

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des Sciences

Département de Chimie



Mémoire de fin d'étude

Pour L'obtention du diplôme de Master 2

Option : Chimie organique

---

**THEME : VALORISATION DE L'HUILE D'OLIVE DE  
LA REGION NORD ALGERIENNE PAR VOIE  
LIPASIQUE**

---

Réalisé par : AICHA Chahinez

KOURICHI Fella

Soutenu le 01-07-2024 devant les jurys :

Mr A. MEZRAG	MCB	USDB1	Président
Mr. AIT YAHIA	MAA	USDB1	Examineur
Mr. A. BELAFRIEKH	MCB	USDB1	Promoteur

Promotion 2023-2024

# *Remerciement*

*Ce travail a été réalisé au sein du département de chimie,*

*faculté des sciences, université de Blida 1,*

*Nous souhaitons exprimer notre profonde reconnaissance  
envers Dr BELAFRIEKH Abderahmane pour son expertise, son  
soutien indéfectible et son engagement inébranlable tout au  
long de ce projet. Notre parcours académique a été  
considérablement enrichi grâce à votre mentorat, qui a été une  
source d'inspiration. Nous vous remercions pour votre  
engagement et votre confiance en nous.*

*Nous tenons également à remercier vivement les membres du  
jury, Dr MEZRAG Abderrahmane et Mr. AIT YAHIA Ahmed,  
d'avoir accepté de juger et d'évaluer ce travail.*

# *Dédicace*

*Avec les sentiments de gratitude les plus profonds, on dédie ce travail à nos parents K.*

*MAHFOUD, K. NADJET, B. SAMIA, A. HASSINE Pour leur soutien constant, leurs encouragements et leurs efforts pour assurer le bon déroulement de nos études ont été inestimables. On dédie également ce travail à nos frères et à nos sœurs A. Zouhir, A.*

*Mohamed, K. Asma, K. Nawel, K. Ihab Khair-Eddine et la petite Nadine qui ont toujours été présents pour nous.*

*On souhaite exprimer nos reconnaissances à Nos amis I. ROUZZI, N. BRITAH, N. FOUGHALI, Y. FOUGHALI, HANNA, RANIA, ROUMAÏSSA, DOUNIA, L. KARAOUÏ, S.*

*ABDALI*

*Durant tout ce trajet, nous avons pu faire confiance à votre amour sans conditions et à votre soutien inébranlable. Les moments de bonheur ont été renforcés par vos sourires, vos paroles d'encouragement et vos épaules sur lesquelles nous nous reposions, ce qui a illuminé les jours sombres. Cette victoire est à la fois de votre côté et de nous. Nous tenons à exprimer notre gratitude pour votre fidélité.*

## Résumé

L'huile d'olive algérienne, et notamment celle de la région nord, jouit d'une réputation et d'une image positive dans tout le pays. Cependant, lors des procédés d'extraction, une quantité non négligeable est classée de basse qualité. De plus, la durée et les conditions de stockage peuvent affecter la qualité de l'huile. L'huile d'olive est principalement composée de triglycérides, qui sont des triesters d'acides gras du glycérol. Le mauvais goût de l'huile d'olive de basse qualité est généralement dû à la présence d'acides gras libres dans sa composition.

Dans cette étude, inscrite dans le cadre de l'utilisation des biocatalyseurs pour la valorisation des bioressources, nous nous sommes intéressés à l'amélioration de la qualité de l'huile d'olive (classée basse qualité) de la région nord algérienne par voie enzymatique. Quatre échantillons de différentes régions ont été récoltés et deux lipases, CRL et LPP, ont été utilisées. Les résultats obtenus montrent une amélioration significative de la qualité de l'huile, exprimée par une diminution de l'acidité.

**Mots clés :** Huile d'olive, Lipase, Acide gras, Estérification, Bioressource

## **Abstract**

Algerian olive oil, particularly from the northern region, enjoys a positive reputation and image throughout the country. However, during the extraction process, a significant quantity is classified as low quality. In addition, storage time and conditions can affect oil quality. Olive oil is mainly composed of triglycerides, which are fatty acid triesters of glycerol. The bad taste of low-quality olive oil is generally due to the presence of free fatty acids in its composition.

In this study, which falls within the scope of the use of biocatalysts to enhance bioresources, we focused on improving the quality of olive oil (classified as low quality) from the northern Algerian region by enzymatic means. Four samples from different regions were collected and two lipases, CRL and LPP, were used. The results show a significant improvement in oil quality, expressed by a reduction in acidity.

**Keywords:** Olive oil, Lipase, Fatty acid, Esterification, Bioresource

## ملخص

يتمتع زيت الزيتون الجزائري خاصةً زيت المنطقة الشمالية، بسمعة وصورة إيجابية في جميع أنحاء البلاد. ومع ذلك، أثناء عملية الاستخلاص، تُصنف كمية معتبرة على أنها منخفضة الجودة. بالإضافة أنه يمكن لوقت وظروف التخزين التأثير على جودة الزيت. يتكون زيت الزيتون بشكل أساسي من الدهون الثلاثية، وهي عبارة عن استرات ثلاثية الأحماض الدهنية و الغليسول. ويرجع الطعم السيئ لزيت الزيتون منخفض الجودة عمومًا إلى وجود الأحماض الدهنية الحرة في تركيبته.

هذه الدراسة، التي تندرج في نطاق استخدام المحفزات الحيوية لتعزيز الموارد الحيوية، ركزنا على تحسين جودة زيت الزيتون (المصنف على أنه منخفض الجودة) من منطقة شمال الجزائر بالوسائل الأنزيمية. تم جمع أربع عينات من مناطق مختلفة واستخدمنا اثنين من الليبازات CRL و LPP ، أظهرت النتائج تحسناً ملحوظاً في جودة الزيت، معبراً عنه بانخفاض الحموضة.

**الكلمات المفتاحية:** زيت الزيتون، الليباز، الأحماض الدهنية، الأسترة، المصدر الحيوي

# Sommaire

**Remerciement**

**Résumé**

**Sommaire**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Abréviations et symboles**

<b>Introduction générale</b> .....	1
Références bibliographiques .....	3
<b>Chapitre1 : Etude bibliographique</b>	
<b>1.Lipases</b> .....	4
1.1 Définition .....	4
1.2 Origines et classification .....	4
a. Les lipases végétales .....	4
b. Les lipases de mammifères .....	4
c. Les lipases microbiennes .....	5
d. Les cutinases .....	5
1.3. sélectivité des lipases .....	5
a. Enantiosélectivité .....	5
b. Chimiosélectivité.....	6
c. Régiosélectivité .....	6
1.4 Domaines d'application des lipases .....	6
a. Réaction d'hydrolyse .....	7
b. Réaction d'estérification .....	7
c. La transesterfication .....	8
d. L'interestérification.....	9
<b>2. Huile d'olive</b> .....	11
2.1.Définition .....	11
2.2.Classification .....	11
a. Huile d'olive vierge.....	11

b. Huile d'olive vierge courante .....	11
c. Huile d'olive vierge lampante .....	12
d. Huile d'olive raffinée .....	12
e. Huile de grignons d'olive .....	12
2.3. Caractéristiques physico-chimiques .....	12
2.4. Composition chimique .....	13
a. Fraction saponifiable .....	13
b. Fraction insaponifiables .....	14
<b>3.Ultrasons</b> .....	16
3.1 Définition .....	17
3.2. Cavitation .....	17
a. Formation des bulles.....	17
b. Croissance des bulles .....	17
c. Implosion des bulles .....	18
d. Effets de la cavitation .....	18
3.3. Facteurs d'influence.....	18
a. Type de solvant.....	18
b. Température .....	19
c. Intensité des ultrasons.....	19
d. Puissance et fréquence des ultrasons.....	19
e. Présence de gaz dissous.....	19
3.4. Inactivation enzymatique .....	20
a. Mécanismes d'inactivation.....	20
b. Optimisation des conditions .....	21
Références bibliographiques .....	22

## Chapitre 2: Matériels et méthodes

<b>1.Enzymes</b> .....	26
1.1.LPP .....	26
1.2.CRL .....	26
<b>2.Réactifs</b> .....	26
2.1 Huile d'olive .....	26
2.2 Glycérol .....	27
2.3 Les solvants .....	27
2.4 Phénolphtaléine .....	28
2.5 Tamis moléculaire .....	28
<b>3. Matériels</b> .....	28
3.1 Agitateur magnétique .....	28
3.2 Bain à ultrason.....	29
4.Réactions enzymatiques .....	30
4.1.Réactions sous agitation .....	30
4.2.Réactions sous ultrasons.....	30
5.Caractéristiques physico-chimique d'huile d'olive .....	31
5.1.Indice d'acidité .....	31
a. Définition.....	31
b. Mode Opérateur .....	31
5.2.Potentiel d'hydrogène (pH) .....	31
a. Définition.....	31
b. Mode opératoire .....	31
6. Analyse par chromatographique phase gazeuse.....	31
6.1.Définition et principe .....	31
Références bibliographiques .....	34

### **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

1.Introduction .....	35
2.Caractéristiques physico-chimiques d'huile d'olive .....	35
2.1.Résultat indice de l'acidité .....	35
2.2.Potentiel d'hydrogène (pH) .....	36
3.Réactions enzymatiques .....	36
3.1.Réactions sous agitation .....	37
3.2.Réactions sous ultrasons.....	39
4.Résultat de l'analyse de CPG .....	42
5.Conclusion.....	43
Références bibliographiques .....	44
Conclusion générale : .....	45

## Liste des figures

### Chapitre 1.

<b>Figure 1.1.</b> Liaisons hydrolysées par les phospholipases.	4
<b>Figure 1.2.</b> Enantiosélectivité des lipases.	5
<b>Figure 1.3.</b> chimiosélectivité des lipases.	6
<b>Figure 1.4.</b> La régiosélectivité des lipases.	6
<b>Figure 1.5.</b> Domaines d'application des lipases	7
<b>Figure 1.6.</b> Réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase en milieu aqueux.	8
<b>Figure 1.7.</b> Différents types de réactions de synthèse catalysées par les lipases en milieu micro-aqueux.	8
<b>Figure 1.8.</b> Transestérification de l'octanol et du vinyl laurate par la lipase de Burkholderia.	9
<b>Figure 1.9.</b> Schéma de l'interestérification de triglycérides et d'acétate de méthyle pour la production de biodiesel.	10
<b>Figure 2.1.</b> Huile d'olive.	11
<b>Figure 2.2.</b> Structure générale d'un tocophérol.	14
<b>Figure 2.3.</b> Structure générale d'un squalène.	15
<b>Figure 2.4.</b> Principaux composés phénoliques de l'huile d'olive.	15
<b>Figure 2.5.</b> Structure de la $\beta$ -carotène.	16
<b>Figure 3.1.</b> Domaines de fréquence des sons.	17
<b>Figure 3.2.</b> Le phénomène de cavitation, formation des bulles	18

### Chapitre 2.

<b>Figure 2.1.</b> Structure de glycérol.	27
<b>Figure 2.3.</b> Structure de la phénolphtaléine.	28
<b>Figure 2.4.</b> Agitateur magnétique.	29
<b>Figure 2.5.</b> Bain à ultrasons.	29
<b>Figure 2.6.</b> Réaction d'estérification sous agitation magnétique.	30
<b>Figure.2.7.</b> Réaction d'estérification sous ultrason .	30

### Chapitre 3.

<b>Figure 3.1.</b> Variation d'acidité libre des échantillons d'huile d'olive étudiée.	35
<b>Figure 3.2.</b> Variation du potentiel de l'hydrogène (pH) des échantillons d'huiles d'olive avant réaction.	36

<b>Figure 3.3.</b> Réactions d'estérification sous agitation magnétique catalysées par CRL.	37
<b>Figure 3.4.</b> Réactions d'estérification sous agitation magnétique catalysées par LPP.	38
<b>Figure 3.5.</b> Comparaison d'estérification des lipases sous agitation magnétique.	38
<b>Figure 3.6.</b> Réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par CRL.	39
<b>Figure 3.7.</b> Réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par LPP.	40
<b>Figure 3.8.</b> Comparaison d'estérification des lipases sous Ultrasons.	40
<b>Figure 3.9.</b> Comparaison de Temps de réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par LPP.	41
<b>Figure 3.10.</b> Comparaison de Temps de réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par CRL.	41
<b>Figure 3.11.</b> Comparaison de Temps de réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par CRL sans Glycérol.	42
<b>Figure 3.12.</b> Les rendements d'estérification sous Ultrasons catalysées par LPP	43

## Liste des tableaux

### Chapitre 1.

**Tableau 2.1.** critères de qualité des différentes catégories d'huile d'olive selon les normes du codex alimentarius 13

### Chapitre 2 .

**Tableau 2.1.** Les propriétés physico-chimiques d'huile d'olive 26

**Tableau 2.2.** Les propriétés physico-chimiques de glycérol 27

**Tableau 2.3.** Propriétés physiques des solvants utilisés 27

**Tableau 2.4.** les propriétés physico-chimiques de La phénolphtaléine 28

## **Abréviations et symboles**

AMP : Adénosine monophosphate

C : Concentration

COI : Conseil Oléicole International

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CRL : Lipase de *Candida rugosa*

GSK : Glaxo Smith Kline

KDa : kilo dalton

LPP : Lipase pancréatique de porc

MGL : Matière grasse laitière

R, S : Enantiomères Rectus et Sinister

Sn : Substitutions nucléophile

T : Température

V : volume

### **Introduction générale**

Les enzymes sont des molécules protéiques qui agissent comme des catalyseurs dans les réactions chimiques des systèmes vivants, régulant les fonctions cellulaires [1] [2] [3].

Les lipases, également connues sous le nom de triacylglycérols acyl hydrolases (EC 3.1.1.3) font partie de la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Elles convertissent les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol [4]. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques insolubles dans l'eau se produit à l'interface entre les lipides et l'eau. Leur forte activité sur les lipides riches en triglycérides, comme l'huile d'olive et le beurre, a conduit à leur dénomination officielle. Elles sont aussi appelées triglycéride lipases ou tributyrases.

En plus d'hydrolyser les graisses, les lipases peuvent catalyser diverses réactions, comme l'estérification, l'alcoolyse et l'acidolyse. Leur capacité à s'adapter à différents microenvironnements et leurs conditions douces de réaction les rendent particulièrement intéressantes pour l'industrie [5].

La problématique de cette étude est d'améliorer la qualité de l'huile d'olive en réduisant son acidité grâce à l'utilisation de lipases. Les lipases peuvent diminuer l'acidité de l'huile par la réaction d'estérification en hydrolysant les triglycérides en acides gras et glycérol. L'étude explore l'efficacité des lipases, les conditions optimales pour leur activité, et leur impact sur les caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive. Elle examine également l'influence de différentes méthodes d'opération, comme l'agitation, l'utilisation d'ultrasons, et l'absence de glycérol, sur les performances des lipases et la qualité de l'huile.

La présentation générale de notre travail sera la suivante :

**Un premier chapitre** sera dédié à une étude bibliographique afin de mieux comprendre la problématique et les différents aspects de notre étude. Il est divisé en trois parties. Dans une première partie, nous aborderons des informations générales sur les lipases, leur mécanisme d'action, ainsi que les caractéristiques de sélectivité des lipases. Nous concluons cette partie en présentant les applications des lipases. La deuxième partie portera sur la définition de l'huile d'olive, sa classification, ses caractéristiques physico-chimiques ainsi que sa composition chimique. Dans la troisième partie, nous aborderons des informations générales sur les ultrasons et les éléments qui peuvent influencer leur utilisation.

## *Introduction générale*

---

**Le deuxième chapitre** de ce manuscrit portera sur la section « matériel et méthodes », où les réactifs et les équipements utilisés dans cette étude seront exposés. Les méthodes variées pour les réactions enzymatiques ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive y seront détaillées.

**Dans le troisième chapitre** nous présenterons et discuterons des résultats obtenus lors de cette étude. L'étude est structurée autour de deux axes principaux. Le premier axe implique l'étude des caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive, tandis que le deuxième concerne les réactions enzymatiques avec trois méthodes d'opération (sous agitation, sous ultrason et sans glycérol). Enfin, les résultats des analyses chromatographiques en phase gazeuse seront présentés

## Références bibliographiques

- [1] Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. *Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. Computational and structural biotechnology journal*, 2012. 2(3), e201209017.
- [2] Madhu, A., & Chakraborty, J. N. *Developments in application of enzymes for textile processing. Journal of cleaner production*, 2017 . 145, 114-133.
- [3] Hewitt, S. H., & Butler, S. J. *Application of lanthanide luminescence in probing enzyme activity. Chemical communications*, 2018 54(50), 6635-6647.
- [4] Mats, M. *Kinetics of triglyceride lipases. Lipases*, 1994. 159-180.
- [5] Fickers, P., J. Destain, and P. Thonart, *Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 2008. 12(2).

# **Chapitre 1. Etude bibliographique**



pancréatique, la lipase hépatique et la lipase linguale. Elles sont également impliquées dans la régulation du métabolisme des lipides dans le corps [8] [9].

### c. Lipases microbiennes

Les lipases microbiennes, produites par des bactéries, des levures et des champignons, sont les plus utilisées en biotechnologie et en industrie en raison de leur grande diversité et de leur stabilité. Elles sont exploitées dans de nombreux processus industriels, incluant la production de biodiesel, les industries alimentaires et pharmaceutiques.

### d. Cutinases

Les cutinases sont des enzymes similaires aux lipases mais spécifiques à la dégradation de la cutine, une composante des cuticules des plantes [10]. Elles sont produites principalement par des micro-organismes phytopathogènes qui dégradent les barrières de protection des plantes pour les infecter [11].

## 1.3. Sélectivité des lipases

Les lipases sont appréciées pour leur capacité à catalyser des réactions avec une grande sélectivité, ce qui est crucial pour la synthèse de composés spécifiques.

### a. Enantiosélectivité

L'énantiosélectivité est la capacité d'une enzyme à discriminer entre les énantiomères d'un substrat chiral. Les lipases peuvent catalyser des réactions qui produisent ou utilisent un énantiomère préférentiel, ce qui est particulièrement important dans la production de composés chiraux dans l'industrie pharmaceutique [12].

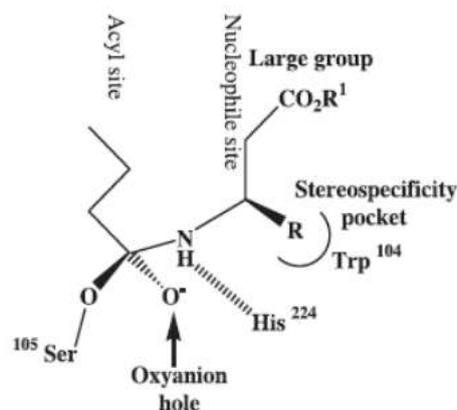


Figure 1.2. Enantiosélectivité des lipases [13].

### b. Chimiosélectivité

La chimiosélectivité fait référence à la capacité de la lipase à choisir entre deux groupes chimiques similaires dans une molécule. Cela permet la transformation sélective de groupes fonctionnels spécifiques sans affecter d'autres parties de la molécule [14].

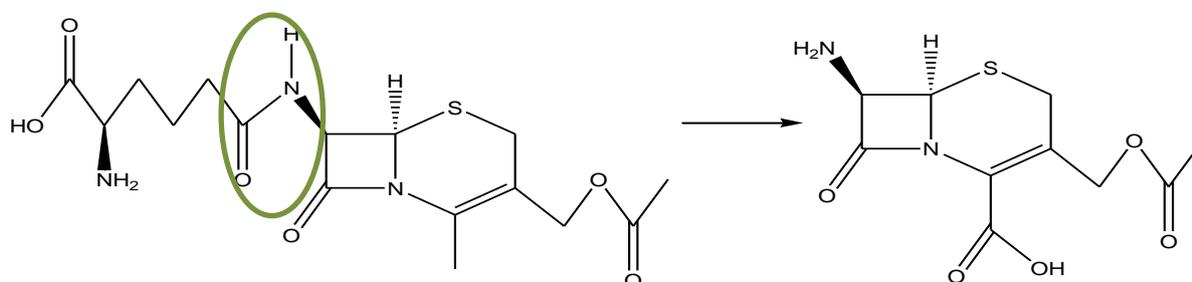


Figure 1.3. Chimiosélectivité des lipases [13].

### c. Régiosélectivité

La régiosélectivité est la capacité d'une enzyme à catalyser la réaction à un endroit spécifique dans une molécule [15]. Les lipases peuvent agir sélectivement sur une position particulière d'un substrat lipidique, ce qui est utile pour la synthèse de lipides structurés [16].

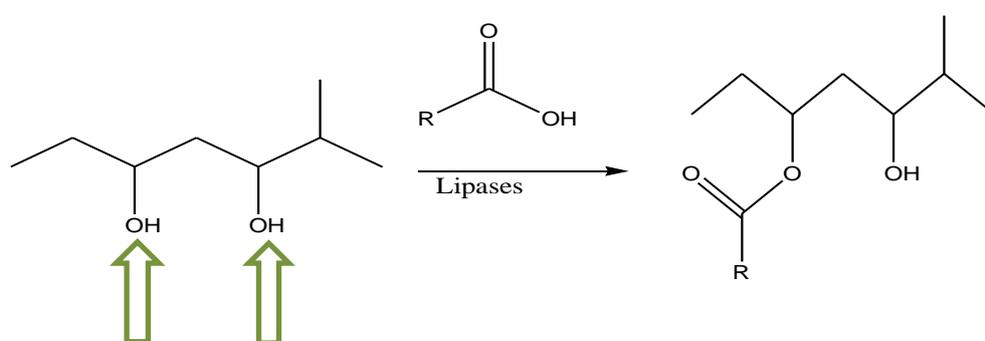


Figure 1.4. La régiosélectivité des lipases.

### 1.4. Domaine d'application des lipases

Les lipases trouvent des applications dans divers domaines en raison de leur capacité à catalyser différentes réactions de manière efficace et spécifique.

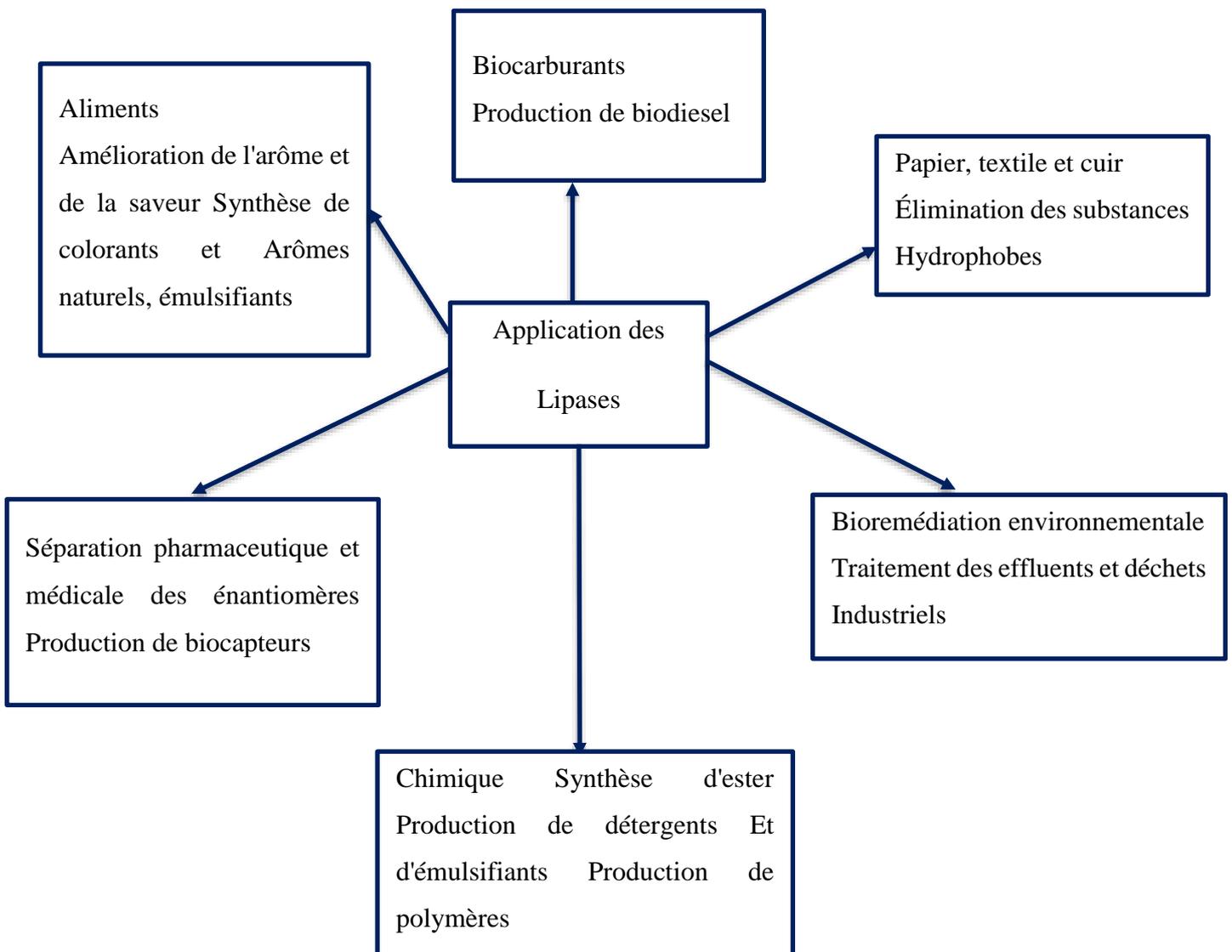


Figure 1.5. Domaines d'application des lipases

### a. Réaction d'hydrolyse

Les réactions d'hydrolyse catalysées par les lipases sont fondamentales pour le métabolisme des graisses [17], décomposant les triglycérides en acides gras libres et en glycérol. Cette réaction est également exploitée dans l'industrie pour la production d'acides gras et de monoglycérides [17] [18].

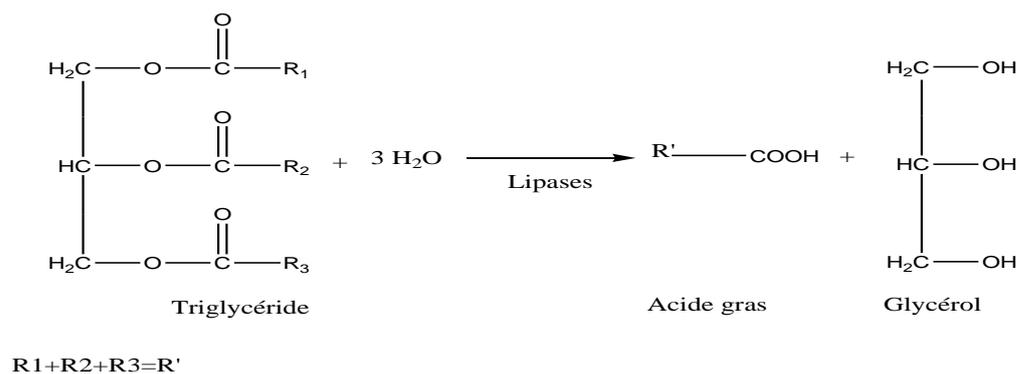


Figure 1.6. Réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase en milieu aqueux.

### b. Réaction d'estérification

Les lipases peuvent catalyser la formation d'esters à partir d'acides et d'alcools [19]. Cette réaction est utilisée dans la synthèse de biolubrifiants, de tensioactifs, et d'arômes alimentaires [20].

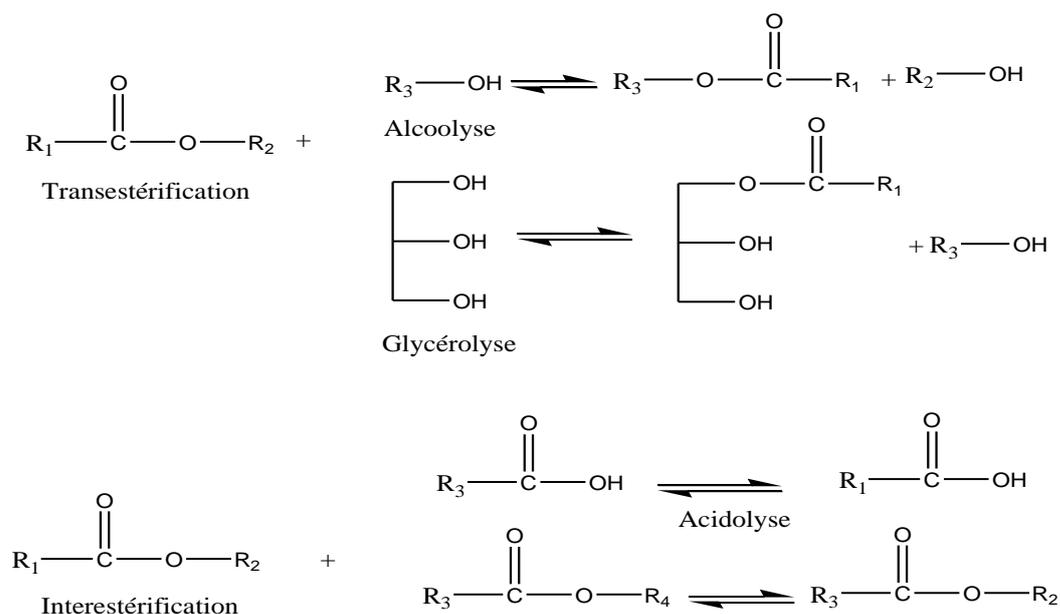
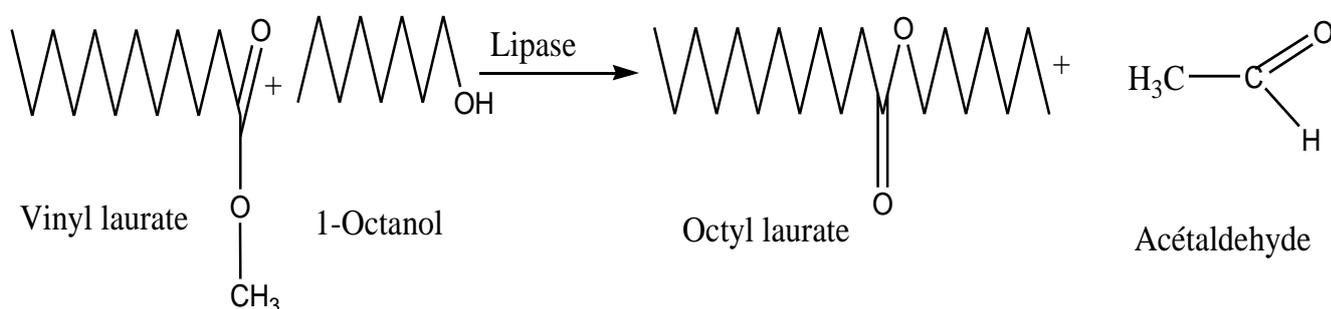


Figure 1.7. Différents types de réactions de synthèse catalysées par les lipases en milieu micro-aqueux

### c. Réaction de transestérification

Dans la réaction de transestérification, une lipase échange les groupes alkyles entre un ester et un alcool. Cette réaction est largement utilisée dans la production de biodiesel, où les triglycérides des huiles végétales ou des graisses animales sont convertis en esters méthyliques d'acides gras [21].

Un exemple de transestérification réalisée dans le but de produire un ester gras (octyl laurate) est utilisé en industries cosmétiques. La réaction qui se déroule entre du vinyl laurate en présence du 1-octanol donnant lieu à un octyl laurate et un aldéhyde (figure 1.8).

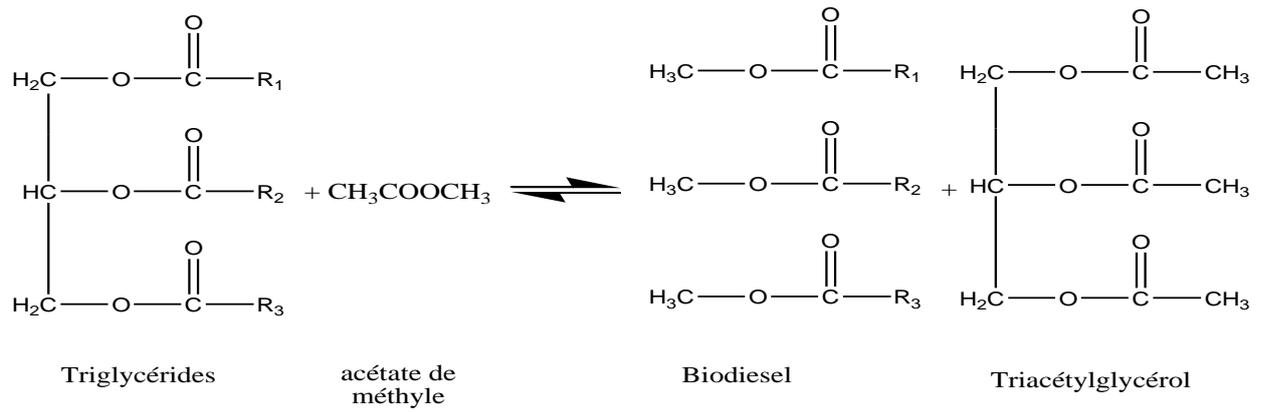


**Figure 1.8.** Transestérification de l'octanol et du vinyl laurate par la lipase de *Burkholderia*.

### d. Réaction d'interestérification

L'interestérification est une réaction où les acides gras sont redistribués entre les triglycérides. Les lipases sont utilisées pour modifier les propriétés physiques des graisses et des huiles, produisant des graisses structurées qui sont utilisées dans les margarines et les confiseries [22]. Les lipases, grâce à leur diversité et à leur spécificité, jouent un rôle crucial dans la biotechnologie moderne et les industries [23], offrant des solutions écologiques et efficaces pour de nombreux processus chimiques et biochimiques [24].

Le biodiesel peut également être produit par interestérification entre un triglycéride et l'acétate de méthyle, catalysée par la lipase de *C. antarctica* immobilisée (Figure 1.9).



**Figure 1.9.** Schéma de l'interestérification de triglycérides et d'acétate de méthyle pour la production de biodiesel.

## 2. Huile d'olive

### 2.1. Définition

L'huile d'olive est une huile végétale obtenue à partir des fruits de l'olivier (*Olea europaea*). Elle est principalement utilisée dans l'alimentation, mais également dans les cosmétiques et les produits pharmaceutiques. Sa composition unique en acides gras et en composés bioactifs lui confère des propriétés nutritionnelles et sensorielles distinctes [25].



**Figure 2.1.** Huile d'olive.

### 2.2. Classification

L'huile d'olive est classée en différentes catégories selon sa méthode de production et ses caractéristiques chimiques et organoleptiques [26].

#### a. Huile d'olive vierge

L'huile d'olive vierge est obtenue uniquement par des procédés mécaniques ou physiques, sans aucun traitement chimique. Elle conserve ainsi tous ses composés naturels et ses qualités nutritionnelles et organoleptiques.

#### b. Huile d'olive vierge courante

C'est une catégorie d'huile d'olive vierge qui ne répond pas aux critères de qualité de l'huile d'olive vierge extra. Elle peut présenter des défauts organoleptiques légers, mais reste consommable.

### **c. Huile d'olive vierge lampante**

L'huile d'olive vierge lampante est une huile de faible qualité, avec des défauts organoleptiques marqués, la rendant impropre à la consommation humaine sans raffinage. Elle est souvent utilisée pour la production d'huile d'olive raffinée.

### **d. Huile d'olive raffinée**

L'huile d'olive raffinée est obtenue par le raffinage d'huiles d'olive vierges lampantes. Le processus de raffinage élimine les défauts organoleptiques et les impuretés, mais réduit également les niveaux de composés bioactifs bénéfiques.

### **e. Huile de grignons d'olive**

L'huile de grignons d'olive est extraite des résidus solides (grignons) restant après l'extraction de l'huile d'olive vierge. Cette huile est ensuite raffinée et souvent mélangée avec une certaine quantité d'huile d'olive vierge pour améliorer sa saveur [27].

## **2.3. Caractéristiques physico-chimiques**

Les caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive incluent son point de fusion, son point de fumée, sa densité, sa viscosité, et son indice de peroxyde [28]. L'huile d'olive a une densité d'environ 0,91 g/cm<sup>3</sup> et un point de fumée autour de 190°C, ce qui la rend adaptée pour la cuisson à haute température. Elle possède également un indice de saponification typique de 184 à 196 mg KOH/g. Quant au règlement de la CE, il est plus spécifique au sujet de l'évaluation sensorielle [29] (**Tableau 2.1**).

**Tableau 2.1.** Critères de qualité des différentes catégories d'huile d'olive selon les normes du codex alimentarius [30].

Types de l'huile d'olive	Acidité %	Indice de peroxyde méq.02/kg max	Extinction spécifique à 270 nm Nm E 1cm	Extinction spécifique à 232nm Nm E 1cm
Extra vierge	≤ 0.8	≤ 20	≤ 0.25	≤ 2.5
Vierge	≤ 2	≤ 20	≤ 0.25	≤ 2.6
Vierge courante	≤ 3.3	≤ 20	≤ 0.3	-
Raffinée	≤ 0.3	≤ 5	≤ 1.10	-
Huile de grignon d'olive	≤ 1.5	≤ 15	≤ 1.70	-

### 2.4. Composition chimique

L'huile d'olive est composée de fractions saponifiables et insaponifiables, chacune ayant des composants distincts qui contribuent à ses propriétés.

#### a. Fraction saponifiable

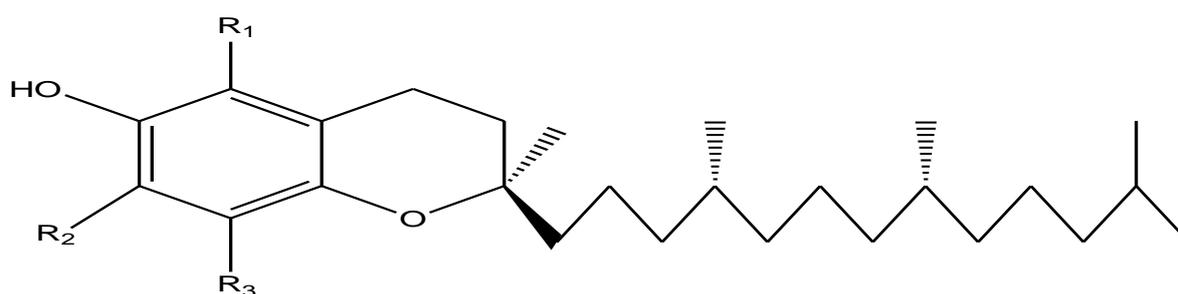
La fraction saponifiable comprend les triglycérides et les acides gras.

- **Acides gras** : L'huile d'olive est riche en acides gras monoinsaturés, principalement l'acide oléique (55-83%). Elle contient également des acides gras saturés comme l'acide palmitique (7-20%) et des acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique (3,5-21%) [31].
- **Triglycérides** : Les triglycérides sont les principaux composants de la fraction saponifiable, constituant environ 98% de l'huile d'olive. Ils sont formés par l'estérification de trois acides gras avec un glycérol [32].

### b. Fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable contient des composés mineurs mais bioactifs, tels que les stérols, les tocophérols, les hydrocarbures, les composés phénoliques, et les pigments colorants.

- **Stérols** : Les stérols, principalement le  $\beta$ -sitostérol, représentent environ 100 à 250 mg pour 100 g d'huile d'olive et contribuent à ses effets hypocholestérolémiants [33].
- **Tocophérols** : L'huile d'olive est une source de vitamine E, notamment l' $\alpha$ -tocophérol, qui agit comme antioxydant naturel [34] [35]



**Figure 2.2.** Structure générale d'un tocophérol.

- **Hydrocarbures** : Les hydrocarbures comme le squalène sont présents et jouent un rôle antioxydant et protecteur contre le vieillissement cutané. Le squalène joue un rôle essentiel dans la synthèse du cholestérol et d'autres stérols (Figure 2.3) [36].

Il y a également des hydrocarbures aromatiques, parmi lesquels plus de 77 composés, conférant à l'huile d'olive arôme et saveur [37] Ces composés ne sont pas à sous-estimer car ils ont une incidence positive sur la digestion.

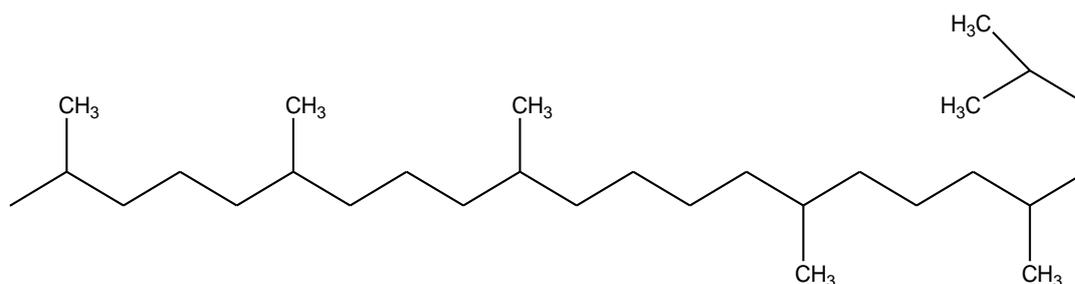


Figure 2.3. Structure générale d'un squalène.

- **Composés phénoliques** : Les phénols, tels que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol, sont responsables de l'amertume et des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de l'huile d'olive [34] (Figure 2.4).

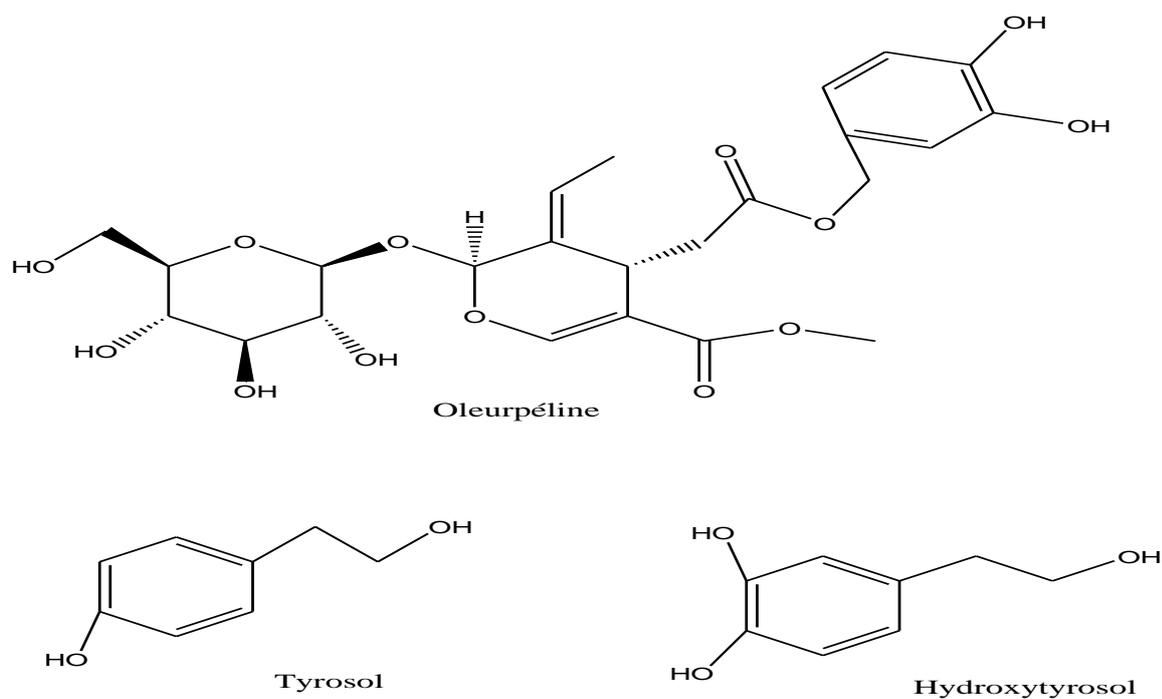
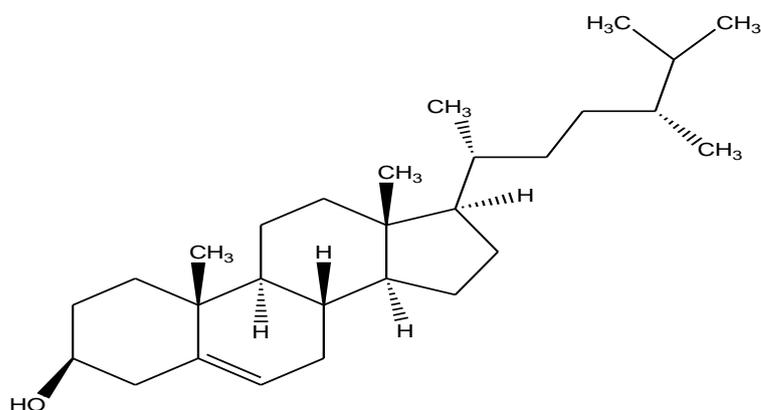


Figure 2.4. Principaux composés phénoliques de l'huile d'olive.

- **Pigments colorants** : Les pigments tels que les chlorophylles et les caroténoïdes influencent la couleur de l'huile d'olive [38] [39].
- **Chlorophylles** : Les chlorophylles donnent une teinte verte à l'huile et ont des propriétés antioxydantes [40].
- **Caroténoïdes** : Les caroténoïdes, comme le  $\beta$ -carotène, contribuent à la couleur jaune de l'huile d'olive et possèdent des propriétés antioxydantes [41].



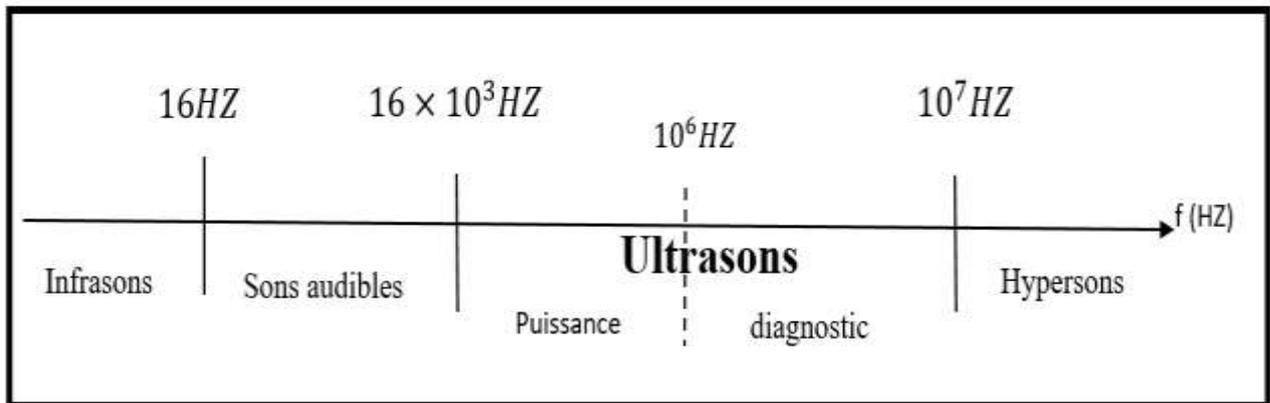
**Figure 2.5.** Structure de la  $\beta$ -carotène.

L'huile d'olive est non seulement une composante clé de la cuisine méditerranéenne, mais également un produit reconnu pour ses bienfaits pour la santé, en grande partie dus à sa composition chimique riche et variée.

### 3. Ultrasons

#### 3.1. Définition

Les ultrasons sont des ondes sonores de haute fréquence, généralement au-delà de la limite de l'audition humaine (au-dessus de 20 kHz). Ils sont utilisés dans diverses applications industrielles, médicales et de recherche pour leur capacité à induire des changements physiques et chimiques dans les milieux où ils se propagent [42].



**Figure 3.1.** Domaines de fréquence des sons.

#### 3.2. Cavitation

La cavitation est le phénomène principal par lequel les ultrasons exercent leurs effets. Elle se produit lorsque des bulles de gaz se forment, grandissent et implosent violemment dans un liquide sous l'effet des ondes ultrasonores. Ce processus génère des températures et des pressions extrêmement élevées localisées, créant des conditions propices à des réactions chimiques et des effets mécaniques [43].

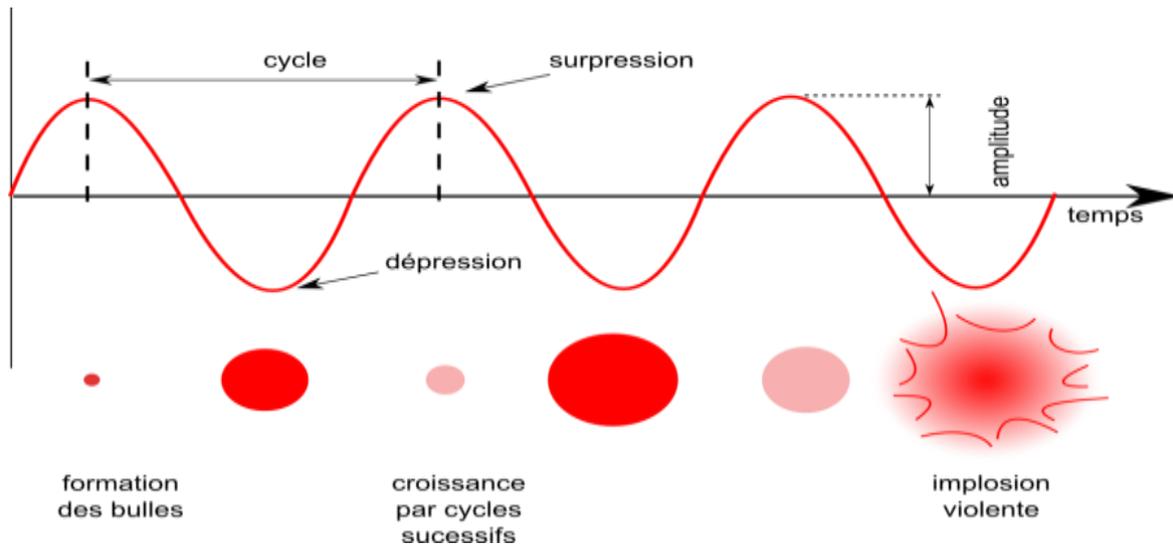


Figure 3.2. Le phénomène de cavitation, formation des bulles [44].

#### a. Formation des bulles

La formation des bulles de cavitation commence lorsque la pression d'une onde ultrasonore tombe en dessous de la pression de vapeur du liquide, créant des vides ou des cavités. Ces bulles contiennent généralement du gaz dissous ou des vapeurs du liquide environnant.

#### b. Croissance des bulles

Les bulles de cavitation croissent par diffusion du gaz dissous dans le liquide environnant vers les bulles ou par coalescence avec d'autres bulles. La taille des bulles augmente jusqu'à ce qu'elles atteignent un point critique.

#### c. Implosion des bulles

Lorsque les bulles atteignent une taille critique, elles implosent violemment sous l'effet des cycles de compression des ondes ultrasonores. Cette implosion génère des micro-jets de liquide, des ondes de choc et des températures localisées extrêmement élevées, souvent supérieures à 5000 K, ainsi que des pressions dépassant les 1000 atm.

#### d. Effets de la cavitation

Les effets de la cavitation sont divers et influencent largement l'efficacité des applications ultrasonores :

- **Effets mécaniques** : Les micro-jets et les ondes de choc résultant de l'implosion des bulles provoquent des forces de cisaillement intenses, permettant la dispersion de particules, le nettoyage de surfaces, et la désagrégation de structures solides.
- **Effets chimiques** : Les conditions extrêmes créées par l'implosion des bulles favorisent des réactions chimiques inhabituelles, notamment la formation de radicaux libres, qui peuvent accélérer les réactions chimiques dans les processus sonochimiques.
- **Effets thermiques** : Les températures élevées générées localement par la cavitation peuvent provoquer des modifications thermiques des substances présentes, augmentant la vitesse des réactions chimiques et des processus de diffusion [45] [46] [47].

### **3.3. Facteurs d'influence**

L'efficacité et les effets des ultrasons dépendent de plusieurs facteurs clés. Ces facteurs influencent la cavitation ultrasonore, le phénomène principal par lequel les ultrasons exercent leurs effets.

#### **a. Type de solvant**

Le type de solvant utilisé influence grandement la propagation des ultrasons et la formation de bulles de cavitation. Les solvants polaires comme l'eau sont souvent plus efficaces pour transmettre les ondes ultrasonores en raison de leurs propriétés physiques et chimiques. La viscosité, la tension superficielle et la densité du solvant déterminent aussi la formation et l'effondrement des bulles de cavitation, impactant ainsi l'efficacité du traitement ultrasonore [45].

#### **b. Température**

La température du solvant affecte la propagation des ultrasons et l'efficacité de la cavitation. À des températures plus élevées, la viscosité des liquides diminue, facilitant la formation de bulles de cavitation. Cependant, une température trop élevée peut réduire l'intensité de la cavitation en diminuant la différence de pression nécessaire pour la formation des bulles. Il est donc crucial de trouver une température optimale pour chaque application spécifique [48] [49] [50].

#### **c. Intensité des ultrasons**

L'intensité des ultrasons, mesurée en watts par centimètre carré ( $W/cm^2$ ), détermine l'énergie transmise au milieu. Une intensité plus élevée entraîne une cavitation plus intense et plus

efficace, augmentant la capacité de fragmentation des bulles et la génération de micro-jets puissants. Cependant, des intensités trop élevées peuvent aussi provoquer une dégradation thermique du milieu ou des substances traitées [46].

### **d. Puissance et fréquence des ultrasons**

La puissance et la fréquence des ultrasons sont des paramètres cruciaux. La puissance (en watts) détermine la quantité totale d'énergie délivrée au système, tandis que la fréquence (en kilohertz ou mégahertz) influence la taille et le comportement des bulles de cavitation [51]. Les basses fréquences (20-40 kHz) produisent de grandes bulles de cavitation avec des implosions violentes, idéales pour des applications de nettoyage et de dispersion. Les hautes fréquences (>1 MHz) produisent des bulles plus petites et une cavitation plus douce, adaptées pour des applications délicates comme l'extraction de composés bioactifs ou l'administration de médicaments [42].

### **e. Présence de gaz dissous**

Les gaz dissous dans le solvant influencent la formation et la stabilité des bulles de cavitation. Les gaz comme l'oxygène et l'azote peuvent stabiliser les bulles de cavitation, augmentant leur durée de vie et leur efficacité. La saturation du liquide en gaz dissous peut ainsi être ajustée pour optimiser le rendement des processus ultrasonores. En outre, la présence de certains gaz réactifs peut participer à des réactions chimiques induites par la cavitation, augmentant l'efficacité des processus sonochimiques [50].

En comprenant et en contrôlant ces facteurs, il est possible d'optimiser l'utilisation des ultrasons pour diverses applications industrielles, médicales et de recherche, en maximisant leur efficacité et en minimisant les effets indésirables [43].

## **3.4. Inactivation enzymatique**

Lorsque les ultrasons sont utilisés pour activer des réactions via les lipases, un facteur crucial à prendre en compte est la possibilité d'inactivation enzymatique. Les lipases, comme toutes les enzymes, sont des protéines susceptibles d'être dénaturées par des conditions extrêmes.

### **a. Mécanismes d'inactivation**

L'inactivation des lipases sous l'effet des ultrasons peut se produire par plusieurs mécanismes :

- **Effets thermiques** : Les températures élevées générées localement par la cavitation peuvent provoquer une dénaturation thermique des enzymes, altérant leur structure tridimensionnelle et donc leur activité catalytique.
- **Forces de cisaillement** : Les forces de cisaillement intenses produites par les micro-jets de cavitation peuvent entraîner des dommages mécaniques aux enzymes, affectant leur intégrité structurelle.
- **Radicaux libres** : La génération de radicaux libres lors de la cavitation peut provoquer des réactions chimiques non spécifiques avec les résidus d'acides aminés des enzymes, conduisant à leur inactivation.

### **b. Optimisation des conditions**

Pour minimiser l'inactivation enzymatique tout en maximisant l'efficacité des réactions d'estérification, il est important d'optimiser les conditions de traitement ultrasonore :

- **Température contrôlée** : Maintenir la température du milieu à un niveau modéré pour éviter la dénaturation thermique des lipases.
- **Intensité et fréquence appropriées** : Utiliser des intensités et des fréquences d'ultrasons adaptées qui sont suffisamment élevées pour induire la cavitation nécessaire sans provoquer des dommages excessifs aux enzymes.
- **Durée d'exposition** : Limiter la durée d'exposition aux ultrasons pour réduire les effets cumulés de la cavitation sur les lipases.
- **Présence d'agents protecteurs** : Ajouter des agents stabilisants ou protecteurs (comme des protéines auxiliaires ou des polyols) qui peuvent aider à préserver l'activité enzymatique en atténuant les effets des forces de cisaillement et des radicaux libres.

En appliquant ces stratégies, il est possible d'exploiter les avantages des ultrasons pour activer les réactions enzymatiques tout en minimisant les risques d'inactivation enzymatique, assurant ainsi une efficacité et une productivité optimales dans les applications industrielles et de recherche [43].

## Références bibliographiques

- [1] Saultani, S., *Synthèse enzymatique d'esters de fructose et d'acide gras: cinétique, purification et caractérisation des propriétés tensioactives*, 2001, éditeur inconnu.
- [2] Beisson, F., et al. *Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2001. **1531**(1-2): p. 47-58.
- [3] Adlercreutz P., Gitlesen T., Ncube I. & Read J. *Veronia lipase: a plant lipase with strong fatty acid selectivity. Methods Enzymol.*1997, 284, 220-231.
- [4] Hills M.J. & Mukherjee K.D. *Triacylglycerol lipase from rape (Brassica napus) suitable for biotechnological purposes. Appl. Biochem. Biotechnol.*1990, 26, 1-10.
- [5] Fickers, P., J. Destain, and P. Thonart, *Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 2008. **12**(2).
- [6] Tsuchiya T., et al., *Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(26): p. 15362-15367.
- [7] Warden C. et al. *Chromosomal localization of lipolytic enzymes in the mouse: pancreatic lipase, colipase, hormone-sensitive lipase, hepatic lipase, and carboxyl ester lipase. J. Lipid Res.*1993, 34, 1451-1455.
- [8] Canaan, S., et al., *Gastric lipase: crystal structure and activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1999. **1441**(2-3): p. 197-204.
- [9] Miled, N., et al., *Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003. **136**(1): p. 131-138.
- [10] Longhi, S. and C. Cambillau, *Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1999. **1441**(2-3): p. 185-196.
- [11] Martinez, C., et al., *Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. Nature*, 1992. **356**(6370): p. 615-618.
- [12] E. Husson, —*Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique*  
To cite this version : HAL Id : tel-01753057 soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr, || 2018.
- [13] Bianco, M., *Acylation enzymatique de lysine par la lipase B de candida antarctica en solvant CO<sub>2</sub> supercritique et en réacteur à lit fixe: essais préliminaires*, 2017, Université de Lorraine.

- [14] Notion, P. — *Chapitre : 1 Synthèse stéréo sélective* Chapitre : 1 Synthèse stéréo sélective, pp. 1–14.
- [15] Ferrari, F., *Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides: prédiction de la sélectivité de la lipase B de Candida antarctica par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases*, 2014, Université de Lorraine.
- [16] Chandler, I.C., *Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001. **78**(7): p. 737-742.
- [17] Jaeger, K.-E. and M.T. Reetz, *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends in biotechnology*, 1998. **16**(9): p. 396-403.
- [18] Tomasini A., Bustillo G. & Lebeault J. *Fat lipolysed with commercial lipase for the production of Blue cheese flavor. Int. Dairy Prod.* 1993, **3**, 117-127.
- [19] Chamouleau F., Coulon D., Girardin M. & Ghouil M. *Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalysed synthesis in organic media. J. Mol. Catal. B: Enzymatic* .2001, **11**, 949-954.
- [20] Chowdary, G. and S. Prapulla, *The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. Process Biochemistry*, 2002. **38**(3): p. 393-397.
- [21] Xu, Y., et al., *A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. Biotechnology letters*, 2003. **25**: p. 1239-1241.
- [22] Pal, P., D. Bhattacharyya, and S. Ghosh, *Modifications of butter stearin by blending and interesterification for better utilization in edible fat products. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001. **78**(1): p. 31-36.
- [23] Ghazali, H., S. Hamidah, and Y. Che Man, *Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1, 3-specific lipases. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1995. **72**(6): p. 633-639.
- [24] Chen, C., et al., *Interpretation of triacylglycerol profiles of palm oil, palm kernel oil and their binary blends. Food Chemistry*, 2007. **100**(1): p. 178-191.
- [25] Veillet, S. *Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive: Entre Tradition et Innovation*. 2010. Avignon.
- [26] Aparicio, R. and J. Harwood, *Handbook of olive oil* 2013: Springer.
- [27] C.O.I. *Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. Conseil oléicole international*. (2015). COIT.15/NC n° 3/Rév. 8

- [28] Blekas, G., et al., *On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. European Journal of Lipid Science and Technology*, 2002. **104**(6): p. 340-346.
- [29] Benabid, H., *Caractérisation de l'huile d'olive algérienne apports des méthodes chimiométriques. INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES, INATAA*, 2009.
- [30] Alimentarius, C., *Norme codex pour les huiles d'olive vierges et raffinées et pour l'huile de grignons d'olive raffinée. Codex STAN*, 1989: p. 33-1981.
- [31] Daoudi, F. and A. Cherif, *Etude comparative des acides gras de quelques huiles d'olives tunisienne—Influence du procédé technologique d'extraction sur la qualité des huiles obtenues. Revue Française des corps gras*, 1981. **5**: p. 236-245.
- [32] Ruiz-Gutierrez, V., et al., *Composition of human VLDL triacylglycerols after ingestion of olive oil and high oleic sunflower oil. The Journal of nutrition*, 1998. **128**(3): p. 570-576.
- [33] Temime, S.B., et al., *Sterolic composition of Chétoui virgin olive oil: Influence of geographical origin. Food Chemistry*, 2008. **110**(2): p. 368-374.
- [34] Psomiadou, E., M. Tsimidou, and D. Boskou,  *$\alpha$ -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. Journal of agricultural and food chemistry*, 2000. **48**(5): p. 1770-1775.
- [35] Schwartz, H., et al., *Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. Journal of food composition and analysis*, 2008. **21**(2): p. 152-161.
- [36] Samaniego-Sánchez, C., et al.,  *$\beta$ -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. Journal of food composition and analysis*, 2010. **23**(7): p. 671-676.
- [37] Jacotot, B., *L'huile d'olive: de la gastronomie à la santé*. 1993: Artulen.
- [38] Roca, M. and M.I. Mínguez-Mosquera, *Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. Journal of agricultural and food chemistry*, 2001. **49**(2): p. 832-839.
- [39] Cichelli, A. and G.P. Pertesana, *High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. Journal of Chromatography A*, 2004. **1046**(1-2): p. 141-146.
- [40] TANOUTI, K., et al., *Caractérisation d'huiles d'olive produites dans des coopérative pilotes (lakrarma et kenine) au niveau du Maroc Oriental. Les technologies de laboratoire*, 2010. **5**(18).

- [41] El Antari A., El Moudni A. et Ajana H. *Evolution comparative de la qualité et de la composition acide de l'huile d'olive chez quelques variétés méditerranéennes cultivées au Maroc. Olivae*, 2003. 95: 26-31
- [42] Mason, T.J., et al., *Application of ultrasound, in Emerging technologies for food processing*. 2005, Elsevier. p. 323-351.
- [43] McClements, D.J., *Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. Trends in Food Science & Technology*, 1995. 6(9): p. 293-299.
- [44] Suslick, K.S., *The chemical effects of ultrasound. Scientific American*, 1989. 260(2): p. 80-87.
- [45] Flannigan, D.J. and K.S. Suslick, *Inertially confined plasma in an imploding bubble. Nature Physics*, 2010. 6(8): p. 598-601.
- [46] Santos, H.M., Lodeiro, C., and Capelo-Martinez, J.-L. *The Power of Ultrasound. In Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*, Wiley, Darmstadt, Germany (2008).
- [47] Palma, M. and C.G. Barroso, *Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. Analytica Chimica Acta*, 2002. 458(1): p. 119-130.
- [48] Zhang, Z.-S., et al., *Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. Separation and Purification Technology*, 2008. 62(1): p. 192-198.
- [49] Esclapez, M., et al., *Ultrasound-assisted extraction of natural products. Food Engineering Reviews*, 2011. 3: p. 108-120.
- [50] Feng, H., G.V. Barbosa-Cánovas, and J. Weiss, *Ultrasound technologies for food and bioprocessing. Vol. 1*. 2011: Springer.

## **Chapitre 2. Matériels et méthodes**

### 1. Enzymes

#### 1.1. Lipase pancréatique porcine

LPP (*Lipase pancréatique porcine*) catalyse l'hydrolyse des triglycérides aux positions 1 et 3 pour produire des 1,2-diacylglycérols et des 2-acylglycérols respectivement. [1] Cette réaction est cruciale pour de nombreux êtres vivants en raison de son rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses et des lipides. [2] Il existe deux types de lipase pancréatique porcine : A et B. Bien que la lipase A soit active dans un milieu plus acide que la lipase B, les deux enzymes sont pratiquement identiques. Ils ont des masses moléculaires d'environ 45 à 50 kDa et leurs points isoélectriques sont de 4,9 pour la lipase A et 5,0 pour la lipase B [3]. Le pH idéal où la lipase fonctionne le mieux (entre 6,5 et 9,0) varie selon le substrat, mais reste dans la zone légèrement alcaline [4].

#### 1.2. *Candida rugosa* lipase

On a purifié la lipase de *Candida cylindracea* (anciennement appelée *Candida rugosa*) jusqu'à obtenir une poudre homogène. Les triacylglycérols sont hydrolysés par CRL sans particularité de longueur de chaîne. La mesure de l'activité spécifique était effectuée en utilisant la trioléine ou la tributyrine comme substrat à une température de 37 °C et un pH de 8. La CRL est une lipase authentique. L'activation interfaciale de cette enzyme se produit lorsque la tripropionine est utilisée comme substrat [5].

### 2. Réactifs

#### 2.1 Huile d'olive

L'huile d'olive est une huile végétale obtenue à partir des olives en les pressant. Cette huile est riche en Oméga-9 et a de nombreuses propriétés bénéfiques pour notre santé [6].

**Tableau 2.1.** Les propriétés physico-chimiques d'huile d'olive [6].

<b>Indice d'acide</b>	<b>0.3-1.02</b>
<b>Etat physique</b>	Liquide
<b>Masse molaire</b>	g/mol
<b>Point de Solidification</b>	-3 °C
<b>Point d'ébullition</b>	300 °C
<b>Masse volumique</b>	0,914–0,918 g cm <sup>-3</sup>

### 2.2 Glycérol

Également connu sous le nom de glycérine, le glycérol est un polyalcool avec la formule  $C_3H_8O_3$ . Il est présent dans la nature dans toutes les huiles et graisses animales ou végétales, et il est également inclus dans de nombreux produits cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques. Le glycérol sert de source d'énergie pour l'organisme. La glycérine est un liquide visqueux, transparent, incolore, inodore et légèrement sucré. Malgré son point de fusion de  $17,8\text{ }^\circ\text{C}$ , elle présente un phénomène de surfusion et ne se solidifie qu'après un refroidissement prolongé [7].

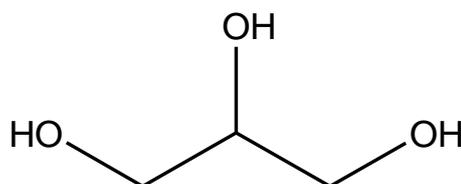


Figure 2.1. Structure de glycérol.

Tableau 2.2. Les propriétés physico-chimiques de glycérol [7].

La formule brute	$C_3H_8O_3$
Etat physique	Liquide
Masse molaire	92.09 g/mol
Point de Solidification	$18.2\text{ }^\circ\text{C}$
Point d'ébullition	$290\text{ }^\circ\text{C}$
Masse volumique	$1.2604\text{ g cm}^{-3}$
Solubilité	Dans l'eau à $25^\circ\text{C}$

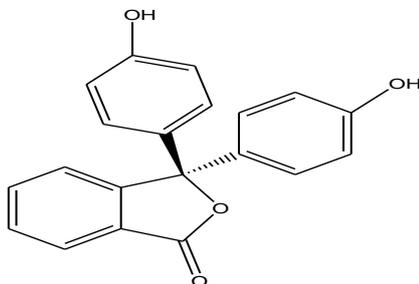
### 2.3 Les solvants

Tableau 2.3. Propriétés physiques des solvants utilisés

Solvants	Formule	Masse molaire	Point de Solidification	T° ébullition	Densité
Ethanol	$C_2H_6O$	46.07g/mol	$-114.1\text{ }^\circ\text{C}$	$78.37\text{ }^\circ\text{C}$	$789\text{ Kg/m}^3$
Chloroforme	$CHCl_3$	119.38g/mol	$-63.5\text{ }^\circ\text{C}$	$61.2\text{ }^\circ\text{C}$	$1.49\text{Kg /Cm}^3$

### 2.4 Phénolphtaléine

La phénolphtaléine est fréquemment utilisée comme indicateur des titrations acide-base. Avec le rouge de méthyle, le bleu de bromothymol et le bleu de thymol, il sert également d'indicateur universel.



**Figure 2.3.** Structure de la phénolphtaléine.

**Tableau.2.4.** Les propriétés physico-chimiques de La phénolphtaléine[8]

<b>La formule brute</b>	<b><math>C_{20}H_{14}O_4</math></b>
<b>Etat physique</b>	Liquide
<b>Masse molaire</b>	318.322 g/mol
<b>Point de fusion</b>	258 à 263 °C
<b>Masse volumique</b>	1.299 $g\ cm^{-3}$
<b>Solubilité</b>	Dans l'eau

### 2.5 Tamis moléculaire

Tamis moléculaire a été découvert en 1756, date à laquelle le mot zéolithe a été utilisé pour décrire un matériau solide dont la partie d'eau pouvait être extraite par chauffage. J.W. McBain a créé le terme "tamis moléculaire" pour décrire un matériau solide et poreux qui possède la capacité d'agir comme un tamis moléculaire. C'est une classe d'adsorbant capable de retenir certaines molécules à l'intérieur de ses pores. Dans l'idéal, il a des pores de petite taille répartis de manière uniforme. Par conséquent, il possède une grande surface spécifique [9].

## 3. Matériels

### 3.1 Agitateur magnétique

Un agitateur magnétique est une méthode couramment employée dans les laboratoires qui implique la rotation d'un aimant ou d'un électroaimant fixe, ce qui génère un champ magnétique

orienté. Il s'agit d'un appareil utilisé pour créer une barre d'agitation, immerger dans un liquide, tourner rapidement, ou agiter ou mélanger une solution, entre autres. En général, un système de chauffage est inclus dans un système d'agitation magnétique afin de chauffer le liquide [10].



**Figure 2.4.** Agitateur magnétique.

### 3.2 Bain à ultrason

Les ultrasons représentent des ondes sonores similaires aux sons audibles, mais elles dépassent le spectre audible par les êtres humains. Ce spécialiste en applications estime que la limite maximale de l'audition humaine est d'un peu moins de 20 kHz (16 kHz) et tout ce qui dépasse cette fréquence est considéré comme ultrason. Ce seuil peut différer d'une personne à l'autre et tendance à diminuer avec l'âge, mais la définition des ultrasons demeure inchangée. Les ultrasons peuvent atteindre des fréquences de plusieurs gigahertz (GHz), même si les applications pratiques se situent principalement dans la plage de 20 kHz à quelques centaines de MHz [11].



**Figure 2.5.** Bain à ultrasons.

### 4. Réactions enzymatiques

#### 4.1. Réactions sous agitation

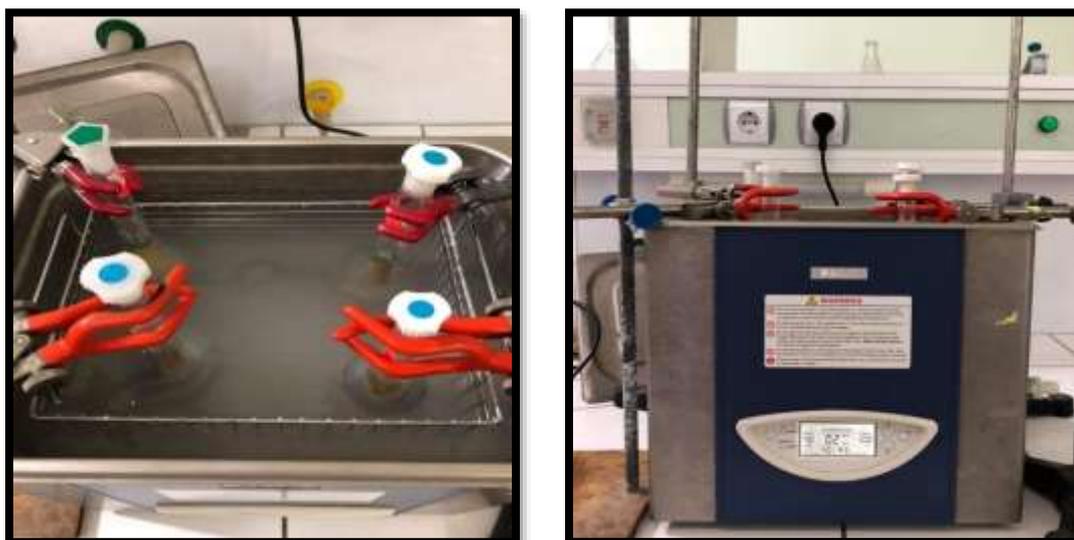
On met 10ml d'huile d'olive, 1ml de glycérol et 1g de tamis moléculaire dans un ballon de 50ml, en agitant magnétiquement à une température de 35 °C. La réaction commence en ajoutant 0,5 g de lipase (*lipase de Candida rugosa* CRL ou *lipase pancréatique de porc* LPP). Une autre réaction est réalisée dans les mêmes conditions, sans glycérol.



**Figure 2.6.** Réaction d'estérification sous agitation magnétique.

#### 4.2. Réactions sous ultrasons

Les mêmes réactions précédentes ont été refaites sous ultrasons. L'ultrason que nous avons utilisé c'est un Bain à ultrasons avec chauffage, multifréquence et puissance réglable (FALC INSTRUMENTS, MOD : LBS2 10Lt, SR.N° : B110547, ANNO/YEAR : 2011).



**Figure.2.7.** Réaction d'estérification sous ultrason

### 5. Caractéristiques physico-chimiques d'huile d'olive

#### 5.1. Indice d'acidité

##### a. Définition

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de sodium nécessaires pour neutraliser les acides libres dans un gramme de corps gras [12].

Le principe consiste à neutraliser les acides libres par une solution alcoolique D'hydroxyde de Sodium titrée.

##### Mode Opérateur

On met 1g d'huile d'olive dissoute dans 50 ml du mélange éthanol/chloroforme (V/V). Après on titre le mélange par une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 N en présence avec 2 gouttes solution de phénolphtaléine à 1% jusqu'au au virage.

$$I \text{ Acidité } \% = \frac{V \times C \times M}{10 \times m} \times 100$$

#### 5.2.Potentiel d'hydrogène (pH)

##### a. Définition

Le pH donne une indication sur l'acidité ou l'alcalinité du milieu, il est déterminé à partir de la quantité d'ions d'hydrogènes libres (H) contenue dans l'huile d'olive [13].

##### Mode opératoire

Avant d'effectuer cette mesure, le pH-mètre a été préalablement étalonné par des solutions tampons pH7 et pH4. Un volume suffisant d'huile d'olives est mis dans un Erlenmeyer, la sonde du pH-mètre est plongée dans l'échantillon et la valeur de pH affichée directement sur l'appareil [14] (pH-mètre modèle Ohaus Corporation 2011) a été lue

### 6. Analyse par chromatographique phase gazeuse

#### 6.1. Définition et principe

La technique de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) consiste à séparer divers mélanges gazeux ou vaporisés dans un four à une température régulée. Elle repose sur la dispersion des éléments d'un mélange entre une phase mobile (gaz porteur) et une phase stationnaire (colonne chromatographique) [15].

## **6.2. Mesure**

L'analyse de réaction d'estérification a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (**Hewlett Packard Agilent 6890 plus**) couplée à la spectrométrie de masse (**Hewlett Packard Agilent 5973**)

Les conditions d'analyse utilisées pour identifier les produits sont :

- **Injecteur**

Température : 250°C

Mode d'injection : Split 1/20

Volume injecté : 1µl

- **Colonne**

Type : HP-5MS

Dimensions : long 30 m \* D int 0.25 mm \* épaisseur film 0.25 µm

Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. (Autre : Spécifier)

- **Température du four**

70°C pendant 5 min, 10°C/min jusqu'à 130°C., isotherme pendant 2min., 3°C/min jusqu'à 220°C, isotherme pendant 4 min, 10°C/min jusqu'à 280°C., isotherme pendant 5 min.

Durée d'analyse : 58 min

Gaz vecteur : Hélium pureté : N6 ; Débit GV : 0.6 ml/min

- **Détecteur de masse**

Mode d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550)

## *Chapitre 2 : matériels et méthodes*

---

Délai du solvant : 3.5min

Température de l'interface : 280 °C

Type d'ionisation : Impact électronique

Intensité du filament : 70 év

Type de l'analyseur de masse : Quadripôles

Température de la source : 230 °C



- [1] Voet, D., et Voet J.G. «Les mécanismes de l'action enzymatique». Biochimie 2• édition, (G.Rousseau et L. Domenjoud Trad.) .2005 .p. 457-496, Bruxelles : De Boeck Université.
- [2] Fickers, P., J. Destain, and P. Thonart, Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. Biotechnologie, agronomie, société et environnement, 2008. 12(2).
- [3] Brokerhoff, H., a. J., RG, Lipolytic Enzyme. 1974, Academic Press, New York.
- [4] Best, C.H. et N.B. Taylor. «Pancreas, liver and bili ary system». In The physiological basis of medical practice (Taylor N.B., Ed.),1961. p. 629-661, Baltimore: The Williams & Wilkins company.
- [5] Mtibaa, H., et al., La lipase de Candida rugosa: caractérisation biochimique. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 2002. 9(1): p. 43-47.
- [6] Codex, A., T. F. O. Intergovernmental, and FOODS DERIVED FROM BIOTECHNOLOGY. "Joint FAO/WHO Food Standard Programme Codex Alimentarius Commission Twenty-Fourth Session Geneva, 2-7 July 2001." Codex (2001).
- [7]<https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/chimie-glycerol-3534/>  
03/02/ 2024 16 :12
- [8][https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Phenolphthalein,MDA\\_CHEM-107233?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Phenolphthalein,MDA_CHEM-107233?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F) 03/02/2024 17:00
- [9] <https://www.propagroup.fr/fr/p-533/faq/tamis-moleculaire> 03/02/ 2024 16 :34
- [10] Loos, M., Processing of polymer matrix composites containing CNTs. Carbon Nanotube Reinforced Composites: CNR Polymer Science and Technology, 2015: p. 171-188
- [11] <https://queveutdire.com/technologie/ultrason-definition/> 07/06/2024 19 :47
- [12] Lion, P., Travaux pratiques de chimie organique. (No Title), 1961.
- [13] Audigié, C., J. Figarella, and F. Zonszain, Manipulations d'analyse biochimique. 1986: Doin éditeurs.
- [14] Idoui, T., Physical and chemical characteristics of a local Jijel's olive oils. Nature & Technology, 2013(8): p. 13A.
- [15] <https://fr.airliquide.com> 09 juin 2024

## **Chapitre 3. Résultats et discussion**

### 1. Introduction

Les lipases sont des enzymes qui catalysent la dégradation des lipides en glycérol et en acides gras. L'application des lipases sur l'huile d'olive peut avoir plusieurs effets, notamment dans le cadre de la production d'huile d'olive aromatisée, de l'hydrolyse des triglycérides, ou encore de la modification des propriétés sensorielles de l'huile, les lipases peuvent être utilisées pour aromatiser l'huile d'olive en catalysant la libération de composés aromatiques à partir de précurseurs présents dans l'huile.

Aussi peuvent influencer les propriétés sensorielles de l'huile d'olive en modifiant sa composition en acides gras. Cela peut affecter le goût, l'odeur et la texture de l'huile.

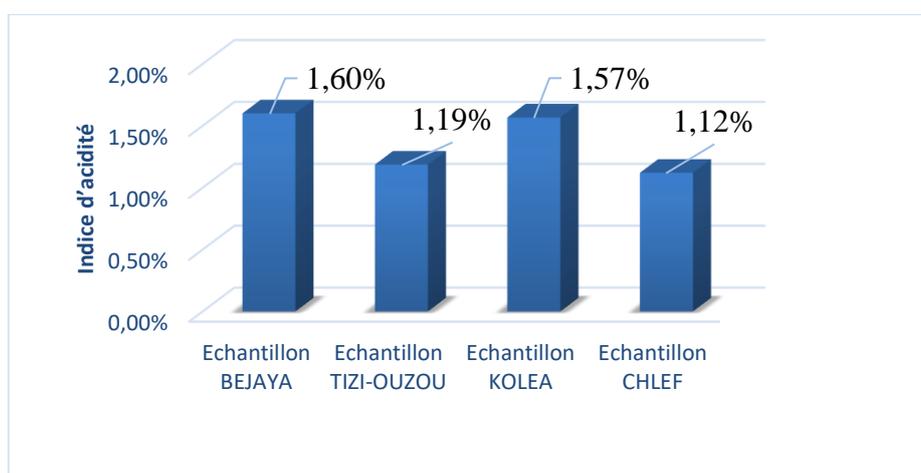
Dans certaines applications, l'utilisation contrôlée de lipases peut améliorer la qualité de l'huile d'olive en favorisant certaines réactions biochimiques, par exemple en réduisant la teneur en acides gras libres ou en améliorant la clarté de l'huile.[1]

### 2. Caractéristiques physico-chimiques d'huile d'olive

#### 2.1. Indice d'acidité

L'acidité libre est un paramètre qui permet de contrôler le niveau de dégradation hydrolytique, enzymatique ou chimique des chaînes d'acides gras des triglycérides en acides gras libres et de glycérides partielles, suite à un mauvais traitement ou à une Mauvaise conservation. [2]

L'acidité libre est un facteur de qualité de l'huile d'olive. Il renseigne sur l'altération de celle-ci par l'hydrolyse de certains composés [3]. Nos résultats de l'indice d'acidité sont représentés dans la figure 3.1



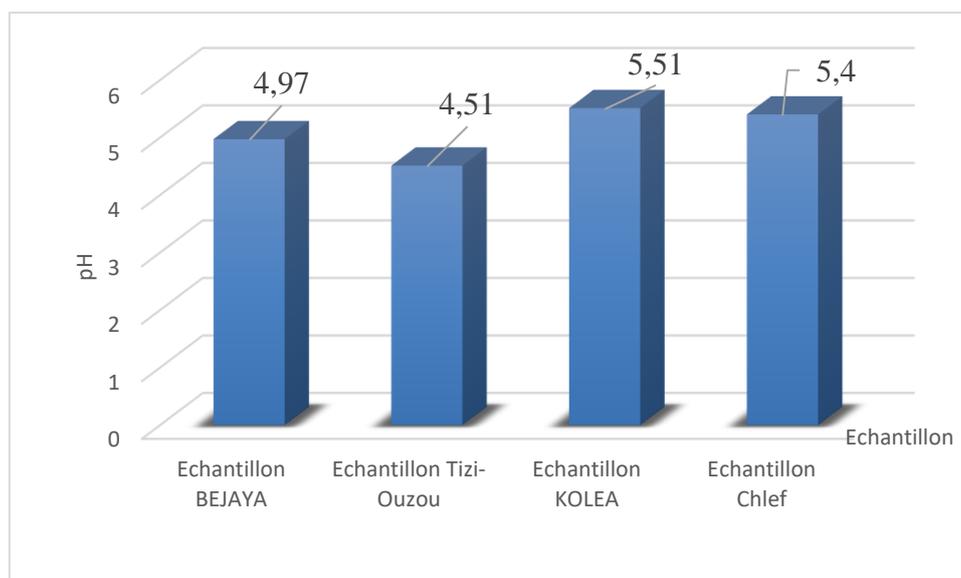
**Figure 3.1.** Variation d'acidité libre des échantillons d'huile d'olive étudiée

D'après les normes du Conseil Oléicole International de 2015 concernant l'acidité libre, on constate que les échantillons provenant de la région Nord Algérienne (Béjaïa), (Tizi-Ouzou), (Kolea) et (Chlef) restent dans les limites établies par le COI. Le résultat, soit (1,6 %), (1,186 %), (1,567 %) et (1,12 %), permet de les classer dans la catégorie des huiles d'olives vierges courantes, car leur acidité est inférieure à 3,3 % et supérieure à 0,8% [4] .

### 2.2.Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH fournit une indication sur l'acidité ou l'alcalinité d'un milieu, et il est déterminé à partir de la quantité d'ions d'hydrogène libre présents dans l'huile d'olive [5].

Les données recueillies par le potentiel en ions hydrogène sont consignées dans la Figure 3.2



**Figure 3.2.** Variation du potentiel de l'hydrogène (pH) des échantillons d'huiles d'olive avant réaction

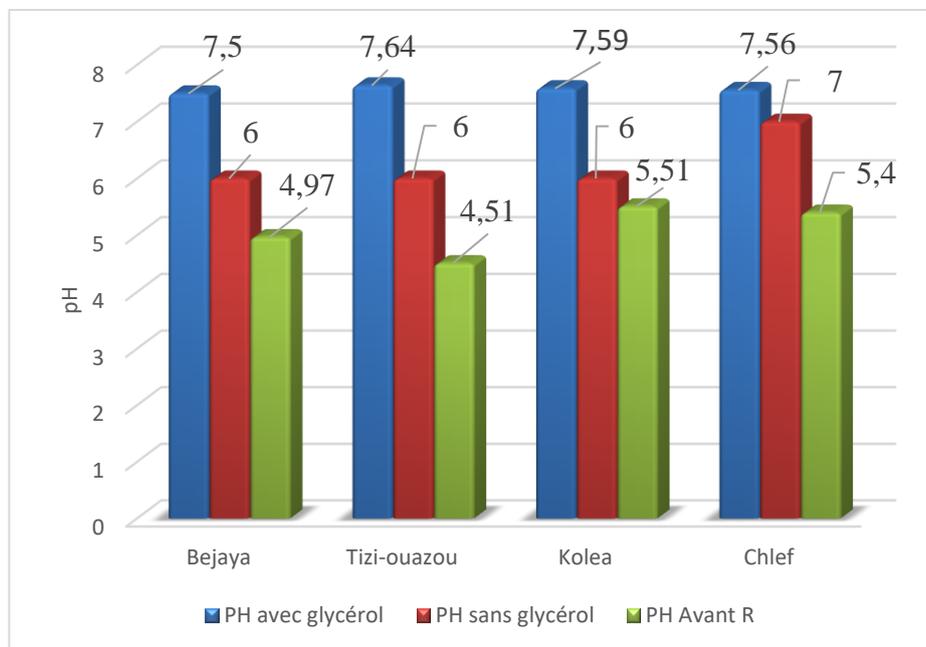
Le pH des huiles d'olive étudiées varie entre 4,51 pour la zone de Tizi-ouzou, 4,97 pour la zone de Bejaya, 5,4 pour la zone de Chlef et 5,51 pour la zone de Kolea cela signifie que pH est acide.

### 3. Réactions enzymatiques

L'objectif principal de cette réaction d'estérification par lipase est de déterminer les conditions optimales pour l'estérification de l'huile d'olive par la lipase. Cela implique de prendre en compte plusieurs paramètres clés, tels que la température, le pH, en présence de CRL ou LPP,

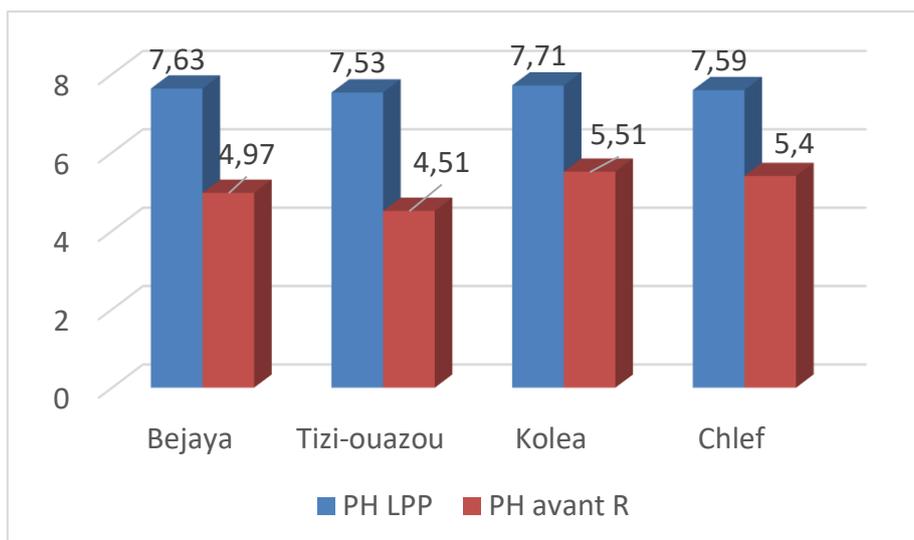
sous agitation magnétique et sous ultrasons. Les résultats de cette étude ont été rassemblés dans la figure suivants :

#### a. Réactions sous agitation



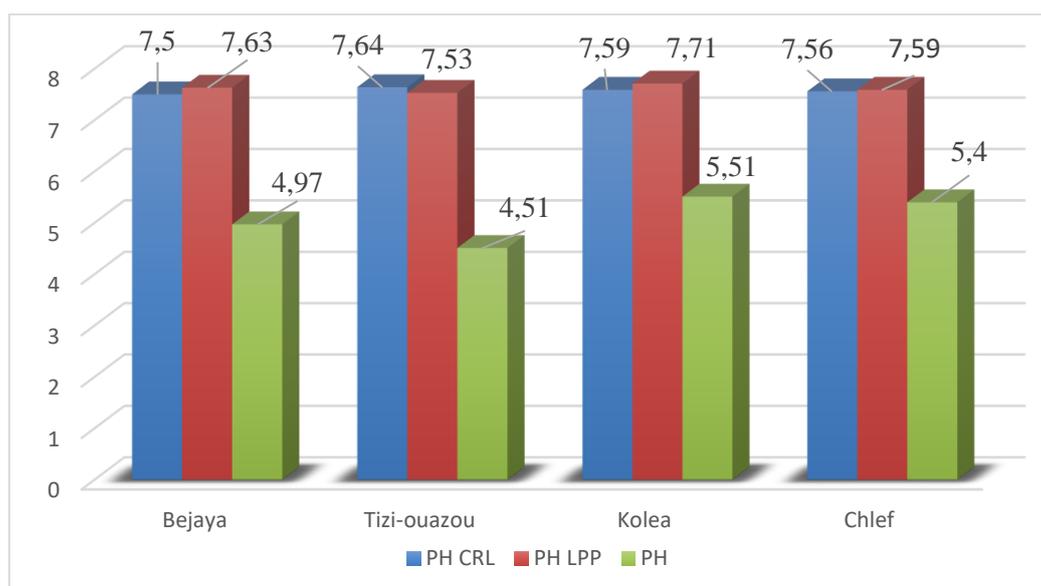
**Figure 3.3.** Réactions d'estérification sous agitation magnétique catalysées par CRL

Les résultats affichés figurent 3.3 illustrent la variation du potentiel d'hydrogène (pH) des échantillons avant après la réaction d'estérification sous agitation magnétique catalysée par la lipase CRL et aussi la réaction enzymatique sans glycérol. Le pH des huiles d'olive avant la réaction varie entre 4,51 pour la zone de Tizi-Ouzou, 4,97 pour la zone de Bejaya, 5,4 pour la zone de Chlef et 5,51 pour la zone de Kolea cela signifie que pH est acide. Après la réaction le pH augmente a 7.64 pour Tizi-Ouzou, 7.5 pour Bejaya, 7.56 pour Chlef et 7.59 pour Kolea. Pour la réaction sans glycérol a était long dans les 4 échantillons, le pH est passé à 5 au 6, et cela a pris 5 heures, sauf la zone de Chlef le pH passé à 5 au 7 en incluant le glycérol, réactif limitant de la réaction.



**Figure 3.4.** Réactions d'estérification sous agitation magnétique catalysées par LPP

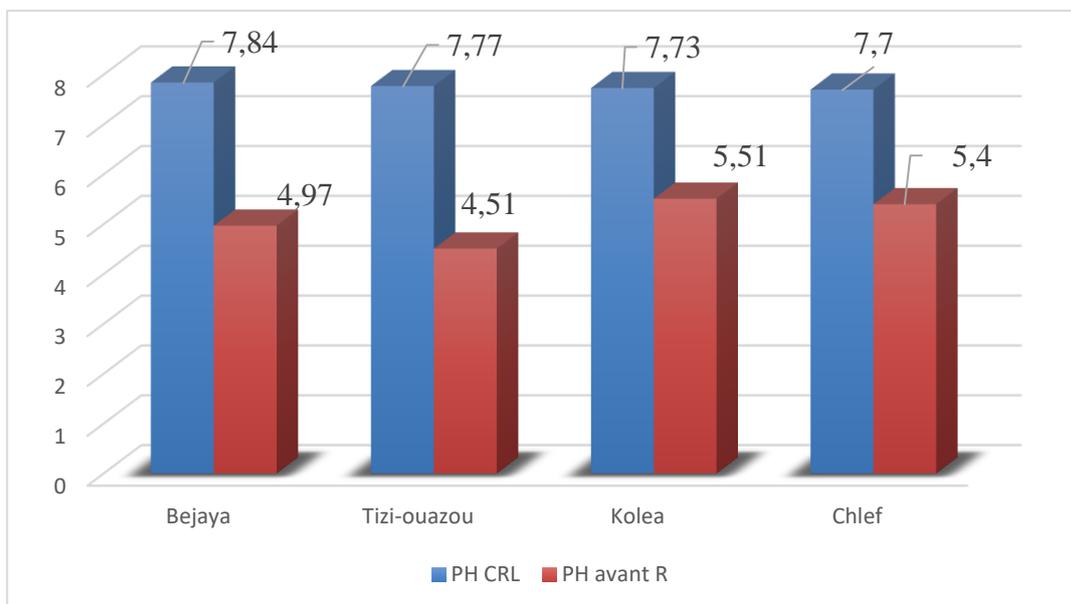
Les résultats affichés dans la figure 3.4 illustrent la réaction d'estérification catalysée par la lipase LPP sous agitation magnétique. Au début de la réaction, le pH de la solution était de varier entre 4 et 5 dans les 4 échantillons, ce qui indique un milieu légèrement acide. En conséquence, le pH augmente progressivement, atteignant finalement 7.63 pour Bejaya, 7.53 pour Tizi-ouazou, 7.71 pour kolea et 7.59 pour la zone de Chlef indiquant un milieu neutre. Ce changement de pH reflète la diminution de l'acidité, et le progrès de la réaction d'estérification vers son état d'équilibre.



**Figure 3.5.** Comparaison d'estérification des lipases sous agitation magnétique

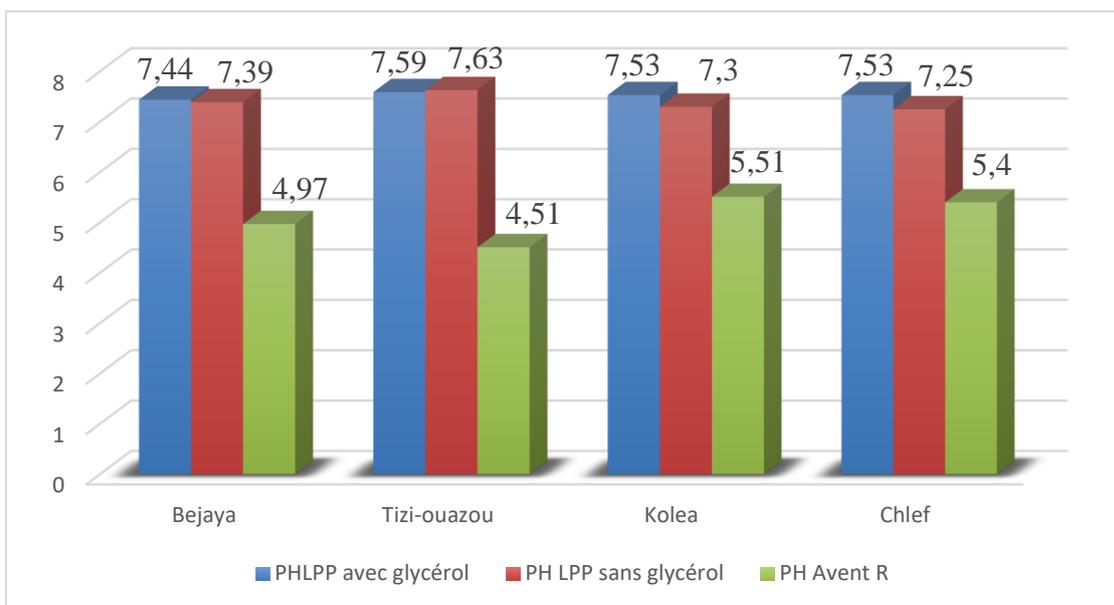
D'après les résultats obtenus Lors de la comparaison des réactions d'estérification sous agitation magnétique catalysées par deux types de lipases LPP et CRL les deux réactions ont abouti à un pH final de 7, indiquant que les deux enzymes ont conduit à un milieu neutre en fin de réaction.

#### b. Réactions sous ultrasons



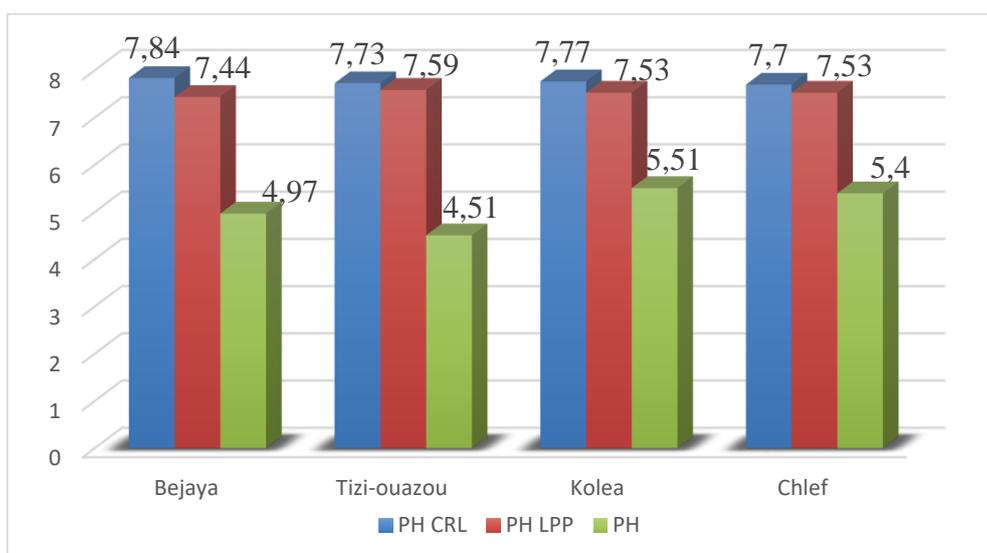
**Figure 3.6.** Réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par CRL

La réaction d'estérification catalysées par la lipase de *Candida rugosa* (CRL) sous ultrasons débutent avec un pH de 5, indiquant un milieu acide. Les ultrasons, grâce à leurs effets de cavitation acoustique, augmentent significativement l'efficacité de la réaction par rapport à l'agitation classique. Nous allons vu une augmentation du pH à 7, dans les 4 échantillons signalant un milieu neutre.



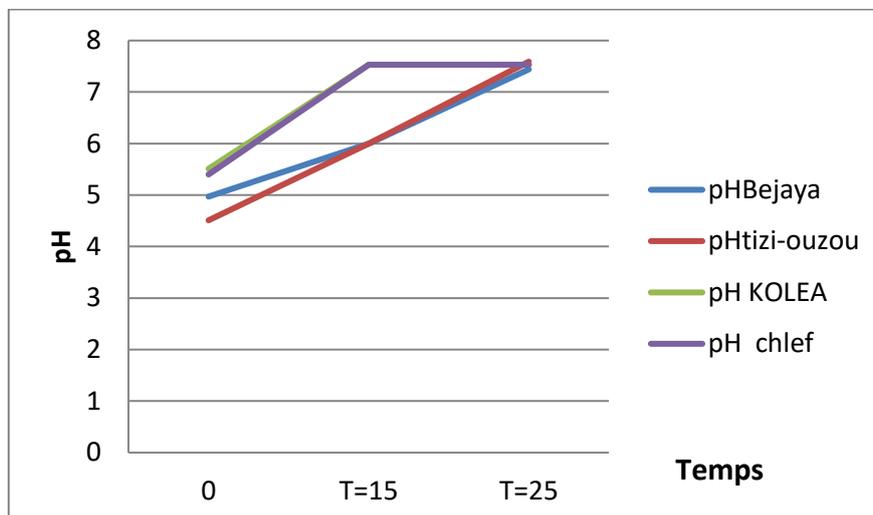
**Figure 3.7.** Réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par LPP

La réaction d'estérification catalysées par les lipases en poudre (LPP) sous ultrasons montrent une efficacité notable, tant en présence qu'en absence de glycérol. Initialement, le pH de la solution était varié entre 4 et 5, indiquant un milieu acide. L'application des ultrasons améliore la dispersion des réactifs et l'efficacité de la catalyse enzymatique. En présence de glycérol, qui peut agir comme un stabilisant enzymatique, la réaction progresse efficacement, tout comme sans glycérol. Dans les deux cas. Une augmentation du pH à 7, indiquant un milieu neutre en fin de réaction. La présence ou l'absence de glycérol n'affecte pas la capacité des ultrasons à accélérer la réaction.

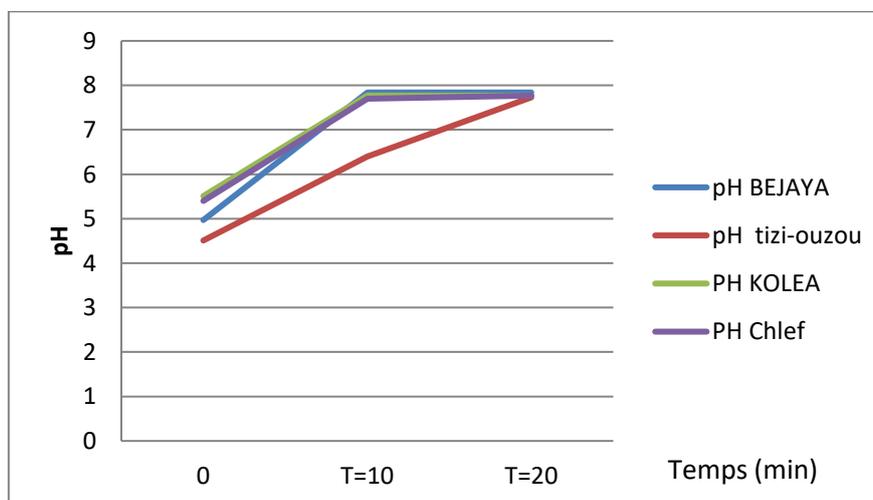


**Figure 3.8.** Comparaison d'estérification des lipases sous Ultrasons

D'après les résultats obtenus de la comparaison des réactions d'estérification sous ultrasons catalysées par les deux lipases CRL et LPP, révèle une différence notable en termes de vitesse de réaction. Bien que les deux types de lipases atteignent un pH final de 7, signifiant une progression similaire de la réaction vers la neutralité.



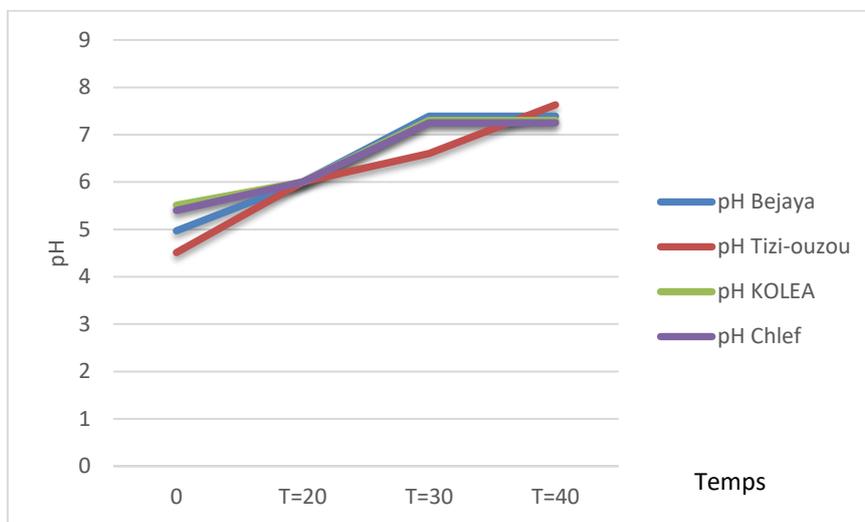
**Figure 3.9.** Comparaison de Temps de réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par LPP



**Figure 3.10.** Comparaison de Temps de réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par CRL

En comparant les réactions d'estérification sous ultrasons catalysées par les deux lipases CRL et LPP, on observe une différence significative en ce qui concerne la vitesse de réaction. Malgré le pH final de 7 des deux types de lipases, la CRL se démarque par une cinétique plus rapide, grâce à ses propriétés catalytiques intrinsèquement plus puissantes, ce qui entraîne une

formation plus rapide des esters par rapport aux LPP. La CRL sous ultrasons présente une efficacité accrue, ce qui en fait une option plus performante pour les applications qui requièrent des temps de réaction réduits.

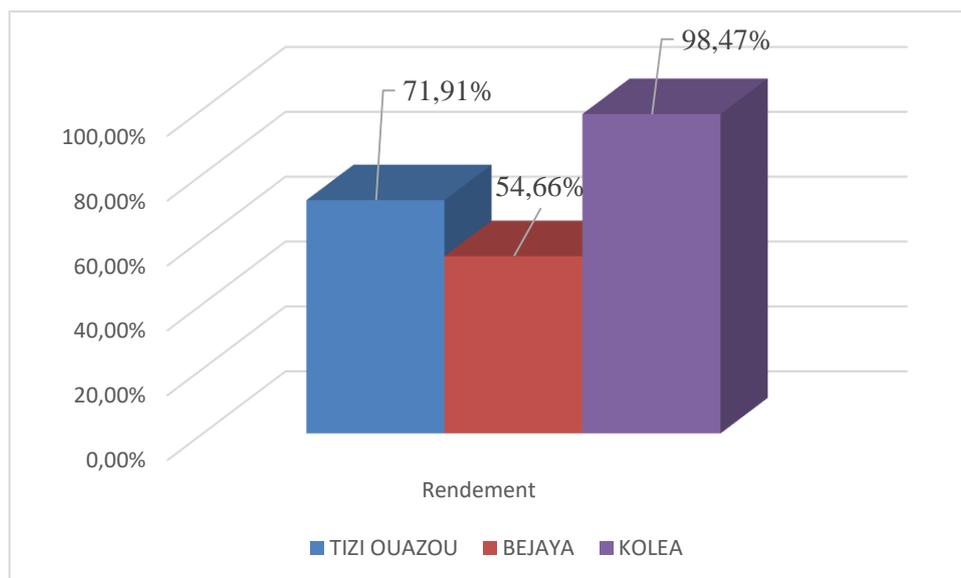


**Figure 3.11.** Comparaison de Temps de réactions d'estérification sous Ultrasons catalysées par CRL sans Glycérol

Une efficacité remarquable est observée en comparant les temps de réactions d'estérification sous ultrasons catalysées par la lipase de *Candida rugosa* (CRL) sans glycérol. La réaction atteint un pH neutre de 7 dans les 4 échantillons mais la zone de Tizi-ouazo la réaction a été long par rapport à les autres grâce à leur acidité. Les ultrasons permettent d'améliorer considérablement le taux de réaction en favorisant une interaction plus efficace entre les réactifs et l'enzyme

#### 4. Résultat de l'analyse de CPG :

Nous avons employé cette méthode d'analyse à la fin de la réaction d'estérification sous ultrasons catalysée par les LPP. Ainsi, nous avons calculé le rendement et l'avons présenté dans la **figure 3.12**.



**Figure 3.12.** Les rendements d'estérification sous Ultrasons catalysées par LPP

#### 5. Conclusion

Les résultats obtenus après la réaction d'estérification de l'huile d'olive avec une lipase comme catalyseur montrent une grande efficacité du processus. Tous les paramètres étudiés ont montré une amélioration, ce qui suggère une baisse de l'acidité de nos échantillons. En outre, la réaction de la CRL a été plus rapide que celle de la LPP. Les avantages des ultrasons en tant qu'outil rapide par rapport à l'agitation classique ont également été mis en évidence dans cette étude, ces derniers ayant un effet intéressant sur l'activité des lipases.

Par ailleurs, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) a mis en évidence un pic important correspondant aux esters créés. Le rendement global de la réaction a été élevé, ce qui suggère une conversion efficace des triglycérides en esters.

## Références bibliographiques

- [1] Han, D. and J.S. Rhee, *Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT–isooctane reversed micelles. Biotechnology and bioengineering*, 1986. 28(8): p. 1250-1255.
- [2] TANOUTI, K., et al., *Caractérisation d’huiles d’olive produites dans des coopérative pilotes (lakrarma et kenine) au niveau du Maroc Oriental. Les technologies de laboratoire*, 2010. 5(18).
- [3] Achouri Y. et CharikhK.(2007). *Analyses physico-chimiques de deux huiles finies au niveau de CO.G.B-Labelle /UP 07. Thèse d’ingénieur, université Abderrahmane mira, Bejaia, 2007.p36.*
- [4] C.O.I. *Norme commerciale applicable aux huiles d’olive et aux huiles de grignons d’olive. Conseil oléicole international,2015. COI/T.15/NC n° 3/Rév. 8*
- [5] Audigié C.I, Figarella J, Zonszain F (1984). *Manipulations d'analyse biochimique, Doin Editeurs, Paris, France,1984. p 274*

# **Conclusion générale**

### **Conclusion générale**

Notre projet de fin d'étude a porté sur la valorisation de l'huile d'olive de la région nord algérienne par voie enzymatique, utilisant des lipases en raison de leur potentiel à améliorer la qualité cette huile. Les lipases sont des enzymes qui catalysent les réactions de transestérification, permettant ainsi la modification des triglycérides présents dans l'huile. Les propriétés catalytiques des lipases semblent avoir favorisé des modifications spécifiques de la composition de l'huile, entraînant des améliorations notables. Ces résultats suggèrent que l'introduction de ce catalyseur peut être une stratégie prometteuse pour valoriser l'huile d'olive, ouvrant ainsi la voie à des applications industrielles plus larges. Toutefois, des études supplémentaires, y compris des analyses approfondies des propriétés organoleptiques, des aspects économiques et des considérations réglementaires, sont nécessaires pour évaluer pleinement l'impact et la viabilité de cette approche.

Notre travail est structuré en trois chapitres principaux. Le premier chapitre présente une étude bibliographique en trois parties. La première partie aborde des informations générales sur les lipases, leur mécanisme d'action, leurs caractéristiques de sélectivité, ainsi que leurs applications. La deuxième partie traite de la définition de l'huile d'olive, de sa classification, de ses caractéristiques physico-chimiques et de sa composition chimique. Dans la troisième partie, nous présentons des informations générales sur les ultrasons et les facteurs qui peuvent influencer leur utilisation.

Les deuxièmes et troisièmes chapitres détaillent notre recherche pratique, au cours de laquelle nous avons déterminé l'indice d'acidité et le potentiel hydrogène (pH) de nos échantillons d'huile d'olive. Nous avons ensuite réalisé des réactions enzymatiques en utilisant deux méthodes d'agitation (classique et ultrasons) et deux types de catalyseurs (LPP et CRL). Une amélioration a été observée dans tous les paramètres étudiés, indiquant une diminution de l'acidité de nos échantillons. De plus, la CRL a montré une vitesse de réaction supérieure à celle de la LPP. Cette étude a également mis en lumière les avantages des ultrasons comme outil rapide par rapport à l'agitation classique, ces derniers ayant un impact intéressant sur l'activité des lipases.

Les perspectives pour l'industrie oléicole sont très prometteuses en ce qui concerne la valorisation de l'huile d'olive par voie enzymatique à l'aide de lipases. Cette approche permet d'améliorer la qualité et le rendement de l'huile d'olive tout en favorisant un processus de production plus durable et respectueux de l'environnement.