

Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3

III. — Stabilité de la régiosélectivité 1-3 (1)

J. MUDERHWA (2), M. PINA (2) et J. GRAILLE (2)

Résumé. — La dernière partie de cette étude concerne la vérification de la conservation au cours du temps de la régiosélectivité 1-3 des biocatalyseurs mis en œuvre pendant la réaction d'interesterification. Cette réaction biocatalysée par les lipases régiosélectives 1-3 ne doit pas affecter la position centrale des triglycérides dont la composition en acides gras doit rester constante, du moins pendant une durée compatible avec les exigences des réactions industrielles. Ce contrôle a été effectué en déterminant la répartition interne-externe des acides gras à l'aide du système huile de coprah/stéarate de méthyle et en suivant l'incorporation de l'acide stéarique sur la position 2 des triglycérides de coprah. Dans le système choisi, il a été démontré que les lipases étudiées, notamment celle de *Mucor miehei* (Lipozyme) et celle du mycélium de *Rhizopus arrhizus*, conservent leur régiosélectivité 1-3 au moins 12 h, soit une durée suffisante pour assurer pratiquement la transformation complète de la matière grasse sans que les phénomènes de transferts d'acyles n'altèrent la régiosélectivité de la transestérification.

INTRODUCTION

Pour clore cette étude sur l'aptitude à l'interesterification de quelques lipases régiosélectives 1-3, le dernier volet qui va être abordé, concerne la vérification de la conservation de la stabilité de la régiosélectivité au cours du temps pendant la réaction d'interesterification. Comme cela a été énoncé dans la 1^{re} partie, l'interesterification catalysée par des lipases régiosélectives 1-3 présente de nombreux avantages, notamment parce qu'elle permet la préservation de la position 2 des triglycérides qui doit théoriquement rester inchangée. En effet, si les lipases mises en œuvre sont effectivement régiosélectives 1-3 par rapport à des conditions analytiques caractérisées notamment par des temps de réaction très brefs, la stabilité de cette propriété n'a pas toujours été le souci majeur des équipes qui ont étudié ce type d'interesterification. La plupart des auteurs se contente de constater que les échanges d'acyles s'effectuent effectivement en suivant le plus souvent l'évolution d'un triglycéride marqueur dans des systèmes huile/contre huile, système relativement complexe à analyser.

Le modèle simple adopté jusqu'ici dans cette étude à savoir huile de coprah/stéarate de méthyle permet de vérifier de façon efficace et sans ambiguïté la stabilité de la régiosélectivité. Toutefois le système équimolaire a été préféré dans ce cas, contrairement aux parties I et II qui concernaient la mise au point d'un test d'activité de transestérification et l'étude de l'activité de l'eau dans les mélanges réactionnels. En effet pour ces précédentes études le rapport molaire des réactifs huile de coprah/stéarate de méthyle était de 20 et la réaction était suivie par l'incorporation du 12 : 0 de l'huile de coprah dans les esters méthyliques. Par contre, dans le cas présent, le marqueur de la réaction est l'acide stéarique, inexistant en position centrale des triglycérides de l'huile de coprah ; théoriquement cet acide gras ne devrait pas s'incorporer sur cette position ; ainsi sa présence éventuelle donnera une image de la stabilité de la régiosélectivité 1-3.

La détermination de la répartition interne-externe des acides gras est donc indispensable pour suivre le processus de l'interesterification régiosélective 1-3 ; elle permet non seulement de prévoir le réarrangement des radicaux acyles à l'équilibre, mais aussi de vérifier la conservation de la régiosélectivité 1-3 des lipases mise en œuvre dans un intervalle de temps donné compatible avec les durées de réactions industrielles.

Les trois lipases de microorganismes sélectionnés précédemment ont été testées :

- la lipase de *Candida deformans* adsorbée sur la célite,
- le mycélium devitalisé de *Rhizopus arrhizus*,
- la lipase de *Mucor miehei* immobilisée sur une résine macroporeuse, échangeuse d'anions (Lipozyme T_M de Novo).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les matériels biologique et chimique ont été développés dans les parties précédentes de cette étude [1, 2].

Les techniques analytiques concernant la répartition interne/externe des acides gras ont été décrites dans de précédents articles [Muderhwa *et al.*, 3, 4]. La méthode IUPAC [5] mettant en œuvre la lipase pancréatique ne pouvant être appliquée aux huiles lauriques, la répartition interne/externe des acides gras des huiles de coprah native et transestérifiée est effectuée selon la méthode de Brockerhoff [6], adaptée par Muderhwa [4], par dégradation ménagée et non spécifique des triglycérides par le bromure d'éthyl magnésium. La répartition glycéridique est déduite d'une relation proposée par Yurkowski et Brockerhoff [7]: $3A_t = 4A_{DG1-2} - A_i$, où les indices t, DG 1-2, et i désignent respectivement la concentration totale, la concentration dans les DG 1-2 et en position interne pour un acide gras A donné.

La récupération par CCM préparative des diglycérides 1-2 issus de la dégradation des triglycérides, la préparation des esters méthyliques provenant des triglycérides et des diglycérides 1-2, ainsi que les conditions chromatographiques en CPG sont détaillées par Muderhwa *et al.* [4].

(1) Les 1^{re} et 2^{ème} parties de cette étude ont paru dans *Oléagineux*, 1988, 43, N° 10 et 11.

(2) Division Chimie des Corps Gras, IRHO-CIRAD B P 5035 - 34032 Montpellier Cédex (France)

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Considérations générales.

Du fait que l'analyse stéréospécifique n'est pas nécessaire dans cette étude, il faut noter que, pour l'interprétation des résultats, les positions 1 et 3 des triglycérides sont considérées comme étant équivalentes et la dénomination DG 1-2 désigne indifféremment diglycérides 1-2 et 2-3.

Compte tenu du fait que la réaction est suivie par l'incorporation de l'acide stéarique dans les triglycérides et non plus par l'incorporation de l'acide laurique dans le stéarate de méthyle, comme pour la détermination de l'activité de transestérification, le rapport molaire huile/stéarate de méthyle a été fixé à 1.

Rappelons qu'avec le système équimolaire et compte tenu de la répartition glycéridique de l'huile de coprah mise en œuvre, l'équilibre de la réaction est atteint lorsque l'incorporation de l'acide laurique tend vers 21,9 % molaire dans la fraction esters méthyliques [1].

1. — Transestérification catalysée par la lipase supportée (célite) de *Candida deformans*.

Le mélange réactionnel est constitué de 5,0 g d'huile de coprah purifiée, de 2,5 g de stéarate de méthyle à 99 % de pureté et 2,56 g de lipase de *Candida deformans* adsorbée sur la célite soit 35,5 % (P/P lipase/corps gras). La réaction s'effectue en batch dans les conditions décrites dans les Parties I et II.

La lipase de *Candida deformans* mise en œuvre est peu active ; l'équilibre n'est atteint qu'au terme de 8 jours de réaction. Cependant la réaction a été arrêtée au bout de 5 jours (120 h), le taux de conversion calculé étant de 87,7 %.

Les triglycérides de l'huile de coprah transestérifiée sont dégradés par le bromure d'éthyl magnésium et les données fournies par les diglycérides 1-2 issus de la dégradation permettent en combinaison avec la composition des acides gras totaux de calculer la composition en positions externes et en position interne. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I et sont comparés à ceux de l'huile de coprah native.

Dans l'huile de coprah native, l'acide stéarique (1,6 % molaire) est en totalité réparti sur l'ensemble de 2 positions externes. Après transestérification on constate que cet acide s'est incorporé à raison de 19,2 % molaires ; il est nettement plus abondant en positions externes (16,9 % molaires) qu'en position interne (2,3 % molaires) ; autrement dit, sur les 19,2 % molaires de 18 : 0 dans les triglycérides, 88,2 % sont répartis sur les positions externes et 11,8 % sur la position centrale.

La composition moyenne des acides gras en position interne des triglycérides de l'huile de coprah transestérifiée est naturellement devenue très différente de la composition moyenne initiale de l'huile de coprah native. Ces résultats mettent en évidence l'incorporation du 18 : 0 en position interne due à un manque de stabilité de la spécificité de la lipase de *Candida deformans* pour un temps de réaction prolongé. Deux hypothèses permettent d'expliquer cette observation :

— d'une part la durée de la réaction étant très longue (5 jours), on peut considérer que la régiosélectivité ne se conservait pas au-delà d'une durée trop importante. La lipase de *Candida deformans* ne peut donc être mise en œuvre pour ce type de réaction car le fait que son AST soit faible oblige à prolonger le temps de réaction au-delà des limites convenables, induisant ainsi une migration d'acyles trop importante. Seules les 2 autres lipases nous ont donné satisfaction ;

— d'autre part selon Naudet [8], les liaisons esters, qui dans un triglycéride lient les différents acides gras au glycérol, ne sont pas totalement inertes. Dans certaines conditions de chauffage prolongé et en milieu presque anhydre, les chaînes acylées s'échangent les unes avec les autres. Ces migrations d'acyles peuvent se produire soit à l'intérieur d'un même glycéride, soit entre triglycérides différents. Naudet [9] fait encore observer que les migrations spontanées sous l'action de la température sont liées à l'induction thermique spontanée de l'activité des fonctions alcools libres des glycérides partiels présents à l'état de traces dans les corps gras ; or l'analyse par CCM du mélange réactionnel après 5 jours de réaction indique que ce mélange a la composition centésimale pondérale suivante : esters méthyl-

TABLEAU I. — Répartition interne/externe des acides gras des triglycérides des huiles de coprah natives et transestérifiées — Transestérification catalysée par la lipase de *Candida deformans* adsorbée sur célite, 35,5 % (P/P)
(Les résultats sont exprimés en % molaires)

Acides gras	T ₀ Huile de coprah native purifiée			T _{120h} Huile de coprah transestérifiée et purifiée		
	TG	Positions		TG	Positions	
		2	1 + 3		2	1 + 3
8 : 0	12,3	0,2	12,1	9,2	0,4	8,8
10 : 0	7,6	1,2	6,4	6,2	1,5	4,7
12 : 0	48,6	26,7	21,9	38,7	23,9	14,8
14 : 0	16,6	3,4	13,2	14,2	3,2	11,0
16 : 0	6,9	0,2	6,7	6,5	0,3	6,2
18 : 0	1,6	—	1,6	19,2	2,3	16,9
18 : 1	5,1	0,9	4,2	4,7	0,8	3,9
18 : 2	1,3	0,7	0,6	1,0	0,6	0,4
20 : 0	—	—	—	0,3	0,1	0,2

liques (26,2), triglycérides (40,2), acides gras libres (16,7), diglycérides 1-3 (9,5), diglycérides 1-2 (6,0), monoglycérides (1,4). On constate donc que les diglycérides principalement sont présents en proportions relativement élevées (15,5 %) et, bien que la lipase de *Candida deformans* soit spécifique 1-3, la concentration de diglycérides 1-3 est nettement supérieure à celle des diglycérides 1-2 ; en effet le rapport DG 1-3/DG 1-2 = 1,6 indique qu'une migration d'acyles s'est produite au cours de la transestérification. Or les diglycérides 1-3 ainsi formés sont plus stables que les diglycérides 1-2. La transformation inverse (DG 1-3 → DG 1-2) est plus difficile. En supposant que les diglycérides 1-3 proviennent tous des diglycérides 1-2, ce qui est plausible compte tenu de la régiosélectivité 1-3 de la lipase de *Candida deformans*, la migration 2 → 1 affecte donc 60 % des diglycérides 1-2, ce qui est considérable. On se rend donc compte que ce phénomène sévissant dans de telles proportions rend totalement aléatoire et vide de tout sens la propriété de régiosélectivité du biocatalyseur pour des durées de réaction trop importantes.

2. — Transestérification catalysée par le lipozyme (*Mucor miehei*) et le mycélium de *Rhizopus arrhizus*.

Du fait que l'on effectue des prélèvements de 1 g du mélange réactionnel au cours de la réaction jusqu'à l'équili-

bre (24 h par la lipase de *Mucor miehei* et 48 h pour la lipase de *Rhizopus arrhizus*), les quantités de corps gras mises en réaction ont été multipliées par 3. Ces prélèvements de 1 g effectués après 1, 2, 4, 12 et 24 h de réaction dans le cas du lipozyme et 2, 4, 8, 24 et 48 h de réaction dans le cas du mycélium de *Rhizopus arrhizus* sont repris par 20 ml d'hexane afin d'obtenir des solutions à 5 % (P/V).

Les mélanges réactionnels sont constitués comme suit :

— 15 g d'huile de coprah purifiée et 6,6 g de stéarate de méthyle auxquels sont ajoutés soit 0,432 g de lipozyme T_M (2 % P/P), soit 0,432 g de mycélium de *Rhizopus arrhizus* (20 % P/P).

La réaction de transestérification a lieu à 50 °C, sous 20 mm de Hg.

a) Analyse de la « fraction esters méthyliques » (FEM).

La FEM est séparée des triglycérides et des glycérides partiels éventuels par CCM préparative et sa composition en acides gras est directement déterminée par CPG. Les résultats obtenus sont consignés respectivement dans les tableaux II et III pour le lipozyme et le mycélium de *Rhizopus arrhizus*.

De ces compositions en acides gras, on retiendra plus particulièrement l'évolution des concentrations de C 12 : 0 et C 18 : 0 en fonction du temps.

TABLEAU II. — Evolution de la composition en acides gras de la fraction « Esters méthyliques ». Transestérification catalysée par le lipozyme^{FM}, 2 % (P/P)

(Les résultats sont exprimés en % molaires)

Acides gras	Temps (heures)							
	0	0,5	1	2	4	8	12	24
8 : 0	—	0,4	0,4	0,4	2,6	2,9	3,1	3,0
10 : 0	—	0,5	0,5	0,9	2,2	2,9	3,8	4,4
12 : 0	—	2,3	5,1	8,1	12,9	18,0	20,5	21,8
14 : 0	—	3,1	4,3	6,7	10,0	13,5	14,6	16,6
16 : 0	0,2	1,6	2,3	3,6	5,2	7,2	7,9	8,7
17 : 0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
18 : 0	98,5	90,1	84,9	77,3	63,3	50,8	44,5	39,9
18 : 1	0,1	0,8	1,2	1,7	2,6	3,4	4,2	4,2
18 : 2	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	0,8
20 : 0	1,1	1,0	1,0	0,9	0,7	0,6	0,5	0,5

TABLEAU III. — Evolution de la composition en acides gras de la fraction « Esters méthyliques ». Transestérification catalysée par le mycélium de *Rhizopus arrhizus*, 20 % (P/P)

(Les résultats sont exprimés en % molaires)

Acides gras	Temps (heures)						
	0	2	4	8	24	32	48
8 : 0	—	1,3	2,4	4,3	5,6	2,2	1,3
10 : 0	—	0,8	1,2	2,9	3,6	3,9	4,3
12 : 0	—	4,7	8,6	15,9	21,1	21,6	21,9
14 : 0	—	3,1	6,0	9,5	12,3	13,8	15,2
16 : 0	0,2	1,8	3,2	5,0	5,5	8,7	8,5
17 : 0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
18 : 0	98,5	85,8	75,2	57,9	46,2	43,4	41,9
18 : 1	0,1	1,1	1,9	2,9	3,9	4,7	4,7
18 : 2	—	0,3	0,5	0,8	1,2	1,1	1,2
20 : 0	1,1	1,0	0,9	0,7	0,5	0,5	0,5

Dans le cas de la transestérification catalysée par le lipozyme T_M , on note d'une part que l'équilibre est atteint pour 24 h de réaction puisque la concentration en C 12 : 0 a une valeur de 21,8 % molaires dans les esters méthyliques et que le taux de conversion est déjà de 93,6 % après 12 heures de réaction et, d'autre part, que la concentration résiduelle de C 18 : 0 dans la FEM a chuté de 98,5 à 39,9 % molaires à l'équilibre.

Dans le cas de la transestérification catalysée par le mycélium de *Rhizopus arrhizus*, l'équilibre de la réaction n'est atteint qu'après 48 h de réaction, mais il faut remarquer que le taux de conversion est déjà de 96 % après 24 h.

b) Répartition interne/externe des acides gras des triglycérides des huiles de coprah transestérifiées.

Les huiles de coprah transestérifiées sont tout d'abord purifiées sur colonne de silice de manière à disposer exclusivement des triglycérides.

Pour chaque prélèvement la composition en acides gras totaux des triglycérides est déterminée et rend compte de l'évolution de la réaction ; c'est sur la base de cette compo-

sition que pourra se déterminer la répartition interne/externe des huiles transestérifiées dont les résultats sont consignés dans les tableaux IV et V pour les réactions de transestérifications catalysées respectivement pour le lipozyme et le mycélium de *Rhizopus arrhizus*.

• Transestérification catalysée par le lipozyme.

Si l'on compare au cours du temps la composition moyenne initiale des acides gras de l'huile de coprah en position interne à celle des acides gras en position interne des triglycérides interestérifiés, on note que cette composition reste pratiquement constante jusqu'à 12 h de réaction, c'est-à-dire pour une durée de réaction pour laquelle le taux de conversion est de 93,6 %. A ce moment là, l'acide stéarique incorporé à l'huile de coprah transestérifiée est totalement situé sur l'ensemble des deux positions externes. Au-delà de 12 h de réaction, et notamment quand l'équilibre est atteint, sur les 22,8 % molaires de C 18 : 0 constitutifs des triglycérides de l'huile transestérifiée, 1,2 % molaire apparaît désormais en position centrale soit 1/20^e environ. De même,

TABLEAU IV. — Répartition interne/externe des acides gras des triglycérides de l'huile de coprah transestérifiée. Réaction catalysée par 2 % (P/P) de lipozymeTM

(Les résultats sont exprimés en % molaires)

Temps (h)	0			1			2			4			12			24		
	Positions			Positions			Positions			Positions			Positions			Positions		
	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3
8 : 0	10,4	0,3	10,1	10,2	0,2	10,0	10,1	0,3	9,8	8,8	0,4	8,4	7,1	0,4	6,7	7,1	0,6	6,5
10 : 0	6,9	1,0	5,9	6,7	0,9	5,8	6,6	0,9	5,7	5,9	0,9	5,0	4,9	0,8	4,1	4,9	1,0	3,9
12 : 0	48,2	26,3	21,9	46,5	26,8	19,0	45,2	26,4	18,8	43,0	26,6	16,4	41,5	26,8	14,7	41,3	24,3	17,0
14 : 0	18,0	3,7	14,3	16,4	3,6	12,8	15,9	3,7	12,2	14,1	3,4	10,7	13,3	3,4	9,9	13,3	3,5	9,8
16 : 0	7,7	0,2	7,5	6,8	0,1	6,7	6,6	0,2	6,4	5,6	0,3	5,3	5,2	0,3	4,9	5,2	0,4	4,8
18 : 0	2,0	—	2,0	6,5	—	6,5	8,8	—	8,8	16,6	—	16,6	22,4	—	22,4	22,8	1,2	21,6
18 : 1	5,3	1,0	4,3	5,2	0,9	4,3	4,7	1,0	3,7	4,3	0,9	3,4	3,9	0,8	3,1	3,9	1,6	2,3
18 : 2	1,5	0,9	0,6	1,5	0,9	0,6	1,9	0,9	1,0	1,5	1,0	0,5	1,4	1,0	0,4	1,2	0,9	0,3
20 : 0	—	—	—	0,2	—	0,2	0,2	—	0,2	0,2	—	0,2	0,3	—	0,3	0,3	—	0,3

TABLEAU V. — Répartition interne/externe des acides gras des triglycérides de l'huile de coprah transestérifiée. Réaction catalysée par 20 % (P/P) de mycélium de *Rhizopus arrhizus*

(Les résultats sont exprimés en % molaires)

Temps (h)	0			2			4			8			24			48		
	Positions			Positions			Positions			Positions			Positions			Positions		
	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3	TG	2	1 + 3
8 : 0	10,4	0,3	10,1	8,5	0,2	8,3	7,1	0,2	6,9	5,8	0,3	5,5	5,2	0,4	4,8	5,1	0,6	4,5
10 : 0	6,9	1,0	5,9	5,6	1,1	4,5	5,0	1,1	3,9	4,3	1,2	3,1	3,8	0,9	2,9	3,7	0,7	3,0
12 : 0	48,2	26,3	21,9	46,6	26,7	19,7	45,4	26,6	18,8	44,4	26,7	17,7	41,2	26,4	14,8	41,1	23,2	17,9
14 : 0	18,0	3,7	14,3	17,2	3,5	13,7	16,7	3,3	13,4	16,1	3,1	13,0	15,1	3,2	11,9	14,2	3,1	11,1
16 : 0	7,7	0,2	7,5	7,1	0,2	6,9	6,9	0,3	6,6	6,7	0,4	6,3	6,6	0,5	6,1	6,7	1,2	5,5
18 : 0	2,0	—	2,0	9,4	—	9,4	13,9	—	13,9	18,3	—	18,3	23,5	0,4	23,1	24,7	2,6	22,1
18 : 1	5,3	1,0	4,3	3,9	1,0	2,9	3,5	0,9	2,6	3,0	0,9	2,1	3,1	0,9	2,2	3,1	1,2	1,9
18 : 2	1,5	0,9	0,6	1,3	0,8	0,5	1,2	0,9	0,3	1,1	0,9	0,2	1,1	0,8	0,3	1,0	0,7	0,3
20 : 0	—	—	—	0,2	—	0,2	0,3	—	0,3	0,3	—	0,3	0,4	—	0,4	0,4	—	0,4

globalement la composition moyenne initiale a évolué et n'est plus constante. L'acide laurique est le plus affecté : sa concentration initiale en position interne passe de 26,6 % molaires à 24,3 % molaires à l'équilibre.

● **Transestérification catalysée par le mycélium de *Rhizopus arrhizus*.**

Dans ce cas, la composition moyenne des acides gras en position interne est pratiquement invariable jusqu'à 8 h de réaction et le C 18 : 0 est totalement incorporé à l'huile de coprah transestérifiée sur l'ensemble des 2 positions externes. Cependant après 24 h de réaction, sur les 23,5 % molaires de C 18 : 0 constitutifs des triglycérides de l'huile transformée, 0,4 % molaire apparaît sur la position interne et à l'obtention de l'équilibre après 48 h de réaction, ce pourcentage molaire s'élève à 2,6 %, soit plus du 1/10^e de l'acide stéarique total. De plus, alors que la composition moyenne initiale des acides gras en position centrale demeure très stable jusqu'à 24 h de réaction, cette composition n'est plus constante après l'équilibre notamment en ce qui concerne la variation du 12 : 0.

CONCLUSION

Dans le cas de la transestérification régiosélective 1-3 catalysée par les lipases étudiées dans ces travaux, la stabilité ou la conservation de la spécificité 1-3 des biocatalyseurs est établie en comparant la composition moyenne initiale des acides gras en position interne des triglycérides de l'huile native à celle des acides gras internes de l'huile traitée au cours de la réaction. Si l'on se contente d'étudier l'état initial et l'état final, aucune conclusion ne peut être formulée quant à l'efficacité de la transformation de la matière grasse. Pour la réaction catalysée par le lipozyme (lipase de *Mucor miehei*) et celle catalysée par le mycélium de *Rhizopus arrhizus*, il a été démontré que la régiospécificité 1-3 est conservée pratiquement pendant 24 h de réaction, durée au-delà de laquelle la composition en acides gras en position centrale n'est plus constante. Cependant pour ces 2 lipases, il faut noter qu'à l'équilibre qui est atteint pour des durées de réactions de l'ordre de la journée, les variations de composition en position centrale n'affectent respectivement que 5 % et 10 % des acides gras ce qui, somme toute, n'est pas très important.

A ce propos, il est probable que dans les faits ces variations de composition soient dues à des migrations d'acyles plutôt qu'à une perte de régiosélectivité des biocatalyseurs. En effet, si l'on attribue aux migrations d'acyles les modifications de la composition en position centrale, ces migrations deviennent dans les faits effectives à partir du moment où la réaction tend vers l'équilibre, c'est-à-dire quand la vitesse apparente de la réaction devient nulle. Compte tenu que les migrations d'acyles dues à des phénomènes d'isomérisation sont attribuées à la présence de glycérides partiels, ces phénomènes lents doivent exister dès le début. Toutefois, ils sont probablement masqués par la vitesse de transestérification initiale très rapide et sont, en fait, non apparents, ce qui n'est plus le cas lorsque la réaction de transestérification se ralentit. Ce fait pourrait être important car cela signifie que, même à l'équilibre, le système n'est pas figé et l'on peut supposer que si la réaction était maintenue pendant une longue durée après l'équilibre, la conséquence pourrait être une évolution vers une répartition statistique. Ce n'est d'ailleurs probablement pas un hasard si, dans le cas de la réaction catalysée par la lipase de *Rhizopus arrhizus* où la vitesse de transestérification est plus lente donc moins efficace que dans le cas de la réaction catalysée par le lipozyme, les phénomènes de migrations sont masqués moins longtemps et apparaissent donc plus tôt.

Toutefois dans la pratique, il semble qu'il soit préférable, bien que ces migrations d'acyles soient peu importantes, d'intervenir avant l'équilibre et notamment aux alentours de 90 % de taux de conversion c'est-à-dire avant la phase de ralentissement de la réaction enzymatique. A la lumière de ces résultats, on peut conclure que pour les biocatalyseurs suffisamment actifs, la régiosélectivité 1-3 est conservée pendant un temps suffisant, compatible avec les durées de réactions industrielles.

Cette étude en 3 volets sur l'aptitude à la transestérification des lipases, dans laquelle ont été successivement mis au point un test de détermination de l'activité de transestérification des biocatalyseurs, le contrôle de l'activité de l'eau dans les mélanges réactionnels et l'évaluation de la conservation de la spécificité des enzymes mises en œuvre, permet d'entreprendre désormais la valorisation biologique de l'huile de palme et de sa fraction concrète par interestérification inter-huiles. Malgré le fait que ce biocatalyseur soit très onéreux, le lipozyme (lipase de *Mucor miehei* immobilisée sur résine échangeuse d'anions) a été choisi pour effectuer quelques exemples d'application car c'est le biocatalyseur le plus actif.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MUDERHWA J., PINA M. et GRAILLE J. (1988) — *Oléagineux*, 43, N° 10, p. 385-392.
- [2] MUDERHWA J., PINA M. et GRAILLE J. (1988) — *Oléagineux*, 43, N° 11, p. 465-470.
- [3] MUDERHWA J., DHUIQUE-MAYER C., PINA M., GALZY P., GRIGNAC P. et GRAILLE J. (1987). — *Oléagineux*, 42, N° 5, p. 207-211.
- [4] MUDERHWA J., PINA M. et GRAILLE J. (1987) — *Rev. fr. Corps Gras*, 34, p. 533-541.
- [5] IUPAC (1979). — Détermination de la teneur en acides gras en position 2 dans les triglycérides - Division de chimie appliquée - Commission des matières grasses et dérivés 3^e éd., 1^{re} partie, Sections I et II, 2-210.
- [6] BROCKERHOFF H. (1987). — *J. Lipid Res.*, 8, p. 167-169.
- [7] YURKOWSKI M. and BROCKERHOFF H. (1966). — *Biochim Biophys Acta*, 125, p. 55-59.
- [8] NAUDET M. (1976) — *Rev. fr. Corps Gras*, 23, p. 387-391.
- [9] NAUDET M. (1974). — *Rev. fr. Corps Gras*, 21, p. 35-43.

SUMMARY

**Transesterification ability of some 1-3 regio-selective lipases.
III. — Stability of 1-3 regio-selectivity.**

J. MUDERHWA, M. PINA and J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 12, p. 465-470.

The final part of this study involves checking preservation over time of the 1-3 regio-selectivity of the biocatalysts used during the interesterification reaction. This reaction, which is biocatalyzed by 1-3 regio-selective lipases must not take up the central position of the triglycerides whose fatty acid composition must remain constant, at least for a duration compatible with the requirements of industrial reactions. This check was made by determining the internal-external distribution of the fatty acids using a copra/methyl stearate mixture and by monitoring stearic acid incorporation in position 2 of the copra triglycerides. For the mixture chosen, it was shown that the lipases studied, namely that of *Mucor miehei* (Lipozyme) and that of the *Rhizopus arrhizus* mycelium, keep their 1-3 regio-selectivity at least 12 hours, i.e. long enough to ensure practically the complete transformation of the fat without acyl transfer phenomena altering transesterification regio-selectivity.

RESUMEN

Habilidad de algunas lipasas regioselectivas 1-3 para la transesterificación. III. — Estabilidad de la regioselectividad 1-3.

J. MUDERHWA, M. PINA y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 12, p. 465-470.

La última parte de este estudio se refiere a la verificación de la conservación a través del tiempo de la regioselectividad 1-3 de biocatalizadores empleados durante la reacción de interesterificación. Esta reacción biocatalizada por las lipasas regioselectivas 1-3 no debe influir sobre la posición central de los triglicéridos cuya composición de ácidos grasos debe mantenerse constante, por lo menos por un plazo compatible con los requerimientos de las reacciones industriales. Este control se realizó estableciendo la distribución interna y externa de los ácidos grasos mediante el sistema de aceite de copra/estearato de metilo y siguiendo la incorporación del ácido esteárico en la posición 2 de los triglicéridos de copra. Dentro del sistema escogido, se demostró que las lipasas estudiadas, en especial la de *Mucor miehei* (Lipozima) y la del micelio de *Rhizopus arrhizus*, conservan su regioselectividad 1-3 durante 12 horas por lo menos, o sea un tiempo suficiente para asegurar casi la transformación completa de la grasa sin que los fenómenos de transferencias de acilas alteren la regioselectividad de la transesterificación.



Le 10ème Salon International
de l'Industrie de l'Alimentation Animale et
des Industries apparentées aura lieu à
Jaarbeurs/Utrecht/Pays Bas

les 23-24-25-26 Mai 1989

**Le Victam est le plus grand salon
international de l'industrie de l'alimentation
animale et des industries apparentées**

Industrie de l'alimentation animale, Meunerie, Industrie sucrière,
Décorticage, Traitement des oléagineux, Féculerie, Equanissage, Traitement
des céréales, Aliments d'allaitement, Aliments pour animaux familiers,
Aliments pour poissons, Fabrication des farines de poissons, Déshydratation,
Manutention et Stockage

Matériels exposés. Matériels et produits pour l'industrie;
Automation, Systèmes d'optimisation pour la
production à moindre coûts des aliments
composés, matières premières et additifs

Importance 350 exposants de 30 pays différents
15 000 visiteurs du monde entier

Surface 30 000 m²

Symposium. Un important symposium se déroulera durant
l'exposition (24-25 Mai) sur le thème: 'La
flexibilité, un impératif pour notre industrie face
à l'évolution des marchés.'

Organisateur. VICTAM INTERNATIONAL
B p 1103, 2302 BC LEIDEN, Pays Bas
téléphone. 71-768603; télécopie* 71-317554,
télécopie: 39103 Victa NL
Directeur: Piet Schrama