

LIPIDES ET BIOTECHNOLOGIES

Lipophilisation des protéines biocatalysées par des lipases ; cas des isolats de protéines de soja

[Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 4, Numéro 4, 284-9, Juillet - Août 1997, Dossier : Lipides et cosmétologie](#)

■ [Résumé](#) 🇬🇧 [Summary](#)

Auteur(s) : Coralie ROUSSEL, Michel PINA, Jean GRAILLE, Alain HUC, Eric PERRIER, .

Résumé : La lipophilisation par biocatalyse a été effectuée sur des isolats de protéines de soja, riches en lysine. Les réactions ont été conduites à 60°C avec et sans solvant en mettant en œuvre une lipase fixée (lipozyme) ou libre (lipase S de *Rhizopus arrhizus*) en faisant réagir les protéines avec une série d'acides gras libres (AGL) de différentes longueurs de chaîne. Une méthode se basant sur la proportion de lysines N-epsilon-acylées par les acides gras libres par rapport aux résidus lysine disponibles des protéines a été mise au point pour estimer le taux de greffage covalent. Des taux de 60%, 33% et 42% sont obtenus pour la réaction catalysée par le lipozyme en milieu exempt de solvant, avec respectivement l'acide caprique, l'acide laurique et l'acide oléique. Un taux de 50% est obtenu pour la réaction catalysée par la lipase S en présence de tertiobutanol avec un mélange acide palmitique/acide stéarique.

Mots-clés : lipophilisation, biocatalyse, lipases, protéines, soja.

[Illustrations](#)

ARTICLE

Introduction

Le terme de lipophilisation se réfère au phénomène général de l'augmentation de l'hydrophobicité de molécules, par exemple de protéines modifiées par greffage de synthons lipidiques avec, pour conséquence, une augmentation de leur affinité pour les composés apolaires [1-4] ; ces modifications de structure entraînent des changements de leurs propriétés physico-chimiques et en particulier de leurs propriétés de surface, telles que les propriétés émulsifiantes et moussantes. Jusqu'à présent, ces transformations ont été conduites par voie chimique en mettant en œuvre le plus souvent des chlorures d'acides, des anhydrides ou des esters activés d'acides gras [5-8]. Actuellement, l'intérêt grandissant suscité par la biocatalyse appliquée à ces mêmes réactions, quand celles-ci sont possibles, se justifie par l'obtention de produits à connotation naturelle, très prisés notamment en cosmétique. À notre connaissance, la présente approche, basée sur l'acylation des résidus lysine, est originale ; la liaison amide est très stable chimiquement, tant en termes de résistance thermique qu'en termes de pH extrêmes comme déjà décrit par Ajinomoto pour la lauryllysine, fabriquée chimiquement et connue sous le nom d'Amihope LL et qui est considérée comme un «talc organique» déjà utilisé dans la poudre de beauté.

Historiquement, la liaison amide a été formée en synthèse peptidique en mettant en œuvre des protéases [9-11] ; mais la liaison peptidique obtenue en milieu aqueux est elle-même hydrolysée par les enzymes qui la génèrent et on tend vers un équilibre. De plus, ces enzymes ont une faible stabilité dans les environnements pauvres en eau ; il a donc été recherché d'autres biocatalyseurs ne possédant pas d'activité protéolytique en milieu aqueux mais stables en présence d'une phase aqueuse très limitée.

Les biocatalyseurs pouvant répondre à ces critères sont les lipases, connues désormais pour catalyser des réactions de synthèse dans des conditions réactionnelles particulières et notamment en milieu non aqueux. Testée efficacement pour synthétiser de nouveaux peptides [12], la première approche de transfert de chaînes grasses biocatalysée par une lipase sur un atome d'azote a été rapportée par Inada *et al.* [13]. Toute une série de travaux faisant intervenir ce type de biocatalyse a été décrite [14-19], la plus proche de celle que nous allons mettre en œuvre consistant à biocatalyser la synthèse de N-epsilon-acyllysines en opposant de la lysine à une série d'acides gras en présence d'une lipase fixée [20]. C'est sur ce principe que nous avons abordé l'incorporation par greffage covalent de chaînes grasses sur la fonction NH₂ des résidus lysine des protéines de soja, en vue d'en diminuer le caractère hydrophile et par conséquent d'en augmenter le pouvoir lipophile.

Matériels et méthodes

Matériels

* Biocatalyseurs

Deux lipases commerciales ont été mises en œuvre : le lipozyme (Novo Nordisk A/S) (lipase 1-3 spécifique de *Mucor miehei* fixée sur une résine macroporeuse échangeuse d'anions) nécessitant une séparation en fin de réaction et la lipase S (lipase 1-3 spécifique de *Rhizopus arrhizus*) qui se présente sous forme de poudre non fixée ne nécessitant pas de séparation en fin de réaction et pouvant s'intégrer, après dénaturation, dans la fraction protéique du produit final.

* Réactifs

L'acide caprique (Sigma), les acides laurique, palmitique et stéarique (AK_{zo}), les acides heptadécanoïque et undécylénique (Merck) sont des réactifs de pureté supérieure à 99%. L'acide oléique technique (Prolabo) à 77,8% de pureté a une masse molaire moyenne de 277,1. Le tertio-butanol (Aldrich) est d'une pureté de 98%.

* Isolats de protéines de soja (IPS)

Les isolats de protéines de soja sont fournis par la société SOGIP Protéines Végétales. Ces isolats contiennent 92% de protéines constituées de 15 à 20% d'albumines et de 80 à 85% de globulines. Elles contiennent 5,6% en poids de lysine (384 μmoles/g de protéines) et 7,8% d'eau ; leurs solutions à 5% dans l'eau à 20°C ont un pH compris entre 6,6 et 7,4. La composition pondérale par rapport à la matière sèche s'exprime :

Protéines (N x 6,38) 92,0%

Glucides 0,6%

Cendres 6,6%

Lipides 0,8%

Conditions de la réaction de lipophilisation

La réaction consiste à faire réagir les acides gras libres aux isolats de protéines de soja en présence d'une lipase avec ou sans solvant. Les réactions sont réalisées dans des flacons en verre de 25 ml, bouchés hermétiquement, avec une agitation magnétique dans une étuve thermorégulée. Les réactions conduites à l'échelle du kg sont réalisées dans des réacteurs sphériques de capacité totale de 2 litres, maintenus dans un bain d'huile minérale thermorégulé à 60°C. L'agitation est assurée par une ancre, à la vitesse de 150 tours/minute. L'analyse des produits et le suivi de la réaction s'effectuent sur des aliquotes de 1 g du milieu réactionnel. Le rapport pondéral isolats de protéines de soja/acides gras libres (AGL) est fixé à 1/3 et le rapport pondéral isolats de protéines de soja/biocatalyseur à 10/3. Les conditions de température, temps de réaction, volume du milieu réactionnel, mode d'agitation seront indiqués pour chaque réaction.

Analyse des acides gras greffés

La méthode d'analyse consiste à couper les liaisons peptidiques de la protéine ainsi que les liaisons amides créées entre les amines libres de la protéine et les acides gras. Les acides gras sont extraits et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). La proportion d'acides gras liés de façon covalente (AGC) aux protéines de soja lipophilisées (PSL) est calculée par différence entre les acides gras greffés totaux (AGT) et les acides gras fixés par des liaisons ioniques ou hydrophobes (AGI).

Dans un premier temps, les AGL en excès dans le mélange réactionnel sont éliminés par extraction à l'hexane dans un appareil de Soxhlet pendant 4 heures, ce qui permet l'obtention des protéines de soja. Sur 200 mg de protéines de soja lipophilisées, les acides gras fixés par des liaisons ioniques ou hydrophobes sont extraits par agitation magnétique dans 25 ml d'un mélange d'HCl 1N/éther éthylique (1/50, V/V) pendant 30 minutes. Sur une autre aliquote de 200 mg de PSL, les acides gras greffés totaux sont libérés par hydrolyse acide totale en présence de 15 ml d'HCl 6N à 105°C pendant 16 heures. Ils sont extraits au chloroforme (3 fois 25 ml). Après filtration sur du sulfate de sodium anhydre puis addition d'un étalon interne, les solvants sont éliminés sous pression réduite. L'acide undécylénique (C11:1) est utilisé comme étalon interne pour le dosage des acides gras à chaîne moyenne et l'acide heptadécanoïque (C17:0) pour les acides gras à longue chaîne. Les acides gras sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sous forme d'esters méthyliques formés par catalyse acide dans le méthanol chlorhydrique obtenu par réaction de 625 ml de méthanol et de 50 ml de chlorure d'acétyle ; les esters sont extraits à l'hexane après ajout de deux volumes d'eau au milieu réactionnel.

Chromatographie en phase gazeuse

1 µl de la phase hexanique est injecté dans l'appareil (Carlo Erba Fracto Vap 2450), équipé d'une colonne capillaire de silice fondue DB WAX de 30 m, de diamètre interne 0,28 mm et d'épaisseur de film 0,25 µm.

Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme sont réglées à 250°C, le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/min., 100 kPa), les esters méthyliques des acides gras à longue chaîne sont analysés en isotherme à 190°C et les esters méthyliques des acides gras courts en isotherme à 140°C.

Calcul du taux de greffage covalent

La proportion d'acides gras liés de façon covalente est calculée par la relation «AGC = AGT - AGI». Le taux d'incorporation des acides gras est donné en pourcentage pondéral par rapport au produit final (protéines de soja lipophilisées). Un rendement de lipophilisation est estimé sur la base arbitraire que les acides gras se greffent uniquement sur les résidus lysine contenus dans les protéines de soja lipophilisées. Celui-ci est exprimé en µmol d'acides gras liés de façon covalente pour 100 µmol de lysine disponible ; en d'autres termes, ce rendement correspond au pourcentage de résidus lysine greffés par rapport aux résidus lysine disponibles dans le milieu réactionnel.

Tests permettant de mettre en évidence un effet émulsionnant

Préalablement à toute utilisation, les produits de condensation obtenus sont neutralisés par HCl, 6N jusqu'à pH 5,5 pour une bonne compatibilité avec les pH des formules cosmétiques (5,0-7,5), eux-mêmes voisins du pH cutané (5,5). Les produits de condensation réalisés sont testés pour leur pouvoir émulsionnant, et leur propriété est comparée au pouvoir émulsionnant des différents réactifs utilisés, à savoir l'isolat de protéines de soja ainsi que le mélange acides stéarique et palmitique. Pour cela une émulsion huile dans eau «type» est réalisée (H/E) (*Tableau 1*). Un mélange d'esters d'acides gras, d'huile végétale et de composés huileux, couramment rencontrés dans les formulations cosmétiques est émulsionné dans une phase aqueuse contenant 5% de glycérol. Aucun agent émulsionnant n'est utilisé autre que les produits en test.

Les ingrédients de la phase A et de la phase B sont mélangés et amenés à 75-80°C séparément ; ces deux phases sont conservées pendant 15-20 minutes à cette température sous agitation mécanique modérée. La phase A est alors émulsifiée dans la phase B sous agitation vigoureuse, à l'aide d'un équipement de type Silverson ou Ultraturrax. L'ensemble est alors refroidi sous agitation mécanique modérée, et le conservateur est ajouté à 30°C. Après refroidissement complet, la stabilité des formulations est étudiée pendant 5 mois à 45°C, à température ambiante et à 4°C.

Résultats et discussion

La formation de la liaison amide entre des acides gras libres et les résidus amines libres des protéines biocatalysée par une lipase dépend fortement de la proportion de lysine dans la protéine. On aura donc avantage à mettre en œuvre une protéine riche en lysine. Toutefois, les résidus aminés libres d'une protéine ne sont pas les seuls points de greffage. Dans nos conditions expérimentales, on peut potentiellement créer d'autres liaisons covalentes à partir d'acides gras et notamment des liaisons ester avec les hydroxyles des résidus sérine, thréonine et tyrosine. De même les sucres et les lipides présents dans l'isolat de protéines de soja peuvent éventuellement réagir avec les acides gras en présence d'une lipase [21-22].

Dans ce contexte, le choix du «synthon hydrophile» protéines de soja se justifie pour plusieurs raisons. Les isolats de protéines de soja sont des produits industriels disponibles ; d'une part leur pureté en protéines est relativement importante par rapport à la matière sèche, et d'autre part la composition en acides aminés varie peu d'une variété de soja à une autre. De plus, le pourcentage pondéral de lysine (5,6 %) est l'un des plus élevés parmi les protéines connues. Toute une série d'acides gras libres a été testée. Les acides caprique et laurique, liquides à la température de la réaction, sont utilisés à l'état liquide en absence de solvant. Des acides gras longs saturés et solides à la température de la réaction sont mis en œuvre en milieu solvant. Toutefois, les essais préliminaires ont été effectués avec de l'acide oléique technique à l'état liquide à la température de la réaction. Compte tenu des résultats antérieurs obtenus en synthèses biocatalysées par le lipozyme et la lipase S [18-20], la température de 60°C a été retenue dans nos essais.

Si l'on prend en compte que les protéines enzymatiques peuvent être également substrat, nous avons vérifié, en remplaçant les isolats de protéines de soja par une quantité identique de biocatalyseur, que ce dernier n'est pas modifié au cours de la réaction. Dans les deux cas (*tableau 2*), les proportions d'acides gras fixés par des liaisons ioniques ou hydrophobes et d'acides gras greffés totaux sont pratiquement identiques, ce qui signifie qu'il n'y a pas de greffage covalent sur le lipozyme et très peu sur la lipase S, sans conséquence sur l'interprétation des résultats.

Essais préliminaires avec l'acide oléique

Les essais préliminaires sont mis en œuvre avec le lipozyme à 60 et 70°C avec un rapport pondéral isolats de protéines de soja/18:1 de 1/5. Parallèlement sont mises en place des réactions témoins sans biocatalyseur. Les réactions durent 7 jours pour tester la faisabilité de la réaction (*figure 1*).

Les rendements atteignent 16% et 42% de résidus lysine greffés respectivement à 60°C et 70°C. Les réactions sans biocatalyseur s'effectuent dans des proportions non négligeables (9% et 15% de lysines greffées respectivement à 60°C et 70°C). Le taux de greffage de ces réactions témoin augmente avec la température pour une même durée de réaction. On peut donc penser que le greffage s'effectue d'une part sous le seul effet thermique ou d'autre part sous l'effet catalytique de certains constituants contenus dans l'isolat de protéines de soja. L'ajout du lipozyme permet de multiplier par deux le rendement de la réaction. Toutefois, pour des raisons de coût et de préservation de la durée de vie du biocatalyseur, nous avons préféré d'une part travailler à 60°C et d'autre part de ramener le rapport pondéral isolats de protéines de soja/acides gras libres de 1/5 à 1/3.

Lipophilisation en milieu exempt de solvant

L'hétérogénéité du milieu nous a amenés à conduire la réaction dans des flacons de 25 ml en nombre suffisant, le contenu de chacun d'entre eux pouvant être ainsi analysé après un temps de réaction donné. On peut ainsi étudier la cinétique de la réaction pour l'acide caprique. On constate que le greffage covalent croît de façon significative tout au long de la réaction comme le montre la [figure 2](#). Les taux de greffage covalent de l'acide caprique après 7, 15 et 21 jours sont respectivement de 8,6, 24,1 et 60,2% par rapport aux résidus de lysine disponibles. Afin de vérifier que l'acylation est bien due à l'activité enzymatique, des réactions témoin sans catalyseurs ont été mises en œuvre. Dans ce cas, on ne constate qu'un taux de greffage covalent de seulement 4,4% au bout de 7 jours.

Menée dans les mêmes conditions, la réaction biocatalysée par la lipase S ne conduit qu'à 1,7% de greffage covalent par rapport aux résidus lysine disponibles au bout de 7 jours. En conséquence, elle n'a donc pas été poursuivie.

L'optimisation de la quantité de lipozyme à mettre en réaction a été étudiée avec l'acide laurique. Cinq cinétiques ont été effectuées avec des quantités de biocatalyseur de 0, 10, 20, 30 et 50% en poids par rapport à la quantité d'isolat de protéines de soja. Les cinétiques sont regroupées dans la [figure 3](#) ; le rendement maximum a été obtenu pour une concentration en poids de 50% de lipozyme au bout de 15 jours, mais pour 10% de lipozyme, on obtient un rendement presque comparable en 10 jours. La durée de réaction est un facteur important puisque, pour un rapport pondéral de 10% de lipozyme/isolat de protéines de soja, 18,2% des résidus lysine sont greffés en 5 jours et 33,4% en 10 jours.

Ces mêmes expériences ont été réalisées en présence de lipase S. Curieusement, on constate que le greffage observé s'effectue majoritairement par liaisons de type ionique ou hydrophobe et pratiquement pas par liaisons covalentes. En conséquence, dans ce cas, les cinétiques de greffage ([figure 4](#)), rendent compte des pourcentages pondéraux d'acides gras greffés totaux/protéines de soja lipophilisées et non des greffages covalents par rapport aux lysines disponibles comme précédemment.

Dans tous les cas et indépendamment de la quantité de lipase S mise en jeu, on observe un maximum de greffage pour 5 jours de réaction ; puis celui-ci diminue et semble ensuite se stabiliser avec le temps. Malheureusement, nous n'avons pas d'explication à donner à cette constatation.

*** Essais en réacteurs de 2 litres :**

Des essais ont été effectués à l'échelle du kg pour vérifier si la géométrie du réacteur et le mode d'agitation ont une influence sur l'efficacité de la réaction. Ces deux paramètres peuvent influencer la mise en contact des substrats avec le biocatalyseur et donc peuvent avoir une incidence sur le taux d'incorporation des acides gras libres. Le milieu étant hétérogène, le principal inconvénient réside dans le fait que les aliquotes prélevées au cours du temps peuvent ne pas être représentatives du milieu réactionnel total. Les milieux réactionnels sont composés de 350 g d'isolat de protéines de soja, de 70 g de lipase S ou 35 g de lipozyme, et de 1000 g d'acide laurique.

Quand la réaction est catalysée par le lipozyme, les rendements de greffage covalent obtenus en réacteur sont globalement similaires à ceux obtenus en flacons de 25 ml à savoir 20,4% et 28,1% pour 7 et 13 jours de réaction. Toutefois, il est intéressant de noter que le lipozyme est moins détérioré dans le réacteur à pale plate qu'en présence d'un barreau aimanté dans un flacon, ce qui rend sa séparation et sa récupération plus aisées.

Le même essai en réacteur de 2 litres avec 20% de lipase S conduit à des résultats encore plus décevants que ceux obtenus en flacons puisqu'on n'observe respectivement qu'un rendement de 0,14 g et 0,18 g d'acides gras greffés totaux pour 100 g de protéines au bout de 7 et 13 jours de réaction, soit un greffage covalent quasi nul. Cela signifie, si la lipase n'a pas été détériorée par ailleurs, que sa mise en œuvre dans nos conditions expérimentales est à exclure.

Le bilan des réactions montre que le lipozyme est un biocatalyseur parfaitement adapté à la lipophilisation des protéines. À titre d'exemple, le rendement de greffage covalent par rapport aux résidus lysine disponibles des isolats de protéines de soja peut atteindre avec l'acide caprique près de 60%.

Lipophilisation en milieu solvant

La synthèse chimique a permis de mettre en évidence de meilleures propriétés émulsifiantes pour les protéines acylées par des acides gras à longue chaîne saturée [1, 5-8]. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés aux réactions en présence d'acides palmitique et stéarique en milieu solvant. Le point de fusion de ces deux acides nécessite de mettre en œuvre la réaction dans le tertiobutanol, solvant autorisé par la législation en cosmétique. De plus, cet alcool tertiaire est inerte et ne fait pas courir le risque d'une estérification des AGL. Il est nécessaire de remarquer que le terme «solvant» est un abus de langage dans ce cas particulier car le tertiobutanol ne joue pas un rôle classique d'agent de solubilisation mais seulement un rôle de fluide de dispersion car il ne dissout que les acides gras. Néanmoins pour des raisons de commodité, ce vocable sera conservé.

La réaction a été initialement testée avec uniquement de l'acide palmitique dans des flacons de 25 ml afin de mettre en évidence la faisabilité de la réaction. Pour le lipozyme puis la lipase S, des rendements respectifs de 5,6% et 2,9% de greffage covalent par rapport aux lysines disponibles ont été obtenus en 7 jours. Ces mêmes réactions ont été alors conduites dans les réacteurs de plus grande capacité ([figure 5](#)) en mettant en œuvre le mélange acide palmitique/acide stéarique (40/60, p/p), mélange très souvent utilisé dans les préparations cosmétiques.

Dans ces conditions, le lipozyme semble être un catalyseur moins performant qu'en milieu non solvant puisque 11% seulement des résidus lysine disponibles sont greffés de façon covalente en 7 jours. Paradoxalement, avec la lipase S, et pour un temps de réaction de 7 jours, près de 50% des résidus lysine disponibles sont modifiés par greffage covalent. On pourrait trouver une explication à ce constat d'une part par la dispersion plus aisée des particules de lipase S dans le fluide et d'autre part par la tendance du lipozyme à décanter par gravité vers le fond du réacteur malgré l'agitation, offrant un contact moins satisfaisant entre les substrats.

Toutefois, quand la réaction est biocatalysée par la lipase S, on remarque avec le temps une diminution du taux de greffage covalent ramenant celui-ci à 30% environ en 21 jours de réaction. Cette observation pourrait être la conséquence d'un greffage covalent parasite sous forme d'ester gras sur les hydroxyles de la sérine par exemple. Si tel était le cas, on concevrait que la liaison ester chimiquement beaucoup moins stable que la liaison amide puisse s'hydrolyser sous l'action entre autres de l'eau néoformée lors des diverses synthèses covalentes. Pour approfondir ce problème, une étude plus poussée de l'activité de l'eau du milieu réactionnel régissant l'orientation des synthèses en phase aqueuse limitée serait nécessaire.

Effets émulsionnants des protéines lipophilisées

Les produits testés sont ceux de la [figure 5](#) : 1) avec la lipase S (lipase de *Rhizopus arrhizus*), 2) avec le lipozyme, 3) sans catalyseur. L'isolat de protéines de soja (4) et le mélange acides stéarique et palmitique (5) sont également testés en témoin. L'addition de ces produits est réalisée dans la phase A ou la phase B.

Lors de l'incorporation au sein de la formulation, on observe que les produits de condensation 1 et 2 sont susceptibles d'être utilisés indifféremment dans la phase A ou la phase B, puisqu'ils se dissolvent en formant des phases homogènes dans l'une ou l'autre de ces phases. L'hydrophobicité, apportée par les chaînes grasses aux protéines hydrophiles, donne à ces molécules un caractère amphiphile très net. Le témoin de la [figure 5](#) présente également un léger caractère amphiphile moins net. L'isolat de protéines de soja est uniquement hydrodispersible et est totalement incompatible avec la phase A. Les acides stéarique et palmitique sont uniquement liposolubles et sont totalement incompatibles avec la phase B.

Les tests de stabilité réalisés montrent une absence totale des propriétés émulsionnantes des différents réactifs pris séparément (produits 4 et 5) (émulsions déphasées après 5 heures à 45°C) ou après mélange pendant 15 jours à 60°C (produit 3) (émulsion déphasée après 24 heures à 45°C).

Les capacités émulsionnantes des lipoprotéines réalisées avec le lipozyme sont également relativement faibles, et un déphasage a systématiquement été observé, après une période de stockage à 45°C comprise entre 2 et 15 jours.

Par contre, les capacités émulsionnantes des lipoprotéines réalisées avec la lipase S sont extrêmement fortes, puisqu'il est possible de réaliser des émulsions stables (> 8 mois à 45°C) sans autre agent émulsionnant présent au sein de la formulation.

CONCLUSION

Le bilan de cette étude fait ressortir comme enseignement majeur qu'un greffage covalent des acides gras sur les protéines est possible par biocatalyse. Le cas particulier des isolats de protéines de soja pourrait donc être extrapolé aux autres macromolécules de ce type. Parmi les aspects les plus avantageux, la mise en œuvre très simple dans des conditions douces et la possibilité dans certains cas de conduire la réaction sans solvant paraissent très prometteurs, d'autant que les rendements de greffage covalent sont aussi performants que ceux obtenus par voie chimique. Pour conclure, les résultats obtenus pour les tests d'activité émulsionnante sont cohérents avec les résultats analytiques. Ils permettent d'envisager l'utilisation de telles lipoprotéines en tant qu'agents émulsionnants naturels, dans des formulations cosmétiques non irritantes, à teneur en agents émulsionnants synthétiques faibles. Cette nouvelle approche de la modification des protéines par lipophilisation biocatalysée a fait récemment l'objet d'un brevet [23].

REFERENCES

1. HAQUE Z, KITO M (1982). Lipophilisation of soybean glycinin: covalent attachment to long chain fatty acid. *Agric Biol Chem*, 46 : 597-99.
2. HAQUE Z, KITO M (1983). Lipophilization of s1-casein. 1. Covalent attachment of palmitoyl residue. *J Agric Food Chem*, 31 : 1225-30.
3. HAQUE Z, KITO M (1984). One step lipophilization of proteins using fatty acyl anhydride. *Agric Biol Chem*, 48 : 1099-101.
4. AKITA EM, NAKAI S (1990). Lipophilization of -lactoglobulin: effect on hydrophobicity and surface functional properties. *J Food Sci*, 55 : 711-7.
5. FRANZEN KL, KINSELLA JE (1976). Functional properties of succinylated and acetylated soy

protein. *J Agric Food Chem*, 24 : 788-95.

6. AOKI H, TANEYAMA O, ORIMO N, KITAGAWA I (1981). Effect of lipophilisation of soy protein on its emulsion stabilizing properties. *J Food Sci*, 46 : 1192-5.
7. KIM SH, KINSELLA JE (1986). Effects of progressive succinylation on some molecular properties of soy glycinin. *Cereal Chemistry*, 63 : 342-5.
8. KITO M (1987). Chemical and physical lipophilization of proteins. *J Am Oil Chem Soc*, 64 : 1676-81.
9. MARGOLIN AL, TAI DF, KLIBANOV AM (1987). Incorporation of D-amino acids into peptides via enzymatic condensation in organic solvents. *J Am Chem Soc*, 109 : 7885-7.
10. YAMASHITA M, ARAI S, AMANO Y, FUJIMAKI M (1979). A novel one-step-process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins : application to soy protein and flour for enhancing their methionine levels. *Agric Biol Chem*, 43 : 1065-79.
11. FERJANCIC A, PUIGSERVER A, GAERTNER H (1991). Papain-catalyzed polymerization of amino acids in low water organic solvents. *Biotechnol Lett*, 13 : 161-6.
12. MATOS JR, WEST JB, WONG CH (1987). Lipase catalyzed synthesis of peptides : preparation of a penicillin G precursor and other peptides. *Biotechnol Lett*, 9 : 233-6.
13. INADA Y, NISHIMURA H, TAKAHASHI K, YOSHIMOTO T, SAHA AR, SAITO Y (1984). Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. *Biochem Biophys Res Commun*, 122 : 845-50.
14. GANCET C, GUIGNARD C (1986). Hydrolyse et synthèse de liaison ester par la lipase d'un mycélium dévitalisé de *Rhizopus arrhizus* en milieu non aqueux. *Rev Fr Corps Gras*, 33 : 423-30.
15. GRAILLE J, MONTET D, SERVAT F *et al.* (1988). Synthèse d'amides gras N substitués par catalyse enzymatique. Brevet européen n° 0 298 796 A1.
16. MONTET D, MARCOU L, GRAILLE J, SERVAT F, RENARD G (1989). Étude de l'acylation des aminopropanols catalysée par les acyltransférases. *Rev Fr Corps Gras*, 36 : 79-83.
17. MONTET D, PINA M, GRAILLE J, RENARD G, GRIMAUD J (1989). Synthèse de N lauryloléylamide par la lipase de *Mucor miehei* en milieu organique. *Fett Wissenschaft Technologie*, 91 : 14-8.
18. SERVAT F, MONTET D, PINA M, ARNAUD A, GALZY P, LEDON M, MARCOU L, GRAILLE J (1990). Synthèse d'acides hydroxamiques gras catalysées par la lipase de *Mucor miehei*. *J Am Oil Chem Soc*, 67 : 2215-20.
19. SERVAT F, MONTET D, PINA M, BERNET N, *et al.* (1990). Utilisation de l'amidase de *Brevibacterium sp 19* pour la synthèse d'un acide hydroxamique gras. *Biotechnol Lett*, 12 : 689-92.
20. MONTET D, SERVAT F, PINA M, GRAILLE J, LEDON M, MARCOU L (1990). Synthèse de N-acyllysine par voie enzymatique. *J Am Oil Chem Soc*, 67 : 771-4.
21. KHALED N, MONTET D, PINA M, GRAILLE J (1991). Fructose oleate synthesis in a fixed catalyst bed reactor. *Biotechnol Lett*, 13 : 167-72.
22. GUILLARDEAU L, MONTET D, KHALED N, PINA M, GRAILLE J (1992). Fructose

caprylate biosynthesis in a solvent free medium. *Tenside Surf Det*, 29 : 342-4.

23. PERRIER E, HUC A, ANTONI D, ROUSSEL C, PINA M, GRAILLE J (1996). Complexes amphiphiles, procédé pour leur préparation et compositions en renfermant. Brevet français n° 95 12137.