

**THÈSE en Cotutelle présentée
Par Rédéo Wilfried MOUSSAVOU MOUNGUENGUI.**

Pour obtenir le grade de
**Docteur de L'Institut Internationale de l'Eau de l'Énergie de
l'Environnement (2iE)**

Discipline: ÉNERGIE

Et

**Docteur du Centre international d'études supérieures en
sciences agronomiques Montpellier**

Discipline: GÉNIE DES PROCÉDÉS

**Synthèse enzymatique d'esters éthyliques
d'huiles végétales pour la production de biodiesel
à l'aide de lipases végétales issues de la biomasse
africaine**

Soutenue le 04 Avril 2014 devant le jury composé de

Mme Yvonne BONZY, Professeur, Université de Ouagadougou
M. Mohamed SOUMANOU, Professeur, Université d'Abomey calavy
M. Michel LINDER, Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy
Mme France THEVEINEAU, Direction Innovation, SOFIPROTEOL, Paris
M. Pierre VILLENEUVE, Directeur de recherche, CIRAD, Montpellier
M. Joël BLIN, Chargé de recherche, CIRAD/2iE,

Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse
Co-Directeur de Thèse

A mes parents...

Remerciements

Ce travail a été réalisé entre le Laboratoire Biomasse Énergie et Biocarburant (LBEB) de l'Institut Internationale de l'Ingénierie de l'eau et de l'environnement (2iE) dirigé par le Docteur Joël BLIN, et le laboratoire Lipochimie de l'UMR IATE dirigé par le Docteur Pierre VILLENEUVE. Je vous adresse donc mes sincères remerciements pour m'avoir permis d'effectuer ce travail au sein de vos laboratoires.

Je remercie le Cirad, la fondation 2iE et AGROPOLE pour leur soutien financier dans le cadre de ces travaux.

Je remercie la fondation DREYER et l'ONG Tiipalga (New Tree) pour avoir fournis des graines de jatropha, d'anacarde et de moringa qui ont servies à la préparation d'extraits végétaux enzymatiques.

Au Docteur Joël BLIN et au Docteur Pierre VILLENEUVE, en tant que co-directeurs de cette thèse, je vous adresse ma profonde gratitude et mon respect, cela n'a pas été facile pour vous et malgré des emplois du temps chargés, vous m'avez témoigné votre soutient même pendant les périodes les plus dures.

Je tiens à remercier:

Mme Yvonne BONZI-COULBALY Professeur à l'Université de Ouagadougou et Mme France THEVENIEAU, Direction Innovation SOFIPROTEOL pour avoir acceptés de prendre part à ce Jury

Monsieur Mohamed SOUMANOU, Professeur à l'université d'Abomey-Calavy et Monsieur Michel LINDER, Professeur ENSAIA-INPL de Nancy pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Monsieur Georges PIOMBO et Madame Nathalie BAROUH pour leur disponibilité durant mes séjours à l'UMR IATE et je tiens à remercier plus particulièrement « Bruno » pour ton soutient à toutes épreuves et ta disponibilité de jour comme de nuit, pour tes conseils et surtout pour ton amitié.

Mlle Christel BRUNSCHWIG, qui a grandement contribué à la réalisation de ce travail, rien de ceci n'aurait été possible sans ton encadrement.

Parce que l'ambiance du laboratoire «Biomasse» Énergie et Biocarburant de Ouagadougou a fortement participé à la qualité de vie que j'ai eu pendant ces quatre années de thèse, je tiens à remercier Odilon CHANGOTADÉ, Igor OUEDRAOGO, Marie SAWADOGO, Sayon SIDIBE, François-Xavier COLLARD, Mbaye GUEYE, Nathalie WEISMAN, Eric NOUMI, Charlie GATETE NDJERMA, Salif DERRA, Michael MELZER, Madieumbe GAYE, Sarah AUDOUIN, Arnaud CHAPUIS, Yohan RICHARDSON, sylvie MOURAS et François PINTA ainsi que l'ensemble des membres permanents et stagiaires du LBEB et du LESEE.

Et aussi parce qu'il y a une vie en dehors de la thèse, je tenais à remercier mes amis Parfait, Claude, Eszter, Andréa, Korbi, sans oublier Elsa (dit chouchou) qui n'ont jamais cessé de m'encourager et de croire en moi.

Et enfin, un grand merci à mes parents, mes frères et sœurs pour leur amour et leur soutien.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Les biocarburants	2
Utilisation du biodiesel dans le secteur du transport	3
Production du biodiesel à l'échelle industrielle	4
Objectif de l'étude	6
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
1. LE BIODIESEL.....	9
1.1 Utilisation du biodiesel dans les moteurs	9
1.1.1 Utilisation directe de l'huile végétale.....	9
1.1.2 Adaptation du moteur pour l'utilisation de l'huile végétale.....	11
1.1.3 Procédés de transformation des huiles végétales	11
1.2 Propriétés carburant des Esters Alkyliques d'Huile Végétale	14
1.3 Émissions gazeuses de la combustion des Esters Alkyliques d'Huile Végétale dans le moteur	17
1.4 Autres applications des Esters Alkyliques d'Huile Végétale.....	18
2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLISQUES D'HUILES VEGETALES	18
2.1 Matières premières	19
2.1.1 Sources potentielles de TAG et acides gras.....	19
2.1.2 Sources potentielles alcools: choix du bioéthanol	20
2.2 Procédés catalytiques de production de biodiesel	21
2.2.1 Catalyse chimique: Cas des catalyses homogène et hétérogène.....	21
2.2.2 Catalyse enzymatique: les lipases	25
3. APPLICATIONS ACTUELLES DES LIPASES VEGETALES.....	30
3.1 Lipases végétales en biosynthèse.....	30
3.1.1 Réactions biocatalysées par les lipases végétales.....	31
3.1.2 Mécanisme catalytique de la catalyse enzymatique.....	32
3.2 Valorisation des lipases végétales.....	35
3.2.1 Production d'AGL ou d'esters synthétiques.....	35
3.2.2 Biotransformation des huiles et des graisses.....	36
3.2.3 Production du biodiesel: État des connaissances	37
4. MISE EN OEUVRE DES LIPASES VEGETALES	38
4.1 Étapes de préparation d'extraits végétaux bruts.....	38
4.1.1 Broyage de la biomasse.....	38

4.1.2	Séchage de la biomasse.....	38
4.1.3	Délipidation du broyat.....	39
4.2	Méthodes de purification des lipases végétales	40
4.2.1	Purification par précipitation	41
4.2.2	Purification par chromatographie	42
4.2.3	Purification par filtration	44
5.	FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES	44
5.1	Effets de la température sur l'activité catalytique des lipases végétales	45
5.2	Effets de l'eau sur l'activité catalytique des lipases végétales.....	46
5.2.1	Effets de la teneur en eau dans le milieu réactionnel.....	47
5.2.2	Effets de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w)	47
5.3	Effets du pH du microenvironnement sur l'activité catalytique des lipases végétales.....	48
5.4	Effets de l'alcool sur l'activité catalytique des lipases végétales	49
5.4.1	Type d'alcool	49
5.4.2	Influence du ratio molaire alcool/TAG	50
5.5	Effets de la nature et de la qualité du substrat lipidique sur l'activité catalytique des lipases végétales.....	51
5.6	Effets du solvant sur l'activité catalytique des lipases végétales.....	52
6.	SYNTHESE DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	53
	MATERIEL ET METHODES	57
1.	MATERIEL	57
1.1	Biomasses végétales étudiées.....	57
1.1.1	Le karité (<i>Vitellaria paradoxa</i>).....	57
1.1.2	L'anacarde (<i>Anacardium occidentale</i>).....	58
1.1.3	Le balanitès (<i>Balanites aegyptiaca</i>).....	59
1.1.4	L'arachide (<i>Arachis hypogaea</i>)	59
1.1.5	Le moringa (<i>Moringa oleifera</i>)	60
1.1.6	Le jatropha (<i>Jatropha curcas</i>).....	61
1.1.7	Le Neem ou margousier (<i>Azadirachta indica</i>)	61
1.1.8	La mangue ou (<i>Mangifera indica</i>)	62
1.2	Produits chimiques et substrats lipidiques.....	63
2.	METHODES	64
2.1	Préparation des extraits végétaux.....	64
2.2	Caractérisation chimique de la matière grasse	64
2.2.1	Mesure de l'acidité de l'huile	64

2.2.2	Mesure des indices d'iode et de peroxyde de l'huile.....	65
2.2.3	Mesure de la composition en acides gras des lipides par dérivation en esters méthyliques.....	67
2.2.4	Mesure de la teneur en eau par Karl Fischer	68
2.3	Test d'activité lipasique des extraits végétaux de la biomasse locale	68
2.3.1	Hydrolyse d'huile de tournesol à l'aide des extraits végétaux.....	69
2.3.2	Transestérification de l'huile de tournesol avec l'éthanol à l'aide des extraits végétaux.	70
2.3.3	Estérification de l'acide oléique à l'aide des extraits végétaux.....	70
2.4	Mesure de l'activité lipasique des extraits végétaux par analyse CCM (HPTLC) couplée à la densitométrie	71
2.4.1	Principe de la méthode CCM/densitométrie	71
2.4.2	Préparation des standards AGL et EEHV	74
2.4.3	Mode opératoire de l'analyse CCM/densitométrie	75
2.5	Détermination du pH et de la température optimale en hydrolyse	76
2.6	Détermination des conditions optimales en transestérification par la méthodologie des plan d'expériences	76
2.6.1	Essais préliminaire de transestérification	77
2.6.2	Réalisation du plan d'expérience	78
2.7	Détermination de l'effet du glycérol sur l'activité catalytique d'extraits végétaux de jatropha et de moringa en transestérification.....	80
2.8	Transestérification en présence de support solides pour le piégeage du glycérol.....	80
2.9	Transestérification de l'huile de tournesol en deux étapes.....	81
2.10	Détermination de la composition du milieu réactionnel par analyse CPG	82
	RESULTATS ET DISCUSSION	85
1.	EVALUATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX DE LA BIOMASSE BURKINABÈ	85
1.1	Caractéristiques de l'huile de tournesol utilisée.....	86
1.2	Mise en évidence de l'activité hydrolytique des extraits végétaux de biomasses	88
1.2.1	Suivi cinétique de l'hydrolyse d'huile de tournesol par les extraits végétaux	90
1.2.2	Activités hydrolytiques comparées des différents extraits végétaux	92
1.3	Déterminations des conditions optimale en hydrolyse des extraits végétaux les plus actifs.....	93
1.3.1	Étude de l'influence du pH du milieu sur l'activité hydrolytique des extraits lipasiques	

1.3.2	Étude de l'influence de la Température sur l'activité hydrolytique des extraits lipasiques.....	96
1.4	Mise en évidence de l'activité biocatalytique en transestérification des extraits végétaux	98
1.4.1	Calcul de l'activité biocatalytique des extraits végétaux actifs au cours de la transestérification éthanolique d'huile de tournesol	101
1.4.2	Activités en transestérification comparées des différents extraits végétaux.....	102
1.5	Corrélations entre l'activité hydrolytique et l'activité en transestérification des extraits végétaux	104
1.6	Bilan de l'évaluation de l'activité enzymatique des extraits végétaux testés.....	106
2.	ETUDE DE CERTAINS FACTEURS INFLUENTS SUR LA REACTION DE TRANSESTÉRIFICATION ÉTHANOLIQUE D'HUILE VÉGÉTALE À L'AIDE DES EXTRAITS DE JATROPHA ET DE MORINGA	109
2.1	Méthodologie de plan d'expérience appliquée à la transestérification éthanolique d'huile végétale à l'aide d'extraits végétaux.....	109
2.1.1	Choix des facteurs à étudier au cours de la réaction de transestérification.....	109
2.1.2	Sélection des différents niveaux des facteurs sélectionné pour la réaction de transestérification	111
2.1.3	Définition du domaine expérimental du plan d'expérience	117
2.2	Analyse statistique des résultats du plan d'expérience	120
2.2.1	Validité du modèle mathématique	122
2.2.2	Analyse des résultats de l'ANOVA.....	123
2.3	Courbes isoréponses de l'analyse statistique des facteurs influençant la transestérification à l'aide des extraits de Jatropha et Moringa.....	125
2.3.1	Courbes isoréponses des facteurs influençant la transestérification à l'aide des extraits de graines germées de Jatropha	125
2.3.2	Courbes isoréponses des facteurs influençant la transestérification à l'aide des extraits graines germées de Moringa.....	127
2.4	Conclusion du plan d'expérience	129
2.5	Influence d'autres facteurs sur l'activité catalytique des extraits végétaux au cours de la transestérification éthanolique d'huile végétale.	130
2.5.1	Influence du glycérol sur le rendement de transestérification éthanolique d'huile végétale catalysée par les extraits végétaux de jatropha et de moringa.....	131
2.5.2	Influence de la teneur en acides gras libres sur l'activité catalytique des extraits végétaux	133
2.5.3	Stabilité thermique des extraits végétaux de graines de Jatropha et de Moringa	135
2.6	Récapitulatif des conditions optimales de transestérification d'huile végétale à l'aide d'extraits végétaux	136

3. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ESTERS ETHYLIQUES D'HUILE VEGETALE A L'AIDE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX DE JATROPHA ET DE MORINGA	139
3.1 Piégeage du glycérol au cours de la production d'esters éthyliques d'huile végétale sur un support solide.....	140
3.1.1 Utilisation de supports solides issus de la biomasse pour le piégeage du glycérol	140
3.1.2 Influence de la charge en gel de silice sur le rendement de transestérification éthanolique de l'huile végétale	145
3.2 Transestérification complète de l'huile végétale avec l'éthanol à l'aide des extraits végétaux de Jatropha et de Moringa	147
3.2.1 Mise en œuvre de deux réactions successives pour la transestérification complète d'huile végétale avec l'éthanol à l'aide d'extraits végétaux	147
3.2.2 Suivi cinétique de la transestérification à l'aide des extraits de JG	152
3.3 Analyse du biodiesel obtenu par transestérification à l'aide d'extraits végétaux	153
CONCLUSION GENERALE	156
PERSPECTIVES.....	159
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	163

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique d'un triglycéride (TAG) d'huile végétale.....	10
Figure 2: Équation bilan de la transestérification catalytique d'un TAG avec un alcool produisant des EAHV ou biodiesel	13
Figure 3: Schéma réactionnel de la transestérification enzymatique d'un TAG avec l'éthanol, avec (encadrée) l'équation bilan de la réaction.	14
Figure 4 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du complexe lipase pancréatique humaine-colipase (Fromer & Merolla, 2013) avec un zoom sur la représentation du site actif.....	26
Figure 5 : Réaction de synthèse pouvant être catalysée par les lipases végétales.....	31
Figure 6 : Mécanisme d'action de la transestérification d'un triglycéride avec un alcool au niveau du site actif de la lipase.	33
Figure 7 : Représentation de Fisher et nomenclature <i>sn</i> d'un TAG	34
Figure 8: Plaque de silice HPTLC numérisée illustrant la séparation de composés contenues dans le mélange analysé après une hydrolyse.	72
Figure 9 : Principe de fonctionnement d'un densitomètre à géométrie 0°/45°	72
Figure 10: Chromatogramme obtenu par balayage densitométrique de la piste P3 de la figure 2.	73
Figure 11 : Section de plaque HTPLC présentant des spots d'AGL de masses croissantes ainsi que la courbe de calibration qui en résulte après analyse densitométrique	74
Figure 12: Cinétique de libération des acides gras par hydrolyse de l'huile de tournesol catalysé par les différents extraits végétaux.	90
Figure 13 : Courbe théorique de cinétique d'une réaction par catalyse enzymatique, (P) la quantité de produit (T) le temps de réaction,.....	92
Figure 14 : Influence du pH sur les réactions d'hydrolyse catalysées par les extraits végétaux de KG (Karité germé) MG (Moringa germé) et JG (Jatropha germé).....	95
Figure 15 : Influence de la température sur les réactions d'hydrolyse catalysées par les extraits végétaux de KG (Karité germé) MG (Moringa germé) et JG (Jatropha germé),.....	96
Figure 16 : Cinétique de formation des EEHV par transestérification éthanolique de l'huile de tournesol catalyser par différents extraits végétaux	101
Figure 17 : Profil d'acides gras d'huiles végétales.....	103
Figure 18: Corrélation entre les activités des lipases en hydrolyse et en transestérification	104
Figure 19: Quantité d'EEHV formée (μ mole) en fonction du ratio molaire TAG:EtOH au bout de 24 H de réaction. A°) avec les extraits de JG et B°) avec les de MG.	111
Figure 20: Rendement en EEHV formés par rapport au ratio molaire TAG:EtOH après 6H et 24H de réaction.	113
Figure 21: Quantité d'EEHV formé (μ mol) en fonction de la teneur en eau dans l'éthanol (v/v) après 6H de réaction.	114
Figure 22: Quantité d'AGL (μ mole) contenue dans le milieu réactionnel en fonction de la teneur en eau dans l'éthanol (% v/v).....	115
Figure 23 : Évolution de la quantité d'EEHV (μ mol) en fonction de la charge en extraits végétaux ..	117
Figure 24 : Courbes isoréponses du rendement en EEHV formé à l'aide d'extraits végétaux de JG en utilisant le plan d'expérience.	126
Figure 25 : Courbes isoréponses du rendement en EEHV formé à l'aide d'extraits végétaux de MG en utilisant le plan d'expérience.	128

Figure 26: Influence du glycérol sur le rendement de transestérification.....	132
Figure 27: Rendement de transestérification en fonction de la teneur en acides gras libres dans l'huile de tournesol.	133
Figure 28: Rendement d'estérification de l'acide oléique (C18:1) avec l'éthanol à l'aide d'extraits de JG et MG pendant 6 H.	135
Figure 29 : influence de la température sur la quantité d'EEHV (μmol) à l'aide des extraits de JG et MG.....	136
Figure 30 : Rendement de transestérification obtenu avec les extraits de JG et MG en fonction du matériau adsorbant testé.....	141
Figure 31: Mécanisme proposé pour les réactions de transestérification enzymatique: (A) absence de matériau adsorbant, (B) en présence de matériau adsorbant (gel de silice).....	144
Figure 32 : Influence de la charge en gel de silice sur le rendement en EEHV obtenu avec les extraits de JG et MG.	146
Figure 33: Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après transestérification éthanolique de l'huile de tournesol catalysée par des extraits de JG et MG.....	148
Figure 34 : Chromatogrammes de la composition de l'huile de tournesol après transestérification éthanolique pendant 144 H à l'aide d'extraits végétaux de JG (courbe en rouge), et d'extraits de MG (courbe en vert). En bleu le chromatogramme de l'huile de tournesol	151
Figure 35 : Courbes d'évolution des EEHV, des TAG et des composés intermédiaires (MAG, DAG) au cours de la transestérification l'huile de tournesol en deux étapes.	152
Figure 36 : Démarche expérimentale à adopter pour l'optimisation des performances de biocatalyseurs préparés à partir de biomasses végétales.....	160

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés carburant des esters d'huiles végétales comparés à celle des huiles végétales et des gazoles	16
Tableau 2 : Réduction des émissions moyennes du biodiesel (méthylliques) par rapport au diesel conventionnel (Kiss <i>et al.</i> , 2006).	17
Tableau 3: Récapitulatif des quelques applications possibles d'esters alkyliques d'huiles végétales..	18
Tableau 4 : Avantages et inconvénients comparés des différents types de catalyseurs utilisés au cours de la transestérification des TAG en biodiesel (Di Serio <i>et al.</i> , 2007; Lam <i>et al.</i> , 2010)	24
Tableau 5: Matrice d'expérience des réactions de transestérification réalisées pour la détermination des conditions optimales.....	79
Tableau 6: tableau récapitulatif des biomasses oléagineuses disponibles localement testées comme source potentielle de lipase.	85
Tableau 7: Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de tournesol raffinée utilisée.....	87
Tableau 8: Résultats de l'évaluation qualitative de l'activité hydrolytique d'extraits végétaux	89
Tableau 9 Activité lipolytiques des extraits végétaux positifs au test d'hydrolyse.....	93
Tableau 10: Résultats de l'évaluation qualitative de l'activité catalytique des extraits végétaux au cours de la transestérification des TAG avec l'éthanol	99
Tableau 11 Récapitulatif des activités catalytiques en transestérification des extraits végétaux positifs au test d'hydrolyse	102
Tableau 12: Récapitulatif des principaux résultats obtenus à l'issus du processus de sélection des extraits végétaux lipasiques en fonction de leurs activité hydrolytique et de leur activité en éthanololyse	106
Tableau 13: Domaine expérimental et niveau de distribution des variables utilisées lors de la transestérification éthanolique de l'huile de tournesol.....	118
Tableau 14 : Matrice d'expérience avec les rendements de transestérification équivalents	119
Tableau 15: ANOVA de la réponse expérimentale étudiée Yobs1 =rendements en EEHV obtenus avec JG. Avec SC : somme des carrés; DDL : degrés de libertés ; MC : moyenne des carrés ; F : F de Fisher calculé, p: erreur alpha.....	121
Tableau 16: ANOVA de la réponse expérimentale étudiée Yobs2 (=rendements en EEHV obtenus avec MG). Avec SC : somme des carrés; DDL : degrés de libertés ; MC : moyenne des carrés ; F : F de Fisher calculé, p: erreur alpha.....	121
Tableau 17: Récapitulatif des coefficients du modèle du premier ordre pour les réponses: (Yobs1) rendement en EEHV obtenu avec les extraits JG et (Yobs2) rendement en EEHV obtenu avec les extraits MG	122
Tableau 18 : Tableau récapitulatif des paramètres optimums de transestérification éthanolique d'huile végétale à l'aide des extraits végétaux de JG et de MG.....	137
Tableau 19 : Surface spécifique et volume des pores des matériaux adsorbants testés	142
Tableau 20: Quelques propriétés du biodiesel obtenu par transestérification éthanolique de l'huile de tournesol catalysée par les extraits de JG	154

Liste des abréviations

2iE : Institut Internationale d'ingénierie de l'Eau et de l'Environnement

Cirad : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

ASTM : American Society Of Testing Material

ANP : Association Brésilienne Des Normes Techniques

IAE : International Energy Agency (Agence Internationale de l'Énergie)

TAG : Triacylglycérol

DAG : Diacylglycérol

MAG : Monoacylglycérol

AGL : Acides Gras Libre

JG : Graines germées de Jatropha curcas

MG : Graines germées de moringa oleofera

DDO : Distillate Diesel Oil

E10 : Mélange Essence-ethanol (90 :10)

E85 : Mélange Essence-éthanol (15 :85)

EAHV : Esters Alkyliques d'Huile Végétale

EEHV : Esters Éthyliques d'Huile Végétale

EMHV: Esters Éthyliques d'Huile Végétale

GLA : Acide Gamma Linoléique

PCS : Pouvoir Calorifique Supérieur

PCI : Pouvoir Calorifique Inférieur

Rf : Rapport Frontal

CCM : Chromatographie Sur Couche Mince

HPTLC : Chromatographie haute performance sur couche mince

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

RM : Ratio Molaire

Sn : Stereo Number

NOx : Oxydes D'azote

SOx : Oxydes de soufre

HC: Hydrocarbures imbrulés

HAP: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

EtOH : Éthanol

MeOH : Méthanol

a_w : Activité thermodynamique de l'eau

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIF DE L'ETUDE

INTRODUCTION GENERALE

L'accès à l'énergie est gage de conditions de vie décentes des populations et un puissant levier de développement pour l'économie et les industries locales. Les combustibles fossiles dont le pétrole, le gaz et leurs dérivés représentent plus de la moitié de l'énergie primaire consommée dans le monde. Selon l'IAE (International Energy Agency, 2012) 68,3% de ces combustibles fossile est consommé par le secteur du transport. Les combustibles fossiles ont permis le développement de la majeure partie des activités industrielles ainsi que l'utilisation de moyens de transport rapides et efficaces. Mais avec l'épuisement des réserves fossiles et les prix qui ne cessent d'augmenter, le monde évolue irréversiblement vers la fin du pétrole bon marché; il est donc nécessaire de trouver des substituts aux combustibles fossiles. De plus aujourd'hui il est unanimement reconnu que l'utilisation des combustibles fossiles et ses dérivés est la principale source d'émissions de gaz à effet des serres anthropiques et de certains polluants atmosphériques (Escobar *et al.*, 2009)

Les pays en développement qui ne disposent pas pour la plus part de ressources énergétiques fossiles sont plus vulnérables dans ce contexte de crise énergétique comparés aux pays riches ou producteurs de pétrole. Conscients qu'assurer leur approvisionnement énergétique à un coût abordable deviendra un sérieux défi dans les années à venir, associée à la prise en considération des préoccupations environnementales; les pays d'Afrique de l'Ouest tel que le Burkina Faso ou le Mali s'intéressent de plus en plus aux biocarburants comme une source renouvelable d'énergie. Ces biocarburants sont, susceptibles de remplacer les dérivés du pétrole (Jumbe *et al.*, 2009; Nonyarma & Laude, 2010; Amigun *et al.*, 2011) dans le secteur des transports, mais aussi pour des applications stationnaires dans les domaines de l'agriculture, la production d'énergie et dans l'industrie. L'utilisation de biocarburants permettrait à ces pays de limiter leur dépendance vis à vis des importations et d'avoir accès à une source d'énergie locale et à moindre coup.

D'autre part la production biocarburants (ou agrocarburants) par des petites unités à l'échelle locale permettent l'accès à l'énergie des zones où l'électricité ou le pétrole sont difficilement accessibles (Von Malititz & Brent, 2008). La contribution des biocarburants en remplacement ou en complément des carburants fossiles tels que le gazole, le fioul oil, le

DDO (Distillate Diesel Oil), l'essence etc., offre une perspective d'approvisionnement en énergie autonome au niveau local et permet de réduire la facture croissante des importations pétrolières qui pèsent lourd sur les finances publiques (Kojima *et al.*, 2010; Amigun *et al.*, 2011). Les biocarburants apparaissent aujourd'hui comme l'une des clefs du développement futur de l'économie africaine

Les biocarburants

Les biocarburants peuvent être utilisés comme combustible pour alimenter les moteurs à combustion interne pour la production d'énergie renouvelable plus respectueuse de l'environnement que les produits dérivés du pétrole. Une large variété de biocarburants peut être obtenue, à partir de la conversion totale ou partielle de la **biomasse** en vecteur énergétiques liquides (éthanol, méthanol, biodiesel, diesel Fischer-Tropsch ...) ou en vecteur énergétique gazeux (hydrogène, méthane...) (Demirbas, 2008). Le terme biomasse renvoi ici à la matière organique d'origine végétale.

Actuellement les biocarburants liquides dits de 1^{ère} génération, produits en quantité considérables et disponibles sur le marché sont:

- (i) le **biodiesel** obtenu par transestérification d'huiles végétales issues de graines oléagineuses ou de graisses animales avec un alcool et ensuite incorporé au gazole pour les moteurs diesel
- (ii) et l'éthanol obtenu après fermentation du sucre ou d'amidon provenant des plantes amylacées comme le maïs, le blé ou des plantes sucrières comme la betterave, la canne à sucre, qui lui est incorporé à l'essence. On parle alors de **bioéthanol**

Toutefois, des travaux de recherches tentent d'amorcer la transition énergétique de l'après pétrole vers des procédés dits de 2nd génération (Van Der Laak *et al.*, 2007; Escobar *et al.*, 2009; Nigam & Singh, 2011) qui visent à réduire les risques d'interférences entre la production de biocarburant et les filières agricoles à vocation alimentaire. Ces procédés de 2nd génération devront permettre d'obtenir des biocarburants à partir de ressources non alimentaires tels que le bois, ou les résidus agricoles avec des rendements plus importants

puisqu'ils permettent de valoriser toute la plante en carburant et pas seulement une partie de la plante (ce qui est le cas des biocarburants 1^{ère} génération) (Bioenergy, 2008; Naik *et al.*, 2010; Nigam & Singh, 2011). Mais en attendant l'émergence de ces nouvelles technologies, le marché des biocarburants de 1^{ère} génération devrait continuer à se développer surtout si toutes compétitions avec l'usage alimentaire des terres cultivables sont évitées.

Utilisation du biodiesel dans le secteur du transport

Les propriétés physicochimiques du biodiesel sont similaires à celle du gazole et permettent son utilisation directe ou en complément dans n'importe quelles proportions au gazole de 0 à 100%, sans modifications majeures des moteurs existants ou de leurs composantes (Demirbas, 2007). En plus de son excellent pouvoir lubrifiant utile pour le bon fonctionnement du moteur, le biodiesel peut être distribué à partir des systèmes de stockage et de vente en détail du diesel fossile existant. Compte tenu de l'urgence et des technologies disponibles aujourd'hui, l'utilisation du biodiesel comme carburant alternatif pour les moteurs diesel du transport est la solution la plus prometteuse à court et moyen terme pour la transition énergétique de l'après pétrole du secteur du transport contrairement à l'utilisation du bioéthanol qui reste confrontée à quelques difficultés.

Le bioéthanol est l'autre biocarburant le plus répandu sur le marché pour les moteurs des véhicules essences existants. Cependant ces moteurs ne sont compatibles qu'avec des mélanges allant jusqu'à 10% de bioéthanol dans l'essence (E10) (Hansen *et al.*, 2005; Von Malitz & Brent, 2008). Au-delà, il faut utiliser la technologie «Flex-fuel cars», qui permet de faire fonctionner les moteurs essences avec des mélanges allant jusqu'à 85% de bioéthanol (E85) au moyen d'un dispositif d'injections, de capteurs électroniques spécifiques et d'une informatique supplémentaire permettant la détection du mélange bioéthanol-essence et l'ajustement automatiquement du fonctionnement du moteur (Escobar *et al.*, 2009). De plus, le bioéthanol est potentiellement corrosif pour les pièces métalliques et non métalliques (élastomères) des moteurs existants en particulier les pièces du système d'injection du carburant (Wyman & Hinman, 1990; Yüksel & Yüksel, 2004; Hansen *et al.*, 2005). Il résulte de ces observations que l'utilisation directe du bioéthanol contrairement au biodiesel ne peut être pas facilement adoptée sans induire des adaptations complexes et coûteuses des moteurs de véhicules déjà existants.

Production du biodiesel à l'échelle industrielle

La possibilité d'utiliser directement le biodiesel dans les moteurs diesels suscite donc un intérêt grandissant pour la production de ce biocarburant. Les procédés de synthèse du biodiesel par transestérification de l'huile végétale avec un alcool qui se développent aujourd'hui à l'échelle industrielle utilisent principalement des voies catalytiques chimiques acides ou basiques en phases homogènes ou hétérogènes (Dalai *et al.*, 2012). Ces voies catalytiques certes très performantes imposent d'utiliser des réactifs de grande pureté, c'est-à-dire un alcool anhydre et une huile dépourvue d'acides gras libres (AGL) (Vasudevan & Briggs, 2008; Lam *et al.*, 2010). De plus, ces voies catalytiques nécessitent des étapes de purifications des produits et dans certains cas de travailler dans des conditions énergivores (hautes températures et pressions élevées) exigeants des installations appropriées (Demirbas, 2003; Borugadda & Goud, 2012).

L'alcool le plus utilisé dans la production de biodiesel est le méthanol. Cet alcool est un réactif peu cher qui est issu de la filière pétrochimique. Pour obtenir du biodiesel à 100% issu de la biomasse et pour les pays qui ne disposent pas de méthanol, l'idéal est de produire du biodiesel à partir du bioéthanol. Le bioéthanol peut être obtenu par fermentation de biomasse riche en sucre ou en amidon. Le Burkina Faso et le Mali sont des pays producteurs de sucre qui disposent d'un fort potentiel en bioéthanol, par simple fermentation alcoolique de la mélasse de canne à sucre qui n'est aujourd'hui que partiellement valorisée. Cependant la réaction de transestérification avec l'éthanol est plus compliquée qu'avec le méthanol. Les rendements de conversions sont moins élevés et varient en fonction de la qualité de l'huile végétale, de la teneur en eau de l'éthanol et du choix des catalyseurs.

De nombreux travaux de recherches ont montré que la catalyse enzymatique utilisant les lipases ou triacylglycerol hydrolases (E.C.3.1.1.3) comme biocatalyseurs représente une alternative intéressante aux catalyseurs chimiques pour la production de biodiesel éthylique (Selmi & Thomas, 1998; Watanabe *et al.*, 1999; Yesiloglu, 2004; Rodrigues *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2010; Verdugo *et al.*, 2010; Stamenkovic *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Les lipases offrent l'avantage de permettre l'obtention de biodiesel à partir d'huile végétale et d'éthanol suivant un procédé respectueux de l'environnement et faible consommateur d'énergie. Elles permettent la production de biodiesel dans des conditions douces de

température et de pression avec plus de spécificité que les catalyseurs chimiques. La catalyse lipasique permet ainsi de s'affranchir de possibles réactions secondaires de saponification courantes en catalyse chimique basique et de s'affranchir d'étapes supplémentaires de purification des réactifs en amont du procédé et des produits en aval (Fukuda *et al.*, 2001) car les lipases possèdent une meilleure tolérance vis-à-vis de l'eau (Kaieda *et al.*, 1999; Al-Zuhair *et al.*, 2006) comparée aux catalyseurs chimiques et elles sont capables de catalyser simultanément l'estérification des AGL et la transestérification des TAG (Al-Zuhair *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2010). L'utilisation de lipases rend possible l'emploi de réactifs de moindres qualités tels que les huiles végétales partiellement hydrolysées et le bioéthanol bon marché mais souvent hydraté (~5%v/v) (Brunschwig *et al.*, 2011).

À l'échelle industrielle, certains verrous limitent la productivité et la viabilité économique de ce procédé enzymatique à savoir:

- (i) la faible stabilité des lipases en présence d'un excès d'alcool,
- (ii) la vitesse de réaction lente,
- (iii) et surtout le coût de production relativement élevé des lipases commerciales, principalement d'origine microbienne, qui impacte directement sur le coût global de production de biodiesel par catalyse lipasique.

Si plusieurs stratégies tels que les ajouts dosés d'alcool par intervalles de temps régulier et l'immobilisation sur un support inerte ont été proposées pour remédier aux problèmes de stabilité des lipases vis-à-vis des alcools au cours de la production de biodiesel (Watanabe *et al.*, 1999; Iso *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2002; Nouredini *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010), très peu d'études portent sur le développement et la mise en œuvre de biocatalyseur enzymatique peu chers, facile à mettre en œuvre pour la production de biodiesel.

Selon les travaux de Mukherjee (Mukherjee & M.J. Hills, 1994), de Villeneuve (Villeneuve, 2003) et plus récemment de Barros (Barros *et al.*, 2010), les plantes ou la biomasse végétale représentent une source de lipases très abondantes et facilement exploitables. Dans leurs travaux ces chercheurs ont montré que les lipases végétales peuvent être utilisées comme biocatalyseurs pour diverses réactions de synthèse dont l'estérification des AGL et la transestérification des TAG. À partir de leurs analyses, l'utilisation de lipases végétales

comme biocatalyseurs dans la production de biodiesel est envisageable. Les lipases végétales sont faciles à mettre en œuvre ceci après une purification sommaire ou partielle de la partie de la plante qui la renferme (Huang, 1985; Mukherjee & M.J. Hills, 1994; Villeneuve, 2003; Paques & Macedo, 2006). L'exploitation de ces dernières nécessite de faibles coûts d'investissement comparé aux lipases microbiennes qui font appel à des techniques de modification, de surexpression génétique ou de purification complexes et coûteuses qui ne sont pas encore maîtrisées dans toutes les parties du globe. Les lipases végétales sont donc potentiellement plus faciles à mettre en œuvre notamment dans les pays en développement où la biomasse est particulièrement riche et abondante.

Objectif de l'étude

Dans ce contexte de raréfaction de combustible fossile associé à la nécessité de développer des technologies facile à vulgariser pour la production locale de source d'énergie renouvelable, l'enjeu autour de ce travail est l'identification d'une ou plusieurs biomasses végétales locales sources de lipases et leur mise en œuvre comme biocatalyseurs pour la production de biodiesel éthylique. Le but étant de pouvoir développer par la suite un procédé de production de biodiesel simple et bon marché à l'aide de ressources renouvelables et disponibles localement (huile végétale, bioéthanol et lipases végétales). Nous nous sommes donc fixés pour objectif de synthétiser des esters éthyliques d'huiles végétales à l'aide de lipases végétales issues de biomasses locales. Pour atteindre cet objectif nous avons développé deux principales questions de recherches:

- 1- *Quelles biomasses locales sont de potentielles sources de lipases?*
- 2- *L'activité catalytique des lipases contenues dans les extraits végétaux issus des biomasses identifiées est-elle suffisante pour permettre la transestérification complète d'huiles végétales en esters éthyliques à l'échelle du laboratoire?*

Pour répondre à ces questions, nous avons travaillé de façon spécifique sur :

- 1- *l'identification de l'activité lipasique en hydrolyse puis en transestérification d extraits issues de biomasses locales*

- 2- *l'étude de l'influence de certains facteurs sur les cinétiques et rendements de réactions (teneur en eau contenue dans l'éthanol, teneur en acides gras libres, ratio molaire huile végétale-éthanol, charge en catalyseur...)*
- 3- *et enfin la détermination des conditions optimales de réaction pour une conversion totale des TAG d'huile végétale en esters.*

Le présent manuscrit est donc articulé autour de trois grandes parties:

1. Une **Synthèse bibliographique** dans laquelle sont présentés les enjeux de l'utilisation du biodiesel, ses caractéristiques comparées au gazole et les différentes voies catalytiques actuellement utilisées pour le produire, les méthodes utilisées pour la mise en œuvre des lipases végétales pour la synthèse d'esters alkyliques, ainsi que sur l'état des connaissances des facteurs qui influent sur l'activité catalytique des lipases végétales. Cette synthèse bibliographique, se conclut par une analyse des performances en synthèse de quelques lipases végétales décrites dans la littérature.
2. Dans la deuxième partie sont décrits le **Matériel et les Méthodes** qui ont permis de mener à bien les travaux entrepris. Elle présente notamment le mode de préparation des extraits végétaux lipasiques et l'ensemble des techniques expérimentales mises en œuvre pour le suivi des réactions de transestérification et l'optimisation du procédé.
3. Enfin la troisième partie présente **l'ensemble des résultats** des travaux effectués et les interprétations découlant des résultats des expérimentations. Cette partie est structurée en trois chapitres. Le premier chapitre porte sur les résultats de l'évaluation de l'activité enzymatique des extraits végétaux de la biomasse locale (Burkina Fasso). Dans le chapitre 2 sont présentés les résultats de l'étude de certains facteurs influents sur la réaction de transestérification éthanolique d'huile végétale à l'aide des extraits végétaux présentant la plus forte activité catalytique. Enfin, le chapitre 3 porte sur l'optimisation de la production d'esters ethyliques d'huile végétale à l'aide des extraits végétaux à l'échelle du laboratoire.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE BIODIESEL

Le biodiesel est un biocarburant de 1^{ère} génération utilisé dans les moteurs diesel du secteur de l'automobile (moteurs à injection directe) en remplacement direct ou en complément du gazole. Le biodiesel est constitué d'un mélange d'esters alkyliques d'acides gras, communément appelés Esters Alkyliques d'Huiles Végétales (EAHV). Pour être considéré comme «biodiesel», ce mélange doit présenter une pureté minimum et répondre aux spécifications des normes internationales (Graboski & McCormick, 1998) tel que les normes européenne EN14214 (European Committee for Standardization, 2003), la norme américaine ASTM 6751-09 (American Society of Testing Materials Standard D6751-09a 2009) et la norme brésilienne ANP N°7/2008 (Brazilian National Agency of Petroleum Natural Gas and Biofuels, 2008).

1.1 Utilisation du biodiesel dans les moteurs

1.1.1 Utilisation directe de l'huile végétale

Le biodiesel résulte de la modification chimique de l'huile végétale, qui elle-même peut directement être utilisée comme biocarburant dans les moteurs diesel (Shay, 1993). Cependant, la viscosité des huiles végétales est de 10 à 15 fois plus élevée que celle du gazole, ce qui rend difficile leur utilisation directe comme carburant (Srivastava & Prasad, 2000). La viscosité élevée des huiles végétales est responsable de problèmes de fonctionnement du moteur tels que:

- (i) la fatigue mécanique de la pompe à injection qui entraîne une perte de charge dans le circuit d'alimentation du moteur,
- (ii) le fonctionnement moins précis des injecteurs lors de la pulvérisation et de l'atomisation du carburant dans la chambre de combustion,
- (iii) et enfin des problèmes de combustion des huiles végétales, car des gouttelettes grossières résultant du mauvais fonctionnement des injecteurs se forment et ne

brulent pas complètement, ce qui peut conduire de l'encrassement des injecteurs à la rupture du moteur au bout de quelques heures.

La viscosité des huiles végétales est étroitement liée à leur composition chimique. Les huiles végétales sont composées majoritairement de triglycérides (cf. Figure 1 ci-dessous) appelés aussi triacylglydérool (TAG) à 90-98% (Feofilova *et al.*, 2010; Sidibe *et al.*, 2011), dont la masse moléculaire est élevée (600 à 900 g/mol) (Ramadhas *et al.*, 2004). Les TAG, sont des triesters de glycérool, qui sont constitués d'un squelette glycérool sur lequel sont greffés trois acides gras de structure chimique identique ou non. Les acides gras des TAG diffèrent par la longueur de leur chaîne, le degré d'insaturation (présence ou non de doubles liaisons) et par la présence éventuelle d'autres fonctions chimiques (ex: fonction hydroxyle –OH pour l'acide ricinoléique). Les acides gras sont en général constitués d'une chaîne linéaire d'un nombre pair d'atomes de carbone allant de 8 à 22 atomes.

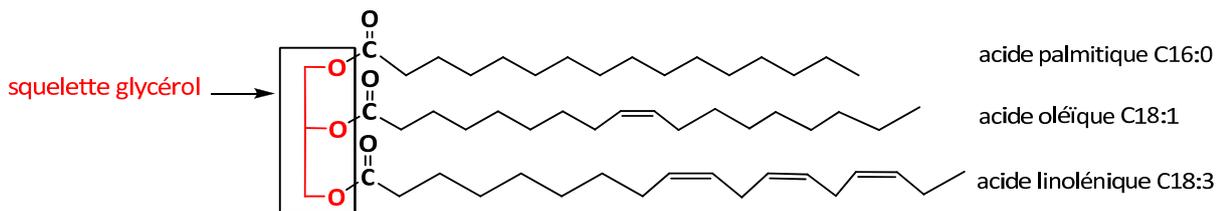


Figure 1 : Structure chimique d'un triglycéride (TAG) d'huile végétale.

Ce TAG est constitué d'un acide gras saturé l'acide palmitique noté C16:0 et de deux acides gras insaturés l'acide oléique et l'acide linoléique, notés respectivement C18:1 et C18:3. Cas de l'acide palmitique: la notation C16:0 signifie 16 atomes de carbones constitutifs de l'acide gras et 0 doubles liaisons

Une autre caractéristique qui limite l'utilisation des huiles végétales dans les moteurs diésels est leur faible volatilité. La faible volatilité des huiles végétales, rend leur combustion plus difficile et est responsable de la formation de dépôts durant le processus de vaporisation et de combustion (Srivastava & Prasad, 2000).

L'indice de cétane de la plupart des huiles végétales est inférieur à celui du diesel. Cet indice caractérise le délai entre l'injection et la combustion dans un moteur diesel. Plus il est élevé, plus le carburant est facilement inflammable (donc le démarrage à froid aisé). Celui des huiles végétales est généralement compris entre 29 et 43 contre 45 à 55 pour le diesel, d'où la difficulté de démarrage à froid du moteur avec les huiles végétales.

1.1.2 Adaptation du moteur pour l'utilisation de l'huile végétale

Le constat fait aujourd'hui est que les huiles végétales sont inadaptées pour la substitution du gazole dans les moteurs du transport à cause de certaines de leurs forte viscosité, leurs faible volatilité et leurs faible indice de cétane (Goering *et al.*, 1982; Ma & Hanna, 1999; Srivastava & Prasad, 2000; Komers *et al.*, 2001). Pour une utilisation optimale, il est nécessaire d'adapter le moteur, ce qui, comme pour le bioéthanol, rend leur utilisation difficilement envisageable à grande échelle surtout sur le parc automobile tel qu'il existe actuellement.

Des solutions existent pour surmonter ces problèmes liés à l'utilisation des huiles végétales, mais celles-ci nécessitent une modification ou une adaptation du moteur. La principale solution qui a été identifiée et retenue est la bicarburation. La bicarburation consiste à démarrer le moteur avec le diesel puis, à l'aide d'un second circuit d'alimentation, d'injecter l'huile seulement quand la charge du moteur est suffisante pour permettre la combustion complète de l'huile (température de la chambre de combustion $\geq 500^{\circ}\text{C}$). Ce procédé est plus facile à appliquer sur les moteurs stationnaires qui, lorsqu'ils sont correctement dimensionnés, peuvent fonctionner à charge élevée et à régime constant. Par contre, il reste difficilement envisageable pour les moteurs du secteur de l'automobile qui sont fréquemment soumis à une variation du régime du moteur due aux nombreuses phases d'accélération et de décélération.

1.1.3 Procédés de transformation des huiles végétales

Des efforts considérables ont été faits pour modifier les propriétés et les performances des huiles végétales pour qu'elles soient proches de celles des hydrocarbures afin de permettre leur utilisation dans les moteurs. Quatre techniques permettent de modifier les huiles végétales, il s'agit de:

- (i) la dilution ou le mélange de l'huile végétale avec un solvant (ex: éthanol) ou le gazole (Ziejewski & Kaufman, 1982),

- (ii) la microémulsion, c'est-à-dire la formation d'une dispersion colloïdale stable thermodynamiquement de l'huile dans un solvant (Schwab *et al.*, 1987; Billaud *et al.*, 1995);
- (iii) la pyrolyse ou la décomposition thermochimique de l'huile végétale en huile de pyrolyse (Katikaneni *et al.*, 1995; Dandik & Aksoy, 1998; Lima *et al.*, 2004)
- (iv) et enfin la transestérification connue également sous le nom d'alcoolyse qui permet la conversion des TAG de l'huile végétale en esters correspondants via un ensemble de mécanismes réactionnels chimiques. Le glycérol contenu dans les TAG est libéré et remplacé par un alcool plus petit tel que le méthanol ou l'éthanol.

La dilution et la microémulsion sont deux méthodes de modification physique qui permettent de diminuer la viscosité de l'huile végétale. Cependant, comme les problèmes d'encrassement et de dépôts de carbone dépendent aussi de la composition chimique de l'huile alors ceux-ci demeurent présents à long terme. La pyrolyse par contre est une méthode de modification chimique de l'huile végétale qui permet l'obtention d'une huile qui a des propriétés proches de celles du diesel fossile (Leung *et al.*, 2010). Mais l'inconvénient majeur de l'huile de pyrolyse est qu'elle est acide (donc corrosives), instables (Demirbas, 2008), et coûteuses à produire à cause de l'énergie consommée au cours du procédé de fabrication.

La transestérification est la méthode de modification parmi toutes les méthodes envisagées pour réduire la viscosité des huiles végétales qui donne les résultats les plus satisfaisants (Gunstone & Hamilton, 2001). La transestérification permet d'obtenir des EAHV, de préférence méthyliques (EMHV: Esters Méthyliques d'Huiles Végétales) ou éthyliques (EEHV: Esters Ethyliques d'Huiles Végétales) en fonction que l'alcool utilisé au cours de sa production soit respectivement du méthanol ou de l'éthanol (Balat & Balat, 2010). Ceux-ci possèdent des propriétés physicochimiques comparables à celles du gazole même si quelques variations mineures sont observées en fonction de la longueur des chaînes acides gras constitutifs des TAG, de leurs degré d'insaturation (De Oliveira *et al.*, 2009) et de la nature de l'alcool utilisé (Lang *et al.*, 2001).

Comme illustré par la Figure 2, cette réaction conduit à la formation de trois molécules d'esters méthyliques (EMHV), ou éthyliques (EEHV) à partir d'une molécule de TAG.

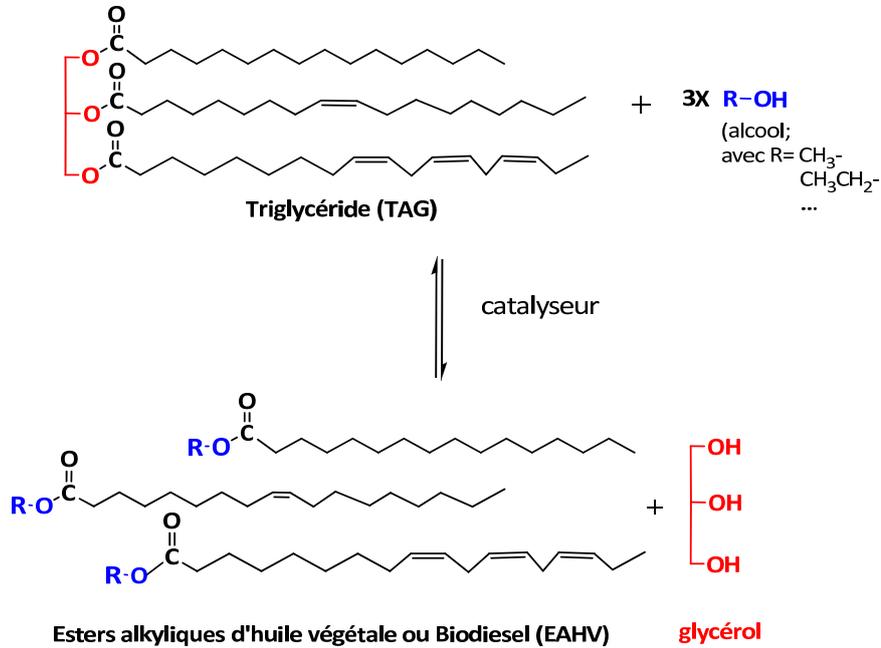


Figure 2: Équation bilan de la transestérification catalytique d'un TAG avec un alcool produisant des EAHV ou biodiesel

La réaction de transestérification est thermodynamiquement favorable, mais lente, et réversible. Pour augmenter sa vitesse et son rendement elle est généralement facilitée en utilisant un catalyseur.

La transestérification est constituée d'une séquence de trois réactions réversibles consécutives. Les TAG sont successivement convertis en composés intermédiaires, c'est-à-dire en DAG puis MAG avant la libération complète du glycérol. À chacune de ces étapes de transformation, une molécule d'EEHV est libérée pour une molécule d'éthanol consommée. Les étapes de transestérification sont décrites sur la Figure 4.

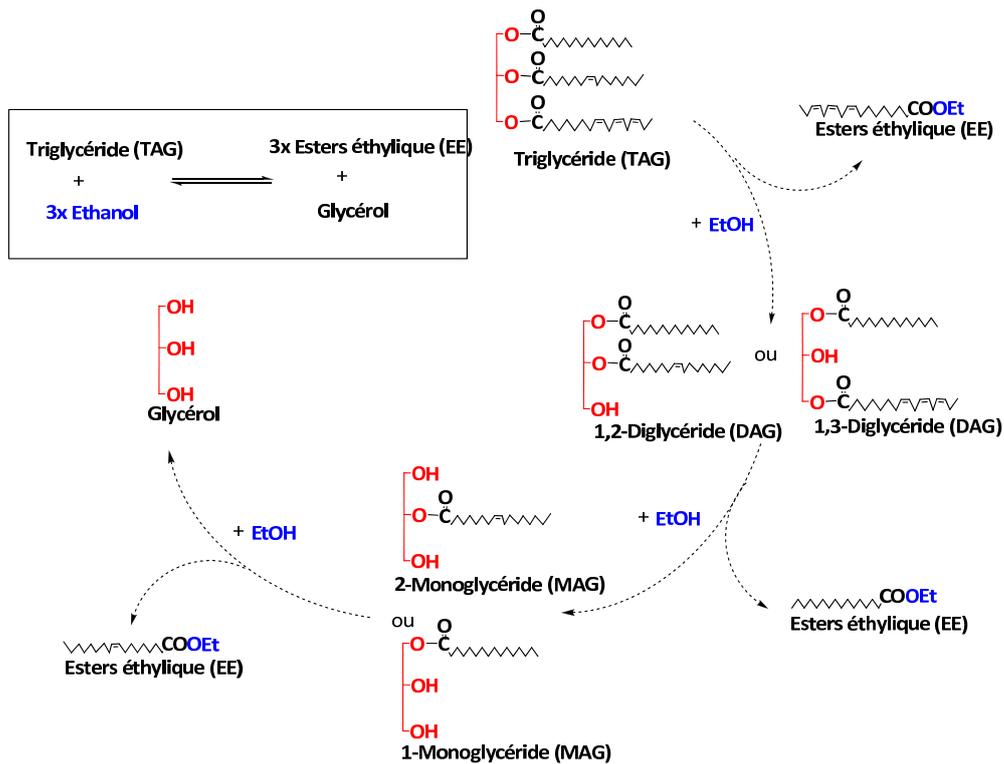


Figure 3: Schéma réactionnel de la transestérification enzymatique d'un TAG avec l'éthanol, avec (encadrée) l'équation bilan de la réaction.

Le mélange obtenu à l'issue de la transestérification des TAG, se répartit après décantation en deux phases non miscibles. La phase supérieure chimiquement composée EAHV et la phase inférieure de glycérol.

1.2 Propriétés carburant des Esters Alkyliques d'Huile Végétale

En général, quelle que soit la source d'huile végétale, les propriétés physico-chimiques des EMHV et des EEHV sont comparables. Les EAHV peuvent être caractérisés comme tout carburant liquide par certaines propriétés physico-chimiques telles que: la viscosité, l'indice de cétane, le pouvoir calorifique, l'indice d'iode, le point de trouble et le point d'écoulement. Toutes ces caractéristiques des EAHV doivent se conformer à la réglementation des normes internationales sur la composition des biodiesels pour leur utilisation comme biocarburant.

Dans le Tableau 1 ci-dessous, sont regroupées certaines propriétés physico-chimiques des EMHV et EEHV comparées à celles des huiles végétales et du diesel fossile. On peut observer que les EMHV et les EEHV ont des caractéristiques proches entre elles et à celles des diesel (Leung *et al.*, 2010). La transestérification de l'huile végétale a pour conséquence directe:

- (i) la diminution de la viscosité,
- (ii) la réduction de la densité,
- (iii) l'accroissement de la volatilité,
- (iv) l'augmentation de l'indice de cétane.

Il est donc plus judicieux et avantageux de modifier chimiquement les huiles végétales pour obtenir un carburant pouvant être utilisé en l'état dans tout type de moteurs diesel.

Tableau 1: Propriétés carburant des esters d'huiles végétales comparés à celle des huiles végétales et des gazoles

Caractéristiques	unité	HV	EMHV	EEHV	Diesels fossiles	Spécifications du Biodiesel (EMHV et EEHV), normes		
						Brésilienne (ABNT)	Américaine (ASTM)	Européenne (EN)
Composition chimique	-	TAG (C12-C22)	EMHV (C12-C22)	EEHV (C12-C22)	HC (C10-C21)	-	-	-
Viscosité cinématique (à 40°C)	mm ² /s	30-106	1.9-6.0	2.6-6.2	1,9-4,1	3,0-6,0	1,9-6,0	3,5-5,0
Densité (à 15°C)	kg/m ³	915-940	860-894	810-919	750-850	850-900	-	860-900
PCS (Pouvoir Calorifique Supérieur)	MJ/kg	37,5-40,6	39-41	38,2-41,7	43,0-46,5	ns	ns	ns
PCI (Pouvoir Calorifique Inférieur)	MJ/kg	35-39,5	37,4-39,5	37,3-40,6	36,6-43,8	ns	ns	ns
Indice de cétane	-	35-45	48-65	48-59	40-55	-	min. 47	min. 51
Point éclair	°C	240-330	100-170	112-196	60-80	min. 100	min. 130	min. 120
Point trouble	°C	-	- 3 à 12	-3 à 23	-15 à 5	max. 19	-	Spécification nationale
Point d'écoulement	°C	-1 à 31	-15 à 10	-15 à 12	-35 à -15	ns	ns	ns

ns: non spécifié; HV: huiles végétales; TAG: triglycérides; EMHV: Esters méthyliques d'huiles végétales; EEHV: esters éthyliques d'huiles végétales; HC: hydrocarbures, EAV: Esters Alkyliques d'Huiles Végétales

1.3 Émissions gazeuses de la combustion des Esters Alkyliques d’Huile Végétale dans le moteur

Les EAHV représentent une solution immédiatement exploitable pour lutter contre la pollution par les transports. Ils sont facilement biodégradable, ne contiennent pas de soufre, ils sont non toxique (Demirbas, 2007) et améliorent la combustion du carburant grâce à sa teneur en oxygène. L’utilisation des EAHV ou biodiesel en substitution ou incorporé de manière optimale au gazole permet la réduction des émissions d’hydrocarbures imbrûlés (HC), de dioxyde de carbone (CO₂), de monoxyde de carbone (CO), d’oxydes de soufre (SO_x), d’hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), d’HAP nitrés (Demirbas, 2007; Brunschwig *et al.*, 2011), à l’exception des NO_x, qui augmentent avec l’augmentation de la concentration de biodiesel (cf. Tableau 2). Avec le biodiesel, les émissions polluantes liées au secteur du transport sont en moyenne inférieures à celles du diesel classique. Le biodiesel est un atout contre les gaz à effet de serre car le CO₂ libéré par sa combustion est considéré comme étant principalement d’origine végétale, il provient du CO₂ de l’atmosphère fixé par la plante au cours de sa croissance.

Tableau 2 : Réduction des émissions moyennes du biodiesel (méthyliques) par rapport au diesel conventionnel (Kiss *et al.*, 2006).

Type d'émission	B20	B100
Hydrocarbures imbrulés (HC)	-20%	-67%
Monoxyde de carbone (CO)	-12%	-48%
Cycle de vie de production — Dioxyde de carbone (CO ₂)	-16%	-79%
Particules	-12%	-47%
Oxydes d'azote (NO _x)	+2%	+10%
oxydes de soufre (SO _x)	-20%	-100%
hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	-13%	-80%
HAP nitrés (NHAP)	-50%	-90%

- B20=Mélange contenant 20% de biodiesel en volume et 80% en volume de diesel conventionnel
- B100=100% de biodiesel

1.4 Autres applications des Esters Alkyliques d'Huile Végétale

D'autres applications ont été développées pour l'utilisation des EAHV. Comme renseigné dans le Tableau 3, les EAHV peuvent servir de solvant, de plastifiant, ou d'intermédiaires réactionnels dans la fabrication d'alcools gras à destination de l'industrie cosmétique ou des détergents. L'exemple qui a retenu notre attention est celui où les EAHV ont contribué en 2000 au nettoyage final des rochers souillés par la marée noire de l'Erika sur la côte atlantique, puis au pompage du fuel resté dans les cuves de l'épave. Les EAHV ont un avenir, les applications possibles de ces derniers devraient permettre l'essor d'une nouvelle oléochimie basée sur des esters.

Tableau 3: Récapitulatif des quelques applications possibles d'esters alkyliques d'huiles végétales

Domaine d'utilisations		
Production énergie	Industrie	Chimie
<p>Carburant ou additif carburant: moteurs diesel à injection directe (automobile, aviation, marine) générateur/turbines pour la production d'électricité substitut de l'hydrogène dans les piles à combustible biolubrifiants</p>	<p>Solvant: biosolvant (polymérisation) agents tensioactifs (nettoyant, et dégraissant) Extraction liquide-liquide</p> <p>Plastifiant: Production de matériaux plastiques</p>	<p>Réactifs ou intermédiaires réactionnels: synthèse d'alcool gras synthèse d'esters à haut poids moléculaire synthèse d'amides grasses additifs alimentaires et émulsifiants</p>
Avantages		
Carburant biodégradable et non-toxique, éco-compatible	Solvant biodégradable, point éclair élevé, faible volatilité pouvoir solvant élevé, non toxique	Intermédiaires de synthèse stable et biodégradables

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLISÉS D'HUILES VÉGÉTALES

Il existe deux voies pour la production de biodiesel à partir d'huiles végétales et d'alcool. Une voie dite catalytique qui utilise un catalyseur pouvant être de nature chimique (un acide

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLISÉS D'HUILES VÉGÉTALES

ou une base) ou biologique (une enzyme) (Fukuda *et al.*, 2001; Marchetti J.M *et al.*, 2007; Demirbas, 2008; Fjerbaek *et al.*, 2009), et une autre voie non catalytique encore en cours de développement, qui implique de travailler en phase supercritique. Cette méthode est plus rapide mais nécessite des conditions opératoires drastiques et rigoureuses (Demirbas, 2002, 2005).

Dans la section 2.2, nous nous attarderons sur les procédés catalytiques les plus faciles à mettre en œuvre et qui ont une longue histoire de développement avec aujourd'hui une maturité prouvée. Le biodiesel produit suivant les procédés catalytiques est disponible en Amérique du Nord, au Japon et dans certains pays d'Europe occidentale.

2.1 Matières premières

2.1.1 Sources potentielles de TAG et acides gras

Le biodiesel est produit essentiellement à partir d'huiles végétales (soja, tournesol, palme, colza, coton) (Singh & Singh, 2010) et rarement à partir de corps gras animal (suif). La source d'huiles végétales dépend généralement des cultures qui se prêtent au climat local. Aux États-Unis, l'huile de soja est la principale matière première pour la production du biodiesel, tandis que le colza et l'huile de palme sont respectivement les sources la plus commune pour le biodiesel, en Europe et dans les pays tropicaux.

Une source appropriée pour produire le biodiesel ne devrait pas rentrer en compétition avec d'autres applications au risque de voir les prix augmenter comme ça été le cas en 2007 et 2008 où la demande croissante de biocarburants a été l'un des facteurs à l'origine de la hausse des prix des denrées alimentaires. La source d'huile végétale pour la production du biodiesel doit répondre le plus près possible à deux critères très importants: un bas prix et une forte disponibilité. Pour cela, l'intérêt se porte vers les huiles végétales de plantes oléagineuses non-alimentaires comme le jatropha, le neem, le ricin (Shah *et al.*, 2004; De Oliveira *et al.*, 2009; Borugadda & Goud, 2012), les huiles de friture (huiles végétales usagées) (Canakci, 2007; Chhetri *et al.*, 2008) ou les lipides issus de microalgues (Chisti, 2008). Les graisses animales, bien que souvent mentionnées, n'ont pas été autant étudiées

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLQUES D'HUILES VEGETALES

dans la mesure où leur forte teneur en acides gras saturés leur confère des profils de fusion problématiques pour un usage biocarburant (solides à température ambiante).

2.1.2 Sources potentielles alcools: choix du bioéthanol

Différents types d'alcools dont le méthanol, l'éthanol, le propanol et le butanol ont été utilisés dans la production de biodiesel (Meher *et al.*, 2006; Sanli & Canakci, 2008). Compte tenu de sa forte réactivité par rapport aux autres alcools et de son bas prix, le méthanol est l'alcool le plus couramment utilisé. Le méthanol est principalement obtenu à partir de ressources fossiles via la production de gaz de synthèse. Une alternative permet de produire du «biométhanol» par gazéification de biomasses lignocellulosiques, mais celle-ci est en cours d'étude (Demirbas, 2009).

Pour des raisons environnementales associées à sa forte toxicité, le méthanol devrait idéalement être remplacé par l'éthanol moins toxique, qui lui peut être facilement obtenu par fermentation du sucre ou de l'amidon contenu dans certaines biomasses végétales (Balat & Balat, 2009; Stamenkovic *et al.*, 2011). Dans le cas où l'éthanol est obtenu à partir de ressources naturelles renouvelables on parle alors de bioéthanol. Le bioéthanol suscite de plus en plus l'attention pour son incorporation dans la production du biodiesel en substitut du méthanol. D'un point de vue économique, l'utilisation du bioéthanol serait un atout majeur pour les pays qui ne disposent pas de ressources fossiles et son incorporation rendrait le biodiesel 100% d'origine végétale et renouvelable. Des travaux de recherche et de développement ont déjà mis l'accent sur l'utilisation de matières premières qui ne soient pas d'usage alimentaire pour la production du bioéthanol. L'utilisation du bois, de plantes herbacées, de tubercules sauvages, de déchets agricoles et forestiers (Zaldivar *et al.*, 2001; Kim & Dale, 2004), de boues de papeterie (déchets de l'industrie du papier), ou encore des déchets solides municipaux celluloseux permet d'éviter l'utilisation de matières premières alimentaires ou toute compétition avec l'usage alimentaire de terres arables. De plus, cela permet de réduire les coûts de la matière première et aussi d'augmenter les rendements de production.

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLQUES D'HUILES VEGETALES

Cependant l'utilisation du bioéthanol dans la production de biodiesel est délicate en raison de sa faible réactivité contrairement au méthanol, et en raison de son caractère hydrophile: le bioéthanol courant est généralement hydraté (jusqu'à 5% en volume). Or la présence d'eau dans le milieu réactionnel tend à désactiver au moins partiellement les catalyseurs chimiques classiques souvent utilisés et favorise l'avènement de réactions secondaires contreproductives (typiquement l'hydrolyse des esters ou la saponification). Il est envisageable de déshydrater le bioéthanol mais cette opération est coûteuse et consomme une partie importante de l'énergie contenue dans l'éthanol lui-même (Brunschwig *et al.*, 2011).

Il existe deux types de catalyseurs pour la production de biodiesel. Les catalyseurs chimiques (acide ou basique, homogène ou hétérogène) et les catalyseurs biologiques (enzymes).

2.2 Procédés catalytiques de production de biodiesel

2.2.1 Catalyse chimique: Cas des catalyses homogène et hétérogène

Les catalyseurs chimiques alcalins en phase homogène sont les plus utilisés pour la production de biodiesel à l'échelle industrielle en raison du faible coût du catalyseur et de son rendement en biodiesel élevé (> 96%) (Ma & Hanna, 1999; Narasimharao *et al.*, 2007; Leung *et al.*, 2010). Les catalyseurs commerciaux tels que l'hydroxyde de sodium (NaOH) et de potassium (KOH) sont les plus couramment utilisés; mais ceux-ci sont moins performants que les alcoolates de métaux alcalins (CH_3ONa) qui donnent des rendements plus élevés (> 98%) (Balat & Balat). L'inconvénient de la catalyse chimique alcaline homogène est la possibilité de générer des réactions secondaires ce qui généralement exige l'utilisation de matières premières d'une grande qualité (anhydre et non altérées) (Narasimharao *et al.*, 2007). La présence d'AGL produits de dégradation des TAG et d'eau dans le milieu réactionnel favorise la réaction de saponification qui est la principale réaction parasite, concurrente à la réaction de transestérification. Les savons produits sont responsables de la formation d'émulsion qui rendent difficiles la récupération du biodiesel et entraînent des pertes du produit lors des étapes de purification (Vasudevan & Briggs, 2008; Balat & Balat; Leung *et al.*, 2010). L'autre difficulté en catalyse alcaline homogène est la séparation du

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLQUES D'HUILES VEGETALES

catalyseur du produit. L'élimination du catalyseur dans le biodiesel s'effectue généralement par le lavage des esters à l'eau ce qui a pour conséquence la production de grandes quantités d'eaux usées hautement alcalines qui peuvent avoir un impact écologique négatif si elles ne sont pas traitées. Le lavage à l'eau du biodiesel suppose également une étape complémentaire de séchage qui est très énergivore.

La catalyse acide en phase homogène utilisant des acides minéraux tels que l'acide sulfurique l'acide ortho phosphorique, l'acide chlorhydrique ou des acides organiques tels que les acides sulfoniques (Balat & Balat, 2010) est aussi citée parmi les procédés catalytiques de production de biodiesel. Elle a l'avantage d'être insensible aux AGL car les réactions d'estérification et de transestérification ont lieu simultanément (Helwani *et al.*, 2009). Pourtant celle-ci est rarement utilisée à cause de la moindre réactivité des catalyseurs acides comparés à leurs homologues basiques (Narasimharao *et al.*, 2007) et surtout des risques élevés de corrosion des installations industrielles.

La catalyse chimique en phase hétérogène qui utilise des catalyseurs solides pouvant être de nature acides, basiques ou acides-bases (Singh & Fernando, 2007; Semwal *et al.*, 2010) est de plus en plus testée. Les catalyseurs solides sont faciles à séparer des produits par simple filtration. D'un point de vue économique, la catalyse hétérogène permet d'abaisser les coûts de production du biodiesel (Narasimharao *et al.*, 2007), les catalyseurs peuvent être récupérés, régénérés puis réutilisés avec la possibilité de travailler en système continu (Helwani *et al.*, 2009) tout en minimisant les problèmes liés à la production d'eaux usées. Cependant, la catalyse hétérogène exige généralement de travailler à des températures élevées allant de 180 à 450°C (Singh & Fernando, 2007; Mcneff *et al.*, 2008; Helwani *et al.*, 2009) et sous de fortes pressions de 25 à 60 bars (Di Serio *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009) à cause des problèmes de transfert de masse liés à la forte viscosité du milieu réactionnel (Endalew *et al.*, 2011). De telles conditions de réaction permettent certes de parvenir à un rendement souhaitable (95-98%) mais augmentent en contrepartie la consommation énergétique et nécessitent des installations appropriées et bien sécurisées.

Des études ont montré que des catalyseurs solides préparés à partir d'oxydes (CaO, MgO, ZnO), d'hydroxydes (Ca(OH)₂), d'alkoxydes (Ca(CH₃O)₂) de métaux ou des catalyseursobtenus

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLQUES D'HUILES VEGETALES

à partir de résines anioniques, permettaient de travailler dans des conditions modérées de températures (60-120°C) et sous pression atmosphérique (Zabeti *et al.*, 2009). Cependant la plupart de ces catalyseurs sont souvent sujets à des problèmes d'inactivation et/ou de lessivage des agents actifs (lixiviation) avec le temps qui ont un impact négatif sur l'efficacité et la recyclabilité du catalyseur. L'empoisonnement de ces catalyseurs peut se faire par simple contact avec l'eau ou le CO₂ atmosphérique particulièrement pour les oxydes de calcium (CaO) (Di Serio *et al.*, 2007), ou par l'échange direct d'ions hydroxyles avec les acides gras libres sur certaines résines.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients comparés des différents types de catalyseurs utilisés au cours de la transestérification des TAG en biodiesel (Di Serio *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2010)

Type de catalyseur	Avantages	Inconvénients
Catalyse homogène basique	Réaction très rapide - 4000 fois plus rapide que la réaction de transestérification catalysée par un acide Réaction en conditions douces et faible consommation d'énergie Catalyseurs relativement pas chers et largement disponibles	Sensible à la teneur en AGL et à l'eau (réactifs purs) Réaction de saponification possible Élimination du catalyseur génère de grande quantité d'eaux usées hautement alcalines
Catalyse hétérogène basique	Réaction relativement plus rapide que celle catalysée par un acide en phase hétérogène Réaction possible dans des conditions modérées et moins consommatrice en énergie Séparation facile du catalyseur du produit Possibilité de réutiliser et de régénérer le catalyseur	Sensible à la teneur en AGL et à l'eau (réactifs purs) Réaction de saponification possible. Empoisonnement du catalyseur lorsqu'il est exposé à l'air ambiant Le lessivage des sites actifs du catalyseur avec contamination des produits (biodiesel et glycérol)
Catalyse homogène acide	Insensible à la teneur en AGL (estérification des AGL et transestérification et des TAG simultanée) Transestérification possible d'huile riche en AGL La réaction peut avoir lieu dans des conditions de réaction douces	Vitesse de réaction très lente Nécessite des quantités très importantes de l'alcool Catalyseur corrosif pour le réacteur et les canalisations Séparation du catalyseur du biodiesel est problématique
Catalyse hétérogène acide	Insensible à la teneur en AGL (estérification des AGL et transestérification et des TAG simultanée) Insensible à la teneur en eau (réaction mise en œuvre à plus de 100°C) Séparation facile de catalyseur du produit Possibilité de réutiliser et de régénérer le catalyseur	Synthèse du catalyseur complexe Température de réaction élevée, Nécessite des quantités très importantes de l'alcool Long temps de réaction nécessaires avec une forte consommation d'énergie Le lessivage des sites actifs du catalyseur avec contamination possible des produits
Catalyse enzymatique (lipases)	Insensible à la teneur en AGL (estérification des AGL et transestérification et des TAG simultanée) et tolérance à l'eau Transestérification possible d'huile riche en AGL Réaction mise en œuvre dans des conditions douces de température et de pression Nombre d'étapes limité comparé à la catalyse chimique	Vitesse de réaction plus lente que la transestérification catalysée par un acide Coûts élevés de production du catalyseur Possibilité de désactivation du catalyseur (alcool, température, glycérol...)

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLISQUES D'HUILES VEGETALES

L'analyse des avantages et inconvénients des différentes voies catalytiques de production de biodiesel présentées dans le Tableau 4 ci-dessus, indique que la catalyse basique (en phase homogène ou hétérogène) n'est pas adaptée pour la transestérification des huiles végétales à forte teneur en AGL comme les huiles végétales brutes ou les huiles végétales usagées avec un alcool hydraté (en particulier le bioéthanol), alors que ces matières premières sont idéales pour abaisser les coûts de production. L'utilisation de catalyseurs acides certes insensibles aux AGL et dans une certaine mesure à l'eau nécessite de long temps de réaction accompagnés par une forte consommation d'alcool et d'énergie.

Il en ressort donc que pour la transestérification des matières premières peut chères et de moindre qualité, les catalyseurs appropriés doivent :

- i) être capables de catalyser les réactions de transestérification et d'estérification, avec de bons rendements
- ii) être insensible à la présence d'eau,
- iii) être actifs à basse température.

La catalyse enzymatique est l'alternative qui présente les qualités suscitées pour produire du biodiesel à partir d'huiles à fortes teneurs en acides gras libres et d'éthanol hydraté. Les lipases ont la capacité de catalyser simultanément l'estérification des AGL et la transestérification des TAG dans des conditions douces de température et de pression avec une meilleure tolérance à l'eau.

2.2.2 Catalyse enzymatique: les lipases

Les lipases ou triacylglycérol hydrolases (E.C.3.1.1.3) sont des macromolécules biologiques responsables du catabolisme des TAG, leurs substrats préférentiels. Les lipases sont très répandues dans le monde vivant où elles jouent un rôle capital dans le métabolisme et le renouvellement des lipides intra- et extracellulaire. Ce sont des macromolécules actives dont la structure tridimensionnelle est un repliement α/β : le feuillet β hydrophobe est composé de brins essentiellement parallèles reliés entre eux par des hélices α amphiphiles (cf. Figure 4).

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLQUES D'HUILES VEGETALES

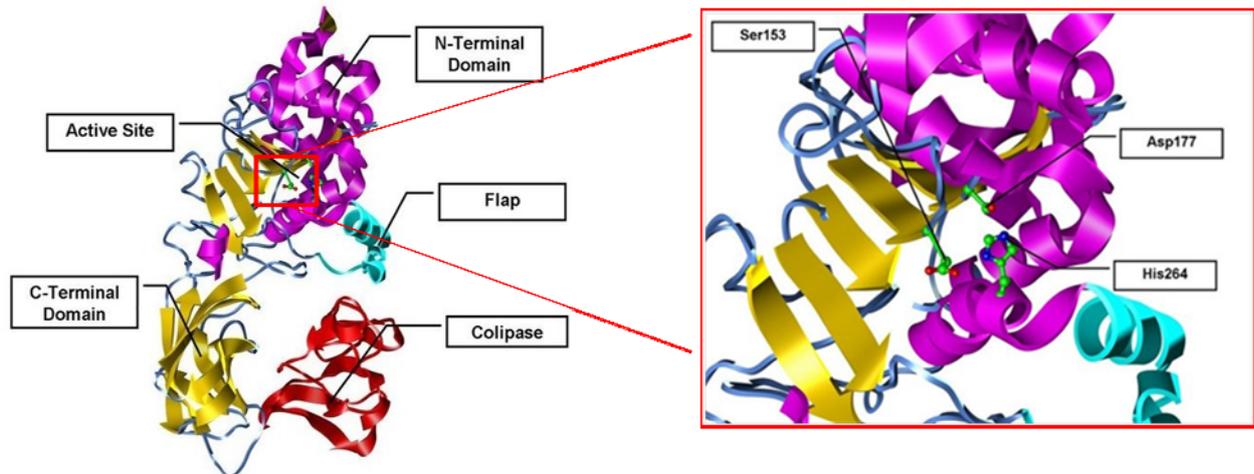


Figure 4 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du complexe lipase pancréatique humaine-colipase (Fromer & Merolla, 2013) avec un zoom sur la représentation du site actif.

Les feuillettes β sont représentés par des flèches jaunes et les hélices α par des formes hélicoïdales de couleur violet. Les résidus de la triade catalytique du site actif de la lipase pancréatique humaine, sont la sérine (Ser153), l'histidine (His264) et Aspartate (Asp177).

A la base des deux domaines hydrophobes se trouve le site actif. Le site actif des lipases peut être recouvert par un domaine mobile amphiphile (appelé aussi volet ou Flap en anglais). Lorsque l'enzyme est au contact d'une interface eau/lipides, ce volet s'écarte permettant la fixation du substrat et son hydrolyse.

La capacité des lipases à hydrolyser des liaisons esters ou à transférer des acyles est attribuable à trois résidus du site actif appelés "la triade catalytique" (Remington *et al.*, 1992). La triade catalytique des lipases est constituée des acides aminés : Sérine, Acide aspartique, glutamique/Histidine (cf. zoom de la Figure 3), la séquence primaire du site actif est conservée d'une espèce à l'autre.

En biosynthèse particulièrement pour la biotransformation des corps gras, les lipases représentent aujourd'hui une variété de biocatalyseurs souples pour l'acylation ou déacylation en milieu organique d'une large gamme de substrats naturels ou artificiels (Huang, 1985; Mukherjee & M.J. Hills, 1994; Kazlauskas & Bornscheuer, 1998; Liaquat & Apenten, 2000; Jaeger & Eggert, 2002; Akoh & Subramani, 2005; Fickers *et al.*, 2008). Étant capables d'agir dans les conditions opératoires douces avec une forte sélectivité et spécificité, expérimentées dans la production de biodiesel, les lipases offrent l'avantage de pouvoir contrôler la pureté du biodiesel et du glycérol obtenus en évitant la formation de

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLQUES D'HUILES VEGETALES

produits secondaires tels que les savons (Ognjanovic *et al.*; Kaieda *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 2002; Demirbas, 2005; Hernández-Martín & Otero, 2008; Bajaj *et al.*, 2009; Fjerbaek *et al.*, 2009; Szczesna Antczak *et al.*, 2009; Balat & Balat, 2010). Ainsi, les procédés de production de biodiesel qui utilisent les lipases comme catalyseurs s'avèrent être moins polluants et moins coûteux énergétiquement que les procédés classique (catalyse basique).

De plus en plus d'équipes de recherche et de sociétés privées s'intéressent à la production de biodiesel à l'échelle industrielle à l'aide de lipases comme biocatalyseur pour les raisons suivantes:

- (i) la catalyse lipasique est sélective et permet d'orienter spécifiquement la réaction de transestérification vers la formation d'esters alkylques en évitant la formation des savons (Jegannathan *et al.*, 2008), avec à la solde l'obtention de biodiesel et de glycérol d'une forte pureté (Fukuda *et al.*, 2001).
- (ii) les lipases sont capables de catalyser aussi bien les réactions de transestérification des TAG, que d'estérification des AGL avec un alcool (Tüter, 1998), ainsi elles rendent possible la production de biodiesel à partir d'huiles végétales brutes, d'huiles végétales usagées voir des graisses animales, tous possédant des niveaux élevés d'AGL, avec in-finé des rendements de biodiesel qui peuvent être supérieurs à 90% (Wu *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2001; Gog *et al.*, 2011).
- (iii) le procédé lipasique est plus respectueux de l'environnement et la demande en énergie pour sa mise en œuvre est faible (Nelson *et al.*, 1996; Akoh *et al.*, 2007; Verdugo *et al.*). Le nombre d'étapes de traitement en amont et en aval du procédé lipasique est limité (Fukuda *et al.*, 2001) comparé aux procédés chimiques et lorsque les lipases sont immobilisées sur un support inerte elles sont facilement récupérables et peuvent être recyclées.

Cependant la catalyse lipasique présente encore certaines contraintes émanant surtout de la difficulté de changement d'échelle du procédé, (de l'échelle pilote à l'échelle industrielle). Les principales difficultés sont:

- (i) la faible stabilité des lipases tout au long de la réaction,

- (ii) la cinétique de transestérification lente
- (iii) et le coût élevé des préparations enzymatiques employées

Les essais de production de biodiesel industrielle par catalyse lipasique impliquent principalement l'utilisation de lipases produites par des microorganismes. Les principaux microorganismes sources de lipases sont les champignons *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica* et la bactérie *Pseudomonas cepacia*. Ces lipases microbiennes extracellulaires, dans la grande partie de cas, sont utilisées sous forme immobilisées (Kaieda *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 1999 ; Samukawa *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009b; Robles-Medina *et al.*, 2009; Ying *et al.*, 2009).

L'immobilisation des lipases sur un support inerte est l'une des stratégies utilisées pour résoudre les problèmes de coûts et de stabilité des lipases microbiennes. L'immobilisation des lipases confère une bonne stabilité thermique, une meilleure résistance vis-à-vis de l'alcool utilisé ou du glycérol produit, tout en permettant la récupération et donc la possibilité de réutiliser les enzymes après une réaction (Iso *et al.*, 2001; Nouredini *et al.*, 2005). Cette technique offre à la fois la possibilité d'améliorer l'activité catalytique des lipases, d'abaisser les coûts de production du biodiesel et de développer de procédés de production en continu. Une autre stratégie pour améliorer l'efficacité des lipases microbiennes est la surexpression cytoplasmique du gène codant pour la lipase dans des cellules hôtes, lesquelles seront ensuite utilisées entières comme biocatalyseur pour la transestérification des TAG (Matsumoto *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010). Bien qu'efficaces, ces deux stratégies impliquent des étapes de conditionnement des lipases qui sont onéreuses. Elles exigent non seulement une compréhension détaillée des mécanismes moléculaires qui régissent le repliement et la sécrétion des lipases, mais aussi une connaissance des caractéristiques du support utilisé, à savoir sa surface spécifique, sa capacité d'adsorption, les interactions chimiques favorables à l'enzyme, sa disponibilité, son coût etc. Selon Akoh *et al.* (Akoh *et al.*, 2007), le succès de l'utilisation des lipases dans la production de biodiesel à l'échelle industrielle dépend aujourd'hui aussi bien du choix de la source de l'enzyme que de l'optimisation des conditions de réaction. L'identification de sources de lipases facilement mobilisables et l'optimisation des facteurs qui influent sur

2. PRODUCTION D'ESTERS ALKYLIS D'HUILES VEGETALES

l'activité catalytique des lipases permettrait d'améliorer la productivité et l'expansion d'un tel procédé.

Les travaux menés actuellement au Laboratoire Biomasse Énergie et Biocarburants (2iE) en collaboration avec l'équipe Lipochimie du Cirad visent à identifier des sources de lipases actives dont l'exploitation serait plus facile. De par leur simplicité de préparation et d'utilisation, les lipases d'origine végétale représentent des candidats potentiels pour la production catalytique de biodiesel. Ces lipases présentent l'avantage par rapport aux lipases microbiennes d'être largement disponibles et facilement mobilisable à faible coûts à partir de biomasse (Villeneuve, 2003), le tout sans avoir besoin de biotechnologies génétiques pour les produire.

3. APPLICATIONS ACTUELLES DES LIPASES VEGETALES

3.1 Lipases végétales en biosynthèse

De nombreuses revues bibliographiques sur les connaissances actuelles des lipases végétales ont été publiées (Huang, 1985; Mukherjee & M.J. Hills, 1994; Villeneuve, 2003).

L'activité lipolytique dans les graines a toujours fait l'objet d'une attention particulière car dans les graines oléagineuses ou céréalières, les lipases sont responsables de l'hydrolyse des lipides endogènes (Eastmond, 2004). Cette hydrolyse pouvant conduire à la dégradation des propriétés nutritionnelles des huiles et des farines, la recherche dans le domaine continue d'œuvrer à déterminer les caractéristiques de certaines lipases végétales afin de les inactiver lors de la préparation des produits agricoles pour un usage commercial. Les lipases issues des graines sont les lipases végétales les plus étudiées. Pour la plupart, elles ne peuvent être exploitées qu'à partir d'un certain stade de développement de la graine, c'est-à-dire une fois la germination amorcée (Huang, 1985). Les lipases à l'intérieur des graines permettent pendant la germination, la mobilisation des importantes réserves de lipides qui servent d'éléments nutritifs ou de source d'énergie au cours de la croissance de l'embryon. Notons cependant que la présence d'enzymes actives dans les graines dormantes (c'est-à-dire non germées) a déjà été rapportée. Parmi ces graines, les graines de ricin (*ricinus communis*) (Huang, 1985), de Vernonia (*Vernonia galamensis*), de cumin noir (*Nigella sativa*) et plus récemment le *Pentaclethra macrophylla* (Enujiugha *et al.*, 2004) où une activité hydrolytique importante est présente même dans les graines non germées (graines dormantes).

D'autres biomasses végétales produites en quantités industrielles pour d'autres propriétés que leur activité lipasique ont été étudiées et certains travaux menés ont permis de montrer à titre d'exemple que le latex de papaye était source potentielle de lipases actives pour la bioconversion des lipides en matières grasses à haute valeur ajoutée (Caro *et al.*, 2000; Villeneuve, 2003; Caro *et al.*, 2004; Fiorillo *et al.*, 2007) ou la synthèse d'esters (Villeneuve *et al.*, 1995 ; Villeneuve *et al.*, 1997a; Villeneuve *et al.*, 1997b; You *et al.*, 2011).

La littérature dans le domaine de l'utilisation des lipases en biosynthèse indique que les lipases végétales représentent une alternative intéressante aux lipases microbiennes pour catalyser non seulement l'hydrolyse de liaisons esters mais aussi pour catalyser efficacement la transestérification d'une large gamme de substrats naturels ou synthétiques (cf. section 3.2).

3.1.1 Réactions biocatalysées par les lipases végétales

L'utilisation des lipases végétales s'est très rapidement développée ces dernières années surtout dans des réactions d'hydrolyse sélective de TAG. Ensuite elle s'est étendue aux réactions d'estérification d'AGL avec divers alcools, aux réactions d'alcoolyse, d'acidolyse et d'interestérification (Foglia & Villeneuve, 1997; Villeneuve *et al.*, 1997b; Villeneuve *et al.*, 1998; Caro *et al.*, 2000; Dhuique-Mayer *et al.*, 2003; Villeneuve, 2003; Caro *et al.*, 2004; Fickers *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2010). Les réactions citées précédemment sont schématisées ci-après et en général les trois dernières sont souvent regroupées en un seul même terme celui de Transestérification ou transfert d'acyle (cf. Figure 5)

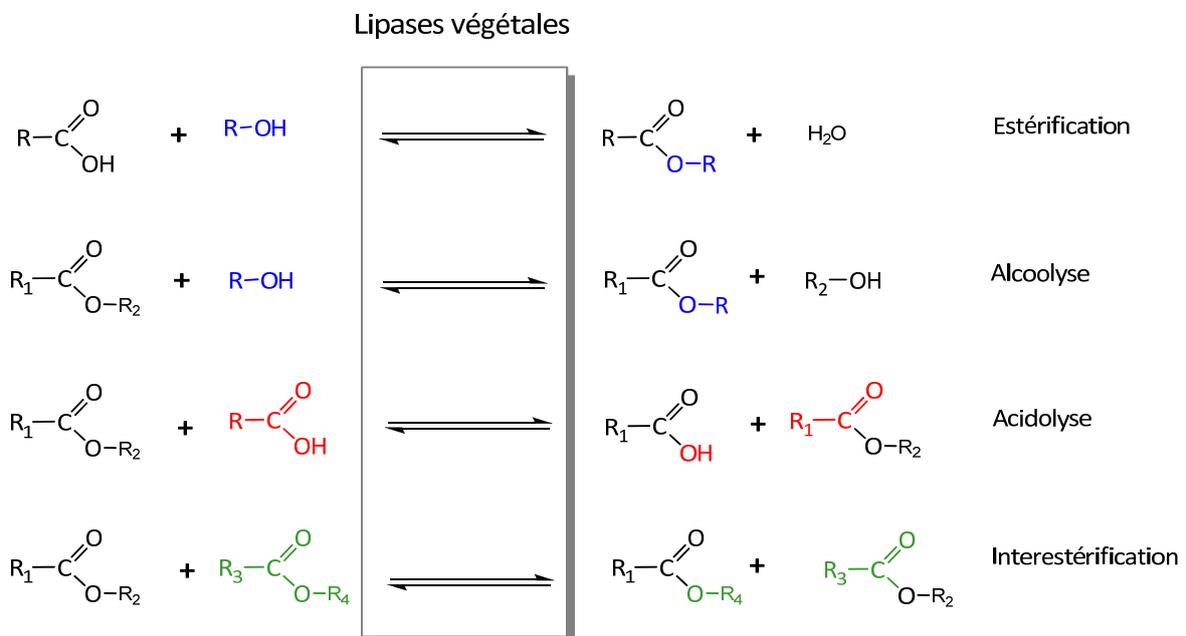


Figure 5 : Réaction de synthèse pouvant être catalysée par les lipases végétales

Le terme transestérification, renvoie à un processus de transfert de groupement d'acyle. Lorsque celui-ci a lieu entre un ester et un acide, on parle d'acidolyse; s'il a lieu entre un

ester et un autre ester c'est l'interestérification, et s'il intervient entre un ester et un alcool, on parle alors d'alcoolyse. Les réactions de transestérification sont des réactions de transformation industrielles courantes des corps gras pour créer des produits restructurés avec de nouvelles propriétés physiques, rhéologiques et nutritionnelles.

3.1.2 Mécanisme catalytique de la catalyse enzymatique

Grâce aux connaissances acquises progressivement dans le domaine du bio-façonnement des corps gras à partir de lipases microbiennes, le mécanisme d'action des lipases végétales peut être décrit comme l'indique la Figure 6. Semblable à celui des lipases microbiennes ou animales, ce mécanisme d'action repose sur deux réactions conjuguées d'acylation et de déacylation du résidu sérine présent sur le site actif de la lipase.

Le mécanisme mis en jeu commence par l'acylation du résidu sérine du site actif de l'enzyme, d'où s'en suit la déacylation de la sérine par une molécule d'eau lorsqu'il s'agit d'une hydrolyse ou par un autre nucléophile (hydroxyle d'un alcool ou d'un glycéride) s'il s'agit d'une réaction de transestérification. Dans la première étape, la sérine est activée par déprotonation pour laquelle l'histidine et de l'aspartate sont requis. Par conséquent, la nucléophilie du résidu hydroxyle de la sérine est renforcée et attaque le groupe carbonyle du substrat formant ainsi un intermédiaire acyl-enzyme. La présence d'un trou oxianion contribue à la stabilisation de la répartition de charge et la réduction de l'énergie de l'état-chaussée de l'intermédiaire tétraédrique (Schmid & Verger, 1998; Reis *et al.*, 2009). L'étape de désacylation est commandée par l'électronégativité des molécules peuplant l'interface. Dans ce processus, un nucléophile (par exemple H₂O, alcool ou glycéride partiel) attaque l'enzyme acylée conduisant à la libération du produit et de la régénération du site catalytique.

3. APPLICATION ACTUELLE DES LIPASES VEGETALES

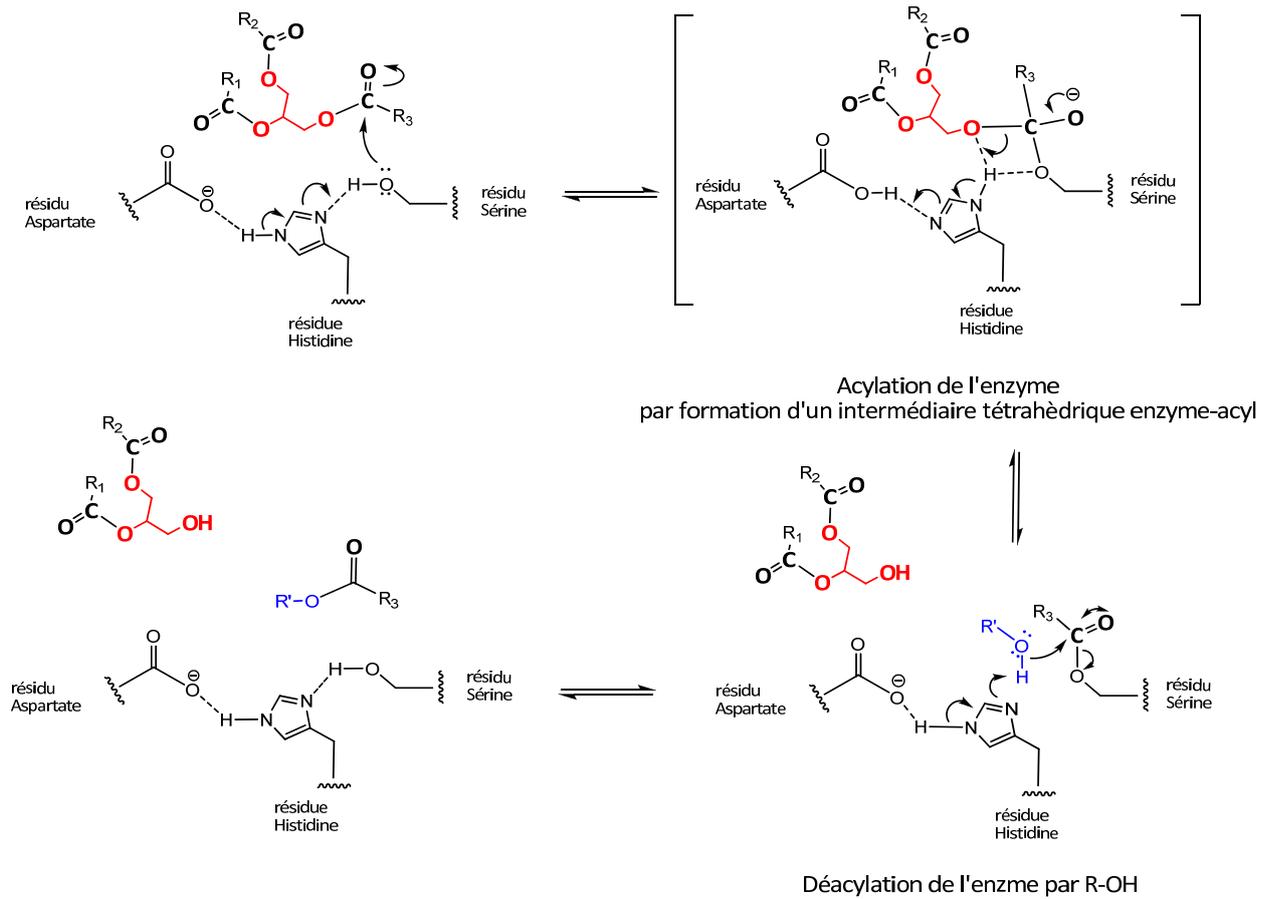


Figure 6 : Mécanisme d'action de la transestérification d'un triglycéride avec un alcool au niveau du site actif de la lipase.

En hydrolyse tout comme pour la transestérification, le mécanisme d'action des lipases présente des spécificités particulières se caractérisant par une sélectivité vis-à-vis du substrat. Cette sélectivité peut être très avantageuse lorsqu'elle est utilisée pour obtenir un composé lipidique ou biosynthétique spécifique ayant des propriétés physico-chimiques ou nutritionnelles désirées. Les spécificités particulières exprimées par les lipases végétales comme pour les lipases microbiennes sont divisées en différents types:

- (i) **La spécificité de substrat:** c'est la capacité des lipases à agir préférentiellement sur un type d'esters de glycérol (les esters de glycérol étant les substrats naturels de lipases). Les lipases végétales catalysent plus rapidement les réactions mettant en jeu les TAG, par rapport à celle mettant en jeu des di-acylglycérols (DAG) ou encore moins des mono-acylglycérols (MAG)
- (ii) **La spécificité de position ou régiosélectivité:** la régiosélectivité est la capacité de certaines lipases à distinguer les deux positions externes du squelette triglycéridique

3. APPLICATION ACTUELLE DES LIPASES VEGETALES

(esters primaires) et la position interne (ester secondaire). Pour bien comprendre cette spécificité d'action des lipases sur les TAG, il faut avoir à l'esprit que ces derniers sont des molécules pro chirales; leurs nomenclature est propre à la chimie des lipides (stereo numbered nomenclature). Celle-ci permet de distinguer les positions *sn-1*, *sn-2* et *sn-3* du squelette triglycéridique en fonction de la configuration du carbone asymétrique représenté par la projection de Fisher ci-dessous.

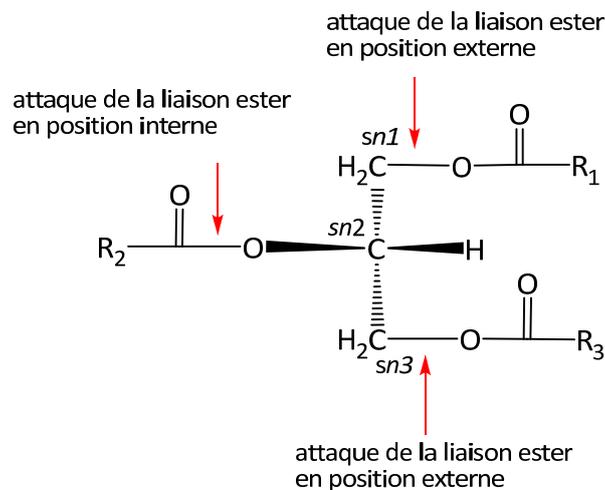


Figure 7 : Représentation de Fisher et nomenclature *sn* d'un TAG

L'action de la lipase est alors nommée *sn-1,3*-régiosélective lorsqu'elle attaque préférentiellement les AGs en positions externes du glycérol comme c'est le cas pour la lipase du latex de papaye (*Carica papaya*) (Villeneuve *et al.*, 1995). Certaines lipases arrivent à faire la distinction entre les positions *sn-1* et *sn-3*, elles ont une action **stéréospécifique**.

- (iii) Enfin, **la spécificité pour un acide gras ou typo-sélectivité**: les lipases peuvent avoir une préférence pour un acide gras particulier ou à un groupe d'acides gras, lequel est alors attaqué peu importe leur position sur le TAG. Les lipases végétales, en particulier celles issues de graines, ont généralement une sélectivité vis-à-vis des TAG contenant le ou les acides gras dominants présent dans la graine dont elles sont issues (Hellyer *et al.*, 1999a)

3.2 Valorisation des lipases végétales

La polyvalence des lipases végétales pour catalyser différentes sortes de réactions associées à leurs différentes spécificités, confèrent à ces enzymes un potentiel d'application important et vaste. Aujourd'hui, les lipases issues de graines ou de latex font l'objet d'études détaillées dans le but de pouvoir mettre en œuvre ces biocatalyseurs pour des applications industrielles à moindre coût (Huang *et al.*, 1988). Capables d'exprimer leur activité sous forme brute ou partiellement purifiée les lipases végétales sont faciles à mettre en œuvre et largement disponibles à partir de leurs sources naturelles.

3.2.1 Production d'AGL ou d'esters synthétiques

La typo- et la stéréo-sélectivité exprimées par les lipases végétales peut être avantageusement utilisée pour la production de concentrés d'acides gras spécifiques, (Villeneuve, 2003; De Maria *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2010). L'autre propriété des lipases végétales, l'énantio-sélectivité, permet au cours de l'hydrolyse ou de l'estérification la résolution de mélanges racémiques d'esters synthétiques (Cheng & Tsai, 2004; Chen *et al.*, 2009a; Xia *et al.*, 2009). Piazza *et al.*, ont montré dans deux études que la lipase d'avoine (*Avena sativa*) était un potentiel biocatalyseur pour la production de concentré d'acide ricinoléique, d'acide oléique, ou d'acide gras polyinsaturés grâce à l'hydrolyse sélective de diverses huiles (Piazza, 1991; Piazza & Farrell, 1991). Su *et al.*, après purification de la lipase de ricin (*Ricinus communis*) (Su *et al.*, 2010) ont montré que celle-ci hydrolyse efficacement les huiles végétales quelle que soit sa source avec un rendement d'hydrolyse supérieure à 70%; à l'exception de l'huile de tournesol où le rendement d'hydrolyse était de 46,1%. Selon (Joab Sampaio De Sousa *et al.*, 2010) les extraits de graines germés de *Jatropha curcas*, contiennent une lipase capable d'hydrolyser efficacement un large éventail de matières grasses (huiles végétales, suif, distillats d'acides gras...).

L'estérification peut aussi bien être catalysée par les lipases végétales mais uniquement en milieu organique faiblement hydraté. Les lipases de grains de blé (*Triticum aestivum*), d'orge (*Hordeum vulgare*), de maïs (*Zea mays*) et de colza (*Brassica napus*) ont été utilisées pour l'estérification directe de l'acide acétique, l'acide butyrique, et les acides caproïque avec

3. APPLICATION ACTUELLE DES LIPASES VEGETALES

l'éthanol, le butanol, l'isopentanol, ou le (Z)-3-hexène-1-ol en un milieu organique (Liaquat & Apenten, 2000). Les extraits végétaux lipasiques bruts ou semi purifiés de chacune des graines utilisées sont efficaces pour la synthèse de ces esters à faible poids moléculaire très utilisés dans l'industrie du parfum et de la cosmétique. Jachmanián et Mukherjee (Jachmanián & Mukherjee, 1996) ont rapporté la capacité des poudres d'acétone des graines germées de colza (*Brassica napus*), à catalyser l'estérification complète d'AGL avec le n-butanol, à catalyser l'alcoolyse de l'oléate de méthyle avec le n-butanol ainsi que l'interestérification de l'alcool oléique avec l'oléate de méthyle. Tüter (Tüter, 1998) et Chong (Chong *et al.*, 2007) ont mis en œuvre une méthode biocatalytique pour produire des MAG, DAG et TAG à partir d'acide gras d'huile végétale et du glycérol respectivement à partir d'extraits végétaux délipidés de ricin (*Ricinus communis*) et de son de riz (*Oryza sativa*).

Les latex des plantes de la famille des *Euphorbiaceae* (Giordani *et al.*, 1991; Moulin *et al.*, 1994; Palocci *et al.*, 2003; Villeneuve *et al.*, 2005), des *Asclepiadaceae* (Giordani *et al.*, 1991), ou des *Caricaceae* (Giordani *et al.*, 1991; Dhuique-Mayer *et al.*, 2001) ont été décrits comme des biocatalyseurs utiles dans plusieurs réactions de synthèse d'esters mettant en œuvre principalement des réactions d'estérification, d'interestérification, de transestérification. Un exemple intéressant est la transestérification de l'octanoate de vinyle avec le citronellol à l'aide de la lipase de papaye (*Carica papaya*) par You (You *et al.*, 2011) avec près de 100% de rendement et de pureté du produit final, dans un rapport équimolaire des substrats.

3.2.2 Biotransformation des huiles et des graisses

Le potentiel des lipases végétales pour la biotransformation des huiles et des graisses est régulièrement examiné dans la littérature dans le but de produire des produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Huang, 1985; Mukherjee & M.J. Hills, 1994; Villeneuve, 2003; Paques & Macedo, 2006; Villeneuve, 2007).

Tüter *et al.* ont utilisé la lipase de graines de ricin (*Ricinus communis*) pour l'estérification de divers acides gras avec du glycérol (Tüter, 1998), ou encore ils ont utilisé la lipase issue des graines de cumin noir (*Nigella sativa*) pour enrichir l'huile de bourrache avec un acide gras particulier l'acide γ -linoléique (GLA) (Tüter *et al.*, 2003). Le GLA est un acide gras essentiel

3. APPLICATION ACTUELLE DES LIPASES VEGETALES

pour le corps humain car il permet la production de précurseurs importants dans la synthèse des phospholipides de la membrane cellulaire. Cette préférence pour ce même un acide gras particulier a été retrouvée chez la lipase de colza (*Brassica napus*) qui a aussi été utilisée pour l'enrichissement de certaines huiles et graisses en acide γ -linoléinique (Hills *et al.*, 1990). Selon les travaux de Staubmann *et al.* (Staubmann *et al.*, 1999), la lipase de *Jatropha curcas* permet de catalyser l'incorporation de l'acide laurique à la trioléine avec des rendements d'interestérification de près de 50%. La lipase de latex de papaye *Carica papaya* a été utilisée avec succès pour la synthèse de lipides structurés ayant une faible teneur en calories (Gandhi & Mukherjee, 2001b). les travaux de Cambon *et al.*, sur l'activité catalytique de latex de *Carica pentagona* (Babaco) ont montré que la lipase contenue dans ce latex est capable de catalyser l'alcoolyse de l'huile de tournesol avec divers alcools primaires dans un milieu sans solvant. Malgré la sensibilité de la lipase de Babaco à l'égard du méthanol en forte concentration, la méthode d'ajouts dosés tel que décrit par Watanabe (Watanabe *et al.*, 1999) permet de limiter l'effet inhibiteur du méthanol et d'atteindre des rendements de transestérification de près de 70% (Cambon *et al.*, 2009).

3.2.3 Production du biodiesel: État des connaissances

À l'heure actuelle, il n'existe pas de procédé pilote ou industrielle de production de biodiesel utilisant des lipases végétales comme biocatalyseurs pour la production de biodiesel. Mais les travaux de recherches menées sur l'estérification ou la transestérification d'AGL et de TAG avec plusieurs alcools en utilisant les lipases du latex brut de Babaco (*Carica pentagona*), de ricin (*Ricinus communis*); de colza (*Brassica napus*), de cumin noir (*Nigella sativa*); de *Jatropha curca* (Ncube, 1993; Jachmanián & Mukherjee, 1996; Tüter, 1998; Staubmann *et al.*, 1999; Dhuique-Mayer *et al.*, 2003; Cambon *et al.*, 2009; Liaquat, 2010; Su *et al.*, 2010) montrent clairement que les lipases issues de ces biomasses sont des sources potentielles de biocatalyseurs pour des applications dans la production d'EAHV, donc de biodiesel.

4. MISE EN ŒUVRE DES LIPASES VEGETALES

Les lipases végétales issues de diverses parties des plantes ont été étudiées pour leur capacité à catalyser l'hydrolyse des TAG et la synthèse d'esters. En fonction de la nature de la source végétale, les méthodes de préparation et de conditionnement de ces biocatalyseurs peuvent être différentes. Généralement, les lipases végétales sont exploitées en biosynthèse soit sous forme d'extraits végétaux bruts ou de préparation enzymatiques partiellement purifiées (Abigor *et al.*, 2002). La purification des lipases se subdivise en sous-étapes qui varient en fonction de la partie de la plante utilisée ou du degré de purification désiré. Dans cette partie, sont résumées les différentes étapes de préparation de biocatalyseurs lipasique à partir de la biomasse.

4.1 Étapes de préparation d'extraits végétaux bruts

4.1.1 Broyage de la biomasse

Dans nombre de cas, à l'exception des latex, la préparation d'extraits végétaux enzymatiques commence par le broyage de la partie de la plante considérée. Le broyage permet la réduction de la matière végétale en fines particules et sert ainsi à augmenter la surface de contact des extraits végétaux avec le milieu extérieur. Il permet ainsi d'augmenter la probabilité que le substrat présent dans le milieu réactionnel accède aux sites actifs des lipases contenues dans l'extrait. Dans ce cas, plus la taille des particules est petite, plus l'activité de la lipase est élevée (Morgana K. Pierozan *et al.*, 2009).

4.1.2 Séchage de la biomasse

Le séchage est une étape importante dans la mise en œuvre de l'activité lipasique des extraits végétaux pour deux raisons. Premièrement, il permet l'élimination d'un maximum d'eau dans les extraits végétaux; car une quantité importante d'eau dans l'environnement des lipases favorise l'hydrolyse des substrats ou des produits de biosynthèse (Akoh & Subramani, 2005; Akoh *et al.*, 2007) par l'enzyme. Deuxièmement, l'étape de séchage permet ensuite une délipidation plus facile et efficace des extraits végétaux. Pour que la

délipidation soit efficace, la teneur en eau résultante dans les extraits séchés doit être très faible (comprise entre 5 et 8%). Généralement les extraits secs sont obtenus après un séchage doux à l'étuve à des températures ne dépassant pas 55°C pour éviter toute dénaturation thermique de la lipase (Ortiz N *et al.*, 1980). Un séchage doux permet de préserver une forme catalytique active des lipases, et ainsi une activité lipasique maximale. D'autres méthodes de séchage plus complexes tel que le séchage par pulvérisation, évaporation ou lyophilisation peuvent aussi être employées et conduisent à l'obtention de produits secs à fortes activités lipolytiques (Fiorillo *et al.*, 2007). Dans le cas où la délipidation (cf chapitre 4.1.3) se fait avec des solvants polaires aprotiques, comme l'acétone (Hassanien & Mukherjee, 1986; Moulin *et al.*, 1992), la déshydratation de l'extrait et l'élimination des lipides se font simultanément. Le séchage dans ce cas est utilisé uniquement pour l'élimination du solvant.

4.1.3 Délipidation du broyat

La délipidation constitue une des étapes clé dans le processus de préparation et de conditionnement des extraits végétaux avant la mise en œuvre de leur activité catalytique pour la synthèse d'esters alkylés. Cette étape importante permet l'élimination des lipides présents dans les extraits végétaux bruts à l'aide d'un solvant organique. Les lipides présents dans la biomasse sèche et broyée sont constitués essentiellement d'acides gras et de TAGs, qui peuvent perturber le processus d'extraction et/ou l'évaluation de l'activité lipolytique des lipases. La délipidation facilite l'extraction en milieu aqueux (Sagiroglu & Arabaci, 2005). Bien que cela ne puisse être généralisé, dans certains cas la délipidation permet aussi d'améliorer l'activité lipasique des extraits végétaux, ainsi que leur stabilité thermique. C'est le cas de la lipase contenue dans les extraits de germe de blé (*Triticum aestivum* L.) (Kapranchikov *et al.*, 2004) ou celle contenue dans les extraits de son de riz (Chong *et al.*, 2007). L'activité catalytique des extraits de germe de blé est améliorée d'un facteur 1,8 après l'élimination des lipides contenus dans l'extrait tandis que l'activité catalytique des extraits de son de riz au cours de l'estérification, est environ 14 fois supérieure à celle des extraits de son de riz non délipidés.

Les solvants les plus efficaces pour la délipidation d'extraits végétaux sont l'éther diéthylique, l'acétone et le n-hexane (Prabhu *et al.*, 1999; Kapranchikov *et al.*, 2004; Sagioglu & Arabaci, 2005) bien que l'éther de pétrole, l'éthanol, le n-butanol et le n-heptane puissent également être utilisés. Le choix du solvant utilisé au cours de cette étape est très important, en raison du risque de dénaturation des enzymes (Cavalcanti *et al.*, 2007). Dans de nombreux cas, le n-hexane semble donner les meilleurs résultats, avec des pertes négligeables de lipases. Certains solvants hydrophiles peuvent entraîner l'élimination de la quasi-totalité de l'eau à la surface des protéines de lipase au cours de l'extraction des lipides ce qui peut entraîner une modification de la conformation active des enzymes ou une dénaturation ultérieure, car un minimum d'eau dans le microenvironnement de l'enzyme est nécessaire pour le maintien de sa conformation active. Selon la méthodologie fréquemment utilisée et décrite par Hassanien et al. (Hassanien & Mukherjee, 1986), l'acétone à froid (-20°C) apparaît aussi comme un bon solvant pour la délipidation. Les biocatalyseurs obtenus après évaporation complète du solvant sont considérés comme des préparations brutes d'extraits lipasiques et sont généralement qualifiés de poudre d'acétone (Ncube & Read, 1995; Jachmanián & Mukherjee, 1996; Enujiugha *et al.*, 2004). Cependant, il faut noter que l'impact de l'acétone lors de la préparation diffère selon les lipases. Sur certaines lipases ce solvant peut avoir un effet négatif qui se traduit par la diminution ou la perte de l'activité catalytique (Moulin *et al.*, 1994) tandis que sur d'autres extraits lipasiques, l'acétone se révèle être le solvant le plus efficace pour la délipidation des extraits (Morgana K. Pierozan *et al.*, 2009) tout en permettant de conserver l'intégralité de l'activité lipasique.

4.2 Méthodes de purification des lipases végétales

Face à l'intérêt grandissant de l'utilisation de lipases en biocatalyse, des travaux de recherche ont été menés sur la purification et la caractérisation de lipases provenant de diverses sources dans le but de mieux comprendre la relation structure-fonction au cours des différentes réactions d'hydrolyse et de synthèse (Saxena *et al.*, 2003). La purification de lipases végétales permet d'obtenir des préparations enzymatique avec des niveaux de puretés comparables à ceux obtenus à partir de microorganismes (Vasudevan, 2004). Dans leur article, Taipa et al. (Taipa *et al.*, 1992) passent en revue les différentes techniques de séparation et de purification qui sont utilisées pour la production des lipases de

microorganismes, de mammifères et de plantes. D'autres travaux comme ceux de Palekar et al (Palekar *et al.*, 2000), et de Saxena et al. (Saxena *et al.*, 2003) examinent plus particulièrement les différentes techniques et stratégies de purification des lipases, principalement celles issues des microorganismes. De ces travaux, il ressort principalement que trois techniques de purification de lipase peuvent être distinguées; la précipitation, la chromatographie sur colonne incluant aussi l'électrophorèse, et la filtration à travers une membrane ou un gel. De nouvelles techniques de purification moins courantes comme l'extraction liquide-liquide, les procédés membranaires et immuno-purification peuvent parfois également être utilisées.

4.2.1 Purification par précipitation

La purification des extraits végétaux enzymatiques par précipitation est une technique de purification partielle (ou pré-purification) qui permet d'obtenir des préparations enzymatiques possédant une meilleure activité catalytique que celle des extraits végétaux bruts de départ quelle que soit la réaction mise en jeu. La précipitation est généralement précédée par l'homogénéisation de l'extrait végétal broyé dans un milieu aqueux dont la composition et le pH permettent de garantir la stabilité et la solubilisation des protéines lipasiques (Staubmann *et al.*, 1999; Abigor *et al.*, 2002). La solution est ensuite filtrée et le surnageant utilisé pour faire précipiter les protéines qu'il contient. La technique la plus employée pour faire précipiter les protéines lipasiques est la précipitation fractionnée à l'aide de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Hasson & Laties, 1976; Abigor *et al.*, 2002; Tuter *et al.*, 2003; Sagiroglu & Arabaci, 2005; Yeşiloğlu & Demirkan, 2010; Pierozan *et al.*, 2011). Les travaux de (Morgana K. Pierozan *et al.*, 2009) ont montré que la purification par précipitation à l'aide de sulfate d'ammonium permet d'obtenir des extraits enzymatiques à partir de grains germés de blé (*Triticum aestivum*) qui ont une activité catalytique de 5 à 6 fois plus importante que celle des extraits bruts au cours de l'estérification de l'acide laurique et du *n*-propanol en milieu sans solvant (Tuter *et al.*, 2003).

Dans la plupart des études où les lipases végétales ont été précipitées à l'aide de sulfate d'ammonium, l'observation de l'activité lipolytique des différentes fractions obtenues a montré que celle-ci dépend de la concentration du sel de sulfate d'ammonium en solution.

Les plus fortes activités lipasiques ont été observées avec les précipités obtenus en utilisant des solutions avec des concentrations de sulfate d'ammonium allant de 60 à 90% (Kapranchikov *et al.*, 2004; Sagioglu & Arabaci, 2005; Yeşiloğlu & Demirkan, 2010; Pierozan *et al.*, 2011). Par suite, le sel peut facilement être éliminé par dialyse en solubilisant à nouveau le précipité. Cependant, il faut noter que l'élimination de l'excès de sel peut parfois entraîner une diminution de l'activité lipasique. Dans leur étude Sagioglu *et al.*, (Sagioglu & Arabaci, 2005) ont observé que l'activité catalytique de la fraction active de l'extrait lipasique de graines de tournesol (*Helianthus annuus*) obtenue après précipitation diminue de 24% après la dialyse visant à éliminer l'excès de sel d'ammonium. Ces derniers en déduisent que ce sel contribue à la stabilisation de lipase lors de la précipitation.

Hormis la précipitation au sulfate d'ammonium, il existe d'autres méthodes de précipitation comme la précipitation sous l'action d'un solvant organique miscible à l'eau comme l'éthanol, le méthanol (Bhardwaj *et al.*, 2001) ou l'acétone (Ncube, 1993; Palocci *et al.*, 2003) ou encore sous l'action de certains polymères tel que le dextrane ou le polyéthylène glycol (PEG) dissouts dans des proportions appropriées (Hills & Mukherjee, 1990). Cependant, les solvants organiques sont de moins en moins utilisés pour éviter tout risque de dénaturation irréversible des protéines lipasiques.

4.2.2 Purification par chromatographie

Presque tous les protocoles de purification des lipases végétales utilisent la chromatographie après l'étape de précipitation (pré-purification). La chromatographie permet de séparer les différentes protéines contenues dans le précipité en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire utilisée. Les techniques les plus utilisées sont la chromatographie échangeuse d'ions (Hasson & Laties, 1976; Suzuki *et al.*, 2004) et la chromatographie d'interactions hydrophobes (Ncube, 1993; Su *et al.*, 2010). La phase stationnaire en chromatographie échangeuse d'anions la plus fréquemment utilisée est le diéthylaminoéthyle (DEAE). A titre d'exemple elle a été utilisée pour la purification de la lipase du blé noir (*Fagopyrum esculentum* Moench), pour la purification de la lipase de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) ou la purification de la lipase de *Ricinus communis* (Hasson & Laties, 1976; Suzuki *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2010). D'autres phases stationnaires échangeuse d'ions avec des

4. MISE EN ŒUVRE DES LIPASES VEGETALES

groupes triéthylaminoethyl sont de plus en plus utilisés dans la purification des lipases (Iftikhar *et al.*, 2011) en raison de leur très bon pouvoir séparatif. La chromatographie d'interactions hydrophobes permet l'obtention de lipases avec un degré de pureté plus élevé que celles obtenues en chromatographie échangeuse d'ions. En utilisant la chromatographie hydrophobique, Bhardwaj , (Bhardwaj *et al.*, 2001), Ncube (Ncube, 1993) ainsi que Su (Su *et al.*, 2010) ont pu identifier et caractériser respectivement les lipases végétales de riz (*Oryza sativa*), de colza (*Brassica napus*) et la lipase de ricin (*Ricinus communis*). En général, une unique étape chromatographique n'est pas suffisante pour obtenir des lipases avec un taux de purification élevé. La plupart des schémas de purification des lipases par chromatographie comprennent une combinaison de plusieurs étapes successives (Saxena *et al.*, 2003). Comme l'ont rapporté Ncube (Ncube, 1993) et Kapranchikov (Kapranchikov *et al.*, 2004), qui ont purifié respectivement la lipase de graines germées de colza (*Brassica napus*) et celle de blé (*Triticum aestivum* L), au moins quatre étapes chromatographiques sont nécessaires pour obtenir une lipase de forte pureté (Hasson & Laties, 1976; Ncube, 1993; Kapranchikov *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004). Ils ont montré dans leurs travaux qu'une combinaison successive de différentes techniques de purification est plus efficace et plus fiable pour l'obtention de lipases végétales pures. Le principal inconvénient de la purification par chromatographie est le coût des adsorbants qui rend l'utilisation de petites colonnes et des injections répétées quasi-obligatoires. Par conséquent, le temps de traitement nécessaire et la possibilité de dégrader le produit avec ou sans modifications structurelles augmentent (Vasudevan, 2004).

En analysant les travaux de Tüter et al. (Tüter *et al.*, 2003) sur l'application de la lipase de cumin noir (*Nigella sativa*) partiellement purifiée dans divers réactions de transestérification, il ressort que les rendements de transestérification de l'acétate de vinyle avec le *n*-octanol obtenus avec des préparations enzymatiques après précipitation dans un cas et après précipitation et chromatographie dans l'autres cas sont identiques dans les mêmes conditions de réactions. Cependant, l'activité catalytique spécifique des préparations obtenues après précipitation et chromatographie est presque 10 fois plus importante que celle obtenue avec les préparations issues uniquement de la précipitation. Ces résultats sont en accord avec l'affirmation de Saxena et al. (Saxena *et al.*, 2003), et Yeşiloğlu et al. (Yeşiloğlu & Başkurt, 2008), selon laquelle l'utilisation de lipases végétales pour des

applications industrielles ne nécessite pas impérativement des préparations de lipases homogènes ou ayant un haut degré de pureté. Les applications industrielles comme la production de biodiesel par exemple n'ont besoin que de lipases dont l'utilisation est efficace; c'est-à-dire des lipases actives et stables dans le milieu réactionnel. Dans ces conditions, la simple purification par précipitation, facile à mettre en œuvre, est adaptée pour la préparation de biocatalyseurs à partir de biomasse destinées à des applications industrielles.

4.2.3 Purification par filtration

La filtration à travers une membrane poreuse fait aussi partie des techniques utilisées pour purifier les lipases (Hasson & Laties, 1976; Ncube *et al.*, 1995; Staubmann *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2004). Plus sélective que la purification par chromatographie, elle permet la séparation des protéines en solution ou en suspension en fonction de leur poids moléculaire. L'utilisation de micro- et ultrafiltrations par (Prabhu *et al.*, 1999) au cours de l'extraction de lipase de son de riz (*Oryza sativa*) a donné des préparations lipasiques avec une activité doublée et une meilleure stabilité au stockage par rapport aux extraits bruts. De même, la purification de la lipase de graines de *Jatropha curcas* (Abigor *et al.*, 2002) par ultrafiltration d'une fraction précédemment obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium a permis de tripler l'activité relative de la lipase contenue dans le surnageant qui était déjà 28 fois supérieur aux extraits bruts. Par contre, cette technique est la plus délicate à mettre en œuvre car elle nécessite la mise au point de conditions expérimentales idoines pour obtenir un gel correctement activé. Même si elle permet d'obtenir des niveaux de pureté extrêmement élevés pour la protéine choisie, cela se fait au détriment du temps de filtration et du volume de l'échantillon à purifier.

5. FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES

Comme pour les lipases microbiennes, la température, la présence d'eau, le pH du microenvironnement, le type et la concentration de l'alcool, le type d'huile ainsi que la

5. FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES

nature du milieu réactionnel sont des facteurs qui affectent les mécanismes mis en jeu et donc les performances des procédés de transestérification enzymatique pour la production de biodiesel (Meher *et al.*, 2006; Villeneuve, 2007; Szczesna Antczak *et al.*, 2009).

Comme très peu d'études portent directement sur l'utilisation de lipases végétales dans la production de biodiesel, nous nous sommes intéressés dans cette partie aux différentes applications des lipases végétales dans la synthèse d'esters alkyliques qui nous permettent d'avoir une idée assez précise sur l'influence de ces paramètres et les conditions de synthèse sur l'activité catalytique de ces enzymes au cours de ces réaction.

5.1 Effets de la température sur l'activité catalytique des lipases végétales

La température a clairement une influence sur l'activité catalytique des lipases végétales. En général, lorsque la température de réaction est supérieure à la température d'activité physiologique de la lipase, le rendement de synthèse à l'équilibre diminue (Athel Cornish-Bowden *et al.*, 2005). La cause la plus communément avancée pour expliquer l'inactivation des enzymes à température élevée est la perte de la conformation active. Cette perte de conformation active serait liée à la rupture des liaisons hydrogènes qui régissent le repliement protéique.

Selon la bibliographique, la gamme de températures à laquelle les lipases végétales restent actives est comprise entre 30 et 55°C. L'activité catalytique maximale des lipases végétales est observée au voisinage des 40°C tel est le cas de la lipase de graines de ricin (*Ricinus communis*), graines de colza (*Brassina napus*), de germe de blé (*Triticum aestivum*) ou du mésocarpe de noix de palme (*Elaeis guineensis*) (Tüter, 1998; Ngando Ebongue *et al.*, 2006; Morgana K. Pierozan *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009). Toutefois des travaux de recherches ont montrés que certaines lipases végétales telles que la lipase de balle de riz (Bhardwaj *et al.*, 2001), la lipase de grains de cumin noir (Ei *et al.*, 1998) ou celle des latex de frangipanier (Cambon *et al.*, 2006) et de papaye (*Carica papaya*) (Gandhi & Mukherjee, 2000; Abdelkafi *et al.*, 2011) ont une activité catalytique maximale en synthèse à des température supérieure à 60°C. En générale, les lipases ont une stabilité thermique plus élevé en milieu organique qu'en milieu aqueux car la thermostabilité d'une enzyme est plus importante lorsque

5. FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES

l'enzyme est intrinsèquement rigide sous sa forme active, autrement dit si l'environnement interdit la flexibilité de l'enzyme. C'est le cas des lipases lorsqu'elles sont immobilisées sur un support (Alloue *et al.*, 2008) ou des lipases libres mais en milieu faiblement hydraté. Turner et al. (Turner & Vulfson, 2000) ont démontré que la température à laquelle une protéine subissent une dénaturation thermique est fortement dépendante de la quantité d'eau associée à la protéine. Ainsi, dans des conditions relativement sèches, certaines lipases comme c'est le cas des lipases microbiennes de *C. antarctica* lipase ou de *Rhizomucor miehei* ne sont dénaturées qu'à très hautes températures entre 111 et 118°C, voir 130°C, tandis que dans l'eau, la dénaturation de celles-ci a lieu à des températures beaucoup plus basses, dès 53°C et 61°C (Turner & Vulfson, 2000).

5.2 Effets de l'eau sur l'activité catalytique des lipases végétales

L'eau représente un paramètre critique lors de la catalyse enzymatique et son importance en milieu organique a été démontrée par plusieurs auteurs (Green & Nakajima, 1998; Villeneuve *et al.*, 1998). Celle-ci a une forte influence sur l'activité catalytique et sur la stabilité de la lipase en affectant soit directement l'hydratation et donc la conformation de la lipase (Tüter, 1998; Abigor *et al.*, 2002; Palocci *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2010), soit indirectement la composition du milieu réactionnel avec pour conséquence de déplacer l'équilibre de réaction dans le sens de l'hydrolyse qui n'est pas la réaction souhaitée; (Kaieda *et al.*, 1999; Shah & Gupta, 2007). Dans la littérature il existe deux manières d'exprimer l'état d'hydratation d'un mélange réactionnel au cours de la production lipasique de biodiesel. Soit sous forme d'activité thermodynamique de l'eau (a_w) définie comme étant un rapport de la pression de vapeur du système par rapport à celle de l'eau pure (p/p_{H_2O}); ou comme la teneur en eau exprimée sous forme de pourcentage (%). Mais le plus important est qu'une quantité minimale d'eau, qui peut varier d'un système à un autre, est nécessaire pour avoir une activité optimale de l'enzyme (Valivety *et al.*, 1994; Bajaj *et al.*, 2009; Szczesna Antczak *et al.*, 2009).

5.2.1 Effets de la teneur en eau dans le milieu réactionnel

La teneur de l'eau dans le mélange réactionnel est un des facteurs les plus importants à contrôler pour optimiser le taux de conversion des TAG et le rendement en esters éthyliques au cours de la réaction de transestérification par catalyse lipasique. Pour avoir une conformation stérique active, une hydratation minimale de l'enzyme est indispensable (Caro *et al.*, 2002). Le bioéthanol qui est utilisé comme réactif est difficile à obtenir et à conserver anhydre, il est généralement contaminé avec de l'eau. Il est donc nécessaire pour la synthèse de biodiesel éthylique par catalyse lipasique de bien connaître la teneur en eau du bioéthanol utilisé. Lorsque la lipase est trop hydratée, une partie de l'eau est sous forme de film de molécules liées à l'enzyme par des interactions de faibles énergies et cette eau libre peut être utilisée par le biocatalyseur comme substrat en favorisant la réaction d'hydrolyse (Shimada *et al.*, 1999).

Très peu d'études utilisant des lipases végétales ont évalué l'effet de la teneur en eau sur l'activité catalytique au cours de réaction de synthèse. Muhammad (Liaquat, 2010) a observé que le rendement de synthèse d'un ester le (Z)-3-hexen-1-yl caproate par la lipase de colza (*Brassica napus*) n'est pas affecté par l'ajout d'eau jusqu'à 30% en masse par rapport à l'acide caproïque. Dans une de ces études Tüter a évalué la teneur en eau pour laquelle l'activité catalytique de la lipase contenue dans les grains de ricin (*Ricinus communis*) au cours de l'estérification d'un mélange d'acides gras avec le glycérol est maximale (Tüter, 1998). Il a observé que la teneur en eau optimale se situe autour de 13% comparable à celle de *Thermomyces lanuginosus* une lipase microbienne (Verdugo *et al.*, 2010).

5.2.2 Effets de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w)

Pour les réactions de synthèses en milieu anhydre, et avec des réactifs anhydres, la présence d'eau est strictement limitée à celle provenant des préparations enzymatiques. Ainsi l' a_w exprimé dans les études de l'activité catalytique des lipases végétales traduit la quantité d'eau présente dans le microenvironnement de l'enzyme. Pour fixer l' a_w d'une préparation enzymatique, il suffit de pré-incuber la préparation dans un milieu à humidité fixée en utilisant une solution saturée en certains sels dont l' a_w est connu (Caro *et al.*, 2002).

5. FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES

Lorsque la phase aqueuse est limitée à celle nécessaire à la structuration tridimensionnelle active de la protéine, les lipases catalysent des réactions de transferts d'acyles. Dans ces conditions de mise en œuvre, l'eau contenue dans le biocatalyseur n'est pas utilisée comme substrat pour la réaction d'hydrolyse compétitive. Il existe pour chaque lipase une valeur optimale de l'activité de l'eau pour laquelle le maximum d'activité enzymatique est obtenu (Bajaj *et al.*, 2009). L'activité catalytique en fonction de l' a_w décrit une courbe gaussienne avec une valeur d' a_w où l'activité catalytique est maximale. Comme pour la plupart des lipases étudiées au cours de la synthèse d'esters alkyls décrits dans la revue de Szczesna Antczak *et al.* (Szczesna Antczak *et al.*, 2009), l' a_w optimal des lipases végétales dans la littérature est compris entre 0,22 et 0,44. L'évaluation de l'influence de l' a_w sur les performances de lipases végétales en particulier celle du latex de papaye (*Carica papaya*) est très bien décrite dans le travail de Caro (Caro *et al.*, 2002). L'activité optimale en alcoololyse est obtenue pour un a_w égal à 0,22. Pour les valeurs d' $a_w > 0,22$ une diminution progressive des rendements de synthèse d'esters est observée, le rendement est quasi nul pour un a_w égal à 0,7. Le même comportement au cours de l'application des lipases de latex de babaco (*Carica pentagona*), de grains germés de *Jatropha curcas*; de blé (*Triticum aestivum* L.), de colza (*Brassica napus*) et de son riz (*Oryza sativa*) a été observé. Les activités catalytiques de ces lipases décroissent pour des valeurs d' a_w supérieures à 0,5, (Ncube, 1993; Staubmann *et al.*, 1999; Cambon *et al.*, 2006; Morgana K. Pierozan *et al.*, 2009).

5.3 Effets du pH du microenvironnement sur l'activité catalytique des lipases végétales

Le pH est un facteur très influent sur l'activité lipasique que ce soit en milieux aqueux, ou en milieux organique. Le pH est responsable de l'état d'ionisation d'une lipase, les charges électrostatiques des groupes polaires contenus dans les molécules lipasiques régissant le bon repliement de la molécule enzymatique pour lui conférer sa forme tridimensionnelle active (Tüter, 1998; Abigor *et al.*, 2002; Palocci *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2010). Comme en milieux aqueux, il est important en milieux organiques que le repliement de la molécule enzymatique soit celui de la conformation active, donc la configuration qui permet une activité hydrolytique maximale à pH optimal en milieux aqueux. Selon Antczak *et al.*, l'état

5. FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES

d'ionisation des lipases peut affecter le taux de conversion des réactions qui se déroulent dans des milieux non aqueux (Antczak *et al.*, 2009). A titre d'exemple, l'activité lipasique en estérification des extraits végétaux du ricin est maximale lorsque ceux-ci sont préalablement conditionnés dans un tampon à pH 4 pendant 4 heures (Tüter, 1998) (63% de taux de conversion) alors que l'activité est quasi nulle (2%) s'ils ne sont pas pré-incubés. Les enzymes, en milieu organique, disposent d'une «mémoire de pH», c'est-à-dire que leur activité catalytique reflète le pH de la dernière solution aqueuse à laquelle ils ont été exposés (Zaks & Klivanov, 1985; Klivanov, 1997). Il est donc important de travailler en milieu non aqueux en ajustant au préalable le pH du microenvironnement de la lipase par pré-incubation dans une solution tampon à un pH approprié (Xu & Klivanov, 1996) avant de la sécher. Ce phénomène de mémoire du pH est due au fait que les groupes de protéines ionogènes des enzymes conservent leur dernier état d'ionisation après la déshydratation et le placement en milieux organique (Klivanov, 2001).

5.4 Effets de l'alcool sur l'activité catalytique des lipases végétales

5.4.1 Type d'alcool

La structure de l'alcool utilisé pour la synthèse d'ester a un effet sur l'activité lipasique, particulièrement la longueur de la chaîne (Gandhi & Mukherjee, 2000, 2001a; Gandhi & Mukherjee, 2001b; Su *et al.*, 2010) et la position des groupes hydroxyles (Gandhi & Mukherjee, 2000, 2001a; Caro *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009a; Liaquat, 2010). Par exemple, les extraits de colza (*Brassina napus*), estérifient plus efficacement les alcools primaires (propan-1-ol et le butan-1-ol) que des alcools secondaires ou tertiaires (propan-2-ol, le tert-butanol ou de tert-hexanol) (Liaquat, 2010).

Au cours de leurs travaux, Caro *et al.*, ont observé des rendements croissants au fur et à mesure que les longueurs des chaînes alkylles des alcools utilisés augmentent (1%, 12%, 40% et 88% respectivement avec le méthanol, l'éthanol, le propanol et le butanol). La synthèse d'esters alkylique est plus favorable avec les alcools à longue chaînes de carbones (Caro *et al.*, 2004).

5. FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES

Il existe cependant quelques exceptions à cette règle; Liaquat (Liaquat & Apenten, 2000) a observé que le rendement de synthèse d'ester à partir de la lipase issue de graines de lin diminue à mesure que le nombre d'atomes de carbone de l'alcool augmente. De même, les extraits graines de colza (*Brassina napus*) (Liaquat, 2010) ont une sélectivité particulière pour les alcools avec une chaîne carbonée de longueur comprise entre C3 à C6, le rendement de synthèse d'ester diminue lorsqu'on passe à des alcools à 7 ou 8 carbones.

5.4.2 Influence du ratio molaire alcool/TAG

Certaines lipases sont désactivées lorsqu'elles sont mises en présence de concentration élevée d'alcool (Watanabe *et al.*, 1999). Les alcools à chaînes courtes comme le méthanol, ou l'éthanol sont faiblement miscibles aux huiles végétales, il en résulte dans les premiers instants de la préparation de biodiesel un système biphasique TAG-alcool. Sous l'effet de l'agitation, les gouttelettes de méthanol non dissoutes qui se forment ont la capacité de se lier avec les protéines lipasiques et conduire soit à la déshydratation des lipases (Cambon *et al.*, 2009) ou provoquer un effet barrière qui empêche les TAG (hydrophobe) d'accéder au site actif de l'enzyme. Dans les deux cas, cela peut entraîner une perte drastique de l'activité enzymatique. Mais lorsque l'alcool se solubilise complètement dans la phase huileuse, ce qui est le cas des alcools à longue chaîne de carbone, l'effet dénaturant vis-à-vis de l'enzyme est considérablement réduit (Gandhi & Mukherjee, 2000, 2001a). Une des stratégies élaborée par (Shimada *et al.*, 1999) pour surmonter ce problème d'inhibition des lipases par les alcools sur la lipase microbienne de *Candida antarctica*, est l'ajout progressif de méthanol par intervalle de temps. Cette méthode dite des «ajouts dosés» s'avère être très efficace car elle permet d'atténuer l'inactivation de la lipase (Watanabe *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 2002). La dite méthode d'ajouts dosés a été testée et validée sur la lipase végétale du latex de babaco (*Carica pentagona*) par Cambon *et al.* (Cambon *et al.*, 2009). Le rendement en esters de 0.5% obtenu initialement au bout de 24H avec un ratio molaire TAG/Alcool de 1:27 augmente considérablement jusqu'à 63% au bout de 15h après six ajouts de 1,33 moles de méthanol par intervalles de temps. Dans cette étude, les auteurs ont observé aussi que le rendement de synthèse augmente avec le nombre de carbone de la chaîne linéaire de l'alcool (méthanol 0,5%, éthanol 12,3%, propanol 39,6% et butanol 87,7%). Ainsi, en théorie

la possibilité d'améliorer le rendement de synthèse de biodiesel à partir d'éthanol en utilisant cette même stratégie d'ajouts dosés est envisageable.

5.5 Effets de la nature et de la qualité du substrat lipidique sur l'activité catalytique des lipases végétales

En fonction de la nature du substrat TAG, DAG, MAG ou AGL, de sa composition en acides gras, ou de l'éventuelle position de la double liaison sur la chaîne carbonée des acides gras, l'activité catalytique des lipases végétales peut varier (Barros M *et al.*, 2010). On parle alors de spécificités particulières des lipases vis-à-vis de leurs substrats. D'après les travaux de P. Hellyer et al. (Hellyer *et al.*, 1999a), les lipases végétales issues de graines ont généralement une sélectivité à hydrolyser les TAG contenant les acides gras dominants de la graine dont elles sont issues. Ce qui n'est pas le cas pour les lipases microbiennes ou animales. Par exemple, la lipase de ricin a une sélectivité pour la triricinoleine; la lipase de noix de palme avec une sélectivité pour la tricaproïne ou la trilaurein; la lipase d'orge une sélectivité pour la tricaproïne et la lipase de *Vernonia galamensis*, une plante à graines oléagineuses de la famille des *Asteraceae*, a une sélectivité pour la trivernolein. Cette préférence pour un substrat donné n'est souvent limitée qu'aux premiers instants de la réaction. Ensuite les lipases sont capables d'hydrolyser une grande variété de TAG.

La spécificité des lipases végétales vis-à-vis d'un acide gras particulier ou d'un un groupe d'acides gras (aussi connu sous le terme de typosélectivité) peut être utile dans la production de biodiesel à l'échelle industrielle car la presque totalité des huiles sont d'origine végétale. Dans ce cas les lipases végétales en particulier celles issues des graines oléagineuses seraient mieux adaptées pour la production de biodiesel à partir d'huile végétale provenant du même type de graines. Il existe aussi des lipases végétales comme celles de *Jatropha curcas* (Staubmann *et al.*, 1999), de colza (*Brassica napus*), de graines de Pin (Barros M *et al.*, 2010) qui sont considérées comme des lipases non-spécifiques. Grâce à la flexibilité de telles lipases à accepter des substrats de différentes sources et de diverse nature, les huiles de fritures a forte teneur en AGL, les distillats acides gras, les graisses animales qui pourraient être utilisées comme matières premières dans la production de biodiesel.

5. FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES

La qualité de l'huile doit aussi être prise en considération pour une conversion efficace en biodiesel sous l'action des lipases végétales. Si la teneur en acides gras pose moins de problèmes en catalyse lipasique qu'en catalyse chimique, d'autres composés comme les phospholipides, ou des composés d'altération oxydative (peroxydes notamment) peuvent avoir des effets inhibiteurs sur l'activité catalytique des lipases. Watanabe et al., ont constaté que la transestérification par la lipase microbienne de *Candida antarctica* de l'huile de soja n'était possible (93,8%) que lorsque l'huile était préalablement dégommée (Watanabe *et al.*, 2002).

5.6 Effets du solvant sur l'activité catalytique des lipases végétales

La stratégie la plus intéressante pour la production de biodiesel est celle qui consiste à travailler en milieu fondu c'est-à-dire sans solvant. Cependant à cause des problèmes entre autres d'inhibition (liés à l'alcool ou au glycérol produit), de diffusion ou de miscibilité des réactifs, l'utilisation de solvants organiques peut être avantageuse. Dans ce cas, il faut de préférence choisir un solvant inoffensif, dans lequel la lipase reste active. Ceci est généralement le cas pour les solvants avec des valeurs de $\log(P) > 3$ (Villeneuve, 2007). Le $\log(P)$ d'un solvant est le coefficient de partage du solvant entre l'octan-1-ol et l'eau, c'est un bon moyen pour estimer la polarité d'un solvant. Pour la transestérification d'huile végétale avec un alcool, les solvants organique tels que le n-hexane ($\log(P) = 3,5$) et le n-heptane ($\log(P) = 4$) sont de bon candidats. Ils solubilisent les TAG et l'alcool et assurent un bon contact entre les deux substrats ce qui limite l'effet inhibiteur de l'alcool sur l'activité lipasique. Yeşiloğlu et al., ont montré que la lipase végétale isolée à partir de noix de noyer royal (*Juglans regia* L.) sont stables dans l'hexane, mais que cette stabilité diminue lorsque la polarité du solvant augmente. À l'exception de certains alcools secondaires ou tertiaires à l'exemple de l'isopropanol ($\log(P) = 0,05$) ou le tert-butanol ($\log(P) = 0,35$) qui sont particulièrement bons solvant pour la transestérification des TAG avec un alcool. Ces solvants bien que de forte polarité ne peuvent pas réagir avec le biocatalyseur car ces alcools ne sont pas des substrats pour la plupart des lipases, ils n'ont pas un effet important sur la désactivation de l'enzyme et de plus leur élimination en fin de réaction n'est généralement pas problématique. En considérant l'isopropanol comme milieu de référence (stabilité 100%), Yeşiloğlu et Demirkan ont montré que la lipase de noyer royal (*Juglans regia* L.) a une

5. FACTEURS QUI INFLUENT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES LIPASES VEGETALES

stabilité 96% dans le butanol ($\log(P)=0,84$), 88% dans l'acétone ($\log(P)=-0,24$), 83% dans N, N-diméthylformamide ($\log(P)=-1,01$), et 75% dans le méthanol ($\log(P)=-0,74$) (Yeşiloğlu & Demirkan, 2010). Ainsi, les solvants organiques polaires peuvent dénaturer les enzymes.

L'utilisation de liquides ioniques dans les procédés catalysés par les lipases suscite un intérêt croissant en tant que solvants «verts», mais le coût de ces liquides ioniques est encore prohibitif pour envisager de les utiliser dans les procédés de production de biodiesel. Toutefois, les lipases ont montré une meilleure activité, stabilité et sélectivité dans ces liquides ioniques par rapport aux solvants organiques classiques (Yang & Pan, 2005; Nakashima *et al.*, 2009; Sureshkumar & Lee, 2009; De Los Rios *et al.*, 2011).

6. SYNTHÈSE DE L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le biodiesel est un carburant, provenant de matières premières végétales et obtenu par transestérification d'huiles végétales avec de l'alcool. Ce biocarburant peut être utilisé en substitution au gasoil dans les moteurs diesel sans avoir besoin de les modifier. Avec la raréfaction des sources d'énergies fossiles bon marché et la prise en considération de l'impact sur l'environnement de leur usage, le biodiesel fait l'objet d'une attention croissante dans le monde entier, et le produire suivant un procédé écologique simple et efficace rendrait son développement plus rapide.

Le choix de l'alcool pour la production de biodiesel entre le méthanol et l'éthanol est favorable à l'éthanol. Le méthanol est certes très répandu en raison de son coût de production, relativement modique. Cependant il issu de l'industrie pétrochimique et présente une empreinte carbone défavorable, associée à des propriétés neurotoxiques, qui le rendent inadapté aux procédés écologiques de production de biodiesel. L'éthanol, en revanche, peut être aisément extrait de la biomasse, typiquement dans l'industrie sucrière, sans poser de problème environnemental ou sanitaire majeur. Les résultats obtenus dans la plupart des cas de transestérification lipasique montrent que la transestérification éthanolique des TAG fonctionne mieux par rapport à la transestérification utilisant le méthanol. La catalyse lipasique, contrairement aux voies catalytiques chimiques, est adaptée

6. SYNTHÈSE DE L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

à la production de biodiesel éthylique avec l'obtention d'un produit d'une meilleure pureté suivant un procédé simple, faible consommateur d'énergie et écologique.

L'étude bibliographique a mis en évidence que très peu de travaux concernant l'utilisation de lipases végétales dans la production de biodiesel ont été publiés. Pourtant les lipases végétales dotées d'une activité acyltransférase représentent une alternative aux lipases microbiennes au cours de la synthèse d'esters alkyliques pour des applications carburants. Contrairement aux lipases microbiennes obtenues par le biais de techniques génétiques complexes et coûteuses, les lipases végétales sont faciles à mettre en œuvre et peuvent être utilisées brutes ou partiellement purifiées. Les lipases végétales possèdent les caractéristiques nécessaires pour être utilisées comme biocatalyseur dans la production de biodiesel puisque qu'elles:

- i) sont capables de catalyser les réactions de transestérification des TAG et d'estérification des AGL avec un alcool,
- ii) sont actives et stables en milieu organique faiblement hydraté et peuvent être mise en œuvre dans des conditions de réaction douces,
- iii) possèdent une spécificité d'action qui permet l'obtention d'un produit de grande pureté sans la formation des réactions secondaires
- iv) et enfin elles sont localement disponibles et mobilisables à faible coût par rapport aux lipases microbiennes.

La transestérification par catalyse lipasique est aujourd'hui en plein essor, et les travaux de recherche menés dans le but de maximiser les rendements de synthèse d'esters alkyliques par les lipases végétales ont montré qu'en milieu sans solvant, certains paramètres réactionnels ou facteurs ont une influence significative sur l'efficacité catalytique des lipases végétales au cours de la transestérification. Il s'agit de:

- i) la concentration initiale en alcool dans le milieu, souvent illustrée par le ratio molaire alcool/TAG, qui peut avoir un effet inhibiteur sur les lipases à condition que l'alcool soit progressivement ajouté dans le milieu réactionnel (c'est la méthode d'ajouts dosés),

6. SYNTHÈSE DE L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- ii) la quantité d'eau dans le milieu réactionnel (a_w ou teneur en eau) responsable de la flexibilité de la molécule lipasique, qui lorsqu'elle est trop importante dans le microenvironnement de l'enzyme peut déplacer l'équilibre de la réaction de transestérification vers l'hydrolyse des réactifs ou des produits,
- iii) la température de réaction qui au-dessus d'un certain seuil entraîne la dénaturation de l'enzyme.
- iv) le pH du microenvironnement de l'enzyme responsable de l'état d'ionisation de l'enzyme et lui confère ou pas sa conformation catalytique active.

Ainsi les lipases végétales représentent une alternative prometteuse, et bon marché, pour la production de biodiesel. La mise en œuvre du procédé de production de biodiesel à l'aide de lipases végétales nécessite de faibles coûts d'investissements ce qui le rend donc potentiellement plus facile à vulgariser et à utiliser à petite ou grande échelle, particulièrement dans les pays en voies de développement. Associé à l'opportunité d'introduire le bioéthanol à la place du méthanol, le biodiesel par catalyse lipasique peut être produit à partir de ressources 100% d'origines végétales et disponibles localement.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL

1.1 Biomasses végétales étudiées

Les extraits végétaux bruts utilisés comme biocatalyseurs lipasiques pour l'hydrolyse et la transestérification des TAG dans cette étude sont issus de graines dormantes ou germées de huit biomasses végétales disponibles localement. Ces biomasses sont présentées ci-après.

Les graines d'arachide, et les noyaux de mangues ont été obtenus sur le marché local de Ouagadougou, tandis que les graines sèches de moringa ont été reçues de la fondation DREYER et celles de jatropha et d'anacarde ont été reçues de l'ONG Tiipalga (New Tree). Les graines de balanites, neem, et karité ont été prélevées à partir fruits mûrs récoltés sur plusieurs arbres aux abords de la concession du site de 2iE à Kamboinsin.

1.1.1 Le karité (*Vitellaria paradoxa*)

Le karité (*Vitellaria Paradoxa*) est l'unique espèce connue du genre *Vitellaria* de la famille des *Sapotaceae* qui pousse en Afrique de l'ouest. C'est l'un des arbres caractéristiques des parcs agro-forestiers des savanes du Burkina Faso.

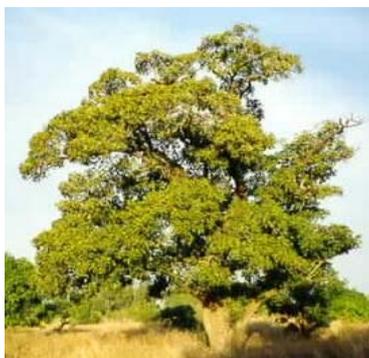


Photo 1 : Arbre de karité
(Blin & Girard, 2011)



Photo 2 : Noix de karité
(Blin & Girard, 2011)

La taille de l'arbre varie entre 15-25 mètres de haut et son fruit renferme une amande très prisée car elle sert à produire du beurre qui rentre dans la fabrication d'huiles (beurre) et de

savons. La teneur en matière grasse de ces amandes par rapport à la masse des amandes sèches est d'environ 45% m/m (Di Vincenzo *et al.*, 2005). Selon les statistiques de la FAO (Organisation des Nations Unie pour L'Alimentation et l'Agriculture), le principal producteur de graines de karité est le Nigéria avec 425 000 tonnes en 2008 soit plus de 50 % de la production africaine, le Mali et le Burkina Faso sont également des producteurs majeurs avec respectivement 190 000 et 70 000 tonnes en 2008.

1.1.2 L'anacarde (*Anacardium occidentale*)

L'anacarde, *Anacardium occidentale* appartient à la famille des *anacardiaceés* dont fait également partie le manguier (*Mangifera indica*). Originaire du Brésil, cet arbre de par sa résistance aux périodes de sécheresse est aujourd'hui cultivé en Afrique de l'ouest pour la production de « noix de cajou » destinée à l'exportation. Selon le rapport de la coopération allemande GIZ (Deutsche Gesellschaft Für Internationale Zusammenarbeit GmbH, 2011), près de 40 % de la production mondiale de noix de cajou estimée à plus de 4,2 millions de tonnes proviennent de la production africaine (Faostat, 2013).



Photo 3 : Anacardier



Photo 4 : Noix de cajou accrochées à la pomme

La noix de cajou est le fruit de l'anacardier au sens botanique du terme. C'est un akène se développant en premier à l'extrémité d'un pédoncule juteux appelé pomme de cajou qui lui aussi est comestible (cf. Photo 4). L'amande contenue dans la noix de cajou est riche en lipides, en moyenne 46,5% m/m (Toschi *et al.*, 1993). L'huile extraite de l'amande est traditionnellement utilisée en pharmacopée indienne, en application directe sur la peau et en massage ayurvédique.

1.1.3 Le balanités (*Balanites aegyptiaca*)

Le balanités (*Balanites aegyptiaca*) est un arbuste de 6 à 10 mètres de hauteur, très résistant à la sécheresse qui prospère particulièrement dans les régions où le climat est de type sahélien et soudano-sahélien. Le Balanites ne fait pas actuellement l'objet d'une exploitation commerciale à cause des difficultés à extraire l'amande de la pulpe et de la coque fibreuse et épaisse.



Photo 5 : Fruits du balanités
(Blin & Girard, 2011)



Photo 6 : Plant de Balanites
(Blin & Girard, 2011)

Le fruit du Balanites a la forme d'une datte, c'est pourquoi il est aussi souvent appelé « dattier sauvage » ou « dattier du désert ». Ce fruit renferme un noyau à la coque très dure dans lequel se trouve une graine riche en huile. La graine de Balanites contient plus de 38,5 % m/m de matière lipidique (Kadri Nouhou).

1.1.4 L'arachide (*Arachis hypogaea*)

L'arachide (*Arachis hypogaea*) est une légumineuse annuelle dont le fruit mûrit en terre. Selon les données statistiques de la FAO, le Nigeria et le Sénégal sont les plus grands exportateurs d'arachide en Afrique avec respectivement 2,9 million de tonnes et 527 528 tonnes produites en 2011 (Faostat, 2013). La production du Burkina Faso est estimée à environ 265 322 tonnes d'arachides non décortiqué en 2011.



Photo 7 : Grains d'arachides
(Blin & Girard, 2011)



Photo 8 : Plans d'arachides
(Blin & Girard, 2011)

Les graines d'arachides servent surtout de matière première pour la production d'huile végétale destinée à l'alimentation. Les graines d'arachides contiennent entre 48-50 % m/m d'huile.

1.1.5 Le moringa (*Moringa oleifera*)

Le *Moringa oleifera*, souvent appelé simplement moringa, est une espèce de petit arbre à croissance rapide pouvant mesurer jusqu'à 10 mètres.



Photo 9 : Fruit sec de moringa
(Oshadi, 2013)



Photo 10 : Plant de moringa
(Oshadi, 2013)

C'est une espèce de la famille des *Moringaceae*, originaire du nord de l'Inde qui s'est acclimatée dans presque toutes les régions tropicales où elle a été introduite. Le moringa est cultivé en Afrique de l'ouest principalement pour ses feuilles auxquelles on attribue des propriétés nutritionnelles «exceptionnelles». Celles-ci sont utilisées pour lutter contre la malnutrition chez les nourrissons et les mères allaitantes. Les fruits de moringa sont faits de gousses qui contiennent entre 12 et 35 graines avec environ 30 à 40% m/m d'huile (Fahey, 2005).

1.1.6 Le jatropha (*Jatropha curcas*)

Le *Jatropha curcas* est un arbuste caducifolié (cf. Photo 12) de la famille des *euphorbiacées*, à croissance rapide. Sa hauteur peut varier de 2 à 3m à l'âge adulte. C'est une espèce originaire de l'Inde et actuellement répandue en Afrique de l'ouest où elle a été introduite pour constituer des haies vives pour protéger les périmètres maraichers des animaux errants et plus récemment pour la production d'huile utilisée comme matière première dans la production de biocarburants. Ses graines contiennent environ 50 à 58 % m/m d'huile non comestible.



Photo 11 : Haie de *Jatropha curcas*
(Photo 2iE, 2010)

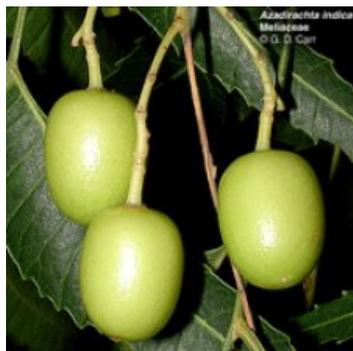


Photo 12 : Graines de *Jatropha curcas* 5
(Photo 2iE, 2010)

Le *Jatropha curcas* est considéré comme une biomasse prometteuse pour la production d'huile végétale non conventionnelle à usage carburant étant donné qu'il apparaît peu exigeant sur le plan agro-écologique. Le jatropha fait l'objet d'importants programmes de plantation dans certains pays de l'Afrique de l'ouest (le Mali, le Burkina Faso, le Ghana et le Sénégal).

1.1.7 Le Neem ou margousier (*Azadirachta indica*)

Le Neem (*Azadirachta indica*) ou margousier est un arbre de la famille des *Meliaceae* qui ne pousse qu'en région chaude. Cet arbre originaire de l'Inde a été introduit en Afrique de l'ouest au cours du XIXe siècle comme arbre ornemental. Il possède la capacité de croître sur des sols pauvres en nutriments des habitats arides. C'est un arbre qui peut atteindre 20 mètres de hauteur et 2,5 mètres de circonférence de tronc.



**Photo 13 : Fruits frais de Neem
(Le Site De Référence Du Neem)**



**Photo 14 : Neemier
(Greenpro, 2009)**

Largement rependu au Burkina Faso, le neem possède un potentiel d'utilisation immense. Il est principalement connu pour les propriétés antiparasitaires ou insecticides de l'huile extraites de ses graines. En Inde, le neem a été identifié comme biomasse pour la production de biodiesel (Karmakar *et al.*, 2012) du fait de la teneur en huile de ces graines qui est comprise entre 30 à 40% m/m (Koul *et al.*, 1990; Muthu *et al.*, 2010).

1.1.8 La mangue ou (*Mangifera indica*)

Le manguier (*Mangifera indica*) est un arbre de la famille des *Anacardiaceae*, originaire d'Asie, largement cultivé dans les pays tropicaux pour son fruit, la mangue. Le manguier est un grand arbre qui peut atteindre 10 à 25 mètres de hauteur.



**Photo 15 : Manguier
(Photo 2iE, 2010)**



**Photo 16 : Noyaux de mangue
(Photo 2iE, 2010)**

Le Burkina Faso dispose d'un potentiel de production d'environ 120 000 tonnes de mangue par an avec une capacité de production (encore artisanale) de 4 à 20 tonnes de mangues séchées par an. Le noyau de mangue constitue entre 15 et 20% des déchets produits lors de la transformation de la mangue.

Notons que le manguiier n'est pas une plante oléagineuse au sens propre du terme, mais l'amande du noyau de son fruit contient environ 11,6% m/m d'huile (Hemavathy *et al.*, 1987) appelée beurre de mangue. Il existe une grande variété de manguiiers, mais celle que l'on rencontre majoritairement dans la sous région et qui a servie pour notre étude est la variété « Kent ».

1.2 Produits chimiques et substrats lipidiques

Tous les produits chimiques, solvants et alcools utilisés sont de grade analytique et ont été achetés chez Sigma, St Louis, MO, USA. Les plaques de silice haute performance (HPTLC plates, 20×10 cm Silica gel 60 F₂₅₄) ont été achetées chez Merck (Darmstadt, Germany). L'huile végétale utilisée (huile de tournesol, Lessieur®) a été achetée dans un supermarché local (Pour 100mL valeur énergétique 3404 KJ; Protéines: 0 g ; glucides: 0 g, lipides 92 g dont saturés 10g, mono-insaturés 24 g, poly-insaturés 58 g. Fibre alimentaires 0 g, sodium 0 g).

2. METHODES

2.1 Préparation des extraits végétaux

Les graines de chacune des biomasses ont été triées afin de ne conserver que celles en bon état et non endommagées et ne présentant pas de signes extérieurs de moisissures. Celles-ci ont ensuite été réparties en deux lots. Un premier lot de graines non germées dites dormantes qui ont été utilisées telles quelles pour la préparation des extraits bruts et un second où les graines ont été incubées pendant 3 à 4 jours entre deux feuilles de papier absorbant humides pour amorcer la germination. Ces graines sont dites germées.

Les graines dormantes ou germées, issues de nos différentes biomasses végétales, sont décortiquées puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique à hélice (Moulinex[®], modèle 843) jusqu'à l'obtention d'un broyat homogène. Ce broyat est séché dans une étuve ventilée (HERAEUS, UT6) à 35°C pendant 24 heures. Des fractions aliquotes de 10 g de broyat sec sont ensuite pesées et placées dans des cartouches en cellulose fermées par du coton puis introduites dans un Soxhlet pour l'extraction des lipides contenus dans le broyat. Cette extraction est réalisée à reflux avec environ 200 mL d'hexane pendant 6 à 8 heures. Le broyat ainsi délipidé, est séché à l'air libre sous une sorbonne pendant une nuit pour éliminer les traces de solvant. Les extraits enzymatiques ainsi obtenus sont à nouveau broyés jusqu'à obtention d'une poudre dont la taille des particules a une granulométrie inférieure à 600 µm. Chaque extrait enzymatique est alors conditionné dans des boîtes en plastiques hermétiquement fermées et stockées au frigo à 4°C jusqu'à utilisation.

2.2 Caractérisation chimique de la matière grasse

2.2.1 Mesure de l'acidité de l'huile

L'acidité de l'huile est mesurée en déterminant le pourcentage d'acides gras libres contenu dans celle-ci, selon la norme Française NF T60-204 de décembre 1985. Par convention, l'acidité d'un corps gras est exprimée en pourcentage d'acide oléique.

Dans un erlenmeyer de 100 mL, 2 g d'huile (PE) sont mis en solution dans 40 mL d'un mélange d'éther diéthylique/éthanol (50/50 v/v) en présence de quelques gouttes de phénolphthaléine. Les acides gras libres sont ensuite titrés à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,1 N sous agitation magnétique, jusqu'au virage de l'indicateur (phénolphthaléine) vers une coloration rose persistante. Parallèlement et simultanément, un essai à blanc sans corps gras est effectué pour déterminer le volume de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation de la même quantité d'éther diéthylique/éthanol utilisée.

L'acidité, exprimée en pourcentage par rapport à la masse est égale à :

$$\text{Acidité (\%)} = \frac{(V - V_0) * N * M}{1000} * \frac{100}{PE} = \frac{(V - V_0) * N * M}{10 * PE}$$

- V = volume en mL de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée lors du titrage de l'huile.
- V₀ = volume en mL de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée lors de l'essai à blanc
- N = normalité exacte en mol/l de la solution d'hydroxyde de potassium
- M = masse molaire en g/mol de l'acide oléique soit 282 g/mol (acide gras adopté pour l'expression des résultats)
- PE = prise d'essai en gramme (g)

2.2.2 Mesure des indices d'iode et de peroxyde de l'huile

2.2.2.1 Mesure de l'indice d'iode

La détermination de l'indice d'iode (I_i) a pour objet la détermination du degré d'insaturation d'une huile. Dans un ballon rodé de 250mL, 130 mg d'huile ont été dissouts dans 15 mL de chloroforme. Exactement 25mL de réactif de Wijs ont été rajoutés au mélange. Le ballon bouché puis doucement agité est placé à l'obscurité. Après une heure dans l'obscurité, 20mL d'iodure de potassium aqueux à 100g/L sont ajoutés à la solution. Ensuite, 150 mL d'eau distillée et un peu d'indicateur d'iode (empois d'amidon) sont rajoutés avant de le titrer avec

une solution de thiosulfate de sodium à 0,1mol/L jusqu'à décoloration du mélange. Un essai blanc dans huile a été réalisé dans les mêmes conditions.

L'indice d'iode qui s'exprime conventionnellement en grammes d'iode par 100g de corps gras est donné par l'équation:

$$I_i = \frac{12.69 * C * (V2 - V1)}{m}$$

Où

- C est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisée.
- V1 est le volume, en millilitres, de la solution titrée de thiosulfate de sodium (4.3) utilisée pour l'essai à blanc.
- V2 est le volume, en millilitres, de la solution titrée de thiosulfate de sodium (4.3) utilisée pour la détermination.
- m est la masse, en grammes, de la prise d'essai.
- Le coefficient 12,69 représente la masse d'iode correspondant à 1ml de thiosulfate de sodium pour 100g de corps gras

2.2.2.2 Mesure de l'indice de peroxyde

La détermination de l'indice de peroxyde (IP) de l'huile donne une information sur l'état d'oxydation de l'huile. Cet indice a été déterminé selon la Norme Française NF T60-220 de décembre 1968. L'IP s'exprime en milléquivalents d'oxygène actif par kilogramme de matière grasse pouvant oxyder l'iodure de potassium en présence d'acide acétique et de chloroforme. Le principe de la détermination de l'IP repose sur l'oxydation de l'iodure par l'oxygène actif des peroxydes contenus dans l'huile, en milieu acide. L'iode ainsi libéré est ensuite dosé en retour par le thiosulfate de sodium.

Dans un Erlenmeyer 1g d'huile est rapidement solubilisé, sous agitation, dans 10 ml de chloroforme. Puis 15mL d'acide acétique glacial et 1mL d'une solution aqueuse saturée iodure de potassium sont successivement rajoutés au mélange. L'Erlenmeyer est ensuite rapidement fermé hermétiquement, agité pendant une minute et placé 5 minutes à l'abri de

la lumière. Au bout des 5 minutes, 75mL d'eau pure est ajouté et le mélange est alors titré sous agitation magnétique par une solution aqueuse de thiosulfate de sodium 2.10^{-3} N, en présence d'empois d'amidon comme indicateur. Un essai blanc est effectué parallèlement et simultanément sans corps gras. L'expression des résultats est donnée par la formule ci-dessous:

$$I_p = \frac{(V - V_0) * N * 1000}{PE}$$

Avec:

- V le volume (mL) de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour la titrer l'échantillon.
- V_0 le volume (mL) de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc
- PE la prise d'essai de l'échantillon exprimée en gramme (g)
- et N la normalité de la solution de thiosulfate de sodium

2.2.3 Mesure de la composition en acides gras des lipides par dérivation en esters méthyliques

La composition en acides gras d'un corps gras est obtenue par dérivation de l'ensemble des acides gras en esters méthyliques de manière à augmenter la volatilité des analytes. La dérivation consiste en une méthanolyse (ou transestérification méthanolique) basique suivie d'une estérification acide selon la norme NF T60-203.

Une solution de méthylate de sodium a été préparée en mélangeant 62 mL d'une solution méthanolique de méthylate de sodium (0,5 M), 560 mL de méthanol et une pointe de phénolphtaléine pure. Une solution de méthanol chlorhydrique a été préparée en mélangeant avec précaution 50 mL de chlorure d'acétyle avec 625 mL de méthanol.

À l'aide d'une pipette pasteur, le corps gras à analyser (20 à 30 mg) a été introduit dans un ballon de 50 mL et 3 mL de la solution de méthylate de sodium ont été ajoutés. Une canne de saponification est placée au-dessus du ballon et le mélange est chauffé à reflux en présence de pierre ponce durant 10 min. 3 mL de la solution de méthanol chlorhydrique sont

alors ajoutés par le haut de la canne de saponification jusqu'à décoloration de la phénolphthaléine. Le mélange est de nouveau chauffé à reflux durant 10 min. Après refroidissement du milieu réactionnel à température ambiante, 10 mL d'eau distillée et 6 mL d'hexane sont ajoutés dans le ballon. Après agitation manuelle, le milieu est laissé au repos 5 min et quelques millilitres de la phase supérieure contenant les esters méthyliques sont prélevés. Cette phase organique est séchée par ajout de Na₂SO₄ anhydre, puis filtrée (millipore 0,45 µm) avant d'être analysée en CPG.

2.2.4 Mesure de la teneur en eau par Karl Fischer

La détermination de la teneur en eau dans l'huile a été menée selon la procédure décrite par la norme française ISO 8534 (novembre 1996) qui permet la détermination de la teneur en eau dans des corps gras d'origine animale et végétale par la méthode de Karl Fischer. Les mesures ont été effectuées sur un appareil GRS 2000 KF-Tritrator (Bioblock Scientific) qui utilise une méthode potentiométrique.

Le principe de l'analyse est basé sur l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode dans une solution de méthanol contenant une base de type 3RN (ex: la pyridine). Deux équations générales permettent de décrire la réaction de Karl Fisher:



Le rapport stœchiométrique entre l'eau et l'iode moléculaire est de 1:1. Une fois que toute l'eau contenue dans l'échantillon analytique est consommée, de l'iode moléculaire libre se retrouve en solution. Ce qui permet la détection de l'équivalence par potentiométrie à intensité contrôlée à l'aide d'une sonde à deux électrodes de platine indicatrices.

2.3 Test d'activité lipasique des extraits végétaux de la biomasse locale

L'activité lipasique des extraits végétaux a été testée sur trois types de réactions généralement catalysées par les lipases:

- (i) l'hydrolyse d'huile végétale,

- (ii) la transestérification éthanolique d'huile végétale,
- (iii) et l'estérification éthanolique d'acide oléique.

Pour faire la comparaison d'activités entre divers échantillons, les essais d'hydrolyse, de transestérification et d'estérification ont été réalisés dans des conditions réactionnelles strictement identiques.

2.3.1 Hydrolyse d'huile de tournesol à l'aide des extraits végétaux

L'activité catalytique des extraits végétaux en hydrolyse a été testée sur l'huile de tournesol en milieu aqueux. Dans un flacon de 250 mL, 3 g d'extraits végétal sont introduits dans un mélange hétérogène, contenant 15 g d'huile de tournesol et 150 mL d'eau distillée. Le mélange est vigoureusement homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique (IKA modèle IKAMAG RCT) à 400 rpm pendant 7 jours et à température ambiante (~30°C). Un essai « blanc » d'hydrolyse est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions de réaction mais en absence de biocatalyseur.

Des prélèvements de 20 mL du milieu réactionnel sont réalisés après 24, 48, 72 et 168 heures. Les échantillons sont lavés à l'hexane et ensuite centrifugés (Jouan modèle CR412) pendant 30 minutes à 2000 rpm. Les phases hexaniques récupérées sont regroupées puis évaporées sous pression réduite (40°C, 400 mbar). 44 µL de la fraction lipidique recueillie est dissoute dans 4 mL d'hexane. 100 µL de la solution mère obtenue sont dilués dans 900 µL d'hexane. De 10 à 20 µL de la solution fille est ensuite analysé qualitativement et quantitativement par CCM couplée à la densitométrie comme décrit en section 2.4.

La présence d'une activité hydrolytique se traduit par l'apparition sur la ligne de développement de la plaque CCM d'un spot noir caractéristique des AGL ($R_f \approx 0,4$) résultant de l'hydrolyse des TAG.

2.3.2 Transestérification de l'huile de tournesol avec l'éthanol à l'aide des extraits végétaux.

Deux séries d'essais de transestérification sont réalisés sur 4 g (soit 4,63 mmol) d'huile de tournesol avec dans la première série 7,24 mL d'éthanol (soit 0,12 mol) correspondant à un ratio molaire TAG:EtOH de (1:27) et dans la seconde 0,13 mL d'éthanol (soit 2,31 mmol) correspondant à un ratio molaire TAG:EtOH est de (2:1). Conformément à la bibliographie qui souligne que le potentiel effet inhibiteur des alcools à chaînes courtes sur l'activité des lipases, nous avons procédé à des essais de transestérification d'huile végétale avec l'éthanol dans un premier temps en très large excès, puis à de faibles quantités par rapport à l'huile végétale.

Les substrats en milieu sans solvant sont introduits dans un flacon de 25mL et la réaction de transestérification est initiée en introduisant 0,8 g d'extrait végétal (soit 20% m/m par rapport à l'huile) dans le mélange. Les flacons hermétiquement fermés sont agités à l'aide d'un barreau magnétique à température ambiante (~30°C). Deux essais «blancs» ne contenant pas d'extrait enzymatique sont réalisés dans les deux conditions de réaction décrites précédemment.

Des échantillons de 44 µL de milieu réactionnel sont prélevés périodiquement après 2H, 7H, 24H, 48H pour être analysés quantitativement par CCM couplée à la densitométrie selon le mode opératoire décrit en section 2.4.

La présence d'une activité acyltransférase se traduit par l'apparition sur la ligne de développement de la plaque CCM d'un spot noir caractéristique des EEHV ($R_f \approx 0,7$) résultant de la transestérification des TAG avec l'éthanol.

2.3.3 Estérification de l'acide oléique à l'aide des extraits végétaux

La mesure rapide de l'estérification éthanolique de l'acide oléique a été réalisée dans les mêmes conditions que celles de la mesure rapide de transestérification. Dans un flacon de 25 mL, l'estérification de 4 g d'acide oléique (soit 14,2 mmol) et 0,43 mL d'éthanol (soit 7,1 mmol) correspondant à un ratio molaire acide oléique/EtOH de (2:1). Les réactions sont

initiées par ajout de 0,8 g d'extrait végétal (soit 20 % m/m substrats). Les substrats en milieu sans solvant sont introduits dans des flacons hermétiquement fermés et placés dans une étuve thermorégulée à 37°C à agitation orbitale de 200 rpm (Orbital Incubator Stuart, Société Legallais). En parallèle, une réaction témoin sans biocatalyseur est suivie dans les mêmes conditions. Après 6 heures de réaction, un prélèvement d'environ 40 µL du mélange réactionnel est effectué et analysé quantitativement par CCM selon le mode opératoire décrit en section 2.4.

La présence d'une activité d'estérase se traduit par l'apparition sur la ligne de développement de la plaque CCM d'un spot noir caractéristique des EEHV ($R_f \approx 0,7$) résultant de l'estérification de l'acide oléique avec l'éthanol

2.4 Mesure de l'activité lipasique des extraits végétaux par analyse CCM (HPTLC) couplée à la densitométrie

La détection de l'activité catalytique des extraits végétaux en hydrolyse et en transestérification s'est appuyées sur l'indentification des molécules d'intérêt par chromatographique sur couche mince haute performance (HPTLC) couplée à des mesures densitométriques. C'est une méthode rapide qui permet une analyse qualitative et quantitative des mélanges complexes. La CCM couplée à la densitométrie est de plus en plus employée pour la quantification des lipides et de ses produits de dégradation (Armand *et al.*, 1996; Sek *et al.*, 2001). Avec le nombre d'extraits végétaux à tester, cette méthode nous a permis de comparer rapidement et simultanément plusieurs dizaines d'échantillons avec une grande flexibilité par rapport aux autres techniques couramment pratiquées (chromatographie liquide haute pression, chromatographie en phase gazeuse...).

2.4.1 Principe de la méthode CCM/densitométrie

Le principe de la densitométrie repose sur la mesure de la photodensité des taches obtenues après séparation et révélation des différents composés contenus dans le mélange réactionnel.

Les différents constituants du mélange sont séparés sur une plaque CCM (plaques HPTLC, 20×10 cm Silica gel 60 F₂₅₄, Merck /Germany) et ceux-ci sont révélés après immersion rapide dans une solution aqueuse saturée de sulfate de cuivre et d'acide phosphorique à 85% puis carbonisation de la plaque pendant 10 min à 180°C. Chaque constituant apparaît alors comme une tache noire sur le support de la plaque resté blanc (cf. Figure 8).

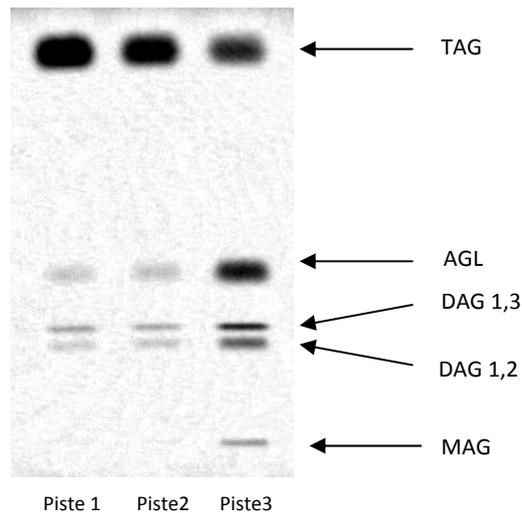


Figure 8: Plaque de silice HPTLC numérisée illustrant la séparation de composés contenus dans le mélange analysé après une hydrolyse.

Monoglycérides (MAG), diglycérides (DAG) acides gras libres (AGL), et de triglycérides (TAG). Éluant hexane/diéthyl éther/acide acétique 70/30/1 v/v/v). Révélation des plaques après immersion rapide dans solution aqueuse saturé de sulfate de cuivre et d'acide phosphorique à 85% et chauffage pendant 10 min à 180°C

La plaque est scannée par un densitomètre (scanner CAMAG TLC série 3) en faisant balayer un faisceau lumineux sur chaque ligne de développement (ou piste).

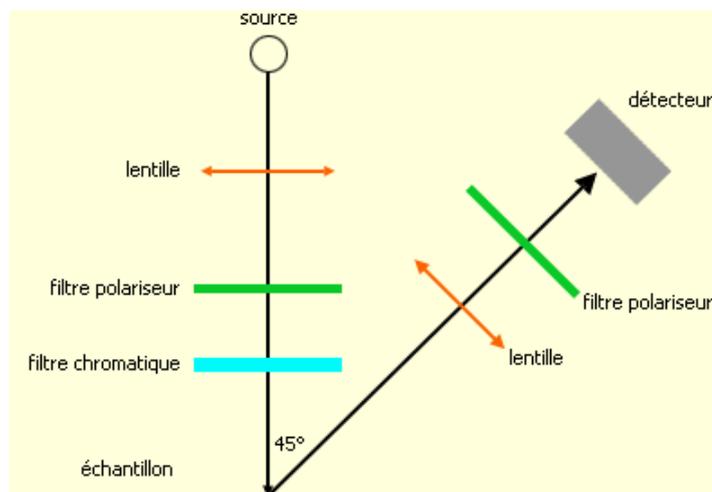


Figure 9 : Principe de fonctionnement d'un densitomètre à géométrie 0°/45°

Plus la zone de la plaque balayée adsorbe le faisceau lumineux, plus sa densité optique est élevée, donc plus le composé caractéristique de cette tache est concentré. La loi de Beer-Lambert qui décrit l'absorbance des substances peut s'appliquer et il est possible de construire un «densitogramme» analogue à un chromatogramme constitué par autant de «pics» qu'il y a de composés séparé à partir du mélange (cf. Figure 10)

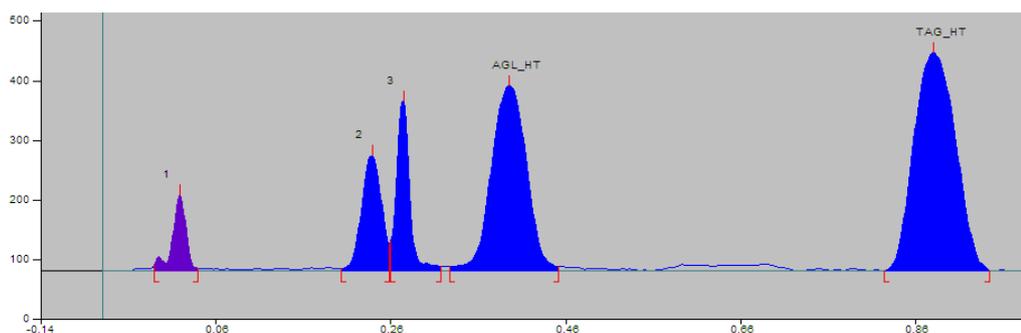


Figure 10: Chromatogramme obtenu par balayage densitométrique de la piste P3 de la figure 2.

Le chromatogramme représente l'aire de pics en fonction de la distance parcourue par chacune des substances. Le pic 1 représente l'aire des monoglycérides (MAG), le pic 2 et 3 celui des DAG 1,2 et 1,3 respectivement, le pic AGL-HT, les acides gras libres (AGL), et le dernier pic les triglycérides (TAG)

La surface de chaque pic est proportionnelle à la quantité du composé présent sur la plaque. Ainsi en réalisant une gamme étalon à partir d'un standard du composé cible, il est possible de déterminer le coefficient de proportionnalité entre la quantité du dit composé et l'aire de son pic correspondant. Il devient donc possible de déduire du «densitogramme» obtenu la composition quantitative de chacun des composés contenus dans le mélange. Pour rester dans des opératoires reproductibles en termes de températures, épaisseur de plaques etc., la gamme d'étalonnage est déposée à chaque fois sur la plaque CCM à analyser.

Le logiciel d'évaluation Camag TLC (CATS V1.4.4.6) nous a permis d'analyser la densité optique de chaque «densitogramme» et de réaliser une courbe de calibration traduisant l'évolution de la densité optique en fonction de la quantité de produit déposée (cf Figure 11). Cette courbe peut être décrite par l'équation:

$$y = y_0 + \frac{ax}{b + x}$$

Avec y_0 qui correspond à l'ordonnée à l'origine et a et b qui sont des constantes de la courbe. Ces inconnues ont été déterminées par comparaison des aires des pics de la courbe standard réalisée simultanément sur la même plaque.

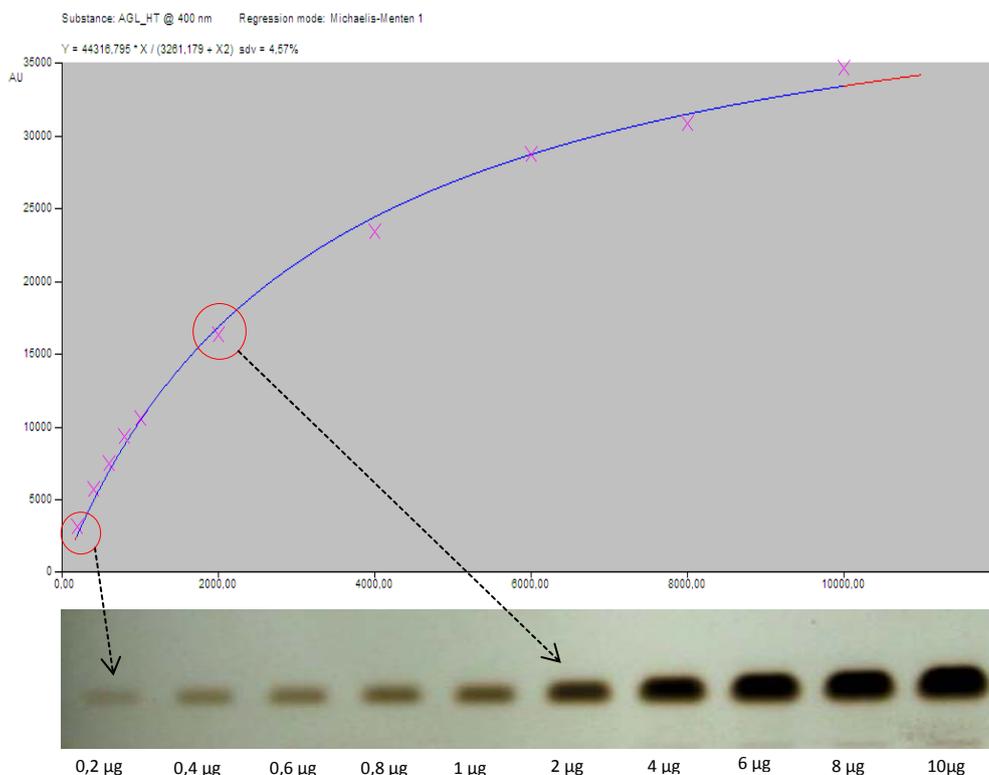


Figure 11 : Section de plaque HTPLC présentant des spots d'AGL de masses croissantes ainsi que la courbe de calibration qui en résulte après analyse densitométrique

Les masses d'AGL sont comprises entre 0,2 µg et 10 µg et la courbe calibration représente l'aire du pic en fonction de la masse.

Les courbes de calibrations réalisées avec chaque classe de composé (AGL et EEHV) nous ont permis de déterminer une gamme d'étalonnage où la quantité d'AGL ou d'EEHV comprise entre 0,2 µg et 1 µg. Cette gamme se situe dans une zone linéaire de la courbe. Nous avons donc choisi de construire les courbes d'étalonnages entre 0,2 et 1 µg en appliquant 10 µl d'une solution hexanique de 0,02 à 0,1 µg/µL de chaque classe de composé par piste.

2.4.2 Préparation des standards AGL et EEHV

Des standards d'AGL et d'EEHV ont été préparés à partir d'huile de tournesol pour permettre l'identification par comparaison des rapports frontaux (Rf) et la quantification à l'aide d'une gamme étalon de ces composés cibles dans les différents mélanges réactionnels.

Les standards d'AGL et d'EEHV ont été obtenus respectivement par hydrolyse alcaline et transestérification éthanolique de l'huile de tournesol. Ces standards ont été préparés à partir de l'huile de tournesol utilisée pour les essais afin de garantir une réponse identique entre les standards et les échantillons des essais d'hydrolyse ou de transestérification.

L'hydrolyse alcaline de 5 g d'huile de tournesol a été effectuée à reflux pendant une nuit dans 150 mL d'une solution de KOH 0,5 N dans un mélange eau-éthanol (90:10 v/v). Elle a été suivie par l'acidification du milieu réactionnel et par l'extraction liquide-liquide des AGL avec 2 x 40 ml d'hexane. Les phases hexaniques rassemblées ont été séchées et évaporées sous pression réduite à 40°C. Le résidu lipidique obtenu ne contenant que des AGL purs a été récupéré, puis passé sous un flux d'azote pendant 15 min pour l'élimination complète du solvant et d'oxygène, puis stocké à -20 °C dans un flacon en verre hermétiquement fermé.

La transestérification de 100g d'huile de tournesol avec 26 mL d'éthanol, a été réalisée à l'aide de 1,0% m/m de KOH à 60°C pendant 2 heures dans les conditions décrites par (Alamu *et al.*, 2007). Les EEHV ont été ensuite purifiés sur colonne de silice avec comme éluant hexane-diéthyl éther (90:10 v/v). Les fractions contenant les EEHV purs ont été collectées et évaporées sous pression réduite à 40°C, avant d'être passée sous flux d'azote et stocker à -20°C dans les mêmes conditions que le standard d'AGL jusqu'à utilisation.

2.4.3 Mode opératoire de l'analyse CCM/densitométrie

Des échantillons de 44 µL de milieu réactionnel sont dilués dans de l'hexane de façon à obtenir une solution à 0,1 µg/µL de lipides totaux. Dans un premier temps 44 µL de la fraction lipidique prélevée est dissout dans 4 mL d'hexane. Puis 100 µL de la solution mère obtenue sont prélevés et dilué dans 900 µL d'hexane. Des aliquotes de 10 à 20 µL sont analysées par chromatographie sur des plaques de silice haute performance (HTPLC) (20×10cm, Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Allemagne).

Le dépôt est réalisé l'aide d'un déposeur automatique (CAMAG, Linomat IV, Camag Ltd.) sous atmosphère d'azote à 15 mm du bord latéral et de 8 mm à partir du bord inférieur de la plaque en bandes de 5 mm de longueur, séparées par un espace de 5 mm. Seize pistes ont été appliquées à chaque plaque, à un débit de 0,2µl/s.

Les plaques CCM sont éluées à l'aide du mélange hexane / éther éthylique / acide acétique (70:30:1, v/v/v) pour la quantification des AGL ou avec le mélange hexane / éther éthylique / acide acétique (90:10:1, v/v/v) pour la quantification des EEHV. Les composés lipidiques sont ensuite révélés par carbonisation à 180°C dans un four pendant 10 min après immersion rapide de la plaque dans une solution saturée de sulfate de cuivre / acide phosphorique / méthanol / eau (10:8:5:78, v/v/v/v). Les plaques une fois refroidies, sont ensuite scannées à l'aide d'un densitomètre CAMAG TLC série 3. Chaque plaque est scannée à 370 nm après révélation.

2.5 Détermination du pH et de la température optimale en hydrolyse

Pour la détermination du pH optimal, 4 g d'huile de tournesol ont été mélangés à 40 mL de solutions aqueuses tamponnées ayant des pH compris entre 2 et 10. L'hydrolyse de l'huile est alors initiée par l'ajout de 0,8g d'extrait végétal (soit 20 % m/m huile). Les différents milieux réactionnels sont ensuite incubés dans une étuve à agitation orbitale à 250 tr/mn et à 40 °C durant 48 heures. Après 48 heures, les différents milieux sont acidifiés avec de l'acide chlorhydrique (HCl) à 37% pour arrêter la réaction en dénaturant l'enzyme. Les milieux réactionnels sont analysés quantitativement par CCM couplée à la densitométrie.

La détermination de la température optimale a été réalisée dans les mêmes conditions de réactions que celles décrites précédemment entre 30 et 60°C à pH 7,2. Pour la détermination du pH comme de la température optimale d'hydrolyse, un essai en absence de biocatalyseur a été réalisé dans chaque condition étudiée. L'analyse quantitative des AGL obtenus au cours de l'hydrolyse dans les différents milieux réactionnels (pour les essais de pH ou de T°C) et avec les différents extraits sélectionnés a été réalisée par CCM comme décrit précédemment (cf. section 2.3.4).

2.6 Détermination des conditions optimales en transestérification par la méthodologie des plan d'expériences

Sur la base de l'étude bibliographique, ainsi que des résultats de la mesure rapide de l'activité catalytique des extraits végétaux en transestérification, le ratio molaire TAG:EtOH,

la teneur en eau et de la charge en biocatalyseur ont été choisis comme facteurs à étudier pour déterminer les conditions optimales de transestérification. Les expérimentations ont été exécutées suivant la méthodologie des plans d'expériences. La méthodologie des plans d'expériences est une méthode statistique qui est utilisée pour l'optimisation des réactions catalysées par des lipases (Barouh *et al.*, 2008). Elle permet de modéliser les réponses du système, de limiter le nombre d'essais lorsque différents facteurs sont évalués, et de minimiser les variances du système.

Mais avant la réalisation du plan d'expérience des essais préliminaires de transestérification ont été réalisés en fixant deux des facteurs à étudier et en faisant varier le troisième afin de déterminer une gamme appropriée pour chacun de ces facteurs (ou variables indépendantes) à l'intérieur de laquelle l'activité catalytique est maximale.

2.6.1 Essais préliminaire de transestérification

Une première série d'essais de transestérification a été réalisée sur 4 g d'huile de tournesol avec 0,8 g d'extraits végétaux de JG et MG (soit un rapport enzyme/substrat de 20% m/m) en utilisant différentes quantités initiales d'éthanol anhydre. Soit 80, 135, 270, 440 et 510 μL d'éthanol correspondant à des ratios molaires TAG:EtOH respectifs de (1:0,3), (1:0,5), (1:1), (1:2) et (1:3). Après 24H de réaction à 37°C, des échantillons d'environ 40 μL de chaque milieu réactionnel ont été prélevés et analysés par CCM couplée à la densitométrie pour déterminer la quantité d'EEHV formée.

Dans les mêmes conditions opératoires, deux autres séries de réaction de transestérification ont été réalisées cette fois en fixant le ratio molaire TAG:EtOH à (1:0,3) et faisant varier dans un premier temps la teneur en eau dans l'éthanol (v/v) de 0% à 15%, puis la charge en biocatalyseur dans des rapports enzyme/substrat q de 10, 20 et 30% m/m. Pour chacun des essais réalisés, des échantillons d'environ 40 μL de chaque milieu réactionnel ont été prélevés après 24 H de réaction et analysés par CCM pour déterminer la quantité d'EEHV formée.

2.6.2 Réalisation du plan d'expérience

Les expérimentations ont été réalisées en considérant trois facteurs (f) ou variables indépendantes, connus pour avoir un effet sur l'activité catalytique des lipases au cours de la réaction de transestérification à savoir:

- le ratio molaire huile végétale-éthanol notée RM (TAG:EtOH),
- la teneur en eau dans l'alcool notée H₂O% v/v
- et la charge en catalyseur notée Cat% m/m.

A chacun des facteurs (f) est assigné deux niveaux (n) avec une valeur basse (-1) et une valeur haute (+1) pour étudier les effets de ces variables indépendantes prédéterminées et de mettre en évidence l'existence possible d'interaction entre eux. Le nombre d'essais réalisés a été déterminé à partir de la relation n^f soit 2^3 , donc huit essais réalisés. Trois répétitions ont été réalisées au centre du domaine d'expérimentation.

Les influences respectives du ratio molaire huile végétale-éthanol RM (TAG:EtOH), de la teneur en eau dans l'alcool (H₂O% v/v) et de la charge en catalyseur (Cat% m/m) ont été évaluées. À partir des essais préliminaires de transestérification éthanolique de l'huile de tournesol avec les extraits végétaux sélectionnés, une gamme appropriée a pu être déterminée pour chacune des variables indépendantes:

- le ratio molaire huile végétale-éthanol RM (TAG:EtOH) noté X1 est compris entre (1:0.3) et (1:0.9). Ce qui correspond à 80 et 240 μ L d'éthanol pour 4 g d'huile,
- la teneur en eau dans l'alcool (H₂O% v/v) notée X2 est comprise entre 0 et 5%
- et enfin la charge en catalyseur (Cat% m/m) notée X3 est comprise entre 10 et 20%.
Ce qui correspond à 0,4 et 0,8 g d'extraits végétaux pour 4 g d'huile.

Pour prédire les conditions de réaction optimales de synthèse d'EEHV et déterminer l'influence des facteurs étudiés, nous avons exécuté les essais de transestérification comme décrits par la matrice d'expérience ci-dessous.

Tableau 5: Matrice d'expérience des réactions de transestérification réalisées pour la détermination des conditions optimales

N° essais	variables codées			variables réelles		
	X1	X2	X3	RM (TAG:EtOH) (mol/mol)	H2O% (v/v)	m Cat (g)
1	-1	-1	-1	(1:0,3)	0	0,4
2	-1	1	-1	(1:0,3)	5	0,4
3	-1	-1	1	(1:0,3)	0	0,8
4	-1	1	1	(1:0,3)	5	0,8
5	1	-1	-1	(1:0,9)	0	0,4
6	1	1	-1	(1:0,9)	5	0,4
7	1	-1	1	(1:0,9)	0	0,8
8	1	1	1	(1:0,9)	5	0,8
9	0	0	0	(1:0,6)	2,5	0,6
10	0	0	0	(1:0,6)	2,5	0,6
11	0	0	0	(1:0,6)	2,5	0,6
12	0	0	0	(1:0,6)	2,5	0,6

La transestérification de 4 g d'huile de tournesol est réalisée dans un flacon en verre de 25 mL hermétiquement fermé, avec une quantité appropriée d'éthanol et d'extrait végétal, les différentes quantités correspondant à la gamme de valeurs déterminées. Après 72 heures de réaction dans une étuve à 37,5°C sous agitation orbitale, des échantillons d'environ 40 µL de chaque milieu sont prélevés et placés dans des tubes à essai avant d'être placés dans une étuve à 90°C pendant 5 à 6 minutes pour inactiver les enzymes. Contrairement aux essais d'hydrolyse, la désactivation thermique des lipases a été préférée à la désactivation à l'acide car le traitement à l'acide chlorhydrique aurait impliqué une étape supplémentaire pour son élimination avec le risque de perdre du produit (~40 µL).

Après le traitement thermique, les échantillons sont refroidis à température ambiante et 4 mL d'hexane sont ajoutés aux échantillons. 100 µL de cette solution mère sont dilués dans 900 µL d'hexane et entre 10 et 20 µL de la solution fille obtenue sont analysés par CCM couplée à la mesure densitométrique pour déterminer la quantité d'esters éthyliques formés au cours de la réaction.

Le rendement de synthèse en esters éthyliques calculé (% molaire) est la réponse Y observée. L'huile végétale étant considéré comme le facteur limitant, le calcul des différents

rendements d'esters éthyliques obtenus dans chaque milieu a été obtenu à partir de l'expression suivante:

$$Y_{\text{obs}} (\%) = \frac{n \text{ EEHV}}{(3 * n \text{ TAG} + 2 * n \text{ DAG} + n \text{ MAG})} * 100$$

Les résultats statistiques déterminés après l'analyse CCM sont ensuite traités par la méthode d'analyse de variance.

2.7 Détermination de l'effet du glycérol sur l'activité catalytique d'extraits végétaux de jatropha et de moringa en transestérification

Pour déterminer l'effet du glycérol sur l'activité catalytique des extraits végétaux au cours de la réaction de transestérification, 4 g d'huile de tournesol avec une teneur initiale en glycérol de 10% m/m ont été transestérifiés à l'aide de 0,8 g d'extraits végétaux de JG et de MG. La transestérification a été conduite en utilisant des ajouts dosés d'éthanol soit 80µL d'EtOH correspondant au ratio molaire TAG:EtOH de (1:0,3) par intervalle de 6H, sous agitation orbitale dans une étuve à 37°C pendant une durée de 66 H. Des échantillons d'environ 40 µL de chaque milieu réactionnel ont été prélevés en fin de réaction et analysés par CCM couplée à la densitométrie pour déterminer la quantité d'EEHV formée

2.8 Transestérification en présence de support solides pour le piégeage du glycérol

La possibilité de piéger le glycérol sur un support solide tout au long de la réaction de transestérification a été testé dans notre étude. Dans un flacon de 25 mL, 4 g d'huile de tournesol (soit 4,63 mmol) sont transestérifiés avec 0,86 mL d'éthanol (soit 13,8 mmol) avec dans le milieu réactionnel la présence 0,8 g de gel de silice, de cendre de balle de riz ou de charbon actif comme support solide pour l'adsorption du glycérol tout au long de la réaction (soit 20% en masse par rapport à l'huile).

Hormis la silice testé qui était d'origine commerciale, la cendre de balle de riz testée comme matériau adsorbant a été obtenue dans notre laboratoire après gazéification à une

température autour de 300-400°C pendant 4-6H de la balle de riz. Les charbons actifs ont été préparés à partir du bois de jatropha préalablement activé chimiquement avec de l'acide ortho phosphorique (H_3PO_4) pendant 24H. La programmation de température du four qui a été utilisée pour l'étape de pyrolyse est la suivante: montée en température ($2^\circ C/min$) de 30 à 700°C, palier final de 120 min à 700°C.

La réaction de transestérification est initiée en introduisant 0,8 g d'extrait végétal (soit 20% m/m par rapport à l'huile) dans le mélange. Selon la méthode des ajouts dosés l'éthanol est ajouté progressivement dans le milieu réactionnel tout au long de la réaction par fraction de 80 μL et par intervalles de 6 heures. Les flacons hermétiquement fermés sont placés dans une étuve thermorégulée à 37°C à agitation orbitale de 200 rpm (orbital incubator Stuart, Société Legallais) pendant les 72 heures.

Des échantillons d'environ 40 μL de chaque milieu réactionnel ont été prélevés en fin de réaction et analysés par CCM couplée à la densitométrie pour déterminer la quantité d'EEHV formée

2.9 Transestérification de l'huile de tournesol en deux étapes

La transestérification complète de l'huile de tournesol en deux étapes successive a été testée. Dans les mêmes conditions de réaction que celles décrites ci-dessus, 4 g d'huile de tournesol (soit 4,63 mmol) et 0,86 mL d'éthanol (soit 13,8 mmol) sont mélangés en présence de 0,8 g de gel de silice (soit 20% en masse par rapport à l'huile). La réaction de transestérification est initiée en introduisant 0,8 g d'extrait végétal (soit 20% m/m par rapport à l'huile) dans le mélange. Comme précédemment l'éthanol est ajouté progressivement dans le milieu réactionnel par fraction de 80 μL et par intervalles de 6 heures pendant 72 heures. La transestérification est réalisée à 37°C dans une étuve thermorégulée et sous agitation orbitale à 200 rpm (orbital incubator Stuart, Société Legallais).

Après les premières 72 heures, le milieu réactionnel obtenu est grossièrement filtré avec du coton pour éliminer toute particule en suspension puis le milieu est réutilisé comme substrat pour une seconde réaction de transestérification avec à nouveau 0,8 g de biocatalyseur neuf

et 0,8 g de la silice neuve. Pendant 24H aucun ajout d'alcool n'est effectué dans le but de permettre l'incorporation de l'éthanol qui n'aurait pas réagi au cours de la première réaction de transestérification. Ensuite 80 μ L d'éthanol sont introduits dans le milieu toutes les 6H pendant 48 heures.

Des échantillons d'environ 40 μ L de chaque milieu réactionnel ont été prélevés en fin de réaction et analysés par CCM couplée à la densitométrie pour déterminer la quantité d'EEHV formée.

2.10 Détermination de la composition du milieu réactionnel par analyse CPG

Le milieu réactionnel obtenue après les deux réactions de transestérification successives, a été analysé par chromatographie en phase gazeuse en utilisant la méthode de normalisation interne l'heptadécane C17.

Le chromatographe en phase gazeuse utilisée (Agilent série 6890 série plus Hewlett Packard) est équipée d'une colonne capillaire Supelcowax 10 (SGE, Courtaboeuf, France) de 30 m de longueur, 0,32 mm de diamètre interne et 0,25 μ m d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), et le logiciel utiliser pour piloter la GC et faire l'acquisition des données est HP 3398.

Environ 100 mg du milieu réactionnel obtenue sont homogénéisé dans une fiole de 10 ml. À l'aide d'une microsiringue, 100 μ l d'une solution mère d'étalon interne d'heptadécane à 2 g/L sont introduits dans la fiole. Le mélange est complété à 10 mL jusqu'au trait de jauge avec de l'hexane et 1 μ L de l'échantillon est analysé par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes :

- injection de 1 μ L de l'échantillon hexanique en mode division (rapport de fuite 1/100),
- injecteur et détecteur respectivement à 250 et 270 °C,
- hélium (gaz vecteur) à un débit de 2 mL/min,

La programmation de température du four qui a été utilisé pour l'analyse des esters éthyliques: palier de 2 min à 185°C, montée en température (4 °C/min) de 185 à 225°C, palier final de 3 min à 225°C.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1: EVALUATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX DE LA BIOMASSE BURKINABÈ

RESULTATS ET DISCUSSION

1. EVALUATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX DE LA BIOMASSE BURKINABÈ

Dans l'optique d'identifier de nouvelles sources de lipases, nous avons étudié la capacité de certains extraits végétaux préparé à partir de graines de biomasses locale (cf. Tableau 6) à catalyser efficacement l'hydrolyse et la transestérification d'huile végétale. Ces biomasses ont été choisies parce qu'elles permettent de satisfaire deux critères essentiels:

- (i) elles sont abondantes en Afrique de l'ouest,
- (ii) et leurs graines contiennent une forte proportion en matière grasse.

La présence de lipide de stockage dans les graines permet de soupçonner la présence de lipase car la mobilisation des lipides de stockage au cours de la germination pour répondre au besoin énergétique de la plante est souvent associée à une activité lipasique (Barros *et al.*, 2010).

Tableau 6: tableau récapitulatif des biomasses oléagineuses disponibles localement testées comme source potentielle de lipase.

Nom courant	Nom scientifique	Teneur en huile % (m/m)
Karité	<i>Vitellaria paradoxa</i>	45
Anacarde	<i>Anacardium occidentale</i>	46,5
Balanitès	<i>Balanites aegyptiaca</i>	38,5
Arachide	<i>Arachis hypogaea</i>	48-50
Moringa	<i>Moringa oleifera</i>	30-40
Jatropha	<i>Jatropha curcas</i>	50-58
Neem	<i>Azadirachta indica</i>	30-40
Mangue*	<i>Mangifera indica</i>	11,6

(*) À titre de rappel, le manguier n'est pas une plante oléagineuse au sens propre du terme, mais l'amande du noyau de son fruit contient environ 11,6% m/m d'huile (Hemavathy *et al.*, 1987).

Pour révéler la présence d'une activité lipasique endogène de biomasses sélectionnées, les travaux de cette thèse ont commencé par:

- (i) la préparation d'extraits végétaux délipidés,
- (ii) la caractérisation de l'huile végétale (tournesol) utilisée,
- (iii) la mise en évidence de l'activité hydrolytique des extraits,
- (iv) et ensuite la mise en évidence de l'activité acyltransférase ou (activité en transestérification) des extraits les plus actifs en hydrolyse.

Les extraits végétaux testés ont été préparés à partir de graines dormantes et germées de biomasses sélectionnées, à l'exception des extraits obtenus à partir des graines de *Jatropha curcas* et d'arachide (*Arachis hypogaea*) qui ont testées uniquement sous leur forme germée. Les travaux de Staubmann et al., sur le *Jatropha curcas* et ceux de Sanders et al., sur l'arachide (*Arachis hypogaea*) ayant montré que l'activité catalytique des extraits obtenus à partir des graines de ces biomasses n'était exploitable qu'une fois la germination des graines amorcée.

1.1 Caractéristiques de l'huile de tournesol utilisée

Avant d'effectuer les tests d'activités catalytiques des extraits végétaux, l'huile de tournesol alimentaire qui a été utilisée tout au long de ces travaux, a été tout d'abord caractérisée. Outre sa composition en acides gras et son indice d'iode, des paramètres d'altération de cette huile ont été évalués. En l'occurrence, son acidité et son indice de peroxyde ont été mesurés. L'acidité est fonction de l'état de dégradation hydrolytique des TAG tandis que l'Indice de peroxyde renseigne sur l'état d'oxydation des chaînes d'acides gras insaturées. Ces états de dégradation hydrolytique ou oxydative doivent impérativement être mesurés au préalable pour toute huile destinée à servir de substrat lipidique dans la mesure d'une activité lipolytique. En effet, il est connu que la présence d'acide gras libres ou celle de composés primaires d'oxydation (peroxydes) peut directement altérer l'efficacité de l'enzyme étudiée.

L'ensemble des résultats de l'analyse de la qualité de l'huile par la mesure des indices classiques, de l'analyse de la composition en lipides et de son profil en d'acides gras est présenté dans le tableau 7.

Tableau 7: Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de tournesol raffinée utilisée.

Caractéristiques	Données expérimentales	Données de la littérature (Ramos <i>et al.</i> , 2008; Grompone, 2011)
Teneur en eau (%)	0,05	<0,05
Indice d'iode (mg d'I ₂ /g)	130,6	118-141
Acidité (%)	0,04	<0,06
Indice de peroxyde (M equiv/kg)	11,6	<10
Composition en glycérides (%)¹		
TAG	93,86	nd
DAG	3,35	nd
MAG	1,65	nd
Autres	0,89	nd
Composition en acide gras (%)²		
Acide palmitique (C16:0)	6,07	5-7,6
Acide stéarique (C18:0)	2,93	2,67-3,7
Acide oléique (C18:1)	31,92	14-39,4
Acide linoléique (C18:2)	57,48	48,3-74,0
Autres	1,60	nd

(¹) Composition en glycérides déterminée par CPG, les résultats sont donnés en pourcentage d'aire % par rapport à l'aire des lipides totaux sur le chromatogramme; (²) c'est le pourcentage % d'aire par rapport à l'aire des acide gras totaux; nd: non déterminé

Comme l'indique les résultats de la caractérisation (cf. Tableau 7), l'huile de tournesol analysée contient un très faible taux d'acide gras libre (0,04 %) ainsi qu'une faible teneur en eau (0,05%), outre l'indice de peroxyde qui est légèrement supérieure à celui recommandé (11,6 M equiv/kg). L'analyse chromatographique en phase gazeuse démontre qu'elle est riche en acides gras insaturés (88,40%), avec majoritairement de l'acide linoléique (C18:2= 57,48%). Les acides gras saturés ne représentent que 7% des acides gras contenus dans l'huile. Les autres composés lipidiques ou non lipidiques qui n'ont pas pu être identifiés représentent 1,6% de la composition de l'huile.

De ces résultats de la caractérisation physico-chimique il ressort que l'huile de tournesol étudiée est non altérée. Elle est donc appropriée pour être utilisée comme substrat lipidique

dans la mesure de l'activité catalytique en hydrolyse et en transestérification des extraits végétaux. De plus les caractéristiques de cette huile répondent aux normes de spécification technique n° E4-05 du 31 mars 2005 relative aux huiles végétales alimentaires précisément pour le cas du tournesol.

L'analyse a également permis de déterminer la masse molaire moyenne des TAG de l'huile de tournesol représentée par la formule suivante:

$$Mm=3* \left(\frac{Mm(C18:0)*2,93+Mm(C18:1)*31,92+Mm(C18:2)*57,48+Mm(C16:0)*6,07}{100} \right)$$

D'où: $Mm_{TAG} = 863,77g/mol$

Cette masse molaire moyenne des TAG a servi tout au long du travail pour la détermination des différents rapports stœchiométriques à utiliser lors des essais de transestérification.

1.2 Mise en évidence de l'activité hydrolytique des extraits végétaux de biomasses

La mise en évidence de l'activité hydrolytique a été effectuée par un test d'hydrolyse réalisé sur l'huile de tournesol en milieu hétérogène eau/huile à température ambiante pendant 7 jours. L'hydrolyse étant la fonction biologique des lipases, ce test a permis d'effectuer un premier criblage et d'écarter les biomasses dont les extraits sont inactifs.

La présence d'une activité hydrolytique se caractérise par l'observation d'AGL initialement absent dans le milieu réactionnel. Des AGL ont été identifiés, après séparation sur CCM puis par comparaison de leur rapport frontal ($R_f = 0,4$) avec ceux de standards utilisés dans les mêmes conditions.

Les résultats du test d'hydrolyse obtenus après une analyse CCM qualitative sont présentés dans le Tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8: Résultats de l'évaluation qualitative de l'activité hydrolytique d'extraits végétaux

Biomasses sources de lipases		Résultats du test d'hydrolyse
Anacarde	Dormant	-
	Germé	-
Arachide	Germé	+
Karité	Dormant	+
	Germé	+
Jatropha	Germé	+++
Balanitès	Dormant	-
	Germé	+
Moringa	Dormant	-
	Germé	++
Mangue	Dormant	-
	Germé	-
Neem	Dormant	-
	Germé	-
Témoin*		-

- : pas d'AGL;
 + : présence d'AGL en faible quantité ;
 ++ : présence d'AGL en forte quantité,
 +++ : présence d'AGL en très forte quantité,
 (*) Témoin réalisé sans biocatalyseur.

Ainsi parmi les extraits végétaux testés, six présentent une activité hydrolytique sur l'huile de tournesol. Il s'agit des extraits obtenus à partir:

- (i) de graines de karité dormantes et germées,
- (ii) de graines de jatropha germées,
- (iii) de graines balanitès germées,
- (iv) de graines de moringa germées,
- (v) et graines d'arachide germées.

Ces extraits végétaux semblent donc contenir une ou plusieurs enzymes capables de catalyser la rupture de liaisons esters présentes sur les TAG de l'huile de tournesol. D'après les résultats présentés dans le Tableau 8, les extraits issus de graines germées de jatropha exprimeraient la plus forte activité catalytique au cours de la production d'AGL par hydrolyse des TAG par rapport aux autres extraits végétaux testés.

Pour avoir une idée précise du pouvoir catalytique de ces extraits en hydrolyse, nous avons réalisé un suivi cinétique de la réaction d'hydrolyse puis déterminé l'activité catalytique de chacun des extraits à partir des courbes du suivi cinétiques de la réaction d'hydrolyse.

1.2.1 Suivi cinétique de l'hydrolyse d'huile de tournesol par les extraits végétaux

Un suivi sur 7 jours a été réalisé afin d'évaluer l'efficacité des différents extraits végétaux que nous avons préparés pour hydrolyser l'huile de tournesol. La réaction d'hydrolyse a été réalisée sur 15 g d'huile de tournesol à l'aide 3 g d'extraits végétaux dans 150 mL d'eau distillée (pH 6-7), à température ambiante ($\sim 30^{\circ}\text{C}$) sous agitation magnétique pendant 7 jours. Toutes les 24H, des échantillons de 44 μL de la phase lipidique sont prélevés et analysés par CCM couplée à la densitométrie.

Les cinétiques d'hydrolyse obtenues par la quantification des AGL en CCM sont représentées sur la Figure 12.

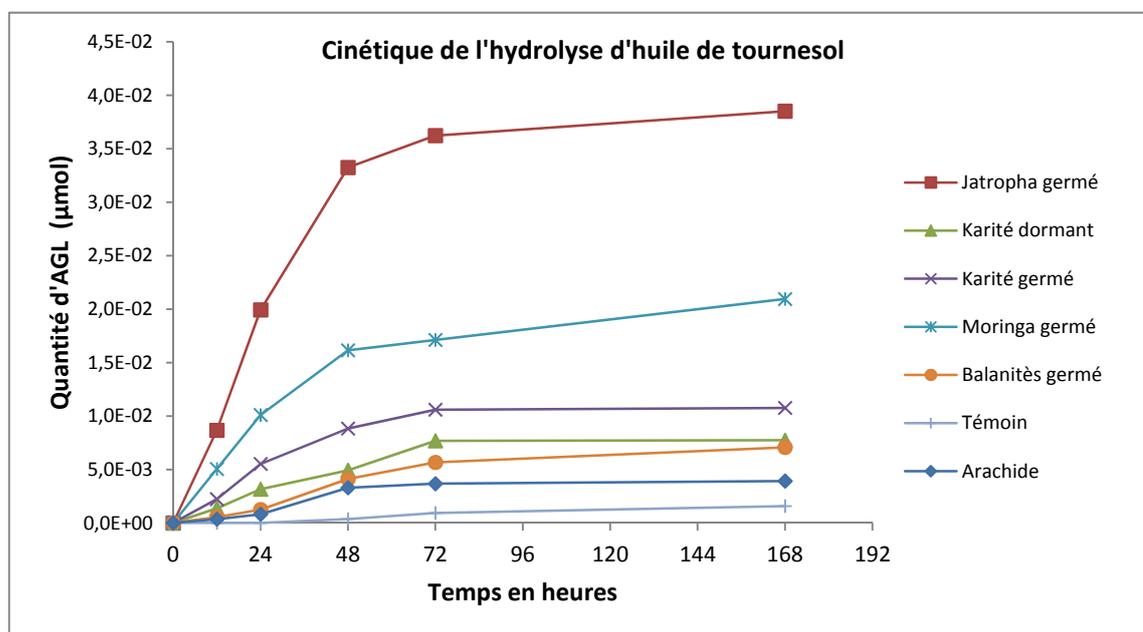


Figure 12: Cinétique de libération des acides gras par hydrolyse de l'huile de tournesol catalysé par les différents extraits végétaux.

À partir des courbes obtenues, on observe quel que soit les extraits végétaux utilisés, les courbes cinétiques observées ont toutes un profil quasi identique où on peut distinguer deux

parties. Une première partie caractérisée par une action rapide des enzymes dans les tous premiers stades de la réaction d'hydrolyse, suivi par un ralentissement de cette cinétique.

Il existe plusieurs hypothèses quant au ralentissement de cette vitesse:

- l'enzyme n'est pas forcément stable dans les conditions utilisées. La qualité de l'interface eau/huile (milieu hétérogène) joue un rôle primordial dans la catalyse enzymatique,
- les produits de l'hydrolyse peuvent inhiber l'enzyme par le biais d'inactivation compétitive (glycérol, glycérides partiels ou AGL),
- le traitement thermique prolongé peut induire une baisse de l'activité enzymatique par dénaturation de l'enzyme,
- des mécanismes de digestion enzymatique (par des protéases contenus dans les extraits) peuvent également avoir lieu, ce qui conduirait à des pertes d'activité potentielles,
- une autre hypothèse impliquerait la modification de la structure tertiaire des lipases lors de la réaction d'hydrolyse, ce qui, par manque d'accessibilité, entraînerait un ralentissement de la cinétique,
- enfin ce ralentissement peut s'expliquer par la spécificité enzymatique, une réduction des sites potentiellement hydrolysables présents au niveau des TAG ou des glycérides partiels néo-synthétisés (MAG, DAG) entraîne au cours du temps un ralentissement de l'activité.

S'il n'est pas possible de conclure sur le type de cinétique ou les phénomènes à l'origine de l'inactivation, par manque d'investigations plus poussées (trop de temps pour une finalité purement fondamentale), il est quand même possible grâce aux courbes d'hydrolyse de réaliser un pré-classement quant à l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des TAG des extraits végétaux dans les conditions testés. La comparaison des cinétiques démontre que les extraits les plus performants dans les conditions de réaction décrites sont ceux issus de graines germées de *Jatropha curcas* suivent par ceux issus de graines germées de *Moringa oleifera* puis ceux issus de graines germées de karité (*Vitellaria paradoxa*).

1.2.2 Activités hydrolytiques comparées des différents extraits végétaux

L'activité catalytique d'une enzyme, définie en termes de vitesse de réaction, traduit la vitesse de formation du produit par unité de masse d'enzyme et par unité de temps. La formule utilisée pour le calcul de l'activité hydrolytique des extraits végétaux est la suivante:

$$\text{Activité hydrolytique} = \frac{V_0 \text{ [AGL]} (\mu\text{mol/ heure})}{\text{quantité d'extraits (g)}}$$

V_0 représente la vitesse initiale.

La vitesse initiale peut être déterminée expérimentalement à partir de la représentation graphique de la quantité de produit formé en fonction du temps de réaction. La pente de la tangente de la courbe de la cinétique de la réaction à partir de son origine correspondant à la vitesse initiale (cf. Figure 13).

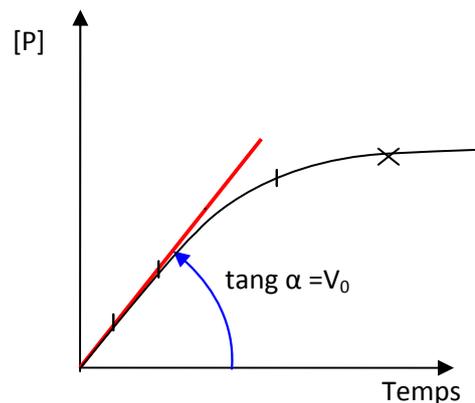


Figure 13 : Courbe théorique de cinétique d'une réaction par catalyse enzymatique, (P) la quantité de produit (T) le temps de réaction,

La vitesse initiale V_0 , correspondant à la variation de concentration du produit en fonction du temps, peut être déterminée à partir de deux points de la "portion linéaire" de la courbe cinétique d'apparition du produit:

$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{\text{nbr } \mu\text{mol (t2)} - \text{nbr } \mu\text{mol (t1)}}{(t2 - t1)}$$

avec [P] la quantité de produit formé à un instant t.

Les activités hydrolytiques de six extraits végétaux obtenus à partir des graines de karité dormant, karité germé, moringa germé, jatropha germé, arachide germé et balanités germé ont été déterminées entre 12 et 24 heures et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 Activité lipolytiques des extraits végétaux positifs au test d'hydrolyse

Extraits végétaux	Quantité d'AGL au bout de 12h (μmol)	Quantité d'AGL au bout de 24h (μmol)	V_0 ($\times 10^{-05} \mu\text{mol/h}$)	Activité lipolytique ($\times 10^{-08} \mu\text{mol/h/mg}$)
Arachide	$3,57 \times 10^{-04}$	$8,20 \times 10^{-04}$	3,86	1,49
Jatropha germé	$8,66 \times 10^{-03}$	$1,99 \times 10^{-02}$	93,9	36,1
Karité dormant	$1,37 \times 10^{-03}$	$3,16 \times 10^{-03}$	14,9	5,72
Karité germé	$2,23 \times 10^{-03}$	$5,52 \times 10^{-03}$	27,4	9,28
Moringa germé	$5,05 \times 10^{-03}$	$1,01 \times 10^{-02}$	42,1	21,0
Balanités germé	$5,45 \times 10^{-04}$	$1,25 \times 10^{-03}$	5,90	2,27
Témoin	0	0	0	0

Mesurées dans les mêmes conditions, les activités lipolytiques des extraits issus de jatropha germé et de moringa germé sont très supérieures à celles des extraits de karité germés et dormants, de balanites et d'arachide germés. Les extrais de jatropha germé et de moringa germé avec une activité de $36,1 \times 10^{-08} \mu\text{mol/h/mg}$ et $21,0 \times 10^{-08} \mu\text{mol/h/mg}$, sont nettement plus performants que les extraits de karité germés et dormants, de balanités et d'arachide qui ont respectivement une activité lipolytique de $9,28 \times 10^{-08} \mu\text{mol/h/mg}$; $5,72 \times 10^{-08} \mu\text{mol/h/mg}$; $2,27 \times 10^{-08} \mu\text{mol/h/mg}$ et de $1,49 \times 10^{-08} \mu\text{mol/h/mg}$.

1.3 Déterminations des conditions optimale en hydrolyse des extraits végétaux les plus actifs

L'hydrolyse en milieu aqueux de l'huile de tournesol à l'aide des extraits les plus actifs (extraits de jatropha germé, de moringa germé et de karité germé) a été étudiée enfin de déterminer le pH et la température à laquelle l'activité lipolytique de ces extraits est maximale.

L'évolution de la quantité d'AG libérés par l'hydrolyse de l'huile de tournesol sous l'action de chaque extrait a été étudiée dans une gamme de pH allant de 2 à 10 et dans une gamme de température comprise entre 30 et 60°C. Le taux d'hydrolyse des TAG est déterminé par le rapport entre le nombre de mole d'AGL mesuré et le nombre de fonctions hydrolysables initialement présentes sur le substrat lipidique. Pour simplifier les calculs, il est considéré que l'huile de tournesol est à 100% constituée de TAG. La formule utilisée pour calculer le taux d'hydrolyse est la suivante:

$$\text{AGL}\% = \frac{\text{nbr mol AGL}}{3 * \text{nbr mol TAG}}$$

1.3.1 Étude de l'influence du pH du milieu sur l'activité hydrolytique des extraits lipasiques

La détermination du pH optimum au cours de l'hydrolyse des TAG a été réalisée en fixant la température de réaction à 40°C. Cette température a été choisie conformément aux données de la littérature qui indiquent en général que la température optimale d'activité des lipases est généralement comprise entre 30°C et 50°C (Antczak *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2010). L'hydrolyse de 4 g l'huile de tournesol a été réalisée avec 0,8 g d'extrait végétal (soit 20 % m/m huile), dans 40 mL d'une solution tampon dont le pH varie entre 2 et 10. Après une durée de 24h, la phase lipidique du milieu est recueillie et analysée par CCM. Les évolutions des quantités d'AGL mesurées en fonction du pH du milieu sont présentées sur la Figure 13.

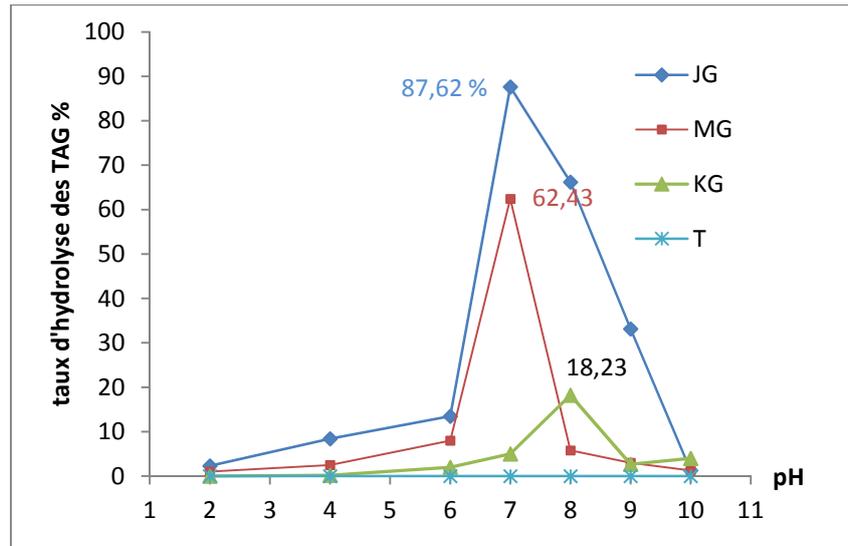


Figure 14 : Influence du pH sur les réactions d'hydrolyse catalysées par les extraits végétaux de KG (Karité germé) MG (Moringa germé) et JG (Jatropha germé)

Sur la Figure 14, il apparaît que l'hydrolyse des TAG est maximale lorsque le pH du milieu est de 7,2 avec les extraits de JG et MG, et de 8 avec les extraits de KG, avec des taux d'hydrolyse de TAG respectifs de 87 %, 62% et 18%.

Le pH optimum d'hydrolyse des TAG par les extraits de JG et de MG est un pH proche de la neutralité. Celui-ci est comparable au pH optimum déterminé pour d'autres lipases connues telles que les graines de colza, les graines de *Pentaclethra macrophylla Benth* (Barros *et al.*, 2010), et le son de riz (Prabhu *et al.*, 1999). Le pH optimum observé avec les extraits de JG, est en accord avec celui rapporté par les études de Staubmann (Staubmann *et al.*, 1999) et Abigor (Abigor *et al.*, 2002), lesquels ont observés que les extraits lipasiques partiellement purifiés à partir de graines de *jatropha* germé possèdent une activité hydrolytique maximale autour d'un pH de 7,5.

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude publiée sur l'activité catalytique de lipase de Karité. Toutefois, le fait de trouver une activité lipolytique optimale en milieu alcalin pour une lipase végétale n'est pas nouveau. Certaines lipases végétales présentant un optimum d'activité à pH alcalin ont déjà été identifiées dans les graines de Bombacaceae (Polizelli *et al.*, 2008), dans les grains de riz, et de coton (Barros *et al.*, 2010). Staubmann *et al.* (Staubmann *et al.*, 1999) ont même rapporté avoir isolé une lipase à partir de graines

Jatropha ayant un pH optimum à 8,5. Donc la large bande observée entre pH 6-9 avec les extraits de JG pourrait traduire la présence de plusieurs lipases dans l'extrait.

A pH optimum, ce sont les extraits de jatropha qui présentent la plus forte activité catalytique conduisant à un taux d'hydrolyse élevé.

1.3.2 Étude de l'influence de la Température sur l'activité hydrolytique des extraits lipasiques

Une fois le pH optimum de chacun des extraits déterminé, la température optimale d'hydrolyse a été déterminée. Pour cela, des essais d'hydrolyse ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites mais cette fois-ci en fixant le pH du milieu au pH optimum de chaque extrait; pH 7,2 pour les extraits de MG et JG et pH 8 pour ceux de KG. Après 6H de réaction, la quantité d'AGL des phases lipidiques a été mesurée par CCM couplée à la densitométrie afin d'évaluer la performance du biocatalyseur à différentes températures considérées.

La Figure 15 présente l'évolution du taux d'hydrolyse des TAG en fonction de la température du milieu réactionnel.

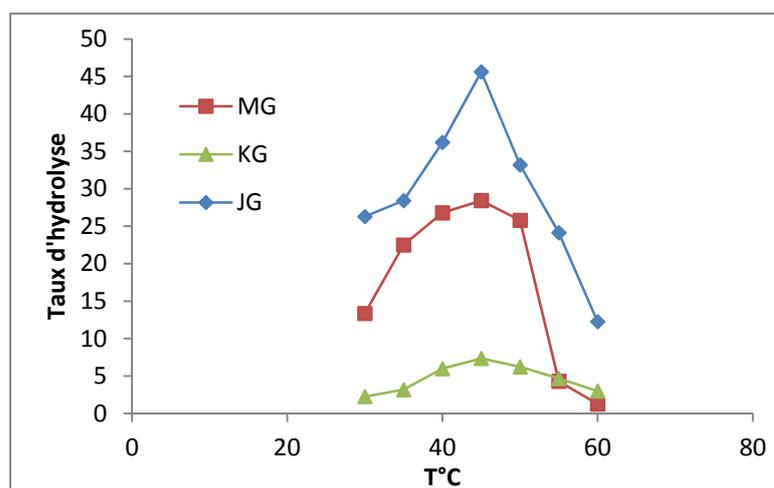


Figure 15 : Influence de la température sur les réactions d'hydrolyse catalysées par les extraits végétaux de KG (Karité germé) MG (Moringa germé) et JG (Jatropha germé),

Le tracé de l'évolution du taux d'hydrolyse en fonction de la température adopte une forme gaussienne avec un maximum atteint à 45°C pour les trois extraits. À cette température la

valeur maximale du taux d'hydrolyse est supérieure à 45% pour les extraits de JG, à 28% pour les extraits de MG et à 7% seulement pour ceux de KG. La catalyse enzymatique est basée sur les interactions entre enzymes et substrats favorisées par les mouvements moléculaires. Ces derniers sont issus d'agitations mécanique ou thermique du milieu. Les contacts étant favorisés par des températures croissantes, les extraits végétaux ont leur activité qui croît jusqu'à une valeur seuil de 45 °C. En augmentant la température au-delà de 45°C, une diminution du taux d'hydrolyse traduit une désactivation progressive des extraits végétaux.

Les résultats obtenus sont concordants avec ceux observés au cours d'essais d'hydrolyse avec d'autres types de lipases végétales rapportés dans la bibliographie (Staubmann *et al.*, 1999; Barros *et al.*, 2010). La température optimale de l'activité hydrolytique (45°C) que nous observons avec les extraits de JG est en accord avec celle rapportée par Staubmann (Staubmann *et al.*, 1999) pour la (ou les) même(s) lipase(s). Toutefois, elle est supérieure à celle observée par Abigor (Abigor *et al.*, 2002) qui ont montré que la température optimale d'hydrolyse à l'aide des extraits de jatropha partiellement purifiés est plus faible, autour de 37°C.

Cette différence entre les deux valeurs de température optimale réside certainement dans les durées de réactions qui ne doivent pas être les mêmes. Cependant celles-ci ne sont clairement spécifiées dans l'étude d'Abigor *et al.* En effet pour étudier l'effet de la température sur l'activité catalytique d'une enzyme, la durée d'incubation est un paramètre très important. Il faut savoir que la température a non seulement un effet sur la vitesse de réaction, mais aussi sur la stabilité de l'enzyme. En dessous de la température de dénaturation d'une enzyme, la vitesse de réaction augmente avec la température. Mais en contrepartie la stabilité de l'enzyme diminue. Donc pour abaisser la température optimale, il est important de réaliser un suivi cinétique de la réaction à différentes températures jusqu'à ce que la vitesse maximale de formation du produit soit atteinte. De ce fait, la température optimale est choisie en faisant un compromis entre la stabilité opérationnelle de l'enzyme au cours du temps et le taux de conversion du substrat en produit.

1.4 Mise en évidence de l'activité biocatalytique en transestérification des extraits végétaux

La mise en évidence de l'activité biocatalytique de transestérification a été effectuée par un test de transestérification réalisé sur l'huile de tournesol. Nous avons utilisé comme substrat l'huile de tournesol et l'éthanol dans un ratio molaire TAG:EtOH de (2:1). La transestérification est mise en oeuvre en milieu lipidique fondu, c'est-à-dire que les substrats jouent eux mêmes le rôle de solvant. Le mécanisme de la réaction de transestérification s'effectue par transfert d'acyles du TAG vers l'éthanol, engendrant ainsi la formation d'EEHV dans le milieu réactionnel. Ces composés néoformés se visualisent par l'apparition de nouveaux spots en CCM avec rapport frontal (R_f) différent des substrats initiaux ($R_f = 0,7$).

En théorie trois moles d'éthanol sont requises pour la transestérification complète d'une mole de TAG. Mais un excès molaire d'alcool par rapport aux TAG est recommandé pour déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction vers le sens de formation des esters et augmenter le rendement de transestérification. Cependant, il faut garder à l'esprit, qu'un excès d'alcool, particulièrement les alcools à chaînes courtes comme l'éthanol, peut en contrepartie inactiver l'enzyme. C'est pourquoi nous avons réalisé les essais de transestérification avec deux ratios molaires différents. Un ratio molaire TAG:EtOH de (1:27) où l'éthanol est en très large excès par rapport aux TAG; et un autre TAG:EtOH de (2:1) où les TAG sont en excès par rapport à l'éthanol.

Le Tableau 10, présente les résultats de l'analyse qualitative en CCM de la composition du milieu réactionnel après transestérification catalysé par différents extraits végétaux précédemment actifs en hydrolyse.

Tableau 10: Résultats de l'évaluation qualitative de l'activité catalytique des extraits végétaux au cours de la transestérification des TAG avec l'éthanol

Biomasses sources de lipases		Transestérification (1)	Transestérification (2)
Arachide	Germé	-	-
Karité	Dormant	-	+
	Germé	-	+
Jatropha	Germé	+	+++
Balanites	Germé	-	-
Moringa	Dormant	-	-
	Germé	-	++
Témoin		-	-

(1) Test de transestérification avec un excès d'éthanol, le ratio molaire TAG:EtOH de (1:27)

(2) Test de transestérification avec une faible quantité d'éthanol, le ratio molaire TAG:EtOH de (2:1)

- : pas d'EEHV;

+: présence d'EEHV en faible quantité ;

++ : présence d'EEHV en forte quantité,

+++ : présence d'EEHV en très forte quantité,

(*) Témoin réalisé sans biocatalyseur.

Parmi les six extraits démontrant une activité hydrolytique, seuls quatre (4) présentent une activité catalytique en transestérification (activité acyltransférase). Il s'agit des extraits obtenus à partir de graines de jatropha germées, à partir de graines de karité sous leurs deux formes (dormantes et germées) et des extraits obtenus à partir de graines germées de moringa.

Les extraits de graines germées d'arachide et de balanites bien que précédemment actifs au cours de l'hydrolyse des TAG sont inactifs en transestérification dans les deux conditions opératoires testées.

Des hypothèses existent dans la bibliographie pour expliquer ces résultats:

- les lipases contenues dans ces extraits ne sont pas adaptées à ce type de réaction (acylhydrolase pure),
- les lipases contenues dans les extraits ne trouvent pas de conditions favorables à leur action de par la présence de l'interface huile/éthanol,
- ou bien l'état de repliement macromoléculaire de lipases dans le milieu empêche l'accessibilité des substrats aux sites actifs des enzymes.

La bibliographie ne permet pas de conclure quant aux hypothèses énoncées ci-dessus. Cependant les travaux de Klivanov (Klivanov, 1997), et de Gandolfi (Gandolfi *et al.*, 2000), enseignent qu'une activité catalytique en hydrolyse ne permet pas systématiquement, de prédire le comportement des extraits végétaux en synthèse comme c'est le cas pour les extraits de graines germées d'arachide et de balanitès.

Les résultats du test de transestérification (2) mettent en évidence une possible inactivation des extraits végétaux par la forte concentration initiale en éthanol. Les extraits issus des graines de karité (dormantes et germées) et de graines germées de moringa, ne catalysent la formation d'EEHV que lorsque la quantité initiale d'éthanol dans le milieu réactionnel est faible correspondant à un ratio molaire TAG:EtOH de (2:1). Il existe un effet inhibiteur de forte concentration en éthanol, sur ces extraits végétaux. Cet effet inhibiteur est confirmé par les résultats observés avec les essais en transestérification (1) et (2) à l'aide des extraits de graines germées de Jatropha. Ceux-ci présentent certes une activité catalytique en présence d'un large excès d'éthanol par rapport aux TAG, mais elle est plus importante lorsque la quantité initiale d'éthanol est faible.

Le ratio molaire TAG:EtOH de (2:1) est plus approprié pour la conversion des TAG en EEHV à l'aide d'extraits végétaux issus de graines germées de jatropha, de moringa ou de karité. Cependant, le ratio stœchiométrique pour la conversion complète des TAG en EEHV nécessite au moins trois fois plus d'alcool par rapport au TAG. Pour éviter une forte concentration en éthanol dans le milieu réactionnel et par conséquent son effet inhibiteur sur les extraits, la méthode décrite par Shimada (Shimada *et al.*, 1999) d'ajouts dosés d'éthanol semble appropriée pour essayer d'obtenir conversion complète et totale des TAG en EEHV. Cette méthode consiste à ajouter progressivement des faibles quantités de l'alcool par intervalles de temps réguliers pendant toute la durée de la réaction. Cette méthode a démontré, dans les études dans lesquelles elle a été employée, son efficacité pour la conversion de TAG en esters alkyliques d'huile végétale.

1.4.1 Calcul de l'activité biocatalytique des extraits végétaux actifs au cours de la transestérification éthanolique d'huile de tournesol

La mise en évidence et la quantification des EEHV formés rendent compte de l'activité biocatalytique en transestérification des extraits végétaux. Par conséquent, au cours de la réaction de transestérification éthanolique mise en oeuvre, l'activité de transestérification a été déterminée par l'évaluation des μmoles d'EEHV formées par heure et par gramme d'extrait.

Les suivis de la formation d'EEHV dans le milieu réaction lors la réaction de transestérification biocatalysée par les extraist végétaux de jatropha germé, moringa germé et karité germé sont indiqués sur la Figure 17. Ces données expérimentales ont été obtenues par analyse CCM couplée à la densitométrie.

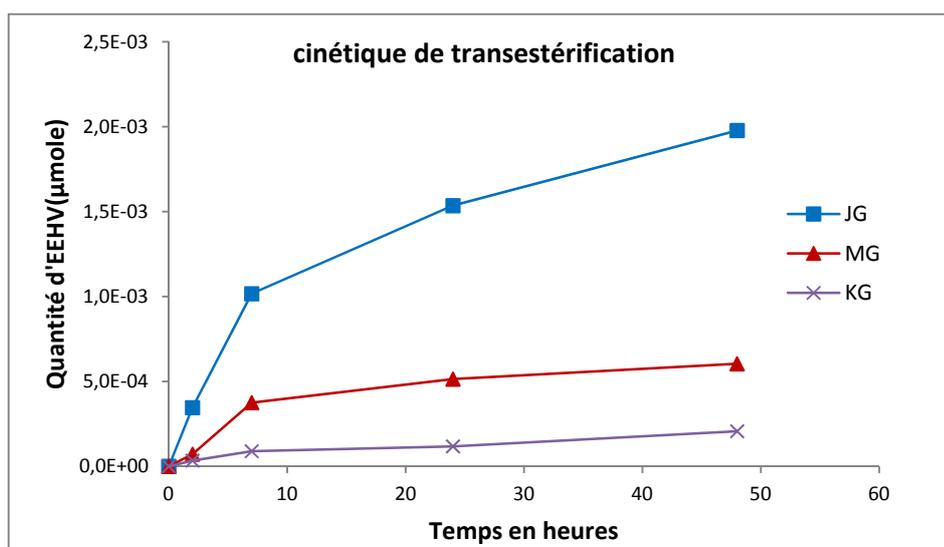


Figure 16 : Cinétique de formation des EEHV par transestérification éthanolique de l'huile de tournesol catalysée par différents extraits végétaux

L'équilibre réactionnel semble être atteint à partir de 24 h de réaction. La "vitesse initiale apparente" de la réaction (en μmoles néoformées d'EEHV par heure) peut être déterminée par la pente de la tangente de la courbe de la cinétique de la réaction à partir de son origine (cf. Figure 13) pendant les 7 premières heures; durée durant laquelle la vitesse de la réaction demeure effectivement linéaire.

Cette "vitesse initiale apparente", prenant en compte les vitesses initiales (V_0) de formation des EEHV, est évaluée comme ci-après:

$$V_0 = \frac{\text{nbr } \mu\text{mol EEHV (t2)} - \text{nbr } \mu\text{mol EEHV (t1)}}{(t2 - t1)}$$

L'activité de transtérification des extraits végétaux peut ensuite être calculée comme ci-après:

$$\text{Activité de transtérification} = \frac{V_0 [\text{EEHV}] (\mu\text{mol/ heure})}{\text{quantité d'extraits (g)}}$$

1.4.2 Activités en transtérification comparées des différents extraits végétaux

Les valeurs d'activité de transtérification provenant des extraits végétaux de jatropha germé, de karité germé et de moringa germé sont présentées dans le Tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 Récapitulatif des activités catalytiques en transtérification des extraits végétaux positifs au test d'hydrolyse

Extraits végétaux	Quantité d'AGL (μmol) après 2h	Quantité d'AGL (μmol) après 7h	V_0 ($\times 10^{-4}$ $\mu\text{mol/h}$)	Activité en éthanolyse ($\times 10^{-8}$ $\mu\text{mol/h/mg}$)
Jatropha germé (JG)	$3,45 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-3}$	1,34	16,8
Karité germé (KG)	$3,38 \times 10^{-5}$	$7,78 \times 10^{-5}$	0,08	1,1
Moringa germé (MG)	$7,10 \times 10^{-5}$	$3,75 \times 10^{-4}$	0,6	7,5

La comparaison des activités en transtérification calculées pour les trois extraits végétaux, indique que les extraits de JG présentent la plus forte activité de transtérification: $16,8 \times 10^{-8}$ $\mu\text{mol/h/mg}$). Les extraits végétaux de KG n'expriment qu'une très faible activité ($1,1 \times 10^{-8}$ $\mu\text{mol/h/mg}$), alors que ceux provenant des extraits de MG possèdent des activités relativement élevées ($7,5 \times 10^{-8}$ $\mu\text{mol/h/mg}$). Sans surprise les extraits de KG sont ceux qui ont une activité la plus faible.

Par conséquent, les extraits de JG et de MG peuvent être avantageusement exploités pour la production de biocatalyseurs doués d'activités de transestérification adéquates pour la production d'EEHV.

Selon nous, la faible activité catalytique des extraits de KG pourrait être liée à une question de spécificité des lipases qu'ils contiennent. Selon Hellyer (Hellyer *et al.*, 1999a) les lipases végétales ont une préférence pour les acides gras dominants dans la graine dont elles sont issues. La composition en acides gras du beurre de karité représentée sur la Figure 18-d indique que l'acide stéarique est un des acides gras majoritaires dans le beurre de *karité* (43,5%) (Salis *et al.*, 2005), alors que ce dernier est présent en très faible proportion (2,93%) dans l'huile de tournesol utilisée (cf. Figure 17-a).

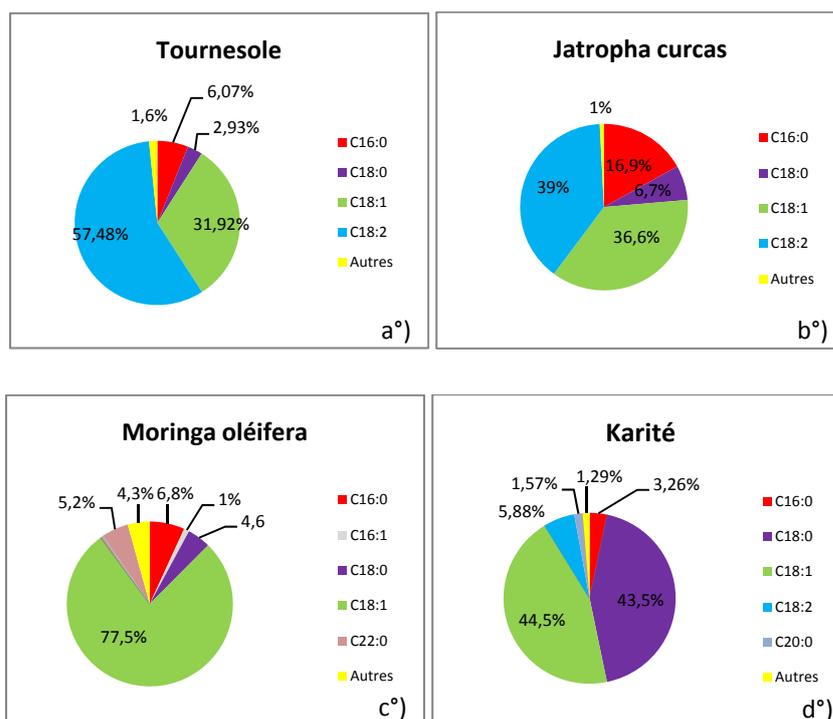


Figure 17 : Profil d'acides gras d'huiles végétales.

Sur la figure 17 a°) l'huile de tournesol, la figure 17 b°) l'huile de jatropha, la figure 17 c°) l'huile de moringa, et la figure 17 d°) l'huile de karité. Les profils (a) et (b) ont été obtenus par analyse CPG et (c) et (d) sont issus de la bibliographie (Alba-Rubio *et al.*; Salis *et al.*, 2005)

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle la lipase de karité aurait tendance à catalyser uniquement les TAG portant l'acide stéarique, un test de spécificité de substrat en utilisant du beurre de karité comme substrat à transestérifier devrait être réalisé.

1.5 Corrélations entre l'activité hydrolytique et l'activité en transestérification des extraits végétaux

Selon la bibliographie, l'activité en hydrolyse et l'activité en transestérification des extraits végétaux enzymatiques sont liées entre elles. Ces deux activités seraient dues aux mêmes protéines enzymatiques: les lipases. En effet, les lipases sont capables de catalyser non seulement l'hydrolyse, mais aussi diverses réactions de synthèse, telles que l'estérification, la transestérification, l'aminolyse etc., (Domínguez De María *et al.*; Hellyer *et al.*, 1999b; M. Barros *et al.*, 2010).

Nous avons étudié l'évolution de l'activité de transestérification des extraits végétaux testés en fonction de leur activité hydrolytique mesurée (cf. Figure 18).

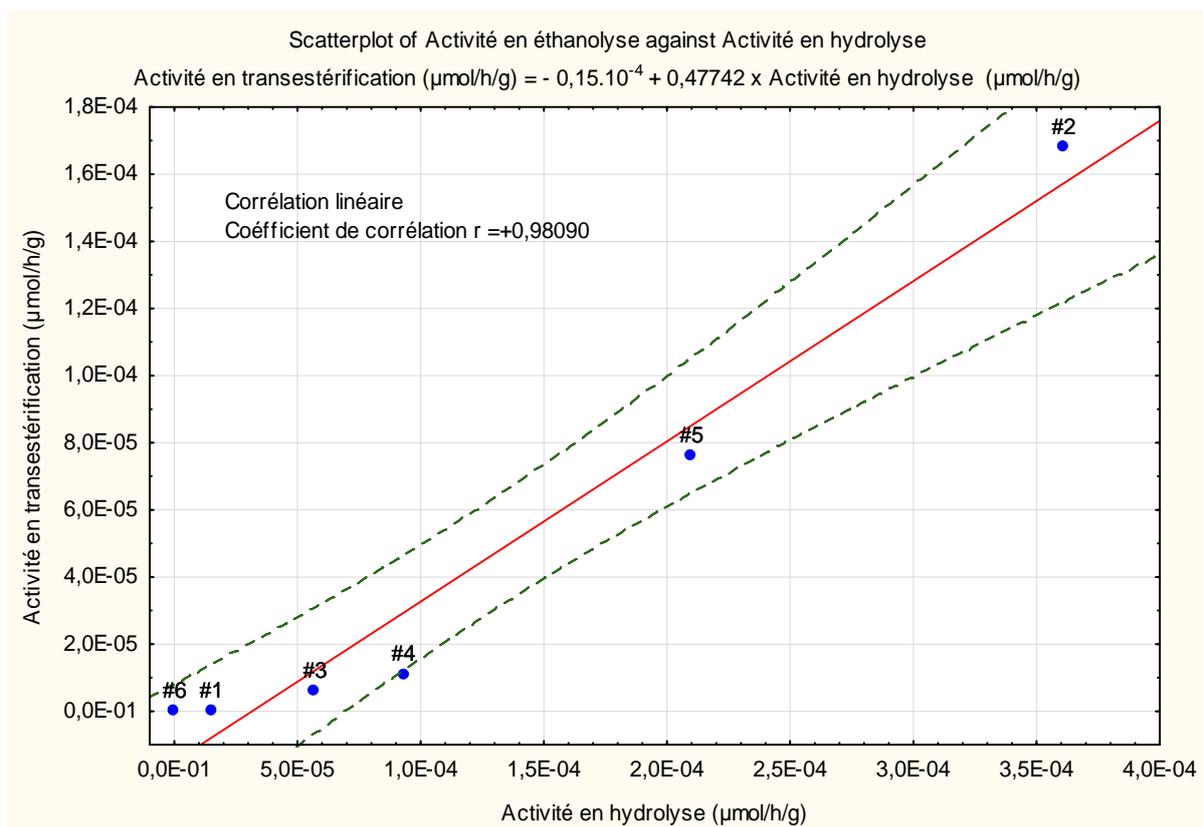


Figure 18: Corrélation entre les activités des lipases en hydrolyse et en transestérification

N°1 : Arachide Germé; N°2 : Jatropha germé; N°3 : Karité dormant; N°4 : Karité germé ; N°5 : Moringa germé ; N°6 :Balanitès germé

L'analyse de cette représentation met clairement en évidence que les deux type d'activités sont liées l'une à l'autre. Une droite parfaite est obtenue en reliant les points ($R^2=0,96$), avec

un coefficient de corrélation $r=+0,98$ obtenu dans un intervalle de confiance de 95%, ce qui traduit bien une forte dépendance entre l'activité en hydrolyse et celles obtenue en transestérification. Ces résultats montrent que mettre en évidence l'activité hydrolytique des différents extraits végétaux est un bon indicateur de la potentielle activité synthétique en transestérification. Toutes fois, il faut garder à l'esprit que le comportement d'une lipase en hydrolyse n'est pas forcément le même quand elle catalyse ou transestérification des TAG (Crooks G.E, 1995; Wu *et al.*, 1996). À cause du fait que l'activité synthétique peut varier en fonction de la composition du milieu réactionnel ou de certaines spécificités intrinsèques de la lipase vis-à-vis du ou des substrats. C'est ce que qu'on a pu observer avec les extraits d'arachide germé et de balanitès germé. Ces dernies qui étaient précédemment actifs en hydrolyse et sont inactifs en transestérification. Dans ce cas, il est donc préférable que l'identification de nouvelles sources de lipase soit réalisée directement à partir de la réaction de synthèse à mettre en œuvre et à valoriser avec les substrats adéquats dans des conditions de réaction bien définies.

1.6 Bilan de l'évaluation de l'activité enzymatique des extraits végétaux testés

Nous avons évalué l'activité lipasique des extraits végétaux obtenus à partir de certaines biomasses locales (Burkina Faso) au cours de:

- (i) l'hydrolyse de l'huile végétale
- (ii) et de la transestérification éthanolique de l'huile végétale.

Comme récapitulé dans le Tableau 12, les extraits végétaux préparés à partir de graines de germées de jatropha, de moringa, de karité sont doués d'une activité hydrolytique et de transestérification.

Tableau 12: Récapitulatif des principaux résultats obtenus à l'issus du processus de sélection des extraits végétaux lipasiques en fonction de leurs activité hydrolytique et de leur activité en éthanolyse

Étapes de screening	Nombre de biomasses sélectionnées	
Préparation des extraits végétaux	14	
Test d'hydrolyse	6	
Test de transestérification	2	
Source de lipases	Activité catalytique ($\times 10^{-8}$ $\mu\text{mol/h/mg}$)	
	Hydrolyse	Ethanolyse
Arachide germé	1,49	-
Jatropha germé	36,1	16,8
Karité dormant	5,72	nd
Karité germé	9,28	1,10
Moringa germé	21,0	7,58
Balanitès germé	2,27	-

À notre connaissance, c'est la première fois que le moringa et le karité sont identifiés comme biomasses avec une activité catalytique en hydrolyse et en transestérification.

Les extraits de graines germées de jatropha et de moringa sont les meilleurs candidats pour la biosynthèse d'esters éthyliques car ayant les activités biocatalytiques les plus élevées en hydrolyse et en transestérification parmi tous les extraits végétaux testés.

Les essais de transestérification ont permis de mettre en évidence que la composition du mélange réactionnel est un facteur très important pour appréhender l'activité catalytique

d'extraits végétaux. Une forte teneur en éthanol dans le milieu inhibe l'activité catalytique des extraits végétaux. Le rapport stœchiométrique entre les TAG et l'éthanol est un paramètre important qui affecte de façon significative l'activité catalytique des lipases et par conséquent le rendement de transestérification.

Il est possible d'optimiser la réaction, en s'inspirant de travaux antérieurs décrits par Mittelbach (Mittelbach, 1990) et Basri et al., (Basri *et al.*, 1997) au cours desquels l'effet inhibiteur de l'alcool est contrecarré par des ajouts progressifs de faibles quantités d'alcool par intervalles de temps réguliers pendant toute la durée de la réaction.

Compte tenu des résultats obtenus et de l'intérêt croissant des esters d'huiles végétales dans le domaine des biocarburants, nous avons poursuivi l'étude en travaillant sur l'optimisation de la production de biodiesel éthylique à l'aide de préparations lipasiques issues de graines germées de jatropha et de moringa.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 2 : ETUDE DE CERTAINS FACTEURS INFLUANT SUR LA REACTION DE TRANSESTÉRIFICATION ÉTHANOLIQUE D'HUILE VÉGÉTALE À L'AIDE DES EXTRAITS DE JATROPHA ET DE MORINGA

2. ETUDE DE CERTAINS FACTEURS INFLUENTS SUR LA REACTION DE TRANSESTÉRIFICATION ÉTHANOLIQUE D'HUILE VÉGÉTALE À L'AIDE DES EXTRAITS DE JATROPHA ET DE MORINGA

Les résultats du chapitre précédent ont permis de mettre en évidence que les extraits végétaux obtenus à partir de graines germées de jatropha (JG), de moringa (MG) sont sources potentielles de lipases capables de catalyser à la fois l'hydrolyse des TAG et la transestérification de ces derniers avec de l'éthanol.

Certains facteurs influant sur la réaction de transestérification pour la production de biodiesel à partir d'huile végétale et d'éthanol, a fait l'objet d'une étude en utilisant comme biocatalyseur les deux extraits végétaux les plus actifs, les extraits de graines germées de jatropha (JG) et de graines germées de moringa (MG). Dans ce chapitre sont présentés les résultats des essais conduits pour étudier l'influence de certains facteurs sur la réaction de transestérification selon la méthodologie de plan d'expérience.

2.1 Méthodologie de plan d'expérience appliquée à la transestérification éthanolique d'huile végétale à l'aide d'extraits végétaux

La méthodologie des plans d'expériences a été choisie plutôt qu'une méthode d'expérimentation classique parce qu'elle permet de déterminer les conditions optimales de réaction en ayant connaissance de l'influence des différents facteurs intervenant au cours de la réaction ainsi que leurs interactions.

2.1.1 Choix des facteurs à étudier au cours de la réaction de transestérification

Une fois la préparation lipasique, le milieu réactionnel et les substrats appropriés choisis, la stabilité et l'efficacité catalytique des lipases en transestérification peuvent être améliorées par l'optimisation de certains paramètres expérimentaux (ou facteurs) (Antczak *et al.*, 2009; Kumari *et al.*, 2009).

Nous avons choisi d'étudier dans un premier temps l'influence du ratio molaire des substrats (TAG:EtOH), de la charge en biocatalyseur, et de la teneur en eau sur l'activité catalytique des extraits végétaux pour les raisons suivantes.

- (i) Le ratio molaire TAG:EtOH est un facteur essentiel à maîtriser compte tenu de l'effet inhibiteur des fortes concentrations en éthanol sur l'activité catalytique des lipases en général, comme nous avons pu l'observer dans le chapitre précédent sur les essais menés à partir des extraits végétaux de JG et MG. Il est donc important d'étudier l'influence du ratio molaire EtOH:TAG afin d'établir sa valeur optimale (Mittelbach, 1990) (Basri *et al.*, 1997),
- (ii) Une quantité minimale d'eau est nécessaire à l'activité catalytique des lipases; cependant une quantité trop importante d'eau augmente le risque d'hydrolyse des TAG ou des esters formés (Kumari *et al.*, 2009), de l'effet barrière et/ou de l'agrégation des protéines enzymatiques. Comme nous envisageons d'utiliser du bioéthanol moins cher, souvent hydraté (95°) (Brunschwig *et al.*, 2011), pour la production de biodiesel, la teneur en eau nous est apparue comme un facteur opérationnel important à étudier,
- (iii) enfin, il est important de déterminer la charge en biocatalyseur appropriée qui permet de maximiser la conversion des TAG en EEHV sans limiter les phénomènes de transfert de masse.

La température est également un facteur influant sur l'activité catalytique des lipases végétales issues de graines. D'après l'analyse bibliographique réalisée, sa valeur optimale en transestérification oscille entre 30 et 40°C, à quelques exceptions près. De ce fait, nous avons choisi de réaliser l'optimisation de la transestérification à 37°C. Ce qui se rapproche de la température optimale démontrée par d'Abigor *et al.*, (Abigor *et al.*, 2002) avec la lipase de *jatropha* bien qu'étant en dessous de 45°C observé au cours de l'hydrolyse des TAG dans le chapitre 1. Le choix de travailler en dessous de 45°C a été conforté par les travaux de Staubmann *et al.*, (Staubmann *et al.*, 1999) qui ont démontré qu'à 45°C la durée de demi-vie de la lipases de *jatropha* est très faible (330 min) par rapport à 30°C (70 jours).

2.1.2 Sélection des différents niveaux des facteurs sélectionné pour la réaction de transestérification

La réalisation du plan d'expérience a permis d'étudier les effets de ces facteurs prédéterminés et de mettre en évidence l'existence possible d'interaction entre eux. Pour chacun des facteurs sélectionnés, deux niveaux correspondant à une valeur basse et à une valeur haute ont été déterminé par des essais préliminaires.

2.1.2.1 Détermination de la gamme du ratio molaire TAG:EtOH

Des réactions de transestérification éthanolique ont été mises en œuvre en faisant varier les ratios molaires entre substrats. Les ratios molaires TAG:EtOH (1:0,3), (1:0,5), (1:1), (1:2), et (1:3) ont été testés. Sur la base de la bibliographie existante, (Watanabe *et al.*, 1999; Yesiloglu, 2004; Rodrigues *et al.*, 2010) nous avons choisi de travailler avec des ratios molaires TAG:EtOH inférieurs ou égales à (1:3) pour limiter l'effet inhibiteur de l'éthanol.

Les évolutions de la quantité d'EEHV formés à l'aide des extraits de JG et MG en fonction du ratio molaire TAG:EtOH sont représentées sur les Figure 19-A°) et 19-B°).

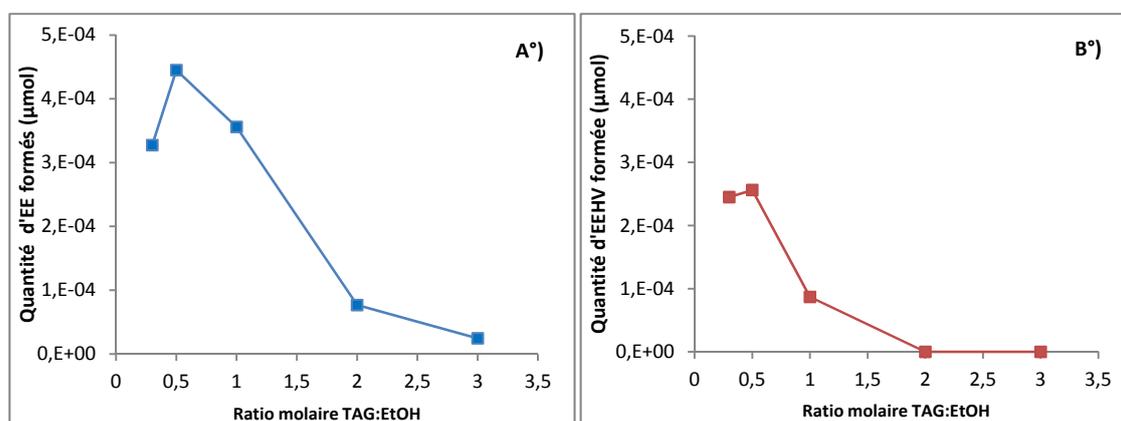


Figure 19: Quantité d'EEHV formée (µmole) en fonction du ratio molaire TAG:EtOH au bout de 24 H de réaction. A°) avec les extraits de JG et B°) avec les de MG.

Les résultats obtenus indiquent qu'entre (1:0,3) et (1:0,5), le nombre de moles d'EEHV formés augmente et le maximum est atteint pour un ratio molaire de (1:0,5). Au-delà de ce ratio molaire, le nombre de moles d'EEHV diminue et celui-ci s'annule lorsque le ratio molaires TAG:EtOH est supérieure ou égale à (1:2) en particulier avec les extraist de MG.

Les alcools à chaînes courtes dont le méthanol et l'éthanol sont connus pour avoir un effet inhibiteur sur l'activité catalytique des lipases au cours de réaction de transestérification (Shimada *et al.*, 2002; Hernández-Martín & Otero, 2008). Selon les travaux de Robles-Medina *et al.*, en 2009, la solubilité du méthanol ou de l'éthanol est le facteur limitant au cours de la transestérification enzymatique des TAG avec l'un de ces alcools. Ces deux alcools n'étant pas complètement solubles dans l'huile forment de fines gouttelettes d'alcool qui sont dispersées dans cette dernière. Le contact des enzymes avec ces fines gouttelettes d'alcool provoque l'inhibition des lipases (Shimada *et al.*, 2002) généralement attribuée à l'élimination par l'alcool de l'eau du microenvironnement de l'enzyme, ce qui entraîne une modification de la conformation active de l'enzyme par déshydratation (Cambon *et al.*, 2009) ou à la formation d'une barrière hydrophile constituée des molécules d'alcool autour des protéines lipasiques (polaires) et qui empêche les TAG hydrophobes d'accéder au site actif de l'enzyme. Cette barrière hydrophile peut aussi provoquer une agglomération des protéines lipasique et réduire ainsi la disponibilité des sites actifs accessibles aux substrats et la diminution de l'activité catalytique.

À partir de ce qui précède, on en déduit que la diminution de la quantité d'EEHV formés que nous avons observé au cours de nos essais de transestérification lorsque le ratio molaire TAG:EtOH est supérieure ou égale à (1:0,5) serait due à une inhibition progressive des extraits de JG et MG par contact avec les gouttelettes d'éthanol dispersées dans l'huile. Les deux extraits végétaux semblent avoir le même seuil d'inhibition par l'éthanol c'est-à-dire lorsque le ratio molaire TAG:EtOH est de (1:0,5). Toutes fois les extraits de JG apparaissent plus résistants à l'effet inhibiteur lié à l'augmentation de la concentration en éthanol que les extraits de MG. À partir du ratio molaire TAG:EtOH (1:2), les extraits végétaux MG sont complètement inactifs. Alors que les extraits de JG exhibent encore activité catalytique même si cette dernière est très faible au vu de petite quantité d'EEHV formés.

Les ratios molaires retenus pour la réalisation du plan d'expérience sont donc de (1:0,3), et (1:0,9) respectivement niveaux inférieur et supérieur. Étant donné qu'il faut plus de trois moles d'éthanol pour la conversion d'une mole de TAG, pour atteindre une conversion complète de l'huile en EEHV, nous allons procéder par des ajouts dosés d'éthanol par intervalles réguliers comme recommandé par certains auteurs dans la littérature (Watanabe

et al., 1999; Shimada *et al.*, 1999 ; Cambon *et al.*, 2009). L'avantage de cette méthode d'ajouts dosés est qu'elle permet d'avoir de faibles concentrations en éthanol tout au long de la réaction et par conséquent d'éviter l'effet inhibiteur de fortes concentrations d'alcool sur les extraits végétaux.

En comparant les rendements de transestérification obtenus après 6H de réaction à ceux obtenus au bout de 24H (cf. Figure 20 ci-dessous), on a pu constater que plus de 70% d'EEHV sont formés pendant les six premières heures de la réaction aussi bien avec les extraits de JG que de MG et ceci quelque soit le ratio molaire TAG:EtOH utilisé. Les rendements en EEHV représentés ci-dessus correspondent aux proportions d'EEHV formés par rapport à la quantité d'éthanol introduite dans le milieu, l'éthanol étant considéré comme le réactif limitant au cours de ces essais. Pour la suite des expérimentations, nous avons retenu la 6H comme intervalle de temps entre deux ajouts d'éthanol. Car s'il faut dix ajouts de 0,3 moles d'éthanol pour convertir 1 mole de TAG (cas du ratio molaire le plus faible TAG:EtOH (1:0,3)), alors 6H représente un bon compromis entre une durée de réaction pas trop longue (60H) et une quantité maximale d'EEHV formé entre deux ajout éthanol.

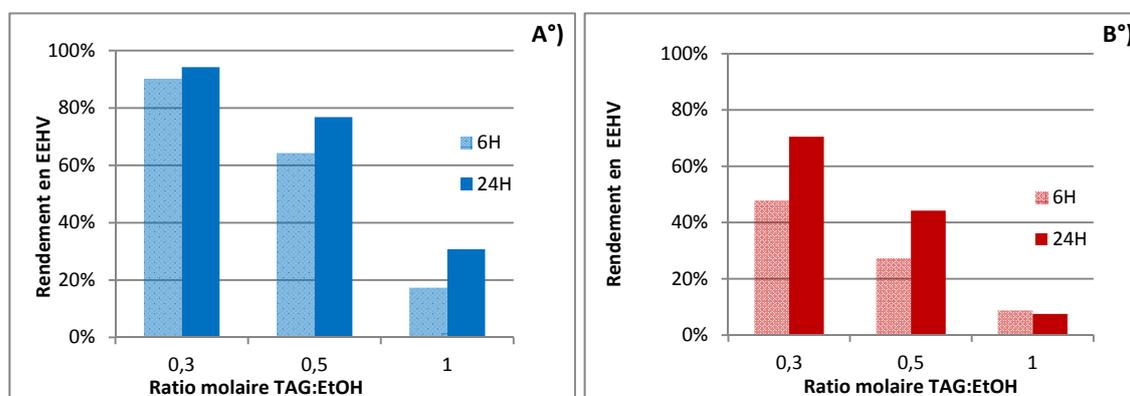


Figure 20: Rendement en EEHV formés par rapport au ratio molaire TAG:EtOH après 6H et 24H de réaction. La figure 20 A°) représente les rendements obtenus avec les extraits de JG et la figure 20 B°) ceux obtenus extraits de MG. Le rendement a été déterminé par le rapport entre le nombre de moles d'EEHV formés et le nombre de moles d'éthanol initial.

2.1.2.2 Détermination de la gamme de teneur en eau dans l'éthanol

Comme nous envisageons l'utilisation du bioéthanol pour la production de biodiesel, une gamme appropriée de la teneur en eau dans l'éthanol a été déterminée pour la réalisation

du plan d'expérience. La Figure 21 présente les résultats du suivi de l'évolution du rendement en EEHV en fonction de la teneur en eau dans l'éthanol comprise entre 0% et 15% (v/v).

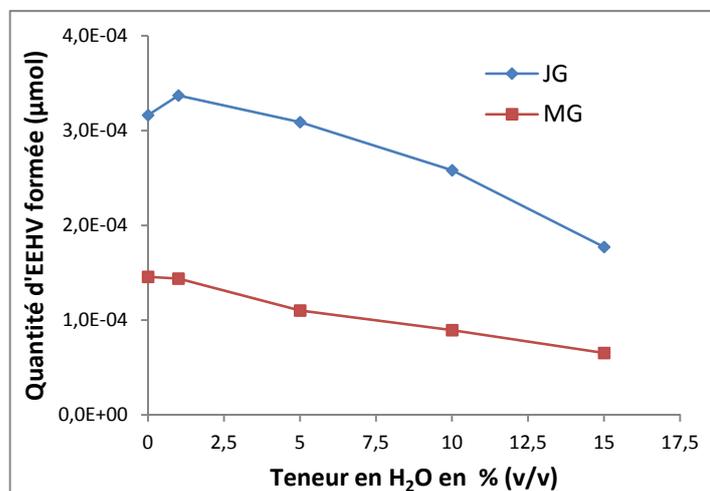


Figure 21: Quantité d'EEHV formé (µmol) en fonction de la teneur en eau dans l'éthanol (v/v) après 6H de réaction.

Sur la Figure 21, On observe qu'entre 0 et 1% d'eau dans l'éthanol, la quantité d'EEHV formés à l'aide des extraits de JG augmente tandis que la quantité d'EEHV formés à l'aide des extraits de MG décroît faiblement. Et lorsque la teneur en eau supérieures à 1%, la quantité d'EEHV formée décroît aussi bien avec les extraits de JG que ceux de MG. Sachant que la quantité d'EEHV formés rend compte de l'activité catalytique des extraits végétaux, on en déduit qu'à hauteur de 1%, l'augmentation de la teneur en eau dans l'éthanol améliore l'activité catalytique des extraits de JG tandis qu'elle altère celle des extraits de MG. L'influence de la teneur en eau sur l'activité catalytique des extraits de JG est similaire à celle observée avec la lipase microbienne de *C. viscosum*. En effet l'addition d'eau à hauteur de 1% dans le milieu réactionnel permet l'augmentation du rendement de production de biodiesel (de 73 à 92%) à l'aide de lipase de *C. viscosum* (Shah *et al.*, 2004). Cet effet de la teneur en eau sur l'activité catalytique des lipases s'expliquent par le fait qu'en milieu organique, les lipases ont généralement besoin d'un minimum d'eau dans leur microenvironnement (Shah *et al.*, 2004; Kumari *et al.*, 2009) qui leur confère une certaine flexibilité et leur permet d'adopter leurs conformations catalytiques actives (Al-Zuhair *et al.*, 2003). Comme on a pu l'observer entre les extraits de JG et ceux de MG, toutes les lipases n'ont pas la même teneur en eau optimale au cours de réactions de transestérifications.

Certaines lipases sont plus sensibles à l'eau que d'autres. Par exemple la teneur en eau optimale pour la transestérification éthanolique de l'huile de jatropha à l'aide de la lipase de *P. cepacia* est de 5% v/v (Shah & Gupta, 2007), tandis la teneur en eau optimale pour la transestérification éthanolique de l'huile de tournesol à l'aide de la lipase de *T. lanuginosus* est de 13% (Verdugo *et al.*, 2010).

Mais attention, l'augmentation de cette quantité d'eau au-delà d'une valeur seuille peut avoir un effet négatif sur le rendement de transestérification. Car une quantité trop importante d'eau peut:

- (i) soit favoriser la formation des réactions d'hydrolyses des TAG ou des EEHV entraînant une diminution du rendement de transestérification,
- (ii) soit provoquer l'agrégation des particules enzymes limitant ainsi l'accessibilité des substrats aux sites actifs des lipases.

Pour vérifier la première hypothèse, c'est-à-dire que l'augmentation de la teneur en eau favoriserait la formation de réaction d'hydrolyse, nous avons déterminé par CCM couplée à la densitométrie la quantité d'acides gras libres (AGL) contenue dans le milieu réaction en fonction de la teneur en eau dans l'éthanol au bout de 6H de réaction de transestérification. Les résultats obtenus sont représentés par la Figure 22.

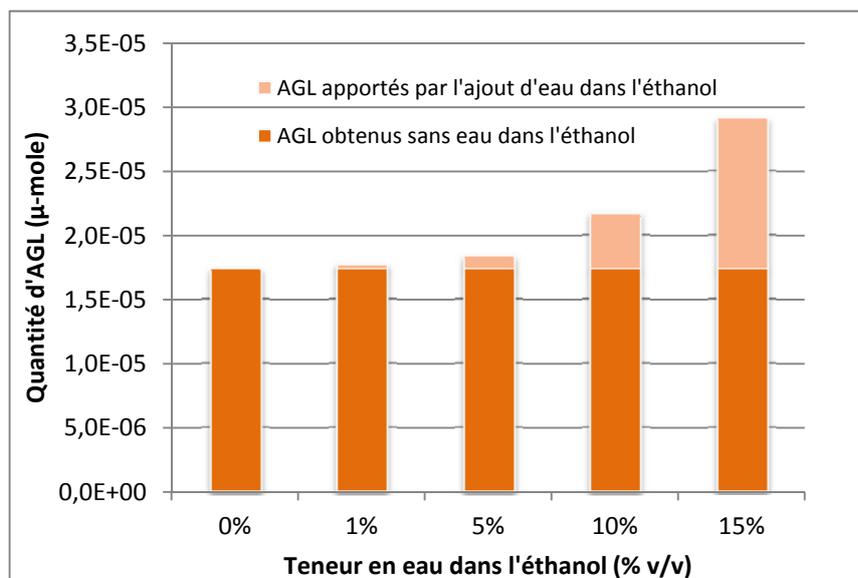


Figure 22: Quantité d'AGL (μmole) contenue dans le milieu réactionnel en fonction de la teneur en eau dans l'éthanol (% v/v).

Résultats de la transestérification éthanolique de l'huile de tournesol à l'aide d'extraits de JG pendant 6H.

Les résultats présentés sur la Figure 22 montrent que les AGL sont produits au cours de la réaction de transestérification quelque soit la teneur en eau dans l'alcool. On remarque que la quantité d'AGL produite à 1% ou celle produite 5 % est légèrement supérieure à celle obtenue avec l'éthanol anhydre (0%). Des résultats similaires ont été obtenus avec les extraits de MG. Si on considère la différence entre la quantité d'AGL obtenue à 1% ou à 5% avec celle obtenue à 0% comme étant la quantité d'AGL apportée par l'ajout d'eau, il ressort que les AGL obtenus dans l'intervalle de 1 à 5% représentent moins de 2% de la totalité des AGL présents dans le milieu. Cela sous-entend que la diminution de la quantité EEHV pour des teneurs en eau comprises entre 1 et 5% ne résulte pas de la formation importante de réactions d'hydrolyses liées à la présence d'eau dans l'éthanol, mais plutôt qu'elle pourrait être due à l'agglomération des particules des extraits au contact avec l'eau. Par contre au-delà de 5%, la teneur en eau dans l'éthanol favorise clairement la formation des réactions d'hydrolyse car la quantité d'AGL obtenue avec 10 ou 15% augmentent de façon exponentielle.

La teneur en eau dans l'éthanol est un facteur opérationnel clé qui doit être optimisé pour chaque lipase. Mais, pour la réalisation du plan d'expérience, les deux extraits seront employés au cours des réactions de transestérification avec des teneurs en eau dans l'éthanol de 0 et 5% (v/v) respectivement niveau inférieure et niveau supérieure.

2.1.2.3 Détermination de la gamme de charge en biocatalyseur

Pour déterminer la charge adéquate en biocatalyseur à utiliser pour le plan d'expérience, des réactions de transestérification éthanolique ont été réalisées avec des charges croissantes en biocatalyseurs de 10, 20 et 30% m/m par rapport au substrat. Cette gamme de charge en biocatalyseur se situe dans l'intervalle de 5 à 50% (m/m), couramment utilisée dans divers études de synthèse d'esters à l'aide de biocatalyseur végétal (Dandik & Aksoy, 1996; Jachmanián & Mukherjee, 1996; Liaquat & Apenten, 2000; Cambon *et al.*, 2009).

L'évolution de la quantité d'EEHV formée (μmol) en fonction de la charge en extrait végétal est reportée sur la Figure 23

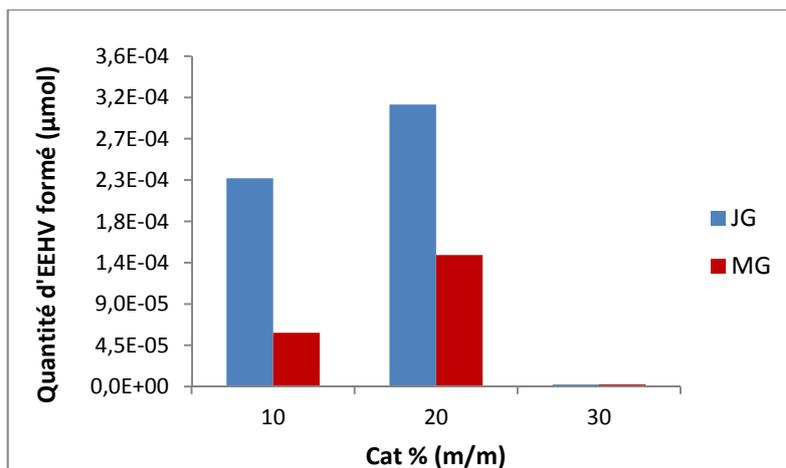


Figure 23 : Évolution de la quantité d'EEHV (μmol) en fonction de la charge en extraits végétaux

De l'analyse des résultats obtenus, il ressort qu'une augmentation de la charge en extraits de 10 à 20 % m/m se traduit par une augmentation de la quantité d'EEHV formée de 35% avec les extraits de JG et de 143% avec les extraits de MG. Ces résultats confirment que l'efficacité de la catalyse est aussi fonction de la charge en biocatalyseur (Dias Ribeiro *et al.*, 2011). L'augmentation de la charge en biocatalyseur entraîne une cinétique de réaction plus rapide et une quantité d'EEHV formée durant 24H plus élevée. Ce phénomène est plus marqué avec les extraits de MG comparé aux extraits de JG.

Les essais avec 30% de charge en catalyseur n'ont pas pu être correctement réalisés, le volume de la phase liquide n'étant pas suffisant pour mettre complètement en suspension le catalyseur solide. La forte charge en extraits rend le milieu si visqueux que l'agitation du milieu réactionnel est quasi impossible. Les charges inférieures et supérieures en biocatalyseur sélectionnées pour le plan d'expérience sont respectivement 10 et 20%.

2.1.3 Définition du domaine expérimental du plan d'expérience

Le domaine expérimental a été déterminé à partir des résultats obtenus lors des essais préliminaires, récapitulés dans le Tableau 13. Les essais de transestérification du plan d'expérience ont été réalisés sur 4 g d'huile de tournesol en utilisant des ajouts dosés d'éthanol par intervalles de 6H, la durée de réaction fixée à 72H. Le ratio molaire (TAG:EtOH) correspondant à (1:0,3) pour le niveau inférieur et à (1:0,9) pour le niveau supérieur. La

teneur en eau dans l'éthanol est de 0 et 5% v/v, et la charge en catalyseur dans le milieu est de 10 et 20%.

Tableau 13: Domaine expérimental et niveau de distribution des variables utilisées lors de la transestérification éthanolique de l'huile de tournesol

facteurs réelles	Facteurs codés	Unités	Niveau inférieur	Niveau supérieur
RM (TAG:EtOH)	X1	mol/mol	(1:0,3)	(1:0,9)
Teneur en eau	X2	v/v (%)	0	5
Charge en Catalyseur	X3	m/m (%)	10	20

Le logiciel STATISTICA® (version 10. Évaluation) a été utilisé pour générer une matrice d'expérience qui comprend 8 essais aux extrémités du domaine expérimental.

Le Tableau 14 représente la matrice des expériences et les différents rendements observés pour chaque essai noté « Yobs », avec Yobs1 indiquant les réponses obtenues avec les extraits de JG et Yobs2 celles obtenu avec les extraits de MG. La réponse expérimentale observée Yobs est nombre de moles d'EEHV/nombre total de liaisons esters possibles ramené au pourcentage.

Le rendement d'EEHV formés est calculé par la formule suivante:

$$Yobs (\%) = \frac{n \text{ EEHV}}{(3 * n \text{ TAG} + 2 * n \text{ DAG} + n \text{ MAG})} * 100$$

où nEEHV est le nombre de mole d'ester éthylique d'huile végétale mesuré, nTAG le nombre de mole de triglycérides, nDAG celui des diglycérides et nMAG le nombre de mole de monoglycérides initial. En d'autres termes le pourcentage d'EEHV traduit le taux de conversion des AG totaux contenus dans l'huile en esters.

Les essais de transestérification ont été réalisés dans l'ordre d'affichage présenté dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Matrice d'expérience avec les rendements de transestérification équivalents

N° essais	Facteurs étudiés			Réponses observées	
	X1	X2	X3	Yobs1 %	Y2obs %
1	(1:0,3)	0	10	13,74	5,60
2	(1:0,3)	5	10	13,23	4,18
3	(1:0,3)	0	20	30,06	10,02
4	(1:0,3)	5	20	29,43	9,81
5	(1:0,9)	0	10	13,81	3,16
6	(1:0,9)	5	10	4,27	2,42
7	(1:0,9)	0	20	14,15	4,72
8	(1:0,9)	5	20	9,48	2,16
9	(1:0,6)	2,5	15	16,66	5,55
10	(1:0,6)	2,5	15	19,99	6,66
11	(1:0,6)	2,5	15	19,06	5,35
12	(1:0,6)	2,5	15	14,89	5,96

À partir du plan d'expérience et des données expérimentales obtenues, un modèle mathématique du premier ordre a été développé pour décrire la relation entre la réponse prédite (Ypred) et les facteurs étudiés. L'équation de prédiction est représentée comme ci-dessous:

$$Y_{\text{pred}} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i * X_i + \sum_{i=1}^2 * \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} * X_i * X_j$$

avec Ypred est la réponse représente la réponse prédite, X_i, X_j les facteurs codés étudiés (les conditions de réaction); $X_i * X_j$ les interactions (multiples) entre différents facteurs, β_0 le terme constant, β_i et β_j le coefficient linéaire de chacun des facteurs, β_{ij} les termes d'interactions entre différents facteurs.

Un essai a été réalisé au centre du domaine (essai 9) pour vérifier la validité du modèle, et 3 essais de répétition toujours au centre (les essais, 10, 11, 12) ont été réalisés afin de déterminer l'erreur expérimentale. L'erreur expérimentale est intégrée dans le calcul de l'estimation des effets des facteurs. Ainsi, au total, 12 essais de transestérification ont été réalisés avec chacun des extraits végétaux.

2.2 Analyse statistique des résultats du plan d'expérience

Les résultats du plan d'expérience ont été traités par la méthode d'Analyse de Variance (Analysis of Variance) ou ANOVA à l'aide du logiciel STATISTICA® (Version 10. Evaluation). L'ANOVA est une méthode statistique qui fournit des indications sur la validité du modèle de prédiction d'une réponse et sur les erreurs associées à cette réponse. Elle permet aussi d'interpréter l'influence des facteurs étudiés y compris leurs interactions sur la performance du procédé mise en œuvre. Cette méthode est couramment utilisée pour l'optimisation des paramètres de réaction transestérification (Ghadge & Raheman, 2006; D'cruz *et al.*, 2007; Kumar Tiwari *et al.*, 2007).

Les résultats de l'ANOVA pour chacun des extraits sont résumés dans les Tableaux 15 et 16, et l'estimation des coefficients de l'équation du modèle pour chacun des extraits sont donnés dans le Tableau 17.

Tableau 15: ANOVA de la réponse expérimentale étudiée Yobs1 =rendements en EEHV obtenus avec JG. Avec SC : somme des carrés; DDL : degrés de libertés ; MC : moyenne des carrés ; F : F de Fisher calculé, p: erreur alpha

Sources de variation	SC	DDL	MC	F	p
RM (X1)	250,2378	1	250,2378	43,32049	0,002759
H ₂ O (X2)	29,4534	1	29,4534	5,09890	0,086865
Cat (X3)	181,1840	1	181,1840	31,36608	0,004990
X1*X2	21,3235	1	21,3235	3,69146	0,127079
X1*X3	90,9446	1	90,9446	15,74407	0,016568
X2*X3	2,8208	1	2,8208	0,48832	0,523175
X1*X2*X3	3,1178	1	3,1178	0,53974	0,503285
Erreur	23,1057	4	5,7764		
TOTAL	602,1876	11			

Coefficient de détermination $R^2 = 0,96$; après ajustement du modèle $R^2 = 0,89$

Tableau 16: ANOVA de la réponse expérimentale étudiée Yobs2 (=rendements en EEHV obtenus avec MG). Avec SC : somme des carrés; DDL : degrés de libertés ; MC : moyenne des carrés ; F : F de Fisher calculé, p: erreur alpha

Sources de variation	SC	DDL	MC	F	p
RM (X1)	36,74165	1	36,74165	71,90045	0,001060
H ₂ O (X2)	3,03374	1	3,03374	5,93678	0,071474
Cat (X3)	16,09596	1	16,09596	31,49849	0,004952
X1*X2	0,34308	1	0,34308	0,67139	0,458581
X1*X3	9,59398	1	9,59398	18,77465	0,012321
X2*X3	0,04603	1	0,04603	0,09007	0,779035
X1*X2*X3	1,14928	1	1,14928	2,24904	0,208079
Erreur	2,04403	4	0,51101		
TOTAL	69,04774	11			

Coefficient de détermination $R^2 = 0,97$; après ajustement du modèle $R^2 = 0,92$.

Tableau 17: Récapitulatif des coefficients du modèle du premier ordre pour les réponses: (Yobs1) rendement en EEHV obtenu avec les extraits JG et (Yobs2) rendement en EEHV obtenu avec les extraits MG

	Ypred1	Ypred2
β_0	16,56532	5,46703
β_1	-5,59283**	-2,14306**
β_2	-1,91877	-0,61581
β_3	4,75899**	1,41845**
β_{12}	-1,63262	-0,20709
β_{13}	-3,37166*	-1,09510*
β_{23}	0,59380	-0,07585
β_{123}	0,62428	-0,37902

(*) : significativité avec $p < 0,05$; (**) : significativité avec $p < 0,01$, sans étoiles: statistiquement non significatif ($p > 0,5$)

Les étoiles dans le Tableau 17 indiquent le niveau de significativité des coefficients associés à chacun des facteurs étudiés par rapport à (p) l'erreur alpha. Si p est inférieur au seuil critique 0,01 ou 0,05 le plus souvent, alors on peut conclure de l'effet significatif du facteur.

2.2.1 Validité du modèle mathématique

Une bonne corrélation entre les données expérimentales et les données prédites par le modèle a été observée avec chacun des deux extraits. Les coefficients de détermination respectifs de $R^2 = 0,96$ et $0,97$ ont été obtenus avec les extraits de JG et de MG.

Les résultats des expériences réalisées au centre du domaine expérimental ont permis de vérifier la validité du modèle mathématique du premier ordre. La moyenne de ces résultats soit 17,65 avec les extraits de JG et 5,88 coïncident avec les résultats prédits par le modèle, soit 16,57 pour les extraits de JG et 5,47 avec une erreur absolue de 6,5% pour les extraits de JG et 7,6% pour les extraits de MG. À partir de ces résultats et du test de Fisher réalisé, il est possible d'en déduire que la régression est adéquate entre les données prédites et les données expérimentales. À l'image des travaux de Dzige et *al.*, sur la production de biodiesel à l'aide de la lipase microbienne immobilisée de *Thermomyces lanuginosus*, un modèle du 1^{er} ordre est suffisant pour expliquer la relation entre la conversion de l'huile en EEHV et les

facteurs étudiés (Dizge *et al.*, 2009). Un modèle du second ordre dans ce cas, ne s'avère pas nécessaire contrairement à la plupart des travaux rencontrés en bibliographie sur l'optimisation de l'activité enzymatique en transestérification (Wu *et al.*, 1999; Demirkol *et al.*, 2006; Sim *et al.*, 2009).

L'équation de prédiction du rendement de transestérification Y (pred) donne alors au 1er degré:

$$Y_{\text{pred}}(\text{JG}) = 16,56 - 5,59 * \text{RM} - 1,91 * \text{H2O} + 4,75 * \text{Cat} - 1,63 * (\text{RM} * \text{H2O}) - 3,37 * (\text{RM} * \text{Cat}) + 0,59 * (\text{H2O} * \text{Cat}) + 0,62 * (\text{RM} * \text{H2O} * \text{Cat})$$

$$Y_{\text{pred}}(\text{MG}) = 5,46 - 2,14 * \text{RM} - 0,61 * \text{H2O} + 1,41 * \text{Cat} - 0,20 * (\text{RM} * \text{H2O}) - 1,09 * (\text{RM} * \text{Cat}) - 0,07 * (\text{H2O} * \text{Cat}) - 0,37 * (\text{RM} * \text{H2O} * \text{Cat})$$

2.2.2 Analyse des résultats de l'ANOVA

Les coefficients de l'équation du modèle permettent d'évaluer les effets des différents facteurs étudiés ainsi que leurs interactions sur le rendement d'EEHV. Plus un facteur a un effet important en valeur absolue (positif ou négatif suivant le sens de l'action) plus son influence est significative par rapport à la réponse ($p < 0,01$ ou $0,05$).

L'analyse des effets obtenus (cf. Tableau 17) montre que quelque soit l'extrait végétal, le ratio molaire TAG:EtOH est le facteur ayant un impact prépondérant sur le rendement de transestérification avec un coefficient β_1 (JG) de -5,59 et β_1 (MG) de -2,14 est le plus grand. La charge en biocatalyseur (β_3 (JG) = 4,75 et β_3 (MG) = 1,41) et la teneur en eau (β_2 (JG) = -1,91 et β_2 (MG) = -0,61) ayant des coefficients plus faibles.

Les valeurs négatives des coefficients respectifs associés au ratio molaire TAG:EtOH et à la teneur en eau traduisent une diminution du rendement de transestérification (effet négatif non recherché) avec l'augmentation du ratio molaire TAG:EtOH ou de la teneur en eau dans l'éthanol. En ce qui concerne la teneur en eau dans l'éthanol, l'ANOVA nous renseigne que cet effet négatif est faible ($p > 0,05$) donc statistiquement négligeable dans l'intervalle étudié (0 à 5%) comparé à l'effet négatif de l'augmentation du ratio molaire TAG:EtOH qui est très

important (significativité avec $p < 0,01$). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'éthanol a un effet inhibiteur irréversible (Shimada *et al.*, 1999) sur l'activité catalytique des lipases tandis que l'eau en faible quantité favorise d'un point de vue cinétique l'activité catalytique exprimée en transestérification (Al-Zuhair *et al.*, 2006). Seule une quantité trop importante d'eau dans le microenvironnement de l'enzyme peut déplacer l'équilibre de la réaction dans le sens de l'hydrolyse des TAG ou des EEHV ce qui à ce moment impacte négativement sur le rendement de transestérification.

L'augmentation de la charge en biocatalyseur a un effet positif sur la conversion des TAG en EEHV avec les deux extraits (β_3 (JG) = 4,75 et β_3 (MG) = 1,41) et cet effet est statistiquement aussi important que l'effet négatif de l'augmentation du ratio molaire TAG:EtOH (significativité avec $p < 0,01$). L'effet positif de l'augmentation de la charge en catalyseur peut s'expliquer par le fait que plus la quantité d'extrait augmente et plus la quantité d'enzyme contenue dans l'extrait est importante. Un nombre plus important de molécules de substrat est adsorbé sur les sites actifs des lipases dans les conditions de réaction décrites. Notons que l'interaction entre le ratio molaire et la charge en catalyseur β_{13} (JG) = -3,37 et β_{13} (MG) = -1,09) impacte négativement sur le rendement de transestérification de façon significative ($p < 0,05$). Lorsque le ratio molaire TAG:EtOH et la charge en catalyseur évoluent dans le même sens, alors le rendement de transestérification diminue.

Tous les résultats obtenus à partir de l'ANOVA sont cohérents vis-à-vis de l'étude paramétrique (cf Chapitre 2 section 2.1.2). Celle-ci avait déjà permis de souligner une diminution des rendements de transestérification avec de fortes concentrations en éthanol, d'évoquer l'inconvénient de la présence de l'eau dans le milieu réactionnel ainsi que l'amélioration du rendement de transestérification avec l'augmentation de la charge en biocatalyseur.

Ainsi, en faisant abstraction des facteurs et des interactions qui ont tous une influence négligeable (statistiquement non significative) sur le rendement de transestérification, à savoir:

- (i) la teneur en eau dans l'éthanol (X_2), de l'influence de l'interaction entre le ratio molaire TAG:EtOH et la teneur en eau ($X_1 * X_2$),

- (ii) l'interaction entre la teneur en eau et de la charge en biocatalyseur ($X_2 * X_3$)
- (iii) ainsi que l'interaction entre le ratio molaire TAG:EtOH et la teneur en eau et de la charge en biocatalyseur ($X_1 * X_2 * X_3$),

il es possible de faire une nouvelle équation de prédiction du rendement en EEHV plus simple:

$$Y_{\text{pred}}(\text{JG}) = 16,56 - 5,59 * \text{RM} + 4,75 * \text{Cat} - 3,37 * (\text{RM} * \text{Cat})$$

$$Y_{\text{pred}}(\text{MG}) = 5,46 - 2,14 * \text{RM} + 1,41 * \text{Cat} - 1,09 * (\text{RM} * \text{Cat})$$

Les coefficients de déterminations ajustées R^2 obtenus avec les extraits de JG et de MG deviennent respectivement 0,89 et 0,91.

À partir des résultats expérimentaux du plan d'expérience et des deux équations de prédiction obtenues, des courbes d'isoréponses peuvent être générées par le logiciel STATISTICA®. L'exploitation de ces courbes permet de visualiser et de déterminer les conditions optimales de la transestérification valables dans le domaine expérimental. En fixant le niveau d'un des trois facteurs à sa valeur au centre du domaine expérimental, il est alors possible de suivre l'évolution des paramètres deux à deux. Nous avons dans un premier temps procédé à l'analyse des courbes isoréponses de transestérification avec les extraits de JG avant celles obtenues avec les extraits de MG.

2.3 Courbes isoréponses de l'analyse statistique des facteurs influençant la transestérification à l'aide des extraits de Jatropha et Moringa

2.3.1 Courbes isoréponses des facteurs influençant la transestérification à l'aide des extraits de graines germées de Jatropha

Les courbes isoréponses du rendement en EEHV formé à l'aide des extraits végétaux de JG obtenues en utilisant l'équation de prédiction $Y_{\text{pred}}(\text{JG})$ du plan d'expérience sont représentées sur la Figure 24.

CHAPITRE 2: ETUDE DE CERTAINS FACTEURS INFLUENTS SUR LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION

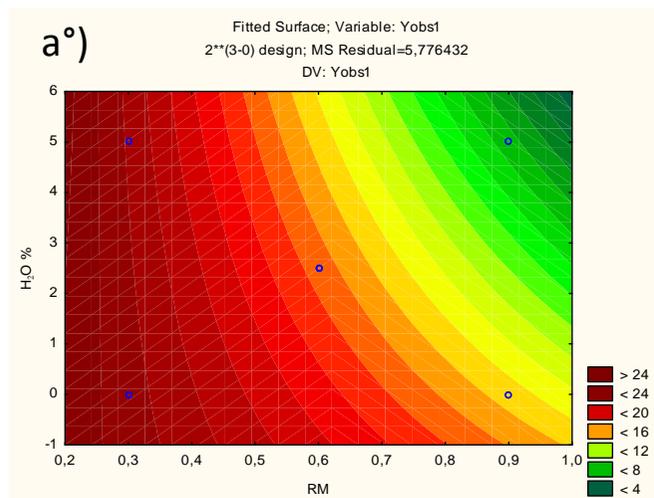
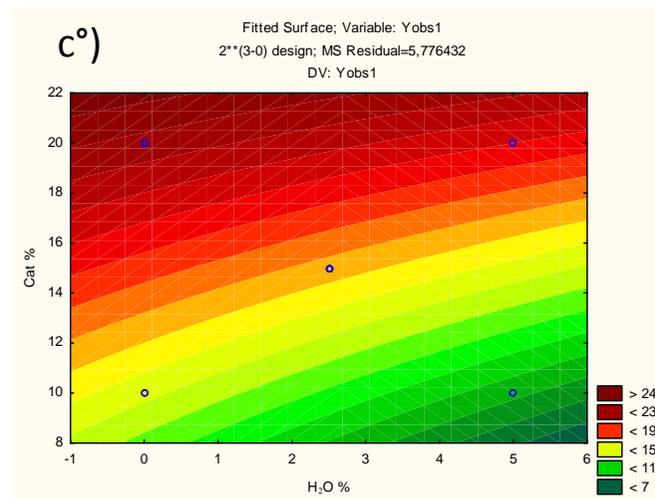
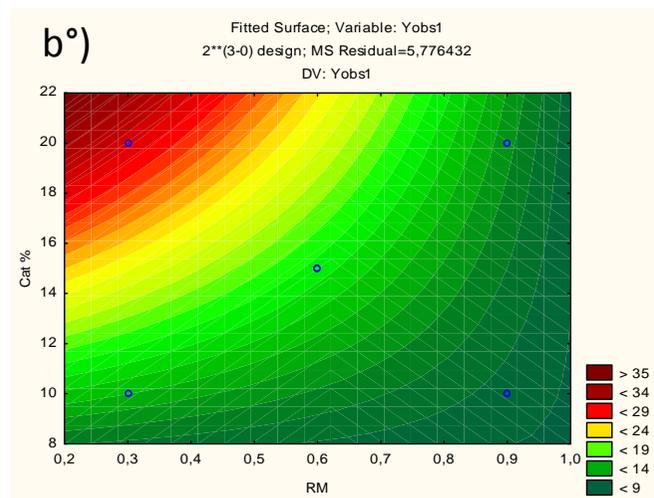


Figure 24 : Courbes isoréponses du rendement en EEHV formé à l'aide d'extraits végétaux de JG en utilisant le plan d'expérience.
RM : ratio molaire TAG:EtOH; H₂O % : teneur en eau, cat% : charge en biocatalyseur

- a) Courbes isoréponses de l'effet du ratio molaire et de la teneur en eau dans l'éthanol sur le rendement en EEHV. La charge en catalyseur fixé à 15%.
- b) Courbes isoréponses de l'effet du ratio molaire et de la charge en biocatalyseur sur le rendement en EEHV. La teneur en eau fixé à 2,5%.
- c) Courbes isoréponses de l'effet de la teneur en eau dans l'éthanol et de la charge en catalyseur sur le rendement en EEHV. Ratio molaire TAG:EtOH fixé à (1:0,6).



De l'analyse de ces résultats, il ressort que le rendement en EEHV est fortement influencé par le ratio molaire TAG:EtOH. Pour des faibles ratios molaires, le rendement d'EEHV est élevé. En revanche, la teneur en eau dans l'éthanol n'a pas d'effet significatif sur le rendement en EEHV particulièrement pour des ratios molaire supérieur à (0,6:1) (cf. Figure 24 –a°)).

Sur la Figure 24 –b°), la teneur en eau (H₂O%) étant fixé à 2,5, l'influence de la charge en catalyseur (Cat%) et du ratio molaire TAG:EtOH sur le rendement en EEHV est représentée. Il ressort que l'augmentation de la charge en catalyseur (Cat%) augmente le rendement en EEHV. Toutefois, il est possible d'observer que l'effet négatif de l'augmentation du ratio molaire sur le rendement de transestérification est prépondérant. L'augmentation de la charge en catalyseur a un effet positif sur le rendement en EEHV. Quelque soit le ratio molaire, l'augmentation de la charge en catalyseur permet d'améliorer le rendement en EEHV. On en déduit que l'augmentation de la charge en catalyseur permettrait de limiter l'effet inhibiteur des fortes concentrations en éthanol. Les meilleurs rendements (EEHV%>24%) sont obtenus pour des charges en catalyseur comprises entre 15 et 20% lorsque le ratio molaire TAG:EtOH est inférieur à (1:0,6).

Sur la Figure 24 –c°), le ratio molaire étant fixé à (0,6:1), l'influence relative de la charge en catalyseur (Cat%) et de la teneur en eau (H₂O%) est représentée. Il apparait que la variation du rendement est plus sensible à l'évolution de la charge en biocatalyseur qu'à celle de la teneur en eau. Sur une plage étendue, comprise entre 15 et 20%, l'augmentation de la charge en catalyseur a un effet prépondérant sur le rendement en EEHV par rapport à la teneur en eau dans l'éthanol.

2.3.2 Courbes isoréponses des facteurs influençant la transestérification à l'aide des extraits graines germées de Moringa

Les courbes isoréponses du rendement en EEHV formé à l'aide des extraits végétaux de JG obtenues en utilisant l'équation de prédiction Ypred (JG) du plan d'expérience sont représentées sur la Figure 25.

CHAPITRE 2: ETUDE DE CERTAINS FACTEURS INFLUENTS SUR LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION

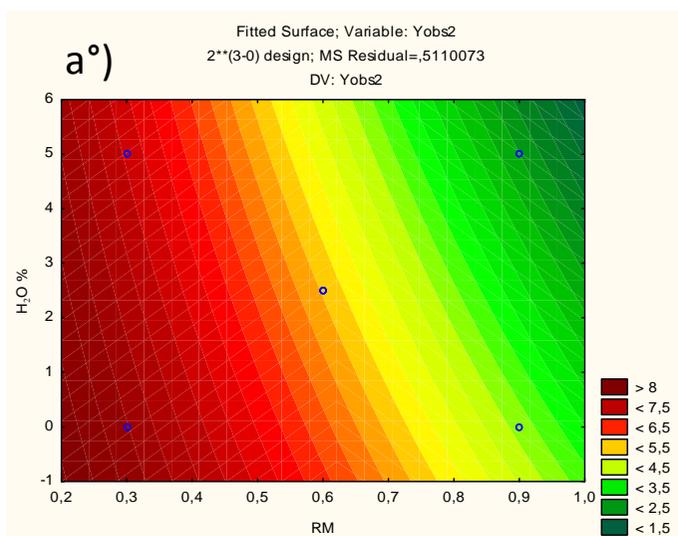
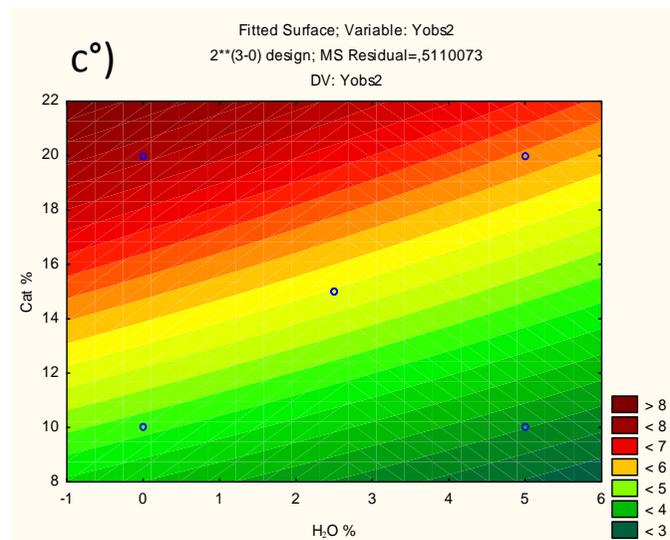
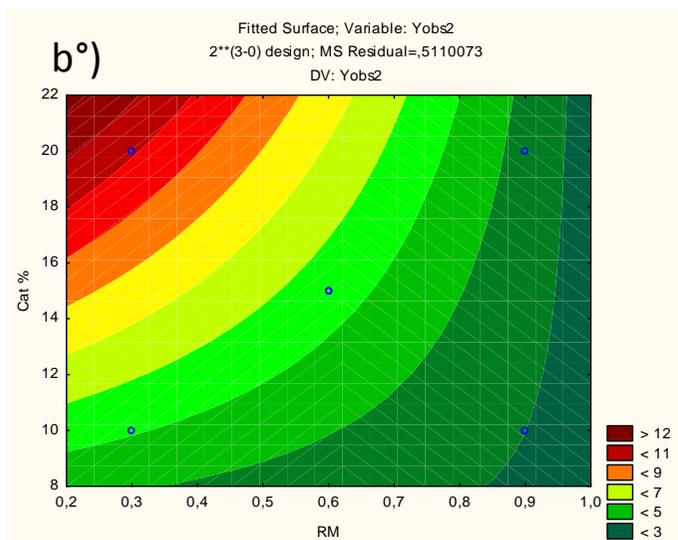


Figure 25 : Courbes isoréponses du rendement en EEHV formé à l'aide d'extraits végétaux de MG en utilisant le plan d'expérience.
RM : ratio molaire TAG:EtOH; H₂O % : teneur en eau, cat% : charge en biocatalyseur

- a) Courbes isoréponses de l'effet du ratio molaire et de la teneur en eau dans l'éthanol sur le rendement en EEHV. La charge en catalyseur fixé à 15%.
- b) Courbes isoréponses de l'effet du ratio molaire et de la charge en biocatalyseur sur le rendement en EEHV. La teneur en eau fixé à 2,5%.
- c) Courbes isoréponses de l'effet de la teneur en eau dans l'éthanol et de la charge en catalyseur sur le rendement en EEHV. Ratio molaire TAG:EtOH fixé à (1:0,6)



Les profils obtenus sont similaires à ceux de la Figure 25, faisant encore une fois ressortir l'importance du ratio molaire TAG:EtOH sur le rendement de transestérification. Comme avec les extraits de JG, le rendement en EEHV est fortement influencé par le ratio molaire TAG:EtOH. Il diminue avec l'augmentation du ratio molaire TAG:EtOH. Lorsqu'on fixe la charge en biocatalyseur à 15%, des rendements en EEHV supérieurs à 5,5% sont obtenus à condition que le ratio molaire soit inférieur à (0,6:1) et la teneur en eau inférieure à 2,5% (cf. Figure 25-a°)).

Lorsqu'on on fixe la teneur en eau à 2,5% l'influence du ratio molaire TAG:EtOH apparait à nouveau prépondérante sur le rendement de transestérification quelque soit la charge en catalyseur (cf. Figure 25-b°)). Toutefois, l'augmentation de la charge en catalyseur à un effet positif sur le rendement en EEHV (cet effet peut aussi être observé sur la Figure 25-c°) lorsque le ratio molaire TAG:EtOH est fixé à (1:0,6)). L'augmentation de la charge en catalyseur permet d'améliorer le rendement en EEHV que pour des faibles ratios molaires TAG:EtOH compris entre (1:0,3) et (1:0,5). Le rendement maximum (>7,5%) est atteint charge lorsque la charge en catalyseur est de 20% pour un ratio molaire TAG:EtOH de (1:0,3). L'effet positif de l'augmentation de la charge en catalyseur est moins prononcé avec les extraits de MG comparé à celui observé avec les extraits de JG.

Sur la Figure 25-c°), le ratio molaire étant fixé à (0,6:1), l'influence relative de la charge en catalyseur (Cat%) et de la teneur en eau (H₂O%) est représentée. Comme pour les extraits végétaux de JG, les extraits devégétaux de MG semble son peu sensible à l'eau. Une forte charge en catalyseur (20%) permet d'obtenir des rendements de transestérification proches du rendement d'EEHV maximum (compris entre 6 et 7%) quelle que soit la teneur en eau dans l'alcool.

2.4 Conclusion du plan d'expérience

A ce stade de l'analyse, il ressort que le ratio molaire et la charge en catalyseur sont les facteurs qui permettent de contrôler le rendement de transestérification de l'huile végétale avec l'éthanol à l'aide des extraits végétaux testés JG et MG. Outre la détermination des effets principaux des différents facteurs, la méthodologie des plans d'expériences, a permis de déterminer les différentes interactions entre les facteurs étudiées. Le Tableau 17 met en

évidence que l'interaction entre le ratio molaire et la charge en catalyseur a un impact négatif et non négligeable sur le rendement de transestérification. Pour affiner l'optimisation du rendement de transestérification, les deux facteurs ne doivent pas évoluer dans le même sens. L'augmentation de la charge en catalyseur doit s'accompagner par la diminution du ratio molaire.

Cependant les rendements de transestérification en fin de réaction n'excèdent pas 30% avec les extraits de JG et 11% pour les extraits MG. Si la réaction était totale les rendements en EEHV devraient atteindre des valeurs proches de 100%. Nous avons émis certaines hypothèses pour tenter d'expliquer l'obtention de ces faibles rendements.

- (i) La première hypothèse est qu'il existerait une selectivité des lipases contenues dans les extraits vis-à-vis du substrat (typoselectivité ou stéréosélectivité)
- (ii) La deuxième hypothèse est qu'il y aurait au cours de la réaction une inhibition compétitive par l'un ou les produits de transestérification (glycérol ou AGL).
- (iii) Et enfin la troisième hypothèse serait une désactivation progressive des lipases contenues dans les extraits à cause du traitement thermique.

Afin de pouvoir apporter des éléments de réponses quant à ces hypothèses, et en fonction des moyens techniques dont nous disposons, nous avons premièrement vérifié l'inhibition compétitive des produits de transestérification et la désactivation thermique des extraits végétaux.

2.5 Influence d'autres facteurs sur l'activité catalytique des extraits végétaux au cours de la transestérification éthanolique d'huile végétale.

Comme l'ont démontré (Stevenson *et al.*, 1994; Dossat *et al.*, 1999) le glycérol, co-produit de la transestérification, est connu pour avoir un effet inhibiteur sur l'activité catalytique des lipases (Stevenson *et al.*, 1994; Dossat *et al.*, 1999) et nous avons voulu vérifier son influence sur l'activité catalytique des extraits végétaux de JG et MG. Sur la base des travaux de Du *et al.*, (Du *et al.*, 2004) qui ont montré que les AG pouvaient aussi avoir un effet inhibiteur sur l'activité lipasique au cours de la transestérification de l'huile végétale pour la production de

biodiesel, nous avons étudié l'influence des AGL contenus dans l'huile sur le rendement transestérification lors de la catalyse à l'aide des extraits de JG et de MG. La stabilité thermique des extraits a aussi été étudiée afin de vérifier si le traitement thermique tout au long de la réaction n'était pas responsable de la désactivation des lipases contenues dans les extraits.

2.5.1 Influence du glycérol sur le rendement de transestérification éthanolique d'huile végétale catalysée par les extraits végétaux de jatropha et de moringa

Le glycérol est un composé connu pour avoir un effet inhibiteur sur l'activité catalytique de lipases au cours de la production de biodiesel (Laane C *et al.*, 1987; Castillo E *et al.*, 1997; Dossat *et al.*, 1999). Dans un système impliquant un mélange stœchiométrique d'éthanol et d'huile, si la conversion est totale, il se forme 10% de glycérol (m/m) par rapport à la masse du substrat (TAG).

Sur cette base, des essais de transestérification d'huile de tournesol contenant 10 % de glycérol (m/m) à l'aide des extraits de JG et MG ont été réalisés en utilisant la méthode des ajouts dosés avec un ratio molaire TAG:EtOH de (1:0,3). L'éthanol a été rajouté par intervalles de 6 heures pendant 66 heures.

Les rendements en EEHV respectivement obtenus avec chacun des extraits après 6H et après 60H ont été déterminés par l'analyse CCM couplée à la densitométrie. Les résultats sont présentés sur la Figure 26.

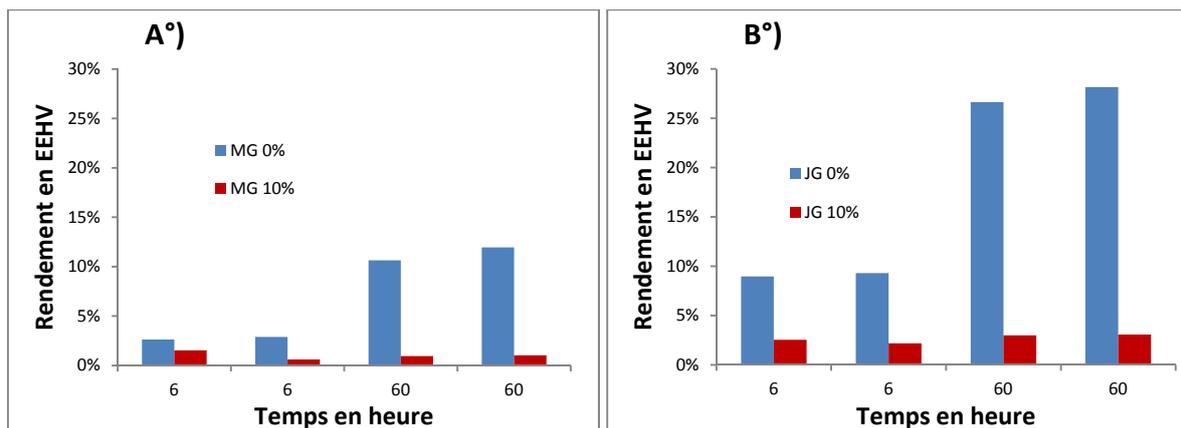


Figure 26: Influence du glycérol sur le rendement de transestérification.

Réactions mise en œuvre avec 10% m/m de glycérol dans le milieu réactionnel en début de réaction. A°) extraits de MG et B°) extraits de JG

Les résultats obtenus indiquent qu'à hauteur de 10% m/m, le glycérol présent initialement dans le milieu réactionnel limite la formation d'EEHV. Les rendements obtenus en fin de réaction contenant initialement 10% (m/m) de glycérol sont environ 90% inférieurs à ceux obtenus sans ajout de glycérol. Le glycérol a un effet négatif sur l'activité catalytique des extraits végétaux. L'addition de ce dernier dans le milieu fait baisser le rendement d'EEHV initial de 11% à 1% et de 27% à 3% respectivement avec les extraits de MG et de JG.

Selon la littérature l'effet inhibiteur du glycérol est lié à son caractère très hydrophile qui le rend insoluble dans le milieu réactionnel hydrophobe (Dossat *et al.*, 1999) et favorise son adsorption sur les protéines lipasiques. Les molécules polaires de glycérol formeraient une barrière hydrophile autour des molécules lipasiques et empêcheraient l'accessibilité des substrats au site actif des lipases. Ce phénomène associé à l'augmentation graduelle d'éthanol qui ne réagit pas entraînerait une diminution progressive de l'efficacité des extraits. Dans ce cas, un procédé de transestérification permettant l'élimination continue du glycérol pourrait permettre de limiter l'effet inhibiteur de ce dernier.

La réaction telle qu'elle a été mise en œuvre n'est pas très représentative des conditions réelles de transestérification, mais les résultats obtenus dans les conditions expérimentales décrites ont permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur du glycérol sur l'activité catalytique des extraits végétaux. Dans les conditions réelles de transestérification, le glycérol est progressivement libéré dans le milieu réactionnel et l'effet inhibiteur du glycérol absent en début de réaction augmente progressivement avec le taux de conversion des TAG

en esters tel qu'observée par (Royon *et al.*, 2007). Ce phénomène aurait pu être observé si le rendement en EEHV au cours de ces essais avait pu être suivi en continu (en fonction de l'évolution de la teneur en glycérol libre ajoutée dans le milieu).

2.5.2 Influence de la teneur en acides gras libres sur l'activité catalytique des extraits végétaux

Comme les AGL sont des produits de l'hydrolyse des TAG, et que ceux-ci peuvent être présents initialement dans l'huile (cas des huiles brutes ou usagées) ou bien peuvent être libérés au cours de la réaction de transestérification, nous avons étudié l'influence de la teneur en AGL dans le milieu réaction de transestérification.

Des essais de transestérification et estérification à l'aide des différents extraits ont été réalisés sur l'huile de tournesol contenant 0, 5, 10 et 20 % d'AGL (m/m). La réaction a été mise en œuvre en utilisant la méthode des ajouts dosés avec un ratio molaire TAG:EtOH de (1:0,3) et l'éthanol a été rajouté par intervalles de 6 heures pendant 66 heures.

Les rendements en EEHV obtenus avec chacun des extraits après 6H et après 60H ont été déterminés à l'issue de l'analyse CCM couplée à la densitométrie de la composition de chaque milieu réactionnel. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 27.

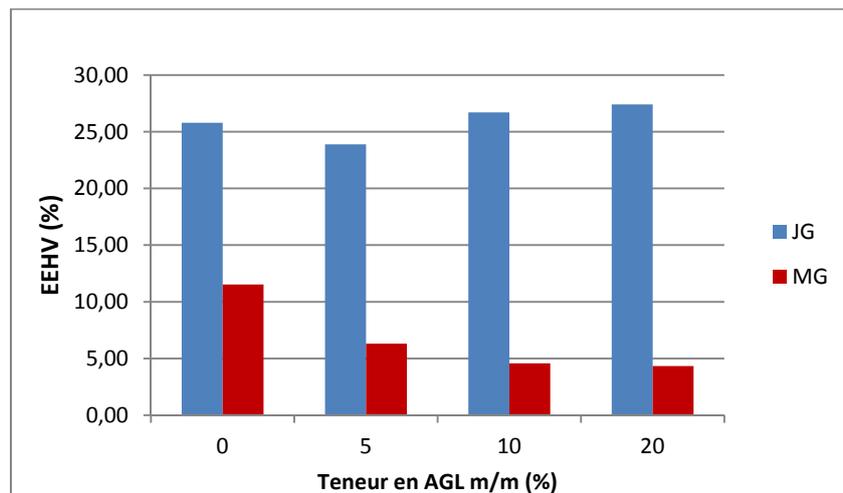


Figure 27: Rendement de transestérification en fonction de la teneur en acides gras libres dans l'huile de tournesol.

L'augmentation de la teneur en AGL entraîne une diminution du rendement en EEHV lorsque la transestérification est catalysée par les extraits de MG, mais par contre celle-ci n'a que très peu d'influence sur le rendement en EEHV avec les extraits de JG.

De ces résultats, il ressort que les AGL ont un effet négatif sur le rendement de transestérification avec les extraits de MG. Pour mener à bien la transestérification catalysée par les extraits de MG, la teneur en acides gras libres (AGL) doit être inférieure à 5%. Les huiles neutres paraissent les plus appropriées pour la transestérification enzymatique à l'aide des extraits de MG; tandis qu'avec les extraits de JG la production d'EEHV à partir d'huile végétale à haute teneur en AGL est possible.

Au vu du comportement des extraits de JG vis-à-vis des AGL, la capacité de ces extraits à catalyser les réactions d'estérification a été rapidement testée en mettant en œuvre l'estérification éthanolique de l'acide oléique en milieu sans solvant. L'intérêt de ce test est qu'il permet, s'il s'avère positif, la diversification de substrat pour la production de biodiesel; en particulier le distillat d'acides gras un sous-produit du raffinage des huiles végétales.

Les essais d'estérification ont été menés dans les conditions décrites dans la section 2.3.3 de la partie Matériel et Méthodes. Les résultats obtenus à l'issue du test d'estérification de l'acide oléique avec l'éthanol en utilisant les deux extraits végétaux sont représentés sur la Figure 28. Les rendements obtenus correspondent à la proportion d'EEAO formés par rapport au réactif limitant (l'éthanol)

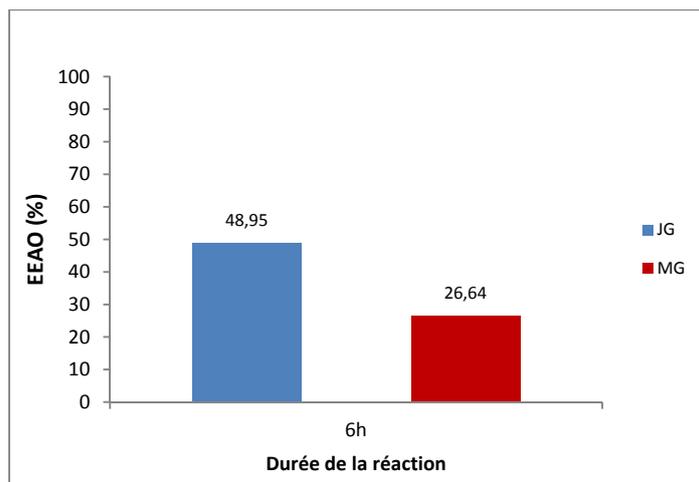


Figure 28: Rendement d'estérification de l'acide oléique (C18:1) avec l'éthanol à l'aide d'extraits de JG et MG pendant 6 H.

On remarque que les extraits de MG tout comme ceux de JG sont capables de catalyser la formation EAO (Esters Éthyliques d'Acide Oléique). Les extraits de JG et de MG sont donc capables de catalyser aussi bien la transestérification des TAG que l'estérification d'AGL avec l'éthanol. Au vu de ces résultats et des observations précédentes (cf. Figure 27), les extraits de JG représentent un bon candidat pour la transestérification d'huile végétale à forte teneur en AGL et même de résidus distillat d'acides gras issus du raffinage des huiles végétales. Ce qui est moins le cas pour les extraits de MG, vis-à-vis des quels les teneurs élevées en AGL semblaient avoir un effet inhibiteur.

2.5.3 Stabilité thermique des extraits végétaux de graines de Jatropha et de Moringa

La stabilité thermique d'une enzyme est un paramètre important à prendre en compte avant son utilisation comme catalyseur. Elle fournit des informations qui permettent de savoir si la diminution ou la perte de l'activité du biocatalyseur qui peut subvenir au cours du temps est due à une dénaturation thermique des protéines enzymatiques ou pas.

La stabilité thermique des différents extraits végétaux a été testée en les pré-incubant à 45°C pendant 54H avant de les tester en transestérification éthanolique d'huile de tournesol à 37°C. La Figure 29 montre la quantité d'EEHV obtenue après l'analyse CCM couplée à la densitométrie du milieu une fois la réaction arrêtée après 6H.

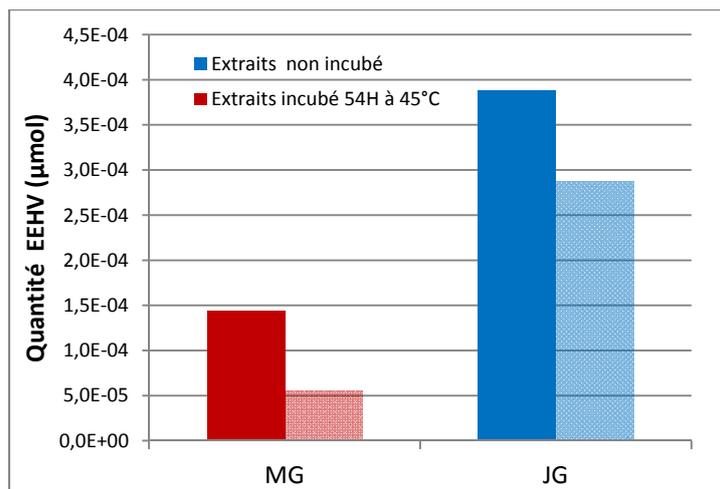


Figure 29 : influence de la température sur la quantité d'EEHV (μmol) à l'aide des extraits de JG et MG

On remarque que la quantité d'EEHV formée avec les extraits non incubés est plus grande que celle obtenue avec les extraits végétaux préalablement incubés. Si on considère la réaction biocatalysée par les extraits végétaux n'ayant pas encore été incubés à 45°C comme référence (100% de la quantité d'EEHV formé) alors les extraits de JG conservent 73% d'activité et ceux de MG conserveraient 38% d'activité catalytique après 54H d'incubation à 45°C. Ces résultats indiquent une faible diminution de l'activité catalytique des lipases contenues dans les extraits de JG contrairement à celles des lipases contenues dans les extraits de MG. Avec des extraits de JG pré-incubés, la synthèse d'EEHV demeure considérable, on en déduit que les extraits de graines germées de jatropha seraient thermiquement plus stables que leurs homologues de moringa.

2.6 Récapitulatif des conditions optimales de transestérification d'huile végétale à l'aide d'extraits végétaux

Le plan d'expérience réalisé a permis de valider l'ensemble des résultats des tests paramétriques et confirmer les tendances observées. Selon les résultats obtenus, la teneur en eau dans l'éthanol comprise entre 0 et 5% v/v a très peu d'influence sur le rendement de la réaction. Le rendement de transestérification dépend fortement du ratio molaire TAG:EtOH, et de la charge en biocatalyseur. Le rendement de la réaction varie inversement au ratio molaire TAG:EtOH. En particulier lorsque que celui-ci est supérieur ou égale à (1:0,6)

et ajouté dans le milieu en une seul fois. La méthode des ajouts dosés est clairement appropriée pour surmonter l'effet inhibiteur de l'éthanol.

Contrairement au ratio molaire, on observe une augmentation du rendement de la réaction avec la charge en catalyseur. Toutefois il faut noter qu'une charge trop élevée ($\geq 30\%$ m/m) nuirait au rendement global dans les conditions de transestérification. Il est préférable de modérer la charge en biocatalyseur.

Dans le Tableau 18 ci-dessous sont récapitulés les paramètres optimums de transestérification éthanolique d'huile végétale à l'aide des extraits végétaux préparés à partir de graines germées de Jatropha (JG) et de Moringa (MG).

Tableau 18 : Tableau récapitulatif des paramètres optimums de transestérification éthanolique d'huile végétale à l'aide des extraits végétaux de JG et de MG

Biocatalyseurs	Ratio molaire (TAG:EtOH)	Charge en catalyseur (m/m)	Teneur en eau (v/v)	Rendement en EEHV
JG	(1:0,3)	20%	0-5%	30-24%
MG	(1:0,3)	20%	0-5%	12-7%

Il est important de souligner que les extraits végétaux de JG et de MG sont sensibles au glycérol libre, coproduit de la réaction. La présence de glycérol libre entraîne une diminution du rendement de transestérification suite à l'inhibition de l'activité catalytique des lipases contenues dans les extraits végétaux. La mise en œuvre d'un procédé de transestérification permettant l'élimination en continu du glycérol tout au long de la réaction aiderait à surmonter ce problème et à améliorer le rendement de transestérification.

Si les extraits de JG sont insensibles à la teneur en AGL, le rendement de transestérification à l'aide des extraits de MG peut être affecté par ces derniers. Il est préférable d'utiliser des huiles végétales neutres pour la transestérification à l'aide d'extraits de MG.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 3: OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ESTERS ETHYLIQUES D'HUILE VEGETALE A L'AIDE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX DE JATROPHA ET DE MORINGA

3. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ESTERS ETHYLIQUES D'HUILE VEGETALE A L'AIDE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX DE *JATROPHA* ET DE *MORINGA*

Les résultats des essais de transestérification obtenus dans les chapitres 1 et 2 ont montré que les extraits végétaux délipidés issus de graines germées de *Jatropha curcas* et de *Moringa oléifera* sont doués d'activités hydrolytiques en milieu aqueux ou d'activités acyltransferasiques en milieu sans solvant. Ces extraits végétaux renferment des lipases capables de catalyser sans purification préalable l'hydrolyse des TAG ou la transestérification de ces derniers avec l'éthanol. Cependant, les différents rendements de synthèse d'EEHV obtenus sont trop faibles (<30%) et de plus certaines expérimentations ont montrés que le glycérol co-produit de la transestérification des TAG avait un effet inhibiteur sur l'activité catalytique de ces extraits végétaux. Il en résulte que la production de biodiesel à l'aide des extraits de *Jatropha curcas* et de *Moringa oléifera* n'est pas envisageable dans les conditions de transestérification décrites.

Pour améliorer les rendements de transestérification à l'aide des extraits de *Jatropha curcas* et de *Moringa oléifera* nous avons envisagé la mise en œuvre d'un procédé de transestérification avec le piégéage du glycérol au fure et à mesure de sa libération dans le milieu par adsorption sur un support solide. L'adsorption du glycérol sur un support solide via des interactions de faibles énergies (du type liaisons hydrogènes et interactions de Van Der Waals) a déjà fait l'objet de plusieurs travaux de recherche (Stevenson *et al.*, 1994; Bornscheuer, 1995; Kawakami *et al.*, 2011). Les résultats de ces travaux ont montré que l'adsorption du glycérol sur un support solide était possible et qu'elle permettait la réduction de l'effet inhibiteur de glycérol sur l'activité catalytique des lipases.

D'autre part, comme nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les lipases exhiberaient une sélectivité vis-à-vis du substrat, la capacité des extraits végétaux à catalyser la transestérification de glycérides partiels va être testée afin de vérifier si les lipases contenues dans les extraits de jatropha et de moringa ont une sélectivité préférentielle vis-à-vis du substrat. En cas de non sélectivité de substrat, les résultats permettront la mise œuvre

d'un procédé de transestérification complète de l'huile végétale en EEHV en plusieurs étapes de transestérification successives.

3.1 Piégeage du glycérol au cours de la production d'esters éthyliques d'huile végétale sur un support solide

Le piégeage du glycérol par adsorption sur un support solide offre l'avantage de faciliter la séparation des EEHV de ce dernier en fin de réaction par une simple filtration. Sachant que l'une des contraintes majeures dans la production de biodiesel éthylique est la séparation de phase difficile entre les esters éthylique et le glycérol à cause de la miscibilité de ces derniers (Yefanova *et al.*, 2013), le piégeage du glycérol sur support solide est adaptée à la mise en œuvre d'un procédé de transestérification éthanolique d'huile végétale simple, innovant, qui soit peu onéreux et ayant un faible impact environnemental.

3.1.1 Utilisation de supports solides issus de la biomasse pour le piégeage du glycérol

Nous avons choisi de piéger le glycérol progressivement libéré au cours de la réaction de transestérification en ayant initialement introduit dans le milieu réactionnel du gel de silice, de la cendre de balle de riz (CBR) ou des charbons actifs (CA) parce qu'ils permettent de répondre à deux exigences:

- (i) Ils sont connus dans la littérature pour avoir des propriétés adsorbantes
- (ii) et ils être peuvent être produits localement à partir de la biomasse locale.

Le gel de silice est connue dans la littérature comme étant un bon support adsorbant du glycérol (Berger *et al.*, 1992; Stevenson *et al.*, 1994; Selmi & Thomas, 1998). Celui-ci peut être obtenu après un traitement thermique de la balle de riz qui est considérée comme une source de silicium élémentaire et aussi d'un certain nombre de composés à base de silicium (Hunt *et al.*, 1984; Karera *et al.*, 1986; Della *et al.*, 2002). Les charbons actifs sont souvent utilisés pour éliminer certains composés mineurs des huiles végétales tels que les AGL, les peroxydes, les caroténoïdes, les phospholipides etc., (Liu *et al.*, 2009).

Les essais de transestérification de l'huile de tournesol ont été réalisés dans des milieux réactionnels contenant 20% en m/m de support solide par rapport à l'huile végétale. La quantité de support introduite représente le double de la quantité totale de glycérol libéré si 100% des TAG sont convertis. Les réactions ont été mises en œuvre en utilisant la méthode des ajouts dosés avec un ratio molaire TAG:EtOH de (1:0,3) et l'éthanol a été rajouté par intervalles de 6 heures pendant 72 heures.

Les différents rendements de transestérification exprimés en pourcentage d'EEHV obtenus avec chacun des extraits en fin de réaction ont été déterminés à l'issue de l'analyse CCM couplée à la densitométrie. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 30 ci-dessous.

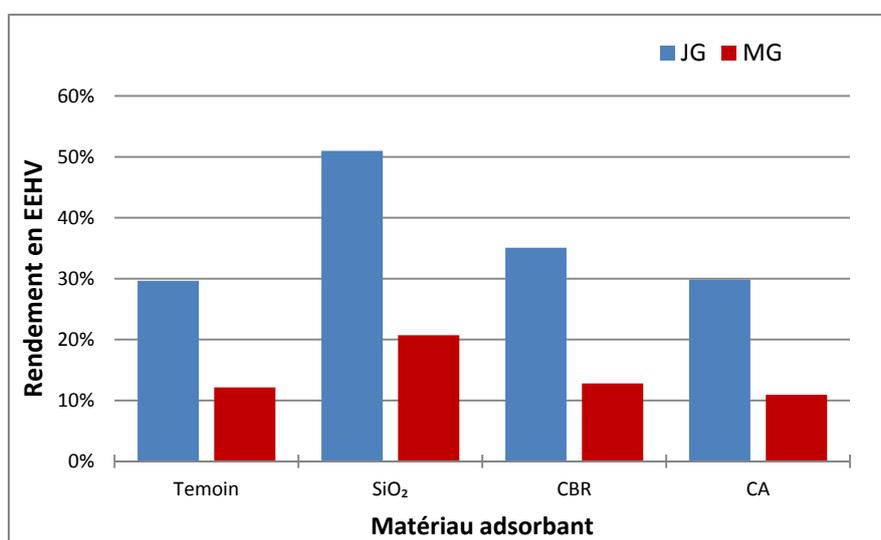


Figure 30 : Rendement de transestérification obtenu avec les extraits de JG et MG en fonction du matériau adsorbant testé.

Témoign (milieu sans matériaux adsorbant); SiO₂ (avec silice); CBR (avec cendre de balle de riz); CA (avec charbon actif).

On observe sur la Figure 30 que le rendement de transestérification varie en fonction du matériau adsorbant introduit dans le milieu réactionnel. Le milieu réactionnel dans lequel a été introduit le gel de silice présente les rendements en EEHV les plus élevés pour chacun des extraits végétaux soit 50,99% avec JG et 20,71% avec MG. Les rendements obtenus dans les milieux contenant le CA sont les plus faibles soit 29,83% avec JG et 10,93% avec MG et ceux-ci sont comparables à ceux obtenus dans le milieu témoin ne contenant aucun

matériau adsorbant. En présence de CBR les rendements en EEHV obtenus sont intermédiaires si on les compare aux deux autres (35,09% avec JG et 12,80 % avec MG).

L'introduction du gel de silice dans le milieu réactionnel permet d'améliorer le rendement de transestérification comparé à l'introduction de la CBR ou du CA et ce quel que soit l'extrait enzymatique utilisé. Cette amélioration significative du rendement en EEHV induite par l'addition de gel de silice est en parfait accord avec les résultats de la littérature (Selmi & Thomas, 1998; Soumanou & Bornscheuer, 2003). Les travaux de plusieurs équipes de recherches ont démontré que le rendement de la production du biodiesel méthylique ou éthylique peut être amélioré par l'ajout de gel de silice dans le mélange réactionnel (Stevenson *et al.*, 1994; Selmi & Thomas, 1998; Lee *et al.*, 2011).

La CBR dans une moindre mesure a un effet positif sur le rendement en EEHV formés. Certainement à cause de sa forte teneur en silice alors que les CA utilisés semblent complètement inerte dans les conditions de réaction mises en œuvre.

Un matériau adsorbant est caractérisé par son volume poreux, la taille et la forme de ses pores. C'est ce qui est à l'origine de sa surface spécifique, c'est-à-dire de la surface développée accessible aux molécules par unité de masse. Un bon pouvoir adsorbant est obtenu avec des matériaux présentant une grande surface spécifique mais aussi un bon volume de pore ainsi qu'une bonne répartition de la taille des pores adaptés avec l'adsorbant (polluant) à traiter. La surface spécifique et le volume des pores des matériaux testés sont donnés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Surface spécifique et volume des pores des matériaux adsorbants testés

Adsorbants	Fournisseur	Surface spécifique (m ² /g)	Volume des pores (cm ³ /g)
Gel de silice	Sigma-aldrich	530	0,8
Charbon actif	LBEB	165	0,115
Cendre de balle de riz	LBEB	88*	0,113*

(*)(Kim *et al.*, 2008)

Les caractéristiques du CA ont été mesurées en utilisant un appareil Autosorb-1 Quantachrome à température de l'azote liquide. Les données recueillies par adsorption $P/P_0 < 1$ ont été ajustées à l'équation BET non linéaire pour le calcul de la surface. Les caractéristiques du gel de silice proviennent du fournisseur (Sigma-Aldrich) et celles de la CBR sont issues des travaux de (Kim *et al.*, 2008) qui ont caractérisé des CBR obtenus dans des conditions de traitement thermique similaires aux nôtres (calcination à 300°C pendant 10H).

Les données présentées dans le Tableau 19 indiquent que le gel de silice possède une surface spécifique beaucoup plus grande que les autres matériaux. Soit 530 m²/g contre 165 m²/g pour le CA et 88 m²/g pour la CBR selon les données de (Kim *et al.*, 2008). La grande surface spécifique du gel de silice comparée aux autres supports explique pourquoi celui-ci possède une capacité d'adsorption plus élevée que la CBR ou le CA. Le rendement de transestérification obtenu en présence du CA ne permet pas de conclure à la capacité des CA à adsorber le glycérol dans l'huile. Le gel de silice adsorbe le glycérol et facilite ainsi le contact entre les lipases, les TAG et l'éthanol. Ce qui rend favorable le déplacement de l'équilibre réactionnel dans le sens de formation des EEHV et limite l'effet inhibiteur du glycérol sur les lipases des extraits.

La nature chimique de la surface du gel de silice est le facteur le plus important en dehors de sa structure poreuse qui détermine ses propriétés d'adsorption. Le gel de silice est un polymère d'acide silicique Si(OH)₄ portant des groupes fonctionnels hydroxyles (-OH) sur toute sa surface. Ces fonctions lui confère un caractère polaire et augmente ainsi son affinité vis-à-vis du glycérol. Ce qui n'est pas le cas pour le CA dont la surface graphitique est essentiellement constituée de polycycles aromatiques même s'il possède certaines fonctions de surface (-COOH, -OH ou -CHO) localisées au niveau des défauts ou des extrémités de la structure graphitique. Comme l'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules se fixent sur la surface de l'adsorbant par des liaisons de faibles énergies, les fonctions de surface impactent de manière significative sur les propriétés hydrophiles ou hydrophobes d'un matériau et donc affectent sa capacité d'adsorption. C'est pourquoi les adsorbats polaires s'adsorbent préférentiellement sur des adsorbants polaires. Le caractère

faiblement polaire des CA mais aussi la taille de ces pores limite son interaction avec les molécules de glycérol. En faisant le parallèle avec la CBR, la capacité d'adsorption du glycérol par cette dernière serait attribuable à la silice (SiO_2) dont elle est composée à près de 94,95% selon (Della *et al.*, 2002).

À partir de ce qui précède, nous proposons le mécanisme d'action du gel de silice comme représenté dans la Figure 31 ci-dessous.

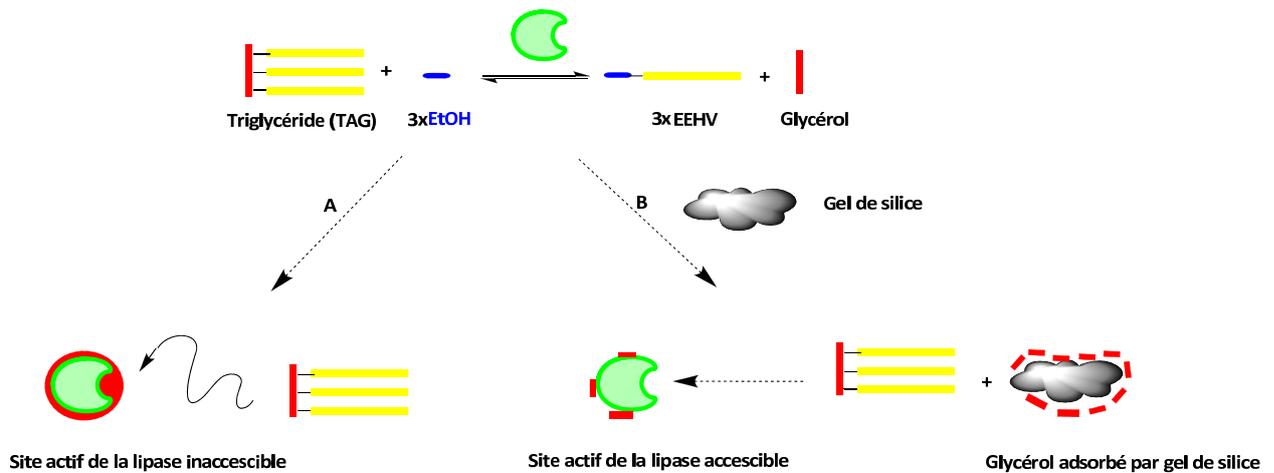


Figure 31: Mécanisme proposé pour les réactions de transestérification enzymatique: (A) absence de matériau adsorbant, (B) en présence de matériau adsorbant (gel de silice)

Dans ce mécanisme, le glycérol libéré au cours de la réaction de transestérification non miscible à l'huile et aux EEHV s'accumule dans le milieu réactionnel et s'adsorbe progressivement sur les protéines enzymatiques créant une barrière polaire entre le milieu réactionnel et l'enzyme (cf. voie A, Figure 31). L'accumulation du glycérol insoluble dans le milieu et son adsorption sur les protéines lipasique va limiter l'accessibilité du substrat au site actif. Par contre, le gel de silice ajouté dans le milieu réactionnel (voie B) grâce à son affinité vis-à-vis du glycérol, joue un rôle protecteur pour l'enzyme en adsorbant le glycérol libre, ce qui rend accessible le site actif de l'enzyme et permet à la réaction de transestérification de se poursuivre.

3.1.2 Influence de la charge en gel de silice sur le rendement de transestérification éthanolique de l'huile végétale

Comme observé précédemment, l'introduction de gel de silice augmente considérablement le rendement de transestérification. Selon les travaux de Yori et al., le gel de silice peut adsorber le glycérol et sa capacité d'adsorption de glycérol mesurée est de 0,13 g par gramme de silice (Yori *et al.*, 2007). La quantité attendue de glycérol produit au cours de nos expériences est d'environ 0,4 g pour la conversion de 4 g d'huile de tournesol. Comparée à la charge en gel de silice utilisée (0,8 g) on en déduit que seule une partie du glycérol libéré a été adsorbée. Il existe toujours dans le milieu une quantité qui limite l'action des lipases. De ce fait, l'augmentation de la charge en gel de silice devrait permettre d'obtenir un meilleur rendement.

Des essais de transestérification ont été réalisés sur l'huile de tournesol dans un milieu réactionnel contenant différentes charges de gel de silice soit 10, 15, 20 et 25% m/m (par rapport à l'huile). Les réactions à été mises en œuvre en utilisant la méthode des ajouts dosés avec un ratio molaire TAG:EtOH de (1:0,3) et l'éthanol a été rajouté par intervalles de 6 heures pendant 72 heures. Notons que pour les mélanges dont la charge est supérieure à 25% le milieu devient de plus en plus visqueux et dans ces conditions, l'agitation n'est plus possible et la quantité d'esters formés ne peut être mesurée.

L'analyse CCM-densitométrie de la composition de chaque milieu en fin de réaction nous a permis d'obtenir les rendements en EEHV obtenus en fonction de la charge en gel de silice (cf. Figure 32)

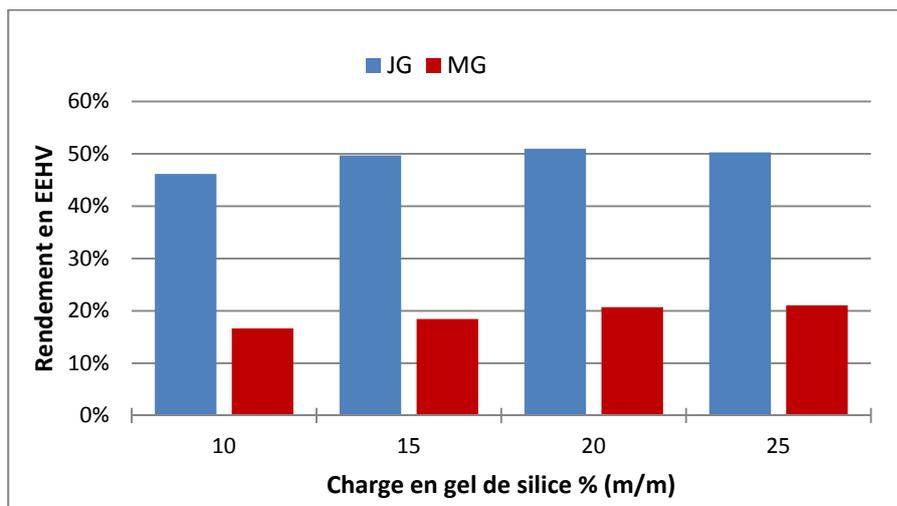


Figure 32 : Influence de la charge en gel de silice sur le rendement en EEHV obtenu avec les extraits de JG et MG.

On observe qu'entre 10 et 25% m/m, l'augmentation de la charge en gel de silice maintient l'activité catalytique des extraits à un niveau élevé, mais le rendement en EEHV n'augmente que faiblement. Celui-ci passe de 47,95% à 50,28% avec les extraits de JG et de 16,63% à 21% avec ceux de MG alors que la charge en gel de silice a plus que doublé. Lorsque la charge en gel de silice est supérieure à 20%, le rendement en EEHV diminue sensiblement.

À partir de ces résultats, on en déduit que l'augmentation de la quantité de gel de silice n'améliore pas les performances de la réaction de transestérification mais plutôt entrave le déroulement de celle-ci. Cela peut s'expliquer par la viscosité du milieu réactionnel qui augmente lorsque la teneur en silice dépasse les 20% m/m. L'augmentation de la viscosité rend difficile l'agitation mécanique du milieu réactionnel et le mélange des réactifs n'est pas correctement réalisé; par conséquent les phénomènes de transfert de masse limités. L'agitation est un paramètre réactionnel primordial pour la réaction de transestérification en raison de l'hétérogénéité du milieu réactionnel (milieu biphasique constitué huile végétale et d'éthanol). Elle favorise la dispersion de l'éthanol dans l'huile et augmente par conséquent la surface d'échange entre les deux phases surtout lorsqu'elle est suffisamment vigoureuse.

3.2 Transestérification complète de l'huile végétale avec l'éthanol à l'aide des extraits végétaux de *Jatropha* et de *Moringa*

Comme les essais de transestérification réalisés précédemment n'ont pas permis d'atteindre la conversion complète de l'huile de tournesol, nous avons envisagé la conversion complète de l'huile de tournesol en deux réactions de transestérification successives en utilisant comme substrat dans la deuxième étape l'huile partiellement transestérifiée obtenu après la première réaction. L'utilisation de l'huile partiellement transestérifiée comme substrat avec des extraits et de la silice non encore utilisés devrait nous permettre de vérifier s'il existe une sélectivité vis-à-vis du substrat des lipases contenues dans les extraits. C'est à dire vis-à-vis de certaines fonctions hydrolysables ou de certains acides gras.

3.2.1 Mise en œuvre de deux réactions successives pour la transestérification complète d'huile végétale avec l'éthanol à l'aide d'extraits végétaux

Le milieu réactionnel obtenu après une première réaction de transestérification éthanolique sur l'huile de tournesol à l'aide d'extraits végétaux en présence de 20% m/m de gel de silice pendant 72H en utilisant la méthode des ajouts dosés avec un ratio molaire TAG:EtOH de (1:0,3) et l'éthanol a été rajouté par intervalles de 6 heures, est filtré afin d'éliminer toute particule en suspension. Le filtrat est ensuite utilisé comme substrat pour une nouvelle réaction de transestérification en présence de 20% m/m d'extraits de JG ou de MG neuf et 20% m/m de silice neuve. Après l'introduction du nouveau catalyseur, le milieu réactionnel est incubé pendant 24H à 37°C sous agitation orbitale sans ajout d'alcool. L'intérêt de cette étape est de permettre l'incorporation de l'éthanol présent dans le milieu réactionnel qui n'aurait pas réagi au cours de la réaction précédente. Après les 24H d'incubation, 80 μ L d'éthanol correspondant au ratio molaire TAG:EtOH de (1:0,3) sont ajoutés dans le milieu et ainsi fait toutes les six heures pendant à nouveau 72H. Toutes les 24 H, la composition des deux milieux réactionnels est analysée qualitativement sur CCM et les résultats sont présentés par la Figure 33.

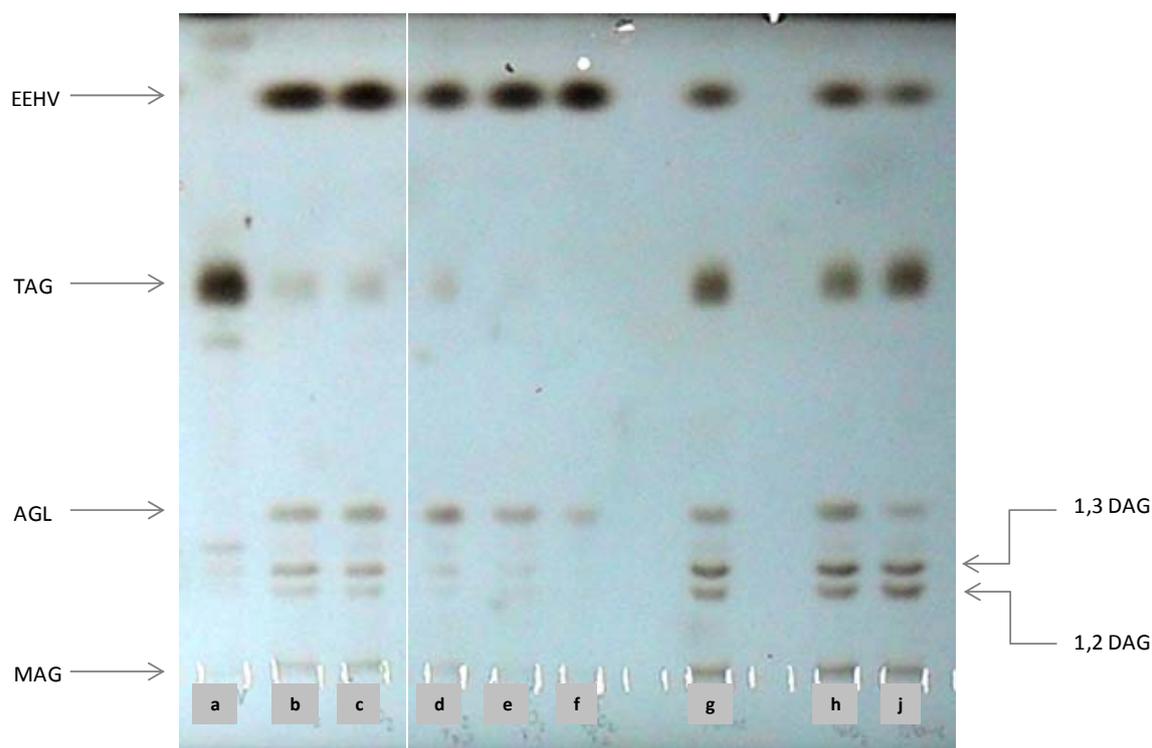


Figure 33: Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après transestérification éthanolique de l'huile de tournesol catalysée par des extraits de JG et MG.

Éluant: Hexane/di-éthyle éther/acide acétique 90/10/1 v/v/v). Piste a: Huile de tournesol (commerciale); pistes b et c: transestérification n°1 avec extraits JG (72H); piste d: transestérification n°2 avec extraits JG sans ajout d'alcool (96H); pistes e et f: transestérification n°2 par extraits de JG avec ajout d'éthanol après 120 et 144H. Piste g: transestérification avec extraits JG sans gel de silice pendant 72H. Pistes h et j: transestérification catalysée par extraits de MG après 72 H (piste j) et 144H (piste h)

L'analyse CCM montre une diminution de l'intensité du spot caractéristique des TAG jusqu'à la disparition complète de ces derniers 72H après la mise en œuvre de la deuxième réaction de transestérification dans le milieu où la transestérification a été catalysée par les extraits de JG (cf Figure 33, les pistes b à f). La deuxième réaction de transestérification a permis la conversion de la presque totalité des TAG en d'EEHV avec les extraits de JG. L'analyse CCM, particulièrement la composition de la piste f, révèle la présence d'une faible quantité d'AGL dans le milieu réactionnel au vue de l'intensité du spot caractéristique de ces composés. Selon cette même analyse, 72H après la second réaction de transestérification, le milieu semble ne plus contenir des DAG ni MAG, initialement présents (piste b et c). Par contre l'anayse CCM révèle la présence de tous les composés impliqués au cours de la réaction de transestérification (MAD, DAG, TAG et AGL) 72H après la mise en œuvre de la second

réaction de transestérification quand la réaction est catalysée par les extraits végétaux de MG (cf. Figure 33, piste h et j).

Étant donné que les extraits de JG ont permis la conversion de la totalité des TAG mais aussi des DAG et des MAG en EEHV, on en déduit que les lipases contenues dans ces extraits ne présentent pas une spécificité particulière vis-à-vis du substrat, vis-à-vis de certaines fonctions hydrolysables ou encore de certains acides gras. Ce qui est difficile à tirer comme conclusion pour les lipases contenues dans les extraits de MG. Une analyse quantitative de la composition du milieu réactionnel apporterait plus d'information.

Ainsi les milieux réactionnels dont les compositions correspondent à celles observées en piste a, piste f et piste h sur la figure 33 ont été analysés par CPG. Les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la Figure 34. Le milieu réactionnel où la transestérification est catalysée par les extraits de JG correspond au chromatogramme en rouge, celui où la réaction est catalysée par les extraits de MG correspond au chromatogramme vert sur la figure Figure 34. Le chromatogramme en bleu correspond à l'huile de tournesol. Ces chromatogrammes montrent la composition des différents milieux réactionnels ainsi que les différents produits de la réaction de transestérification. On voit sur les chromatogrammes rouge et vert que les esters sont bien séparés des produits intermédiaires de réaction ainsi que des TAG. En effet, les EEHV apparaissent sous forme de deux grands pics larges entre 12-13 minutes, les MAG apparaissent sous forme de deux petits pics entre 16-18 minutes, les DAG apparaissent sous forme de deux petits pics entre 25-28 minutes et enfin les TAG principaux constituant de l'huile apparaissent sous forme de trois pics entre 31-34 minutes.

L'aire de chaque pic est fonction de la concentration du composé correspondant, on obtient ainsi que 94% des TAG ont été transformés en EEHV dans le milieu où la réaction a été catalysée par les extraits de JG 72H après la seconde réaction de transestérification. Ce milieu contient respectivement 3,8% et 2,8% de TAG et DAG résiduels et seulement des traces de MAG, confirmant les observations faites en CCM. Contrairement aux extraits de JG, l'analyse chromatographique du milieu réactionnel où la transestérification a été réalisée avec les extraits végétaux de MG révèle une conversion de 48,5% des TAG en EEHV. Le milieu réactionnel contient entre autre 25,2% de TAG résiduels, 13,8% de DAG et 12,5% de

MAG. À partir de ces résultats, on ne peut conclure que la lipase de MG possède une sélectivité particulière vis-à-vis du substrat. Seul un test de transestérification avec un substrat spécifique tel que la trioléine ou la trilinoléine pourrait le confirmer. Cependant on conclure que la mise en œuvre de deux réactions de transestérification successives a permis d'améliorer le taux de conversion de l'huile de tournesol en EEHV, la conversion complète de l'huile de tournesol à l'aide des extraits de JG est donc possible.

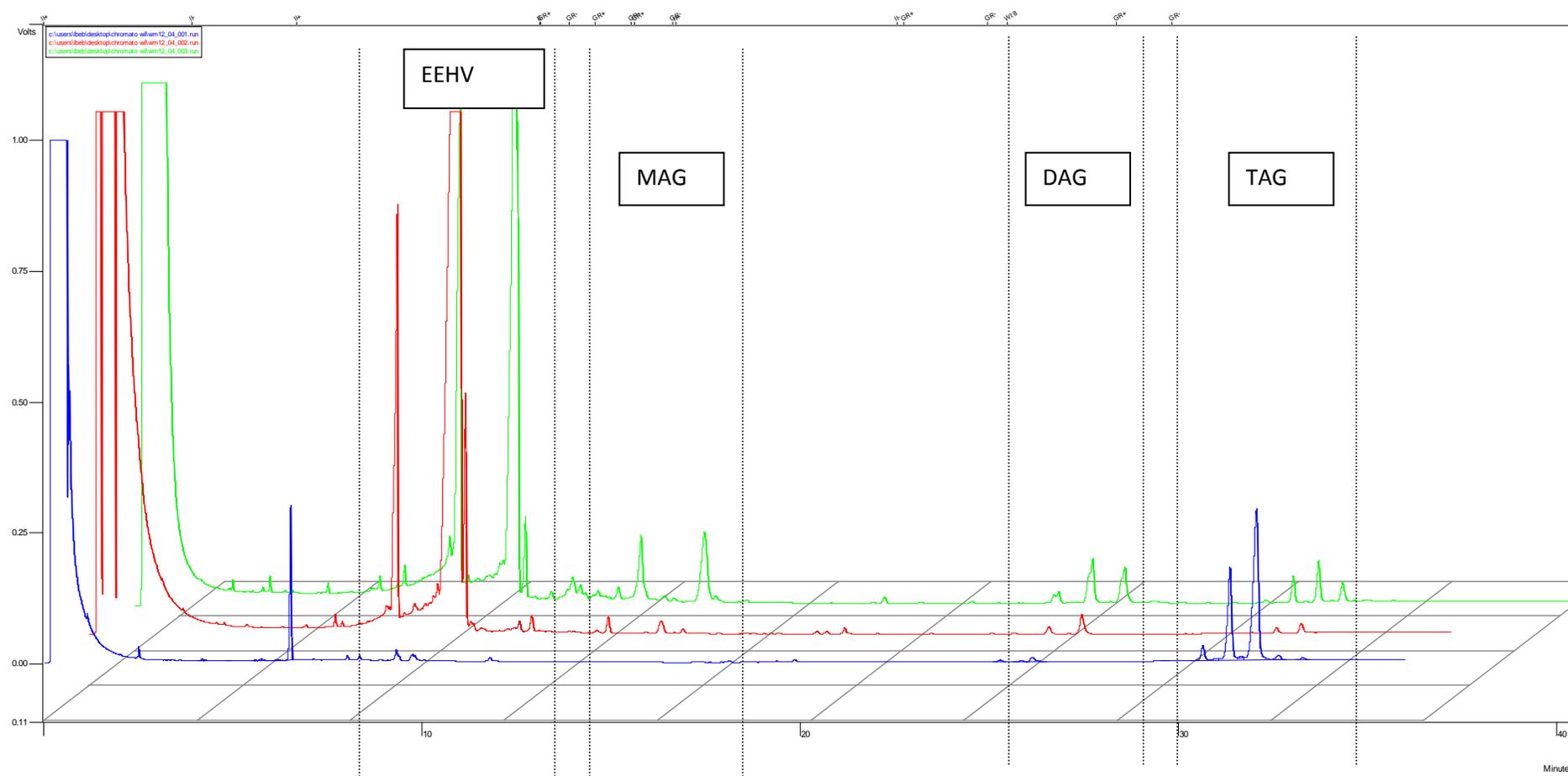


Figure 34 : Chromatogrammes de la composition de l'huile de tournesol après transestérification éthanolique pendant 144 H à l'aide d'extraits végétaux de JG (courbe en rouge), et d'extraits de MG (courbe en vert). En bleu le chromatogramme de l'huile de tournesol

3.2.2 Suivi cinétique de la transestérification à l'aide des extraits de JG

Afin de suivre la synthèse d'EEHV catalysée par les extraits de JG, la composition du milieu réactionnel au cours du temps a été analysée. La réaction de transestérification a été mise en œuvre selon le mode opératoire utilisé dans la section 3.1.1., mais cette fois ci, la synthèse d'EEHV a été réalisée sur 200 g d'huile et uniquement à l'aide des extraits végétaux de JG (20% m/m de charge en biocatalyseur ont été utilisés dans la première étape et 10% dans la deuxième compte tenu de la quantité de biocatalyseur disponible).

La synthèse d'EEHV à l'aide des extraits végétaux de JG étant effective avec 4 g d'huile, nous avons jugé intéressant de vérifier sa faisabilité à plus grande échelle (soit 200 g d'huile) pour permettre des extrapolations futures et aussi pour disposer de matière pour déterminer certaines propriétés physicochimiques du biodiesel obtenu. Les résultats de l'analyse sont présentés sur la Figure 35.

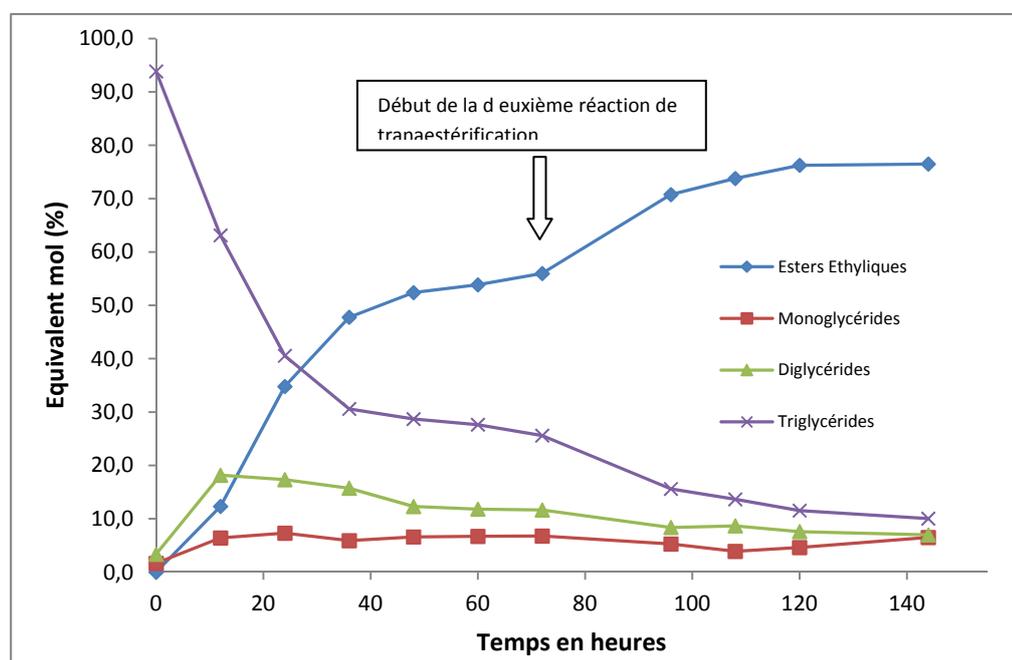


Figure 35 : Courbes d'évolution des EEHV, des TAG et des composés intermédiaires (MAG, DAG) au cours de la transestérification l'huile de tournesol en deux étapes.

De 0 à 72H transestérification n°1, de 72 à 144 H transestérification n°2. Des échantillons du milieu ont été prélevés toutes les 12H puis analysés par CPG.

Comme le montre les résultats de l'analyse CPG (cf. Figure 41) le nombre de moles de TAG diminue rapidement au cours des trente-six premières heures. Ce phénomène montre bien

que les TAG sont le substrat préférentiel de la lipase de *Jatropha curcas*. Parmi les 93,86% TAG de départ, 47,8% ont été convertis en EEHV après 36H avec la formation des intermédiaires de réaction DAG et MAG dont les teneurs augmentent pendant ce temps jusqu'aux valeurs maximales respectives de 7,3% et 18,2%. Sensiblement 47,8% des EEHV sont « rapidement » formés durant ces premières 36H, un plateau est atteint entre 48 et 72H où le rendement en EEHV augmente très peu de 52,4% à 57%. D'après l'allure de cette courbe la réaction de transestérification est efficacement catalysée par les lipases entre 0 et 48H.

Après 72H la deuxième étape de transestérification est « relancée » avec du catalyseur frais et de la silice fraîche. Une augmentation de la vitesse de réaction est observée ce qui se traduit par une augmentation de la quantité d'EEHV formée qui passe de 57% à 76,5%. Le fait que la conversion des TAG n'est pas complète ici contrairement à ce qui a été observé au cours de la transestérification de 4 g d'huile est selon nous attribuable aux problèmes de transfert de masse des substrats.

3.3 Analyse du biodiesel obtenu par transestérification à l'aide d'extraits végétaux

Certaines caractéristiques du biodiesel obtenu après filtration ont été évaluées à savoir sa densité à 20°C, sa viscosité dynamique à 40°C, son indice d'acide, son indice de phosphore, sa teneur en silice ainsi que sa composition en glycérides résiduels. Les résultats ont été comparés avec les valeurs établies par la Résolution n° 7 du 19/03/2008, de l'ANP (Agence Nationale du Pétrole, gaz naturel et les biocarburants), qui établit les spécifications nécessaires à la vente de biodiesel au Brésil. Les normes brésiliennes sont similaires à leurs homologues européennes et américaines, même si elles ont une certaine flexibilité supplémentaire qui tient compte des caractéristiques des matières premières brésiliennes.

Tableau 20: Quelques propriétés du biodiesel obtenu par transestérification éthanolique de l'huile de tournesol catalysée par les extraits de JG

Caractéristiques déterminées	Biodiesel obtenu	Norme de spécification Brésiliennes (ANP)
Viscosité à 40°C (mm ² .s ⁻¹)	5,81	1,9-6
Densité (15°C)	0,88	0,85-0,9nc
Indice d'acide (mg KOH/g)	15.5	0,72-0,80
Teneur en phosphore (ppm)	<1,0	10
Teneur en silice (SiO ₂) (ppm)	61,0	nc
Composition en glycérides (% mol)		
EEHV	76,5	96,5
MAG	6,5	0,80
DAG	6,9	0,20
TAG	10,0	0,20

* ANP: Agence Nationale du Pétrole, gaz naturel et les biocarburants, normes brésiliennes

Le Tableau 20 montre les propriétés du biodiesel produit comparées aux spécifications publiées par l'ANP. On peut constater que la transestérification à l'aide de lipases végétales de d'huile de tournesol produit un biocarburant dont la viscosité et la densité respectivement 5,81 mm².s⁻¹ et 0,88. Pour rappel, la viscosité est l'une des propriétés la plus importante car elle influe sur l'injection et l'efficacité de la combustion. Des valeurs élevées de viscosité peuvent induire une mauvaise pulvérisation du carburant, la combustion incomplète, et les dépôts de carbone sur les injecteurs. La viscosité du biodiesel obtenue est conforme à la norme brésilienne requise pour l'utilisation du biodiesel dans les moteurs diesel. La détermination de l'indice d'acide a indiqué que le contenu en AGL en fin de réaction est très important soit 15 mg KOH/g de biodiesel (soit 7,5% m/m) plus dix fois supérieure aux normes requise (ANP). Les niveaux de MAG, DAG, et TAG trouvés dans le biodiesel brut sont supérieurs à ceux requis par la norme APN. En fin de réaction le biodiesel obtenu est composé à 76,5% d'EEHV, à 6,5 de MAG, à 6,9% de DAG et à 10,04% de TAG résiduels.

Bien que ce résultat confirme bien que la réaction de transestérification n'a pas été complète. Toutefois, selon (Verdugo *et al.*, 2010) à partir de 70% de TAG convertis, le produit de transestérification d'une huile peut en théorie être directement utilisé comme

biodiesel ou en mélange avec le diesel (à hauteur de 35% de diesel fossile). De plus, avec cette composition, la viscosité à 40°C du produit obtenu est de $5,81\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$, cette viscosité se situe dans la marge requise par la norme de spécification brésilienne du biodiesel.

Si l'utilisation en l'état du biodiesel obtenu n'est pas possible il est possible de s'appuyer sur les travaux de (Hsu *et al.*, 2004) qui ont démontré que la purification par simple filtration sur gel de silice, permet de réduire à des niveaux indétectables les niveaux de MAG, DAG et AGL y compris celui de glycérol. De cette manière, le biodiesel obtenu après purification peut répondre aux normes de spécification sur le biodiesel commercial. Cela ouvre la voie vers un nouveau procédé de production de biodiesel au cours duquel on s'affranchit de l'étape d'élimination totale du glycérol obligatoire dans la production de biodiesel conventionnel et dans lequel les extraits végétaux peuvent aisément être utilisés comme biocatalyseurs.

CONCLUSION GENERALE

Certains extraits de biomasses végétales expriment une activité lipasique aussi bien en hydrolyse qu'en synthèse de liaisons esters. Cette activité peut s'exprimer sans purification préalable. Compte tenu du faible coût de production et de la disponibilité de ces biomasses végétales, celles-ci apparaissent indiscutablement intéressantes pour la production de biodiesel par transestérification des TAG en esters. Il y a aujourd'hui un véritable engouement pour l'utilisation d'enzymes microbiennes pour la production de biodiesel compte tenu des enjeux économiques engagés. Or il pourrait être envisagé de remplacer ces biocatalyseurs coûteux par une biomasse végétale brute, utilisable en l'état. Pour les pays du sud qui disposent d'une grande variété de biomasse végétale et abondante, l'utilisation des lipases végétales dans la production de biodiesel devrait être considérée.

L'objectif de cette thèse consistait à réaliser la synthèse d'ester éthylique d'huile végétale (Biodiesel) à l'aide de lipases issue de biomasses végétales locales. Il s'agissait donc d'identifier l'activité lipasique dans des extraits végétaux de biomasses locales; d'évaluer cette activité au cours de la transestérification de TAG d'huile de tournesol avec l'éthanol et enfin de déterminer les conditions optimales de transestérification qui permettent de réaliser la conversion complète de l'huile végétale en esters ou biodiesel.

Nous avons pu identifier sur huit biomasses oléagineuses deux biomasses potentielles sources de lipases actives pour cette application. Les extraits végétaux délipidés obtenus à partir de graines germées de *Jatropha curcas* et de *Moringa oleifera* sont capables de catalyser aussi bien l'hydrolyse que la transestérification des TAG. Les résultats de cette étude permettent de conclure que les extraits de graines germées de *Jatropha curcas* et de *Moringa oleifera* contiennent des enzymes dont l'activité catalytique s'exprime en hydrolyse ainsi qu'en transestérification sans purification préalable. L'activité catalytique des enzymes contenues dans les extraits de graines germées de *Jatropha curcas* est plus importante que celle des extraits de graines germées de *Moringa oleifera*. Cette activité catalytique peut être étendue à l'estérification des d'AGL avec l'éthanol ou à la transestérification des huiles à haute teneur en AGL.

La détermination des conditions optimales de transestérification a permis de montrer que l'utilisation d'extraits végétaux délipidés particulièrement ceux issus des graines germées de *Jatropha curcas*, comme biocatalyseur permet la transestérification complète de l'huile végétales avec de l'éthanol dans des conditions douces (T=37°C, Pression atmosphérique), mais à condition que:

- i- l'éthanol (pouvant être hydraté, teneur $\leq 5\%$) soit ajouté progressivement dans le milieu réactionnel par intervalles de 6 H. les fractions d'éthanol devant être comprises entre 0,3-0,5 équivalent molaire d'éthanol par rapport à une (1) mole de TAG,
- ii- le glycérol produit au cours de la réaction de transestérification soit éliminé par adsorption sur un support solide (la silice) et de façon continue. L'avantage de ce procédé est que la purification du biodiesel se fait par simple filtration du mélange réactionnel. Ce qui permet de séparer en une unique étape le biodiesel obtenue du glycérol piégé par la silice et du catalyseur présent sous forme d'extraits végétaux,
- iii- la transestérification de l'huile végétale se déroule en deux étapes successives. Une première étape pour la conversion de près de 50% de TAG, et une deuxième étape pour la conversion de la fraction de l'huile non transestérifiée en utilisant une nouvelle préparation enzymatique (extraits végétaux) et un nouvel agent adsorbant (silice).

L'utilisation des extraits végétaux de *Jatropha curcas* et de *Moringa oleifera* comme biocatalyseur tel que décrit dans notre travail permet de mettre au point un procédé biocatalytique de production de biodiesel simple, économe en énergie et en devises, mais surtout respectueux de l'environnement.

Toutefois la difficulté à utiliser les extraits végétaux pour la production industrielle de biodiesel est la cinétique de transestérification qui reste lente. Pour que la production de biodiesel à l'aide d'extraits végétaux se développe, il est nécessaire que les temps de réactions soient courts pour réduire les durées de cycle de production et ainsi diminuer les temps de mobilisation des équipements avec pour conséquence l'augmentation de la productivité. D'où l'intérêt de poursuivre des recherches non seulement sur l'identification

de nouvelles sources de lipase végétales mais aussi sur l'optimisation des conditions de réaction de celles qui à l'heure actuelle sont prometteuses.

Un aspect très positif de cette étude a été de faire la preuve du potentiel d'application des extraits végétaux issus de biomasses locales à travers l'exemple du procédé de transestérification des TAG en esters éthyliques. Il faut concevoir que bien d'autres applications sont envisageables avec ce même procédé. On peut penser à la synthèse de tensioactifs polyfonctionnels, à la restructuration de corps gras, à la formulation "d'aliments"...

PERSPECTIVES

Sur la base des résultats de l'analyse de la bibliographie et des résultats de ces travaux de thèse, il apparaît que les lipases végétales contenues dans les extraits de graines germées de *Jatropha curcas* et de *Moringa oleifera* sont compatibles avec la transestérification des TAG avec l'éthanol. Mais pour que ces lipases végétales soient des biocatalyseurs industriels viables, il faut une meilleure maîtrise du procédé à l'aide des lipases végétales sélectionnées. Cela passe par:

- (i) l'optimisation en amont de la réaction de transestérification non plus avec des extraits végétaux brutes mais à partir de préparations enzymatiques concentrées et stables,
- (ii) l'immobilisation des lipases sur un support approprié qui permet la récupération et la réutilisation du biocatalyseur. Sur le plan fonctionnel, l'immobilisation permet aussi l'augmentation de stabilité des enzymes et de son activité catalytique.

La démarche à adopter serait d'abord d'obtenir à partir des extraits bruts, des préparations aqueuses d'enzyme concentré, suivit de la précipitation des protéines enzymatiques par l'ajout de différents composés tels que des sels d'ammonium, des solvants organiques, des sucres ou des polyols. Certains agents précipitants ont pour effet de stabiliser l'enzyme et surtout pour ce qui nous intéresse de faciliter l'étape suivante de déshydratation. La déshydratation va permettre en fonction du procédé de précipitation (déshydratation par atomisation ou par lyophilisation) d'aboutir à une poudre, un liquide concentré, une enzyme enrobée ou à des microgranulés dont l'activité catalytique sera évaluée.

La méthode la plus adaptée pour l'immobilisation est la méthode par adsorption. Contrairement à l'immobilisation par inclusion et l'immobilisation par liaisons covalentes, l'immobilisation par adsorption est la méthode la plus rentable et la plus simple à mettre en œuvre. La celite, la silice et les charbons actifs peuvent être choisis comme support solide car ils comptent parmi les supports d'adsorption dans la plupart des applications industrielles des lipases en raison de leur caractère poreux. Ce sont des supports qui peuvent

être obtenu localement et particulièrement les charbons actifs et la silice mésoporeuse à partir de biomasse végétale locale.

Sur la Figure 36 est schématisée la démarche expérimentale qui pourrait être adoptée

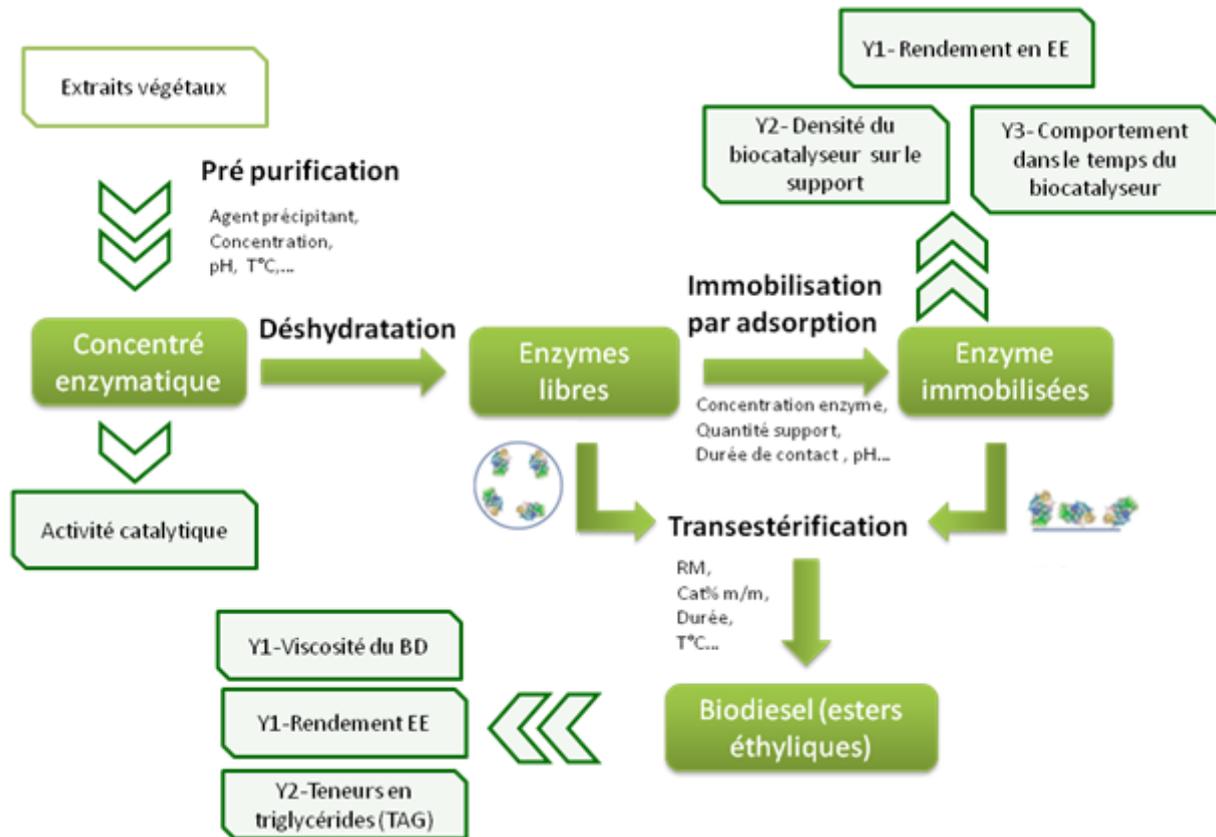


Figure 36 : Démarche expérimentale à adopter pour l'optimisation des performances de biocatalyseurs préparés à partir de biomasses végétales

Au cours de la préparation d'enzymes libres, l'influence des paramètres suivants sur l'activité catalytique des lipases vont être étudiés :

- la nature de l'agent précipitant et sa concentration
- le pH du milieu
- la température
- le temps de séjour
- la stabilité (thermique et au stockage).

Comme l'immobilisation des lipases par adsorption fait intervenir des interactions fortes (liaisons ioniques), ou des interactions faibles (liaisons hydrogènes et de Van Der Waals), et que les interactions faibles entre lipases et les surfaces du support peuvent être facilement

perturbées et entraîner le lessivage de l'enzyme au cours de la réaction, alors l'influence des paramètres d'immobilisation présentés ci-dessous sur l'activité enzymatique va être étudiée:

- la nature du support,
- le pH du milieu,
- la concentration en enzyme,
- la température,
- la durée de contact.

Une fois la lipase immobilisée, le pourcentage d'immobilisation (%), les phénomènes de lessivage, la tenue mécanique ainsi que la stabilité au stockage devront être étudiés

Enfin, une fois le procédé optimisé, une analyse économique devrait être menée pour estimer la viabilité de cette nouvelle voie de production de biodiésel, estimer si le procédé est viable à petites échelles (y a-t-il des effets d'échelle?)

.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelkafi, S., Barouh, N., Fouquet, B., Fendri, I., Pina, M., Scheirlinckx, F., Villeneuve, P. & Carrière, F. (2011) *Carica papaya* lipase: A naturally immobilized enzyme with interesting biochemical properties. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, **66**, 34-40
- Abigor, R., Uadia, P., Foglia, T., Haas, M., Scott, K. & Savary, B. (2002) Partial purification and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **79**, 1123-1126
- Akoh, C.C., Chang, S.W., Lee, G.C. & Shaw, J.F. (2007) Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 8995-9005
- Akoh, C.C. & Subramani, S. (2005) Applications of lipases in modifications of food lipids. *Handbook of industrial biocatalysis*, pp. 9-1-9-39. CRC Press.
- Al-Zuhair, S., Hasan, M. & Ramachandran, K.B. (2003) Kinetic of hydrolysis of palm oil using lipase. *process Biochemistry*, 1155-1163
- Al-Zuhair, S., Vaarma Jayaraman, K., Krishnan, S. & Chan, W.-H. (2006) The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 212-217
- Alamu, O.J., Waheed, M.A. & Jekayinfa, S.O. (2007) Alkali-catalysed laboratory production and testing of biodiesel fuel from nigerian palm kernel oil.
- Alba-Rubio, A.C., Santamaría-González, J., Mérida-Robles, J.M., Moreno-Tost, R., Martín-Alonso, D., Jiménez-López, A. & Maireles-Torres, P. Heterogeneous transesterification processes by using cao supported on zinc oxide as basic catalysts. *Catalysis Today*, **149**, 281-287
- Alloue, W.A.M., Destain, J., Ghalfi, H., Thonart, P., Aguedo, M., Wathelet, J.-P. & Blecker, C. (2008) Immobilized lipases and their applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **12**
- American Society of Testing Materials Standard D6751-09a (2009) *Standard specification for biodiesel fuel blend stock (b100) for middle distillate fuel*, doi :10.1520/d6751-09. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Amigun, B., Musango, J.K. & Stafford, W. (2011) Biofuels and sustainability in africa. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**, 1360-1372
- Antczak, M.S., Kubiak, A., Antczak, T. & Bielecki, S. (2009) Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, **34**, 1185-1194
- Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., Senft, M., Andre, M., Peyrot, J., Salducci, J. & Lairon, D. (1996) Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, **271**, G172-G183
- Athel Cornish-Bowden, Marc Jamin & Saks, V. (2005) *Cinétique enzymatique*.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P.N. & Mehrotra, R. (2009) Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **62**, 9-14
- Balat, M. & Balat, H. (2009) Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, **86**, 2273-2282
- Balat, M. & Balat, H. (2010) Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*, **In Press, Corrected Proof**
- Barouh, N., Piombo, G., Goli, T., Baréa, B., Pina, M., Lago, R. & Villeneuve, P. (2008) Enzymatic production of conjugated linoleic acid monoacylglycerols from dehydrated isomerized castor bean oil. *Journal of food lipids*, **15**, 13-27
- Barros M, Fleuri L. F & Macedo G. A (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **27**, 15-29
- Barros, M., Fleuri L. F & Macedo G. A (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **27**, 15-29

- Basri, M., Heng, A. & Razak, C. (1997) Alcoholysis of palm oil mid-fraction by lipase from *Rhizopus rhizopodiformis*. *J Am Oil Chem Soc* 113-6
- Berger, M., Laumen, K. & Schneider, M.P. (1992) Enzymatic esterification of glycerol I. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1, 3-sn-diacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **69**, 955-960
- Bhardwaj, K., Raju, A. & Rajasekharan, R. (2001) Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*, **127**, 1728-1738
- Billaud, F., Dominguez, V., Broutin, P. & Busson, C. (1995) Production of hydrocarbons by pyrolysis of methyl esters from rapeseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **72**, 1149-1154
- Bioenergy, I.E.A. (2008) From 1st-to 2nd-generation biofuel technologies. *An overview of current industry and RD&D activities*. IEA-OECD
- Blin, J. & Girard, P. (2011) *Guide technique pour une utilisation énergétique des huiles végétales dans les pays de la cedeao*. l'Harmattan.
- Bornscheuer, U.T. (1995) Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**, 578-586
- Borugadda, V.B. & Goud, V.V. (2012) Biodiesel production from renewable feedstocks: Status and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**, 4763-4784
- Brazilian National Agency of Petroleum Natural Gas and Biofuels (2008) Technical regulation and n°7/2008. *Diário Oficial da União*, **19.03.2008**
- Brunschwig, C., Moussavou, W. & Blin, J. (2011) Use of bioethanol for biodiesel production. *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**, 283-301
- Cambon, E., Bourlieu, C., Salum, T.F.C., Piombo, G., Dubreucq, E. & Villeneuve, P. (2009) Ability of *Vasconcellea heilbornii* lipase to catalyze the synthesis of alkyl esters from vegetable oils. *Process Biochemistry*, **44**, 1265-1269
- Cambon, E., Gouzou, F., Pina, M., Barea, B., Barouh, N., Lago, R., Ruales, J., Tsai, S.W. & Villeneuve, P. (2006) Comparison of the lipase activity in hydrolysis and acyl transfer reactions of two latex plant extracts from babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv.) and *Plumeria rubra*: Effect of the aqueous microenvironment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 2726-2731
- Canakci, M. (2007) The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Bioresource Technology*, **98**, 183-190
- Caro, Y., Pina, M., Turon, F., Guilbert, S., Mougeot, E., Fetsch, D.V., Attwood, P. & Graille, J. (2002) Plant lipases: Biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, **77**, 693-703
- Caro, Y., Turon, F., Villeneuve, P., Pina, M. & Graille, J. (2004) Enzymatic synthesis of medium-chain triacylglycerols by alcoholysis interesterification of copra oil using a crude papain lipase preparation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 503-512
- Caro, Y., Villeneuve, P., Pina, M., Reynes, M. & Graille, J. (2000) Investigation of crude latex from various carica papaya varieties for lipid bioconversions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **77**, 891-901
- Castillo E, Dossat V, Marty A, Condoret Js & D., C. (1997) The role of silica gel in lipase-catalyzed esterification reactions of high polar substrates. *J Am Oil Chem Soc*, **74**, 77-85
- Cavalcanti, E.D.C., Maciel, F.M., Villeneuve, P., Lago, R.C.A., Machado, O.L.T. & Freire, D.M.G. (2007) Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **137**, 57-65
- Chen, H.-M., Wang, P.-Y. & Tsai, S.-W. (2009a) Carica papaya lipase-catalyzed transesterification resolution of secondary alcohols in organic solvents. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **40**, 549-554
- Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P. & Wang, X. (2009b) Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, **50**, 668-673

- Cheng, Y.C. & Tsai, S.W. (2004) Enantioselective esterification of (rs)-2-(4-chlorophenoxy) propionic acid via carica papaya lipase in organic solvents. *Tetrahedron-Asymmetry*, **15**, 2917-2920
- Chhetri, A., Watts, K. & Islam, M. (2008) Waste cooking oil as an alternate feedstock for biodiesel production. *Energies*, **1**, 3-18
- Chisti, Y. (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in biotechnology*, **26**, 126-131
- Chong, F., Tey, B., Dom, Z., Cheong, K., Satiawihardja, B., Ibrahim, M., Rahman, R., Biak, D. & Ling, T. (2007) Rice bran lipase catalyzed esterification of palm oil fatty acid distillate and glycerol in organic solvent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **12**, 250-256
- Crooks G.E (1995) Comparison of hydrolysis and esterification behavior of humicola lanuginosa and rhisomucor miehei lipases in aot stabilized water in oil microemulsions: li. Effect of temperature on reaction kinetics and general consideration of stability and productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, **48**, 190
- D'cruz, A., Kulkarni, M.G., Meher, L.C. & Dalai, A.K. (2007) Synthesis of biodiesel from canola oil using heterogeneous base catalyst. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **84**, 937-943
- Dalai, A.K., Issariyakul, T. & Baroi, C. (2012) Biodiesel production using homogeneous and heterogeneous catalysts: A review. *Catalysis for Alternative Energy Generation*, 237
- Dandik, L. & Aksoy, H.A. (1996) Applications of nigella sativa seed lipase in oleochemical reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 277-281
- Dandik, L. & Aksoy, H.A. (1998) Pyrolysis of used sunflower oil in the presence of sodium carbonate by using fractionating pyrolysis reactor. *Fuel Processing Technology*, **57**, 81-92
- De Los Rios, A.P., Hernández Fernández, F.J., Gómez, D., Rubio, M. & Villora, G. (2011) Biocatalytic transesterification of sunflower and waste cooking oils in ionic liquid media. *Process Biochemistry*, **46**, 1475-1480
- De Maria, P.D., Sinisterra, J.V., Tsai, S.W. & Alcantara, A.R. (2006) Carica papaya lipase (cpl): An emerging and versatile biocatalyst. *Biotechnology Advances*, **24**, 493-499
- De Oliveira, J.S., Leite, P.M., De Souza, L.B., Mello, V.M., Silva, E.C., Rubim, J.C., Meneghetti, S.M.P. & Suarez, P.A.Z. (2009) Characteristics and composition of jatropha gossypifolia and jatropha curcas l. Oils and application for biodiesel production. *Biomass & Bioenergy*, **33**, 449-453
- Della, V.P., Kã¼Hn, I. & Hotza, D. (2002) Rice husk ash as an alternate source for active silica production. *Materials Letters*, **57**, 818-821
- Demirbas, A. (2002) Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. *Energy Conversion and Management*, **43**, 2349-2356
- Demirbas, A. (2003) Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: A survey. *Energy Conversion and Management*, **44**, 2093-2109
- Demirbas, A. (2005) Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science*, **31**, 466-487
- Demirbas, A. (2007) Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*, **35**, 4661-4670
- Demirbas, A. (2008) Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conversion and Management*, **49**, 125-130
- Demirbas, A. (2009) Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, **50**, 14-34
- Demirkol, S., Aksoy, H., Tüter, M., Ustun, G. & Sasmaz, D. (2006) Optimization of enzymatic methanolysis of soybean oil by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **83**, 929-932
- Deutsche Gesellschaft Für Internationale Zusammenarbeit GmbH (2011) Filière compétitive au profit des producteurs en afrique. In: *Initiative pour le Cajou Africain*
- Dhuique-Mayer, C., Caro, Y., Pina, M., Ruales, J., Dornier, M. & Graille, J. (2001) Biocatalytic properties of lipase in crude latex from babaco fruit (carica pentagona). *Biotechnology Letters*, **23**, 1021-1024

- Dhuique-Mayer, C., Villarreal, L., Caro, Y., Ruales, J., Villeneuve, P. & Pina, M. (2003) Lipase activity in alcoholysis and esterification reactions of crude latex from babaco fruit (*carica pentagona*). *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides*, **10**, 232-234
- Di Serio, M., Tesser, R., Pengmei, L. & Santacesaria, E. (2007) Heterogeneous catalysts for biodiesel production. *Energy & Fuels*, **22**, 207-217
- Di Vincenzo, D., Maranz, S., Serraiocco, A., Vito, R., Wiesman, Z. & Bianchi, G. (2005) Regional variation in shea butter lipid and triterpene composition in four african countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** 7473–7479
- Dias Ribeiro, B., Machado De Castro, A., Zarur Coelho, M.A. & Guimarães Freire, D.M. (2011) Production and use of lipases in bioenergy: A review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, **16**
- Dizge, N., Aydinler, C., Imer, D.Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A. & Keskinler, B. (2009) Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*, **100**, 1983-1991
- Domínguez De María, P., Sinisterra, J.V., Tsai, S.-W. & Alcántara, A.R. Carica papaya lipase (cpl): An emerging and versatile biocatalyst. *Biotechnology Advances*, **24**, 493-499
- Dossat, V.R., Combes, D. & Marty, A. (1999) Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: Influence of the glycerol production. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 194-200
- Du, W., Xu, Y.Y., Liu, D.H. & Zeng, J. (2004) Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **30**, 125-129
- Eastmond, P.J. (2004) Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 45540-45545
- Ei, N., Dandik, L. & Aksoy, H. (1998) Solvent-free glycerolysis catalyzed by acetone powder of *nigella sativa* seed lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 1207-1211
- Endalew, A.K., Kiros, Y. & Zanzi, R. (2011) Inorganic heterogeneous catalysts for biodiesel production from vegetable oils. *Biomass and Bioenergy*, **35**, 3787-3809
- Enujiugha, V.N., Thani, F.A., Sanni, T.M. & Abigor, R.D. (2004) Lipase activity in dormant seeds of the african oil bean (*pentaclethra macrophylla benth*). *Food Chemistry*, **88**, 405-410
- Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yañez, E.E., Castillo, E.F. & Almazan, O. (2009) Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **13**, 1275-1287
- European Committee for Standardization (2003) Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (fame). Determination of oxidative stability (accelerated oxidation test), en 14112: 2003. In. European Committee for Standardization (CEN) Brussels, Belgium
- Fahey, J.W. (2005) *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for Life Journal*
- Faostat (2013) Organisation des nations unie pour l'alimentation et l'agriculture URL <http://faostat.fao.org/site/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=fr>
- Feofilova, E.P., Sergeeva, Y.E. & Ivashchkin, A.A. (2010) Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, **46**, 369-378
- Fickers, P., Destain, J. & Thonart, P. (2008) Lipases are atypical hydrolases: Principal characteristics and applications. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, **12**, 119-130
- Fiorillo, F., Palocci, C., Soro, S. & Pasqua, G. (2007) Latex lipase of *euphorbia characias* l.: An aspecific acylhydrolase with several isoforms. *Plant Science*, **172**, 722-727
- Fjerbaek, L., Christensen, K.V. & Norddahl, B. (2009) A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, **102**, 1298-1315

- Foglia, T.A. & Villeneuve, P. (1997) Carica papaya latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **74**, 1447-1450
- Fromer, M. & Merolla, M. (2013) Pancreatic triacylglycerol lipase URL <http://maptest.rutgers.edu/drupal/?q=node/50>
- Fukuda, H., Kondo, A. & Noda, H. (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**, 405-416
- Gandhi, N.N. & Mukherjee, K.D. (2000) Specificity of papaya lipase in esterification with respect to the chemical structure of substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 566-570
- Gandhi, N.N. & Mukherjee, K.D. (2001a) Reactivity of medium-chain substrates in the interesterification of tripalmitin catalyzed by papaya lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **78**, 965-968
- Gandhi, N.N. & Mukherjee, K.D. (2001b) Synthesis of designer lipids using papaya (*carica papaya*) latex lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11**, 271-277
- Gandolfi, R., Marinelli, F., Lazzarini & Molinari, F. (2000) Cell-bound and extracellular carboxylesterase from streptomyces : Hydrolytic and synthetic activities. *J Appl Microb*, 870-5
- Ghadge, S.V. & Raheman, H. (2006) Process optimization for biodiesel production from mahua (*madhuca indica*) oil using response surface methodology. *Bioresource Technology*, **97**, 379-384
- Giordani, R., Moulin, A. & Verger, R. (1991) Tributyrilglycerol hydrolase activity in carica papaya and other latices. *Phytochemistry*, **30**, 1069-1072
- Goering, C.E., Schwab, A.W., Daugherty, M.J., Pryde, E.H. & Heakin, A.J. (1982) Fuel properties of 11 vegetable-oils. *Transactions of the Asae*, **25**, 1472-&
- Gog, A., Roman, M., Toăya, M., Paizs, C. & Irimie, F.D. (2011) Biodiesel production using enzymatic transesterification - current state and perspectives. *Renewable Energy*, **39**, 10-16
- Graboski, M.S. & McCormick, R.L. (1998) Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, **24**, 125-164
- Green, K. & Nakajima, M. (1998) Evaluation of immobilized modified lipase: Aqueous preparation and reaction studies in <i>i>n</i> -hexane. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 1519-1526
- Greenpro (2009) The neem tree (azadirachta indica). URL <http://www.greenerpro.com/NeemTree.html>
- Grompone, M.A. (2011) Sunflower oil. *Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses* (ed. by F. Gunstone), pp. 137-167. Wiley-Blackwell.
- Gunstone, F.D. & Hamilton, R.J. (2001) *Oleochemical manufacture and applications*. Blackwell.
- Hansen, A.C., Zhang, Q. & Lyne, P.W.L. (2005) Ethanol-diesel fuel blends--a review. *Bioresource Technology*, **96**, 277-285
- Hassanien, F.R. & Mukherjee, K.D. (1986) Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **63**, 893-897
- Hasson, E.P. & Laties, G.G. (1976) Separation and characterization of potato lipid acylhydrolases. *Plant Physiology*, **57**, 142-147
- Hellyer, S.A., Chandler, I.C. & Bosley, J.A. (1999a) Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride? *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1440**, 215-224
- Hellyer, S.A., Chandler, I.C. & Bosley, J.A. (1999b) Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1440**, 215-224
- Helwani, Z., Othman, M.R., Aziz, N., Kim, J. & Fernando, W.J.N. (2009) Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: A review. *Applied Catalysis a-General*, **363**, 1-10
- Hemavathy, J., Prabhakar, J.V. & Sen, D.P. (1987) Composition of polar lipids of alphonso mango (*mangifera indica*) kernel. *Journal of Food Science*, **52**, 833-834

- Hernández-Martín, E. & Otero, C. (2008) Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym- 435 and lipozyme-tl im. *Bioresource Technology*, **99**, 277-286
- Hills, M. & Mukherjee, K. (1990) Triacylglycerol lipase from rape (brassica napus L.) suitable for biotechnological purposes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **26**, 1-10
- Hills, M.J., Kiewitt, I. & Mukherjee, K.D. (1990) Enzymatic fractionation of fatty acids: Enrichment of 3 -linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **67**, 561-564
- Hsu, A.F., Jones, K.C., Foglia, T.A. & Marmer, W.N. (2004) Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **81**, 749-752
- Huang, A.H. (1985) Plant lipases. *Lipases* (ed. by B. Borgström and H.L. Brockman), pp. 420-442. Elsevier Science Amsterdam.
- Huang, A.H.C., Lin, Y.-H. & Wang, S.-M. (1988) Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **65**, 897-899
- Hunt, L.P., Dismukes, J.P., Amick, J.A., Schei, A. & Larsen, K. (1984) Rice hulls as a raw material for producing silicon. *Journal of the Electrochemical Society*, **131**, 1683-1686
- Iftikhar, T., Niaz, M., Jabeen, R. & Ul Haq, I. (2011) Purification and characterization of extracellular lipases. *Pakistan Journal of Botany*, **43**, 1541-1545
- International Energy Agency (2012) Key world energy statistics. URL <http://www.iea.org/Textbase/nppdf/free/2006/Key2006.pdf>.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. & Shrestha, S. (2001) Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **16**, 53-58
- Jachmanián, I. & Mukherjee, K. (1996) Esterification and interesterification reactions catalyzed by acetone powder from germinating rapeseed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**, 1527-1532
- Jaeger, K.-E. & Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 390-397
- Jegannathan, K.R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E.S. & Ravindra, P. (2008) Production of biodiesel using immobilized lipase: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **28**, 253-264
- Joab Sampaio De Sousa, Elisa D'ávila Cavalcanti-Oliveira, Donato Alexandre Gomes Aranda & Freire, D.M.G. (2010) Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **65**, 133-137
- Jumbe, C.B.L., Msiska, F.B.M. & Madjera, M. (2009) Biofuels development in sub-saharan africa: Are the policies conducive? *Energy Policy*, **37**, 4980-4986
- Kadri Nouhou, O. (2011) Balanites aegyptiaca. URL <http://www.cooperation.net/k2ri/balanites-aegyptiaca>
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E. & Fukuda, H. (1999) Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**, 627-631
- Kapranchikov, V.S., Zherebtsov, N.A. & Popova, T.N. (2004) Purification and characterization of lipase from wheat (*Triticum aestivum* L.) germ. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40**, 84-88
- Karera, A., Nargis, S., Patel, S. & Patel, M. (1986) Silicon-based materials from rice-husk. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **45**, 441-448
- Karmakar, A., Karmakar, S. & Mukherjee, S. (2012) Biodiesel production from neem towards feedstock diversification: Indian perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**, 1050-1060
- Katikaneni, S.P.R., Adjaye, J.D. & Bakhshi, N.N. (1995) Catalytic conversion of canola oil to fuels and chemicals over various cracking catalysts. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **73**, 484-497

- Kato, M., Fuchimoto, J., Tanino, T., Kondo, A., Fukuda, H. & Ueda, M. (2007) Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *candida antarctica*; lipase b (mcalb) by a yeast molecular display system and its practical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**, 549-555
- Kawakami, K., Oda, Y. & Takahashi, R. (2011) Application of a burkholderia cepacia lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude jatropha oil. *Biotechnology for Biofuels*, **4**, 42
- Kazlauskas, R.J. & Bornscheuer, U.T. (1998) Biotransformations with lipases. *Biotechnology Set*, 37-191
- Kim, M., Yoon, S.H., Choi, E. & Gil, B. (2008) Comparison of the adsorbent performance between rice hull ash and rice hull silica gel according to their structural differences. *LWT-Food Science and Technology*, **41**, 701-706
- Kim, S. & Dale, B.E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, **26**, 361-375
- Kiss, A., Omota, F., Dimian, A. & Rothenberg, G. (2006) The heterogeneous advantage: Biodiesel by catalytic reactive distillation. *Topics in Catalysis*, **40**, 141-150
- Klibanov, A. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water? . *Trends Biotechnol*, **15**, 97-101
- Klibanov, A.M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **409**, 241-246
- Kojima, M., Matthews, W. & Sexsmith, F. (2010) Petroleum markets in sub-saharan africa. In: *Extractive Industries for Development* World Bank
- Komers, K., Stloukal, R., Machek, J. & Skopal, F. (2001) Biodiesel from rapeseed oil, methanol and koh. 3. Analysis of composition of actual reaction mixture. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103**, 363-371
- Koul, O., Isman, M.B. & Ketkar, C.M. (1990) Properties and uses of neem, azadirachta indica. *Canadian Journal of Botany*, **68**, 1-11
- Kumar Tiwari, A., Kumar, A. & Raheman, H. (2007) Biodiesel production from jatropha oil (*jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass and Bioenergy*, **31**, 569-575
- Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V.K. & Banerjee, R. (2009) Enzymatic transesterification of jatropha oil. *Biotechnology for Biofuels*, **2**
- Laane C, Boeren S, Vos K & C., V. (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology Bioengineering*, **30**, 81-7
- Lam, M.K., Lee, K.T. & Mohamed, A.R. (2010) Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*, **28**, 500-518
- Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi, N.N., Reaney, M.J. & Hertz, P.B. (2001) Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology*, **80**, 53-62
- Le Site De Référnce Du Neem. URL <http://www.neem.fr/fr/>
- Lee, M., Lee, J., Lee, D., Cho, J., Kim, S. & Park, C. (2011) Improvement of enzymatic biodiesel production by controlled substrate feeding using silica gel in solvent free system. *Enzyme and Microbial Technology*, **49**, 402-406
- Leung, D.Y.C., Wu, X. & Leung, M.K.H. (2010) A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, **87**, 1083-1095
- Li, E., Xu, Z.P. & Rudolph, V. (2009) Mgcoal-ldh derived heterogeneous catalysts for the ethanol transesterification of canola oil to biodiesel. *Applied Catalysis B: Environmental*, **88**, 42-49
- Li, Q., Xu, J., Du, W., Li, Y. & Liu, D. (2013) Ethanol as the acyl acceptor for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **25**, 742-748
- Liaquat, M. (2010) Optimized synthesis of (z)-3-hexen-1-yl caproate using germinated rapeseed lipase in organic solvent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **68**, 59-65
- Liaquat, M. & Apenten, R.K.O. (2000) Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. *Journal of Food Science*, **65**, 295-299

- Lima, D.G., Soares, V.C.D., Ribeiro, E.B., Carvalho, D.A., Cardoso, A.C.V., Rassi, F.C., Mundim, K.C., Rubim, J.C. & Suarez, P.A.Z. (2004) Diesel-like fuel obtained by pyrolysis of vegetable oils. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **71**, 987-996
- Liu, S., Musuku, S.R., Adhikari, S. & Fernando, S. (2009) Adsorption of glycerol from biodiesel washwaters. *Environmental Technology*, **30**, 505-510
- M. Barros, Fleuri, L.F. & Macedo, G.A. (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **27**, 15-29
- Ma, F. & Hanna, M.A. (1999) Biodiesel production: A review. *Bioresource Technology*, **70**, 1-15
- Marchetti J.M, Miguel V.U & Errazu A.F (2007) Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **11**, 1300–1311
- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H. & Kondo, A. (2001) Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of rhizopus oryzae lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, 515-520
- Mcneff, C.V., Mcneff, L.C., Yan, B., Nowlan, D.T., Rasmussen, M., Gyberg, A.E., Krohn, B.J., Fedie, R.L. & Hoyer, T.R. (2008) A continuous catalytic system for biodiesel production. *Applied Catalysis A: General*, **343**, 39-48
- Meher, L.C., Vidya Sagar, D. & Naik, S.N. (2006) Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **10**, 248-268
- Mittelbach, M. (1990) Lipase-catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *Journal of American Oil Chemical Society* 168-70
- Morgana K. Pierozan, Roger J. Da Costa, Octavio A. C. Antunes, Enrique G. Oestreicher, J. Vladimir Oliveira, Rogerio L. Cansian, Helen Treichel & Oliveira, A.D.D. (2009) Optimization of extraction of lipase from wheat seeds (triticum aestivum) by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 9716-9721
- Moulin, A., Giordani, R., Teissere, M. & Pieroni, G. (1992) Purification of a lipase from the latex of euphorbia-characias using an apolar solvent-extraction method. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*, **314**, 337-342
- Moulin, A., Teissere, M. & Bernard, C. (1994) Lipases of the euphorbiaceae family - purification of a lipase from euphorbia-characias latex and structure-function-relationships with the b-chain of ricin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 11328-11332
- Mukherjee, K.D. & M.J. Hills (1994) Lipases from plants. *Lipases-their structure, biochemistry and application*, (ed. by P. Woolley and S.B. Petersen), pp. 49-75. Cambridge University Press, Cambridge.
- Muthu, H., Sathyaselvabala, V., Varathachary, T.K., Kirupha Selvaraj, D., Nandagopal, J. & Subramanian, S. (2010) Synthesis of biodiesel from neem oil using sulfated zirconia via tranesterification. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **27**, 601-608
- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K. & Dalai, A.K. (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, 578-597
- Nakashima, K., Arai, S., Tanino, T., Ogino, C., Kondo, A. & Fukuda, H. (2009) Production of biodiesel fuel in ionic liquids catalyzed by whole-cell biocatalysts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **108**, Supplement 1, S43
- Narasimharao, K., Lee, A. & Wilson, K. (2007) Catalysts in production of biodiesel: A review. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, **1**, 19-30
- Ncube, I., Gitlesen, T., Itlesen, I., Adlercreutz, P., Read, J.S. & Mattiasson, B. (1995) Fatty-acid selectivity of a lipase purified from vernonia-galamensis seed. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, **1257**, 149-156
- Ncube, I. & Read, J.S. (1995) Evaluation of vernonia galamensis lipase (acetone powder) for use in biotechnology. *Industrial Crops and Products*, **3**, 285-292
- Ncube, I.A., P. Read, J. Mattiasson, B. (1993) Purification of rape (brassica-napus) seedling lipase and its use in organic media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **17**, 327-336

- Nelson, L.A., Foglia, T.A. & Marmer, W.N. (1996) Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **73**, 1191-1195
- Ngando Ebongue, G.F., Dhoub, R., Carrière, F., Amvam Zollo, P.H. & Arondel, V. (2006) Assaying lipase activity from oil palm fruit (*elaeis guineensis jacq.*) mesocarp. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 611-617
- Nigam, P.S. & Singh, A. (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, **37**, 52-68
- Nonyarma, E. & Laude, J.P. (2010) Policy framework for the development of biofuels in burkina faso. *Sud Sciences & Technologies*, **19-20**, 9
- Noureddini, H., Gao, X. & Philkana, R.S. (2005) Immobilized pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*, **96**, 769-777
- Oda, M., Kaieda, M., Hama, S., Yamaji, H., Kondo, A., Izumoto, E. & Fukuda, H. (2005) Facilitatory effect of immobilized lipase-producing rhizopus oryzae cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *Biochemical Engineering Journal*, **23**, 45-51
- Ognjanovic, N.D., Petrovic, S.D., Bezbradica, D.I. & Knezevic-Jugovic, Z.D. Lipases as biocatalysts for biodiesel production. *Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela*, **64**, 1-8
- Ortiz N, A., Madrigal S, L., Fernandez H, R. & Cooke, R.D. (1980) The storage and drying characteristics of papaya (*carica papaya l.*) latex. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **31**, 510-514
- Oshadi (2013) Moringa oleifera – l'arbre de vie. URL <http://herbes-et-yoga.fr/moringa-oleifera-larbre-de-vie/>
- Palekar, A.A., Vasudevan, P.T. & Yan, S. (2000) Purification of lipase: A review. *Biocatalysis and Biotransformation*, **18**, 177-200
- Palocci, C., Soro, S., Cernia, E., Fiorillo, F., Belsito, C.M.A., Monacelli, B., Delle Monache, G. & Pasqua, G. (2003) Lipolytic isoenzymes from euphorbia latex. *Plant Science*, **165**, 577-582
- Paques, F.W. & Macedo, G.A. (2006) Plant lipases from latex: Properties and industrial applications. *Quimica Nova*, **29**, 93-99
- Piazza, G.J. (1991) Generation of polyunsaturated fatty acids from vegetable oils using the lipase from ground oat (*avena sativa l.*) seeds as a catalyst. *Biotechnology Letters*, **13**, 173-178
- Piazza, G.J. & Farrell, H.M. (1991) Generation of ricinoleic acid from castor oil using the lipase from ground oat (*avena sativa l.*) seeds as a catalyst. *Biotechnology Letters*, **13**, 179-184
- Pierozan, M.K., Oestreicher, E.G., Vladimir Oliveira, J., Oliveira, D., Treichel, H. & Cansian, R.L. (2011) Studies on immobilization and partial characterization of lipases from wheat seeds (*triticum aestivum*). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**, 75-86
- Polizelli, P.P., Facchini, F.D.A., Cabral, H. & Bonilla-Rodriguez, G.O. (2008) A new lipase isolated from oleaginous seeds from pachira aquatica (*bombacaceae*). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **150**, 233-242
- Prabhu, A.V., Tambe, S.P., Gandhi, N.N., Sawant, S.B. & Joshi, J.B. (1999) Rice bran lipase: Extraction, activity, and stability. *Biotechnology Progress*, **15**, 1083-1089
- Ramadhas, A.S., Jayaraj, S. & Muraleedharan, C. (2004) Use of vegetable oils as ic engine fuels - a review. *Renewable Energy*, **29**, 727-742
- Ramos, M.J., Casas, A., Rodríguez, L., Romero, R. & Pérez, À. (2008) Transesterification of sunflower oil over zeolites using different metal loading: A case of leaching and agglomeration studies. *Applied Catalysis A: General*, **346**, 79-85
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E. & Miller, R. (2009) Lipases at interfaces: A review. *Advances in colloid and interface science*, **147**, 237-250
- Remington, S.J., Franken, S.M., Sussman, J.L., Frolow, F., Ollis, D.L., Verschueren, K.H.G., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B. & Harel, M. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, **5**, 197-211
- Robles-Medina, A., Gonzalez-Moreno, P.A., Esteban-Cerdan, L. & Molina-Grima, E. (2009) Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, **27**, 398-408

- Rodrigues, R.C., Pessela, B.C.C., Volpato, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. & Ayub, M.A.Z. (2010) Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilize-stabilized lipase from thermomyces lanuginosus. *Process Biochemistry*, **45**, 1268-1273
- Rodrigues, R.C., Volpato, G., Ayub, M.A.Z. & Wada, K. (2008) Lipase-catalyzed ethanolysis of soybean oil in a solvent-free system using central composite design and response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **83**, 849-854
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G. & Locatelli, S. (2007) Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*, **98**, 648-653
- Sagiroglu, A. & Arabaci, N. (2005) Sunflower seed lipase: Extraction, purification, and characterization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **35**, 37-51
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M. & Solinas, V. (2005) Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, **119**, 291-299
- Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H. & Fukuda, H. (2000) Pretreatment of immobilized candida antarctica lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **90**, 180-183
- Sanli, H. & Canakci, M. (2008) Effects of different alcohol and catalyst usage on biodiesel production from different vegetable oils. *Energy & Fuels*, **22**, 2713-2719
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B. & Davidson, W.S. (2003) Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, **52**, 1-18
- Schmid, R.D. & Verger, R. (1998) Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, **37**, 1608-1633
- Schwab, A.W., Bagby, M.O. & Freedman, B. (1987) Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. *Fuel*, **66**, 1372-1378
- Sek, L., Porter, C.J.H. & Charman, W.N. (2001) Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by hptlc coupled with in situ densitometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25**, 651-661
- Selmi, B. & Thomas, D. (1998) Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 691-695
- Semwal, S., Arora, A.K., Badoni, R.P. & Tuli, D.K. (2010) Biodiesel production using heterogeneous catalysts. *Bioresource Technology*, **102**, 2151-2161
- Shah, S. & Gupta, M.N. (2007) Lipase catalyzed preparation of biodiesel from jatropha oil in a solvent free system. *Process Biochemistry*, **42**, 409-414
- Shah, S., Sharma, S. & Gupta, M.N. (2004) Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of jatropha oil. *Energy & Fuels*, **18**, 154-159
- Shay, E.G. (1993) Diesel fuel from vegetable-oils-status and opportunities. *Biomass & Bioenergy*, **4**, 227-242
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. & Y., T. (1999) Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized candida antarctica lipase. *J Am Oil Chem Soc*, 789-793
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. (2002) Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **17**, 133-142
- Sidibe, S.D.S., Blin, J. & Nganaoh, V.S. (2011) Utilisation des hvc (huile végétales carburants) dans les moteurs diesels. *Guide technique pour l'utilisation énergétique des huiles végétales dans les pays de la cedeao*, p. 91.
- Sim, J.H., Haruna Kamaruddin, A. & Bhatia, S. (2009) Effect of mass transfer and enzyme loading on the biodiesel yield and reaction rate in the enzymatic transesterification of crude palm oil. *Energy & Fuels*, **23**, 4651-4658
- Singh, A.K. & Fernando, S.D. (2007) Reaction kinetics of soybean oil transesterification using heterogeneous metal oxide catalysts. *Chemical Engineering & Technology*, **30**, 1716-1720

- Singh, S.P. & Singh, D. (2010) Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **14**, 200-216
- Soumanou, M. & Bornscheuer, U. (2003) Improvement in lipase-catalysed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 97-103
- Srivastava, A. & Prasad, R. (2000) Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **4**, 111-133
- Stamenkovic, O.S., Velickovic, A.V. & Veljkovic, V.B. (2011) The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. *Fuel*, **90**, 3141-3155
- Staubmann, R., Ncube, I., Gübitz, G.M., Steiner, W. & Read, J.S. (1999) Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. *Journal of Biotechnology*, **75**, 117-126
- Stevenson, D.E., Stanley, R.A. & Furneaux, R.H. (1994) Near-quantitative production of fatty acid alkyl esters by lipase-catalyzed alcoholysis of fats and oils with adsorption of glycerol by silica gel. *Enzyme and Microbial Technology*, **16**, 478-484
- Su, E.-Z., Zhou, Y., You, P.-Y. & Wei, D.-Z. (2010) Lipases in the castor bean seed of chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization. *Journal of Shanghai University (English Edition)*, **14**, 137-144
- Sureshkumar, M. & Lee, C.-K. (2009) Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **60**, 1-12
- Suzuki, T., Honda, Y. & Mukasa, Y. (2004) Purification and characterization of lipase in buckwheat seed. *J. Agric. Food Chem.*, **52**
- Szczesna Antczak, M., Kubiak, A., Antczak, T. & Bielecki, S. (2009) Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, **34**, 1185-1194
- Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R. & Cabral, J.M.S. (1992) Purification of lipases. *Journal of Biotechnology*, **26**, 111-142
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L. & Wang, F. (2010) Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, **In Press, Uncorrected Proof**
- Toschi, T.G., Caboni, M.F., Penazzi, G., Lercker, G. & Capella, P. (1993) A study on cashew nut oil composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **70**, 1017-1020
- Turner, N.A. & Vulfson, E.N. (2000) At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 108-113
- Tüter, M. (1998) Castor bean lipase as a biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 417-420
- Tuter, M., Secundo, F., Riva, S., Aksoy, H.A. & Ustun, G. (2003) Partial purification of nigella sativa L. Seed lipase and its application in transesterification reactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **80**, 6
- Valivety, R.H., Halling, P.J., Peilow, A.D. & Macrae, A.R. (1994) Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. *European Journal of Biochemistry*, **222**, 461-466
- Van Der Laak, W.W.M., Raven, R.P.J.M. & Verbong, G.P.J. (2007) Strategic niche management for biofuels: Analysing past experiments for developing new biofuel policies. *Energy Policy*, **35** 3213-3225
- Vasudevan, P.T. (2004) *Purification of lipase*, Biochemistry to Molecular Pharmacology edn. Lipases and Phospholipases in Drug Development
- Vasudevan, P.T. & Briggs, M. (2008) Biodiesel production-current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35**, 421-430
- Verdugo, C., Luna, D., Posadillo, A., Sancho, E.D., Rodríguez, S., Bautista, F., Luque, R., Marinas, J.M. & Romero, A.A. (2010) Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*, **167**, 107-112
- Villeneuve, P. (2003) Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **105**, 308-317

- Villeneuve, P. (2007) Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, **25**, 515-536
- Villeneuve, P., Foglia, T.A., Mangos, T.J. & Nunez, A. (1998) Synthesis of polyfunctional glycerol esters: Lipase-catalyzed esterification of glycerol with diesters. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **75**, 1545-1549
- Villeneuve, P., Pina, M., Skarbek, A., Graille, J. & Foglia, T.A. (1997a) Specificity of carica papaya latex lipase-catalyzed interesterification reactions. *Biotechnology Techniques*, **11**, 91-94
- Villeneuve, P., Pina M., Montet D. & J., G. (1995) Carica papaya latex lipase: Sn-3 stereoselectivity or short-chain selectivity? Model chiral triglycerids are removing the ambiguity. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **72**, 753-755
- Villeneuve, P., Skarbek, A., Pina, M., Graille, J. & Foglia, T.A. (1997b) Catalytic behavior of carica papaya latex in transesterification reactions. *Biotechnology Techniques*, **11**, 637-639
- Villeneuve, P., Turon, F., Caro, Y., Escoffier, R., Barea, B., Barouh, B., Lago, R., Piombo, G. & Pina, M. (2005) Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**, 150-155
- Von Malitz, G. & Brent, A. (2008) Assessing the biofuel options for southern africa. In: *Science real and relevant: 2nd CSIR Biennial Conference*, , p. 16. CSIR Natural Resources and the Environment, Pretoria
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. (1999) Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized candida antarctica lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**, 622-626
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. (2002) Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized candida antarctica lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **17**, 151-155
- Wu, W.H., Foglia, T.A., Marmer, W.N. & Phillips, J.G. (1999) Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **76**, 517-521
- Wu, X.Y., Jääskeläinen, S. & Linko, Y.-Y. (1996) An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 226-231
- Wyman, C.E. & Hinman, N.D. (1990) Ethanol : Fundamentals of production from renewable feedstocks and use as a transportation fuel *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **24/25**, 735-753
- Xia, X., Wang, Y.-H., Yang, B. & Wang, X. (2009) Wheat germ lipase catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in non-aqueous media. *Biotechnology Letters*, **31**, 83-87
- Xu, K. & Klibanov, A.M. (1996) Ph control of the catalytic activity of cross-linked enzyme crystals in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 9815-9819
- Yang, Z. & Pan, W. (2005) Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**, 19-28
- Yefanova, S.N., Coniglio, L., Schneider, R., Nebie, R. & Bonzi-Coulibaly, Y. (2013) Ethylic biodiesel production: Evaluation of two-stage ethanolysis performances In: *4ème Conférence Biocarburant Bioénergies* p. 15, Ouagadougou, Burkina Faso
- Yesiloglu, Y. (2004) Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **81**
- Yeşiloğlu, Y. & Başkurt, L. (2008) Partial purification and characterization of almond seed lipase. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **38**, 397-410
- Yeşiloğlu, Y. & Demirkan, B. (2010) Biocatalytic properties of lipase from walnut seed (*Juglans regia* L.). *Journal of the American Oil Chemists Society*, **87**, 659-665
- Ying, Y.J., Shao, P., Jiang, S.T. & Sun, P.L. (2009) Artificial neural network analysis of immobilized lipase catalyzed synthesis of biodiesel from rapeseed soapstock. *Computer and computing technologies in agriculture ii, volume 2* (ed. by D. Li and C. Zhao), pp. 1239-1249.
- Yori, J.C., D'ippolito, S.A., Pieck, C.L. & Vera, C.R. (2007) Deglycerolization of biodiesel streams by adsorption over silica beds. *Energy & Fuels*, **21**, 347-353
- You, P., Su, E., Yang, X., Mao, D. & Wei, D. (2011) Carica papaya lipase-catalyzed synthesis of terpene esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **71**, 152-158

- Yüksel, F. & Yüksel, B. (2004) The use of ethano-gasoline blend as a fuel in an si engine. *Renewable Energy*, **29**, 1181-1191
- Zabeti, M., Wan Daud, W.M.A. & Aroua, M.K. (2009) Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review. *Fuel Processing Technology*, **90**, 770-777
- Zaks, A. & Klivanov, A.M. (1985) Enzyme-catalyzes in organique sovents *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 3192-3196
- Zaldivar, J., Nielsen, J. & Olsson, L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**, 17-34
- Ziejewski, M. & Kaufman, K.R. (1982) Long-term performance of a sunflower oil diesel fuel blend. *North Dakota Farm Research*, **39**, 27-35

PUBLICATIONS

Moussavou Mounquengui, R.W., Brunschwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P., Blin, J., **2013. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production?** *Progress in Energy and Combustion Science*, 39, 441-456

Brunschwig, C., Moussavou, W., Blin, J., **2011. Use of bioethanol for biodiesel production.** *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 283-301.

Moussavou Mounquengui, R.W., Blin, J., Baréa, B., Brunschwig, C., Villeneuve, P. **Screening of enzymatic activity in different plant extracts from subsaharan biomass for biodiesel production** (En préparation).

COMMUNICATION ORALE

Moussavou Mounquengui, R.W., Brunschwig, C., Villeneuve, P., Blin, J.,. **Screening de l'activité lipasique dans des extraits végétaux de la biomasse burkinabé pour la synthèse d'esters éthylique d'huile végétale (EEHV).** 6èmes Journées Scientifiques de 2iE, Ouagadougou/Burkina Faso. **2011**

RÉSUMÉ

Le biodiesel est un biocarburant obtenu par transestérification de l'huile végétale avec un alcool. Il est composé d'esters éthyliques ou méthyliques en fonction que l'alcool utilisé soit de l'éthanol ou du méthanol et représente l'alternative la plus prometteuse pour la substitution de gazole dans les moteurs Diesel du transport. Ce travail de thèse présente une synthèse bibliographique sur l'origine et les enjeux autour de la production du biodiesel. Il présente aussi différents procédés catalytiques où des efforts continus sont faits pour le développement de nouveaux procédés de production techniquement solides et surtout respectueux de l'environnement. La catalyse lipasique est le procédé le plus simple qui répond à ces exigences. Cependant le coût élevé des lipases commerciales principalement d'origine microbienne limite l'expansion de ce procédé à l'échelle industrielle. La biomasse végétale représente une source potentielle de lipases peu chères, très abondantes et facilement exploitables. Pour ces raisons, l'identification d'une ou plusieurs biomasses végétales sources de lipases et leur mise en œuvre comme biocatalyseurs pour la production de biodiesel éthylique a été réalisée dans cette étude. Des graines dormantes et germées de huit biomasses oléagineuses locales (Burkina Faso) ont été broyées puis délipidées et la capacité des extraits végétaux obtenus à catalyser l'hydrolyse et la transestérification éthanolique de l'huile de tournesol a été testée. Ensuite, les conditions optimales de transestérification avec les extraits végétaux les plus actifs ont été déterminées. Les résultats des travaux réalisés ont montré que les extraits de graines germées de *Jatropha curcas* et de *Moringa oleifera* renferment une ou plusieurs lipases dont l'activité catalytique peut être exploitée sans purification préalable pour l'hydrolyse et la transestérification éthanolique de l'huile de tournesol.

Mots clés: Biodiesel, transestérification éthanolique, catalyse enzymatique, lipases végétales, adsorption, glycérol

ABSTRACT

Biodiesel is a biofuel obtained via transesterification of vegetable oil with an alcohol. It's composed by methyl or ethyl esters depending if the alcohol used is ethanol or methanol, and it represents the most promising substitute for diesel fuel in diesel engine alternative transport. This thesis presents a literature review on the origin and issues around the production of biodiesel. It also presents different catalytic processes for biodiesel producing where continuous efforts are made to develop new processes technically strong and friendly environmentally. Lipase catalysis is the simplest method that meets these requirements. However the high cost of commercial lipase mainly from microbial origin limits expansion of this process on an industrial scale. Plant biomass represents a potential source of cheap lipases, abundant and easily exploitable. For these reasons, the identification of one or more lipases in plant biomass and their implementation as biocatalysts for biodiesel production was carried out in this study. Dormant and germinated seeds of eight local oleagenous biomass (Burkina Faso) were ground and defatted and capacity of plant extracts obtained to catalyze the hydrolysis and ethanolic transesterification of sunflower oil was tested. Then, the optimal transesterification conditions with the most active plant extracts were determined. The results of this work showed that the extracts of germinated seeds from *Jatropha curcas* and *Moringa oleifera* contain one or more lipases whose catalytic activity can be exploited without any purification for the hydrolysis and ethanolic transesterification of sunflower oil.

Keywords: Biodiesel, ethanolic Transesterification, enzymatic catalysis, lipase plant, adsorption, glycerol