

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA -
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Analyses biologiques et biochimiques

Présenté par :

Mlle. DJILALI Naïma
Mr. OUANAS Hocine

Thème

*Essai de synthèse d'esters de sucre à partir de la biomasse
végétale*

Soutenu le : 03/07/2017

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M. DJOUAHRA Djamila

M.A.A.

Univ. de Bouira

Présidente

M. CHEKROUNE Malika

M.A.A.

Univ. de Bouira

Promotrice

M. BOURFIS Nassima

M.A.A.

Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2016/2017

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mon père qui est la source de ma réussite.

Ma mère qui a œuvré pour ma réussite de par son amour son soutien et ses sacrifices, pour son assistance et sa présence dans ma vie.

L'âme de mes grands-parents.

Mes frères Belkacem et Adel, ma sœur Kabina et mes belles sœurs Fabima et Meriem pour leur amour et leur soutien.

Mon neveu « Zino ». À mes nièces Lina, Racha, Ritadje et Sarah,

Mer Ladaoui Hacene pour ses encouragements

Mes collègues de l'EPSP de Bouira plus particulièrement à mon équipe de garde ; mes amies sœurs Mm Zaidi Soumia, Mm Miboubi Mouna et Berdis,

Mes amis(es) ou qu'ils soient partout dans le monde notamment Naima Mamer, Saada, Samira, Houria, Chadia, Makbelouf.

Mes professeurs de SNV Bouira pour leurs efforts et leurs disponibilités

Ingénieurs de laboratoire SNV Bouira, en précise Fatima Gherbi, Behar Samia, Hadioche Houria, Naima Maakaci, Meriem, Fatima Zobra, pour leurs gentillesse et leurs disponibilités.

Aux personnes chères qui comptent énormément pour moi et qui m'ont toujours soutenu, Je suis très fier de vous avoir à mes côtés.

Naima

Remerciement

Nous remercions avant tout Allah le tout puissant, de nous avoir guidés toutes ces années d'étude et de nous avoir donnés la volonté, la patience et le courage pour terminer ce modeste travail.

Que madame CHEKROUNE M., qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail tout le long de sa réalisation accepte nos sincères gratitude, pour ces conseils, son aide, et sa patience.

Nous portons notre gratitude aux ingénieurs du département de biologie.

Nous adressons nos respectueux remerciements à monsieur DAHMOUNE F., chef de département de des sciences de la vie et de la terre à l'université de Bouira, qui a toujours été au service des étudiants.

Nous tenons d'exprimer toute notre reconnaissance aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont prêté à ce mémoire en acceptant de l'évaluer, en l'occurrence DJOUAHRA. D, en tant que présidente et BOURFIS .N, en tant qu'examinatrice.

Un remerciement tout particulier est adressé à: BEGHOURA Ch. pour ses conseils, ses encouragements, sa disponibilité.

Sans oublier nos camarades de classe pour leur soutient incessant et leur aide précieuse, ils étaient pour nous comme une deuxième famille.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Étude bibliographique	2
1. <i>Introduction</i>	2
1.1. Les tensioactifs	2
1.2. Les tensioactifs non ioniques	3
1.3. Les tensioactifs synthétisés à partir des sources naturelles	3
2. <i>Les esters des sucres</i>	5
2.1. Avantages des esters des sucres comme tensioactif	5
2.2. Voies de synthèse des esters des sucres	5
2.2.1. Synthèse chimique	5
2.2.2. Synthèse enzymatique	6
2.3. Applications des esters des sucres	7
2.3.1. Applications dans le domaine agroalimentaire.....	9
2.3.2. Les applications pharmaceutiques et médicales.....	9
2.3.3. Produits cosmétiques	10
3. <i>Les enzymes</i>	10
3.1. Les lipases	11
3.2. Origine des lipases	12
3.2.1. Les lipases de mammifères.....	12
3.2.2. Les lipases microbiennes	12
3.2.3. Les lipases végétales.....	12
4. <i>Sources des lipases végétales</i>	13
Chapitre II : Partie expérimental	16
<i>Partie 1. Matériel & méthodes</i>	17
1.1. Matériels.....	16
1.1.1. Biomasses végétales étudiées	16
a. Graines de lin	16
b. Graines de Nigél.....	17
c. Graines de sésame	17
d. Graines de soja	18
e. Graines de lupin.....	18
f. Grains de Fenouil.....	19
g. Graines de Maïs	19
h. Graines de moutarde noire	20
1.1.2. Source des acides gras.....	20
1.1.3. Source de sucre	21
1.2. Méthodes.....	23
1.2.1. Préparation de la poudre de datte.....	23
a. Processus de séchage des dattes.....	23
b. Obtention de la poudre	23
1.2.2. Préparation des extraits végétaux.....	23

a. Germination	23
b. Séchage et broyage de la biomasse végétale étudiée	24
c. Délipidation	24
d. Screening de l'activité lipasique des extraits végétaux de la biomasse étudié	25
1.2.3. Synthèse enzymatique des ester de sucre et d'acide gras.....	26
1.2.4. Méthodes de dosage et d'analyse des esters de sucres	26
a. Dosage des esters des sucres par la méthode volumétrique.....	26
b. Méthodes d'analyse par chromatographie sur couche mince.....	27
<i>Partie 2. Résultats & discussions</i>	16
2.1. Le séchage des dattes	31
2.2. Développement de germination	31
2.3. Activité hydrolytique des extraits lipasique étudiés	32
2.4. Synthèse enzymatique des esters de sucre.....	35
2.4.1. Quantification des esters de sucre par neutralisation des acides gras libérés	35
2.4.2. Etude des esters synthétisés par chromatographie sur couche mince	36
Conclusion	40

Résumé

La biosynthèse des esters de sucre en utilisant des biocatalyseurs végétaux bruts propose un éventuel choix pour substituer la synthèse chimique. Dans cet objectif un screening de l'activité lipasique a été effectué pour les extraits bruts issus des graines oléagineuses à fin de les exploiter comme biocatalyseurs pour la production des esters de sucre et d'acide gras en se servant de la poudre de dattes et de l'huile d'olive comme substrats. Le mélange réactionnel est dosé par méthode de titrage suivi par une analyse qualitative par CCM, le rendement d'estérification le plus élevé est obtenu par l'extrait de nigelle germée par 68,75% suivi par le sésame germé par 62,5%.

Mots clé : biocatalyseur, poudre de dattes, lipase, estérification, ester de sucre.

Abstract

The biosynthesis of sugar esters using crude plant biocatalysts suggests a possible choice to substitute the chemical synthesis. For this purpose a screening of the lipase activity was carried out for the crude extracts resulting from the oilseeds in order to exploit them as biocatalysts for the production of the sugar and fatty acid esters using the powder of date and Olive oil as substrates. The reaction mixture is assayed by titration method followed by a qualitative analysis by TLC, the highest esterification yield is obtained by the 68.75% germinated nigelle extract, followed by Sesame germinated by 62.5%.

Key words: biocatalyst, date powder, lipase, esterification, sugar ester.

الملخص

التركيب الحيوي لأسترات السكر باستخدام المحفزات البيولوجية يوفر أفضل خيار ممكن لتعويض التركيب الكيميائي، لهذا الغرض تم إجراء انتقاء وظيفي لنشاط انزيمات الليباز لمستخلصات خامة ناتجة عن بذور زيتية بهدف استغلالها كمحفزات بيولوجية لإنتاج استرات السكر والأحماض الدهنية وذلك باستخدام مسحوق التمر و زيت الزيتون بمثابة ركائز. تم الكشف الكمي لأسترات السكر الدهنية الناتجة بطريقة المعايرة اللونية يليها التحليل النوعي بتقنية كروماتوغرافيا الصفائح الرقيقة، حيث تم الحصول على أعلى عائد استرة مع مستخلص الحبة السوداء المنتشة بنسبة % 68.75 يليها مستخلص السمسم المنتش بنسبة % 62.5.

الكلمات المفتاحية : المحفزات البيولوجية، مسحوق التمر، الليباز، الأسترة، استرات السكر.

Liste des abréviations

AG : Acide Gras

AGL : Acide gras libre

APG : Alkylpolyglucosides

C : Carbone

°C : Degré Celsius

CCM : Chromatographie sur couche mince

cm : centimètre

EC : Enzyme Commission number

G : germée

g : gramme

h : heure

HLB : Balance hydrophile / lipophile

M : masse molaire

m : mètre

ml : millilitre

µm : micromètre

N : normalité

pH : Potentiel Hydrogène

TG : Triglycérides

v : volume

Liste des figures

Figure 1 : Structure simplifiée d'un tensioactif	2
Figure 2 : Équation générale de la réaction d'estérification	5
Figure 3 : Equation générale d'hydrolyse	11
Figure 4 : Grains de lin	16
Figure 5 : Grain de nigelle	17
Figure 6 : Grains de sésame	17
Figure 7 : Grains de soja	18
Figure 8 : Grains de lupin	18
Figure 9 : Grains de fenouil	19
Figure 10 : Grains de maïs	19
Figure 11 : Grains de moutarde noire	20
Figure 12 : L'huile d'olive	20
Figure 13 : Dattes de variété Mech-Degla	22
Figure 14 : Les dattes Mech-degla coupées en petits morceaux	23
Figure 15 : Les principales étapes de titrage colorimétrique	26
Figure 16 : Table de miscibilité des solvants	28
Figure 17 : Détermination de rapport frontale	30
Figure 18 : Aspect de la poudre de Mech-degla	31
Figure 19 : Les résultats du test hydrolytique des extraits végétaux (à l'état germé et dormant)	34
Figure 20 : Rendement d'estérification des extraits végétaux (%)	35
Figure 21 : Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après de la réaction d'estérification catalysée par des extraits germés de moutarde, sésame, nigelle et de fenouil	36
Figure 22 : Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après de la réaction d'estérification catalysée par des extraits germés de : Fenouil, sésame, Motarde et de Nigelle germé	37
Figure 23 : Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après de la réaction d'estérification catalysée par des extraits de nigelle germée et sésame germée	38
Figure 24 : Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après de la réaction d'estérification catalysée par des extraits germés de : Fenouil, sésame, Motarde et de Nigelle	39

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison entre la synthèse chimique et la synthèse enzymatique	6
Tableau II : HLB de quelques esters de sucres	8
Tableau III : Relations entre HLB et propriétés fonctionnelles	8
Tableau IV : Composition en acides gras d'huile d'olive par chromatographie en phase gazeuse	21
Tableau V : Durée de germination des graines étudiées	32
Tableau VI : Evaluation de l'activité hydrolytique d'extraits végétaux	33

Introduction

Introduction

Les tensioactifs sont des molécules d'intérêt dont le squelette amphiphile laisse apparaître des propriétés de surface spécifiques. Cette particularité structurale autorise leur usage pour la formulation de produits de consommation courante : les différentes émulsions alimentaires, les détergents et les cosmétiques, mais également dans de nombreuses industries comme le textile, le cuir, la métallurgie, ou encore les peintures. Compte-tenu des importants volumes produits chaque année et du développement des comportements respectueux de l'environnement, les tensioactifs doivent répondre de plus en plus à des impératifs de biodégradabilité [1].

Les esters de sucres sont des tensioactifs non-ioniques de structure simple, ils ne sont pas disponibles dans la nature. Leur synthèse est réalisée par la voie chimique, entraînant la production d'une quantité non négligeable de produits secondaires. Ces derniers doivent être éliminés, ce qui implique des coûts de purification relativement importants. Ce problème peut être contourné en optant pour une voie de synthèse beaucoup plus spécifique : la biocatalyse ; L'utilisation de lipases permet d'envisager le greffage d'un acide gras sur un sucre grâce à une liaison ester [2]. Les esters de sucres sont arrivés dans ce contexte, apportant de nouvelles solutions aux industriels du secteur des tensioactifs. L'accent sera placé sur cette dernière voie de synthèse tout en gardant à l'esprit que seule la voie chimique est exploitée à ce jour [3].

L'objectif de ce travail consiste à utiliser des biocatalyseurs végétales pour la synthèse des esters de sucres par la voie naturelle comme alternative de la voie chimique. Dans un premier temps, les extraits bruts issus des graines oléagineuses ont fait l'objet d'un screening de l'activité hydrolytique. Dans un deuxième temps les extraits actifs en hydrolyse ont été utilisés pour la synthèse des ester de sucre et d'acides gras, en exploitant l'huile d'olive comme source d'acide gras et la poudre de datte comme source de sucre.

Chapitre I : Étude bibliographique

1. Introduction

Les tensioactifs font partie de notre quotidien. L'ambivalence de leur structure et la diversité de leurs propriétés sont mises à profit dans de nombreux produits de la vie courante, notamment dans les détergents ménagers et industriels et dans les formulations cosmétiques. Les considérations environnementales liées à un marché en plein essor, incitent aujourd'hui à se détourner de la pétrochimie pour s'orienter vers l'utilisation de matières renouvelables et la production de tensioactifs non toxiques et biodégradables [4].

1.1. Les tensioactifs

Les tensioactifs ou agents de surface sont des molécules synthétiques ou naturelles possédant une chaîne à caractère lipophile (ou queue hydrophobe) liée à un groupement à caractère hydrophile (appelée tête polaire) comme illustré sur la (Fig 1). Ces molécules constituées de deux parties d'affinité opposée sont dites amphiphiles [4].

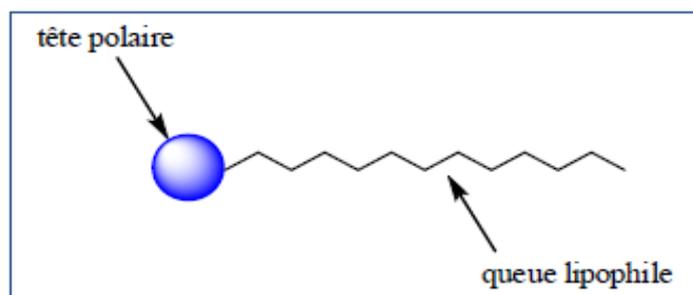


Fig.1 : Structure simplifiée d'un tensioactif [4].

Leur structure particulière permet aux agents de surface de se concentrer :

- aux interfaces liquides liquides à cause de l'amphiphilie qui les caractérise. Chaque groupement se dirige vers le liquide pour lequel il a le plus d'affinité.
- aux interfaces liquide-gaz et liquide-solide, le liquide repoussant vers l'extérieur les groupements qui ont une affinité opposée [4].

Les tensioactifs peuvent être classés de différentes manières (importance économique, solubilité dans l'eau, valeur HLB, propriétés, applications ...) mais le classement le plus usuel à l'heure actuelle est fondé sur leur caractère ionique, c'est-à-dire la nature de leur tête polaire. Ils sont répartis en quatre classes :

- Anioniques (charge négative: carboxylates COO^- , sulfonates SO_3^- , sulfates OSO).
- Cationiques (charge positive : amines R_3NH^+ , ammoniums quaternaires R_4N^+).
- Zwitterioniques (fonction anionique+ cationique : betaines, phospholipides).
- Non ioniques (ethoxylats, polyols,...). [5].

1.2. Les tensioactifs non ioniques

Ils constituent la classe la plus récente de tensioactifs [2], ils ne se dissocient pas dans des solutions aqueuses, l'hydrophile est apportée par des groupements fonctionnels non chargés (alcool, éther, ester, amide) contenant des hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène. Ces fonctions ont une faible contribution à l'hydrophile, c'est pour cela que ce type de tensioactifs est souvent polyfonctionnel : polyéthers (tensioactifs polyéthoxylés) ou polyols (tensioactifs dérivés de sucres) [6]. Ils sont utilisés pour leurs performances tensioactives à faible concentration. Peu moussants, ils rentrent dans la composition des lessives [2].

Les agents tensioactifs synthétiques ont connu un essor considérable. Ils sont synthétisés à partir de ressources pétrochimiques. Les agents tensioactifs anioniques et non ioniques ont été utilisés dans les détergents à usages ménagers et industriels [7], sont de plus en plus utilisés dans les formulations et, par conséquent, une quantité importante de tensioactifs est produite et se retrouve ensuite dans la nature [3]. La difficulté d'élimination de ces agents, non biodégradables, dans les stations de traitement et la mortalité des poissons dans le milieu aquatique ont conduit à la limitation de leur utilisation [7]. Ceci implique la production de composés à la fois économiques (matières premières et procédés de fabrication) et respectueux de l'environnement et au développement de traitements spécifiques [3].

1.3. Les tensioactifs synthétisés à partir des sources naturelles

Le taux de pénétration des tensioactifs d'origine végétale est aujourd'hui d'environ 20%. L'accroissement de la part des matières premières renouvelables dans ce domaine permettra à terme de sauvegarder les ressources fossiles et de répondre à l'image verte souhaitée par le consommateur [8]. Elle constitue une source inépuisable et diversifiée de matériaux de base [3].

Le terme de tensioactif naturel est ambigu. Pris au sens strict, un tensioactif naturel est issu de ressources naturelles. Cette source peut être d'origine animale ou végétale. Les tensioactifs naturels doivent être obtenus par des procédés de séparation tels que l'extraction, la précipitation ou la distillation qui n'introduisent pas de pollution. En réalité, il y a très peu de tensioactifs qui remplissent ces conditions. Le facteur limitant la production de ces tensioactifs naturels est leur coût de production beaucoup plus élevé que celui des tensioactifs synthétiques aux propriétés équivalentes, car ces produits sont généralement présents en faibles quantités et les procédés de séparations sont laborieux.

Les termes de tensioactif naturel et de biotensioactifs sont donc souvent utilisés dans un sens plus large. En effet, les tensioactifs synthétisés à partir de matière première naturelle sont généralement qualifiés de naturels. Ainsi un tensioactif dont l'une de ses parties, hydrophobe ou hydrophile, est obtenue à partir d'une source naturelle est appelé tensioactif naturel ou biotensioactifs. Par la suite, ces termes seront utilisés au sens large. Les principaux tensioactifs naturels commercialisés sont soit dérivés de polyols comme les alkylpolyglucosides (APG), les sucroesters et les alkylglucamides aminés [9].

➤ **Composition des tensioactifs naturels**

a. Partie hydrophile

La partie polaire est généralement constituée de carbohydrates, de polyols ou d'acides aminés/peptides.

Les carbohydrates, tels que le glucose, le saccharose, le lactose et la xylose, peuvent provenir de l'industrie du sucre (betterave sucrière, canne à sucre) et de l'amidon (froment, maïs, blé) [10].

b. Partie hydrophobe

La partie hydrophobe est essentiellement issue d'huiles végétales obtenues par trituration des graines ou fruits des plantes oléagineuses.

Les huiles sont d'origine végétale, minérale ou animale. Dans les plantes, en général, l'huile est contenue dans la substance dure et ligneuse des graines ou du noyau et se trouve enfermée dans les cellules oléifères sous forme de petites gouttes. Les huiles d'olive et de palme font exception dans la mesure où elles sont contenues dans l'enveloppe charnue du fruit. L'hydrolyse des triglycérides conduit au glycérol et aux acides gras.

Les acides gras peuvent être classés en trois catégories : saturés, mono insaturés et polyinsaturés. Les acides gras majeurs sont les acides laurique (C12), myristique (C14), palmitique (C16), stéarique (C18), oléique (C18 :1, c.-à-d. C18 avec une insaturation), linoléique (C18 :2), linoléique (C18 :3). Les acides palmitiques, stéariques, oléiques et linoléiques sont parmi les plus courants. Il existe d'autres acides gras à chaînes saturées, mono insaturées et polyinsaturées mais présents en moindre quantité dans les corps gras [10].

2. Les esters des sucres

Compte tenu de quasi innocuité des composés non ioniques et de la demande croissante en produits respectueux de l'environnement, les surfactants glucidiques constituent une voie émergente dans l'industrie des tensioactifs. Les sucres constituent sans aucun doute une matière première polaire de choix pour l'élaboration de biotensioactifs. Leur point commun est de posséder un nombre important de fonctions hydroxyles participant à la formation de réseaux de liaisons hydrogène en présence d'eau. Selon leur famille (hexose ou pentose) et/ou leurs poids moléculaires (mono-, di-, tri-, oligo- ou polysaccharides) [11].

2.1. Avantages des esters des sucres comme tensioactif

- ❖ matières premières peu coûteuses et renouvelables.
- ❖ biodégradabilité complète tant en aérobiose qu'en anaérobiose.
- ❖ molécules ne présentant ni toxicité (lors de la digestion, les sucroesters sont convertis en sucres et en acides gras, donc en molécules métabolisables), ni caractère irritant.
- ❖ large gamme de structures disponibles [3].

2.2. Voies de synthèse des esters des sucres

Les esters des sucres et d'acide gras sont des surfactants biodégradables et non toxiques dont des applications touchent à des domaines variés : industrie agroalimentaire, cosmétiques, détergents, pharmaceutiques, pesticides, ... la synthèse de ces molécules peut être réalisée par voie chimique ou enzymatique [3].

2.2.1. Synthèse chimique

D'un point de vue général, la réaction envisagée est une estérification (Fig 3) réalisée à haute température en présence d'un catalyseur alcalin. Les substrats nécessaires sont tout d'abord la source de sucre et ensuite un chlorure ou un anhydride d'acide gras. Ce type de synthèse ne permet de contrôler ni le site de réaction, ni le nombre de groupements hydroxyles qui seront estérifiés [3].

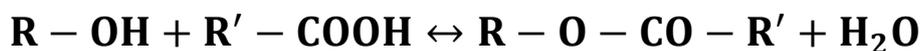


Fig.2 : Équation générale de la réaction d'estérification [3].

Ces dernières années, une alternative a été évoquée par de nombreux groupes de recherche : l'utilisation d'enzymes afin d'orienter les réactions de synthèse. De nombreux essais de synthèse d'esters de sucres par voie enzymatique ont été réalisés à l'échelle du laboratoire et pourraient constituer une alternative à la production chimique classique.

Remarquons tout de même que malgré ses désavantages, la voie de synthèse chimique reste actuellement la seule envisagée industriellement [3].

2.2.2. Synthèse enzymatique

L'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions de synthèse permet de cibler le site de réaction et aussi d'opérer dans des conditions plus douces, limitant ainsi les réactions secondaires comme la caramélisation.

Le principe de la synthèse enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase, nom abrégé d'une (triacyl glycérol acyle hydrolase) dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, l'activité de la lipase est inversée, passant de l'hydrolyse à l'estérification. La biocatalyse permet d'envisager la production sélective de structures complexes et originales.

Les lipases permettent, en effet, de réaliser une acylation sélective d'un groupement hydroxyle de la molécule de sucre. Par conséquent, la stéréochimie du produit final se trouve complètement contrôlée par la spécificité de l'enzyme. En plus, les lipases sont utilisées dans des conditions très douces de température et de pH. En effet, la synthèse chimique est catalysée par des protons ou des ions hydroxyles en milieu fortement acide ou alcalin tandis que la synthèse enzymatique se fait à un pH proche de la neutralité. Quant à la température, elle est généralement assez faible afin d'éviter la dénaturation de l'enzyme [3].

2.2.3. Comparaison entre la synthèse chimique et la synthèse enzymatique

Tableau. I : Comparaison entre la synthèse chimique et la synthèse enzymatique [3].

Synthèse chimique	Synthèse enzymatique
Avantages	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Économique. ✓ Rapide. ✓ Bons rendements. ✓ Réalisable avec de nombreuses molécules. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sélectivité. ✓ Conditions de réaction douces. ✓ Label "naturel". ✓ Purification aisée. ✓ Conditions "solvent free" possibles. ✓ Composition du produit définie.
Inconvénients	
<ul style="list-style-type: none"> – Toxicité (solvant et catalyseur). – Faible sélectivité. – Température élevée (caramélisation, formation d'artéfacts, cyclisation, etc.). – Composition du produit non définie. 	<ul style="list-style-type: none"> – Coûteuse au niveau industriel. – Problèmes de solubilité des substrats. – Rendements fort variables. – Temps de réaction longs (> 24 h).

Bien que la voie chimique soit appliquée à l'échelle industrielle, elle présente l'inconvénient d'être peu sélective et de mener à la formation d'artéfacts colorés. Il a d'ailleurs été démontré dans de nombreux travaux que les synthèses réalisées par voie enzymatique étaient plus sélectives [3].

2.3. Applications des esters des sucres

Pratiquement toutes les propriétés fonctionnelles des sucroesters et donc leurs applications sont liées à leur caractère tensioactif, lié à leur amphiphile. C'est pourquoi leur classement doit être envisagé en termes d'équilibre entre les tendances hydrophile et hydrophobe. Pour ce faire, une notion s'impose dans le domaine des agents de surface, ou plutôt d'interface : la balance hydrophile/lipophile, plus communément appelée HLB. Ce paramètre représente l'équilibre entre les groupements hydrophiles et lipophiles au sein d'une structure moléculaire. Elle peut être déterminée expérimentalement (sur base de données chromatographiques) ou par calcul (sur base de la formule développée de la molécule). La valeur de HLB d'un sucroester dépend du type de sucre ainsi que du type et du nombre de chaînes grasses (Tableau II). Une valeur comprise entre 1 et 10 indique une tendance lipophile et une valeur comprise entre 11 et 20 indique une tendance hydrophile. Aux valeurs de HLB correspondent des gammes d'applications attendues des molécules (Tableau III). Un point intéressant à noter est que les esters de saccharose sont, avec les esters de sorbitan éthoxylés et les alkylpolyglucosides, les seuls tensioactifs non ioniques à présenter des HLB supérieures à 8 [3].

Tableau II : HLB de quelques esters de sucres [3].

Famille	Formule	HLB
Esters de sorbitan polyéthoxylés		
– Laurate de sorbitan polyéthoxylé	C12	16,7
– Palmitate de sorbitan polyéthoxylé	C16	15,6
– Stéarate de sorbitan polyéthoxylé	C18	14,9
– Tristéarate de sorbitan polyéthoxylé	C18	10,5
Esters de sorbitan		
– Laurate de sorbitan	C12	8,6
– Palmitate de sorbitan	C16	6,7
– Stéarate de sorbitan	C18	4,7
– Trioléate de sorbitan	C18 :1	1,8
Esters de saccharose		
– Caproate de saccharose	C6	14,7
– Caprylate de saccharose	C8	13,8
– Caprate de saccharose	C10	13,2
– Laurate de saccharose	C12	12,4
– Myristate de saccharose	C14	11,6
– Palmitate de saccharose	C16	11,0
– Stéarate de saccharose	C18	10,6
Esters de glucose		
– Caproate de glucose	C6	11,6
– Caprylate de glucose	C8	10,6
– Caprate de glucose	C10	9,8
– Laurate de glucose	C12	8,8
– Myristate de glucose	C14	8,2
– Palmitate de glucose	C16	7,6
– Stéarate de glucose	C18	7,2

Tableau III : Relations entre HLB et propriétés fonctionnelles [3].

HLB	Propriétés
1,5 – 3	Anti moussant
3 – 6	Émulsifiant eau dans huile
7 – 9	Moussant
8 – 13	Émulsifiant huile dans eau
13 – 15	Détergent
15 – 20	Solubilisant

2.3.1. Applications dans le domaine agroalimentaire

Les applications potentielles des esters de sucres sont nombreuses et touchent tant le secteur agroalimentaire que les domaines cosmétiques ou pharmaceutiques. Actuellement, les esters de sucres sont principalement employés en tant qu'agents émulsifiants ou dans la formulation de microémulsions. On peut notamment répertorier les applications suivantes :

- ils permettent de stabiliser l'émulsion des matières grasses lors de la production de biscuits et limitent le phénomène d'adhérence de la pâte.
- dans la formulation de chewing-gums, ils facilitent le mélange initial ainsi que l'émulsification et la dispersion des arômes. Le produit fini est moins collant et plus élastique.
- les sucroesters permettent de réduire la viscosité du chocolat, facilitant son étalement. Ils ralentissent la séparation de phases et la cristallisation du sucre ;
- dans les crèmes glacées, les sucroesters stabilisent l'émulsion, limitant la cohésion des matières grasses lors de la congélation. Ils améliorent le caractère onctueux du produit.
- les esters de sucres préviennent la dénaturation de l'amidon dans les produits congelés et en stabilisent la texture.
- en enrobage des fruits, ils en préservent la fraîcheur et prolongent la durée de stockage [3].

2.3.2. Les applications pharmaceutiques et médicales

Etant donné leur innocuité (ils sont facilement métabolisables et n'entraînent aucune altération des constantes du sang), les sucroesters présentent également un intérêt dans le domaine pharmaceutique :

- Ils entrent dans la composition de crèmes et de gels dans lesquels sont mises à profit leurs propriétés détergentes, antiseptiques et émulsifiantes. Les propriétés tensioactives donnent au produit une meilleure consistance et une plus grande douceur ; les dérivés du saccharose ne provoquent aucune irritation de l'épiderme et peuvent donc être appliqués sans danger.
- Ils permettent par ailleurs une meilleure dispersion des composés Insolubles.

Les sucroesters (et les tensioactifs en général), agissent également en modifiant la perméabilité de l'épiderme, ce qui facilite le passage du principe actif.

- Les sucroesters entrent également dans la composition des médicaments administrés par voie orale comme les comprimés ou les gélules.
- Ils sont utilisés dans l'enrobage ou comme agents lubrifiants lors de la fabrication de produits ayant une forte viscosité. Par ailleurs ils sont incorporés sous forme solide dans les cachets pour améliorer, au niveau du système digestif, la solubilisation, la dispersion et donc l'absorption des molécules actives [12].

Il a également été démontré que des esters de sucres et d'acide valproïque permettent de réduire l'intensité de crises d'épilepsie [3].

2.3.3. Produits cosmétiques

Dans le domaine des cosmétiques comme dans beaucoup d'autres, les sucroesters intéressent les chercheurs tout d'abord en raison de leur innocuité. En effet, ils sont facilement métabolisables, biodégradables, n'induisent pas d'allergies et ne provoquent aucune irritation de la peau ou des yeux. De plus, contrairement à d'autres composés, ils ne détruisent pas les lipides superficiels de la peau et ne perturbent que transitoirement ses constantes, notamment le pH.

Leur neutralité vis-à-vis des tissus constitue un avantage par rapport aux surfactants ioniques auxquels on peut facilement les combiner, ce qui permet de diminuer le caractère agressif de certaines formulations (comme par exemple les shampoings « ne piquant pas les yeux »).

Ainsi ils sont particulièrement indiqués dans la formulation des démaquillants, des produits de soins pour la peau, les lèvres et le contour des yeux, ainsi que dans les produits de soins pour bébés [12].

3. Les enzymes

Les enzymes sont des protéines présentes dans tous les organismes vivants et responsable de la catalyse de différentes réactions chimiques, il existe un nombre très importants d'enzymes et en découvre encore aujourd'hui de nouvelle. Six classes d'enzymes sont répertoriées selon la réaction chimique qu'elles catalysent : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases, et les ligases selon cette classification à chaque enzyme correspond un numéro « enzymes commission».

Une enzyme est spécifique d'un substrat, molécule dont elle catalyse la transformation, à la fin de la réaction l'enzyme se trouve inchangée. Les enzymes sont des catalyseurs efficaces parce que les réactions enzymatiques sont accélérées par rapport aux réactions non enzymatiques d'un facteur 10^8 à 10^{10} [13].

3.1. Les lipases

Les lipases (triacyl glycérol hydrolases EC : 3.1.1.3) sont des sérines hydrolases atypiques [14] de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats qui sont retrouvées aussi bien chez les végétaux, animaux, bactéries Gram+ ou Gram -, et chez les mycètes. Nativement utilisées dans la régulation du métabolisme des triglycérides et lipoprotéines [15]. Le pH et la température optimum pour l'activité enzymatique de la lipase végétale étaient de pH 8,0 et à 30 ° C, avec une lipolyse importante à 80 ° C, soulignant la thermostabilité de l'enzyme [16].

En fonction du micro-environnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycérol. Chez de nombreux êtres vivants, cette réaction est capitale de par son rôle physiologique majeur dans le métabolisme des graisses et des lipides. De plus, certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques. En milieu solvant, elles peuvent catalyser bon nombre de réactions allant de l'estérification à l'acidolyse ou l'alcoololyse tout en présentant une certaine énantio-, régio- et chimio-sélectivité. Les lipases forment une classe d'enzymes hétérogènes de par leur origine, qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes, ce qui augmente encore leurs potentialités. Toutes ces propriétés ont conduit au développement de nombreuses applications aussi bien au point de vue industriel, notamment dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie chimique, qu'en médecine humaine [14].

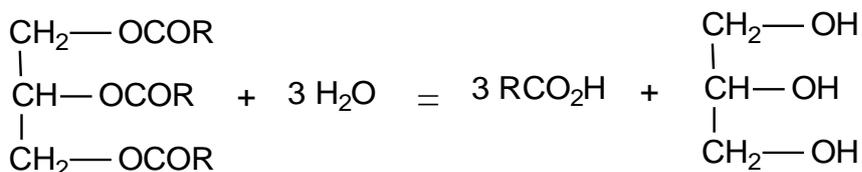


Fig.3 : Equation générale d'hydrolyse [14].

3.2. Origine des lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires [14,17].

3.2.1. Les lipases de mammifères

Les lipides constituent pour les mammifères une source énergétique essentielle et avantageuse de par leur faible densité. Chez l'homme, ainsi que chez d'autres vertébrés, les lipases interviennent dans le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses. Les lipases jouent un rôle important dans la digestion chez le nouveau-né dont l'alimentation est riche en lipides.

Les lipases de mammifères les plus étudiées sont les lipases liées à la digestion des graisses et leur absorption. Il s'agit de la lipase gastrique, de la lipase pancréatique, de la lipoprotéine lipase et de la lipase hépatique [14].

3.2.2. Les lipases microbiennes

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par les bactéries à Gram positif que par des bactéries à Gram négatif [18]; Gram + telles que celles des genres *Bacillus* et *Staphylococcus*, Gram – telles que *Pseudomonas*.

Elles sont également largement répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces*. Bien que les premières lipases étudiées étaient d'origine animale, l'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans des domaines très variés [14].

3.2.3. Les lipases végétales

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante.

Les lipases végétales interviennent également dans Le métabolisme, le réarrangement et la dégradation de la chlorophylle lors de la croissance et de la sénescence des feuilles ainsi que dans le processus de mûrissement des fruits chez les plantes supérieures, les lipases

interviennent dans la biosynthèse de transducteur intervenant dans les mécanismes de régulation ou de défense contre une variété de pathogènes.

D'un point de vue industriel, l'intérêt des lipases végétales n'a cessé de s'accroître depuis quelques années, notamment dans le domaine de la biotransformation de lipides. En effet, les lipases végétales sont facilement isolées à partir de graines et elles présentent des spécificités de substrat atypique comparées aux lipases microbiennes [14].

- **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 font l'objet d'études détaillées dans le but de :

- ❖ Pouvoir mettre en œuvre ces biocatalyseurs pour des applications industrielles à moindre coût. 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 [19].
- ❖ Facile Préparation et d'utilisation car possibilité d'exclusion des étapes de purification et immobilisation.
- ❖ Faible coût des matériels d'obtention car immobilisée naturellement à travers le matériel de leurs grains.
- ❖ Efficaces sous formes immobilisée et non immobilisée, typosélectivité des lipases accepté facilement dans les industries alimentaires et pharmaceutiques [20].

4. Sources des lipases végétales

Les lipases végétales sont généralement disponibles dans la plus part des graines oléagineuses, dans les céréales, dans le latex ou le nectar de certaines plantes [20]. Les oléagineux sont des plantes cultivées spécifiquement pour leurs graines ou leurs fruits riches en matières grasses, dont on extrait de l'huile à usage alimentaire, énergétique ou industriel , les graines oléagineuses sont issues des plantes cultivées spécifiquement pour la production d'huile[21] .

L'identification de nouvelles sources de lipase est parmi le bute des recherche actuelle pour cela nous avons optés à étudier a une liste des graine oléagineuses comme une éventuelle source de biocatalyseurs qui sont exposées ci-dessous.

a. Graines de lin

Le lin cultivé (*Linum usitatissimum*) est une espèce de plantes dicotylédones de la famille des Linaceae, originaire d'Eurasie. C'est une plante herbacée annuelle autogame, largement cultivée pour ses fibres textiles et ses graines oléagineuses [22].

La graine de lin est riche en huile ; celle-ci représente 35 à 50 % de sa masse sèche. L'acide linoléique (oméga 3) peut représenter 55 à 75 % des acides gras qui composent cette huile [23].

b. Graines de Nigelle

Les graines de nigelle sont de forme triangulaires, deviennent noires pendant le mûrissement. Elles mesurent de 2,5 à 3 mm et présentent 3 angles avec une face supérieure finement granuleuse, contiennent 40% d'huile grasse [21].

c. Graines de sésame

Les graines de sésame mesurent quelques millimètres, et leur couleur peut varier du blanc crème au brun jusqu'au noir. Les grains de sésame sont riches en acides gras insaturés et en calcium [21].

d. Graines de Soja

Les graines de soja, sont de forme sphérique ou elliptique, ont un diamètre de 5 à 11 mm et sont comestibles. Leur couleur varie du jaune au noir en passant par le vert, Les graines de soja contiennent de 18 à 21 % d'huile et de 36 à 40 % de protéines [21].

e. Graines de lupin

Les lupins constituent un genre de plantes (*Lupinus*) de la famille des Fabaceae, ou légumineuses, regroupant de très nombreuses espèces. Qui peut atteindre de 30 cm à 1,2 m de haut. Ce sont des espèces annuelles ou vivaces, herbacées ou ligneuses, de l'Ancien et du Nouveau monde. Les lupins ont des feuilles composées palmées. Le nombre de folioles varie de 5 à 11. Les lupins sont des plantes qui ont une forte teneur en protéines (43 %) et contiennent aussi des fibres (25,5 %), des sucres (13,5 %), des matières grasses (12,5 %) et des minéraux (5,5 %) [21].

f. Grains de Fenouil

Espèce originaire de la région subméditerranéenne et subatlantique. Plante à feuilles très finement divisées, au pétiole dont on consomme notamment la base charnue comme légume. La plante peut atteindre 1,50 à 2,50 m de haut, à grosse racine fusiforme et presque toujours bifide et aux graines allongée, arrondie aux deux extrémités de couleur jaune, utilisées comme aromate [21].

g. Graines de Maïs

Le grain de maïs est en fait un caryopse, formé de trois parties d'origines différentes, La grosseur et le poids du grain dépendent de la variété. En moyenne, le poids de 1000 grains oscille entre 200 et 350 grammes, et peut être de 13 à 700 g selon la variété considérée. Le mélange des couleurs entre les différentes couches du grain (albumen, aleurone et péricarpe) donne des couleurs intermédiaires (orangé, rose, marron, vert), riche en Glucide 64,2 g/100g, Protéines 8,66 g/100g, Lipides 3,8 g/100g [21].

h. Graines de moutarde noire

Les graines de moutarde sont riches en mucilage et en lipides insaturés (acide érucique, oléique, linoléique) à maturité, les graines sont brun-noirâtre et ont une saveur très piquante [21].

Chapitre II

Partie Expérimentale

Partie 1

Matériels et méthodes

Nous avons effectué notre travail au niveau des laboratoires de biochimie de la faculté SNV à l'université Akli Mohand Oulhadj de Bouira, dont l'objectif est l'essai de la biosynthèse des esters de sucre en utilisant une source de sucre locale (datte Mech-degla), une source d'acides gras locale (l'huile d'olive) et de différentes graines oléagineuses (source de lipase).

1. Matériel & méthodes

1.1. Matériels

1.1.1. Biomasses végétales étudiées

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 [17,19].

Les extraits végétaux bruts utilisés comme source de lipase pendant la production des esters de sucre et d'acide gras sont issus de huit graines (à l'état dormant ou germé) disponibles sur le marché local de Bouira, ces biomasses sont présentées ci-dessous :

a. Graines de lin

Nom commun : Graines de lin

Nom scientifique : *Linum usitatissimum*

Famille : Linaceae [22].

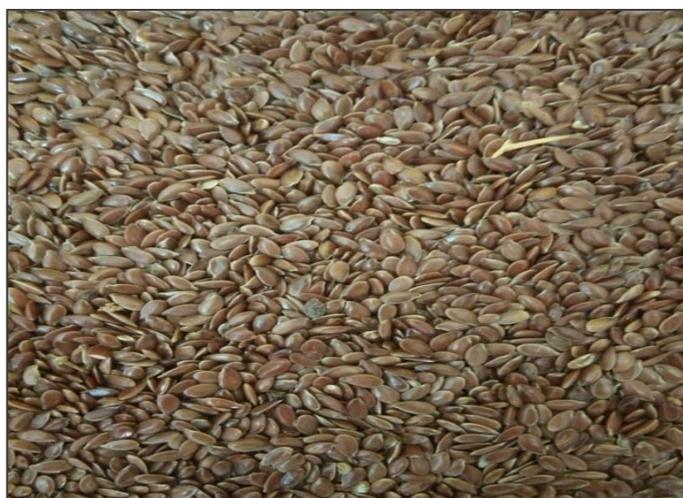


Fig.4 : Graines de lin [originale].

b. Graines de Nigelle

Nom commun : La nigelle

Nom scientifique : *Nigella sativa*

Famille : Ranunculaceae [21].



Fig.5 : Graines de nigelle [originale].

c. Graines de sésame

Nom commun : Graines de sésame (djeldjelain)

Noms scientifiques : *Sesamum indicum*

Famille : Pedaliaceae [21].



Fig.6 : Graines de sésame [originale].

d. Graines de soja

Nom commun : soja, soya

Noms scientifiques : *Glycine max*

Famille : Fabaceae [21].



Fig.7 : Graines de soja [originale].

e. Graines de lupin

Nom commun : lupin blanc

Noms : scientifiques : *Lupinus albus*

Famille : Fabaceae [21].



Fig.8 : Graines de lupin [originale].

f. Grains de Fenouil

Nom commun : fenouil

Noms scientifiques : *Foeniculum vulgare*

Famille : Apiaceae [21].



Fig.9 : Graines de fenouil [originale].

g. Graines de Maïs

Noms communs : maïs, blé d'Inde

Nom scientifique : *Zea mays*

Famille : Poaceae [21].



Fig.10 : Graines de maïs [originale].

h. Graines de moutarde noire

Nom commun : moutarde

Noms scientifiques : *Brassica hirta* ou *alba*, *B. nigra*, *B. juncea*

Famille : crucifères ou Brassicaceae [21].



Fig.11 : Graines de moutarde noire [originale].

1.1.2. Source des acides gras



Fig.12 : L'huile d'olive [24].

La matière grasse de l'huile d'olive est composée de triglycérides. Ceux-ci sont constitués d'acides gras de différentes sortes, dont la répartition est caractéristique de l'huile d'olive, et à un niveau de détail plus poussé, des différentes variétés ou du lieu de production. Lorsque des triglycérides sont dégradés, les acides gras qui les constituaient sont détachés et errent librement dans l'huile : ils sont alors dits « acides gras libres ». Leur pourcentage dans l'huile est ce que l'on appelle « acidité » de l'huile, et s'exprime en « grammes d'acide oléique libre pour 100 grammes d'huile ». Le principale acide gras de l'huile d'olive est l'acide oléique (55-83%), les deux autres acides importants sont l'acide

palmitique (7.5-20%) et l'acide linoléique (2.5-21%) [24]. Les limites de composition en acide gras sont données par le tableau :

Tableau IV : Composition en acides gras d'huile d'olive par chromatographie en phase gazeuse (% acides gras totaux) [25].

Acide gras	Pourcentages
Myristique C14:0	≤0,03
Palmitique C16:0	7,50-20,00
Palmitoléique C16:1	0,30-3,5
Héptadécanoïque C17:0	≤0,30
Héptadécénoïque C17:1	≤0,30
Stéarique C18:0	0,50-5,00
Oléique C18:1 ω9	55,00-83,00
Vaccinique C18:1	-
Linoléique C18:2 ω6	2,50-21,00
Arachidique C20:0	≤0,60
Linoléénique C18:3 ω3	≤1,00
Gadoléique C20:1	≤0,40
Béhénique C22:0	≤0,20
lignocérique C24:0	≤0,20

L'huile d'olive utilisée dans ce travail est une huile vierge (variété ; Chemlal) récoltée en (janvier 2017), et issue de la wilaya de Bouira (Heizar).

1.1.3. Source de sucre

Les dattes sont particulièrement riches en sucres et en éléments minéraux. Les fruits de dattes, y compris les variétés sèches, sont un véritable concentré de calories avec plus de 50% de sucres par rapport à la matière sèche, Compte tenu de sa richesse en sucre, les dattes communes peuvent remplacer le sucre blanc commercialisé (glace ou cristallise) et leur valorisation pourrait représenter une forte valeur ajoutée sur l'impact socio-économique [26].

A ces raisons, notre étude porte une contribution à la valorisation des dattes sèche ; de variété Mech-Degla dont le but de ce travail est :

Valorisation des dattes communes ou peu utilisées dans la préparation de la farine à base de datte Mech-Degla, essai d'incorporation de la farine des dattes dans le domaine de la synthèse des esters des sucres ; utilisée comme source de sucre [26].

Nous avons choisi Mech degla pour les raisons suivantes :

- ❖ Facile à sécher (Datte d'origine sèche) ; faible Teneur en eau (13,7%).
- ❖ une teneur élevée en sucres réducteurs (glucose, fructose) et principalement en saccharose (50.40%) par rapport à la matière sèche.
- ❖ Facile à obtenir en raison de leur faible prix et le manque d'attention, l'exploitation et le manque de consommation par des personnes [26].



Fig.13 : Dattes de variété Mech-Degla [26].

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation de la poudre de datte

a. Processus de séchage des dattes

Les échantillons de dattes de la variété Mech-Degla utilisées sont issus de plusieurs palmiers à partir de la cueillette de l'automne 2016 dans la région de Biskra. Un échantillon est pris au hasard des dattes (Mech- degla), ces derniers sont dénoyautées et coupées en morceaux égaux (Fig 14) [27,28], puis sont étalée en une seule couche sur un plateau métallique perforé recouvert de papier aluminium lui-même perforé et préalablement tarés [28].

Les dattes sont séchées dans une étuve avec ventilation d'air à 55°C jusqu'à obtention d'un poids constant [28].



Fig.14 : Les dattes Mech-degla coupées en petits morceaux [originale].

b. Obtention de la poudre

Après séchage, les dattes sont broyées par un moulin à café, la poudre obtenue est tamisée à travers un tamis en inox de 200 μm de diamètre en vue d'obtenir une poudre de granulométrie plus ou moins homogène. La poudre est ensuite stockée dans des flacons en verre à l'abri de l'humidité [28].

1.2.2. Préparation des extraits végétaux

a. Germination

Les graines sont généralement riches en triacylglycérol, qui sert de source d'énergie compacte pour la nouvelle plante émergente. Pendant la germination de la graine, les triacylglycérol réservés disparaissent, puisque les acides gras ne peuvent pas être oxydés pour fournir de l'énergie jusqu'à ce qu'ils soient libérés de la triacylglycérol. Les lipases sont contrôlées pendant la germination et l'activité de la lipase est élevée pendant la germination [17].

Cinquante grammes (50g) de chaque variété de graines sont mises à germer sur un plateau recouvert de papier buvard ou du coton, imbibé d'eau à fin de faciliter la germination. Les grains sont étendus uniformément et recouverts avec une deuxième couche de coton. L'humidification se fait quotidiennement et la germination est réalisée pendant 03 à 08 jours à température ambiante (25°C) [17].

b. Séchage et broyage de la biomasse végétale étudiée

Le séchage assure un bon stockage, une excellente délipidation et surtout pour assurer un milieu non aqueux favorisant l'estérification au lieu de l'hydrolyse [20]. Dans ce but, un séchage doux est réalisé pour les seize échantillons issus des graines à l'état dormants et germés dans une étuve ventilée (model venticelle), à une température de 40°C afin d'éviter la dénaturation des lipases [17].

Les deux variétés des graines (soja, lupin blanc), vu leurs taille moyenne, sont décortiquées. Les autres de petite taille sont séchées entièrement. Après le premier séchage les graines sont broyées à l'aide d'un moulin à café, pour que la délipidation soit efficace, la teneur en eau dans les extraits séchés doit être comprise entre 5 et 8 % [19]. Les poudres de graines sont pesées et passés à l'étuve une deuxième fois. Le poids des échantillons est contrôlé chaque deux heures jusqu'à obtention d'un poids constant. Les poudres obtenues sont ensuite tamisées à travers un tamis en inox de diamètre 200 µm et stockés dans des flacons en verre.

c. Délipidation

Pour un screening plus fiable pour l'activité enzymatique il faut s'assurer que le seul substrat disponible pour les lipases contenues dans les extraits végétaux bruts est notre huile d'olive pour cela, il était indispensable de réaliser une dilapidation par un solvant organique à fin d'éliminer la fraction lipidique existante dans les extraits bruts [19].

Plusieurs solvants peuvent être utilisés pour délipidée des extraits végétaux, les plus efficaces sont l'éther diéthylique, l'acétone et le n-hexane [19].

30g de chaque poudre de graines oléagineuse étudiés sont broyée dans un mortier avec 30 ml d'acétone froid, le mélange est filtré à travers un papier filtre de 100 µm de diamètre ensuite lavé quatre fois en moyenne avec 20ml d'acétone à chaque fois jusqu'à ce que l'acétone de lavage devient claire, le résidu a été séché à l'air à température ambiante ($26 \pm 1 \text{ } ^\circ \text{C}$) sous la hôte pour évaporer l'acétone, la poudre est stockée dans des flacons en verre et enrobées par papier aluminium ensuite stockée à 4°C [16, 29].

d. Screening de l'activité lipasique des extraits végétaux de la biomasse étudié

L'activité catalytique des lipases sous forme d'extraits végétaux brutes issus de 8 graines (l'état dormant et germé) a été testée en hydrolyse de l'huile d'olive en milieu aqueux.

Le mélange réactionnel est composé de : 5 g d'huile d'olive (substrat), 2,5 ml d'hexane à fin de le solubiliser l'huile et 1 g de l'enzyme brute (poudre de graine à tester). Le mélange a été incubé à 30 ° C pendant 1 h sous agitation continue. Un témoin négatif « blanc » d'hydrolyse est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions de réaction mais en absence d'enzyme [16].

La réaction est arrêtée par l'addition de 25 ml d'éthanol-acétone (1: 1; v / v) pour éliminer l'étape de l'extraction des acides gras libres libérés. Le dosage de l'activité hydrolytique a été réalisé par méthode de titrage colorimétrique [16].

➤ **Titration colorimétrique**

Un dosage colorimétrique est un type de dosage qui consiste à déterminer la concentration d'une espèce chimique en solution à l'aide d'une transformation chimique. Un titrage est dit colorimétrique si l'équivalence est repérée grâce à un changement de couleur.

Les acides gras libérés par l'hydrolyse sont titrés comme suit :

- prendre 5 g de la solution d'hydrolysée (mélange réactionnel ; solution titrer).
- Verser ce volume dans un bécher ou un erlenmeyer.
- Ajouter 20 ml de l'indicateur coloré (phénolphtaléine 1%).
- Ajouter le barreau magnétique sans faire de projection Remplir la burette avec le réactif titrant (NaOH 0.1 N).
- Déposer un papier blanc sur l'agitateur magnétique.
- Placer le bécher préparé précédemment sur l'agitateur magnétique puis mettre l'agitation en route.
- Verser rapidement la solution titrante jusqu'au changement de couleur. (Rose persistante) [30].

Les principales étapes est illustré dans la figure ci-dessous (fig 15) :

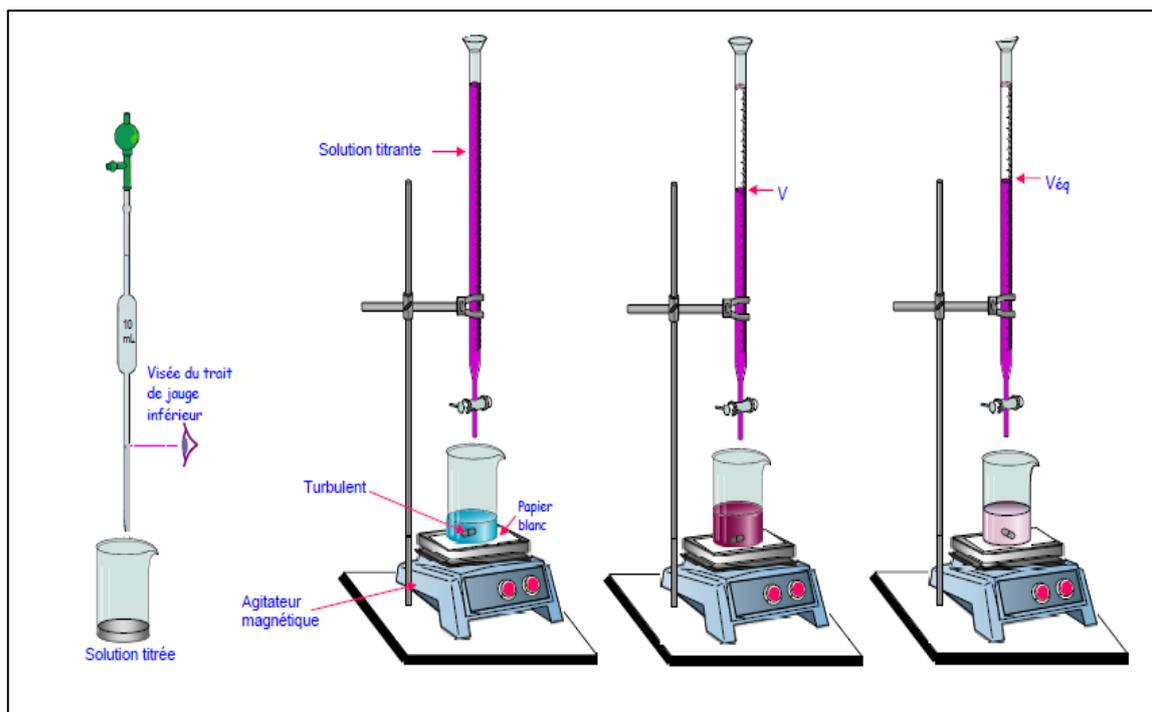


Fig.15 : Les principales étapes de titrage colorimétrique [30].

1.2.3. Synthèse enzymatique des ester de sucre et d'acide gras

La synthèse enzymatique des ester de sucre et d'acide gras d'huile d'olive est réalisée par les extraits enzymatiques les plus actifs en teste d'hydrolyse, on ajoute pour une ration de 1/5 (v/v) poudre de datte huile d'olive, on ajoute 2g d'extrait enzymatique, le mélange est mis sous agitation magnétique 72 heure à température ambiante, un contrôle est réalisé par la même procédure sans l'incorporation de l'enzyme **[originale]**.

1.2.4. Méthodes de dosage et d'analyse des esters de sucres

a. Dosage des esters des sucres par la méthode volumétrique

La teneur en esters de sucre des extraits végétaux est évaluée par le calcul de la quantité d'acide gras résiduel dans le mélange réactionnel, par la méthode volumétrique. En bref ; 0,1g d'échantillon de la réaction d'estérification a été dilué dans 20 ml de solution de phénolphtaléine (0,1% préparé dans l'éthanol absolu). Le mélange est titré avec la solution d'hydroxyde sodium (0.1 N) [31]. Le rendement est calculé à l'aide des équations suivantes :

$$\frac{V(\text{échantillon})\text{ml} \times 0.1}{P(\text{échantillon})\text{g}} = X \dots (1)$$

$$\frac{V(\text{blanc})\text{ml} \times 0.1}{P(\text{blanc})\text{g}} = Y \dots (2)$$

$$\text{Rendement (\%)} = 100 - \left(\frac{(1)}{(2)} \times 100 \right) \quad [31].$$

V : volume d'hydroxyde de sodium (NaOH) en ml.

P : poids en gramme.

b. Méthodes d'analyse par chromatographie sur couche mince

➤ Principe

La chromatographie d'adsorption sur une couche mince permet d'analyser l'avancement d'une réaction. Il existe plusieurs plaques CCM ; c'est un support solide déposé sur une grande surface plane (Aluminium, verre, plastique) de façon homogène, mais pour usage analytique régulier on utilise plutôt des plaques commerciales : gel de silice 60 sur plaque d'aluminium [32].

Lors de découpage des plaques, il faut couper les angles et raboter légèrement les côtés pour ne pas avoir l'effet de bord. La hauteur doit être suffisante pour avoir une bonne migration, environ 6 cm [32].

➤ Le choix de systèmes d'élutions

On utilise généralement des mélanges de solvants, de polarité voisine de celle des solutés à séparer (ceux-ci doivent être solubles dans l'éluant). On classe les différents solvants selon leur "force éluant" qui traduit leur polarité. Selon la nature des composés à séparer, on choisit des solvants de force éluant appropriée ; c'est rarement un solvant pur, mais en fait un mélange de 2 à 4 solvants, optimisé par tests successifs vis-à-vis des composés étudiés, sans que cela obéisse à des règles permettant de prédire les résultats, dans un système d'élution composé d'un mélange de réactif on doit tenir compte de la miscibilité de solvant et leur polarité [33]; dans la table suivante nous informons sur ce paramètre :

		TABLE DE MISCIBILITE DES SOLVANTS																		
		<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 15px; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></div> Miscible </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: black; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></div> Non-miscible </div>																		
acide acétique																				
acétone																				
acétonitrile																				
benzène																				
n-butanol																				
chloroforme																				
cyclohexane																				
dichlorométhane																				
DMSO																				
eau																				
éthanol																				
éthyle acétate																				
éther éthylique																				
hexane																				
iso-octane																				
méthanol																				
2-propanol																				
	acide acétique	acétone	acétonitrile	benzène	n-butanol	chloroforme	cyclohexane	dichlorométhane	DMSO	eau	éthanol	éther éthylique	éthyle acétate	hexane	iso-octane	méthanol	2-propanol			

Fig.16 : Table de miscibilité des solvants [32].

Selon la littérature la synthèse enzymatique des ester des sucre est réalisé par des sucre pures (glucose , lactose , fructose ,saccharose) alors que la source de sucre utilisée dans ce travail est un mélange de sucre (glucose fructose et saccharose) c'est ce qui n'a pas été effectué auparavant ainsi dans le but de mettre au point un system élution qui révèle tous les composés qui peuvent être retrouvés dans le mélange réactionnel on a réalisés plusieurs essais des systèmes d'élution utilisé dans les différents travaux sur les esters de sucre .

1. Le premier système d'élution utilisé est une adaptation de la littérature sur la synthèse des ester de fructose et de glucose, l'éluant est un mélange des solvants de polarité différente (Chloroforme / méthanol /eau v/v/v/v, 85/13.5/1.5/) [33].
2. Le deuxième système d'élution est composé de (hexane /éther diéthylique/acide acétique, v/v/v) dans les proportions suivantes (70/30/1) [34].
3. Le troisième système contient un même volume de l'hexane et l'acétone.
4. Un quatrième essai est réalisé selon le travail de Gilles Olive [33] sur les ester de fructose dans lequel est réalisé une triple élutions pour la même plaque CCM, cela

consiste en une première élution de 2,7 cm par du chloroforme/méthanol/eau (85/13,5/1,5, v/v/v) suivie d'un séchage de la plaque. Un deuxième développement de 5,2 cm est réalisé par un mélange de (chloroforme/méthanol/acide acétique 98,5/1,5/1, v/v/v). La plaque est à nouveau séchée puis éluee une dernière fois par un mélange de *n*-hexane/ éther diéthylique/acide acétique (70/30/1, v/v/v) sur une hauteur de 9 cm [33].

➤ **Le TWEEN**

Pour une meilleure identification par CCM il est nécessaire d'utiliser un témoin positif qui ne peut être qu'un ester de sucre. Parmi les sucroesters disponibles dans le commerce, on retrouve les esters de saccharose et également les esters de sorbitan, mieux connus sous les appellations commerciales Tween [3]. Les esters de sorbitan sont préparés par estérification du sorbitol avec des acides gras en conditions acides. L'éther cyclique est obtenu après déshydratation du sorbitol sous l'influence de la chaleur ou des acides. La production annuelle des esters de sorbitan est supérieure à 10 000 tonnes. Ces produits sont connus sous le nom de SPAN et sont couramment utilisés comme émulsifiants dans l'agroalimentaire, la cosmétique et dans les produits pharmaceutiques. On augmente la solubilité des SPAN dans l'eau en y greffant des polyoxy ethylene sur la partie sorbitan. Ces produits sont connus sous le nom de TWEEN® et ont des applications dans les mêmes domaines que les SPAN [2].

➤ **Révélation**

1) Avec l'iode : On place la plaque sèche dans une enceinte renfermant des vapeurs d'iode. Dans un bécher contenant des cristaux d'iode, les produits forment des taches brunes. L'iode peut être éliminé de la plaque en la chauffant légèrement au pistolet thermique. Il est alors possible d'effectuer une autre teste coloré [32].

2) Acide sulfurique : Acide sulfurique est un réactif universel des composés organiques cette technique permet de carboniser tous les composés organiques [32], la révélation ayant été réalisée par pulvérisation d'acide sulfurique à 50 % puis chauffage à 105 °C [33].

➤ **Le rapport frontal**

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur ; caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (fig 17) ; $R_f = \frac{\text{hauteur de la tache}}{\text{hauteur du front du solvant}}$ = valeur entre 0 et 1 [32].

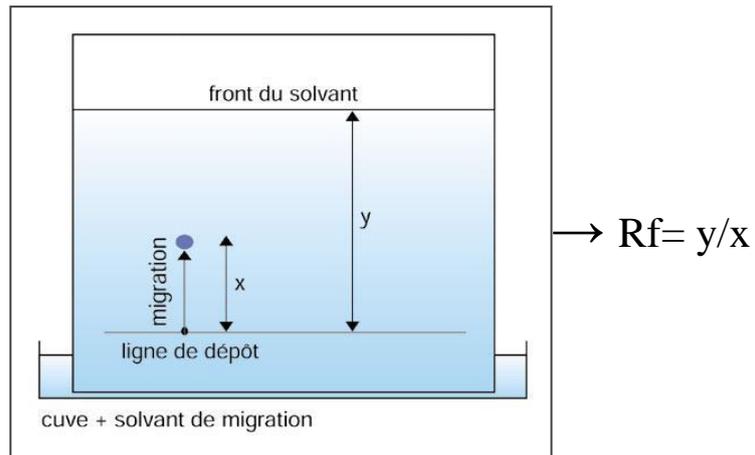


Fig.17 : Détermination de rapport frontale [32].

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même R_f [32]).

Partie 2

Résultats et discussion

2. Résultats & discussions

2.1. Le séchage des dattes

Le séchage des dattes est une étape importante qui a comme but de ramener la teneur en eau au taux de stabilisation. La teneur en eau après séchage doit être inférieure ou égale à 5%, valeur généralement exigée pour les poudres de fruits [35].

Les dattes sont séchées jusqu'au poids constant, pendant environ (59 h) à 55°C. Ces conditions de séchage permettent d'obtenir une poudre apte au broyage [28].

➤ Obtention de la poudre de datte

Parmi les variétés algériennes qui convenaient mieux pour la production de la farine (poudre de fruits), la variété Mech-Degla. Les farines de dattes peuvent être produites uniquement à partir des variétés sèches ou susceptible d'être après dessiccation jusqu'à une humidité de 5% [26].

Les morceaux de dattes séchés sont ensuite broyés pour augmenter la surface de contact avec les extraits enzymatiques. La poudre obtenue (fig 18) est tamisée en utilisant un tamis de 200 µm de diamètre afin d'avoir une poudre de datte à granulométrie homogène.



Fig.18 :Aspect de la poudre de Mech-degla[originale].

2.2. Développement de germination

La germination des graines est aboutie entre trois et huit jour (selon la variété), le (tableau V), indique le temps de germination pour chaque variété.

Tableau V : Durée de germination des graines étudiées.

Graines	Nigelle	Fenouille	Lupin	Graine de lin	Sésame	Soja	Maïs	Moutarde
Durée de germination (jours)	7	8	3	4	3	5	4	3

La différence de temps de germination entre les différentes graines est due à:

- La teneur en eau de la graine augmente et doit atteindre une valeur-seuil pour que la graine puisse germer. Cette teneur dépend des espèces considérées.
- La variation de teneur en oxygène affecte la germination des différentes espèces.
- Le déroulement des processus menant à la germination est fortement dépendant de la température,
- La masse et la taille des graines varient très largement à la fois entre espèces et à l'intérieur d'une espèce (masse des réserves et taille de l'embryon) [36].
- Les constituants des réserves des graines ont démontré que les graines à teneur totale élevée en lipides ont une germination plus lente en particulier, une teneur importante en sucres solubles, rapidement disponibles, serait un critère favorable à une germination rapide [17,36].

2.3. Activité hydrolytique des extraits lipasique étudiés

Le screening est réalisé dans le but d'enquêter sur l'activité des lipases dans les extraits brutes issus de la biomasse étudié, qui est explorées comme une éventuelle source de lipase. Les teste d'hydrolyse est effectué sur les huit graines oléagineuses dormantes et leurs germinatives on utilisant l'huile d'olive comme substrat des lipases.

L'hydrolyse est l'une des fonctions biologiques des lipases ce qui a permis de faire un criblage donc d'écarter les extraits enzymatique dont l'activité hydrolytique est faible à moyenne et de sélectionner les extraits enzymatiques qui possèdent une activité hydrolytique élevée à fin de les utiliser par suite pour la synthèse enzymatique des esters des sucres et d'acide gras [19].

L'activité hydrolytique est mesurée par titrage des acides gras libérés dans le milieu réactionnel on utilisant NaOH (0,1N) comme solution titrante et la phénolphtaléine comme indicateur coloré. À l'équilibre le taux d'AGL est proportionnel au volume de NaOH consommé, c'est ce qui nous permet d'évaluer l'activité hydrolytique [16].

Le (tableau VI), résume les résultats obtenus ainsi que une évaluation de l'activité hydrolytique des extraits végétaux bruts :

Tableau VI : Evaluation de l'activité hydrolytique d'extraits végétaux :

Extraits végétaux		Volume NaOH consommée (ml)	Résultats du test d'hydrolyse
Graine de lin	dormante	1,625	++
	Germée	1,450	+
Nigelle	dormante	2,050	+++
	Germée	3,150	++++
Moutarde	dormante	1,800	++
	Germée	2,050	+++
Sésame	dormante	1,700	++
	Germée	1,900	++
Fenouil	dormante	1,750	++
	Germée	1,775	++
Lupin	dormante	1,450	+
	Germée	1,600	++
Soja	dormante	1,475	+
	Germée	1,500	+
Mais	dormante	1,450	+
	Germée	1,575	+
Huile d'olive*		1,325	-

-: pas d'AGL;

+ : présence d'AGL en faible quantité ;

++ : Présence d'AGL en moyenne quantité ;

+++ : Présence d'AGL en forte quantité ;

++++ : Présence d'AGL en très forte quantité ;

(*) Témoin réalisé sans biocatalyseur.

D'après le (tableau VI) tous les extraits bruts des graines dormantes et germées ont montré une activité hydrolytique plus au moins forte, cela met en évidence l'existence d'une ou plusieurs enzymes capables de catalyser la rupture de liaisons esters présentés sur les TAG de l'huile d'olive [19]. Afin de faciliter la comparaison les résultats du tableau sont représentés dans le diagramme ci-dessous (fig 19) ce qui va permettre de visualiser la différence.

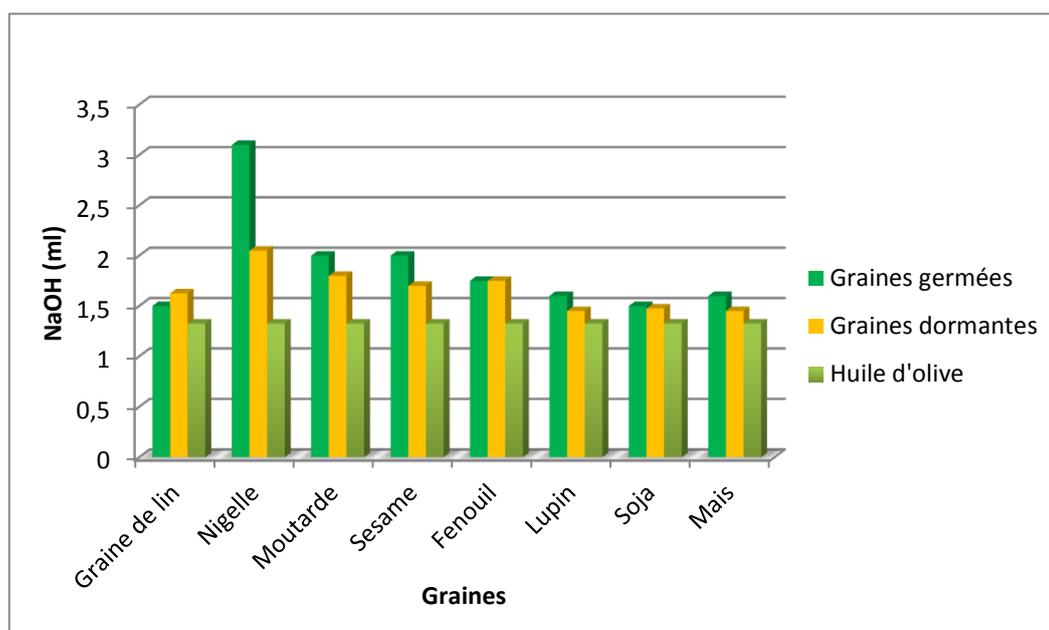


Fig.19 : Les résultats du test hydrolytique des extraits végétaux (à l'état germé et dormant).

La (fig 19) montre que les grains de nigelle présentent une très forte activité hydrolytique suivi par : les graines de sésame et de moutarde noir avec une forte activité, moyenne pour le grain de fenouil et la graine de lin et en fin on remarque une faible activité pour le grain de lupin, soja et le maïs.

La comparaison des résultats montre aussi l'activité élevée dans les germinatives par rapport au dormantes cela est liée au stade physiologique et métabolique de la cellule car dès l'imbibition de la graine se déclenche des modifications hormonales, qui vont aboutir à des réactivations enzymatiques permettant le début de mobilisation des réserves[36], Sous l'action de lipase ces réserves stockées sous forme de triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante [17,36].

La différence de l'activité hydrolytique des différents extraits étudiés est due à la différence du pouvoir sélectif des extraits vis-à-vis les différents acides gras de l'huile étudiée [17].

Selon les résultats obtenus dans le teste d'hydrolyse quatre extraits ont été sélectionnés vu leurs forte activité. Il s'agit des extraits obtenus à partir de:

- ✓ de graines de Nigelle germées,
- ✓ de graines de Moutarde germées,
- ✓ de graines Sésame germées,
- ✓ de graines de Fenouil germées,

Ces quatre extraits enzymatiques riches en lipases vont faire l'objet de synthèse enzymatique des esters de sucre et d'acides gras sachant que l'hydrolyse et l'estérification sont deux fonctions biologiques des lipases [14].

2.4. Synthèse enzymatique des esters de sucre

2.4.1. Quantification des esters de sucre par neutralisation des acides gras libérés

Dans un premier temps, la synthèse enzymatique des esters de sucre est évaluée par la neutralisation des acides gras libérés. D'après les résultats trouvés dans le screening de l'activité hydrolytique, quatre extraits bruts ont été sélectionnés pour effectuer l'estérification (sésame germé, fenouil germé, moutarde germé, nigelle germé). Les résultats obtenus sont représentés par la (fig 20):

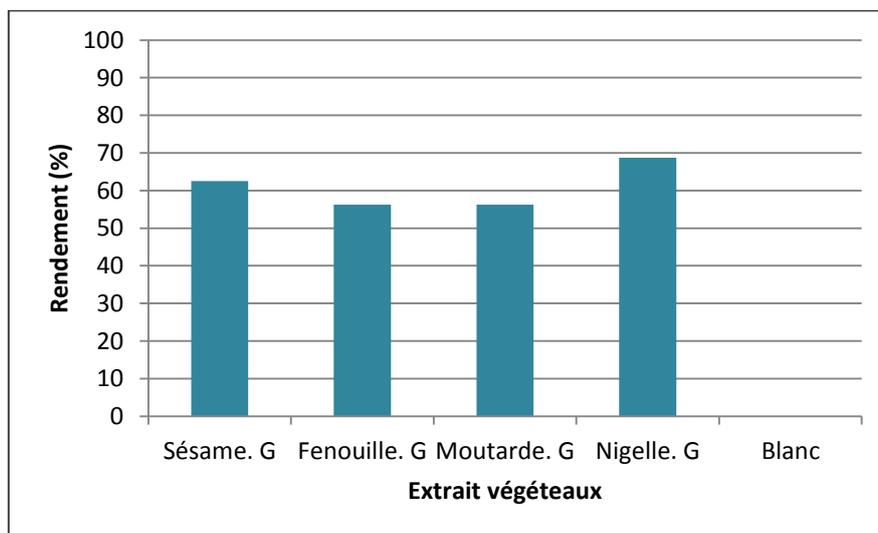


Fig.20 : Rendement d'estérification des extraits végétaux (%).

Après 72h, le taux d'estérification le plus élevé a été obtenu à partir de l'extrait brut de nigelle germé (68,75%) suivi par le sésame avec 62,5% et finalement les extraits de fenouil et de moutarde avec le même rendement de 56,25%. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats du test hydrolytique. Pour confirmer plus nous résultat on a essayés de les comparé avec d'autre travaux mais selon la recherche bibliographique aucun travail n'a était fait sur les biocatalyseurs et les substrats exploités dans notre étude ce qui confirme d'autre part l'originalité de nous résultats.

2.4.2. Etude des esters synthétisés par chromatographie sur couche mince

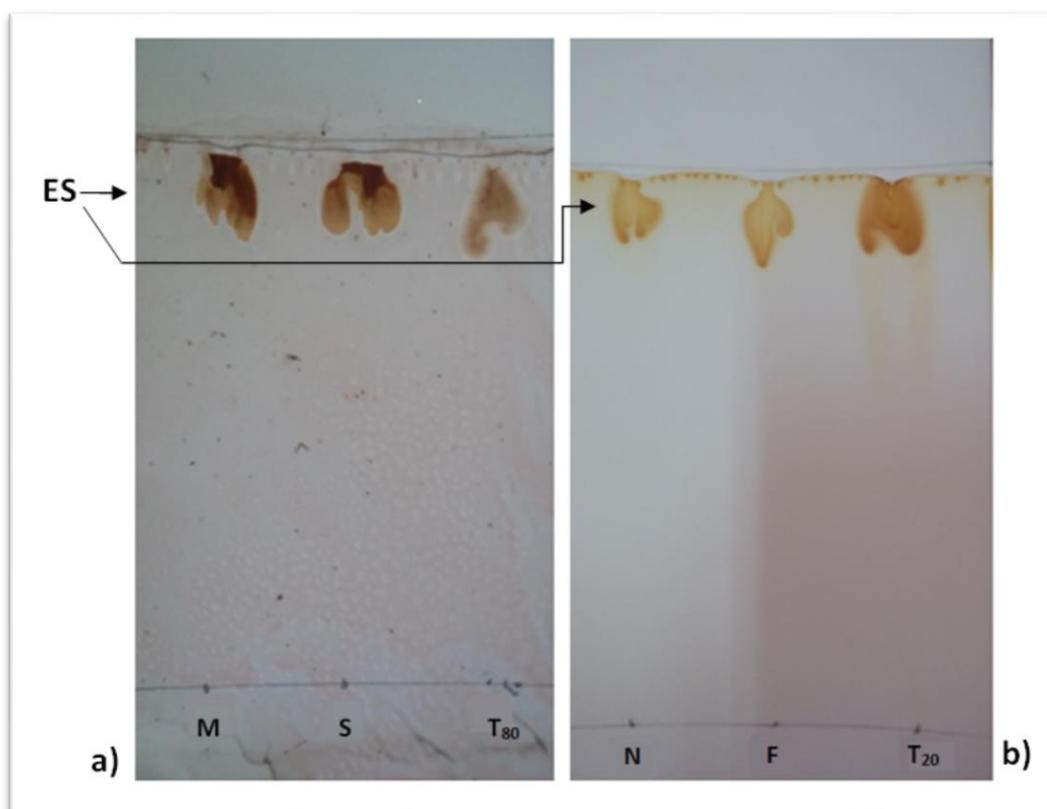


Fig.21: Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après de la réaction d'estérification catalysée par des extraits germés de moutarde, sésame, nigelle et de fenouil. **Éluant :** chloroforme/méthanol/eau/ (85/13.5/1.5). **ES :** Esters de sucre. **M :** extrait de Motarde germé. **S :** extrait de sésame germé. **N :** extrait de nigelle germé. **F :** extrait de fenouil germé. **T₈₀, T₂₀ :** tween (témoin Positif). **Système révélateur :** **a)**Acide sulfurique à 50 % puis chauffage à 105 °C, **b)** cristaux d'iode.

Les différents produit réactionnelles sont séparés dans deux plaque CCM (fig 21)avec le Tween 20 et tween 80 (esters de sucre) comme témoins positif , l'ensemble est élué par un mélange de solvant (chloroforme/méthanol /eau ; 85/13.5/1.5) ,avec deux révélations ; l'iode (a),et l'acide sulfurique (b) .

Dans les deux plaques on observe clairement des spots ou des tache foncées de la même forme et qu'ont le même niveau de migration, ces spots représente les quatre échantillons et le tween ; ce qui met en évidence la présence des esters de sucre dans les produit réactionnels issus d'une estérification enzymatique.

D'autre part La migration des constituants au même niveau et avec un rapport frontal $FR=0,9$ indique que le system d'éluion est très polaire et ne permet pas la séparation de tous les composés qui peuvent être existé dans le mélange réactionnel (AGL, TG...) pour cela d'autre système ont été testé.

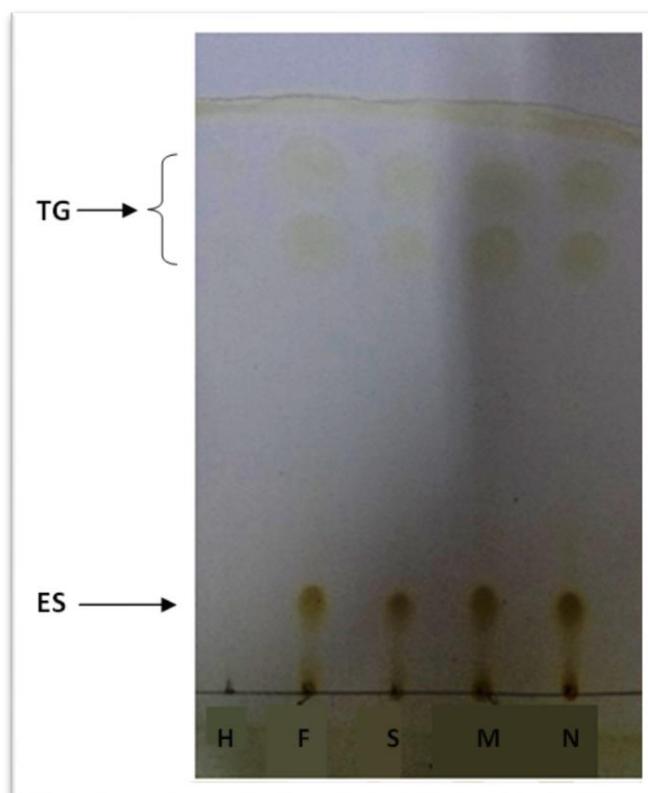


Fig.22 : Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après de la réaction d'estérification catalysée par des extraits germés de : Fenouil, sésame, Motarde et de Nigelle germé

Éluant: Hexane/éther diéthylique/acide acétique (70/30/1). **ES:** Esters de sucre. **H:** témoin négatif (huile/datte). **F:** extrait de Fenouil germé. **S:** extrait de sésame germé. **M:** extrait de Motarde germé. **N:** extrait de Nigelle germé. **T₈₀:** Tween 80(témoin positif). **Système révélateur:** cristaux de l'iode

Dans ce système d'élution dont le mélange de solvant est : l'éther diéthylique/ hexane/ acétone (30/70/1), et une révélation avec l'iode et un témoin négatif ; blanc de réaction. On remarque une bonne séparation du produit réactionnel traduite par plusieurs taches bien définies pour chaque échantillon.

Pour les quatre extraits une tache plus foncé que les autre et qui migre avec un même $RF=0,26$ ce spot est absent dans le blanc cela indique qu'il représente un produit réactionnel synthétisé par la lipase et que ne peut être qu'un ester de sucre. Un RF de $0,26$ indique que le mélange de solvant utilisé est peu polaire par rapport au composé a élué ce que nous a poussé a procédé avec un autre système. D'autre spots qui révèlent d'autres constituants qui migrent plus loin que les esters synthétisé avec $RF=0.8$ et 0.9 , ces taches existent l'un dans le blanc de réaction (H), ce qui montre que ces constituants doivent être des triglycérides, diglycéride ou monoglycéride.

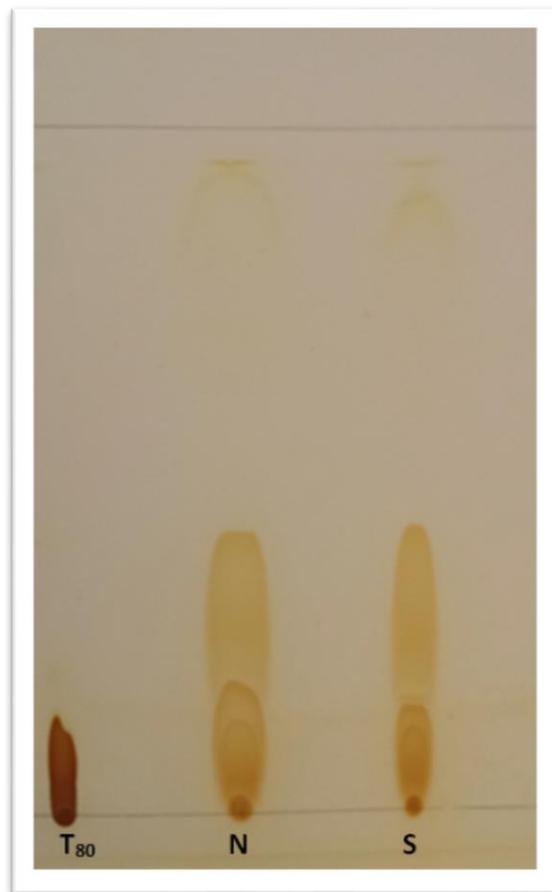


Fig.23 : Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après de la réaction d'estérification catalysée par des extraits de nigelle germée et sésame germée.

Éluant : acétone/hexane (50/50). **ES** : Esters de sucre. **T₈₀** : Tween 80(témoin positif). **N** : extrait de Nigelle germé. **S** : extrait de sésame germé. **Système révélateur** : cristaux de l'iode.

Une combinaison d'acétone /hexane par les mêmes proportions fait l'objet d'un autre système d'éluant (fig 23) et dont on a pas eu une bonne migration avec $FR = 0,22$ qui indique que ce système a une polarité insuffisante pour séparer les constituants de milieu, on remarque que le spot qui représente le tween témoin migre de la même façon et au même niveau que deux spots des échantillons cela montre que sont les mêmes substances et mis en évidence une autre fois les esters de sucre.

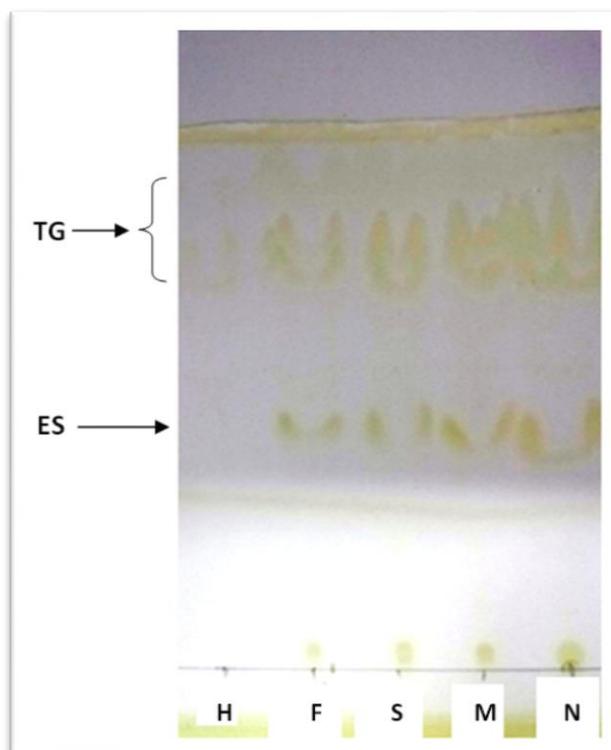


Fig.24 : Analyse CCM de la composition des milieux réactionnels après de la réaction d'estérification catalysée par des extraits germés de : Fenouil, sésame, Motarde et de Nigelle.

Éluant :1) migration de 2.7cm par : chloroforme/méthanol/eau/ (85/13.5/1.5).**2)** migration de 5.2cm par : Chloroforme/méthanol/acide acétique (98.5/1.5/1).**3)** migration 9cm par : n-hexane/éther diéthylique/acide acétique (70/30/1). **ES** : Esters de sucre. **TG** : triglycéride. **F** : extrait de Fenouil germé. **S** : extrait de sésame germé. **M** : extrait de Motarde germé. **N** : extrait de Nigelle germé. **Système révélateur** : cristaux de l'iode.

Un système d'une triple élution développée par Nair et al [31], offrent une amélioration remarquable dans la séparation des constituants, on observe sur la plaque CCM (fig 24), après révélation par les cristaux d'iode des spots qui sont présent dans les quatre extraits végétaux bruts ,et absent dans le blanc de réaction (huile / sucre) et qui ont $RF=0.5$.

Nair et al [31], ont obtenu le même RF (0,5) pour les esters de sucre synthétisé (ester de fructose). La (fig 24) montre aussi l'existence, au même niveau de migration, deux spots voisins. Cela peut être expliqué par l'existence de deux types d'esters synthétisés par deux sucres différents et d'acide gras.

Conclusion

Conclusion

Ce travail a contribué à mettre en évidence l'activité lipasique aussi bien en hydrolyse qu'en estérification des extraits bruts issus de huit variétés de graines oléagineuses. Les graines les plus actives en hydrolyse (nigelle, sésame, moutarde et fenouil) ont été sélectionnées comme biocatalyseur de la réaction d'estérification en présence de la poudre de dattes comme source de sucre (fonction alcool) et de l'huile d'olive comme source d'acide gras.

Une analyse qualitative (CCM) a été effectuée pour démontrer la synthèse des sucroester en essayant plusieurs systèmes d'élution retrouvés dans la littérature. Une triple élution était nécessaire pour monter les spots d'ester de sucre à $RF=0,5$.

Les résultats trouvés ont montré que les extraits de graines germées renferment une ou plusieurs lipases dont l'activité catalytique peut être exploitée sans purification préalable pour l'hydrolyse et pour l'estérification des huiles végétales et du sucre de dattes.

La biomasse végétale étudiée représente une éventuelle source potentielle de biocatalyseurs peu chères, très abondantes et facilement exploitables ce qui va permettre la production d'un nouveau tensioactif (ester de sucre) naturel et tolérant pour les consommateurs et l'environnement à la fois.

Malgré les avantages de la voie enzymatique reste un défi de convaincre les industriels par les propriétés biotechnologique intéressante à fin de substituer la voie chimique par cette voie. 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 optimales de la réaction d'estérification ainsi que l'hydrolyse tel que l'étude de la cinétique d'hydrolyse des différents extraits, l'influence d'utilisation des tamis moléculaires, l'effet des biosolvants et des substrats sur le rendement de la réaction.

Références bibliographiques

- [1]NETO, Virginie. *Nouvelles méthodes d'élaboration de tensioactifs glycosylés par métathèse croisée et cycloaddition 1,3-dipolaire*. Thèse de doctorat, Chimie Appliquée – Chimie des Substances Naturelles. Université de Limoges : École doctorale science-technologie-santé, 2007,244p.
- [2]EPOUNE LINGOME, Cédric. *Nouveaux agrotensioactifs glycolipidiques: synthèse, propriétés physico-chimiques et application en polymérisation*. Thèse de doctorat, Chimie. Lyon : l'institut national des sciences appliquées, 2011,289p.
- [3]PICCICUTO, Salvator; BLECKER, Christophe; BROHÉE, Jean-Christophe *et al.* Les esters de sucres: voies de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*2001, vol.5, n°4, pp.209-219
- [4]VANDEPUTTE, Jacky. Les agro-tensioactifs. *Lipochimie*, 2012, vol.12, n°2, pp. 133-137.
- [5]LUDOT, Camille. *Développement de méthodologies de synthèse de tensioactifs glycosidiques à partir de biomasse lignocellulosique*.Thèse de doctorat, Chimie organique. Reims : l'université de Reims Champagne-Ardenne, 2013,248p.
- [6]ESTRADA, Del Campo. *Écoulements de mousse pour la dépollution d'aquifères*. Thèse de doctorat, Mécanique. Bordeaux : Ecole doctorale des sciences physiques et de l'ingénieur, 2014,2013p.
- [7]ORNEK, Haydar. *Synthèse de particules et incorporation dans un revêtement en vue d'améliorer ses propriétés lubrifiantes*. Thèse de doctorat, Chimie-physique. Franche-Comté : l'Université de Franche-Comté, UFR Sciences et Techniques, 2014,217p.
- [8]NOIRET, Nicolas ; BENVENU, Thierry ; PLUSQUELLEC, Daniel. Tensioactifs à base de substances renouvelables. *L'actualité chimique*, 2002, pp.070-075.
- [9]RONDEL, Caroline. *Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives*. Thèse de doctorat, Sciences des agroressources. Toulouse : l'Institut national polytechnique de Toulouse, 2009,248p.
- [10]WERTZ, Jean Luc. *Aperçu sur les biotensioactifs et les biosolvants*.1^{ère} éd. Wallonne : ValBiom – Gembloux Agro-Bio Tech, 2012,22p.
- [11]HELLAL, Djamila. *Optimisation de la réactivité dans la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose*. Mémoire de Magister, Chimie organique. Badji Mokhtar Annaba: Faculté des Sciences, Département de Chimie, 2011,79p.
- [12]CECCHIN, Mireille. *Domaines d'application des sucroesters et sucroglycérides*. Rapport de recherche, Lyon : DESS ingénierie documentaire-Enssib, 2001,87p.

- [13]BOUKERCHE, Toufik Taalibi. *synthèse de nouvelles molécules tensioactives non ionique par voie enzymatique*. Mémoire de magister, Chimie organique. Oran Es-Senia : Faculté des Sciences, Département de Chimie, 2007,140p.
- [14]FICKERS, Patrick ; DESTAIN, Jacqueline ; THONART, Philippe. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 2008, vol.12, n°2, pp. 119-130.
- [15]ROUILLARD, Hervé. *Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde*. Thèse de doctorat, Chimie organique. La Rochelle : École doctorale sciences pour l'environnement Gay Lussac, 2012,289p.
- [16]ENUJIUGHA, Victor. Isolation and preliminary characterization of conophor nut (Tetracarpidium conophorum) lipase. *African Journal of Biochemistry Research*, 2009, Vol.3, n°2, pp. 009-012.
- [17]GADGE, P.P ; MADHIKAR, S.D; YEWLE, J.N, *et al*. Biochemical studies of lipase from Germinating oil seeds (Glycine max). *American journal of biochemistry and biotechnology*.2011, vol.7, n° 3, pp.141-145.
- [18]KARAM, N-E; DELLALI, A; ZADI-KARAM, H. Activité lipolytique chez les bactéries lactiques Lipolytic Activity from Lactic Bacteria.*Renc.Rech.Ruminants*, 2012, vol.19, pp.415.
- [19]MOUSSAVOU MOUNGUENGUI, Rédéo Wilfried. *Synthèse enzymatique d'esters éthyliques d'huiles végétales pour la production de biodiesel à l'aide de lipases végétales issues de la biomasse africaine*. Thèse de doctorat, Génie des procédés. Ouagadougou: Institut international d'ingénierie, 2014,191p.
- [20]KOUADIO, Yao Toussaint. *Screening de l'activité lipasique : application en hydrolyse*. Master en ingénierie, Eau et assainissement. Ouagadougou : Institut international d'ingénierie, 2014,63p.
- [21]YBERT, Edith. Larousse encyclopédie des plantes médicinales. 2nd Edition. Paris : Dorling Kindersley Limited, 2001, 335 p. (ISBN: 2-03-560252-1)
- [22]AOUADHI, Samia. *Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude de 57 plantes recommandées par les herboristes [en ligne]*.mémoire de master. Spécialisé en toxicologie. Tunis : Faculté de médecine, 2010. [12/06/2017]. 196p. Disponible à l'adresse : http://www.memoireonline.com/03/12/5518/m_Atlas-des-risques-de-la-phytotherapie-traditionnelle-tude-de-57-plantes-recommandees-par-les-he.html.
- [23]WIKIPEDIA. *Lin cultivé*. [en ligne]. (modifié le 19 avril 2017) Disponible sur : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Lin_cultiv%C3%A9> (Consulté le 12/06/2017).

- [24] BENRACHOU, Nora. *Etude des caractéristiques physicochimiques et de la composition biochimique d'huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est algérien*. Thèse de doctorat, Biochimie Appliquée. Annaba : Université Badji Mokhtar, 2013, 112p.
- [25] Conseil oléicole international. *Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive*. COIT.15/NC n° 3/Rév.8.France, 2015, 18p.
- [26] BEN ABBES, Farah. *Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « Phoenix dactylifera L. »*. Mémoire de Magister, Génie des procédés pharmaceutiques. Sétif : Université Ferhat Abbas, 2011, 110p.
- [27] MKAOUAR, Sameh ; KECHAOU, Nabil. Valorisation des écartes de triage de dattes par séchage pour l'obtention d'une poudre pour l'alimentation animale. *Déchets sciences et technique*, 2013, n°63, pp. 26-30.
- [28] CHEKROUNE, Malika; DERRADJI, Nawel ; AMELLAL, Hayet, *et al.* Effet du couple temps-température sur l'efficacité du séchage cas des dattes Mech-Degla. *actualités techniques et scientifiques*, 2008, vol.125, n° (03-04), pp.22-25.
- [29] HASSANIEN, F.R; MUKHERJEE, K.D.J. Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1986, vol.63, pp.893-897.
- [30] TARRIDE, Isabelle ; CLAUDE, Jean, ANDREANI, Xavier. Effectuer un titrage colorimétrique. (22/01/2012). [Fiche TP] **In** : *TI-Planet* .Disponible sur :< [https:// tiplanet.org /forum/archives_voir.php?id=3907](https://tiplanet.org/forum/archives_voir.php?id=3907) > (Consulté le 08/06/2017).
- [31] DO AMARAL SAMPAIO NETA, Nair; CLEITON SOUSA DOS SANTOS, José; DE OLIVEIRA SANCHO, Soraya, *et al.* Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. *Elsevier, Food Hydrocolloids*, 2012, vol.27, pp. 324-331.
- [32] BOURGUET, Erika ; AUGÉ, Christophe. *Les techniques de laboratoire*. 1^{ère} Edition. Paris : ellipses, 2008. 151p. ISBN 978-2-7298-3871-3.
- [33] OLIVE, Gilles; TOREZAN, Gabriella; BLECKER, Christophe. Synthèse enzymatique d'esters de fructose. *Elsevier Masson*, 2012, vol.15, n°12, pp.1037-1047.
- [34] MOUSSAVOU, Rédéo Wilfried ; BRUNSCHWING, Christel ; VILLVENEUVE, Pierre *et al.* *Screening de l'activité lipasique dans des extraits végétaux de la biomasse burkinabé pour la synthèse d'esters éthylique d'huile végétale (EEHV)*. 6^{ème} Edition : campus, 2011, 6p.
- [35] MUNIER, P. Note sur le séchage et conditionnement des dattes communes. *Fruit*, 1961, Vol. 16, n° 8, pp.415-417.

[36]BRUNEL, Sophie. *Caractérisation écophysiole de différents génotypes de medicago truncatula au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe*. Thèse de doctorat, Sciences Agronomiques. France : Ecole doctorale d'Angers, 2008,278p.

Annexe

Annexe

a) Séchage des dattes

1. Triage

Le triage des dattes communes consiste uniquement à éliminer les fruits avariés, incomplètement mûres ou immature, c'est à dire des fruits issus du développement des carpelles non fécondés [35].

2. Nettoyage des dattes

Le nettoyage des fruits peut être effectué par voie sèche ou par voie humide. En générale, les dattes sont nettoyées par voie humide.

Le lavage doit être mené de telle façon que la durée du contact des fruits avec l'eau soit la plus réduite possible ; il faut en effet éviter la diffusion des sucres dans l'eau de lavage et l'absorption de celle-ci par les dattes. Les dattes sont simplement mises à égoutter sur claies dans un local aéré avant de passer au séchage [35].

➤ préparation de 250 ml de solution de NaOH à 0.1 N :

1) Calcul de la masse NaOH pour préparer 250 ml de solution 0.1N :

$$N = (m_{NaOH} / M_{NaOH}) \times Z_{(eq)} / V_{(l)} \rightarrow m_{NaOH} = N \times M_{NaOH} \times V_{(l)} / Z_{(eq)}$$

2) La masse molaire NaOH :

$$M_{NaOH} = 23 + 16 + 1 = 40 \text{ g/mol.}$$

$Z = 1$, NaOH monobasique.

$$\text{Donc : } m_{NaOH} = 0.1 \times 40 \times 0.25 / 1 = 1\text{g.}$$

3) Préparation :

On pèse $m = 1\text{g}$ de NaOH en utilisant une balance analytique. Il prélève le solide en poudre avec une spatule dans une capsule préalablement tarée.

On place cette masse dans une fiole jaugée de 250 ml. Il ajoute un peu d'eau distillée, agite, puis complète avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Il rend homogène la solution en agitant la fiole préalablement bouchée. Jusqu'au la dissoudre complète de la quantité de NaOH [30].

➤ **Préparation de phénolphtaléine 1% :**

A l'aide d'une balance analytique peser 1g de poudre de phénolphtaléine. Dans une fiole jaugée, Faire dissoudre cette quantité de phénolphtaléine dans 80mL de l'alcool éthylique (Éthanol), et compléter à 100mL avec ce dernier. (Éthanol) **[30]**.

b) Photos



La chambre de séchage utilisée lors des essais.

c) Les tableaux

Variation de poids des dattes dans le temps pendant le séchage.

temps (h)	Poids (g)
0	467
3	462,320
8	458,430
20	456,280
32	454,960
38	454,030
57	453,860
58	453,790
59	453,760

Rendement d'estérification des extraits végétaux des graines sélectionné.

Extrait enzymatique	Sésame. G	Fenouille. G	Moutarde. G	Nigelle. G	Blanc
Volume NaOH consommé (ml)	0.3	0.35	0.35	0.25	0.8
Rendement (%)	62.5	56.25	56.25	68.75	0

