

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
ANNABA



جامعة باجي مختار
عنابة

Faculté des Sciences

Année : 2011

Département de Chimie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de **Magister**

THEME

***Optimisation de la réactivité dans la réaction
d'estérification enzymatique du D-glucose***

Option : **Chimie Organique**

Par : M^{elle} **HELLAL DJAMILA**

Devant le jury :

Directrice de mémoire	: M ^{me} . BIDJOU-HAIOUR Chahra	Maître de conférences A	U. B. M., Annaba
Président :	M. BOUKHARI Abbès	Professeur	U. B. M., Annaba
Examineurs :	M. LADJAMA Ali	Professeur	U. B. M., Annaba
	M^{me}. BENYAHIA Samira	Maître de conférences A	E.P.S.T., Annaba
	M. LEGSEIR Belgacem	Professeur	U. B. M., Annaba

Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu Monsieur le Professeur **R. BENLOUCIF** de sa confiance pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Ces travaux ont été encadrés par Madame **C.BIDJOU HAIOUR** Maître de conférences à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba, que je souhaite remercier très chaleureusement pour m'avoir donné sa confiance et son appui pour la réalisation de ces travaux. Merci, pour votre dynamisme et vos compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ces travaux.

Je remercie Monsieur le professeur, **A. BOUKHARI**, de l'honneur qu'il me fait aujourd'hui de bien vouloir présider le jury de ce mémoire.

Monsieur **A. LADJAMA**, Professeur au Département de biologie, à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba, a accepté de juger ce travail. Qu'il me soit permis de lui exprimer ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie également Madame **S. BENYAHIA**, Maître de conférences A à l'E.P.S.T d'Annaba, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **B. LEGSEIR**, Professeur au Département de chimie, à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba qui a bien voulu accepter de faire partie de ce jury. Je le prie de croire en mes sincères remerciements.

Sans oublier mademoiselle **Nadia KLAI**, maitre assistante B à l'université de Msila. Pour son aide technique et scientifique.

ملخص

أسترات السكريات هي عبارة عن مركبات غير أيونية. بفعل خصائصها وتشكيلتها المميزة يسمح باستعمالها في عدة مجالات نذكر منها (مواد التنظيف، التجميل، المستحضرات الصيدلانية، الأطعمة... الخ) ، يمكن الحصول عليها بعملية الأستلة سواء بطريقة كيميائية أو إنزيمية.

و على هذا, نتطرق إلى دراسة عملية أسترة الغلوكوز بواسطة حمض لوريك كمانح للأسيل في محاليل ذات استقطابية مختلفة (اثيل ميثيل كيتون/ثنائي الميثيل كبريتات الأوكسيد) في وجود إنزيم فطري حر و مجمد بطريقة الإدمصاص على السيليس و السيليت على صعيد المخبر. و ذلك بهدف مقارنة نشاط الإنزيمات الحرة مع الإنزيمات المجمدة.

خلال هذا الموضوع تمت دراسة تأثير مختلف المعايير المساهمة في عملية الأسترة للغلوكوز ('مانحات الأسيل، المحاليل، نوع الإنزيم، درجة الحرارة... الخ).

أعلى نسبة تحويل للغلوكوز المتحصل عليها هي 60% وذلك في وجود الإنزيمات المجمدة على السيليت و محلول اثيل ميثيل كيتون في درجة حرارة 40°م.

المفاتيح: أسترات السكريات، الإنزيمات المجمدة، الأستلة، الإنزيم، أسترة.

Résumé

Les esters de sucre sont des tensioactifs non-ioniques possédant une grande particularité structurale qui autorise leur utilisation dans divers domaines (produits détergents, cosmétiques, pharmaceutiques, alimentaires...etc). Leur synthèse est réalisée soit par voie chimique soit par voie enzymatique.

Au cours de ce travail nous avons étudié la réaction d'estérification du D-glucose par l'acide laurique comme agent acylant dans des solvants à différentes polarités (éthyle méthyle cétone/diméthyle sulfoxyde) en présence d'une enzyme fongique : la lipase de *Candida cylindracea* libre et immobilisée sur silice et sur célite à l'échelle de laboratoire dans le but de comparer les résultats obtenus avec l'enzyme libre et immobilisée.

Nous avons rapporté dans ce travail une étude des différents paramètres qui influent sur la réactivité dans la réaction d'estérification du D-glucose (agent acylant, enzyme, solvant, température, quantité du tamis moléculaire).

La meilleure conversion (60%) est obtenue avec l'enzyme immobilisée su célite dans l'éthyle méthyle cétone à 40°C.

Mots clés : esters de sucre, tensioactifs, enzyme, enzyme immobilisée, estérification.

Abstract

Sugar esters are nonionic surfactants with a large structural feature that allows their use in various fields (detergents, cosmetics, pharmaceutical, food ... etc.), their synthesis is carried out either chemically or enzymatically process.

In this work we studied the esterification of D-glucose with lauric acid as acylating agent in different polarity solvent (methyl ethyl ketone / dimethyl sulfoxide) in the presence of a fungal enzyme: *Candida cylindracea* lipase free and immobilized on silica and celite in the laboratory to compare the results obtained with the free and immobilized enzyme.

We have made this work study different parameters affecting the esterification reaction of D-glucose (acylating agent, enzyme, solvent, temperature, amount of molecular sieves).

The best conversion (60%) is obtained with the enzyme immobilized on celite in ethyl methyl ketone at 40 ° C.

Keywords: Sugar esters, surfactants, enzyme, immobilized enzyme, esterification.

Sommaire

Introduction générale

1

Chapitre 1 : Mise au point bibliographique sur les tensioactifs

1. Introduction	3
2. Les différentes classes des tensioactifs	3
2.1. Les tensioactifs anioniques	3
2.2. Les tensioactifs cationiques	4
2.3. Les tensioactifs zwitterioniques	4
2.4. Les tensioactifs non ioniques	5
3. Domaine d'application des tensioactifs	5
3.1. Secteur de la détergence	5
3.2. Secteur de la cosmétique	6
3.3. Secteur industriel	6
4. Les esters de sucre	6
4.1. Synthèse par voie chimique	7
4.2. La synthèse enzymatique	8
5. Influence du milieu réactionnel sur la synthèse enzymatique des esters de sucre	10
5.1. L'influence de l'eau	10
5.2. L'influence de solvant organique	10
5.3. L'influence de la longueur de la chaîne de l'agent acylant	11
5.4. L'influence de la nature de la lipase	11
5.5. L'influence de la température	12
5.6. L'influence du rapport molaire entre les substrats	12
6. Application potentielles des esters de sucre	12
7. Conclusion	14

Chapitre 2 : Mise au point bibliographique sur les enzymes

1. Introduction	15
2. Composition des enzymes	15
3. Efficacité catalytique des enzymes	16
4. Structure des enzymes	16
4.1. Structure primaire	16
4.2. Structure secondaire	16
4.3. Structure tertiaire	17
4.4. Structure quaternaire	17
5. Mécanisme d'action des enzymes	17
6. Classification des enzymes	18
6.1. Nomenclature systématique	18
6.2. Classification CAZy	19
7. Cinétique enzymatique (équation de Michaelis-Menten)	20
8. Immobilisation des enzymes	22
8.1. Immobilisation par adsorption	22
8.2. Immobilisation par micrencapsulation	22
8.3. Immobilisation par inclusion	22
8.4. Immobilisation par réticulation	23
8.5. Immobilisation par des liaisons covalente	23
9. Dénaturation des enzymes	23
10. Domaines d'applications des enzymes	24
11. Les lipases	24
11.1. Origines des lipases	24
11.2. Structure et mécanisme réactionnel des lipases	24
11.2.1. Mécanisme réactionnel des lipases	24
11.2.2. Structure des lipases	25
11.3. Application des lipases	26
11.3.1. Réaction d'hydrolyse	26
11.3.2. Réaction de synthèse	27

11.3.2.1. Estérification et thioestération	27
11.3.2.2. Transestérification	27
11.3.2.2.1. Interestérification	27
11.3.2.2.2. Alcoolyse	27
11.3.2.2.3. Acidolyse	27
12. Conclusion	28

Chapitre 3 : Estérification enzymatique de l' α -(+)-D glucose

1. Introduction	30
2. La réaction d'acylation	30
2.1. Acylation par voie chimique	30
2.2. Acylation par voie enzymatique	31
3. Acylation enzymatique de l' α -(+)-D-glucose	31
4. Immobilisation de la lipase <i>Candida cylindracea</i>	33
5. Estérification enzymatique de l' α -(+)-D-glucose	34
6. Résultats et discussion	34
6.1. Influence de la quantité du tamis moléculaire	34
6.2. Influence de la quantité d'enzymes	37
6.3. Influence de la quantité d'agent acylant	39
6.4. Influence de la température	42
6.5. Influence d'un cosolvant	44
7. Conclusion	47
Conclusion générale	49
Protocoles expérimentaux	50
Références bibliographiques	57
Annexes	64

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : Schéma simplifié d'un tensioactif.

Chapitre 2

Figure 2 : L'influence des enzymes sur l'énergie d'activation.

Figure 3 : Mode d'action des enzymes.

Chapitre 3

Figure 4 : réactivité des groupements hydroxyles du D-glucose.

Figure 5 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité du tamis moléculaire sur la conversion dans le cas de la CCL libre.

Figure 6 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité du tamis moléculaire sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(c)}.

Figure 7 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité du tamis moléculaire sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(s)}.

Figure 8 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'enzyme sur la conversion dans le cas de la CCL libre.

Figure 9 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'enzyme sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(c)}.

Figure 10 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'enzyme sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(s)}.

Figure 11 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'agent acylant sur la conversion dans le cas de la CCL libre.

Figure 12 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'agent acylant sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(c)}.

Figure 13 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'agent acylant sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(s)}.

Figure 14 : Suivi cinétique de l'influence de la température sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(c)}.

Figure 15 : Suivi cinétique de l'influence de la température sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(s)}.

Figure 16 : Suivi cinétique de l'influence de cosolvant sur la conversion dans le cas de la CCL libre.

Figure 17 : Suivi cinétique de l'influence de cosolvant sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(c)}.

Figure 18 : Suivi cinétique de l'influence de cosolvant sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(s)}.

Liste des schémas

Chapitre 1

Schéma1 : Tensioactifs anioniques.

Schéma 2 : Tensioactif cationique.

Schéma 3 : Tensioactif amphotère.

Schéma 4 : Tensioactifs non ioniques.

Schéma 5 : Estérification chimique du (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose.

Schéma 6 : Transésterification chimique du saccharose.

Schéma 7 : Transésterification enzymatique du lactose.

Schéma 8 : Estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique.

Schéma 9 : Influence de l'activité de l'eau.

Schéma 10 : Influence de la nature du solvant organique.

Schéma 11 : Influence de la longueur de la chaîne de l'agent acylant.

Schéma 12 : Influence de la nature de lipase.

Schéma 13 : Influence de la température.

Schéma 14 : Influence du rapport molaire entre les substrats.

Chapitre 2

Schéma 15 : Hydrolyse de la triacétine par l'estérase du foie de cheval et la lipase pancréatique de porc. Dépendance de la vitesse d'hydrolyse à l'égard de la concentration en substrat exprimée en multiple de la saturation.

Schéma 16 : Schéma du repliement α/β . Les flèches représentent les feuillet β et les rectangles les hélices α . Le rectangle noir représente le volet amphiphile.

Chapitre 3

Schéma 17 : Schéma général de la réaction d'acylation par voie chimique.

Schéma 18 : Schéma général de la réaction d'acylation par voie enzymatique.

Schéma 19 : Schéma d'estérification du glucose.

Schéma 20 : Schéma de transestérification du glucose.

Chapitre 4

Schéma 21 : Schéma de purification générale des esters de sucre.

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1 : Relation entre HLB et propriétés fonctionnelles des esters de sucre.

Liste des abréviations

Ac ₂ O.....	Anhydride acétique
h	Heur
NEt ₃	Triéthylamine
°C	Degré celsius
CAL-B	Lipase du <i>Candida Antartica</i> B
Rdt	Rendement
Ae	Activité de l'eau
[C]	Concentration
TM	Tamis moléculaire
DMF.....	N,N-Diméthylformamide
BS.....	Protéase <i>Bacillus subtilis</i>
PPL.....	lipase <i>Pancréatique du porc</i>
DMSO.....	Diméthylsulfoxyde
AL-89.....	Protéase <i>alcaline lypophilisée</i>
V _i	Vitesse initiale
A.A.	Agent acylant
eq.....	Equivalent grammes
HLB.....	Balance hydrophile/hydrophobe
E _a	Energie d'activation
EC.....	Enzyme commission
CCL.....	Lipase <i>Candida cylindracéa</i> libre
CCL _{im(c)}	Lipase <i>Candida cylindracéa</i> immobilisée sur célite

$\text{CCL}_{\text{im(s)}}$ Lipase *Candida cylindracea*
 immobilisée sur silice
 EMKEthyl methyleketone
 A.L.Acide laurique
 R_f Rapport frontal
 M..... Masse molaire
 F.....Point de fusion
 Pb.....Point d'ébullition
 MeOHMethanol
 EtOHEthanol
 $\text{\AA}$ Angstrom
 CConversion

Introduction générale

La préservation de l'environnement avec la conservation des ressources fossiles, la réduction des émissions de gaz à effet de serre et l'amélioration de l'innocuité ainsi que de la biodégradabilité des produits sont autant d'arguments pour développer l'utilisation des ressources renouvelables en substitution de celles d'origine fossile.

Les tensioactifs sont des molécules d'intérêt dont le squelette amphiphile laisse apparaître des propriétés de surface spécifiques. Cette particularité structurale autorise leur usage pour la formulation de produits de consommation courante tels que les détergents et les cosmétiques, mais également dans de nombreuses industries comme le textile, le cuir, la métallurgie, ou encore les peintures. Compte-tenu des importants volumes produits chaque année et du développement des comportements respectueux de l'environnement, les tensioactifs doivent répondre de plus en plus à des impératifs de biodégradabilité. A ce titre, l'emploi de ressources naturelles comme matière première de base propose une alternative de choix pour la synthèse de nouveaux composés respectueux de l'environnement.

L'objectif de ce travail consiste à synthétiser un tensioactif de type esters de sucre. Leur synthèse est réalisée soit par voie chimique ou bien par voie enzymatique.

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à la production d'ester de glucose par une estérification enzymatique en présence d'un acide gras.

Après l'introduction générale, une mise au point bibliographique sur les esters de sucres et les différents modes d'accès à de telles molécules ainsi que leurs applications feront l'objet d'un premier chapitre.

Dans le deuxième chapitre nous aborderons des généralités sur la biocatalyse.

Le troisième chapitre de ce mémoire rassemble les résultats obtenus, il s'intitule « estérification enzymatique du D-glucose ». Dans ce chapitre, nous étudions la synthèse des esters de glucose ainsi que les différents paramètres qui influent sur l'évolution des réactions mises en œuvre.

Introduction générale

Après une conclusion générale vient, la partie expérimentale dans laquelle les protocoles opératoires sont détaillés. Les références bibliographiques sont réunies par chapitre à la fin du présent mémoire.

1. Introduction

Les tensioactifs ou agents de surface sont des molécules d'origine naturelle ou synthétique possédant d'une part une chaîne à caractère lipophile (ou queue hydrophobe) et d'autre part un groupement à caractère hydrophile (aussi appelé tête polaire) comme illustré sur la figure 1. Ces composés sont dits amphiphiles.

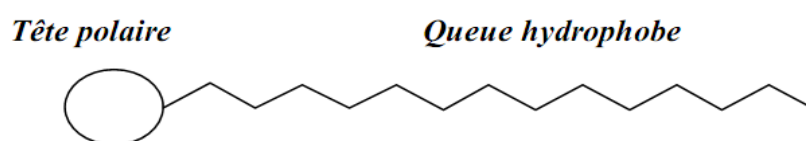


Figure 1 : Schéma simplifié d'un tensioactif.

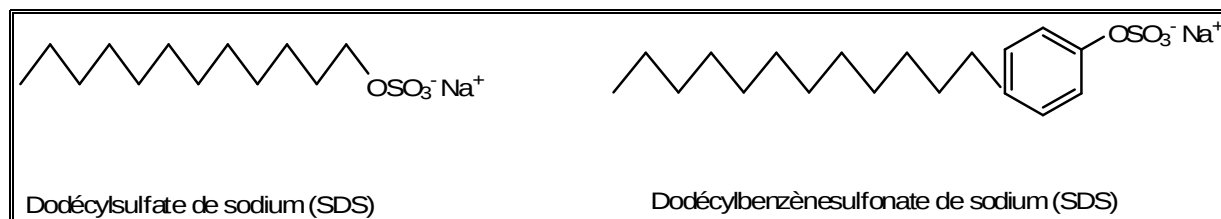
Dans la littérature, on rencontre diverses structures de tensioactifs, variant notamment selon la nature de la partie hydrophile.

2. Les différentes classes de tensioactifs

Il est possible de classer les agents de surface de différentes manières : importances économiques, solubilité dans l'eau, propriétés, applications, etc... Mais le classement le plus rationnel est relatif au caractère ionique des tensioactifs. Il existe 4 classes de tensioactifs qui sont les tensioactifs anioniques, cationiques, amphotères et non ioniques.

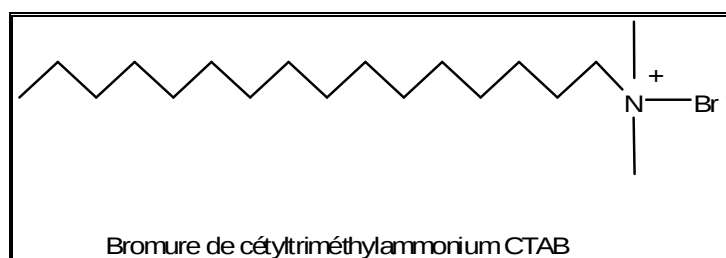
2.1. Les tensioactifs anioniques

Les tensioactifs anioniques (Schéma1) sont actuellement les tensioactifs les plus utilisés notamment dans le domaine de la détergence. En solution aqueuse, ils se dissocient pour donner des ions amphiphiles chargés négativement. A titre d'exemples, nous citerons les sulfates d'alkyles tels que le dodécylsulfate de sodium (Ross et al., 1953) et les sulfonates d'alkylbenzène tel que le dodécylbenzènesulfonate de sodium (Koltalo Portet et al., 2003).

**Schéma1** : Tensioactifs anioniques.

2.2. Les tensioactifs cationiques

En solution aqueuse, les tensioactifs cationiques (Schéma 2) se dissocient pour donner des ions amphiphiles chargés positivement comme les ammoniums quaternaires, par exemple le bromure de cétyltriméthylammonium CTAB utilisé dans le domaine de la détergence (One et al., 2005).

**Schéma 2** : Tensioactif cationique

2.3. Les tensioactifs zwitterioniques

Les tensioactifs amphotères (Schéma 3) possèdent au moins deux groupements de polarités opposées. Ils sont par conséquent électriquement neutres et peuvent être employés dans la formulation d'encre pour les stylos jetables (Fu et al., 2002 ; Chem, 2004). Cependant, selon le pH du milieu, certains composés peuvent devenir anioniques ou cationiques. De nombreuses substances naturelles comme les bétaines (One et al., 2005) entrent dans cette classe de tensioactifs.

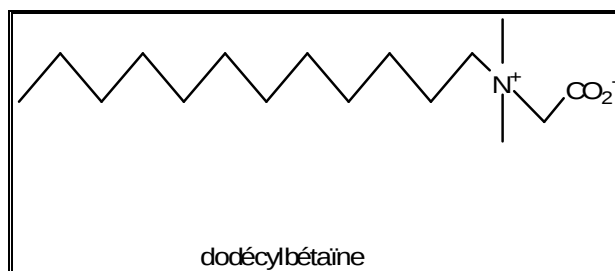


Schéma 3 : Tensioactif amphotère.

2.4. Les tensioactifs non ioniques

Les tensioactifs non ioniques (Schéma 4) ne se dissocient pas en solution aqueuse. Leur hydrophilie provient alors de la présence dans leur structure moléculaire de groupements polaires du type éther, alcool, carbonyle ou amine. Les polyoxyéthylènes tels que le Brij ® 35 ou les polyglucosides d'alkyle « APG » (Damez 2006), utilisés en détergence ou en cosmétique en sont des exemples.

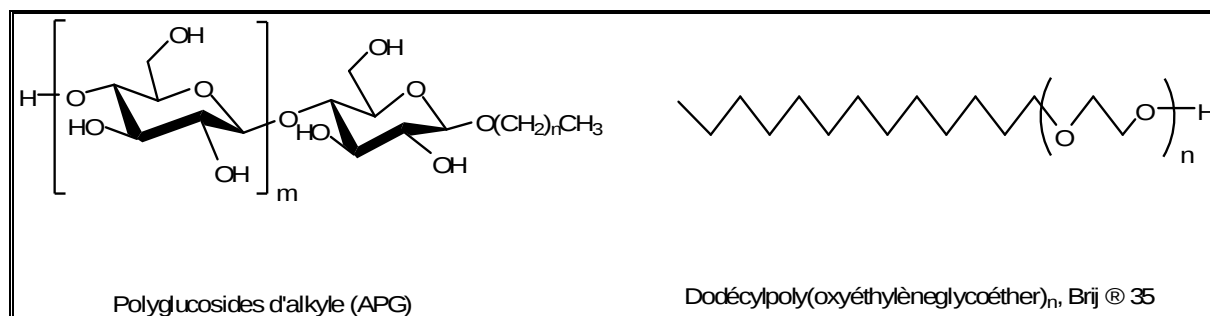


Schéma 4 : Tensioactifs non ioniques.

3. Domaine d'application des tensioactifs

3.1. Secteur de la détergence

Les tensioactifs entrent dans la formulation de tous les détergents et représentent en moyenne 20% de leur composition. Il convient de distinguer la détergence ménagère et la détergence industrielle.

3.2. Secteur de la cosmétique

On distingue deux grands domaines, la cosmétique rincée (produits d'hygiène lavants tels que les shampoings, gels douches, dentifrices) et la cosmétique blanche (produits de beauté tels que les crèmes, laits, maquillages et autres produits de soin).

3.3. Secteur industriel

Outre la détergence et la cosmétique, les domaines d'application des tensioactifs sont nombreux : les industries des additifs alimentaires, des céramiques, des matières plastiques, des peintures, du cuir, du papier, du pétrole, du phytosanitaire et engrais, également la métallurgie et le textile (Neto 2007).

4. Les esters de sucre

Compte tenu de quasi innocuité des composés non ioniques et de la demande croissante en produits respectueux de l'environnement, les surfactants glucidiques constituent une voie émergente dans l'industrie des tensioactifs.

Les sucres constituent sans aucun doute une matière première polaire de choix pour l'élaboration de biotensioactifs. Leur point commun est de posséder un nombre important de fonctions hydroxyles participant à la formation de réseaux de liaisons hydrogène en présence d'eau. Selon leur famille (hexose ou pentose) et/ou leurs poids moléculaires (mono-, di-, tri-, oligo- ou polysaccharides), ils permettront de moduler aisément la HLB de l'agent de surface ainsi que sa géométrie générale.

Les esters de sucre ou sucroester, sont dans ce contexte les molécules appropriées. Les esters gras de sucre sont des tensioactifs intéressants en raison de leur grande biodégradabilité, leur faible toxicité et leur grande tolérance vis-à-vis des yeux et de la peau (Baker et al., 2000).

Nous allons, dans un premier temps, résumer les travaux de la littérature puis nous détaillerons nos résultats dans le troisième chapitre.

La réaction de mono-estérification des sucres peut se faire soit par voie enzymatique régiosélective, (Riva et al., 1998) en utilisant des lipases, (Adelhorst et al., 1990) des protéases (Riva et al., 1998) ou des protéinases, (Potier et al., 2001) soit par voie chimique selon différentes méthodes : estérification en présence d'un chlorure d'acide, (Castro et al. 1997 ; Thévenet et al., 1999) réaction de type Koenigs-Knorr (Wulff et al., 1970) ou de

condensation (transestérification), (Mizutani et al., 1985 ; Keglevic et al., 1974) utilisation d'esters activés). (Söderberg et al. 1995 ; Pfeffer et al., 1976 ; Pfander et al., 1982 ; Plusquellec et al., 1986).

4.1. Synthèse par voie chimique

La synthèse chimique des esters de sucre fut pour la première fois réalisée par Herzfeld dans les années 50 (Fregapane et al., 1994). Ces principaux avantages résident dans que cette méthode est économique, rapide avec un bon rendement (<24h) et réalisable avec de nombreuse molécules.

Nous allons citer quelques exemples de synthèses chimiques tirés de la littérature.

Damez C. a réalisé l'estérification du (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose (Schéma 5) avec du chlorure d'un décénoyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane pendant 20h pour donner un mélange α/β (30/70) d'un déc-10'-énoyl (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranoside avec un rendement de 88% (Damez 2006).

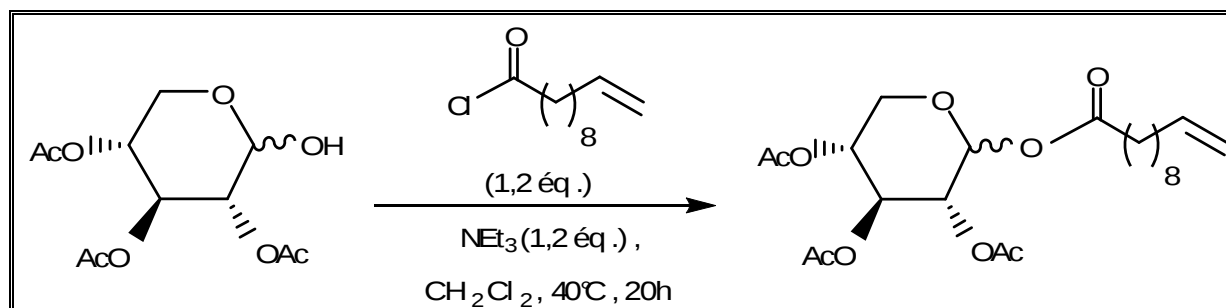


Schéma 5 : Estérification chimique du (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose.

Un autre exemple donné par le schéma 6, est celui de la transestérification chimique du saccharose (Juliette et al., 2007).

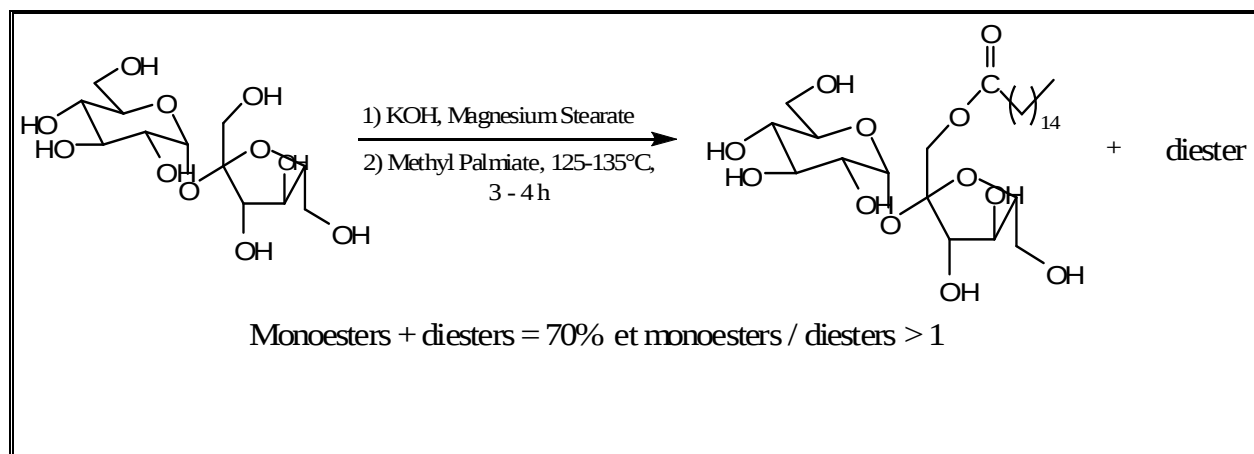


Schéma 6 : Transésterification chimique du saccharose.

Mais cette voie rencontre plusieurs problèmes :

- Obtention de sous-produits (provoquant une coloration)
- La toxicité des solvants utilisés
- La caramélisation qui est due à l'élévation de la température
- La faible sélectivité : Ce type de synthèse ne permet de contrôler ni le site de réaction, ni le nombre de groupements hydroxyles qui seront estérifiés (Plou et al., 1995 ; Sin et al., 1998 ; Spiliotis et al., 2000).

4.2. Synthèse par voie enzymatique

Ces dernières années, une alternative a été évoquée par de nombreux groupes de recherche l'utilisation d'enzymes afin d'orienter les réactions de synthèse (Ferrer et al., 1999). L'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions de synthèse permet de cibler le site de réaction et aussi d'opérer dans des conditions plus douces, limitant ainsi les réactions secondaires comme la caramélisation. Les seuls contaminants présents suite à la synthèse enzymatique sont le sucre et l'acide gras résiduels (Cao et al., 1998).

Le principe de la synthèse enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase) dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, l'activité de la lipase est inversée, passant de l'hydrolyse à l'estérification (Ferrer et al., 1999). La biocatalyse permet d'envisager la production sélective de structures complexes et originales.

De nombreux essais de synthèse d'esters de sucres par voie enzymatique ont été réalisés à l'échelle du laboratoire, citons quelques exemples :

Le schéma 7 illustre l'acylation enzymatique du D-glucose avec le vinyle caprylate catalysée par la lipase du *Candida antarctica* B (CAL B) dans l'acétone, avec un rendement de 67% (Ghanwa et al., 2005).

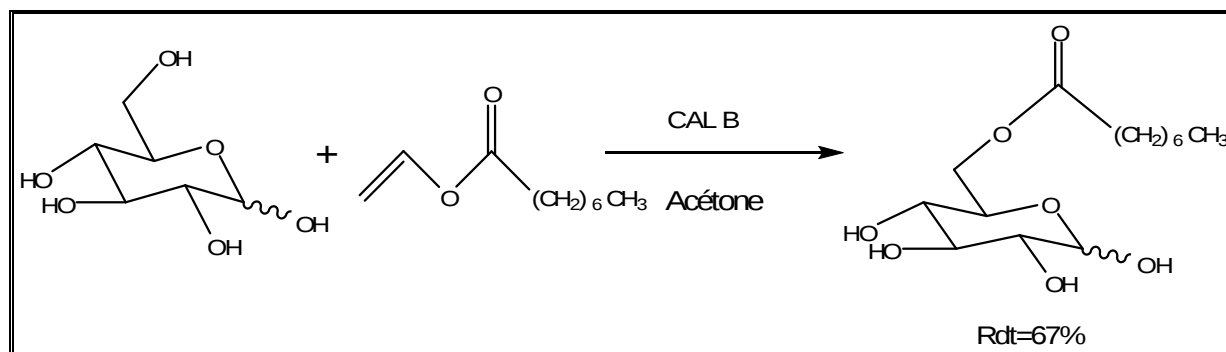


Schéma 7 : Transfésterification enzymatique du lactose.

Razafindralambo et coll. ont réalisé l'estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique en présence de la CAL B (Razafindralambo et al., 2009) comme nous le montre le schéma suivant :

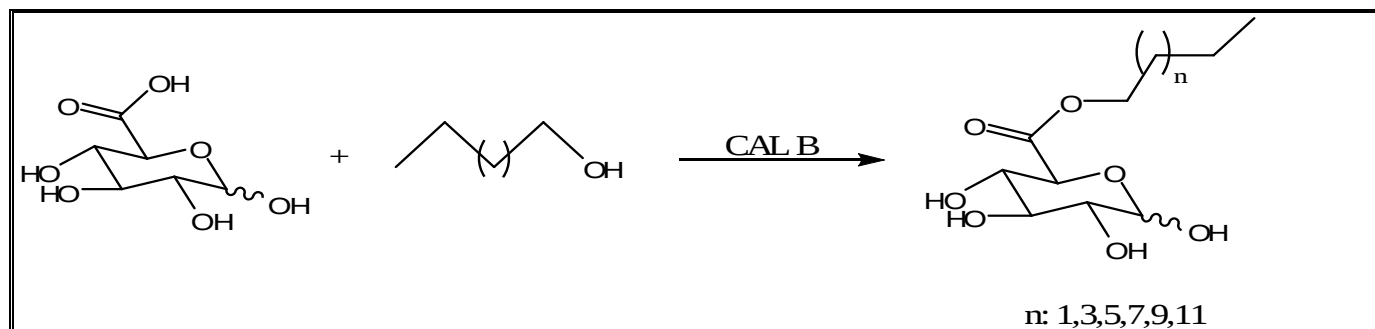


Schéma 8 : Estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique.

La voie enzymatique se distingue par plusieurs avantages qui sont la sélectivité, les conditions de réaction douces, la purification aisée, la composition du produit définie etc. L'avenir de la synthèse par voie enzymatique semble assuré, mais cela n'empêche pas qu'elle présente des inconvénients (Plou et al., 1995 ; Sin et al., 1998 ; Spiliotis et al., 2000) qui sont :

- Synthèse coûteuse au niveau industriel ;
- Problèmes de solubilité des substrats ;
- Rendements forts variables ;
- Temps de réaction longs (>24h).

5. Influence du milieu réactionnel sur la synthèse enzymatique des esters de sucre

Dans le domaine des bioconversions et particulièrement celui de l'acylation de biomolécules, une diversité des milieux réactionnels émerge et présente des potentialités intéressantes telles que la solubilisation de composés polaires et l'amélioration de la sélectivité et de l'efficacité enzymatique.

5.1. L'influence de l'eau

L'eau est le principal paramètre à maîtriser et à contrôler pour la mise en œuvre de la réaction d'acylation enzymatique catalysée par des hydrolases de type lipases. Les effets possibles de l'eau sur l'activité catalytique des enzymes en particulier des lipases en milieu organique s'exercent selon plusieurs mécanismes et sont généralement dus à un manque d'eau ou à un excès d'eau. La quantité d'eau disponible et donc susceptible d'intervenir dans la réaction, est donnée par une mesure d'activité de l'eau (A_w) (Husson, 2008).

Chamouleau et coll. ont réalisé une étude, qui relie la quantité de l'eau et la concentration du fructose monopalmitate (Chamouleau et al., 2001) formée dans la réaction (schéma 9).

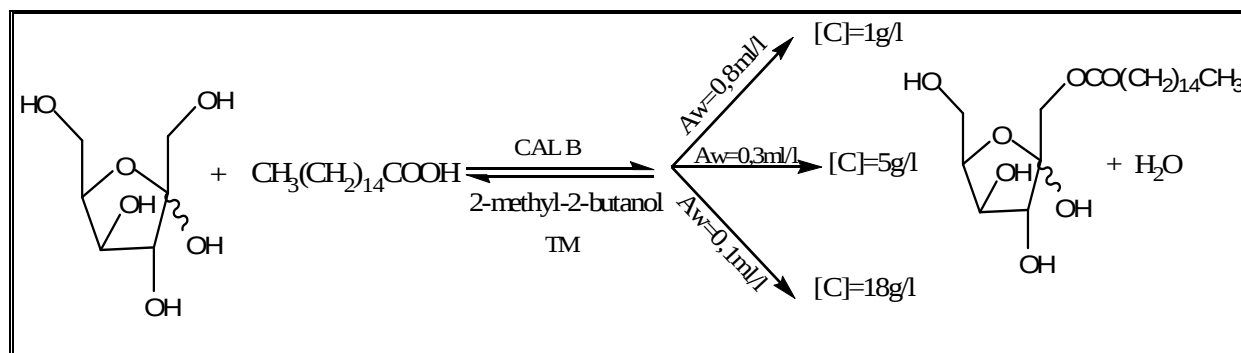


Schéma 9 : Influence de l'activité de l'eau.

5.2. L'influence du solvant organique

Les solvants organiques, en fonction de leur nature (polarité, pouvoir dissociant, volatilité) sont considérés comme de bons milieux réactionnels pour les réactions enzymatiques à conditions qu'ils soient anhydre et qu'ils permettent une bonne solubilisation des substrats et n'affectent pas l'activité enzymatique (Klibanov, 2001).

Le schéma ci-dessous montre l'influence de la nature du solvant (Yon-mei et al., 2005).

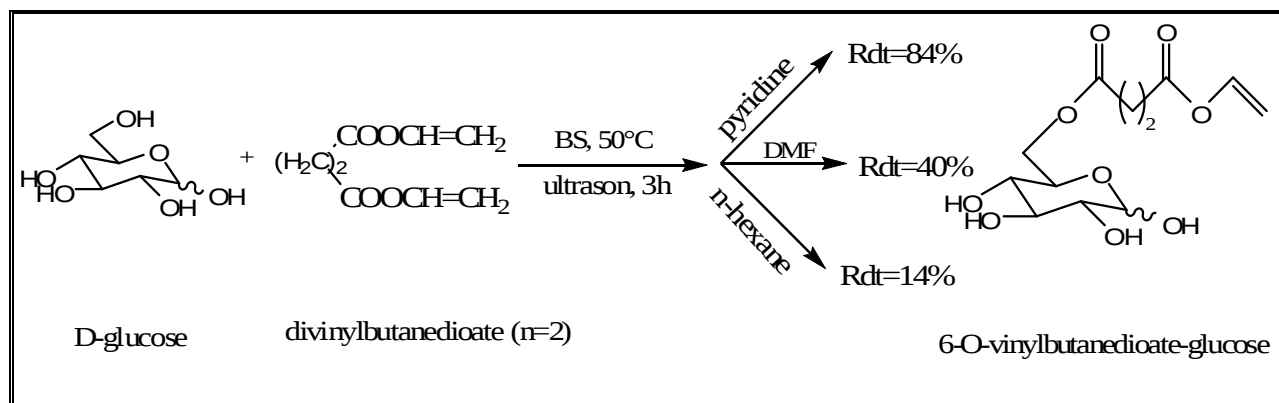


Schéma 10 : Influence de la nature du solvant organique.

5.3. L'influence de la longueur de la chaîne de l'agent acylant

L'avancement de la réaction de synthèse enzymatique des esters de sucre est influencé par la nature des agents acylants et la longueur de leurs chaînes. Ceci est illustré dans le schéma 11 (Yon-mei et al., 2005).

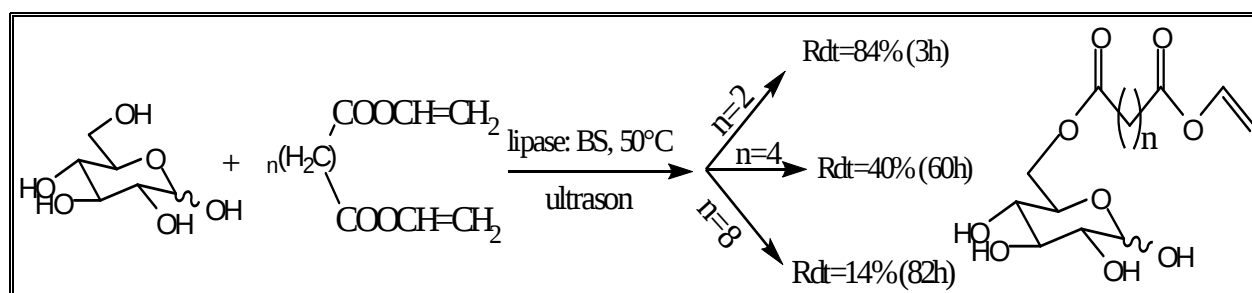


Schéma 11 : Influence de la longueur de la chaîne de l'agent acylant.

5.4. L'influence de la nature de la lipase

La nature de la lipase influe sur le rendement de synthèse enzymatique des esters de sucre comme nous montre le schéma 12 (Ghanwa et al., 2005).

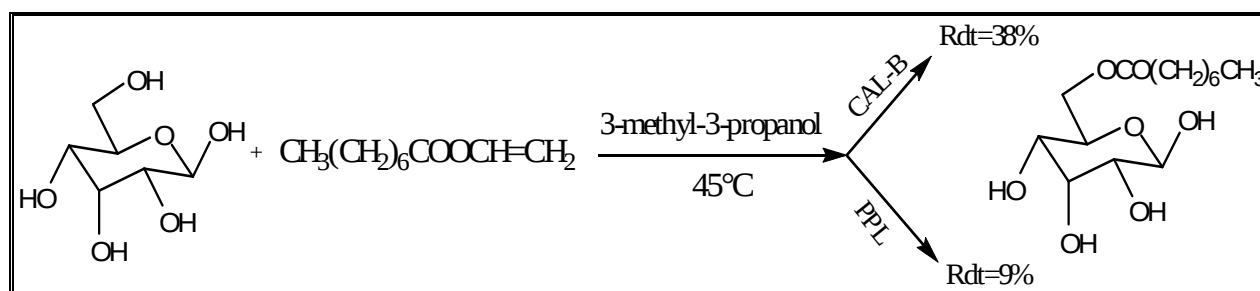


Schéma 12 : Influence de la nature de la lipase.

5.5. L'influence de la température

La température influe sur la vitesse de la réaction soit par activation ou désactivation de l'enzyme (Dixon et al., 1979). Sinthuwat et coll. ont fait une étude sur l'influence de la température sur la vitesse initiale d'une réaction de transestérification du saccharose par le vinyle stéarate en présence d'une protéase *alcaline lipophilisée* AL-89 (Sinthuwat et al., 2009). Ceci est illustré sur le schéma 13.

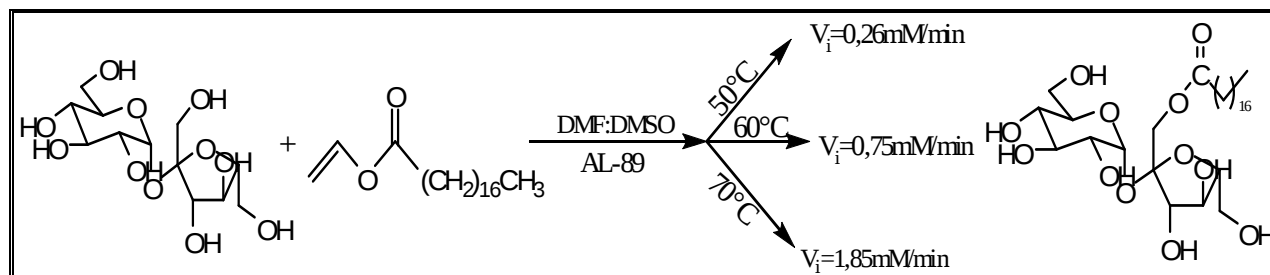


Schéma 13 : Influence de la température.

5.6. L'influence du rapport molaire entre les substrats

le schéma 14 montre aussi l'influence du rapport molaire entre les substrats (Sinthuwat et al., 2009).

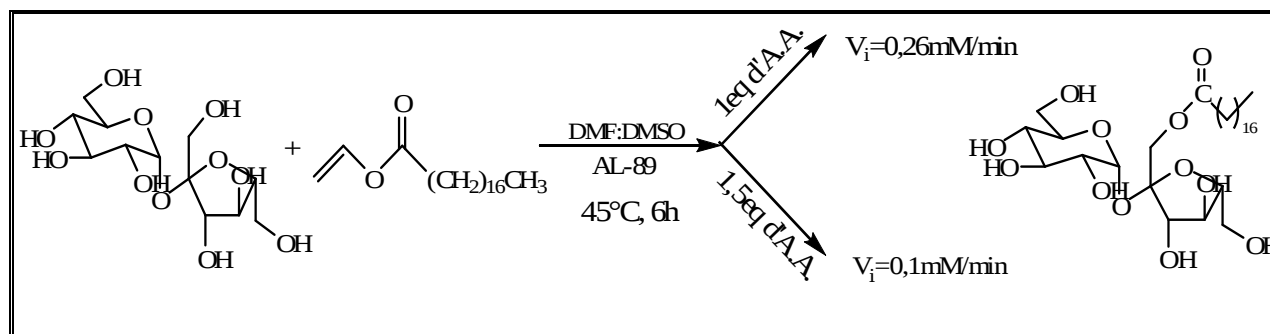


Schéma 14 : Influence du rapport molaire entre les substrats.

6. Application potentielles des esters de sucre

Bon nombre des propriétés fonctionnelles des sucroesters et des sucroglycérides résultent de la réunion dans une même molécule d'un composé ayant une forte affinité pour l'eau (et donc une affinité faible pour les lipides) comme c'est le cas pour les sucres, et de composés se comportant de manière exactement inverse tels que les acides gras.

Le ratio [partie glucidique hydrophile / partie lipidique lipophile] influence fortement les propriétés tensioactives de ces composés et pour pouvoir les caractériser et les comparer, on se base sur une grandeur semi-empirique, utilisée par ailleurs pour d'autres molécules présentant la même particularité ; il s'agit de la HLB ou Hydrophilic Lipophilic Balance. C'est une grandeur sans dimension, comprise entre 1 et 20. Une valeur comprise entre 1 et 10 indique une tendance lipophile et une valeur comprise entre 11 et 20 indique une tendance hydrophile (Puisieux et al., 1983 ; Yan et al., 2001; Piccicuto et al., 2001).

Ce paramètre peut être déterminé expérimentalement (sur la base de données chromatographique) ou par calcul (sur la base de la formule développée de la molécule).

La formule de calcul du HLB est :

$$HLB = 20 \frac{M_h}{M_r}$$

Où :

M_h : La masse moléculaire de la fraction hydrophobe

M_r : La masse moléculaire totale de la molécule d'ester de sucre

Ainsi, de par de leur double affinité, ces dérivés offrent comme principal intérêt celui de pouvoir se positionner au niveau de l'interface séparant deux substances non miscibles. La valeur de la HLB donne le plus souvent une indication quant aux utilisations possibles, comme nous le montre le tableau suivant :

HLB	Propriétés
1,5-3	Anti moussant
3-6	Emulsifiant eau dans huile
7-9	Moussant
8-13	Emulsifiant huile dans eau
13-15	Détergent
15-20	Solubilisant

Tableau 1 : Relation entre HLB et propriétés fonctionnelles des esters de sucre.

Les applications potentielles des esters de sucres sont nombreuses et touchent tant le secteur agroalimentaire que les domaines cosmétiques ou pharmaceutiques. Actuellement, les esters de sucres sont principalement employés en tant qu'agents émulsifiants ou dans la formulation de microémulsions (Garti et al., 2000a, 2000b).

7. Conclusion

Les esters de sucres présentent des atouts majeurs qui en feront sans doute une famille de tensioactifs très prisée dans un futur proche. Tout d'abord, ils sont rapidement biodégradables et ne présentent ni toxicité, ni caractère irritant. Mais leur avantage principal est sans doute la diversité de leur structure.

La pleine exploitation des potentialités des esters de sucres est bloquée par les inconvénients inhérents à la voie chimique. Le nombre impressionnant d'articles relatant les synthèses enzymatiques menées à l'échelle du laboratoire ainsi que les projets de production à l'échelle pilote lancés par quelques entreprises permettent d'entrevoir le passage à une production industrielle des esters de sucres par cette voie biotechnologique. Ceci pourrait élargir considérablement leur horizon d'utilisation.

Les coûts de production de molécules comme les esters de sucres par une voie enzymatique restent élevés et limitent les applications envisageables à des domaines où la valeur ajoutée de la formulation est élevée comme dans les domaines des cosmétiques et particulièrement des produits pharmaceutiques.

1. Introduction

Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseurs dans les réactions chimiques du métabolisme, avec une efficacité et une spécificité remarquables. Elles sont synthétisées par les cellules biologiques et dans tous les organismes (Belitz et al., 2009).

La première enzyme fut découverte par « Anselme Payen et Jean-François Persoz » en 1833. Après avoir traité un extrait aqueux de malt à l'éthanol, ils ont précipité une substance sensible à la chaleur. Cette substance était capable d'hydrolyser l'amidon : ils l'ont nommée diastase (diastasis = séparation) car elle sépare le sucre soluble de l'amidon.

2. Composition des enzymes

La majorité des enzymes connus sont de nature protéique, c'est-à-dire résultats de la condensation d'acides α -aminés de la série L, avec formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyle d'un acide aminé et le groupe amine d'un autre acide aminé et ainsi de suite, de proche en proche, pour constituer une protéine (polypeptide de masse moléculaire élevée).

Certains enzymes sont des holoprotéines constituées uniquement d'un enchainement d'aminoacides ; d'autres sont des hétéroprotéines possédant deux parties, une partie protéique « l'apoenzyme » et une partie non protéique « le cofacteur », appelées « holoenzymes ». Dans ce cas sans le coenzyme la catalyse ne peut avoir lieu. Les cofacteurs sont des corps chimiques indispensables à l'activité des enzymes. Ils peuvent être des ions métalliques ou des petites molécules présentes dans les milieux biologiques. Pour les cofacteurs qui sont plus complexes, ils sont synthétisés par des cellules appelées coenzymes (Lehninger et al., 1994).

3. Efficacité catalytique des enzymes

- pouvoir catalytique : L'utilisation d'une enzyme permet de diminuer l'énergie d'activation E_a (figure 2) et d'augmenter les vitesses réactionnelles comme on peut les utiliser même à des faibles concentrations (10^{-8} à 10^{-6}).
- spécificité : Pour chaque enzyme, on peut définir une réaction chimique et le plus souvent un substrat caractéristique.
- Sensibilité : Les enzymes sont sensibles à la géométrie des molécules car, ils peuvent discriminer des stéréoisomères.

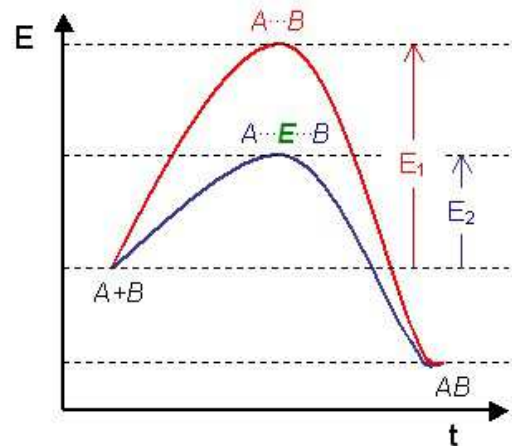


Figure 2 : L'influence des enzymes sur l'énergie d'activation

4. Structure des enzymes

Les caractéristiques spatiales des protéines sont la clé de leurs fonctions. La structure des enzymes est définie à plusieurs niveaux :

4.1. Structure primaire

C'est l'ordre d'enchaînement des acides aminés de série L, liés entre eux par une liaison peptidique. Ce premier niveau de structure est responsable au moins indirectement des niveaux supérieurs d'organisation et ainsi de toutes les propriétés des protéines, en particulier des propriétés catalytiques des enzymes.

4.2. Structure secondaire

Elle résulte de l'établissement de liaisons hydrogène entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (-CO) du squelette peptidique. Il existe trois principales catégories de structures secondaires selon le repliement des liaisons peptidiques : les hélices (de type alpha), les feuillets (de type bêta) et les coudes.

4.3. Structure tertiaire

La chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire peut se replier sur elle-même pour former une molécule de configuration spatiale bien déterminée. Les liaisons intramoléculaires (pont disulfure, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, liaisons hydrophobes) responsables de la stabilité de la structure tertiaire se forment à partir des chaînes latérales des acides aminés.

4.4. Structure quaternaire

Les protéines sont souvent constituées de plusieurs sous-unités qui correspondent chacune à une chaîne polypeptidique de structure tertiaire définie. L'association de ces sous-unités entre elles par le même type de liaisons que celles rencontrées au niveau de la structure tertiaire constitue la structure quaternaire de la protéine. C'est de cette association dont dépend l'activité de la protéine (Smith G., 1995).

5. Mécanisme d'action des enzymes

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure (secondaire et tertiaire) d'un site particulier appelé le **site actif**. Schématiquement, il a la forme d'une cavité dans lequel vont se fixer les substrats grâce à plusieurs liaisons chimiques faibles.

Il y a une douzaine d'acide aminés autour du site actif avec seulement 2 ou 3 qui sont directement impliqués, les autres ont un rôle purement structural.

De façon extrêmement simplifiée, voici le mécanisme d'action d'une enzyme. Dans la figure 2, on voit un substrat, c'est-à-dire la molécule qui va être modifiée, arrivé sur l'enzyme. Une fois arrivée à proximité il se produit les phénomènes suivants (Andrés I., 2008) :

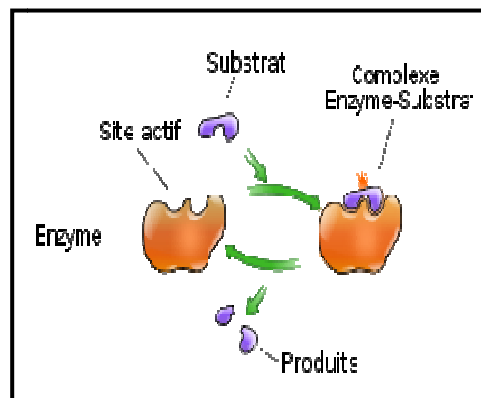


Figure 3 : Mode d'action des enzymes

- le substrat se positionne dans la cavité
- l'enzyme le fixe
- la réaction se produit
- le substrat transformé est relâchée.

6. Classification des enzymes

6.1. Nomenclature systématique

Les enzymes sont généralement nommées en additionnant le suffixe *ase* au nom de leur substrat ou produit (exemple, l'uréase pour l'urée). Mais, le nom de l'enzyme peut être aussi lié à une propriété de cette enzyme (exemple, l'invertase hydrolyse le saccharose). Pour clarifier tout cela, elles sont classifiées par un système numérique standard. Leur numéro est attribué par l'« Enzyme Commission » en code de 4 chiffres précédé de EC « EC W.X.Y.Z. »

1^{er} chiffre (W) : type de réaction.

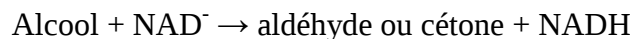
2^{ème} chiffre (X) : (sous classe) type de groupement chimique ou de liaison concernée.

3^{ème} chiffre (Y) : (s/sous classe) nature précise de groupes et les mécanismes réactionnels mis en jeu.

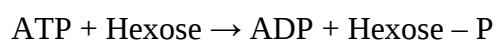
4^{ème} chiffre (Z) : numéro de série de l'enzyme à l'intérieur de la s/sous classe.

Les classes d'enzymes ainsi constituées sont au nombre de six :

1 – Oxydoréductases : Enzymes qui catalysent les réactions d'oxydo-réduction. Exemple : alcool déshydrogénase (E.C.1.1.1.1).

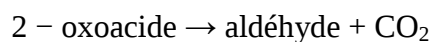


2 – Transférases : Enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe spécifique d'une molécule à une autre. Exemple : hexokinase (E.C.2.7.1.1)



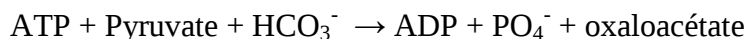
3 – Hydrolases : Enzymes qui catalysent la coupure hydrolytique des liaisons C—O, C—N et C—C. Exemple : l' α -amylase(E.C.3.2.1.1) hydrolyse des liaisons 1,4— α -D - glucosidiques dans des polysaccharides contenant 3 ou plus D-glucose.

4 – Lyases : Enzymes qui coupent les liaisons C—C, C—O et C—N par élimination, en formant des doubles liaisons ou des cycles. Exemple : pyruvate décarboxylase (E.C.4.1.1.1)



5 – Isomérases : Enzymes qui catalysent des changements géométriques ou structuraux dans une molécule. Exemple : la glucose-isomérase (E.C.5.3.1.5) catalyse l'isomérisation du glucose en fructose.

6 – Ligases : Enzymes qui catalysent la liaison entre deux molécules, couplée à l'hydrolyse d'une liaison phosphate de l'ATP (ou un autre triphosphate). Exemple : pyruvate carboxylase (E.C.6.4.1.1) (Henrissat B., 1991).



6.2. Classification CAZy (Carbohydrate Active enZyme)

Cette classification repose sur une étude de la séquence d'acides aminés d'une enzyme, elle permet, notamment, de révéler les relations au cours de l'évolution entre les enzymes d'une même famille, ainsi que de prédire des données concernant leur mécanisme catalytique. La classification CAZy est divisée en cinq parties :

1 – Glycoside Hydrolases (GH) : Les Glycoside-Hydrolases (EC 3.2.1.-) constituent un vaste groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de liaisons osidiques associant un ose à un autre ose ou à une molécule non osidique.

2 – Glycosyl Transférases (GT) : La biosynthèse des liaisons glycosidiques implique des enzymes (EC 2.4.-.-) capables de catalyser le transfert spécifique d'un ose d'un intermédiaire activé (donneur) sur une autre molécule (accepteur).

3 – Polysaccharide Lyases (PL) : La rupture des liaisons osidiques par un mécanisme de β -élimination est catalysée par les Polysaccharide Lyases (EC 4.2.2.-).

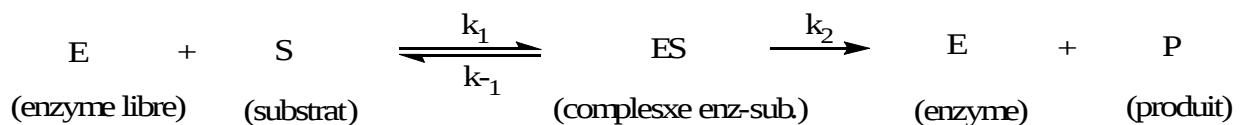
4 – Carbohydrate estérases (CE) : Ces estérases catalysent la O- ou la N-désacétylation des glucides. Deux groupes de substrats sont distingués, suivant que la partie acyle ou la partie alcool de l'ester provient du glucide.

5 – Carbohydrate-binding modules (CBM) : Les « modules de liaison au glucide » sont des éléments de la structure d'enzymes capables de se lier spécifiquement à un glucide, sans présenter d'activité catalytique propre (Coutinho et al., 1999, Rajan et al., 2004).

7. Cinétique enzymatique (équation de Michaelis-Menten)

Comme dans tout procédé catalytique il est important, avant d'utiliser un enzyme dans une synthèse ou une analyse, d'en connaître le comportement cinétique.

De façon simplifiée, nous allons admettre pour une réaction enzymatique le schéma réactionnel suivant :



La réaction est considérée au début, c'est-à-dire quand peu de produit P s'est accumulé, de façon à ce que la réaction en retour soit négligeable. De plus, on admet que l'on atteint l'**état stationnaire**.

Soient [E], [S], [ES], et [P] les concentrations des différentes espèces au temps t. Si l'on admet que la concentration en enzyme est beaucoup plus petite que celle du substrat et que le taux d'avancement de la réaction est faible de façon à pouvoir négliger la variation de la concentration en substrat, la vitesse de la réaction est :

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]$$

L'état stationnaire implique que la concentration de ES reste constante pendant la mesure de la vitesse. Donc :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_2 [ES] - k_{-1} [ES] = 0$$

$$[E] = \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \frac{[ES]}{[S]}$$

Or la quantité totale d'enzyme $[E]_0$ ne varie pas. Donc :

$$[E]_0 = [E] + [ES] = [ES] \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \frac{1}{[S]}$$

Et la vitesse devient :

$$V = \frac{k_2 [E]_0}{1 + \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \frac{1}{[S]}}$$

Ainsi l'étude de la vitesse en fonction de $[E]_0$ et de $[S]$ permet de déterminer k_2 et $(k_{-1} + k_2) / k_1$, mais pas k_1 et k_{-1} . Le coefficient $(k_{-1} + k_2) / k_1$ est appelé constante de Michaelis (k_m) et l'expression de la vitesse devient :

$$V = \frac{k_2 [E]_0}{1 + \frac{k_m}{[S]}} \quad (\text{Equation de Michaelis-Menten})$$

Si la formation et la dissociation du complexe ES sont rapides par rapport à la transformation écrite par k_2 , la constante de Michaelis est voisine de la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat ES : $k_s = k_{-1} / k_1$. L'étude de l'influence de la concentration du substrat sur la vitesse montre qu'à concentration élevée de S par rapport à k_m , la vitesse est constante. En effet, si $[S]$ est très grand par rapport à k_m , la vitesse devient : $V = k_2 [E]_0 = V_{\max}$

La moitié de cette vitesse maximale est atteinte quand $[S]$ est égal à k_m . L'équation de Michaelis devient (Penasse L., 1974 ; Ricard J. 1973 ; Cornish-Bowden A., 1976) :

$$V = \frac{V_m}{1 + \frac{k_m}{[S]}}$$

8. Immobilisation des enzymes

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation de produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques. Une alternative consiste à immobiliser l'enzyme sur une matrice appropriée. Du point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée, des changements dans l'activité enzymatique, le pH optimum et l'affinité pour le substrat ont été observés (Balcão et al., 1996 ; Ivanov et al., 1997 ; Ramachandra et al., 2002).

Les méthodes d'immobilisation d'enzymes peuvent être regroupées en cinq grandes catégories :

8.1. Immobilisation par adsorption

L'immobilisation par adsorption repose sur l'établissement d'interactions de type liaisons de faible niveau énergétique (Van der Waals, ionique, hydrogène, transfert de charges, échange de ligands, hydrophobe, pont métallique...) entre les groupes fonctionnels situés à la surface de la molécule d'enzyme et ceux présents à la surface du support insoluble. Les paramètres qui conditionnent l'efficacité de l'adsorption sont : la concentration d'enzyme, l'aire spécifique disponible par unité de masse de support, le temps de contact, le milieu, le support.

8.2. Immobilisation par microencapsulation

L'enzyme en solution aqueuse est enfermée dans des microencapsules sphériques. Dont la paroi est une membrane semi-perméable qui peut être liquide ou solide. Cette membrane retient l'enzyme, mais laisse passer le substrat et le produit.

8.3. Immobilisation par inclusion

La molécule d'enzyme est retenue physiquement soit à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère, soit à l'intérieur du volume défini par une

membrane ou une microcapsule. Cette rétention peut éventuellement être accompagnée d'une réticulation covalente par un réactif polyfonctionnel.

8.4. Immobilisation par réticulation

Le principe est ici de ponter les molécules d'enzymes entre elles, ou entre elles et d'autres protéines, à l'aide d'un réactif polyfonctionnel tel que le glutaraldéhyde, afin d'obtenir des macrostructures insolubles.

8.5. Immobilisation par des liaisons covalente

Lorsque l'on désire éviter tout risque de libération des molécules d'enzymes dans le milieu, la solution de choix est l'établissement de liaisons covalentes. Il faut pour cela impliquer les groupes fonctionnels présents à la surface de la molécule d'enzyme, dont la réactivité chimique est très limitée.

Aucune méthode d'immobilisation n'est générale. Il faut prendre en compte à la fois la nature et la pureté de la préparation d'enzyme mise en œuvre, le type de réaction (substrat, produit, milieu réactionnel, pH, température), les contraintes économiques spécifiques, pour choisir la méthode adéquate (Amorim et al., 2003 ; Bagi et al., 1997).

9. Dénaturation des enzymes

La structure tertiaire ou quaternaire des enzymes, dépend des forces responsables des liens reliant entre eux les radicaux des acides aminés constituant sa structure primaire. Dans certaines conditions, ces liens peuvent se défaire. L'enzyme peut alors changer de forme. Comme nous le verrons plus loin, la fonction biologique d'une protéine est intimement liée à sa forme. La protéine modifiée ne peut donc généralement plus assurer sa fonction. Elle est alors dite dénaturée. Les trois principaux facteurs pouvant provoqué la dénaturation d'une protéine (Dixon et al., 1979) sont:

- La chaleur : L'agitation thermique a pour effet de briser les faibles liaisons hydrogène reliant les radicaux de la chaîne.
- Un pH extrême : La plupart des protéines se dénaturent en milieu trop acide ou trop alcalin.
- Un milieu très concentré en électrolytes (**ions**).

10. Domaines d'applications des enzymes

Les principaux domaines d'utilisation sont l'industrie des détergents, de l'amidon (liquéfaction, puis son hydrolyse en monomères de D-glucose), l'agroalimentaire (alimentation humaine et animale), la chimie fine et le secteur de la santé, ainsi que les domaines de l'analyse (elles sont très souvent utilisées pour déterminer la concentration de leur substrat par des mesures de vitesse initiale de réaction) et des capteurs (Aehle W. 2004).

11. Les lipases

Les lipases ou les triacylglycéroacyl-hydrolases (EC 3.1.1.3), sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. Elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycérol. En milieu solvant, elles peuvent catalyser un bon nombre de réactions allant de l'estérification à l'acidolyse ou l'alcoolyse tout en présentant une certaine énantio-régio- et chimio-sélectivité. Ce sont des enzymes d'accès facile et ne nécessitent pas de cofacteur pour leur fonctionnement, ce qui facilite leur utilisation par les chimistes.

11.1. Origines des lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez des nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires.

11.2. Structure et mécanisme réactionnel des lipases

11.2.1. Mécanisme réactionnel des lipases

La réaction de catalyse nécessite une molécule d'eau et se déroule à l'interface eau / substrat insoluble. Cette particularité catalytique a été démontrée en représentant les vitesses initiales d'hydrolyse en fonction de la concentration du substrat, dans le cas d'une lipase et une estérase :

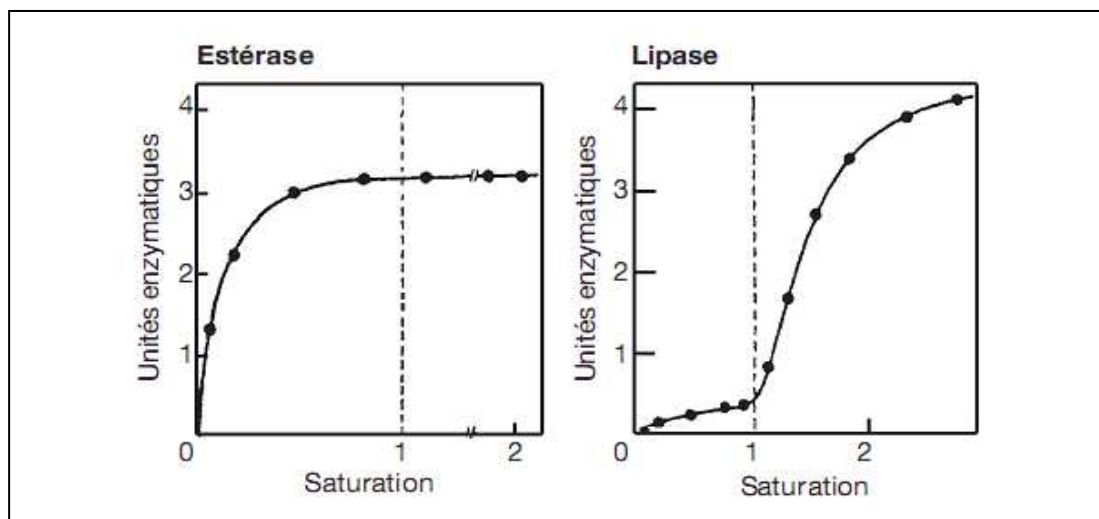


Schéma 15 : Hydrolyse de la triacétine par l'estérase du foie de cheval et la lipase pancréatique de porc. Dépendance de la vitesse d'hydrolyse à l'égard de la concentration en substrat exprimée en multiple de la saturation.

Le schéma ci-dessus montre que dans le cas de l'estérase, la vitesse augmente graduellement avec la concentration du substrat. Dans le cas de la lipase, en dessous d'une certaine concentration critique, les vitesses d'hydrolyse sont faibles. Au dessus de cette concentration, les molécules de substrat prennent la forme de micelles, d'une émulsion ou d'un film monomoléculaires aboutissant à la formation d'une interface eau/ lipide. La formation de cette interface a pour séquence une augmentation brutale de la vitesse d'hydrolyse, comme le montre le schéma ci-dessus (Patrick et al., 2008).

C'est de ces observations qu'a émergé la notion de phénomène d'**activation interfaciale** dans la plupart des lipases (Fojan et al., 2000).

11.2.2. Structure des lipases

La majorité des lipases sont caractérisés par la présence d'un couvercle, qui est en fait une hélice α constituée d'une quinzaine d'acides aminés et qui agit comme une porte. Lorsque celle-ci est fermée, l'enzyme est dans sa conformation inactive. Cette conformation ne permet donc pas au substrat d'être en contact avec la triade catalytique se trouvant à l'intérieur du site actif. Dans la forme ouverte ou active, l'hélice α et sa face hydrophobe se met en contact avec la phase lipide de l'interface eau/lipide, le site actif devenant accessible au substrat : c'est l'activation interfaciale des lipases.

Le site catalytique des lipases est constitué d'une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique (aspartique ou glutamique) (Derewenda et al., 1992; Dodson et al., 1992).

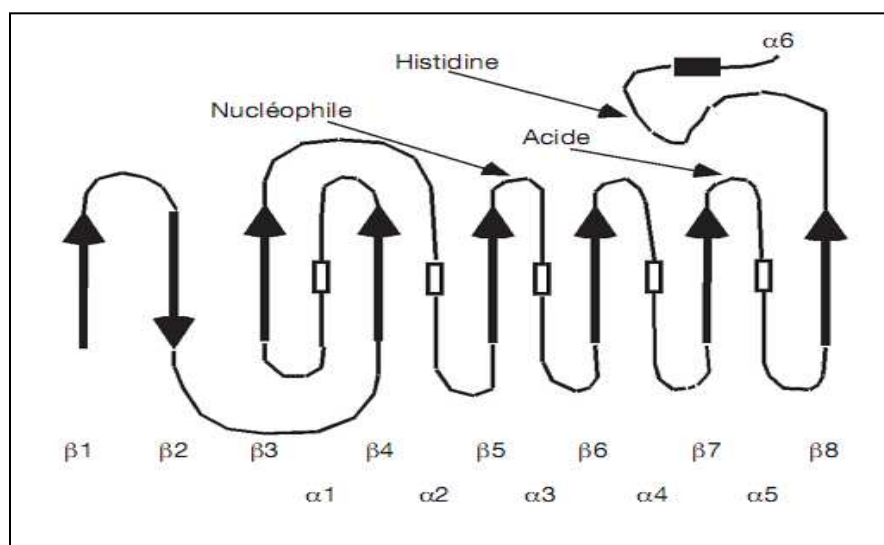


Schéma 16 : Schéma du repliement α/β . Les flèches représentent les feuillets β et les rectangles les hélices α . Le rectangle noir représente le volet amphiphile (Egloff et al., 1995).

Le schéma ci-dessus montre la disposition de ces trios acides aminés responsables de la réaction d'hydrolyse de substrat. Ces trois acides aminés constituent ce qu'on appelle la triade catalytique.

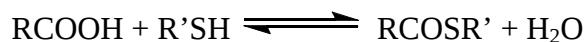
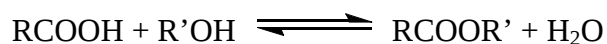
11.3. Application des lipases

11.3.1. Réaction d'hydrolyse

L'hydrolyse d'un ester par la lipase est effectuée par la triade catalytique en cinq grande étapes :

- Complexe de Michaelis non-covalent : la triade catalytique polarise la liaison OH de la sérine qui devient très acide et capable de protoner l'histidine ;
- Acylation : formation d'un intermédiaire stabilisé par des liaisons H ;
- Libération d'une molécule d'alcool et formation de l'acyl-enzyme ;
- Attaque nucléophile de l'acyl-enzymes par une molécule d'eau ;
- Libération du produit et régénération du site actif.

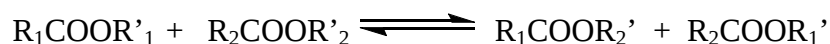
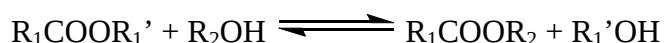
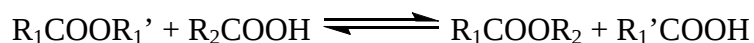
En dehors de l'hydrolyse, les autres réactions ont lieu en milieu organique où il a été montré que les lipases gardent leur activité.

11.3.2. Réaction de synthèse**11.3.2.1. Estérification et thioestérification**

Par conséquent, l'eau générée au cours de l'estérification enzymatique doit être éliminée afin de poursuivre la réaction (Chamouleau et al., 2001).

L'eau joue également dans la structure du biocatalyseur un rôle que l'on peut qualifier de "lubrifiant" qui confère à l'enzyme la flexibilité nécessaire à la catalyse (Blecker C., 1993).

Ainsi, une teneur en eau en-dessous d'un certain seuil (0,5 %) ne permet pas l'hydratation nécessaire de la lipase et entraîne une diminution du rendement de la réaction (Secundo et al., 2002).

11.3.2.2. Transestérification**11.3.2.2.1. Interestérification****11.3.2.2.2. Alcoolyse****11.3.2.2.3. Acidolyse :**

La transestérification implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolyse) ou avec le glycérol (glycérolyse).

Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras polyinsaturés, des substituts de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorique (Lancelot et al., 2002).

L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final.

12. Conclusion

Grâce à leur grande spécificité d'action, les enzymes constituent un outil de fabrication et d'analyse irremplaçable dans de nombreux secteurs de la recherche, et de la production industrielle.

L'obtention de nouvelles sources d'enzymes plus stable par l'introduction des techniques d'insolubilisation des biocatalyseurs, suscite un intérêt considérable en raison de nombreux avantages : amélioration des rendements, obtention des dérivés plus purs, diminution des besoins énergétiques etc...

1. Introduction

Les esters de sucre sont des molécules amphiphiles résultant de l'acylation des sucres par une modification structurale prometteuse pour valoriser aux mieux le potentiel thérapeutique, cosmétique ou encore agro-alimentaire de ces composés. Ils sont connus pour être des tensioactifs non-ioniques, présentant diverses applications. Leur synthèse par la voie enzymatique est actuellement très répandue. Il est généralement admis qu'une enzyme placée dans un milieu organique exprime de nouvelles propriétés telles que l'augmentation de la thermostabilité, la modification de la spécificité et surtout la capacité à catalyser des réactions impossibles cinétiquement et thermodynamiquement en milieux aqueux telles que l'acylation en solvants organiques catalysées par des hydrolases (Klibanov 2001).

2. La réaction d'acylation

La réaction d'acylation est définie comme l'établissement d'une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile telle qu'une amine ou un alcool. Il existe deux voies d'acylation possibles : la voie chimique et la voie enzymatique.

2.1. Acylation par voie chimique

L'acylation de biomolécules de type acides aminés, de sucre ou de peptides par voie chimique est aujourd'hui bien connue. La condensation entre un acide gras et un acide aminé par exemple, est généralement réalisée par la réaction de Schotten-Baumann en présence d'un chlorure d'acide gras ou d'un anhydride à pH basique (schéma 17).

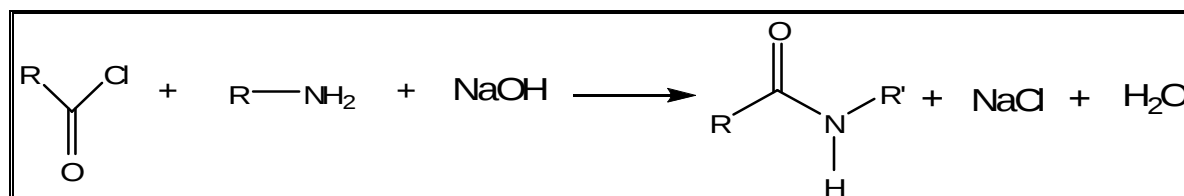


Schéma 17 : Schéma général de la réaction d'acylation par voie chimique

L'avantage de cette réaction est son rendement important, mais son manque de spécificité nécessite la mise en place de procédé de protection et de déprotection, ce qui entraîne inévitablement une baisse de rendement. Une alternative intéressante à cette voie chimique est

la voie enzymatique qui consiste à employer des biocatalyseurs le plus souvent dans des milieux organiques.

2.2. Acylation par voie enzymatique

Le principe de l'acylation enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase ou triacylglycérol ou acyl-hydrolase) dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, la réaction inverse de l'hydrolyse est favorisée et permet ainsi l'attachement covalent d'un groupe acyle sur une fonction nucléophile. Le schéma général de la synthèse consiste soit à catalyser la formation d'une liaison ester lorsque l'accepteur d'acyle comporte une fonction hydroxyle soit la formation d'une liaison amide lorsque celui-ci comporte une fonction amine (Husson 2008).

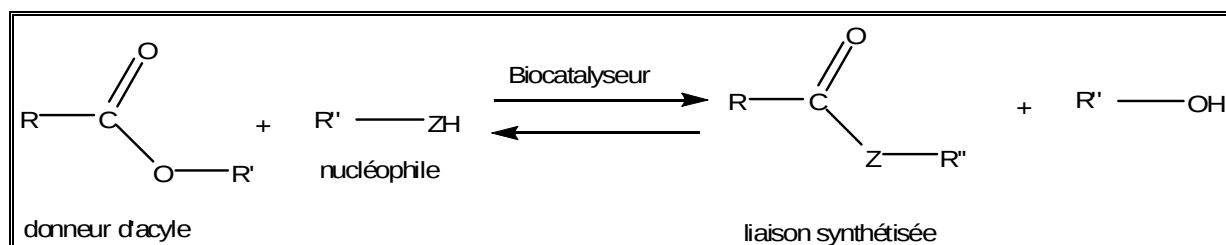


Schéma 18 : Schéma général de la réaction d'acylation par voie enzymatique.

3. Acylation enzymatique de l' α -(+)-D-glucose

L'acylation enzymatique de l' α -(+)-D-glucose peut se faire soit par une estérification (schéma 19) ou par une transestérification (schéma 20) sur la position la plus réactive (figure 4).

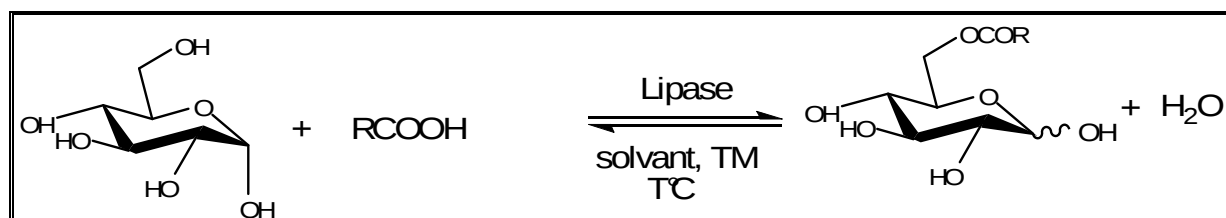


Schéma 19 : Estérification de l' α -(+)-D glucose.

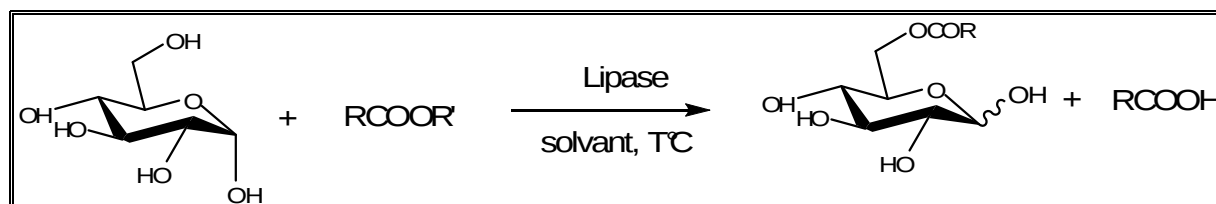
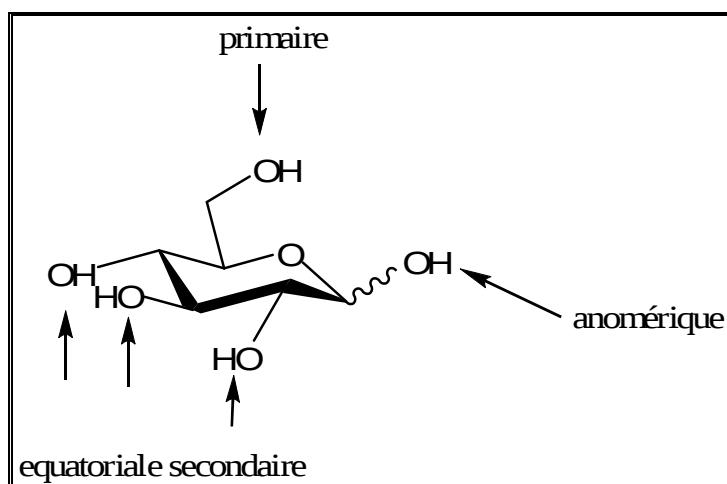


Schéma 20 : Transestérification de l' α -(+)-D glucose.

Le glucose comme tous les sucres, comporte plusieurs groupements hydroxyles, qui n'ont pas tous la même réactivité : l'hydroxyle primaire est le plus réactif, suivi par l'alcool anomérique et les alcools secondaires qui sont les moins réactifs comme le montre la figure ci-dessous.



Primaire

Anomérique

Secondaire équatoriale

Activité décroissante (-)

Figure 4 : Réactivité des groupements hydroxyles du D-glucose.

La modification sélective à l'aide des enzymes permet de s'affranchir de la méthodologie classique de protection et de déprotection alternées des hydroxyles et constitue, de ce fait, un thème majeur de la chimie organique naturelle.

Ces modèles ont fait l'objet de nombreux travaux. Nous avons recensés quelques exemples de synthèse d'ester de glucose à partir de la littérature, ainsi que leur importance et application potentielle.

Le métronidazole est un antibiotique et un antiparasitaire appartenant à la famille des nitroimidazoles. Il est utilisé pour le traitement des infections liées à des bactéries anaérobies ainsi qu'à des protozoaires (Land et al., 1997). Cependant il possède des effets indésirables tels que le choc anaphylactique, les convulsions et les dommages de l'ADN (Ferreiro et al., 2002). L'augmentation de sa solubilité le rend plus adapté à la membrane cellulaire intestinale, ce qui facilite son absorption intestinale et cellulaire, d'où la diminution de ces effets indésirables. Le greffage de cette molécule sur le glucose qui est un substrat hydrophile par une liaison ester permet d'augmenter sa solubilité et d'améliorer son efficacité.

4. Immobilisation de la lipase *Candida cylindracea* (CCL)

Dans notre travail nous avons immobilisé la lipase du *Candida cylindracea* (CCL) par adsorption sur silice et sur célite.

5. Estérification enzymatique de l' α -(+)-D-glucose

L' α -(+)-D-glucose est estérifié par l'acide laurique en présence de la lipase de *Candida cylindracea* (CCL) libre et immobilisée sur célite (CCL_{im(c)}) et sur silice (CCL_{im(s)}) à l'échelle du laboratoire. Les réactions ont lieu dans l'EMK à différentes températures. L'avancement de la réaction est suivi par CCM. Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers afin d'évaluer la conversion. Après un certain temps, qui dépend de la réactivité de l'enzyme, les produits obtenus sont récupérés et séparés par chromatographie sur colonne.

6. Résultats et discussion

6.1. Influence de la quantité du tamis moléculaire

L'estérification enzymatique est une réaction réversible qui se produit entre un acide carboxylique et un alcool en présence d'une lipase pour donner un ester et de l'eau. Pour favoriser la formation de l'ester il faut éliminer l'eau produite au cours de la réaction. Pour cela l'introduction d'une certaine quantité de tamis moléculaire dans le milieu réactionnel est nécessaire. Il ne faut cependant pas perdre de vue qu'un minimum d'eau est quand même nécessaire pour que l'enzyme soit active. Cette teneur en eau varie en fonction du type de la lipase utilisée.

Ceci nous amène à rechercher la quantité optimale de tamis moléculaire à introduire dans le milieu réactionnel. Nous avons varié la quantité de tamis moléculaire de 5 à 50 mg en passant par des quantités intermédiaires. Les résultats obtenus sont réunis dans les figures 5, 6 et 7.

➤ Cas de la CCL libre

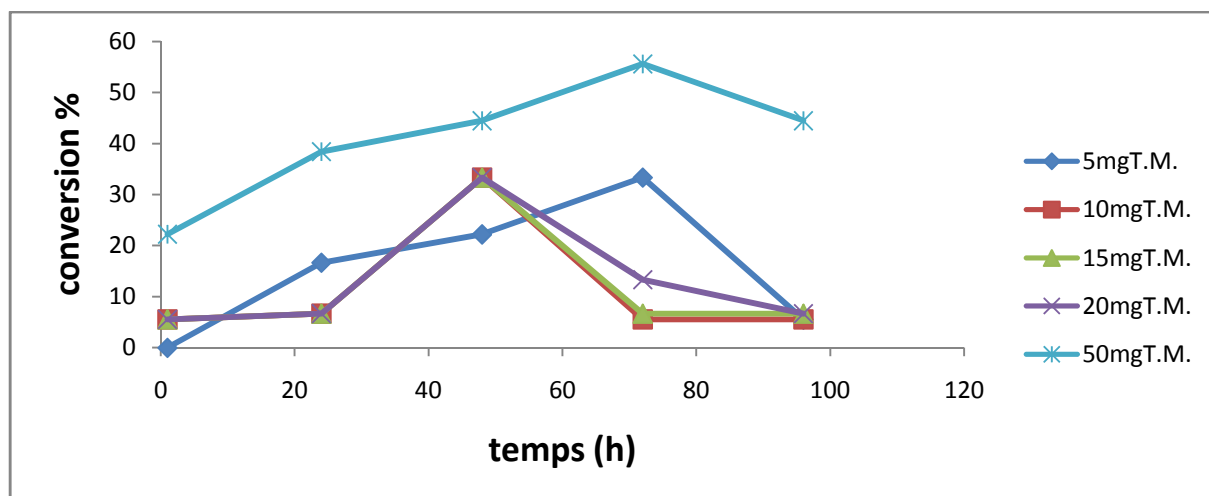


Figure 5 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité de tamis moléculaire sur la conversion dans le cas de la CCL libre.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L, 5mg CCL, (5, 10, 15, 20 et 50) mg de T.M dans 1,5ml EMK à 40°C.

Une variation de conversion dépendant de la quantité du tamis moléculaire utilisée est observée. La meilleure conversion (55%) est obtenue avec 50 mg de tamis moléculaire au bout de 72 h. En diminuant cette quantité, il s'en suit une diminution de la conversion.

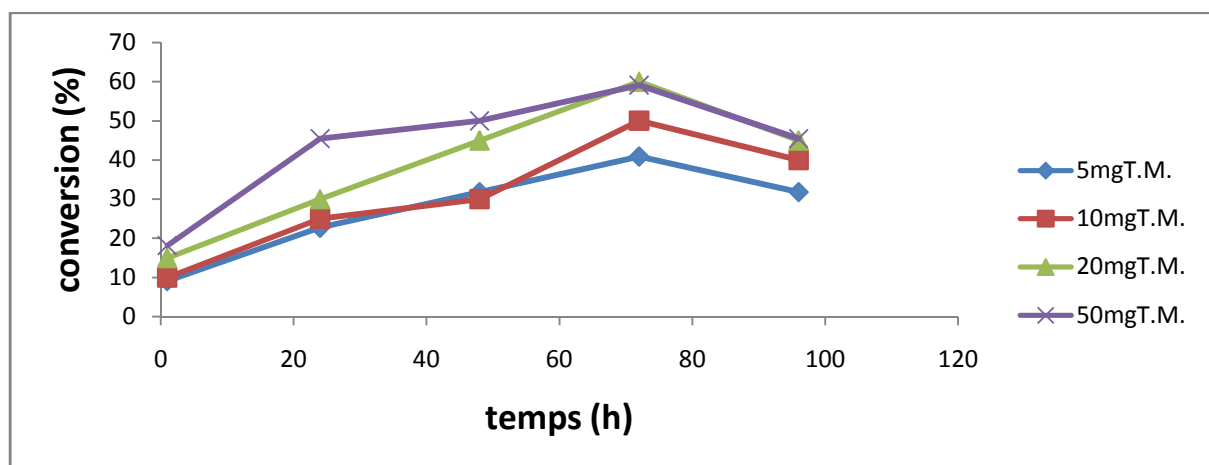
➤ Cas de la CCL_{im(c)}

Figure 6 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité de tamis moléculaire sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(c)}.

Conditions réactionnelles : 0,1 mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L, 5mg CCL_{im(c)}, (5, 10, 20 et 50) mg de T.M dans 1,5ml EMK à 40°C.

En présence de la $CCL_{im(c)}$, on observe qu'avec les différentes quantités de tamis moléculaire utilisées la vitesse initiale ne change pratiquement pas. La meilleure conversion obtenue (60%), est celle avec 50 mg de tamis moléculaire au bout de 72 h. En passant de 50 mg à 5 mg, on aura une diminution de la conversion de 60 à 40%.

➤ Cas de la $CCL_{im(s)}$

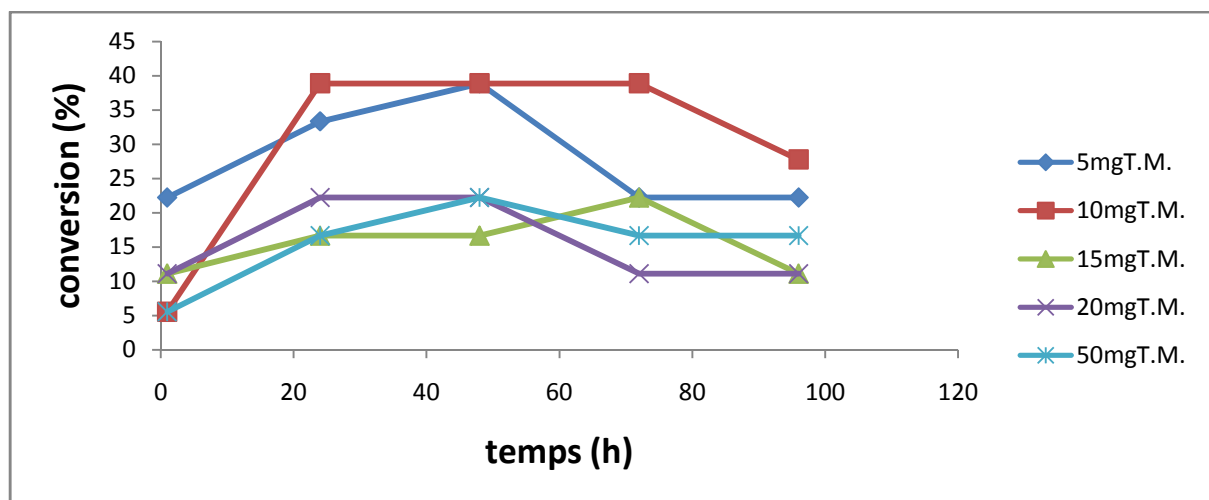


Figure 7 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité de tamis moléculaire sur la conversion dans le cas de la $CCL_{im(s)}$.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L., 5 mg $CCL_{im(s)}$, (5, 10, 15, 20 et 50 mg) de T.M dans 1,5ml EMK à 40°C.

Dans le cas de la $CCL_{im(s)}$, la meilleure conversion (38%) est obtenue avec 10 mg de tamis moléculaire au bout de 24h avec une grande vitesse initiale. L'augmentation de la quantité de tamis moléculaire fait diminuer la conversion.

En comparant les résultats obtenus dans les trois cas étudiés, on observe que la quantité du tamis moléculaire mise en jeu influe considérablement sur la conversion. En effet l'augmentation de cette quantité conduit dans le cas de la CCL libre et immobilisée sur célite (figure 5 et 6) à l'élévation de la conversion du sucre en monoester (60 %, 72 h, 50 mg de T.M.). Par contre, dans le cas de la $CCL_{im(s)}$ (figure 7) la conversion diminue avec l'augmentation de la quantité du tamis moléculaire et la meilleure conversion (38%) est obtenue avec 10 mg de tamis moléculaire au bout de 24 h avec une grande vitesse initiale.

Au-delà d'un certains temps, on observe une diminution de la conversion qui est probablement due à la formation du diester (Manuel et al. 1999).

Une quantité de tamis moléculaire est nécessaire pour adsorber toute quantité d'eau formée dans la réaction d'estérification afin de favoriser la réaction dans le sens de formation de l'ester. En revanche une teneur minimale en eau est nécessaire pour garder la souplesse de l'enzyme et pour qu'elle ne soit pas dénaturée. Cette teneur varie en fonction de la nature et de l'origine de l'enzyme (Liaquat et al., 2000 ; Wahtej et al., 1997).

6.2. Influence de la quantité de l'enzyme

Les lipases ont une particularité catalytique. C'est-à-dire, qu'elles nécessitent pour être efficaces une activation interfaciale, qui est liée à la quantité du substrat utilisé. Ceci nous amène à faire varier la quantité d'enzyme de 25, 50, 75 à 100 % avec les trois formes de la lipase de *Candida cylindracea* (CCL, CCL_{im(c)} et CCL_{im(s)}) par rapport à la quantité du sucre utilisée.

Les figures 8, 9 et 10 montrent l'influence de la quantité de la lipase sur la conversion.

➤ Cas de la CCL libre

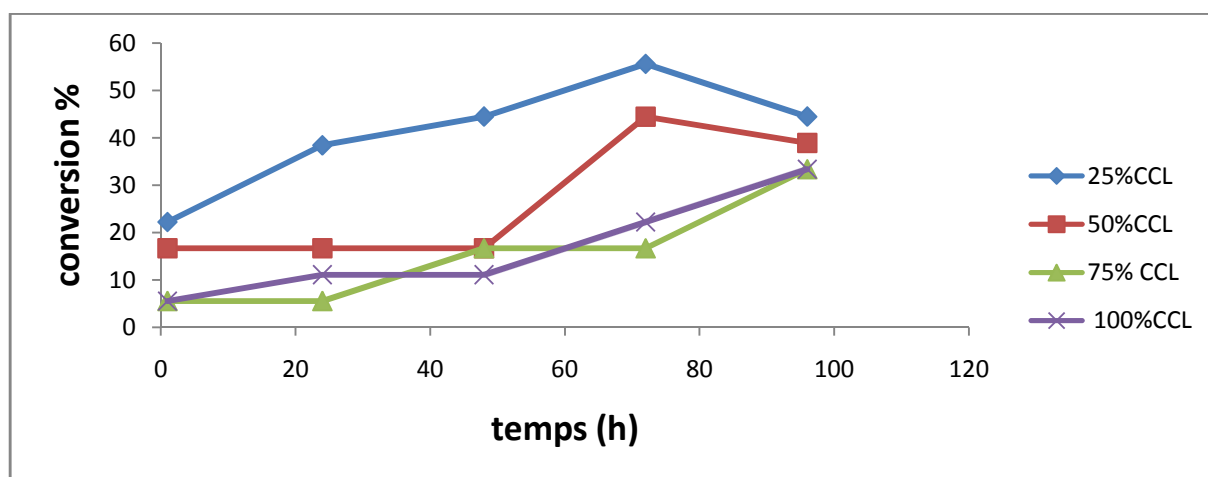


Figure 8 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'enzyme sur la conversion dans le cas de la CCL libre.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L, (25, 50,75 et 100 %) CCL, 50 mg de T.M dans 1,5 ml EMK à 40°C.

D'après la figure 8, nous observons que dans le cas où on utilise 50% d'enzyme, aucune évolution n'est observée après 1h de temps et ce, pendant 48 h. Par contre, avec 25 % de lipase libre, le monoester commence à se former après 1h de temps et la meilleure conversion (55%) est observée avec cette quantité de lipase au bout de 72h.

Au-delà de cette proportion, on observe une diminution de la conversion :

- Des conversions de 33% avec 75% et 100% de lipase sont observées au bout de 96h.
- Une conversion de l'ordre de 44% est obtenue avec 50% de CCL libre à 72h.

➤ Cas de la CCL_{im(c)}

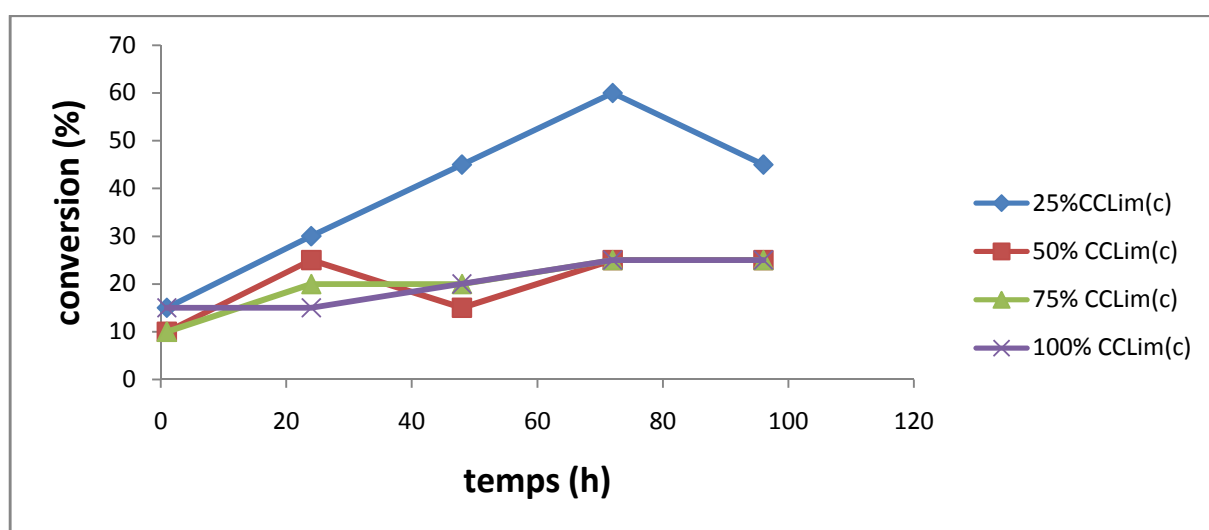


Figure 9 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'enzyme sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(c)}.

Conditions réactionnelles : 0,1 mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L, 25, 50, 75 et 100% CCL_{im(c)}, 50 mg de T.M. dans 1,5 ml EMK à 40°C.

On observe une grande vitesse initiale avec 25% de CCL_{im(c)} qui correspond à la meilleure conversion (60%). Avec l'augmentation de la quantité d'enzyme on aura de très faibles conversions (de l'ordre de 25%).

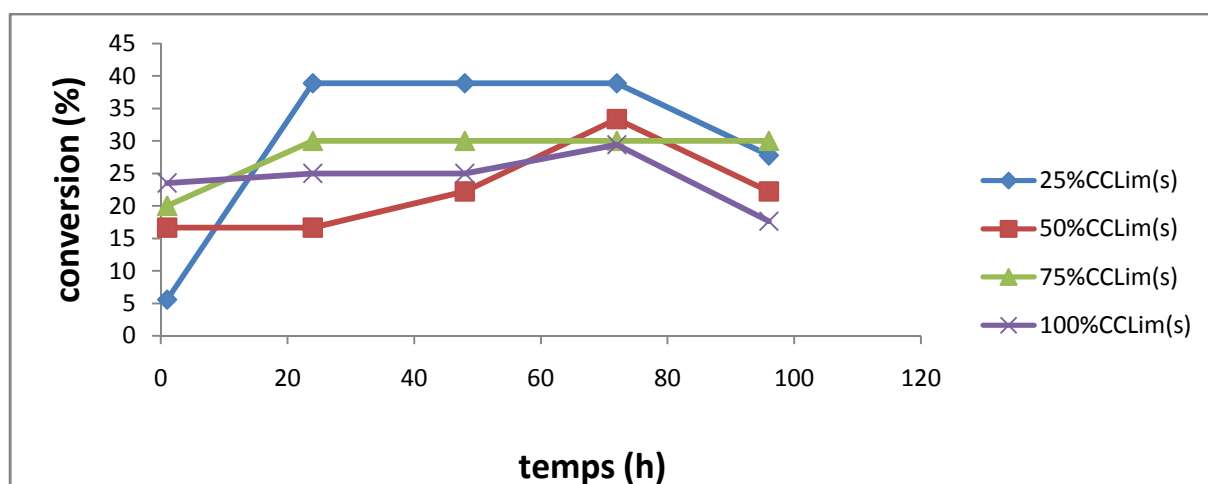
➤ Cas de la CCL_{im(s)}

Figure 10 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'enzyme sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(s)}.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L, 25, 50, 75 et 100 % CCL_{im(s)}, 10 mg de T.M. dans 1,5ml EMK à 40°C.

Dans le cas de la CCL_{im(s)}, on observe que la conversion diminue avec l'augmentation de la quantité d'enzyme et la meilleure conversion (38%) est obtenue avec 25% de CCL_{im(s)} au bout de 24h.

En comparant les trois figures 8, 9 et 10, on déduit que les meilleures conversions observées avec les trois formes de la lipase du *Candida cylindracea*, sont celles obtenues avec de faibles proportions de la lipase (25%) par rapport au substrat.

Cette quantité optimale de la lipase est liée à une certaine concentration critique en substrat pour qu'il y ait une activation interfaciale de cette lipase (Patrick et al., 2008).

6.3. Influence de la quantité de l'agent acylant

Une étude se rapportant à l'influence du nombre d'équivalent de l'agent acylant utilisé, sur la conversion du glucose a été réalisée et est donnée par les figures 10, 11 et 12. Les quantités d'agent acylant utilisés sont : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 3eq avec les trois lipases utilisées.

➤ Cas de la CCL libre

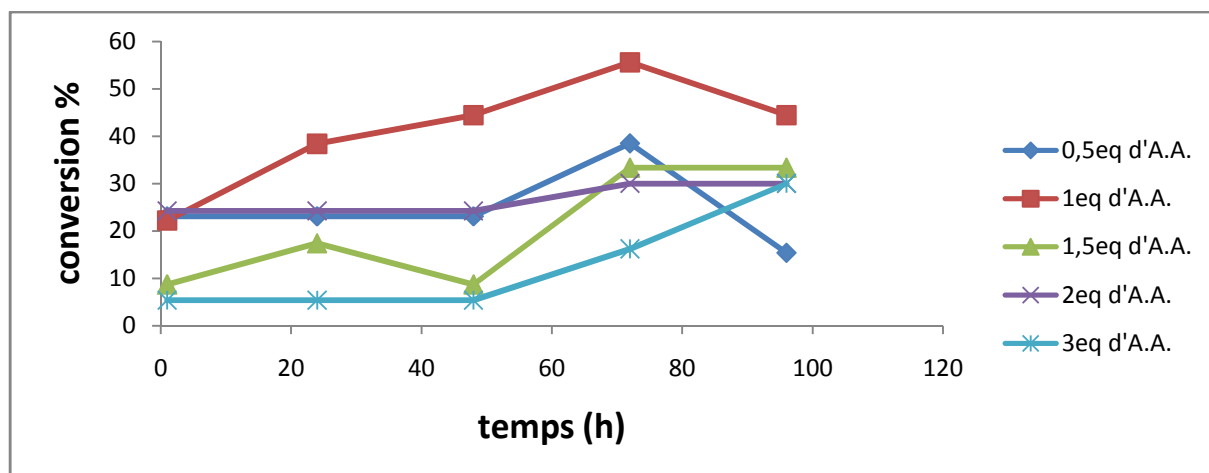


Figure 11 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'agent acylant sur la conversion dans le cas de la CCL libre.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 3eq) d'A.L, 5 mg CCL, 50mg de T.M dans 1,5ml EMK à 40°C.

D'après les résultats de la figure 11, nous remarquons que l'augmentation de la quantité d'acide laurique fait diminuer la conversion et les meilleurs résultats (C=55%) sont obtenus avec 1eq d'agent acylant après 72h de réaction.

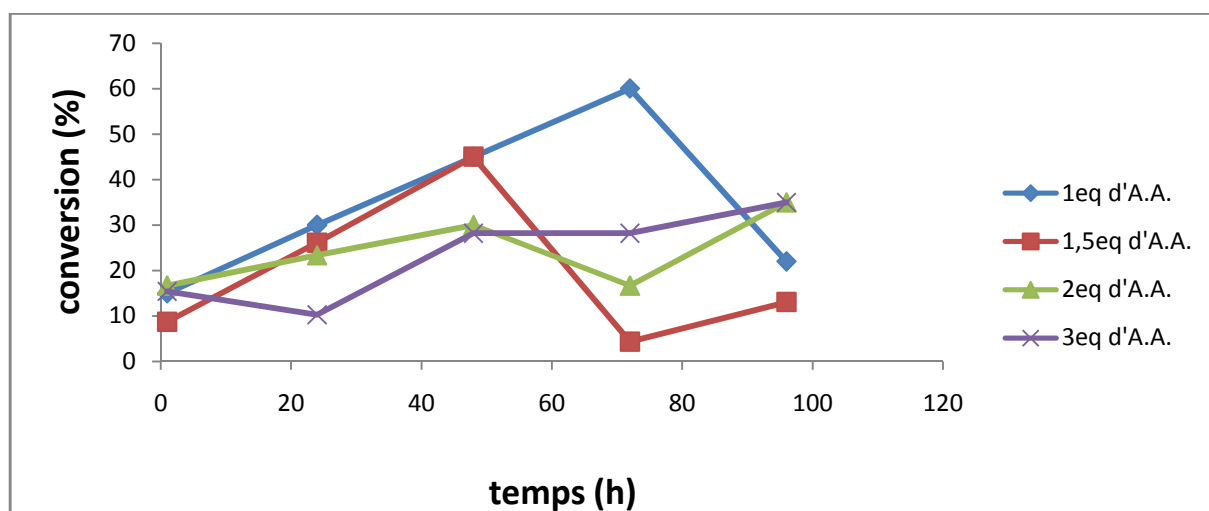
➤ Cas de la CCL_{im(c)}

Figure12 : Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'agent acylant sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(c)}.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, (1 ; 1,5 ; 2 et 3eq) d'A.L, 5mg CCL_(c), 50 mg de T.M dans 1,5ml EMK à 40°C.

Une grande vitesse initiale avec une très grande conversion (60%) sont observées avec 1eq d'acide laurique au bout de 72h. Des conversions de 45% sont obtenues dans le cas où on utilise 1,5eq d'acide laurique et 35% dans les cas de 2 et 3eq. C'est-à-dire, la conversion diminue avec l'augmentation de la quantité d'agent acylant.

➤ Cas de la CCL_{im(s)}

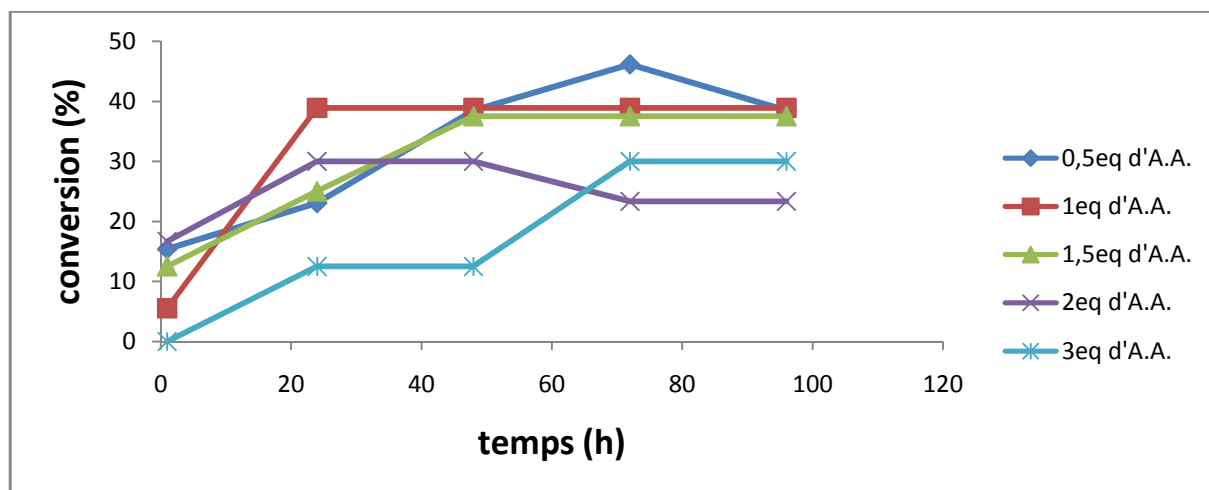


Figure 13: Suivi cinétique de l'influence de la quantité d'agent acylant sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(s)}.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 3eq d'A.L., 5mg CCL_(s), 10mg de T.M. dans 1,5ml EMK à 40°C.

Dans le cas de la CCL_{im(c)}, la meilleure conversion (46%) est obtenue avec 0,5eq d'acide laurique au bout de 72h. On observe aussi une très grande vitesse initiale avec 38% de conversion dans le cas où on utilise 1eq d'agent acylant.

En comparant les figures 11, 12 et 13 on remarque que la conversion diminue avec l'augmentation du nombre d'équivalents de l'acide laurique. Ceci peut être dû à une élévation de l'acidité du milieu réactionnel. Les meilleures conversions sont obtenues à des faibles quantités en agent acylant 1eq pour la CCL libre et immobilisée sur célite et 0,5eq pour la CCL immobilisée sur silice.

D'après la littérature, les lipases d'origine fongiques ont un pH neutre ou légèrement acide 6,5 (Patrick et al., 2008). Elles peuvent donc être inhibées dans des milieux acides ce qui peut être le cas ici.

6.4. Influence de la température

En règle générale, la température de fonctionnement de la CCL libre n'excède pas les 45°C. Afin d'examiner l'influence de l'élévation de la température sur les enzymes synthétisées au laboratoire ($CCL_{im(s)}$ et $CCL_{im(c)}$). Nous avons, effectué les réactions d'estérification à 40°C et à 60°C. Ceci est illustré sur les figures 14 et 15.

➤ cas de la $CCL_{im(c)}$

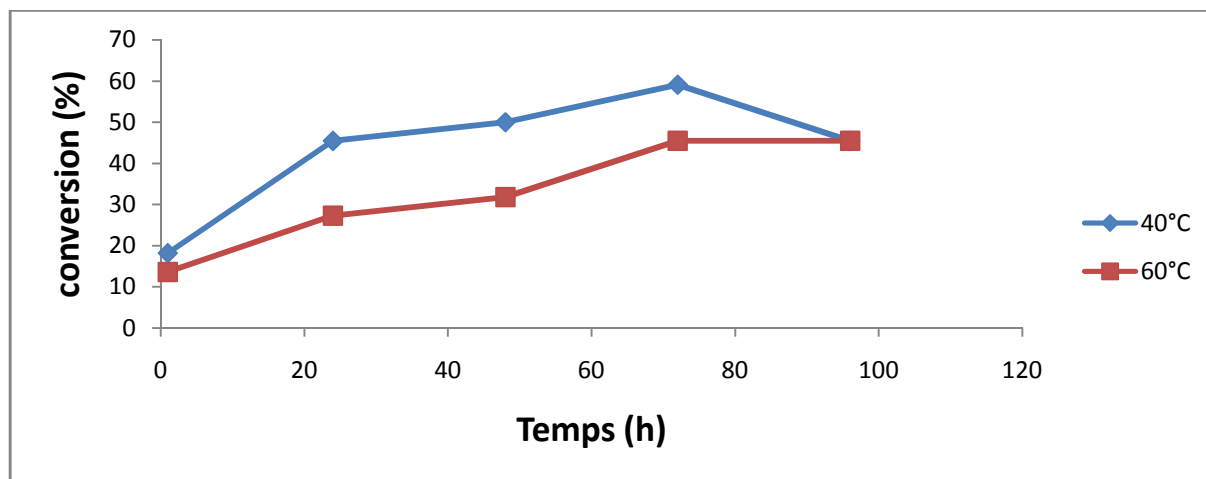


Figure 14: Suivi cinétique de l'influence de la température sur la conversion dans le cas de la $CCL_{im(c)}$.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L., 5mg $CCL_{im(c)}$, 50mg de T.M. dans 1,5ml EMK à 40 et 60 °C.

D'après la figure 14, les courbes obtenues à 40°C et 60°C ont presque la même allure, mais les meilleurs résultats sont observés à 40°C (60%, 72h). Par contre avec 60°C on a 45% de conversion après 72h. Au-delà de 72h on observe une constance de la conversion à 60°C, ce qui n'est pas le cas à 40°C.

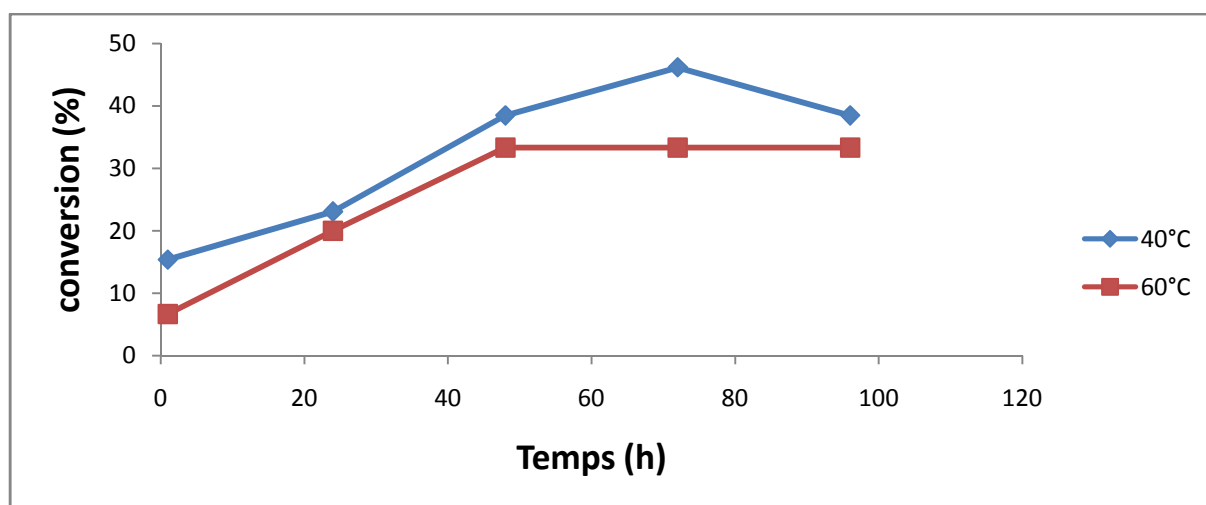
➤ Cas de la CCL_{im(s)}

Figure 15 : Suivi cinétique de l'influence de la température sur la conversion dans le cas de la CCL_{im(s)}.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 0,5eq d'A.L., 5mg CCL_{im(s)}, 10 mg de T.M. dans 1,5 ml EMK à 40 et 60°C.

Avec la CCL_{im(s)}, la meilleure conversion (46%) est observée à 40°C après 72h, et 33% à 60°C après 48h. Il y'a toujours une diminution de la conversion à 40°C. Par contre, à 60°C la conversion reste constante.

D'après les deux figures 14 et 15, on remarque que les enzymes synthétisées restent stables même à 60°C, mais avec des faibles conversions par rapport à celles obtenues à 40°C.

En fait, la variation de l'activité enzymatique résulte de deux effets antagonistes ; d'une part l'augmentation de l'agitation des molécules avec l'élévation de la température qui va accroître la fréquence des collisions entre le substrat et l'enzyme, d'où réactivité. D'autre part, l'agitation thermique des molécules du solvant du milieu provoque la rupture plus ou moins importante de l'organisation structurale de la protéine nécessaire à l'activité catalytique entraînant la modification des structures tertiaires et quaternaire de la lipase (Dixon et al., 1979), ce qui peut conduire à une perte de la réactivité.

En plus, en examinant les figures 14 et 15, on remarque qu'à 60°C, et qu'à un temps fixe t, la conversion reste constante. On forme donc uniquement le monoester. Par contre, en réalisant les réactions à 40°C, on observe la formation du diester (Manuel et al. 1999).

D'autre part, l'immobilisation de la CCL sur différents supports à augmenté sa thermostabilité.

6.5. Influence d'un cosolvant

Pour faire un compromis entre l'enzyme et le solvant nous avons utilisé un cosolvant : le DMSO qui est solvant polaire. Différents pourcentages ont été utilisés, pour évaluer son influence sur la conversion du sucre. Ceci est illustré sur les figures 16, 17 et 18.

➤ Cas de la CCL libre

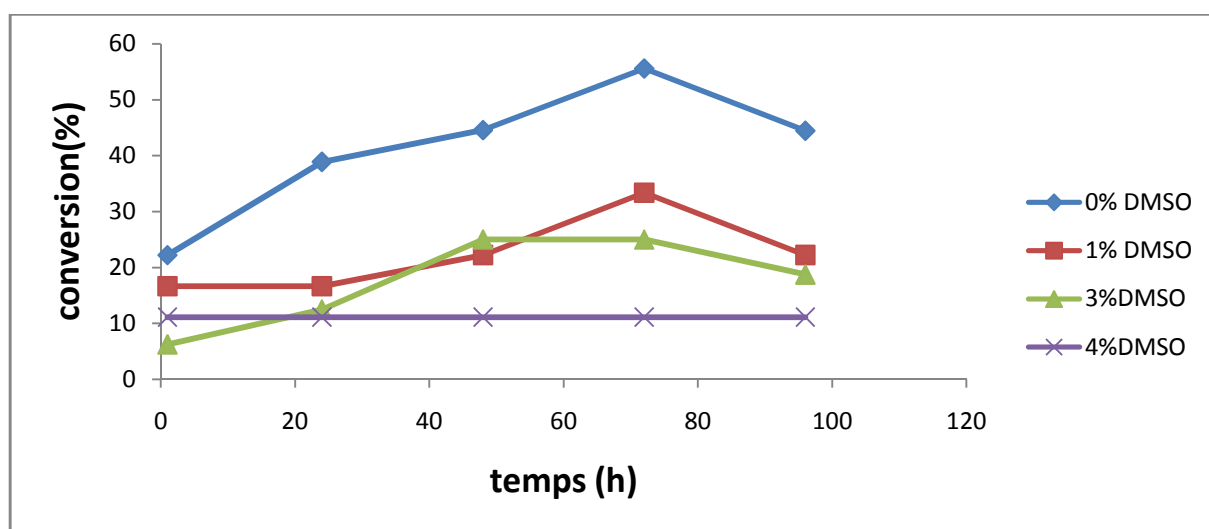


Figure 16 : Suivi cinétique de l'influence de cosolvant sur la conversion dans le cas de la CCL libre.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L., 5mg CCL, 50mg de T.M. dans 1,5ml (EMK/DMSO) à 40°C.

D'après l'analyse de la figure 16 (cas de la CCL libre), on observe qu'il y'a une influence du cosolvant sur la conversion du sucre. Avec 1% de DMSO, on observe une diminution de la conversion et on passe de 55% (avec 0% du DMSO) à 33% (avec 1% du DMSO). En augmentant le pourcentage du cosolvant, la conversion continue à diminuer (C=11% avec 4% de DMSO).

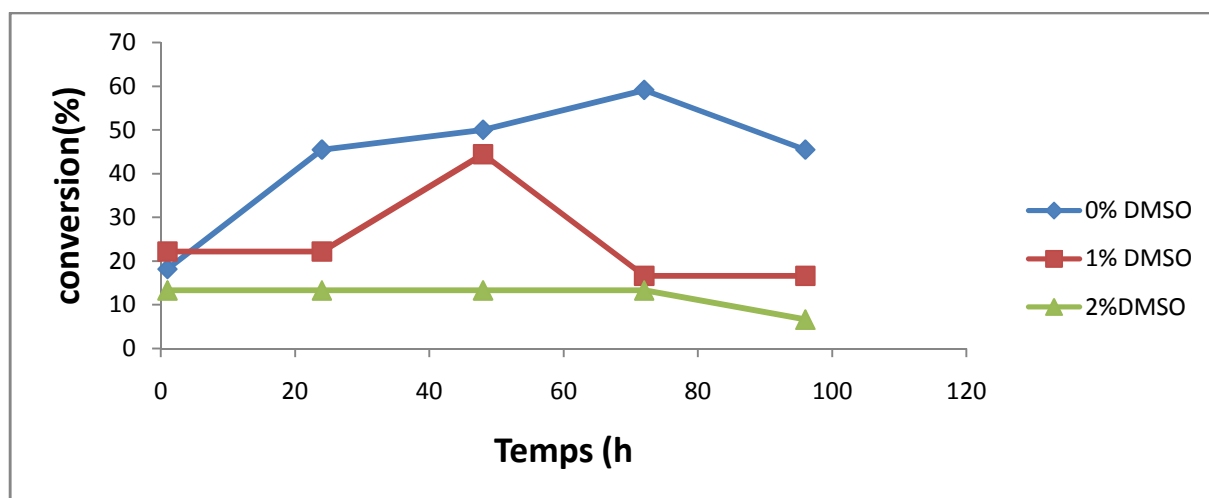
➤ Cas de la $CCL_{im(c)}$ 

Figure 17 : Suivi cinétique de l'influence de cosolvant sur la conversion dans le cas de la $CCL_{im(c)}$.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 1eq d'A.L., 5mg $CCL_{(c)}$, 50mg de T.M. dans 1,5ml (EMK/DMSO) à 40°C.

Avec la $CCL_{im(c)}$, l'ajout d'une quantité de DMSO fait aussi diminuer la conversion de 60% (0% du DMSO) à 45% (1% du DMSO) et à 13% (2% du DMSO).

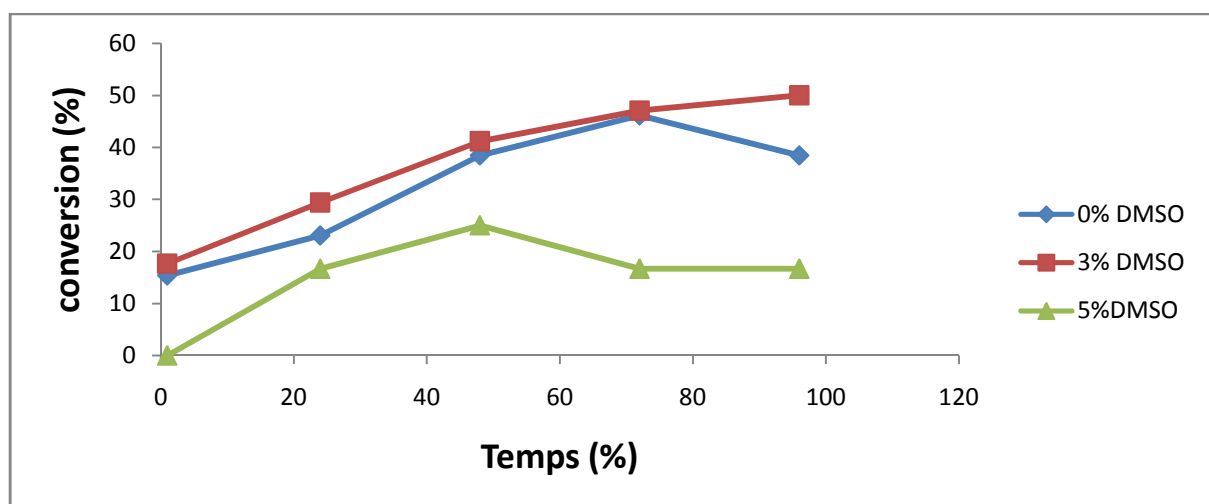
➤ Cas de la $CCL_{im(s)}$ 

Figure 18 : Suivi cinétique de l'influence de cosolvant sur la conversion dans le cas de la $CCL_{im(s)}$.

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D glucose, 0,5 eq d'A.L., 5mg $CCL_{(s)}$, 10mg de T.M. dans 1,5ml (EMK/DMSO) à 40°C.

Par contre, dans le cas de la CCL_{im(s)}, la conversion est légèrement modifiée avec l'ajout du DMSO. On obtient des conversions de C= 46% avec 0% de DMSO et C= 50% avec 3% de DMSO. Au-delà de 3%, la conversion diminue (C=25%, 5% de DMSO).

En comparant les résultats obtenus dans les figures 16 et 17, on peut dire que les meilleures conversions sont obtenus sans cosolvant. L'augmentation de la quantité du DMSO entraîne une diminution de la conversion.

Les résultats obtenus sont contraires à ceux attendus. Ceci peut être dû à la dénaturation de l'enzyme, car les solvants polaires absorbent l'eau constitutif de la lipase qui joue le rôle d'un lubrifiant pour que l'enzyme garde sa forme active.

Par contre, dans le cas de la CCL_{im(s)} (figure 18) la conversion est légèrement augmentée en présence d'une faible proportion de cosolvant.

7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une approche originale de la synthèse d'un tensioactif glucidique de type monocaténaire, portant une chaîne carbonée à 12 carbones : le 6-0-dodécanoyl-D-glucopyranose.

Pour cela, nous avons mis en œuvre la réaction d'estérification enzymatique de l' α -(+)-D-glucose par l'acide laurique en présence de la lipase *Candida cylindracea* CCL avec ses trois formes : libre et immobilisée sur célite et sur silice.

Une optimisation des paramètres réactionnels pour aboutir aux meilleures conversions (solvant, lipase, agent acylant, température, temps, tamis moléculaire) a été réalisée.

Dans un premier temps, nous avons essayé de trouver la quantité optimale du tamis moléculaire nécessaire, pour une conversion maximale. Elle est de l'ordre de 50 mg avec les deux lipases : CCL libre et immobilisée sur célite pour une conversion égale à 60%. Avec la CCL immobilisée sur silice la conversion maximale est de 38% avec 10 mg de tamis moléculaire.

Dans un deuxième temps, on s'est intéressé à l'étude de l'influence de la quantité de la lipase sur la conversion du sucre. Les meilleures conversions ont été obtenues avec une faible proportion d'enzyme (25%) avec les lipases synthétisées au laboratoire (CCL_{im(c)} et CCL_{im(s)}) et 50% avec la CCL libre.

D'autre part, l'étude de l'influence de la quantité d'agent acylant à donner les résultats suivants :

- 60% de conversion avec 1eq d'acide laurique dans le cas de la CCL_{im(c)} ;
- 46% de conversion avec 0,5eq d'acide laurique dans le cas de la CCL_{im(s)} ;
- 55% de conversion avec 0,5eq d'acide laurique dans le cas de la CCL libre.

Une autre étude se rapportant à l'influence de l'élévation de la température sur la stabilité et l'activité catalytique des lipases synthétisées a été réalisée. Nous avons constaté que les réactions avancent mieux à 40°C et que l'immobilisation améliore considérablement la stabilité de la CCL, face à la température grâce au maintien d'une structure tridimensionnelle adéquate.

Afin de bien solubiliser le sucre, on a introduit un cosolvant, le DMSO avec différentes proportions par rapport au substrat, dans le milieu réactionnel pour voir son influence sur l'avancement de la réaction mise en oeuvre. Les meilleures conversions sont obtenues sans cosolvant dans le cas de la CCL libre et immobilisée sur célite. Par contre, dans le cas de la CCL_{im(s)}, l'ajout de 3% du DMSO a modifié légèrement la conversion de 46 à 50%.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans cette étude, nous avons décrit la synthèse d'une classe originale de tensioactifs non ioniques obtenus à partir d'agro-ressources qui sont les glucides. L'utilisation de ressources renouvelables en substitution des matières premières fossiles permet en effet d'élaborer des molécules biodégradables, à haute valeur ajoutée.

Nous avons tout d'abord présenté la synthèse d'un tensioactif non ionique en partant d'un sucre simple, le glucose qui sera transformé en ester de glucose par une estérification enzymatique en présence de la lipase du *Candida cylindracea* (CCL).

Les conditions de la réaction mise en jeu ont été optimisées pour aboutir aux meilleures conversions. Tout d'abord, on s'est intéressé à augmenter la réactivité de la lipase étudiée par une immobilisation par adsorption sur célite et sur silice à l'échelle du laboratoire.

En effet, la lipase du *Candida cylindracea* immobilisée sur célite est plus efficace que la lipase libre et celle immobilisée sur silice. En plus, l'immobilisation de cette lipase augmente sa stabilité via la température.

Nous pouvons conclure que :

- La présence d'une teneur minimale en eau est nécessaire pour que l'enzyme soit dans sa forme active et pour que la réaction d'estérification soit favorisée dans le sens de formation du produit désiré.
- La structure des lipases nécessite une concentration critique en substrat qui est liée à la quantité de la lipase utilisée.
- L'élévation de l'acidité et la polarité du milieu réactionnel peut inhiber la lipase du *Candida cylindracea*.
- La température optimale de la réaction est 45°C pour les trois formes d'enzyme.
- Enfin, les meilleures conversions sont obtenues avec la CCL_{im(c)} à 40°C (60%).

D'un point de vue prospectif, la poursuite de l'étude mathématique statistique avec les résultats obtenus seraient nécessaire afin de trouver toujours la bonne voie de synthèse de ce type de tensioactif.

Appareillage et conditions générales

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée sur plaque de gel de silice (Merck 60F-254), les plaques ont été révélées au moyen d'une solution d'acide sulfurique, puis chauffage à 150°C. Le « R_f », qui représente le rapport de la distance parcourue par le produit (h) à la distance parcourue par le solvant (H), est spécifique à chaque substance.

$$R_f = h/H$$

Les chromatographies liquides sur colonne ont été effectuées sur gel de silice Merck 230-400 mesh (0,04-0,063mm).

Les spectres RMN¹ H ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker de type AM200 ou AC250, les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm). Les abréviations suivantes ont été utilisées : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, et les constantes de couplage sont exprimés en Hertz (Hz).

Les spectres RMN¹³ C ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker de type AM200 à 50,5 MHz ou AC250 à 62,9 MHz.

Spectroscopie de masse (SM) ont été enregistrés au moyen d'un appareil GCMS (QP2010s, Shimadzu) après silylation des produits, soit par impact électronique soit par la méthode électrospray ionisation (ESI+ 30eV).

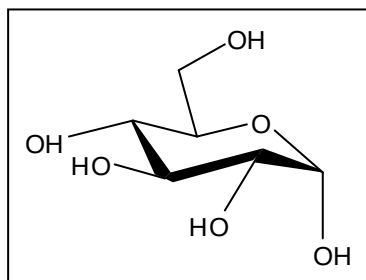
Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer FT-1600. Les échantillons liquides sont déposés en film entre deux pastilles de NaCl, et en présence de KBr dans le cas des échantillons solides. Le nombre d'onde est exprimé en cm^{-1} .

Les points de fusion non corrigés : ont été déterminés en capillaire sur un appareil Buchi 510.

Les pouvoirs rotatoires : ont été déterminés en utilisant un polarimètre de Perkin-Elmer 241.

1. Produits chimiques

1.1. Le sucre : le sucre utilisé est le α -(+)-D glucose de source sigma



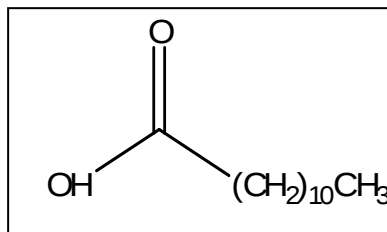
$M = 180 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} [\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6]$; poudre blanche

$R_f = 0$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10]

$F = 146^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{25} + 53$ (C=1 dans H_2O)

1.2. L'agent acylant : Acide laurique de source Fluka



$M = 200 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} [\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2]$; Poudre blanche

$F = 44\text{-}46^\circ\text{C}$

$P_b = 225^\circ\text{C}$

2. Les solvants organiques

Les solvants organiques utilisées dans l'acylation enzymatique sont conservés sur tamis moléculaire, le tableau suivant donne les paramètres caractéristiques des solvants utilisés.

Solvant	Log p	Provenance
MeOH	-0,76	Fluka
DMSO	-1,3	Fluka
Acétone	-0,30	Fluka
CH ₂ Cl ₂	0,64	Fluka

Nous avons utilisé dans l'acylation enzymatique du D-glucose d'autres produits que nous réunissons dans le tableau suivant :

produit	Provenance
NaOH	Fluka
EtOH	Fluka
H ₂ SO ₄	Fluka
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fluka
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	Sigma
Phénolphtaléine	Sigma
Tamis moléculaire 4A°	Sigma
Celite 545	Fluka
Silice	Fluka
Gel de silice 60 (70-230mesh)	Fluka

3. Les enzymes utilisées

L'enzyme utilisée c'est la lipase *candida cylindracea* de source Fluka.

4. Immobilisation de la lipase *Candida cylindracea* (CCL)

4.1. Préparation de la solution tampon (pH 8 ; 0.1M)

Dans 1000ml d'eau distillée on dissout 9.42g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 249.702g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

4.2. Protocol opératoire de l'immobilisation

Dans un ballon, on dissout 60 mg de CCL dans 10 ml de la solution tampon (pH = 8 ; 0.1M). On agite pendant 30 minutes à 4°C, puis on ajoute goutte à goutte 20 ml d'acétone froide (-15°C). Après 2 heures de temps, la réaction est arrêtée, l'enzyme filtrée sous vide et lavée trois fois avec l'acétone. La lipase est ensuite séchée dans un dessiccateur sous vide en présence de silica gel, puis conservée à -18°C. Le rendement d'immobilisation peut être déterminé par dosage colorimétrique (méthode de : Bradford, biuret et lowry).

5. Synthèse des esters de glucose

Mode opératoire : procédure générale d'estérification de l' α -(+)-D-glucose

Dans un ballon on dissout 0,1mmol (20 mg) de glucose et (0.5-3) équivalents d'acide gras (AL) dans 1,5ml de solvant. Après 30 minutes d'agitation on ajoute l'enzyme. Une quantité adéquate de tamis moléculaire est ensuite additionnée dans le milieu réactionnel. Des échantillons sont régulièrement prélevés dans le milieu réactionnel, afin d'évaluer la conversion. Après un certains temps qui dépend de la réactivité de l'enzyme, la réaction est stoppée. L'ester de glucose est purifié suivant le protocole opératoire décrit sur le schéma suivant :

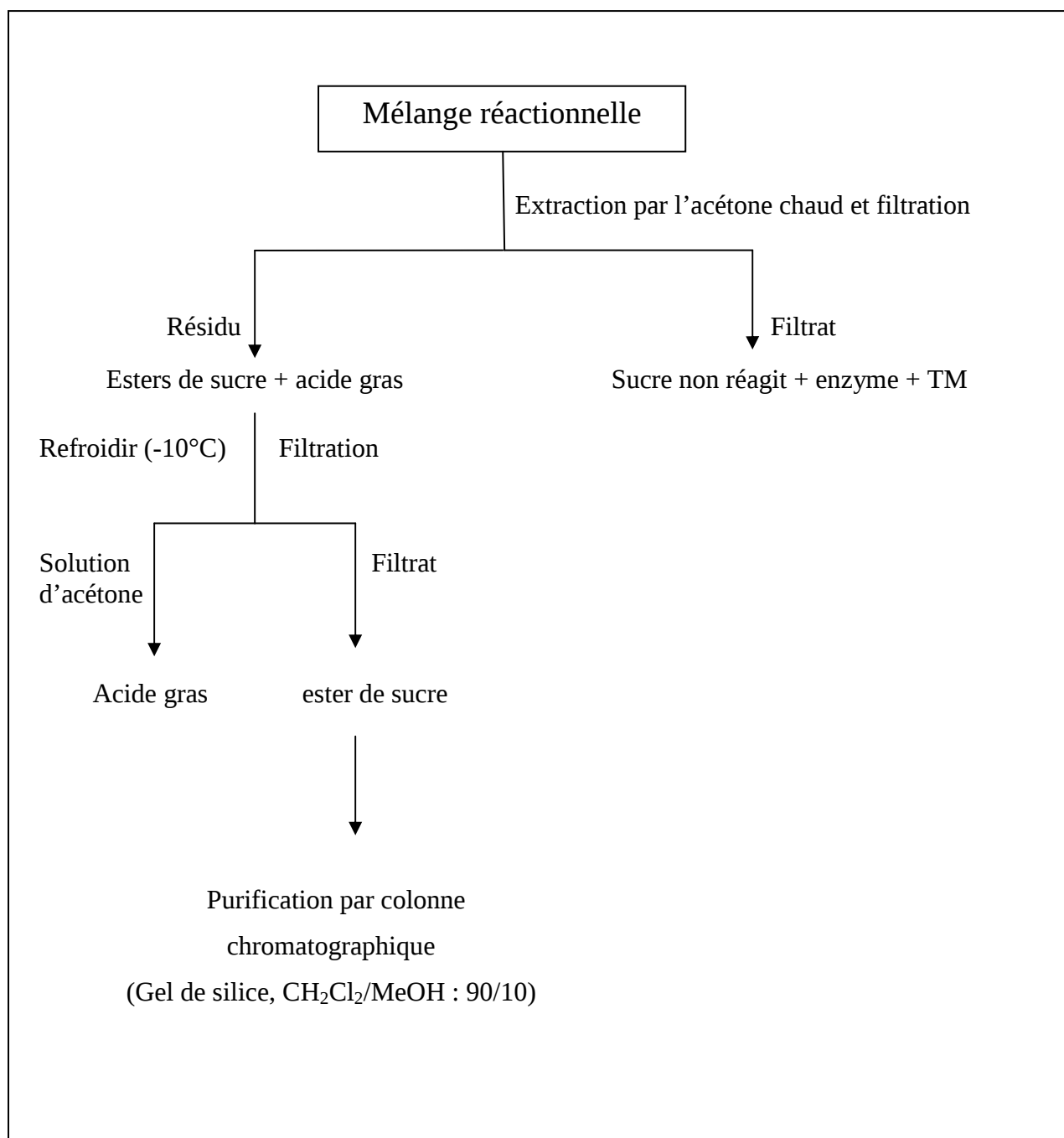
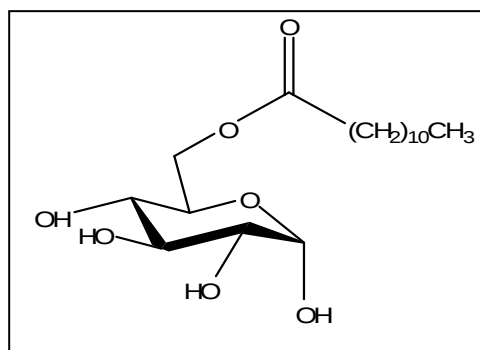


Schéma 22 : Schéma de purification générale des esters de sucre

6-0-dodécanoyle-D-glucopyranose :

$M = 362 \text{ g.mol}^{-1}$ [$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_7$]; poudre blanche

$R_f = 0.27$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10]

$[\alpha]_D^{20} + 39$ (C=1 dans MeOH)

$F = 130^\circ\text{C}$.

RMN¹ H dans DMSO-d₆: (84.31% de l'anomère α / 15.68% de l'anomère β) 0.85 (t, 6H, **H-12'**), 1.25 (m, 32H, **H-4'-11'**), 1.50 (m, 4H, **H-3'**), 2.27 (t, 4H, **H-2'**), 2.95-3.20 (m, 6H, **H-2 α** , **H-2 β** , **H-3 α** , **H-3 β** , **H-4 α** , **H-4 β**), 3.76 (m, 2H, **H-5 α** , **H-5 β**), **3.98**(dd, 2H, $J=5.95$, 6.03, **H-6**), 4.24 (d, 2H, $J=10.8$, **H-6**, **OH-1 β**), 4.56 (m, 2H, **OH-4 α** , **OH-4 β**), 4.72-5.20 (m, 5H, **OH-2 α** , **OH-2 β** , **OH-3 α** , **OH-3 β** , **H-1 α**), 6.35 (d, 1H, $J=2.98$, **OH-1 α**), 6.65 (d, 1H, **OH-1 β**).

RMN¹³ C DMSO-d₆: **moitié lauroyl** 13.87 (C-12', CH₃), 22.01 (C-11', CH₂), 24.38 (C-3', CH₂), 28.35 (C-4', CH₂), 28.63 (C-5', C-6', CH₂), 28.83 (C-7', CH₂), 28.92 (C-8', C-9', CH₂), 31.21 (C-10', CH₂), 33.38 (C-2', CH₂), 172.83 (C-1', C=O); **moitié glucose**, 63.78 (C-6, CH₂), 69.03 (C-4, CH), 70.45 (C-5, CH), 72.09 (C-2, CH), 72.76 (C-3, CH), 92.19 (C-1, CH).

IR: O-H 3340 cm^{-1}

C=O (ester) 1735 cm^{-1}

C-O 1149 cm^{-1}

-CH₂ 1468 cm^{-1} .

SM: (GCMS du produit silylé) : $[\text{M-TMS-TMSOH-H}]^- = 486$

Mesure de la conversion par titrage

La conversion est mesurée par la quantité d'acide gras non réagit dans le milieu réactionnel selon le mode opératoire suivant :

0.1g de mélange réactionnel est dilué dans 20 ml d'une solution de phénophtaléine dans l'éthanol 0.1M. Une solution de NaOH est ensuite ajoutée goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'une coloration rose.

La conversion est donnée par l'expression suivante :

$$C\% = \frac{V_{NaOH \text{ (avant l'ajout de l'enzyme)}} - V_{NaOH \text{ (après l'arrêt de la réaction)}}}{V_{NaOH \text{ (avant l'ajout de l'enzyme)}}$$

Chapitre 1

- Adelhorst K., Björkling F., Godtfredsen S. E., O. Kirk Synthesis. (1990), 112-115.
- Baker I. J. A., Matthews B., Soares H., Krodziewska I., Furlong D. N., Grieser F., Drummond C. J., Surf J.. Deterg. (2000), 3, 1-11.
- Cao L., Borscheuer U T., Schmid RD. Lipase-catalysed solid-phase synthesis sugar ester. IV: selectivity of lipase towards primary and secondary hydroxyl group carbohydrates. Biocatal. Biotransform. (1998), 16, 249–257.
- (a). Castro M., Kovensky J., A. Fernandez Cirelli Tetrahedron Lett. (1997), 38 (23), 3995-3998. (b). M. J. L. Castro, J. Kovensky, A. Fernandez Cirelli Tetrahedron. (1999), 55, 12711- 12722.
- Chamouleau, F.; Coulon, D.; Girardin, M. ; Ghoul, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalysis in organic media. Molecular catalysis B : enzymatic. (2001), 11, 949-954.
- Chem. Abstr. (2004), 141, 73090.
- Damez C. transformation d'agro-ressource régionale et étude de leurs propriétés amphiphiles. Université de Reims Champagne-Ardenne, (2006).
- Dixon M. et Webb E.C. – Enzymes. Academic Press, New-York, (1979).
- Ferrer M., Angeles Cruces M., Bernabé M., Ballesteros A., plou FJ. Lipase-catalysed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. Biotechnol. Bioeng. (1999), 65 (1), 10–16.
- Fregapane G., Sarney DB., Greenberg SG., Knight DJ., Vulfson EN. Enzymatic synthesis of monosacharide fatty acid esters and their comparison with conventional products. J. Am. Oil Chem. Soc. (1994), 71, 87-91.
- Fu Z., L. C. Graziano US Pat. Appl. (2002).
- Ghanwa, A. ; Yasuhiro, K. ; Ken, I. ; Biotechnol. Biochem, (2005), 69 (4), 833-835.
- (a) Garti N., Aserin A., Fanun M. Non-ionic sucrose esters microemulsions for food applications. Part 1. Water solubilization. Colloids Surf. A: Physicochem., Eng. (2000),

- 164, 27–38. (b) Garti N., Aserin A., Tiunova I., Fanun M.. A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. *Colloids Surf. A: Physicochem., Eng.* (2000), 170, p. 1–18.
- Husson E., Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique. Université de Paris, (2008).
- Juliette F., Queneau Y., Jean-Paul Maitre and Alain Bouchu. *Tetrahedron letters*, (2007), 48, 4111-4114.
- (a). Keglevic D., Valentekovic S., Roglic G., F. Plavsic *Carbohydr. Res.* (1973), 29, 25-39.
 (b). D. Keglevic, S. Valentekovic *Carbohydr. Res.* (1974), 38, 133-145.
- Klibanov, A.M. “ Improving enzymes by using them in organic solvents”. *Nature* 409 (2001), 6817, 241-246.
- Koltalo Portet F., Desbene P. L., Treiner C.. *Colloid Interf. Sci.* (2003), 261, 40-44.
- Mizutani K., Ohtani K., Kasai R., Tanaka O., H. Matsuura *Chem. Pharm. Bull.* (1985), 33, 2266-2272.
- Neto, V. ; Nouvelle méthode d’élaboration des tensioactifs glycosylés par métathèse croisée et cycloaddition 1,3-dipolaire. Université de limoges, Paris, (2007).
- Ono Y., Shikata T.J. *Physical Chem.* (2005), 109, 7412-7419.
- (a). Pfander H., F. Wittwer *Helv. Chim. Acta* (1979), 62, 1944-1951. (b). Pfander H., M. Läderach *Carbohydr. Res.* (1982), 99, 175-179.
- Pfeffer P. E., Rothman E. S., G. G. Moore *J. Org. Chem.* (1976), 41, 2925-2927.
- Piccicuto, S. ; Belker, C. ; Brohée, J-C. ; Mbampara, A. ; lognay, G. ; Deroanne, C. ; Paquot, M. ; Marlier, M. *Biotechnol. Argon ; Soc. Environ.* (2001), 5 (4), 209-219.
- Plou FJ., Cruces MA., Bernabe M., Martin-Lomas M. , Parra JL., Ballesteros A. Enzymatic synthesis of partially acylated sucroses. *Enzyme Eng. XII - Ann. N Y Acad. Sci.* (1995), 750, 332–337.
- Plusquellec D., Roulleau F., Bertho F., M. Lefeuvre *Tetrahedron* (1986), 42, 2457-2467.

- Potier P., Bouchu A., Gagnaire J., Y. Queneau *Tetrahedron: Asymmetry*, (2001), 12, 2409-2419.
- Puisieux F., Seiller M. *Galenica : les Systèmes Dispersés – Agents de Surface et Émulsions*, vol 1. Paris : Technique et Documentation Lavoisier. (1983). ISBN 2-85206-196-1
- Razafindralambo H. and al. *J. Phys. Chem. B.* (2009), 113, 8872-8877.
- Riva S., Nonini M., Ottolina G., B. Danieli *Carbohydr. Res.* (1998), 314, 259-266.
- Ross J., Miles Am G. D. *Soc. For Testing Materials, Method D1173-53*, Philadelphia, (1953).
- Sin YM., Cho KW., Lee TH. *Synthesis of fructoseesters by Pseudomonas sp. lipase in anhydrous pyridine. Biotechnol. Lett.* (1998), 20, 91–94.
- Sinhuwat Ritthithan, Reinhard Wimmer, Allan Stensballe, Lars Haastrup Pedersen. *Molécular catalysis B : enzymatic.* (2009), 59 266–273
- Söderberg I., Drummond C. J., Furlong D. N, Godkin S., B. Matthews *Colloids Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* (1995), 102, 91-97.
- Spiliotis N., Voustas E., Magoulas K., Tassios D. *Recovery of fructose laurate produced through enzymatic esterification. Separ. Purif. Technol.* (2000), 19, 229–236.
- Thévenet S., Wernicke A., Belniak S., Descotes G., Bouchu A., Y. Queneau *Carbohydr. Res.* (1999), 318, 52-66.
- Wulff G., Röhle G., W. Krüger *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* (1970), 9, 455-456.
- Yan, Y. ; Bornscheuer, U. ; Stadler, G. ; Reuss, R. ; Schmid, D. *lipid Sci. Technol.* (2001).
- Yon-mei Xiao, Qi Wu, Ying Cai and Xian-fu lin. *Carbohydrat research.* (2005), 340, 2097-2013.

Chapitre 2

- Aehle W. – Enzymes in industry. Production and applications. Wiley-VCH, Weinheim (2004).
- Amorim R.V.S. et al., Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. *Bioresour. Technol.*, (2003), 89 (1), 35-39.
- Andrés Illanes, enzyme biocatalysis. School of Biochemical Engineering, (2008).
- Bagi K., Simon L.M. & Szajani B., Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme Microb. Technol.*, (1997) 20, 531-535.
- Balcão V.M., Paiva A.L. & Malcata X.F. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb. Technol.*, (1996), 18, 392-416.
- Blecker C., La catalyse enzymatique en milieu organique : potentialités d'utilisation des lipases. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, (1993), 28, 51-85.
- Chamouleau, F.; Coulon, D. ; Girardin, M. ; Ghouli, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalysis in organic media. *Molecular catalysis B : enzymatic*. (2001),11, 949-954.
- Coutinho (P.M.) et Henrissat (B.). – Carbohydrate-active enzymes : an integrated database approach. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, Gilbert (H.J.), Davies (G.), Henrissat (B.) et Svensson (B.) eds., The Royal Society of Chemistry, p. 3-12, Cambridge (1999).
- Cornish-Bowden (A.). – principle of enzyme kinetics.. Butterworths Londres (1976), 206p
- Derewenda Z., Derewenda , Dodson G., The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, (1992), 227, 818-839.
- Dixon (M.) et Webb (E.C.). – Enzymes. Academic Press, New-York. (1979).

- Dodson G., Lawson D. & Winkler F., Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss.* (1992), 93, 95-105.
- Egloff M.P. et al., Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. *Protein Sci.*, (1995), 4, 44-57.
- Fojan P., Jonson P., Petersen M. & Petersen S.B., What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie*, (2000), 82, 1033-1041.
- H.-D. belitz et al, food chemistry, Springer, (2009).
- Henrissat (B.). – A classification of glycosyl hy-drolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.*, (1991), 280, 309-316.
- Husson Eric, Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique université de Paris, (2008).
- Ivanov A.E. & Schneider M.P., Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, (1997), 3, 303-309.
- Lancelot W.K., Luke M., John S.R. & Ignatious N., Characterisation of some underutilised vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase-catalysed production of cocoa butter equivalents. *Ind. Crops Prod.*, (2002), 16, 237-244.
- Lehninger, Nelson et Cox. *Principes de Biochimie*, deuxième édition, (1994), p 199.
- Penasse (L.)- les enzymes : cinétique et mécanisme d'action. masson Paris, (1974), p 227.
- Patrick Fickers, Jacqueline Destain, Philippe Thonart *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (2008), 12(2), 119-130
- Rajan (S.S.), Yang (X.), Collart (F.), Yip (V.L.), Withers (S.G.), Varrot (A.), Thompson (J.), Davies (G.J.) et Anderson (W.F.). – Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD⁺/Mn²⁺ -dependent phospho-alpha-glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure*. (2004), 12, p. 1619-1629.
- Ramachandra Murty V., Jayadev Bhat, and P. K. A. Muniswaran *Biotechnol. Bioprocess Eng.* (2002), 7: 57-66.

Ricard (J.). –cinétique et mécanisme d'action des enzymes.. Doin paris, (1973), 209p.

Secundo F. & Carrea G., Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2002, 19-20, 93-102.

Smith (G.M.);- The nature of enzymes, in *Biotechnology, a Comprehensive Treatise*. 2^e édn., sous la direction de REHM (H.-J.) et REED (G.), Springer-Verlag, Weinheim, Allemagne 1995, vol. 9.

Chapitre 3

Dixon (M.) et Webb (E.C.). – *Enzymes*. Academic Press, New-York, (1979).

Ferreiro, G.; Badias, L.; Lopez-Nigro, M.; Palermo, A.; Mudry, M.; Elio, P. *Toxicol Lett.* (2002), 132, 109–15.

Husson Eric, *Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique* université de Paris, (2008).

Klibanov, A.M. “ Improving enzymes by using them in organic solvents”. *Nature* 409 (2001), (6817), 241-246.

Land, K.; Johnson, P.; Molecular mechanisms underlying metronidazole resistance in trichomonads experimental. *Parasitology*. (1997), 87, 305–8.

Liaquat M., Owusu Apenten RK. Synthesis of low molecular weight flavour esters using plant seedling lipase in organic media. *J. Food. Sci.* (2000), 65, 295–299.

Manuel Ferrer, M. Angeles Cruces, Manuel Bernabé, Antonio Ballesteros, Francisco J. Plou. Acylation of sucrose in solvent mixtures. *Biotechnologie and Bioengineering*; (1999), vol. 65.

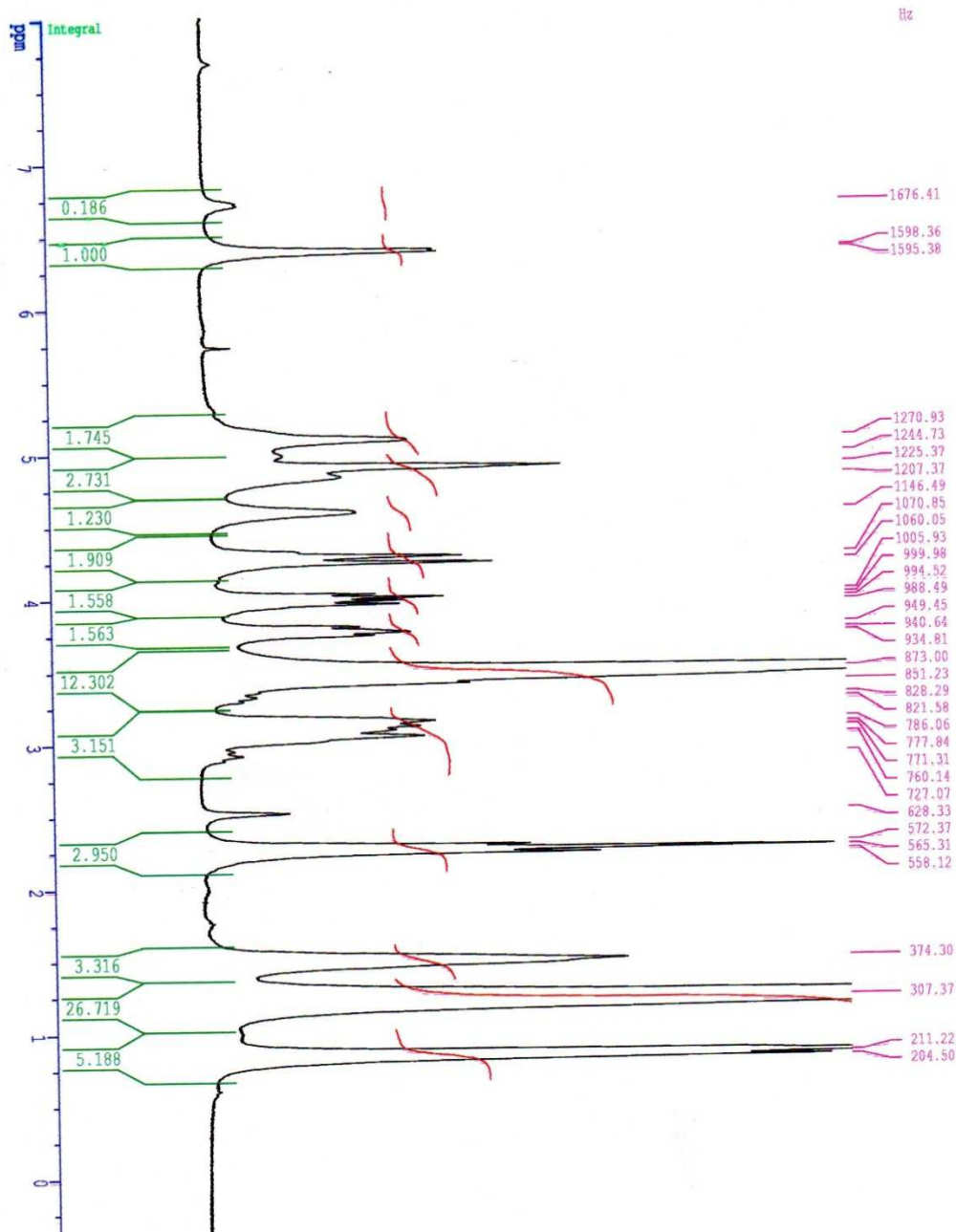
Patrick Fickers, Jacqueline Destain, Philippe Thonart. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (2008), 12(2), 119-130.

Qi, W.; Meng, W.; Zhi, C-C.; De Shui, L.; Xian, F-L.; *Enzyme and Microbial Technology*. (2006), 39, 1258–1263.

Wahtej E., Adlercreutz P. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnol. Bioeng.* (1997), 55, 798–806.

RMN¹H du 6-0-dodécanoyle-D-glucopyranose

Spectre proton : ECH: ANSTMLE

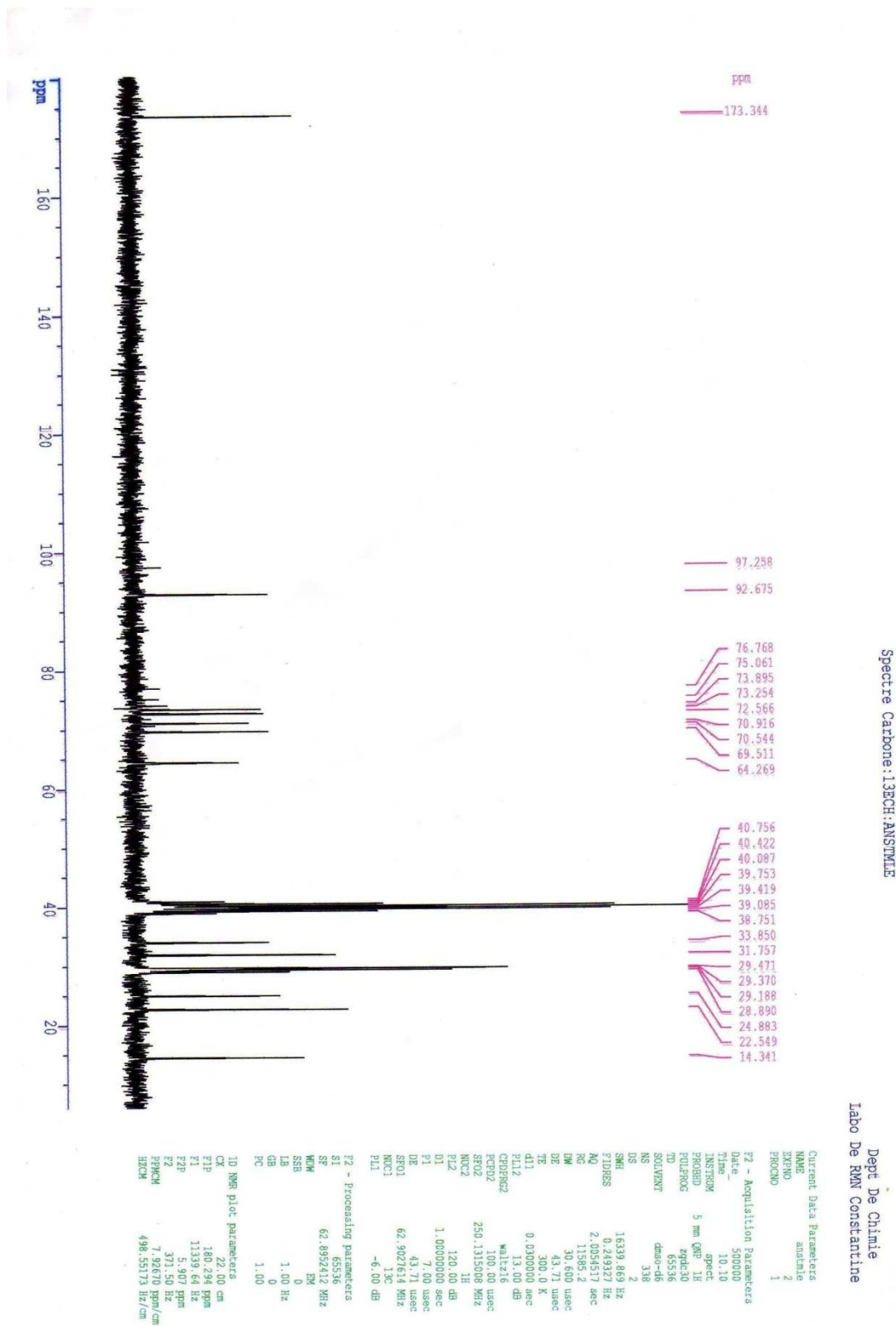


Current Data Parameters
NAME: Anstmlle
EXPNO: 1
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20060605
Time: 14.50
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm QNP 1H
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: dms-d5
DS: 2
SS: 2
AQ: 5.520.287 Hz
FIDRES: 0.168466 Hz
AQ: 2.9680116 sec
RG: 35.9 usec
DE: 10.515 usec
TE: 300.0 K
D1: 1.00000000 sec
F1: 12.00 usec
DE: 129.39 usec
SFO1: 250.132512 MHz
P1: 12.00 usec
P2: 12.00 usec
P3: 12.00 usec
PC: 2.00

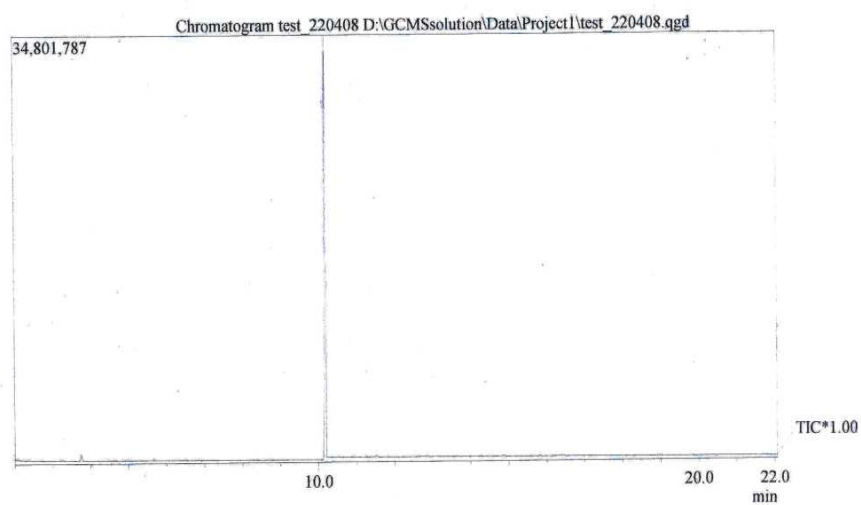
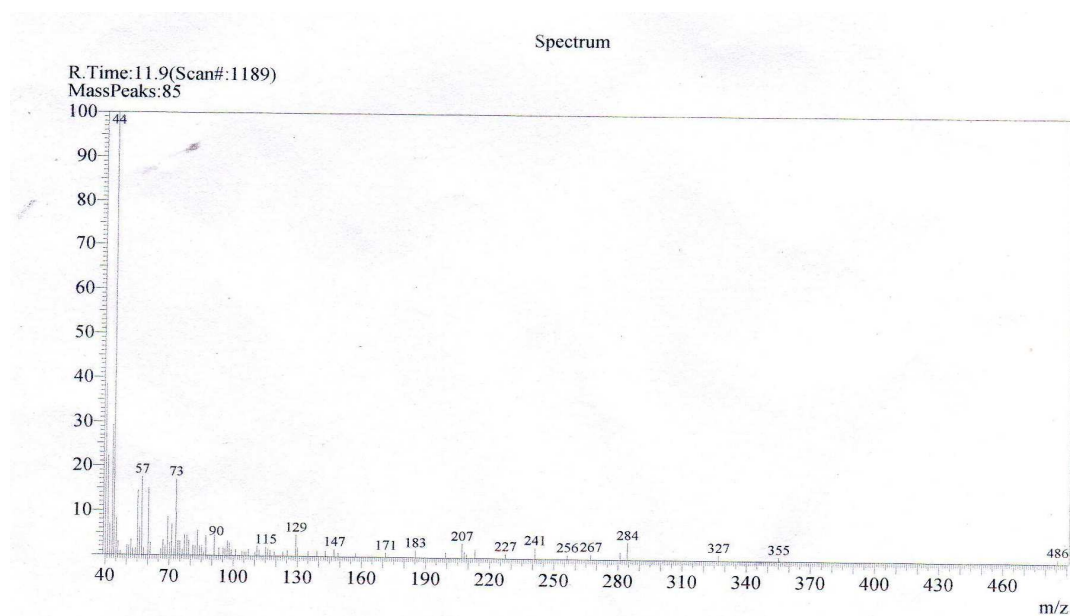
F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 250.1300000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
GB: 0
PC: 2.00

1D NMR plot parameters
CX: 2.00000000 cm
CT: 2.00000000 cm
F1: 200.1300000 MHz
F2: -0.370 ppm
F3: -82.54 Hz
FREQM: 0.168466 ppm/cm
HDCM: 51.08223 Hz/cm

RMN¹³C du 6-0-dodécanoyle-D-glucopyranose



GCMS du 6-0-dodécanoyle-D-glucopyranose



Spectre IR du 6-0-dodécanoyle-D-glucopyranose

