

Screening de l'activité lipasique dans des extraits végétaux de la biomasse burkinabé pour la synthèse d'esters éthylique d'huile végétale (EEHV)

Rédéo Wilfried MOUSSAVOU M¹, Christel BRUNSCHWIG¹, Pierre VILLENEUVE², Joël BLIN^{1,3}

RESUME

Les esters alkyliques d'acides gras synthétisés à partir d'huiles végétales par réaction d'éthanololyse (ou transestérification éthanolyse) peuvent être utilisés comme carburant dans les moteurs diesel du secteur de l'automobile. L'éthanololyse d'huile de tournesol a été testée en utilisant comme catalyseurs des lipases contenues dans certains extraits végétaux issus de biomasse burkinabé. En milieu aqueux, les extraits bruts de graines de karité, de balanites, d'arachide et de moringa sont actifs au cours de l'hydrolyse. La capacité de ces extraits à catalyser l'éthanololyse en milieu sans solvant a été étudiée par la suite. A l'exception des extraits de moringa, toutes les lipases contenues dans les extraits végétaux actifs en hydrolyse sont inactives en éthanololyse. Afin d'éviter l'inhibition des lipases par l'excès d'éthanol, des ajouts en trois étapes d'éthanol ont été réalisés, avec en parallèle, un conditionnement des extraits dans un environnement aqueux contrôlé. Dans ces conditions, les résultats obtenus montrent que les extraits de graines de karité, balanites sont capables de catalyser la conversion des triglycérides (TG) d'huile de tournesol en esters éthyliques.

INTRODUCTION

Récemment, avec la pénurie mondiale de combustibles fossiles, l'augmentation excessive du prix du pétrole brut et les prises en considérations des préoccupations environnementales, il y a un intérêt grandissant pour optimiser les procédés de production de biodiesel comme carburant de substitution au gasoil. L'utilisation du biodiesel dans les moteurs diesel du secteur de l'automobile contrairement à l'huile végétale ne nécessite aucune modification majeure ni ajustement du moteur et de ses composantes. Le biodiesel est très peu polluant, très facilement biodégradable et le CO₂ libéré par sa combustion est considéré comme étant principalement d'origine végétale. La production de biodiesel s'inscrit bien dans le cadre du développement des technologies innovantes pour répondre aux besoins énergétiques et à la lutte contre les changements climatiques avec en ligne de mire le développement d'une économie durable.

Le biodiesel est un mélange d'esters alkyliques obtenu par réaction de transestérification entre un alcool et les triglycérides (TG) qui sont les principaux constituants des huiles végétales. La plupart des esters préparés aujourd'hui sont des esters méthyliques. Ces derniers, faciles à synthétiser, sont préparés à partir de méthanol, un alcool peu cher qui est issu de la filière pétrochimique. Cependant, pour obtenir un ester à 100% issu de la biomasse végétale (donc 100% renouvelable) et pour les pays qui ne disposent pas de méthanol, l'idéal est de produire des esters éthyliques à partir d'éthanol. L'éthanol par rapport au méthanol est faiblement toxique pour l'environnement. Il peut être obtenu par fermentation de biomasse riche en sucre, en amidon ou en cellulose comme certains déchets de l'agriculture.

Dans le processus de fabrication de biodiesel, la réaction centrale est la transestérification des triesters de glycérol ou triglycérides en mono esters d'alkyls.

¹ Institut International d'Ingénierie de l'Eau et de l'Environnement (2iE), Rue de la Science 01 BP 594, Ouagadougou 01, Burkina Faso

² UMR IATE Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France

³ Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR Biomasse Energie, TA B-42/16, 73 rue Jean-François Breton, 34398 Montpellier Cedex 5, France



Équation 1: Transestérification des triglycérides (TG) en mono esters d'alkyles en présence d'un alcool avec libération du glycérol

Cette réaction peut être accélérée par un catalyseur de nature chimique (un acide ou une base) ou biologique (enzyme du type lipase). Les lipases ou triacylglycérol hydrolases (E.C.3.1.1.3) sont des enzymes responsables de l'hydrolyse des TG pour donner des diglycérides, des monoglycérides, des acides gras libres (AGL) et du glycérol dans un organisme. Par ailleurs, utilisées en biocatalyse, les lipases se révèlent être des outils intéressants pour catalyser non seulement l'hydrolyse, mais aussi diverses réactions de synthèse, telles que l'estérification, la transestérification, l'aminolyse etc., en milieu organique ou en l'absence de solvant et ce façon sélective et spécifique [1-3].

Problèmes spécifiques, liés à l'utilisation des lipases en biocatalyse

Cependant, bien que les lipases soient utilisées comme biocatalyseurs, et que celles-ci soient efficaces pour la biotransformation des TG en mono ester d'alkyl [4], la catalyse enzymatique pour la production d'esters alkyliques n'est pas répandue en milieu industriel. Le risque potentiel de la dénaturation des enzymes en milieu polaire, ainsi que les temps de réactions élevés, sont défavorables à la catalyse enzymatique par rapport aux systèmes catalysés par des agents chimiques. Mais la principale barrière réside dans les coûts trop élevés de la production d'enzymes qui sont pour la plupart d'origines microbiennes [3] faisant souvent appel à des techniques de modification génétique complexes et qui, pour la plupart, ne sont pas encore maîtrisées dans toutes les régions du globe, en particulier dans certains pays en voie de développement.

Un des moyens pour surmonter cette principale difficulté réside dans l'utilisation des lipases végétales comme biocatalyseur pour la production d'esters alkyliques. Par rapport aux lipases microbiennes ou aux lipases animales, les lipases végétales ont l'avantage d'être d'un coût plus faible, et faciles à mettre en œuvre lorsqu'elles sont utilisées après une purification sommaire et partielle de l'extrait végétal dont elles sont issues. [5]. Les lipases végétales ont démontré qu'elles pouvaient être stables et actives en milieux non aqueux (milieux organiques peu hydratés) [3, 6, 7]. Dans ce cas, leur utilisation peut considérablement faire baisser les coûts de production de biodiesel par voie enzymatique qui à l'heure actuelle restent le principal inconvénient pour une application à grande échelle.

C'est dans cette optique que l'étude réalisé au LBEB (Laboratoire Biomasse Energie et Biocarburant) a pour objectif la mise en œuvre d'un procédé de synthèse d'esters éthyliques d'huiles végétales, biocatalysé par des lipases contenues dans des extraits végétaux de biomasses végétales locales, qui devrait permettre ainsi d'obtenir du biodiesel, à faible coût, et à partir de ressources naturelles, renouvelables, et locales.

Screening des lipases végétales

Des lipases végétales sous forme d'extraits végétaux bruts obtenus à partir de graines oléagineuses ont été testées en screening. L'activité lipasique de ces extraits a été mise en évidence dans un premier temps par un test d'hydrolyse en milieux aqueux. Ensuite, les extraits actifs en hydrolyse, ont été testés pour catalyser des réactions de synthèse d'esters alkyliques par éthanolyse de l'huile de tournesol en milieu sans solvant. Le choix de travailler avec des lipases provenant d'extraits de graines oléagineuses se justifie par le fait que: i) la plupart des graines oléagineuses contiennent des lipases capables d'être utilisées dans la biotransformation des lipides [3]. ii) la forte disponibilité locale des graines choisies, iii) les graines représentent un matériel biologique facile à collecter et à mettre en forme avec les moyens dont nous disposons au LBEB.

MATERIEL ET METHODES

Collecte et préparation des extraits lipasiques

Le matériel biologique utilisé regroupe sept (7) extraits végétaux bruts provenant de graines oléagineuses à l'état dormant ou germé disponibles localement. Ces graines proviennent des végétaux suivant: le karité (*Vitellaria paradoxa*), l'anacarde (*Anacardium occidentale*), l'arachide (*Arachis hypogaea*), le balanites (*Balanites aegyptiaca*), la mangue (*Mangifera indica*), le *Moringa oleifera*, et le neem (*Azadirachta indica*). Les extraits végétaux bruts ont été obtenus après broyage, séchage (doux 35°C) et délipidation à l'hexane des graines.

Hydrolyse des TG

3g d'extraits végétaux sont introduits dans un mélange hétérogène, contenant 15 g d'huile de tournesol et 150 mL d'eau (pH entre 6 et 7) Le mélange obtenu est homogénéisé au moyen d'un agitateur magnétique avec une vitesse de rotation de 400 rpm pendant 7 jours à température ambiante (~30°C). 20 mL de chaque milieu réactionnel a été prélevé après 24, 48, 72 et 168 heures. Les échantillons prélevés sont lavés à l'hexane puis centrifugés pendant 30 minutes à 2000 rpm. Les phases hexaniques récupérées sont regroupées puis évaporées sous pression réduite (40°C, 400 mbar). 100 mg de l'huile récupérée est solubilisés dans 2,5 mL d'hexane et 10 µL de cette solution sont déposés sur plaques CCM.

Stabilisation des biocatalyseurs dans un environnement aqueux contrôlé

Les extraits végétaux sont placés ensemble dans un dessiccateur contenant une solution saturée de sel pendant une durée minimum de 2 semaines à 31 °C afin de les pré équilibrer à l'activité de l'eau requise Le sel utilisé est le NaCl ($a_w=0,75$).

Transestérification éthanolique en milieu sans solvant

La transestérification de l'huile de tournesol avec l'éthanol a été réalisée avec les extraits les plus actifs en hydrolyse. Les essais de transestérification sont réalisés sur 72 heures, avec une charge d'extrait enzymatique de 20% m/m par rapport à l'huile. La réaction est initiée en introduisant 2.75g d'extraits végétaux dans un mélange d'huile et d'éthanol (ratio molaire 1:27), le tout sous agitation (quel type d'agitation) à température ambiante (~30°C). Des échantillons (100 mg) sont prélevés périodiquement (après 24H, 48H, 72H) du milieu réactionnel.

Lors des essais avec des ajouts dosés d'éthanol, la réaction a été initiée dans les conditions stœchiométriques suivantes: un équivalent en mole d'éthanol pour 2 équivalents en moles de TG. Ensuite 1 mole d'éthanol a été ajoutée après 24h et 48h.

Analyses par chromatographie sur couche mince

Dans ce travail, seule une analyse semi-quantitative par chromatographie sur couche mince (CCM) a été effectuée pour le suivi des réactions. Le mélange composé d'hexane, d'éther éthylique et d'acide acétique dans les proportions (70:30:1, v/v/v) a été utilisé comme système de d'élution. Ensuite les plaques ont été révélées à chaud (~175°C, 10 min) avec un mélange sulfate de cuivre-acide ortho phosphorique-méthanol-eau dans les proportions (10:8:5:78).

RESULTATS ET DISCUSSION

Avant la conduite des réactions d'éthanololyse, les activités lipolytiques de sept (7) extraits végétaux sur de l'huile de tournesol en milieu aqueux ont été mises en évidence et la libération d'acide gras a été suivie par CCM.

Tableau 1 : Réponse aux essais d'hydrolyse et d'éthanololyse de l'huile de tournesol, catalysées par les extraits végétaux testés au bout de 48h de réaction.

Biomasses		Test d'hydrolyse	Test d'éthanololyse			
			Extraits végétaux bruts		Extraits végétaux conditionnés à a_w NaCl	
			Excès d'éthanol	Ajouts dosés	excès d'éthanol	ajouts dosés
Anacarde	Dormant	-				
	Germé	-				
Arachide	Germé	+	-	-	-	-
Balanites	Dormant	-				
	Germé	+	-	++	+	+
Karité	Dormant	+	-	++	+	+
	Germé	+	-	++	+	+
Mangue	Germé	-				
Moringa	Dormant	-				
	Germé	++	++	+++	+	++
Neem	Dormant	-				
	Germé	-				
Témoin		-	-	-	-	-

- : pas d'activité ;
 + : activité moyenne ;
 ++ : activité forte,
 +++ : activité très forte.

En gris : tests non réalisés.

Activités hydrolytiques des extraits végétaux

Comme le montre le tableau 1, seuls les extraits de graines d'arachide germées, de karité dormantes et germées, de balanites germées et de moringa germées accélèrent d'hydrolyse des TG de l'huile de tournesol au bout de 48h de réaction, et ce avec des efficacités à l'hydrolyse différentes. Au delà de 48h de réaction, la fiabilité de l'analyse CCM est limitée, car l'analyse révèle la présence d'un composé dans le milieu témoin qui migre avec un rapport frontal proche de celui des AGL. Une CCM qualitative plus précise ou une analyse GC nous permettrait d'identifier ce composé

D'après ces résultats, il ressort que les extraits de neem, mangue, anacarde et balanites dormant sont inactifs en hydrolyse dans ces conditions expérimentales. En revanche, les extraits de karité (dormants et germés), de balanites germés, d'arachides germées et de moringa germé contiennent des enzymes qui peuvent être utilisés comme catalyseurs de l'hydrolyse des TG.

Activités d'éthanololyse des extraits végétaux

Les extraits de karité dormants et germés, de balanites germés, d'arachides germées et de moringa étant actifs comme catalyseurs pour l'hydrolyse des TG, il apparaît que ceux-ci contiennent donc des lipases. La capacité de ces derniers à catalyser des réactions de transestérification éthanolique a donc été étudiée. Les produits réactionnels, notamment les esters éthyliques ont été séparés et identifiés par CCM.

Au regard des résultats obtenus (Figure 1), il ressort que seuls les extraits de *Moringa oleifera* germés présentent une activité catalytique au cours de la transestérification en milieux sans solvant et en présence d'excès d'éthanol. En dehors de cet extrait, tous les autres extraits, précédemment actifs en hydrolyse, sont inactifs en transestérification dans les conditions opératoires choisies (large excès d'éthanol). Plusieurs études faisant ressortir des relations entre les activités hydrolytiques en milieu aqueux et les activités synthétiques en milieu non conventionnel ont été menées. D'après les travaux de *Klibanov AM* [8], et de *Gandolfi R*, [9], il ressort que les données sur les activités hydrolytiques des enzymes ne permettent pas de prédire le comportement en milieu organique de leurs activités synthétiques. D'où la nécessité de mener des investigations sur l'effet de l'eau et de l'alcool sur l'activité catalytique des lipases des extraits végétaux au cours de la transestérification. Ces paramètres sont connus pour faire partie des paramètres [10] qui contrôlent l'activité catalytique des lipases et le rendement de la transestérification

Effets de l'activité de l'eau sur l'éthanololyse catalysée par les lipases contenues dans les extraits végétaux.

En milieu sans solvant, après conditionnement de tous nos extraits végétaux dans un environnement aqueux contrôlé où l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) est de 0.75, on observe l'apparition d'esters d'acides gras au cours du test de la transestérification éthanolique. En effet, l'influence de son microenvironnement aqueux sur l'activité de l'enzyme est un paramètre très important, notamment en milieu organique. En milieu organique, l'apport d'un minimum d'eau dans le microenvironnement des lipases est nécessaire. [11] [7]

Cette eau a pour rôle d'assurer premièrement la conformation active à l'enzyme. L'environnement naturel des enzymes est l'eau, dans un milieu apolaire, les enzymes ont tendance à se réorganiser pour minimiser les contacts avec les molécules apolaires. La conformation de l'enzyme et donc l'accès au site actif et de fixation peuvent être altérée. Compte tenu de la nature protéique des enzymes, les lipases contenues dans les extraits végétaux testés semblent être inactivées par l'excès d'alcool, à l'exception des lipases contenues dans les extraits de moringa qui elles présentent une forte résistance à l'éthanol et montrent une aptitude à catalyser la formation d'esters éthyliques dans ces conditions.

Effets de l'alcool sur l'éthanololyse catalysée par les lipases contenues dans les extraits végétaux

Des études antérieures décrites par *Mittelbach* [12] et *Basri et al.* [13] démontrent que l'effet inhibiteur du méthanol sur certaines lipases est étroitement lié à la polarité du milieu réactionnel essentiellement contrôlée par l'alcool présent en excès. En s'inspirant de ces travaux, nous avons appliqué la méthode des ajouts dosés pour pallier à ce phénomène d'inhibition des lipases qui pourrait être lié à l'excès d'éthanol dans notre cas. Cette méthode consiste à ajouter progressivement des faibles quantités d'alcool par intervalles de temps réguliers pendant toute la durée de la réaction.

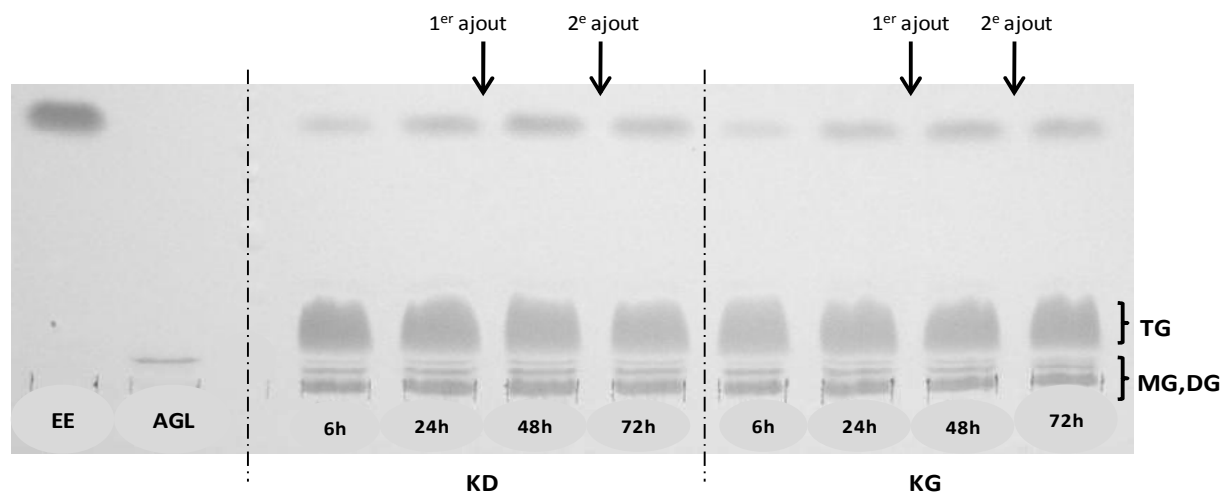


Figure 1 : Analyse CCM du test de transestérification par ajouts dosés d'éthanol avec les extraits bruts karité dormant (KD) et de karité germés (KG). 1 équivalent en mole d'éthanol par rapport au nombre de mole de TG de l'huile végétale a été ajouté à 0, 24 et 48h. EE=ester éthylique, TG=triglycérides, DG=diglycéride et MG=monoglycérides

Avec cette stratégie, la formation d'esters éthyliques a pu être observée au cours des essais d'éthanolyses catalysés par les extraits bruts de balanites germés, de karités dormants et germés inactivés précédemment lors des tests avec un excès d'éthanol (Figure 1). Ces résultats sont en accord avec ceux de *Shimada* et al. [14] qui ont démontré dans leur cas, que les ajouts dosés de méthanol sont efficaces pour la conversion d'acide gras d'huile végétale en leurs esters d'alkyl correspondants en réduisant l'inactivation de la lipase mise en œuvre. En effet, l'éthanol lorsqu'il est en excès peut former un azeotrope avec l'eau nécessaire pour maintenir la structure active des lipases ce qui peut conduire à la baisse d'activité ou à l'inactivation du biocatalyseur éventuel [15]. Ainsi, l'ajout dosé d'éthanol a permis de réduire cet effet, et explique la conversion observée. Et avec l'analyse des résultats observés avec les extraits de moringa bruts, l'ajout dosé d'éthanol permet aussi d'améliorer le rendement de transestérification qui se traduit par l'augmentation de la quantité d'esters éthyliques synthétisés.

CONCLUSION

Au cours de ce travail de pré-caractérisation de lipases végétales, nous avons procédé à la mise en œuvre de réactions enzymatiques, tels que l'hydrolyse et la transestérification éthanolique de l'huile de tournesol, le tout catalysé par des extraits végétaux issus de la biomasse burkinabé. Ces travaux nous ont permis d'apprécier de manière qualitative uniquement, les pouvoirs catalytiques de certaines lipases contenues dans les extraits de biomasses végétales comme le karité, le balanites, et le moringa qui ont pas été étudiés pour la première fois. Les lipases végétales testées dans cette étude ont conduit à des résultats qui varient selon le conditionnement des extraits et la composition du mélange réactionnel. D'une manière générale, le conditionnement de l'enzyme et l'ajout d'éthanol au milieu réactionnel à des intervalles de temps permettent d'augmenter considérablement l'activité enzymatique des lipases contenues dans les extraits. Compte tenu de l'intérêt croissant des esters d'huiles végétales dans le domaine des biocarburants, d'une part et sachant que les coûts de production actuels de biodiesel par catalyses chimiques sont inférieurs à ceux des processus enzymatiques d'autre part, la production à moindre coût des préparations de lipases d'origine végétale et utilisables comme biocatalyseurs pourrait donner lieu au remplacement des procédés chimiques par les procédés enzymatiques plus respectueux de l'environnement.

RÉFÉRENCES

1. Hellyer, S.A., I.C. Chandler, and J.A. Bosley, *Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1999. **1440**(2-3): p. 215-224.
2. Domínguez de María, P., et al., *Carica papaya lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst.* Biotechnology Advances. **24**(5): p. 493-499.
3. M. Barros, L.F. Fleuri, and G.A. Macedo, *Seed lipases: sources, applications and properties – A review.* Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2010. **27**(1): p. 15-29.
4. Xu, X., *Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalyzed Reactions: a Review.* European Journal of Lipid Science and Technology, 2000. **3**: p. 287.
5. Villeneuve, P., *Plant lipases and their applications in oils and fats modification.* European Journal of Lipid Science and Technology, 2003. **105**(6): p. 308-317.
6. CAMBON, E., *Plantes laticifères : Mise en évidence et applications des activités lipasiques de Carica pentagona et Plumeria rubra*, in *École Doctorale: Sciences des procédés – Sciences des aliments*. 2008, Université Montpellier 2, Sciences et Techniques du Languedoc. p. 154.
7. Caro, Y., et al., *Plant lipases: Biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reactions.* Biotechnology and Bioengineering, 2002. **77**(6): p. 693-703.
8. Klivanov, A., *Why are enzymes less active in organic solvents than in water?* Trends Biotechnology, 1997 **15**: p. 97-101.
9. Gandolfi R, et al., *Cell-bound and extracellular carboxylesterase from Streptomyces : hydrolytic and synthetic activities.* Journal of Applied Microbiology, 2000 (89): p. 870-5.
10. Bajaj, A., et al., *Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010. **62**: p. 9-14.
11. Haas MJ, P.G., Foglia TA, *Enzymatic approaches to the production of biodiesel fuels.* Lipid biotechnology, 2002: p. 587–98.
12. Mittelbach, M., *Lipase-catalyzed alcoholysis of sunflower oil.* Journal of American Oil Chemical Society 1990(67): p. 168-70.
13. Basri M, Heng AC, and Razak CNA, *Alcoholysis of palm oil mid-fraction by lipase from Rhizopus rhizopodiformis.* Journal of American Oil Chemical Society 1997 (74): p. 113-6.
14. Y. Shimada, et al., *Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized Candida antarctica lipase.* Journal of American Oil Chemical Society, 1999 (76): p. 789-793.
15. Mohamed M. Soumanoua and U.T. Bornscheuer, *Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils.* European Journal of Lipid Science and Technology, 2003(105): p. 656–660.