

Liste d'abréviations	13
Introduction générale	19

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1. Introduction.....	29
2. Réglementation.....	30
2.1. Alimentation conventionnelle.....	30
2.2. Alimentation certifiée biologique	30
2.3. Le concept du « clean-label »	31
2.4. Les additifs	34
2.5. Les auxiliaires technologiques.....	37
3. Systèmes dispersés et agents stabilisants	39
3.1. Les émulsions.....	39
3.1.1. Emulsions simples	39
3.1.2. Emulsions de Pickering	40
3.1.3. Emulsions concentrées	41
3.1.4. Emulsions multiples	42
3.2. Les mousses	43
3.3. Molécules assurant la stabilisation des émulsions et des mousses	45
3.3.1. Les tensioactifs	45
3.3.1.a. Les lécithines	49
3.3.1.b. Les mono- et diglycérides.....	50
3.3.2. Le Polyglycerol polyricinoleate (PGPR)	52
3.3.3. Les protéines.....	52
3.3.4. Les particules solides stabilisantes.....	54
3.3.5. Agents de texture	55
3.4. Instabilités des systèmes dispersés	55
3.4.1. Les émulsions	55
3.4.1.a. Crémage et sédimentation.....	56

3.4.1.b. Flocculation	57
3.4.1.c. Coalescence	58
3.4.1.d. Murissement d'Ostwald	59
3.4.2. Les mousses.....	59
4. Impacts des mono et diglycérides dans les matrices alimentaires	60
4.1. Rôle sur le rassissement.....	61
4.2. Rôle sur le développement de l'alvéolation	64
4.3. Rôle sur l'émulsification et le foisonnement	66
4.4. Rôle sur la texture des huiles végétales	68
5. Les enzymes comme auxiliaires technologiques	70
5.1. Nomenclature et classification.....	70
5.2. Structure et activité.....	71
5.3. Mode d'action	72
5.4. Grandes classes d'enzymes utilisées dans l'agro-alimentaire	74
6. Conclusion	77
7. Références bibliographiques	78

Chapitre 2 : Caractérisation des MDGs et des huiles végétales

1. Introduction.....	99
2. Caractérisations des MDGs	100
2.1. RMN	100
2.1.1. Intérêt de la méthodologie	100
2.1.2. RMN ^1H d'un mélange de MDGs.....	101
2.1.3. RMN des standards.....	102
2.1.3.a. Déplacements chimiques en RMN ^1H	102
2.1.3.b. Déplacements chimiques en RMN ^{13}C	104
2.1.3.c. RMN 2D	106
2.1.4. Attribution des signaux des MDGs commerciaux en RMN ^1H	108
2.2. Identification des molécules des MDGs commerciaux	109

3. Caractérisations des huiles végétales de colza et de tournesol.....	112
3.1. RMN	112
3.1.1. RMN ¹ H.....	112
3.1.2. RMN ¹³ C.....	113
3.1.3. Analyse des huiles par RMN ¹³ C	116
3.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	117
3.3. Tension de surface	122
3.4. DSC.....	125
4. Conclusion	127
5. Partie expérimentale	128
5.1. Liste des produits utilisés	128
5.2. Identifications des standards par RMN.....	128
5.3. Analyses de la composition en acide gras de l'huile par CPG	132
5.4. Tension de surface	132
5.5. DSC.....	132
6. Références bibliographiques	134

Chapitre 3 : Lipolyse enzymatiques des huiles végétales

1. Introduction.....	141
2. Principe de la lipolyse enzymatique sur une huile végétale	142
3. Lipolyse enzymatique de l'huile de colza avec l'enzyme Sumizyme[®] NLS.....	143
3.1. Suivi par indice d'acidité.....	145
3.2. Suivi par tension de surface	146
3.3. Identification des molécules formées au cours de la lipolyse	147
3.3.1. Analyse CPG	148
3.3.2. Analyses RMN	150
3.3.2.a. RMN ¹ H.....	150
3.3.2.b. RMN ¹³ C.....	152
3.4. Etude de recyclage de l'enzyme Sumizyme [®] NLS	156

3.4.1. Suivi par indice d'acidité	156
3.4.2. Analyse RMN ^{13}C	157
4. Lipolyse avec changement du substrat	159
4.1. Suivi par indice d'acidité	159
4.2. Analyse RMN ^{13}C	160
5. Lipolyse avec changement d'enzyme	162
5.1. Suivi par mesures d'indice d'acidité	163
5.2. Suivi par tension de surface	165
5.3. Analyse RMN ^{13}C	166
5.3.1. Production en AGLs	167
5.3.2. Production en DGs	169
5.3.3. Production en MGs	170
5.4. Analyse thermique des huiles hydrolysées	171
6. Conclusion et perspectives	174
7. Partie expérimentale	177
7.1. Produits commerciaux utilisés	177
7.2. Réactions enzymatiques	177
7.2.1. Activation des enzymes	177
7.2.2. Catalyse en milieu émulsionné	178
7.2.3. Prélèvements et inactivation des enzymes	178
7.2.4. Recyclage des enzymes	178
7.3. Détermination de l'indice d'acidité	178
7.4. Détermination de l'indice de peroxyde.....	179
7.5. Analyse CPG	180
7.6. Analyse RMN.....	180
7.6.1. RMN ^1H	180
7.6.2. RMN ^{13}C	180
7.7 Analyse DSC	180
9. Références bibliographiques	182

Chapitre 4 : Intérêt des huiles hydrolysées dans les systèmes alimentaires

1. Introduction.....	189
2. Applications des huiles hydrolysées dans les émulsions	190
2.1. Les émulsions inverses	190
2.1.1. Caractérisations	195
2.1.1.a. Rhéologie oscillante.....	195
2.1.1.b. Microscopie optique	196
2.1.1.c. Granulométrie laser.....	199
2.2. Les émulsions doubles.....	201
3. Réactions enzymatiques en lot pilote.....	204
3.1. Indice d'acidité et mesure de tension de surface	204
3.2. Etude RMN ¹³ C	206
4. Utilisation des huiles hydrolysées dans des matrices alimentaires	208
4.1. Les crèmes glacées	208
4.1.1. Fabrications	209
4.1.2. Etude d'écoulement	211
4.1.3. Etude de la dureté	214
4.2. Les barres pâtisseries	216
4.2.1. Fabrication.....	216
4.2.2. Substitution de l'huile végétale.....	217
4.2.3. Ajustement de la quantité d'huile hydrolysée	218
4.2.4. Suivi dans le temps de la dureté.....	221
4.2.5. Sensibilité à l'oxydation	224
4.3. Les brioches	227
4.3.1. Fabrication.....	227
4.3.2. Substitution de l'huile.....	228
4.3.3. Etude du recyclage des enzymes.....	230
4.3.3.a. Mesure de la dureté à t_0	230
4.3.3.b. Suivi de la dureté dans le temps.....	231

5. Conclusion et perspectives	233
6. Partie expérimentale	235
6.1. Ingrédients utilisés.....	235
6.2. Réactions enzymatiques sur pilotes	235
6.2.1. Stephan®	235
6.2.2. CDH®	236
6.2.3. Séparation des phases	237
6.3. Analyse de l'oxydation des huiles végétales.....	237
6.4. Analyse du rancissement des huiles.....	237
6.5. Analyse des teneurs en phospholipides des lécithines	237
6.6. Fabrication des émulsions	238
6.6.1. Emulsions inverses	239
6.6.2. Emulsions doubles.....	239
6.7. Caractérisations des émulsions	239
6.7.1. Rhéologie	239
6.7.2. Microscopie optique	240
6.7.3. Granulométrie.....	240
6.8. Fabrication des matrices alimentaires.....	240
6.8.1. Fabrication des crèmes glacées.....	241
6.8.2. Fabrication des barres pâtisseries.....	244
6.8.3. Fabrication des brioches	246
6.9. Mesures de texturométrie	248
6.9.1. Des crèmes glacées.....	248
6.9.2. Des produits céréaliers.....	249
6.9.3. Mesure du taux d'écoulement des glaces.....	249
7. Références bibliographiques	250
Conclusion générale	249

Liste des abréviations

Chiffres

1,2-DGs : 1,2-diglycérides

1,3-DGs : 1,3-diglycérides

1-MGs : 1-monoglycérides

2-MGs : 2-monoglycérides

Lettres grecques

γ : Tension de surface (mN/m)

δ : Déplacement chimique (ppm)

Δ_E : Energie (J)

Δ_G : Enthalpie libre (J)

Δ_ρ : Différence de masse volumique (kg.m⁻³)

η_c : Viscosité dynamique de la phase continue (Pa.s)

θ : Angle de contact (°)

ρ_c : Masse volumique de la phase continue (kg.m⁻³)

ρ_d : Masse volumique de la phase dispersée (kg.m⁻³)

ϕ : Fraction volumique (%)

ϕ^* : Fraction volumique seuil (%)

ϕ_c : Fraction volumique critique (%)

Σ : Somme

A

AG : Acides gras

AGI : Acides gras insaturés

AGLs : Acides gras libres

AGS : Acides gras saturés

a_0 : Aire de la tête polaire du tensioactif (Å²)

A_w : Activité de l'eau

C

CI : Indice de complexation de l'amylose (%)

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CMC : Carboxylméthyl cellulose

COSY : Correlation Spectroscopy

D

D[3,2] : Diamètre moyen des gouttes en surface (μm)

D[4,3] : Diamètre moyen des gouttes en volume (μm)

d_e : Diamètre de la goutte (m)

DJA : Dose Journalière Admissible (mg.kg^{-1})

DGs : Diglycérides

DSC : Differential Scanning Calorimetry (calorimétrie différentielle à balayage)

E

E : Eau

EC : Ethylcellulose

EFSA : European Food Safety Authority (Agence de la santé Européenne)

G

g : Accélération de l'apesanteur (m.s^{-2})

G : Glycérol

G' : Module élastique (Pa)

G'' : Module visqueux (Pa)

H

H: Huile

HLB : Hydrophilic Lipophylic Balance

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMPC : Hydroxylpropylméthyl cellulose

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

I

I_A : Indice d'acidité (mg de KOH/g d'huile)

I_P : Indice de peroxyde (milliéquivalents d' O_2/kg d'huile)

L

l_c : Longueur de la chaîne du tensioactif ($\text{\AA}$)

M

MDGs : Mono- et diglycérides d'acides gras

MGs : Monoglycérides

MM : Masse molaire (g.mol^{-1})

N

nd : non détecté

n.i : non informé

O

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

P

p : Paramètre d'empilement

PA : Acide phosphatidique

PC : Phosphatidylcholines

PE : Phosphatidyléthanolamines

PGPR : Polyglycerol polyricinoleate

pH : Potentiel hydrogène

pI : Point isoélectrique

PI : Phosphatidylinositols

PS : Phosphatidylsérines

pKa : Constante d'acidité

PNNS : Programme National de Nutrition Santé

R

r : Rayon (m)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMN ^{13}C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone

RMN ^1H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

RMN ^{31}P : Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore

rpm : Rotation par minute

T

T_{amb} : Température ambiante ($^{\circ}\text{C}$)

T_c : Température de cristallisation ($^{\circ}\text{C}$)

T_f : Température de fusion ($^{\circ}\text{C}$)

TGs : Triglycérides

t_0 : Temps après fabrication

V

v : Vitesse (m.s^{-1})

v_0 : Volume de la tête polaire du tensioactif ($\text{\AA}^3$)

Introduction générale

Le monde agroalimentaire a subi de nombreuses crises ces dernières années qui ont fragilisé la confiance des consommateurs vis-à-vis des produits de grande consommation. On peut citer les scandales sanitaires tels que l'affaire Spanghero (de la viande chevaline retrouvée dans des plats cuisinés au bœuf) ou encore la vache folle au Royaume-Uni. On observe également les prises de conscience environnementales et de santé publique qui ont poussé les consommateurs à vouloir limiter leur consommation d'huile de palme ou d'additifs comme le dioxyde de titane (interdit, depuis janvier 2021). Ces crises alimentaires peuvent donc avoir des origines variées, environnementales, bactériologiques, chimiques, épidémiologiques ou encore économiques. Leur succession a impliqué une perte de confiance du consommateur vis-à-vis des produits qu'il achète et de l'industrie alimentaire en général. Son comportement a donc évolué, avec une attention grandissante sur son alimentation et sa santé.

Dans un même temps, l'offre alimentaire s'est diversifiée et de nouveaux régimes alimentaires apparaissent et se démocratisent tels que le véganisme, les « produits-sans » par exemple sans lactose, sans gluten, ou encore les produits labellisés tels que « agriculture biologique ». Ces labels sont apparus pour répondre à la demande du consommateur souhaitant acheter des produits plus sains, plus respectueux de l'environnement, avec des ingrédients connus et naturels... Les consommateurs portent aussi une plus grande attention aux allégations de santé et aux informations qui apparaissent sur l'emballage des produits (notamment le diagnostic nutritionnel et la liste d'ingrédients). Le bouleversement dans les modes de consommation a fait naître le concept dit du « clean-label », qui consiste essentiellement à avoir des déclarations claires et transparentes pour le consommateur. La recherche de la naturalité et de l'authenticité sont les caractéristiques principales de cette tendance. Le défi actuel de l'industrie alimentaire est donc de s'adapter à ces nouveaux modes de consommation pour retrouver la confiance des consommateurs.

Parmi les substances décriées par les consommateurs, on retrouve les additifs alimentaires, identifiables par les codes « E » sur l'emballage. Ils apportent de la fonctionnalité aux produits et permettent de moduler les propriétés organoleptiques et/ou sanitaires des produits transformés (conserver la texture du produit le plus longtemps possible, limiter la prolifération de flores microbiologiques ou bactériennes...). Toutefois, leur forte consonance chimique fait perdre l'idée de naturalité du produit tant recherchée. Dans le but d'éviter l'utilisation de ces additifs, certains industriels peuvent avoir recours à l'emploi d'auxiliaires technologiques. Ils sont utilisés au cours du procédé de fabrication pour apporter les mêmes propriétés que les additifs mais les auxiliaires technologiques sont désactivés et/ou éliminés

lors de ce même procédé de fabrication. Par conséquent, ils n'apparaissent donc pas dans la liste des ingrédients du produit fini.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse, dans lesquels nous avons souhaité remplacer certains additifs dans les matrices alimentaires afin de préparer des produits « clean-label » pour répondre aux nouvelles exigences des consommateurs. Pour cela nous nous sommes focalisés sur les mono- et diglycérides d'acides gras (MDGs ; E471). Cette catégorie d'additifs est présente dans de nombreuses matrices alimentaires où ils peuvent avoir différents rôles en fonction des produits dans lesquels ils sont incorporés. Le remplacement des MDGs est complexe car il faut, bien souvent, revoir la formule et/ou le procédé de fabrication. Au cours de nos travaux, nous avons donc cherché à impacter le moins possible la formulation. Afin d'éviter l'utilisation exogène des MDGs, nous avons voulu les générer *in situ* dans des huiles végétales, ingrédients essentiels et récurrents lors de la fabrication de matrices alimentaires. Dans ce but, nous avons travaillé avec des enzymes, reconnues comme auxiliaires technologiques et dont l'usage est connu dans le domaine agroalimentaire. A la différence d'une utilisation usuelle, où l'enzyme est directement intégré dans le produit fini, le concept développé ici est basé sur la lipolyse enzymatique d'huiles végétales comme étape en amont de la fabrication. Le but de ce travail est donc d'étudier la synthèse *in situ* des MDGs puis de caractériser les huiles hydrolysées et de les incorporer ensuite dans des matrices alimentaires comme finalité ultime.

Le premier chapitre sera une revue bibliographique sur le concept du « clean-label » ainsi que sur la réglementation européenne des produits alimentaires. Les différents systèmes dispersés que l'on retrouve seront abordés. Nous décrirons notamment les modes de stabilisation via les agents stabilisants ainsi que les différents mécanismes de déstabilisation. Nous nous focaliserons ensuite sur les principaux rôles des MDGs dans les matrices alimentaires et leurs modes d'action. Pour finir, une description des enzymes sera réalisée en se focalisant sur les lipases, catégorie d'enzymes que nous allons cibler pour former des mono- et diglycérides.

Dans un second chapitre, nous aborderons les différentes méthodologies utilisées pour la caractérisation des MDGs et des huiles végétales. Nous verrons l'intérêt que présente la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) dans la caractérisation de mélanges complexes contenant différents MDGs. Nous aborderons aussi la caractérisation approfondie des huiles végétales de colza et de tournesol, par les techniques de Chromatographie en Phase

gazeuse (CPG), de tensiométrie de surface et de calorimétrie différentielle à balayage (DSC), qui nous serviront de manière récurrente pour la suite des études.

Le troisième chapitre sera consacré à l'étude des réactions de lipolyses enzymatiques sur les huiles végétales. L'objectif sera de montrer la possibilité de former des MDGs *in situ* par l'action de lipases et de caractériser l'ensemble des molécules hydrolysées que ce soit qualitativement et/ou quantitativement. Afin de prouver la généralisation du procédé développé, différentes huiles végétales et lipases seront testées. La recyclabilité des enzymes et l'impact de la lipolyse sur les propriétés physico-chimiques des huiles hydrolysées seront présentées.

Enfin, le dernier chapitre sera consacré à l'utilisation de ces huiles hydrolysées dans des matrices alimentaires. Nous étudierons par ce biais, l'intérêt de l'incorporation, en tant qu'ingrédient alimentaire, de ces huiles hydrolysées différemment enrichies en MDGs, dans les matrices alimentaires. Pour cela, dans un premier temps, nous aborderons la formulation d'émulsions inverses et doubles stabilisées à partir d'huiles hydrolysées et étudierons leurs stabilités. Nous nous consacrerons ensuite à la transposition d'échelle c'est-à-dire du laboratoire vers le pilote de la réaction de lipolyse enzymatique. Enfin, les MDGs pouvant avoir différents rôles dans les matrices alimentaires, nous étudierons l'impact de l'utilisation des huiles hydrolysées dans la fabrication de crèmes glacées, de barres pâtisseries et de brioches.

Chapitre 1 :

Etude bibliographique

Tables des matières

1. Introduction.....	29
2. Réglementation.....	30
2.1. Alimentation conventionnelle.....	30
2.2. Alimentation certifiée biologique	30
2.3. Le concept du « clean-label »	31
2.4. Les additifs	34
2.5. Les auxiliaires technologiques.....	37
3. Systèmes dispersés et agents stabilisants	39
3.1. Les émulsions.....	39
3.1.1. Emulsions simples	39
3.1.2. Emulsions de Pickering	40
3.1.3. Emulsions concentrées	41
3.1.4. Emulsions multiples	42
3.2. Les mousses	43
3.3. Molécules assurant la stabilisation des émulsions et des mousses	45
3.3.1. Les tensioactifs	45
3.3.1.a. Les lécithines	49
3.3.1.b. Les mono- et diglycérides.....	50
3.3.2. Le Polyglycerol polyricinoleate (PGPR)	52
3.3.3. Les protéines.....	52
3.3.4. Les particules solides stabilisantes.....	54
3.3.5. Agents de texture	55
3.4. Instabilités des systèmes dispersés	55
3.4.1. Les émulsions	55
3.4.1.a. Crémage et sédimentation.....	56
3.4.1.b. Floculation	57
3.4.1.c. Coalescence	58
3.4.1.d. Murissement d'Ostwald	59

3.4.2. Les mousses.....	59
4. Impacts des mono et diglycérides dans les matrices alimentaires	60
4.1. Rôle sur le rassissement.....	61
4.2. Rôle sur le développement de l'alvéolation	64
4.3. Rôle sur l'émulsification et le foisonnement	66
4.4. Rôle sur la texture des huiles végétales	68
5. Les enzymes comme auxiliaires technologiques	70
5.1. Nomenclature et classification.....	70
5.2. Structure et activité.....	71
5.3. Mode d'action	72
5.4. Grandes classes d'enzymes utilisées dans l'agro-alimentaire	74
6. Conclusion	77
7. Références bibliographiques	78

1. Introduction

Les travaux de recherches menés tout au long de cette thèse concernent la physico-chimie des systèmes dispersés appliqués au domaine de l'agroalimentaire. Les axes étudiés sont d'une part le développement d'un nouveau procédé « clean-label » qui permet de se passer d'un additif, basé sur l'utilisation de réactions enzymatiques et d'autre part son utilisation dans la fabrication de matrices alimentaires diverses, dans le domaine des produits sucrés. Cette approche va permettre de limiter l'utilisation d'additifs déclarés sur l'étiquetage des produits, qui apportent de la fonctionnalité au produit. Ceci permet ainsi de répondre à la demande, toujours plus croissante, des consommateurs et des industriels. En effet, à l'heure actuelle, les consommateurs sont de plus en plus regardants sur les produits qu'ils consomment et les industriels doivent formuler dans un esprit de naturalité et de transparence. L'une des principales difficultés de cette approche réside dans le remplacement des additifs sans perte de leurs avantages fonctionnels. Le recours à l'utilisation d'auxiliaires est aujourd'hui un avantage car il n'est pas mentionné sur l'étiquetage du produit.

Dans une première partie de cette étude bibliographique, nous décrirons les principales réglementations européennes auxquelles doivent se référer les fabricants de denrées alimentaires. Nous présenterons également les systèmes dits « hors équilibre » de type émulsions ou mousses ainsi que les principaux agents stabilisants utilisés dans la conception de ces systèmes ou des produits agroalimentaires au sens large. Enfin, nous décrirons les additifs présents dans les denrées alimentaires et nous nous intéresserons plus précisément aux rôles fonctionnels que peuvent avoir les mono- et diglycérides d'acides gras (MDGs) dans différentes matrices alimentaires.

La deuxième partie de ce chapitre concernera l'utilisation des enzymes en tant qu'auxiliaires technologiques et nous nous focaliserons plus particulièrement sur la lipolyse.

2. Réglementation

2.1. Alimentation conventionnelle

Dans l'Union Européenne, tous les produits en lien direct avec l'alimentation sont très réglementés. De nombreux textes législatifs sont apparus ces dernières années et sont réévalués constamment. La politique de la sécurité alimentaire développée par l'Union Européenne, ainsi que l'EFSA (European Food Safety Authority) visent à protéger les consommateurs. Pour cela, une traçabilité est développée pour garantir la qualité des denrées alimentaires ou des aliments ; de la matière première au produit fini. Le règlement européen 178/2002 du 28 janvier 2002, définit les aliments comme *« toute substance ou produit, transformé, partiellement transformé ou non-transformé, destiné à être ingéré ou raisonnablement susceptible d'être ingéré par l'être humain. Ce terme recouvre les boissons, les gommes à mâcher et toute substance, y compris l'eau, intégrée intentionnellement dans les denrées alimentaires au cours de leur fabrication, de leur préparation ou de leur traitement »*. Ce même règlement met en place les mesures d'hygiène à appliquer pour éviter des contaminations alimentaires (appelé « Food Law »). Depuis sa mise en place, les fabricants doivent veiller de façon encore plus attentive aux différentes étapes de production, de la transformation à la distribution et vérifier que les aliments répondent aux demandes de la législation en vigueur.

2.2. Alimentation certifiée biologique

Les produits certifiés biologiques sont soumis à la réglementation européenne, leur réglementation est plus stricte que celle des produits dits conventionnels. La réglementation entrée en vigueur le 1^{er} janvier 2009 indique que pour revendiquer un produit « biologique » ou « Bio », il faut que le produit agricole ou la denrée alimentaire suive et respecte les règles spécifiques de l'agriculture biologique et ce de la production jusqu'à la commercialisation (Bertrand, *et al.*, 2011). Depuis le 1^{er} janvier 2021, le nouveau règlement européen n°2018/848 du 30 mai 2018 relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques est entré en vigueur. Ce dernier précise les principes de la transformation des produits biologiques comme suit :

- Utiliser des ingrédients issus de l'agriculture biologique pour la fabrication de denrées alimentaires biologiques ;

- Restreindre l'utilisation des additifs alimentaires, des ingrédients non biologiques (lorsque l'ingrédient n'est pas disponible sur le marché sous la forme biologique) ayant des fonctions principalement technologiques ou organoleptiques, ainsi que des micronutriments et des auxiliaires technologiques, afin qu'il y soit recouru le moins possible et seulement lorsqu'il existe un besoin technologique essentiel ou à des fins nutritionnelles particulières ;
- Exclure les substances et méthodes de transformation susceptibles d'induire en erreur quant à la véritable nature du produit ;
- Transformer avec soin les denrées alimentaires biologiques et recourir de préférence à des méthodes biologiques, mécaniques et/ou physiques ;
- Exclure les denrées alimentaires contenant des nanomatériaux ou consistant en de tels nanomatériaux.

La liste des additifs et des auxiliaires technologiques autorisés dans la fabrication de matrices alimentaires biologiques reste celle de l'annexe VIII du règlement n°2019/2164 de la commission du 17 décembre 2019 « Produits et substances utilisés dans la production de denrées alimentaires biologiques transformées, de levures et de produits à base de levures biologiques ». De plus, lors de la formulation d'un produit « biologique », en plus de suivre la réglementation et de vérifier les produits autorisés dans les annexes, il est important de respecter certaines conditions. En effet, il faut qu'au moins 50% des produits soient d'origine agricole (hors eau et sel de cuisine) et qu'au moins 95% de ces produits soient certifiés biologiques. Les produits agricoles non biologiques qui peuvent être utilisés sont listés dans l'annexe IX du règlement n°889/2008.

2.3. Le concept du « clean-label »

Le terme « clean-label », qui renvoie à la notion littérale d'étiquette propre, est un concept apparu il y a une quinzaine d'années. Bien que cette appellation se soit démocratisée dans le domaine agroalimentaire, aucune réglementation n'existe. Les fabricants doivent alors développer de nouveaux produits en se consacrant aux principales demandes des acheteurs. En effet, les consommateurs souhaitent s'orienter vers des produits dont la liste d'ingrédients est la plus courte possible. Ils recherchent aussi des produits fabriqués avec des ingrédients de consommation courante (le terme « ingrédients du placard » est plébiscité) (Asioli, *et al.*, 2017). De plus, ils désirent que les produits soient authentiques, plus naturels et respectueux de leur

santé. Ils veulent éviter de consommer des produits contenant des substances dont les noms ont une forte connotation « chimique » (Volkert & Serrur, 2020). Ils donnent aussi de l'importance à la façon dont les ingrédients sont cultivés (végétaux), produits et transformés. Ils tolèrent difficilement la présence d'organisme génétiquement modifié (OGM) dans les produits transformés. Par ces notions, de clean-label et de naturalité, les consommateurs demandent à avoir des déclarations claires et transparentes de la part des fabricants (Figure 1.1) (Jorge, *et al.*, 2020; Osborn, 2015; Román, *et al.*, 2017).

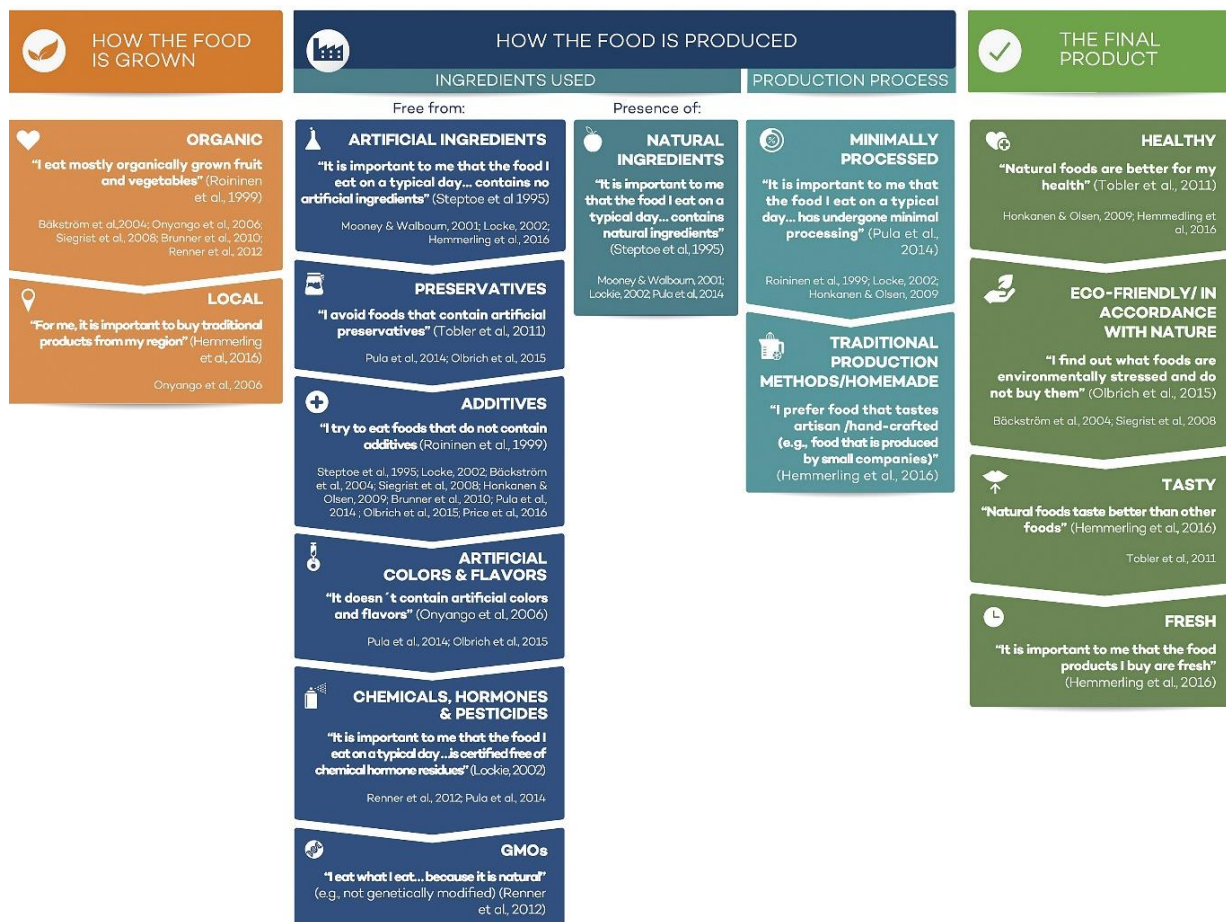


Figure 1.1 : Représentation schématique du concept clean-label (Román, *et al.*, 2017).

La population française est très attentive à ces principes de consommation alimentaire. Une étude menée dans l'ensemble des pays européens a permis de mettre en évidence les sujets qui préoccupent le plus les consommateurs en matière de sécurité alimentaire (EFSA, 2019). Les Français, contrairement à la moyenne des européens, sont plus soucieux de la présence de certains additifs comme les colorants, les conservateurs et les arômes présents dans les aliments et les boissons (43% contre 36%, Figure 1.2).

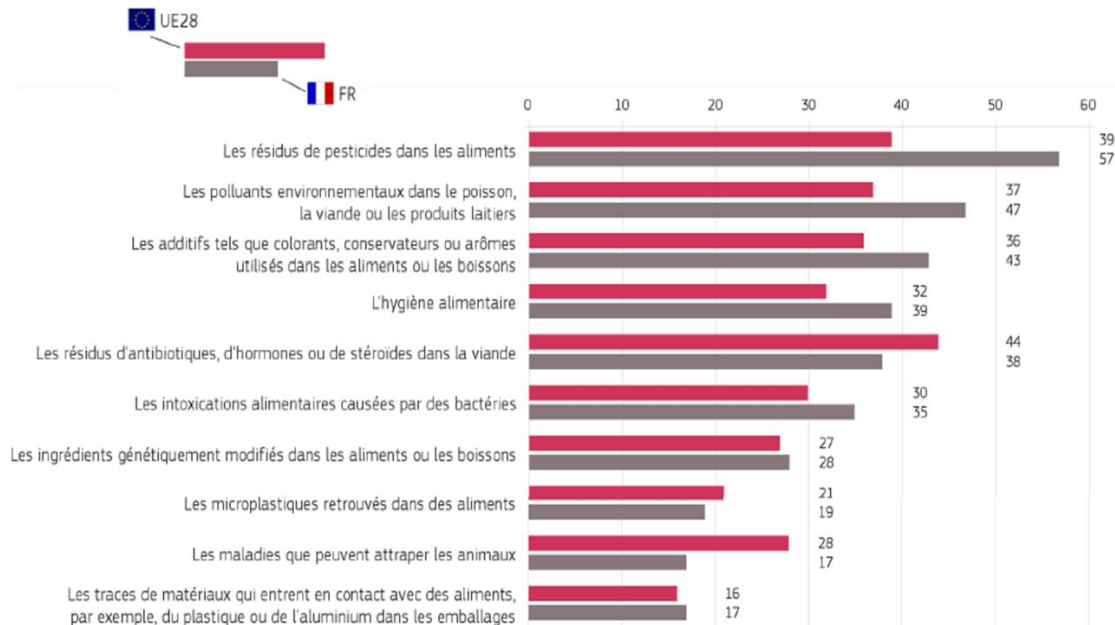


Figure 1.2 : Les sujets qui préoccupent le plus en matière d'alimentation (EFSA, 2019).

L'ensemble de ces choix, d'une importance grandissante chez les consommateurs, oriente le comportement des industriels qui favorisent de plus en plus ce concept de « clean-label » lors de la fabrication de leurs produits. Ainsi, parmi les concepts précédemment évoqués, le remplacement des additifs est devenu, pour eux, une priorité. Cela se traduit par de nombreuses recherches dans ce domaine sur le plan scientifique. Le nombre de publications sur ces thèmes ne cesse d'ailleurs d'augmenter significativement sur ces dernières années (Figure 1.3).

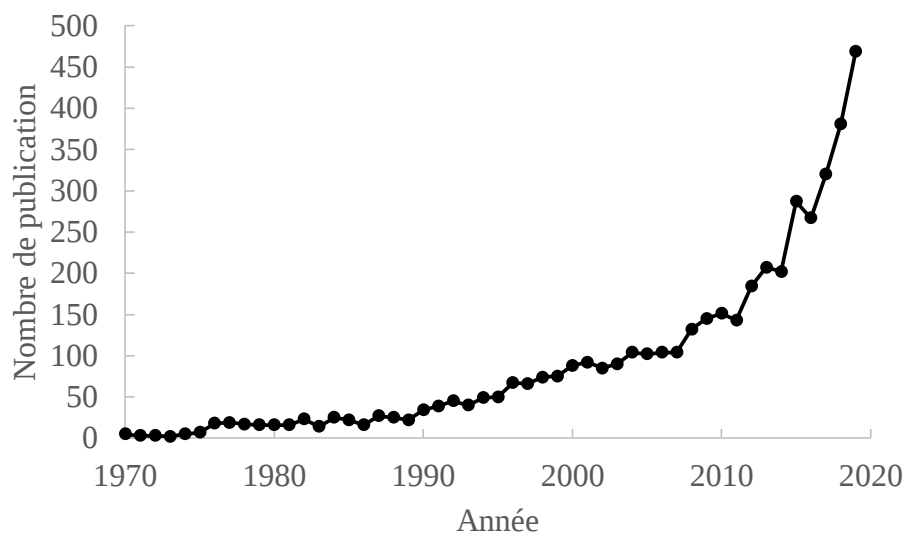


Figure 1.3 : Evolution du nombre de publications avec le mot clé « clean-label » - Web of Science.

2.4. Les additifs

Les additifs sont des substances introduites lors de la fabrication de produits alimentaires. Dans ce domaine, ils sont définis par le règlement européen N°1333/2008 du 16 décembre 2008 comme : « *toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive, et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires, dans un but technologique au stade de leur fabrication ; transformation, préparation traitement, conditionnement transport ou entreposage a pour effet, ou peut raisonnablement être estimée avoir pour effet, qu'elle devient elle-même ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant de ces denrées alimentaires* ». Les additifs sont donc ajoutés dans le but d'apporter une amélioration aux produits finis, tels que la conservation, le goût, la coloration, la texture ... Ils peuvent être classés en six principales catégories (Figure 1.4) qui sont : les conservateurs, les agents nutritionnels, les colorants, les agents aromatisants ou les texturants et une catégorie « divers » (Carocho, *et al.*, 2014; Cox, *et al.*, 2020; De Reynal & Multon, 2009; Faustino, *et al.*, 2019; Saltmarsh, 2021).

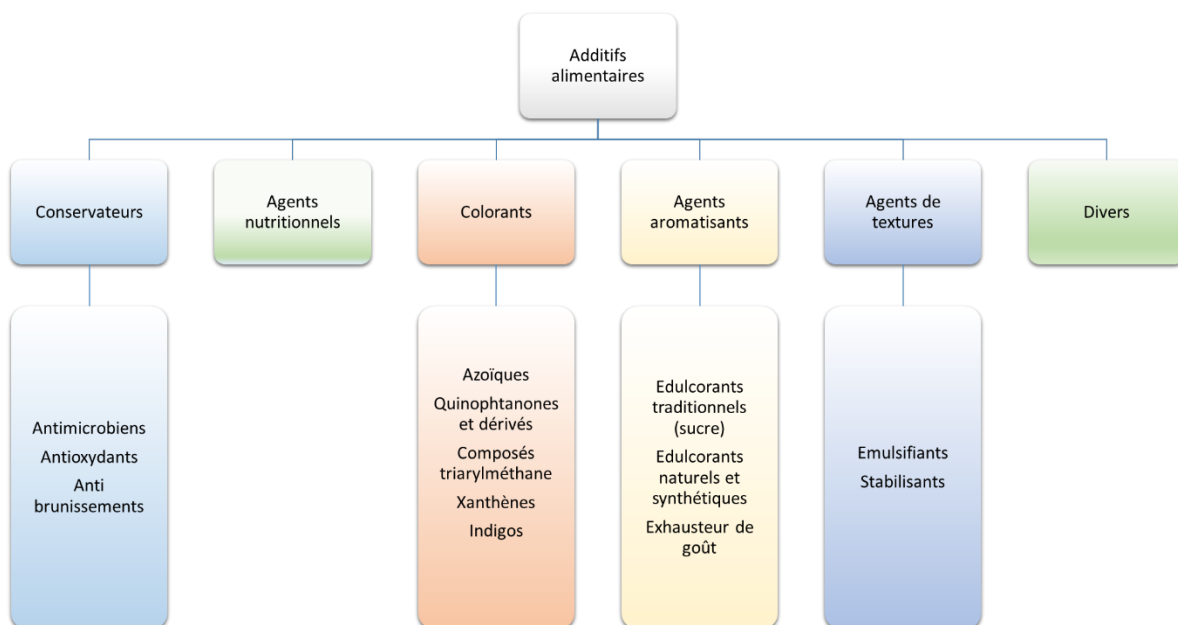


Figure 1.4 : Six principales catégories des additifs (adaptée (Carocho, *et al.*, 2014)).

En Europe, la réglementation des additifs alimentaires est très stricte. Une liste positive des produits autorisés existe (Annexe II du règlement européen N°1333/2008 du 16 décembre 2008), décrivant notamment le type, la quantité et l'utilisation.

Matières grasses et huiles, et émulsions de matières grasses et d'huiles						
02	Matières grasses et huiles pratiquement anhydres (à l'exclusion des matières grasses laitières anhydres)					
02.1	Numéro de catégorie	Numéro E	Dénomination	Quantité maximale (en mg/l ou mg/kg selon le cas)	Notes	Restrictions/exceptions
	E 321		Butylhydroxy-toluène (BHT)	100	(41)	Uniquement matières grasses et huiles pour la fabrication professionnelle de denrées alimentaires subissant un traitement thermique; huiles et matières grasses destinées à la friture (excepté l'huile de grignons d'olives), saindoux, huile de poisson, graisses de bœuf, de volaille et de mouton
	E 322		Lécithines	30 000		À l'exception des huiles vierges et des huiles d'olive
	E 330		Acide citrique	quantum satis		À l'exception des huiles vierges et des huiles d'olive
	E 331		Citrates de sodium	quantum satis		À l'exception des huiles vierges et des huiles d'olive
	E 332		Citrates de potassium	quantum satis		À l'exception des huiles vierges et des huiles d'olive
	E 333		Citrates de calcium	quantum satis		À l'exception des huiles vierges et des huiles d'olive
	E 392		Extraits de romarin	30	(41) (46)	Uniquement huiles végétales (à l'exception des huiles vierges et des huiles d'olive) et matières grasses dont la teneur en acides gras polynésaturés est supérieure à 15 % m/m du total des acides gras, pour une utilisation dans les produits alimentaires non traités thermiquement
	E 392		Extraits de romarin	50	(41) (46)	Uniquement huiles de poisson et huile d'algue; saindoux, graisses de bœuf, de volaille, de mouton et de porc; matières grasses et huiles pour la fabrication professionnelle de denrées alimentaires subissant un traitement thermique; huiles et matières grasses destinées à la friture, excepté l'huile d'olive et l'huile de grignons d'olives
	E 471		Mono- et diglycérides d'acides gras	10 000		À l'exception des huiles vierges et des huiles d'olive
	E 472c		Esters citriques des mono- et diglycérides d'acides gras	quantum satis		Uniquement pour la cuisson et/ou la friture ou la préparation de sauces
	E 900		Diméthylpolysiloxane	10		Uniquement huiles et matières grasses destinées à la friture
	(1): Les additifs peuvent être ajoutés seuls ou en mélange.					
	(41): Exprimée par rapport à la matière grasse.					
	(46): Somme du carnosol et de l'acide carnosique.					

Figure 1.5 : Extrait du règlement Européen N°1333/2008 du 16 décembre 2008 de la liste positive des additifs.

Comme l'illustre la Figure 1.5, dédiée notamment aux graisses alimentaires, l'usage de certains émulsifiants est limité (ex : E322, lécithines : 30 000 mg/g) alors que d'autres peuvent être utilisés sans limitation mais jusqu'à l'obtention de la fonctionnalité désirée (ex : E471, MDGs « *quantum satis* »).

L'étiquetage du produit fini doit mentionner la présence des additifs, soit sous leur fonction suivie de leur nom scientifique (ex : émulsifiant : mono et diglycérides) ; soit avec son code fixé au niveau européen lettre « E » suivi d'un numéro permettant d'identifier facilement la substance (par exemple : E471) (Anon, 2009). La codification des additifs permet de repérer rapidement à quelle catégorie appartient un additif ; par exemple les colorants sont notés E100, les conservateurs E200, les émulsifiants, gélifiants et épaississants E 400. A ce jour, 330 additifs sont autorisés au niveau européen pour la fabrication de produits alimentaires (Chazelas, *et al.*, 2020). On en dénombre seulement 51 pour la fabrication d'aliments certifiés biologiques. Les agents stabilisants (émulsifiants ou texturants) représentent à eux seuls près de 62% des additifs utilisés dans les produits alimentaires (respectivement 33,5 % pour les stabilisants et 28,5 % pour les émulsifiants) (Martins, *et al.*, 2019). Un tel pourcentage montre leur importance dans la conception des produits et le grand défi que cela peut représenter de les substituer (Figure 1.6 ; catégories encadrées en jaune).

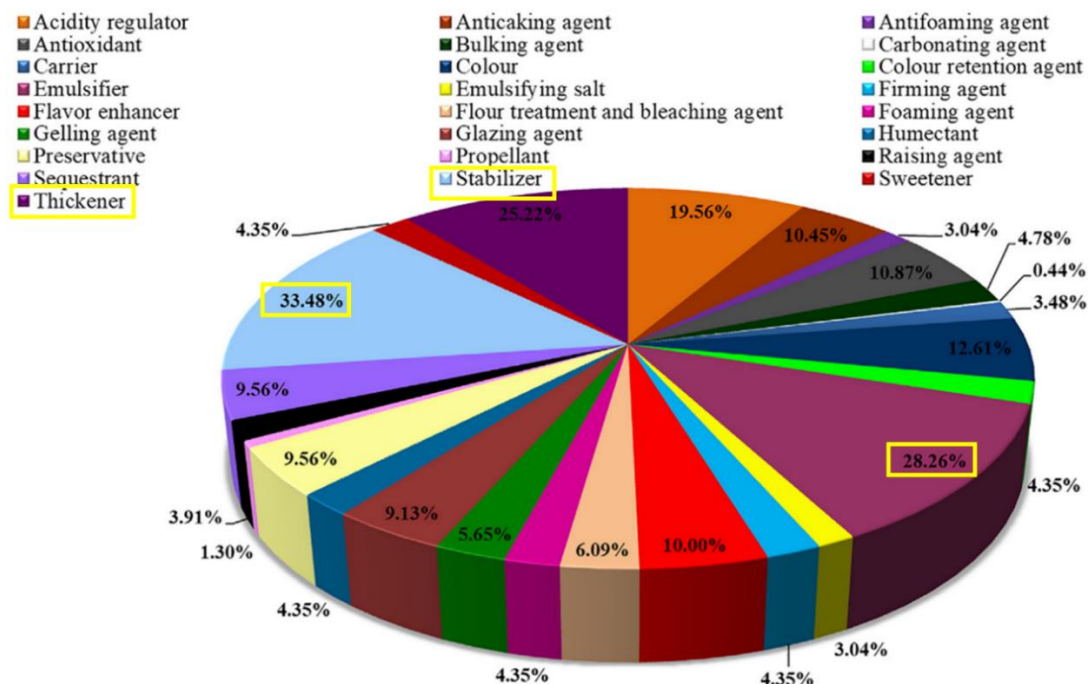


Figure 1.6 : Proportion de chaque catégorie d'additifs alimentaires utilisés dans les industries alimentaires (Martins, *et al.*, 2019).

Les avancées scientifiques en toxicologie et dans le domaine analytique font que les additifs autorisés avant le 20 janvier 2009 sont en cours de réévaluation par l'EFSA. Au 10 juin 2020, 124 avis ont été publiés sur le site de l'EFSA couvrant 227 additifs. Dans ces premiers rapports, quatre cas de figures sont apparus :

- Certains groupes ont vu leurs DJA (Dose Journalière Admissible) diminuer : c'est le cas des sorbates dont la DJA passe de 25 à 3 mg/kg ;
- D'autres peuvent avoir des DJA qui augmentent, voire des extensions d'utilisation à d'autres matrices alimentaires. C'est le cas du PGPR dont la DJA passe de 7,5 à 25 mg/kg et dont l'utilisation pourrait être étendue aux produits céréaliers ;
- Certains additifs sont en étroite surveillance comme les β -cyclodextrines ou les carraghénanes. Les premiers nommés pourraient présenter des DJA élevées pour certains types de population alors que les seconds cités pourraient provoquer des effets ulcérant.

2.5. Les auxiliaires technologiques

Pour éviter l'utilisation d'additifs, les industriels peuvent avoir recours à des auxiliaires technologiques. D'après le règlement européen N°1333/2008 du 16 décembre 2008, on entend par auxiliaire technologique « *toute substance non consommée comme ingrédient alimentaire en soi, qui est volontairement utilisée dans la transformation de matières premières, de denrées alimentaires ou de leurs ingrédients pour répondre à un certain objectif technologique pendant le traitement ou la transformation et pouvant, avoir pour résultat la présence non intentionnelle mais techniquement inévitable de résidus de cette substance ou de ses dérivés dans le produit fini, à condition que ces résidus ne présentent pas de risque sanitaire et n'aient pas d'effets technologiques sur le produit fini* ». Les auxiliaires technologiques sont ajoutés au cours du procédé pour la fonctionnalité qu'ils apportent. Ils peuvent notamment faciliter la mise en œuvre, améliorer la stabilité du produit ... Contrairement aux additifs, les auxiliaires technologiques sont éliminés ou désactivés durant le procédé de fabrication (De Reynal & Multon, 2009). Ils sont classés en différentes catégories en fonction des effets apportés lors de leur utilisation et n'ont actuellement aucune obligation d'être déclarés sur l'étiquette (Figure 1.7).

●	Antimousses
●	Catalyseurs
●	Agents de clarification / Adjuvants de filtration
●	Agents décolorant
●	Agents de lavage et de pelage/épluchage
●	Agent de plumaison et d'épilation
●	Résines échangeuses d'ions
●	Agent de congélation par contact et agents de refroidissement
●	Agents de dessiccation/antiagglomérants
●	Enzymes
●	Agents d'acidification, d'alcalinisation ou de neutralisation
●	Agents de démoulage
●	Floculants et coagulants
●	Biocides
●	Antitartres
●	Solvants d'extraction
●	Divers

Figure 1.7 : Catégories des auxiliaires technologiques.

La réglementation relative aux auxiliaires technologiques n'est pour l'instant pas harmonisée au niveau européen et il convient de se référer aux dispositions nationales. Seule la catégorie des solvants d'extraction est réglementée (directive 88-344 du 13 juin 1988). Une étude pour la proposition de règlement relative aux enzymes alimentaires est en cours. Pour cela, chaque enzyme est étudiée de façon à vérifier son utilité et la sécurité de cette dernière notamment au niveau santé.

En France, tout comme les additifs, les auxiliaires technologiques sont réglementés et se basent sur le principe de « listes positives ». Dans la fabrication de denrées alimentaires, il est donc interdit d'employer des additifs ou des auxiliaires technologiques dont l'usage n'est ni déclaré ni listé par arrêté.

Nous venons de mettre en avant que l'utilisation des additifs et des auxiliaires technologiques est très réglementée. Ils sont malgré tout nécessaires car ils apportent des fonctionnalités essentielles pour améliorer et/ou préserver les produits alimentaires. Les aliments étant des matrices complexes qui évoluent dans le temps, il est donc nécessaire de

comprendre la physico-chimie de certains systèmes dispersés et le rôle joué par les émulsifiants pour atténuer ces évolutions. Dans un premier temps, nous décrirons les émulsions et les mousses, principaux systèmes dispersés présents en agroalimentaire puis, dans un second temps, nous verrons quels sont les principaux additifs utilisés pour stabiliser ces systèmes.

3. Systèmes dispersés et agents stabilisants

3.1. Les émulsions

La plupart des matrices alimentaires sont des émulsions complexes. Ce sont par définition des dispersions constituées de deux phases non miscibles ; le plus souvent de l'huile et de l'eau. L'une des deux phases se retrouve généralement sous la forme de gouttelettes. Les émulsions étant des systèmes thermodynamiquement instables, il est nécessaire d'y associer des agents stabilisants tels que des tensioactifs ou des polymères, pour augmenter leur durée de vie (Leal-Calderon, *et al.*, 2007; Zembyla, *et al.*, 2020). La phase formant des gouttelettes est appelée la phase dispersée alors que la phase environnante est nommée la phase continue (Israelachvili, 1994). Il existe différents types d'émulsions qui sont détaillés ci-après.

3.1.1.a. Emulsions simples

Dans les émulsions simples, il existe deux catégories (Figure 1.8) :

- **Emulsions directes** dans lesquelles la phase lipophile (huile : H) est dispersée dans la phase aqueuse (eau : E), elles sont notées huile-dans-eau ou H/E.
- **Emulsions inverses** où cette fois, la phase aqueuse est dispersée dans la phase huileuse, elles sont notées eau-dans-huile ou E/H.

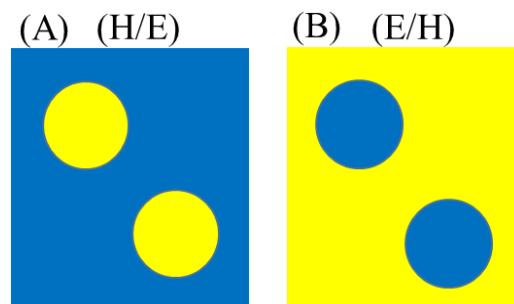


Figure 1.8 : Représentation schématique (A) d'une émulsion directe et (B) d'une émulsion inverse.

D'une manière générale, la fraction volumique des constituants (ϕ) a une incidence sur le sens préférentiel de l'émulsion à savoir que la phase continue se trouve souvent en proportion majoritaire par rapport à la phase dispersée.

Dans l'industrie agroalimentaire, de nombreuses émulsions directes sont recensées telles que les produits laitiers, la mayonnaise, les vinaigrettes, les produits céréaliers.... Certains produits comme la margarine ou le beurre sont des émulsions inverses.

3.1.2. Emulsions de Pickering

Les émulsions de Pickering ou émulsions solides sont, contrairement aux émulsions standards, stabilisées par des particules solides colloïdales (Figure 1.9). Le terme Pickering est une référence aux travaux de Spencer Umfreville Pickering qui, en reprenant les travaux de Ramsden a démontré la possibilité de stabiliser des émulsions à l'aide de particules colloïdales (Pickering, 1907; Ramsden & Gotch, 1904). Ces émulsions de Pickering sont stabilisées par l'adsorption de particules à l'interface liquide-liquide formant ainsi une barrière empêchant une recombinaison rapide des gouttelettes et une séparation irréversible des phases (Berton-Carabin & Schroën, 2015; Vignati, *et al.*, 2003). Ces émulsions présentent des perspectives intéressantes notamment pour le remplacement de tensioactifs d'origine synthétique. Elles sont généralement plus stables que les émulsions standards. En effet, l'adsorption des particules colloïdales si elle a lieu, est irréversible. Cette adhésion très forte empêche les phénomènes de coalescence (fusion entre les gouttes) (Leal-Calderon & Schmitt, 2008).

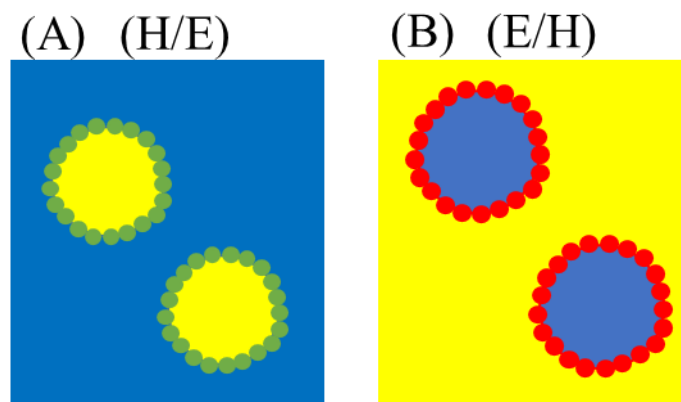


Figure 1.9 : Représentation schématisée des émulsions de Pickering (A) directe et (B) inverse.

Dans l'industrie agroalimentaire, ce type d'émulsions est typique des ganaches au chocolat (Merachli, *et al.*, 2020) où la rugosité de surface générée par les particules de cacao impacte leur texture. Afin de stabiliser ces émulsions, des travaux récents ont démontré

l'utilisation de nombreuses particules alimentaires dont les cristaux d'amidon, les fibres de cellulose, les flavonoïdes, les micro-gels de protéines ou encore les tourteaux d'oléagineux et de la poudre de cacao (Joseph, *et al.*, 2019a; Joseph, *et al.*, 2019b). Pour être adsorbées à la surface, les particules doivent posséder une dualité hydrophile-hydrophobe et mouiller partiellement les deux phases (Finkle, *et al.*, 1923). Cette notion sera détaillée plus loin dans ce chapitre.

3.1.3. Emulsions concentrées

Ce sont des systèmes dispersés particuliers où la phase continue est inférieure à 30% en moyenne. Dans ce type d'émulsion, les gouttes sont fortement déformées lors du cisaillement ; de ce fait, les propriétés rhéologiques de ces émulsions sont impactées. Les contacts permanents entre gouttes entraînent une élévation d'énergie aux interfaces qui se traduit macroscopiquement par une augmentation de la viscosité globale du système (Princen, 1983). Elles sont considérées comme des liquides viscoélastiques. Dans ce système (Figure 1.10), les gouttes sont dispersées et distribuées de manière aléatoire dans un volume donné et vont invariablement se toucher à partir d'une fraction volumique seuil (ϕ^*) appelée Random Close Packing (Brochette, 2013). Les émulsions concentrées de type mono-disperses ont généralement une fraction volumique (ϕ^*) de la phase dispersée supérieure à 64% (Berryman, 1983). Pour des émulsions dites poly-disperses, cette même concentration se trouve plutôt vers 74% (Radin, 2008; Scott & Kilgour, 1969). En deçà de cette fraction seuil, l'énergie dissipative globale de l'émulsion est uniquement gouvernée par le mouvement hydrodynamique des particules dans la phase continue (Scott, 1960; van Aken, *et al.*, 2011). L'exemple le plus courant en agroalimentaire qui illustre ce phénomène est la mayonnaise où l'émulsion se texture progressivement lorsque de l'huile est incorporée et progressivement dispersée dans le jaune d'œuf.

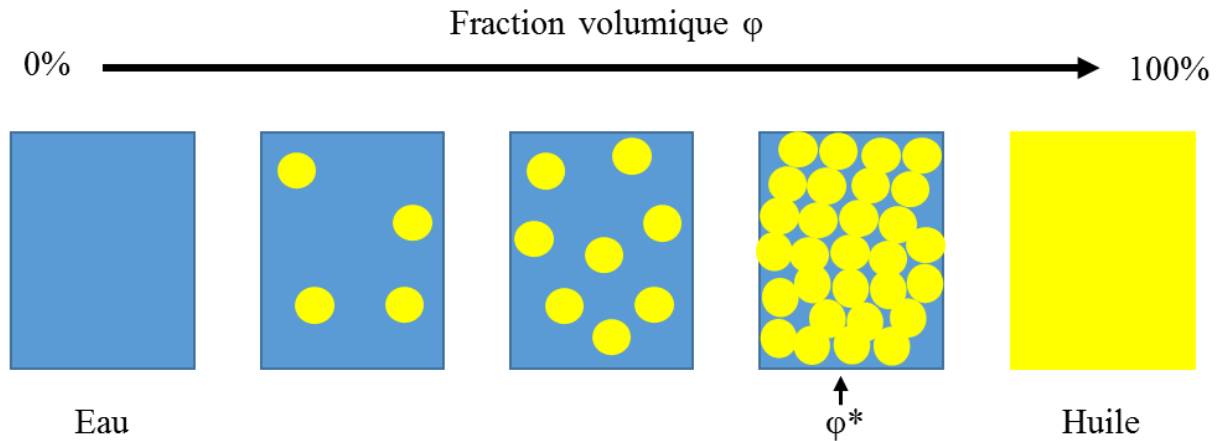


Figure 1.10 : Représentation schématique d'une émulsion concentrée en fonction du Random Close Packing.

3.1.4. Emulsions multiples

Il existe aussi des systèmes plus complexes comme les émulsions multiples, les plus courantes étant les émulsions doubles. Il en existe deux catégories :

- **Les émulsions doubles directes** notées E/H/E (Figure 1.11(A)) où une phase aqueuse est dispersée dans une phase huileuse elle-même dispersée dans une phase aqueuse.
- **Les émulsions doubles indirectes** notées H/E/H (Figure 1.11(B)) où une phase lipophile est dispersée dans une phase aqueuse, le tout étant dispersé dans une phase huileuse. Selon la même logique elles sont codifiées H/E/H.

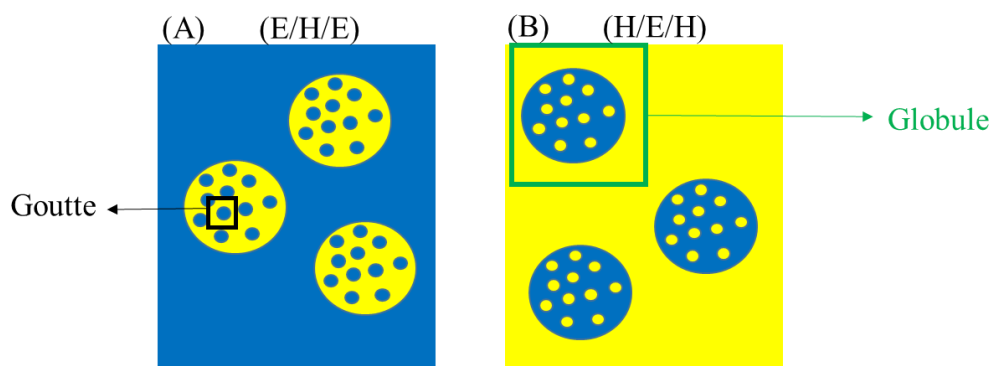


Figure 1.11 : Représentation schématique d'une émulsion double (A) directe et (B) inverse.

Les émulsions doubles sont généralement réalisées par un procédé multi-étape (Figure 1.12). Ainsi, au cours de la formation d'une émulsion E/H/E, une première émulsion inverse

est réalisée, suivie d'une seconde émulsification où l'émulsion primaire est ensuite redispersée dans une phase aqueuse externe (De Luca, *et al.*, 1991 ; Sapei, *et al.*, 2012; Ursica, *et al.*, 2005).

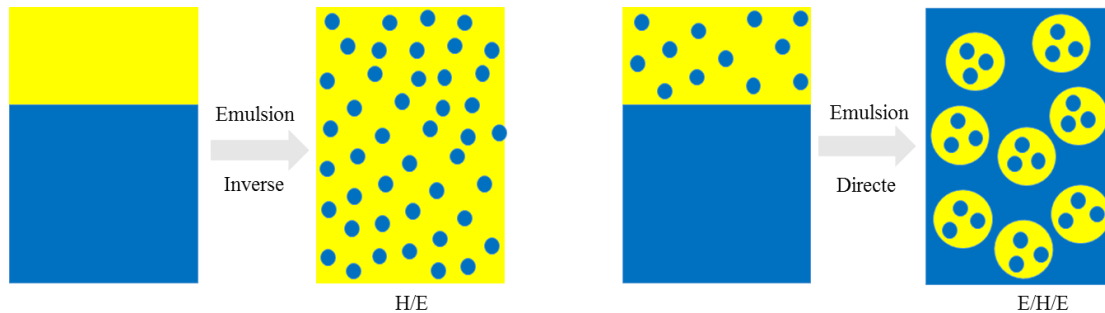


Figure 1.12 : Procédé de fabrication d'une émulsion double E/H/E.

En 2001, le Programme National de Nutrition Santé (PNNS) a été lancé visant à améliorer l'état de santé de la population en priorisant des actions de recherche sur l'amélioration nutritionnelle. Ce programme vise à sensibiliser les consommateurs sur une alimentation moins grasse, moins salée et moins sucrée. Pour limiter la teneur en matières grasses, la réalisation d'émulsions doubles constitue une piste de recherche très prometteuse. En effet, l'utilisation d'émulsions doubles dans les produits alimentaires permettrait d'alléger le produit sans pour autant dénaturer le goût. En émulsionnant la matière grasse, la proportion d'eau augmente, le profil nutritionnel du système est amélioré tout en conservant les qualités gustatives du produit (les globules de gras, vecteurs du goût sont toujours présents). Le second intérêt des émulsions multiples concerne l'encapsulation d'actifs (arômes, Vitamine C ...) ou de minéraux (magnésium) afin d'enrichir les aliments pour traiter des carences ou restaurer l'apport en nutriments essentiels (Bonnet, *et al.*, 2009; Bonnet, *et al.*, 2010; Serdaroglu, *et al.*, 2015).

3.2. Les mousses

Les mousses sont des systèmes colloïdaux très présents dans l'industrie agroalimentaire. Ce sont, tout comme les émulsions, des dispersions ; toutefois dans ce cas, la phase dispersée est un gaz non miscible et la phase continue est bien souvent une phase aqueuse. Les bulles de gaz sont séparées entre elles par des films qui sont plus ou moins fins (Salager & Choplin, 2008; Schramm & Wassmuth, 1994). En fonction de la fraction volumique d'air dispersée dans la phase aqueuse, on trouve les dénominations suivantes : mousses sèches,

humides ou liquides bulleux (Figure 1.13). Les mousses sèches contiennent très peu de liquide, le film qui sépare les différentes bulles de gaz est très fin et ces dernières deviennent polyédriques. Plus la fraction volumique de gaz sera faible (point de bascule à une fraction volumique critique notée ϕ_c), moins il y aura de contact entre les bulles d'air. Elles retrouveront ainsi leurs formes sphériques et les problématiques liées à leur instabilité seront moindres (Langevin, 2017).

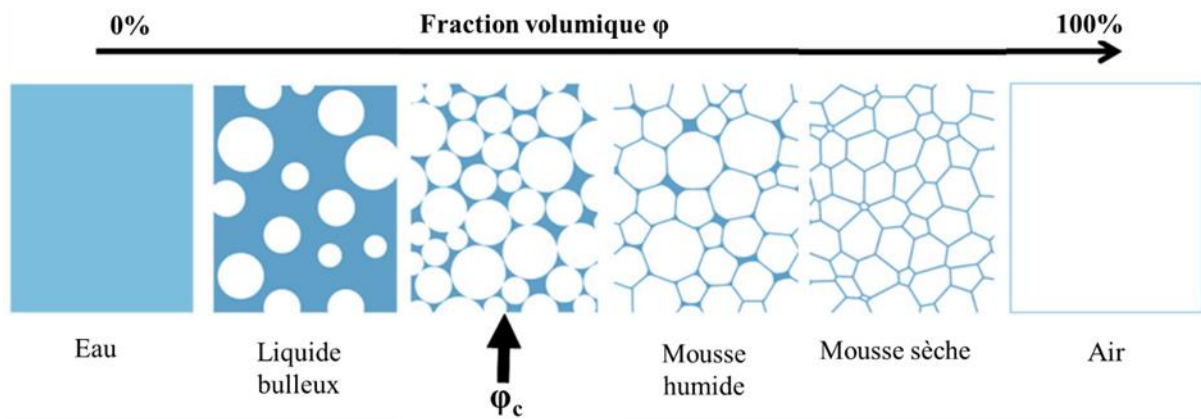


Figure 1.13 : Représentation schématique d'une mousse en fonction de la fraction volumique (adapté (Langevin, 2017)).

Les mousses obtenues par ajout d'air sont également appelées des produits foisonnés car l'étape d'incorporation d'air dans une matrice est littéralement appelée foisonnement. Cet ajout d'air permet non seulement de diminuer la densité du produit, d'augmenter le volume mais également de modifier sa texture, sa couleur et sa tenue en bouche. Classiquement, la mesure du taux de foisonnement permet de déterminer la quantité d'air ajoutée et stabilisée au sein de la matrice (Schorsch, 2007). Dans l'industrie agroalimentaire, on retrouve des mousses aussi bien dans les produits salés (mousse de foie de volaille, de légumes, de poisson...), que sucrés (mousse au chocolat, crème fouettée...) et dans les boissons (bière, champagne...).

Tout comme les émulsions, les mousses sont des systèmes thermodynamiquement instables et fragiles. Pour aider à la distinction, on parle alors de mousse éphémères (durée de vie de l'ordre de la seconde ou de la minute) ou bien de mousses durables (durée de vie en heures ou en jours).

Pour stabiliser les émulsions ainsi que les mousses, des agents stabilisants (appelés émulsifiants en agroalimentaire et tensioactifs ou détergents dans le domaine des cosmétiques) sont utilisés et permettent d'abaisser la tension de surface entre deux liquides naturellement

immiscibles favorisant ainsi la stabilisation globale du système. Ils peuvent aussi stabiliser les différents systèmes en induisant des répulsions stériques ou électrostatiques (Chen, 2015; Thomas, *et al.*, 2003). Lors du cisaillement, les agents stabilisants viennent s'adsorber aux interfaces afin d'éviter que les gouttelettes ne fusionnent entre elles trop rapidement. Ce phénomène est appelé effet « Marangoni ». Les mécanismes d'action des différents émulsifiants seront décrits plus loin.

3.3. Molécules assurant la stabilisation des émulsions et des mousses

Les systèmes dispersés décrits ci-avant sont des systèmes thermodynamiquement instables. Il est donc nécessaire de recourir à des molécules pour les stabiliser. Pour assurer cette fonction, il faut agir sur l'interface grâce à l'emploi d'émulsifiants ou d'agents texturants.

3.3.1. Les tensioactifs

Les tensioactifs présentent (Figure 1.14) une partie hydrophile (tête polaire) et une autre lipophile (queue aliphatique), ces molécules sont dites amphiphiles (Hasenhuettl, 2008a; Larpent, 1995). De par leur dualité hydrophile - hydrophobe, ils se placent naturellement aux interfaces eau/huile ou eau/air modifiant ainsi la tension interfaciale du système, ce qui favorise l'émulsification et la stabilité du système obtenu.

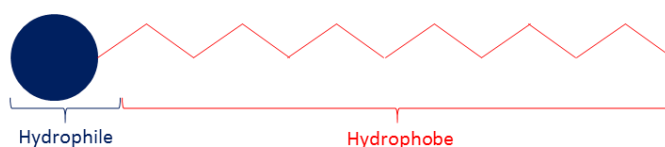


Figure 1.14 : Représentation schématique d'une molécule tensioactive.

Les tensioactifs peuvent être classés en fonction de leurs caractéristiques chimiques (Miller, 2016). En fonction de la nature de la tête polaire, il est possible de distinguer les tensioactifs en quatre sous-catégories (Cousin, *et al.*, 2010; Hutin, 2019) :

- Les anioniques (tête polaire chargée négativement),
- Les cationiques (tête polaire chargée positivement),
- Les amphotères (tête polaire chargée à la fois positivement et négativement),

- Les non ioniques (tête polaire non chargée).

Les tensioactifs les plus couramment utilisés sont les non ioniques car ils présentent l'avantage d'être insensibles aux effets de pH.

Selon la nature de la partie lipophile des tensioactifs, et notamment de par leurs structures, ils peuvent être également classés en quatre sous-catégories distinctes (Guilbot, 2006) :

- Les monocaténaires (une chaîne carbonée et une tête polaire),
- Les bicaténaires (deux chaînes carbonées reliées à une tête polaire),
- Les bolaformes simples ou doubles (plusieurs têtes hydrophiles reliées à une ou plusieurs chaînes carbonées),
- Les géminis (qui ont deux têtes polaires qui sont reliées entre elles).

Les molécules tensioactives peuvent être répertoriées en tenant compte de leur HLB (Hydrophilic - Lipophilic Balance) ou de leur paramètre d'empilement. La première échelle de HLB établie par Griffin permet de classer les tensioactifs de 0 à 20 (Griffin, 1949). Plus la valeur est grande plus la dispersion dans l'eau est favorisée. Davies a fait évoluer cette notion et a proposé une méthode de calcul simple en prenant en compte les contributions respectives des parties hydrophiles et lipophiles de l'émulsifiant (Davies, 1957). Différentes méthodes de calcul peuvent être employées dans le cas d'une molécule où la structure est parfaitement connue (Pasquali, *et al.*, 2008). L'une des formules les plus utilisées est celle décrite par l'Équation 1.1 mais, dans le cas de structures plus complexes, le calcul peut s'avérer plus compliqué à déterminer. Dans la Figure 1.15 sont listés les HLB des principaux tensioactifs utilisés en agroalimentaire.

Équation 1.1 : Une des méthodes de calcul du HLB.

$$HLB = 20 \times \frac{\text{Masse molaire fraction hydrophile}}{\text{Masse molaire de la molécule}}$$

Name	E number	HLB
Lecithins	E 322	3–4
Hydrolysed lecithins (lysolecithins)		10–12
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (polysorbate 20)	E 432	16.7
Polyoxyethylene sorbitan monooleate (polysorbate 80)	E 433	15.4
Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (polysorbate 40)	E 434	15.6
Polyoxyethylene sorbitan monostearate (polysorbate 60)	E 435	14.4
Polyoxyethylene sorbitan tristearate (polysorbate 65)	E 436	10–11
Sodium, potassium and calcium salts of fatty acids	E 470a	16–18
Mono- and diglycerides of fatty acids	E 471	3–4
Acetic acid esters of mono- and diglycerides of fatty acids	E 472a	2–3
Lactic acid esters of mono- and diglycerides of fatty acids	E 472b	3–4
Citric acid esters of mono- and diglycerides of fatty acids (CITREM)	E 472c	10–12
Tartaric acid esters of mono- and diglycerides of fatty acids	E 472d	
Mono- and diacetyl tartaric acid esters of mono- and diglycerides of fatty acids (DATEM)	E 472e	8–10
Mixed acetic and tartaric acid esters of mono- and diglycerides of fatty acids	E 472f	
Sucrose esters of fatty acids	E473	3–16
Sucroglycerides	E474	
Polyglycerol esters of fatty acids	E475	5–13
Polyglycerol polyricinoleate	E476	1.5
Propane-1,2-diol esters of fatty acids	E477	2–3
Sodium stearyl-2-lactylate	E481	10–12 (according to other data: 21)
Calcium stearyl-2-lactylate	E482	5–6
Stearyl tartrate	E483	
Sorbitan monostearate	E491	3–6
Sorbitan tristearate	E492	2.1
Sorbitan monolaurate	E493	8.6
Sorbitan monooleate	E494	4.3
Sorbitan monopalmitate	E495	6.7
Sucrose acetate isobutyrate	E444	1
Glycerol ester of wood rosin	E445	no data

Figure 1.15 : HLB de certains émulsifiants alimentaires (Csáki & Sebestyén, 2019).

Le paramètre d'empilement (p) permet lui, de mettre en évidence une relation entre la structure de la molécule tensioactive et ses propriétés d'auto-organisation spontanée à partir d'une concentration seuil (Israelachvili, *et al.*, 1976). Ce paramètre est défini par la longueur de chaîne lipophile (l_c), le volume (v_0) et l'aire de sa tête polaire (a_0) (Équation 1.2).

Équation 1.2 : Paramètre d'empilement p .

$$p = \frac{v_0}{a_0 \times l_c}$$

Si $p < 1/5^{\text{ème}}$, la tête polaire est prédominante et donc la molécule tensioactive adopte une géométrie de type conique. A l'inverse, lorsque $p > 1$, la chaîne hydrophobe est prépondérante et donc la géométrie sera préférentiellement de type cône inversé. Ce paramètre peut être relié à la HLB de la molécule tensioactive (Figure 1.16).

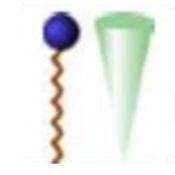
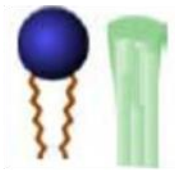
p	Géométrie	HLB
$p < 1/5$		> 13
$1/5 < p < 1$		
$p = 1$		7-10
$p > 1$		< 7

Figure 1.16 : Morphologie des molécules tensioactives corrélant les paramètres d'empilements et leurs valeurs de HLB (adapté (Bergenståhl, 1997)).

Le choix des différents constituants est la première étape lors de la mise au point d'une émulsion. Le type de tensioactif sélectionné, va impacter le sens préférentiel de l'émulsion. La règle de Bancroft et la notion de HLB sont des paramètres importants pour choisir le tensioactif le plus adapté à l'émulsion envisagée. La règle de Bancroft est essentiellement empirique et stipule que la phase dans laquelle le tensioactif est le plus « soluble » constituera la phase continue de l'émulsion (Bancroft, 1913). Ainsi, si le tensioactif est préférentiellement dispersé dans l'eau, l'émulsion sera alors directe. Un tensioactif avec une HLB comprise entre 0 et 8 caractérise un tensioactif plutôt lipophile ce qui favorisera des émulsions inverses tandis qu'une HLB comprise entre 12 et 20 caractérise un tensioactif hydrophile qui stabilisera préférentiellement des émulsions directes. Pour les valeurs de HLB intermédiaires (entre 8 et 12), il est plus difficile de prédire le type d'émulsion obtenu car le sens d'émulsion peut basculer aléatoirement selon une « inversion de phase catastrophique ». Actuellement dans le domaine de l'agroalimentaire, les tensioactifs les plus couramment utilisés sont les lécithines et les mono et diglycérides (Hasenhuettl, 2008a). Il n'existe cependant pas de corrélation claire entre la valeur de HLB et l'efficacité de stabilisation (Leser, *et al.*, 2006).

3.3.1.a. Les lécithines

Les lécithines sont des molécules tensioactives de type phospholipides découvertes en 1846 par le pharmacien Théodore Gobley. Au sens strict le terme Lécithines désigne uniquement le groupe des phosphatidylcholines. Ce terme a ensuite été étendu à l'ensemble des phospholipides extraits du vivant. Celles utilisées dans la formulation de produits agroalimentaires (E322), sont végétales et majoritairement issues du soja mais aussi du tournesol et du colza (van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008). Les lécithines végétales sont constituées au minimum de 60% de phospholipides purs (appelé acétone insoluble) mais également de stérols, tocophérols, glycolipides. Les teneurs entre les différents phospholipides ainsi que la nature des acides gras qui les composent évoluent en fonction de la source botanique. Les phospholipides sont des molécules composées d'une chaîne glycérol sur laquelle sont fixés en positions 1 et 2 des chaînes d'acides gras et sur la position 3 des groupements phosphates (Sun, *et al.*, 2018). Les chaînes d'acides gras constituent la partie lipophile, tandis que la fraction constituée du phosphate et du résidu amino-alcool forment la tête polaire. Les groupements amino-alcool peuvent être de différentes natures (Figure 1.17) ; on dénombre les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylinositols (PI) et les phosphatidylsérines (PS) (Robert, *et al.*, 2020; Sun, *et al.*, 2018). De par leurs structures, ces molécules présentent des charges au niveau de leurs têtes polaires, leur conférant des propriétés dépendantes du pH du milieu. A pH standard d'utilisation (pH = 5-7), les têtes des PI et des PS sont anioniques alors que les PC et PE sont zwitterioniques (Dijkstra, 2017; McClements & Gumus, 2016; Sun, *et al.*, 2018). A pH acide (pH = 3), les PC, PS et PE sont cationiques alors que les PI seront neutres. Inversement à pH basique (pH > 10), ils sont tous anioniques et seules les PC sont neutres. Aujourd'hui, les lécithines sont les seuls émulsifiants autorisés par la réglementation pour la fabrication de produits biologiques.

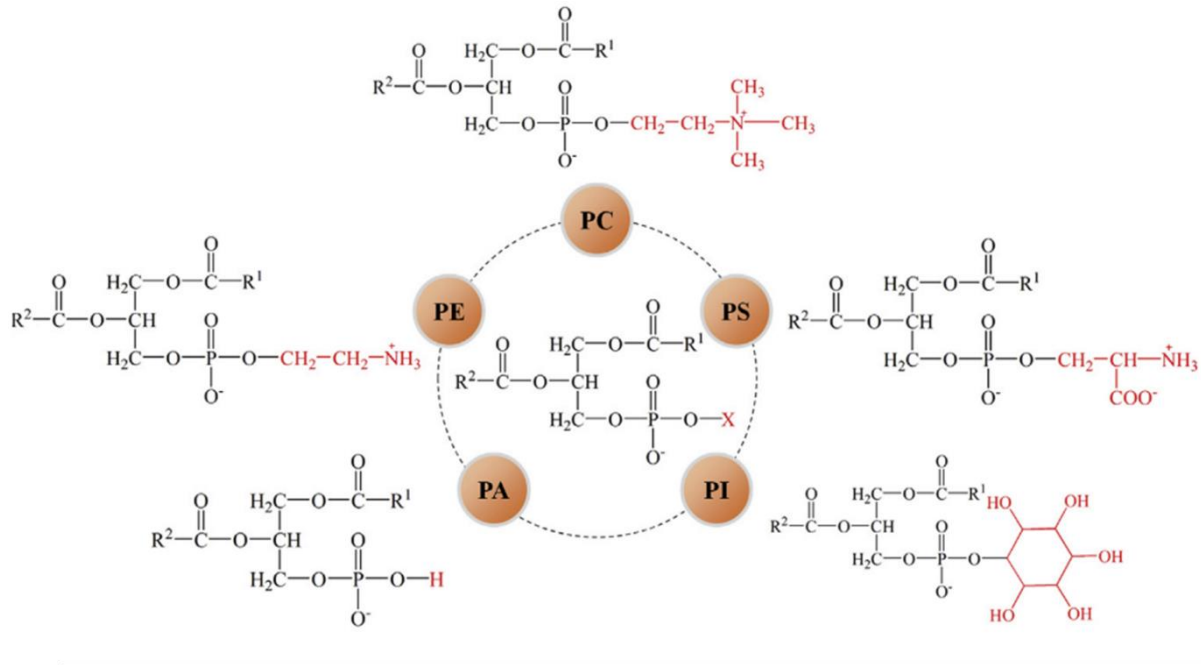


Figure 1.17 : Structures des phospholipides majeurs trouvés dans les lécithines (Sun, *et al.*, 2018).

3.3.1.b. Les mono- et diglycérides

Les mono- et diglycérides d'acides gras (MDGs) sont des émulsifiants synthétiques, polaires et non-ioniques. Ils sont autorisés par la directive européenne et leur code additif est le E471. Ils font actuellement partie des émulsifiants de synthèse parmi les plus utilisés dans la fabrication de matrices alimentaires (Hasenhuettl, 2008b). Ce sont des dérivés de graisses animales ou végétales. Ils sont obtenus par transestérification catalytique du glycérol avec les triglycérides (TGs) ou tout simplement synthétisés directement à partir du glycérol et d'acides gras en milieu basique (Corma, *et al.*, 1998; Kantekin-Erdogan, *et al.*, 2019; K. Thomas, *et al.*, 2003). Ces réactions peuvent être réalisées par voie chimique ou enzymatique. Pour des usages industriels, il est difficile d'obtenir sélectivement des MGs ou DGs purs (Fregolente, *et al.*, 2008; Fregolente, *et al.*, 2010; Nicholson & Marangoni, 2019). Les monoglycérides (MGs) peuvent être classés en deux groupes : les 1-MGs (si l'AGs est en position α ou α') et les 2-MGs (si l'AG est en position β). De la même manière, il existe aussi deux groupes de diglycérides (DGs) : les 1,2-DGs (position α et β) et les 1,3-DGs (position α et α'). L'ensemble

de ces structures est représenté sur la

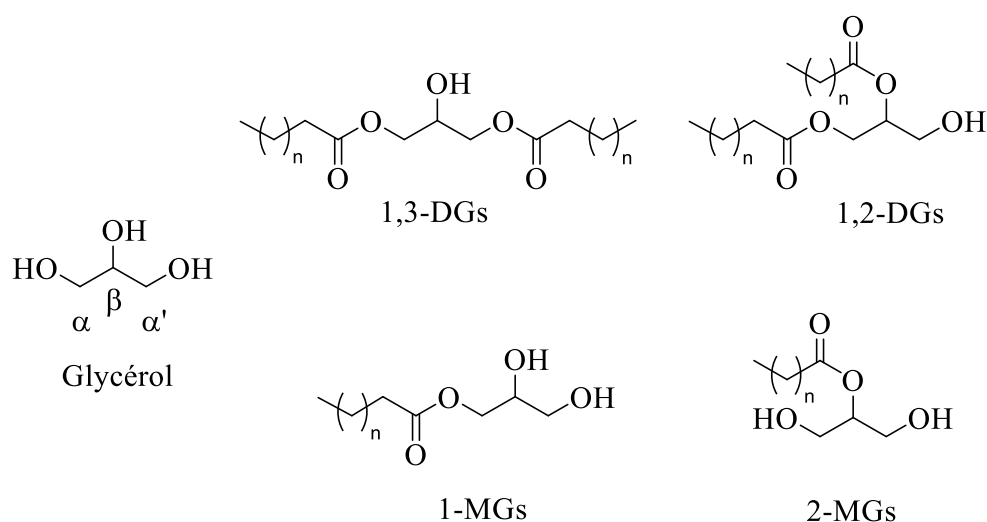


Figure 1.18.

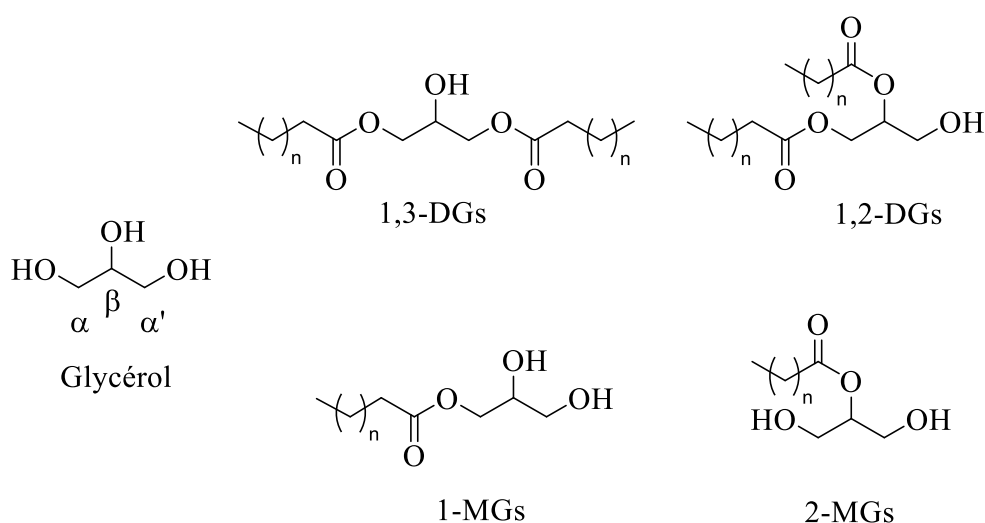


Figure 1.18 : Structures du glycérol et des molécules présentes dans les MDGs.

De par leurs faibles valeurs de HLB (3-4), les MDGs ont tendance à stabiliser les émulsions inverses. Dans des produits alimentaires, ils offrent également d'autres fonctionnalités où, pour le pain, ils assouplissent la pâte et favorisent le moelleux tout comme en biscuiterie, pâtisserie ou viennoiserie. Ils peuvent être également utilisés dans les chewing-gums, pour enrober les fruits, les confiseries et les produits à base de cacao. Les MDGs sont donc des agents stabilisants incontournables de l'industrie agroalimentaire (Hasenhuettl, 2008a; Kamel, 1991).

3.3.2. Le Polyglycerol polyricinoleate (PGPR)

Le PGPR (E476) est un liquide visqueux composé d'esters de polyglycérol et d'acides gras issu de l'huile de ricin (Figure 1.19).

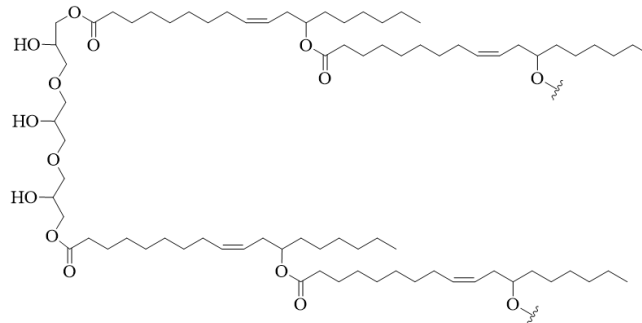


Figure 1.19 : Structure moléculaire du PGPR.

Il s'agit d'un émulsifiant non-ionique, très lipophile et donc soluble dans les phases grasses (Christiansen, 2014). Sa faible valeur de HLB (1,5) favorise la formation d'émulsions inverses (Mezzenga, *et al.*, 2004; Okuro, *et al.*, 2019). Avec cet émulsifiant, il est également possible d'obtenir des émulsions inverses très concentrées avec des fractions volumiques en eau qui peuvent atteindre 90%. A l'heure actuelle, il est difficile de le remplacer par un autre émulsifiant alimentaire pour obtenir de pareilles concentrations (Delample, *et al.*, 2014; Leal-Calderon, *et al.*, 2012). Au niveau réglementaire, le PGPR ne peut être utilisé que dans la fabrication de vinaigrettes et de chocolat. Cependant, comme évoqué précédemment, son utilisation va être étendue prochainement. Il réduit la viscosité du chocolat en limitant les frictions entre les particules de cacao, de sucre et de lait permettant ainsi un écoulement plus facile (Bastida-Rodríguez, 2013). En réduisant efficacement ces phénomènes de friction, il permet de réduire les quantités de beurre de cacao utilisées, la valeur nutritionnelle mais aussi les coûts associés. Dans ce domaine il peut être utilisé seul ou en association avec les lécithines. Cependant, à l'heure actuelle, le PGPR est complètement délaissé au profit d'un usage unique de lécithines.

3.3.3. Les protéines

Les protéines sont des molécules amphiphiles formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Chacune de ces chaînes est constituée par un enchaînement d'acides aminés

liés entre eux par des liaisons peptidiques (N-C=O). De nature plutôt hydrophile, elles ont une activité émulsifiante qui leur permet de stabiliser des émulsions directes. L'adsorption aux interfaces dépend de plusieurs paramètres, notamment le pH qui est directement corrélé au pKa (Bos, *et al.*, 1997). La dépendance au pH est due aux mélanges d'acides aminés constitutifs qui peuvent être anioniques, cationiques ou neutres (Figure 1.20) (McClements & Gumus, 2016).

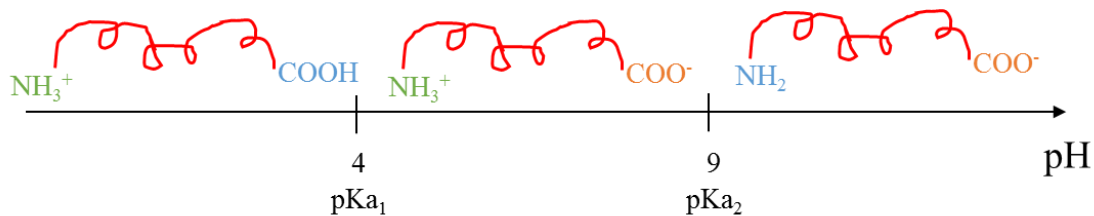


Figure 1.20 : Schéma général montrant l'évolution de la charge des protéines en fonction du pH.

Une modification du pH de la phase aqueuse ($\text{pH} < 4$ ou $\text{pH} > 9$), permet une meilleure solubilité des protéines entraînant ainsi une meilleure capacité émulsifiante (Krstonošić, *et al.*, 2020). En effet, en fonction des valeurs du pH des phases aqueuses, les molécules peuvent se trouver sous une forme ionique (NH_3^+ ou COO^-), permettant donc d'augmenter les répulsions électrostatiques, alors qu'à des pH proches des points isoélectriques (pI), les protéines sont neutres et les forces attractives entre elles sont maximales (Hailing & Walstra, 1981; Lam & Nickerson, 2013; Pérez-Gago & Krochta, 1999). Il est important de savoir que chaque protéine possède des pI spécifiques. Il est calculé en faisant des rapports entre les pKa des groupes amines et des groupes acides qui entourent la partie neutre des protéines (Sillero & Ribeiro, 1989).

Dans l'agroalimentaire, les protéines sont utilisées car elles réduisent la tension interfaciale aidant ainsi à stabiliser à la fois des émulsions ou des mousses (Arntfield & Maskus, 2011; Murray, 2020). Pour pouvoir être actives, ces molécules s'organisent pour que les régions lipophiles soient en contact avec l'huile et que les fragments hydrophiles soient préférentiellement dirigés vers la phase aqueuse. Ce processus est généralement long car les protéines doivent se déplier et migrer à l'interface formant alors un film protecteur (Loi, *et al.*, 2018). Un film viscoélastique relativement dense est obtenu contrairement aux émulsifiants de plus faible poids moléculaire (Dickinson, 2010). Classiquement les protéines utilisées dans les industries agroalimentaires sont issues du lait ou des œufs. A l'heure actuelle, de plus en plus de produits contenant des protéines végétales se développent (essor du véganisme) et on retrouve des formulations à base de protéines de pois ou de pois chiche... (Amagliani &

Schmitt, 2017; Burger & Zhang, 2019; Saurel, 2020). En plus des propriétés émulsifiantes, les protéines peuvent également présenter de bonnes aptitudes foisonnantes, des propriétés de texturation, de stabilisation, de coloration et d'aromatisation (Kinsella & Melachouris, 1976).

3.3.4. Les particules solides stabilisantes

Pour stabiliser les émulsions de Pickering, il est possible d'utiliser des poudres présentant une solubilité préférentielle pour l'une ou l'autre des deux phases. Ces particules solides vont donc se localiser à l'interface et stabiliser le système en limitant la recombinaison des gouttes. Cette stabilisation réside dans la forte énergie nécessaire pour stabiliser une particule à l'interface (Δ_E , J) (Finkle, *et al.*, 1923). L'adsorption est généralement irréversible et est déterminée par la loi de Finkle qui dépend de la taille de la particule (r , m), de l'angle de contact (θ , en $^\circ$) et de l'interface entre la phase aqueuse et la phase grasse (γ , N/m) (Équation 1.3).

Équation 1.3 : Loi de Finkle.

$$\Delta_E = \pi r^2 \gamma (1 - \cos \theta)^2$$

Ce mouillage préférentiel, tout comme la notion de HLB pour les émulsifiants, va conditionner le type d'émulsion final. Pour stabiliser une émulsion directe, il faut que la particule soit davantage dirigée vers la phase aqueuse et donc que l'angle de contact soit inférieur à 90° . Dans le cas d'une émulsion inverse, la mouillabilité de la particule doit être plutôt dans l'huile avec un angle, cette fois-ci, supérieur à 90° (Figure 1.21) (Albert, *et al.*, 2019).

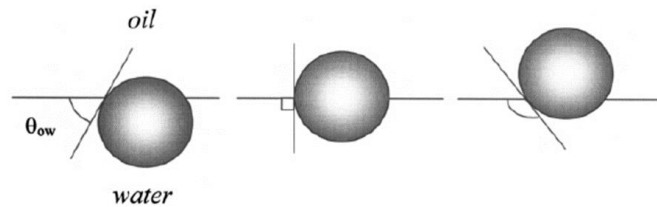


Figure 1.21 : Sens de l'émulsion de Pickering en fonction du mouillage de la particule.

3.3.5. Agents de texture

La stabilisation dans ce cas est obtenue par augmentation de la viscosité de la phase continue. Le choix de l'agent stabilisant sera fonction de la nature de cette phase. Les agents de texture, stabilisateurs d'émulsion H/E, les plus connus sont les épaississants et les gélifiants. Pour de faibles concentrations, ils ont la faculté d'augmenter la viscosité de la phase hydrophile. Ces additifs modificateurs de viscosité peuvent provenir essentiellement de glucides (gomme arabique, agar, amidons) ou de protéines (gélatine). Les additifs texturants permettant la stabilisation des émulsions E/H sont moins employés que ceux des systèmes H/E notamment pour des raisons de disponibilité plus restreintes. En effet, les dérivés protéiques ou glucidiques, hydrophiles, sont plus accessibles et nombreux que des agents modulateurs de viscosité présentant une affinité pour les huiles. Un exemple récent mentionne toutefois l'utilisation d'ingrédients de type fibres, riches en cellulose, permettant de moduler la viscosité des huiles liquides. La teneur et la granulométrie de la fibre sont alors les principaux paramètres qui permettent de moduler la rhéologie (David, *et al.*, 2021).

Nous venons de décrire différents types d'agents stabilisants des émulsions ou des mousses, très utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire. Comme mentionné précédemment, les émulsions et les mousses sont thermodynamiquement instables. Malgré l'utilisation d'agents stabilisants décrits précédemment et qui visent à ralentir les phénomènes, ces systèmes peuvent néanmoins se déstabiliser. Nous allons donc décrire quels peuvent être les processus de déstabilisation tout en sachant qu'ils peuvent être observés dans les produits alimentaires.

3.4. Instabilités des systèmes dispersés

3.4.1. Les émulsions

Les émulsions, tout comme les mousses, sont des systèmes thermodynamiquement instables. Une particule colloïdale en suspension va, dans la plupart des cas, présenter une charge électrostatique à sa surface. Si cette dernière est suffisamment importante, les particules se repousseront et resteront donc individualisées. Il existe aussi d'autres forces qui dépendent soit de la structure moléculaire du système, soit de forces liées à l'agitation aléatoire de ces particules dans un continuum liquide. Selon les cas, elles peuvent prendre le dessus sur les autres pour aboutir à la déstabilisation du système. Ces phénomènes de déstabilisation sont de

nature réversible ou irréversible (Figure 22) et ont lieu pour que le système tende vers un minimum d'énergie libre (ΔG). Il existe plusieurs types de déstabilisation. La coalescence et le mûrissement d'Ostwald sont des processus où la taille des gouttelettes augmente avec le temps. Le crémage et la floculation sont plutôt liés à la migration des gouttelettes du fait du mouvement aléatoire des particules dans le liquide (mouvement Brownien). Dans les formules alimentaires, l'ensemble de ces phénomènes sont observés. (Berton-Carabin & Schroën, 2015; Leal-Calderon, *et al.*, 2007; McClements, 2006; Tharwat, 2016).

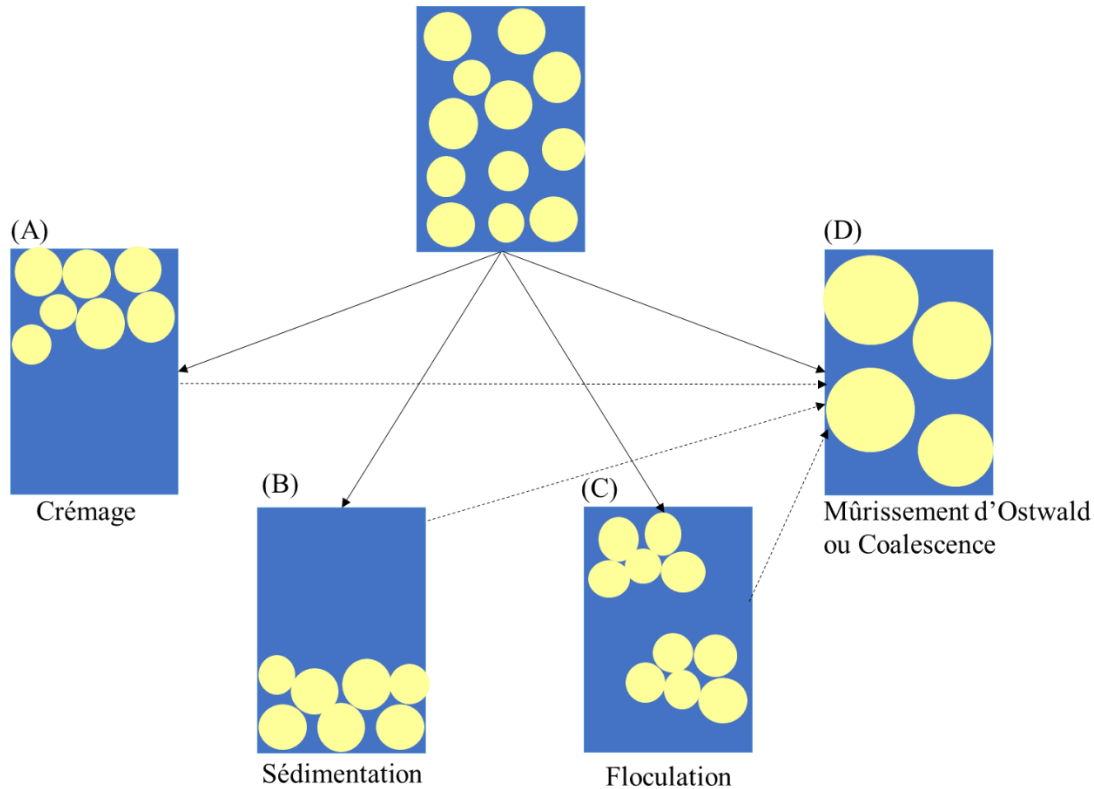


Figure 1.22 : Principaux phénomènes physiques de déstabilisation des émulsions (adaptée (McClements, 2006)).

3.4.1.a. Crémage et sédimentation

Les phénomènes de crémage (Figure 1.22(A)) ou de sédimentation (Figure 1.22(B)) sont principalement liés à des différences de densité importantes entre la phase aqueuse et huileuse. Ce sont des processus non destructifs et donc réversibles. Ainsi dans un phénomène de crémage, un regroupement de la phase dispersée, localisée dans la phase supérieure du volume, est observé ; l'huile étant moins dense que l'eau. L'inverse se produit quand la phase dispersée est la plus dense. Dans ce cas on parle de sédimentation. En général, le crémage va se produire dans les émulsions directes tandis que la sédimentation a plutôt lieu dans les

émulsions inverses (McClements & Jafari, 2018). La vitesse de sédimentation ou de crémage d'une gouttelette isolée (v ; en m.s^{-1}) est modélisée par la loi de Stokes-Einstein (

Équation 1.4) avec g : accélération de la pesanteur (m.s^{-2}), r : rayon de la goutte (m), ρ_d : masse volumique de la masse dispersée (kg.m^{-3}), ρ_c : masse volumique de la phase continue (kg.m^{-3}) et η_c : viscosité dynamique de la phase continue (Pa.s).

Équation 1.4 : Loi de Stokes–Einstein.

$$v = \frac{2 (\rho_d - \rho_c) g r^2}{9 \eta_c}$$

Les solutions possibles pour diminuer le phénomène de crémage ou de sédimentation sont de diminuer la taille des particules dispersées, de diminuer la différence de densité entre la phase continue et la phase dispersée ou encore d'augmenter la viscosité de la phase continue avec l'utilisation d'agents texturants par exemple (Dickinson, 2009).

3.4.1.b. Flocculation

Le phénomène de flocculation (Figure 1.22(C)) se produit lorsque les forces d'attraction sont supérieures aux forces de répulsion. Les particules s'agglomèrent pour former des flocs qui correspondent à une agrégation des particules. Au cours de ce phénomène de déstabilisation, les gouttelettes restent toutefois individualisées. Ce phénomène peut être accentué par les effets de concentration, le mouvement brownien des particules, les forces gravitationnelles et les forces hydrodynamiques. Dans le cas d'une flocculation faible, ce phénomène est toutefois réversible. Enfin, ce processus peut être contrôlé de différentes façons :

- Par modification du pH du système ; ceci peut entraîner une modification des charges de surface créant ainsi des répulsions électrostatiques (Dickinson, 2009). L'ajout d'agents ioniques, tel que le sel, peut aussi jouer le rôle de modulation de la force ionique.

- En favorisant l'encombrement de la surface des objets, par ajouts de polymères comme des protéines ou des polysaccharides, limitant ainsi l'agrégation via une répulsion stérique (Dickinson, 2019; Ji & Walz, 2015).

3.4.1.c. Coalescence

Le phénomène de coalescence correspond à une fusion des gouttelettes pour former une goutte de taille plus grande (Figure 1.22(D)). Ce processus se produit généralement après le crémage, la sédimentation ou la floculation, traduisant une proximité physique des gouttes. A ce niveau, une rupture du film interfacial se produit après un phénomène de nucléation entre deux gouttes. Plus un film en surface est résistant, moins la coalescence aura lieu. La coalescence est un phénomène qui s'auto-accélère et qui est irréversible conduisant à une séparation des phases. Le phénomène de coalescence peut toutefois être limité (sans relaxation totale des formes). Ceci est observé lorsqu'une matière grasse cristallisée est utilisée. Ce système est appelé coalescence partielle. Ainsi, dans l'industrie agroalimentaire, de nombreuses émulsions directes sont stockées au frais pour des problèmes de conservation ; c'est le cas des émulsions laitières. A basse température, certaines matières grasses peuvent cristalliser du fait de leur richesse en AG saturés (crèmes foisonnées de type Chantilly, glaces, fourrages à base de cacao ...) provoquant une solidification des gouttes avec un équilibre entre corps gras liquides et cristallisés (Fredrick, *et al.*, 2010). Le phénomène de coalescence n'est pas total (

Figure 1.23) puisqu'il est toujours possible de différencier les gouttelettes constitutives qui sont devenues irrégulières et partiellement fusionnées (Goff, 1997b).

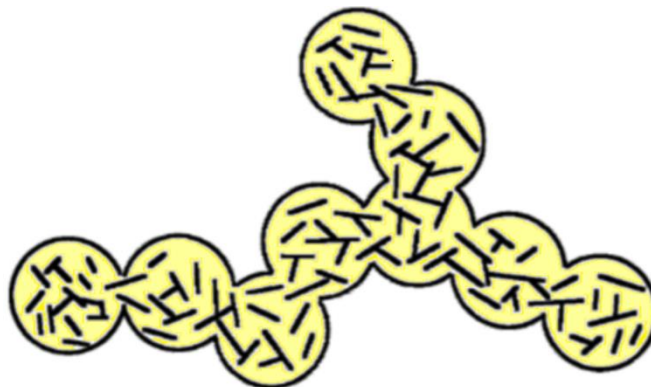


Figure 1.23 : Phénomène de coalescence partielle (Goff, 1997b).

3.4.1.d. Murissement d'Ostwald

Le murissement d'Ostwald (Figure 1.22(D)) est aussi un processus destructif par lequel les grosses gouttelettes grossissent aux dépens des plus petites mais, à la différence de la coalescence, le contact n'est pas direct. Cela implique le transfert d'une petite goutte vers l'autre, plus grosse, au travers de la phase continue. Ce phénomène diffusif est intimement lié à la solubilité intrinsèque de la phase dispersée dans la phase continue. Souvent, la distribution de taille des gouttes devient homogène et mono-disperse. C'est donc un processus destructif mais à la différence de la coalescence, il s'auto-ralentit. D'après la loi de Laplace (Équation 1.5), plus une goutte à un diamètre petit, plus la pression interne dans la goutte est forte. Ainsi, lorsque deux gouttes voisines présentent des diamètres différents, un transfert de matière de la plus petite goutte vers la plus grosse va s'opérer (Kabalnov, 2001).

Équation 1.5 : Loi de Laplace.

$$p = \frac{2\gamma}{R}$$

Cela se traduit donc par la disparition progressive de petites gouttes au profit des plus grosses. Ce phénomène est très lent dans les émulsions mais très présent dans les mousses (système foisonné air-dans-eau). A température ambiante, l'air étant plus soluble dans l'eau que l'huile dans l'eau, cela explique un tel différentiel.

3.4.2. Les mousses

Nous venons de décrire les phénomènes de déstabilisation dans les émulsions. Dans les mousses, des phénomènes de déstabilisation sont également présents, mettant en jeu les mêmes mécanismes physiques. On parle alors de drainage, de coalescence ou de murissement d'Ostwald (Figure 1.24). Pendant le drainage, le liquide s'écoule entre les différentes bulles d'air par effet de capillarité et de gravité entraînant alors un amincissement des films entre le gaz et le liquide. Les phénomènes de coalescence ont lieu lorsque le film interfacial est suffisamment mince et fragile et est amené à se rompre entraînant une fusion entre les bulles. On parle alors d'un système qui collapse (Langevin, 2019). Pour finir, comme évoqué ci-avant, le murissement d'Ostwald est le phénomène où le gaz diffuse des petites bulles vers les plus grosses (Saint-

Jalmes, 2006). L'ensemble de ces systèmes de déstabilisation sont interdépendants et les vitesses d'apparition peuvent être plus ou moins rapides selon les forces mises en jeu.

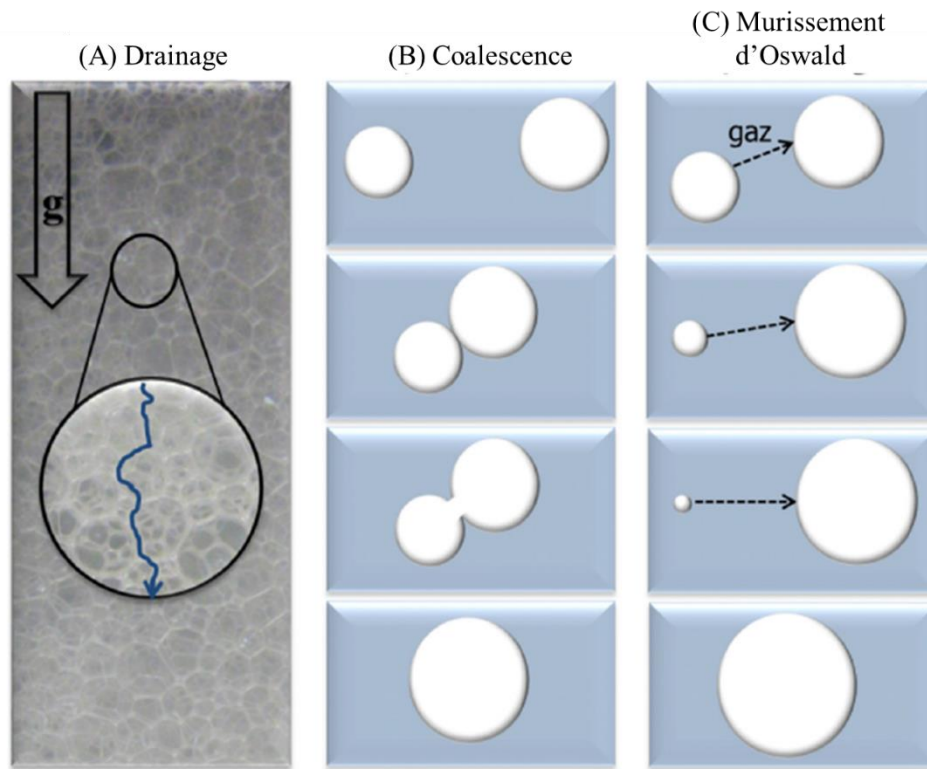


Figure 1.24 : Phénomènes de déstabilisation des mousses (Fameau & Salonen, 2014).

Pour éviter au maximum ces phénomènes d'instabilité, il est donc essentiel voire impératif d'ajouter aux cours de la formulation, des molécules tensioactives qui jouent le rôle de liant entre les deux phases non miscibles mais aussi de barrière aux interfaces. Dans l'agroalimentaire, certains de ces émulsifiants n'ont pas que ce seul rôle et peuvent également intervenir avec d'autres modes d'action au sein de la matrice. Les travaux de thèse présentés ici se focalisent sur les MDGs. Nous nous sommes donc intéressés à leurs actions dans les produits alimentaires.

4. Impacts des mono et diglycérides dans les matrices alimentaires

Une matrice alimentaire est notamment constituée de nombreuses molécules telles que des lipides, des protéines, des sucres (plus ou moins polymérisés tels que sucres simples ou glucides complexes : amidon ou fibres) et d'eau. Tout cela constitue alors un mélange complexe. Ces molécules vont interagir entre elles, ce qui influence la qualité du produit fini. Les MDGs sont des constituants qui offrent de nombreux avantages fonctionnels dans beaucoup

de matrices alimentaires. De ce fait, nous allons détailler leurs rôles dans deux sortes de produits céréaliers, c'est-à-dire les pâtes jaunes et les pâtes levées ainsi que dans les crèmes glacées. Ils apparaissent sous le code E471 et offrent des fonctionnalités différentes en fonction du produit formulé. Ils vont permettre de réduire le rassissement, de développer l'alvéolation et de favoriser l'émulsification et le foisonnement (Kamel & Ponte, 1993; Kayacier & Singh, 2003; Stampfli & Nersten, 1995). Enfin, de nombreux travaux apparaissent ces dernières années sur leur rôle en tant qu'agent gélifiant responsable de la texturation des huiles liquides.

4.1. Rôle sur le rassissement

Lors de la formulation de pâtes jaunes de type gâteaux moelleux, barres pâtisseries ou madeleines, l'un des paramètres les plus importants concerne la conservation du moelleux dans le temps. Certains émulsifiants sont intégrés pour éviter ou du moins limiter un durcissement trop rapide du produit fini. On dit qu'ils ont un pouvoir anti-rassissement. En effet, dans la fabrication de moelleux, la farine (amidon) est l'un des constituants principaux de la recette. L'amidon est un mélange de deux polysaccharides : l'amylose et l'amylopectine (Figure 1.25), dont les proportions sont variables en fonction des origines botaniques. L'amylose constitue 15 à 30 % de la masse de l'amidon. C'est un polymère linéaire constitué d'unités de glucose liées par une liaison α -(1,4)-D-glucosidique. L'amylose, dans l'eau, forme une hélice (6 résidus glucose par tour d'hélice), stabilisée par des liaisons hydrogènes. L'amylopectine représente 70 à 85 % en masse de l'amidon. C'est un polymère semi-cristallin ramifié, de haut poids moléculaire. L'enchaînement des molécules de glucose se fait en α -1,4 avec des branchements en α -1,6. L'amylopectine est à l'origine de la structure cristalline des granules, formée par l'empilement ordonné des doubles hélices structurées en lamelle (Jarroux, 2008).

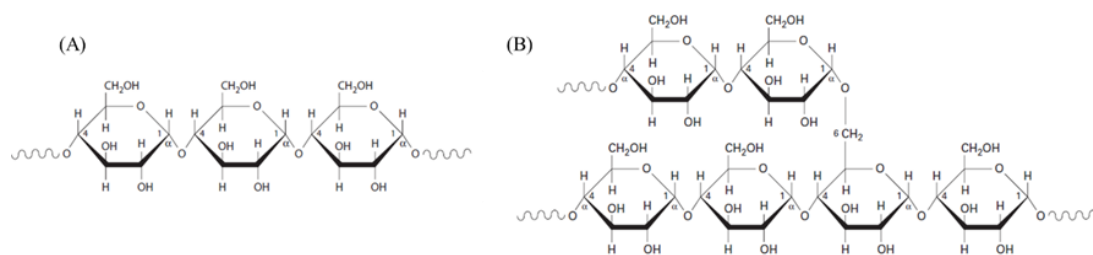


Figure 1.25 : Constituants de l'amidon (A) amylose et (B) amylopectine (adapté (Jarroux, 2008)).

Au cours de la cuisson, le grain d'amidon sera le siège de plusieurs transformations (Figure 1.26) ; il se produit un phénomène de gélatinisation qui confèrera à la pâte son caractère viscoélastique (Buléon, *et al.*, 1990).

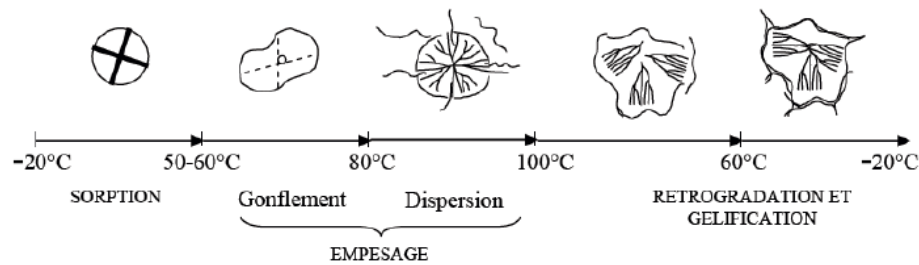


Figure 1.26 : Phénomènes de gélatinisation et rétrogradation de l'amidon (Buléon, *et al.*, 1990).

Ainsi, jusqu'à 60°C, il aura tendance à absorber l'eau et à gonfler. Entre 60 et 100°C, les granules d'amidon continuent à absorber l'eau désorganisant les chaînes d'amylose et conduisant à la rupture des liaisons hydrogènes (étape d'empesage). Ceci entraîne la déstructuration du grain libérant ainsi les molécules d'amylose et d'amylopectine dans le milieu environnant. A ce stade, il y a perte de la structure cristalline. Au cours du refroidissement, les chaînes d'amylose et d'amylopectine se regroupent en chassant les molécules d'eau (via un processus de synérèse et de rétrogradation). Ce processus est lié à la fusion de la structure cristalline des grains, formée par l'empilement ordonné. Cela se traduit au final par une augmentation de la viscosité (Kamel & Ponte, 1993; Matignon & Tecante, 2017; Wang, *et al.*, 2015).

Ce phénomène de rétrogradation de l'amidon est à l'origine du rassissement des pâtes. Pour pallier ce problème, l'ajout d'émulsifiants au cours de la formulation tels que les MDGs peut être une solution (Eliasson & Krog, 1985; Goldstein & Seetharaman, 2016). En effet, ils permettent la formation de complexes d'inclusion essentiellement avec l'amylose (

Figure 1.27). La cavité interne de l'hélice d'amylose va être occupée par le MDGs, ce qui va éviter une interaction avec les molécules voisines. La formation de ces complexes est possible car l'intérieur de l'hélice d'amylose est hydrophobe et les émulsifiants, comme les MDGs, présentent également cette dualité. Par conséquent, les chaînes hydrocarbonées des MDGs vont directement s'intégrer dans la cavité de l'hélice (Pareyt, *et al.*, 2011; Putseys, *et al.*, 2010; Riisom, *et al.*, 1984; Wang, *et al.*, 2015). Ce complexe est dû à l'existence de forces de Van der Waals entre les méthylènes des chaînes hydrocarbonées et les hydrogènes des unités glucose de l'amylose (Obiro, *et al.*, 2012; Winter & Sarko, 1974).

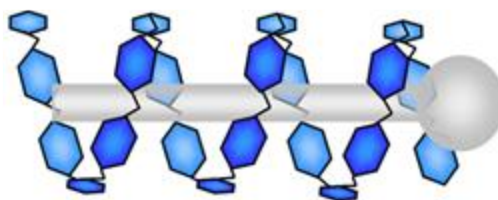


Figure 1.27 : Complexe d'inclusion amylose-MDG (Putseys, *et al.*, 2010).

Les émulsifiants n'ont pas tous les mêmes capacités à former ces complexes d'inclusion avec l'amylose (Tableau 1.1). Parmi les émulsifiants autorisés en agroalimentaire, les mono et diglycérides ainsi que les acides gras sont cependant réputés très efficaces. De par leur structure, les triglycérides ne peuvent pas former de complexes (Gelders, *et al.*, 2005; Karkalas, *et al.*, 1995; Tufvesson, *et al.*, 2003a, 2003b; Yamashita, *et al.*, 2020).

Tableau 1.1 : Pourcentage d'inclusion de certains émulsifiants dans l'amylose (adapté Weyland & Hartel, 2008).

Molécules	CI
Glycerol monostearate (85%)	87
Glycerol monooleate (45%)	35
Mono et diglycerides (50% monoester)	42
Diacetyl tartique esters de monoglyceride (DATEM)	49
Sorbitan monostearate	18
Lécithine	16
Polysorbate 60	32
Acetylate monoglycerides	0

La formation d'un tel complexe dépend essentiellement de la longueur de chaîne de l'amylose ainsi que de la nature et la longueur de chaîne de l'émulsifiant. Si l'hélice est inférieure à 20 unités glucidiques, la complexation ne pourra avoir lieu. De la même manière, si les chaînes aliphatiques sont trop courtes (< 10 carbones), l'hydrophilie de l'émulsifiant étant trop importante, la formation de ces complexes ne peut s'établir. Notons également que les chaînes de carbone constituées de 16 à 18 atomes représentent les longueurs idéales pour la complexation (Blazek, *et al.*, 2011; Osman, *et al.*, 1961). Si l'on compare la nature des chaînes aliphatiques, les émulsifiants polyinsaturés sont moins efficaces que leurs homologues saturés. La non linéarité de leurs chaînes fait qu'ils ont plus de mal à s'introduire dans la cavité des hélices (Seo, *et al.*, 2015; Zhou, *et al.*, 2007).

Pour l'ensemble de ces raisons, les molécules monocaténaires telles que les acides gras ou les monoglycérides qui présentent des longueurs de chaîne entre 16 et 18 atomes de carbones et des chaînes plutôt saturées constituent des agents de complexation de choix (Godet, *et al.*, 1995). A l'inverse, les émulsifiants bicaténaires tels que les diglycérides ou les lécithines le sont moins. Pour cette dernière, les charges présentes sur la tête polaire peuvent également jouer un rôle délétère supplémentaire dans la complexation de l'amylose, ce qui explique les faibles teneurs d'encapsulation (16%).

4.2. Rôle sur le développement de l'alvéolation

L'ajout d'émulsifiants dans les produits céréaliers peut améliorer l'alvéolation de la pâte. Dans la farine en plus de l'amidon, il y a également des protéines plus connues sous le nom de gluten (Landgraf, 2002). Ce dernier est un mélange de gliadines et de gluténines (Figure 1.28). Les gliadines sont des protéines de faibles poids moléculaire, qui donnent à la pâte des propriétés élastiques. Les gluténines, quant à elles, sont des agrégats protéiques de masses moléculaires variables liées par des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophobes et des ponts disulfures. L'association de gliadines et de gluténines est responsable de la structure de la pâte et lui donne ainsi les propriétés d'extensibilité, de viscosité et d'élasticité (Wieser, 2007). Au cours du pétrissage, de l'eau est absorbée par les protéines de gluten qui gonflent et forment un réseau tridimensionnel qui emprisonne les gaz produits (Figure 1.28). La quantité de gluten est importante car elle détermine la force de la farine, l'hydratation de la pâte et le volume du produit final (Landgraf, 2002).

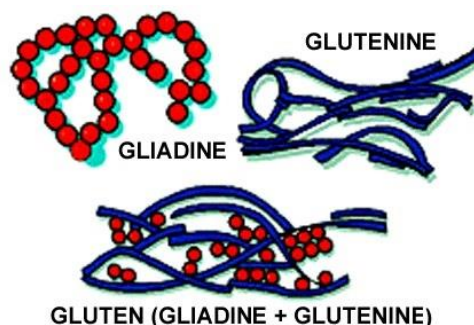


Figure 1.28 : Protéines de gluten présentes dans la farine.

Au cours de la fabrication de matrices à pâte levée comme le pain ou les brioches, des émulsifiants sont ajoutés pour favoriser l'alvéolation. Cette dernière est liée à la quantité d'air

présente dans la pâte ; c'est un paramètre important qui permet d'augmenter le volume du produit mais aussi de changer ses propriétés rhéologiques et donc sa texture. La quantité d'air située dans la pâte sera fonction de la quantité de gaz incorporée au cours de la fabrication. Ceci se fait notamment pendant le pétrissage ou sinon le gaz est généré *in situ* via un processus enzymatique qui libère du CO₂ mais aussi favorise sa stabilisation au sein de la matrice. Dans les produits alvéolés, le réseau protéique de gluten permet en partie de jouer ce rôle de stabilisant (Dizlek & Ozer, 2018; Pareyt, *et al.*, 2011). Un dernier paramètre important concerne le temps de repos, il permet une réorganisation moléculaire des émulsifiants présents dans la matrice aux interfaces. A la cuisson, les gaz se dilatent et la vapeur d'eau se dégage. Les interfaces air-eau sont stabilisées par les émulsifiants favorisant ainsi une augmentation du volume final (Figure 1.29).

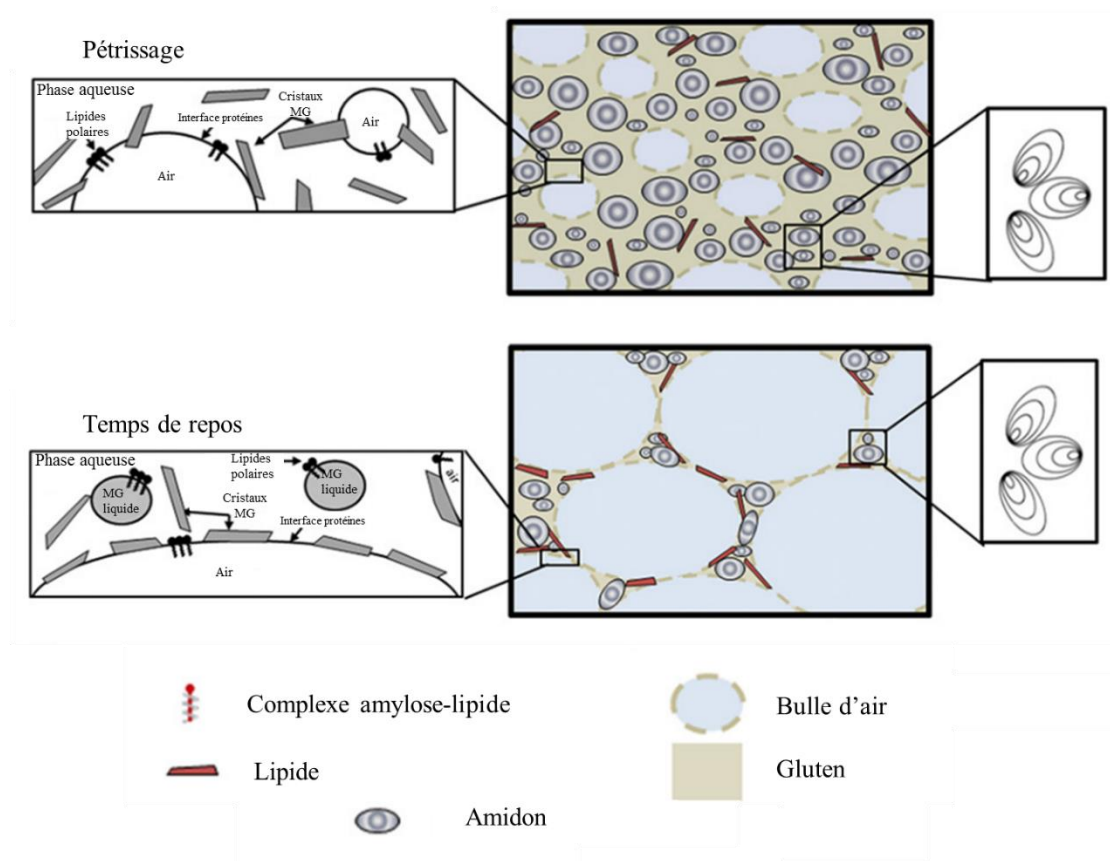


Figure 1.29 : Schématisation de l'organisation moléculaire dans la pâte au cours du pétrissage et du temps de repos (Pareyt, *et al.*, 2011).

De par leur nature amphiphile, les MDGs peuvent tout à fait favoriser la stabilisation des bulles d'air ce qui permet au produit de gonfler. Du fait de leurs propriétés tensioactives, ils vont abaisser la tension de surface entre l'air et la pâte et rendre l'interface protéines-lipides

plus homogène. (Campbell, 2003; Inoue, *et al.*, 1996; Ooms & Delcour, 2019; Orthoefer, 2008; Sahi, 2003). De plus, ils semblent renforcer le réseau de gluten grâce à l'établissement de liaisons hydrogènes (Pomeranz & Chung, 1978 ; Sahi, 2003). Lors de la fabrication de matrices alimentaires aérées, l'ajout d'émulsifiants tels que les MDGs est nécessaire pour d'une part, assurer une bonne dispersion, répartition et homogénéité des lipides au sein de la matrice et d'autre part, stabiliser les bulles d'air (Cauvain, 2003). Sans ces additifs, les protéines contenues dans les œufs peuvent aussi jouer ce rôle de stabilisant mais la structure résultante est plus grossière et moins homogène. Il est donc important d'ajouter des émulsifiants qui en fonction de la teneur ajoutée peuvent avoir des effets synergétiques avec les protéines.

4.3. Rôle sur l'émulsification et le foisonnement

Les produits de type laitiers correspondent à une émulsion directe. En effet il s'agit d'une dispersion de matières grasses dans une phase aqueuse contenant elle, des protéines laitières, des œufs, du sucre... L'ajout d'émulsifiants dans la fabrication des mix laitiers comme par exemple les yaourts et les crèmes glacées est bien décrit dans la littérature (Goff, 1997a; Goff & Hartel, 2013). Ils sont généralement ajoutés dans le but d'améliorer la fabrication des mix laitiers (homogénéité) et de stabiliser la dispersion. Les crèmes glacées sont constituées d'un mélange de cristaux de glace, de bulles d'air et de globules gras en équilibre dans un liquide (Petrut, *et al.*, 2016). Elles peuvent donc être définies comme des dispersions émulsionnées et foisonnées (incorporation de microbulles d'air) qui sont destinées à être congelées. Avant congélation, les produits sont d'abord mélangés et stabilisés à l'aide de molécules émulsifiantes présentes dans la préparation. Au cours du foisonnement, leur présence va permettre de stabiliser les bulles d'air, d'augmenter ainsi la quantité d'air introduite (Boutonnier, 2018; Goff, 2002). Enfin, ces molécules limiteront l'apparition de gros cristaux qui auront tendance à croître au cours du stockage ou en cas de fluctuation de température. Cet ensemble de phénomènes permettra d'aboutir à une texture onctueuse avec une meilleure stabilité en texture et une meilleure résistance à la fonte. Ce sont majoritairement les protéines laitières et les MDGs qui jouent ce rôle. Les protéines sont des émulsifiants favorisant les émulsions directes, les MDGs quant à eux, sont des émulsifiants qui auront tendance à favoriser la formation d'émulsions inverses compte tenu de leur lipophilie intrinsèque. En effet, ils possèdent une valeur de HLB généralement comprise entre 2 et 4 (Goff & Hartel, 2013; Kako & Kondo, 1979). Cependant, lorsqu'ils sont utilisés en faibles quantités et associés à d'autres émulsifiants, comme les protéines, des effets synergiques peuvent avoir lieu ce qui rend possible la stabilisation du mix

à l'origine de la crème glacée. Les MDGs, tout comme les protéines viennent se placer aux interfaces (Figure 1.30). Si la quantité de MDGs est trop importante, ils vont avoir tendance à déstabiliser le système en désorbant les protéines de la surface des globules gras (Cheng, *et al.*, 2020; Goff, 2008; Loi, *et al.*, 2019; Moran-Valero, *et al.*, 2017; Nylander, *et al.*, 2008). A l'inverse, si les MDGs sont ajoutés en quantités modérées, ils vont déplacer une partie des protéines et ainsi déstabiliser partiellement l'émulsion directe. Ceci se traduit par une fusion localisée des gouttes de matières grasses, avec relaxation partielle de la forme et la formation d'un réseau de gouttes connectées. Cette complémentarité entre les protéines et les MDGs est importante car elle permet de réguler à la fois la coalescence partielle des globules de gras et la stabilité des bulles d'air qui sont deux paramètres essentiels lors de la préparation des crèmes glacées.

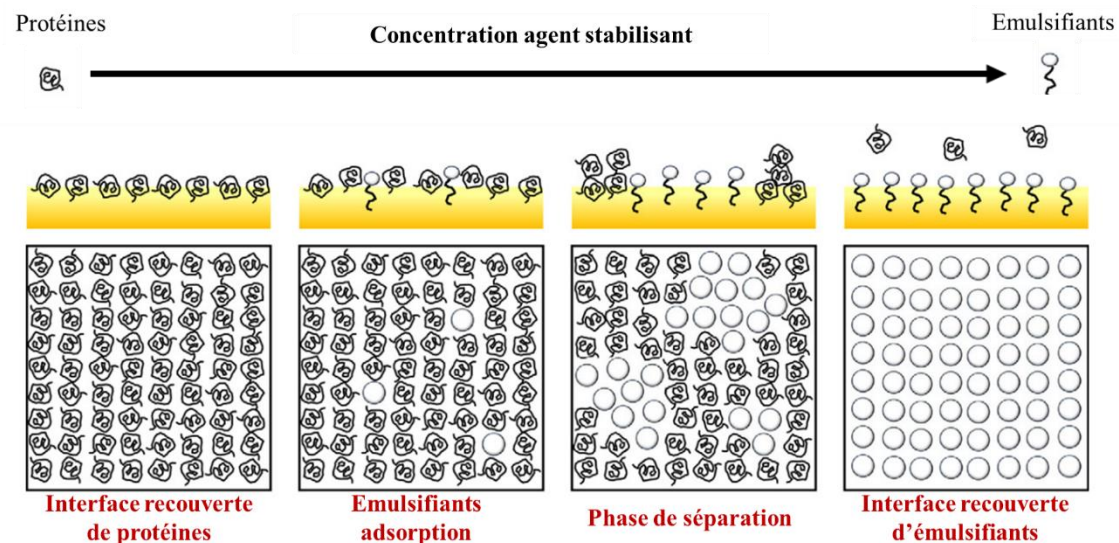


Figure 1.30 : Stabilisation des interfaces par les protéines en présence et/ou absence d'émulsifiants (adapté (McClements & Jafari, 2018)).

Les émulsions stabilisées avec les protéines et des émulsifiants anioniques auront tendance à gélifier tout en gardant la mousse stable. Les mousses stabilisées par des protéines et des émulsifiants non ioniques (comme les MDGs) auront tendance à être plus stables et à favoriser la coalescence partielle, ce qui a pour effet d'augmenter la viscosité du système.

La stabilisation des bulles d'air se fait comme nous l'avons vu par les protéines, les MDGs, mais également des lipides solides. Par rapport à un lipide cristallisé isolé, des gouttes de lipides cristallisées formées via la coalescence partielle semblent mieux stabiliser les bulles

d'air (Figure 1.31). Au final, même les MDGs déstabilisent les émulsions, cela engendre malgré tout une meilleure stabilisation des crèmes glacées (Cropper, *et al.*, 2013; J. Jiang, *et al.*, 2018; Munk, *et al.*, 2014).

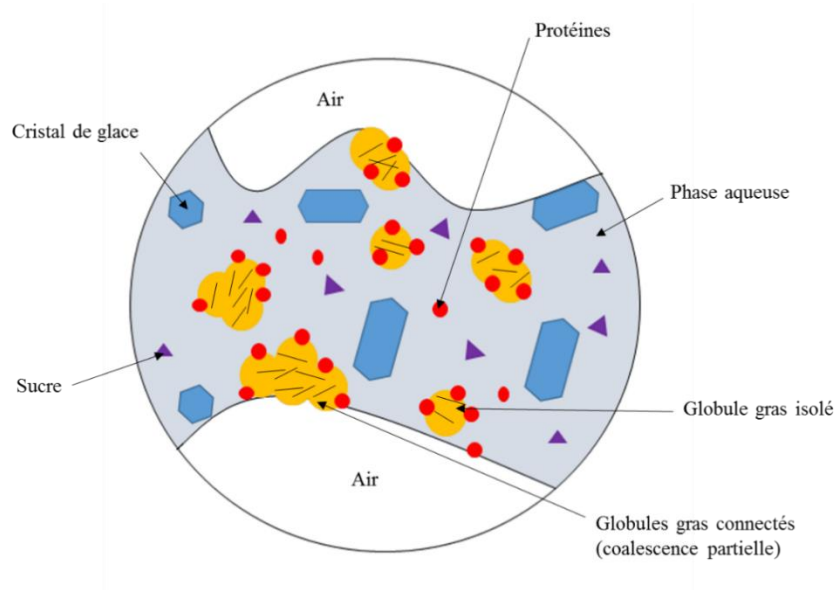


Figure 1.31 : Représentation schématique de la structure d'une crème glacée (adaptée (Petrut, *et al.*, 2016)).

4.4. Rôle sur la texture des huiles végétales

Dans l'univers physicochimique appliqué au domaine alimentaire, de nombreuses recherches sont réalisées pour texturer les produits. La texturation des corps gras liquides constitue ces dernières années, un domaine de recherche très en vogue dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle des aliments. En effet, une demande de plus en plus forte existe dans l'industrie agroalimentaire, pour faire disparaître les corps gras saturés au profit des insaturés, sans perte de fonctionnalité (Brun, *et al.*, 2015 ; Martins, *et al.*, 2018; Patel, *et al.*, 2020; A. R. Patel & Dewettinck, 2016; Pehlivanoğlu, *et al.*, 2018).

Certaines molécules émulsifiantes ou texturants permettent de piéger les huiles végétales dans un réseau tridimensionnel. Ces systèmes sont appelés oléogels ou organogels et sont largement étudiés dans la littérature (Cerqueira, *et al.*, 2017; Davidovich-Pinhas, *et al.*, 2015; Ferreira Chaves, *et al.*, 2018; Hwang, 2020). Les acides gras sous leurs formes cristallisées (polymorphes α , β' ou β) peuvent s'auto-assembler puis piéger la phase huileuse liquide. Cependant, la formation d'un réseau cristallin nécessite souvent des teneurs élevées en molécules gélifiantes pour éviter une séparation de phase (Manzocco, *et al.*, 2014). Les MDGs

présentent aussi ces aptitudes puisque les 1,3-DGs vont cristalliser sous la forme β alors que les 1,2-DGs auront tendance à se trouver sous la forme β' ou α (Tavernier, *et al.*, 2019). Ces molécules sont donc connues pour être de bons agents gélifiants. Il est également important de prendre en considération la nature du solvant et les interactions présentes entre le solvant et l'agent structurant. En effet, l'agrégation des gélifiants dans la phase liquide peut être due aux forces de Van der Waals, aux liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes....

Les gélifiants peuvent être grossièrement classés en deux catégories en fonction de leur poids moléculaire :

- Les petites molécules (avec un poids moléculaire généralement inférieur à 3000 Da) sont couramment utilisées. On retrouve dans cette catégorie les lécithines, les acides gras libres ou les mono- et diglycérides. Ces molécules peuvent s'auto-assembler dans la phase grasse pour former des structures supramoléculaires telles que des vésicules, des tubes, des micelles ou des phases lamellaires inverses.
- Des molécules et des polymères possédant un degré de polymérisation important peuvent également être utilisés, c'est le cas des protéines (Mezzenga, 2011; Scholten, 2019) et des dérivés cellulosiques : carboxyméthyl cellulose (CMC), éthylcellulose (EC) ou hydroxylpropylméthyl cellulose (HPMC) (Y. Jiang, *et al.*, 2018; A. Singh, *et al.*, 2017). Cependant, pour être efficaces, ils doivent être d'abord dispersés dans l'eau pour hydrater le polymère, puis dispersés dans le corps gras pour former une émulsion. L'ensemble est lyophilisé de manière à enlever l'eau, ce qui permet ensuite au polymère de se rigidifier dans le milieu huileux.

Nous venons de voir dans cette partie que l'ajout d'émulsifiants dans la fabrication des diverses matrices alimentaires apporte des fonctionnalités différentes mais importantes. Pour garder la même fonctionnalité, la substitution notamment des MDGs s'avère donc complexe car ils interviennent sous beaucoup d'aspects. Comme toute utilisation d'additif dans les produits alimentaires, ils doivent être indiqués sur l'étiquette du produit. Comme évoqué précédemment, pour envisager une démarche « clean-label », l'un des enjeux majeurs consiste à éviter l'utilisation d'additifs. De ce fait, l'usage d'auxiliaires technologiques permettant de générer des composés de substitution aux additifs peut être une solution intéressante permettant de garder les mêmes fonctionnalités.

5. Les enzymes comme auxiliaires technologiques

Les enzymes sont par définition des protéines dotées de propriétés catalytiques. Elles sont définies comme des catalyseurs car elles sont actives à de faibles concentrations et augmentent considérablement la vitesse des réactions chimiques dans lesquelles elles interviennent. Elles sont présentes en grand nombre dans nos organismes vivants et jouent un rôle physiologique essentiel notamment au cours de la digestion, la synthèse d'hormones, la conduction nerveuse, etc. Cet engouement pour les enzymes n'épargne pas l'industrie agroalimentaire puisqu'elles sont utilisées depuis des siècles pour confectionner de nombreuses matrices alimentaires comme le pain, le fromage, la bière et le vin. A chaque fois, elles vont intervenir au cours de la transformation du produit ou des matières premières et par la suite être désactivées ou dénaturées au cours de ce même processus de fabrication. De ce fait, elles n'entrent pas dans la liste des ingrédients à déclarer (Collados, *et al.*, 2020; Tebben, *et al.*, 2018). Généralement, les enzymes sont produites à partir de produits naturels d'origines fongiques ou bactériennes.

5.1. Nomenclature et classification

Les différentes enzymes sont définies par un nom usuel qui fait référence au substrat qu'elles attaquent (lipase par exemple dans le cas des lipides) et par un numéro EC (Enzyme Classification) qui est défini par la commission des enzymes de l'Union Internationale selon la codification suivante : le premier chiffre indique le type de réaction biochimique mise en jeu (van Oort, 2010) :

- 1 : les oxydoréductases qui catalysent les réactions d'oxydo-réduction,
- 2 : les transférases qui transfèrent un groupe fonctionnel d'une molécule à une autre,
- 3 : les hydrolases qui hydrolysent les liaisons chimiques en présence d'eau,
- 4 : les lyases, qui sont capable de rompre des liaisons (carbone-carbone, carbone-oxygène, carbone-azote) et d'en reconstituer de nouvelles simultanément,
- 5 : les isomérases qui réarrangent les groupements d'une molécule pour former des isomères,
- 6 : les ligases ou synthétases qui permettent la jonction entre deux molécules.

Le deuxième chiffre est une sous-classe qui précise le type de groupement chimique ou de liaison concerné. Le troisième détermine la nature précise des groupements chimiques mis en jeu ou les mécanismes réactionnels lorsqu'ils sont connus. Enfin, le dernier est le numéro d'ordre d'enregistrement de l'enzyme dans la sous-sous-classe concernée. Par exemple une lipase, qui hydrolyse les triglycérides constitutifs des lipides, sera nommée EC.3.1.1.3 (Fickers, *et al.*, 2008).

5.2. Structure et activité

Les enzymes sont des protéines qui s'organisent en différentes structures en fonction des différentes séquences en acides aminés qui les composent (Figure 1.32) (Copeland, 2000) :

- La structure primaire correspond à l'enchaînement des acides aminés par des liaisons peptidiques covalentes (liaisons très fortes).
- La structure secondaire résulte de l'établissement de liaisons hydrogènes entre les groupements amides et carbonyle du squelette peptidique. Cela entraîne différentes conformations pour former des hélices α et des feuillets β .
- La structure tertiaire correspond à des regroupements de structures secondaires linéaires (hélices α , feuillets β) qui se replient sur elles-mêmes pour former une molécule possédant une nouvelle conformation en 3-dimensions. Cette structure est stabilisée par la présence d'interactions électrostatiques, d'interactions hydrophobes, de liaisons hydrogènes et également de ponts disulfures qui se forment à partir des chaînes latérales des acides aminés.
- La structure quaternaire est le niveau le plus élevé d'organisation des protéines. Il s'agit d'associations entre les différentes unités polypeptidiques de structures tertiaires. Ces liaisons définissent ce que l'on appelle des sous-unités et sont établies par les mêmes interactions que ce que nous retrouvons dans la structure tertiaire.

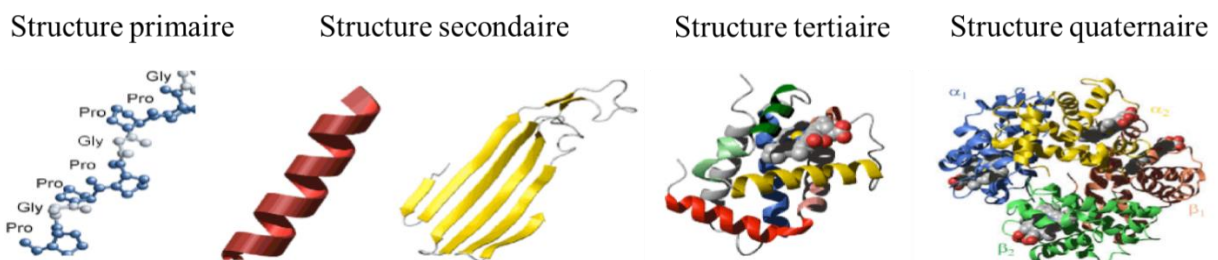


Figure 1.32 : Possible structure des enzymes (Abraham, 2008).

Les enzymes qui présentent une sensibilité réactionnelle sont soit sous la forme tertiaire ou sous la forme quaternaire. Deux exemples peuvent être cités : la lipase pancréatique est classiquement une structure tertiaire puisqu'il s'agit d'une association d'hélice α , et de feuillets β . Quant à l'enzyme « *Mushroom polyphenol oxidase* », elle comporte des sous unités donc il s'agit d'une enzyme quaternaire (Whitaker, 1995; Wong, 1995).

5.3. Mode d'action

Comme nous l'avons vu précédemment, les enzymes sont spécifiques d'un substrat et les acides aminés qui constituent l'enzyme ont une organisation précise qui détermine l'action spécifique de l'enzyme. Les différentes parties de l'enzyme n'ont pas toutes la même utilité. Ainsi, certaines zones de la protéine favorisent la mise en place du substrat par rapport au site actif. D'autres acides aminés interagissent avec le substrat et favorisent la catalyse enzymatique. Les enzymes vont agir selon deux types de mécanismes ; on parlera d'enzymes michaeliennes et d'enzymes allostériques ou coopératives. Certaines d'entre elles ont seulement un site actif ; c'est le cas des enzymes michaeliennes, alors que d'autres plus complexes comme les enzymes allostériques peuvent en posséder plusieurs.

Depuis 1965, l'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à la transformation d'un substrat en produit en fonction du temps. Elle s'exprime en unités par gramme (u/g) ou en katal (Reed, 1975). Afin d'assurer une activité réactionnelle, les enzymes doivent dans un premier temps se lier à leurs substrats. Chaque site actif est spécifique au substrat que va attaquer l'enzyme. La formation d'un complexe enzyme-substrat peut alors s'opérer notamment au travers de liaisons hydrogènes, de liaisons électrostatiques ou d'interactions de Van der Waals. Le substrat s'adsorbe alors sur le site actif selon un mécanisme dit « clé-serrure ». Une fois que le complexe enzyme-substrat est formé, l'enzyme va être activée et ainsi procéder à la réaction chimique. Quand le produit est formé, il se désorbe car celui-ci n'a pas d'affinité avec le site actif. Ce dernier étant à nouveau libre, il peut fixer un autre substrat et recommencer le cycle catalytique (Figure 1.33).

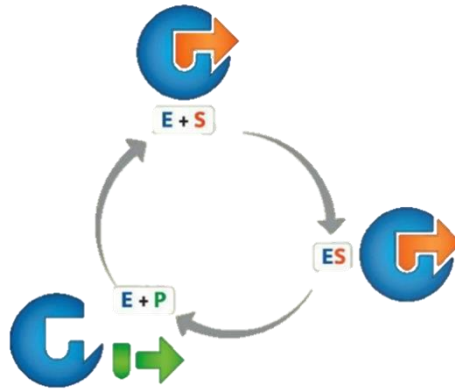


Figure 1.33 : Représentation schématique d'une réaction enzymatique (enzyme Michaelienne)
(S : Substrat, E : enzyme, P : produit, ES : complexe enzyme-substrat).

Bien souvent dans les systèmes enzymatiques, les réactions ne sont pas uniques. En effet, certaines réactions peuvent s'établir en parallèle ou se succéder. Dans ce dernier cas, le produit issu de la première réaction devient le substrat pour la seconde réaction et ainsi de suite. Ces réactions sont dites en « cascades », ce qui complexifie la compréhension des cinétiques chimiques (Ricca, *et al.*, 2011; Walsh & Moore, 2019) (Figure 1.34).

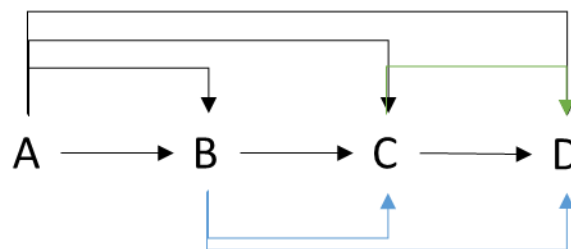


Figure 1.34 : Représentation schématique des réactions enzymatiques en cascade (adapté Ricca, *et al.*, 2011)).

Différents paramètres externes peuvent influencer l'efficacité de la réaction enzymatique. Chacune des enzymes possède des conditions d'utilisation qui lui sont spécifiques et qui lui permettent d'aboutir à des rendements de réactions optimaux. L'un des premiers paramètres à contrôler est la température d'activation. En général, les enzymes ont des températures optimales d'utilisation avoisinant les 40 °C. En deçà ou au-delà, une chute de l'activité enzymatique peut être observée. Une modification de température peut également entraîner une inactivation des enzymes qui pourra être réversible pour de faibles températures ou irréversible pour des températures élevées. Pour ce dernier cas de figure, les enzymes sont détruites si elles subissent une dénaturation thermique. De même, chaque enzyme a un pH pour

lequel son activité est maximale. Une modification de ce paramètre entraîne une modification de l'activité enzymatique, certes réversible, car elle modifie la structure même du site actif. Le contrôle des conditions expérimentales lors d'une réaction enzymatique s'avère donc capital.

5.4. Grandes classes d'enzymes utilisées dans l'agro-alimentaire

Les enzymes sont spécifiques et portent généralement le nom des substrats qu'elles attaquent, ainsi il existe les lipases pour les enzymes qui attaquent les lipides, protéases pour les protéines, amylases pour les amidons.... Le règlement européen n°1332/2008 définit le terme « enzyme alimentaire » comme : « *un produit obtenu à partir de plantes, d'animaux ou de micro-organismes ou de produits dérivés, y compris un produit obtenu par un procédé de fermentation à l'aide de micro-organismes. Ce produit qui contient une ou plusieurs enzymes capables de catalyser une réaction biochimique spécifique ; et qui est ajouté à des denrées alimentaires à des fins technologiques à toute étape de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage* ». Au vu de leurs rôles essentiellement technologiques, les enzymes sont définies comme des auxiliaires de fabrication. Actuellement, il n'existe aucune obligation de mentionner leur usage sur l'étiquette du produit. Cependant, toutes les enzymes ne sont pas autorisées en France et en Europe. En effet, pour pouvoir les utiliser, il faut que celle-ci apparaisse sur une liste positive. Comme dans le cas des additifs, cette liste décrit le type d'enzyme, la provenance et sur quelle matrice elle est autorisée. Actuellement, une liste communautaire est en cours d'évaluation de façon à harmoniser les enzymes autorisées dans les pays membres de l'Union Européenne. Cette future réglementation devrait entrer en vigueur sous peu et permettre de spécifier des exigences notamment au niveau d'un possible étiquetage des enzymes (ou au moins leur support d'immobilisation).

Les principales enzymes utilisées actuellement en agroalimentaire sont les amylases, les protéases et les lipases. Elles appartiennent à la catégorie des hydrolases, c'est-à-dire qu'elles catalysent diverses liaisons en présence d'eau (Dahiya, *et al.*, 2020; Kirk, *et al.*, 2002; Linko, *et al.*, 1997; Villas-Boas, *et al.*, 2019). Parmi ces enzymes, la famille des lipases a particulièrement attiré notre attention ; les travaux de cette thèse ayant pour but de générer *in situ* des MDGs par le biais de lipases.

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides, constitutifs de la matière grasse. Leur réaction catalytique nécessite une molécule d'eau et se déroule à l'interface eau/substrat puisque ce dernier est non miscible avec la phase

aqueuse dans laquelle les enzymes sont solubilisées (Houde, *et al.*, 2004; Sharma, *et al.*, 2001). En mélange dans un produit, ces dernières hydrolysent les TGs aux interfaces et les transforment en plusieurs sous-produits de réaction tels que les monoglycérides (1- et 2-MGs), diglycérides (1,2- et 1,3-DGs), acides gras libres (AGLs) et glycérol (G) (Figure 1.35) (Fureby, *et al.*, 1997 ; Jensen, *et al.*, 1983 ; A. K. Singh & Mukhopadhyay, 2012).

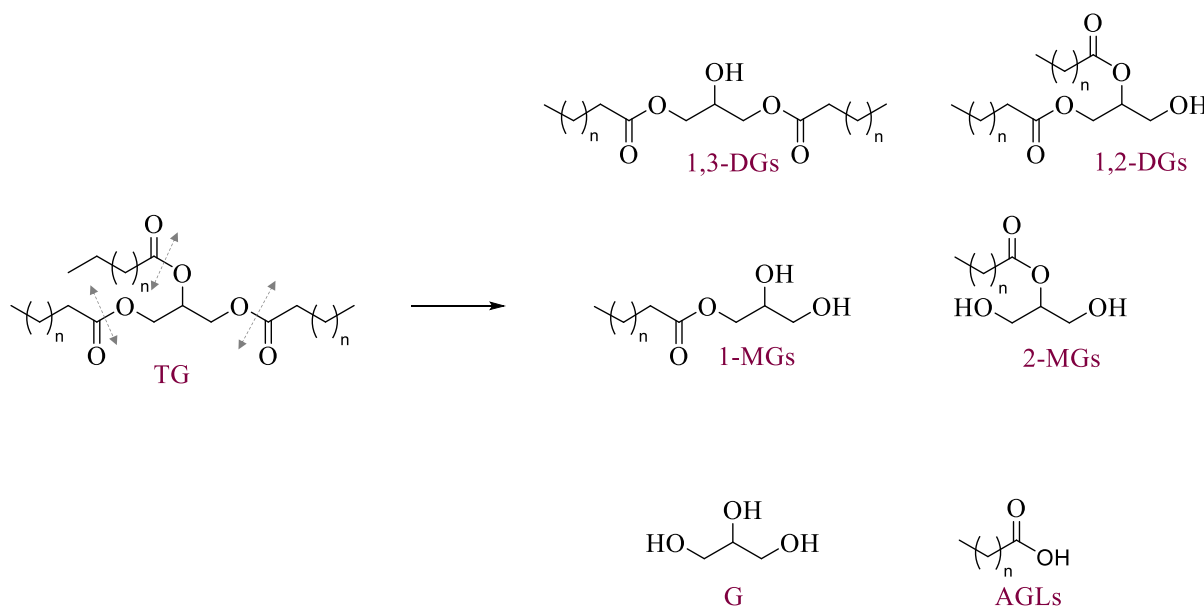


Figure 1.35 : Produits formés au cours d'une lipolyse.

A l'état naturel, les lipases sont entre autres présentes dans de nombreux végétaux et chez les mammifères. Dans les végétaux, elles sont généralement présentes dans les graines et sont responsables de la germination et du développement de la graine et des plantes (Barros, *et al.*, 2010; Staubmann, *et al.*, 1999). Les lipases peuvent être actives au niveau de la digestion, de l'absorption des graisses et de la production de ces dernières, notamment dans la production du lait maternel. L'usage des lipases pancréatiques est fréquemment décrit dans la littérature. Elles participent à l'hydrolyse des TGs et notamment des DGs qui sont libérés par les lipases gastriques (Benzonana & Desnuelle, 1965; Gargouri, *et al.*, 1986; Sarda & Desnuelle, 1958).

Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie, dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés et même de certaines charcuteries (saucissons, salamis). L'hydrolyse de la matière grasse conduit, en fonction de la spécificité de l'enzyme utilisée, à la libération d'acides gras à courtes chaînes (C4-C6) ou à plus longues chaînes (C12-C14), ce qui donne des arômes plus ou moins intenses au produit. Ces enzymes sont ajoutées directement dans la formule au cours de la fabrication

afin qu'elles puissent *in situ* réagir avec les lipides de l'huile (ingrédient de la recette) ou de la farine (lipides endogènes). Les MDGs ainsi synthétisés permettent d'améliorer la stabilité de la pâte, la conservation du moelleux et le volume pour les produits aérés en stabilisant les bulles d'air (Gerits, *et al.*, 2014; Gerits, *et al.*, 2015; Melis, *et al.*, 2019; Sofian-Seng, *et al.*, 2017).

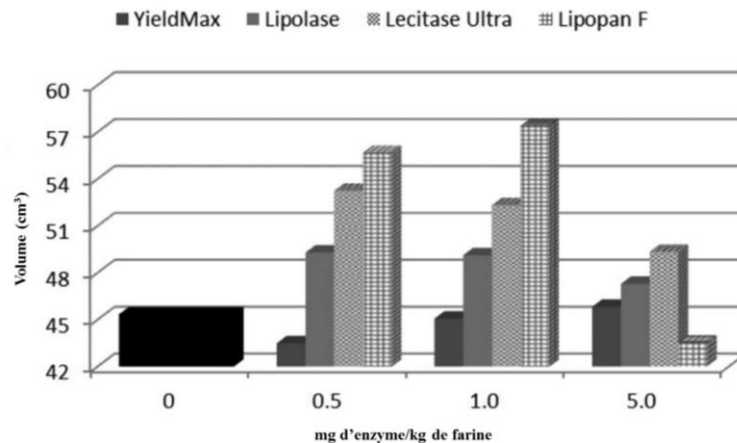


Figure 1.36 : Evolution du volume du pain en faisant varier les enzymes et les teneurs (Gerits, *et al.*, 2014)

Sur l'exemple ci-dessus, qui vise à comparer des volumes de pains, plusieurs choses notables peuvent être mises en avant. Tout d'abord, l'utilisation de lipase augmente significativement le volume du produit par rapport à un produit témoin. Ensuite, la nature de l'enzyme a une influence sur le volume. D'autre part, le dosage même de l'enzyme doit être contrôlé. En effet, pour de faibles teneurs en lipase (0.5 ou 1 mg/kg de farine), l'effet escompté est visible, cependant pour de plus fortes teneurs (5 mg/kg de farine) un effet délétère sur le volume est noté (Figure 1.36). Tout cela illustre donc l'importance de ces paramètres qui doivent être absolument considérés lors de notre approche.

Dans la littérature, nous trouvons également des publications qui comparent l'action des lipases aux émulsifiants classiquement utilisés dans la fabrication des produits alimentaires (Colakoglu & Özkaya, 2012; Gerits, *et al.*, 2014; Guy & Sahi, 2006; Kornbrust, *et al.*, 2012; Rodríguez-García, *et al.*, 2014).

Comme nous venons de le voir, les enzymes, dont les lipases, sont très présentes dans le développement de nombreuses matrices alimentaires. Dans la stratégie que nous envisageons ici, ce sont ces enzymes que nous allons utiliser pour former *in-situ* des MDGs dans le but

d'obtenir des produits « clean-label ». Cette stratégie pourrait à terme éviter l'utilisation d'additifs en fonctionnalisant *in-situ* les ingrédients. C'est donc cette action que nous allons envisager dans les chapitres expérimentaux suivants où les lipases vont venir hydrolyser directement les triglycérides (TGs) d'une huile végétale de colza pour ainsi former *in-situ* des molécules émulsifiantes telles que des DGs, MGs et AGLs.

6. Conclusion

L'étude bibliographique présentée a décrit la réglementation des additifs et des auxiliaires technologiques. Nous avons aussi rappelé les attentes (grandissantes) des consommateurs à l'égard de la disparition de ces additifs et décrit l'émergence de nouvelles notions telles que le « clean-label ».

Nous avons fait un état de l'art sur le principe des systèmes dispersés, des différentes structures associées (émulsions simples, multiples, directes, inverses...) ainsi que les agents stabilisants responsables de leurs stabilités. Plus spécifiquement, nous avons décrit et focalisé notre approche sur l'impact des mono et diglycérides comme additifs. Par différents mécanismes mis en jeu dans les matrices alimentaires, ils apportent des propriétés recherchées que ce soit au cours des procédés de fabrication ou dans la conservation du produit fini. Ces observations nous ont alors permis de mettre en évidence la difficulté liée à leur substitution et donc au défi scientifique que cela représente actuellement. Nous avons également mis en évidence que l'usage des enzymes comme auxiliaires technologiques dans les matrices alimentaires peut être une stratégie qui pourrait, à terme, éviter l'utilisation d'additifs car ils fonctionnalisent des ingrédients couramment utilisés par les transformateurs, sans que leur mention ne soit obligatoire sur l'emballage du produit fini.

7. Références bibliographiques

- Abraham, A.-L. (2008). Caractérisation et analyse évolutive des répétitions intragéniques : une étude au niveau des gènes, des séquences protéiques et des structures tridimensionnelles.
- Albert, C., Beladjine, M., Tsapis, N., Fattal, E., Agnely, F., & Huang, N. (2019). Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release*, 309, 302-332.
- Alexandri, E., Ahmed, R., Siddiqui, H., Choudhary, M. I., Tsiafoulis, C. G., & Gerothanassis, I. P. (2017). High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution. *Molecules*, 22(10).
- Amagliani, L., & Schmitt, C. (2017). Globular plant protein aggregates for stabilization of food foams and emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 248-259.
- Anarjan, N., & Tan, C. (2013). Effects of Selected Polysorbate and Sucrose Ester Emulsifiers on the Physicochemical Properties of Astaxanthin Nanodispersions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18, 768-777.
- Anon. (2009). Appendix A.4 - Additives currently permitted in food within the EU and their associated E numbers. In P. J. Fellows (Ed.), *Food Processing Technology (Third Edition)*, (pp. 857-860): Woodhead Publishing.
- Arntfield, S. D., & Maskus, H. D. (2011). Peas and other legume proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Food Proteins*, (pp. 233-266): Woodhead Publishing.
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Naes, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the "clean-label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*, 99(Pt 1), 58-71.
- Balcaen, M., Steyls, J., Schoeppe, A., Nelis, V., & Van der Meeren, P. (2021). Phosphatidylcholine-depleted lecithin: A clean-label low-HLB emulsifier to replace PGPR in w/o and w/o/w emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 581, 836-846.
- Bancroft, W. D. (1913). The Theory of Emulsification, V. *The Journal of Physical Chemistry*, 17(6), 501-519.
- Barros, M., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2010). Seed lipases: sources, applications and properties - a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27, 15-29.
- Bastida-Rodríguez, J. (2013). The Food Additive Polyglycerol Polyricinoleate (E-476): Structure, Applications, and Production Methods. *ISRN Chemical Engineering*, 2013, 1-21.
- Bella, G., & Rotondo, A. (2020). Theoretical prediction of ¹³C NMR spectrum of mixed triglycerides by mean of GIAO calculations to improve vegetable oils analysis. *Chemistry and Physics of Lipids*, 232, 104973.
- Benejam, W., Steffolani, M. E., & León, A. E. (2009). Use of enzyme to improve the technological quality of a panettone like baked product. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2431-2437.

- Benzonana, G., & Desnuelle, P. (1965). Etude cinetique de l'action de la lipase pancreatique sur des triglycerides en emulsion. Essai d'une enzymologie en milieu heterogene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 105(1), 121-136.
- Bergenståhl, B. (1997). Physicochemical Aspects of an Emulsifier Functionality. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications*, (pp. 147-172). Boston, MA: Springer US.
- Berryman, J. G. (1983). Random close packing of hard spheres and disks. *Physical Review A*, 27(2), 1053-1061.
- Berton-Carabin, C., & Schroën, K. (2015). Pickering Emulsions for Food Applications: Background, Trends, and Challenges. *Annual review of food science and technology*, 6.
- Bertrand, C., Chevallier, F., Lebois, S., Lequippe, S., Majou, D., Mondejar, G., & Prin, A. (2011). *Produits Bio: guide pratique pour la transformation*. Paris.
- Biliaderis, C. G. (1983). Differential scanning calorimetry in food research—A review. *Food Chemistry*, 10(4), 239-265.
- Blazek, J., Gilbert, E. P., & Copeland, L. (2011). Effects of monoglycerides on pasting properties of wheat starch after repeated heating and cooling. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 151-159.
- Bockisch, M. (1998). Chapter 2 - Composition, Structure, Physical Data, and Chemical Reactions of Fats and Oils, Their Derivatives, and Their Associates. In M. Bockisch (Ed.), *Fats and Oils Handbook*, (pp. 53-120): AOCS Press.
- Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M. H., Anton, M., & Leal-Calderon, F. (2009). Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 92-101.
- Bonnet, M., Cansell, M., Placin, F., Anton, M., & Leal-Calderon, F. (2010). Impact of sodium caseinate concentration and location on magnesium release from multiple W/O/W emulsions. *Langmuir*, 26(12), 9250-9260.
- Borel, P., Armand, M., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., & Lairon, D. (1994). Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase in vitro. Effect on pancreatic lipase activity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5(3), 124-133.
- Bos, M., Nylander, T., Arnebrant, T., & Clark, D. C. (1997). Protein/Emulsifier Interactions. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications*, (pp. 95-146). Boston, MA: Springer US.
- Boutonnier, J.-L. (2018). Crèmes glacées, glaces et sorbets : formulation et fabrication. *Techniques de l'ingénieur*.
- Brochette, P. (2013). Émulsification Élaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'ingénieur Cosmétiques : procédés de formulation, base documentaire : TIB634DUO*(ref. article : j2150).
- Brun, M., Delample, M., Harte, E., Lecomte, S., & Leal-Calderon, F. (2015). Stabilization of air bubbles in oil by surfactant crystals: A route to produce air-in-oil foams and air-in-oil-in-water emulsions. *Food Research International*, 67, 366-375.
- Buléon, A., Colonna, P., & Leloup, V. (1990). Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. In).

- Burger, T. G., & Zhang, Y. (2019). Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 25-33.
- Campbell, G. M. (2003). AERATED FOODS. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, (pp. 55-61). Oxford: Academic Press.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399.
- Cauvain, S. P. (2003). CAKES | Nature of Cakes. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, (pp. 751-756). Oxford: Academic Press.
- Cerqueira, M. A., Fasolin, L. H., Picone, C. S. F., Pastrana, L. M., Cunha, R. L., & Vicente, A. A. (2017). Structural and mechanical properties of organogels: Role of oil and gelator molecular structure. *Food Res Int*, 96, 161-170.
- Chazelas, E., Deschasaux, M., Srouf, B., Kesse-Guyot, E., Julia, C., Alles, B., Druet-Pecollo, N., Galan, P., Hercberg, S., Latino-Martel, P., Esseddik, Y., Szabo, F., Slamich, P., Gigandet, S., & Touvier, M. (2020). Food additives: distribution and co-occurrence in 126,000 food products of the French market. *Scientific Reports*, 10(1), 3980.
- Chen, L. (2015). Emulsifiers as food texture modifiers. In J. Chen & A. Rosenthal (Eds.), *Modifying Food Texture*, (pp. 27-49): Woodhead Publishing.
- Cheng, J., Dudu, O. E., Li, X., & Yan, T. (2020). Effect of emulsifier-fat interactions and interfacial competitive adsorption of emulsifiers with proteins on fat crystallization and stability of whipped-frozen emulsions. *Food Hydrocolloids*, 101, 105491.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186.
- Christiansen, K. (2014). PGPR, Polyglycerolpolyricinoleate, E476. In Emulsifiers in Food Technology. In V. Norn (Ed.), *Emulsifiers in Food Technology*, (pp. 209-230).
- Chumpitaz, L. D. A., Coutinho, L. F., & Meirelles, A. J. A. (1999). Surface tension of fatty acids and triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(3), 379-382.
- Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*, 13(1), 24-29.
- Colakoglu, A. S., & Özkaya, H. (2012). Potential use of exogenous lipases for DATEM replacement to modify the rheological and thermal properties of wheat flour dough. *Journal of Cereal Science*, 55(3), 397-404.
- Collados, A., Conversa, V., Fombellida, M., Rozas, S., Kim, J. H., Arboleya, J.-C., Román, M., & Perezábad, L. (2020). Applying food enzymes in the kitchen. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 21, 100212.
- Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*.
- Corma, A., Iborra, S., Miquel, S., & Primo, J. (1998). Catalysts for the Production of Fine Chemicals: Production of Food Emulsifiers, Monoglycerides, by Glycerolysis of Fats with Solid Base Catalysts. *JOURNAL OF CATALYSIS*, 173(2), 315-321.
- Cousin, F., Grillo, I., Jestin, J., & Oberdisse, J. (2010). Une brève introduction à la matière molle.

- Cox, S., Sandall, A., Smith, L., Rossi, M., & Whelan, K. (2020). Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. *Nutrition Reviews*.
- Cropper, S. L., Kocaoglu-Vurma, N. A., Tharp, B. W., & Harper, W. J. (2013). Effects of locust bean gum and mono- and diglyceride concentrations on particle size and melting rates of ice cream. *J Food Sci*, 78(6), C811-816.
- Csáki, F. K., & Sebestyén, É. (2019). Who will carry out the tests that would be necessary for proper safety evaluation of food emulsifiers? *Food Science and Human Wellness*, 8(2), 126-135.
- Dahiya, S., Bajaj, B. K., Kumar, A., Tiwari, S. K., & Singh, B. (2020). A review on biotechnological potential of multifarious enzymes in bread making. *Process Biochemistry*.
- Davies, JT, *A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent*, Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface. Proceedings of the International Congress of Surface Activity (1957): 426-438.
- David, A., David, M., Lesniarek, P., Corfias, E., Pululu, Y., Delample, M. & Snabre, P. (2021), Oleogelation of rapeseed oil with cellulose fibers as an innovative strategy for palm oil substitution in chocolate spreads, *Journal of Food Engineering*, 292, 110315.
- Davidovich-Pinhas, M., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (2015). The gelation of oil using ethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 117, 869-878.
- De Gennes, P. G., & Brochard-Wyart, F. (2005). *Gouttes, bulles, perles et ondes*: Humensis.
- De Luca, M., Rocha-Filho, P., Grossiord, J. L., Rabaron, A., Vaution, C., & Seiller, M. (1991). Les émulsions multiples. *International Journal of Cosmetic Science*, 13(1), 1-21.
- De Reynal, B., & Multon, J.-L. (2009). *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires : à l'exclusion des produits utilisés au niveau de l'agriculture et de l'élevage : pesticides, hormones, etc* (4e édition ed.). Paris: Paris : Éditions Tec & Doc-Lavoisier.
- Delample, M., Da Silva, F., & Leal-Calderon, F. (2014). Osmotically driven gelation in double emulsions. *Food Hydrocolloids*, 38, 11-19.
- Dias, A. N., Cerqueira, M. B. R., Moura, R. R. d., Kurz, M. H. S., Clementin, R. M., D'Oca, M. G. M., & Primel, E. G. (2012). Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography. *Fuel*, 94, 178-183.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids and emulsion stability. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)*, (pp. 23-49): Woodhead Publishing.
- Dickinson, E. (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 130-140.
- Dickinson, E. (2019). Strategies to control and inhibit the flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 96, 209-223.
- Dijkstra, A. J. (2017). About water degumming and the hydration of non-hydratable phosphatides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(9), 1600496.

- Dizlek, H., & Ozer, M. S. (2018). The effects of various ratios of sunflower oil and surfactant on household type cake quality. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 173-181.
- EFSA. (2019). Special Eurobarometer - April 2019 "Food safety in the EU" In E. Union (Ed.), European Union ed., (pp. 104).
- Eliasson, A. C., & Krog, N. (1985). Physical properties of amylose-monoglyceride complexes. *Journal of Cereal Science*, 3(3), 239-248.
- Faergemand, M., & Krog, N. (2005). Interactions of Emulsifiers with Other Components in Foods. In *Ingredient interactions: Effects on food quality*, (pp. 389-422).
- Fameau, A.-L., & Salonen, A. (2014). Effect of particles and aggregated structures on the foam stability and aging. *Comptes Rendus Physique*, 15(8), 748-760.
- Farhoosh, R. (2007). The Effect of Operational Parameters of the Rancimat Method on the Determination of the Oxidative Stability Measures and Shelf-Life Prediction of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(3), 205-209.
- Faustino, M., Veiga, M., Sousa, P., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2019). Agro-Food Byproducts as a New Source of Natural Food Additives. *Molecules*, 24(6), 1056.
- Fénart, É. (2004). Huile de colza et consommation alimentaire. *OCL*, 11(2), 150-152.
- Fernandes, J. L., de Souza, R. O., & de Vasconcellos Azeredo, R. B. (2012). ¹³C NMR quantification of mono and diacylglycerols obtained through the solvent-free lipase-catalyzed esterification of saturated fatty acids. *Magn Reson Chem*, 50(6), 424-428.
- Ferreira Chaves, K., Barrera-Arellano, D., & Ribeiro, A. P. B. (2018). Potential application of lipid organogels for food industry. *Food Research International*, 105, 863-872.
- Fickers, P., Destain, J., & Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12, 119-130.
- Finkle, P., Draper, H. D., & Hildebrand, J. H. (1923). The theory of emulsification. *Journal of the American Chemical Society*, 45(12), 2780-2788.
- Firestone, D., & Yurawecz, M. P. (2002). Peroxide value of oils and fats- official method 985.33. In *Oil and fat*, (pp. 3-69): AOCS International.
- Fredrick, E., Foubert, I., Sype, J., & Dewettinck, K. (2008). Influence of Monoglycerides on the Crystallization Behavior of Palm Oil. *Crystal Growth & Design - CRYST GROWTH DES*, 8.
- Fredrick, E., Walstra, P., & Dewettinck, K. (2010). Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 153(1), 30-42.
- Fregolente, P. B. L., Fregolente, L. V., Pinto, G. M. F., Batistella, B. C., Wolf-Maciel, M. R., & Filho, R. M. (2008). Monoglycerides and Diglycerides Synthesis in a Solvent-Free System by Lipase-Catalyzed Glycerolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146(1), 165-172.
- Fregolente, P. B. L., Pinto, G. M. F., Wolf-Maciel, M. R., & Filho, R. M. (2010). Monoglyceride and diglyceride production through lipase-catalyzed glycerolysis and molecular distillation. *Appl Biochem Biotechnol*, 160(7), 1879-1887.

- Fureby, A. M., Tian, L., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1997). Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(3), 198-206.
- Gargouri, Y., Pieroni, G., Rivière, C., Lowe, P. A., Saunière, J.-F., Sarda, L., & Verger, R. (1986). Importance of human gastric lipase for intestinal lipolysis: an in vitro study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 879(3), 419-423.
- Gassin, P.-M. (2014). Mesure de la tension superficielle par la technique de la goutte pendante. *Bulletin de l'union des physiciens (BUP)*, 963.
- Gelders, G. G., Goesaert, H., & Delcour, J. A. (2005). Potato Phosphorylase Catalyzed Synthesis of Amylose–Lipid Complexes. *Biomacromolecules*, 6(5), 2622-2629.
- Gerits, L. R., Pareyt, B., Decamps, K., & Delcour, J. A. (2014). Lipases and Their Functionality in the Production of Wheat-Based Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 978-989.
- Gerits, L. R., Pareyt, B., Masure, H. G., & Delcour, J. A. (2015). A lipase based approach to understand the role of wheat endogenous lipids in bread crumb firmness evolution during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 874-880.
- Godet, M. C., Tran, V., Colonna, P., Buleon, A., & Pezolet, M. (1995). Inclusion/exclusion of fatty acids in amylose complexes as a function of the fatty acid chain length. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(6), 405-408.
- Goff, H. D. (1997a). Colloidal Aspects of Ice Cream. *International Dairy Journal*.
- Goff, H. D. (1997b). Instability and Partial Coalescence in Whippable Dairy Emulsions. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2620-2630.
- Goff, H. D. (2002). Formation and stabilisation of structure in ice-cream and related products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5), 432-437.
- Goff, H. D. (2008). 65 Years of ice cream science. *International Dairy Journal*, 18(7), 754-758.
- Goff, H. D., & Hartel, R. W. (2013). Mix Ingredients. In *Ice Cream*, (pp. 45-87). Boston, MA: Springer US.
- Goibier, L. (2018). *Techniques de structuration et d'émulsification de la matière grasse laitière*. Université de Bordeaux.
- Goldstein, A., & Seetharaman, K. (2016). Baked Product Staling: Mechanisms, Determinations, and Anti-staling Strategies. In C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman & J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of Food Grains (Second Edition)*, (pp. 403-407). Oxford: Academic Press.
- Grenet, J., & Legendre, B. (2010). Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC). *Techniques de l'ingénieur Méthodes thermiques d'analyse, base documentaire : TIB384DUO*(ref. article : p1205).
- Griffin, W.C. (1949) Classification of Surface-Active Agents by “HLB”. *Journal of Cosmetic Science*, 1, 311-326.
- Gros, A. T., & Feuge, R. O. (1952). Surface and interfacial tensions, viscosities, and other physical properties of some n-aliphatic acids and their methyl and ethyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 29(8), 313-317.

- Guilbot, J. (2006). Importance des corps gras dans le domaine des tensioactifs. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13, 178-186.
- Guillén, M. a. D., & Ruiz, A. (2001). High resolution ^1H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends in Food Science & Technology*, 12(9), 328-338.
- Gunstone, F. D. (1991). ^{13}C -NMR studies of mono-, di-and tri-acylglycerols leading to qualitative and semiquantitative information about mixtures of these glycerol esters. *Chemistry and Physics of Lipids*, 58(3), 219-224.
- Guy, R. C. E., & Sahi, S. S. (2006). Application of a lipase in cake manufacture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(11), 1679-1687.
- Hailing, P. J., & Walstra, P. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(2), 155-203.
- Hasenhuettl, G. (2008a). Overview of Food Emulsifiers. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications*, (pp. 1-9). Boston, MA: Springer US.
- Hasenhuettl, G. (2008b). Synthesis and Commercial Preparation of Food Emulsifiers. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition*, (pp. 11-37). New York, NY: Springer New York.
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1), 155-170.
- Hussein, L., Mohammad, M., Abouelhassan, A., Grzeskiewicz, S., & Cantellops, D. (2001). Assessment of the fatty acid patterns in vegetable oils, fats and fat-rich foods commonly consumed in Egypt. *Grasas y Aceites*, 52.
- Hutin, A. (2019). *Les Tensioactifs*.
- Hwang, H.-S. (2020). A critical review on structures, health effects, oxidative stability, and sensory properties of oleogels. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101657.
- Inoue, S., Tugita, K., Koike, S., Suzuki, K., & Kamoi, I. (1996). Effects of Monoglyceride Fatty Acid Species on the Properties of Dough Protein. *Food Science and Technology International, Tokyo*, 2(2), 97-102.
- Israelachvili, J. N. (1994). The science and applications of emulsions — an overview. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91, 1-8.
- Jarroux, N. (2008). Les biopolymères : différentes familles, propriétés et applications. *Techniques de l'ingénieur Innovations en matériaux avancés, base documentaire : TIB186DUO*(ref. article : am3580).
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23-34.
- Jensen, R. G., deJong, F. A., & Clark, R. M. (1983). Determination of lipase specificity. *Lipids*, 18(3), 239-252.
- Ji, S., & Walz, J. Y. (2015). Depletion forces and flocculation with surfactants, polymers and particles — Synergistic effects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 20(1), 39-45.

- Jiang, J., Jin, Y., Liang, X., Piatko, M., Campbell, S., Lo, S. K., & Liu, Y. (2018). Synergetic interfacial adsorption of protein and low-molecular-weight emulsifiers in aerated emulsions. *Food Hydrocolloids*, 81, 15-22.
- Jiang, Y., Liu, L., Wang, B., Sui, X., Zhong, Y., Zhang, L., Mao, Z., & Xu, H. (2018). Cellulose-rich oleogels prepared with an emulsion-templated approach. *Food Hydrocolloids*, 77, 460-464.
- Jie, M. S., & Mustafa, J. (1997). High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy--applications to fatty acids and triacylglycerols. *Lipids*, 32(10), 1019-1034.
- Jorge, E., Lopez-Valeiras, E., & Gonzalez-Sanchez, M. B. (2020). The Importance Given to Food Naturalness Attributes by Millennial University Students. *Sustainability*, 12(2), 728.
- Joseph, C., Harscoat-Schiavo, C., Savoie, R., Pintori, D., Monteil, J., Faure, C., & Leal-Calderon, F. (2019a). Redispersible dry emulsions stabilized by plant material: Rapeseed press-cake or cocoa powder. *LWT*, 113, 108311.
- Joseph, C., Savoie, R., Harscoat-Schiavo, C., Pintori, D., Monteil, J., Leal-Calderon, F., & Faure, C. (2019b). O/W Pickering emulsions stabilized by cocoa powder: Role of the emulsification process and of composition parameters. *Food Research International*, 116, 755-766.
- Kabalnov, A. (2001). Ostwald Ripening and Related Phenomena. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 22(1), 1-12.
- Kako, M., & Kondo, S. (1979). The stability of soybean oil-water emulsions containing mono- and diglycerides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 69(1), 163-169.
- Kamel, B. S. (1991). Emulsifiers. In J. Smith (Ed.), *Food Additive User's Handbook*, (pp. 169-201). Boston, MA: Springer US.
- Kamel, B. S., & Ponte, J. G. (1993). Emulsifiers in baking. In B. S. Kamel & C. E. Stauffer (Eds.), *Advances in Baking Technology*, (pp. 179-222). Boston, MA: Springer US.
- Kantekin-Erdogan, M. N., Ketenoglu, O., & Tekin, A. (2019). Effect of monoglyceride content on emulsion stability and rheology of mayonnaise. *Journal of Food Science and Technology*, 56(1), 443-450.
- Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.
- Karkalas, J., Ma, S., Morrison, W. R., & Pethrick, R. A. (1995). Some factors determining the thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids. *Carbohydrate Research*, 268(2), 233-247.
- Kayacier, A., & Singh, R. K. (2003). Effect of mono-and diglyceride addition on baked tortilla chipas and their storage properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27(1), 1-8.
- Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7(3), 219-280.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Koksel, F., & Scanlon, M. G. (2018). Investigation of the influence of bakery enzymes on non-yeasted dough properties during mixing. *Journal of Cereal Science*, 79, 86-92.

- Konuskan, D. B., Arslan, M., & Oksuz, A. (2019). Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 340-344.
- Kornbrust, B. A., Forman, T., & Matveeva, I. (2012). Applications of enzymes in breadmaking. In *Breadmaking*, (pp. 470-498).
- Kostik, V., Memeti, S., & Bauer, B. (2013). Fatty acid composition of edible oils and fats. *J. Hyg. Eng. Des.*, 4, 112-116.
- Krstonošić, V. S., Kalić, M. D., Dapčević-Hadnađev, T. R., Lončarević, I. S., & Hadnađev, M. S. (2020). Physico-chemical characterization of protein stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 125045.
- Kumar, A., Sharma, A., & C. Upadhyaya, K. (2016). Vegetable Oil: Nutritional and Industrial Perspective. *Current Genomics*, 17(3), 230-240.
- Laguerre, M., Nlandu Mputu, M., Briys, B., Lopez, M., Villeneuve, P., & Dubreucq, E. (2017). Regioselectivity and fatty acid specificity of crude lipase extracts from *Pseudozyma tsukubaensis*, *Geotrichum candidum*, and *Candida rugosa*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(8), 1600302.
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975-984.
- Landgraf, F. (2002). Produits et procédés de panification. *Techniques de l'ingénieur Filière de production : produits d'origine végétale, base documentaire : TIB433DUO*(ref. article : f6180).
- Langevin, D. (2017). Aqueous foams and foam films stabilised by surfactants. Gravity-free studies. *Comptes Rendus Mécanique*, 345(1), 47-55.
- Langevin, D. (2019). Coalescence in foams and emulsions: Similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 44, 23-31.
- Larpent, C. (1995). Tensioactifs. *Techniques de l'ingénieur Constantes chimiques des solvants et produits, base documentaire : TIB337DUO*(ref. article : k342).
- Le Neindre, B. (1993). Tensions superficielles et interfaciales. *Techniques de l'ingénieur Constantes mécaniques et viscosité, base documentaire : TIB339DUO*(ref. article : k475).
- Leal-Calderon, F., Bibette, J., & Schmitt, V. (2007). Double Emulsions. In *Emulsion Science: Basic Principles*, (pp. 173-199). New York, NY: Springer New York.
- Leal-Calderon, F., Homer, S., Goh, A., & Lundin, L. (2012). W/O/W emulsions with high internal droplet volume fraction. *Food hydrocolloids.*, 27(1), 30-41.
- Leal-Calderon, F., Mondain-Monval, O., Pays, K., Royer, N., & Bibette, J. (1997). Water-in-Oil Emulsions: Role of the Solvent Molecular Size on Droplet Interactions. *Langmuir*, 13(26), 7008-7011.
- Leal-Calderon, F., & Schmitt, V. (2008). Solid-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 217-227.
- Leal-Calderon, F., Thivilliers, F., & Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4-5), 206-212.

- Lee, S.-M., Wagh, A., Sandhu, G., & Walsh, M. (2018). Emulsification Properties of Lactose Fatty Acid Esters. *Food and Nutrition Sciences*, 09, 1341-1357.
- Leser, M. E., Sagalowicz, L., Michel, M., & Watzke, H. J. (2006). Self-assembly of polar food lipids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126, 125-136.
- Levy, G. C., & Cargioli, J. D. (1973). Spin-lattice relaxation in solutions containing Cr(III) paramagnetic relaxation agents. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 10(2), 231-234.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2, e201209017-e201209017.
- Linko, Y.-Y., Javanainen, P., & Linko, S. (1997). Biotechnology of bread baking. *Trends in Food Science & Technology*, 8(10), 339-344.
- Loi, M., Eyres, G., & Birch, E. (2018). Protein-Stabilised Emulsions. In, (pp. 404-409).
- Loi, M., Eyres, G., & Birch, E. (2019). Effect of mono- and diglycerides on physical properties and stability of a protein-stabilised oil-in-water emulsion. *Journal of Food Engineering*, 240, 56-64.
- Mabille, C., Schmitt, V., Gorria, P., Leal Calderon, F., Faye, V., Deminière, B., & Bibette, J. (2000). Rheological and Shearing Conditions for the Preparation of Monodisperse Emulsions. *Langmuir*, 16(2), 422-429.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Camerin, M., Pizzale, L., & Nicoli, M. C. (2014). Prediction of firmness and physical stability of low-fat chocolate spreads. *Journal of Food Engineering*, 126, 120-125.
- Martins, L., F. C. O., Sentanin, M. A., & De Souza, D. (2019). Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chemistry*, 272, 732-750.
- Martins, A. J., Vicente, A. A., Cunha, R. L., & Cerqueira, M. A. (2018). Edible oleogels: an opportunity for fat replacement in foods. *Food Funct*, 9(2), 758-773.
- Matignon, A., & Tecante, A. (2017). Starch retrogradation: From starch components to cereal products. *Food Hydrocolloids*, 68, 43-52.
- McClements, D. J. (2006). *Food emulsions: principes, practices and techniques* (Vol. 20). Boca Raton: CRC Press.
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers - Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Adv Colloid Interface Sci*, 234, 3-26.
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Adv Colloid Interface Sci*, 251, 55-79.
- Melis, S., Meza Morales, W. R., & Delcour, J. A. (2019). Lipases in wheat flour bread making: Importance of an appropriate balance between wheat endogenous lipids and their enzymatically released hydrolysis products. *Food Chemistry*, 298, 125002.
- Merachli, F., Devienne, J., Delmas, R., Plawinski, L., Leal-Calderon, F., & Delample, M. (2020). Impact of cocoa fibers on the stability and rheological properties of chocolate ganaches. *LWT*, 110505.
- Mezzenga, R. (2011). 12 - Protein-templated Oil Gels and Powders. In A. G. Marangoni & N. Garti (Eds.), *Edible Oleogels*, (pp. 271-293): AOCS Press.

- Mezzenga, R., Folmer, B. M., & Hughes, E. (2004). Design of Double Emulsions by Osmotic Pressure Tailoring. *Langmuir*, 20(9), 3574-3582.
- Miller, R. (2016). Emulsifiers: Types and Uses. In B. Caballero, P. M. Finglas & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, (pp. 498-502). Oxford: Academic Press.
- Monakhova, Y. B., & Diehl, B. W. K. (2016). Quantitative Analysis of Sunflower Lecithin Adulteration with Soy Species by NMR Spectroscopy and PLS Regression. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(1), 27-36.
- Monakhova, Y. B., & Diehl, B. W. K. (2018). Automated multicomponent phospholipid analysis using ³¹P NMR spectroscopy: example of vegetable lecithin and krill oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(30), 7891-7900.
- Moran-Valero, M. I., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., & Pilosof, A. M. R. (2017). Synergistic performance of lecithin and glycerol monostearate in oil/water emulsions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 151, 68-75.
- Munk, M. B., Larsen, F. H., van den Berg, F. W. J., Knudsen, J. C., & Andersen, M. L. (2014). Competitive Displacement of Sodium Caseinate by Low-Molecular-Weight Emulsifiers and the Effects on Emulsion Texture and Rheology. *Langmuir*, 30(29), 8687-8696.
- Murray, B. S. (2020). Recent developments in food foams. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 50, 101394.
- Ng, S. (2000). Quantitative analysis of partial acylglycerols and free fatty acids in palm oil by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(7), 749-755.
- Nicholson, R. A., & Marangoni, A. G. (2019). Diglycerides. In *Encyclopedia of Food Chemistry*, (pp. 70-73).
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2014). A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. *Food Research International*, 66, 379-387.
- Nylander, T., Arnebrant, T., Cárdenas, M., Bos, M., & Wilde, P. (2008). Protein/Emulsifier Interactions. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications*, (pp. 101-192). Cham: Springer International Publishing.
- Obiro, W. C., Sinha Ray, S., & Emmambux, M. N. (2012). V-amylose Structural Characteristics, Methods of Preparation, Significance, and Potential Applications. *Food Reviews International*, 28(4), 412-438.
- Okuro, P. K., Gomes, A., Costa, A. L. R., Adame, M. A., & Cunha, R. L. (2019). Formation and stability of W/O-high internal phase emulsions (HIPEs) and derived O/W emulsions stabilized by PGPR and lecithin. *Food Res Int*, 122, 252-262.
- Ooms, N., & Delcour, J. A. (2019). How to impact gluten protein network formation during wheat flour dough making. *Current Opinion in Food Science*, 25, 88-97.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R., & Mlcek, J. (2015). Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12871-12890.
- Orthoefer, F. (2008). Applications of Emulsifiers in Baked Foods. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition*, (pp. 263-284). New York, NY: Springer New York.

- Osborn, S. (2015). 12 - Labelling relating to natural ingredients and additives. In P. Berryman (Ed.), *Advances in Food and Beverage Labelling*, (pp. 207-221). Oxford: Woodhead Publishing.
- Osman, E. M., Leith, S. J., & Fles, M. (1961). Complexes of amylose with surfactants. *Cereal Chem.*, 38, 449-454.
- Pal, R. (1993). Rheological behaviour of surfactant-flocculated water-in-oil emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 71(2), 173-185.
- Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A., & Delcour, J. A. (2011). Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 266-279.
- Pasquali, R. C., Taurozzi, M. P., & Bregni, C. (2008). Some considerations about the hydrophilic–lipophilic balance system. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1), 44-51.
- Patel, A., Nicholson, R., & Marangoni, A. (2020). Applications of Fat mimetics for the replacement of saturated and hydrogenated fat in food products. *Current Opinion in Food Science*, 33.
- Patel, A. R., & Dewettinck, K. (2016). Edible oil structuring: an overview and recent updates. *Food & Function*, 7(1), 20-29.
- Pehlivanoglu, H., Demirci, M., Toker, O. S., Konar, N., Karasu, S., & Sagdic, O. (2018). Oleogels, a promising structured oil for decreasing saturated fatty acid concentrations: Production and food-based applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(8), 1330-1341.
- Pérez-Gago, M., & Krochta, J. (1999). Water Vapor Permeability of Whey Protein Emulsion Films as Affected by pH. *Journal of food science*, 64, 695-698.
- Petrut, R. F., Danthine, S., & Blecker, C. (2016). Assessment of partial coalescence in whippable oil-in-water food emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 229, 25-33.
- Pickering, S. U. (1907). CXCVI.—Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 91(0), 2001-2021.
- Plank, C., & Lorbeer, E. (1995). Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 697(1), 461-468.
- Plou, F. J., Barandiarán, M., Calvo, M. V., Ballesteros, A., & Pastor, E. (1996). High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(1), 66-71.
- Pomeranz, Y., & Chung, O. K. (1978). Interaction of lipids with proteins and carbohydrates in breadmaking. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(2), 285-289.
- Princen, H. M. (1983). Rheology of foams and highly concentrated emulsions: I. Elastic properties and yield stress of a cylindrical model system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 91(1), 160-175.
- Putseys, J. A., Lamberts, L., & Delcour, J. A. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 238-247.

- Radin, C. (2008). Random Close Packing of Granular Matter. *Journal of Statistical Physics*, 131(4), 567-573.
- Ramsden, W., & Gotch, F. (1904). Separation of solids in the surface-layers of solutions and suspensions. *Proceedings of the Royal Society of London*, 72(477-486), 156-164.
- Reed, G. (1975). CHAPTER 3 - General Characteristics of Enzymes. In G. Reed (Ed.), *Enzymes in Food Processing (Second Edition)*, (pp. 15-29): Academic Press.
- Ricca, E., Brucher, B., & Schrittwieser, J. H. (2011). Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(13), 2239-2262.
- Riisom, T., Krog, N., & Eriksen, J. (1984). Amylose complexing capacities of cis- and trans-unsaturated monoglycerides in relation to their functionality in bread. *Journal of Cereal Science*, 2(2), 105-118.
- Robert, C., Couedelo, L., Vaysse, C., & Michalski, M. C. (2020). Vegetable lecithins: A review of their compositional diversity, impact on lipid metabolism and potential in cardiometabolic disease prevention. *Biochimie*, 169, 121-132.
- Rodríguez-García, J., Sahi, S. S., & Hernando, I. (2014). Functionality of lipase and emulsifiers in low-fat cakes with inulin. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 173-182.
- Román, S., Sánchez-Siles, L. M., & Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 44-57.
- Sahi, S. S. (2003). The Interfacial Properties of the Aqueous Phases of Full Recipe Bread Doughs. *Journal of Cereal Science*, 37(2), 205-214.
- Saint-Jalmes, A. (2006). Physical chemistry in foam drainage and coarsening. *Soft Matter*, 2(10), 836-849.
- Salager, J.-L., & Choplin, L. (2008). Mousses Formation, formulation et propriétés. *Techniques de l'ingénieur Cosmétiques : procédés de formulation, base documentaire : TIB634DUO*(ref. article : j2200).
- Saltmarsh, M. (2021). Chapter 1 Food Additives and Why They Are Used. In *Saltmarsh's Essential Guide to Food Additives* (5), (pp. 1-9): The Royal Society of Chemistry.
- Sapei, L., Naqvi, M. A., & Rousseau, D. (2012). Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 316-323.
- Sarda, L., & Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et biophysica ACTA*, 30(3), 513-521.
- Saurel, R. (2020). Protéines de pois : structure, extraction et fonctionnalités. (ref. article : f6040).
- Schaich, K. M. (2020). Lipid Oxidation: New Perspectives on an Old Reaction. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, (pp. 1-72).
- Scholten, E. (2019). Edible oleogels: how suitable are proteins as a structurant? *Current Opinion in Food Science*, 27, 36-42.
- Schorsch, C. (2007). Formulation des mousses laitières. *Techniques de l'ingénieur Élaboration des formulations, base documentaire : TIB335DUO*(ref. article : j2268).

- Schramm, L. L., & Wassmuth, F. (1994). Foams: Basic Principles. In *Foams: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*, vol. 242 (pp. 3-45): American Chemical Society.
- Scott, G. D. (1960). Packing of Spheres: Packing of Equal Spheres. *Nature*, 188(4754), 908-909.
- Scott, G. D., & Kilgour, D. M. (1969). The density of random close packing of spheres. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2(6), 863-866.
- Sek, L., Porter, C. J. H., & Charman, W. N. (2001). Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(3), 651-661.
- Seo, T.-R., Kim, J.-Y., & Lim, S.-T. (2015). Preparation and characterization of crystalline complexes between amylose and C18 fatty acids. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 889-897.
- Serdaroglu, M., Öztürk Kerimoğlu, B., & Kara, A. (2015). An Overview of Food Emulsions: Description, Classification and Recent Potential Applications. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3, 430-438.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662.
- Shimada, A., & Ohashi, K. (2003). Interfacial and Emulsifying Properties of Diacylglycerol. *Food Science and Technology Research*, 9(2), 142-147.
- Sillero, A., & Ribeiro, J. M. (1989). Isoelectric points of proteins: Theoretical determination. *Analytical Biochemistry*, 179(2), 319-325.
- Singh, A., Auzanneau, F. I., & Rogers, M. A. (2017). Advances in edible oleogel technologies – A decade in review. *Food Research International*, 97, 307-317.
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2), 486-520.
- Sofian-Seng, N.-S., Golding, M., Goh, K., Janssen, P., & Lee, S. J. (2017). In Situ Enzymatic Synthesis of Polar Lipid Emulsifiers in the Preparation and Stabilisation of Aerated Food Emulsions. *Food Biophysics*, 12(3), 323-338.
- Stampfli, L., & Nersten, B. (1995). Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry*, 52(4), 353-360.
- Staubmann, R., Ncube, I., Gübitz, G. M., Steiner, W., & Read, J. S. (1999). Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. *Journal of Biotechnology*, 75(2), 117-126.
- Stolyhwo, A., Colin, H., & Guiochon, G. (1985). Analysis of triglycerides in oils and fats by liquid chromatography with the laser light scattering detector. *Analytical chemistry*, 57(7), 1342-1354.
- Sun, N., Chen, J., Wang, D., & Lin, S. (2018). Advance in food-derived phospholipids: Sources, molecular species and structure as well as their biological activities. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 199-211.
- Tavernier, I., Moens, K., Heyman, B., Danthine, S., & Dewettinck, K. (2019). Relating crystallization behavior of monoacylglycerols-diacylglycerol mixtures to the strength of their crystalline network in oil. *Food Res Int*, 120, 504-513.

- Tebben, L., Shen, Y., & Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 10-24.
- Tharwat, F. T. (2016). *Emulsions : Formation, Stability, Industrial Applications*: De Gruyter.
- Thomas, A., Matthäus, B., & Fiebig, H.-J. (2015). Fats and Fatty Oils. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (pp. 1-84): Wiley - VCH.
- Thomas, K., Artz, W., & Mahungu, S. (2003). EMULSIFIERS | Organic Emulsifiers. In, (pp. 2070-2077).
- Tufvesson, F., Wahlgren, M., & Eliasson, A.-C. (2003a). Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 2. Fatty Acids. *Starch - Stärke*, 55(3-4), 138-149.
- Tufvesson, F., Wahlgren, M., & Eliasson, A.-C. (2003b). Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 1. Monoglycerides. *Starch - Stärke*, 55, 61-71.
- Ursica, L., Tita, D., Palici, I., Tita, B., & Vlaia, V. (2005). Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsions. *J Pharm Biomed Anal*, 37(5), 931-936.
- van Aken, G. A., Vingerhods, M. H., & de Wijk, R. A. (2011). Textural perception of liquid emulsions: Role of oil content, oil viscosity and emulsion viscosity. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 789-796.
- van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 472-486.
- van Oort, M. (2010). Enzymes in Food Technology – Introduction. In Wiley-Blackwell (Ed.), *Enzymes in Food Technology, second edition*, (pp. 1-17). Iowa.
- Vignati, E., Piazza, R., & Lockhart, T. P. (2003). Pickering Emulsions: Interfacial Tension, Colloidal Layer Morphology, and Trapped-Particle Motion. *Langmuir*, 19 (17), 6650-6656.
- Villas-Boas, F., Yamauti, Y., Moretti, M. M. S., & Franco, C. M. L. (2019). Influence of molecular structure on the susceptibility of starch to alpha-amylase. *Carbohydr Res*, 479, 23-30.
- Vlahov, G. (1999). Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 35(4), 341-357.
- Volkert, M., & Serrur, M. (2020). Chapter 12 - Future outlooks. In S. Braun, C. Zübert, D. Argyropoulos & F. J. Casado Hebrard (Eds.), *Nutritional and Health Aspects of Food in Western Europe*, (pp. 239-247): Academic Press.
- Walsh, C. T., & Moore, B. S. (2019). Enzymatic Cascade Reactions in Biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(21), 6846-6879.
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568-585.
- Weyland, M., & Hartel, R. W. (2008). Emulsifiers in Confectionery. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition*, (pp. 285-305). New York, NY: Springer New York.

- Whitaker, J. R. (1995). Polyphenol Oxidase. In *Food Enzymes: Structure and Mechanism*, (pp. 271-307). Boston, MA: Springer US.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115-119.
- Winter, W. T., & Sarko, A. (1974). Crystal and molecular structure of V-anhydrous amylose. *Biopolymers*, 13(7), 1447-1460.
- Wong, D. W. S. (1995). Lipolytic Enzymes. In *Food Enzymes: Structure and Mechanism*, (pp. 170-211). Boston, MA: Springer US.
- Xing, C., Yuan, X., Wu, X., Shao, X., Yuan, J., & Yan, W. (2019). Chemometric classification and quantification of sesame oil adulterated with other vegetable oils based on fatty acids composition by gas chromatography. *LWT - Food Science and Technology*, 108, 437-445.
- Yamashita, S., Matsumiya, K., Kogo, Y., Takamatsu, K., & Matsumura, Y. (2020). Emulsifiers efficiently prevent hardening of pancakes under refrigerated conditions via inclusion complexes with starch molecules. *Food Hydrocolloids*, 100, 105432.
- Zaks, A., Iyengar, R., & Gross, A. (1989). Lipase-catalyzed in situ generation of mono- and di-glycerides. In): ENZYTECH, INC.
- Zembyla, M., Murray, B. S., & Sarkar, A. (2020). Water-in-oil emulsions stabilized by surfactants, biopolymers and/or particles: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 49-59.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., & Blanchard, C. (2007). Effect of the addition of fatty acids on rice starch properties. *Food Research International*, 40(2), 209-214.

Chapitre 2 :

Caractérisation des MDGs et des huiles végétales

Tables des matières

1. Introduction.....	99
2. Caractérisations des MDGs	100
2.1. RMN	100
2.1.1. Intérêt de la méthodologie	100
2.1.2. RMN ^1H d'un mélange de MDGs.....	101
2.1.3. RMN des standards.....	102
2.1.3.a. Déplacements chimiques en RMN ^1H	102
2.1.3.b. Déplacements chimiques en RMN ^{13}C	104
2.1.3.c. RMN 2D	106
2.1.4. Attribution des signaux des MDGs commerciaux en RMN ^1H	108
2.2. Identification des molécules des MDGs commerciaux	109
3. Caractérisations des huiles végétales de colza et de tournesol.....	112
3.1. RMN	112
3.1.1. RMN ^1H	112
3.1.2. RMN ^{13}C	113
3.1.3. Analyse des huiles par RMN ^{13}C	116
3.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	117
3.3. Tension de surface	122
3.4. DSC.....	125
4. Conclusion	127
5. Partie expérimentale	128
5.1. Liste des produits utilisés	128
5.2. Identifications des standards par RMN.....	128
5.3. Analyses de la composition en acide gras de l'huile par CPG	132
5.4. Tension de surface.....	132
5.5. DSC.....	132
6. Références bibliographiques	134

1. Introduction

Les mono et diglycérides (MDGs) sont des additifs souvent présents dans les matrices alimentaires et utilisés pour les nombreux avantages qu'ils apportent tant au niveau de la stabilisation des produits au cours de la fabrication qu'au niveau de la conservation des matrices alimentaires. En revanche, leurs compositions et leurs teneurs restent souvent imprécises voire inconnues. Les seules fiches techniques provenant des fournisseurs et accessibles aux utilisateurs, ne détaillent pas de façon précise les ratios en MGs et DGs, leurs stéréochimies et leurs longueurs de chaînes.

Le but de ce chapitre est de présenter la méthodologie mise en place pour l'étude et la caractérisation des MDGs. Nous étendrons cette démarche aux huiles végétales ; c'est sur ces substrats que notre stratégie de substitution d'additifs se positionne. En effet, les MDGs ont des structures moléculaires très proches, complexifiant ainsi la caractérisation de ces produits. Afin de mieux connaître la composition moléculaire de ces mélanges, ainsi que leur proportion lorsqu'ils sont inclus dans des huiles végétales, nous avons utilisé différentes techniques et approches analytiques.

Dans une première partie, des molécules modèles (standards) seront caractérisées. Les standards utilisés seront des AGs (acides gras), MGs (monoglycérides), DGs (diglycérides) et TGs (triglycérides) et auront des longueurs de chaîne en C16. La principale méthode de caractérisation utilisée sera la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Différentes expériences 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMBC et ^1H - ^{13}C HSQC) seront effectuées pour permettre une attribution de l'ensemble des signaux de ces composés. Cette technique analytique sera également utilisée pour déterminer la teneur de chacune des espèces dans nos mélanges. Les TGs, AGLs ou MDGs, se composent de chaînes d'acides gras de longueurs et de nombres d'insaturations variables. La RMN ne permettant pas d'avoir cette information, des analyses par chromatographie en phase gazeuse (CPG) seront réalisées.

Dans la seconde partie, nous nous focaliserons sur la caractérisation des huiles végétales de colza et de tournesol à l'aide d'analyses RMN et CPG. Nous étudierons également leurs propriétés avec des mesures de tension de surface et de calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

2. Caractérisations des MDGs

2.1. RMN

2.1.1. Intérêt de la méthodologie

La RMN est une technique analytique souvent employée dans la détermination de la structure de composés chimiques. Elle consiste à analyser le comportement des noyaux lorsqu'ils sont soumis à l'effet d'un champ magnétique intense. Elle est également très utile pour connaître la composition d'un mélange et pour quantifier ses constituants. Dans notre cas, nous nous intéresserons à la caractérisation par RMN de produits présents dans les milieux lipophiles comme les TGs, les DGs, les MGs et les AGLs.

La RMN ^1H a déjà été appliquée avec succès dans le cas des corps gras, notamment dans des huiles végétales. Certains auteurs ont ainsi pu identifier la présence de 1,2-DGs, 1,3-DGs, 1-MGs et 2-MGs dans de l'huile végétale d'olive (Guillén & Ruiz, 2001). Toutefois, pour arriver à déterminer la teneur de ces molécules, le recours à des calculs, souvent complexes est nécessaire (Nieva-Echevarría, *et al.*, 2014). En effet, la faible largeur spectrale en RMN ^1H (10 ppm) entraîne souvent une superposition des signaux sur le spectre, surtout pour des molécules aux structures assez proches.

Une alternative est l'utilisation de la RMN ^{13}C . Moins sensible que la RMN ^1H , elle peut cependant amener de précieuses informations dans le cas de nos molécules d'intérêt. Par exemple, la largeur spectrale plus importante (autour de 200 ppm) limite la possibilité de recouvrement. Les signaux spécifiques de chaque molécule dans un mélange pourront alors être plus facilement identifiés. Il sera également possible de déterminer la présence d'insaturations sur les chaînes aliphatiques au sein de ces molécules (Jie & Mustafa, 1997). Il sera donc aisé par cette méthode de déterminer la présence de TGs, DGs, MGs et AGLs dans des milieux complexes, mais également de faire de la quantification (Gunstone, 1991). Toutefois, les temps de relaxation des carbones étant assez longs, il est souvent nécessaire d'avoir recours à des agents relaxants pour permettre d'accélérer le retour à l'équilibre des atomes étudiés afin de diminuer le temps d'analyse (Levy & Cargioli, 1973).

Les expériences 2D sont principalement utilisées pour faire une attribution sans ambiguïté du squelette glycérol récurrent sur l'ensemble de ces molécules. Une attribution de l'ensemble des signaux de toutes les chaînes aliphatiques peut être envisagée et cela malgré la faible dispersion des déplacements chimiques des carbones et protons des chaînes carbonées (Alexandri, *et al.*, 2017; Bella & Rotondo, 2020).

2.1.2. RMN ^1H d'un mélange de MDGs

Les MDGs commerciaux utilisés dans la fabrication de produits agroalimentaires sont des mélanges avec des proportions variables de MGs et DGs. Un spectre RMN ^1H de l'un de ces mélanges montre la présence de très nombreux signaux (Figure 2.1). Une attribution sans ambiguïté est assez délicate sur ce spectre, même en utilisant les données de la littérature. On peut cependant localiser des régions spécifiques des MDGs, entre 1 et 2,5 ppm, très intenses pour les chaînes aliphatiques de tous les acides gras et autour de 4 et de 5 ppm pour les CH_2 et les CH de la chaîne du glycérol. Cette région riche en signaux dénote la présence de plusieurs molécules de structure voisine.

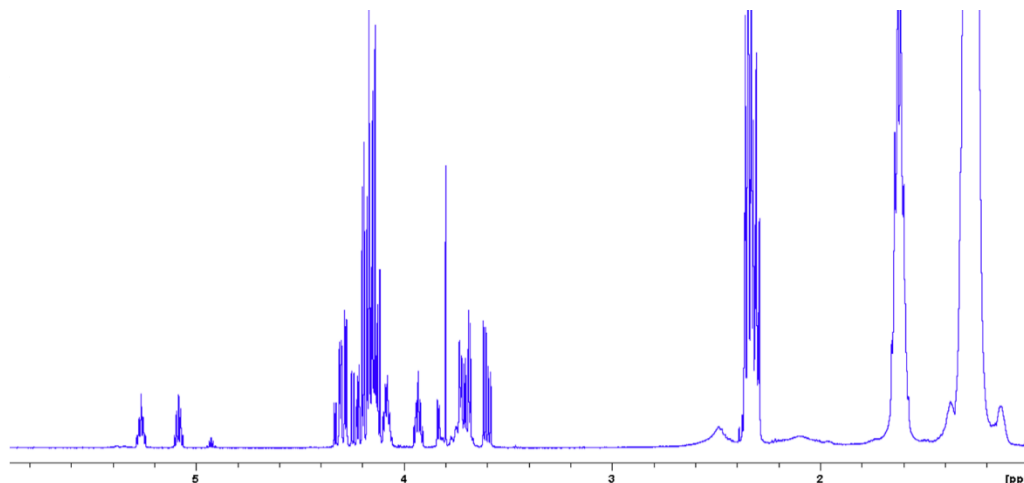


Figure 2.1 : Spectre RMN ^1H d'un MDG commercial (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Afin de faciliter l'attribution des différents signaux et d'envisager la quantification de l'ensemble des molécules présentes dans ces mélanges, nous avons réalisé des analyses sur une série de standards dont la composition moléculaire est connue.

2.1.3. RMN des standards

Les standards utilisés, l'acide palmitique (AGLs), α -monopalmitine (1-MGs), 2-palmitoylglycerol (2-MGs), 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (1,2-DGs), glyceryl-1,3-dipalmitate (1,3-DGs) et glyceryl tripalmitate (TGs), sont saturés et possèdent des longueurs de chaînes aliphatiques identiques (chaînes en C16) (Figure 2.2). Afin de simplifier l'identification, dans l'ensemble du chapitre, ces molécules seront notées : AGLs, 1-MGs, 2-MGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs et TGs.

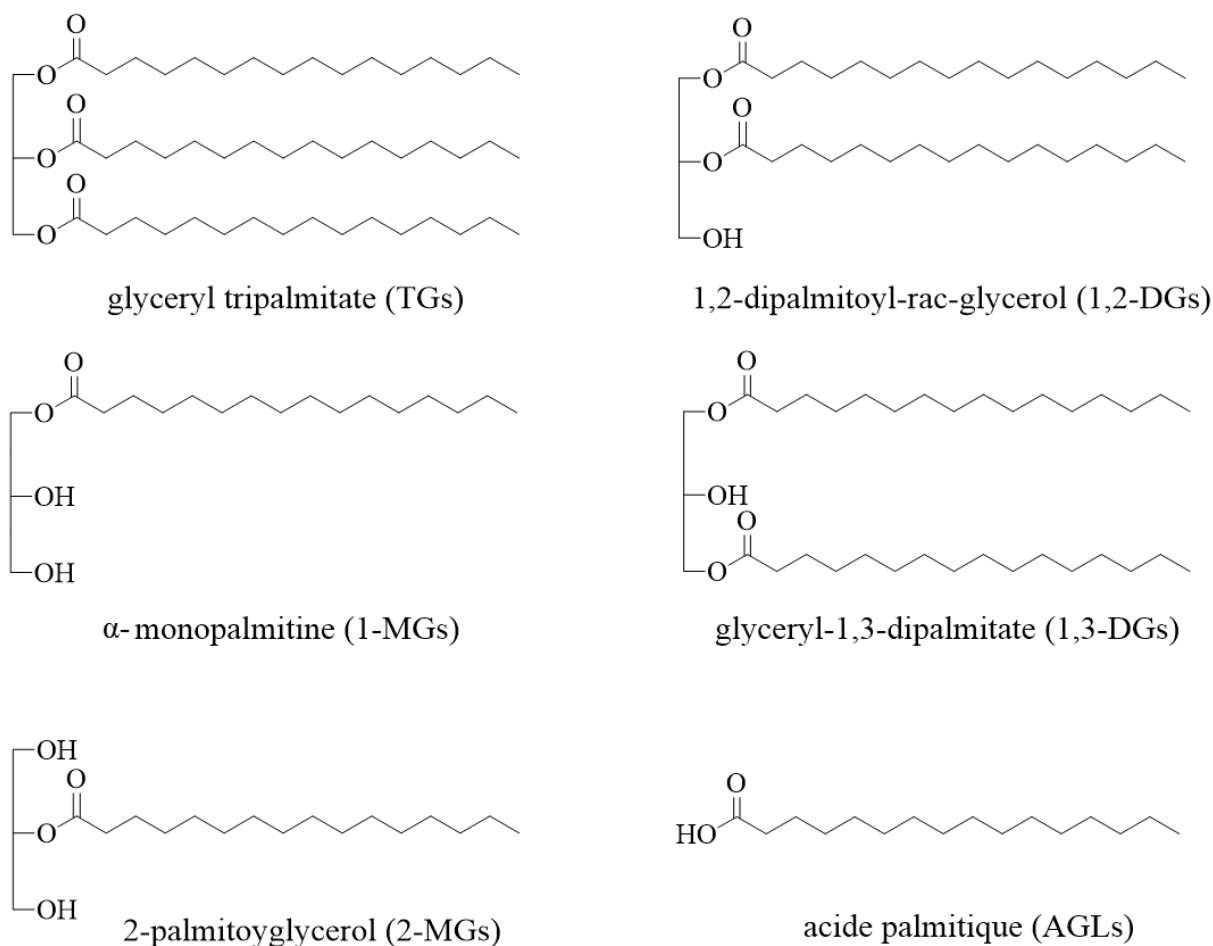


Figure 2.2 : Molécules standards utilisées pour l'identification des signaux par RMN ^1H et ^{13}C .

2.1.3.a. Déplacements chimiques en RMN ^1H

Nous avons dans un premier temps, réalisé les analyses par RMN ^1H de chacun des standards. La Figure 2.3 présente la superposition de ces composés où l'on peut distinguer des régions très similaires en déplacements chimiques mais également des régions spécifiques.

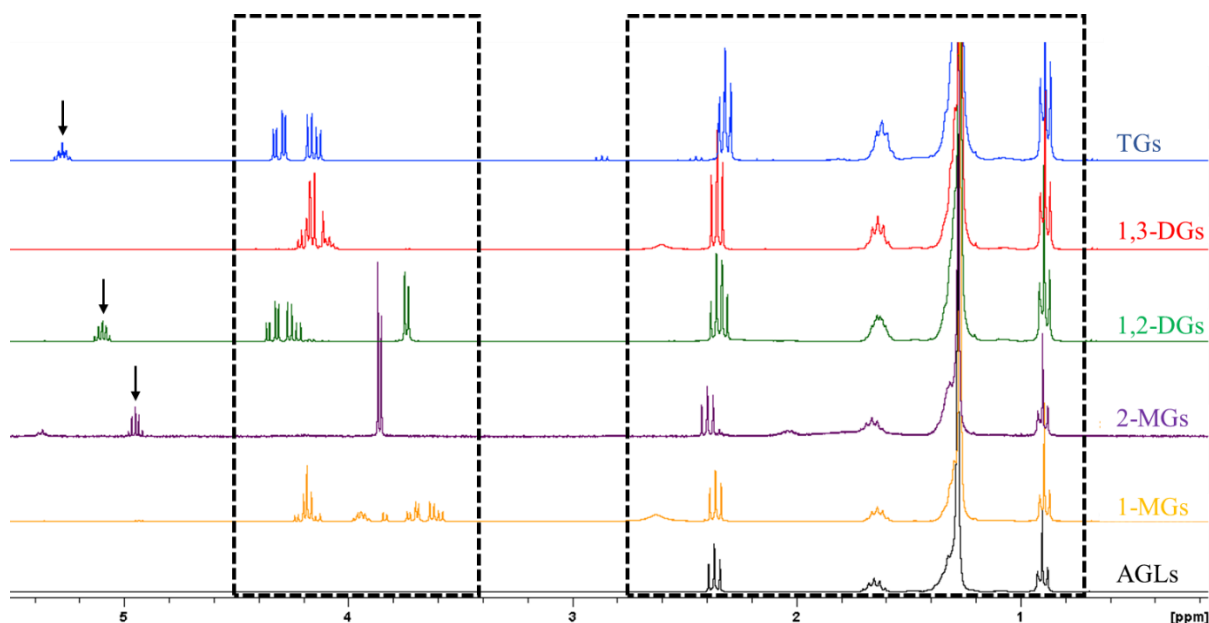


Figure 2.3 : Spectres RMN ^1H des différents standards, (AGLs, 1-MGs, 2-MGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs et TGs) (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

La zone entre 0,8 et 3 ppm sur la Figure 2.3 est très similaire quelles que soient les molécules analysées avec des déplacements chimiques très proches pour l'ensemble des signaux. Par exemple, le triplet à 0,8 ppm correspond au groupement CH_3 terminal des chaînes aliphatiques. Le signal avec un $\delta \approx 2,4$ ppm correspond au groupement CH_2 à proximité du groupement carbonyle. On peut également distinguer un signal déformé et très intense à 1,15 ppm qui correspond à la majorité des groupements CH_2 des chaînes aliphatiques qui ont un environnement chimique similaire. Par contre la zone des déplacements chimiques entre 3,4 et 4,6 ppm semble plus spécifique à chacune des molécules. Cette région correspondant aux groupements $-\text{CH}_2$ de la partie glycérol, liée à une fonction OH ou O-CO- ainsi que les CH-OH. Enfin aux alentours de 5 ppm, nous avons des signaux spécifiques aux groupements CH-OCO- présents dans les molécules des 2-MGs, 1,2-DGs et TGs. La multiplicité de ces signaux va dépendre de la symétrie de la molécule. Les attributions complètes de ces signaux sont présentées dans la partie 2.1.4.

Dans le cas d'un mélange complexe, certains signaux peuvent être isolés comme pour les molécules de TGs, 1,2-DGs et 2-MGs (représentés par une flèche sur la Figure 2.3), une identification par famille de molécule et une quantification pourrait alors être envisagées. Toutefois, pour les autres familles, la quantification peut être faite à l'aide de formules

mathématiques (Nieva-Echevarría, *et al.*, 2014). De plus, au cours de l'indentification de l'ensemble des signaux, nous ne pouvons pas déterminer la présence d'AGLs dans le milieu.

2.1.3.b. Déplacements chimiques en RMN ^{13}C

Du fait des nombreuses superpositions des signaux en RMN ^1H , il est nécessaire d'utiliser d'autres expériences pour lever les ambiguïtés d'attribution. Pour cela, des expériences menées en RMN ^{13}C ont été enregistrées ainsi que des expériences 2D que nous présenterons par la suite. Des études par RMN ^{13}C en J-modulé (carbones quaternaires et secondaires positifs, carbones tertiaires et primaires négatifs) sur les standards nous ont également permis de différencier tous les signaux carbones.

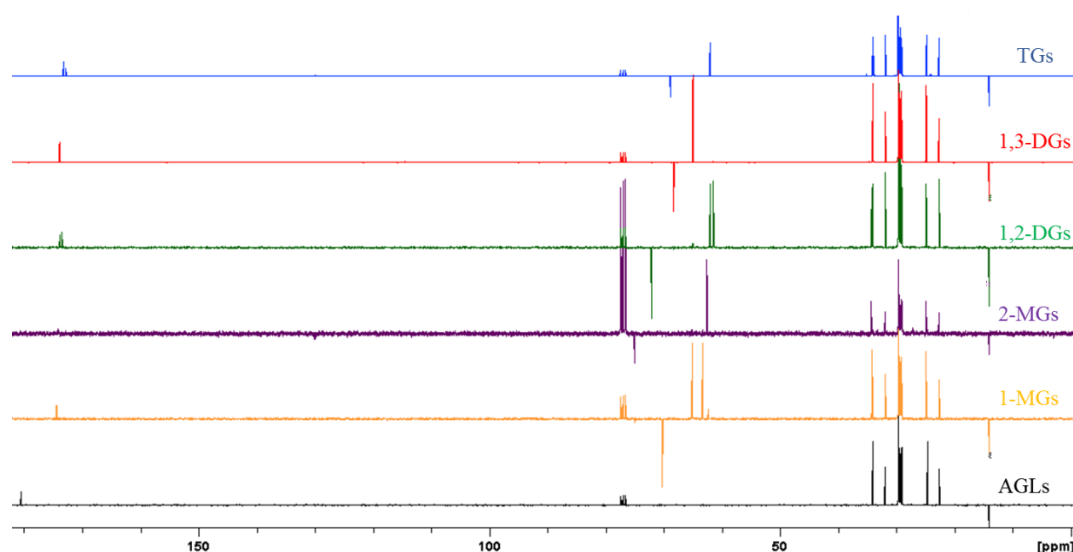


Figure 2.4 : Spectres RMN ^{13}C Jmod des différents standards, (AGLs, 1-MGs, 2-MGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs et TGs) (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

En observant l'ensemble des spectres RMN ^{13}C de la Figure 2.4, nous avons pu identifier plusieurs régions : une commune à l'ensemble des molécules (10-40 ppm) et deux régions plus spécifiques entre 60-80 ppm et 170-180 ppm. Comme pour la RMN ^1H , les déplacements chimiques ^{13}C des chaînes aliphatiques sont très proches, avec le CH_3 autour de 14 ppm (négatif sur la J-modulé) et les CH_2 entre 20 et 30 ppm (positif). La Figure 2.5 montre des zooms sur les parties des spectres où une différenciation entre les molécules est possible. Les groupements $\text{CH}_2\text{-OH}$ et $\text{CH}_2\text{-O-CO-}$ ont des intensités positives en J-modulé, alors que pour les groupements CH-OH et CH-O-CO celles-ci sont négatives. On peut distinguer très facilement les molécules symétriques avec la présence d'un seul signal pour les $-\text{CH}_2$ sur le

spectre ^{13}C . C'est le cas pour les molécules de la famille des TGs, 1,3-DGs et du 2-MGs (Figure 2.5 (A)), spectres violet, rouge et bleu).

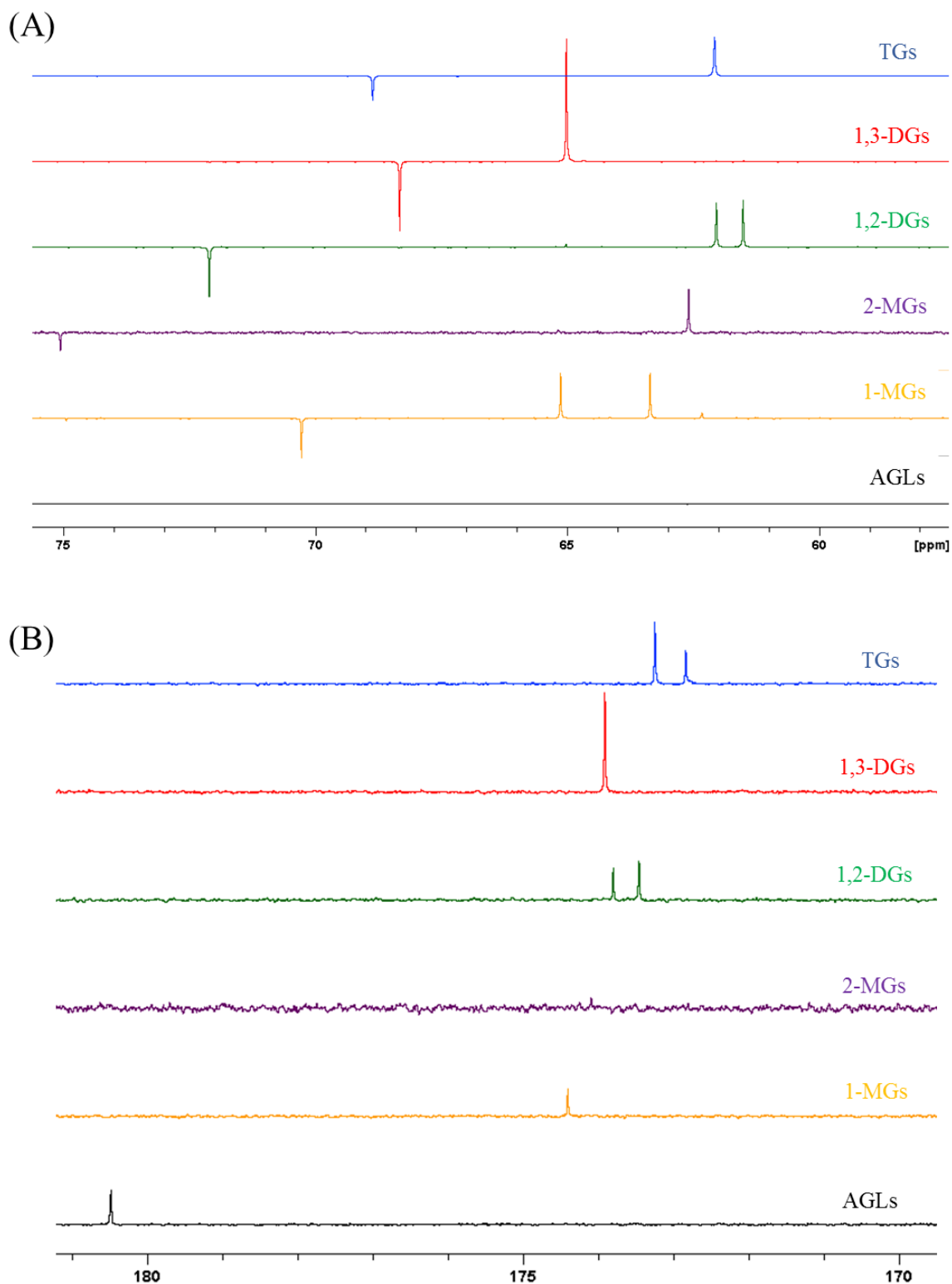


Figure 2.5 : Zooms (A) entre 60-75 ppm et (B) entre 170-180 ppm des spectres RMN ^{13}C Jmod des différents standards (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

On peut également remarquer que chaque molécule a des déplacements chimiques qui lui sont propres contrairement à ce que l'on a pu observer en RMN ^1H . La dernière région permet de distinguer les carbonyles des fonctions esters entre 172 et 175 ppm mais également la fonction acide carboxylique de l'acide gras autour de 180 ppm. Ainsi, l'utilisation de la RMN ^{13}C pourrait avoir un rôle majeur dans nos analyses, autre que celui d'une simple expérience de routine avec les 2D pour la détermination structurale. Elle pourrait nous permettre, d'une part de distinguer chaque famille de molécules sans avoir recours à des calculs comme cela peut être le cas en RMN ^1H , et d'autre part récolter de précieuses informations sur les acides gras libres.

2.1.3.c. RMN 2D

Afin de valider nos hypothèses d'attribution, nous avons enregistré des spectres 2D ^1H - ^1H COSY (Correlation SpectroscopY), ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) et ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) (Figure 2.6).

Les analyses COSY (proton-proton) permettent de voir les corrélations entre les protons portés par le même atome avec les protons voisins, grâce aux couplages scalaires $^2J_{\text{HH}}$ et $^3J_{\text{HH}}$. Les spectres HMBC et HSQC (proton-carbone) permettent de montrer les corrélations hétéronucléaires. Dans le cas des analyses HSQC, nous pouvons rapidement mettre en évidence les protons qui sont directement liés à un carbone ($^1J_{\text{CH}}$) alors que les spectres HMBC permettent de voir les corrélations (en $^2J_{\text{CH}}$ et/ou $^3J_{\text{CH}}$) entre les protons et les carbones voisins.

Dans l'exemple de la Figure 2.6, le signal à 5,1 ppm, corrèle avec les protons à 4,2, 4,35 et 3,75 ppm en COSY (Figure 2.6(A)) et à 72,2 ppm en HSQC avec un signal négatif sur la projection 1D correspondant à l'expérience ^{13}C J-modulé (Figure 2.6(B)). Ce couple carbone-proton correspond au CH du squelette glycérol. Les signaux à 4,2 et 4,35 ppm corréleront en COSY mais avec un seul signal en carbone sur l'HSQC. C'est le système ABd d'un CH_2 du squelette glycérol. Enfin le signal à 3,75 ppm correspond au deuxième CH_2 du squelette. L'HMBC (Figure 2.6(C)) nous a permis de mettre en évidence les corrélations d'un CH_2 et du CH avec des carbonyles autour de 175 ppm. L'absence de corrélation pour le deuxième CH_2 et les valeurs de son déplacement chimique sont en faveur d'un groupement $\text{CH}_2\text{-OH}$. Après analyse, il est très facile de conclure que nous avons à faire à une molécule de la famille des 1,2 DGs.

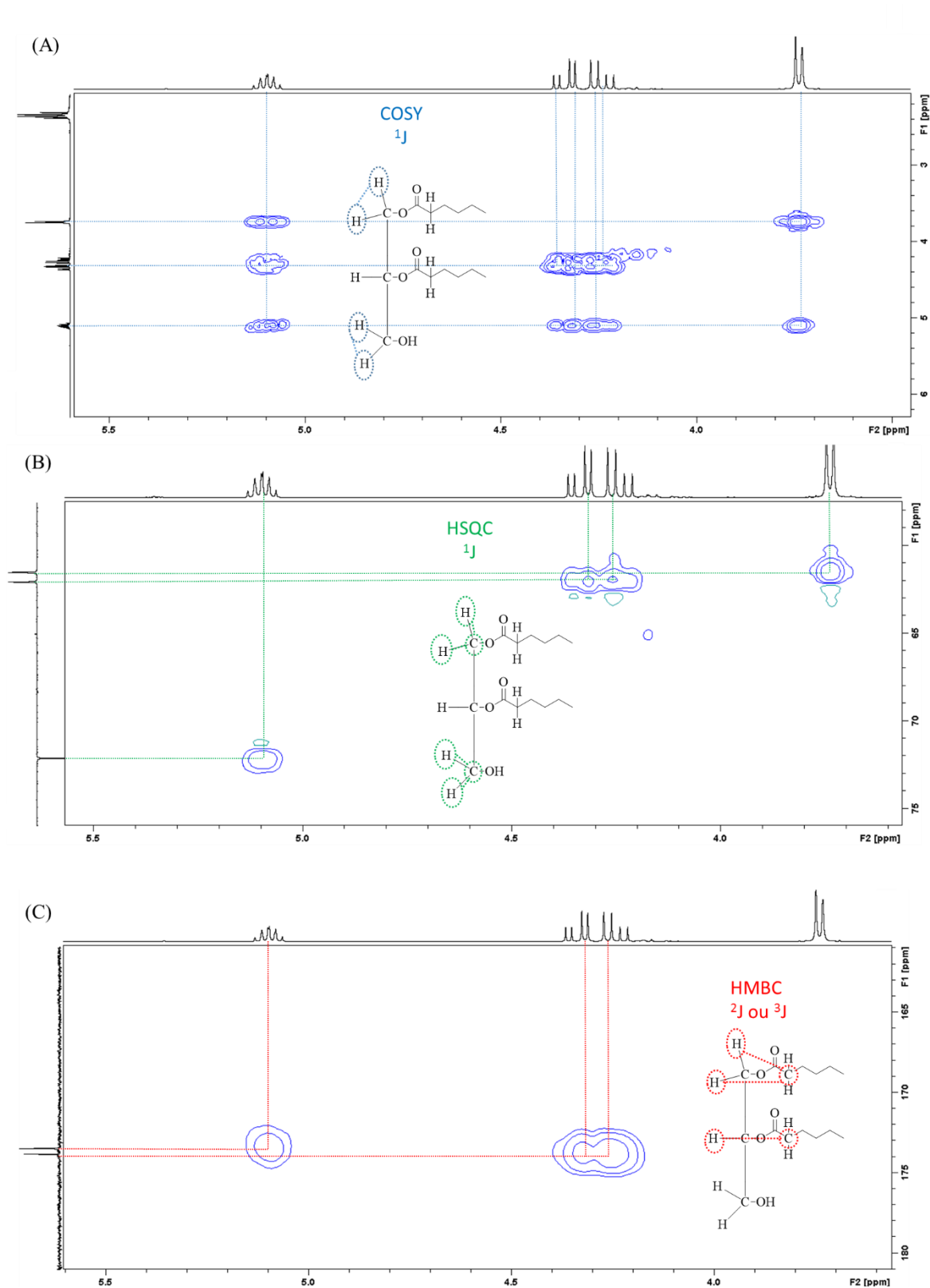


Figure 2.6 : Spectres RMN (A) COSY, (B) HSQC et (C) HMBC du 1,2-DGs standard (300 MHz, $CDCl_3$, 25 °C).

2.1.4. Attribution des signaux des MDGs commerciaux en RMN ^1H

Afin de faciliter l'identification, nous avons attribué une notation spécifique. Les carbones A, B et C correspondent aux différentes positions sur la partie glycérol alors que les carbones nommés 1, 1' et 1'' correspondent quant à eux aux carbones des chaînes aliphatiques (Figure 2.7).

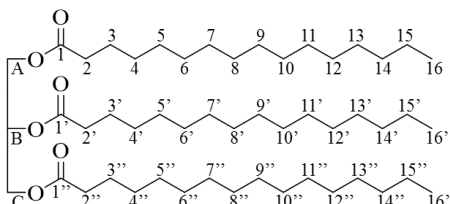


Figure 2.7 : Nomenclature du glyceryl tripalmitate pour l'identification des signaux RMN.

Grace à l'ensemble des analyses précédentes, nous avons pu attribuer sans ambiguïté les déplacements chimiques ^1H des signaux de la partie glycérol des standards (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Déplacements chimiques des standards avec identification précise des groupements déterminés par RMN ^1H .

Molécules	Groupements	Position sur la chaîne glycérol	Multiplicité (J, Hz)	δ (ppm)
TGs	$-\underline{\text{CH}}-\text{O}-\text{CO}-$	B	tt (4,3 ; 6,0)	5,25
1,2-DGs	$-\underline{\text{CH}}-\text{O}-\text{CO}-$	B	qapp	5,05
2-MGs	$-\underline{\text{CH}}-\text{O}-\text{CO}-$	B	q (4,7)	4,93
1,2-DGs	$-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-\text{CO}-$	A	ABd (4,4 ; 5,7 ; 11,9)	4,33 4,24
TGs	$-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-\text{CO}-$	A et C	ABd (4,4 ; 6,0 ; 11,9)	4,29 4,12
1-MGs	$-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-\text{CO}-$	A ou C	ABd (4,8 ; 5,0 ; 16,5)	4,15 4,26
1,3-DGs	$-\underline{\text{CH}_2}-\text{O}-\text{CO}-$	A et C	m	4,15
1,3-DGs	$-\underline{\text{CH}}-\text{OH}$	B	m	4,07
1-MGs	$-\underline{\text{CH}}-\text{OH}$	B	qapp	3,92
2-MGs	$-\underline{\text{CH}_2}-\text{OH}$	A et C	d (4,8)	3,84
1,2-DGs	$-\underline{\text{CH}_2}-\text{OH}$	C	d (5,1)	3,72
1-MGs	$-\underline{\text{CH}_2}-\text{OH}$	A ou C	ABd (3,9 ; 5,8 ; 11,5)	3,60 3,70

m : multiplet ; q : quintuplet ; dd : doublet dédoublé ; d : doublet ; tt : triplet détriplé ; ABd : système AB dédoublé ; qapp : quintet apparent

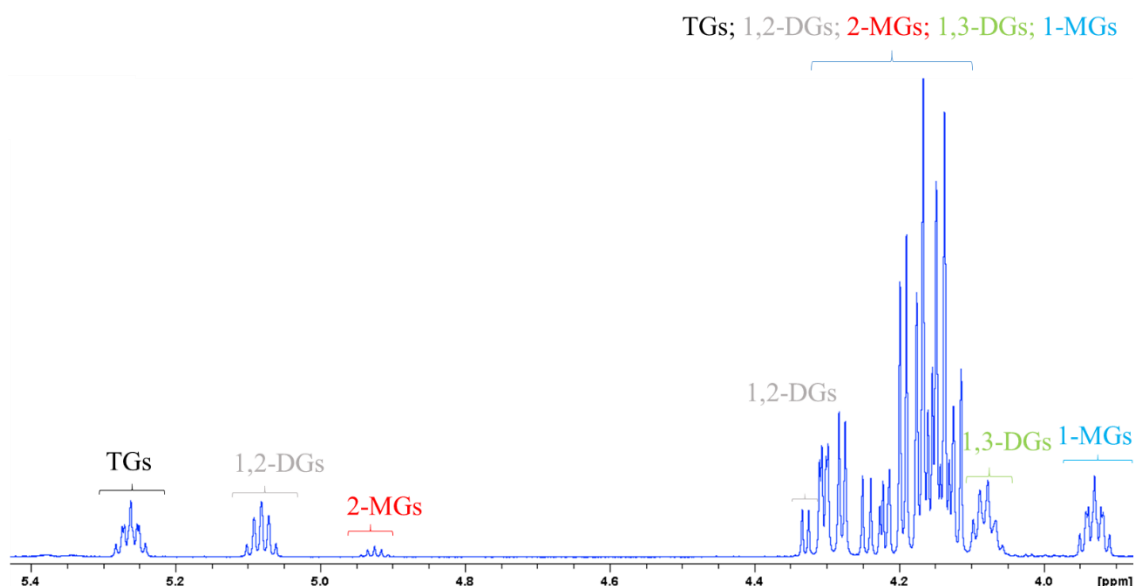


Figure 2.8 : Spectre RMN ^1H avec attribution d'un MDG commercial (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

La Figure 2.8 présente le spectre d'un MDGs commercial où sont donc reportées les attributions des molécules présentes. On peut distinguer très facilement chacun des cinq molécules avec un signal bien isolé qui pourra par la suite être intégré pour déterminer les teneurs de chaque type de molécules. De plus, dans le cas d'un mélange de MDGs, il n'est également pas possible de différencier les signaux propres aux chaînes aliphatiques de ceux correspondant aux AGLs. En effet, les AGLs n'ont pas un déplacement chimique bien spécifique et distinct et chaque signal des chaînes aliphatiques se retrouve invariablement avec ceux des 1-MGs, 2-MGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs et TGs.

2.2. Identification des molécules des MDGs commerciaux

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les MDGs sont classiquement utilisés dans la fabrication des produits alimentaires. Nous avons donc souhaité analyser plusieurs MDGs commerciaux pour ainsi tenter de corréler nos données à celles des fiches techniques émanant des fournisseurs. Cette caractérisation par cette méthodologie permet de pousser plus loin la qualification et la quantification précise d'un mélange complexe. Cela pourrait, à terme, permettre de relier des effets technologiques, observés dans les produits alimentaires, à une catégorie précise de molécules (MGs ou DGs).

Les MDGs commerciaux que nous avons utilisés se différencient par leur provenance (origine botanique) et leur fournisseur. Leur identification et la teneur des molécules qui les composent ont été réalisées par RMN ^1H car comme on peut le voir sur les spectres de la Figure

2.9, chaque molécule présente un signal bien distinct. La RMN du carbone ne sera pas nécessaire pour cette étude.

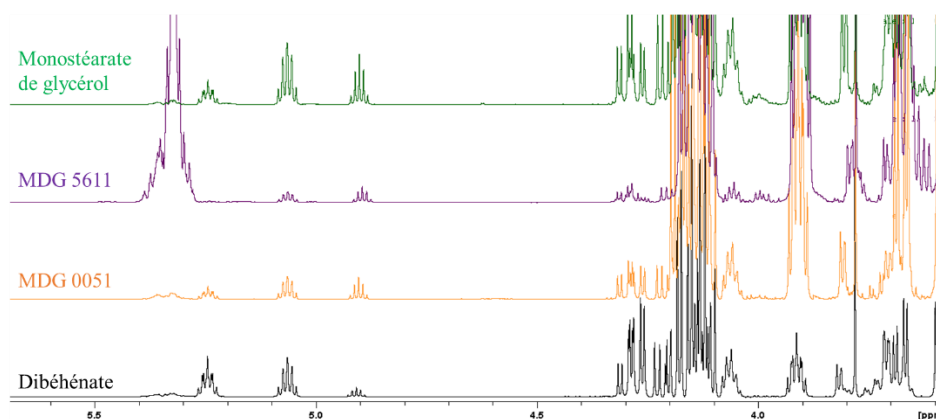


Figure 2.9 : Spectres RMN ^1H de quelques MDGs commerciaux (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Afin de déterminer les différents pourcentages de chacune des molécules contenues dans les MDGs commerciaux, nous avons enregistré des expériences RMN dites quantitatives, en optimisant la durée de l'acquisition ainsi que le délai de relaxation pour que l'ensemble des protons soit totalement relaxé. Les conditions sont reportées dans la partie matériels et méthodes de ce chapitre.

Une fois le traitement des expériences réalisé (phase, correction de ligne de base, calibration), les signaux suivants ont été intégrés, tous correspondent au groupement -CH de la chaîne glycérol : $\delta = 5,25$ ppm pour les TGs, $\delta = 5,05$ ppm pour les 1,2-DGs, $\delta = 4,9$ ppm pour les 2-MGs, $\delta = 4,05$ ppm pour les 1,3-DGs et $\delta = 3,9$ ppm pour le 1-MGs. Le pourcentage relatif de chaque molécule a été déterminé à l'aide de l'Équation 2.1. Les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Équation 2.1 : Calcul du pourcentage relatif des molécules présentes dans un milieu déterminé par RMN ^1H .

$$\% \text{ molécule} = \frac{\text{Intégrale CH d'une molécule}}{\sum \text{intégrale des CH des molécules}} \times 100$$

Tableau 2.2 : Données des pourcentages relatifs des teneurs massiques en TGs, DGs (1,2-DGs, 1,3-DGs) et MGs (1-MGs, 2-MGs) des MDGs commerciaux, déterminées par RMN ¹H.

Nom commercial	MGs ^a	1-MGs ^b	2-MGs ^b	Σ MGs ^b	1,2-DGs ^b	1,3-DGs ^b	TGs ^b
Dibéhénate	20	33,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	35,6	17,0 ± 0,1	28,7 ± 0,4	18,8 ± 0,3
MDG 0051	60%	74,0 ± 2,4	2,6 ± 0,2	76,5	4,7 ± 0,4	15,9 ± 1,4	2,9 ± 0,4
MDG 0091	90%	95,3 ± 0,5	3,4 ± 0,5	98,7	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,1
MDG 0096	> 90%	97,8 ± 0,1	0,2 ± 0,1	98,0	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1
MDG 0298	90%	93,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1	97,4	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1
MDG 5611	> 90%	95,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	96,9	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	0,2 ± 0,1
MDG 5616	> 90%	96,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1	97,9	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,0 ± 0,1
Type I	54	64,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	70,0	9,2 ± 0,1	17,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1
Type II	80	84,5 ± 0,3	5,4 ± 0,1	89,9	3,9 ± 0,1	6 ± 0,2	0,2 ± 0,1
Monostéarate de glycérol	49	59,0 ± 0,1	4,7 ± 0,1	63,7	10,1 ± 0,1	22,2 ± 0,2	4,0 ± 0,1
Multec Mono 9202	> 90%	96,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	97,6	0,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	0,0 ± 0,1

^a : données trouvées sur les fiches techniques données par le fournisseur ; ^b : teneurs relatives déterminées par RMN ¹H

En se focalisant sur les teneurs de chacune des molécules présentes dans les MDGs, nous pouvons observer que la composition en MGs et DGs est différente. De plus, nous pouvons confirmer que dans chacun des échantillons, les composés majoritaires sont bien les MGs (de 64 à 99 %) suivis des DGs (de 2 à 32%) et avec de faibles quantités de TGs (< 4%) excepté pour le Dibéhénate qui présente de plus fortes proportions en cette catégorie de molécule. Par rapport aux données fournisseurs, notre caractérisation est plus complète car nous sommes capables de déterminer les teneurs en isomères des DGs et des MGs. De manière systématique la teneur en 1-MGs est largement supérieure à la teneur en 2-MGs (pour le MDG 0298 : 3,5% de 2-MGs versus 93,9% ; pour le monostéarate de glycérol : 4,7% et 59%). Également, les teneurs en 1,3-DGs sont deux fois plus importantes que les teneurs en 1,2-DGs. Ces résultats indiquent donc une formation préférentielle de certains isomères due à des configurations d'ordre stérique. En effet, dans le cas des DGs, il semblerait que les AGs se fixent principalement sur les carbones adjacents du squelette glycérol (A et C) pour des raisons d'encombrement stérique entre les chaînes d'acides gras. De plus, dans chacun des échantillons analysés, nous avons des teneurs en MGs qui sont toujours supérieures par rapport aux données

des fournisseurs. Dans le cas du dibéhénate, nous avons le double de MGs (35,6% versus 20%) par rapport à la quantité annoncée par le fournisseur.

Dans cette partie, nous avons vu que la caractérisation de mélanges constitués de MDGs était complexe. Grâce à l'étude des standards de MGs, DGs, TGs et AGLs par RMN nous avons pu identifier ces composés et leurs isomères ; cela nous a ainsi permis d'obtenir des informations plus précises sur les teneurs, non communiquées voire erronées sur les fiches techniques, des différentes molécules présentes dans les MDGs. La composition en isomères sur les MGs et DGs a été déterminée ainsi que la présence de résidus de TGs. Les teneurs de chacune des molécules étant différentes dans les produits, les propriétés finales ne seront pas les mêmes ; il est sans doute possible d'établir des corrélations entre la composition et l'effet technologique.

3. Caractérisations des huiles végétales de colza et de tournesol

Les huiles végétales de colza et de tournesol sont riches en acides gras mono- et polyinsaturés qui sont indispensables à l'être humain car ils participent entre autres à la bonne croissance de l'organisme et notamment pour certains d'entre eux, ils aident au développement de la rétine, des neurones, du fœtus (Fénart, 2004; Kumar, *et al.*, 2016). Bien qu'ayant un aspect similaire (liquides à $T_{amb.}$), ces huiles présentent quelques différences dans leurs compositions en acides gras (Konuskan, *et al.*, 2019; Kostik, *et al.*, 2013; Orsavova, *et al.*, 2015).

Etant donné que le chapitre suivant s'intéresse à l'huile végétale comme substrat de base nous avons souhaité connaître et caractériser les propriétés physicochimiques de ces huiles. Pour cela nous avons utilisé la RMN, la CPG, la DSC et la tension de surface.

3.1. RMN

3.1.1. RMN 1H

En analysant une huile végétale de colza par RMN 1H , une seule famille moléculaire est présente appartenant aux TGs. Le signal à 5,25 ppm caractéristique de cette famille est bien présent mais en partie superposé aux signaux spécifiques des alcènes, à environ 5,3 ppm (Figure 2.10), démontrant ainsi la présence de doubles liaisons sur les chaînes aliphatiques. Sur cette huile, il serait simple de connaître la teneur en TGs puisque le système ABd à 4,2 ppm est isolé.

Cependant, la présence de MGs et DGs empêcherait toute possibilité d'analyse des TGs. Comme nous l'avons vu précédemment, aucune information sur la présence d'acides gras libres ne peut être donnée en RMN ^1H . De plus, il sera également impossible de connaître si les huiles sont mono- ou polyinsaturées car les protons éthyléniques des alcènes sur les chaînes aliphatiques auront un déplacement chimique très proche. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé pour la suite des analyses de travailler quasi exclusivement en RMN ^{13}C .

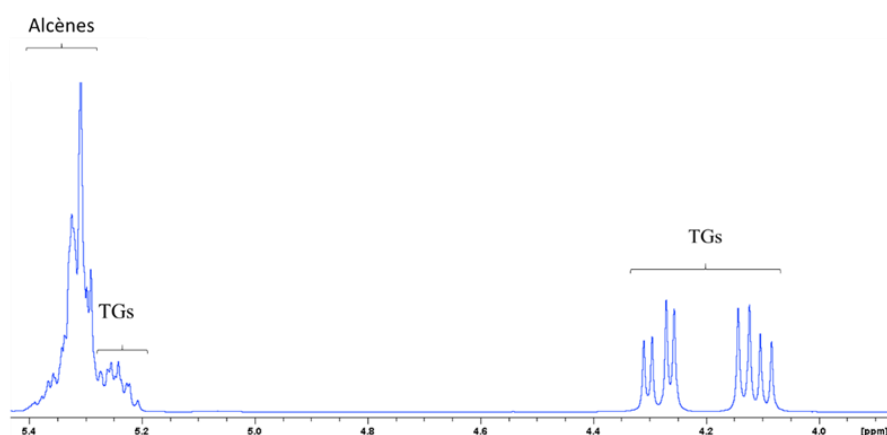


Figure 2.10 : Spectre RMN ^1H avec attribution d'une huile végétale (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

3.1.2. RMN ^{13}C

En faisant les analyses de l'huile végétale de colza par RMN ^{13}C , nous pouvons distinguer des signaux avec les déplacements $\delta = 173,3$ et $172,9$ ppm qui sont spécifiques des carbones des chaînes aliphatiques et ceux avec les déplacements chimiques de $\delta = 68,9$ et $62,2$ ppm qui sont spécifiques des carbones de la chaîne glycérol. De plus, dans la zone entre 125 et 135 ppm nous avons des signaux qui sont indicatifs de la présence d'insaturations dans l'huile végétale (Figure 2.11).

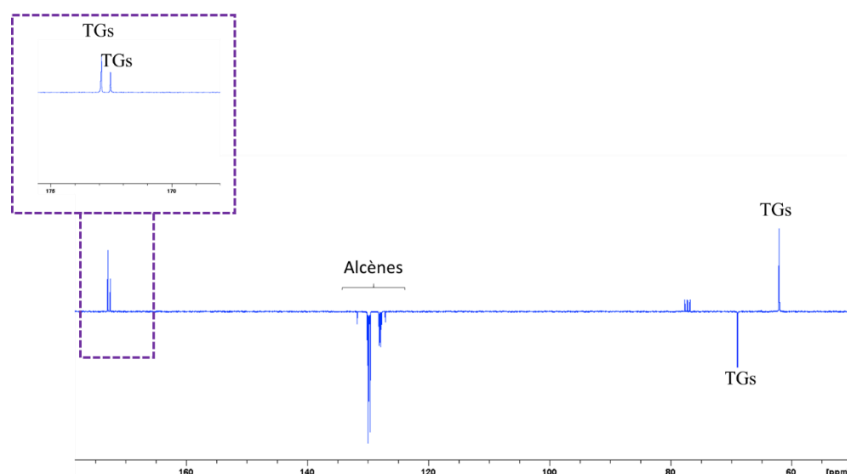


Figure 2.11 : Spectre RMN ^{13}C de l'huile végétale de colza (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Par cette méthode, nous pouvons obtenir des informations sur la présence de molécules insaturées dans un mélange, mais il est également possible de déterminer le nombre d'insaturations présentes dans les huiles. En effet, à l'aide de différentes molécules insaturées (acides gras de type : acide linoléique, acide α -linolénique...), l'ensemble des signaux a été attribué (Figure 2.12).

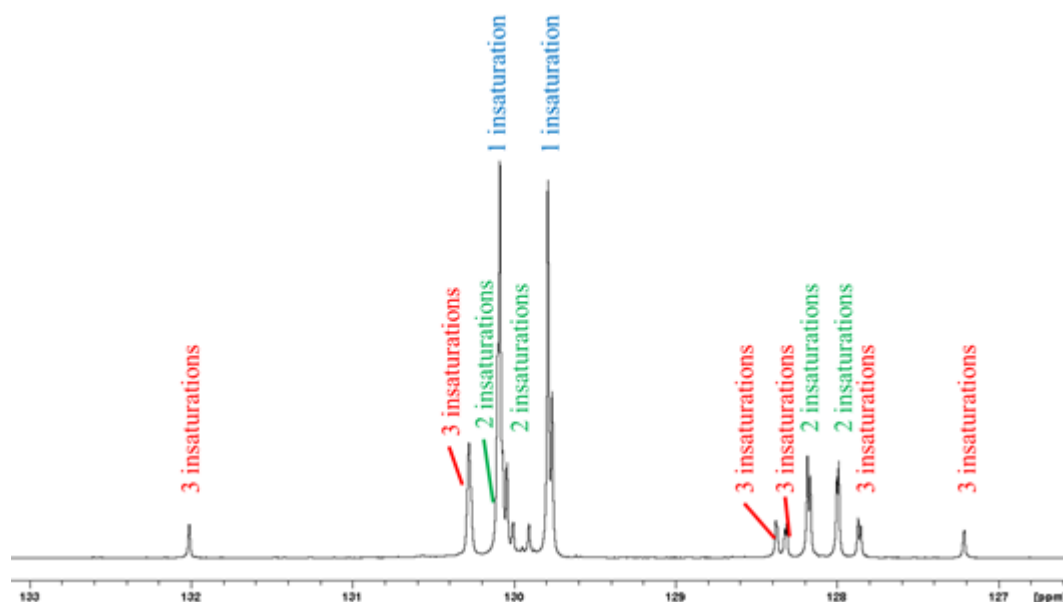


Figure 2.12 : Identification par RMN ^{13}C du nombre d'insaturations présentes dans l'huile de colza (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Il est décrit dans la littérature que la RMN ^{13}C donne des informations précises sur le squelette carboné des molécules. Contrairement à l'analyse par RMN ^1H , elle permet l'identification sans ambiguïté des principaux constituants d'un mélange quelles que soient leurs masses molaires, leurs structures et leurs environnements. Cette méthode peut donc être utilisée pour identifier et quantifier la présence des différentes molécules qui nous intéressent, les TGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs, 1-MGs, 2-MGs et AGLs (Fernandes, *et al.*, 2012; Gunstone, 1991; Ng, 2000; Vlahov, 1999). Grâce aux différents standards présentés dans la partie précédente ainsi qu'aux différentes séquences RMN, nous avons pu identifier les différents signaux et relever ceux spécifiques à chacune des molécules (Tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Déplacements chimiques des standards avec identification précise des groupements déterminés par RMN ^{13}C .

Molécules	Groupements	Position sur la chaîne glycérol	$\delta(\text{ppm})$
AGLs	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OOH}$	1	180,0
1-MGs	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-$	1	174,4
2-MGs	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-$	1'	174,2
1,3-DGs	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-$	1 et 1''	173,9
1,2-DGs	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-$	1 et 1''	173,8
1,2-DGs	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-$	1'	173,5
TGs	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-$	1 et 1''	173,3
TGs	$-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OO}-\text{CH}_2-$	1'	172,9
Insaturations	$-\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}-$	-	130,1
			129,8
			130,3
Insaturations	$(-\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}-)_2$	-	130,1
			128,2
			128
			131,8
			130,0
Insaturations	$(-\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}-)_3$	-	128,2
			128,1
			127,7
			127,1
2-MGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$	B	75,0
1,2-DGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$	B	72,2
1-MGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$	B	70,3
TGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$	B	68,9
1,3-DGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$	B	68,4
1-MGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$	A ou C	65,2
1,3-DGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$	A et C	65,1
1-MGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{OH}$	A ou C	63,4
2-MGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{OH}$	A et C	62,3
TGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$	A et C	62,2
1,2-DGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$	C	62,1
1,2-DGs	$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{OH}$	A	61,5

Par cette technique, nous pouvons ainsi identifier les signaux spécifiques aux molécules (AGLs, 1-MGs, 2-MGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs et TGs) et déterminer leurs teneurs en une seule analyse. Toutefois, la quantification est délicate car les temps de relaxation des

différents carbones sont plus longs que ceux des protons (15s pour les CO contre 3s pour les protons).

3.1.3. Analyse des huiles par RMN ^{13}C

En observant les spectres des huiles végétales de colza et de tournesol, nous pouvons conclure pour chacune d'elles que les molécules présentes dans ces milieux sont uniquement les TGs (Figure 2.13(A)).

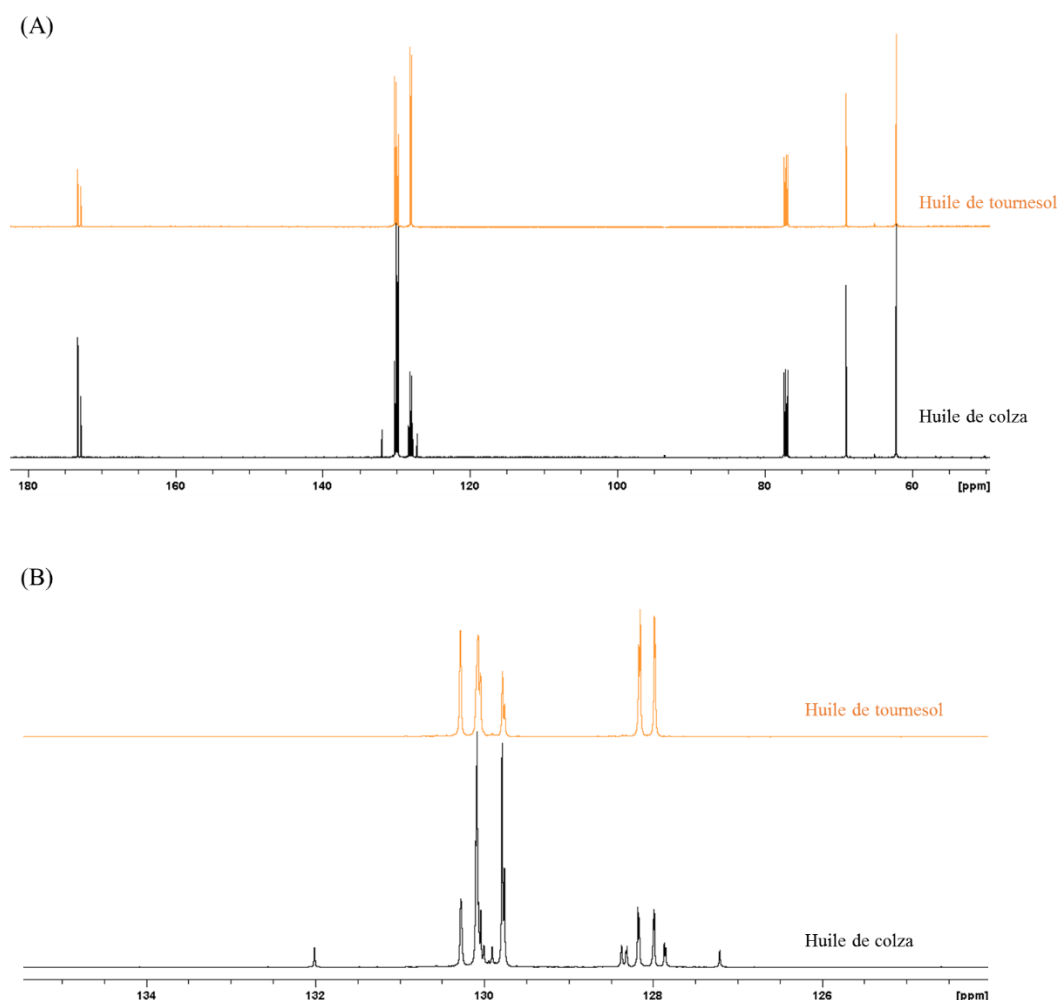


Figure 2.13 : Spectres RMN ^{13}C (A) des huiles végétales (B) zoom sur la région des alcènes entre 125 et 135 ppm (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Toutefois, dans la zone spécifique correspondant aux signaux des carbones éthyléniques, nous remarquons une différence sur le nombre d'insaturations (Figure 2.13 (B)). En effet, l'huile de colza présente des chaînes aliphatiques différemment insaturées : mono-

($\delta \approx 130,1$ et $129,8$ ppm), doubles ($\delta \approx 130,3$ et 128 ppm) et triples liaisons ($\delta \approx 131$ et 127 ppm) alors que l'huile de tournesol contient uniquement des mono- ($\delta \approx 130,1$ et $129,8$ ppm) et des doubles ($\delta \approx 130,3$ et 128 ppm) insaturations.

La RMN ^{13}C est une technique analytique appropriée pour analyser des huiles puisqu'elle permet d'identifier les différentes familles de constituants des huiles, les TGs, ainsi que les DGs et MGs mais également d'avoir des informations sur les acides gras libres et sur le nombre d'insaturations. Par contre, cette méthode ne permet pas de connaître les longueurs de chaînes. Pour connaître la nature exacte des chaînes aliphatiques constituant les TGs de l'huile de colza, nous avons réalisé des analyses CPG.

3.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une technique analytique très répandue, qui présente un fort potentiel pour séparer et identifier les composés présents dans un mélange complexe. Elle est également très utilisée dans la caractérisation des huiles végétales contenant majoritairement des triglycérides (Plank & Lorbeer, 1995; Sek, *et al.*, 2001; Stolyhwo, *et al.*, 1985). Elle permet, au travers des temps de rétentions, de déterminer la présence de TGs, DGs, MGs et AGLs mais également de déterminer les différentes longueurs des chaînes et la présence ou non d'insaturations. Ces analyses ont été réalisées par l'ITERG, un institut spécialisé dans les corps gras pour des usages en agroalimentaire ou en cosmétique.

Pour améliorer la détection et ainsi connaître avec précision la composition totale en acides gras de chacun des composants présents dans les corps gras, les longueurs des chaînes aliphatiques et leur nature (saturés, insaturés, polyinsaturés), il est nécessaire de réaliser au préalable une transestérification des composés. Cette réaction se réalise en milieu basique par la présence de méthanol ou éthanol (transformation des triglycérides en esters méthyliques ou éthyliques (Figure 2.14)).

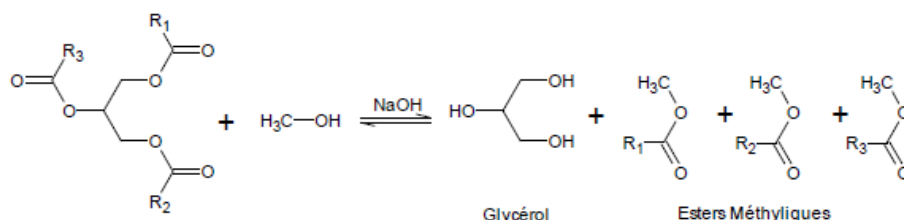


Figure 2.14 : Mécanisme de la transestérification.

Après ce traitement, et à l'aide des temps de rétention, tous définis et séparés, les différents acides gras présents dans l'huile sont identifiés (Hussein, *et al.*, 2001; Xing, *et al.*, 2019). Il est possible de caractériser et de quantifier, à l'aide d'un ester méthylique en C11 qui sert d'étalon, les différents esters de glycérol présents dans les corps gras sans toutefois pouvoir distinguer la position de ces acides gras sur la chaîne glycérol étant donné que la transestérification « coupe » l'ensemble des acides gras quel que soit leur substrat de départ (TGs, DGs ou MGs) (Dias, *et al.*, 2012; Plank & Lorbeer, 1995).

Dans la littérature, nous pouvons trouver la composition d'huiles de colza et de tournesol, déterminée par CPG. Nous y trouvons les différents degrés d'insaturations ainsi qu'entre les longueurs de chaînes des acides gras constitutifs (Tableau 2.4). Ils possèdent des longueurs de chaînes majoritairement en C16 et C18, mais leurs degrés d'insaturations sont différents. L'huile de tournesol est plus riche en acides gras polyinsaturés (62,4%) alors que l'huile de colza est plus riche en acides gras mono-insaturés (72,8%). On notera quand même une fraction plus importante en acide linoléique (C18:3) dans l'huile de colza (1,2% contre 0,16%) ce qui rend son utilisation intéressante d'un point de vue nutritionnel. Pour l'ensemble de ces raisons, tous les travaux développés dans les chapitres suivants se focaliseront essentiellement sur l'huile de colza.

Tableau 2.4 : Composition en pourcentage massique en AGLs de l'huile de colza et de tournesol (adapté (Vingering, et al., 2010)).

Acides gras	Huile de colza	Huile de tournesol
C14:0	0,1	0,1
C16:0	4,5	6,0
C16:1 (n-7 + n-9)	0,2	0,1
C17:0	0,1	0,1
C18:0	1,6	3,6
C18:1 cis (n-9)	55,2	29,4
C18:1 cis (n-7)	4,0	1,3
C18:1 trans	-	-
C18:2 cis (n-6)	19,4	54,5
C18:2 trans	0,1	0,5
C18:3 (n-3)	7,8	0,1
C18:3 trans	0,6	-
C20:0	0,3	0,3
C20:1 (n-9)	0,2	0,2
Acides gras saturés	7,3	10,9
Acides gras mono-insaturés	59,7	30,8
Acides gras polyinsaturés	26,9	54,6
n-3 Acides gras polyinsaturés	7,8	0,1
n-6 Acides gras polyinsaturés	19,1	54,5

Ces données nous informent sur la composition générale en acides gras présents dans ces huiles. Elle peut cependant, sensiblement changer d'un lot à l'autre. C'est pourquoi nous avons analysé et caractérisé plus précisément les huiles que nous avons utilisées.

Grâce à ces analyses (menées essentiellement par CPG), nous avons pu calculer et déterminer la masse molaire moyenne des molécules initialement présentes dans l'huile (majoritairement TGs ;

Tableau 2.5). Le calcul des masses molaires se détermine avec les formules ci-dessous et le profil des acides gras se révèle capital pour les futurs calculs quantitatifs. Dans un premier temps, pour faciliter les calculs, il est nécessaire de connaître la masse molaire des TGs. Nous savons qu'ils sont constitués d'une molécule de glycérol et de trois chaînes d'acide gras. Cependant, compte tenu des liaisons covalentes de type ester entre les deux parties, il est nécessaire de soustraire trois molécules d'eau.

La formule est donc la suivante :

$$MM\ TGs = (MM\ Glycérol + (3MM\ AGLs - 3MM\ H_2O)) \times \% \text{ massique d'acide gras}$$

Dans le cas de la détermination de la masse molaire d'un DGs, nous nous servons de la masse molaire du TGs duquel un AG est enlevé. Lors de l'hydrolyse, un proton se fixe sur le glycérol alors qu'un groupement -OH vient se greffer sur la fonction acyle de l'acide gras. Il faut donc tenir compte d'une molécule d'eau. La formule pour la détermination de la masse molaire est donc la suivante :

$$MM\ DGs = (MM\ TGs - MM\ AGLs + MM\ H_2O) \times \% \text{ massique d'acide gras}$$

Dans la même démarche que pour le calcul précédent, il y a, à nouveau, libération d'un acide gras de la chaîne glycérol. Le calcul reste donc similaire pour les MGs.

$$MM\ MGs = (MM\ DGs - MM\ AGLs + MM\ H_2O) \times \% \text{ massique d'acide gras}$$

Les calculs des masses molaires moyennes des MGs, DGs et TGs sont réalisés en considérant la même probabilité d'avoir un acide gras qui se fixe sur la partie glycérol quelle que soit sa nature ou sa longueur de chaîne.

Tableau 2.5 : Profil des acides gras et détermination des masses molaires des potentiels produits présents dans l'huile de colza.

Acides gras de l'huile de colza	Masse molaire de l'acide gras (g/mol)	g/100g (exprimé en methylester équivalent)	Masse molaire (g/mol)			
			MM(TGs)	MM(DGs)	MM(MGs)	MM(AGLs)
C10:0	172,27	<0,05	-	-	-	-
C12:0	200,32	<0,05	-	-	-	-
C14:0	228,37	0,055	0,40	0,28	0,17	0,13
C15:0	242,40	<0,05	-	-	-	-
C16:0	256,42	4,785	38,63	27,22	15,81	12,27
C16:1	254,41	0,25	2,00	1,41	0,82	0,64
C17:0	270,45	0,065	0,55	0,39	0,22	0,18
C17:1	268,45	0,06	0,51	0,36	0,21	0,16
C18:0	284,48	1,56	13,91	9,75	5,59	4,44
C18:1 cis	282,46	62,245	551,11	386,50	221,90	175,82
C18:1 trans	282,46	0,07	0,62	0,43	0,25	0,20
C18:2 cis	280,44	19,625	172,57	121,07	69,56	55,04
C18:2 trans	280,44	0,07	0,62	0,43	0,25	0,20
C18:3 cis	278,43	8,125	70,95	49,80	28,64	22,62
C18:3 trans	278,43	0,29	2,53	1,78	1,02	0,81
C20:0	312,53	0,535	5,22	3,64	2,07	1,67

C20:1	310,53	1,27	12,31	8,60	4,88	3,94
C22:0	340,58	0,29	3,07	2,14	1,20	0,99
C22:1	338,58	0,455	4,79	3,34	1,88	1,54
C24:0	368,63	0,115	1,32	0,91	0,51	0,42
C24:1	366,62	0,14	1,59	1,10	0,62	0,51
TOTAL (ΣMM)	-	-	882,70	619,15	355,60	281,57

Ces données nous serviront pour la détermination des teneurs molaires de l'ensemble des molécules présentes dans les huiles végétales avant, pendant et après l'action de la lipase.

3.3. Tension de surface

L'action des lipases peut créer des DGs, MGs ou AGLs à partir des TGs. Ces molécules étant reconnues tensioactives, la mesure de l'activité de surface peut constituer une méthodologie de choix pour suivre la lipolyse. Pour mesurer la tension superficielle d'un liquide, plusieurs techniques existent : méthode dite d'arrachement ou d'étirement de films interfaciaux (lame de Wilhelmy ou l'anneau de du Noüy) ou encore des mesures de suivi de formes telle que la méthode de la goutte pendante (De Gennes & Brochard-Wyart, 2005; Le Neindre, 1993). Dans le cas de notre étude, la tension de surface de nos systèmes a été déterminée selon la technique de suivi de forme par la méthode dite de la goutte pendante. Pour ce faire, une seringue avec son aiguille est fixée verticalement et est placée à l'intérieur d'une cuve contenant un liquide (eau si la goutte est de l'huile et inversement). Puis, à l'aide d'une vis sans fin, une pression est exercée sur le piston, permettant ainsi la formation d'une goutte pendante au bout de l'aiguille. Pour visualiser la goutte formée, une lampe, à intensité variable, ainsi qu'une caméra sont placées dans l'alignement de la cuve. Le tout est alors relié à un logiciel qui permet d'afficher instantanément la forme et le volume de la goutte et donne ainsi des informations sur la tension de surface (Figure 2.15) (Gassin, 2014).

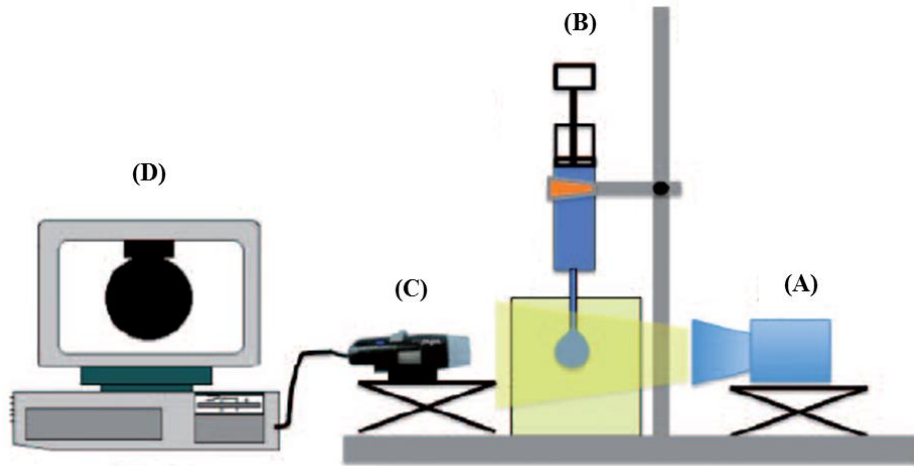


Figure 2.15 : Description schématique du tensiomètre à goutte: (A) lampe blanche, (B) seringue et aiguille droite, (C) webcam, (D) ordinateur avec le logiciel DSA program (Gassin, 2014).

L'utilisation de cet appareil peut se faire dans plusieurs configurations. Dans le cas où le fluide placé dans la seringue est plus dense que celui placé dans la cuve (goutte d'eau dans l'huile), une aiguille droite est utilisée pour former une goutte pendante (Figure 2.16(A)). Dans le cas inverse où le liquide formant la goutte est moins dense que le solvant présent dans la cuve (goutte d'huile dans l'eau), une aiguille courbée est utilisée pour former une goutte montante (Figure 2.16(B)).

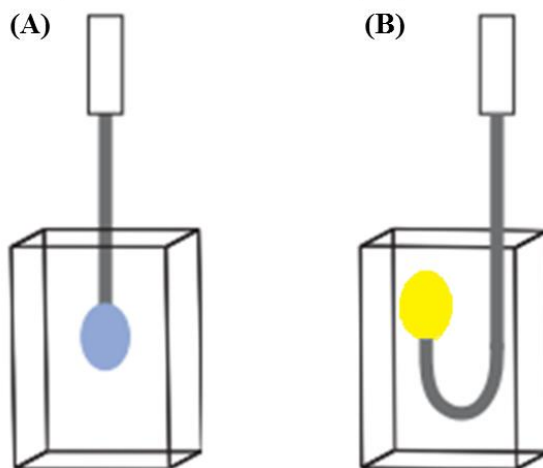


Figure 2.16 : Configurations des gouttes (A) pendante et (B) montante.

Avant toute détermination des tensions de surface, des mesures de densité sur les différents milieux ont été réalisées à l'aide d'un pycnomètre. La détermination des tensions de surface γ se fait en tenant compte des différences de densité ($\Delta\rho$), du coefficient de gravitation

(g) et du diamètre de la goutte au carré en la supposant totalement sphérique (d_e). Un facteur de correction ($\frac{1}{H}$) est ensuite appliqué à l'ensemble (Figure 2.17).

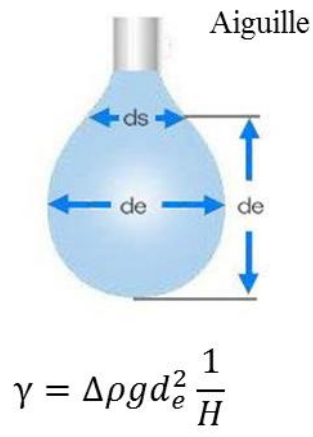


Figure 2.17 : Détermination de la tension de surface par la méthode de la goutte.

Les mesures de tension de surface effectuée dans les deux configurations (goutte pendante et montante) dans l'eau distillée ou dans l'huile sont présentées ci-dessous (Figure 2.18).

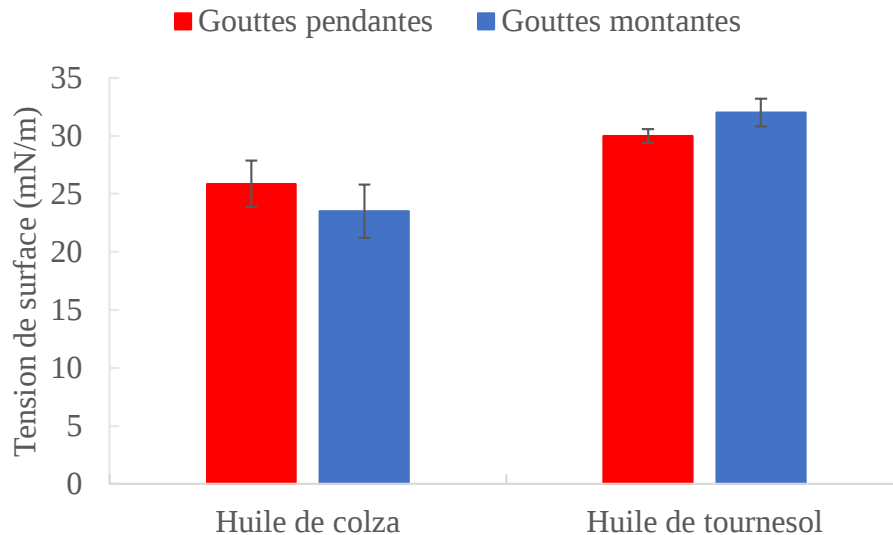


Figure 2.18 : Tensions de surface à 20 °C de l'huile de colza et de l'huile de tournesol selon la méthode utilisée.

Les tensions de surface (dans l'huile ou dans l'eau) sont proches, et varient légèrement en fonction de la composition de l'huile végétale. Plus la chaîne d'acide gras sera longue, plus

sa valeur de la tension de surface sera importante (Chumpitaz, *et al.*, 1999; Gros & Feuge, 1952).

3.4. DSC

La cristallisation des huiles végétales dépend de la présence d'acides gras saturés et de leurs longueurs de chaînes ; plus les chaînes saturées seront longues et plus la cristallisation sera dense. Les huiles de colza et de tournesol sont des composés liquides à température ambiante compte tenu de leur forte teneur en acides gras insaturés. Toutefois, nous avons souhaité déterminer les propriétés thermiques de ces huiles par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) avec les températures de fusion T_f et de cristallisation T_c . Ces températures sont mesurées par différence de transfert de chaleur entre le composé analysé et une référence (dans notre cas huile et air, respectivement). Son principe est basé sur la mesure de la quantité de chaleur, absorbée ou dégagée, au cours des transitions de phase lors d'un cycle thermique imposé (montée, descente ou plus complexe) (Figure 2.19). Pour éviter d'éventuelles réactions parasites du composé étudié avec l'atmosphère du four, les analyses sont effectuées sous un gaz inerte (Grenet & Legendre, 2010).

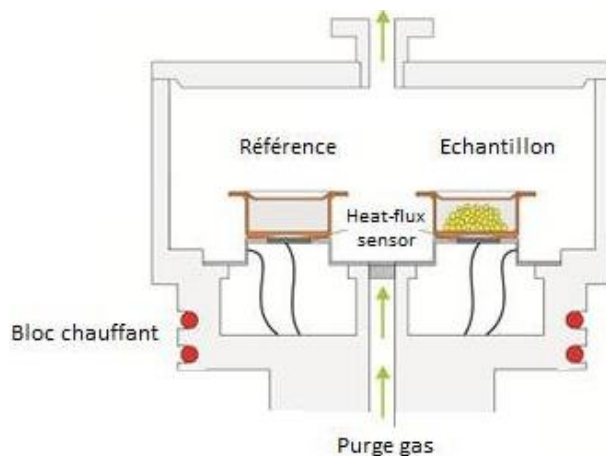


Figure 2.19 : Principe de fonctionnement de la DSC.

Les huiles végétales sont majoritairement composées de TGs avec des T_f et T_c qui sont dépendantes de la morphologie des cristaux qui varie en fonction de la température. En effet, au cours d'une cristallisation, les TGs peuvent être sous trois formes majeures : les formes α , β' et β , qui dans cet ordre, présentent une stabilité thermique croissante (Biliaderis, 1983). Également, plus les longueurs de chaînes seront longues, plus la T_f sera élevée et plus le nombre d'insaturations sera important, plus la T_f sera faible (A. Thomas, *et al.*, 2015).

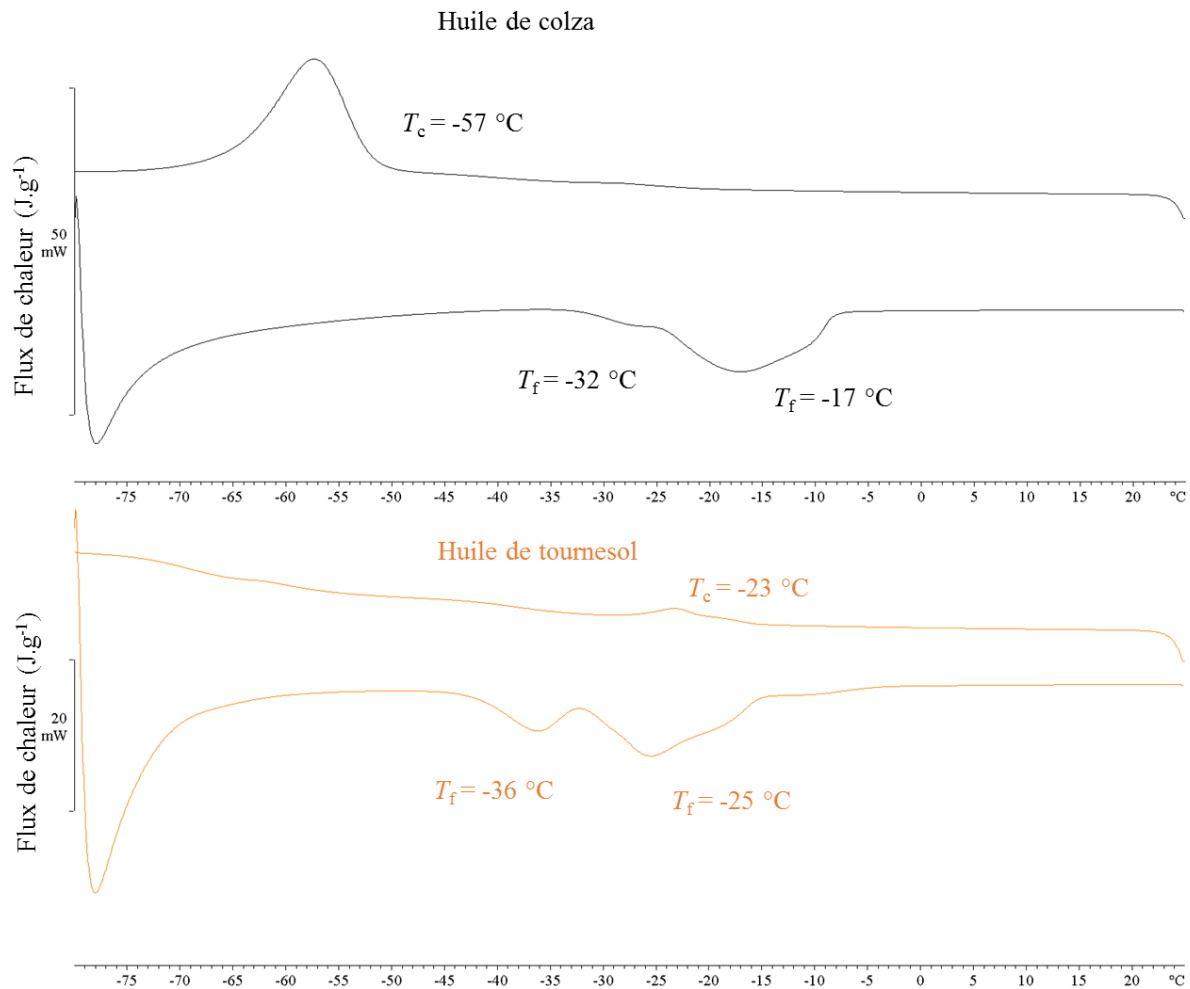


Figure 2.20 : Thermogrammes des huiles végétales (A) de colza et (B) de tournesol.

Sur les deux huiles que nous avons analysées, nous observons des températures de cristallisation et de fusion différentes (Figure 2.20). Toutefois, lors d'une descente en température jusqu'à -80 °C , nous observons un seul pic de cristallisation : $T_c = -57\text{ °C}$ pour l'huile de colza et $T_c = -23\text{ °C}$ pour l'huile de tournesol. Lorsque l'huile subit une montée en température, deux pics de fusion plus ou moins distincts apparaissent : $T_f = -32\text{ °C}$ et -17 °C pour l'huile de colza et $T_f = -36\text{ °C}$ et -25 °C pour l'huile de tournesol.

4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit notre approche essentiellement analytique pour la caractérisation des MDGs et des huiles végétales. Le choix de l'utilisation de la RMN comme outil de caractérisation s'est vite révélé intéressant. Dans un premier temps, l'analyse des standards (TGs, DGs, MGs et AGLs) a été nécessaire pour faciliter l'interprétation des spectres. Grâce à une caractérisation approfondie de chacun des composés, une analyse croisée par RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HMBC et HSQC a permis d'attribuer de façon précise chacun des signaux.

Ces attributions ont ensuite permis de déterminer la teneur en chacune des molécules présentes dans une sélection de MDGs commerciaux, ce qui permet d'étoffer les données émises par les fournisseurs. En effet, nous avons pu déterminer les teneurs en MGs et DGs ainsi que les isomères de chacun d'entre eux. Concernant la nature des chaînes carbonées, la RMN ^{13}C a permis d'identifier sélectivement les signaux relatifs aux insaturations (1, 2 ou 3) mais la distinction entre les longueurs de chaîne reste encore trop complexe.

Dans un second temps, nous avons caractérisé les huiles végétales de colza et de tournesol qui serviront de références pour la suite des travaux. Grâce notamment aux résultats obtenus par CPG, nous avons pu calculer et déterminer les masses molaires des molécules susceptibles d'être présentes dans les huiles végétales de colza, ce qui nous servira lors des caractérisations pour les futures lipolyses.

Ces huiles ont aussi été analysées par des mesures de tension de surface à l'aide d'un tensiomètre à goutte pendante. Ces études ont montré une légère différence entre ces deux huiles. Enfin, des analyses DSC ont été menées et les valeurs de températures de fusion et de cristallisation de chacune des huiles ont été mesurées. Ces mesures nous serviront une nouvelle fois de références dans la suite de nos travaux.

5. Partie expérimentale

5.1. Liste des produits utilisés

Tableau 2.6 : Liste des produits commerciaux utilisés

Nom	Fournisseur	Concentration
Huile de colza	Metro	n.i
Huile de tournesol	Metro	n.i
TGs : Glyceryl tripalmitate	Sigma aldrich	99%
TGs : Glyceryl trioleate	Sigma aldrich	99%
1,2-DGs : Dipalmitoyl-rac-glycerol	Sigma aldrich	99%
1,3-DGs : 1,3 glyceryl 1,3 dipalmitate	Sigma aldrich	99%
1-MGs : DL- α palmitin	Sigma aldrich	99%
2-MGs : 2-palmitoyglycerol	Sigma aldrich	99%
AGLs : acide palmitique	Alfa aesar	>95%

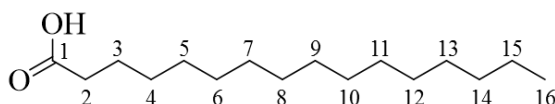
5.2. Identifications des standards par RMN

Pour faire la quantification des MDGs commerciaux et des standards, une masse connue de composé (MDGs ou huile végétale) a été dissoute dans 700 μL de CDCl_3 . Les expériences de RMN ^1H ont été réalisées avec un spectromètre Bruker Avance 300, équipé d'une sonde Dual ^{13}C - ^1H de 5 mm à 25 $^\circ\text{C}$.

Une séquence d'impulsions RMN conventionnelle avec un délai de relaxation de 3s, un angle d'impulsion de 30° et un temps d'acquisition de 5,29s ont été appliqués.

Les données RMN ont été traitées à l'aide du logiciel Topspin 3.6.1 (Bruker Biospin AG, Fallanden, Suisse) et un ajustement de phase ainsi qu'une correction de ligne de base polynomiale ont été effectués manuellement sur chaque spectre. Les déplacements chimiques de l'ensemble des molécules ont été relevés après avoir calibré les spectres à l'aide du trioxane : $\delta = 93.67$ Hz.

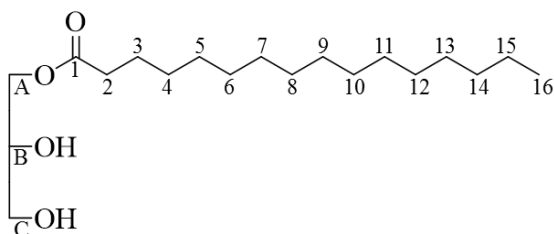
AGLs en C16 : acide palmitique



RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.88 (t, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH_3), 1.21-1.40 (m, 22H, $(\text{CH}_2)_{11}$), 1.63 (q, $J = 7.1$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 2.34 (t, $J = 7.35$ Hz, CH_2-CO)

RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14.2 (CH_3 ; C_{16}), 22.8 (CH_2 ; C_{15}), 32.0 (CH_2 ; C_{14}), 29.33, 29.45, 29.52, 29.68, 29.73, 29.75, 29.76, 29.77, 29.79 (CH_2 ; C_{5-13}), 29.1 (CH_2 ; C_3), 24.7 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.2 (CH_2-CO), 180.4 ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}$)

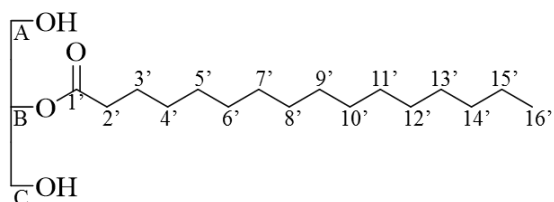
1-MGs en C16: α -monopalmitine



RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH_3), 1.17-1.37 (m, 34H, $(\text{CH}_2)_{17}$), 1.62 (q, $J = 7.3$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 2.34 (t, $J = 7.4$ Hz, CH_2-CO), 3.60 et 3.70 (ABd, $J = 3.9$; 5.8 ; 11.5 Hz, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}$), 3.92 (qapp, $-\text{CH}-\text{OH}$), 4.15 et 4.26 (dd, $J = 4.8$; 5.0, 16.5 Hz, $-\text{CH}_2-\text{OH}$)

RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14.2(CH_3 ; C_{16}), 22.7 (CH_2 ; C_{15}), 32.0 (CH_2 ; C_{14}), 29.32, 29.43, 29.53, 29.67, 29.72, 29.75, 29.76, (CH_2 ; C_{5-13}), 29.2 (CH_2 ; C_4), 24.9 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.2 (CH_2-CO), 63.4 ($-\text{C}_A\text{H}_2-\text{O}-\text{CO}-$), 70.3 ($-\text{C}_B\text{H}-\text{OH}$), 65.2 ($-\text{C}_C\text{H}_2-\text{OH}$) 174.4 ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}$)

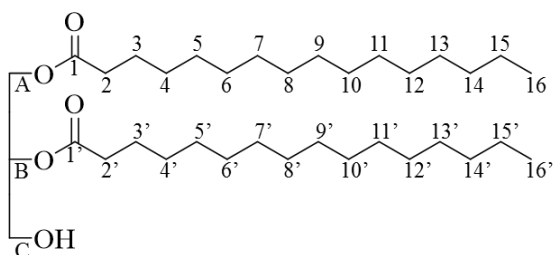
2-MGs en C16: 2-palmitoylglycerol



RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.88 (t, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH_3), 1.17-1.37 (m, 22H, $(\text{CH}_2)_{11}$), 1.64 (q, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 2.38 (t, $J = 7.4$ Hz, CH_2-CO), 3.84 (d, $J = 4.8$ Hz, 4H, $(\text{CH}_2-\text{OH})_2$), 4.93 (q, $J = 4.7$ Hz, $-\text{CH}-\text{O}-$)

RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14.2 (CH_3 ; $\text{C}_{16'}$), 22.7 (CH_2 ; $\text{C}_{15'}$), 32.0 (CH_2 ; $\text{C}_{14'}$), 29.34, 29.43, 29.54, 29.68, 29.73, 29.77 (CH_2 ; C_{5-13}), 29.2 (CH_2 ; C_4), 25.0 ($\text{C}_3\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.4 ($\text{C}_2\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 62.3 ($-\text{C}_A-\text{CH}_2-\text{OH}$)₂, 75.0, ($-\text{C}_B\text{H}-\text{OH}$), 174.2 ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}$)

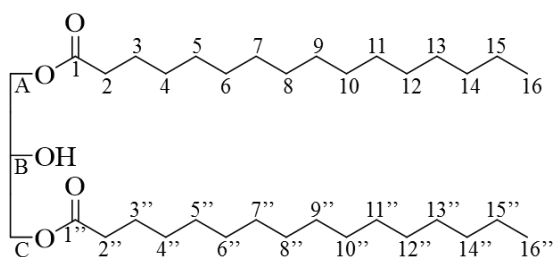
1,2-DGs en C16: 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol



RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.87 (t, 6H, $J = 6.5$ Hz, $(\text{CH}_3)_2$), 1.17-1.36 (m, 44H, $(\text{CH}_2)_{22}$), 1.61 (m, $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO})_2$), 2.33/2,31 ($\text{H}_{2-2'}$, t/t $J = 7.26/7,26$ Hz, $(-\text{CH}_2-\text{CO})_2$), 3.72 (d, $J = 5.1\text{Hz}$, $-\text{C}_\text{C}\text{H}_2-\text{OH}$) 4.33 et 4.22 (ABd, $J = 4.4, 5.7, 11.9$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}$), 5.05 (qapp, $J = 5.1$ Hz, $\text{CH}-\text{O}-\text{CH}-$)

RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14.2 (CH_3 ; $\text{C}_{16-16'}$), 22.9 (CH_2 ; $\text{C}_{15-15'}$), 32.0 (CH_2 ; $\text{C}_{14-14'}$), 29.34, 29.37, 29.45, 29.55, 29.57, 29.71, 29.75, 29.79 (CH_2 ; C_{5-13} et $5'-13'$), 29.2 (CH_2 ; C_4 ou $4'$), 29.2 (CH_2 ; C_4 ou $4'$), 24.9 ($\text{C}_{3 \text{ ou } 3'}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 25.0 ($\text{C}_{3 \text{ ou } 3'}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.4 ($\text{C}_{2-2'}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 61.6, $(-\text{C}_\text{C}\text{H}_2-\text{OH})$, 62.1, $(-\text{C}_\text{A}\text{H}_2-\text{O}-\text{CO})$, 72.2, $(-\text{C}_\text{B}\text{H}-\text{O}-\text{CO})$, 173.5 $(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_\text{I}'=\text{O})$, 173.8 $(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_\text{I}=\text{O})$

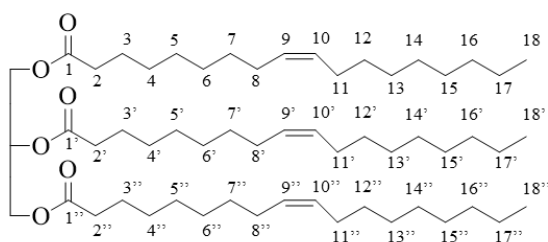
1,3-DGs en C16 : glyceryl-1,3-dipalmitate



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.86 (t, 6H, $J = 6.5$ Hz, $(\text{CH}_3)_2$), 1.22-1.34 (m, 44H, $(\text{CH}_2)_{22}$), 1.61 (m, $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO})_2$), 2.33 (t, $J = 7.4$ Hz, $(-\text{CH}_2-\text{CO})_2$), 4.07 (m $\text{CH}-\text{OH}$), 4.15 (m $(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}-)_2$)

RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14.2 (CH_3 ; $\text{C}_{16-16''}$), 22.8 (CH_2 ; $\text{C}_{15-15''}$), 32.0 (CH_2 ; $\text{C}_{14-14''}$), 29.35, 29.46, 29.56, 29.70, 29.75, 29.77, 29.77 (CH_2 ; C_{5-13} et $5''-13''$), 29.2 (CH_2 ; $\text{C}_{4-4''}$), 24.9 ($\text{C}_{3-3''}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.2 ($\text{C}_{2-2''}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 65.1 $(-\text{C}_\text{A-C}\text{H}_2-\text{OH})_2$, 68.4, $(-\text{C}_\text{B}\text{H}-\text{OH})$, 173.9 $(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_\text{I-I}''=\text{O})$

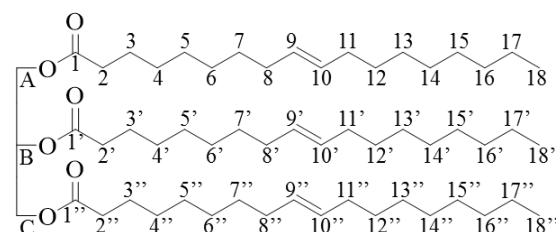
TGs en C16 : glyceryl tripalmitate



RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.87 (t, 6H, $J = 6.5$ Hz, $(\text{CH}_3)_3$), 1.17-1.37 (m, 66H, $(\text{CH}_2)_{33}$), 1.59 (m, $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO})_3$), 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz, $(-\text{CH}_2-\text{CO})_3$), 4.29 et 4.12 (ABd, $J=4.4$, 11.9 et 6.0 Hz, $(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}-)_2$), 5.25 (tt, $J=4.3$ et 6.0 Hz, $(-\text{CH}-\text{O}-\text{CH})$)

RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14.2 (CH_3 ; $\text{C}_{16-16'-16''}$), 22.8 (CH_2 ; $\text{C}_{15-15'-15''}$), 32.0 (CH_2 ; $\text{C}_{14-14'-14''}$), 29.38, 29.47, 29.51, 29.73, 29.77, 29.81 (CH_2 ; C_{5-13} et $5'-13'$), 29.22 (CH_2 ; $\text{C}_{4-4'}$), 29.2 (CH_2 ; $\text{C}_{4''}$), 24.9 ($\underline{\text{C}}_{3-3'''}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 25.0 ($\underline{\text{C}}_3\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.1 ($\underline{\text{C}}_{2-2''}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.3 ($\underline{\text{C}}_2\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 62.2 ($(-\underline{\text{C}}_{\text{A-C}}\text{H}_2-\text{OH})_2$), 68.9, $(-\underline{\text{C}}_{\text{B}}\text{H}-\text{OH})$, 172.9 ($(-\text{CH}_2-\text{O}-\underline{\text{C}}_{\text{I}}=\text{O})$), 173.3 ($(-\text{CH}_2-\text{O}-\underline{\text{C}}_{\text{I-I'}}=\text{O})$)

TG en C18 insaturé: glyceryl trioléate



RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 0.86 (t, 6H, $J = 6.5$ Hz, $(\text{CH}_3)_3$), 1.21-1.38 (m, 66H, $(\text{CH}_2)_{33}$), 1.60 (m, $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO})_3$), 1.99 (m, $(-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-)_3$), 2.29 (t, $J = 2.30$ Hz, $(-\text{CH}_2-\text{CO})_3$), 4.29 et 4.14 (ABd, $J = 4.4$, 6.0 et 11.9 Hz $(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}-)_2$), 5.25 (tt, $J=4.3$ et 6.0 Hz, $(-\text{CH}-\text{O}-\text{CH})$), 5.32 (m $((-\text{CH}=\text{CH}-)_3$)

RMN ^{13}C (300MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 14.2 (CH_3 ; $\text{C}_{18-18'-18''}$), 22.8 (CH_2 ; $\text{C}_{17-17'-17''}$), 32.0 (CH_2 ; $\text{C}_{16-16'-16''}$), 27.36, 27.31 ($\text{C}_{10}, \text{CH}=\text{CH}$), 29.38, 29.47, 29.51, 29.73, 29.77, 29.81 (CH_2 ; C_{5-13} et $5'-13'$), 29.22 (CH_2 ; $\text{C}_{4-4'}$), 29.2 (CH_2 ; $\text{C}_{4''}$), 24.9 ($\underline{\text{C}}_{3-3'''}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 25.0 ($\underline{\text{C}}_3\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.15 ($\underline{\text{C}}_{2-2''}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 34.3 ($\underline{\text{C}}_2\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CO}$), 62.2 ($(-\underline{\text{C}}_{\text{A-C}}\text{H}_2-\text{OH})_2$), 68.9, $(-\underline{\text{C}}_{\text{B}}\text{H}-\text{OH})$, 172.9 ($(-\text{CH}_2-\text{O}-\underline{\text{C}}_{\text{I}}=\text{O})$), 173.3 ($(-\text{CH}_2-\text{O}-\underline{\text{C}}_{\text{I-I'}}=\text{O})$)

5.3. Analyses de la composition en acide gras de l'huile par CPG

L'analyse du profil d'acide gras de l'huile de colza a été réalisée par l'ITERG (Institut des corps gras) situé à Pessac (33). Les esters méthyliques ont été préparés par transestérification directe des triglycérides en présence de BF_3 comme catalyseur, dans le méthanol à 5% de méthanolate de sodium (base). Ces esters ont ensuite été injectés sur un chromatographe en phase gazeuse (Agilent 6800) équipé d'un injecteur split/splitless et d'un détecteur FID. Pour cette étude, une colonne polaire a été spécifiquement utilisée : CP-Sil 88 (longueur : 100 m ; diamètre intérieur de 0.25 mm et épaisseur : 0.2 μm).

Les échantillons ont été injectés à 225 KPa dans une chambre d'injection à 250 °C (ratio d'injection : 1/10). En sortie, le détecteur FID est à 275 °C. Le programme d'analyse a été le suivant :

- La température du four est maintenue à 60 °C pendant 5 min
- La première rampe de température est de 15 °C/min, jusqu'à 165 °C
- La seconde rampe de température permet d'atteindre 225 °C à une vitesse de 2 °C/min
- Pour finir, un palier est maintenu à 225 °C pendant 20 min

Pour chaque ester méthylique d'acide gras, un facteur de réponse spécifique a été appliqué. La quantification a été réalisée en utilisant l'ester méthylique C11 comme référence.

5.4. Tension de surface

Dans le cas de notre étude, la tension de surface de nos systèmes a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre à goutte (DSA10 ; Kruss) qui permet de faire des mesures en analysant la forme de celles-ci. Avant toute mesure, des mesures de densité sur les différents milieux ont été réalisées à l'aide d'un pycnomètre de 5 mL et d'une balance de précision de marque Sartorius®. Toutes les mesures (densité et tension de surface) ont été réalisées à 22 °C $\pm$ 2 °C. La tension de surface a été déterminée après un temps d'équilibre de 30 secondes.

5.5. DSC

La DSC est ici utilisée pour déterminer les températures de fusion T_f et de cristallisation T_c des huiles végétales. Les deux creusets se trouvent dans un four qui chauffe et

refroidit à 5 °C/min. Chacun des thermocouples est relié à l'ordinateur qui fait la différence entre la température de l'échantillon et de la référence et les convertit ensuite en flux de chaleur.

L'étude de DSC est réalisée sur un appareil DSC 1 STARe System (Mettler Toledo). Une masse connue d'huile (≈ 20 mg) est pesée dans un creuset en aluminium de 40 μ L. Le programme appliqué est le suivant :

- Rampe de 25 °C à -80 °C (-40 °C/min)
- Isotherme de 10 min à -80 °C
- Rampe de -80 °C à 25 °C (5 °C/min)
- Isotherme de 10 min à 25 °C
- Rampe de 25 °C à -80 °C (-5 °C/min)

6. Références bibliographiques

- Alexandri, E., Ahmed, R., Siddiqui, H., Choudhary, M. I., Tsiafoulis, C. G., & Gerothanassis, I. P. (2017). High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution. *Molecules*, 22(10).
- Bella, G., & Rotondo, A. (2020). Theoretical prediction of ¹³C NMR spectrum of mixed triglycerides by mean of GIAO calculations to improve vegetable oils analysis. *Chemistry and Physics of Lipids*, 232, 104973.
- Biliaderis, C. G. (1983). Differential scanning calorimetry in food research—A review. *Food Chemistry*, 10(4), 239-265.
- Chumpitaz, L. D. A., Coutinho, L. F., & Meirelles, A. J. A. (1999). Surface tension of fatty acids and triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(3), 379-382.
- De Gennes, P. G., & Brochard-Wyart, F. (2005). *Gouttes, bulles, perles et ondes*: Humensis.
- Dias, A. N., Cerqueira, M. B. R., Moura, R. R. d., Kurz, M. H. S., Clementin, R. M., D'Oca, M. G. M., & Primel, E. G. (2012). Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography. *Fuel*, 94, 178-183.
- Fénart, É. (2004). Huile de colza et consommation alimentaire. *OCL*, 11(2), 150-152.
- Fernandes, J. L., de Souza, R. O., & de Vasconcellos Azeredo, R. B. (2012). ¹³C NMR quantification of mono and diacylglycerols obtained through the solvent-free lipase-catalyzed esterification of saturated fatty acids. *Magn Reson Chem*, 50(6), 424-428.
- Gassin, P.-M. (2014). Mesure de la tension superficielle par la technique de la goutte pendante. *Bulletin de l'union des physiciens (BUP)*, 963.
- Grenet, J., & Legendre, B. (2010). Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC). *Techniques de l'ingénieur Méthodes thermiques d'analyse, base documentaire : TIB384DUO*(ref. article : p1205).
- Gros, A. T., & Feuge, R. O. (1952). Surface and interfacial tensions, viscosities, and other physical properties of some n-aliphatic acids and their methyl and ethyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 29(8), 313-317.
- Guillén, M. a. D., & Ruiz, A. (2001). High resolution ¹H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends in Food Science & Technology*, 12(9), 328-338.
- Gunstone, F. D. (1991). ¹³C-NMR studies of mono-, di-and tri-acylglycerols leading to qualitative and semiquantitative information about mixtures of these glycerol esters. *Chemistry and Physics of Lipids*, 58(3), 219-224.
- Hussein, L., Mohammad, M., Abouelhassan, A., Grzeskiewicz, S., & Cantellops, D. (2001). Assessment of the fatty acid patterns in vegetable oils, fats and fat-rich foods commonly consumed in Egypt. *Grasas y Aceites*, 52.
- Jie, M. S., & Mustafa, J. (1997). High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy--applications to fatty acids and triacylglycerols. *Lipids*, 32(10), 1019-1034.
- Konuskan, D. B., Arslan, M., & Oksuz, A. (2019). Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 340-344.

- Kostik, V., Memeti, S., & Bauer, B. (2013). Fatty acid composition of edible oils and fats. *J. Hyg. Eng. Des.*, 4, 112-116.
- Kumar, A., Sharma, A., & C. Upadhyaya, K. (2016). Vegetable Oil: Nutritional and Industrial Perspective. *Current Genomics*, 17(3), 230-240.
- Le Neindre, B. (1993). Tensions superficielles et interfaciales. *Techniques de l'ingénieur Constantes mécaniques et viscosité, base documentaire : TIB339DUO*(ref. article : k475).
- Levy, G. C., & Cargioli, J. D. (1973). Spin-lattice relaxation in solutions containing Cr(III) paramagnetic relaxation agents. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 10(2), 231-234.
- Ng, S. (2000). Quantitative analysis of partial acylglycerols and free fatty acids in palm oil by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(7), 749-755.
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2014). A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. *Food Research International*, 66, 379-387.
- Plank, C., & Lorbeer, E. (1995). Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 697(1), 461-468.
- Sek, L., Porter, C. J. H., & Charman, W. N. (2001). Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(3), 651-661.
- Stolyhwo, A., Colin, H., & Guiochon, G. (1985). Analysis of triglycerides in oils and fats by liquid chromatography with the laser light scattering detector. *Analytical chemistry*, 57(7), 1342-1354.
- Thomas, A., Matthäus, B., & Fiebig, H.-J. (2015). Fats and Fatty Oils. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (pp. 1-84): Wiley - VCH.
- Vingering, N., Oseredczuk, M., du Chaffaut, L., Ireland, J., & Ledoux, M. (2010). Fatty acid composition of commercial vegetable oils from the French market analysed using a long highly polar column. *OCL*, 17(3), 185-192.
- Vlahov, G. (1999). Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 35(4), 341-357.
- Xing, C., Yuan, X., Wu, X., Shao, X., Yuan, J., & Yan, W. (2019). Chemometric classification and quantification of sesame oil adulterated with other vegetable oils based on fatty acids composition by gas chromatography. *LWT - Food Science and Technology*, 108, 437-445.

Chapitre 3 :

Lipolyses enzymatiques des huiles végétales

Tables des matières

1. Introduction.....	141
2. Principe de la lipolyse enzymatique sur une huile végétale	142
3. Lipolyse enzymatique de l'huile de colza avec l'enzyme Sumizyme® NLS.....	143
3.1. Suivi par indice d'acidité.....	145
3.2. Suivi par tension de surface.....	146
3.3. Identification des molécules formées au cours de la lipolyse	147
3.3.1. Analyse CPG	148
3.3.2. Analyses RMN	150
3.3.2.a. RMN ¹ H.....	150
3.3.2.b. RMN ¹³ C.....	152
3.4. Etude de recyclage de l'enzyme Sumizyme® NLS	156
3.4.1. Suivi par indice d'acidité	156
3.4.2. Analyse RMN ¹³ C.....	157
4. Lipolyse avec changement du substrat	159
4.1. Suivi par indice d'acidité.....	159
4.2. Analyse RMN ¹³ C.....	160
5. Lipolyse avec changement d'enzyme	162
5.1. Suivi par mesures d'indice d'acidité.....	163
5.2. Suivi par tension de surface.....	165
5.3. Analyse RMN ¹³ C.....	166
5.3.1. Production en AGLs	167
5.3.2. Production en DGs	169
5.3.3. Production en MGs.....	170
5.4. Analyse thermique des huiles hydrolysées	171
6. Conclusion et perspectives	174
7. Partie expérimentale	177
7.1. Produits commerciaux utilisés.....	177

7.2. Réactions enzymatiques	177
7.2.1. Activation des enzymes	177
7.2.2. Catalyse en milieu émulsionné	178
7.2.3. Prélèvements et inactivation des enzymes	178
7.2.4. Recyclage des enzymes	178
7.3. Détermination de l'indice d'acidité	178
7.4. Détermination de l'indice de peroxyde.....	179
7.5. Analyse CPG	180
7.6. Analyse RMN.....	180
7.6.1. RMN ^1H	180
7.6.2. RMN ^{13}C	1807
7.7. Analyse DSC	180
9. Références bibliographiques	182

1. Introduction

Dans les produits alimentaires, l'ajout exogène de MDGs doit être mentionné sur l'étiquette comme additif avec le code E471. A l'heure actuelle, les fabricants souhaitent limiter le nombre d'additifs. Pour cela, afin d'éviter cette mention, ils peuvent totalement repenser leur formulation ou bien avoir recours à des auxiliaires technologiques comme les lipases dans l'objectif de mimer les fonctionnalités initiales. Par réaction de lipolyse enzymatique, elles vont générer *in situ*, au moment de la fabrication, des MDGs par hydrolyse des lipides présents dans la matrice (issue de la farine, matières grasses, ...). En fin de production, les auxiliaires technologiques sont dénaturés par action thermique mais restent cependant présents sous forme inerte dans le produit commercialisé. Dans ce cas, l'usage de la lipase est unique. Bien que la réglementation actuelle n'impose pas leur mention sur l'étiquette, celle-ci pourrait évoluer en étiquetant à terme l'enzyme et/ou son support d'immobilisation. Pour remédier à la présence de ces auxiliaires technologiques dans le produit fini, l'objectif est de développer une stratégie en travaillant sur un seul ingrédient en amont de la fabrication. Le but est d'obtenir une huile végétale enrichie *in situ* en MDGs et la rendre ainsi fonctionnelle. Pour cela, dans ce chapitre, nous avons étudié la réaction de lipolyse enzymatique sur des huiles végétales avec différentes lipases.

Après une brève introduction du principe de la lipolyse enzymatique sur une huile végétale, nous développerons la réaction de lipolyse enzymatique de l'huile végétale de colza avec l'enzyme Sumizyme® NLS (non-OGM et non auto-clonée). Des études menées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par résonance magnétique nucléaire (RMN), permettront d'évaluer la nature des molécules formées lors de la réaction de lipolyse et d'en déterminer leurs teneurs en fonction du temps de réaction. Le recyclage de l'enzyme et sa réutilisation potentielle seront également abordés. La seconde partie de ce chapitre sera dédiée à l'utilisation de différents substrats et enzymes pour ces réactions de lipolyse enzymatique. Tout d'abord, nous ferons varier la nature de l'huile et testerons la réaction de l'enzyme Sumizyme® NLS sur l'huile de tournesol. Nous étudierons aussi l'influence et l'efficacité de différentes enzymes sur la lipolyse de l'huile de colza (teneurs en TGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs, 1-MGs, 2-MGs et AGLs). Enfin, des analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permettront de mettre en évidence des modifications des propriétés thermiques des huiles indépendamment des enzymes utilisées.

2. Principe de la lipolyse enzymatique sur une huile végétale

Nous avons vu dans le chapitre consacré à l'étude bibliographique que les enzymes portent le nom des substrats qu'elles transforment. A ce titre, une lipase va hydrolyser les lipides qui sont, dans le cas de l'huile, constitués de triglycérides (TGs). Dans le domaine de l'agroalimentaire, ces enzymes sont directement utilisées au cours de la fabrication et sont généralement dénaturées lors d'un processus de chauffage (Benejam, *et al.*, 2009; Colakoglu & Özkaya, 2012). Du fait de leur statut d'auxiliaires technologiques, l'utilisation des enzymes s'est largement répandue au cours des dernières années (Collados, *et al.*, 2020; Koksel & Scanlon, 2018; Li, *et al.*, 2012). Nous avons travaillé sur une stratégie basée sur la réaction de lipolyse enzymatique directe entre une lipase et un corps gras de type huile végétale liquide. Pour cela, il faut mettre en contact le substrat (huile) avec son catalyseur (lipase). Or cette dernière est soluble dans une phase aqueuse, alors que les TGs présents dans l'huile sont par nature hydrophobes (Plou, *et al.*, 1996; Sarda & Desnuelle, 1958; Zaks, *et al.*, 1989). Cette incompatibilité limite la réaction qui se déroule au niveau de l'interface et de ce fait le rendement de l'hydrolyse risque d'être faible (Figure 3.1(A)).

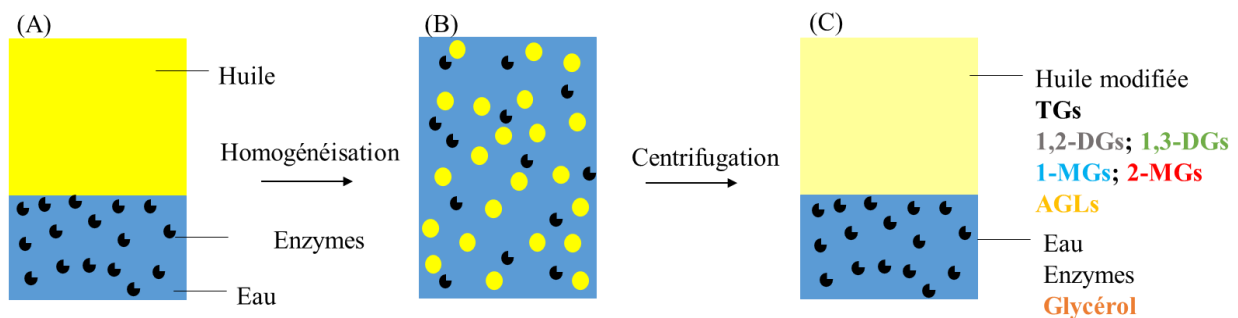


Figure 3.1 : Principe de la réaction enzymatique.

Pour améliorer les paramètres réactionnels (rendement, sélectivité...), il est nécessaire d'augmenter la surface d'échange entre ces deux phases (Figure 3.1(B)). Cette manière de procéder porte le nom de catalyse en milieu émulsionnant et a déjà été décrite dans le cas de la lipase pancréatique (Benzonana & Desnuelle, 1965 ; Borel, *et al.*, 1994). Plus l'émulsion directe huile/eau (H/E) sera fine, plus la surface d'échange sera importante et donc meilleur sera le rendement de l'hydrolyse. Après réaction, la phase grasse est récupérée par centrifugation du milieu. Elle contient le reste de TGs et est alors enrichie en diglycérides (1,2-DGs et 1,3-DGs), monoglycérides (1-MGs et 2-MGs) et acides gras libres (AGLs). Cette phase peut être ensuite

utilisée telle quelle dans la fabrication de produits alimentaires (Figure 3.1(C)). La phase aqueuse, qui contient les enzymes et le glycérol formé est conservée dans l'éventualité d'une nouvelle réaction de lipolyse. Un tel procédé présente de multiples avantages :

- Pas de contact direct des lipases avec le produit fini ;
- Les enzymes sont isolées au cours du procédé de fabrication ;
- Les enzymes peuvent être réutilisées ;
- L'huile végétale liquide est standardisée, ce qui assure la répétabilité du procédé.

Nous allons voir par la suite, la faisabilité de la réaction entre l'huile de colza et l'enzyme Sumizyme[®] NLS. Le suivi de la lipolyse sera assuré par la mesure de l'indice d'acidité et de la tension de surface des huiles hydrolysées. Des analyses plus approfondies menées essentiellement par RMN (¹H et ¹³C) et CPG, permettront une caractérisation et une quantification des molécules formées *in-situ*.

3. Lipolyse enzymatique de l'huile de colza avec l'enzyme Sumizyme[®] NLS

Pour l'étude présentée, l'enzyme Sumizyme[®] NLS (50 000 U/g) utilisée est non-OGM et non auto-clonée et se présente sur un support constitué de maltodextrine (50%). Elle est issue d'un champignon : l'*Aspergillus Niger* et est obtenue selon une fermentation traditionnelle japonaise. Il s'agit là d'un ensemencement réalisé sur du son de blé suivi par une fermentation aqueuse de surface (Koji). Comme évoqué précédemment dans la partie réglementaire, les lipases doivent être affichées sur une liste positive pour pouvoir être utilisées. Certaines lipases sont aujourd'hui autorisées mais celles-ci sont exclusivement OGM. La stratégie que nous avons choisi d'explorer vise un aspect « clean-label » mais nous souhaitons pouvoir l'adapter au développement de produits bio. Dans cet univers, seules les enzymes non-OGM peuvent être utilisées (validation par l'organisme ECOCERT). Or, aucune lipase non-OGM n'est actuellement autorisée et seule l'enzyme Sumizyme[®] NLS fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès de la Commission Européenne. Il apparaît donc essentiel de prendre de l'avance et maîtriser le fonctionnement de cette enzyme en cas de future autorisation.

D'après les informations du fournisseur, le profil des produits obtenus lors de la réaction est généralement large du fait que l'enzyme soit non-OGM et obtenue par un processus naturel. Chaque enzyme possède des conditions d'utilisation spécifiques et optimales. Dans le

cas de l'enzyme NLS, le pH d'utilisation est compris entre 4 et 8 à une température de 37 °C. L'activité et la stabilité sont très dégradées au-delà d'un pH supérieur à 9 et d'une température supérieure à 50 °C (Figure 3.2).

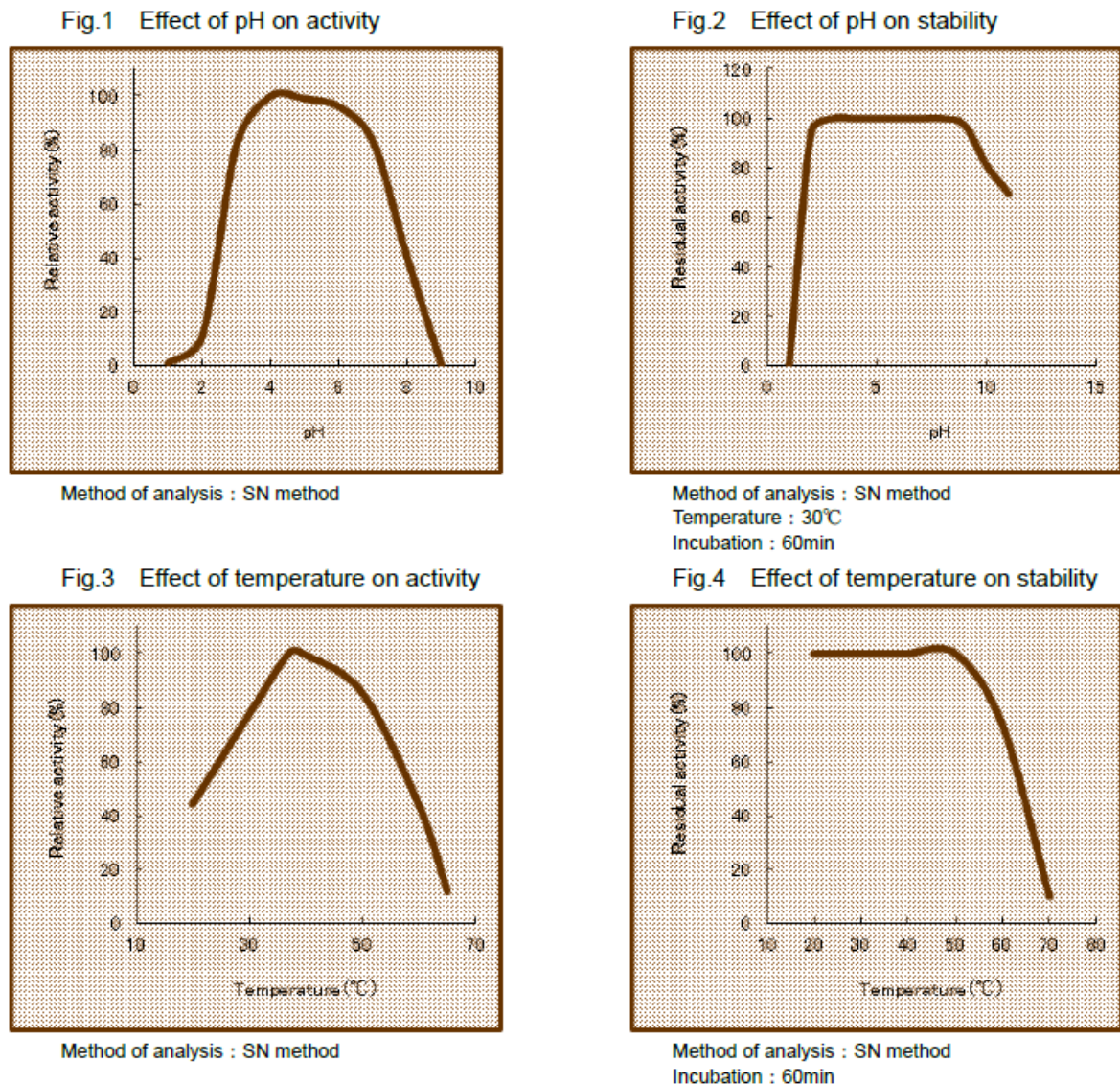


Figure 3.2 : Activité et stabilité de l'enzyme Sumizyme® NLS (fiche technique Takabio).

Nous avons donc réalisé les réactions enzymatiques sur la base de ces recommandations. Après avoir fait quelques tests préliminaires (quantité d'eau, quantité d'enzymes, ...), les ratios sélectionnés mis en jeu sont les suivants : 55% d'huile de colza, 43% d'eau (pH $\approx$ 7) et 2% d'enzyme, à une température de 37 °C. Dans ces proportions, la teneur en huile est suffisamment élevée pour permettre une bonne efficacité de la lipolyse tout en étant inférieure au Random Close Packing, ce qui permet donc de garder une bonne fluidité de l'émulsion et favoriser les échanges. De façon à étudier la cinétique de la réaction, des

prélèvements ont été réalisés à différents temps de réactions variant de 30 minutes à 24 heures. Au final chaque prélèvement a été caractérisé par des mesures d'indice d'acidité (I_A) et de tension de surface (γ).

3.1. Suivi par indice d'acidité

L'indice d'acidité (I_A) se révèle être un bon indicateur de suivi de la lipolyse enzymatique. Cette technique consiste à doser les acides gras libres présents dans le milieu. En effet, plus l'enzyme sera efficace, meilleure sera l'hydrolyse des TGs, et donc plus la présence d'AGLs sera importante. La mesure de l'acidité (exprimé par l'indice associé, I_A) se fait par un dosage en retour (exprimé en mg de KOH/g d'huile).

Nous pouvons observer (Figure 3.3) que la valeur de l' I_A augmente fortement entre 0 et 2h de réaction (de 11 à 86 mg de KOH/g d'huile) ; au-delà, l'augmentation est plus nuancée (de 86 à 113 mg de KOH/g d'huile à 24h). Une mesure complémentaire est la détermination des indices de peroxyde (I_P). En effet, il est fondamental de vérifier si une éventuelle oxydation des huiles au cours de ces réactions enzymatiques (Firestone & Yurawecz, 2002). Nous avons constaté que les valeurs mesurées n'évoluent pas au cours de la cinétique (estimé à 3 milliéquivalents de O_2 /kg d'huile pour une huile de colza et 4 milliéquivalents de O_2 /kg d'huile pour une huile hydrolysée 24h), les écarts n'étant pas significatifs, nous pouvons considérer il n'y a donc pas oxydation de l'huile durant son hydrolyse.

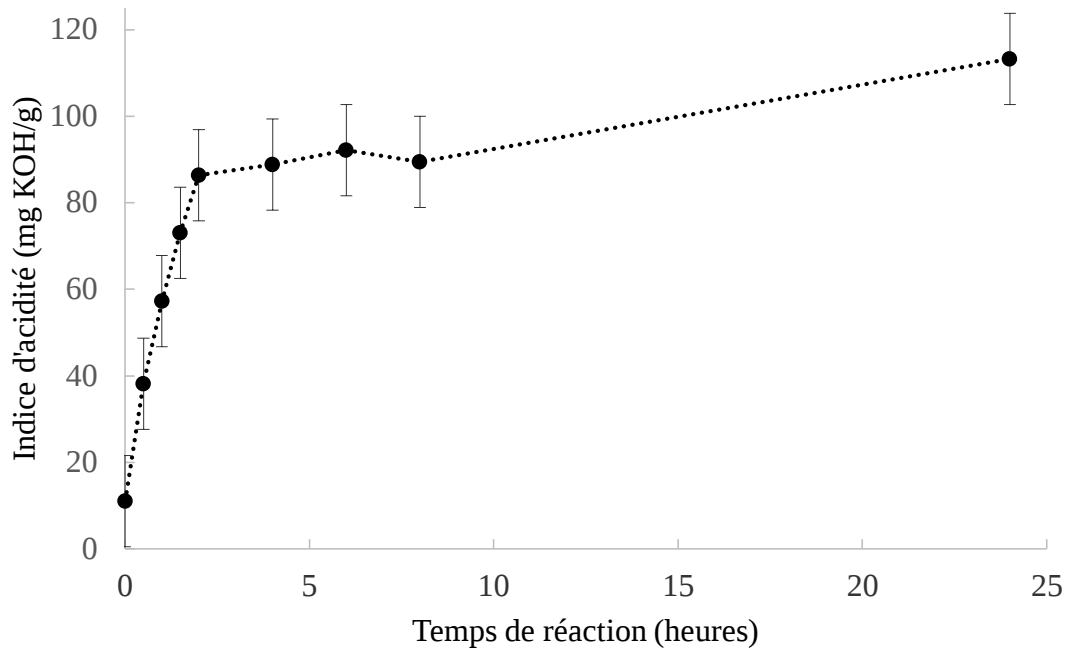


Figure 3.3 : Evolution de l' I_A au cours de la lipolyse enzymatique.

L'évolution de l' I_A met en évidence la formation d'AGLs. Ainsi, nous pouvons valider que la mise en contact direct de la lipase avec l'huile de colza par catalyse émulsifiante permet, dans nos conditions opératoires, l'hydrolyse de l'huile de colza. Toutefois, à ce stade nous n'avons pas d'informations sur la sélectivité de l'enzyme utilisée. Cette méthode ne permet pas d'identifier quels types de dérivés sont formés au cours de la réaction. Les DGs, MGs ainsi que les AGLs présentent tous des propriétés tensioactives, nous avons réalisé des mesures de tension de surface afin de vérifier leurs formations.

3.2. Suivi par tension de surface

La présence de DGs, MGs et AGLs dans l'huile hydrolysée devrait induire un abaissement de la tension de surface du fait de leurs propriétés tensioactives. Compte tenu des faibles valeurs de HLB des MDGs, les mesures de tension de surface ont été réalisées à l'aide d'un tensiomètre à goutte en simulant une émulsion inverse (goutte d'eau dans l'huile hydrolysée).

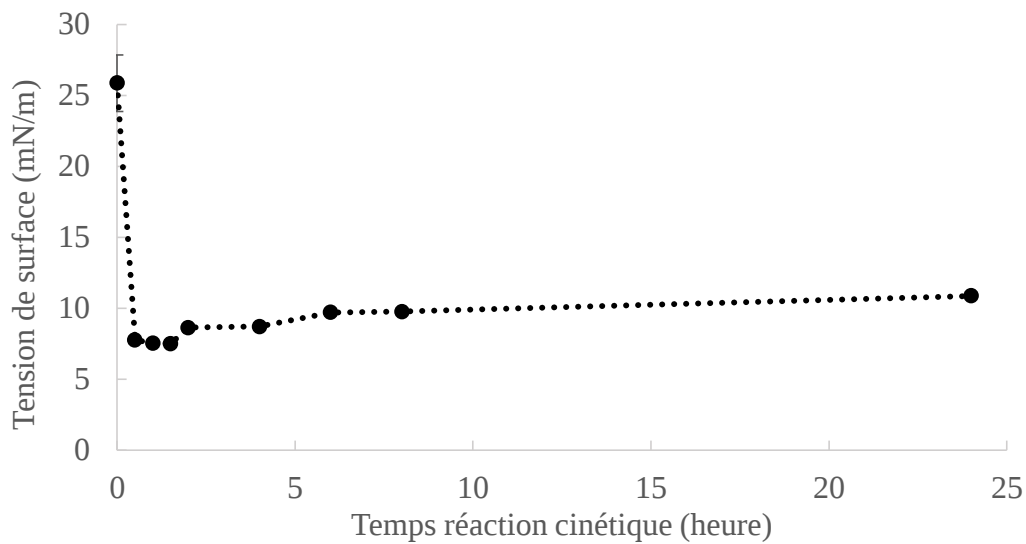


Figure 3.4 : Evolution de la tension de surface γ au cours de la lipolyse enzymatique.

Nous pouvons observer que la tension de surface diminue de manière drastique après 30 min de réaction d'hydrolyse. Elle passe ainsi de $26 \text{ mN/m} \pm 2$ pour l'huile de colza à $8 \text{ mN/m} \pm 0.2$ et se stabilise jusqu'à 1h30 de réaction (Figure 3.4). Une légère ré-augmentation est observée entre 2h et 24h de réaction (8 à $11 \text{ mN/m} \pm 0.2$). Celle-ci, bien que faible mais suffisamment significative au vu des faibles incertitudes de mesure, peut se traduire par la production d'un tensioactif à HLB plus élevé dans l'huile (Lee, *et al.*, 2018; Shimada & Ohashi, 2003). En effet, parmi les molécules susceptibles d'être hydrolysées et au pH de notre milieu ($> 4,6$), seuls les AGLs (présents sous la forme anionique, COO^-) ont une valeur de HLB élevée. Une hypothèse pourrait être que l'hydrolyse se déroule en deux étapes avec dans un premier temps la formation de DGs et MGs (HLB faible) puis dans un second temps leurs éventuelles hydrolyses libérant alors des AGLs.

3.3. Identification des molécules formées au cours de la lipolyse

Le suivi de la réaction de lipolyse par mesures de l'indice d'acidité et de la tension de surface nous a montré que l'huile de colza s'hydrolysait pour former *in situ* des émulsifiants. En revanche, ces analyses ne nous permettent pas de déterminer le profil précis des molécules formées en fonction du temps d'hydrolyse. Une caractérisation plus approfondie a donc été menée par CPG et RMN, suivant la méthodologie utilisée pour la caractérisation des MDGs standards.

3.3.1. Analyse CPG

C'est une technique très répandue pour isoler et caractériser des composés au sein d'un mélange complexe. Elle nous permet de connaître précisément les longueurs des chaînes des AGLs mais également la présence et le nombre d'insaturation. De plus, il est également possible de caractériser les différents esters de glycérol des corps gras analysés et leurs proportions en TGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs, MGs et AGLs dans les huiles hydrolysées (Dias, *et al.*, 2012; Plank & Lorbeer, 1995). Nous avons donc utilisé cette technique afin de connaître les molécules formées au cours de la lipolyse enzymatique. Les résultats exprimés d'abord en pourcentages massiques ont été recalculés en nombre de moles en nous aidant des masses molaires déterminées et présentées lors du chapitre précédent. Au final, nous avons donc pu obtenir la composition molaire de l'huile hydrolysée en fonction du temps de lipolyse. Nous constatons, comme attendu, que la concentration en TGs, diminue au cours de la réaction. Par la suite, cette consommation est plus modérée pour attendre un plateau après 24h avec 76% de conversion (Figure 3.5).

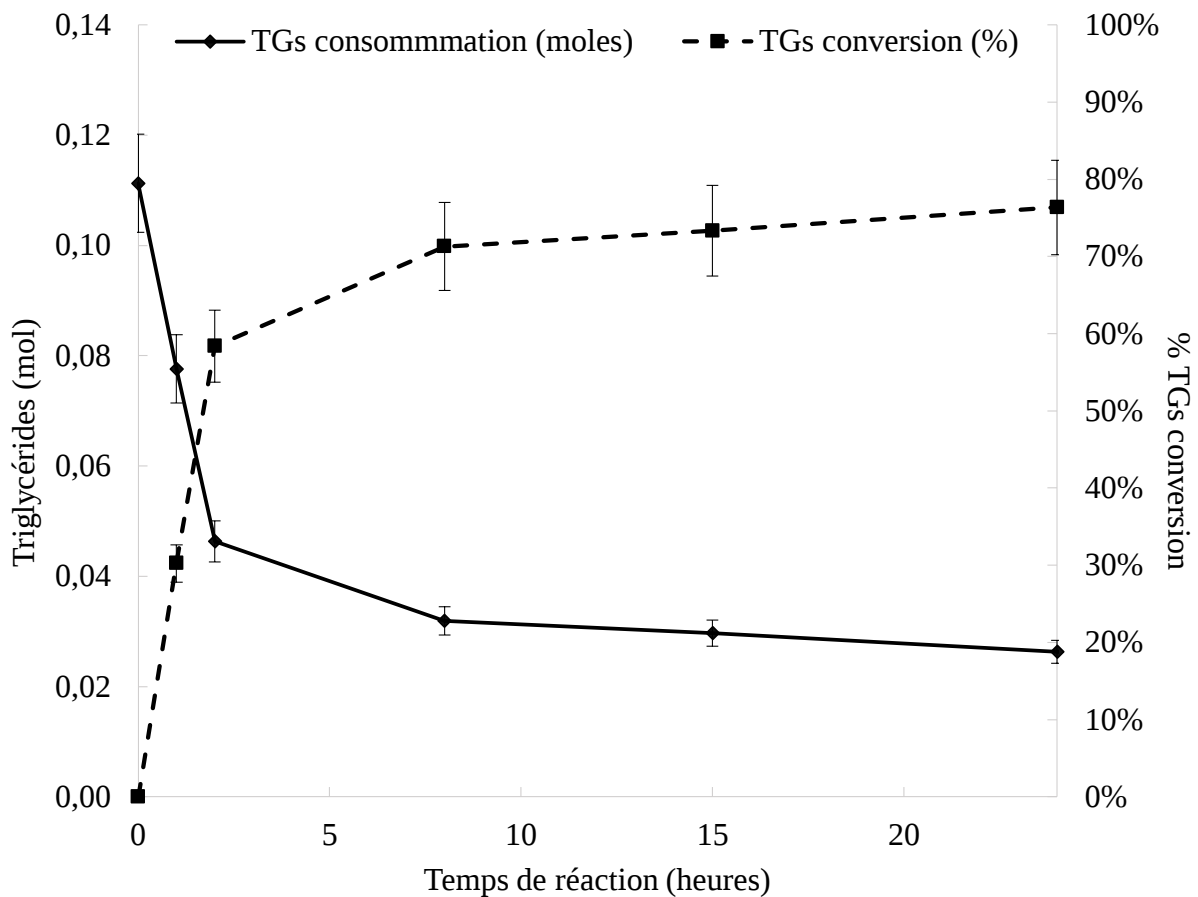


Figure 3.5 : Evolution de consommation des TGs au cours de la lipolyse enzymatique.

Au début de la lipolyse, la quantité de TGs est de 0,11 mol. Après 2h de réaction, nous notons une forte hydrolyse des TGs puisque le taux de conversion avoisine les 60 %. Par la suite, cette consommation est plus modérée pour atteindre un plateau après 24h avec 76% de conversion.

En parallèle de l'hydrolyse des TGs, la teneur en AGLs augmente de manière continue (Figure 3.6, courbe jaune en pointillée, axe secondaire). Initialement, l'huile de colza contient très peu d'AGLs (< 1 mmol) alors que l'huile hydrolysée en contient 210 mmol au bout de 24 heures de réaction. Ces résultats sont cohérents avec ce que nous avons pu observer lors des analyses d'indices d'acidité.

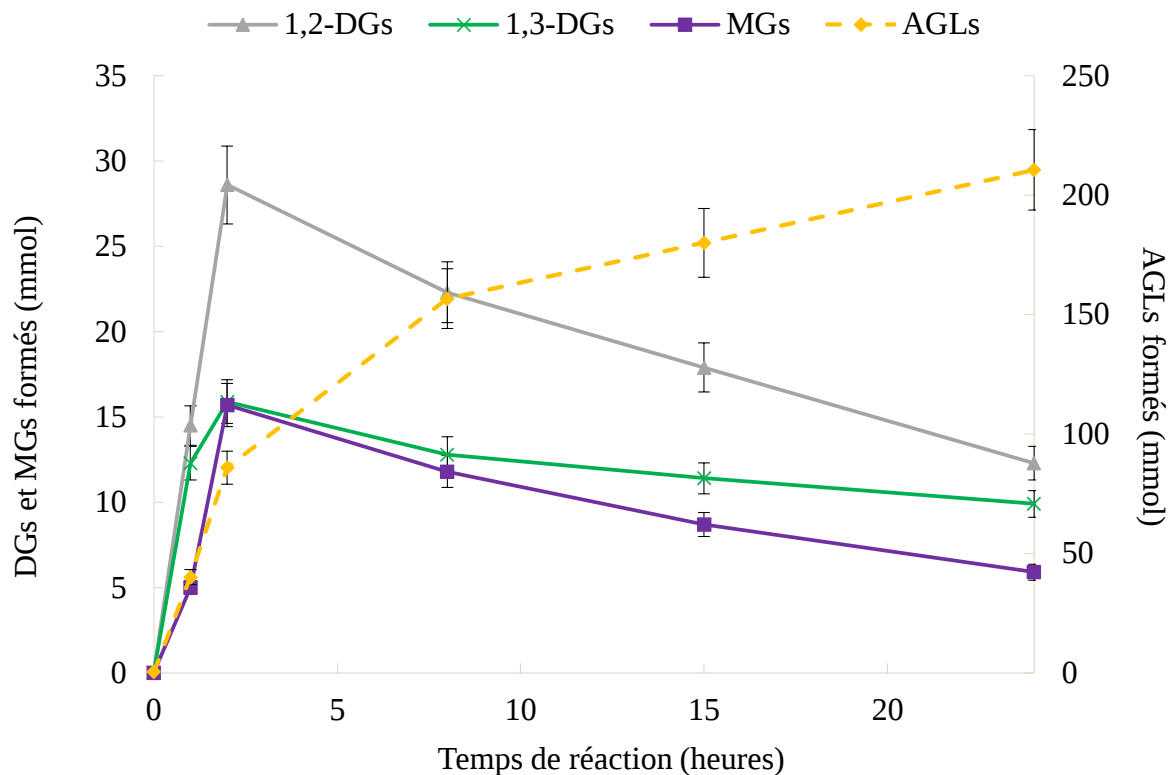


Figure 3.6 : Evolutions des DGs, MGs et AGLs formés au cours de la lipolyse enzymatique.

En se focalisant, à présent, sur les DGs et MGs, nous observons que pour chacun de ces produits, une teneur maximale est obtenue à 2 heures de réaction (28,6 mmol pour le 1,2-DGs, 15,9 mmol pour le 1,3-DGs et 15,7 mmol pour les MGs). Au-delà et ce jusqu'à 24 heures nous observons une diminution, signe de leur hydrolyse par la lipase. Les MGs sont eux transformés en AGLs et en glycérol. Cependant, les DGs pouvant être hydrolysés sur deux fonctions, ils peuvent, dans le cas d'une hydrolyse partielle, former des MGs ou uniquement des AGLs, dans le cas d'une hydrolyse totale.

L'ensemble de ces résultats permet de confirmer que l'hydrolyse de l'huile de colza par l'enzyme NLS entraîne une disparition partielle des TGs et la formation *in situ* d'AGLs, de 1,2-DGs, 1,3-DGs et de MGs. Les isomères de positions des MGs ayant des temps de rétention très proches par CPG, cette méthode montre ses limites en vue de leur quantification.

3.3.2. Analyses RMN

En suivant la méthodologie présentée dans le chapitre 2, permettant d'analyser des mélanges complexes de MDGs par RMN ^1H et ^{13}C à l'aide de standards, nous avons eu la possibilité de bien distinguer et quantifier les 1-MGs et les 2-MGs. Nous allons donc utiliser cette méthodologie à des fins de complémentarité avec la CPG.

3.3.2.a. RMN ^1H

Les signaux des MGs sont facilement identifiables avec un déplacement chimique aux alentours de 3,9 ppm pour les 1-MGs et de 4,9 ppm pour les 2-MGs. Ceci va permettre de déterminer le pourcentage respectif en calculant les ratios (Figure 3.7).

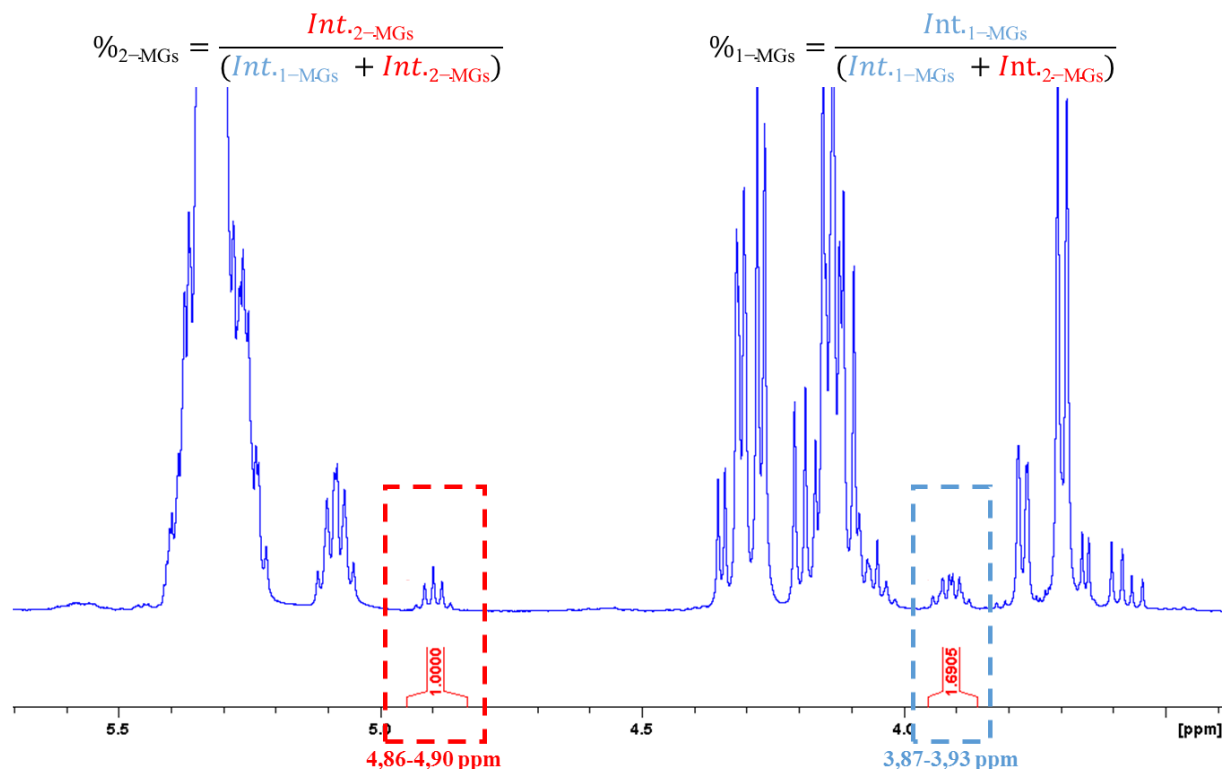


Figure 3.7 : Spectre RMN ^1H de l'huile hydrolysée avec déplacement chimique des 1-MGs (bleu) et 2-MGs (rouge) et méthode de calcul des ratios (500MHz, CDCl_3 , 25 °C).

En couplant ces pourcentages pour chaque prélèvement avec les données molaires de MGs totales obtenues par CPG, nous avons pu déterminer la teneur molaire de chacun des isomères (1-MGs et 2-MGs) en fonction du temps de lipolyse (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Données des teneurs en 1-MGs et 2-MGs présents dans l'huile hydrolysée en fonction du temps de réaction.

Temps de réaction (h)	MGs	1-MGs		2-MGs	
	Teneur totale ^a (mmol)	Proportion ^b (%)	Teneur ^c (mmol)	Proportion ^b (%)	Teneur ^c (mmol)
0	0	0	0	0	0
1	5,1	80	4,08	20	1,02
2	15,7	60	9,42	40	6,28
8	11,8	75	8,85	25	2,95
15	8,7	75	6,53	25	2,17
24	5,9	80	4,72	20	1,18

^a déterminée par GPG ; ^b déterminé par RMN ¹H; ^c teneur = teneur totale MGs x (% 1-MG ou 2-MGs)/100.

La concentration maximale en MGs est obtenue pour 2 heures de réaction (15,7 mmol) où la proportion en 1-MGs est de 9,42 mmol et celle en 2-MGs de 6,28 mmol (ratio de 60/40 en 1-MGs/2-MGs). Nous constatons également qu'au bout de 24 heures, ces isomères sont tous les deux hydrolysés, leurs teneurs se rapprochant de celles obtenues au bout de 1 heure de réaction (4,72 mmol pour les 1-MGs et de 1,18 mmol pour les 2-MGs). Ces analyses RMN ¹H nous ont donc permis de déterminer la composition en 1-MGs et 2-MGs alors que les analyses CPG nous avaient permis de déterminer la teneur en TGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs et AGLs. La combinaison de ces deux techniques, nous donne donc le profil complet de l'huile hydrolysée au cours de la lipolyse enzymatique (Figure 3.8).

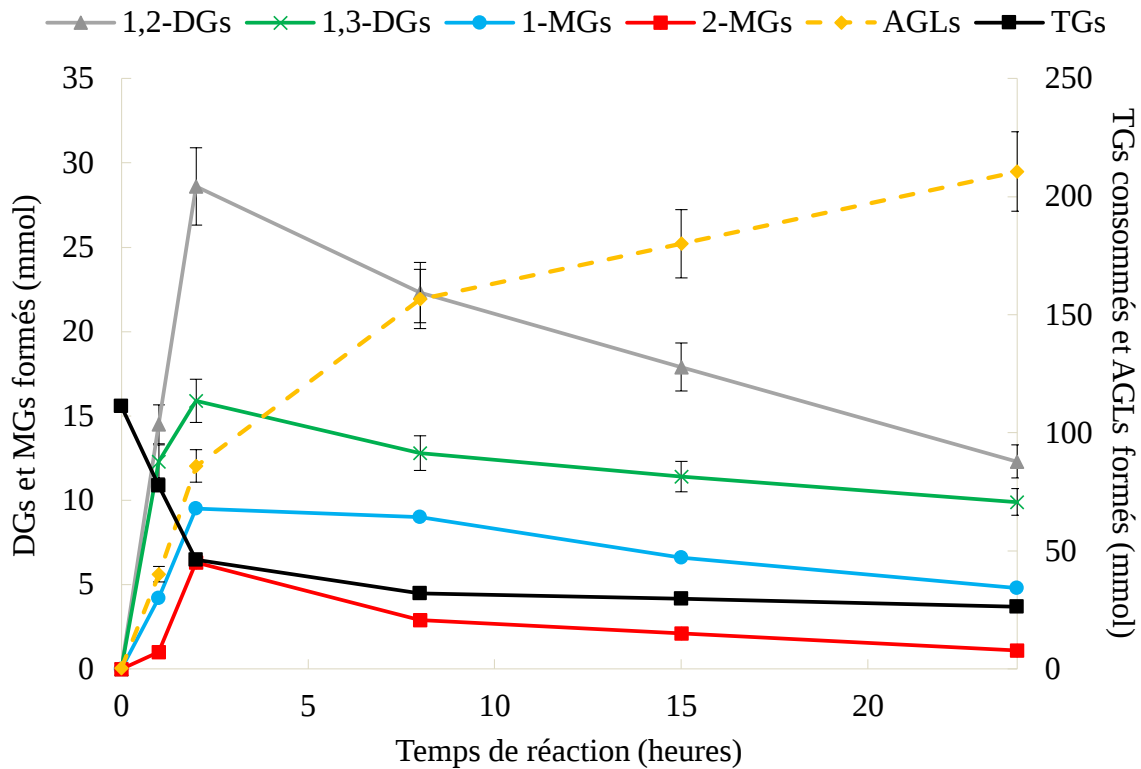


Figure 3.8 : Evolution des différentes teneurs des molécules au cours de la lipolyse enzymatique.

Le profil réactionnel complet ayant été obtenu par deux méthodes, nous avons souhaité savoir si la RMN ^{13}C ne pouvait pas être utilisée directement afin de qualifier la composition des huiles durant la lipolyse. En effet, comme détaillé dans le chapitre 2, l'analyse des MDGs et AGLs est possible directement par RMN ^{13}C . L'objectif est donc de comparer les résultats entre cette méthode et le couplage entre RMN ^1H et CPG.

3.3.2.b. RMN ^{13}C

Nous avons dans un premier temps analysé l'huile hydrolysée par l'enzyme NLS, au bout de 2 heures de réaction. En effet, cette huile hydrolysée présente la teneur maximale en DGs et MGs. A l'aide de la RMN ^{13}C et de l'identification des standards d'AGLs, de MGs, de DGs et de TGs, nous avons pu attribuer les différents signaux correspondants aux TGs et aux autres molécules issues de l'hydrolyse de l'huile de colza (Figure 3.9(A)). Pour cela, trois zones de déplacements chimiques nous intéressent :

- La zone aux alentours de 14 ppm correspondant aux groupements méthyles ($-\text{CH}_3$) communs à toutes les molécules ;

- La zone entre 68 et 76 ppm correspondant aux groupements ($-\text{CH}_2\text{-O}$ ou $-\text{CH-O}$) des structures glycérol des 1-MGs, 2-MGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs et TGs ;
- La zone aux alentours de 180 ppm correspondant aux groupements carbonyle ($-\text{C=O}$) des AGLs.

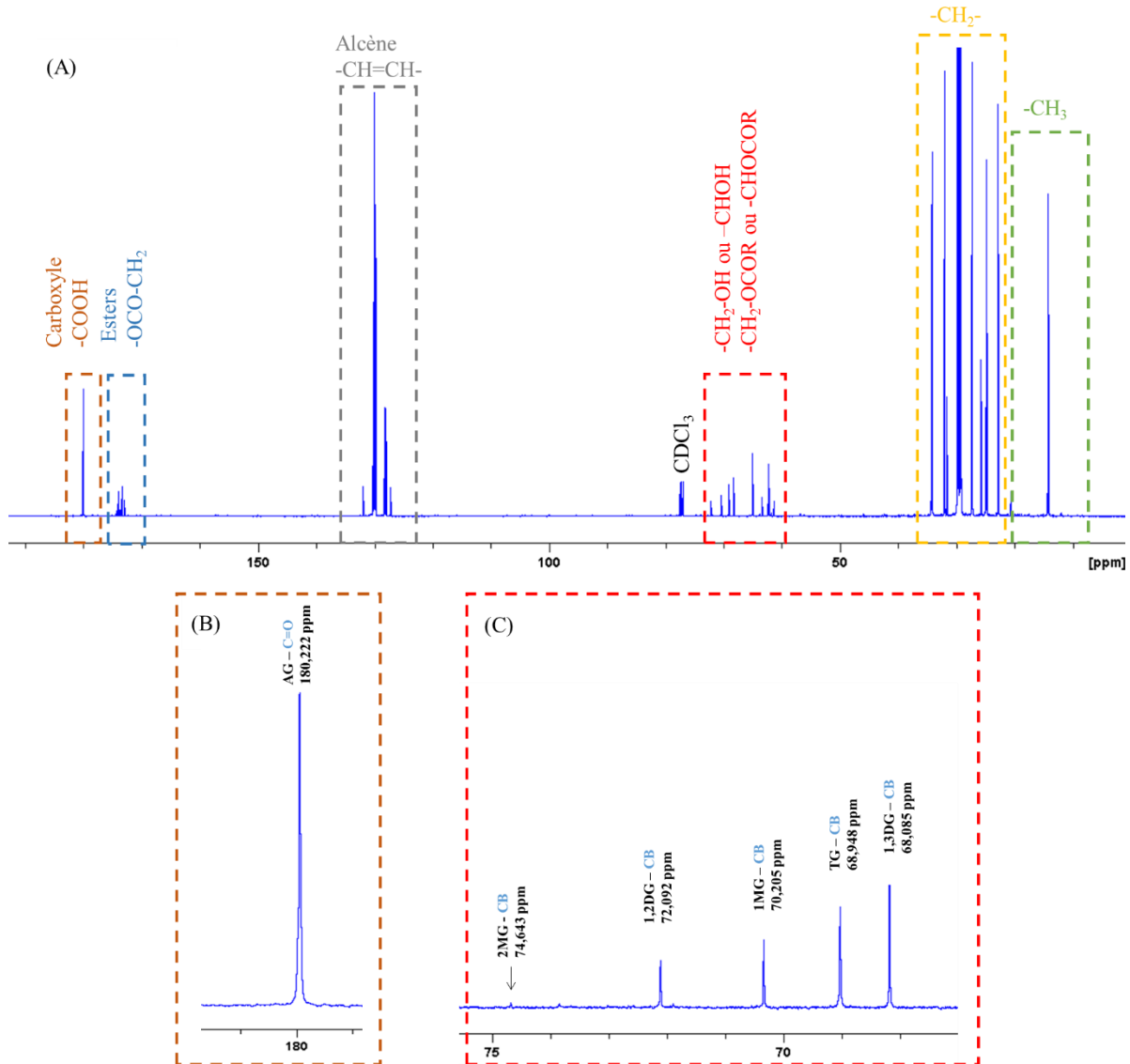


Figure 3.9 : (A) Spectre RMN ^{13}C de l'huile hydrolysée 2h, (B) zoom à 180 ppm et (C) zoom entre 65 et 75 ppm (500MHz, CDCl_3 , 25 °C).

Pour comparer les analyses entre elles et déterminer les teneurs de chacune des molécules, nous avons normalisé leurs intégrales par rapport à l'intégrale du groupement méthyle ($-\text{CH}_3$, ≈ 14 ppm) commun à l'ensemble des molécules présentes dans l'huile hydrolysée. Pour faciliter l'interprétation, les ratios ont tous été multipliés par 1000. Une analyse quantitative des produits de réaction n'est pas possible ici car nous avons des temps de relaxation pour les carbones très différents. Dans nos conditions d'analyses, 99,9% des TGs

sont relaxés, 99,2% des 1,2-DGs, 98,4% des 1,3-DGs, 96,8% des 2-MGs, 88,7% des 1-MGs et seulement 46,2% des AGLs. Au vu de ces différences, il est impossible de comparer précisément les teneurs absolues entre les différentes molécules.

Pour l'ensemble des études menées par RMN ^{13}C présentées maintenant et dans le but d'obtenir des profils de cinétique pour chacune des molécules formées en fonction des différents temps d'hydrolyse, chaque prélèvement a été analysé de façon identique. Nous avons alors déterminé les ratios (Int. molécule/Int. CH_3) des intégrales correspondantes pour chacune des molécules en fonction de l'intégrale du groupement méthyle qui est commun à toutes les molécules (Tableau 3.2). A l'issue, nous pouvons comparer l'évolution de chacune des molécules au cours de la lipolyse enzymatique.

Tableau 3.2 : Données des ratios Int. molécule/Int. CH_3 déterminés par RMN ^{13}C en fonction du temps de lipolyse enzymatique.

Temps d'hydrolyse	Int.TGs /Int CH_3	Int.1,3-DGs /Int CH_3	Int.1,2-DGs /Int CH_3	Int.1-MGs /Int CH_3	Int.2-MGs / Int CH_3	Int.AGLs/ Int CH_3
0h	447,52	6,15	1,89	2,26	0	18,88
1h	292,03	96,18	36,62	28,06	3,37	78,98
2h	175,43	136,36	58,53	71,63	10,36	167,68
8h	107,62	107,62	49,47	65,04	4,93	249,96
15h	117,15	89,26	37,57	46,35	3,29	263,64
24h	91,81	85,65	35,25	33,07	2,21	311,99

Dans la partie précédente, nous avons vu la possibilité de déterminer les teneurs des différentes molécules présentes dans les huiles hydrolysées en corrélant les résultats d'analyses CPG et RMN ^1H (Figure 3.8). Il nous a également été possible, en une seule analyse par RMN ^{13}C d'obtenir un panorama des molécules et de déterminer leurs teneurs relatives mais de façon plus directe. Afin de vérifier la cohérence des résultats obtenus par les différentes techniques (CPG, RMN ^1H et RMN ^{13}C), nous avons comparé la teneur de chacun des composés contenus dans l'huile pour les différents temps de réaction enzymatique. Pour ce faire, chacun des ratios des produits, formés et consommés ont été normalisés en pourcentage par rapport à la teneur maximale du produit (100%). Les profils comparatifs CPG/RMN ^1H et RMN ^{13}C seuls sont présentés dans la Figure 3.10. Les courbes en rouges représentent les résultats obtenus par CPG (AGLs, TGs, 1,2-DGs et 1,3-DGs) et/ou en RMN ^1H (1-MGs et 2-MGs). Celles en bleues correspondent aux teneurs déterminées uniquement par RMN ^{13}C .

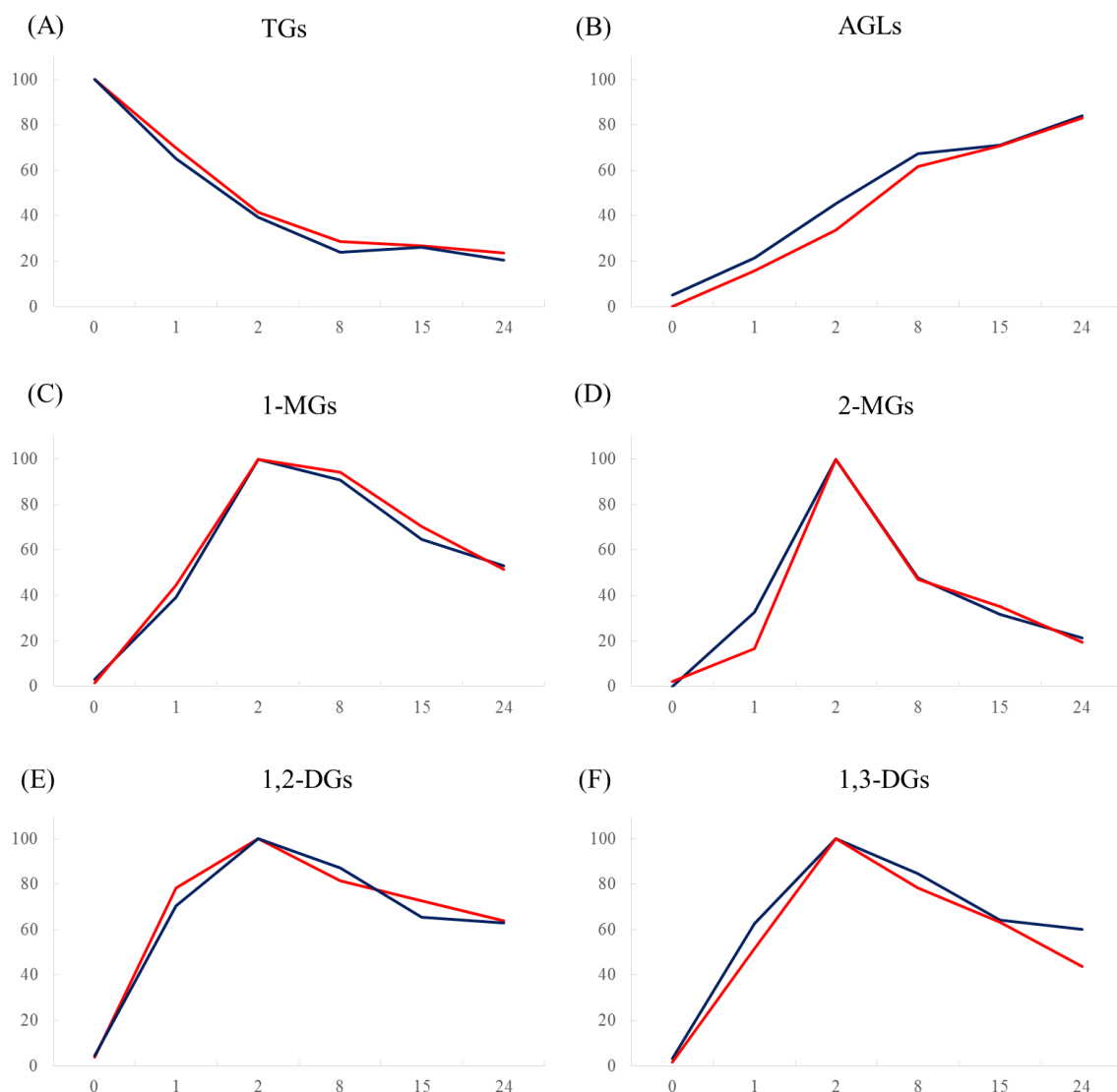


Figure 3.10 : Comparaison des profils obtenus par analyses CPG/RMN ^1H (rouge) et RMN ^{13}C (bleu) en fonction du temps de la lipolyse enzymatique.

L'étude des profils pour chacune des molécules nous montre des résultats semblables que ce soit pour les produits consommés (TGs) que pour les produits issus de l'hydrolyse (1-MGs, 2-MGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs et AGLs). Cependant, pour obtenir le profil complet de la composition des huiles, les résultats par CPG/RMN ^1H requièrent deux analyses différentes. A l'inverse, la RMN ^{13}C permet à elle seule de déterminer l'ensemble des molécules sur un seul et même spectre. De ce fait, pour la suite des études dédiées à la lipolyse enzymatique, nous avons choisi de faire l'analyse des différentes huiles hydrolysées par RMN ^{13}C uniquement.

L'objectif de cette première partie consistait en l'étude de la faisabilité de la lipolyse enzymatique de l'huile de colza avec l'enzyme Sumizyme[®] NLS. L'ensemble des résultats

obtenus ont permis de mettre en évidence l'hydrolyse des TGs et la production *in situ* de MGs, DGs et AGLs. Contrairement à nos attentes, la quantité de DGs et MGs formée augmente jusqu'à atteindre un maximum pour 2 heures de réaction puis ils sont hydrolysés à leur tour au-delà de ce temps. Ce profil est sans doute spécifique à l'enzyme NLS, montrant alors l'importance de connaître le profil des produits formés lors de l'utilisation d'une lipase. Toutefois, nous avons pu valider la lipolyse de l'huile de colza par catalyse en milieu émulsionnant (eau + lipase/huile) et obtenir une huile enrichie en MDGs et AGLs.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'un des avantages de ce procédé est la possibilité de récupérer spécifiquement la phase aqueuse contenant les enzymes. Dans le but de réutiliser l'enzyme pour de nouvelles réactions. Il est donc maintenant nécessaire de réaliser le recyclage de la phase aqueuse et d'étudier dans quelle mesure l'activité enzymatique peut être maintenue.

3.4. Etude de recyclage de l'enzyme Sumizyme® NLS

Dans le procédé que nous avons développé, les enzymes sont désactivées et non dénaturées. En effet, la catalyse est effectuée à 37 °C mais est suivie par un stockage à 4 °C pour stopper la réaction avant la centrifugation. De plus, par cette étape, la totalité de l'enzyme mise en jeu au cours de la réaction est récupérée. L'idée de cette étude est donc de vérifier si l'enzyme peut être réutilisée pour d'autres lipolyses, dans les mêmes conditions, tout en gardant leur activité. Au cours de la lipolyse de l'huile de colza avec l'enzyme NLS, la quantité maximale de MDGs étant obtenue après 2 heures de réaction, l'étude du recyclage de l'enzyme a donc été réalisée au bout de ce même temps. Pour ce faire, les réactions enzymatiques sont menées dans les mêmes conditions opératoires (quantité d'huile et d'enzyme, température, pH) que pour l'étude cinétique décrite précédemment (cycle 1). Entre chaque cycle, la phase grasse est prélevée puis analysée et la phase aqueuse est placée à l'étuve de façon à réactiver les lipases (37 °C).

3.4.1. Suivi par indice d'acidité

Comme pour le cas précédent, l'étude de l' I_A est le premier marqueur pour déterminer si les enzymes hydrolysent les TGs de façon efficace. Nous observons que l'indice d'acidité est constant jusqu'au huitième cycle, la quantité d'AGLs produite au cours de la réaction

enzymatique doit sans doute être la même (Figure 3.11). A partir du neuvième cycle, nous observons une baisse significative de la valeur de l'indice d'acidité (de 61 à 34 mg KOH/g), ce qui correspond à une diminution de la quantité d'AGLs dans le milieu et donc de l'activité de l'enzyme en elle-même ; ceci pourrait être dû à une désactivation de la lipase. L'optimisation du procédé et des coûts de fabrication est donc possible grâce à un recyclage des enzymes jusqu'à 8 cycles.

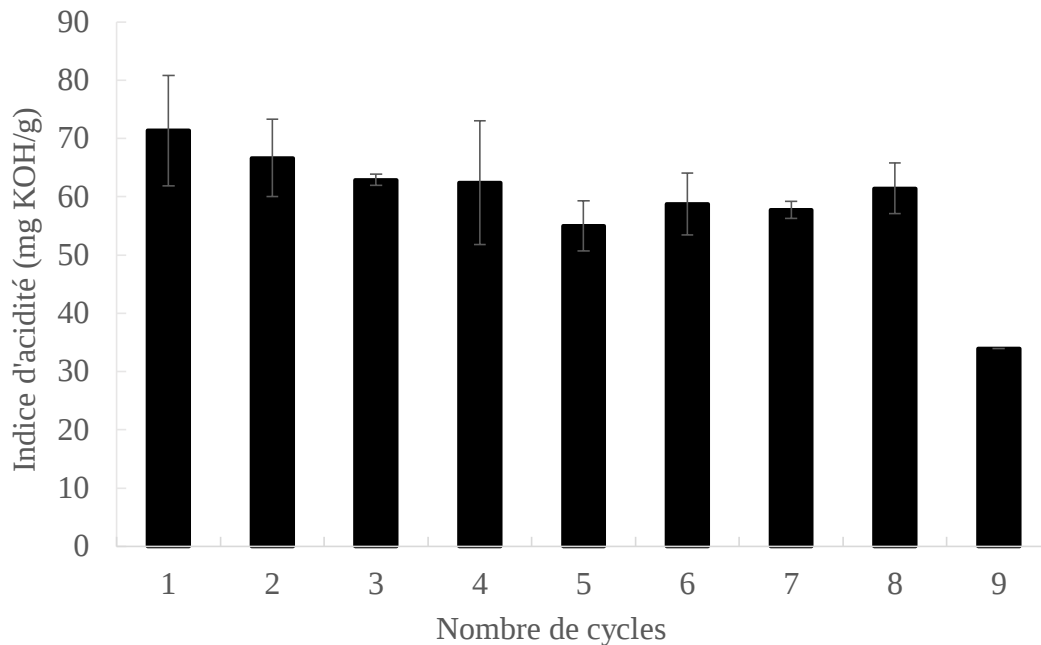


Figure 3.11 : Evolution de l'indice d'acidité en fonction du nombre de recyclage.

3.4.2. Analyse RMN ^{13}C

Nous avons mené des analyses RMN ^{13}C sur les différentes huiles hydrolysées pour confirmer les résultats précédemment obtenus. La Figure 3.12 décrit l'évolution des produits présents dans l'huile (TGs, AGLs, 1,2-DGs, 1,3-DGs, 1-MGs et 2-MGs) en fonction du nombre d'utilisation de l'enzyme (nombre de cycles imposés).

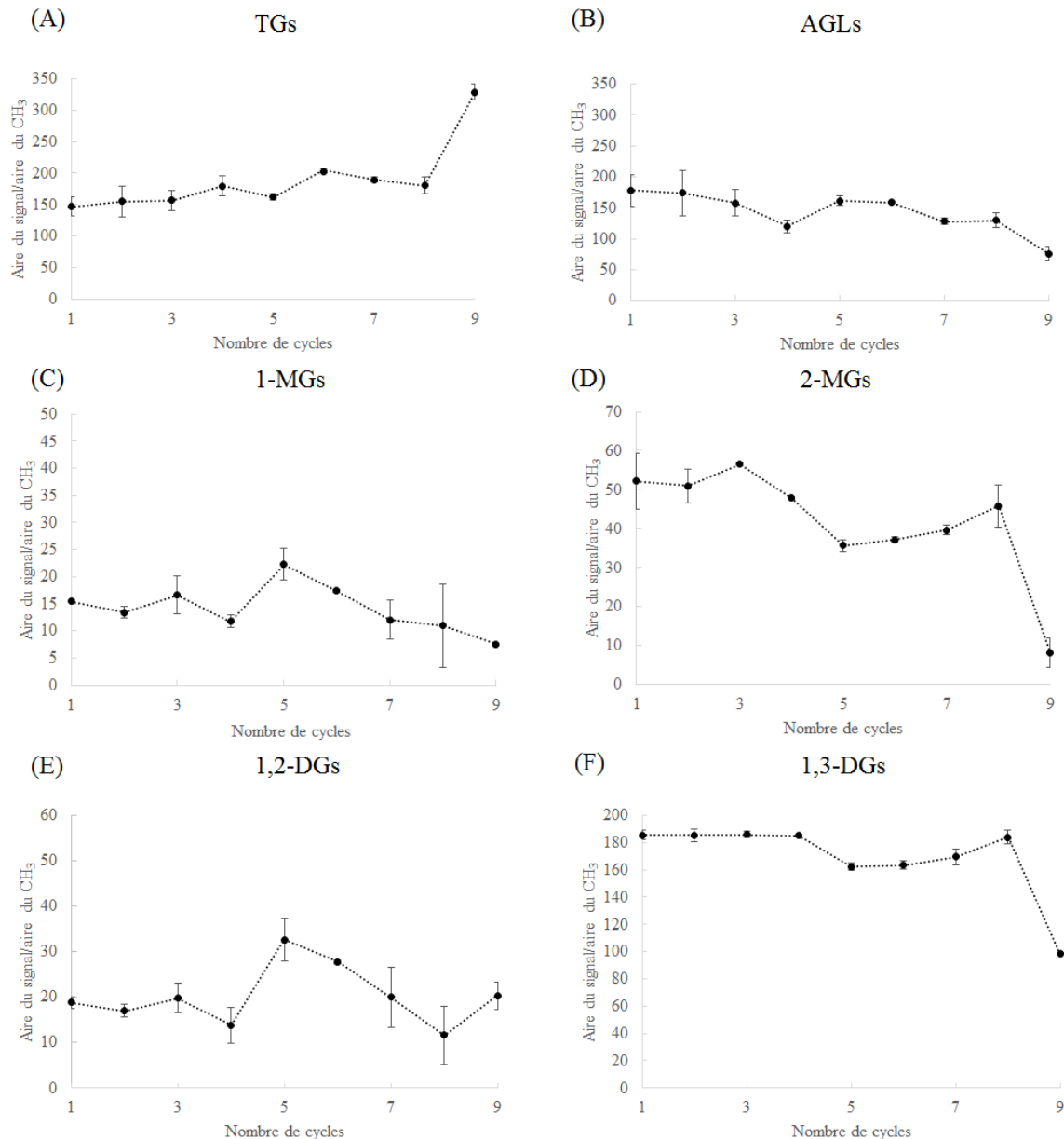


Figure 3.12 : Evolutions des composés hydrolysés en fonction du nombre de cycles de recyclage de l'enzyme NLS.

Comme précédemment, nous constatons que jusqu'au huitième cycle, la quantité d'AGLs et de TGs restent similaires. Au neuvième cycle, apparaît une diminution concomitante de la consommation en TGs (Figure 3.12(A)) et de la production d'AGLs (Figure 3.12(B)).

Les quantités de 2-MGs et 1,3-DGs formées restent également les mêmes jusqu'au huitième cycle puis une baisse significative apparaît au neuvième cycle. Concernant les 1-MGs et 1,2-DGs, les résultats sont moins marqués compte tenu de leurs faibles teneurs dans l'huile associée.

L'ensemble de ces observations permettent donc de montrer que le recyclage et la réutilisation des lipases est possible jusqu'à huit cycles de réactions. Au-delà, l'efficacité de l'enzyme diminue significativement. Cette baisse d'activité peut également s'expliquer par la forte présence de glycérol dans la phase aqueuse. Nous pouvons supposer qu'à partir d'une concentration « critique » en glycérol, l'accessibilité du substrat est limitée.

Le concept de lipolyse et de réutilisation de l'enzyme étant maintenant clairement établi, nous avons poursuivi ce travail exploratoire par une généralisation du procédé. Pour ce faire, nous avons souhaité étudier l'influence de la nature du substrat, pour cela, l'huile de colza a été remplacée par de l'huile de tournesol.

4. Lipolyse avec changement du substrat

Comme évoqué précédemment, les huiles végétales liquides les plus couramment utilisées dans la fabrication de matrices alimentaires sont les huiles de colza et de tournesol. Ces huiles, liquides à température ambiante, présentent comme nous l'avons vu au chapitre 2, quelques différences dans leurs compositions en acide gras. Afin d'étudier l'impact de ces différences de compositions, nous avons fait réagir, dans les mêmes conditions expérimentales, l'enzyme Sumizyme® NLS sur l'huile de tournesol. La même méthodologie de suivi de réaction et de caractérisation des molécules (indice d'acidité, tension de surface et RMN ^{13}C) est utilisée pour permettre une comparaison.

4.1. Suivi par indice d'acidité

La comparaison des indices d'acidité des réactions d'hydrolyses sur l'huile de colza et sur l'huile de tournesol, permet d'observer des profils quasi similaires (Figure 3.13). En effet, jusqu'à 2 heures de réaction, nous observons une nette augmentation de l'indice d'acidité avec des valeurs proches dans les deux cas (86 mg KOH/g pour huile de colza et 91 mg KOH/g pour huile de tournesol). Au-delà de 2 heures, un palier apparaît et cela jusqu'à 24 heures de réaction avec des valeurs d'indices d'acidités similaires (113 mg KOH/g pour huile de colza et 120 mg KOH/g pour huile de tournesol).

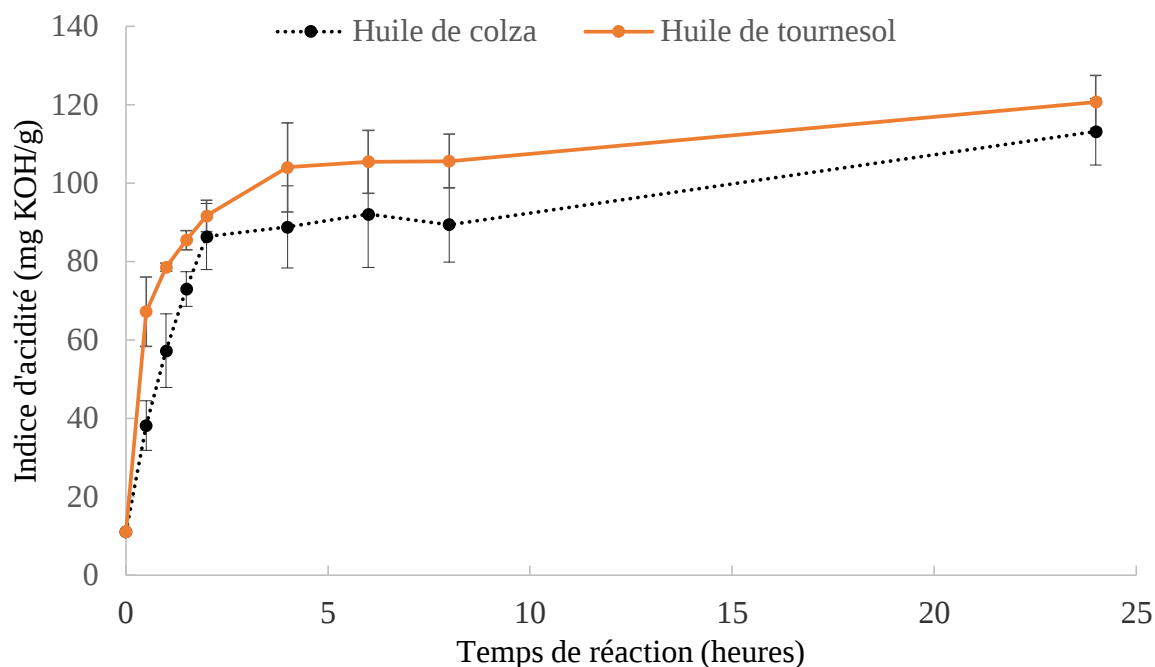


Figure 3.13 : Comparaison de l' I_A des hydrolyses de l'huile de colza et de l'huile de tournesol en fonction du temps de lipolyse enzymatique.

Ces premiers résultats permettent de mettre en évidence que l'enzyme NLS n'est pas spécifique à un type d'huile végétale, car elle peut également hydrolyser l'huile de tournesol. Des mesures de tension de surface ont aussi été réalisées, et ont montré des profils similaires pour les deux huiles hydrolysées.

4.2. Analyse RMN ^{13}C

Nous avons caractérisé ces huiles hydrolysées à l'aide de la RMN ^{13}C en fonction du temps de réaction. Pour avoir une idée de l'évolution de l'ensemble des molécules formées, nous avons intégré les signaux correspondants aux déplacements chimiques attribués à chacune des molécules. Les différents profils obtenus pour l'huile de tournesol sont comparés avec ceux obtenus avec l'huile de colza.

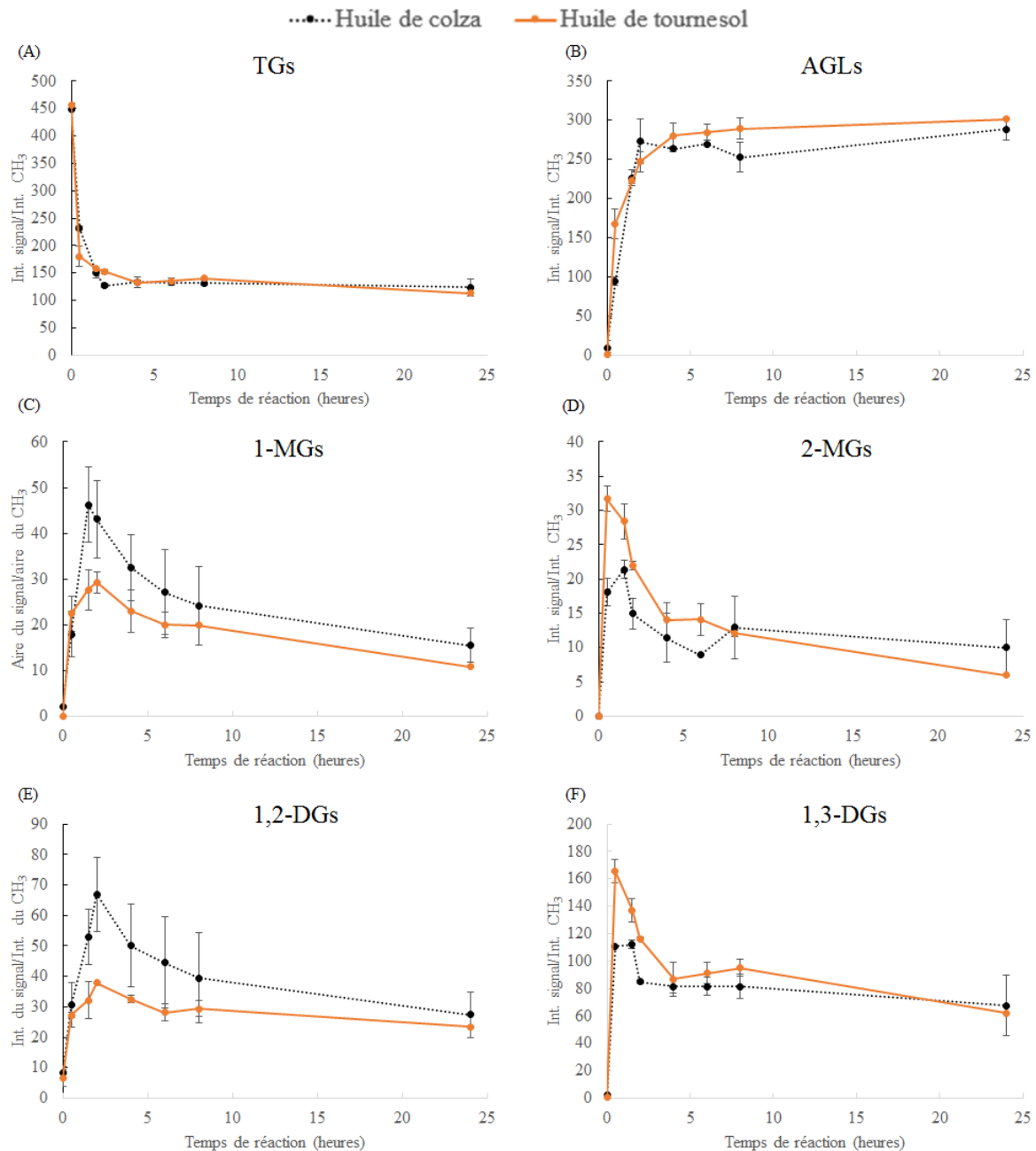


Figure 3.14 : Evolutions des profils de (A) TGs, (B) AGLs, (C) 1-MGs, (D) 2-MGs, (E) 1,3-DGs, (F) 1,2-DGs au cours de la lipolyse enzymatique pour les huiles de colza et de tournesol.

Si nous comparons la consommation en TGs (Figure 3.14(A)) et la production d'AGLs (Figure 3.14(B)), il semble que quel que soit le substrat, l'hydrolyse se déroule de la même manière. Ce résultat confirme les observations faites lors des mesures d'indice d'acidité. Comme dans le cas de l'huile de colza, l'enzyme NLS hydrolyse non seulement les TGs de l'huile de tournesol mais aussi, à partir de 1h30 de réaction, les DGs et MGs formés *in situ*. Toutefois, en analysant plus en détail le ratio des produits, nous observons quelques différences notables. En effet, la production de 1-MGs et de 1,2-DGs est plus importante dans le cas de

l'huile de colza (Figure 3.14(C), (E)). A l'inverse, les 2-MGs et 1,3-DGs sont préférentiellement formés dans le cas de l'hydrolyse de l'huile de tournesol (Figure 3.14(D), (F)). Il semble donc que la nature de l'huile hydrolysée par l'enzyme NLS n'ait pas d'influence sur la consommation des TGs et la formation des AGLs. Cependant elle semble impacter la sélectivité, le rendement et donc les teneurs en produits formés.

Pour approfondir cette étude sur la généralisation du concept lié à la lipolyse enzymatique, nous avons décidé d'étudier et de comparer l'activité de sept lipases différentes sur l'huile de colza.

5. Lipolyse avec changement d'enzyme

Dans la littérature, il est décrit que les lipases peuvent être sélectives en fonction de la nature et de la composition des lipides, et à ce titre elles sont classées en trois différentes catégories (Javed, *et al.*, 2018). La première correspond aux lipases dites non spécifiques ; dans ce cas les acides gras sont hydrolysés de manière aléatoire quel que soit leur positionnement sur le squelette glycérol (Laguerre, *et al.*, 2017). La seconde catégorie comprend les enzymes qui hydrolysent les TGs en fonction de la nature des chaînes alkyles. Dans ce cas, elles vont être spécifiques à une longueur de chaîne ou bien au nombre d'insaturations. Enfin, la dernière catégorie correspond aux lipases 1,3-spécifiques, qui hydrolysent les acides gras situés aux extrémités (position primaire) du glycérol pour former majoritairement des 1,2-DGs et/ou des 2-MGs (Kapoor & Gupta, 2012).

Jusqu'à maintenant, l'ensemble de nos études se focalisait sur l'utilisation de l'enzyme Sumizyme[®] NLS. En effet, cette enzyme est non-OGM, non-auto clonée et une demande d'autorisation de mise sur le marché pourrait permettre son utilisation dans un futur proche. Afin d'essayer de généraliser notre étude, nous avons analysé la capacité d'autres lipases à hydrolyser l'huile de colza. Pour cela, nous avons utilisé des enzymes non-OGM (Sumizyme[®] RLS, Sumizyme[®] MML-G et Lilipase[®] A-10D) et OGM (Bakezyme[®] L80 000B, Palatase[®] 20 000L et Lipopan[®] Xtra BG) ; elles sont toutes immobilisées sur support maltodextrine à des teneurs avoisinants les 50% (sauf pour les enzymes RLS et Lilipase où les teneurs avoisinent respectivement 10 et 2,5%) et présentent différentes activités et des origines variées (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Caractéristiques des enzymes utilisées (enzyme non OGM, enzyme OGM).

	Origine	Fournisseur	Activité (U/g)	pH optimal	T optimale (°C)
Sumizyme® NLS	<i>Aspergillus niger</i>	Takabio	50 000	4	37
Bakezyme® L80 000B	<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM	80 000	7	36-38
Palatase® 20 000L	<i>Rhizomucor miehei</i>	Sigma aldrich (Novozyme)	20 000	nc	nc
Sumizyme® RLS	<i>Candida rugosa</i>	Takabio	30 000	7	55
Sumizyme® MML-G	<i>Rhizomucor miehei</i>	Takabio	3 500	7	40
Lipopan® Xtra BG	<i>Aspergillus oryzae</i>	Novozyme	7 200	8	40
Lilipase® A-10D	<i>Rhizopus oryzae</i>	Takabio (Nagase Enzymes)	1 000 000	7	40

Afin de pouvoir comparer l'efficacité des enzymes entre elles, les hydrolyses ont été réalisées en iso-quantité (55% d'huile de colza, 43% d'eau et 2% d'enzyme) dans les conditions optimales de l'enzyme NLS c'est-à-dire à 37 °C et à pH 7. Etant donné que les méthodes de détermination des activités enzymatiques ne sont pas normalisées, les fournisseurs n'utilisent pas les mêmes modes de calculs d'une lipase à une autre. Dans notre cas, nous ne pouvons donc pas faire de comparaison en iso-activité.

5.1. Suivi par mesures d'indice d'acidité

Les indices d'acidité de chacune de ces réactions enzymatiques montrent que les enzymes n'ont pas la même capacité d'hydrolyse de l'huile de colza. En effet, l'huile hydrolysée par l'enzyme Sumizyme® RLS a un I_A largement supérieur aux autres huiles et ce dès 30 min de réaction (191 mg KOH/g d'huile), ce qui nous laisse supposer une surproduction d'acide gras libres, soit directe, soit par l'intermédiaire d'une fabrication importante et rapide de mono- ou diglycérides. Après 30 min de réaction, l' I_A reste constant (191 mg KOH/g d'huile) (Figure 3.15). Pour les autres enzymes, les évolutions de l' I_A présentent des profils similaires avec une augmentation rapide jusqu'à 2 heures de réaction puis ensuite une augmentation plus progressive entre 2h et 24h d'hydrolyse. Les valeurs d' I_A après 24 heures sont comprises entre 69 et 113 mg KOH/g d'huile en fonction de l'enzyme impliquée.

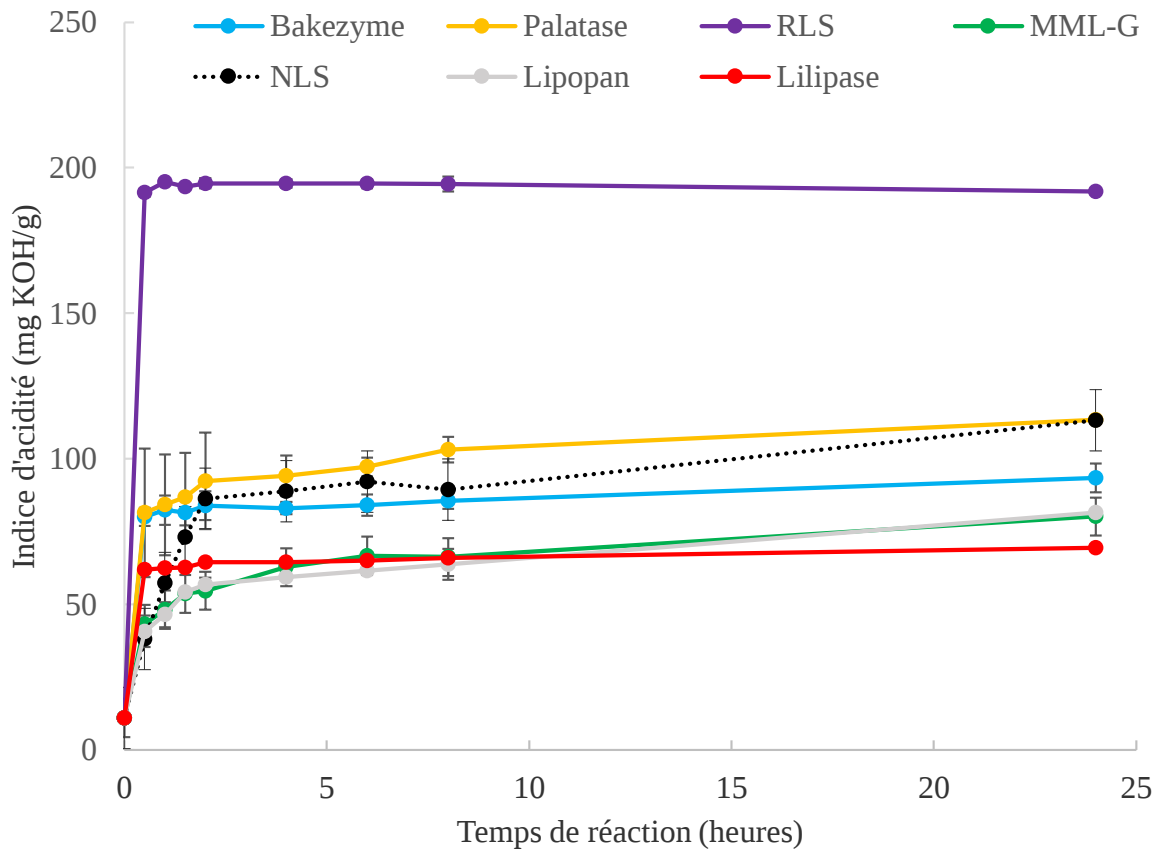


Figure 3.15 : Evolutions des I_A au cours des lipolyses enzymatiques en fonction des différentes enzymes en iso-quantité.

Etant donné que les réactions enzymatiques ont été réalisées en iso-quantité, nous avons souhaité comparer les valeurs des I_A obtenues à 24h de réaction (une fois que l'activité enzymatique s'est équilibrée) avec les activités enzymatiques intrinsèques via les données des fournisseurs. Cependant, aucune corrélation directe n'en ressort. En effet, l'enzyme Lilipase, avec l'activité la plus élevée devrait posséder, en théorie, la valeur d' I_A la plus forte ; cette valeur est la plus faible de la série (69 mg KOH/g d'huile). L'enzyme RLS qui a l' I_A le plus élevé (191 mg KOH/g d'huile) a une activité 33 fois plus faible que la Lilipase. De plus, l'enzyme MML-G avec la plus faible activité (3500 U/g) a également une valeur de l' I_A légèrement plus élevée que pour la Lilipase (80 mg KOH/g d'huile versus 69 mg KOH/g d'huile).

5.2. Suivi par tension de surface

Afin de confirmer les différences d'activités d'hydrolyse des enzymes, nous avons étudié le comportement des molécules tensioactives présentes dans les différentes huiles hydrolysées par les mesures de tension de surface. Comme attendu, nous observons des valeurs de tension de surface différentes en fonction de l'enzyme utilisée. Dans tous les cas, une diminution significative de cette tension de surface est observée à environ 30 minutes (Figure 3.16).

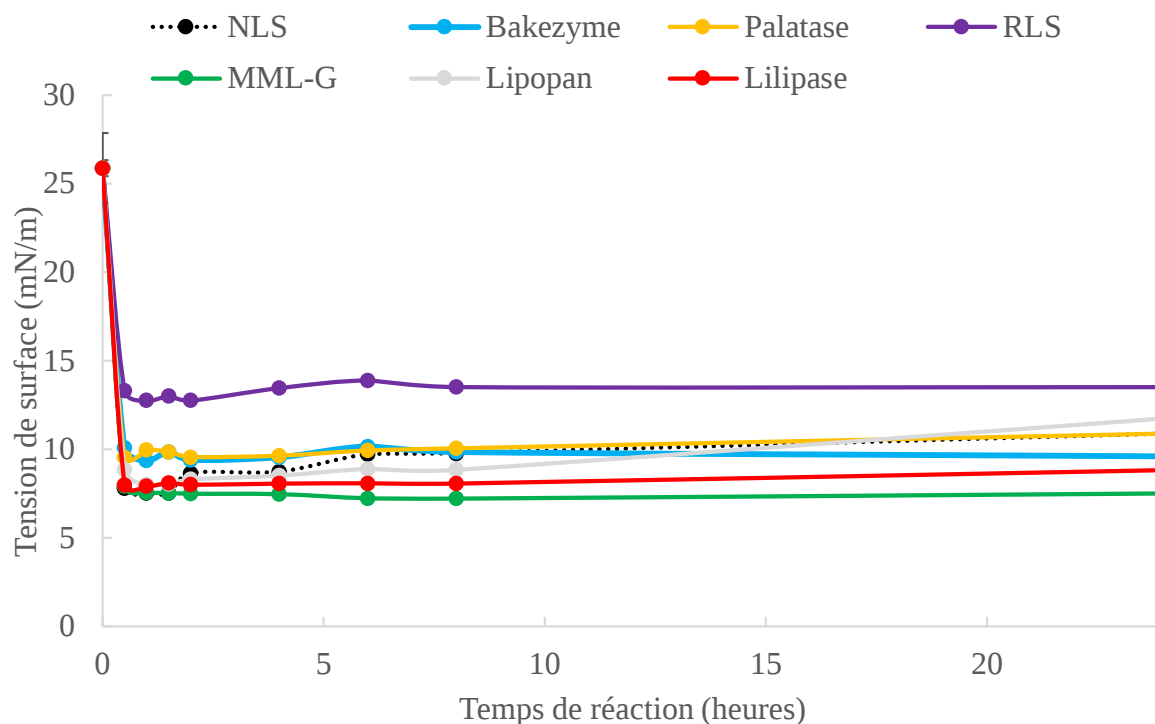


Figure 3.16 : Tension de surface des huiles hydrolysées avec les différentes enzymes en fonction du temps de lipolyse enzymatique.

Pour les enzymes NLS et Lipopan, nous notons une légère ré-augmentation de la tension de surface entre 2h et 24h, probablement due à une production plus importante d'AGLs. En effet, au cours de la lipolyse, les AGLs sont les seules molécules formées avec une HLB plus élevée comparativement aux MDGs. L'analyse quantitative menée par CPG et RMN¹H avec l'enzyme NLS a montré une diminution des MDGs avec une production constante d'AGLs permettant alors de confirmer l'hypothèse selon laquelle une ré-augmentation de la valeur de γ pouvait être assimilée à la production d'AGLs. Nous observons également que l'huile qui a été hydrolysée par l'enzyme RLS a une tension de surface plus importante que les autres huiles.

Nous pouvons alors supposer qu'à partir de 30 min de réaction, elle a une production quasi exclusive d'AGLs.

Il est possible que les molécules produites au cours des lipolyses soient différentes en fonction des enzymes impliquées. Dans le but de le vérifier, nous avons analysé par RMN ^{13}C les différentes huiles hydrolysées et ainsi déterminé leurs compositions relatives en fonction du temps de réaction.

5.3. Analyse RMN ^{13}C

L'ensemble des huiles hydrolysées ont été caractérisées par RMN ^{13}C . En regardant les spectres des huiles obtenues après 2h d'hydrolyse, nous constatons bien que les enzymes se comportent différemment (Figure 3.17).

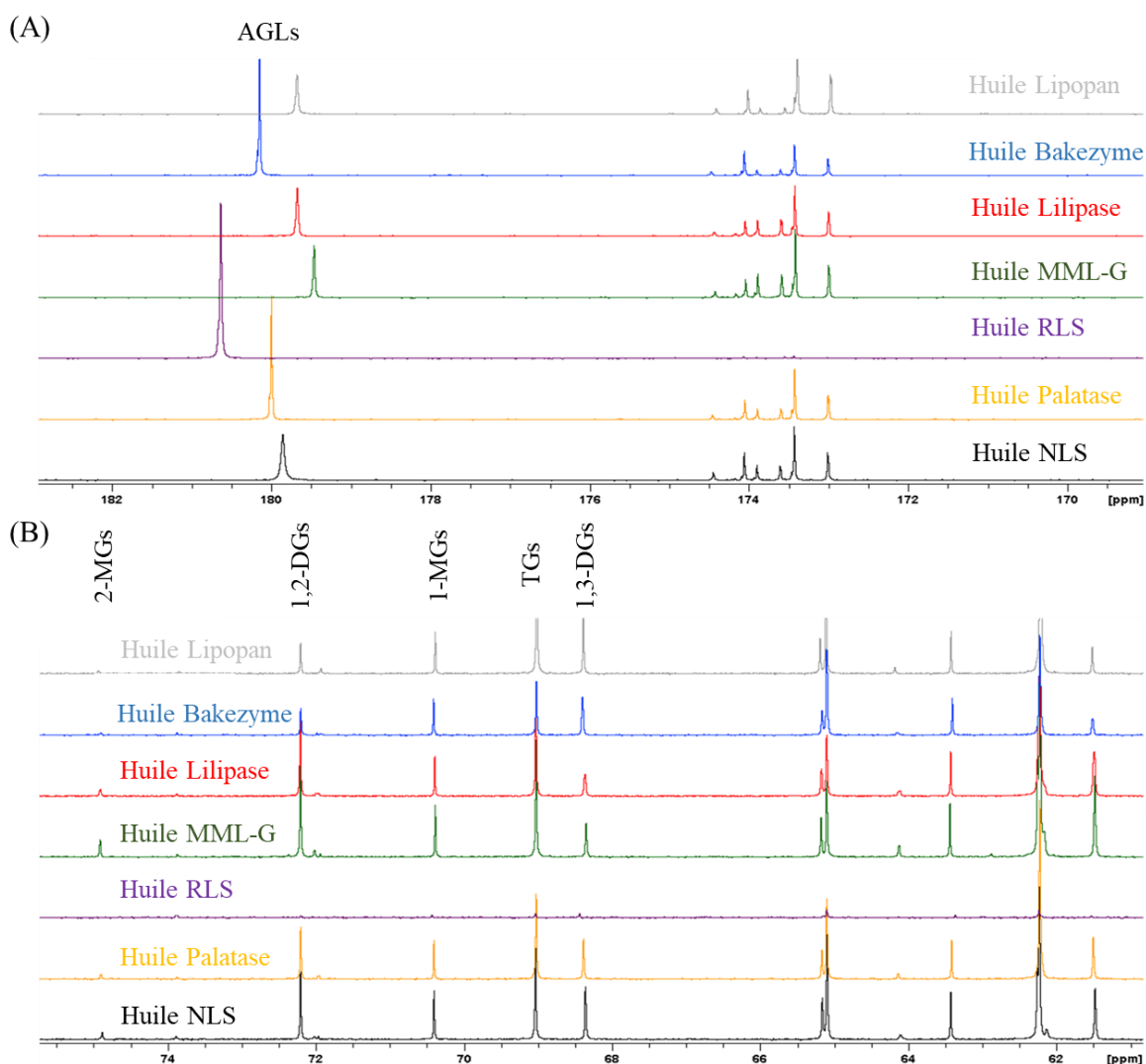


Figure 3.17 : Spectres RMN ^{13}C (A) 168-185 ppm et (B) 60-76 ppm des différentes huiles hydrolysées en fonction de l'enzyme utilisée (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C).

En se focalisant sur les signaux correspondants aux AGLs (Figure 3.17(A)), avec un déplacement chimique aux alentours de 178-182 ppm, nous voyons que les intensités, normalisées sur la référence, ne sont pas les mêmes. Il semblerait que certaines enzymes forment plus d'AGLs que d'autres. C'est notamment le cas des enzymes RLS, Bakezyme et Palatase. De plus, les signaux correspondants aux AGLs de chacune des huiles, ont un déplacement chimique différent en fonction des enzymes utilisées. Cette différence peut être due à l'acidité du milieu qui augmente en fonction de la quantité d'acides gras libres. De plus, il est accentué par un effet de concentration d'AGLs : plus cette dernière sera importante, plus le déplacement chimique de ce signal sera déblindé. En regardant maintenant la zone entre 60-75 ppm correspondant aux signaux spécifiques aux 2-MGs, 1,2-DGs, 1-MGs, 1,3-DGs et TGs, (Figure 3.17(B)), nous remarquons également des différences d'intensité des signaux, preuve une nouvelle fois que des différences au niveau des profils réactionnels peuvent être attendues.

Toutefois, dans le cas de l'enzyme RLS, on remarque que l'huile ne présente pas de signaux dans cette zone ($\delta = 60-75$ ppm), ce qui traduit l'absence de TGs et de MDGs. Cette observation, nous montre qu'il y a une hydrolyse quasi-totale des TGs associée à une sélectivité très importante en AGLs et qu'il y a donc une production exclusive d'acides gras libres. Ce résultat permet donc de montrer une nouvelle fois que les tensions de surface précédemment mesurées et supérieures dans le cas de la RLS par rapport aux autres huiles hydrolysées sont bien associées à la forte présence d'AGLs dans le milieu.

5.3.1. Production en AGLs

Pour étudier la consommation des TGs et la quantité des produits formés au cours des hydrolyses, les intégrales des signaux sont normalisées par rapport à l'intégrale du signal des groupements méthyles présents dans l'ensemble des molécules. Ceci permet de suivre l'évolution de la consommation et de la production des différentes molécules issues des lipolyses.

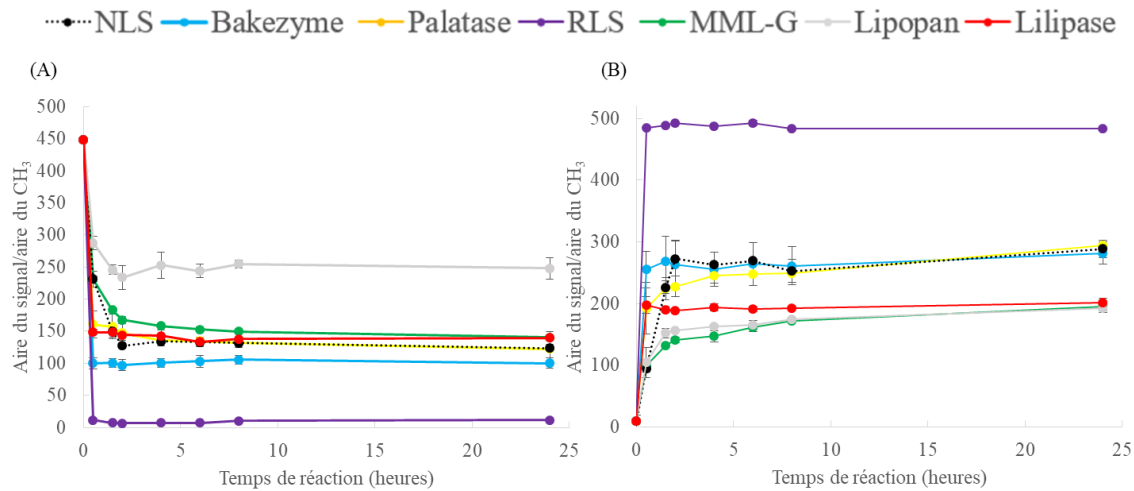


Figure 3.18 : (A) Consommation des TGs et (B) formation des AGLs en fonction des différentes enzymes et du temps d'hydrolyse.

En regardant la consommation des TGs (Figure 3.18(A)) et la production associée d'AGLs au cours du temps de réaction (Figure 3.18(B)), nous observons bien l'obtention de profils différents en fonction des lipases utilisées. Cela reste cohérent avec les analyses précédentes (I_A , tension de surface) et confirme que chaque enzyme possède sa propre spécificité d'hydrolyse. L'enzyme RLS hydrolyse la totalité des TGs en AGLs, par son biais nous pouvons déterminer aisément la teneur maximale d'AGLs pouvant être produite au cours de la lipolyse. L'enzyme RLS servira donc de référence pour comparer les pourcentages d'AGLs obtenus avec les autres enzymes. Nous observons que les huiles qui produisent le plus d'AGLs sont celles dont la teneur en TGs est la plus faible et inversement. Par exemple, pour l'enzyme Lipopan, la conversion des TGs n'est que de 45% dont 38% d'AGLs formés au bout de 24 heures contre 96% pour l'enzyme RLS. Le Tableau 3.4 récapitule ces données pour toutes les lipases utilisées.

Tableau 3.4 : Données de consommation de TGs et production d'AGLs en fonction des enzymes (à 24h d'hydrolyse).

	RLS	Lipopan	Palatase	NLS	Bakezyme	Lilipase	MML-G
TGs convertis (%)	97	45	73	72	78	69	69
AGLs produits (%)	96	38	59	58	58	40	39
AGLs/TGs	0,99	0,84	0,81	0,80	0,74	0,58	0,57

Afin de comparer les activités enzymatiques, nous avons donc calculé le rapport production d'AGLs sur consommation de TGs pour 24h de réaction (Tableau 3.4). Cela permet de se rendre compte de la sélectivité plus ou moins orientée en AGLs et de classer les enzymes à l'équilibre réactionnel. En effet, plus ce ratio est proche de 1, plus l'hydrolyse aboutira à une conversion totale des TGs en AGLs. A l'inverse, plus le ratio est faible, plus des DGs ou MGs seront formés. Sur cette base, les enzymes peuvent être classées en 3 catégories :

- Celles qui hydrolysent l'ensemble des TGs pour former exclusivement des AGLs : ce qui est le cas de l'enzyme RLS.
- Celles qui forment majoritairement des AGLs et dont le ratio AGLs/TGs > 0,7 : ce qui est le cas des enzymes Lipopan, Palatase, Bakezyme et NLS.
- Celles avec un ratio AGLs/TGs de 0,5 et qui forment donc autant d'AGLs et de MGs/DGs : ce qui est le cas des enzymes Lilipase et MML-G.

5.3.2. Production en DGs

Suite à cette classification, nous avons étudié plus spécifiquement les DGs formés au cours des différentes lipolyses. Les graphiques suivants, présentent l'évolution de la formation des 1,2-DGs et 1,3-DGs en fonction du temps d'hydrolyse, pour chacune des huiles hydrolysées (Figure 3.19).

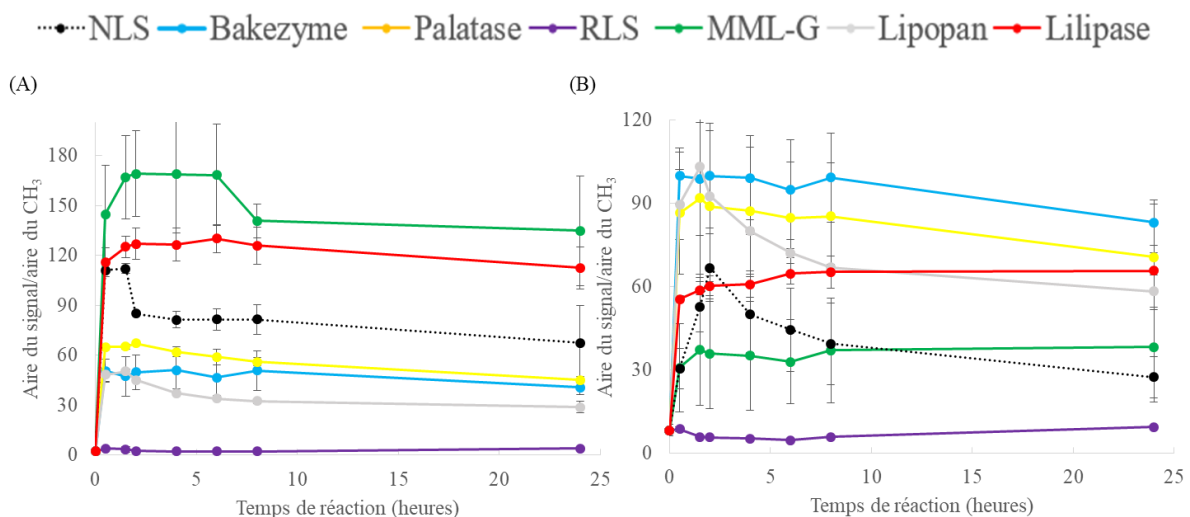


Figure 3.19 : Production des (A) 1,2-DGs et (B) 1,3-DGs en fonction des différentes enzymes.

Pour l'ensemble des enzymes, les profils obtenus sont différents. L'enzyme RLS formant exclusivement des AGLs, ne sera pas discutée ici. Comme dans le cas de l'enzyme

NLS, l'enzyme Lipopan atteint une production maximale de 1,2-DGs et 1,3-DGs au bout de 1h30 de réaction. Au-delà, la quantité de DGs diminue, ce qui signifie qu'ils sont hydrolysés, soit en MGs, soit en AGLs. Pour les autres huiles, nous pouvons observer que la production de DGs atteint son maximum entre 30 min et 1h30 de réaction (en fonction de l'enzyme) et qu'ensuite un plateau apparaît.

Nous avons comparé les teneurs en DGs, obtenues par les différentes enzymes au bout de 24 heures de réaction à celles formées par l'enzyme NLS (référence de l'étude). Pour les 1,2-DGs, il semblerait que les enzymes Bakezyme, Palatase et Lipopan ont une production moins importante contrairement aux enzymes Lilipase et MML-G, qui en forment davantage. L'enzyme la plus efficace étant la MML-G. Pour la production des 1,3-DGs, l'ensemble des enzymes est plus efficace que la NLS.

5.3.3. Production en MGs

La production des MGs (1-MGs et 2-MGs) au cours du temps, est représentée dans la Figure 3.20. Les mêmes observations que pour la formation des DGs peuvent être faites. Dans le cas des 1-MGs, les enzymes NLS et Lipopan ont une production maximale atteinte à 1h30 puis une diminution importante est observée jusqu'à 24h de réaction. Pour les autres enzymes, la production maximale semble être atteinte entre 30 min et 1h30 de réaction et une diminution progressive est observée jusqu'à 24h.

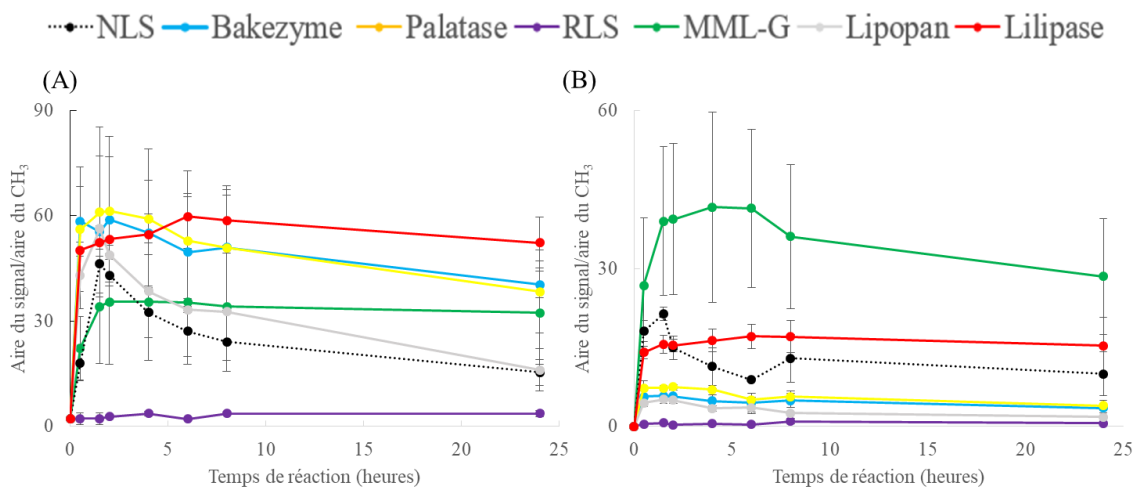


Figure 3.20 : Production des (A) 1-MGs et (B) 2-MGs en fonction des différentes enzymes.

Par comparaison à 24h de réaction, la quantité de 1-MGs produite pour l'enzyme Lipopan est proche de l'enzyme NLS. Pour les autres enzymes, la production de 1-MGs est générée de manière plus importante. En se focalisant sur la production des 2-MGs après 24h de réaction, les enzymes Lipopan, Bakezyme et Palatase semblent avoir des productions plus faibles que pour l'enzyme NLS. A contrario, les huiles hydrolysées par les enzymes MML-G et Lilipase ont une teneur en 2-MGs supérieure à l'huile hydrolysée par l'enzyme NLS.

L'ensemble de ces caractérisations par la RMN ^{13}C nous permet de mettre en évidence la formation d'émulsifiants de type MDGs et AGLs par le procédé enzymatique développé et cela, quelle que soit la nature de la lipase utilisée. Toutefois, dans les mêmes proportions, certaines enzymes comme la RLS fabriquent uniquement des AGLs et ce très rapidement alors que les autres enzymes vont plutôt former de manière plus ou moins sélective des MGs et DGs.

Pour finaliser ce chapitre et la comparaison entre les différentes enzymes, nous allons étudier le comportement thermique des huiles hydrolysées. En effet, nous avons remarqué que les huiles issues des différents traitements avec différentes enzymes présentaient des comportements différents notamment lors de l'arrêt des réactions pour un stockage à 4 °C. Pour faire la démonstration, nous nous sommes focalisés sur des huiles présentant des ratios différents en AGLs/TGs (présentés en Tableau 3.4). Ainsi, sur l'ensemble des enzymes utilisées, notre choix s'est porté sur les enzymes RLS (0,99), Lipopan (0,84), NLS (référence, 0,80) et Lilipase (0,58).

5.4. Analyse thermique des huiles hydrolysées

Afin de stopper les réactions enzymatiques, nous plaçons les huiles hydrolysées à 4 °C, c'est lors de cette étape que nous avons observé des différences de texture notamment au niveau de la cristallisation (Figure 3.21). Contrairement à l'huile de colza, des phénomènes de cristallisation (avec l'apparition de turbidité et de prise en viscosité) plus ou moins prononcés sont apparus dans le cas de certaines huiles hydrolysées et selon les enzymes utilisées. Il semblerait donc que la lipolyse enzymatique entraîne une modification des propriétés thermiques des huiles (températures de cristallisation T_c et de fusion T_f). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons donc réalisé des analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

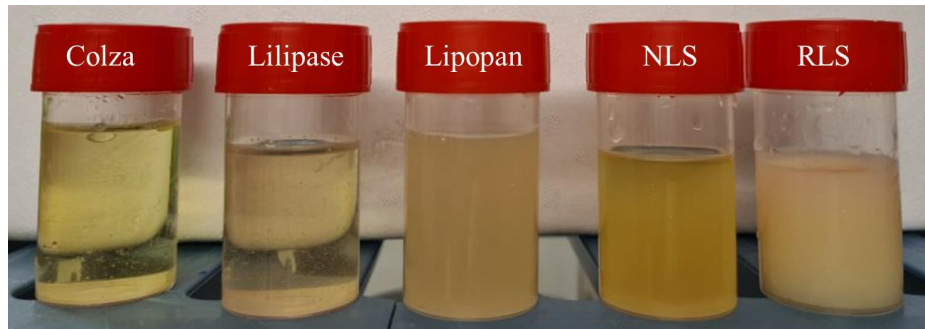


Figure 3.21 : Aspects visuels des huiles stockées à 4 °C.

Comme évoqué précédemment, nous avons focalisé notre approche sur l'analyse des huiles hydrolysées obtenues à 24 heures par les enzymes NLS, RLS, Lipopan et Lilipase. L'huile de colza présente une T_c de -55 °C et une T_f de -27 °C. Pour rappel, les acides gras greffés sur le squelette glycérol ont une grande importance sur les températures de changement d'état. Leur nature ainsi que leur position sur le squelette glycérol ont leur importance (Bockisch, 1998) (Fredrick, *et al.*, 2008).

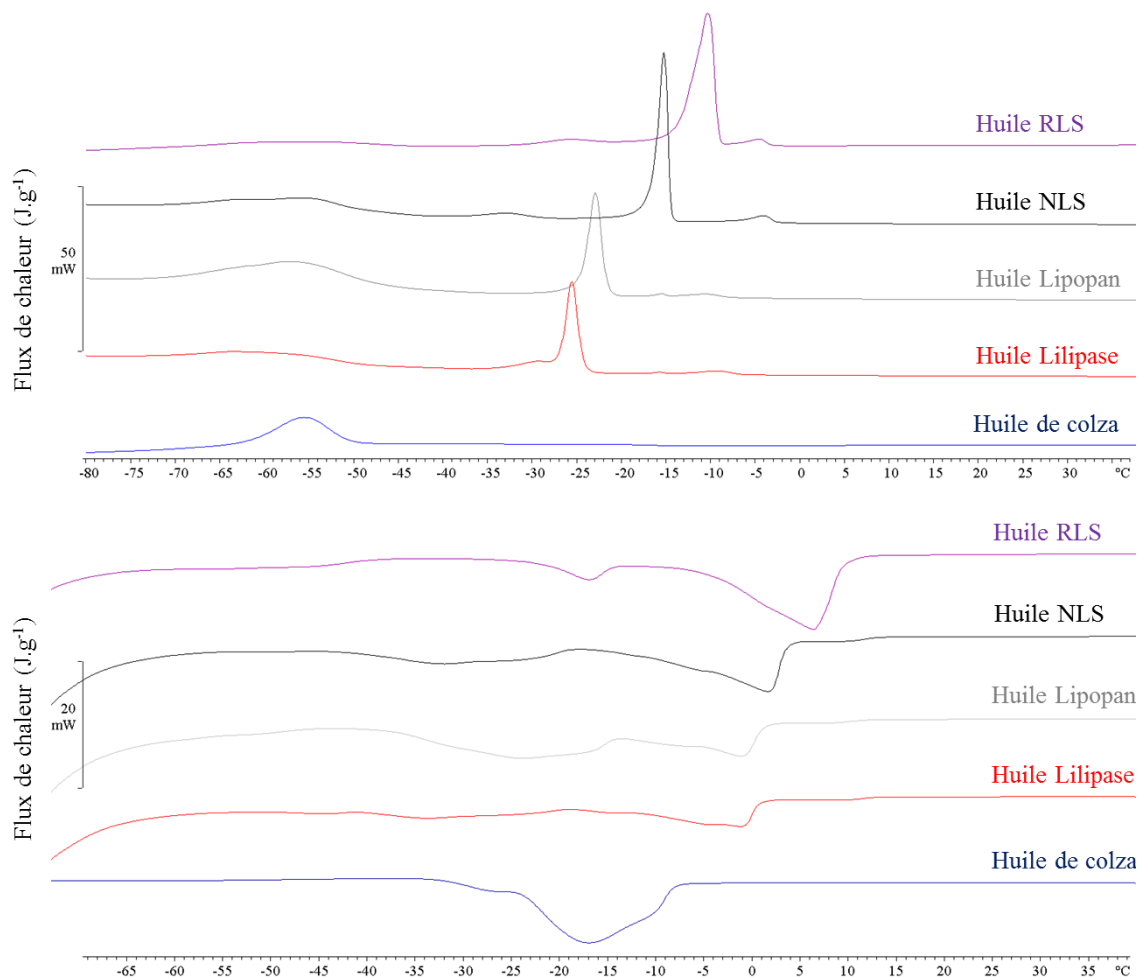


Figure 3.22 : Thermogrammes (A) de cristallisation et (B) de fusion des différentes huiles.

En comparant les thermogrammes de l'huile de colza et des différentes huiles hydrolysées à 24 heures de réaction, nous remarquons des changements de température de cristallisation (Figure 3.22 (A)) et de fusion (Figure 3.22(B)) plus ou moins importants pour l'ensemble des huiles. Les huiles hydrolysées sont constituées d'un mélange de TGs, de DGs, de MGs et d'AGLs. Les proportions de ces molécules, qui varient en fonction de l'enzyme utilisée, peuvent sans doute expliquer les différences que nous observons sur les thermogrammes associés. Pour chacune des huiles hydrolysées, contrairement à l'huile de colza, nous observons la présence de plusieurs phénomènes de cristallisation et de fusion, ce qui reflète un mélange huileux complexe (Figure 3.22). Cependant, dans chacune des huiles, une T_c et une T_f majoritaires ressortent (avec une enthalpie plus élevée). Les différentes données sont répertoriées dans le Tableau 3.5, les valeurs indiquées correspondent à la température au sommet du pic et les valeurs des pics majoritaires sont représentées en gras.

Tableau 3.5 : Données des températures de cristallisations et de fusions de l'huile de colza et des huiles hydrolysées 24h (pic majoritaire en gras).

		Pic 1 (°C)	Pic 2 (°C)	Pic 3 (°C)	Pic 4 (°C)
Huile de colza	Cristallisation	-55	-	-	-
	Fusion	-25	-17	-	-
Huile NLS	Cristallisation	-55	-30	-15	-4
	Fusion	-32	+2	10	-
Huile RLS	Cristallisation	-57	-26	-10	-5
	Fusion	-46	-17	+6	-
Huile Lipopan	Cristallisation	-55	-23	-5	-
	Fusion	-24	-1	-	-
Huile Lilipase	Cristallisation	-57	-28	-9	-
	Fusion	-27	-1	-	-

Nous observons des différences importantes des valeurs de T_c et de T_f entre l'huile de colza et les différentes huiles hydrolysées par les différentes enzymes testées (Tableau 3.5). En considérant la T_c majoritaire des huiles, elles cristallisent dans l'ordre suivant : huile RLS, huile NLS, huile Lipopan, huile Lilipase et huile de colza.

Comme nous venons de le voir, l'hydrolyse des huiles avec différentes enzymes entraîne des modifications plus ou moins importantes au niveau de leurs températures de cristallisation et de fusion et ce sans ajout exogène de texturant. Avec ces changements de propriétés, ces huiles pourraient avoir un impact positif lors de la fabrication de produits laitiers tels que les crèmes glacées. En effet, au cours de la fabrication de ces matrices, les huiles pourraient cristalliser et donc remplacer l'usage de matières grasses concrètes saturées tout en gardant les mêmes propriétés. Ceci sera donc présenté et approfondi dans le chapitre suivant dédié à la fabrication de produits alimentaires.

6. Conclusion et perspectives

Ce chapitre avait pour objectif d'étudier la lipolyse enzymatique sur une huile végétale afin d'étudier la faisabilité de l'hydrolyse des TGs pour former *in situ* des MDGs par contact direct d'une enzyme avec une huile végétale.

Après une brève présentation du principe de la lipolyse, nous avons, dans un premier temps, fait réagir une lipase non-OGM (Sumizyme® NLS) sur de l'huile de colza. Nous avons mis en évidence la possibilité d'hydrolyser les TGs pour former des molécules tensioactives telles que des MGs et DGs mais aussi des AGLs. Des analyses CPG ont permis de déterminer une partie de la composition glycéridique molaire des produits présents dans l'huile hydrolysée (TGs, 1,2-DGs, 1,3-DGs, MGs et AGLs). Grâce au couplage de ces données avec des analyses par RMN ^1H , nous avons pu déterminer la quantité en isomères 1-MGs et 2-MGs et ainsi obtenir des profils quantitatifs complets de l'ensemble des molécules. Nous avons également mené des analyses par RMN ^{13}C qui, nous ont permis d'obtenir des informations qualitatives sur l'ensemble des molécules présentes dans l'huile permettant de valider en comparaison plusieurs concepts liés au recyclage de l'enzyme ou à la généralisation du procédé.

La lipolyse enzymatique présente les avantages d'obtenir une phase grasse enrichie en DGs, MGs et AGLs et de ne plus contenir d'enzymes. En effet, au cours de la dernière étape de la réaction (centrifugation), il est possible de récupérer sélectivement la phase aqueuse contenant les enzymes. Nous avons donc étudié son recyclage pour de nouvelles réactions de lipolyse et la même activité d'hydrolyse que ce soit en termes de rendement ou de sélectivité dans les produits formés a été observée jusqu'au huitième cycle.

Nous avons vu qu'il était également possible de faire une lipolyse enzymatique avec l'enzyme Sumizyme[®] NLS sur l'huile végétale de tournesol. Ce changement de substrat n'influence pas l'activité globale de l'enzyme et les teneurs finales mais toutefois, à 1h30 d'hydrolyse, les ratios de production en 1-MGs, 2-MGs, 1,2-DGs et 1,3-DGs sont différents comparativement à l'huile de colza.

Pour finir, nous avons étudié la capacité de différentes lipases (en faisant varier leurs origines et leurs activités) à hydrolyser l'huile de colza. Dans chacun des cas et dans les mêmes conditions opératoires que pour l'enzyme NLS, nous avons réussi à hydrolyser les TGs de manière plus ou moins importante. En effet, avec la lipase RLS, la totalité des TGs a été transformée exclusivement en AGLs et ce au bout de seulement 30 min. Pour les autres lipases, nous avons obtenu, en fonction du temps de lipolyse, des teneurs modulables en TGs, DGs, MGs et AGLs. Ces dernières observations sont importantes car elles permettent de mettre en évidence la possibilité d'obtenir des huiles différemment enrichies en MDGs et AGLs et donc d'adapter l'huile hydrolysée à la matrice.

De plus, nous avons montré l'impact de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés thermiques des huiles en fonction de l'enzyme utilisée. Des modifications importantes, notamment au niveau des températures de cristallisation et de fusion ont été observées, modifiant l'aspect et la texture des huiles à 4 °C.

Pour compléter ces études, il serait intéressant d'étudier la lipolyse enzymatique sur des huiles concrètes de type graisse de coprah, huile de palme, beurre, beurre de cacao et corréler cela avec leurs comportements physico-chimiques. En effet, de nombreux produits industriels, notamment dans la biscuiterie, sont formulés à partir de graisses concrètes. Dans ces cas, les TGs sont solides à température ambiante. Il serait alors nécessaire de travailler à plus haute température afin de passer à l'état liquide et faciliter l'émulsification mais il convient de vérifier la capacité d'hydrolyse (activité à $T > 37\text{ °C}$).

Dans le même esprit, il serait intéressant de comparer l'efficacité des enzymes en iso-activité puisqu'elles présentent toutes des disparités. Toutefois, après avoir réalisé des premiers essais, ces études ne sont pas comparables en l'état. En effet, après avoir discuté avec les fournisseurs, il s'avère que les méthodes utilisées pour la détermination de ces activités enzymatiques ne sont pas normalisées. Chacun utilise des méthodes différentes en fonction de la lipase. En utilisant la même méthode de calcul que pour l'enzyme Sumizyme[®] NLS, de fortes

différences sont apparues pour l'ensemble des enzymes comparativement aux données des fiches techniques (Tableau 3.6). Il serait intéressant de reprendre l'étude sur les comparaisons des lipases en travaillant en iso-activité en tenant compte des valeurs obtenues via la même méthode de calcul.

Tableau 3.6 : Comparaison des activités enzymatiques avec la méthode utilisée pour l'enzyme NLS.

Nom	Activité (LU/g) fiche technique	Activité (U/g) par méthode de calcul NLS
Sumizyme NLS	50 000	50 000
Bakezyme 80 000L	80 000	25 000
Palatase 2000L	20 000	4 700
Sumizyme RLS	30 000	16 600
Lipopan	7 200	9 400

7. Partie expérimentale

7.1. Produits commerciaux utilisés

Tableau 3.7 : Liste des produits commerciaux utilisés.

Nom		Fournisseur
Acide acétique	> 99,8%	Honeywell
Acide chlorhydrique	12 mol/L	Sigma
Ethanol absolu	99,98%	Sigma
Chloroforme	99,8%	Honeywell
Chloroforme deutéré	> 99,5%	Eurisotop
Ether diéthylique	> 99,8%	Honeywell
Hydroxyde de potassium	> 85%	Sigma aldrich
Iodure de potassium	> 99%	Sigma aldrich
Phénolphthaléine	-	Sigma aldrich
Thiosulfate de sodium	0,1 mol/L	Sigma aldrich
Huile de colza	-	Metro
Huile de tournesol	-	Metro

7.2. Réactions enzymatiques

Le but de ce procédé est de faire réagir des enzymes sur des huiles végétales. Pour que l'hydrolyse ait lieu, il faut mettre en contact la phase grasse (lipides) avec la phase aqueuse. Après avoir réalisé des essais, un protocole identique a été sélectionné pour les différentes réactions enzymatiques. Les pourcentages massiques mis en jeu ont été les suivants : 55% d'huile végétale, 43% d'eau et 2% d'enzymes.

7.2.1. Activation des enzymes

Avant de procéder à la réaction enzymatique, les lipases ont été activées au préalable. Pour cela, la totalité des enzymes a été solubilisée avec la moitié de l'eau utilisée à 37 °C pendant 1h. Pour éviter un choc thermique, l'huile ainsi que la fraction restante d'eau ont été thermostatées dans les mêmes conditions.

7.2.2. Catalyse en milieu émulsionné

Pour réaliser la réaction, l'huile a tout d'abord été disposée en totalité dans un bécher. La phase aqueuse contenant les enzymes a été ajoutée. La partie restante d'eau a ensuite été incorporée pour atteindre les fractions volumiques désirées. Pour maintenir une émulsion durant toute la durée de la lipolyse, le mélange a été agité de façon continue (agitateur à pale, Heidolph de type RZR1) à 250 rpm et à 37 °C. Lors de la réaction, le bécher a été recouvert d'un film d'aluminium afin de limiter l'évaporation de la phase aqueuse.

7.2.3. Prélèvements et inactivation des enzymes

Pour réaliser des prélèvements au cours de la lipolyse, 50 mL du mélange sont prélevés dans un tube à centrifuger et sont ensuite déposés à 4 °C pour une durée minimale de 1h. Afin de récupérer spécifiquement l'huile, chacun des milieux a été centrifugé à 9000 rpm (centrifugeuse de marque Hettich® universal 32 R) pendant 30 min et la phase aqueuse a été conservée à 4 °C.

7.2.4. Recyclage des enzymes

Pour réaliser les études de recyclage, la phase aqueuse (contenant les lipases) a été récupérée après chaque réaction et mise à l'étuve (37 °C) pendant 1h afin de réactiver les enzymes. Chaque cycle de réaction s'est déroulé dans les mêmes conditions que la première lipolyse.

7.3. Détermination de l'indice d'acidité

L' I_A correspond à la quantité de KOH (hydroxyde de potassium), exprimée en milligrammes, nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1 g de corps gras et est déterminée par un dosage en retour. Les conditions de ce dosage sont issues de la norme ISO 660/2020 « Corps gras d'origines animales et végétales- Détermination de l'indice d'acide et de l'acidité ». Dans notre cas, au vu de la forte teneur en AGLs, les concentrations en solution ont été adaptées.

Pour pouvoir faire le dosage, une masse connue d'huile (≈ 8 g) a été diluée dans un bécher avec 50 mL d'une solution organique initialement préparée (mélange diéther/alcool absolu 50/50 v/v). Puis, 50 mL d'une solution de KOH (1 mol/L, dans l'éthanol technique) ont alors été ajoutés ainsi que 2 gouttes d'indicateur coloré (phénolphthaléine) ; une coloration rose persistante doit être observée. Le titrage a ensuite été réalisé avec une solution de HCl de concentration connue (0,93 mol/L) et le volume de la solution de HCl ajouté est alors relevé ($V_{\text{HCl essai}}$). La zone de virage correspond à la décoloration de la solution. Un dosage témoin (sans ajout de matière grasse) a été réalisé.

L' I_A se détermine alors par calcul selon l'équation suivante où $V_{\text{HCl témoin}}$ et $V_{\text{HCl essai}}$ correspondent aux volumes (en mL) équivalents obtenus respectivement.

$$I_A = \frac{(V_{\text{HCl témoin}} - V_{\text{HCl essai}}) \times M_{\text{KOH}} \times [\text{HCl}]}{m_{\text{huile}}}$$

7.4. Détermination de l'indice de peroxyde

L' I_p permet de déterminer le degré d'oxydation des acides gras. En effet, il correspond à la quantité d'oxygène actif présent dans la matière grasse et permet de déterminer la quantité d'acide gras pouvant être oxydée. Afin de réaliser le dosage, 5 g d'huile doivent être pesés et dilués dans 30 mL d'une solution acide acétique/ chloroforme (3:2 v/v). 500 μL de solution d'iodure de potassium saturé ont été ensuite ajoutés. Le tout est mis sous agitation pendant 2 minutes à l'obscurité, puis 30 mL d'eau ont été ajoutés. L'iode libéré est ensuite titré avec une solution de thiosulfate de sodium à 0,01 mol/L. Lorsque la couleur marron disparaît, 5 mL d'une solution d'emploi d'amidon ont été ajoutés ce qui permet de vérifier la fin de la réaction. Le volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ajouté est alors noté (V_{essai}). La même procédure a été réalisée sans ajout de matière grasse ($V_{\text{témoin}}$). L'indice de peroxyde est ensuite calculé à l'aide de l'équation ci-après et est exprimé en milliéquivalent d' O_2 par kg d'huile ($\text{meq O}_2/\text{kg d'huile}$).

$$I_p = \frac{(V_{\text{essai}} - V'_{\text{témoin}}) \times [\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3]}{m_{\text{oil}}} \times 1000$$

7.5. Analyse CPG

L'analyse de la composition glycérique des huiles hydrolysées par CPG a été réalisée par l'ITERG (Institut des Corps Gras, Pessac, France). Avant les analyses, une silylation sur le corps gras a été réalisée. Pour cela, 10 g d'huile ont été mélangées avec 100 μL d'un mélange pyridine/HMDS/TMCS (9:3:1 m/m/m). Avant injection, le mélange a été traité pendant 15 min à 105 °C. Les échantillons ont été analysés sur un appareil CPG Thermo 1300 (Thermo Fisher) équipé d'un injecteur (100 KPa), d'un détecteur FID (380 °C) et d'une colonne non polaire ZB-5HT (longueur : 10 m ; diamètre intérieur : 0,25 mm ; épaisseur : 0,1 μm). Le programme d'élution est le suivant :

- Plateau de 1 min à 60 °C
- Rampe de température jusqu'à 370 °C avec une vitesse de 15 °C/min
- Isotherme de 5 min à 370 °C

7.6. Analyse RMN

7.6.1. RMN ^1H

Pour la quantification par RMN ^1H , 150 μL d'huile ont été dilués dans 650 μL de CDCl_3 . Les analyses de RMN ^1H ont été réalisées avec un spectromètre Bruker Avance 500, équipé d'une sonde Dual ^{13}C - ^1H de 5 mm à 25 °C. Une séquence d'impulsions RMN conventionnelle avec un délai de relaxation de 3s, un angle d'impulsion de 30° et un temps d'acquisition de 5,29s ont été appliqués. Les données RMN ont été traitées à l'aide du logiciel Topspin 3.6.1 (Bruker Biospin AG). Un ajustement de phase et une correction de ligne de base polynomiale ont été effectués manuellement sur chaque spectre. L'intégration a été réalisée sur le signal CH du glycérol du 1-MGs et 2-MGs. Le pourcentage de chaque MGs a été estimé en divisant l'aire par la somme des aires totales des MGs.

7.6.2. RMN ^{13}C

Pour faire la quantification par RMN ^{13}C , 150 μL ont été dilués dans 660 μL de CDCl_3 et 40 μL d'une solution de trioxane comme référence ($C = 554,9 \text{ mmol/L}$). Les analyses RMN ^{13}C ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance 500, équipé d'une cryo-sonde

de 5 mm à 25 °C. Une séquence d'impulsions RMN conventionnelle avec un délai de relaxation de 1,5s, un angle d'impulsion de 30° et un temps d'acquisitions de 2,61s (TD = 128K) ont été utilisés. La largeur spectrale utilisée est de 200 ppm et le nombre de scan de 384 pour une durée d'expérience de 28 minutes. Les données RMN ont été traitées à l'aide du logiciel Topspin 3.6.1, une transformée de Fourier a été appliquée en utilisant une fonction exponentielle avec un élargissement de raie de 1Hz et un niveau de zéro filling. Un ajustement de phase et une correction de ligne de base ont été effectués manuellement sur chaque spectre.

L'intégration des signaux des molécules de TGs, 1,3-DGs, 1,2-DGs, 1-MGs, 2-MGs et AGLs a été réalisée en fonction des déplacements chimiques décrits dans le chapitre 2. Chacune des intégrations a été normalisée par rapport à l'intégration du signal du groupement CH₃.

7.7. Analyse DSC

L'analyse thermique est réalisée à l'aide d'une DSC (Differential Scanning Calorimetry) FRS5® (Mettler Toledo) plus connue sous le nom de « DSC1 STARe System for thermal analysis ». Une masse connue d'huile $\approx$ 20 mg est pesée dans un creuset en aluminium de 40 μ L, la méthode appliquée est décrite en Figure 3.23. Afin de vérifier la répétabilité des températures de fusion et de cristallisation mesurées, le cycle a été répété trois fois par échantillon. L'ensemble des analyses a été réalisé sous azote (gaz inerte) avec un débit constant de 20 mL/min.

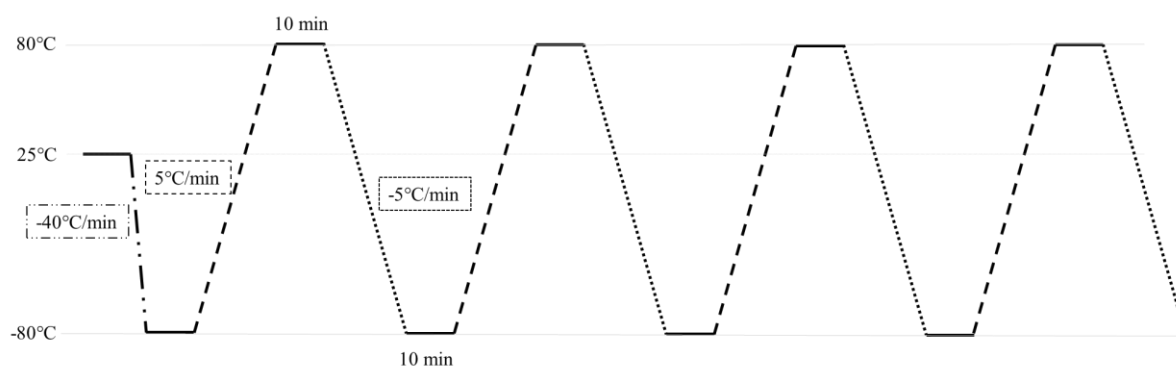


Figure 3.23 : Méthode pour les analyses DSC des huiles végétales.

8. Références bibliographiques

- Benejam, W., Steffolani, M. E., & León, A. E. (2009). Use of enzyme to improve the technological quality of a panettone like baked product. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2431-2437.
- Benzonana, G., & Desnuelle, P. (1965). Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 105(1), 121-136.
- Bockisch, M. (1998). Chapter 2 - Composition, Structure, Physical Data, and Chemical Reactions of Fats and Oils, Their Derivatives, and Their Associates. In M. Bockisch (Ed.), *Fats and Oils Handbook*, (pp. 53-120): AOCS Press.
- Borel, P., Armand, M., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., & Lairon, D. (1994). Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase in vitro. Effect on pancreatic lipase activity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5(3), 124-133.
- Colakoglu, A. S., & Özkaya, H. (2012). Potential use of exogenous lipases for DATEM replacement to modify the rheological and thermal properties of wheat flour dough. *Journal of Cereal Science*, 55(3), 397-404.
- Collados, A., Conversa, V., Fombellida, M., Rozas, S., Kim, J. H., Arbolea, J.-C., Román, M., & Perezabad, L. (2020). Applying food enzymes in the kitchen. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 21, 100212.
- Dias, A. N., Cerqueira, M. B. R., Moura, R. R. d., Kurz, M. H. S., Clementin, R. M., D'Oca, M. G. M., & Primel, E. G. (2012). Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography. *Fuel*, 94, 178-183.
- Firestone, D., & Yurawecz, M. P. (2002). Peroxide value of oils and fats- official method 985.33. *Oil and fat*, (pp. 3-69): AOCS International.
- Fredrick, E., Foubert, I., Sybe, J., & Dewettinck, K. (2008). Influence of Monoglycerides on the Crystallization Behavior of Palm Oil. *Crystal Growth & Design - CRYST GROWTH DES*, 8.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23-34.
- Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.
- Koksel, F., & Scanlon, M. G. (2018). Investigation of the influence of bakery enzymes on non-yeasted dough properties during mixing. *Journal of Cereal Science*, 79, 86-92.
- Laguerre, M., Nlandu Mputu, M., Briys, B., Lopez, M., Villeneuve, P., & Dubreucq, E. (2017). Regioselectivity and fatty acid specificity of crude lipase extracts from *Pseudozyma tsukubaensis*, *Geotrichum candidum*, and *Candida rugosa*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(8), 1600302.

- Lee, S.-M., Wagh, A., Sandhu, G., & Walsh, M. (2018). Emulsification Properties of Lactose Fatty Acid Esters. *Food and Nutrition Sciences*, 09, 1341-1357.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2, e201209017-e201209017.
- Masson, T.G., Lacasse, M-D., Grest, G.S., Levine, D., Bibette, J. & Weitz, D.A. (1997). Osmotic pressure and viscoelastic shear moduli of concentrated emulsions. *Physical Review E*. 56, 3150-3166.
- Plank, C., & Lorbeer, E. (1995). Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 697(1), 461-468.
- Plou, F. J., Barandiarán, M., Calvo, M. V., Ballesteros, A., & Pastor, E. (1996). High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(1), 66-71.
- Sarda, L., & Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et biophysica ACTA*, 30(3), 513-521.
- Shimada, A., & Ohashi, K. (2003). Interfacial and Emulsifying Properties of Diacylglycerol. *Food Science and Technology Research*, 9(2), 142-147.
- Zaks, A., Iyengar, R., & Gross, A. (1989). Lipase-catalyzed in situ generation of mono- and di-glycerides. In): ENZYTECH, INC.

Chapitre 4 :

Intérêt des huiles hydrolysées dans les
systèmes dispersés alimentaires

Tables des matières

1. Introduction.....	189
2. Applications des huiles hydrolysées dans les émulsions	190
2.1. Les émulsions inverses	190
2.1.1. Caractérisations	195
2.1.1.a. Rhéologie oscillante.....	195
2.1.1.b. Microscopie optique	196
2.1.1.c. Granulométrie laser.....	199
2.2. Les émulsions doubles.....	201
3. Réactions enzymatiques en lot pilote.....	204
3.1. Indice d'acidité et mesure de tension de surface	204
3.2. Etude RMN ¹³ C	206
4. Utilisation des huiles hydrolysées dans des matrices alimentaires	208
4.1. Les crèmes glacées	208
4.1.1. Fabrications	209
4.1.2. Etude d'écoulement	211
4.1.3. Etude de la dureté	214
4.2. Les barres pâtisseries	216
4.2.1. Fabrication.....	216
4.2.2. Substitution de l'huile végétale.....	217
4.2.3. Ajustement de la quantité d'huile hydrolysée	218
4.2.4. Suivi dans le temps de la dureté.....	221
4.2.5. Sensibilité à l'oxydation	224
4.3. Les brioches	227
4.3.1. Fabrication.....	227
4.3.2. Substitution de l'huile.....	228
4.3.3. Etude du recyclage des enzymes.....	230
4.3.3.a. Mesure de la dureté à t_0	230

4.3.3.b. Suivi de la dureté dans le temps	231
5. Conclusion et perspectives	233
6. Partie expérimentale	235
6.1. Ingrédients utilisés.....	235
6.2. Réactions enzymatiques sur pilotes	235
6.2.1. Stephan®	235
6.2.2. CDH®	236
6.2.3. Séparation des phases	237
6.3. Analyse de l'oxydation des huiles végétales.....	237
6.4. Analyse du rancissement des huiles.....	237
6.5. Analyse des teneurs en phospholipides des lécithines	237
6.6. Fabrication des émulsions	238
6.6.1. Emulsions inverses	239
6.6.2. Emulsions doubles.....	239
6.7. Caractérisations des émulsions	239
6.7.1. Rhéologie	239
6.7.2. Microscopie optique	240
6.7.3. Granulométrie.....	240
6.8. Fabrication des matrices alimentaires.....	240
6.8.1. Fabrication des crèmes glacées.....	241
6.8.2. Fabrication des barres pâtisseries.....	244
6.8.3. Fabrication des brioches	246
6.9. Mesures de texturométrie	248
6.9.1. Des crèmes glacées.....	248
6.9.2. Des produits céréaliers.....	249
6.9.3. Mesure du taux d'écoulement des glaces.....	249
7. Références bibliographiques	250

1. Introduction

Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence la possibilité d'obtenir *in situ* des huiles enrichies en MDGs et/ou AGLs à l'aide de lipases, en jouant notamment sur la nature de l'huile en tant que substrat ou sur la lipase utilisée. Nous avons également montré la possibilité de moduler la quantité et le type de MDGs souhaités. En effet, en fonction de la lipase utilisée et du temps de réaction, il est possible d'obtenir préférentiellement des MGs, des DGs ou des AGLs. Dans le chapitre 1, nous avons montré que le rôle joué par les MDGs varie en fonction du type de matrice alimentaire.

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'impact de ces huiles hydrolysées sur la fabrication et la stabilisation d'émulsions ainsi que dans la fabrication de matrices alimentaires. La première partie de ce chapitre est dédiée à l'étude d'émulsions inverses réalisées à partir des huiles hydrolysées tant au niveau de leur conception mais aussi de leurs stabilités respectives. La seconde partie du chapitre est consacrée à la transposition de la lipolyse à l'échelle pilote, qui constitue le premier défi auquel il est nécessaire de répondre pour pouvoir entreprendre des fabrications permettant d'obtenir un nombre suffisant de produits et assurer un suivi dans le temps si l'on souhaite regarder le vieillissement. Enfin, la dernière partie sera consacrée à l'utilisation des huiles hydrolysées en tant qu'ingrédients dans certaines matrices alimentaires. Ces étapes ont pour objectif d'envisager la fabrication de ces produits sans ajout exogène de mono et diglycérides et d'observer comment l'ensemble des propriétés de ces produits sont modulées. Ces essais vont également permettre de vérifier les pistes évoquées dans le chapitre précédent. Pour cela, nous avons utilisé tout d'abord une huile enrichie avec des proportions variables en MDGs ou AGLs. Nous avons également appréhendé la possibilité d'utiliser des huiles issues de différents recyclages et enfin regardé l'impact de la nature de l'enzyme sur la qualité des produits finis. Ces différentes études ont été menées sur des matrices de type crèmes glacées, barres pâtisseries ou encore brioches afin de couvrir un large univers agroalimentaire. Ces produits appartiennent au domaine des produits sucrés et qui constituent la spécificité du CRT AGIR.

2. Applications des huiles hydrolysées dans les émulsions

La fabrication des émulsions inverses a été réalisée en utilisant les huiles obtenues après hydrolyse enzymatique par l'enzyme NLS. L'étude qui suit a été menée sur des huiles obtenues après 2 et 24 heures d'hydrolyse. Au bout de 2 heures nous sommes déjà au maximum de MDGs alors qu'à 24 heures nous sommes en très fort excès d'AGLs. La référence pour l'ensemble de nos études est un système constitué d'huile de colza non hydrolysée.

2.1. Les émulsions inverses

Les études précédentes nous ont permis de mettre en évidence la présence d'un mélange de MDGs et d'AGLs dans les huiles hydrolysées. Ce sont des molécules tensioactives mais leur comportement dans les systèmes dispersés est différent. En effet, il est décrit dans la littérature que les MDGs sont des émulsifiants avec une faible valeur de HLB, donc lipophiles alors que les AGLs (au pH standard de l'eau) sont plutôt hydrophiles car leurs têtes polaires sont ioniques (Anarjan & Tan, 2013; Csáki & Sebestyén, 2019). Ainsi, une huile riche en MDGs favorisera l'obtention d'émulsions inverses alors qu'une huile riche en AGLs orientera plutôt l'émulsion dans un sens plutôt direct (H/E).

Notre objectif a été de formuler des émulsions inverses. Pour cela nous avons réalisé des émulsions concentrées (70/30 m/m Eau/Huile hydrolysée). Ces dernières ont été cisailées manuellement par ajout progressif d'eau dans l'huile. De tels systèmes permettent de visualiser rapidement la viabilité de l'émulsion. En effet, du fait de la forte concentration en huile, les gouttes dispersées sont nécessairement en contact les unes des autres et il est donc facile de se rendre compte de la stabilité du film interfacial.

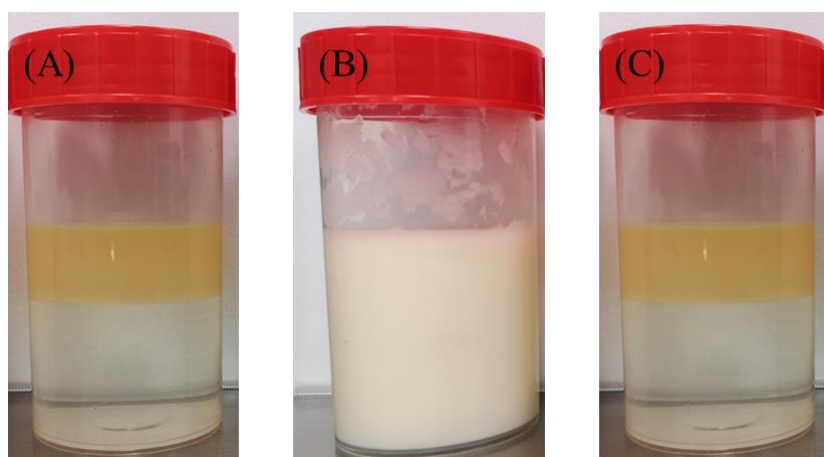


Figure 4.1 : Emulsions inverses concentrées (70/30 m/m (Eau/Phase grasse)) avec (A) huile de colza, (B) huile hydrolysée 2h et (C) huile hydrolysée 24h.

Que ce soit pendant le cisaillement ou directement après l'émulsification, nous constatons que lorsque la quantité de MDGs est importante (2h de lipolyse), le système est stable (

Figure 4.1(B)) alors que pour l'huile de référence ou l'huile riche en AGLs (24h de lipolyse) l'émulsion inverse ne peut être obtenue.

A la vue des différences observées sur la stabilité post-fabrication, il semble donc que les ratios de MDGs et d'AGLs présents dans les huiles hydrolysées impactent la faisabilité de l'émulsion. Il n'est possible de stabiliser des émulsions inverses que dans le cas d'une forte présence d'émulsifiants lipophiles (huile hydrolysée 2h riche en MDGs, (

Figure 4.1(B)). Pour les deux autres émulsions (huile de colza et huile hydrolysée 24h) il est impossible de stabiliser les systèmes dispersés au cours du processus d'émulsification. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas d'émulsifiants dans le cas de l'huile de colza (

Figure 4.1(A)) ou bien à cause d'une forte présence d'AGLs (émulsifiants hydrophiles) dans le cas de l'huile hydrolysée 24h (

Figure 4.1(C)). De plus, les émulsions inverses formulées avec l'huile hydrolysée 2h sont stables mais seulement à l'échelle de quelques heures.

Dans le but d'améliorer la stabilité de ces systèmes, il est possible d'ajouter des émulsifiants hydrophobes tels que le PGPR ou les lécithines. L'usage du PGPR étant peu prisé des industriels de l'agroalimentaire, de nombreux fabricants souhaitent diminuer voire contourner son utilisation. La littérature décrit que pour diminuer la quantité de PGPR tout en conservant la stabilité des émulsions inverses, un ajout de lécithine peut être utilisé. La lécithine est mieux tolérée que le PGPR et plus connue par le consommateur. De plus, à ce jour, c'est le

seul émulsifiant autorisé dans la fabrication de produits certifiés bio. Toutefois, si dans le mélange la teneur en lécithine devient trop élevée ($> 50\%$), la synergie entre les deux émulsifiants n'est plus maintenue aux interfaces et une inversion de phase peut être observée (Okuro, *et al.*, 2019). Également, il a été montré que les composants phospholipidiques des lécithines jouent un rôle important sur la stabilité des émulsions. En effet, des travaux ont décrit la possibilité de stabiliser des émulsions inverses avec des lécithines (soja et tournesol) mais que ces dernières avaient une stabilité faible (environ 1h). Néanmoins, la stabilité des émulsions peut être augmentée avec l'ajout de lécithine appauvrie en phosphatidylcholine (PC) (Balcaen, *et al.*, 2021).

Nous avons donc fabriqué de nouvelles émulsions inverses à partir d'huile hydrolysée 2h dans laquelle nous avons mélangé, préalablement à l'émulsification, différentes natures de lécithines (soja, colza ou tournesol). Sur chaque système, nous avons aussi fait varier leur teneur (5 et 15%), dans le but de mettre en évidence une éventuelle augmentation de stabilité.

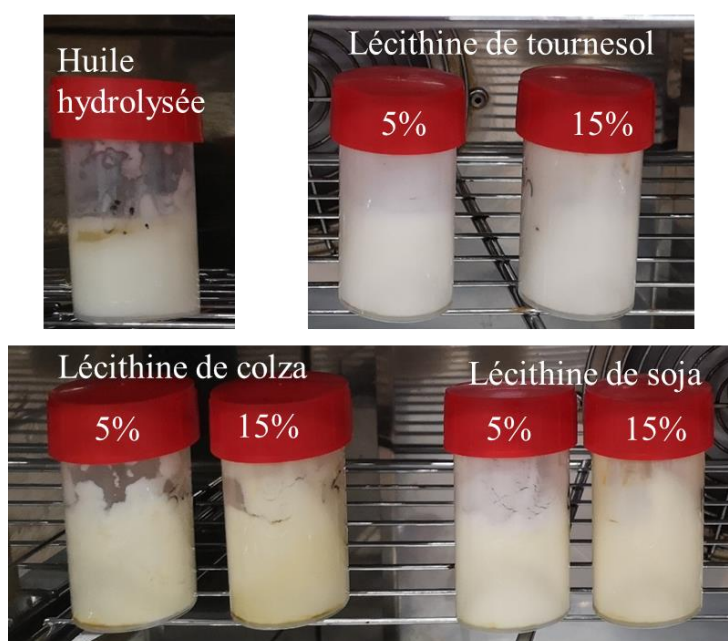


Figure 4.2 : Emulsions inverses (70 % eau/30 % phase grasse) avec ajout de différentes lécithines (5% ou 15%) dans l'huile hydrolysée.

Afin d'obtenir rapidement un aperçu de la stabilisation des émulsions inverses formulées à partir d'huile hydrolysée avec ou sans présence de lécithine (5 et 15%), nous avons placé l'ensemble des échantillons à 30 °C. Après 6h, l'émulsion formulée avec uniquement de

l'huile hydrolysée 2h a commencé à se déstabiliser. Comparativement, sur les autres systèmes, nous observons l'apparition de marbrures plus ou moins marquées qui peuvent être le signe d'un début de déstabilisation, soit par floculation, soit par coalescence (Figure 4.2). Toutefois, les émulsions qui semblent être les plus stables, sont obtenues avec des lécithines de tournesol spécifiquement. Il semble donc que la source botanique joue un rôle dans la stabilité. Les teneurs employées dans cette approche initiale sont élevées pour des productions industrielles (surcoût des formulations), dans la suite de nos études nous les optimiserons.

Etant donné que les phospholipides possèdent tous un groupement phosphoré, nous avons mené des analyses par RMN du phosphore (RMN ^{31}P) afin de comprendre si cette différence pouvait être due aux différents phospholipides présents dans les lécithines (Monakhova & Diehl, 2016, 2018).

Tableau 4.1 : Teneurs en phospholipides dans les lécithines déterminées par RMN ^{31}P .

	% phospholipides (incertitude de mesure <5%)	% PC	%PE	%PI
Colza	48,5	18,0	6,7	6,9
Soja	56,7	11,9	5,8	5,4
Tournesol	51,6	18,2	5,7	12,2

Les lécithines ont des teneurs en phospholipides proches quelle que soit leur origine botanique (environ 50%, Tableau 4.1). Néanmoins, ces lécithines provenant de différentes sources botaniques peuvent avoir des distributions en phospholipides et/ou des longueurs de chaînes/insaturations différentes qui pourraient impacter la stabilité des émulsions. Les ressources végétales sont majoritairement composées de C16 et C18, il est donc peu probable que ce paramètre influence la stabilité (van Nieuwenhuyzen & Tomás, 2008). Il n'y a donc pas de corrélation significative entre la teneur et la nature des phospholipides présents dans les lécithines et la stabilité des émulsions inverses. Toutefois, nous avons retenu que la meilleure stabilité est obtenue en présence de lécithine de tournesol dans l'huile hydrolysée 2h et celle-ci pourrait sans doute être expliquée par la plus forte teneur en PI où on observe une différence significative par rapport au soja ou au colza. Nous avons alors voulu ajuster la teneur à ajouter pour améliorer la stabilité de nos systèmes et voir à partir de quelle concentration des effets délétères, MDGs/lécithines pouvaient être observés. Nous avons donc fait varier la concentration de lécithine de tournesol entre 0,5 et 15%. Après différentes observations

visuelles (réalisées à 30 °C), la meilleure stabilité a été obtenue avec un ajout de 2% de lécithine de tournesol dans l'huile hydrolysée 2h qui permet de passer d'une stabilité de 1 jour à 7 jours.

Suite à ces observations, nous avons ensuite cherché à déterminer la fraction volumique de phase aqueuse pouvant être incorporée au maximum avant que les émulsions inverses ne se déstabilisent totalement (formulées avec de l'huile hydrolysée 2h, et 2% de lécithine de tournesol). Ces émulsions ont été fabriquées avec un cisaillement manuel. Des émulsions inverses très concentrées ont pu être obtenues avec 85, 90 et même jusqu'à 96% de phase aqueuse dispersée. Un effet de texture est clairement visible au fur et à mesure de l'ajout et le système n'a pas déphasé pour de telles teneurs, ce qui montre la grande stabilité pouvant être atteinte (suivi sur 15 jours à 30 °C).



Figure 4.3 : Emulsions inverses concentrées à différentes fractions volumiques aqueuses (A) 85% (B) 90% et (C) 96%.

Au fur et à mesure de l'ajout de la phase aqueuse, nous avons donc des textures qui sont modifiées avec une augmentation significative des viscosités. En effet, pour les plus faibles concentrations en eau les émulsions sont plutôt liquides. Plus la fraction volumique ajoutée est importante, plus l'émulsion s'épaissit laissant apparaître un comportement élastique croissant (Figure 4.3). L'émulsion concentrée à 96% est quant à elle très visqueuse et élastique ce qui limite le cisaillement manuel et rend difficile tout ajout d'eau supplémentaire. Nous considérons donc que l'émulsion est très stable pour de telles fractions volumiques.

Pour les émulsions inverses réalisées sans lécithines, nous observons quasiment les mêmes comportements (ϕ_{eau} à 96% pouvant être atteint manuellement) mais ces dernières se déstabilisent après seulement quelques heures. Pour la suite des essais, nous allons continuer à travailler avec un mélange huile hydrolysée 2h et contenant 2% de lécithine puisque ce mélange est celui qui donne les meilleurs résultats au niveau de la stabilité globale. Ces émulsions ayant

toutes été réalisées manuellement (conditions de cisaillement non contrôlées), nous avons ensuite souhaité approfondir l'étude en calibrant la taille des gouttes de l'émulsion. Pour cela, nous les avons affinées à l'aide de la cellule de Couette.

2.1.1. Caractérisations

Pour l'ensemble des analyses qui sont présentées ici, nous avons souhaité travailler dans des conditions de cisaillements contrôlées. Pour cela, nous avons affiné les émulsions inverses concentrées (85% et 90% de fraction aqueuse) à la cellule de Couette. Ce dispositif permet d'affiner de manière homogène une émulsion grâce à un système rotor-stator permettant de calibrer les gouttes d'eau (état polydispersé vers un état monomodal). Pour chaque proportion, les émulsions ont été réalisées à différentes vitesses de cisaillement (de 50 à 700 rpm). Afin de mesurer l'impact de ce paramètre sur la qualité des émulsions, nous avons réalisé des mesures en rhéologie oscillante, des observations en microscopie optique et des analyses en granulométrie laser.

2.1.1.a. Rhéologie oscillante

Etant donné que les émulsions inverses concentrées sont des systèmes présentant une certaine viscosité, les mesures menées en rhéologie oscillante vont permettre d'apporter une première réponse sur l'affinage des gouttes en suivant notamment le module élastique G' (aussi appelé module de stockage). Une augmentation de ce paramètre pourrait s'expliquer par la présence de gouttes de plus en plus petites dans la phase continue. Dans les deux émulsions étudiées ($\phi_{\text{eau}} = 85\%$ et 90%), nous observons bien cet effet puisque'une augmentation graduelle du G' est observée avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement (Figure 4.4). La texture est également impactée par la vitesse de cisaillement lors de l'affinage par la cellule de Couette ce qui implique que la rhéologie de ces émulsions, très concentrées, est à la fois gouvernée par la taille des gouttes ($G'_{700\text{rpm}} > G'_{50\text{rpm}}$) et la fraction volumique ($G'_{90\%} > G'_{85\%}$).

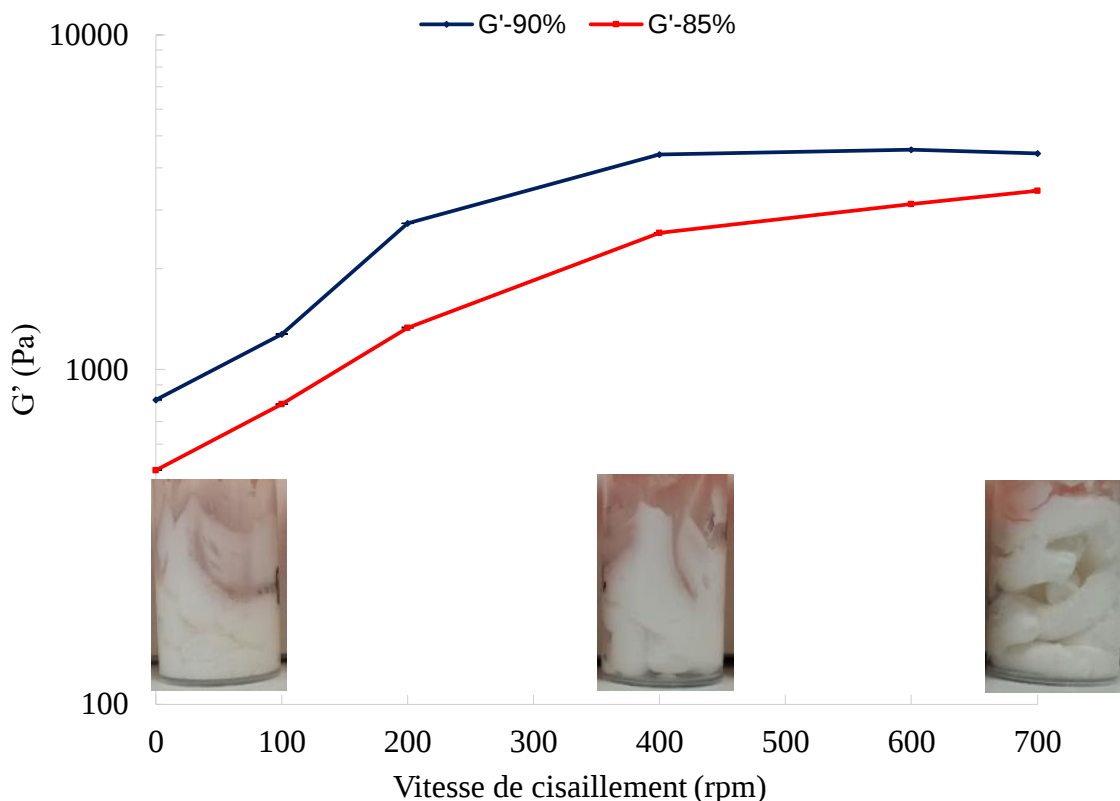


Figure 4.4 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement au cours de l'affinage à la cellule de Couette à 25 °C (échelle log).

Afin de valider notre hypothèse sur la relation entre la viscosité des émulsions et les tailles de gouttes dispersées, nous avons réalisé des mesures de tailles de particules. Pour plus de clarté, sur les résultats exposés ci-après, nous ne présentons qu'un seul système constitué à 85% de phase aqueuse dispersée. Etant donné que la fraction volumique de l'émulsion inverse est importante, il est nécessaire de faire des dilutions afin de pouvoir faire des observations au microscope dans de bonnes conditions tout en sachant que la dilution n'impacte pas la taille des gouttes.

2.1.1.b. Microscopie optique

La microscopie optique peut être utilisée pour observer la taille des gouttes d'eau dispersées dans l'huile. Préalablement et dans le but d'isoler les gouttes pour mieux les visualiser, il est nécessaire de réaliser une dilution des émulsions concentrées. En effet, l'avantage de la dilution réside dans le fait que les gouttes se dispersent dans le milieu tout en conservant leurs tailles. Pour cela, nous avons réalisé dans un premier temps une dilution dans

l'huile de colza seule, cependant, nous avons observé un phénomène de floculation. Cela pourrait s'expliquer par une diminution de la teneur totale en émulsifiants due à la dilution qui impacterait la stabilité de l'émulsion. Dans le but de conserver constante la teneur en MDGs ou en émulsifiants (MDGs + lécithine) lors de la dilution, l'huile hydrolysée 2h et de l'huile hydrolysée 2h contenant 2% de lécithine ont donc été utilisées pour essayer d'atténuer ce phénomène. Toutefois, nous observons encore des réseaux de gouttes connectées, signe évident d'une floculation (Figure 4.5(B)) alors que ce phénomène n'est pas visible avant la dilution (Figure 4.5(A)).

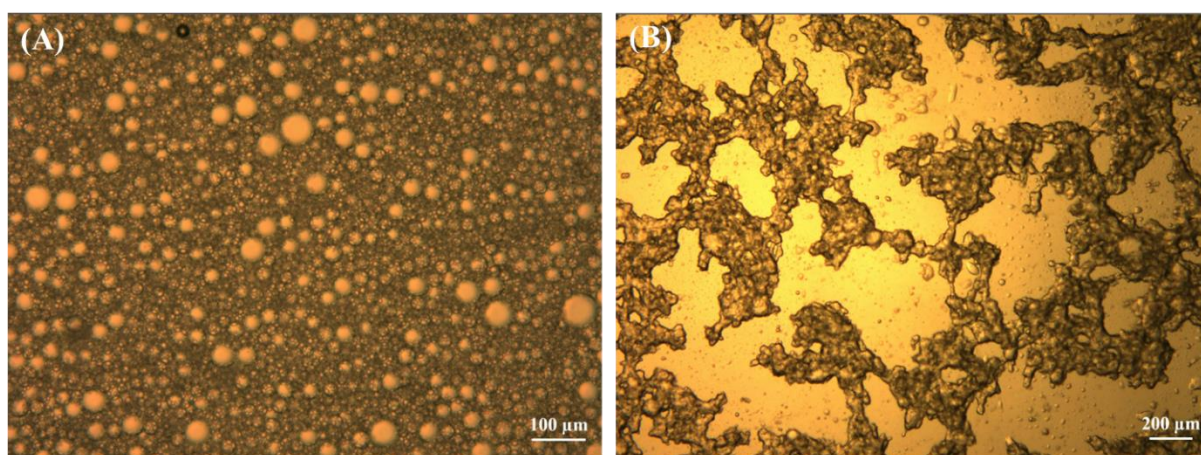


Figure 4.5 : Images microscopiques d'émulsions inverses (A) concentrée (B) diluée dans l'huile hydrolysée 2h + 2% de lécithine.

Pour tenter d'expliquer cette floculation sous l'effet de la dilution, il faut corrélérer les différentes longueurs de chaînes des émulsifiants aux interfaces et la nature quasi-similaire du milieu de dispersion. Dans notre cas, les MDGs qui sont formés au cours de l'hydrolyse enzymatique possèdent les mêmes longueurs de chaîne que les TGs présents dans l'huile végétale utilisée pour la dilution. Par conséquent, le film formé par les MDGs adsorbés aux interfaces ne permet pas à l'huile de pénétrer entre les gouttes et donc de les dissocier (Leal-Calderon, *et al.*, 1997). Également, ce phénomène peut être dû à une concentration trop importante d'émulsifiants dans le milieu. En effet, ce phénomène de floculation augmente en fonction de la quantité d'émulsifiants mais également de la teneur de la phase dispersée (Pal, 1993). Sur la base de ces hypothèses, nous avons donc réalisé des dilutions avec des matières grasses à chaînes plus courtes comme par exemple le miglyol® (triglycérides en C8/C10) mais les mêmes observations ont été faites. À l'inverse, l'utilisation du miglyol® contenant 5% de PGPR nous a permis d'éviter cette floculation. En effet, le PGPR ayant une HLB généralement

plus faible que les MDGs (1 vs 3), cet émulsifiant aura tendance à venir désorber les MDGs aux interfaces, favorisant alors une bonne stabilité et une meilleure dissociation des gouttes tout en conservant leurs tailles. Les phénomènes de floculation ont bien été évités et nous avons pu poursuivre nos observations au microscope.

Le but initial étant d'étudier l'influence du cisaillement sur la taille des gouttes formées, nous avons alors réalisé une dilution avec un mélange constitué de miglyol® et de 5% de PGPR pour chaque émulsion cisailée à différentes vitesses (0, 100, 200, 400, 600 et 700 rpm). Ces dilutions observées au microscope optique, au même grossissement, nous ont permis de noter que plus la vitesse de cisaillement est importante et plus les tailles des gouttes obtenues sont petites (Figure 4.6).

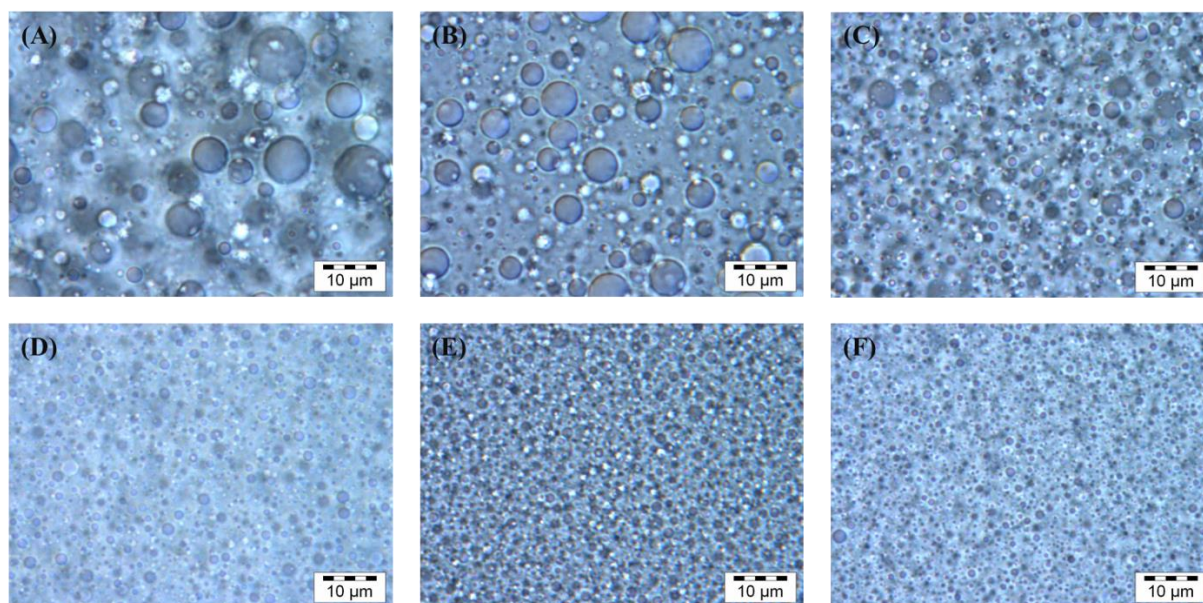


Figure 4.6 : Images microscopiques (x 100) d'une émulsion inverse concentrée à 85% affinée à la cellule de Couette avec une vitesse d'agitation de (A) 0 rpm, (B) 100 rpm, (C) 200 rpm, (D) 400 rpm, (E) 600 rpm et (F) 700 rpm.

Ces observations nous montrent que des vitesses de cisaillement plus élevées entraînent la formation de gouttes plus fines. Afin de déterminer de façon plus précise la taille et la polydispersité des particules, nous avons alors caractérisé ces émulsions diluées en granulométrie laser.

2.1.1.c. Granulométrie laser

Cette technique, basée sur la diffraction de la lumière, permet de déterminer le profil de taille moyenne des particules présentes dans l'émulsion mais également d'informer sur la polydispersité de l'émulsion. Pour ce faire, une fraction d'émulsion diluée (identiques à celles analysées en microscopie, $\approx 50 \mu\text{L}$) est ajoutée dans $\approx 50 \text{ mL}$ d'un milieu dispersant (miglyol®). La dilution est maintenant considérée comme « infinie » ce qui permet d'éloigner les gouttes les unes des autres. Compte tenu des tailles de particules observées par microscopie, nous avons focalisé les mesures de granulométrie entre 0 et 50 μm .

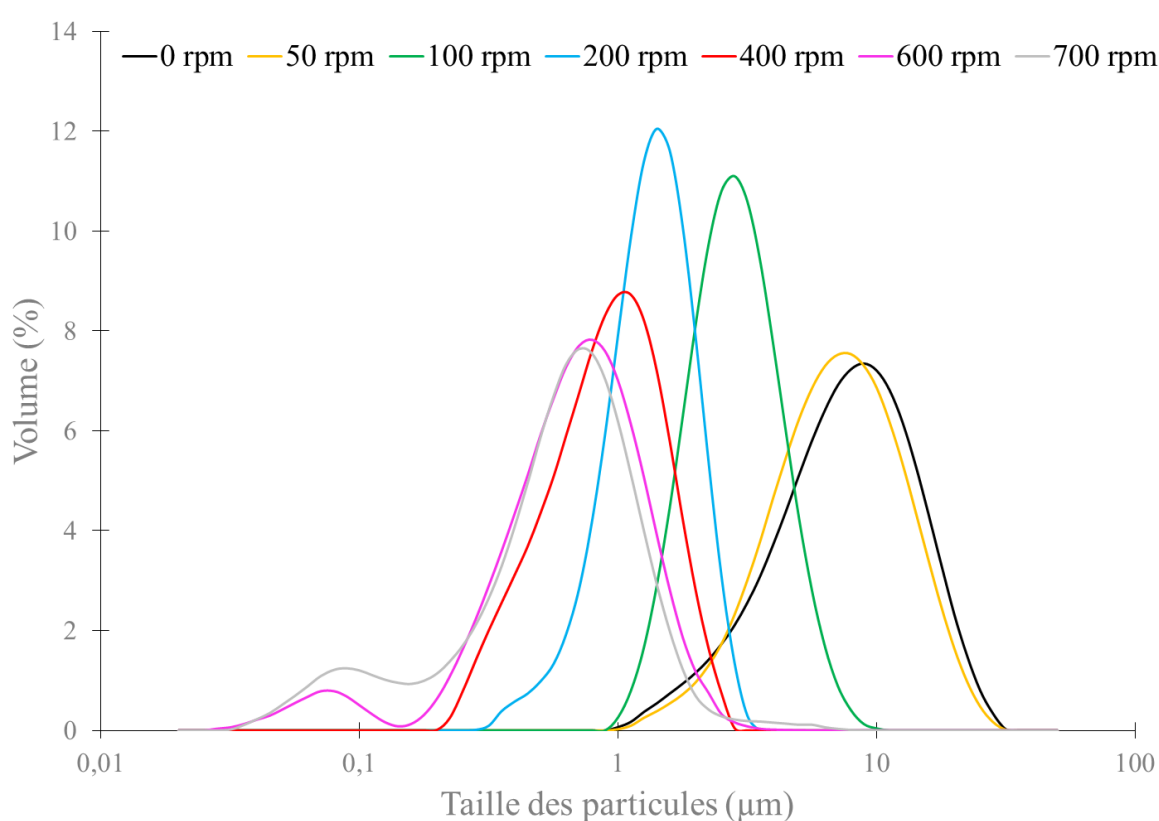


Figure 4.7 : Evolution du diamètre des gouttes de l'émulsion inverse concentrée (85%) en fonction des vitesses de cisaillement au cours de l'affinage à la cellule de Couette.

Pour les émulsions manuellement cisailées (0 rpm) et celles cisailées à 50 rpm, la population en taille moyenne est centrée sur 10 μm . Pour des vitesses de cisaillement plus importantes, nous observons que le signal se décale progressivement vers les petites tailles jusqu'à se stabiliser autour de 0,6 μm (Figure 4.7). Ainsi, nous pouvons en conclure, comme dans le cas de la microscopie, que plus la vitesse de cisaillement est élevée, plus le diamètre des

gouttes diminue. L'évolution des populations vers les petites tailles se répercute aussi sur les diamètres moyens $D[3,2]$ et $D[4,3]$ des particules (Tableau 4.2). Le $D[3,2]$ donne des informations sur le diamètre moyen des gouttes en surface et est lié à la quantité d'interface. Le $D[4,3]$ donne quant à lui des informations sur le diamètre moyen mais dont le calcul se base sur la contribution par rapport au volume.

Tableau 4.2 : Evolution des diamètres moyens $D[3,2]$ et $D[4,3]$ des gouttes de l'émulsion à 85% en fonction de la vitesse de cisaillement.

Vitesse de cisaillement (rpm)	0	50	100	200	400	600	700
$D[3,2]$ (µm)	5,97	5,81	2,61	1,20	0,76	0,42	0,34
$D[4,3]$ (µm)	8,86	8,19	3,06	1,41	0,99	0,77	0,72

Le décalage des signaux ainsi que les valeurs des diamètres moyens $D[3,2]$ et $D[4,3]$ devenant de plus en plus petits, nous observons bien que la taille des gouttes diminue lorsque les vitesses de cisaillement augmentent.

Équation 4.1 : Détermination de la tension de surface γ par la contribution rhéologique de l'émulsion (Masson, 1997).

$$G' = 1,7 \times \frac{\gamma}{R} \times \varphi^2 \times (\varphi - \varphi^*)$$

En corrélant les valeurs de $D[3,2]$ et les valeurs de G' obtenues précédemment en rhéologie, nous pouvons déterminer, grâce à l'Équation 4.1, la valeur théorique de la tension de surface γ de la phase grasse contenant les émulsifiants. Dans l'équation, G' représente le module élastique exprimé en Pa, $D[3,2]$ représente le diamètre moyen surfacique (µm) et φ et φ^* représentent respectivement les fractions volumiques de la phase dispersée pour une teneur donnée et la teneur critique (respectivement à 0,85 et 0,74). Dans notre cas, la phase grasse concernée est l'huile hydrolysée 2h contenant 2% de lécithine avec une valeur γ calculée de 5,6 mN/m.

Afin de vérifier cette valeur théorique, nous avons alors réalisé des mesures de tension de surface par goutte pendante (goutte d'eau dans huile) en fonction du temps (cinétique

d'adsorption). Le profil cinétique de la tension de surface de l'huile hydrolysée 2h contenant 2% de lécithine montre qu'un temps de stabilisation de l'ordre de 50 secondes est nécessaire (Figure 4.8). Ce temps pourrait être assimilé à la vitesse d'adsorption d'équilibre des émulsifiants aux interfaces. Cette mesure nous permet donc de déterminer une valeur expérimentale de $\gamma = 5,2 \pm 0,1$ mN/m, ce qui est cohérent avec la valeur théorique de 5,6 mN/m déterminée par l'équation précédente.

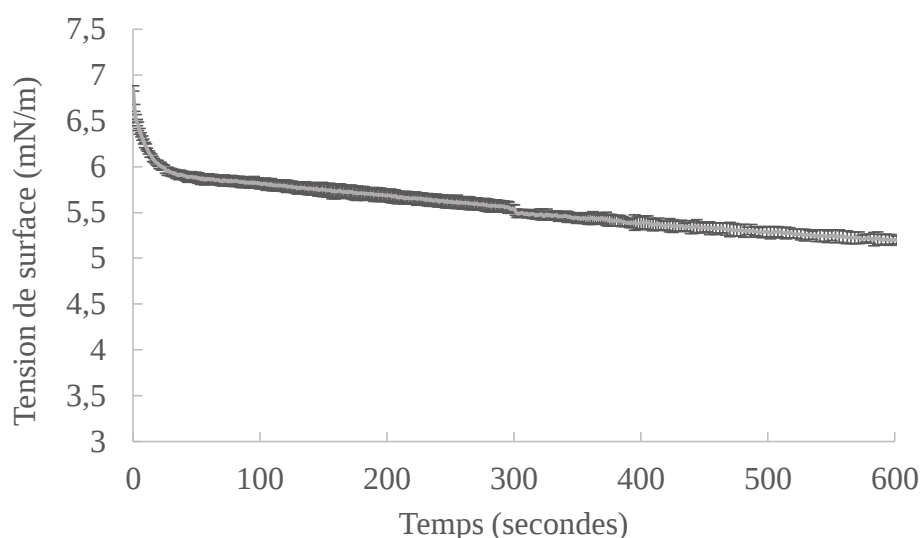


Figure 4.8 : Evolution de la tension de surface d'une goutte d'huile hydrolysée 2h avec 2% de lécithine en fonction du temps à 25 °C.

Dans cette partie, nous venons de mettre en évidence la possibilité de formuler des émulsions inverses concentrées à partir de l'huile de colza hydrolysée 2h et de 2% de lécithine de tournesol. Différentes fractions volumiques d'eau ont pu être obtenues et l'ensemble des systèmes a pu être caractérisé par rhéologie, microscopie optique et granulométrie. Ces systèmes permettent d'atteindre des fractions volumiques (96%) aussi élevées voire plus qu'avec du PGPR (Delample, *et al.*, 2014). Cette démarche permet de démontrer la faisabilité d'une émulsion inverse stable et ce sans ajout exogène d'additifs autre que la lécithine. Nous avons par la suite souhaité l'utiliser pour formuler des émulsions doubles.

2.2. Les émulsions doubles

Comme nous venons de le voir, plus une émulsion est concentrée, plus elle présente une viscosité élevée, ce qui a pour effet d'augmenter le module élastique G' tout en diminuant

la taille des gouttes. Nous avons donc décidé de réaliser des émulsions doubles à partir des émulsions inverses concentrées qui constituent la première étape de fabrication de ces systèmes.

Pour cela, nous avons tout d'abord fabriqué une émulsion inverse concentrée à 85% afin d'obtenir des tailles de gouttes d'eau les plus petites possibles puis dilué cette émulsion avec de l'huile hydrolysée 2h contenant 2% de lécithine. Cette émulsion inverse diluée constituera donc la phase dispersée lors de la seconde émulsification (émulsion directe à phase continue aqueuse). L'utilisation de protéines, comme les caséinates, permet de stabiliser la deuxième interface de ce système dispersé. Nous avons utilisé une solution de caséinate de sodium à 12%, car elle est capable de s'adsorber à l'interface huile/eau et favorise les émulsions directes. Elle amène également de la texture à partir de 10%, ce qui permet de fragmenter l'émulsion inverse lors de la seconde émulsification (Delample, *et al.*, 2014).

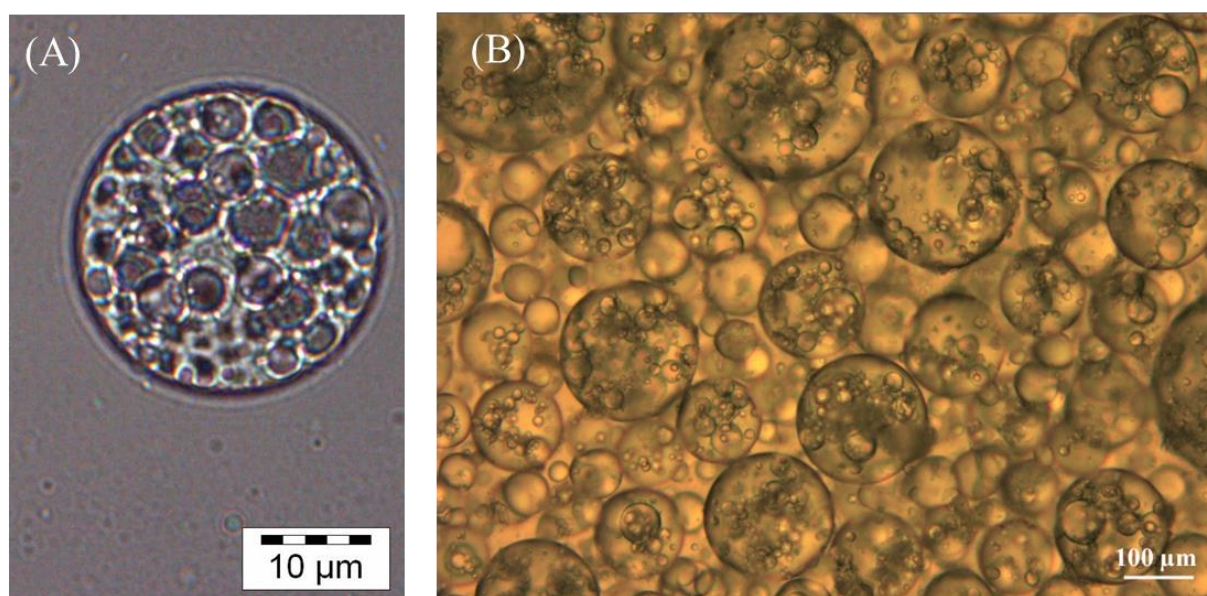


Figure 4.9 : Emulsions doubles E/H/E dans une solution de caséinate de sodium à 12 % formulée à partir d'une émulsion inverse stabilisée avec (A) le PGPR et (B) l'huile hydrolysée 2h contenant 2% de lécithine.

Avec une émulsion double formulée à partir d'une émulsion inverse stabilisée par du PGPR (Figure 4.9(A)) nous observons des gouttelettes qui occupent tout l'espace du globule d'huile. Toutefois, l'utilisation d'une émulsion inverse (concentrée puis rediluée à 50% volumique) stabilisée par le mélange huile hydrolysée 2h/ lécithine de tournesol 2% ne permet d'aboutir à la même configuration gouttes/globules car d'une part, l'émulsion inverse diluée est floculée et d'autre part, parce que le cisaillement induit lors de la seconde étape détruit

partiellement l'émulsion. Pour éviter ce phénomène, des essais ont été réalisés en augmentant la viscosité de la phase aqueuse. Ceci permet d'avoir des viscosités entre les deux phases aussi proches que possibles pour ainsi améliorer la dispersion. Nous avons essayé de travailler avec de l'eau salée (gouttes internes) afin d'augmenter les répulsions de charge et limiter ainsi la floculation au niveau des gouttes, mais cela n'a pas permis une amélioration du système.

Pour éviter la floculation indésirable, nous avons donc fabriqué une émulsion inverse directement à la fraction volumique de 50%. En parallèle, la solution de caséinate de sodium a été diluée pour atteindre une concentration massique de 11%. Les deux effets combinés ont permis d'aboutir à une structure d'émulsion double plus conforme à ce qui est observé avec le PGPR (Figure 4.9(B)). Même si la structure goutte/globule est retrouvée, les systèmes apparaissent très fragiles puisque les gouttes internes coalescent ou s'échappent du globule rapidement (le temps de l'observation au microscope).

Toutefois, mêmes si ces systèmes doivent être optimisés, dans les conditions du laboratoire, nous avons malgré tout démontré la possibilité de formuler des émulsions doubles sans ajout de PGPR. Ceci a été réalisé grâce à des émulsions inverses formulées à partir d'huile de colza hydrolysée par réaction enzymatique. Également, nous avons montré que l'ajout de lécithine pouvait améliorer la stabilité de nos systèmes. Ces essais constituent une avancée majeure dans le domaine pour la fabrication d'émulsions inverses sans PGPR.

Nous venons, dans cette partie, de démontrer l'intérêt d'impliquer des huiles hydrolysées par réaction enzymatique dans la formulation d'émulsions inverses et doubles. Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous consacrer à l'utilisation et l'incorporation directe de ces huiles hydrolysées dans la fabrication de matrices alimentaires (crèmes glacées, barres pâtisseries et brioches). L'objectif est de caractériser et comparer ces produits fabriqués à partir des huiles hydrolysées avec des produits témoins formulés avec de l'huile de colza afin de déterminer et quantifier des différences liées à la présence de MDGs, d'AGLs ou des deux. Toutefois avant d'aborder cela, nous avons travaillé sur le transfert d'échelle des réactions enzymatiques.

3. Réactions enzymatiques en lot pilote

La fabrication de matrices alimentaires nécessite l'utilisation de quantités importantes d'huile. La première étape a donc consisté à vérifier la faisabilité des hydrolyses enzymatiques à une échelle pilote. La dispersion au stade laboratoire, réalisées avec une pale créant ainsi un vortex en son milieu, engage des volumes à hauteur de 500 mL. A l'échelle pilote, des systèmes différents ont été utilisés : des mélangeurs équipés d'une hélice en bas de cuve et d'une contre-pale d'agitation assurant un renvoi du liquide dans le volume général. Le premier mélangeur possède une capacité de 12 L (Stéphan[®]) et le second, une capacité de 85 L (CDH[®]). Sur ces deux équipements, les réactions enzymatiques ont été effectuées avec l'enzyme NLS et de l'huile de colza, dans les mêmes proportions et conditions de température que celles décrites dans le chapitre 3. Les huiles hydrolysées ont ensuite été analysées avec les mêmes méthodes de caractérisation et ont été comparées avec les profils de produits et réactifs obtenus au cours des réactions enzymatiques réalisées à l'échelle laboratoire.

3.1. Indice d'acidité et mesure de tension de surface

La détermination de l'indice d'acidité (I_A) permet de savoir rapidement si le changement d'échelle impacte la lipolyse enzymatique. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué, au cours de la réaction, plus le système est émulsionné, meilleur sera le rendement d'hydrolyse des triglycérides (Benzonana & Desnuelle, 1965; Sarda & Desnuelle, 1958). Ici, en plus de l'augmentation du volume des phases aqueuses et grasses engagées, le mode d'agitation a été modifié. C'est sur ce point que le changement d'échelle pourrait donner les plus grandes différences. L'ensemble des réactions a été réalisé à une température de 37 °C, sous agitation constante. Les prélèvements, pour le suivi de réaction, ont été réalisés à 30 min, 1h, 1h30, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h.

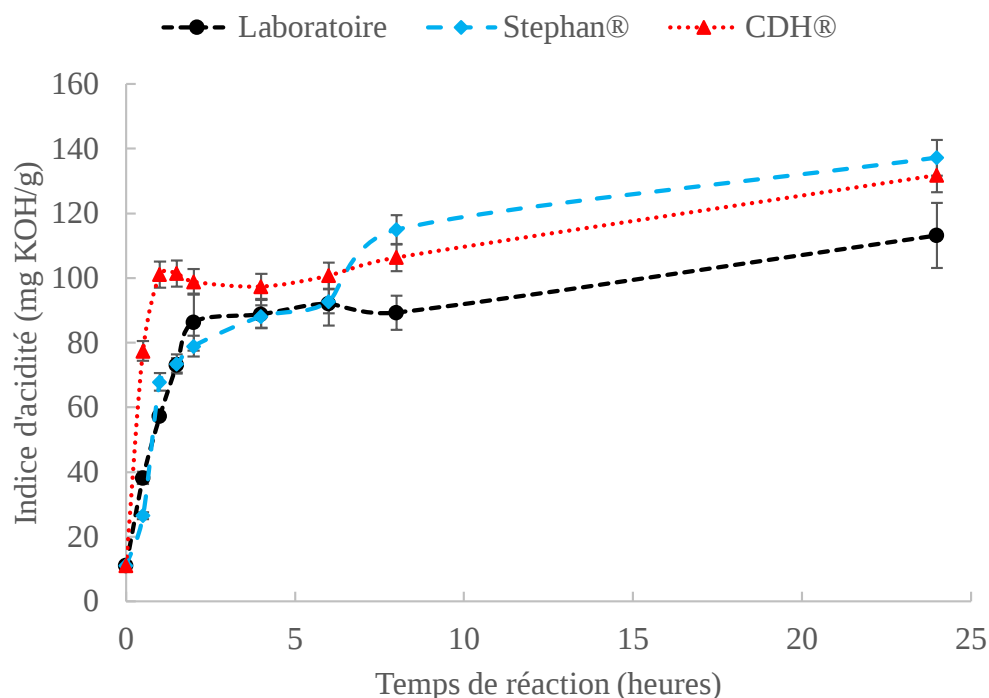


Figure 4.10 : Evolution de l' I_A des réactions enzymatiques au cours du transfert d'échelle.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 4.10, les enzymes ont le même profil d'activité quel que soit le réacteur utilisé, ce qui est donc indépendant du transfert d'échelle. La cinétique de la réaction enzymatique peut être divisée en deux parties. Nous observons une augmentation brutale de l'indice d'acidité entre 0 et 2h, un tel profil est en faveur d'une hydrolyse rapide de l'huile. Au-delà, l'hydrolyse semble plus progressive jusqu'à 24h. Il semblerait que les deux systèmes d'agitation à l'échelle pilote soient plus efficaces en termes d'hydrolyse enzymatique que l'appareillage du laboratoire. Ces résultats nous permettent donc de valider la possibilité d'hydrolyser les TGs à plus grande échelle (500 mL, 12 L et 60 L) avec de bons rendements. Les faibles différences d' I_A observées, montrent que les systèmes d'agitation pilotes et les conditions opératoires sont bien adaptées à un transfert d'échelle.

Des mesures de tension de surface ont ensuite été effectuées, à différents intervalles de temps, pour comparer les huiles hydrolysées obtenues avec les huiles de référence synthétisées à l'échelle pilote ou au laboratoire. Aucune différence notable entre ces huiles n'est observée (Figure 4.11). En effet, les profils montrent une baisse significative de la valeur de tension de surface (γ) puis un palier au-delà.

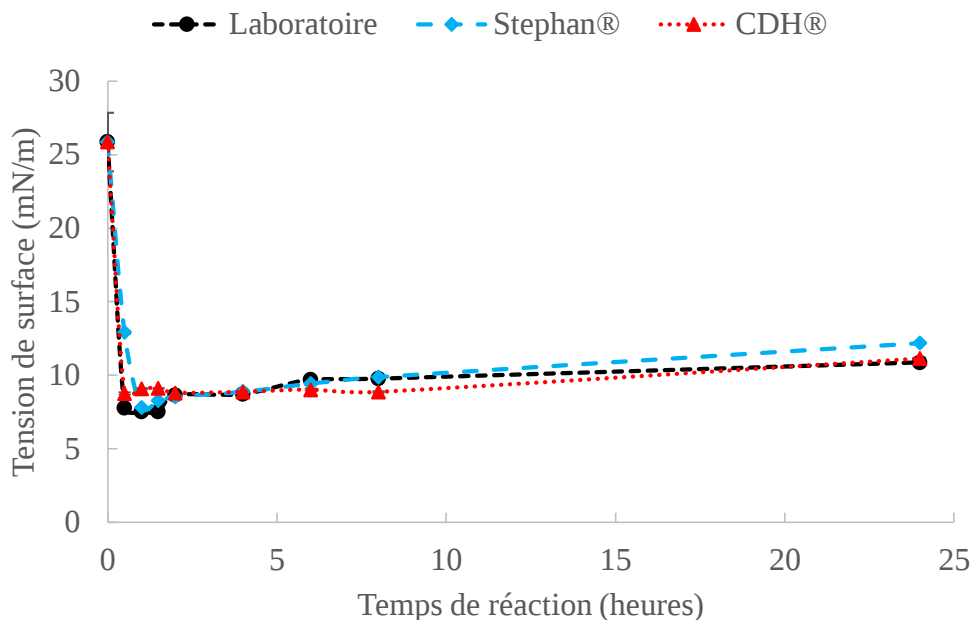


Figure 4.11 : Evolution de γ des réactions enzymatiques au cours du transfert d'échelle.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les molécules obtenues dans les différentes huiles pourraient présenter les mêmes propriétés tensioactives. Afin de le confirmer, il convient de vérifier maintenant si les molécules formées au cours des différentes hydrolyses à l'échelle pilote sont identiques à celles obtenues en référence à l'échelle du laboratoire (chapitre 3). Pour cela, des analyses, réalisées en cours d'hydrolyse, ont été effectuées par RMN ^{13}C .

3.2. Etude RMN ^{13}C

L'étude menée ici a été réalisée dans des conditions opératoires identiques aux études précédentes, à savoir que les huiles sont prélevées au cours du temps, centrifugées et préparées en solution dans le CDCl_3 . Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, afin de connaître les proportions de chacune des molécules présentes dans le milieu réactionnel, nous avons tout d'abord fixé comme référence le signal du groupement méthyle terminal des chaînes d'AG qui est commun à toutes les molécules. Comme pour les précédentes études, nous avons par la suite effectué des rapports d'intensité avec les signaux spécifiques sur chaque catégorie de molécules synthétisées. Nous sommes donc dans des conditions d'étude qualitative et non quantitative.

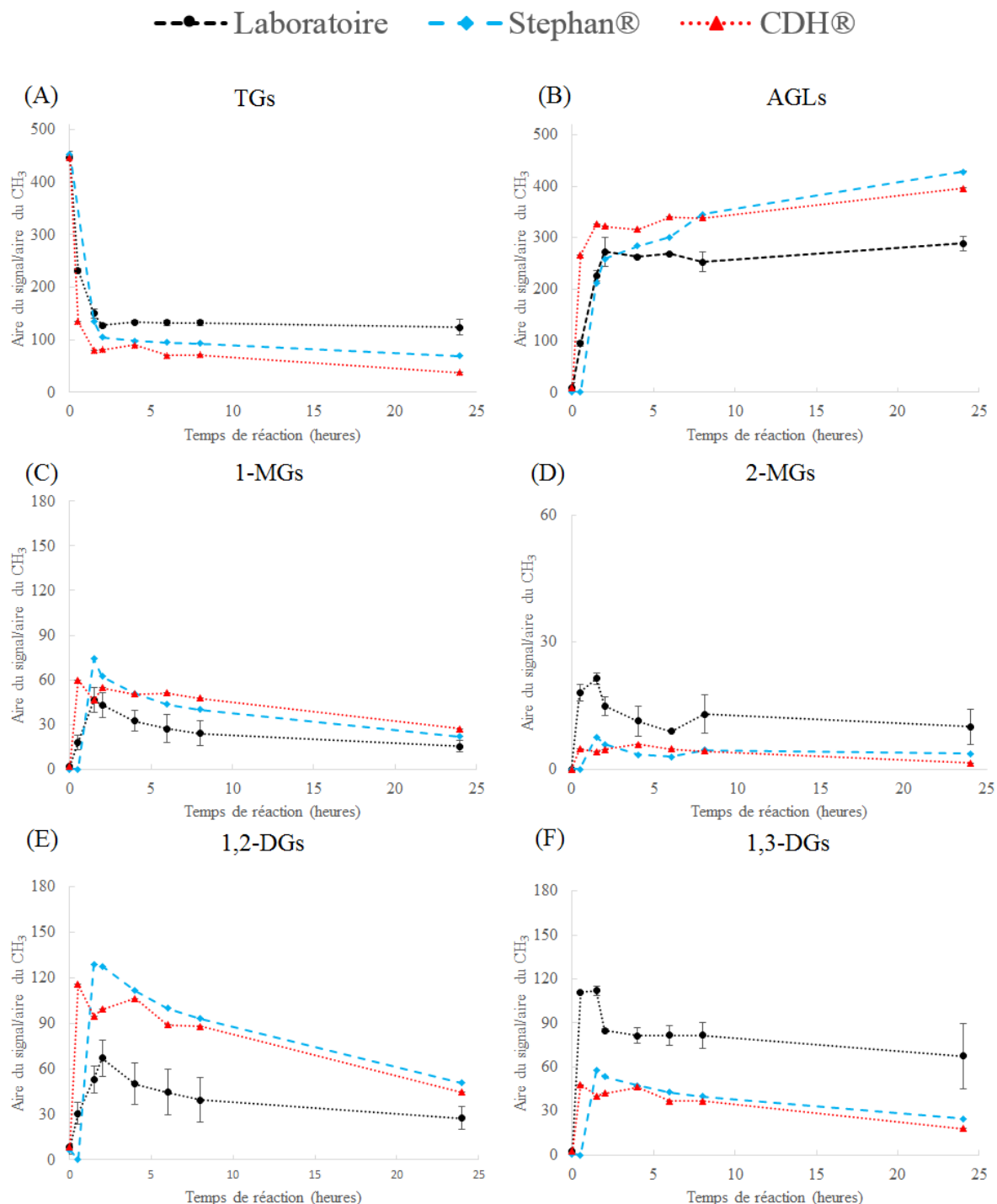


Figure 4.12 : Evolution des molécules présentes dans l'huile de colza en fonction du matériel utilisé (laboratoire : 500 mL ; Stéphan : 12 L et CDH : 60 L).

En se focalisant sur les teneurs en TGs (Figure 4.12(A)), nous observons que leur consommation est rapide jusqu'à 2h et plus faible au-delà, rappelant ainsi tous les profils obtenus jusqu'alors. Cependant, il semble qu'il y ait une dépendance en fonction de l'échelle

considérée. En effet, dans les réactions menées avec le Stephan[®] (12L) et le CDH[®] (60L), il semble que les TGs se consomment plus rapidement que lors des fabrications au laboratoire mettant en avant un effet volume et un effet dû au système d'agitation. Pour les AGLs, (Figure 4.12(B)), nous observons également une production plus importante de ces molécules dans le Stephan[®] et le CDH[®]. De plus, les autres molécules formées au cours de l'hydrolyse des TGs (MGs et DGs) ne sont pas présentes dans les mêmes proportions. Effectivement, la production de 1-MGs et 1,2-DGs semble légèrement plus importante pour les mélangeurs pilotes que pour l'échelle laboratoire (Figure 4.12(C) et (E)). A l'inverse, la production de 2-MGs et 1,3-DGs est légèrement plus faible lorsque nous sommes à plus grande échelle (Figure 4.12(D) et (F)).

Sur l'ensemble des profils obtenus, on notera une différenciation (plus marquée sur les MDGs) entre les résultats obtenus à l'échelle du laboratoire et ceux menés en pilotes, où les courbes rouges et bleues se regroupent souvent. Il semble donc que l'augmentation du volume réactionnel n'impacte pas la cinétique mais que ce sont les conditions d'agitation qui influencent les sélectivités et les rendements de réaction. Aussi, malgré ces différences, la tendance est toujours similaire, à savoir que la production maximale de chacun des produits est atteinte après 1h30 de réaction et qu'ensuite ces derniers sont reconsommés. L'activité de l'enzyme NLS n'est donc pas modifiée avec la transposition d'échelle.

Nous venons donc de mettre en évidence la possibilité de transposer les réactions enzymatiques sur les huiles végétales à une échelle pilote (12 L et 60 L) et ainsi nous pouvons obtenir des huiles hydrolysées avec des caractéristiques proches de celles réalisées à l'échelle du laboratoire (500 mL). Nous pouvons donc entrevoir une future fabrication de produits alimentaires. Cette partie dédiée est traitée ci-après où nous aborderons les crèmes glacées, les barres pâtisseries et les brioches en essayant d'appliquer les concepts mis en avant lors du chapitre précédent.

4. Utilisation des huiles hydrolysées dans des matrices alimentaires

4.1. Les crèmes glacées

Les crèmes glacées peuvent être décrites comme des mix laitiers de type émulsion directe dans lesquels est incorporé de l'air. Le tout est notamment stabilisé par des molécules émulsifiantes, essentiellement des protéines. La grande majorité des crèmes glacées présentes

dans le commerce sont formulées à partir de crème et/ou de lait. Toutefois, celles fabriquées sans matières laitières peuvent contenir des matières grasses concrètes comme de l'huile de coprah, de l'huile de palme, ... et des agents stabilisants ou épaississants (tels que les gommes). La cristallisation de ces ingrédients se fait par une étape de refroidissement, ce qui permet d'apporter de la texture aux produits. L'utilisation d'une huile liquide à température ambiante, comme l'huile de colza ne présente pas forcément un grand intérêt dans cette application. En effet, du fait de sa température de cristallisation très faible ($T_c = -55\text{ °C}$), elle ne peut pas être ajoutée seule et requiert de nombreux additifs afin de texturer les mixes et les crèmes glacées.

Lors de notre étude dédiée à la lipolyse enzymatique de l'huile de colza réalisée avec différentes enzymes et présentée dans le chapitre 3, nous avons observé une modification de l'aspect de certaines huiles lors du stockage à 4 °C . Une modification des températures de cristallisation et de fusion de l'huile hydrolysée pendant 24h a pu être mise en évidence par des analyses thermiques. De ce fait, il nous est apparu intéressant d'étudier l'influence de ces huiles hydrolysées sur la tenue et la texture des produits glacés. En effet, l'utilisation d'une matière grasse moins saturée pourrait améliorer le profil nutritionnel. Pour rappel, les températures de cristallisation des différentes huiles hydrolysées, en fonction des enzymes sont : Sumizyme[®] RLS ($T_c = -10\text{ °C}$), Sumizyme[®] NLS ($T_c = -15\text{ °C}$), Lipopan[®] Xtra BG ($T_c = -23\text{ °C}$) et Lilipase[®] A-10D ($T_c = -28\text{ °C}$).

Précédemment, nous avons mis en évidence que le temps d'hydrolyse des huiles a une incidence sur la nature des produits obtenus et ne permet donc pas la stabilisation des mêmes émulsions. En effet, une huile hydrolysée 2h (enrichie en MDGs) stabilise les émulsions inverses contrairement à l'huile hydrolysée 24h (riche en AGLs). Les crèmes glacées étant des émulsions directes, il nous faut donc travailler avec une huile riche en AGLs. C'est la raison pour laquelle notre choix s'est plutôt orienté vers des huiles de colza hydrolysées pendant 24h.

4.1.1. Fabrications

L'idée de ce travail est de substituer les additifs présents dans certaines recettes commerciales de crèmes glacées, en utilisant une huile hydrolysée enrichie en AGLs. Afin de voir l'influence de nos huiles hydrolysées sur les crèmes glacées, nous avons reproduit une recette « modèle » de glaces. A l'aide de la liste des ingrédients et des valeurs nutritionnelles indiquées sur l'emballage nous avons pu contretyper une recette commerciale. Cette formule

contient de l'huile végétale de colza que nous allons substituer par les différentes huiles traitées avec les différentes lipases (ingrédient variable indiqué en gras dans le tableau). Les ingrédients et les proportions utilisées pour formuler nos crèmes glacées sont décrits dans le Tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Ingrédients des crèmes glacées et leurs proportions.

Ingrédients	Quantité (%)
Eau	62,55
Sucre	17,70
Poudre de lait	5,29
Sirop de glucose	4,00
Huile végétale	6,45
Sucre inverti	2,70
Farine de caroube	0,16
Gomme guar	0,09
Arôme naturel de vanille	1,00
Colorant jaune	0,07

Les produits de types crèmes glacées ou mix laitiers sont des produits aqueux, ce qui justifie la quantité importante d'eau et de lait écrémé réhydraté. De plus, l'ajout de lait permet d'apporter des protéines qui permettront de stabiliser les globules gras présents dans la matrice. Les agents stabilisants tels que la farine de caroube et la gomme de guar sont ajoutés afin de donner de la texture au produit et, tout en participant à la stabilisation des émulsions, ils facilitent l'incorporation d'air et agissent également sur la fonte de la glace. Classiquement, du fait de leur T_c élevée, l'ajout de matières grasses saturées permet d'améliorer la texture des crèmes glacées et leurs stabilités. Dans nos préparations, l'ensemble des ingrédients sera ajouté dans les mêmes proportions que la formule commerciale et seul le type d'huile végétale sera modifié pour l'étude. Pour notre étude, la glace formulée avec l'huile de colza non hydrolysée servira de référence et nous ferons une substitution totale de celle-ci avec les huiles hydrolysées 24h issues des différentes enzymes (NLS, RLS, Lipopan, Lilipase). Après formulation, les produits sont mis au surgélateur pendant 30 min à $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis conservés à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. D'après les T_c et T_f des huiles hydrolysées relevées en DSC, nous pouvons supposer qu'à la température de stockage ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) certaines huiles seront à l'état cristallisé (NLS et RLS) alors que d'autres seront liquides (huile de colza, Lilipase, Lipopan). Pour mieux caractériser et comprendre

l'influence des différentes huiles hydrolysées sur la consistance des crèmes glacées, nous les avons caractérisées par des études d'écoulement et de suivi de texture (Goibier, 2018).

4.1.2. Etude d'écoulement

Cette étude donne des informations sur la cinétique de fonte des différentes crèmes glacées lorsqu'elles sont mises à température ambiante. Pour cela, une masse définie de glace est déposée sous la forme d'un médaillon découpé à l'emporte-pièce, sur un tamis présentant une ouverture de maille de 2 mm. Au cours de la fonte, la quantité de glace liquide fondue est relevée en fonction du temps à température constante. (Figure 4.13). Ces mesures ont été effectuées dans une pièce thermostatée à 20 °C de façon à éviter d'éventuelles fluctuations thermiques pour une meilleure reproductibilité des résultats.

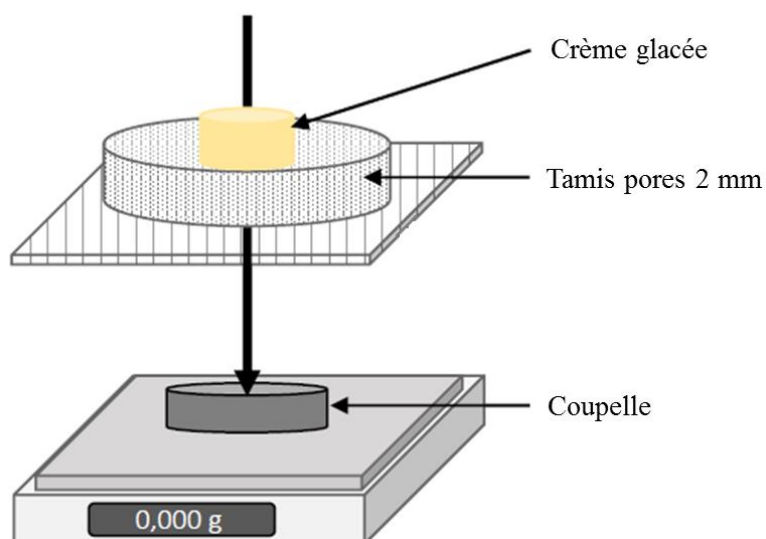


Figure 4.13 : Description schématique du dispositif pour l'étude de fonte des crèmes glacées (Goibier, 2018).

Dans le but d'étudier l'influence des températures de fusion des huiles hydrolysées avec les différentes enzymes, chaque crème glacée fabriquée a été analysée par cette méthode où l'on suit la masse cumulée de glace fondue au cours du temps. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 4.14.

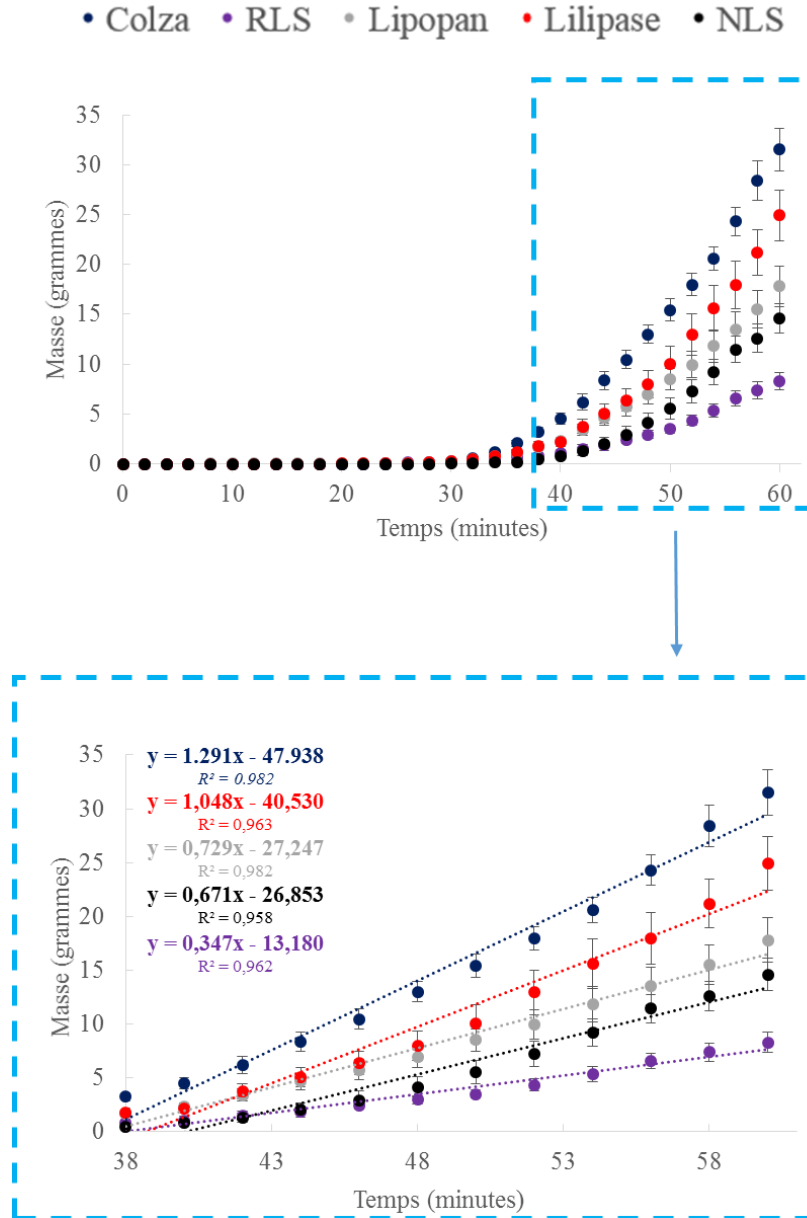


Figure 4.14 : Fonte des crèmes glacées à 20 °C en fonction du temps.

Comme nous pouvons le voir, l'ensemble des glaces ne s'écoule pas avant 30 min à 20 °C. Toutefois, à partir de 38 min un écoulement significatif est observé pour l'ensemble des crèmes glacées. Contrairement à ce que nous pouvions imaginer, aucun retard de fonte n'est observé en fonction des différences de T_f des huiles, elles commencent toutes à s'écouler au bout de la même durée. Cela peut s'expliquer par la présence des gommes dans la formule. En revanche, nous avons observé des différences dans la vitesse de fonte une fois que celle-ci est amorcée. Les vitesses de fonte ont été déterminées par régression linéaire pour l'écoulement entre 38 et 60 min, le coefficient directeur de la droite indiquant la vitesse de fonte exprimée en

grammes par minutes. Celles-ci sont en corrélation directe avec les différentes températures de fusion des huiles. En effet, les valeurs de vitesse d'écoulement des glaces diminuent dans l'ordre suivant : huile de colza (1,29 g/min), et les huiles traitées par Lilipase (1,05 g/min), Lipopan (0,73 g/min), NLS (0,67 g/min) et RLS (0,35 g/min). Cela est donc cohérent avec les T_f majoritaires déterminées lors des analyses en DSC (Tableau 4.4).

Tableau 4.4 : Caractéristiques des crèmes glacées en fonction des huiles utilisées.

	Ratio RMN ^{13}C en AGLs à 24h	Ratio RMN ^{13}C en TGs à 24h	Enthalpie de cristallisation (pic majoritaire ; J/g)	T_c majoritaire (°C)	T_f majoritaire (°C)	Vitesse de fonte (g/min)
Huile de colza	0 ± 2	450 ± 1	$71,5 \pm 1,4$	-56	-17	$1,29 \pm 0,05$
Lilipase	201 ± 7	140 ± 10	$34,5 \pm 1,9$	-26	-1	$1,05 \pm 0,06$
Lipopan	192 ± 5	248 ± 17	$26,7 \pm 0,4$	-23	-1	$0,73 \pm 0,03$
NLS	289 ± 14	125 ± 16	$34,3 \pm 0,2$	-15	+2	$0,67 \pm 0,04$
RLS	483 ± 6	11 ± 1	$51,9 \pm 0,1$	-10	+6	$0,35 \pm 0,02$

Les huiles hydrolysées, contrairement à l'huile de colza, présentent une quantité non négligeable d'AGLs. Il semble y avoir une corrélation directe entre la teneur en AGLs et les enthalpies de cristallisation ($r^2 = 0,9726$). La même observation est aussi valable pour les TGs ($r^2 = 0,9728$) si l'on se base sur les ratios déterminés par RMN ^{13}C . De plus, il y a aussi un lien entre les T_f et les vitesses de fonte même si cet effet est plus atténué (Tableau 4.4). L'huile de colza qui ne contient pas d'AGLs a le taux d'écoulement le plus élevé (1,29 g/min) alors que l'huile hydrolysée par la RLS, qui contient uniquement des AGLs, a le taux d'écoulement le plus faible (0,35 g/min). Entre ces deux comportements extrêmes, il est plus difficile de faire une corrélation uniquement basée sur la teneur en AGLs dans les huiles. Les différences semblent donc être en relation avec les variations de MDGs au sein des huiles mais cela reste plus complexe à interpréter.

De plus, nous avons mesuré les taux de foisonnement sur l'ensemble des essais et ces derniers oscillent entre 30 et 40%. Sur les deux essais qui montrent des comportements extrêmes (huile de colza et RLS), le taux de foisonnement est strictement identique ($39\% \pm 2$). Cela permet de montrer que la teneur en air incorporé n'a pas d'impact sur les différences de comportement observées mais que ces dernières sont uniquement corrélées à la cristallisation des huiles végétales. C'est donc bien la cristallisation de l'huile qui gouverne le comportement de des produits.

4.1.3. Etude de la dureté

Une étude de dureté a ensuite été réalisée sur les crèmes glacées formulées avec les différentes huiles hydrolysées (Figure 4.15). Les mesures de dureté ont été faites à l'aide d'un texturomètre, sur les glaces préalablement stockées à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant plusieurs jours, afin d'assurer un équilibre au niveau de la cristallisation. Le texturomètre permet de mesurer la réponse d'un échantillon en termes de force et de déformation, lorsqu'une contrainte contrôlée est appliquée à l'aide d'une tige. Dans notre cas, afin de comparer la fermeté des différentes glaces, nous avons relevé la force qui doit être appliquée afin que le mobile pénètre de 20 mm à l'intérieur de la glace (après 1 min à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). L'objectif de ces mesures est d'identifier d'éventuelles différences de consistance entre les glaces et d'essayer de les corrélérer aux différentes températures de cristallisation des huiles.

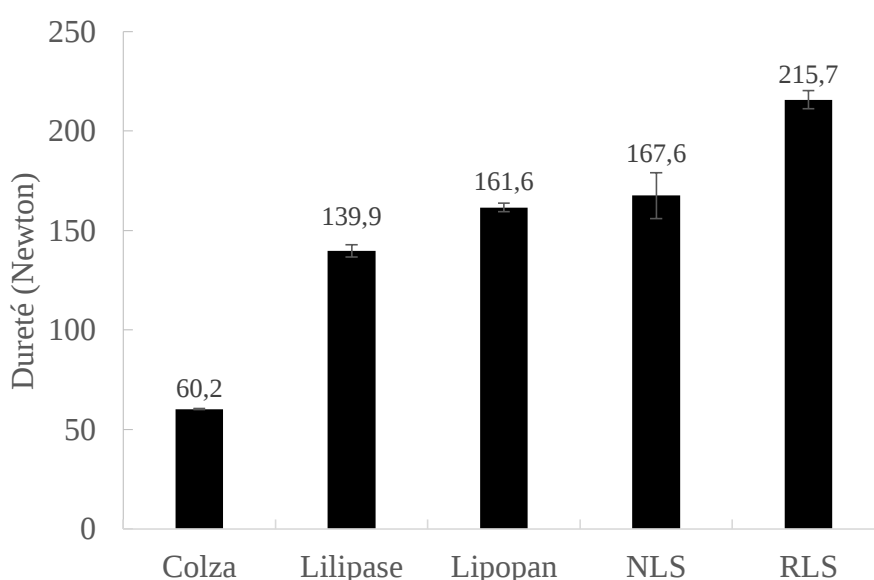


Figure 4.15 : Evolution de la dureté en fonction du type d'huile hydrolysée utilisée.

Nous observons bien des différences de dureté en fonction de l'huile végétale utilisée. De plus, nous pouvons voir, une nouvelle fois, une relation directe entre la texture des glaces et les T_c des huiles végétales utilisées. En effet, la glace qui présente la texture la plus souple est celle constituée d'huile de colza ($T_c = -55\text{ °C}$), qui n'est pas cristallisée à -18 °C . A l'inverse, la glace qui présente la plus grande dureté est celle dont l'huile a été hydrolysée avec l'enzyme RLS et qui a la T_c la plus élevée ($T_c = -10\text{ °C}$). Les autres glaces confectionnées avec les huiles hydrolysées par les enzymes Lilipase, Lipopan et NLS ont des températures de cristallisation et des duretés intermédiaires dont les différences au niveau de leurs duretés sont moins marquées et non significatives. En traçant les duretés des glaces obtenues en fonction des températures de cristallisation des huiles, nous pouvons observer qu'il existe une corrélation linéaire entre la texture des glaces et la température de cristallisation de la matière grasse (Figure 4.16 , $r^2 = 0,9490$). La même observation peut aussi être faite en corrélant la dureté avec la température de fusion ($r^2 = 0,9633$).

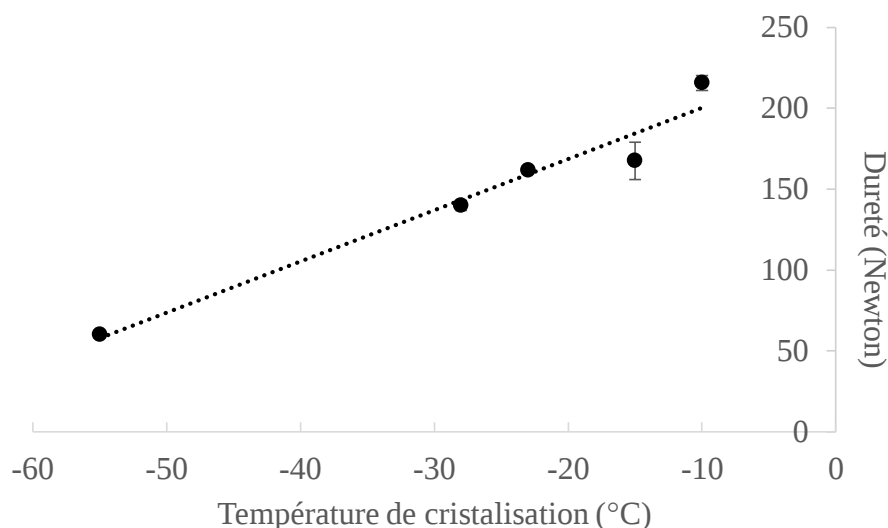


Figure 4.16 : Tracé de la dureté des crèmes glacées en fonction des T_c des huiles hydrolysées.

Les glaces fabriquées avec l'huile hydrolysée par l'enzyme RLS, qui contient uniquement des AGLs, sont celles qui ont la dureté la plus importante. A l'inverse, celles qui ont la dureté la plus faible ne contiennent pas d'AGLs (huile de colza). Cependant, entre les deux, les huiles hydrolysées par les enzymes Lilipase, Lipopan et NLS, qui contiennent en plus des AGLs, différents ratios en MDGs, jouent aussi un rôle sur la T_c et présentent des duretés intermédiaires. Les ratios MDGs/AGLs des huiles n'ayant pas été déterminés de façon quantitative, il est donc délicat de juger de leur influence sur la dureté.

Nous avons vu ici que les propriétés des huiles hydrolysées, c'est-à-dire leurs T_c , T_f et leurs compositions en MDGs et AGLs jouent un rôle important sur les matrices alimentaires de type crèmes glacées. Nous allons à présent voir l'impact de ces huiles hydrolysées dans la fabrication de matrices de type céréalières (barres pâtisseries et brioches) et étudier leurs impacts sur la structure de la mie, la dureté et la conservation du moelleux dans le temps.

4.2. Les barres pâtisseries

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les MDGs sont classiquement ajoutés dans les produits alimentaires de type céréalières car ils viennent complexer l'amylose de la farine permettant ainsi de conserver le moelleux dans le temps (Pareyt, *et al.*, 2011; Putseys, *et al.*, 2010). Nous allons dans cette partie étudier l'influence de la composition des huiles de colza hydrolysées par l'enzyme NLS à différents temps de réaction sur la conservation du moelleux dans les produits alimentaires spongieux. En effet, dans le chapitre précédent, nous avons vu qu'en utilisant l'enzyme NLS, la quantité des MDGs et des AGLs est différente dans l'huile de colza hydrolysée à 2h et à 24h.

4.2.1. Fabrication

La recette utilisée est issue de différents essais, dont les objectifs étaient de trouver le bon équilibre entre une recette représentative du marché dans laquelle a été substituée une teneur en huile végétale suffisamment conséquente pour observer les effets technologiques. La proportion en huile végétale retenue est de 11,6% ; les ingrédients et leurs proportions sont listés dans le Tableau 4.5.

Tableau 4.5 : Ingrédients des barres pâtisseries et leur proportion.

Ingrédients	Quantité (%)
Farine T55	30,7
Sucre	27,7
Œufs	18,0
Huile végétale	11,6
Eau	9,95
Poudre à lever	0,75
Sel	0,5
Arôme vanille	0,5
Sorbate de potassium	0,3

Comme nous l'avons décrit au chapitre 1, avec sa composition en amylose, en amylopectine mais également en protéines de gluten, la farine va permettre d'apporter une consistance à la pâte. Le sucre, les œufs et la matière grasse complètent le rôle de la farine dans l'obtention d'une texture moelleuse après cuisson. En plus d'avoir une fonction sur le goût, le sucre joue également un rôle sur l'abaissement de l'activité de l'eau (A_w). Les barres pâtisseries possédant une valeur d' A_w élevée, peuvent développer des levures et des moisissures. Notre objectif étant de réaliser un suivi de nos produits dans le temps (6 mois), du sorbate de potassium est ajouté comme conservateur, afin d'éviter tout développement de moisissures et de bactéries. Nous avons donc utilisé 0,3% de cet additif dans la recette, ce qui représente un apport inférieur à 2 g/kg d'acide sorbique qui est la teneur maximale autorisée conformément à la réglementation européenne pour ce type de matrice.

4.2.2. Substitution de l'huile végétale

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'huile de colza hydrolysée par l'enzyme NLS contient des teneurs différentes en MDGs et en AGLs en fonction du temps de réaction. Quantitativement, à 2h de réaction, nous avons un ratio MDGs/AGLs de 0,14 mol/mol alors que celui-ci est de 0,07 mol/mol pour 24h de réaction donc deux fois moins en MDGs. Afin d'étudier l'influence de ces ratios sur la structure des barres pâtisseries, nous avons dans un premier temps, substitué en totalité l'huile de colza par de l'huile hydrolysée pendant 2h ou 24h.

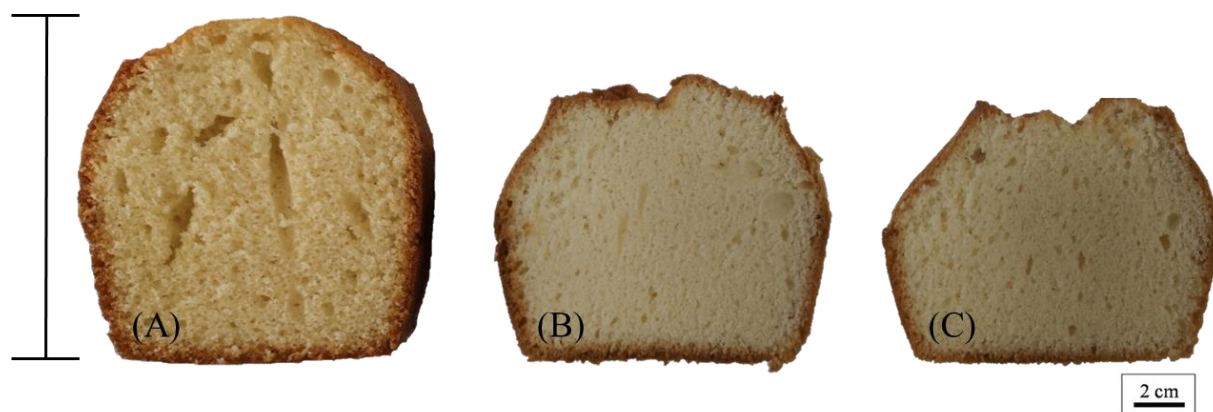


Figure 4.17 : Comparaison du volume des barres pâtisseries (A) témoin et en substituant 100% de l'huile végétale de colza par (B) l'huile hydrolysée 2h et (C) l'huile hydrolysée 24h.

La substitution totale de la matière grasse par de l'huile hydrolysée apporte des modifications majeures au niveau du volume mais également au niveau de la structure de la mie (Figure 4.17). En effet, les produits obtenus avec l'huile hydrolysée 2h ou 24h apparaissent beaucoup plus petits et avec une mie beaucoup plus dense que le produit formulé avec uniquement de l'huile de colza.

Nous pouvons en déduire que la proportion de MDGs et/ou AGLs influence la structure et le développement du produit fini. Ces barres pâtisseries sont non conformes aux standards attendus, il faut donc modérer au sein du produit l'apport en MDGs et AGLs. Nous avons alors envisagé de fabriquer des barres pâtisseries en modulant la quantité d'huile hydrolysée et donc d'émulsifiants présents au sein de la formule.

4.2.3. Ajustement de la quantité d'huile hydrolysée

Comme nous venons de le constater lors de nos essais préliminaires, un excès de MDGs ou la présence d'AGLs en quantités importantes aboutissent à un résultat non conforme aux standards alimentaires. Il est donc essentiel de mieux contrôler la quantité d'émulsifiants présents au sein de la formule. Certains travaux décrivent que dans la fabrication de matrices alimentaires de type moelleux, comme le pain, il existe une concentration seuil à partir de laquelle tout l'amylose est complexé. A partir de cette dernière, l'excès de molécules émulsifiantes se retrouve alors libre dans la pâte (Osman, *et al.*, 1961; Tufvesson, *et al.*, 2003a, 2003b). Nous avons donc réalisé des mélanges huile de colza/huile hydrolysée en différentes

quantités afin de suivre le rapport de la quantité d'émulsifiants (MDGs + AGLs) en fonction de la quantité de la farine ; cette étude a donc permis de donner des informations sur la présence d'émulsifiants libres dans la préparation.

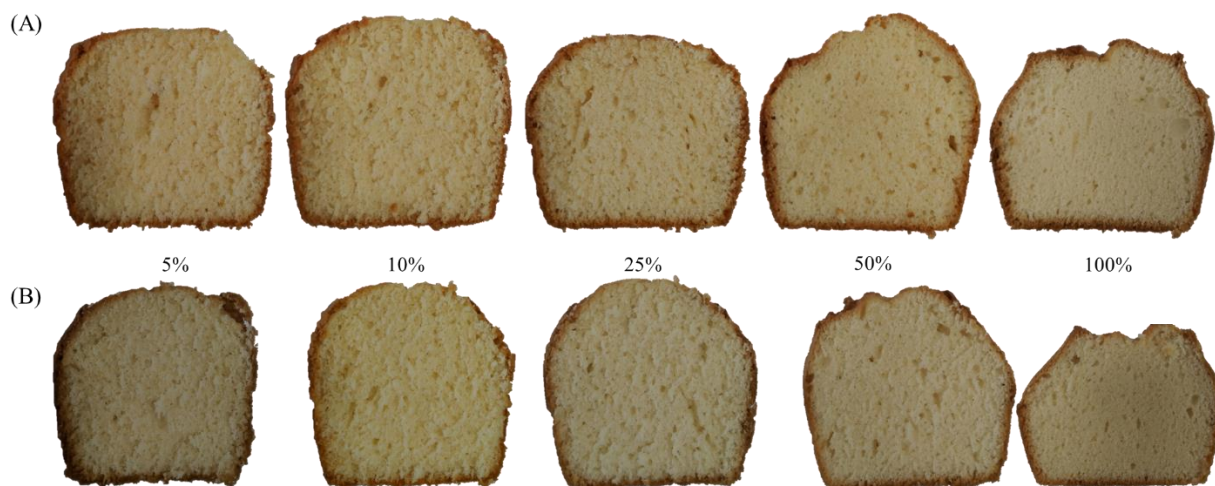


Figure 4.18 : Comparaison des volumes des tranches de gâteaux formulées avec (A) huile hydrolysée 2h et (B) huile hydrolysée 24h à différents ratios huile hydrolysée/ huile de colza.

En faisant des substitutions partielles et progressives de l'huile de colza par de l'huile hydrolysée, nous observons que jusqu'à 50% d'huile substituée et ce, quel que soit le temps d'hydrolyse (2h ou 24h), les gâteaux ont visuellement des aspects similaires au témoin (Figure 4.18). En effet, nous constatons que le volume global est conservé. A partir de 25% en revanche, il semble que la mie soit impactée au niveau de l'alvéolation avec une structure devenant un peu plus élastique. Cela montre bien que la quantité d'émulsifiant a un impact sur le produit. Pour chacun de ces gâteaux, nous avons réalisé des mesures de dureté au texturomètre post-fabrication (t_0) (Tableau 4.6). Afin de pouvoir comparer les duretés de chacune des barres pâtisseries, nous avons mesuré la force nécessaire pour enfoncer le mobile de 8 mm dans une tranche de 1,5 cm d'épaisseur. Les mesures ont été réalisées sur neuf tranches, prises au milieu de la barre pâtissière, et la valeur moyenne est calculée sur sept mesures (les valeurs extrêmes de chaque série ont été écartées).

Tableau 4.6 : Données de l'étude de la dureté des barres pâtissières en fonction des ratios des huiles hydrolysées 2h et 24h.

Huile de substitution	Huile hydrolysée/ huile colza (%)	Dureté (N)	Rapport émulsifiant/ farine (g/100g)
Hydrolysée 2h	0/100	2659 ± 128	0
	5/95	2207 ± 108	1,1
	10/90	1815 ± 177	2,2
	25/75	2070 ± 226	5,4
	50/50	3640 ± 333	10,8
	100/0	7671 ± 294	21,6
Hydrolysée 24h	0/100	2659 ± 128	0
	5/95	1942 ± 128	1,4
	10/90	1570 ± 265	2,8
	25/75	2354 ± 265	7,1
	50/50	3365 ± 108	14,2
	100/0	7907 ± 226	28,3

En comparant les mesures effectuées sur les différentes barres pâtissières, quel que soit le temps d'hydrolyse de l'huile de substitution (2h ou 24h), nous remarquons que la dureté diminue jusqu'à un mélange huile hydrolysée/huile de colza de 10/90. Au-delà de cette proportion, la dureté du produit augmente de manière significative. Cette augmentation de la dureté semble être due à un excès d'émulsifiant dans le produit qui impacte alors ses propriétés. Ce rapport est spécifique du type de produit fabriqué mais également fonction de la quantité des ingrédients ajoutés. Dans la littérature, il a été décrit que pour le pain, le rapport optimal émulsifiants/farine est de 1,5 g/100 g (Faergemand & Krog, 2005). Selon ce que nous avons déterminé, il semblerait que dans le cas de nos barres pâtissières, le ratio optimal émulsifiants/farine soit compris entre 2,2 et 2,8 g/100 g.

A ce stade, nous venons de mettre en évidence qu'à t_0 , l'ajout de 10% d'huile hydrolysée par la NLS avec un temps d'hydrolyse de 2h aboutit au meilleur compromis entre

structure optimale et dureté minimale. Pour compléter l'étude, nous avons suivi l'évolution de la dureté dans le temps.

4.2.4. Suivi dans le temps de la dureté

Afin de pouvoir évaluer la conservation du moelleux dans le temps et le pouvoir anti-rassissant de l'huile hydrolysée, nous avons fait une étude de la dureté des barres pâtisseries fabriquées avec différents ratios d'huile hydrolysée/huile de colza. Pour cela, nous nous sommes placés dans des ratios qui visent à encadrer le 10% optimal : 5 et 25%. Ainsi, dix barres pâtisseries, issues d'un même lot de fabrication ont été produites pour chaque proportion envisagée. Ces barres ont été emballées dans des sachets barrière à l'humidité et conservées dans les mêmes conditions. A chaque période de mesure ($t = 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150$ et 180 jours), une nouvelle barre pâtisserie a été ouverte puis découpée en tranches égales en prenant soin d'enlever les talons (≈ 9 tranches de $1,5$ cm). La dureté a alors été mesurée sur chaque tranche et les valeurs indiquées dans le graphique représentent les moyennes et leurs écart-types associés obtenus sur 7 tranches. La valeur d'activité de l'eau (A_w) a été mesurée pour chaque barre pâtisserie et il est important de noter que l' A_w reste constante ($0,84$) pour l'ensemble des produits étudiés permettant ainsi de dire que l'huile hydrolysée n'a pas d'impact sur ce paramètre et écartant par la même occasion les biais pouvant venir d'un écart de fabrication.

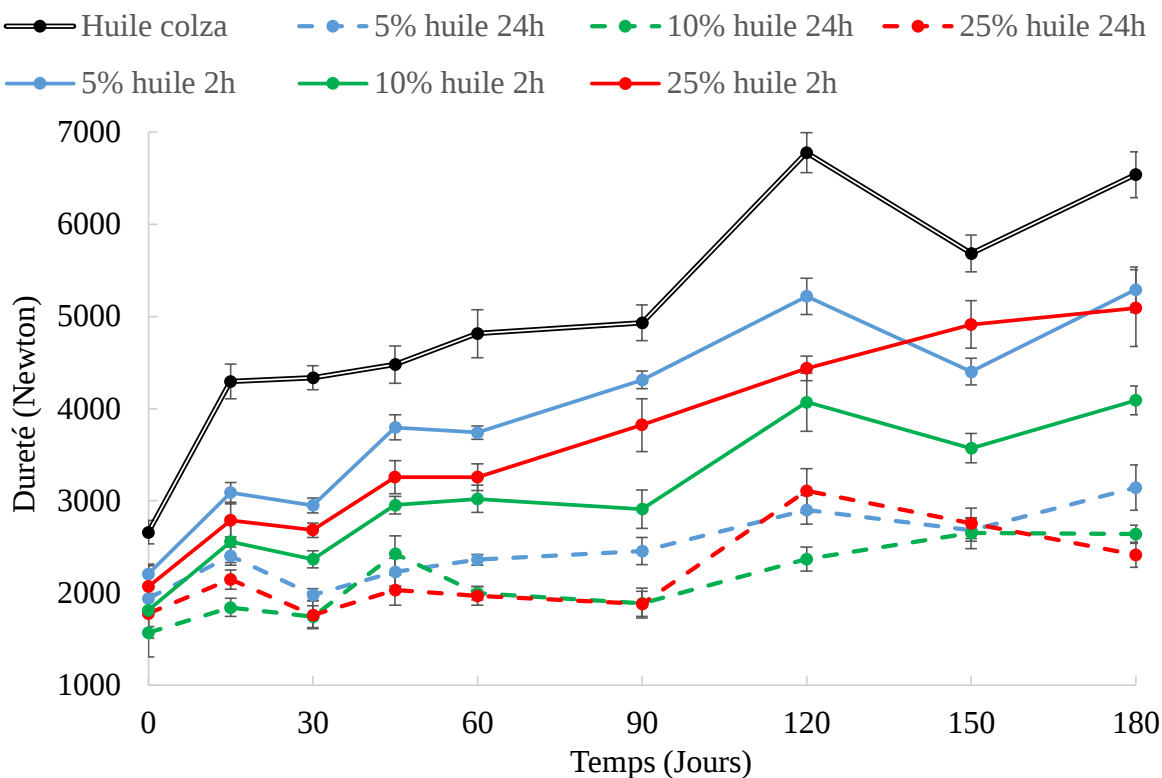


Figure 4.19 : Evolution de la dureté des différentes barres pâtisseries au cours du temps.

L'étude que nous avons menée a été suivie pendant 6 mois, donc au-delà d'une période de conservation classiquement préconisée pour les produits du commerce (environ 3 mois). Comme nous pouvons le voir sur le graphique, nous observons une augmentation régulière de la dureté (Figure 4.19). Toutefois, nous pouvons observer que rapidement trois groupes se distinguent. En effet, les produits qui durcissent le plus rapidement sont ceux formulés avec l'huile de colza. Le second groupe comprend les produits formulés avec les huiles hydrolysées 2h et le dernier groupe correspond aux produits formulés avec les huiles hydrolysées 24h. Après 6 mois de conservation et comparativement au témoin, nous avons un gain de moelleux de 31% pour les produits formulés avec l'huile hydrolysée 2h et de 76% pour les produits avec les huiles hydrolysées 24h. Ces observations permettent de mettre en évidence que les MDGs et les AGLs présents dans les huiles hydrolysées sont capables de former des complexes avec l'amylose présent dans les barres pâtisseries permettant ainsi de retarder la rétrogradation. D'après ces résultats, nous constatons que les AGLs qui sont en grande quantité dans l'huile hydrolysée 24 heures présentent une meilleure capacité de complexation que les MDGs qui eux sont en grande quantité dans l'huile hydrolysée 2 heures. De telles constations sont en adéquation avec les données décrites dans la littérature (Weyland & Hartel, 2008).

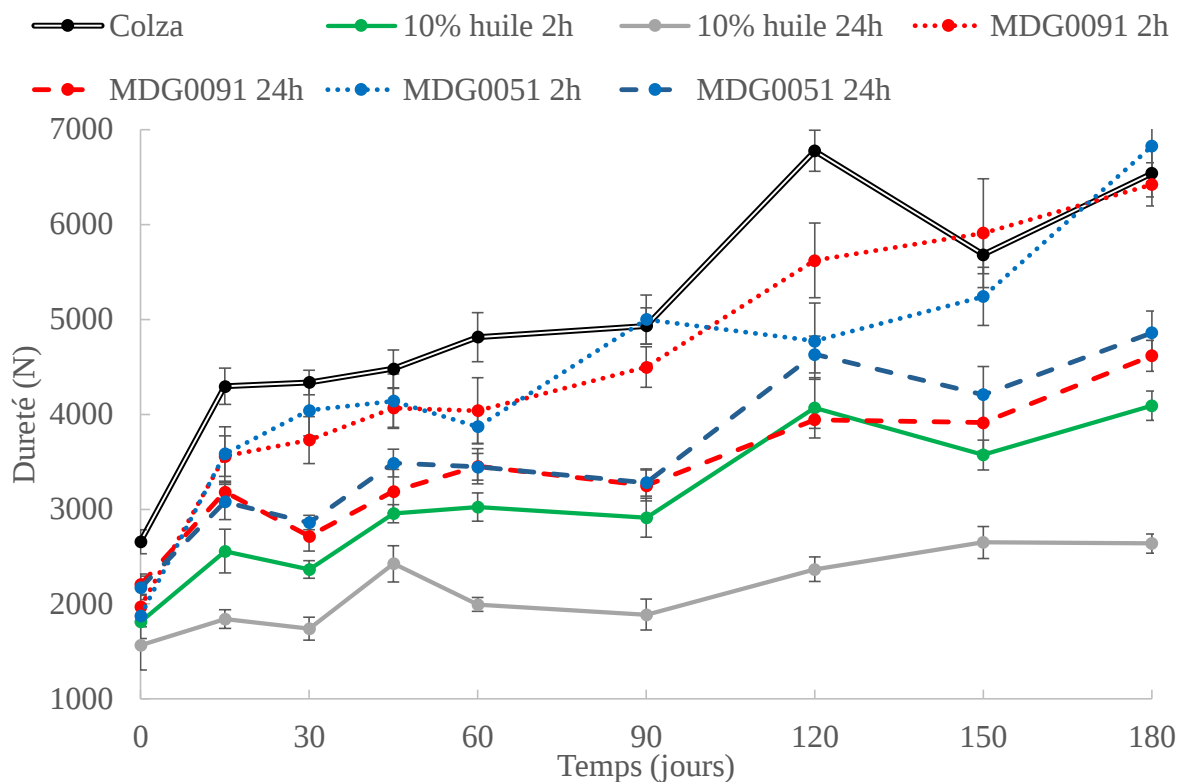


Figure 4.20 : Evolution de la dureté des barres pâtisseries au cours du temps comparée aux MDGs commerciaux.

Dans la continuité de cette étude, nous avons souhaité évaluer l'aptitude des MDGs commerciaux vis-à-vis du système que nous avons mis en place. Pour cela, nous avons utilisé deux MDGs issus du colza (MDG 0051 et 0091) dont les teneurs en MGs déterminées par RMN sont différentes (76,5 et 98,7% respectivement). Nous avons mélangé ces MDGs dans les huiles de colza nécessaires à la fabrication dans les teneurs déterminées dans les huiles hydrolysées que ce soit 2h ou 24h (10%). Nous avons ensuite comparé avec les produits fabriqués contenant 10% d'huile hydrolysée, que ce soit 2h ou 24h. Le suivi de dureté dans le temps est présenté en Figure 4.20.

Comparativement au produit formulé avec l'huile de colza seule, les MDG commerciaux ont un effet anti-rassissant qui semble être plus marqué pour des teneurs correspondantes à l'huile ayant subi 24h d'hydrolyse. Des teneurs plus faibles en MDGs dans l'huile semblent donc avoir un effet améliorant. Par contre, au vu des faibles écarts observés entre chacun des MDGs commerciaux, il n'est pas possible de savoir si la teneur en MGs a un effet significatif sur la dureté.

Le suivi des données indique clairement que l'huile ayant subi une hydrolyse (2h ou 24h) est malgré tout plus efficace que les MDGs commerciaux quelle que soit leur teneur, positionnant ainsi notre stratégie comme tout à fait viable pour cette application de préservation du moelleux.

4.2.5. Sensibilité à l'oxydation

Des analyses sensorielles formalisées n'ont pu être organisées à grande échelle pour des raisons purement liées à la réglementation, mais des observations internes ont été émises. Ainsi des tests hédoniques (résultats non montrés ici) ont été organisés ayant pour but d'évaluer le ressenti de consommateurs naïfs sur les produits. Les produits généraient une amertume décroissante au fil du temps (après 3 semaines de fabrication, ces goûts disparaissaient malgré tout).

Pour expliquer cela, nous avons émis l'hypothèse que cette sensation pourrait être liée, soit à une teneur élevée en AGLs dans l'huile, soit à une oxydation possible de celle-ci au cours du procédé de fabrication et notamment durant la cuisson. Afin de comprendre l'origine de cette amertume et vérifier nos hypothèses, nous avons dosé les acides gras à chaque étape du procédé de fabrication par des analyses en CPG. Pour cela, les lipides contenus dans le produit ont été extraits à l'aide d'un mélange hexane/isopropanol que ce soit avant ou après cuisson. De plus, nous avons étudié l'évolution de la teneur en acides gras saturés (AGS) et insaturés (AGI) en fonction du temps d'hydrolyse (0h, 2h et 24h). En effet, plus il y aura d'acides gras insaturés, plus la sensibilité à l'oxydation sera importante.

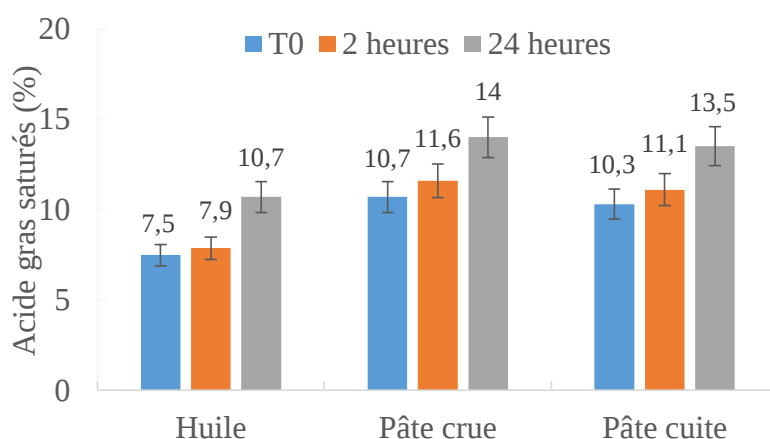


Figure 4.21 : Evolution de la teneur des acides gras saturés dans l'huile, dans les pâtes crues et cuites (t_0) en fonction du temps d'hydrolyse des huiles.

Lors de l'étude de la composition en acides gras des huiles et des pâtes crues et cuites, nous constatons des évolutions sur les teneurs en acides gras saturés et insaturés. En effet, dans chaque cas, la teneur en AGI diminue en faveur de la teneur en AGS. L'évolution est plus significativement marquée sur les AGS que sur les AGI au vu des teneurs mesurées et des incertitudes associées. Un tel phénomène est lié à une oxydation des AGI et nous remarquons que les produits s'oxydent davantage en fonction du temps d'hydrolyse des huiles végétales (Figure 4.21). La teneur en AGS des huiles hydrolysées augmente de +5% pour les huiles hydrolysées 2 heures contre +30% pour les huiles hydrolysées 24 heures. De plus, nous constatons que les huiles riches en AGLs sont plus sensibles à l'oxydation ce qui explique une teneur plus importante en AGS des huiles hydrolysées 24 heures contrairement aux huiles hydrolysées 2 heures. Ces phénomènes d'oxydation des lipides insaturés qui se font au niveau des doubles liaisons entraînent une succession de réactions en chaîne provoquant l'apparition de molécules plus ou moins volatiles (Choe & Min, 2006; Cillard & Cillard, 2006; Schaich, 2020). De plus, dans les pâtes crues et cuites, les teneurs en AGS augmentent de +8% pour les produits fabriqués avec l'huile hydrolysée 2 heures et de +24% avec les huiles hydrolysées 24 heures. Contrairement à ce que nous aurions pu penser, l'étape de cuisson n'augmente pas drastiquement l'oxydation des lipides. L'amertume ressentie dans les premiers jours de dégustation des barres pâtisseries peut alors être associée à la présence de molécules volatiles issues de cette oxydation et qui disparaissent au cours du temps.

Dans la continuité de cette démonstration, nous avons cherché à déterminer la susceptibilité à l'oxydation des huiles hydrolysées à l'aide d'un Rancimat®. Ces mesures, réalisées à l'ITERG, consistent à faire buller de l'air dans de l'huile végétale à température constante (98 °C) afin d'accélérer les phénomènes d'oxydation (Farhoosh, 2007). Le temps nécessaire à une oxydation totale de l'huile est alors mesuré ; il est appelé temps d'induction.

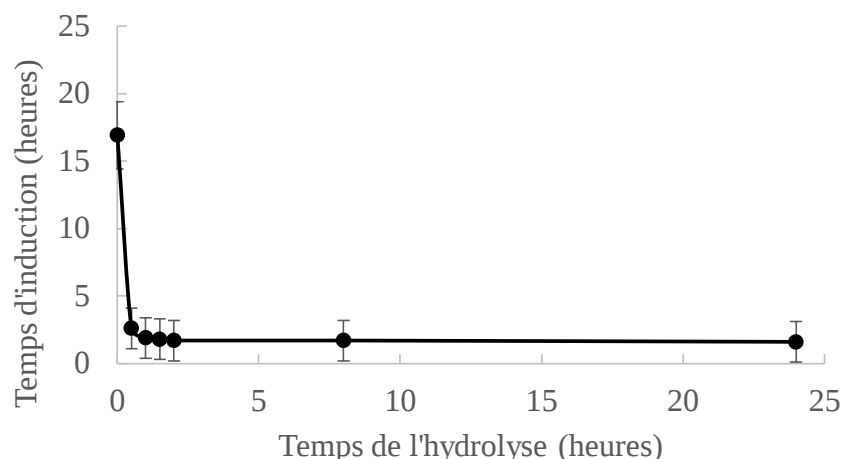


Figure 4.22 : Stabilité à l'oxydation des huiles hydrolysées en fonction du temps d'hydrolyse.

D'après la Figure 4.22, nous constatons que l'huile non hydrolysée a un temps d'induction de 17 heures alors que l'huile hydrolysée 2 heures est totalement oxydée au bout de 1,6 heures. Le temps d'induction diminue fortement en fonction du temps de lipolyse. Ainsi nous confirmons que les huiles hydrolysées sont plus sensibles à l'oxydation. Une huile ayant été hydrolysée 2 heures aura la même capacité à s'oxyder qu'une huile ayant subi 24 heures d'hydrolyse. Il y a donc un palier, vite atteint, au bout de seulement 1 heure d'hydrolyse de l'huile. Malgré l'apparition d'acides gras dans l'huile et de leur altération permettant d'expliquer l'apparition des goûts indésirables, nous avons tout de même mis en évidence la possibilité de substituer les MDGs dans les barres pâtisseries en ajoutant des huiles hydrolysées via des réactions enzymatiques. Les MDGs et AGLs formés *in situ* au cours des lipolyses présentent la capacité de complexer l'amylose et ont alors un rôle anti-rassissant. Il est malgré tout nécessaire de contrôler leur teneur, soit en modifiant le temps de lipolyse enzymatique sur l'huile végétale, soit en réalisant différents ratios lors de l'ajout de l'huile hydrolysée.

Dans la partie qui suit, nous allons étudier l'incorporation des huiles hydrolysées dans la fabrication d'une autre famille de produits céréaliers alvéolés, les brioches. Ces matrices ont la spécificité de faire intervenir une « levée », c'est-à-dire le développement de bulles de gaz dans la pâte par l'action de levures biologiques. Il est donc judicieux de s'intéresser à ces produits et de voir si les huiles hydrolysées peuvent jouer un rôle dans l'aération des brioches.

4.3. Les brioches

Au cours de l'étude précédente sur les barres pâtisseries, nous avons souligné l'importance des teneurs en émulsifiants lors de leur fabrication. Dans cette partie, nous avons donc essayé de voir si les huiles hydrolysées et plus particulièrement, les MDGs générés au cours des hydrolyses enzymatiques peuvent stabiliser les bulles d'air créées au cours de la fermentation des levures et améliorer le développement alvéolaire des brioches. En effet, les lipases sont classiquement ajoutées dans la farine pour aider au développement de ces produits (Benejam, *et al.*, 2009).

4.3.1. Fabrication

Pour la fabrication des brioches, la liste des ingrédients utilisés ainsi que leurs proportions sont toujours issues d'un contre-typage d'une recette du commerce contenant des MDGs (Tableau 4.7). La mise au point a donc été faite de la même façon que pour la crème glacée en s'inspirant de la liste d'ingrédients et des valeurs énergétiques.

Tableau 4.7 : Liste des ingrédients d'une brioche et leur proportion.

Ingrédients	Quantité (%)
Farine de blé T55	24,37
Farine de Gruau	24,09
Eau	15,35
Sucre	8,85
Œufs frais	9,0
Sirop de sucre inverti	4,47
Beurre 82% MG	5,63
Huile végétale	4,5
Levure fraîche	2,03
Sel	0,91
Arôme vanille	0,8

4.3.2. Substitution de l'huile

De la même manière que pour la fabrication des barres pâtisseries, nous avons étudié l'impact d'une substitution progressive de l'huile de colza par de l'huile hydrolysée avec l'enzyme NLS (2 heures de réaction et donc plus riche en MDGs). Cette huile hydrolysée a donc été incorporée et substituée à l'huile de colza à des proportions variant de 0 à 100%. Comme précédemment, il sera alors possible de sélectionner le meilleur ratio en suivant l'aspect du produit et la dureté à t_0 .

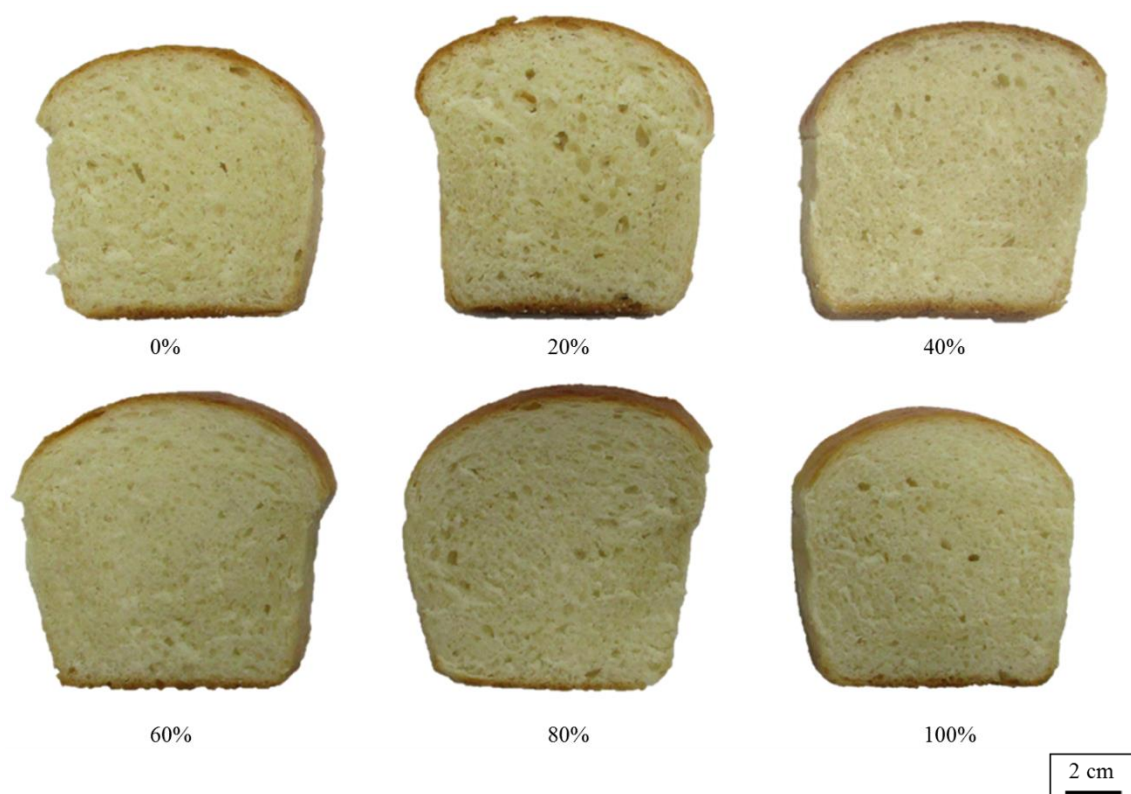


Figure 4.23 : Aspect des brioches en fonction du pourcentage d'huile hydrolysée utilisée.

Nous constatons (Figure 4.23) que les brioches fabriquées avec 100% d'huile hydrolysée présentent la moins bonne alvéolation sur l'ensemble des essais. En effet, les bulles d'air semblent plus petites ce qui n'est pas sans rappeler l'étude précédente sur les barres pâtisseries où un excès d'émulsifiant était tout aussi responsable de ces propriétés. À l'inverse, les brioches formulées avec une quantité d'huile hydrolysée variant entre 20 et 80% présentent une structure de la mie identique au produit témoin.

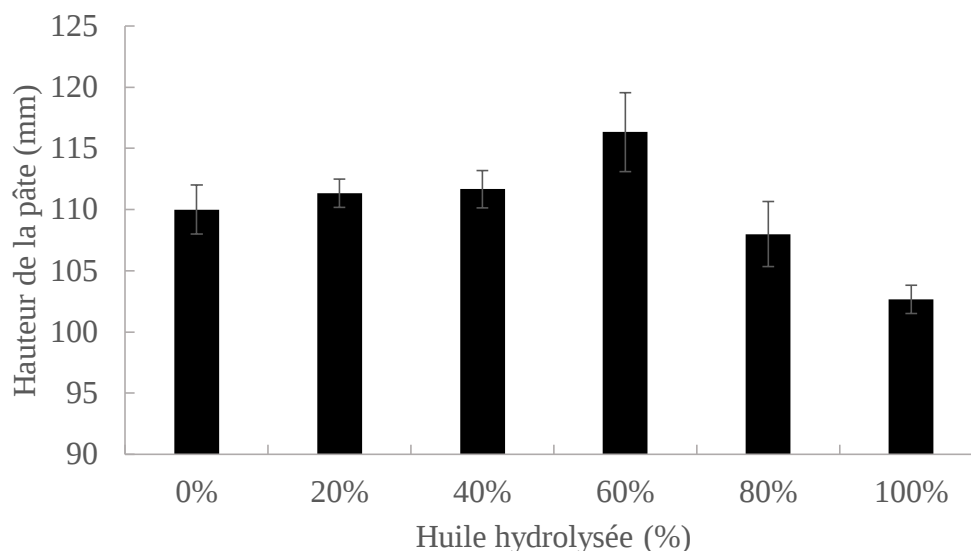


Figure 4.24 : Développement des brioches en fonction du pourcentage d’huile hydrolysée utilisé observé après 3h30 de fermentation.

Également, au cours de l’étape de fermentation, les levures utilisent les sucres du milieu pour produire du gaz carbonique et de l’alcool. Les bulles de CO₂ sont par la suite piégées par le réseau de gluten et au cours de l’étape de cuisson, elles vont se dilater, ce qui crée l’alvéolation. Nous pouvons voir que la teneur en huile hydrolysée a une influence sur la stabilisation des bulles d’air. En observant les développements des brioches formulées avec les différents ratios en huile hydrolysée, nous remarquons que les produits présentant une meilleure aération sont ceux formulés avec 60% d’huile hydrolysée (Figure 4.24). A l’inverse, les produits les moins bien aérés sont ceux formulés avec 100% d’huile hydrolysée.

D’après ces observations, nous pouvons dire qu’une absence ou un excès d’émulsifiant empêche le développement du produit. Ainsi, la présence de MDGs semble influencer positivement le processus de fermentation avec comme principal résultat des produits présentant des volumes et des hauteurs plus importants. En effet, il est connu que l’ajout de lipase permet aux produits alvéolés de mieux se développer et également de conserver le moelleux au cours du temps (Benejam, *et al.*, 2009). Il est à noter que les MDGs ajoutés au cours de la formulation vont permettre d’interagir avec les molécules de gluten. Ceci va favoriser le réseau, et donc l’incorporation des bulles d’air qui vont pouvoir se développer, permettant un gonflement plus important des brioches (Pareyt, *et al.*, 2011; Pomeranz & Chung, 1978; Sahi, 2003).

De plus, des mesures de dureté menées par texturométrie sur ces systèmes permettent d'observer une diminution en fonction de la teneur en huile modifiée ajoutée dans l'huile de colza. Cependant, au-delà de 60% de substitution, la dureté ré-augmente. La dureté minimale (677 N) est donc obtenue pour les brioches fabriquées avec 60% d'huile hydrolysée correspondant à un ratio optimal émulsifiants/farine de 6,4 g/100 g (Tableau 4.8). Cette teneur permet également d'obtenir la meilleure hauteur de pâte. C'est donc cette teneur que nous allons conserver pour la suite de nos essais.

Tableau 4.8 : Données de la dureté et du ratio d'émulsifiants des brioches en fonction de la quantité d'huile hydrolysée.

Ratio huile hydrolysée/huile de colza	Dureté (N)	Ratio (MDGs + AGLs)/ farine (g/100 g)
0/100	1324 ± 88	0
20/80	1059 ± 39	2,2
40/60	1059 ± 58	4,3
60/40	677 ± 39	6,4
80/20	736 ± 20	8,6
100/0	804 ± 29	10,7

Dans le chapitre précédent, l'un des concepts réactionnels que nous avons abordé concerne la possibilité de recycler la phase aqueuse contenant les enzymes et donc de les réutiliser pour engager une nouvelle réaction enzymatique sur l'huile de colza. Pour être complémentaire par rapport aux études précédentes, nous avons souhaité étudier ici l'impact des huiles qui ont été hydrolysées à partir de ces différents recyclages et d'évaluer l'effet technologique dans les brioches.

4.3.3. Etude du recyclage des enzymes

4.3.3.a. Mesure de la dureté à t_0

Comme nous l'avons déjà mis en évidence, il est possible de recycler les enzymes présentes dans la phase aqueuse. En effet, au cours des différents recyclages, les MDGs et AGLs

formés *in situ* dans l'huile hydrolysée étaient obtenus dans les mêmes proportions et quantités et ce jusqu'au huitième cycle. Au-delà, nous avons mis en évidence au travers des valeurs d' I_A et des analyses RMN ^{13}C que les enzymes étaient moins actives (baisse significative des produits de réaction couplée à une diminution de la composition en TGs). Nous avons alors étudié la possibilité d'utiliser ces différentes huiles dans les brioches et si d'éventuelles différences en fonction du nombre de cycles pouvaient être observées. Pour ces essais, les brioches ont été réalisées avec 60% d'huile hydrolysée, proportion où les produits présentent des propriétés optimales. Selon la même méthodologie que précédemment, nous avons mesuré la dureté initiale en fonction du nombre de cycles imposés.

Tableau 4.9 : Dureté des brioches à t_0 en fonction du recyclage de l'enzyme NLS.

Nombre de cycles	Dureté (N)
1	595 ± 39
2	658 ± 50
4	589 ± 38
6	655 ± 80
8	644 ± 47
9	654 ± 28

A l'issue de la fabrication, les résultats indiquent qu'il n'y a pas d'effet significatif sur la dureté des brioches et que le recyclage des enzymes n'impacte pas la dureté à t_0 même au niveau du neuvième recyclage où l'enzyme est moins active (Tableau 4.9). Toutefois, afin de voir si la différence des teneurs en MDGs et AGLs a une importance sur le moelleux, nous avons fait une étude de la dureté en fonction du temps sur chacun des produits formulés avec les huiles issues du recyclage.

4.3.3.b. Suivi de la dureté dans le temps

Les brioches, tout comme les barres pâtisseries sont amenées à durcir dans le temps par un mécanisme de rétrogradation de l'amidon. Des mesures de dureté ont été réalisées sur les brioches afin de déterminer l'évolution de ce paramètre dans le temps. Pour cela, tous les lots ont été fabriqués le même jour et stockés dans les mêmes conditions. L'évolution de la

dureté a été suivie sur 3 semaines. En effet, ces produits durcissent plus rapidement que les barres pâtisseries et ont des durées de vie classiquement plus courtes.

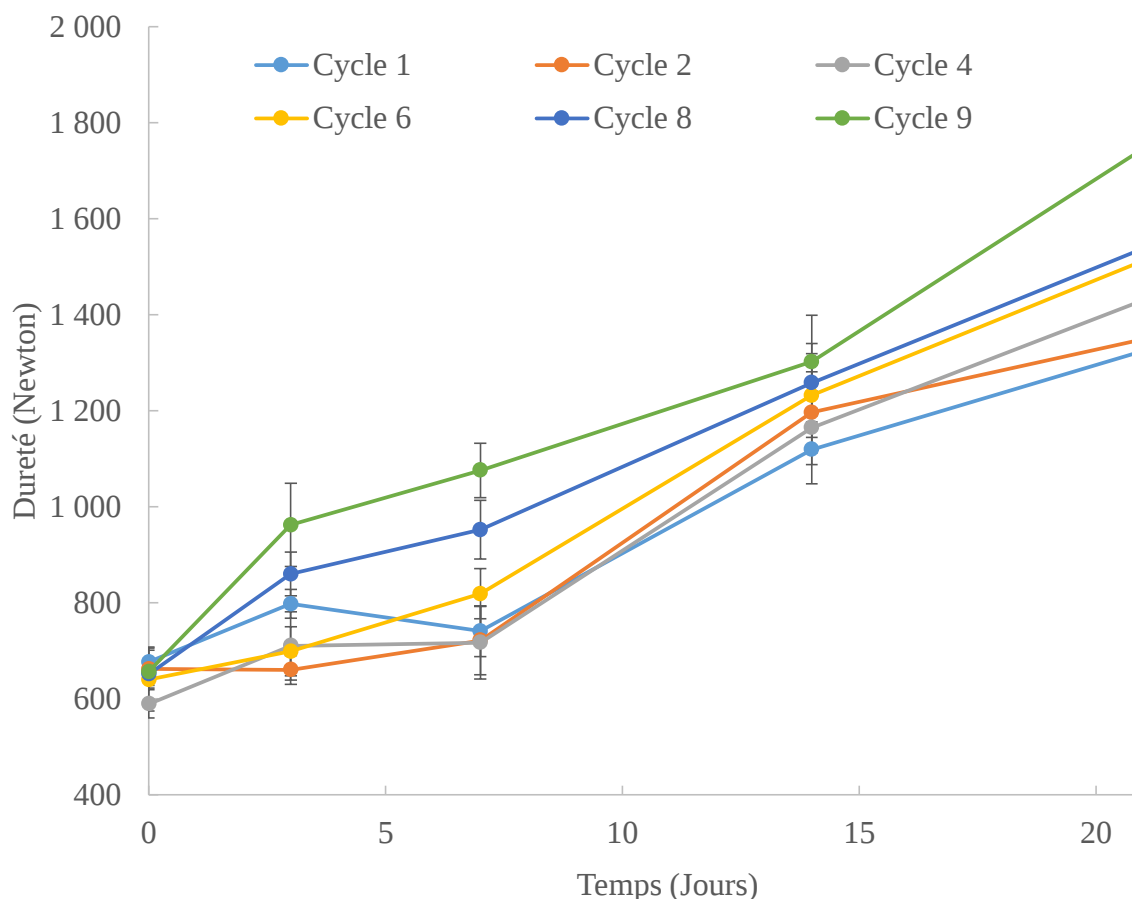


Figure 4.25 : Evolution de la dureté dans le temps des brioches contenant 60% d'huile hydrolysée 2h en fonction du nombre de recyclage des enzymes.

Les différentes évolutions de la dureté au cours du temps indiquent que la teneur en MDGs des huiles hydrolysées a une incidence sur la conservation du moelleux des brioches. Nous constatons que la dureté augmente régulièrement et avec le même profil cinétique quelle que soit l'huile hydrolysée utilisée (Figure 4.25). Après 21 jours de conservation, les produits formulés avec les huiles hydrolysées entre le premier et le huitième recyclage présentent des duretés qui peuvent être considérées comme équivalentes. Seules les brioches formulées avec l'huile obtenue lors du dernier recyclage de l'enzyme (neuvième cycle) présentent une dureté plus élevée que les autres. Ceci est lié à une modification des teneurs en MDGs et en AGLs dans cette huile hydrolysée où ils sont moins formés au neuvième cycle. Il apparaît donc que l'utilisation d'huiles hydrolysées obtenues par recyclage de l'enzyme NLS est possible et

permet d'obtenir des produits avec une dureté voisine des brioches témoin. Cela est très intéressant économiquement car l'utilisation d'enzymes représente un coût non négligeable. Le fait de pouvoir recycler l'enzyme NLS jusqu'à 8 fois réduit fortement ce problème. La stratégie mise en place ici représente un gain économique par rapport à une utilisation traditionnelle de lipases où l'enzyme n'est utilisée qu'une seule fois et dénaturée lors de la cuisson.

5. Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre, nous avons montré qu'il était possible de transférer à l'échelle pilote, l'hydrolyse des huiles par voie enzymatique avec l'enzyme NLS. Cette étape est nécessaire à l'utilisation et l'incorporation de ces huiles hydrolysées dans des procédés nécessitant une fabrication de produits à plus grande échelle. Ce transfert d'échelle ne semble ni impacter le rendement ni l'activité de l'enzyme.

Chacune de ces huiles hydrolysées a été utilisée dans la fabrication de matrices alimentaires. Tout d'abord les émulsions, qui sont la base de très nombreux produits agroalimentaires (gâteaux, crèmes glacées, mayonnaises...). Les émulsions inverses et multiples sont très intéressantes mais restent compliquées à formuler à l'heure actuelle, particulièrement dans une stratégie clean-label et en raison de leur fragilité intrinsèque. L'utilisation d'huiles hydrolysées dans la formulation de tels systèmes fait partie des challenges et ouvre de nombreuses et encourageantes perspectives. Du fait des fortes teneurs en MDGs formés *in situ*, nous avons pu réaliser des émulsions inverses concentrées avec des fractions volumiques en eau pouvant atteindre 96% et sans avoir recours à du PGPR.

Également l'utilisation de ces huiles hydrolysées dans la fabrication des crèmes glacées, des barres pâtisseries et des brioches a été possible avec succès. En effet, dans le cas des crèmes glacées, l'utilisation des huiles hydrolysées permet de moduler la texture des crèmes glacées tout en limitant l'ajout d'additifs. Dans le cas des barres pâtisseries et des brioches, une substitution partielle de l'huile au profit de l'huile hydrolysée permet d'obtenir des produits plus gonflés qui résistent mieux au rassissement avec une bonne conservation du moelleux. Enfin, dans le cas des brioches, nous avons montré la possibilité d'utiliser des huiles hydrolysées obtenues par différents recyclages des enzymes tout en maintenant les performances. Ceci est très intéressant d'un point de vue économique.

Bien que l'utilisation d'huiles hydrolysées dans des applications alimentaires ait montré un bon potentiel, plusieurs idées ou résultats pourraient venir compléter ces études et leurs intérêts. Dans la continuité des travaux sur les émulsions inverses et doubles, il serait intéressant de vérifier la faisabilité de ces dernières en réalisant différentes proportions d'huile hydrolysée par rapport à l'huile de colza. De plus, il serait intéressant d'améliorer les qualités organoleptiques des matrices et de réaliser des tests sensoriels avec un panel de consommateur. L'emploi des MDGs est également possible dans d'autres matrices alimentaires qui n'ont pas été exploitées dans le cadre de cette thèse. Ils peuvent par exemple améliorer la machinabilité et l'extensibilité des pâtes lors du laminage. Afin de vérifier cette capacité, l'utilisation de l'huile hydrolysée peut être envisagée dans les produits de type crackers.

6. Partie expérimentale

6.1. Ingrédients utilisés

Pour l'ensemble des fabrications des matrices alimentaires, la majorité des ingrédients utilisés ont le grade alimentaire et ont été achetés chez Metro. Les MDGs commerciaux (MDG 0091 et MDGs 0051) proviennent du fournisseur Palsgaard. La farine de caroube et la gomme de guar ont été achetés chez Caldic. Les lécithines de colza (canolacithin[®]), soja (soycithin[®]) et tournesol (suncithin[®]) proviennent de chez Novastell.

6.2. Réactions enzymatiques sur pilotes

Pour les réactions enzymatiques à l'échelle pilote, les mélanges ont été effectués dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre 3 avec les proportions suivantes : huile de colza (55%), lipase NLS (2%) et eau (43%).

6.2.1. Stephan[®]

Le Stephan[®] (référence UMSK 24E) possède une cuve multifonction de 12 L avec une double enveloppe (vapeur/eau) munie d'un racleur et d'un couteau, associé à une pompe à vide (Figure 4.26) et a été utilisé pour faire le premier changement d'échelle. La fraction d'eau dans laquelle est solubilisée l'enzyme est chauffée dans la cuve à 37 °C pendant 30 minutes tout en maintenant une agitation du racleur à 480 rpm. En parallèle, la seconde fraction aqueuse et l'huile sont chauffées 30 minutes dans une étuve à 37 °C puis ajoutées dans la cuve. L'ensemble est maintenu à 37 °C et sous agitation tout au long de la réaction enzymatique. Des prélèvements ont été réalisés au bout de 30 min, 1h, 1h30, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h de réaction et directement placés en chambre froide à 4 °C pendant 1 heure afin de stopper l'activité enzymatique. Par cette technique, des lots d'huiles hydrolysées d'un volume de 6 L ont pu être préparés.



Figure 4.26 : Pilote Stephan® UMSK 24E (12 L).

6.2.2. CDH®

Le second changement d'échelle a été réalisé à l'aide du pilote CDH® (référence 85). Il s'agit d'une cuve multifonction double enveloppe (vapeur/eau) de 85 L (Figure 4.27) qui offre la possibilité de mélanger, de foisonner sous air ou sous vide. Le protocole mis en place est identique à celui utilisé dans le cas du Stephan®. La réaction enzymatique a été réalisée pour une quantité de 60 L (charge utile).



Figure 4.27: Equipement CDH® référence 85 (85 L).

6.2.3. Séparation des phases

Afin d'utiliser les huiles hydrolysées dans la fabrication de matrices alimentaires, elles doivent être séparées de la phase aqueuse contenant les enzymes et le glycérol. Les premiers essais ont été réalisés à l'aide d'une centrifugation à assiette. Cette dernière n'a pas été retenue car l'agitation étant trop forte, une auto-émulsification spontanée des milieux avait lieu. La séparation des deux phases traitées par les outils pilotes est alors réalisée par simple décantation (24 à 48h) et soutirage de la phase aqueuse puis de la fraction lipidique enrichie en MDGs et AGLs.

6.3. Analyse de l'oxydation des huiles végétales

Pour les analyses du profil en acides gras présents dans l'huile végétale, la méthode utilisée est la même que celle décrite dans le chapitre 3. En effet, ces analyses sont effectuées à l'aide des normes ISO 12966-2 et 12966-4 et ont été réalisées à l'ITERG.

6.4. Analyse du rancissement des huiles

Ces études permettent de voir le comportement des huiles végétales au niveau de l'oxydation des lipides. Pour ce faire, les études ont été réalisées à l'ITERG et sont conformes à la norme ISO 6886. Afin d'accélérer le phénomène d'oxydation, une injection d'oxygène à un débit de 10 g/L à une température contrôlée de 98 °C est réalisée sur 3 grammes d'huile.

6.5. Analyse des teneurs en phospholipides des lécithines

Ces teneurs ont été déterminées par analyses RMN ^{31}P à l'IECB de Bordeaux (Institut Européen de Chimie et Biologie) sur un spectromètre Bruker 400 MHz. Une solution de triphénylphosphate (TPP) (41,26 mg) dans d'un mélange de $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (665/335 v/v) a été préparée puis ajoutée comme référence interne dans chaque échantillon. Le signal à -17,8 ppm est pris comme étalon. Dans chacun des tubes, une masse connue de lécithine a été pesée et diluée dans un mélange de solvant $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (330/130 v/v) et 20 μL de la solution de TPP. Une solution tampon d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique, 0,2 M dans du D_2O (pH = 6)) est utilisée pour chélater les ions paramagnétiques ; il est nécessaire de connaître la

concentration optimale de solution tampon à utiliser pour chaque lécithine analysée. Pour l'analyse des lécithines soycithin[®] et suncithin[®], 360 μL de la solution tampon sont ajoutés, pour la lécithine canolacithin[®] 120 μL de solution sont ajoutés. Pour chacun de ces essais, les masses pesées sont les suivantes : 45,33 mg pour la lécithine soycithin[®], 33,16 mg pour la lécithine suncithin[®] et 9,26 mg pour la lécithine canolacithin[®].

6.6. Fabrication des émulsions

Dans le but de mieux contrôler la fabrication des émulsions inverses concentrées et doubles, elles sont dans un premier temps réalisées manuellement (prémix). Pour faciliter l'émulsification, les émulsions inverses sont réalisées dans des béciers en plastique qui, contrairement au verre, auront tendance à « accrocher » la matière grasse et favoriser la fragmentation des gouttes d'eau. A l'inverse, les émulsions doubles sont dispersées dans des béciers en verre car l'affinité de ce support pour la phase aqueuse permet une bonne transmission de la contrainte. Afin de calibrer les émulsions, les prémix ont été affinés à la cellule de Couette de type PG398C (TSR, France). Cet appareillage permet d'affiner les émulsions par un système de rotor/stator cylindrique et coaxial séparés par un faible entrefer (Figure 4.28) et permet d'appliquer un cisaillement contrôlé et des contraintes élevées qui permettent de contrôler l'affinage des gouttes dispersées.

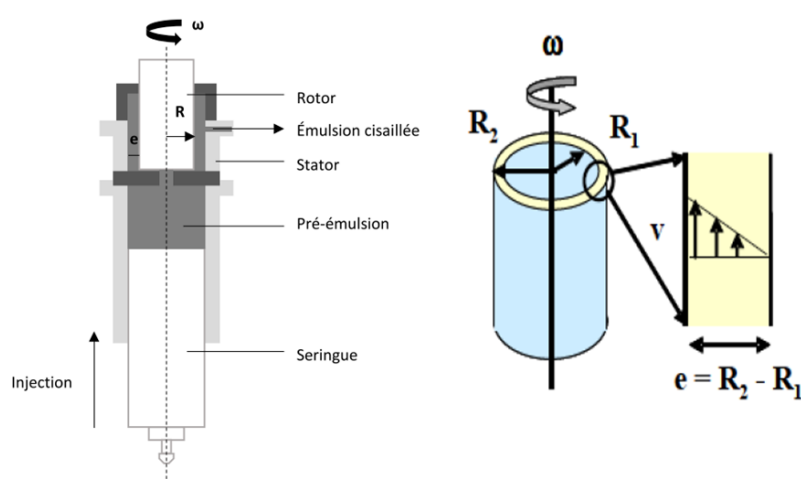


Figure 4.28 : Descriptif du principe de la cellule de Couette (Mabille, *et al.*, 2000).

6.6.1. Emulsions inverses

Les émulsions concentrées sont formulées avec des huiles hydrolysées par la NLS enrichies en MDGs et AGLs auxquelles a pu être parfois être ajoutée une fraction de lécithine végétale de tournesol. Les émulsifications primaires ont été réalisées à la main. La calibration avec la cellule de Couette a été réalisé avec un entrefer de 100 μm . La vitesse de pousse de la seringue est fixée à 4 alors que la vitesse de cisaillement du rotor oscille entre 0 et 700 rpm de façon à vérifier l'impact du cisaillement sur l'affinage des gouttes.

6.6.2. Emulsions doubles

Pour fabriquer les émulsions doubles, l'émulsion inverse avec une fraction volumique de 85% précédemment formulée a été diluée de manière à ramener cette fraction volumique à 50%. Cela permet d'abaisser la viscosité et de faciliter la seconde émulsification. L'émulsion directe dans laquelle l'émulsion inverse est dispersée, est stabilisée à l'aide de protéines. Pour cela, une solution de caséinate de sodium a été préparée à 12% massique. Cette solution est préparée 24h à l'avance de manière à optimiser la stabilisation des protéines aux interfaces.

L'émulsion double se fait manuellement avec 30% d'émulsion inverse diluée, délicatement dispersée dans la phase aqueuse externe constituée de caséinate. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque l'émulsion inverse a été directement fabriquée à 50% volumique permettant d'éviter la floculation indésirable des gouttes d'eau.

6.7. Caractérisations des émulsions

6.7.1. Rhéologie

L'ensemble des analyses rhéologiques a été réalisé à l'aide d'un rhéomètre ARG2 (TA Instrument). La recherche du domaine linéaire a tout d'abord été nécessaire pour faire les mesures de G' et G'' (modules indicateurs de la partie solide et liquide des gels). Pour cela, nous avons travaillé à 25 °C et fait varier la contrainte de déformation entre 0,01 et 10 000% à une fréquence de 1 Hz (recherche du domaine linéaire). Une valeur de contrainte de déformation de 0,5% à une fréquence de 1 Hz a été choisie pour les mesures de G' et G'' .

6.7.2. Microscopie optique

Les émulsions observées en microscopie optique ont été diluées dans une solution de miglyol[®] et de PGPR. Les observations ont été réalisées entre lame et lamelle à l'aide d'un microscope optique Olympus BX51 (Zeiss) avec des grossissements x10, x20, x40 et des objectifs à immersion x60 et x100. Le microscope est équipé d'une caméra permettant de prendre des images des dispersions.

6.7.3. Granulométrie

Pour faire les mesures de la taille des particules par granulométrie laser, une dilution préalable de l'émulsion inverse à 50% a été réalisée avec une solution de miglyol[®] contenant 5% de PGPR afin d'éviter la floculation des gouttes entre elles. Les mesures ont été réalisées sur un granulomètre laser Mastersizer 2000 (Malvern). Pour permettre les mesures de tailles de particules des émulsions inverses, le système doit être monté en configuration inverse (le diluant étant le mélange miglyol[®]). Le réglage « *general purpose* » de l'appareil est utilisé et permet de déterminer la taille des particules en considérant les gouttes sphériques. L'indice de réfraction de la phase dispersée (eau) est de 1,33 et celui de la phase dispersante (miglyol[®]) est de 1,45. Les tailles moyennes D[3,2] et D[4,3] ainsi que la polydispersité sont calculées selon les équations suivantes :

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum N_i D_i^4}{\sum N_i D_i^3}; P = \frac{1}{\bar{D}} \frac{\sum N_i D_i^3 (\bar{D} - D_i)}{\sum N_i D_i^3}$$

$$D_{[3,2]} = \frac{\sum N_i D_i^3}{\sum N_i D_i^2}; P = \frac{1}{\bar{D}} \frac{\sum N_i D_i^3 (\bar{D} - D_i)}{\sum N_i D_i^3}$$

6.8. Fabrication des matrices alimentaires

Les recettes développées pour l'ensemble des matrices alimentaires sont issues d'études de contre-typage de produits classiques retrouvés dans le commerce. Toutes les fabrications ont été réalisées au laboratoire ou sur la plateforme pilote avec les outils présents au CRT AGIR.

6.8.1. Fabrication des crèmes glacées

Les fabrications des crèmes glacées ont été réalisées à l'aide du pilote Bravo Trittico® (référence Executive 610) (Figure 4.29). Cet outil pilote est composé d'une cuve supérieure chauffante qui permet en une seule étape l'agitation et la pasteurisation. La cuve inférieure est un échangeur de canon cylindrique munie d'un racloir rotatif à couteau et permet un refroidissement et une surgélation par une double enveloppe réfrigérée à l'eau froide.

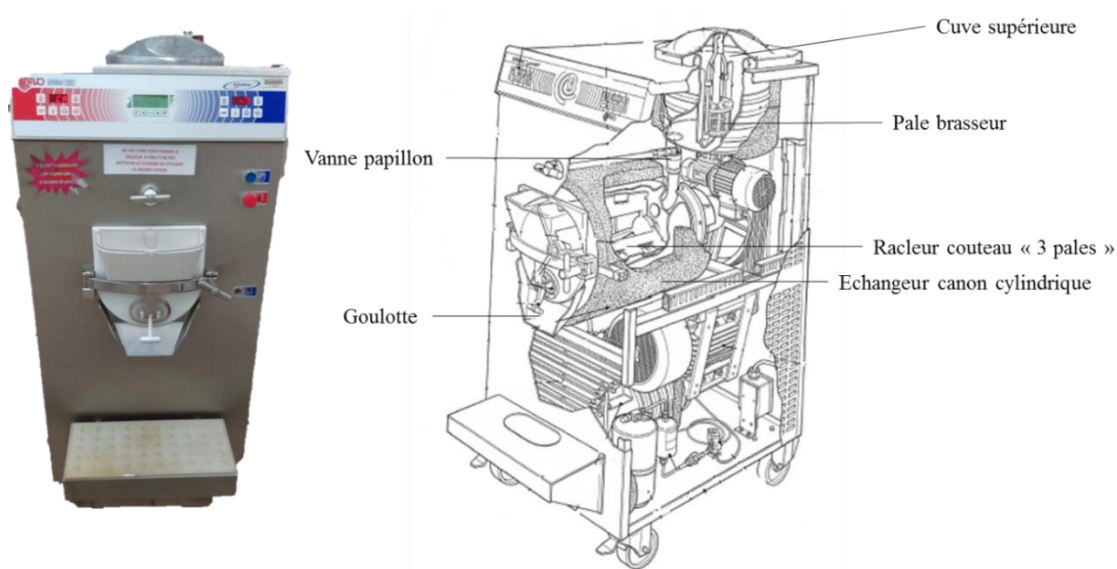


Figure 4.29 : Bravo Trittico® modèle Executive 610.

De plus, l'homogénéisation du mix laitier se fait à l'aide d'un homogénéisateur à haute pression simple effet de la marque Pierre Guerin® (modèle ALM-2) (Figure 4.30). Il permet de diviser les globules gras en très fines particules et assurer une meilleure dispersion et donc une meilleure tenue de l'émulsion et une meilleure texture de la glace.

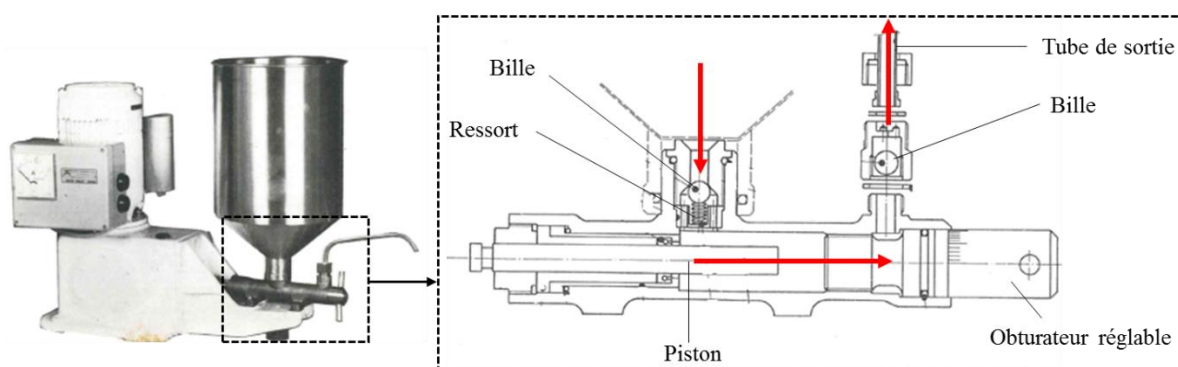


Figure 4.30 : Homogénéisateur Pierre Guerin® modèle ALM-2.

Le diagramme de fabrication est présenté ci-après (Figure 4.31). La recette utilisée est décrite dans le Tableau 4.10.

Tableau 4.10 : Liste des ingrédients de la crème glacée.

Ingrédients	Quantité (%)
Eau	62,55
Sucre	17,70
Poudre de lait	5,29
Sirop de glucose	4,00
Huile végétale	6,45
Sucre inverti	2,70
Farine de caroube	0,16
Gomme guar	0,09
Arôme naturel de vanille	1,00
Colorant jaune	0,07

La fabrication des crèmes glacées se déroule en plusieurs étapes. Premièrement, des mix glacés sont fabriqués puis homogénéisés et pasteurisés. Ensuite, un temps de maturation est nécessaire pour que les matières grasses aient le temps de cristalliser, et permettre aux protéines de s'hydrater afin d'assurer une bonne stabilisation du mélange. Pour finir, la dernière étape est l'incorporation d'air tout en refroidissant le mix glacé. Le produit obtenu est une glace à -6 °C qu'il faut rapidement refroidir à l'aide d'une cellule de surgélation à -32 °C durant 30 min. Les crèmes glacées sont conservées au congélateur à -18 °C.

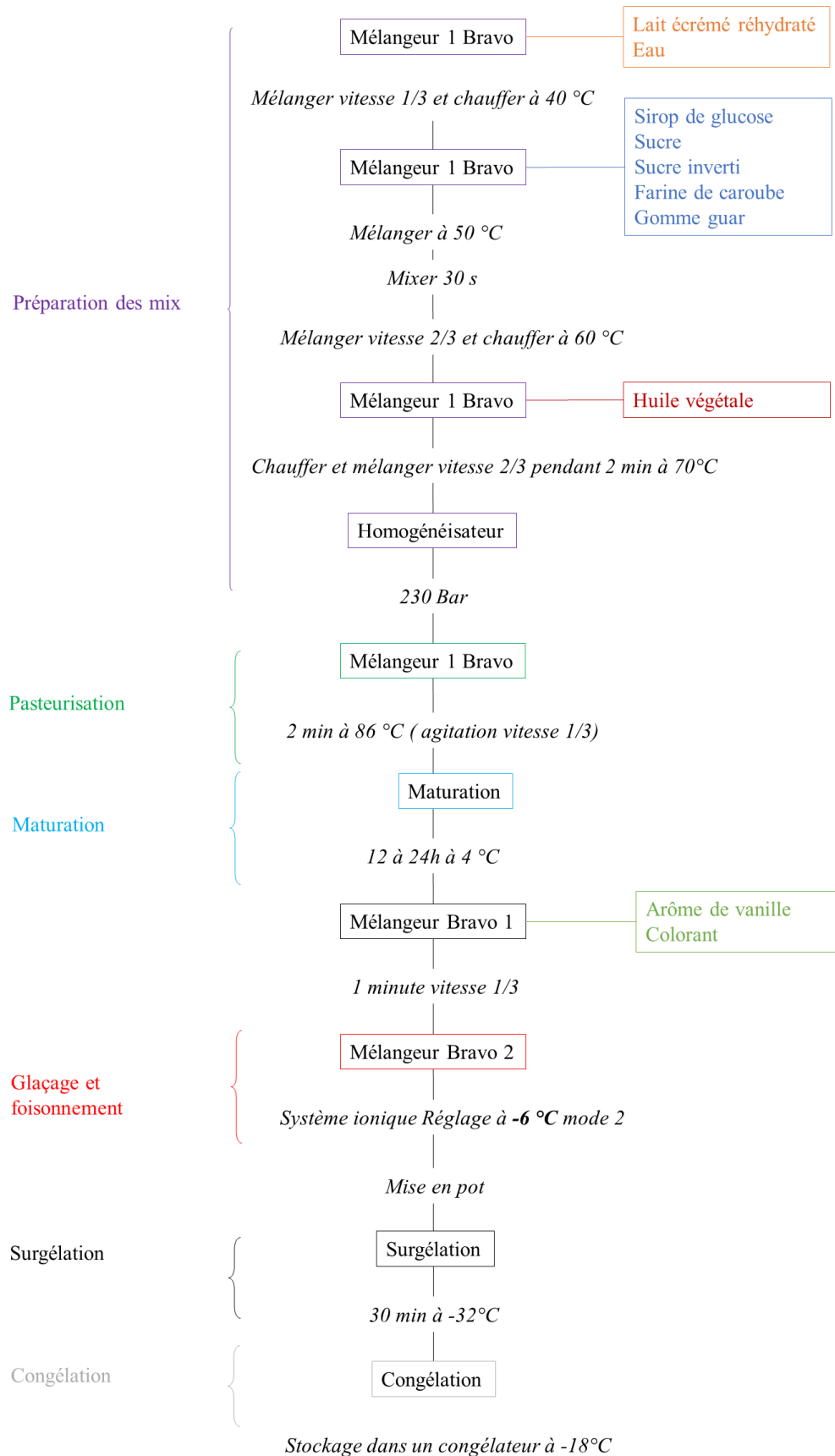


Figure 4.31 : Diagramme de fabrication des crèmes glacées.

6.8.2. Fabrication des barres pâtissières

Les fabrications des barres pâtissières ont été réalisées à l'aide d'un batteur planétaire Starmix® (référence PL40N3V0) (Figure 4.32(A)). Par un mouvement planétaire, les matières premières sont mélangées jusqu'à obtention d'une pâte homogène (Figure 4.32(B)).

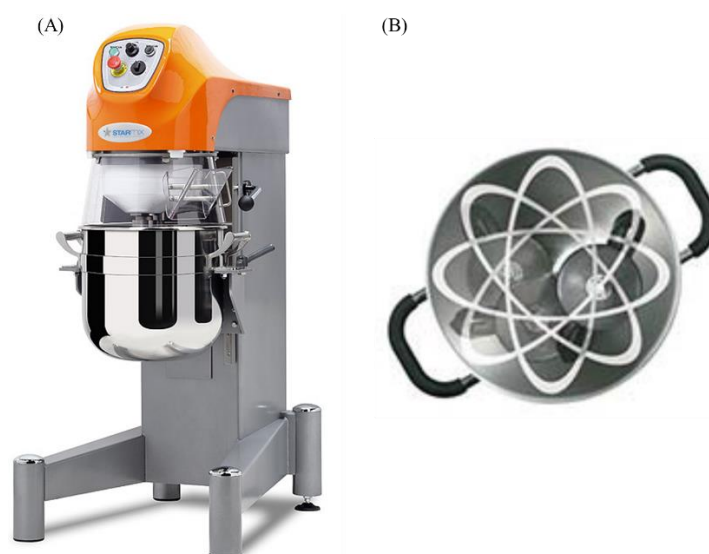


Figure 4.32 : (A) Equipement Starmix® modèle PL40N3V0 et (B) représentation schématique d'un mouvement planétaire.

Dans un premier temps, l'ensemble des ingrédients aqueux sont mélangés dans le pétrin. Afin d'avoir une meilleure répartition des poudres, notamment celles présentes en faibles quantités comme les levures, elles sont d'abord pré-mélangées ensemble, puis ajoutées dans le pétrin. Après homogénéisation de la pâte, l'ajout de matière grasse est réalisé. L'homogénéité de la pâte est contrôlée avant le remplissage des moules. La cuisson se fait dans un four Rational® à 170 °C pour une durée de 33 minutes (Figure 4.33). La recette suivie pour cette fabrication est décrite dans le Tableau 4.11.

Tableau 4.11 : Liste des ingrédients utilisés pour les barres pâtisseries.

Ingrédients	Quantité (%)
Farine T55	30,7
Sucre	27,7
Œufs	18,0
Huile végétale	11,6
Eau	9,95
Poudre à lever	0,75
Sel	0,5
Arôme de vanille	0,5
Sorbate de potassium	0,3

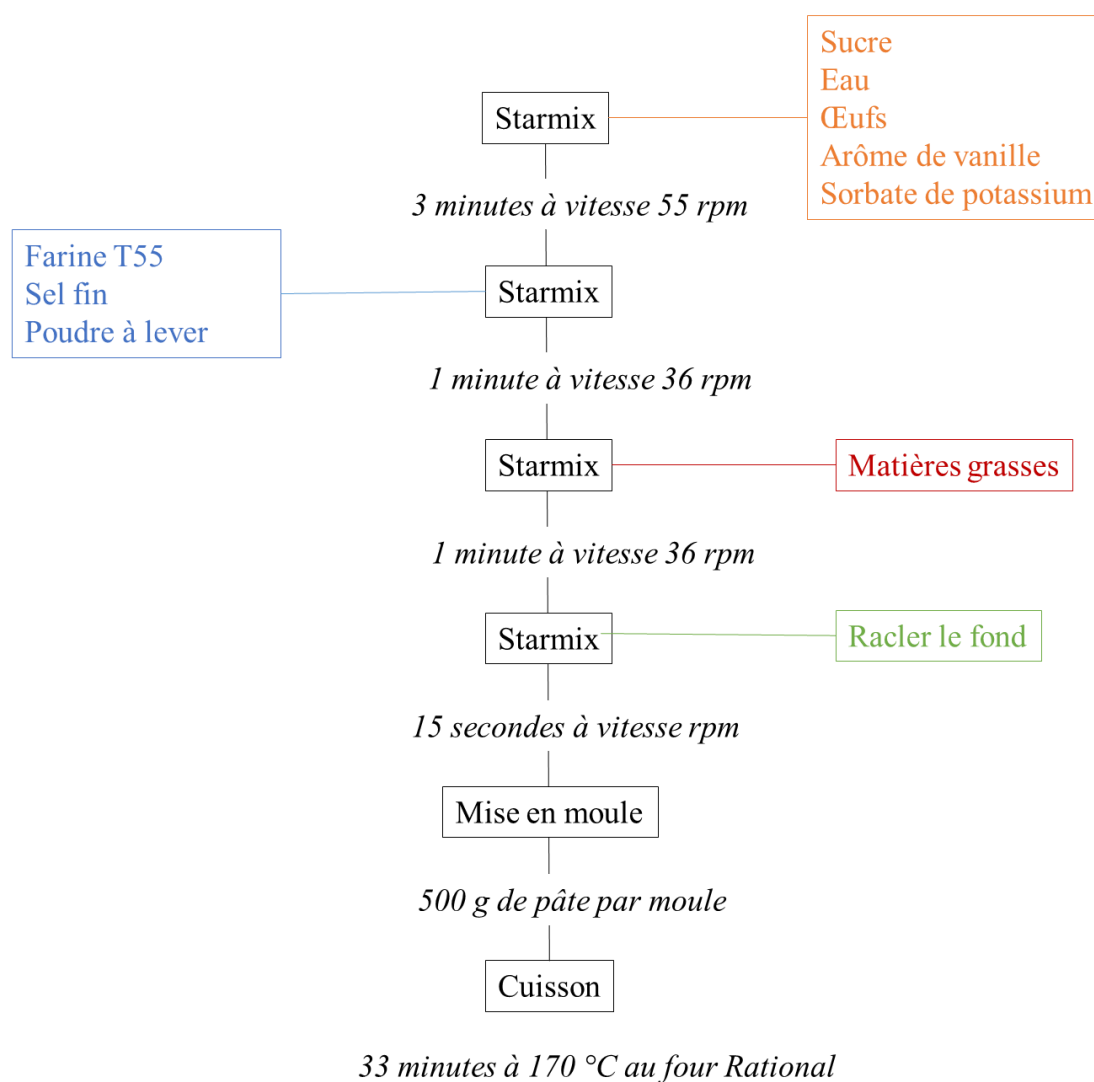


Figure 4.33 : Diagramme de fabrication des barres pâtisseries.

6.8.3. Fabrication des brioches

La fabrication des brioches a été réalisée avec un mélangeur Kenwood® (modèle Cooking Chef KCC9044S) ayant un mouvement planétaire qui permet de mélanger les matières premières jusqu'à obtention d'une pâte homogène. La recette utilisée est décrite dans le Tableau 4.12.

Tableau 4.12 : Ingrédients et pourcentages pour la recette.

Ingrédients	Quantité (%)
Farine de blé T55	24,37
Farine de Gruau	24,09
Eau	15,35
Sucre	8,85
Œufs frais	9,0
Sirup de sucre inversé	4,47
Beurre 82% MG	5,63
Huile végétale	4,5
Levure fraîche	2,03
Sel	0,91
Arôme vanille	0,8

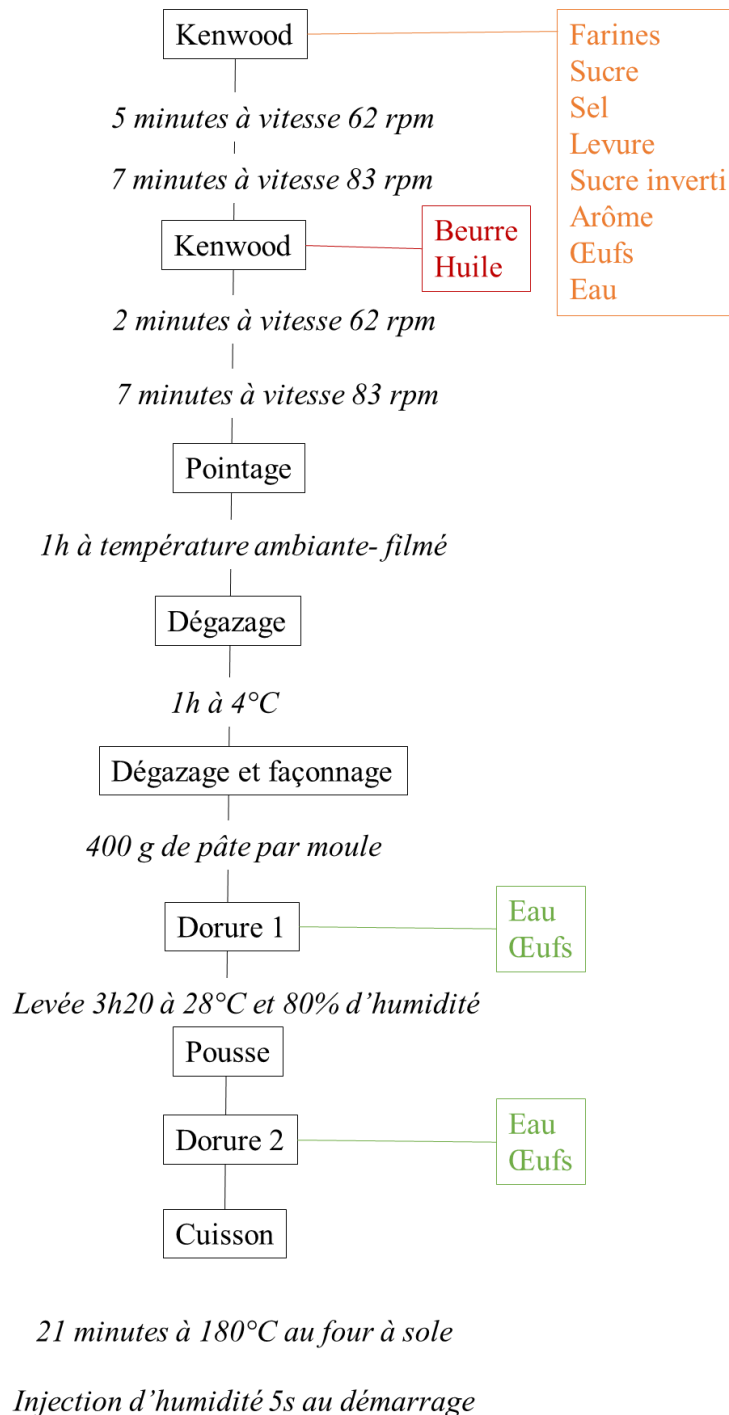


Figure 4.34 : Diagramme de fabrication des brioches.

Après avoir pétri tous les ingrédients, la matrice requiert de nombreux temps de repos. Entre certaines étapes, il est nécessaire de faire un dégazage. Après avoir mis la pâte dans une chambre froide à 4 °C pendant 1h, 400 g de pâte sont façonnés et placés dans un moule en aluminium. Ensuite, les brioches sont mises à lever en chambre de pousse pendant 3h20. En effet, la pâte doit être laissée au repos de façon à ce que les levures biologiques s'activent et

produisent du gaz (CO₂). Ce dernier est piégé par le réseau formé par le gluten et les molécules émulsifiantes. L'injection de vapeur d'eau au moment de la cuisson, permet d'humidifier la croute pour qu'elle ne sèche pas vite à la cuisson, favorisant ainsi le gonflement (Figure 4.34).

6.9. Mesures de texturométrie

Les mesures de dureté ont été effectuées à l'aide d'un texturomètre de TAXT2 (Stable Micro System®) et les protocoles ont été adaptés en fonction des matrices alimentaires.

6.9.1. Des crèmes glacées

Pour la dureté des crèmes glacées, les mesures ont été réalisées en mode compression simple avec un retour en position de départ. Les glaces sont sorties du congélateur à -18 °C et laissées 1 min à 20 °C. Dans le but de faire des comparaisons de texture en fonction des différentes huiles utilisées dans les crèmes glacées, les mesures de dureté ont été réalisées avec les paramètres et réglages décrits dans le Tableau 4.13. La surface de contact du mobile est de 19,6 mm². La valeur de la force relevée correspond à une pénétration de 20 mm du mobile dans la glace. La valeur moyenne de dureté indiquée et l'écart type sont calculés sur les trois premières mesures.

Tableau 4.13 : Paramètres de réglage du texturomètre pour les mesures de dureté des glaces.

Paramètres	Valeurs
Type de mesure	Mesure de force en compression
Type d'essai	Retour position de départ
Unité de force	Newton (N)
Distance	mm
Pré-vitesse	10,0 mm/s
Vitesse	1,0 mm/s
Post-vitesse	10,0 mm/s
Déplacement	20,0 mm
Déclenchement de force	Auto, 5 g

6.9.2. Des produits céréaliers

Dans le cas des mesures de dureté des barres pâtisseries et des brioches des mesures de TPA (Texture Profile Analysis) ont été réalisées avec un mobile cylindrique d'une surface de contact de 491 mm². Afin de faire les mesures, des tranches de 1,5 cm dans les barres pâtisseries et de 2 cm dans les brioches ont été découpées. Des prélèvements à l'emporte-pièce au centre de la tranche ont été effectués de façon à faire les mesures de dureté optimales et limiter d'éventuels effets de bord. Pour une meilleure discrimination entre les essais, les mesures sont réalisées sur neuf tranches et la valeur de dureté indiquée est la moyenne réalisée sur les mesures après avoir exclu les deux données extrêmes. Les paramètres appliqués pour les analyses sont présentés dans Tableau 4.14.

Tableau 4.14 : Paramètres de réglage pour les mesures de dureté sur les barres pâtisseries et les brioches.

Paramètres	Valeurs
Type d'essai	Profil Analyse de Texture
Unité de force	Newton (N)
Distance	mm
Pré-vitesse	5,0 mm/s
Vitesse	1,0 mm/s
Post-vitesse	10,0 mm/s
Déplacement	8 mm
Temps de repos	5 s
Déclenchement de force	Auto, 5 g

6.9.3. Mesure du taux d'écoulement des glaces

Cette étude est réalisée pour l'étude de la cinétique de fonte des crèmes glacées à 20 °C. A l'aide d'un emporte-pièce, une masse de 125 g (+/- 5g) de crème glacée est prélevée et déposée sur un tamis d'une ouverture de maille de 2 mm. Afin de suivre la fonte de la glace, la partie liquide qui s'écoule du tamis est collectée dans un récipient préalablement déposé sur une balance, et la masse est relevée toutes les 2 min pendant 1 heure.

7. Références bibliographiques

- Anarjan, N., & Tan, C. (2013). Effects of Selected Polysorbate and Sucrose Ester Emulsifiers on the Physicochemical Properties of Astaxanthin Nanodispersions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18, 768-777.
- Arditty, S. (2004). *Fabrication, stabilité et propriétés rhéologiques des émulsions stabilisées par des particules colloïdales*. Université de Bordeaux.
- Balcaen, M., Steyls, J., Schoeppe, A., Nelis, V., & Van der Meeren, P. (2021). Phosphatidylcholine-depleted lecithin: A clean-label low-HLB emulsifier to replace PGPR in w/o and w/o/w emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 581, 836-846.
- Benejam, W., Steffolani, M. E., & León, A. E. (2009). Use of enzyme to improve the technological quality of a panettone like baked product. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2431-2437.
- Benzonana, G., & Desnuelle, P. (1965). Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 105(1), 121-136.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186.
- Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*, 13(1), 24-29.
- Csáki, F. K., & Sebestyén, É. (2019). Who will carry out the tests that would be necessary for proper safety evaluation of food emulsifiers? *Food Science and Human Wellness*, 8(2), 126-135.
- Delample, M., Da Silva, F., & Leal-Calderon, F. (2014). Osmotically driven gelation in double emulsions. *Food Hydrocolloids*, 38, 11-19.
- Faergemand, M., & Krog, N. (2005). Interactions of Emulsifiers with Other Components in Foods. In *Ingredient interactions: Effects on food quality*, (pp. 389-422).
- Farhoosh, R. (2007). The Effect of Operational Parameters of the Rancimat Method on the Determination of the Oxidative Stability Measures and Shelf-Life Prediction of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(3), 205-209.
- Goibier, L. (2018). *Techniques de structuration et d'émulsification de la matière grasse laitière*. Université de Bordeaux.
- Leal-Calderon, F., Mondain-Monval, O., Pays, K., Royer, N., & Bibette, J. (1997). Water-in-Oil Emulsions: Role of the Solvent Molecular Size on Droplet Interactions. *Langmuir*, 13(26), 7008-7011.
- Mabille, C., Schmitt, V., Gorria, P., Leal Calderon, F., Faye, V., Deminière, B., & Bibette, J. (2000). Rheological and Shearing Conditions for the Preparation of Monodisperse Emulsions. *Langmuir*, 16(2), 422-429.

- Monakhova, Y. B., & Diehl, B. W. K. (2016). Quantitative Analysis of Sunflower Lecithin Adulteration with Soy Species by NMR Spectroscopy and PLS Regression. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(1), 27-36.
- Monakhova, Y. B., & Diehl, B. W. K. (2018). Automated multicomponent phospholipid analysis using ³¹P NMR spectroscopy: example of vegetable lecithin and krill oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(30), 7891-7900.
- Okuro, P. K., Gomes, A., Costa, A. L. R., Adame, M. A., & Cunha, R. L. (2019). Formation and stability of W/O-high internal phase emulsions (HIPEs) and derived O/W emulsions stabilized by PGPR and lecithin. *Food Res Int*, 122, 252-262.
- Osman, E. M., Leith, S. J., & Fles, M. (1961). Complexes of amylose with surfactants. *Cereal Chem.*, 38, 449-454.
- Pal, R. (1993). Rheological behaviour of surfactant-flocculated water-in-oil emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 71(2), 173-185.
- Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A., & Delcour, J. A. (2011). Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 266-279.
- Pomeranz, Y., & Chung, O. K. (1978). Interaction of lipids with proteins and carbohydrates in breadmaking. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(2), 285-289.
- Putseys, J. A., Lamberts, L., & Delcour, J. A. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 238-247.
- Sahi, S. S. (2003). The Interfacial Properties of the Aqueous Phases of Full Recipe Bread Doughs. *Journal of Cereal Science*, 37(2), 205-214.
- Sarda, L., & Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 30(3), 513-521.
- Schaich, K. M. (2020). Lipid Oxidation: New Perspectives on an Old Reaction. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, (pp. 1-72).
- Tufvesson, F., Wahlgren, M., & Eliasson, A.-C. (2003a). Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 2. Fatty Acids. *Starch - Stärke*, 55(3-4), 138-149.
- Tufvesson, F., Wahlgren, M., & Eliasson, A.-C. (2003b). Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 1. Monoglycerides. *Starch - Stärke*, 55, 61-71.
- Van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 472-486.
- Weyland, M., & Hartel, R. W. (2008). Emulsifiers in Confectionery. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition*, (pp. 285-305). New York, NY: Springer New York.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse sont positionnés dans la thématique du développement de produits agroalimentaires dans le cadre d'une stratégie dite « clean-label » qui permet d'éviter l'utilisation exogène d'additifs. Le but était de développer et d'étudier une réaction de lipolyse via une stratégie enzymatique pour produire *in situ* des huiles enrichies en mono- et diglycérides d'acides gras (MDGs). Ces huiles, différemment enrichies et considérées comme nouvel ingrédient fonctionnel, devaient permettre la fabrication de matrices alimentaires tout en améliorant leurs propriétés.

Dans un premier temps, nous avons présenté la démarche et les méthodes/techniques utilisées qui nous ont permis de caractériser des mélanges complexes de MDGs mais également d'huiles végétales. Afin d'identifier les différentes molécules présentes, nous avons réalisé des analyses de RMN, de CPG, de DSC et des mesures de tensiométrie. L'ensemble de ces analyses a constitué un socle solide de caractérisation qui nous a permis d'avancer efficacement dans la stratégie de la lipolyse. La RMN est une technique intéressante, adaptée et discriminante dans la caractérisation des corps gras. Cependant, l'identification préalable des familles de molécules a constitué un travail préliminaire conséquent mais nécessaire, du fait de la complexité des mélanges post-traitement enzymatique obtenus. A l'aide de standards de TGs, DGs, MGs et AGs, nous avons pu identifier par RMN ^1H et RMN ^{13}C , l'ensemble des signaux correspondants.

Dans un second temps, les réactions de lipolyse enzymatique pour former *in situ* les MDGs à partir d'huiles végétales ont été effectuées. Nous avons essentiellement utilisé l'huile de colza mais cette réaction est généralisable à l'huile de tournesol. L'incompatibilité intrinsèque entre le substrat (triglycérides) et le milieu de dispersion (eau + enzymes) limite la cinétique de lipolyse et son efficacité. L'hydrolyse ayant à l'interface huile/eau, il a fallu travailler en milieu émulsifiant pour augmenter la surface de contact entre les deux phases et donc l'efficacité de réaction. Dans le but d'assurer un suivi cinétique de réaction, des prélèvements de la phase grasse à différents temps ont été réalisés. Tous les échantillons ont ensuite été analysés par CPG et RMN, deux techniques qui se sont révélées complémentaires pour l'identification de l'ensemble des molécules et la détermination de l'ensemble des isomères présents dans les huiles hydrolysées.

Tout d'abord, l'hydrolyse de l'huile de colza avec l'enzyme Sumizyme® NLS a été étudiée. Cette enzyme, non OGM, s'est avérée très efficace pour hydrolyser les TGs et générer

in situ des MDGs et AGLs. Selon la même méthodologie, d'autres hydrolyses ont été réalisées en utilisant des lipases avec des origines et des activités différentes. A l'issue, nous en avons déduit que la lipolyse est généralisable. Toutefois, les cinétiques sont différentes et donc le choix d'une lipase ne s'improvise pas. En effet, pour les enzymes NLS et Lipopan, des teneurs maximales en MGs et DGs après 1h30 de réaction ont été observées mais, au-delà, ces produits sont à nouveau hydrolysés et la production associée d'AGLs augmente. L'enzyme RLS produit quant à elle, uniquement des AGLs. Dans ce cas, la conversion des TGs est quasi-totale et l'enzyme est très sélective. Les autres enzymes étudiées ont montré des productions en MGs et DGs sans re-consommation mais dont les teneurs présentent des variabilités. Ces études permettent de montrer qu'il est possible de moduler les teneurs en TGs, DGs, MGs et AGLs dans les huiles hydrolysées en fonction de l'enzyme sélectionnée. De plus, ces différentes compositions moléculaires ont un impact sur les propriétés physico-chimiques des huiles, avec notamment des modifications au niveau des températures de cristallisation et de fusion.

Même si l'incompatibilité des substrats avec les enzymes peut s'avérer être un inconvénient pour notre processus réactionnel, il se révèle être un atout de taille dans le traitement des échantillons. En effet, la séparation entre les produits de réaction et le milieu se fait par simple centrifugation. Le fait de séparer les substrats et l'eau sans dénaturer les enzymes nous a permis de réutiliser le milieu réactionnel pour recycler les enzymes. L'étude menée avec l'enzyme NLS a permis d'aboutir aux mêmes ratios que ce soit en TGs consommés ou en produits formés ; et cela jusqu'à huit cycles réactionnels consécutifs. Au-delà, nous avons observé une baisse d'activité de l'enzyme.

Dans la dernière partie, nous avons utilisé les huiles hydrolysées en tant qu'ingrédients fonctionnels pour la fabrication d'émulsions et de différentes matrices alimentaires. Ceci nous a permis d'étudier l'impact des émulsifiants formés *in situ* par lipolyse. Les fabrications nécessitant des quantités importantes d'huile, nous avons tout d'abord étudié la possibilité d'un transfert d'échelle (laboratoire vers l'utilisation d'outils pilotes).

Les MDGs étant des émulsifiants lipophiles, nous avons envisagé d'utiliser les huiles hydrolysées pour stabiliser des émulsions inverses. Ainsi, nous avons pu obtenir des émulsions concentrées jusqu'à 96% de phase aqueuse prouvant ainsi la robustesse du film interfacial. Des émulsions doubles ont pu être également obtenues mais il convient de maîtriser la dilution afin de limiter la floculation. Ainsi, sans avoir recours au PGPR, traditionnellement utilisé,

l'obtention des émulsions inverses et doubles est possible. Une fragilité de ces édifices est tout de même observée. Nous pouvons toutefois supposer qu'il existe une synergie entre les MDGs et la lécithine de tournesol car cette dernière nous a permis d'améliorer grandement la stabilité des émulsions.

Enfin, différentes matrices alimentaires ont été fabriquées en essayant de cibler une large gamme de produits du marché où les MDGs jouent des rôles différents : les crèmes glacées, les barres pâtisseries et les brioches. Au travers de ces exemples, nous avons évalué les différents concepts introduits durant l'étude de la lipolyse enzymatique, soit la modulation de la teneur en émulsifiants ou de la composition de l'huile enrichie (MDGs ou AGLs), la nature de la lipase utilisée ou bien l'impact des huiles issues des différents recyclages. Tout ceci a été comparé à des produits de référence fabriqués à partir d'huile de colza traditionnelle.

Les crèmes glacées ont été formulées avec les huiles hydrolysées par différentes enzymes (différentes teneurs en MDGs et AGLs). Nous avons pu mettre en évidence des différences importantes de cristallinité des huiles et donc sur les propriétés d'écoulement et de dureté après congélation des produits finis.

Ensuite, des huiles hydrolysées issues d'un traitement via une seule et même enzyme (NLS) mais dont les temps de réaction constituaient le paramètre variable, ont été incorporées pour la fabrication de barres pâtisseries. Les différences de composition des huiles ont permis de montrer de façon générale la possibilité de conserver le moelleux jusqu'à 6 mois. Dans ce type de matrice, comparativement à des MDGs commerciaux ajoutés de manière exogène, notre système offre de meilleurs résultats. Cependant, ces études ont également mis en évidence qu'une teneur trop élevée en émulsifiant pouvait avoir un effet négatif sur la dureté du produit fini. Le pourcentage en émulsifiants contenu dans les huiles hydrolysées est donc un paramètre important dans la sélection de l'huile. Des analyses sensorielles, menées en interne, ont aussi révélé sur certains produits des goûts parasites. Ils ne sont pas forcément dus à une teneur élevée en AGLs dans l'huile, mais plus à une sensibilité à l'oxydation plus élevée des huiles issues des lipolyses pouvant alors générer des composés volatils lors de traitements thermiques.

Enfin, les huiles hydrolysées issues de différents recyclages enzymatiques (toujours avec la NLS) ont été utilisées pour la fabrication de brioches. Une étude approfondie sur la levée de la pâte durant la fermentation, l'alvéolation du produit post-cuisson avec un suivi de la dureté dans le temps a été réalisé. Ceci nous a permis de mettre en évidence qu'une huile enrichie en MDGs (avec le pourcentage optimal d'émulsifiant) aide à stabiliser les bulles d'air, favorisant ainsi une meilleure alvéolation lors de l'étape de la levée de la pâte. De plus, nous

avons montré qu'il était possible de recycler huit fois l'enzyme NLS tout en conservant les mêmes propriétés sur les produits finis.

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis de mettre en évidence la possibilité de développer un procédé de lipolyse enzymatique, effectué sur l'huile en amont de la fabrication des produits. Un tel procédé permet de générer des MDGs *in situ* dans des huiles végétales. Ce procédé est répétable, généralisable et transférable à une échelle pilote. La nature de l'enzyme impacte la composition de l'huile au niveau des produits issus de l'hydrolyse, mais aussi la durée de réaction de l'enzyme avec son substrat, ce qui peut influencer les propriétés du produit final. La teneur en émulsifiants est également un paramètre à contrôler afin d'obtenir les propriétés souhaitées. Tout cela a pu être réalisé sans ajout exogène de MDGs et s'inscrit dans les tendances du « clean-label ». Bien que des études sur la fabrication d'autres matrices alimentaires restent nécessaires, les travaux menés tout au long de cette thèse représentent une avancée non négligeable et encourageante pour le futur développement de solutions « clean-label ».

Lipolyse enzymatique de triglycérides pour la fabrication de matrices alimentaires dans le cadre d'une stratégie « clean-label »

Résumé : Dans cette thèse, nous avons voulu explorer des voies dites « clean-label » qui permettraient d'intégrer des mono- et diglycérides d'acides gras (MDGs ; E471) dans des matrices alimentaires. En effet, les fabricants cherchent des solutions pour remplacer les additifs obtenus par voie de synthèse tout en gardant les mêmes fonctionnalités dans les produits alimentaires. L'utilisation d'auxiliaires technologiques, comme les enzymes, entre parfaitement dans la démarche de produits plus respectueux du consommateur et de l'environnement ; c'est-à-dire « clean-label ». Ainsi avec une lipase mise en contact avec de l'huile de colza, nous avons démontré que des MDGs pouvaient être générés *in situ* avec un bon rendement. Pour mieux comprendre les cinétiques de lipolyse et caractériser l'ensemble des produits formés, des analyses par chromatographie en phase gazeuse et RMN ^1H et ^{13}C ont été effectuées. Enfin, les huiles de colza, différemment enrichies en MDGs ont ensuite été utilisées dans la fabrication directe de produits alimentaires. En effet, sur chacun des produits choisis, les MDGs jouent des rôles différents. Des produits tels que des barres pâtisseries, des brioches et des crèmes glacées ont donc été formulés et caractérisés afin de mettre en avant les effets technologiques et les différences par rapport à des produits fabriqués avec de l'huile de colza seule. Enfin, la fabrication d'émulsions inverses concentrées réalisée à partir de l'huile hydrolysée a été développée permettant d'entrevoir la possibilité de fabriquer des émulsions doubles.

Mots clés : Mono- et diglycérides d'acides gras ; Clean-label ; Produits alimentaires ; Lipolyse enzymatique ; RMN

Enzymatic lipolysis of triglycerides to make food products in the framework of a clean-label strategy

Abstract: In this project, we wanted to explore “clean-label” strategies to incorporate mono- and diglycerides of fatty acids (MDGs; E471) in food products. Indeed, manufacturers try to find solutions in order to substitute synthetic additives while keeping the same functionalities in the food products. The use of processing aids, such as enzymes, fits perfectly with the approach of products that are more respectful of consumers and the environment; that is to say “clean-label”. Thus, by reacting a lipase with rapeseed oil, we demonstrated that MDGs could be generated *in situ* and with a good yield. To better understand the kinetics of lipolysis and to characterize all the products formed, analysis by gas chromatography and ^1H and ^{13}C NMR were carried out. Finally, rapeseed oils with different MDGs rates, were used in the fabrication of different food products. Indeed, on each of the products chosen, the MDGs play different roles. Products like sponge cakes, brioches and ice creams were formulated and characterized to highlight all benefits comparatively to products made with unmodified rapeseed oil. Finally, the fabrication of concentrated reverse emulsions starting from the post-enzymatic oil has been developed that allow the possibility to obtain doubles emulsions.

Keywords: Mono- and diglycerides of fatty acids; Clean-label; Food products; Enzymatic lipolysis; NMR

Lipolyse enzymatique de triglycérides pour la fabrication de matrices alimentaires dans le cadre d'une stratégie « clean-label »

Résumé : Dans cette thèse, nous avons voulu explorer des voies dites « clean-label » qui permettraient d'intégrer des mono- et diglycérides d'acides gras (MDGs ; E471) dans des matrices alimentaires. En effet, les fabricants cherchent des solutions pour remplacer les additifs obtenus par voie de synthèse tout en gardant les mêmes fonctionnalités dans les produits alimentaires. L'utilisation d'auxiliaires technologiques, comme les enzymes, entre parfaitement dans la démarche de produits plus respectueux du consommateur et de l'environnement ; c'est-à-dire « clean-label ». Ainsi avec une lipase mise en contact avec de l'huile de colza, nous avons démontré que des MDGs pouvaient être générés *in situ* avec un bon rendement. Pour mieux comprendre les cinétiques de lipolyse et caractériser l'ensemble des produits formés, des analyses par chromatographie en phase gazeuse et RMN ^1H et ^{13}C ont été effectuées. Enfin, les huiles de colza, différemment enrichies en MDGs ont ensuite été utilisées dans la fabrication directe de produits alimentaires. En effet, sur chacun des produits choisis, les MDGs jouent des rôles différents. Des produits tels que des barres pâtisseries, des brioches et des crèmes glacées ont donc été formulés et caractérisés afin de mettre en avant les effets technologiques et les différences par rapport à des produits fabriqués avec de l'huile de colza seule. Enfin, la fabrication d'émulsions inverses concentrées réalisée à partir de l'huile hydrolysée a été développée permettant d'entrevoir la possibilité de fabriquer des émulsions doubles.

Mots clés : Mono- et diglycérides d'acides gras ; Clean-label ; Produits alimentaires ; Lipolyse enzymatique ; RMN

Enzymatic lipolysis of triglycerides to make food products in the framework of a clean-label strategy

Abstract: In this project, we wanted to explore “clean-label” strategies to incorporate mono- and diglycerides of fatty acids (MDGs; E471) in food products. Indeed, manufacturers try to find solutions in order to substitute synthetic additives while keeping the same functionalities in the food products. The use of processing aids, such as enzymes, fits perfectly with the approach of products that are more respectful of consumers and the environment; that is to say “clean-label”. Thus, by reacting a lipase with rapeseed oil, we demonstrated that MDGs could be generated *in situ* and with a good yield. To better understand the kinetics of lipolysis and to characterize all the products formed, analysis by gas chromatography and ^1H and ^{13}C NMR were carried out. Finally, rapeseed oils with different MDGs rates, were used in the fabrication of different food products. Indeed, on each of the products chosen, the MDGs play different roles. Products like sponge cakes, brioches and ice creams were formulated and characterized to highlight all benefits comparatively to products made with unmodified rapeseed oil. Finally, the fabrication of concentrated reverse emulsions starting from the post-enzymatic oil has been developed that allow the possibility to obtain doubles emulsions.

Keywords: Mono- and diglycerides of fatty acids; Clean-label; Food products; Enzymatic lipolysis; NMR