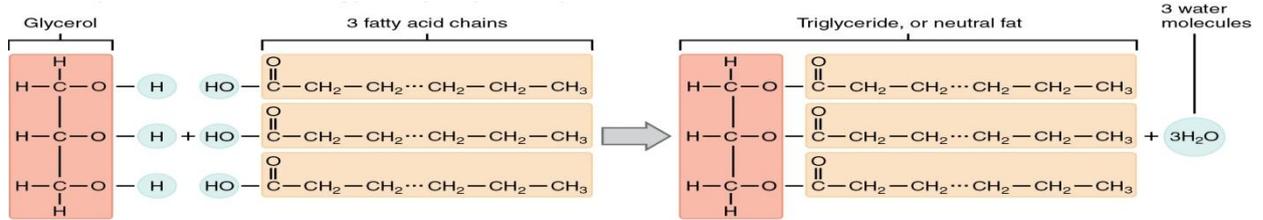


I -Propriétés chimiques des lipides

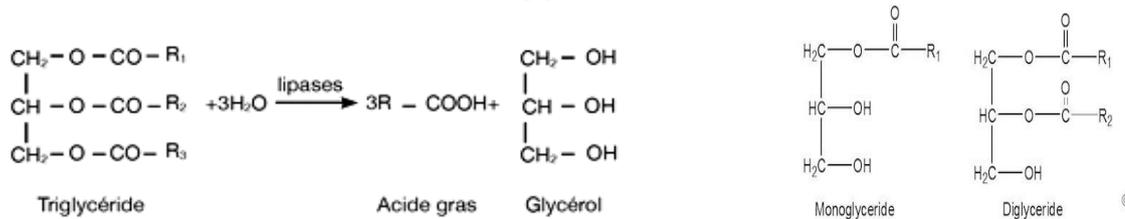
Hydrolyse des lipides

1. Généralités

Les lipides (98 % sous forme de triglycérides) en tant que qu'esters d'acides gras sont susceptibles d'être hydrolysés par **voie chimique ou enzymatique** en acides gras libres, monoacyl-glycérol et diacyl-glycérol. La coupure des liaisons se développe sous l'action de l'humidité et de la chaleur. Les glycérides partiels sont incolores, sans saveur et très bien digérés, mais ceci n'est pas le cas des acides gras libres (tableau 1).



Formation d'un triglycéride (Esterification)



Réaction d'hydrolyse par les lipases

Tableau 1 : Effet de l'hydrolyse sur la détérioration des lipides alimentaires

Agent hydrolytique	Produit	Effet
Lipases	Mono et diacyl-glycérol	Activité de surface augmentée
	Acides gras long (> 14 C)	Effet non prononcé
	Acides gras moyens (C6-C12)	Gout de savon
	Acides gras courts (< 6C)	Gout de beurre rance
Phospholipases	Lysophospholipides	Activité de surface augmentée
Stérol-estérases	Stérols	Effet non prononcé

Le rancissement savonneux peut se développer dans les produits contenant une lipase active et suffisamment d'eau. Le gout de savon est le résultat de libération d'acides gras à courte chaîne. Les seuils de détection des acides gras à courte chaîne sont relativement bas, mais augmente avec la longueur de la chaîne carbonée. Ex. C4 :0 (0.6 Ppm), C6 :0 (2.5 Ppm), C8 :0 (350 ppm).

Les acides gras à moyenne chaîne (C8- C14) sont présents notamment dans le beurre et les huiles de palmiste et de coprah. Après hydrolyse, les C6, C8 et C10 communiquent aux aliments un gout de savon très perceptible, idem pour le C12 : élément à prendre en considération lorsqu'on utilise les huiles de coprah et de palmiste pour les fritures (tableau 2).

NB : L'hydrolyse des lipides en libérant des acides gras libres participe au développement d'arôme de produits (cas des fromages, jambon...)

Tableau 2 : Composition en acides de quelques matières grasses (en % des acides gras totaux)

	Beurre	Palmiste	Coprah
C4 :0	2.8- 4		
C6 :0	1.1 -3	< 0.8.	0.4-0.6
C8 :0	1- 2	1.4-6.2	8-10
C10 :0	2.1- 3.9	2.6- 5	4.5-8
C12 :0	2.6-4.2	41-55	43-51
C14 :0	10.2-17.5	14-18	16-21
C16 :0	22.3-38.5	6.5-10	7.5-10
C16 :1	1.9-2.6		
C18 :0	6.6-13.5	1.3-3	2-4
C18 :1	16-35	12-19	5-10
C18 :2	1.3-2.9	1-3.5	1-2.5
C18 :3	0.7-4.8		

Les acides gras à courte chaîne peuvent être oxydés et décarboxylés par des enzymes microbiennes qui peuvent engendrer des défauts organoleptiques apparentés aux parfums des aliments à base de lait ou de noix de Cocco. L'importance de la lipolyse dépend de la nature de la matière grasse. Le beurre qui contient 0.1 d'acides gras libres est inacceptable, alors que l'huile d'olive de bonne qualité l'extra-vierge peut contenir jusqu'à 0.8 %, la vierge (2%) et la vierge courante (< 3.3 %). Les huiles brutes (max 2 %), huiles raffinées (0.1- 0.3 %), margarine < 0.2

Les acides gras libres sont inoffensifs du point de vue nutritionnel et ce n'est qu'à une certaine concentration (supérieure à 5 %) qu'ils peuvent provoquer des troubles de digestion.

La dégradation lipolytique pose un problème important si les acides gras sont insaturés car ils deviennent des substrats pour la lipoxigénase (oxydation enzymatique) ou l'auto oxydation. Ces deux mécanismes génèrent des composés volatiles qui peuvent conduire à l'odeur de rance.

Les lipases sont largement répandues dans la nature ou elles ont un rôle physiologique dans le métabolisme des lipides. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les vertébrés et les invertébrés, mais également chez les microorganismes principalement sous formes de protéines extracellulaires. Ces lipases sont responsables de l'altération des graines pendant le stockage.

Chez l'homme ainsi que chez d'autres mammifères, les lipases interviennent dans la digestion, l'absorption, reconstitution des graisses (métabolisme : source d'énergie).

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Les avantages des lipases microbiennes ont permis le

développement de nombreuses applications qui ont abouti à de nouveaux produits commerciaux.

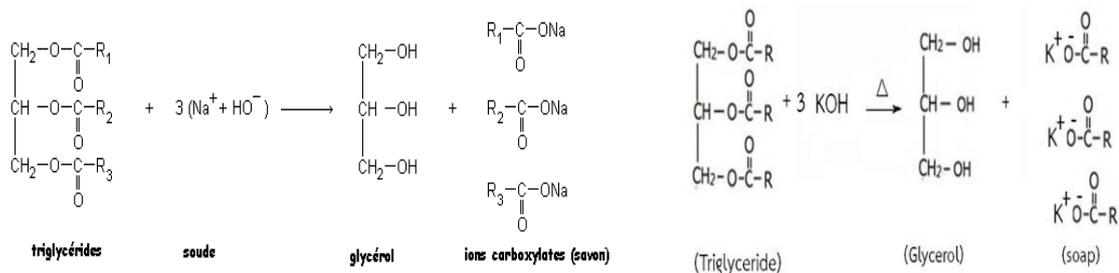
2 . Les différents types d'hydrolyse

2.1-Hydrolyse chimique (Saponification)

Explication

Les lipides peuvent être hydrolysés en milieu acide (acide sulfurique) mais la façon la plus utilisée est celle qui consiste à traiter à chaud (80 à 100°C) et en milieu alcalin (en présence de potasse ou de soude) pour donner l'alcool et l'acide gras qui se retrouve alors sous la forme de sel (savon).

Cette réaction est encore appelée saponification. Les savons possèdent des propriétés émulsifiantes, certains d'entre eux, de haut poids moléculaire et insaturés sont des germicides puissants comme le monolauryl sulfate de sodium. Les savons solubles en milieu aqueux sont récupérés par relargage en présence de chlorure de sodium (200 à 300 g/L). L'indice de saponification est un des paramètres qui permet d'apprécier la qualité d'une huile végétale. C'est la quantité de potasse (KOH), exprimée en milligrammes, nécessaire à la saponification d'un gramme d'huile.



Réaction de saponification avec NaOH ou KOH

2-2.Hydrolyse enzymatique des lipides alimentaires (catabolisme)

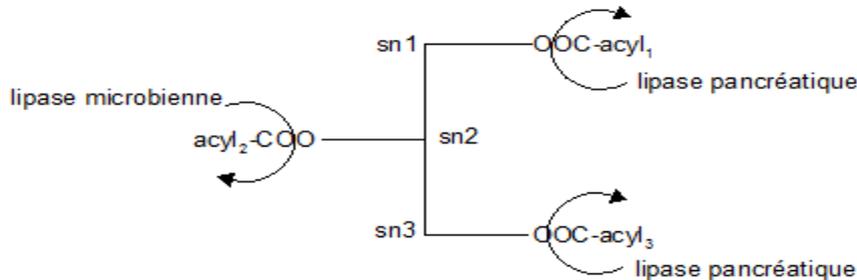
Les lipides ingérés sont constitués majoritairement des triglycérides et pour le reste de cholestérol, de phospholipides et d'esters de vitamines liposolubles. L'absorption des lipides dans l'organisme humain peut être séparé en trois étapes : la lipolyse, la solubilisation micellaire et la présynthèse des triglycérides dans les enterocytes d'où elles sont excrétées dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines : les chylomicrons. Si on prend comme exemple la digestion des lipides chez l'Homme, la lipolyse enzymatique sera réalisée par le biais d'estérases. Ces estérases font partie de la classe des hydrolases.

Différentes lipases agissent sur les lipides alimentaires

- **Lipase gastrique** : attaque les positions externes des triglycérides. Elle joue un rôle crucial dans l'initiation de la lipolyse pancréatique à la liaison du complexe lipase colipase aux gouttelettes lipidiques.

- **Lipases pancréatiques**

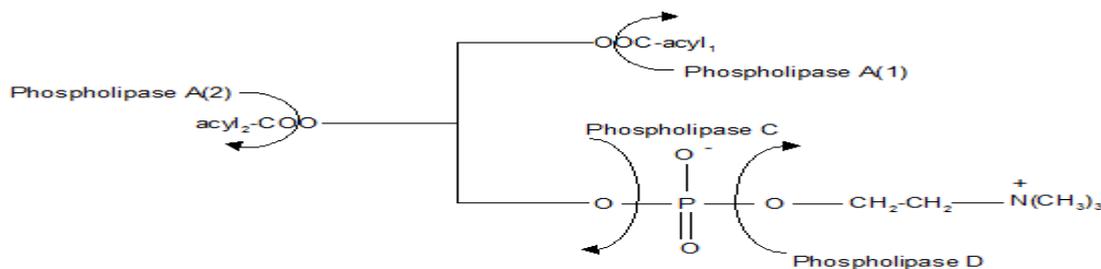
La lipase pancréatique (EC 3.1.1.3) attaquera préférentiellement les acides gras placés en sn1 puis en sn3 et sera sans action sur les esters en sn2. Les lipases de micro-organismes hydrolysent préférentiellement les groupements acylés en position sn2.



La carboxyester-hydrolase : en présence de sels biliaires, elle possède une activité sur les triglycérides à longue chaîne et des esters du cholestérol et une activité élevée sur les esters de vitamine A et E.

La cholestérol estérase hydrolyse les stérides pour donner du cholestérol et un acide gras.

Les phospholipases vont intervenir sur les lipides complexes du type glycérophosphoaminolipides (lécithines, lysolécithine, plasmalogènes et les phosphatidyléthanolamines). On caractérisera la phospholipase A(1) (EC 3.1.1.32) qui génère des lysolécithines par hydrolyse spécifique du groupement acylé en position sn1, la phospholipase A(2) (EC 3.1.1.4) qui hydrolyse le groupement acylé en position sn2 en libérant du 1-acylglycérophosphocholine. La phospholipase C (EC 3.1.4.3) libère un diacylglycérol et une phosphocholine à partir d'une lécithine.



4. Les lipases et leur application :

Les lipases par leur capacité à hydrolyser et à estérifier trouvent des applications dans différents secteurs industriels (hydrolyse des lipides, synthèse des lipides...) l'immobilisation est une stratégie qui peut élargir le champ d'application de ces enzymes (**tableau 2**).

- **Domaine alimentaire**
- Détergents biologiques
- Tannerie
- Environnement et bioremediation,
- Synthèse organique : cosmétique, parfumerie, industries pharmaceutique

Tableau 2. Différentes formes de lipase, leur origine et leur application — *Different forms of lipase, their origin and their application.*

Source de la lipase	Forme	Société	Rôle et application	Références
<i>Candida rugosa</i>	Poudre	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma	Hydrolyse des lipides	Knezevic et al., 2004
<i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres	Ducret et al., 1995
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres	Ferrer et al., 2005
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM60)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres	Ward et al., 1997 Chen et al., 2005
<i>Pseudomonas mendocina</i> (Lumufast)	Poudre	Genencor	Hydrolyse (industries des détergents)	Jaeger et al., 1998
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (Lipomax)	Poudre	Genencor	Hydrolyse (industries des détergents)	Jaeger et al., 1998
<i>Rhizomucor miehei</i> (Palatase)	Liquide	Novo Nordisk	Hydrolyse (développement des arômes dans le fromage)	Tarahomjoo et al., 2003
<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase)	Poudre	Novo Nordisk	Hydrolyse (industries des détergents et agroalimentaires)	Destain, 1998
Lipase (E.C.3.1.1.3.) de <i>Yarrowia lipolytica</i>	Poudre	Artechno S.A.	Hydrolyse des graisses	
Extrait pancréatique de porc (Créon)	Granule enrobé	Solvay pharma	Hydrolyse (industrie pharmaceutique)	

4. Lipolyse et produits agroalimentaires : l'utilisation des lipases est très variée. Le tableau ci-dessous donne quelques exemples de lipases commerciales des principaux fournisseurs mondiaux d'enzymes.

Producteur d'enzymes	Exemples de produits	Application
NOVOZYMES	NOVOZYMES Lipase 435	Lipase polyvalente
	Lipolase	Détergents
DSM	Gumzyme Maxapal A2	Dégommage des huiles Traitement de l'œuf
AB ENZYMES	Rohalase PL, Rohalase F, Veron Hyperbake	Dégommage des huiles Panification
AMANO	Lipase DF	Panification

4.1 Produits laitiers :

La matière grasse des fromages est constituée à 98% de triacylglycérols. L'hydrolyse de ces lipides constitue la réaction la plus importante durant la maturation des fromages. Les lipases sont utilisées pour décomposer les matières grasses du lait et donner saveurs caractéristiques aux fromages. Les acides gras issus de l'hydrolyse des lipides ont des rôles multiples puisqu'ils sont aromatiques ainsi que des précurseurs des méthyl-cétones, des alcools, des esters et des lactones (**figure 1**). Les lipases qu'elles soient isolées de *Mucor miehei* ou de certaines souches de *Penicillium*

roqueforti sont utilisées pour la fabrication de certains fromages et en particulier des fromages bleus ou italiens (Romano, Provolone). Le goût piquant caractéristique est dû à la présence d'acides gras à courte chaîne (C4:0 à C12:0) libérés par ces lipases soit présentes dans les préparations en pâte de la présure utilisée pour la fabrication de ce type de produit soit encore par ensemencement naturel de micro-organismes présents dans les caves d'affinage.

Les principaux acteurs de la formation des méthyl-cétones dans les fromages à croûte moisie sont les champignons. *Penicillium camberti*, *penicillium roqueforti* et *geotrichum candidum* possèdent un système enzymatique qui permet la déviation de la β -oxydation (**figure 2**). Les acides gras seront les précurseurs de molécules aromatiques soit à partir de l'hélice de Lynen soit en servant de substrats aux lipoxygénases et autres oxydo-réductases des micro-organismes pour la synthèse de cétones, d'aldéhydes substitués et d'alcools, supports du goût de certains fromages (méthylpropylcétone, pentanol 2, phényléthanol, méthane-thiol...).

Dans le genre *Penicillium* on va mettre en évidence que les propriétés des enzymes sont différentes selon qu'on s'adresse à *Penicillium roqueforti* ou à *Penicillium camemberti*.

Les membranes des globules lipidiques diminuent l'action des lipases et il est donc nécessaire si on veut une lipolyse importante de travailler avec du lait homogénéisé. Dans le cas des fromages de type camembert et roquefort, la lipolyse est comprise entre 5 et 10%, elle peut atteindre 20% dans d'autres spécialités de type bleu. Les bactéries lactiques peuvent, elles aussi, apporter leurs lipases qui sont nettement moins actives que les précédentes. Le taux de lipolyse peut atteindre entre 0,5 et 2% comme dans le comté et le gruyère.

L'utilisation des lipases exogènes diminuera considérablement le temps d'affinage des fromages.

Dans le beurre, si la note de fond vient du diacétyle, l'importance de la dégradation de la matière grasse peut agir positivement à faible dose, elle devient rapidement responsable des défauts de rancidité.

Dans le cas de la maturation des jambons secs, on constate que la lipolyse se poursuit au cours des 10 premiers mois de séchage, l'augmentation des acides gras libres est de l'ordre de 10 à 12%. Ce taux est stable par la suite. On observe une augmentation du taux des diacylglycérols et les enzymes semblent réagir préférentiellement sur les triacylglycérols renfermant de l'acide linoléique ce qui explique la présence d'acides gras polyinsaturés. L'hydrolyse des phospholipides est très rapide, leur teneur est inférieure à 0,2% après quelques mois de séchage.

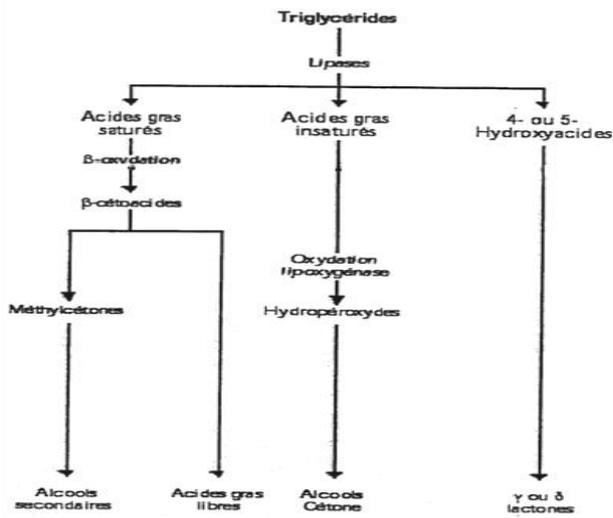


Figure 1. Formation de composés aromatiques à partir des lipides

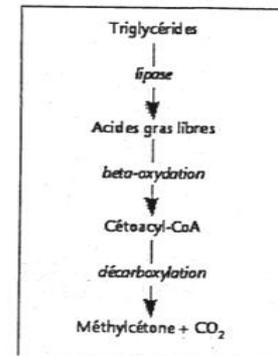
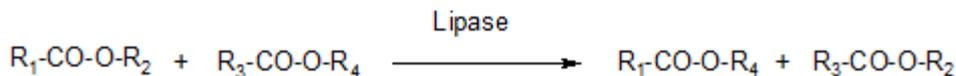


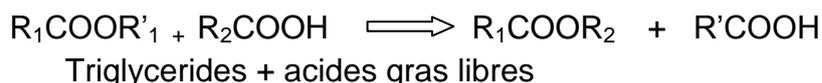
Figure 2. Voie de biosynthèse des méthylcétones.

4.2. Substituts (remplaceurs) du beurre de cacao (La transestérification)



Les processus enzymatiques ont été développés pour catalyser la réaction d'interestérification de différents huiles comestibles pour produire des graisses ayant une composition et propriétés comparables à celles du cacao beurre. Ces produits sont appelés beurre de cacao équivalents ou substituts du beurre de cacao (CBS). Le chocolat renferme 30% de beurre de cacao et, comme ce produit est relativement onéreux, on cherche à fabriquer des matières grasses qui possèdent les mêmes propriétés rhéologiques et plus particulièrement des triacylglycérols possédant une plage de fusion comprise entre 29 et 43°C. Le beurre de cacao est constitué par 3 triacylglycérols différents PamOleSte (41-52%), PamOlePam (16%) et SteOleSte (18-27%). Le traitement de l'huile de coton hydrogénée et d'huile d'olive en présence de lipase donne après interestérification les triacylglycérols suivants : PamOleSte à une concentration pratiquement identique à ce qu'on trouve dans le beurre de cacao et SteOleSte en concentration légèrement supérieure donnant une zone de fusion comprise entre 29 et 49°C. Il est possible d'obtenir des résultats analogues en traitant un mélange d'huile de tournesol et de palme.

4.3 Les substituts de graisse du lait maternel (acidolyse)



La matière grasse du lait maternel contient différents acides gras : oléique (30–35%), acide palmitique (20-30%), linoléique (7-14%) et stéarique (5,7–8%). Contrairement aux huiles végétales et à la matière grasse du lait de vache, dans HMF (Human Milk Fat : matière grasse du lait maternel), l'acide palmitique, le principal acide gras saturé, est principalement estérifié à la position sn-2 des TAG, tandis que les insaturés sont aux positions externes. Le profil des acides gras de la matière grasse du lait maternel a un effet crucial sur sa digestibilité et sur son absorption chez les nourrissons. Les

substituts de graisse du lait maternel (HMFS) ont été obtenus par acidolyse catalysée par la sn-1,3 lipase de tripalmitine, huile de palme, stéarine de palme ou saindoux (riche en acide palmitique en position sn-2) avec les acides gras libres (FFA) de différentes sources.

Le produit commercial Betapol® est fabriqué par un processus biocatalytique par acidolyse entre le saindoux et les acides gras du soja, catalysé par la lipase sélective sn-1,3 de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® RM).

- **Modification des propriétés nutritionnelles des matières grasses**

L'acidolyse est surtout utilisée pour introduire des acides gras polyinsaturés comme l'acide eicosapentaénoïque afin de modifier les propriétés nutritionnelles des matières grasses. Après extraction plus ou moins sélective des acides gras polyinsaturés des huiles de poisson, on les réintroduit par acidolyse soit dans des matières grasses végétales ou encore dans des huiles commerciales de poisson.

4.4 Dans l'industrie de la boulangerie, les (phospho) lipases peuvent être utilisées pour remplacer ou compléter les émulsifiants traditionnels par la dégradation des lipides du blé pour produire des lipides émulsifiants in situ. La lipase dans la cuisson améliore également le goût des produits de la boulangerie en libérant des acides gras à chaîne courte par estérification. En synergie avec d'autres enzymes (amylases, xylanases ...), les lipases contribuent à augmenter le volume du pain et améliorer la fermeté de la mie, permettre prolonger la durée de conservation des produits cuits et améliorer leur texture et douceur.

4.5 Dégommage enzymatique des huiles

Lors du raffinage des huiles végétales, il est nécessaire d'éliminer les impuretés qui affectent le rendement, mais aussi le goût, l'odeur, aspect visuel et stabilité au stockage de l'huile. Les phospholipides, souvent désignés comme "gommes". Depuis des décennies, l'industrie utilise des procédés thermochimiques pour éliminer ces phospholipides (PL) de l'huile brute, et plus récemment différentes solutions d'enzymes (à base de phospholipases) ont été proposées. Le dégommage enzymatique peut être appliqué aux huiles de colza (canola), soja, riz, maïs, graines de tournesol, et palme avec les avantages suivants:

- Rendements en huile plus élevés (jusqu'à 2% d'augmentation);
- Economies d'énergie (fonctionnement entre 50 et 60 ° C contre 85 ° C pour procédé conventionnel);
- très faibles pertes d'huile;
- facilite les opérations de pompage et de séparation;
- formation limitée de savons;
- Réduction de la consommation d'eau.

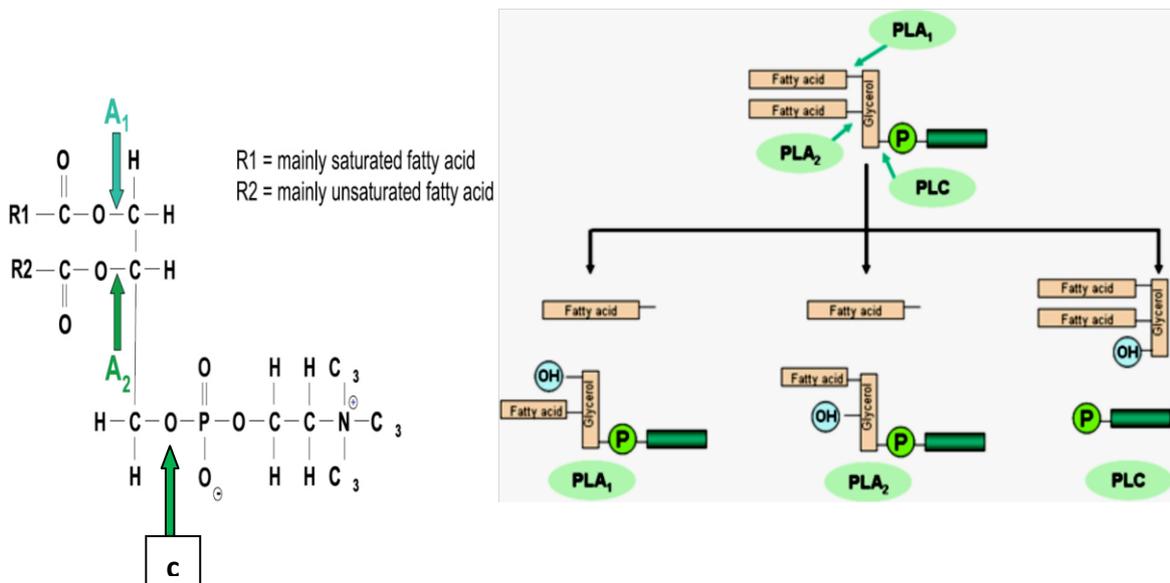
Le tableau ci-dessous donne un Aperçu des différents phospholipases (PL) des principaux fournisseurs d'enzymes (**Phospholipases disponibles**) dans le commerce pour le dégommage des huiles brutes.

Phospholipases disponibles dans le commerce pour le dégommage des huiles

Producteur d'enzymes	Marque	Activité	origine
AB enzymes	Rohalase® MP	PLA2	<i>Trichoderma reesei</i>
Danisco	Lysomax®	PLA2	<i>Streptomyces violaceoruber</i>
DSM	Gumzyme®	PLA2	<i>Aspergillus niger</i>
Novozymes	Lecitase® 10L	PLA2	<i>Porcine pancreas</i>
Novozymes	Lecitase® Novo	PLA1	<i>Fusarium oxysporum</i>
Novozymes	Lecitase® Ultra	PLA1	<i>Thermomyces lanuginosa/Fusarium oxysporum</i>
DSM (ex.VERENIUM range)	Purifine™ PLC	PLC	<i>Pichia pastoris</i>

Différentes phospholipases peuvent être utilisées : PLA1 (libère acide gras en position 1) ; PLA2 : libère acide gras en position 2 ; PLC : élimine la partie contenant le phosphate. En libérant les acides gras des phospholipides en position 1 ou 2, le lysophospholipide devient plus facilement soluble dans l'eau (éliminés).

L'action de ces phospholipases est montrée dans les figures ci-dessous



3.4 Traitement des œufs

Les œufs fournissent des ingrédients fonctionnels à l'industrie alimentaire avec une variété de propriétés, y compris moussage, gélification, émulsifiant dans les pâtes et la

mayonnaise et améliorant de la texture des produits de boulangerie. Les lipides des œufs sont responsables des propriétés émulsifiantes. Les lipases peuvent grandement améliorer le pouvoir émulsifiant des lipides de l'œuf pour de meilleures performances et moins d'addition du jaune d'œuf dans les recettes d'aliments transformés, telles que vinaigrettes et produits de type mayonnaise.

Un tiers du marché des émulsifiants sont concentrés en Russie et en Europe de l'Est des pays. Le marché est très industrialisé, avec des acteurs tels que Nestlé, Kraft et Unilever. Le jaune d'œuf est une émulsion complexe huile-eau composée de 50% d'eau, 32% lipides et 16% de protéines. Environ 1/3 des lipides sont phospholipides, dont environ 80% est la phosphatidylcholine (PC). Le jaune d'œuf contient également de la phosphatidyléthanolamine.