

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



BADJI MOKHTAR -ANNABA
UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
ANNABA

جامعة باجي مختار
- عنابة -

Faculté des Sciences

Année : 2022

Département de Chimie

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Doctorat en Sciences*

Les esters de sucres. Synthèse et optimisation.

Option

Chimie Organique

Par

M^r Rezgui Nacer

Directrice de thèse: M^{me} Bidjou-Haiour Chahra Professeur

U.B.M. Annaba

Devant le jury

President :	M ^r Boukhari Abbès	Professeur	U.B.M. Annaba
Examineurs :	M ^{me} Belghiche Robila	Professeur	U.B.M. Annaba
	M ^r Chouchane Toufik	Directeur de recherches	C.R.T.I. Annaba
	M ^r Guenadil Faouzi	Maître de conférences A	U. El-Taref
	M ^{me} Boudiba Sameh	Maître de conférences A	U. Tebessa

DEDICACES

*Avant de présenter et opposer l'hommage nécessaire de cet ouvrage par des dédicaces à tous ceux et celles auxquels je tiens beaucoup, je remercie **Allah** de m'avoir prêté forces et persévérances jusqu'à l'accomplissement de ce travail.*

Je dédie donc ce travail à :

Mes très chers parents, avant tout et partout, pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard et pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance... Que dieu vous protège et vous garde pour nous.

*A celle qui m'a soutenu, suivi mes pas, et m'a apaisé les pendant les difficultés ; À ma chère épouse, **Naima**, qui a m'a beaucoup soutenue et ma présence ici n'aurait pas eu lieu sans ses encouragements constants.*

*A mon fils **Adam**.*

*Et ma fille, **Tasnim**.*

*A mes frères : **Rachid, Ayoub, Abouda, Allaa, ilyes**.*

A tous les membres de ma famille

A mes amis(es).

Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Nacer

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au Laboratoire de synthèse Organique, Modélisation et Optimisation des Procédés chimiques (LOMOP) de l'Université Badji-Mokhtar de Annaba.

C'est avec une certaine émotion et beaucoup de sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes ayant soutenu et apprécié mon travail.

Je voudrais remercier en particulier:

Madame **Chahra BIDJOU-HAIOUR**, Professeur de l'Université d'Annaba, ma Directrice de thèse, pour la confiance qu'elle a mis en moi en me proposant le sujet et qui m'a dirigée tout au long de ces années d'études. Au travers de nos discussions, elle m'a apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet. Je salue sa souplesse et l'ouverture de son esprit qui ont contribué à me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche. Son encadrement était des plus exemplaires.

Le Professeur **Abbès BOUKHARI**, de l'Université d'Annaba me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je l'en remercie.

Je le remercie également pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche, et pour les conseils stimulants que j'ai eu l'honneur de recevoir de sa part. Son œil critique m'a été très précieux. J'ai apprécié l'ambiance d'équipe qui s'est formée. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse toute ma reconnaissance.

Je remercie également les membres de jury :

M^{me} Belghiche Robila, Professeur de l'Université d'Annaba, **M^r Chouchane Toufik**, Directeur de Recherches au C.R.T.I, **M^r Guenadil Faouzi**, Maître de conférences A à l'Université d'El-Tarf et **M^{me} Boudiba Sameh**, Maître de conférences A à l'Université de Tébessa, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Ils vont contribuer, par leurs remarques et suggestions, à améliorer la qualité de ce mémoire. Je leur en suis très reconnaissant et leur adresse mes vifs remerciements.

J'exprime aussi mes remerciements distingués à mesdames ***Klai Nadia*** et ***Bouzaouit Nadia*** pour leur aide précieuse durant toute la durée de ce travail ainsi que pour les conseils stimulants que j'ai eu l'honneur de recevoir de leur part.

J'adresse également mes remerciements, à tous mes enseignants de mon parcours d'étude, qui m'ont donné les bases scientifiques nécessaires.

D'autres personnes m'ont encouragé à finir ce travail par des gestes d'amitié et auxquels je suis reconnaissant. Je citerai : ***Akram Soltani, Issam, Ilyes, Ayoub, Bilal, Amir, Imad.***

Sur cette page, la difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne, alors mes sincères remerciements vont à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Je remercie enfin toutes les personnes intéressées par mon travail, en espérant qu'elles puissent trouver dans mon rapport des explications utiles pour leurs propres travaux.

Résumé

Les esters de sucres, en particulier les esters de glucopyranose, sont des tensioactifs non-ioniques, connus pour leur biodégradabilité. Ils possèdent une grande particularité structurale qui autorise leur nombreuse application dans les industries alimentaires, détergentes, cosmétiques et pharmaceutiques.

Ce travail concerne l'optimisation de la réaction d'estérification enzymatique du glucose avec les lipases. Pour ce faire une étude préliminaire concernant l'acylation enzymatique du D-glucose en présence de la lipase de *Candida antarctica* B est entreprise. Les paramètres réactionnels optimisés sont retenus pour la suite de l'étude.

Dans un but d'optimisation les conditions réactionnelles, les lipases *Pancréatique de porc* et de *Candida cylindracea* sont par la suite modifiées par le processus de l'immobilisation, à savoir l'adsorption sur un support solide et l'encapsulation par des tensioactifs non ioniques. Elles sont caractérisées à l'aide des techniques de la microscopie électronique à balayage, associée à la microanalyse par énergie dispersive de rayon X et de la diffraction des rayons X. Elles sont par la suite testées dans la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose avec l'acide laurique, sous les conditions préalablement trouvées.

Une étude de solvant est faite par l'utilisation de différents milieux (organique, liquide ionique) avec des polarités différentes, le tétrahydrofurane, le 2-méthylbutan-2-ol, le diméthylsulfoxyde, l'éthylméthylcétone, le 1-butyl-3-méthyl-imidazolium tétrafluoroborate et le 1-éthyl-3-méthyl-imidazolium tétrafluoroborate.

Les nouvelles lipases synthétisées possèdent une activité catalytique élevée.

La meilleure conversion (54.5 %) est celle obtenue en présence de la lipase *Pancréatique de porc* enrobée avec le span 65, à 60°C au bout de 72 h dans le mélange binaire (1-butyl-3-méthyl-imidazolium tétrafluoroborate/diméthylsulfoxyde) : (1ml/50µl).

Mots clés : D-glucose, lipases, estérification, solvant organique, solvant ionique.

Abstract

Sugar esters, in particular glucopyranose esters, are non-ionic surfactants, known for their biodegradability. They have a great structural particularity which authorizes their numerous applications in food, detergent, cosmetic and pharmaceutical industries.

This work is concerned with the lipase-catalyzed optimization of the esterification of glucose. A preliminary study concerning enzymatic esterification of D-glucose with *Candida antarctica* B lipase is undertaken. The optimized reaction parameters are retained for the rest of the study.

For the purpose of optimization the reaction conditions, lipases from *Pancreatic porc* and *Candida cylindracea* are subsequently modified by the process of immobilization. They were adsorbed on a solid support or coated by non-ionic surfactants. They are characterized using scanning electron microscopy associated with energy dispersive X-ray microanalysis and X-ray diffraction.

They are then tested in the enzymatic esterification reaction of D-glucose with lauric acid, under the conditions previously found.

A solvent study is made by the use of organic or ionic liquid media with different polarities like tetrahydrofuran, 2-methylbutan-2-ol, dimethylsulfoxide, ethylmethylketone, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. The new synthesized lipases possess a high catalytic activity. The best conversion (54.5%) is that obtained with *Pancreatic porc* lipase coated with span 65 at 60°C after 72h in the mixture of (1-butyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate/dimethylsulfoxide) : (1ml/50µl).

Keywords: D-glucose, lipases, esterification, organic solvent, ionic solvent.

الملخص

استرات السكر ، وبالأخص استرات الجلوكوبيرانوز ، هي مواد خافضة للتوتر السطحي غير أيونية ، معروفة بقابليتها للتحلل البيولوجي. لديها خصائص هيكلية كبيرة مما يسمح لنا بتطبيقها في عدة مجالات منها الصناعات الغذائية والمنظفات ومستحضرات التجميل والمواد الصيدلانية.

يتعلق هذا العمل بتحسين تفاعل الأسترة الأنزيمية للجلوكوز مع الليباز. وللقيام بذلك، قمنا بإجراء دراسة أولية تتعلق بتفاعلات الأسيلة الأنزيمية للجلوكوز-د- في وجود انزيم *Candida antarctica* B. ومنه يتم ضبط المتغيرات الأمثل التفاعل لبقية الدراسة.

من اجل هدف التحسين من متغيرات التفاعل قمنا بعملية تعديل لليبازات (*Pancreatique de porc* (PPL) و *Candida cylindracea* (CCL) عن طريق عملية التثبيت ، اي الإمتزاز على دعامة صلبة والتغليف بواسطة مواد خافضة للتوتر السطحي غير أيونية. التي يتم توضيح تركيبها باستخدام تقنيات المسح المجهر الإلكتروني ، المرتبطة بالتحليل الدقيق للأشعة السينية المشتتة للطاقة وانحراف الأشعة السينية. التي سوف نقوم فيما بعد باختبارها في تفاعل الأسترة للجلوكوز-د- مع حمض اللوريك ، في ظل الظروف التي تم ضبطها مسبقاً.

تم إجراء دراسة للمذيبات باستخدام واطاس مختلفة (سائل عضوي ، أيوني) ذات قطبيات مختلفة رباعي هيدرو الفوران، (THF) مثيل-2-بوتانول(2M2B) ، وثنائي مثيل سلفوكسيد(DMSO) و ايثيل مثيل سبتون (EMC) عند 60 درجة مئوية ، السوائل الأيونية إيميدازوليوم: 1-بيوتيل-3-ميثيل-إيميدازوليوم رباعي فلورو بورات (LI1) و 1-إيثيل-3-ميثيل-إيميدازوليوم رباعي فلورو بورات(LI2) .

تمتلك الليبازات المركبة الجديدة نشاطاً تحفيزياً عالياً، 54.5٪ في وجود PPL C65 عند 60 درجة مئوية بعد 72 ساعة في الوسط (LI1/DMSO) (1مل/50ميكرو لتر)

الكلمات المفتاحية: د-جلوكوز ، ليباز ، أسترة ، مذيب عضوي ، مذيب أيوني.

Sommaire

<i>DEDICACES</i>	I
<i>REMERCIEMENTS</i>	II
Résumé	IV
Abstract	V
المخلص	VI
Liste des tableaux	XII
Liste des figures	XIV
Liste des schémas	XVI
Liste des abréviations	XVII
Introduction générale.....	

Etude bibliographie

I. Les enzymes	5
1. Définition des enzymes	5
2. Activité enzymatique.....	5
3. Facteurs qui influencent l'activité enzymatique.....	6
4. Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat	7
a. Modèle de Fisher : Clé-serrure	7
b. Modèle de Koshland : Ajustement induit.....	8
c. Modèle de Strain-Jenks	8
5. Classification des enzymes.....	8
a. Les oxydo-réductases	9
b. Les transférases	9
c. Les hydrolases	9
d. Les lyases	9
e. Les isomérases.....	9
f. Les ligases (synthétases)	9
6. Les Lipases	10
a. Généralités.....	10
b. Structure et Mécanismes des lipases	10
- Etape d'acylation :	12
- Etape de désacylation :.....	13

c. Réactions réalisables par les lipases	14
1. La réaction d'hydrolyse	15
2. Réactions d'estérification	15
a. L'estérification :	15
b. la transestérification :	15
c. L'interestérification :	15
d. L'aminolyse ou amidation :	15
e. La catalyse enzymatique	16
II. Les esters de sucres	17
1. Introduction	17
2. Différentes méthodes de synthèse des esters de sucres	18
a. Méthodes par voie chimique	18
b. Méthodes par voie enzymatique	20
3. Influence du milieu réactionnel	21
a. Influence du solvant	22
1. Solvants organiques	22
2. Les liquides ioniques	24
a. Définition	25
b. Propriétés physico-chimiques des liquides ioniques	27
1. Le point de fusion	28
2. Densité et Viscosité	29
a. La densité	29
b. La viscosité	29
3. Solubilité	30
a. Solubilité dans l'eau	30
b. Solubilité dans les solvants organiques	32
4. Toxicité et biodégradabilité	32
c. Application des liquides ioniques	32
1. Biocatalyse	33
2. En électrochimie	34
3. Catalyse chimique	34
3. Influence de la nature de la lipase	34
a. Immobilisation des enzymes	35
1. Les différentes techniques d'immobilisation	36

a. Immobilisation par adsorption.....	37
b. Immobilisation par liaison covalente	39
• Immobilisation par réticulation:.....	39
• Immobilisation sur support:	39
c. Immobilisation par inclusion	40
d. Immobilisation par encapsulation	40
4. Influence d'autres facteurs	44
a. Influence de la longueur de la chaîne de l'agent acylant.....	44
b. Influence de la température	44
c. Influence du rapport molaire entre les substrats.....	45

Chapitre I- Acylation enzymatique du D-glucose. Etude préliminaire

I. Introduction.....	46
II. Réaction d'acylation des sucres.....	47
1. Acylation par voie chimique	47
2. Acylation par voie enzymatique.....	48
III. Synthèse du 6- <i>O</i> -Dodecanoyl-D-glucopyranose.....	49
IV. Résultats et Discussion.....	50
1. Influence du milieu réactionnel.....	51
a. Influence du solvant.....	51
b. Influence de l'agent acylant	53
1. Effet de la nature de l'agent acylant.....	53
2. Effet de la proportion Glucose /Agent Acylant (Glc/AA)	54
c. Influence de la quantité de lipase	55
d. Influence de la quantité du tamis moléculaire.....	57
e. Influence de la température	58
V. Caractérisation spectroscopique du 6- <i>O</i> -Dodecanoyl-D-glucopyranose	59
VI. Conclusion	64

Chapitre II-Influence du milieu réactionnel sur l'acylation enzymatique du D-glucose. Etude de l'effet de la modification des lipases.

I. Introduction.....	65
II. Résultats et discussions	65
1. Modification des lipases.....	65

a. Modification des lipases par immobilisation (adsorption)	66
b. Modification des lipases par encapsulation (enrobage)	67
2. Mesure de la concentration des lipases modifiées par la méthode de Bradford.....	68
a. Calcul des concentrations des enzymes modifiés.....	68
3. Etude structurale de la lipase de <i>Candida cylindracea</i> modifiée	72
a. Par encapsulation avec les span 60 (CCL C60) et 65 (CCL C65).....	72
1. Microscopie Electronique à Balayage (MEB) couplée à l'EDX.....	72
2. Diffraction des Rayons X (DRX).....	76
b. Par immobilisation sur la celite (CCL Ic)	77
4. Etude structurale de la lipase <i>Pancréatique de porc</i> modifiée.....	78
a. Par encapsulation par le span 65 (PPL C65)	78
b. Par immobilisation sur la celite (PPL Ic)	80
5. Effet de la modification des lipases sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique de l' α -(+)-D-glucose	81
a. Cas de la CCL.....	82
b. Cas de la PPL	83
6. Comparaison des lipases modifiées avec la CAL B.....	84
III. Conclusion.....	86

***Chapitre III- Influence du milieu réactionnel sur l'acylation enzymatique du D-glucose.
Etude de l'effet de solvant***

I. Introduction.....	91
II. Influence de la solubilité sur la réaction d'estérification.....	91
1. Test de solubilité	91
III. Influence du milieu réactionnel.....	92
1. Résultats	93
a. Cas de la CCL Ic.....	93
i. Réactions en milieu solvant seul	93
ii. Influence du co-solvant	93
b. Cas de la CCL Is.....	94
i. Réactions en milieu solvant seul	94
ii. Influence du co-solvant	95
c. Cas de la PPL Ic	96
i. Réactions en milieu solvant seul	96

i. Influence du co-solvant	96
d. Cas de la PPL Is	97
i. Réactions en milieu solvant seul	97
ii. Influence du co-solvant	98
e. Cas de la PPL C65	98
i. Réactions en milieu solvant seul	98
ii. Influence du co-solvant	99
III. Discussion	100
IV. Conclusion	103
Conclusion générale	111

Partie expérimentale

I. Généralités et appareillages	108
1. Solvants et réactifs commerciaux.....	108
2. Méthodes chromatographiques.....	108
3. Analyse par Résonance magnétique nucléaire RMN	108
4. Spectroscopie infrarouges (IR).....	108
5. Diffraction des Rayons X (DRX).....	108
6. Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	109
II. Protocoles opératoires.....	109
1. Immobilisation de la lipase Pancréatique de porc (PPL) et de la lipase de <i>Candida cylindracea</i> (CCL)	109
a. Préparation des solutions mères	109
b. Préparation des solutions tampons (pH = 8 ; 0.2 M).....	109
c. Protocole opératoire de l'immobilisation	109
2. Enrobage de la lipase <i>Pancréatique de porc</i> (PPL) et de la lipase de <i>Candida cylindracea</i> (CCL)	110
a. Protocole opératoire de l'enrobage des lipases par les tensioactifs (<i>Coated lipase</i>)	110
3. Dosage des protéines	110
a. Préparation de Réactif de Bradford	110
b. Mode opératoire	110
4. Estérification enzymatique des sucres.....	111
a. Procédure générale	111

b. Mesure de la conversion (C%)	111
c. Caractérisation du 6- <i>O</i> -Dodécanoyl-D-glucopyranose	112

Liste des tableaux

Etude bibliographie

Tableau 1	<i>Exemple d'anions de liquide ionique</i>	27
Tableau 2	<i>Propriétés physiques de quelques liquides ioniques, à température ambiante</i>	30
Tableau 3	<i>solubilité du binaire liquide ionique/eau à 25°C</i>	31

Chapitre I- *Acylation enzymatique du D-glucose. Etude préliminaire*

Tableau 4	<i>Influence du solvant sur la conversion.</i>	52
Tableau 5	<i>Influence de la nature de l'agent acylant sur la conversion.</i>	53
Tableau 6	<i>Influence de la proportion d'agent acylant sur la conversion</i>	54
Tableau 7	<i>Influence de la quantité d'enzyme sur la conversion</i>	55
Tableau 8	<i>Influence de la quantité de tamis moléculaire sur la conversion.</i>	58
Tableau 9	<i>Influence de la température sur la conversion</i>	59

Chapitre II- *Influence du milieu réactionnel sur l'acylation enzymatique du D-glucose. Etude de l'effet de la modification des lipases.*

Tableau 10	<i>Influence de la modification dans le cas de la CCL.</i>	69
Tableau 11	<i>Influence de la modification dans le cas de la PPL.</i>	69
Tableau 12	<i>Caractéristiques physico-chimiques des spanes</i>	71
Tableau 13	<i>Données de l'analyse EDX de la CCL C60.</i>	74
Tableau 14	<i>Données de l'analyse EDX de la CCL C65.</i>	75
Tableau 15	<i>Données de l'analyse EDX du CCL.</i>	78
Tableau 16	<i>Données de l'analyse EDX du PPL C65.</i>	80
Tableau 17	<i>Données de l'analyse EDX du PPL Ic.</i>	81
Tableau 18	<i>Suivi cinétique de l'influence de de la lipase sur la conversion dans le cas de la CCL.</i>	82
Tableau 19	<i>Suivi cinétique de l'influence de de la lipase sur la conversion dans le cas de la PPL.</i>	83
Tableau 20	<i>Comparaison des lipases modifiées avec la CAL B.</i>	84

**Chapitre III : Influence du milieu réactionnel sur
l'acylation enzymatique du D-glucose. Etude de l'effet de
solvant**

Tableau 21	<i>Solubilité de l' $\alpha(+)$ D-glucose.</i>	92
Tableau 22	<i>Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la CCL Ic.</i>	93
Tableau 23	<i>Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la CCL Ic.</i>	94
Tableau 24	<i>Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la CCL Is.</i>	94
Tableau 25	<i>Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la CCL Is.</i>	95
Tableau 26	<i>Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la PPL Ic.</i>	96
Tableau 27	<i>Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la PPL Ic.</i>	97
Tableau 28	<i>Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la PPL Is.</i>	97
Tableau 29	<i>Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la PPL Is.</i>	98
Tableau 30	<i>Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la PPL C65.</i>	99
Tableau 31	<i>Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la PPL C65.</i>	99

Liste des figures

Introduction générale

Figure 1	<i>Exemple de sucro-ester.</i>	1
-----------------	--------------------------------	---

Etude bibliographique

Figure 2	<i>Structure secondaire du repliement α/β des hydrolases.</i>	11
Figure 3	<i>Structure de la CAL B.</i>	12
Figure 4a	<i>Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme.</i>	17
Figure 4b	<i>Effet de la diminution de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules susceptibles de réagir.</i>	17
Figure 5	<i>Les différentes techniques d'immobilisation d'enzymes</i>	37
Figure 6	<i>Bactérie piégée dans un gel humide ¹⁷⁴</i>	41
Figure 7	<i>Capsule a) sans et b) avec cellules</i>	42
Figure 8	<i>Encapsulation d'enzyme dans une particule d'or creuse</i>	42
Figure 9	<i>Enrobage des enzymes</i>	43

Chapitre I- Acylation enzymatique du D-glucose. Etude préliminaire

Figure 10	<i>Représentation schématique du volet amphiphile et du phénomène d'activation interfaciale en milieu organique.</i>	57
------------------	--	----

Chapitre II- Influence du milieu réactionnel sur l'acylation enzymatique du D-glucose. Etude de l'effet de la modification des lipases.

Figure 11	<i>Courbe d'étalonnage du BSA</i>	68
Figure 12	<i>Observation microscopique MEB de la CCL libre</i>	73
Figure 13	<i>Observations microscopiques MEB de a) span 60 et b) CCL C60</i>	73
Figure 14	<i>Observations microscopiques MEB de a) span 65 et b) CCL C65</i>	75
Figure 15	<i>Spectres DRX de (a) span 65 et (b) CCL C65</i>	76
Figure 16	<i>Spectres DRX de (a) span 60 et (b) CCL C60.</i>	76
Figure 17	<i>Observations microscopiques MEB de a) celite et b) CCL Ic</i>	77
Figure 18	<i>Observation microscopique MEB de la PPL libre</i>	79
Figure 19	<i>Observations microscopiques MEB de a) span 65 et b) PPL C65</i>	79

Figure 20	<i>Observations microscopiques a) celite, b) PPL Ic par MEB</i>	81
Figure 21	<i>Spectre électronique par microanalyse EDX de la CCL</i>	88
Figure 22	<i>Spectre électronique par microanalyse EDX de la PPL</i>	88
Figure 23	<i>Spectre électronique par microanalyse EDX de la CCL Ic</i>	89
Figure 24	<i>Spectre électronique par microanalyse EDX de la CCL C65</i>	89
Figure 25	<i>Spectre électronique par microanalyse EDX de la CCL C65</i>	89
Figure 26	<i>Spectre électronique par microanalyse EDX de la PPL Ic.</i>	90
Figure 27	<i>Spectre électronique par microanalyse EDX de PPL C65</i>	90

Liste des schémas

Etude bibliographique

Schéma 1	<i>Mécanisme d'un cycle de catalyse enzymatique</i>	7
Schéma 2	<i>Le site actif modèle de Fisher</i>	7
Schéma 3	<i>Site actif, modèle de Koshland</i>	8
Schéma 4	<i>Site actif Modèle de Strain-Jenks</i>	8
Schéma 5	<i>Mécanisme catalytique proposé pour les lipases</i>	14
Schéma 6	<i>Différentes réactions possibles par utilisation de lipases</i>	16
Schéma 7	<i>Synthèse d'ester de saccharose par transestérification de polyols de sucre</i>	19
Schéma 8	<i>Estérification de l'amidon à l'aide d'anhydrides</i>	19
Schéma 9	<i>Synthèse du palmitate de 6-O-glucose en présence de la CAL B.</i>	20
Schéma 10	<i>Estérification du D-glucose avec des acides gras.</i>	21
Schéma 11	<i>Estérification du L(+)-arabinose avec l'acide palmitique.</i>	21
Schéma 12	<i>Cations des liquides ioniques</i>	26
Schéma 13	<i>Etapes impliquées dans la formation du biocapteur</i>	40
Schéma 14	<i>Influence de la longueur de la chaîne de l'agent acylant</i>	44
Schéma 15	<i>Influence de la température sur la vitesse de la réaction</i>	44
Schéma 16	<i>Influence du rapport molaire entre les substrats.</i>	45

Chapitre I: Acylation enzymatique du D-glucose. Etude préliminaire

Schéma 17	<i>Schéma général de la réaction d'acylation par voie enzymatique</i>	48
Schéma 18	<i>Estérification de l'α-(+)-D-glucose</i>	49
Schéma 19	<i>Transestérification de l'α-(+)-D-glucose</i>	49
Schéma 20	<i>Estérification enzymatique de l'α-(+)-D-glucose</i>	50
Schéma 21	<i>Synthèse d'une série de 6-O-acylglucose</i>	51
Schéma 22	<i>Les différentes formes du D-glucose en équilibre.</i>	60
Schéma 23	<i>Structure de 6-O-Dodecanoyl-D-glucopyranose</i>	60

Chapitre II : Influence du milieu réactionnel sur l'acylation enzymatique du D-glucose. Etude de l'effet de la modification des lipases.

Schéma 24	<i>Réaction d'estérification enzymatique de l'α-(+)-D-glucose</i>	82
------------------	---	----

Liste des abréviations

[Bmim][BF₄]	1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate
[Bmim][PF₆]	1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate
°C	Degré Celsius
µl	Micro litre
2M2B	2Methylbutan-2-ol
Å	Angström
AA	Agent acylant
Al	Acide laurique
Ap	Acide palmitique
As	Acide stearique
BHL	Balance hydrophobe-lipophile
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Conversion
c	Celite
CAL	Lipase de <i>Candida antarctica</i>
CAL B	Lipase de <i>Candida Antractica B</i>
Cat	Catalyseur
CCL	Lipases de <i>Candida cylindracéa</i>
CCL I	Lipase de <i>Candida cylindracéa</i> immobilisée
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl₃	Chloroforme deutéré
CMC	Concentration Micellaire Critique
DCM	Dichlorométhane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRX	Diffraction des Rayons X
E	Enzyme
EDX	Energie Dispersive de rayon X
EMC	Ethylmethylcétone
éq	Nombre d'équivalents grammes
ES	Enzyme-Substrat
FDA	Administration des aliments et des médicaments
h	heure

HPL	lipase <i>Pancréatique humaine</i>
HRP	Lipase <i>horseradish peroxydase</i>
Hz	Hertze
KDa	Kilo Dalton
KeV	Kilo électron volte
LI	Liquide ionique
LI1	le 1-butyl-3-méthyl-imidazolium tétrafluoroborate
LI2	1-éthyl-3-méthyl-imidazolium tétrafluoroborate
LIs	Liquides ioniques
Log p	coefficient de partage octanol/eau
M	Masse moléculaire
MEB	la Microscopie Electronique à Balayage
min	Minute
MML	Lipase de <i>Mucor miehei</i>
mol	Mole
MPa	Mégapascal
PCMC	microcristaux coted de protéines
PPL	Lipase <i>Pancréatique de porc</i>
PPL I	Lipase <i>Pancréatique de porc</i> immobilisé
ppm	Partie par million
PSL-C	lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
Qe	Quantité d'enzyme
Rdt	Rendement
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
RMN ¹³C	La Résonance Magnétique Nucléaire de Carbone 13
RMN ¹H	La Résonance Magnétique Nucléaire de Proton
RX	Rayons X
S	substrat
s	Seconde
span 60	monostéarate de sorbitan
span 65	tristéarate de sorbitan
span 80	monooléate de sorbitan
span 85	trioléate de sorbitan

T°	Température
t-BuOH	Tertio-butanol
THF	Tetrahydrofurane
TLL	Lipase <i>de Thermomyces lanuginosus</i>
TM	Tamis Moléculaire
v/v	Volume/volume
µg/mL	Microgramme par millilitre

Introduction générale

La synthèse de dérivés fonctionnels de molécules à potentialité tensioactive telles que les esters de sucres constitue un domaine d'étude en expansion continue. Le développement des produits et des procédés verts concurrentiels vis-à-vis des produits et des procédés chimiques se basent actuellement sur les concepts de la chimie verte et du développement durable^{1,2}. Le coût des matières premières, impose le recours à des procédés simples et peu coûteux. C'est le cas des biotensioactifs à base des sucres obtenus par la voie enzymatique³. La synthèse de ces composés à partir uniquement de matières première renouvelables passe par la connexion d'une partie hydrophile et d'une partie lipophile en présence d'une enzyme.

Grâce à leur disponibilité, les sucres (en tant que têtes polaires) et les acides gras (en tant que têtes apolaires) ont trouvé, au cours des dernières décennies leur place dans la réaction d'estérification⁴.

Les tensioactifs non ioniques d'origine naturelle les plus connus sont les sucro-esters^{5,6}.

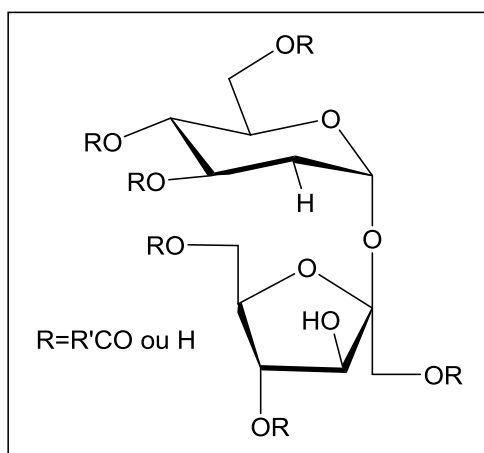


Figure 1- Exemple de sucro-ester.

Ce sont des molécules biodégradables de caractère inoffensifs pour la santé et l'environnement. Elles sont totalement biocompatibles et peuvent être utilisés dans toutes les applications en contact direct avec l'homme telles que l'agroalimentaire⁷, la pharmacie⁸, les

¹ H. Oka, K. Aimonio, S. Tsuyutani, T. Fujita, K. Hashiba. *Eur. Patent EP 492397, Kao Corp.* **1992**.

² H. Lüders, *Eur. Patent EP 252241, Hüls AG.* **1987**.

³ H.A. El-Baz, A.M. Elazzazy, T.S. Saleh, M. Dourou, J.A. Mahyoub, M.N. Baeshen, H.R. Madian, and G. Aggelis. Enzymatic Synthesis of Glucose Fatty Acid Esters Using SCOs as Acyl Group-Donors and Their Biological Activities. *Applied Sciences.* **2021**, 11, 2700.

⁴ N. Nicolas, B. Thierry, P. Daniel. Tensioactifs à base de substances renouvelables. *L'actualité chimique.* **2000**. 70, 75.

⁵ T. Raku, M. Kitagawa, H. Shimakawa, Y. Tokiwa. Enzymatic synthesis of hydrophilic undecylenic acid sugar esters and their biodegradability. *Biotechnology letters.* **2003**, 161, 166.

⁶ T. Raku, M. Kitagawa, H. Shimakawa, Y. Tokiwa. Enzymatic synthesis of trehalose esters having lipophilicity. *Journal of biotechnology.* **2003**, 100, 208.

⁷ N. do Amaral Sampaio Neta, J.C. Sousa dos Santos, S. de Oliveira Sancho, S. Rodrigues, L. Rocha Barros Goncalves, L.R. Rodrigues, J.A. Teixeira. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids.* **2012**, 27, 331.

détergents, les cosmétiques⁹, les additifs alimentaires...etc¹⁰. Selon les fractions glucidiques et acyles choisies, les esters de sucres et d'acides gras se sont avérés avoir des propriétés anti-oxydantes¹¹, anti-microbiennes^{12,13,14}, insecticides¹⁵ et anti-tumorales¹⁶. Ils peuvent être obtenus par voie chimique à l'aide de catalyseurs alcalins¹⁷, mais cette stratégie nécessite des températures élevées et l'utilisation de solvants dangereux comme la pyridine, qui n'est pas compatible avec les applications alimentaires. Par ailleurs, comme tous les groupes hydroxyles glucidiques présentent une réactivité similaire, il en résulte généralement des mélanges d'esters, sans aucun contrôle de la composition du produit réactionnel¹⁸.

Des enzymes telles que les lipases, les protéases et les estérases sont capables de catalyser la synthèse d'esters de sucres et d'acide gras avec une sélectivité élevée, donnant directement des mono-esters sans nécessiter d'étapes de protection et de déprotection supplémentaires¹⁹. Parmi elles, les lipases sont les enzymes les plus utilisées pour catalyser la synthèse de tels composés. Ces enzymes sont actives dans de nombreux solvants organiques et à des températures plus basses. La voie enzymatique a donc été largement étudiée comme une alternative plus douce et plus verte pour synthétiser les esters de sucres à base d'acides gras²⁰.

Il est à noter que la production globale des esters du sucres est estimée à 6000 t/an²¹. Au Japon, ils sont autorisés dans tous les domaines à partir de 1957; aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) autorise l'utilisation des sucro-esters en 1983 comme

⁸ L. Schiefelbein, M. Keller, F. Weissmann, M. Luber, F. Bracher, W. Friess. Synthesis, characterization and assessment of suitability of trehalose fatty acid esters as alternatives for polysorbates in protein formulation. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. **2012**, 76, 350.

⁹ N.R. Kahn, V.K. Rathod. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. *Process Biochemistry*. 2015, 50, 1806.

¹⁰ C. N. Mulligan. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollution*. **2004**, 133, 198.

¹¹ S.W. Hsieh, M.R. Lee, C.W. Tsai, L.Y. Lai, T. Yeh, C.W. Hsieh, T.J. Yang, S.W. Chang. Enzymatic synthesis, purification and identification of bioactive trehalose ester derivatives for health applications. *Food Bioprod. Process*. **2015**, 95, 172.

¹² M. Habulin, S. Sabeder, Z. Knez. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. *The Journal of Supercritical Fluids*. **2008**, 45, 345.

¹³ M. Ferrer, J. Soliveri, F.J. Plou, N. Lopez-Cortes, D. Reyes-Duartes, M. Christensen, J.L. Copa-Patino, A. Ballesteros. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties, *Enzyme and Microbial Technology*. **2005**, 36, 398.

¹⁴ T. Watanabe, S. Katayama, M. Matsubara, Y. Honda, M. Kuwahara. Antibacterial carbohydrate monoesters suppressing cell growth of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. *Current microbiology*. **2000**, 41, 213.

¹⁵ J.K. Peterson, H.F. Harrison, O.T. Chortyk. Effects of various synthetic sucrose esters on weed seed germination and crop growth: structure - activity and dose - response relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1997**, 45, 4837.

¹⁶ S. Okabe, M. Saganuma, Y. Tada. Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factor - alpha release are new anti-cancer agents. *Japanese journal of cancer research*. **1999**, 90, 676.

¹⁷ C.C. Akoh, B.G. Swanson. Synthesis and properties of alkyl glycoside and stachyose fatty acid polyesters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1989**, 66, 1301.

¹⁸ G. Paggiola. Biocatalysis in bio-derived solvents: an improved approach for medium optimisation, *Green Chemistry*. **2014**, 16, 2110.

¹⁹ P. Fickers, J. Destain, P. Thonart. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie agronomie, société et environnement*. **2008**, 12, 130.

²⁰ A. Dounia, G. Etienne, N. Stéphane, 6-O-glucose palmitate synthesis with lipase: Investigation of some key parameters. *Molecular Catalysis*. **2018**, 460, 68.

²¹ A. K. Chandel, R. Rudravaram, L. V. Rao, P. Ravindr, M. L. Narasu. Industrial enzymes in bioindustrial sector development: an Indian perspective. *Journal. Commercial Biotechnology*. **2007**, 13, 283.

émulsifiants et agents de texture dans l'alimentation ou comme couche protectrice pour la conservation des fruits²². En Europe, la consommation alimentaire de sucro-esters (E473) est autorisée en 1989 et est limitée à 25 mg/j/kg.

La demande en esters de sucres devrait accroître avec la découverte de nouveaux procédés plus sélectifs de fabrication des composés répondant aux exigences économiques et environnementales²³.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la production d'ester de glucose par la voie enzymatique, moyennant la réaction d'estérification en présence d'un acide gras. Une étude d'optimisation est réalisée par la valorisation des lipases non couteuses telles que les lipases de *Candida cylindracea* (CCL) et *Pancréatique de porc* (PPL) et de solvants non conventionnels comme les liquides ioniques. Dans cette optique, tous les résultats obtenus sont comparés avec ceux obtenus dans la même réaction d'estérification catalysée par une lipase immobilisée commerciale, la lipase de *Candida antarctica* (CAL B).

L'objectif de cette thèse est donc d'optimiser la synthèse du 6-*O*-Dodecanoyl-D-glucopyranose en étudiant l'influence de plusieurs paramètres opératoires sur la conversion.

La première partie de ce mémoire est consacrée à une étude bibliographique sur les enzymes, leurs domaines d'application ainsi que les différentes méthodes de modification des enzymes permettant d'améliorer leurs activités catalytiques. Nous avons aussi présenté les esters de sucres, leurs différents modes d'accès et l'influence des paramètres réactionnels sur la réaction d'estérification enzymatique.

Les résultats de ce travail sont regroupés dans trois chapitres distincts.

Un premier chapitre est consacré à une étude préliminaire sur l'acylation enzymatique du D-glucose avec la lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) afin de déterminer les conditions opératoires optimales.

Un deuxième chapitre suit et concerne les effets de la modification des lipases libres. Les lipases *Pancréatique de porc* (PPL) et de *Candida cylindracea* (CCL) sont modifiées par les techniques de l'immobilisation sur un support solide et l'encapsulation avec des tensioactifs non ioniques (span). Elles sont par la suite testées dans la réaction d'estérification

²² S. Nakamura. Using sucrose esters as food emulsifiers. *Inform* **1997**, 8, 874.

²³ S. Cassel, C. Debaig, T. Benvegny, P. Chaimbault, M. Lafosse, D. Plusquellec, P. Rollin. Original synthesis of linear, branched and cyclic oligoglycerol standards. *European Journal of Organic Chemistry*. **2001**, 875, 1829.

enzymatique du D-glucose. Une caractérisation des nouvelles lipases synthétisées est réalisée à l'aide des techniques de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) associée à la microanalyse par Energie Dispersive de rayon X (EDX) et de la Diffraction des Rayons X (DRX).

Dans le troisième chapitre, les enzymes modifiées ont été utilisées pour déterminer l'effet du solvant sur l'avancement de la réaction. La réaction d'estérification est effectuée dans un des solvants organiques avec différentes polarités. Les liquides ioniques sont par la suite examinés comme une alternative verte aux solvants organiques²⁴. Enfin, l'addition d'un co-solvant, à savoir le DMSO, est étudié afin d'améliorer la solubilité et par conséquent la conversion. Le manuscrit est terminé par une conclusion générale, les perspectives envisagées sont également mentionnées. Les références bibliographiques sont notées en bas de chaque page du mémoire. Toutes les informations concernant l'ensemble des travaux effectués sont rassemblées dans la partie expérimentale.

Les travaux publiés pendant cette thèse sont mis en annexe.

²⁴ L. Xiao-Sheng, W. Qing, H. Ze-Lin, C. Yu-Zheng, J. Peter. Z. Hallingc. Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology. *Process Biochemistry*, **2015**, 50, 1852.

Etude bibliographie

I. Les enzymes

1. Définition des enzymes

Les enzymes sont des protéines fonctionnelles qui peuvent jouer un rôle de catalyseur biologique (biocatalyseur). Plus efficaces que les catalyseurs chimiques, la spécificité de l'enzyme est due à la présence d'une région tridimensionnelle appelée "site actif" qui reconnaît et fixe le substrat. Les enzymes possèdent ainsi la capacité de cibler les réactions voire même d'éviter celles indésirables²⁵. La spécificité de ces catalyseurs biologiques sous ses différentes formes (énantio-, régio- et stéréo- sélectivité) constitue un des avantages de leur utilisation dans des procédés biologiques comme alternative aux procédés chimiques.

- **Enantiosélectivité** : lorsque l'enzyme est sélective vis-à-vis d'un ou de plusieurs énantiomères (substrats de la réaction).
- **Régiosélectivité** : lorsque l'enzyme est sélective vis-à-vis d'un site réactif spécifique du groupement fonctionnel d'un substrat donné.
- **Stéréosélectivité** : lorsque l'enzyme est sélective vis-à-vis d'un ou de plusieurs stéréoisomères (produits de la réaction).

Par conséquent, les produits obtenus par synthèse enzymatique sont de meilleure qualité et contiennent moins d'impuretés, ce qui permet de limiter voire d'éviter des étapes de purification souvent coûteuses et fastidieuses. De plus, les enzymes permettent d'opérer dans des conditions douces de pH, de température etc..., contrairement aux catalyseurs chimiques. Récemment, les enzymes ont été utilisées dans diverses réactions chimiques telles que la synthèse organique, l'hydrolyse ou l'oxydoréduction^{26,27}.

2. Activité enzymatique

Une enzyme agit comme un catalyseur dans une réaction chimique, c'est-à-dire qu'elle accroît les vitesses réactionnelles. L'énergie d'activation de la réaction est alors abaissée. Chaque enzyme « reconnaît » spécifiquement une ou plusieurs molécules selon un principe de complémentarité de type clé-serrure, grâce à des sites de reconnaissance et de fixation situés à sa surface²⁸. Ce sont des catalyseurs spécifiques puisqu'elles ne peuvent participer qu'à des réactions bien déterminées. A la fin du processus, l'enzyme retrouve sa structure. Il est à noter

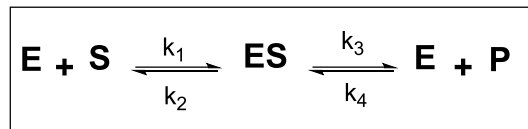
²⁵ R.J. Whitehurst, M.V. Oort, *Enzymes in food technology*. Wiley-Blackwell. **2010**. 388.

²⁶ A. Schmid, F. Hollmann, J.B. Park, B. Bühler, The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Current Opinion in Biotechnology*. **2002**, 13, 359.

²⁷ J.S.D. A. Schmid, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts and B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, **2001**, 409, 258.

²⁸ M. Chaplin, C. Bucke. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press. **1990**.

que les enzymes participent aux réactions ayant lieu dans les organismes vivants. De ce fait, l'enzyme fonctionne dans des conditions douces de température, de pH et de pression. La réaction catalytique se déroule au niveau du site catalytique dit site actif de l'enzyme, situé dans la poche protéique, cavité aux caractéristiques structurales et chimiques spécifiques. La substance chimique cible, nommée substrat (S), se fixe sur l'enzyme (E) au niveau du site actif qui permet la réaction. Il se forme alors un complexe intermédiaire ES. Après réaction, le produit (P) est libéré et l'enzyme régénérée. Ce processus s'effectue des milliers de fois à la seconde.



3. Facteurs qui influencent l'activité enzymatique

La température, la concentration du substrat et le pH sont les principaux facteurs qui influencent l'activité enzymatique en milieu aqueux tout comme en milieu non aqueux. Le pH et la température agissent en synergie sur la conformation de l'enzyme et sa structure tridimensionnelle modifiant ainsi son activité autour de sa température et son pH optimaux²⁹.

La concentration du substrat est un paramètre très important car elle influence la vitesse de la réaction. En outre, l'augmentation de cette concentration peut conduire à l'augmentation de la vitesse de la réaction compte tenu de la loi de vitesse. D'autre part, un substrat en excès peut dans certains cas inhiber l'enzyme et la vitesse de la réaction s'en trouve alors diminuée. De la même façon, l'enzyme peut être également inhibée par le produit de la réaction³⁰.

Par ailleurs, d'autres paramètres jouent un rôle très important dans la modulation de l'activité enzymatique tel que la présence d'eau. Pour maintenir son action catalytique, notamment en milieu non aqueux, l'enzyme nécessite la présence d'une certaine quantité d'eau³¹. Cette dernière peut agir de plusieurs façons sur l'activité enzymatique : en modifiant sa structure par organisation et/ou désorganisation des liaisons non covalentes et des liaisons hydrogène au sein de la protéine, en influençant de façon plus ou moins favorable la diffusion des réactifs et en modifiant l'équilibre de la réaction³².

²⁹ C.N. Mulligan, Environmental applications for biosurfactants, *Environmental Pollution*, **2005**, 133, 183.

³⁰ O.J. Rojas, C. Stubenrauch, L.A. Lucia, Y. Habibi. Interfacial properties of sugar-based surfactants. *Bio-Based Surfactants and Detergents: Synthesis, Properties and Applications*, AOCS Press, Urbana. **2009**. 457.

³¹ M.J. Rosen. Surfactants and interfacial phenomena (3rd ed). *New Jersey. Wiley-Interscience*, **2004**, 207.

³² R. Thavasi, S. Jayalakshmi, T. Balasubramanian, I.M. Banat, Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2008**, 24 917.

4. Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

La réaction enzymatique fait appel à la fixation du substrat au niveau du site actif³³.

Le site actif doit être dans une conformation spatiale telle que le substrat puisse s'y fixer, les substrats sont liés aux enzymes par des interactions faibles : constantes d'association de 10^{-2} à 10^{-8} M et ΔG d'interaction entre -3 et -12 kcal/mol. La liaison du substrat au site actif implique souvent de nombreuses liaisons non-covalentes de types (Van der Waals, électrostatiques, ponts hydrogènes). Ces trois types de liaisons non-covalentes diffèrent dans leurs contraintes géométriques, force et spécificité. Le schéma 1 montre le mécanisme d'un cycle de catalyse enzymatique.

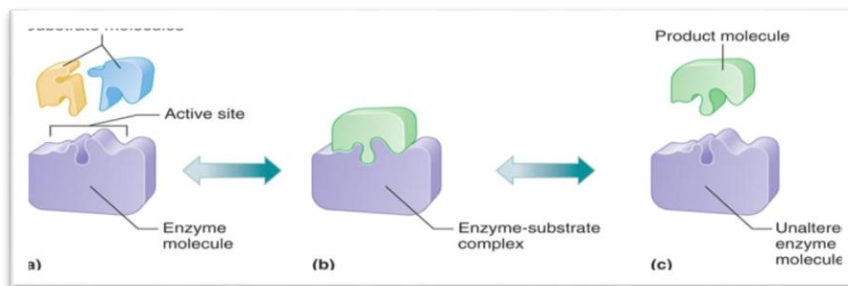


Schéma 1- Mécanisme d'un cycle de catalyse enzymatique

Il existe des différents modèles de complexe enzyme-substrat ES.

a. Modèle de Fisher : Clé-serrure

Dans ce modèle, la formation du complexe enzyme-substrat ES nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes fonctionnels ou domaines du substrat avec des motifs de la cavité enzymatique (Schéma 2).

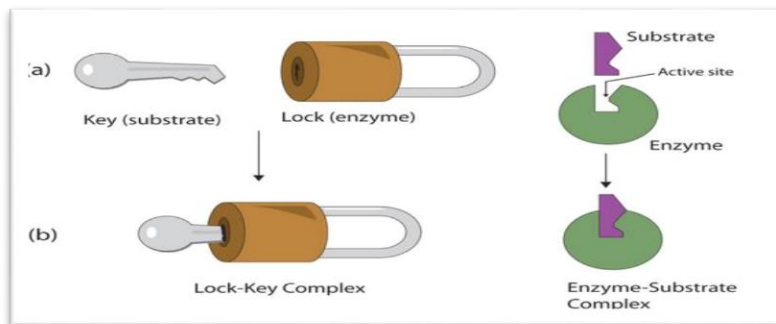


Schéma 2- Modèle de Fisher

³³ A. Illanes. Enzyme Biocatalysis. School of Biochemical Engineering Editorial Springer-Verlag New York Inc., United States. 2008. 1, 56.

b. Modèle de Koshland : Ajustement induit

L'association enzyme-substrat est permise après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat (Schéma 3).

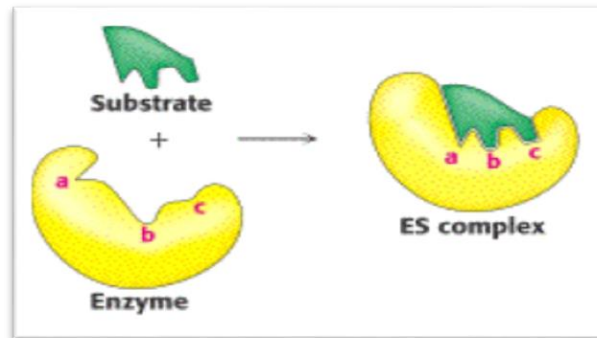


Schéma 3- Modèle de Koshland

c. Modèle de Strain-Jenks

L'enzyme et le substrat lorsqu'ils ne sont pas dans le milieu présentent chacun une conformation particulière. La présence mutuelle de ces 2 molécules entraîne une déformation partagée de l'enzyme et du substrat, de manière à ce que le substrat se fixe sur les fonctions complémentaires des acides aminés de contact (Schéma 4).

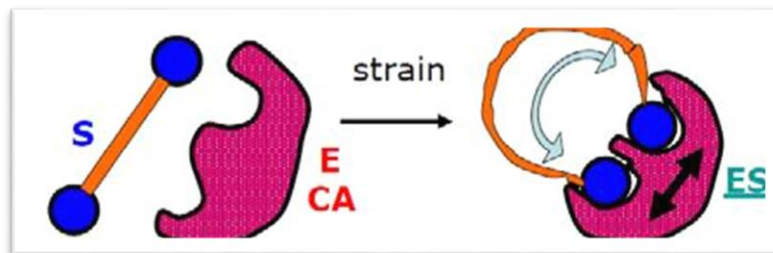


Schéma 4- Modèle de Strain-Jenks

5. Classification des enzymes

La commission des enzymes et l'union internationale en biochimie³⁴ a établi une classification comportant. Il existe six classes d'enzymes chacune subdivisée en sous classe selon leurs activités catalytiques.

³⁴ U. Behnke. International Union of Biochemistry: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions. *Enzyme Nomenclature*. 1984, 738.

a. Les oxydo-réductases

Ces enzymes catalysent les réactions d'oxydoréduction et englobent les réactions d'oxygénation, comme par exemple le passage de C-H à C-OH, ainsi que l'addition ou l'élimination d'atomes d'hydrogène, comme par exemple CH(OH) à C=O et CH-CH à C=C.

b. Les transférases

Les enzymes de ce groupe transfèrent des radicaux (méthyle, éthyle, ...) ou des groupements d'atomes (l'hydroxyméthyl, carbonyl et les groupements carbonés des fonctions aldéhydes ou cétones, ...) d'une molécule (substrat donneur) à une autre (substrat accepteur).

c. Les hydrolases

Ce type d'enzyme forme une classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse d'esters, et de liaisons osidiques. Ces enzymes ne nécessitent généralement pas de co-enzyme.

d. Les lyases

Cette classe de catalyseur favorise les additions de HX sur les doubles liaisons comme C=C, C=N, C=O et leur processus inverse.

e. Les isomérases

Ces enzymes catalysent les changements géométriques ou structuraux, souvent par réarrangement des groupements fonctionnels et conversion de la molécule en l'un de ses isomères.

f. Les ligases (synthétases)

Elles permettent la formation de divers types de liaisons telles que C-O, C-C, C-S, C-N.

Parmi toutes les classes d'enzymes, nous nous sommes intéressés aux hydrolases³⁵ plus précisément aux lipases qui sont les enzymes les plus sollicitées par le chimiste organicien. Ce sont une classe très importante de biocatalyseurs³⁶ pour des réactions biotechnologiques. Leur stéréosélectivité, chimiosélectivité et régiosélectivité en font un outil, extrêmement intéressant pour le chimiste organicien et les industriels³⁷.

³⁵ a). B. Danieli, S. Riva. Enzyme-mediated regioselective acylation of polyhydroxylated natural products. *Pure and applied chemistry*. **1994**, 66, 2215.

b). A. A. Assamoi, J. Destain, P. Thonart. Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1, 4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **2009**, 13, 281.

³⁶ L. Cao, Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design. *Wiley-VCH*, **2005**, 334.

³⁷ V.M. Balcão, A.L. Paiva, F. Xavier Malcata, Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, **1996**, 18, 392.

6. Les Lipases

a. Généralités

Les lipases sont des enzymes largement répandues dans la nature et font partie de la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. Elles sont retrouvées aussi bien chez les végétaux, les animaux³⁸, les champignons ou les bactéries^{39,40}.

Généralement utilisées dans les procédés biotechnologiques⁴¹, elles sont également utilisées en chimie fine pour la synthèse organique propre et écologique, en agroalimentaire⁴², dans les applications pharmaceutiques et médicales pour leur haut degré de régio et stéréosélectivité⁴³.

Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse telles que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (deux esters) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acyle d'un ester sur d'autres nucléophiles tels que les amines ou les thiols.

Grâce à leur larges champs d'activités les lipases représentent une des familles d'enzymes les plus étudiées tant dans le monde industriel que dans le monde universitaire.

b. Structure et Mécanismes des lipases

La structure tridimensionnelle des lipases ainsi que leur mécanisme réactionnel sont depuis longtemps source d'études^{44,45}.

Toutes les lipases connues à ce jour présentent de nombreuses caractéristiques communes, malgré leurs tailles variées et leurs origines. La figure 2 représente l'organisation 3D, du repliement α/β hydrolase et de la triade catalytique⁴⁶.

³⁸ Cherif S., Gargouri Y. Thermoactivity and effects of organic solvents on digestive lipase from hepatopancreas of the green crab. *Food Chemistry*. **2009**, 116, 82.

³⁹ M. Guncheva, D. Zhiryakova, Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2011**, 68, 21.

⁴⁰ R. Gaur, A. Gupta, S.K. Khare. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant Pseudomonas aeruginosa PseA. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 1040.

⁴¹ B. Joseph, P.R. Ramteke, G. Thomas. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments, *Biotechnology Advances*, **2008**, 470, 26457.

⁴² N. do Amaral Sampaio Neta, J.C. Sousa dos Santos, S. de Oliveira Sancho, S. Rodrigues, L. Rocha Barros Goncalves, L.R. Rodrigues, J.A. Teixeira. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. *Food Hydrocoll*. **2012**, 27, 331.

⁴³ L. Schiefelbein, M. Keller, F. Weissmann, M. Lubber, F. Bracher, W. Friess. Synthesis, characterization and assessment of suitability of trehalose fatty acid esters as alternatives for polysorbates in protein formulation. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. **2012**, 76, 350.

⁴⁴ E. De Oliveira, C. Humeau, L. Chebil, E. Maia, F. Dehez, B. Maigret, M. Ghoul, J.-M Engasser. Molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 59, 96.

⁴⁵ T. Xu, B. Gao, L. Zhang, J. Lin, X. Wang, D. Wei. Template-based modeling of a psychrophilic lipase: Conformational changes, novel structural features and its application in predicting the enantioselectivity of lipase catalyzed transesterification of secondary alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2010**, 1804, 2183.

⁴⁶ M. F. Egloff, S. Ransac, F. Marguet, E. Rogalska, H. Van Tilbeurgh, G. Buono, C. Cambillau, R. Verger, *OCL. Enzymes lipolytiques et lipolyse. Ol. Corps Gras Lipides*. **1995**, 2, 52.

Le repliement α/β (Figure 2) est la structure de base commune de toutes les lipases connues, composée d'un feuillet β central, formé de huit brins, essentiellement parallèles, connectés entre eux par des hélices α , contenant le résidu catalytique sérine (nucléophile). Ce dernier est la caractéristique la plus importante et la plus conservée des α/β hydrolases⁴⁷. La triade catalytique qui constitue le site actif de la lipase est composée de trois acides aminés. Il s'agit essentiellement de trois résidus aminés associés aux repliements (α/β) des hydrolases, un résidu nucléophile typiquement une serine, un résidu catalytique aspartate (ou glutamate) et un résidu de coordination histidine, (Ser...His...(Asp/Glu))^{48,49,50}, capable d'accélérer l'hydrolyse des liaisons esters, Le mécanisme d'action des lipases a été extrapolé à partir de celui proposé pour la chymotrypsine⁵¹.

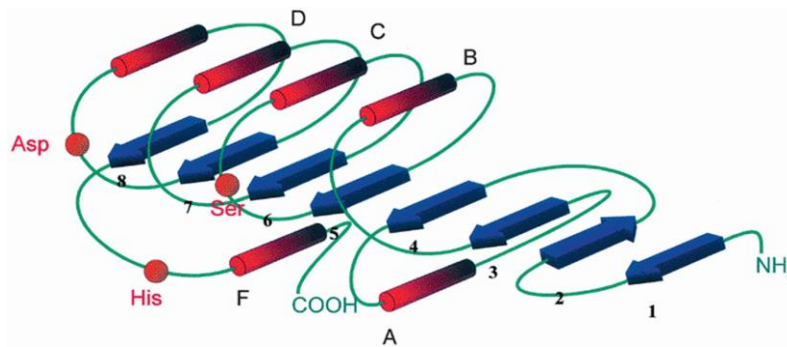


Figure 2- Structure secondaire du repliement α/β des hydrolases.

Les brins (1 à 8) sont représentés par des flèches bleues et les hélices (A à F) par des cylindres rouges. Le positionnement relatif des acides aminés de la triade catalytique est indiqué par des points rouges⁵².

Souvent, le site actif est recouvert par un volet amphiphile, formé d'une ou deux hélices α reliées au squelette de l'enzyme par une structure flexible. La face hydrophobe de ce volet est orientée vers l'intérieur du site actif, qui le rend totalement inaccessible au solvant et au substrat, quand l'enzyme est sous sa forme inactive. Lorsque l'enzyme se trouve à l'interface

⁴⁷ a). M. Nardini, B. W. Dijkstra. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*, **1999**, 9, 6, 732.

b). J. D. Schrag, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, R. Schmid, D. Schomburg, T. J. Rydel, J. D. Oliver, L. C. Strickland, C. M. Dunaway, S. B. Larson, A. McPherson. The open conformation of a Pseudomonas lipase. *Structure*, **1997**, 5, 2, 187.

⁴⁸ D. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. Franken, M. Harel, S. Remington, L. Silman, J. Schrag, J. Sussman, K. Verschuere, A. Goldman. The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection, A. Protein Engineering*, **1992**, 5, 197-211.

⁴⁹ J. Fischer, M. Peiker, M. Thiele, C. Schmid, R. D. J. Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2000**, 10, 5, 491.

⁵⁰ C. A. Kohh, G. C. Lee, Y. C. Liaw, T. H. Huang & J. F. Shaw, GDSL family of serine esterase/lipases, *Prog Lipid Res.* **2004**, 43, 6, 534.

⁵¹ D. M. Blow, J. J. Birktoft, and B. S. Hartley. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*, **1969**, 221, 337.

⁵² U. T. Bornscheuer. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev*, **2002**, 26, 73.

lipide/eau, l'hélice α couvrant le site actif s'ouvre, le rendant accessible au solvant et au substrat, l'enzyme est sous sa forme ouverte, activée⁵³.

La lipase de *Candida Antarctica B* (CAL B) est une protéine de 33 kDa, constituée de 317 acides aminés qui se caractérise, comme chez les estérases, par la présence d'une structure α/β . La figure 3 représente la structure de la CAL B.

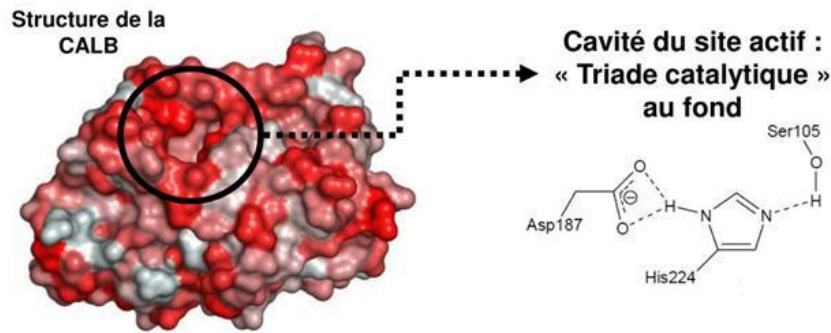


Figure 3- Structure de la CAL B

Le mécanisme d'action des lipases est de type Bi-Bi Ping-Pong⁵⁴. Il s'opère en deux étapes principales (Schéma 5) :

- **Etape d'acylation** : Le groupement hydroxyle de la sérine est activé par le relais de charges impliquant un résidu acide (Aspartique/Glutamique) et un résidu basique (Histidine). L'histidine agit séquentiellement comme catalyseur basique, puis acide, assurant ainsi le transfert de protons. L'aspartate, par interaction ionique avec l'histidine, oriente la chaîne latérale de l'histidine de façon à faire des liaisons hydrogène avec la sérine. L'histidine, grâce à son noyau imidazole, établit deux liaisons hydrogènes avec la sérine et l'aspartate ou glutamate qui jouent, dans cette triade catalytique, le rôle de donneur et d'accepteur final de proton, respectivement, et activent ainsi le groupement hydroxyle de la sérine. L'oxygène activé de la sérine attaque le carbone de la fonction carboxyle du substrat pour former un premier intermédiaire tétraédrique⁵⁵. Cet intermédiaire est stabilisé par des liaisons hydrogènes entre l'oxygène chargé négativement (oxyanion) de l'intermédiaire tétraédrique et des groupes N-H peptidiques stabilisent la charge négative de l'oxyanion^{56,57} (cet

⁵³ L. Brady, A. M. Brzozowski, E. Derewenda, G. Dodson, S. Tolley, B. Turkenburg, L. Norskov, L. Thim, U. Menge. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*. **1990**, 343, 767.

⁵⁴ M.-P. Bousquet-Dubouch, M. Graber, N. Sousa, S. Lamare, M.-D. Legoy. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a ping pong bi bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**. 26, 90.

⁵⁵ P. Fickers, D. Jacqueline. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. **2008** 12, 2, 119.

⁵⁶ J. Kraut. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem*, **1977**, 46, 331.

environnement atomique et électronique est appelé trou de l'oxyanion). Ce trou stabilise la structure tétraédrique et donc abaisse l'énergie d'activation de la réaction.

Au cours de cette catalyse acido-basique la liaison ester carboxylique est clivée, le premier produit de la réaction partant (soit une molécule d'eau soit une molécule d'alcool, en fonction du substrat mis en jeu) emporte un proton de l'ion imidazolium du résidu histidine, et la formation de l'acyle-enzyme. (La chaîne acyle de la liaison ester du substrat reste liée de façon covalente à l'enzyme sous forme d'un intermédiaire acyl-enzyme).

- Etape de désacylation : L'étape de désacylation fait intervenir une attaque nucléophile qui peut être exercée par une molécule d'eau (réaction d'hydrolyse) ou par une molécule d'alcool (réaction de synthèse) sur le carbonyle de l'acyle-enzyme formant le second intermédiaire tétraédrique⁵⁸. Cette étape de désacylation qui suit un processus analogue à celui de l'étape d'acylation conduit à la formation du second produit de la réaction (acide carboxylique ou ester) avec régénération de l'enzyme libre⁵⁹.

Le deuxième intermédiaire tétraédrique est stabilisé par le trou de l'oxyanion.

Le trou de l'oxyanion peut être soit préformé comme dans le cas de la lipase de *Candida cylindracea*⁶⁰, soit se mettre en place lors de l'ouverture du volet de l'enzyme comme dans le cas de la lipase *Pancréatique humaine* (HPL)⁶¹. Dans le cas de la lipase gastrique, le trou de l'oxyanion a pu être identifié par superposition avec des structures d'autres lipases comme la HPL ouverte ou la nommer la lipase de *Candida cylindracea*⁶².

⁵⁷ A.K. Whiting And W.L. Peticolas. Details of the acyl-enzyme intermediate and the oxyanion hole in serine protease catalysis. *Biochemistry*, **1994**, 33, 552.

⁵⁸ A. Salis, P. Marcella, M. Maura, S. Vincenzo, Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2008**, 54, 19.

⁵⁹ M. Cygler, P. Grochulski, R.J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serreqi, A. K. Gupta. *Journal of the American Chemical Society*., **1994**, 116, 3180.

⁶⁰ P. Grochulski, F. Bouthillier, R.J. Kazlauskas, A.N. Serreqi, J.D. Schrag, E. Ziomek, and M. Cygler. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry*, **1994**, 33, 3494.

⁶¹ H. Van Tilbeurgh, M.P. Eglhoff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger, and C. Cambillau, Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, **1993**, 362, 814.

⁶² A. Roussel, N. Miled, L. Berti-Dupuis, M. Riviere, S. Spinelli, P. Berna, V. Gruber, R. Verger, and C. Cambillau, Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277, 2266.

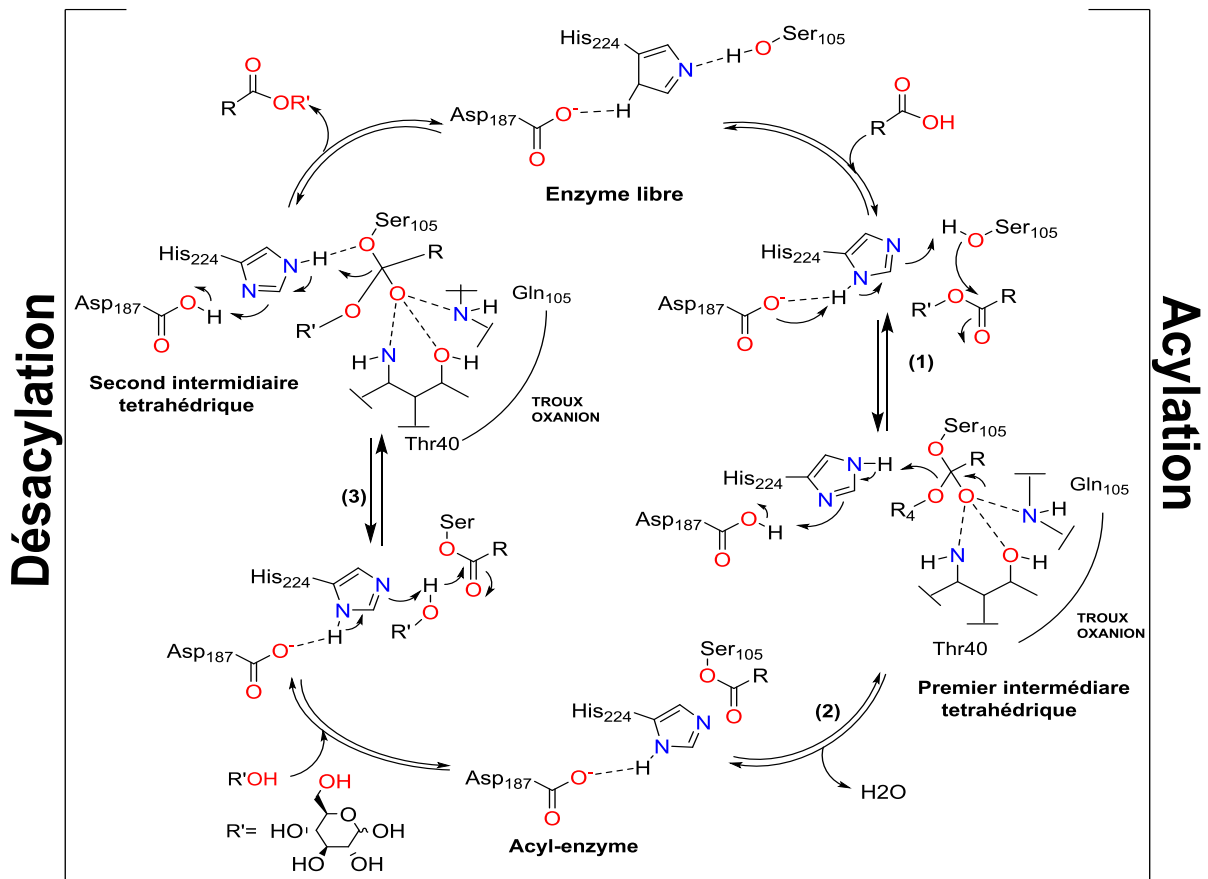


Schéma 5- Mécanisme catalytique proposé pour les lipases

c. Réactions réalisables par les lipases

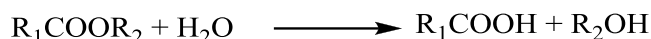
En fonction de l'environnement et des substrats mis en jeu et des conditions opératoires, les lipases peuvent effectuer différents types de réactions. En milieu aqueux, ces lipases sont capables de catalyser des réactions d'hydrolyse de la liaison esters, alors qu'en milieu non conventionnel (solvant organique) ces dernières sont capables de réaliser des synthèses d'esters (l'estérification, la transestérification et l'interestérification).

Ces différentes réactions se font plus souvent en présence d'hydrolases et plus particulièrement les lipases qui sont actuellement largement employées, tant à l'échelle du laboratoire qu'à celle de l'industrie.

Les différents types de réactions catalysées par les lipases sont :

1. La réaction d'hydrolyse

Les lipases catalysent naturellement l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol. Elles sont également actives sur de nombreux esters d'acides gras. Dans tous les cas, la réaction s'effectue à l'interface entre le substrat hydrophobe et le milieu aqueux (milieu naturel des enzymes), formant un système réactionnel biphasique. Ce système résulte de la présence d'une phase organique non miscible à l'eau constituée soit du substrat seul, soit du substrat dissout dans un solvant non miscible à l'eau⁶³.



2. Réactions d'estérification

En milieu non aqueux (solvant organique) les lipases catalysent la réaction inverse de l'hydrolyse, c'est-à-dire la synthèse de liaisons esters. Dans cet environnement elles présentent une grande stabilité, notamment sous forme immobilisées. Ces réactions sont très utilisées dans les procédés industriels^{64,65}. Quatre schémas réactionnels sont observés, on peut citer :

a. L'estérification : C'est la réaction directe entre un acide et un alcool.

b. la transestérification : Elle regroupe deux réactions :

- L'alcoolyse (réaction d'un groupe acyle avec un alcool)
- L'acidolyse (réaction d'un groupe acyle avec un acide).

c. L'interestérification : Elle se produit par le transfert d'un groupe d'acyle d'un ester à un autre ester. Cette réaction trouve une large application dans la synthèse des lipides⁶⁶.

d. L'aminolyse ou amidation : si $R_2 = H$: Les lipases peuvent catalyser également la réaction entre une amine et un ester qui conduit à la formation d'une fonction amide. Les réactions d'aminolyse catalysées par les lipases ont une grande importance dans la synthèse des amides substituées d'intérêt pharmaceutique et la résolution des amino alcools chiraux.

Le Schéma 6 représente les différentes réactions possibles par l'utilisation de lipases.

⁶³ Y. Zhang, J. Liu. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochemical Engineering Journal*. **2011**, 54, 40.46.

⁶⁴ P. Vidya, A. Chadha. *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester: A comparison in ionic liquids vs hexane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 68.72.

⁶⁵ M. Singh, S. Singh, R.S. Singh, Y. Chisti, U. Banerjee. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 2116.

⁶⁶ J. Ottosson, K. Hult, Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of sec-alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**, 11, 1025.

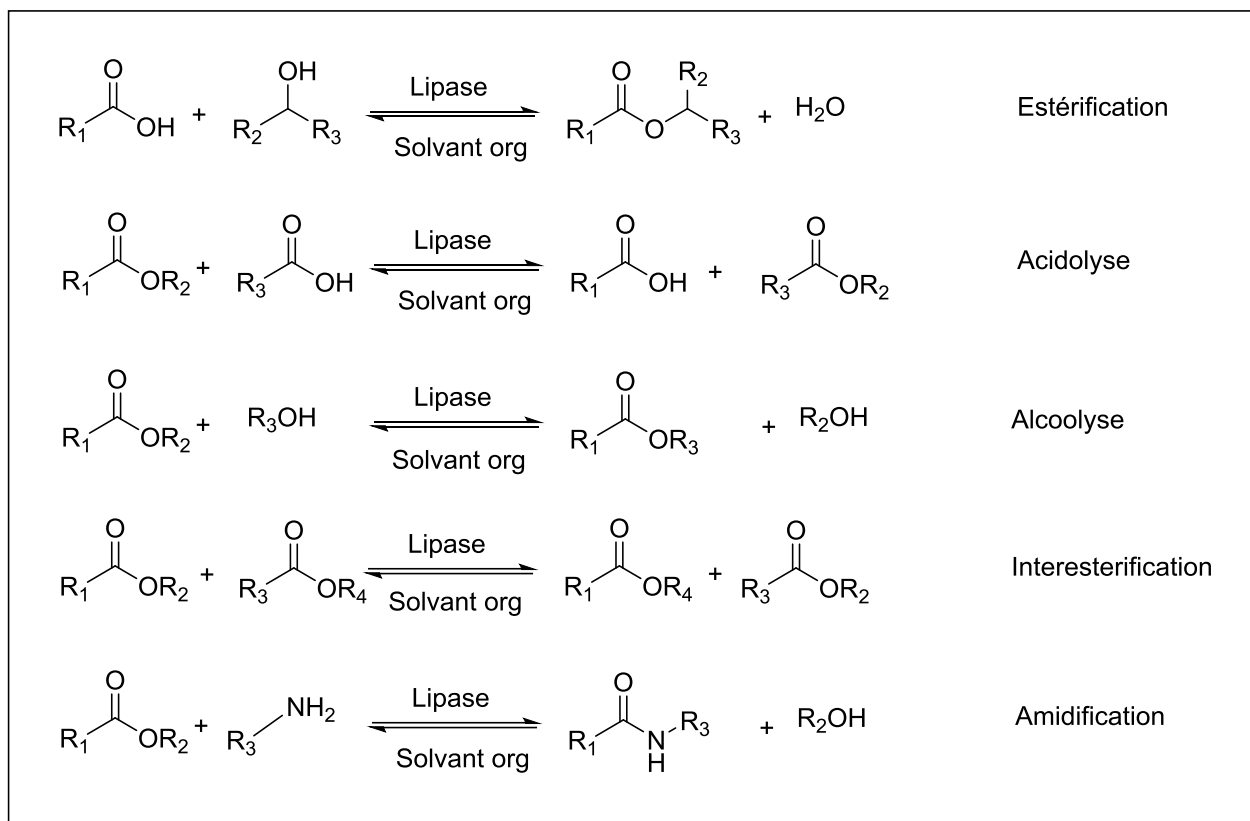


Schéma 6- Différentes réactions possibles par utilisation de lipases

e. La catalyse enzymatique

La catalyse enzymatique permet d'augmenter la vitesse d'une réaction sans modifier les paramètres thermodynamiques de celle-ci. Le catalyseur va permettre d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction et d'augmenter le nombre de molécules susceptibles de réagir. En effet, l'état de transition se retrouve à une énergie inférieure, en présence d'enzyme, ce qui a pour résultat d'abaisser l'énergie d'activation comme illustré sur la figure 4a. Cette diminution de l'énergie d'activation augmente le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps comme on peut le voir sur la figure 4b.^{67,68}

⁶⁷ M. Vincent, Blood glucose: Its measurement and clinical importance. *Clinica Chimica Acta*, **1996**, 3, 251.

⁶⁸ J. Wang, Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews*. **2007**, 108, 814.

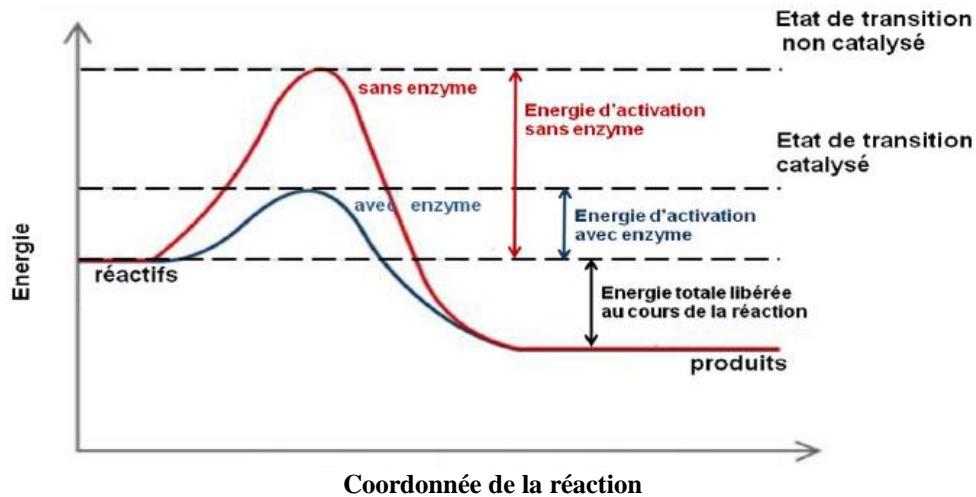


Figure 4a- Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme.

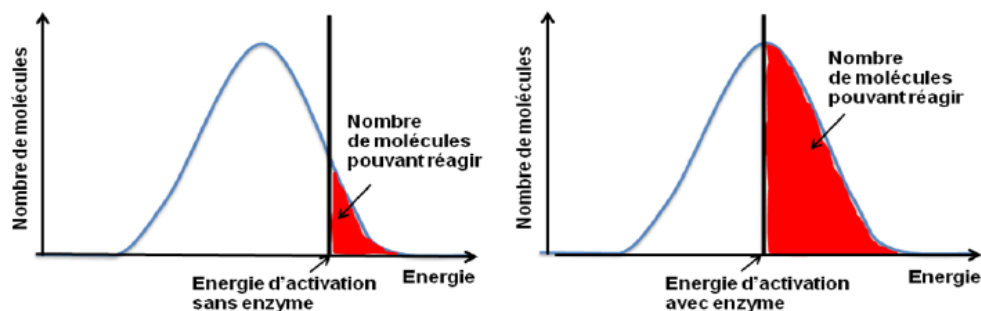


Figure 4b- Effet de la diminution de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules susceptibles de réagir.

II. Les esters de sucres

1. Introduction

Les esters de sucres sont des tensioactifs non-ioniques de structure simple non disponibles dans la nature. Leur synthèse est réalisée par la voie chimique, entraînant la production d'une quantité non négligeable de produits secondaires. Ces derniers doivent être éliminés, ce qui implique des coûts de purification relativement importants. Ce problème peut être contourné en optant pour une voie de synthèse beaucoup plus spécifique : la biocatalyse. L'utilisation d'enzymes et plus spécifiquement de lipases permet le greffage d'un acide gras sur un sucre grâce à une liaison ester⁶⁹.

Les esters de sucres⁷⁰ sont donc des tensioactifs non-ioniques qui présentent une diversité de leurs structures et une ambivalence due à la présence d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. Ils ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et non allergènes. Leur

⁶⁹ L. C. Epoune, Nouveaux agrotensioactifs glycolipidiques : synthèse, propriétés physico-chimiques et application en polymérisation. *Thèse de doctorat en Chimie. INSA. Lyon, France, 2011.*

⁷⁰ Y. M. Sin, K. W. Cho, T. H. Lee. Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnology letters*. **1998**, 20, 91.

synthèse par voie enzymatique est une alternative pour la production de molécules intervenant dans la formulation de produits agro-alimentaires⁷¹, cosmétiques⁷², détergents⁷³ ou pharmaceutiques. Actuellement, les esters de sucres sont principalement employés en tant qu'agents émulsifiants ou dans la formulation de microémulsions⁷⁴.

Les tensioactifs font partie de notre quotidien. La diversité de leurs propriétés est mise à profit dans de nombreux produits de la vie courante, notamment dans les détergents ménagers et industriels et dans les formulations cosmétiques. Les considérations environnementales liées à un marché en plein essor, incitent aujourd'hui à se détourner de la pétrochimie pour s'orienter vers l'utilisation de matières renouvelables et la production de tensioactifs non toxiques et biodégradables⁷⁵.

2. Différentes méthodes de synthèse des esters de sucres

Les esters de sucres et d'acide gras amphiphiles sont des surfactants biodégradables qui peuvent être utilisés comme émulsifiants de nourriture par ce qu'ils sont insipides, inodores et non toxiques. D'autre part avec la propriété d'être non irritant aux yeux et à la peau, ils ont été appliqués dans l'industrie pharmaceutique. Leurs propriétés antimicrobiennes, anti-tumorales et insecticides ont été rapportées et ceci pourrait ouvrir des marchés. La synthèse de ces molécules peut être réalisée par les voies chimique ou enzymatique.

a. Méthodes par voie chimique

Les exemples suivants concernent la synthèse d'un ester de saccharose par transestérification de polyols de sucre (Schéma 7) et l'estérification de l'amidon en présence d'anhydrides (Schéma 8).

⁷¹ a. G. Sekeroglu, S. Fadiloglu, E. Ibanoglu, Production and characterisation of enzymatically produced lauric acid esters of fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2002**, 82, 1516.

b. S. Sabeder, M. Habulin, Z. Knez, Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering*, **2006**, 77, 880.

⁷² G. Fregapane, D. B. Sarney, S. G. Greenberg, D. J. Knight, E. N. Vulfson. Enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their comparison with conventional products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1994**, 71, 87.

⁷³ C. Damez. Transformation d'agro-ressources régionales et étude de leurs propriétés amphiphiles. *Thèse de doctorat Université de Reims. Champagne-Ardenne*. **2006**.

⁷⁴ L. Cao, T. Bornscheuer, D. Schmid. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters, IV: selectivity of lipases towards primary and secondary hydroxyl groups in carbohydrates. *Biocatalysis and Biotransformation*. **1998**, 16, 249.

⁷⁵ Vandeputte J. Les agro-tensioactifs. *Oléagineux, Corps gras, Lipochimie*, **2012**, 12, 133.

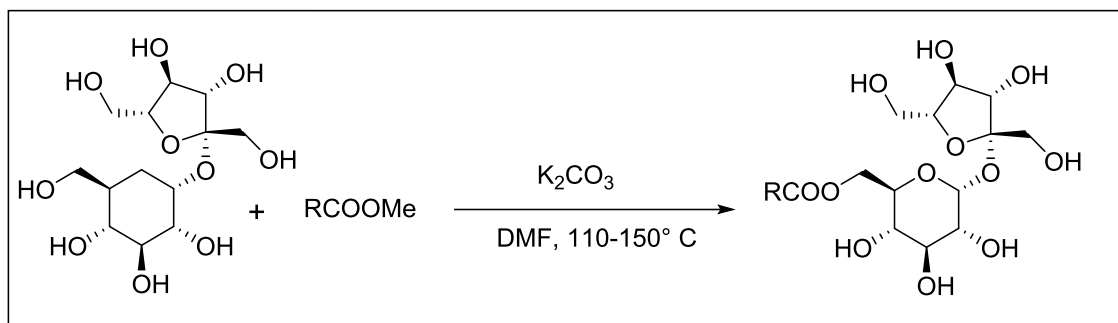


Schéma 7- Synthèse d'ester de saccharose par transestérification de polyols de sucre⁷⁶.

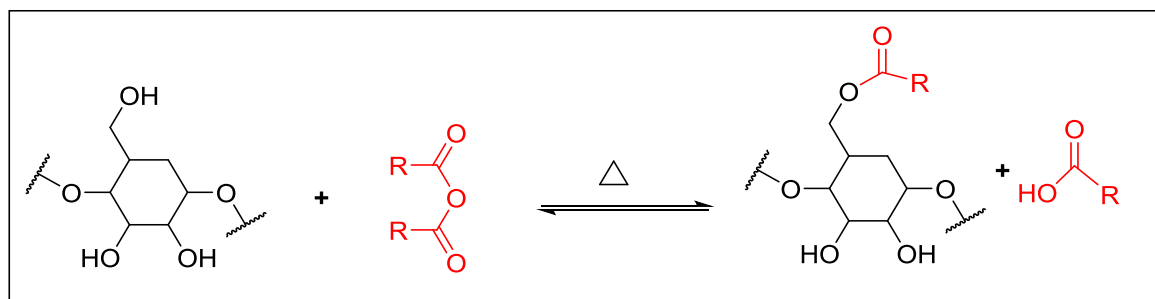


Schéma 8- Estérification de l'amidon à l'aide d'anhydrides⁷⁷.

Cependant, cette voie de production présente plusieurs inconvénients. La réaction a généralement lieu à des températures élevées, dans des solvants toxiques difficiles à enlever⁷⁸. Un phénomène de coloration des produits⁷⁹ (caramélisation) peut aussi avoir lieu, une étape de décoloration est alors rajoutée. L'obtention d'un mélange de molécule et des sous-produits nocifs⁸⁰ engendre plusieurs étapes de purification. La régiosélectivité est difficilement contrôlable, à cause de la présence des groupements hydroxyles du sucre⁸¹.

Pour pallier à ces problèmes, les catalyseurs chimiques peuvent être remplacés par les enzymes. Ces biocatalyseurs permettent, en effet, de réaliser une acylation sélective d'un groupement hydroxyle de la molécule du sucre. Par conséquent, la régiosélectivité du produit final se trouve complètement contrôlée par la sélectivité de l'enzyme.

⁷⁶ P. S. Deshpande, T. D. Deshpande, R. D. Kulkarni, P. P. Mahulikar. Synthesis of sucrose-coconut fatty acids esters: Reaction kinetics and rheological analysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **2013**, 52, 15024.

⁷⁷ B. Imre, F. Vilaplana. Organocatalytic esterification of corn starches towards enhanced thermal stability and moisture resistance. *Green Chemistry*. **2020**, 22, 15.

⁷⁸ J.A. Arcos, M. Bernabé, C. Otero. Quantitative enzymatic production of 1, 6-diacetyl fructofuranoses. *Enzyme and microbial technology*. **1998**, 22, 27.

⁷⁹ D. Coulon, M. Girardin, J.M. Engasser, M. Ghoul. Investigation of keys parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. *Industrial Crops and Products, Ind.* **1997**, 6, 375.

⁸⁰ R. Gulati, P. Arya, B. Malhotra, A.K. Prasad, R.K. Saxena, J. Kumar, A.C. Watterson, V.S. Parmar. Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids: synthesis of sorbitol 1 (6)-monostearate. *Arkivoc*. **2003**, 159.

⁸¹ N. Spiliotis, E. Voutsas, K. Magoulas, D. Tassios. Recovery of fructose laurate produced through enzymatic esterification. *Separation and Purification Technology*. **2000**, 19, 229.

b. Méthodes par voie enzymatique

Dans cette méthode nous utilisons les lipases pour permettre de répondre à des synthèses plus vertes. La plupart des cas rencontrés dans la littérature traitent de la réaction d'acylation des hydroxyles du sucre par un acide gras^{82,83}. L'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions de synthèse permet de cibler le site de réaction et d'opérer dans des conditions plus douces, limitant ainsi les réactions secondaires comme la caramélisation. Le principe de la synthèse enzymatique est d'utiliser une lipase dans un milieu non conventionnel. Dans ces conditions, l'activité de la lipase est inversée, passant de l'hydrolyse à l'estérification⁸⁴. L'avantage de cette méthode réside dans les conditions douces utilisées par rapport à la voie chimique⁸⁵. On obtient généralement des monoesters.⁸⁶ De nombreux essais de synthèse d'esters de sucres par voie enzymatique ont été réalisés à l'échelle du laboratoire,⁸⁷ citons quelques exemples :

- Le schéma suivant illustre l'acylation enzymatique du glucose en position six avec le vinyle palmitique et l'acide palmitique catalysée par la lipase de *Candida antarctica B* (CAL B) dans le THF⁸⁸.

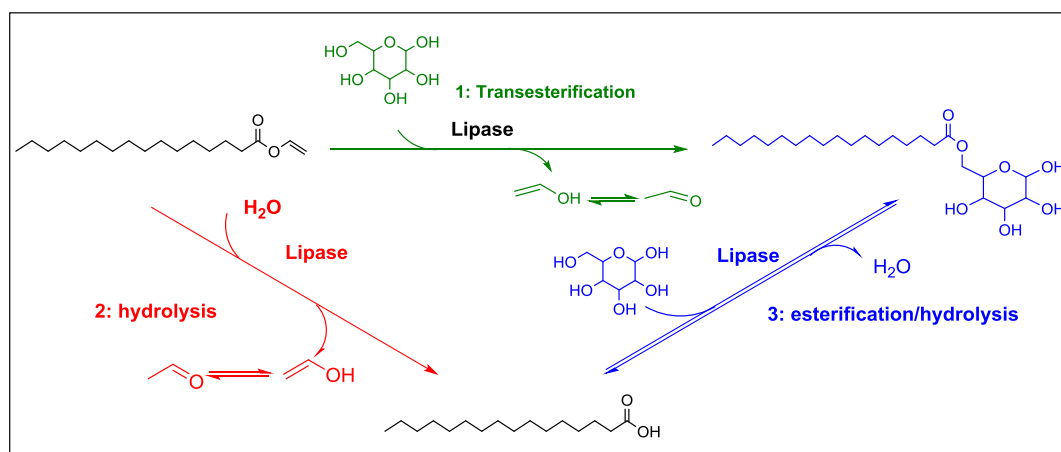


Schéma 9- Synthèse du palmitate de 6-O-glucose en présence de la CAL B.

⁸² B. Moreau, G. Lognay, C. Blecker, J.C. Brohée, F. Chéry, P. Rollin, M. Paquot, M. Marlier. Synthesis of novel D-glucuronic acid fatty esters using *Candida antarctica* lipase in tert-butanol, *Biotechnology Letters*, **2004**, 26, 419.

⁸³ C. Blecker, S. Piccicuto, G. Lognay, C. Deroanne, M. Marlier, M. Paquot, Enzymatically prepared n-alkyl esters of glucuronic acid: the effect of hydrophobic chain length on surface properties, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2002**, 247, 424.

⁸⁴ M. Ferrer, M. Angeles Cruces, M. Bernabé, A. Ballesteros, F.J. plou. Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnology and bioengineering*, **1999**, 65, 10.

⁸⁵ D. Coulon, A. Ismail, M. Girardin, B. Rovel, M. Ghoul, Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate. *Journal of biotechnology*, **1996**, 51, 115.

⁸⁶ F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 949.

⁸⁷ a. T. Kobayshi. Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media. *Biotechnology letters*, **2011**, 33, 1911.

b. R. Rufino, F. C. Biaggio, J. C. Santos, H. F. De Castro, Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 47, 5.

⁸⁸ A. Dounia., G. Etienne, G. Stéphane, C. Henri, P. Frédéric. 6-O-glucose palmitate synthesis with lipase: Investigation of some key parameters. *Molecular Catalysis*, **2018**, 460, 63.

- Serap *et al.* ont réalisé la synthèse d'esters de D-glucose avec des acides gras (acide oléique et acide palmitique) avec ou sans biocatalyseur dans le même milieu organique (DMSO/*t*-butanol : v/v)⁸⁹ (Schéma 10).

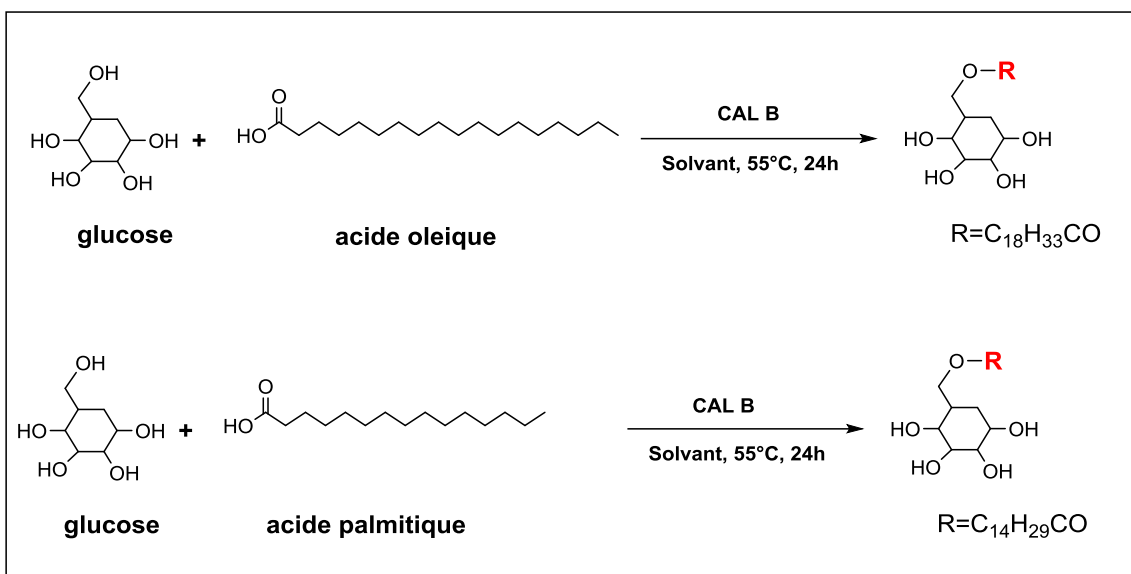


Schéma 10- Estérification du D-glucose avec des acides gras.

- Pappalardo *et al.* ont utilisé la novozyme 435 pour la synthèse et la caractérisation d'esters d'arabinose avec l'acide palmitique par estérification enzymatique (Schéma 11). Les réactions ont été réalisées à deux températures différentes 40 et 60°C, dans du *t*Bu et du MTBE seuls ou en mélange binaire avec du DMSO ou du tampon phosphate à pH=7 (qui est proche du pH optimal de l'enzyme)⁹⁰.

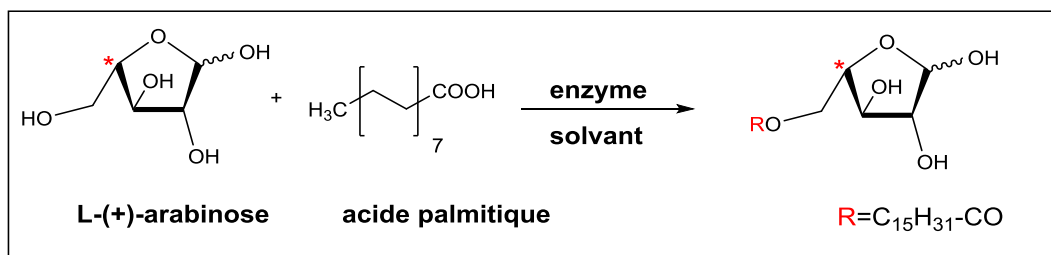


Schéma 11- Estérification du L-(+)-arabinose avec l'acide palmitique.

3. Influence du milieu réactionnel

L'utilisation d'enzymes en milieu non conventionnel présente certes plusieurs avantages dont les principaux sont le pouvoir catalytique et la sélectivité. Cependant, ces deux caractéristiques sont largement dépendantes du choix des différents paramètres de la réaction

⁸⁹ C. Serap, Y. Ali Fazil, B. Faika, S. Kamuran, D-glucose-fatty acid ester synthesis with or without a biocatalyst in the same organic media. *Journal of Oleo Science*. **2020**, 69, 7 737-742.

⁹⁰ M. Pappalardo, G. Carmen, Z. Federica, R. Nicoletta. Synthesis and characterization of arabinose-palmitic acid esters by enzymatic esterification. *Molecular Catalysis, Molecular Catalysis*, **2017**, 433, 383.

à savoir le solvant, la température, le temps etc... Nous allons passer en revue les différents facteurs et leur influence sur le milieu réactionnel.

a. Influence du solvant

L'influence des solvants sur les réactions enzymatiques est complexe. Le potentiel d'action des enzymes peut être considérablement amélioré en utilisant des solvants réactionnels autres que leurs milieux aqueux originels⁹¹. Le volume et la nature du solvant doivent être optimisés afin de ne pas diminuer le contact des réactifs avec l'enzyme.

1. Solvants organiques

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 non toxiques et facilement séparable des autres constituants du milieu. Ils doivent être compatibles avec l'activité enzymatique et ne doivent pas affecter la structure tridimensionnelle de l'enzyme ainsi que la couche d'hydratation indispensable à l'activité enzymatique⁹². Le solvant doit en effet posséder une certaine polarité qui lui permet de solubiliser les substrats et de maintenir en même temps l'activité de la lipase.

De plus, la régio-/stéréo- ou chimio-sélectivité de l'enzyme peut être modifiée en fonction de la nature du solvant réactionnel.

Les premiers auteurs à s'être intéressés à l'influence des solvants organiques sur les réactions de biocatalyse sont Brink et Tramper en 1985⁹³. Ces auteurs ont étudié l'influence de la polarité des solvants, mesurée grâce au paramètre de solubilité sur l'activité enzymatique. Cette approche a été critiquée par Laane *et al.*⁹⁴ du fait du manque de précision de la mesure et ont proposé de prendre plutôt le coefficient de partage, log P, comme indicateur de la polarité des solvants. Ces mêmes auteurs ont étudié l'effet de l'hydrophobicité des solvants sur l'activité catalytique de biocatalyseurs de différentes origines.

Donc L'hydrophobicité du solvant organique possède un effet significatif sur l'activité catalytique des lipases avec des effets plus ou moins importants suivant l'origine de l'enzyme.

⁹¹ F. Ferrari, Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides : prédiction de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases. *Thèse de doctorat*. **2017**.

⁹² A. M. Klibanov. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **2001**, 241.

⁹³ L.E.S. Brink, et J. Tramper. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, 27, 1258,

⁹⁴ M.P. Bousquet, R.M. Willemot, P. Monsan, et E. Bours, Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermo-cosmetic applications. *Biotechnol. Bioeng.*, **1999**, 63, 730.

L'étude menée par Bousquet *et al.*⁹⁵ sur la synthèse d'esters de glucosides et d'acides gras insaturés catalysée par la lipase immobilisée de *Candida antarctica* a montré que le solvant le plus adapté pour ce genre de synthèse est le 2-méthylbutan-2-ol dont la valeur de log P est de 1.30. En effet, ce solvant a permis d'obtenir le taux de conversion le plus élevé de l'acide gras (62 %) par rapport aux autres solvants utilisés.

Dans la plupart des synthèses réalisées avec la lipase de *Candida antarctica*, on a constaté que le solvant retenu est le butan-2-one⁹⁶.

En effet, ce solvant dissout le substrat potentiel pour cette lipase de telle sorte à diminuer l'encombrement stérique au niveau du site actif⁹⁷.

Selon Bousquet *et al.*⁹⁸, il s'agit d'un solvant non toxique pouvant être utilisé dans des domaines telles que la pharmacologie et la cosmétologie. En outre, la butanone est largement utilisée parce qu'elle permet de solubiliser la majorité des substrats utilisés et ne provoque pas la dénaturation de la lipase⁹⁹.

D'autres milieux tels que les milieux fondus^{100,101}, le CO₂ supercritique^{102,103}, les milieux biphasiques¹⁰⁴ sont utilisés pour l'acylation enzymatique. Ils confèrent aux enzymes des propriétés nouvelles et permettent d'observer des sélectivités différentes. Dans ce contexte les liquides ioniques peuvent être utilisés. Ce sont des solvants que l'on retrouve dans différents domaines de la synthèse comme la catalyse organique, la catalyse organométallique et la biocatalyse¹⁰⁵.

⁹⁵ C. Laane, S. Boeren, K. Vos. On optimizing organic solvents in multiphase liquid-liquid phase biocatalysis. *Trends Biotechnol.*, **1985**, 3, 251.

⁹⁶ D. Hugon, Production biotechnologique d'une nouvelle gamme de tensioactifs: des esters de tréhalose et d'acides gras. *Thèse de l'INPL, Nancy*, **2000**.

⁹⁷ A. Ducret, A. Giroux, M. Trani, R. Lortie, Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 48, 214.

⁹⁸ M.P. Bousquet, R.M. Willemot, P. Monsan, E. Boures, Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermo-cosmetic applications. *Biotechnol. Bioeng.*, **1999**, 63, 730.

⁹⁹ N. Khaled, Synthèse enzymatique d'une nouvelle classe de molécules amphiphiles originales: les sucroesters. *Thèse Doctorat de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier*. **1990**.

¹⁰⁰ H.R. Hobbs, N.R. Thomas, Biocatalysis in supercritical fluids, in fluorinated solvents, and under solvent-free conditions. *Chemical reviews.*, **2007**, 107, 2786.

¹⁰¹ M. Lancaster, Renewable resources. *Green Chem.* **2008**, 44, 166.

¹⁰² D.A. Hammond, M. Karel, A.M. Klivanov, V.J. Krukonis. Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, 11, 393.

¹⁰³ T. Yasmin, T. Jiang, B. Han, J. Zhang, X. Ma. Transesterification reaction catalysed by Novozym 435 in supercritical carbon dioxide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **2006**, 41, 27.

¹⁰⁴ L. Vaysse, A. Ly, G. Moulin, E. Aubreucq. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. *Enzyme Microb. Technol.*, **2002**, 31, 648.

¹⁰⁵ J. P. Hallett, T. Welton. Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis. *Chemical reviews.* **2011**, 111, 3508.

2. Les liquides ioniques

Dernièrement les Liquides Ioniques (LIs) sont devenus l'objet de nombreuses études récentes, ils sont devenus des solvants importants dans des domaines variés de la chimie¹⁰⁶ tels que l'électrochimie et le génie des procédés. Ils sont aussi utilisés dans la synthèse et la catalyse dans les réactions organiques, catalytiques ou biochimiques en raison de leurs propriétés spécifiques dues à leur composition.

D'autre part, leur grande stabilité thermique, leur efficacité à promouvoir une grande diversité de réactions chimiques et leur capacité à solubiliser les composés polaires et apolaires, rendent les liquides ioniques (LIs) des solvants appropriés pour la glycochimie^{107,108}. Ils sont capables de dissoudre les sucres libres¹⁰⁹ ainsi que les polysaccharides tels que la cellulose¹¹⁰. Ils sont aussi employés comme solvants dans les réactions de fonctionnalisation, de dérivatisation et d'hydrolyse de la cellulose¹¹¹.

Les premiers sels liquides ont été rapporté au début du 20^{ème} siècle par Walden *et al.* en 1914 durant la première guerre mondiale^{112,113}. Il a protoné l'éthylamine avec de l'acide nitrique pour conduire au nitrate d'éthylammonium (EtNH₃⁺, NO₃⁻), qui a un point de fusion de 14°C. Ces découvertes furent le début de l'ère des LIs tels qu'ils sont connus à ce jour¹¹⁴.

Dans les années 1960, le professeur John Yok, de l'Université de l'Oregon, relança le développement des LIs afin de former un liquide résultant du mélange de deux solides, le chlorure de cuivre et le chlorure d'alkylammonium selon l'équation:



Durant les années 1970 et 1980, les liquides ioniques composés d'anions comme les chloroaluminates ou de cations tels que les alkylphosphoniums ont été synthétisés. Ils représentent la première génération de liquides ioniques, basés sur le contre-ion AlCl₄⁻ ou

¹⁰⁶ P. Wasserscheid, T. Welton. *Ionic liquids in Synthesis* (2nd Edition): Weinheim : Wiley-Vch. **2008**.

¹⁰⁷ a) R. Rinaldi, F. Schüth. Acid hydrolysis of cellulose as the entry point into biorefinery schemes. *ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials*. **2009**, 2, 1096.

b) N. Meine, R. Rinaldi, F. Schüth, Solvent-free catalytic depolymerization of cellulose to water-soluble oligosaccharides. *ChemSusChem*, **2012**, 5, 1449.

¹⁰⁸ L. Xiao-Sheng, W. Qing, H. Ze-Lin, C. Yu-Zheng, J. P. Halling, Z. Yanga. Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology. *Process Biochemistry*, **2015**, 50 1852.

¹⁰⁹ Y. Zhen, H. Ze-Lin, Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids. *Catalysis Science & Technology*. **2012**, 2, 1767.

¹¹⁰ Fang, J. M.; Sun, R. C.; Salisbury, D.; Fowler, P.; Tomkinson, J. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polymer degradation and stability*. **1999**, 66, 423.

¹¹¹ A. Ebringerová, Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In: *Macromolecular symposia*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag. **2006**, 232, 1.

¹¹² P. Walden, Over the molecular size and electrical conductivity of some melted salts, *Bull. Acad. Imper. Sci*, **1914**, 8, 405.

¹¹³ E. Gassmann, J.E. Kuo, R.W. Zare. Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science*. **1985**, 230, 813.

¹¹⁴ J. S. Wilkes, A short history of ionic liquids - from molten salts to neoteric solvents. *Green Chem*. **2002**, 4, 73.

Al_2Cl_7^- , mais comportent un inconvénient majeur du fait de ne pas être stables à l'air. Depuis, de nombreux développements ont permis de résoudre la stabilité chimique des LIs, ce qui a permis d'élargir leur champ d'application à tous les domaines de la chimie.

Ces dernières années la modification du cation et le choix de l'anion ainsi que l'énorme nombre de leurs combinaisons possibles sont devenu un objectif d'intérêt important car ils ont permis d'améliorer les propriétés physiques et chimiques des liquides ioniques.

Wilkes et Zaworotko ont synthétisé des liquides ioniques en 1992 stables à l'humidité et à l'air, basés sur le cation 1-éthyl-3-méthylimidazolium avec le tétrafluoroborate ou l'hexafluorophosphate comme anion¹¹⁵. Après ces travaux, d'autres liquides ioniques basés sur des anions plus hydrophobes tels que l'hexafluorophosphates (PF_6^-), trifluorométhanesulfonate (CF_3SO_3^-), bis (trifluorométhanesulfonyl)amide $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-]$ et tris(trifluorométhanesulfonyl)méthide $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_3\text{C}^-]$ ^{116,117} ont été développés. Ces liquides ioniques ont reçu une attention intense, non seulement en raison de leur faible réactivité avec l'eau, mais aussi pour leurs larges fenêtres de stabilité électrochimique.

Depuis les années 1990 et jusqu'à maintenant, le remplacement des solvants organiques nocifs et volatils, traditionnellement utilisés dans l'industrie, par les liquides ioniques est devenu important dans une optique de chimie verte. Beaucoup de travaux ont été effectués récemment afin d'estimer leur toxicité¹¹⁸. Certaines questions importantes telles que le cycle de vie d'un liquide ionique, la pureté, la stabilité, la biodégradabilité et la régénération ont été intensément étudiées. De plus en plus, les liquides ioniques montrent des perspectives prometteuses dans des applications diverses comprenant la catalyse, la science des matériaux, et la technologie de séparation¹¹⁹ etc...

a. Définition

Les liquides ioniques sont des sels liquides qui possèdent un point de fusion inférieure à 100°C. Ils sont constitués d'un cation le plus souvent organique, associé à un anion organique ou inorganique et les combinaisons cations/anions possibles sont très nombreuses et en constante évolution¹²⁰.

¹¹⁵ J. S. Wilkes, M. J. Zaworotko, Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1992**, 32, 965.

¹¹⁶ P. Bonhôte, A-P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorganic chemistry*. **1996**, 35, 1168.

¹¹⁷ D. R. MacFarlane, P. Meakin, J. Sun, N. Amini, Pyrrolidinium imides: a new family of molten salts and conductive plastic crystal phases. *The Journal of Physical Chemistry B*. **1999**, 4164.

¹¹⁸ J. Ranke, A. Mueller, U. Bottin-Weber, F. Stock, S. Stolte, J. Arning, R. Stoermann, B. Jastorff. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*. **2007**, 67, 430.

¹¹⁹ J. Wu, J. Zhang, H. Zhang, J. He, Q. Ren, M. Guo. Homogeneous acetylation of cellulose in a new ionic liquid. *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 266.

¹²⁰ Olivier-Bourbigou, H.; Vallee, C. In *Multiphase Homogeneous Catalysis*; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**, 2, 413.

Généralement les cations rencontrés sont de nature volumineuse et dissymétrique. Les plus représentés sont à la base de systèmes hétéroaromatiques tels que : l'imidazolium, les pyridiniums, les pyrrolidiniums, le phosphonium, le triazolium le tétraalkylammonium. Les plus étudiés sont les sels d'imidazoliums diversement substitués sur les atomes d'azote et de carbone (Schéma 12).

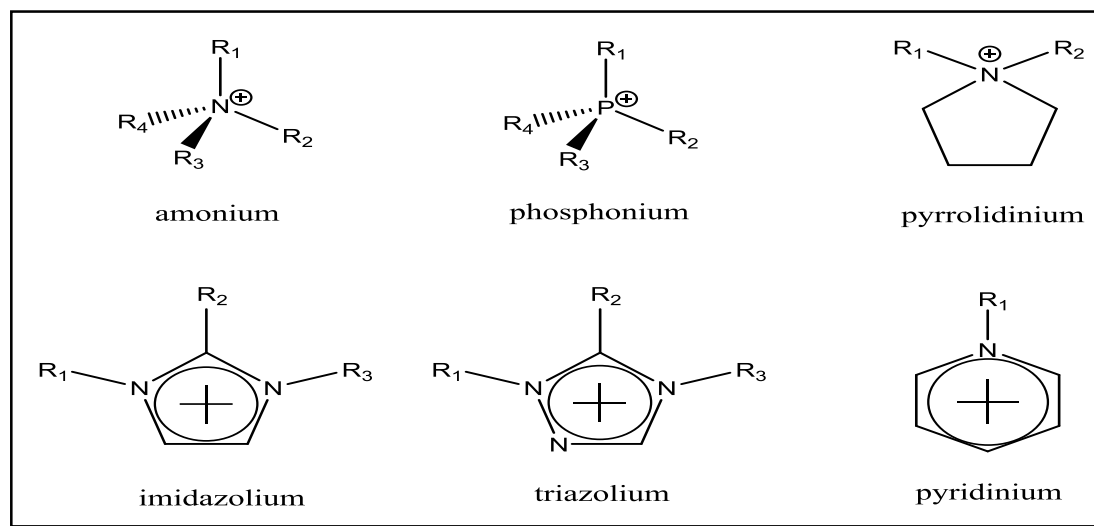


Schéma 12- Cations des liquides ioniques

En outre, une série de cations fonctionnalisés a été récemment développée notamment des cations portant des groupements amines¹²¹, alcools ou éthers^{122,123}, acides carboxyliques ou esters¹²⁴, thiols¹²⁵, vinyl et allyl^{126,127}, alcynes^{128,129} ou encore nitriles^{130,131}. Des cations

¹²¹ W. A. Herrmann, C. Koecher, L. J. Goossen, G. R. J. Artus. Heterocyclic carbenes: A high-yielding synthesis of novel functionalized N-heterocyclic carbenes in liquid ammonia. *Chemistry—A European Journal*. **1996**, 2, 1627.

¹²² L. C. Branco; J. N. Rosa, J. J. M. Ramos, C. A. M. Afonso, Preparation and characterization of new room temperature ionic liquids. *Chemistry—A European Journal*, **2002**, 8, 3671.

¹²³ A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. Rasheed, Ionic liquids based upon metal halide/substituted quaternary ammonium salt mixtures. *Inorganic chemistry*. **2004**, 43, 3447.

¹²⁴ Z. Fei, W. H. Ang, T. J. Geldbach, R. Scopelliti, P. J. Dyson. Ionic Solid-State Dimers and Polymers Derived from Imidazolium Dicarboxylic Acids. *Chemistry—A European Journal*. **2006**, 12, 4014-4020.

¹²⁵ Itoh, H.; Naka, K.; Chujo, Y. Synthesis of gold nanoparticles modified with ionic liquid based on the imidazolium cation. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 3026.

¹²⁶ Z. Fei, D. Kuang, D. Zhao, C. Klein, W. H. Ang, S. M. Zakeeruddin, M. Graetzel, P. J. Dyson. A supercooled imidazolium iodide ionic liquid as a low-viscosity electrolyte for dye-sensitized solar cells. *Inorganic Chemistry*. **2006**, 45, 10407.

¹²⁷ F. Mazille, Z. Fei, D. Kuang, D. Zhao, S. M. Zakeeruddin, M. Graetzel, P. J. Dyson, Influence of ionic liquids bearing functional groups in dye-sensitized solar cells. *Inorganic chemistry*, **2006**, 45, 1585.

¹²⁸ H. Schottenberger, K. Wurst, U. E. I. Horvath, S. Cronje, J. Lukasser, J. Polin, J. M. McKenzie, H. G. Raubenheimer. Synthesis and characterisation of organometallic imidazolium compounds that include a new organometallic ionic liquid. *Dalton Transactions*, **2003**, 4275.

¹²⁹ Z. Fei, D. Zhao, R. Scopelliti, P. J. Dyson, Organometallic complexes derived from alkyne-functionalized imidazolium salts. *Organometallics*, **2004**, 23, 1622.

¹³⁰ D. Zhao, Z. Fei, R. Scopelliti, P. J. Dyson. Synthesis and characterization of ionic liquids incorporating the nitrile functionality. *Inorganic chemistry*. **2004**, 43, 2197.

¹³¹ D. Zhao, Z. Fei, T. J. Geldbach, R. Scopelliti, P. J. Dyson, Nitrile-functionalized pyridinium ionic liquids: Synthesis, characterization, and their application in carbon-carbon coupling reactions. *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 15876.

chiraux ont également été synthétisés^{132,133}. Les anions utilisés sont des anions inorganiques ou organiques (Tableau 1).

Tableau 1- Exemple d'anions des liquides ioniques

Anions inorganiques	Anions organiques
OH ⁻ , SCN ⁻ , BF ₄ ⁻ , NTf ₂ ⁻ , N(CN) ₂ ⁻ C ₆ H ₄ (CO) ₂ N ⁻ , DCA ⁻ , AlCl ₄ ⁻ , I ⁻ , Br ⁻ Cl ⁻ , PF ₆ ⁻ , CuCl ₂ ⁻ , AuCl ₄ ⁻ , ZnCl ₃ ⁻ SnCl ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻	Sulfonate, tosylate, acétate, triflate, imides R ₃ BOH ⁻ , BR ₄ ⁻ , CF ₃ CO ₂ ⁻ , CF ₃ SO ₃ ⁻ , (CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻

D'autres anions ont récemment été développés avec des propriétés spécifiques telles que des anions fonctionnalisés par des nitriles¹³⁴, des hydroxyborates¹³⁵ ou des bases de Lewis¹³⁶. Des systèmes anioniques à base d'hétéropolyanions ou de sels métalliques sont également étudiés^{137,138}.

b. Propriétés physico-chimiques des liquides ioniques

Les liquides ioniques présentent un grand intérêt du fait de leurs propriétés physico-chimiques particulières qui font d'eux une classe de solvants très convoitée : en raison d'une grande plage de stabilité thermique et chimique, facilité de préparation, une conductivité élevée de la chaleur et d'une faible pression de saturation de la vapeur les rendant ininflammables^{139,140}.

D'autre part, les propriétés des LI sont principalement liées à leur possibilité d'agir en tant que donneur ou accepteur de liaison hydrogène¹⁴¹. Les interactions de Van der Waals sont un des paramètres important qui dépendent fortement du type d'anion mis en jeu.

¹³² C. Baudequin,; J. Baudoux,; J. Levillain,; D. Cahard,; A. C. Gaumont,; J.- C. Plaquevent,. Ionic liquids and chirality: opportunities and challenges. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, *14*, 3081.

¹³³ C. Baudequin,; D. Bregeon,; J. Levillain,; F. Guillen,; J.-C. Plaquevent, A.-C Gaumont. Chiral ionic liquids, a renewal for the chemistry of chiral solvents? Design, synthesis and applications for chiral recognition and asymmetric synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3921.

¹³⁴ Y. Yoshida, O. Baba, G. Saito, Ionic liquids based on dicyanamide anion: influence of structural variations in cationic structures on ionic conductivity. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2007**, *111*, 4742.

¹³⁵ C. Bibal,; C. C. Santini, Y. Chauvin, H. Olivier-Bourbigou, C. Vallée, A selective synthesis of hydroxyborate anions as novel anchors for zirconocene catalysts. *Dalton Transactions*. **2008**, *04*, 935.

¹³⁶ D. R. MacFarlane, J. M. Pringle, K. M. Johansson, S. A. Forsyth, M. Forsyth. Lewis base ionic liquids. *Chemical communications*. **2006**, 1905.

¹³⁷ T. Welton, Ionic liquids in catalysis. *Coordination chemistry reviews*. **2004**, *248*, 2459.

¹³⁸ V. Lecocq, A. Graille, C. C. Santini, A. Baudouin. Y. Chauvin. J.-M. Basset. D. Bouchu, B. Fenet, Synthesis and characterization of ionic liquids based upon 1-butyl-2, 3-dimethylimidazolium chloride/ZnCl₂. *New journal of chemistry*. **2005**, *29*, 700.

¹³⁹ M. J. Earle, J. M. S. S. Esperanca, M. A. Gilea, J. N. Canongia Lopes, L. P.N. Rebelo, J. W. Magee, K. R. Seddon, J. A. Widegren, The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature*, **2006**, *439*, 831.

¹⁴⁰ L. Jing-fu, J. A. Jonsson, G-B Jiang, Application of ionic liquids in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2005**, *24*, 1.

¹⁴¹ T. Welton. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chemical reviews*, **1999**, *99*, 2071.

De plus, la possibilité d'ajuster leurs caractéristiques physico-chimiques par variation de la nature de l'anion ou du cation ou en modifiant les substituants portés par le cation du LI est un atout majeur. Il faut aussi mentionner que les LIs sont capables de dissoudre un grand nombre de composés organiques ou inorganiques. Les paramètres suivants seront discutés.

1. Le point de fusion

L'un des principaux critères d'évaluation du liquide ionique est, par définition, son point de fusion. Un sel fondu est défini comme un liquide ionique lorsque son point de fusion est inférieur à 100°C. Le point de fusion est difficile à corrélérer avec la composition chimique.

Les principaux facteurs qui influencent le point de fusion des liquides ioniques sont^{142,143}: la distribution de charge sur les ions, la possibilité de liaisons hydrogène, la symétrie des ions et les interactions de Van der Waals, la longueur de la chaîne alkyle portée par l'hétéroatome (N, P ou S), les ramifications des chaînes alkyles, la nature du cation mais surtout de celle de l'anion¹⁴⁴, plus l'anion est volumineux, plus le point de fusion du LI est bas. De même, les cations encombrés et portant des substituants dissymétriques conduisent à des LIs à plus bas point de fusion¹⁴⁵.

Les faibles valeurs de points de fusion sont attribuées à une importante délocalisation de la charge sur l'anion, une diminution de l'attraction coulombienne dans le sel et à une faible interaction de liaison hydrogène

La longueur de la chaîne alkyle substituée sur les cations des liquides ioniques a une grande influence sur leur point de fusion. Holbrey *et al.*, et Chun *et al.* ont systématiquement étudié l'influence de ce paramètre¹⁴⁶. Il apparaît, en règle générale, une diminution de la valeur du point de fusion lorsque l'on augmente la chaîne alkyle du méthyle au butyle, puis un palier pour les chaînes butyle à hexyle, et enfin une augmentation pour les chaînes alkyle supérieure à l'hexyle.

¹⁴² J. L. Anthony, J. F. Brennecke, J. D. Holbrey, E. J. Maginn, R. A. Mantz, R. D. Rogers, P. C. Trulove, A. E. Visser, T. Welton, Wasserscheid, P., Welton., Phase equilibria of gases and liquids with 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate: *T. Ed Wiley-VCH: Weinheim*, **2003**, 41-55.

¹⁴³ P.J. Dyson, Kluwer Elucidation of the protein folding landscape by NMR. In: *Methods in enzymology. Academic Press*. **2005**, 394, 299.

¹⁴⁴ P. A. Hunt, Why does a reduction in hydrogen bonding lead to an increase in viscosity for the 1-butyl-2, 3-dimethylimidazolium-based ionic liquids. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2007**, 111, 4844.

¹⁴⁵ F. Endres,; S. Zein, Air and water stable ionic liquids in physical chemistry. *Physical chemistry chemical physics*, **2006**, 8, 2101.

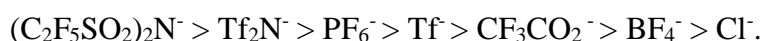
¹⁴⁶ T. Gutel, Les liquides ioniques, leur utilisation et leur rôle comme solvants de réaction catalytique, *thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I*, **2007**.

2. Densité et Viscosité

a. La densité

La plupart des liquides ioniques sont généralement plus denses que l'eau avec des densités comprises entre 1.2 et 1.6 g.cm⁻³ (à 25°C). La densité des LIs diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle portée par le cation imidazolium augmente. En général, elle est contrôlée par la nature de l'anion et augmente linéairement lorsque la température diminue¹⁴⁷.

Pour un même cation, la densité semble décroître avec la masse molaire des anions. On peut ainsi, par la synthèse de divers travaux, définir l'ordre suivant¹⁴⁸ :



b. La viscosité

Les liquides ioniques sont des liquides très visqueux, environ deux ordres de grandeur de plus que l'eau ou les solvants organiques classiques. En effet, la viscosité d'un liquide ionique augmente avec l'allongement de la chaîne alkyle et ce pour un même anion.

La viscosité des LIs est fortement dépendante de la nature des deux ions. Les viscosités élevées sont attribuées à la petite taille de l'anion, pour lequel les interactions électrostatiques et les liaisons d'hydrogène sont plus fortes^{149,150}.

En plus, la symétrie de l'anion inorganique a été considérée comme un paramètre additionnel. La viscosité diminue dans l'ordre Cl⁻ > [PF₆]⁻ > [BF₄]⁻ > [TFSI]⁻ pour les anions et pyrroldinium > imidazolium pour les cations¹⁵¹. D'autre part, l'augmentation des interactions de Van der Waals entraîne la diminution des interactions coulombiennes provoquant ainsi la diminution de la fluidité (l'inverse de la viscosité)¹⁵².

Des propriétés physiques pour quelques liquides ioniques, à température ambiante, sont récapitulées dans le Tableau 2.

¹⁴⁷ S. V. Dzyuba, A. Bartsch Richard, Influence of structural variations in 1-alkyl (aralkyl)-3-methylimidazolium hexafluorophosphates and bis (trifluoromethylsulfonyl) imides on physical properties of the ionic liquids. *ChemPhysChem*. **2002**, 3, 161.

¹⁴⁸ J.J. Fox, J.L. McHarg, R.F. Gilmour, Ionic mechanism of electrical alternans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **2002** 282, H51.

¹⁴⁹ C. Chiappe, D. Pieraccini, Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *Journal of Physical Organic Chemistry*. **2005**, 18, 275.

¹⁵⁰ L. C. Branco, J. N. Rosa, J. J. Moura Ramos, Preparation and characterization of new room temperature ionic liquids. *Chemistry—A European Journal*. **2002**, 8, 3671.

¹⁵¹ J. G. Huddleston, A. E. Visser, W. M. Reichert, H. D. Willauer, G. A. Broker and R. D. Rogers. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green chemistry*. **2001**, 3, 156.

¹⁵² C. A. Angell, N. Byrne, J-P. Belieres, Parallel developments in aprotic and protic ionic liquids: physical chemistry and applications. *Accounts of chemical research*, **2007**, 40, 1228.

Tableau 2- Propriétés physiques de quelques liquides ioniques, à température ambiante¹⁵³.

Liquide ionique	Point de fusion (C°)	Densité (g.ml ⁻¹)	Viscosité (Cp)
1-Butyl-3-methylimidazolium			
Hexafluorophosphate	10	1.373	450
Tetrafluoroborate	-81	1.208	219
Trifluoroacetate		1.209	73(20°C)
Trifluoromethanesulfonate	16	1.290	90
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide		1.429	52
Octylsulfate		1.064	34
1-Ethyl-3-methylimidazolium			
Trifluoroacetate	-14	1.285	35(20°C)
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide	-39	1.470	37
Trifluoromethanesulfonate	-9	1.390	45(20°C)
Trifluoroacetate	-14	1.285	35(20°C)
Tetrafluoroborate	6	1.248(20°C)	67(20°C)
Ethylsulfate		1.238	98
1-Hexyl-3-methylimidazolium			
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide		1.377	71
Hexafluorophosphate	-61	1.310	585
Tetrafluoroborate	-82	1.208	314
1-Octyl-3-methylimidazolium			
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide	-86	1.310	87
Tetrafluoroborate	-79	1.110	493
Hexafluorophosphate	-70	1.238	682

3. Solubilité

Le grand pouvoir de solubilisation des LIs (une large gamme de composés organiques, inorganiques et organométalliques) et le fait d'être liquides dans une large gamme de température permettent de les envisager facilement comme solvants de réaction.

a. Solubilité dans l'eau

Les LIs à base d'imidazolium sont généralement hygroscopiques mais ils peuvent être soit totalement miscibles avec l'eau (LIs hydrophiles) soit partiellement (LIs hydrophobes).

¹⁵³ F. Colin Poole, K. Salwa, Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 2268.

Ce comportement est principalement gouverné par la nature de l'anion qui forme des liaisons hydrogène avec l'eau et la longueur des chaînes alkyles du cation¹⁵⁴.

Une collection utile de données de solubilité pour les liquides ioniques dans l'eau a été préparée par Ranke *et al*¹⁵⁵. Des données représentatives pour la solubilité mutuelle des liquides ioniques avec l'eau et à température ambiante sont récapitulées dans le Tableau 3.

Tableau 3- solubilité du binaire liquide ionique/eau à 25°C

Liquide ionique	Solubilité LI/eau		Solubilité eau/LI	
	Fraction molaire	Pourcentage massique(%)	Fraction molaire	Pourcentage massique(%)
1-Ethyl-3-methylimidazolium				
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide	8.38x10-4	1.81	0.298	1.94
Tetracyanoborate		4.2		11.7
1-Butyl-3-methylimidazolium				
Hexafluorophosphate	1.21x10-3	2.0	0.272	2.3
Tricyanomethane	6.22x10-3		0.857	
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide	3.07x10-4	0.72	0.257	1.84
Tris(trifluoromethylsulfonyl)methide		0.11		0.53
1-Butyl-2,3- dimethylimidazolium				
Hexafluorophosphate	8,17 x 10-4	1,60		
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide		0,61		
1-Hexyl-3-methylimidazolium				
Hexafluorophosphate	4,34 x10-4		0,229	1.05
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide	9,58 x 10-5	0.24	0,208	
1-Octyl-3-methylimidazolium				
Hexafluorophosphate	1,27 x 10-4	0.7	0,205	1,3
Tetrafluoroborate	1,17 x 10-3	1.8	0,63	10,8
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide	3,36 x 10-5	0.09	0,187	0,87
1-Methyl-3-propylpyridinium				
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide	3,75 x 10-4		0.236	

¹⁵⁴ L. Cammarata, S. G. Kazarian, P. A. Salter, T. Welton,, Molecular states of water in room temperature ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2001**, 3, 5192.

¹⁵⁵ J. Ranke, A. Othman, P. Fan, A. Muller, Explaining ionic liquid water solubility in terms of cation and anion hydrophobicity. *International journal of molecular sciences*, **2009**, 10 1271.

b. Solubilité dans les solvants organiques

La plupart des liquides ioniques sont entièrement ou partiellement miscibles avec des solvants organiques polaires par exemple, méthanol, acétonitrile, tétrahydrofurane, dichlorométhane, acétone, etc... Des systèmes biphasés sont généralement formés avec des solvants organiques à basse polarité par exemple, hexane, toluène, éthers alkyliques.

4. Toxicité et biodégradabilité

Les LIs sont souvent présentés comme des solvants de la chimie verte. Leur toxicité est pour l'instant méconnue, bien que certaines études ont été entreprises pour évaluer quelques propriétés toxicologiques^{156,157}. Des études systématiques, s'intéressant principalement aux LIs à base d'imidazolium, ont été entreprises assez récemment.

Ranke *et al.*¹⁵⁸ démontrent que plus la chaîne alkyle latérale du cation est longue plus la toxicité du LI est grande. L'introduction d'une chaîne polaire réduit leur toxicité et augmente leur biodégradabilité. En revanche, aucune tendance n'a pu être dégagée quant à l'influence de la nature du cation: imidazolium, pyridinium, ou ammonium quaternaire, même si les cations non-aromatiques paraissent moins toxiques que les cations aromatiques¹⁵⁹.

Il a par contre été montré que les LIs étaient ininflammables¹⁶⁰.

c. Application des liquides ioniques

En raison de la grande variété des propriétés physico-chimiques des liquides ioniques, nous trouvons de nombreuses applications différentes dans les domaines de la catalyse chimique, la biocatalyse, la synthèse organique, l'électrochimie, et une variété de processus d'analyses tels que la séparation, l'extraction, l'électro-analyse, la détection et la spectrométrie.

Au cours de la dernière décennie, un certain nombre de vues détaillées ont introduit les avantages de l'utilisation des liquides ioniques comme de bons solvants pour la synthèse organique¹⁶¹. De par leur faible volatilité, les liquides ioniques constituent une alternative

¹⁵⁶ J. Ranke, S. Stolte, R. Stoermann, J. Arning. Design of sustainable chemical products the example of ionic liquids. *Chemical Reviews*, **2007**, 107, 2183.

¹⁵⁷ J. Ranke, A. Mueller, U. Bottin-Weber, Stock, F. S. Stolte, J. Arning, R. Stoermann, B. Jastorff, Ecotox. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, **2007**, 67, 430.

¹⁵⁸ J. Ranke, K. Molter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser, B. Jastorff, Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicology and environmental safety*, **2004**, 58, 396.

¹⁵⁹ S. Stolte, M. Matzke, J. Arning, A. Boschen, W. R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Green Chemistry*, **2007**, 9, 1170.

¹⁶⁰ M. Smiglak, W. M. Reichert, J. D. Holbrey, J. S. Wilkes, L. Sun,; Thrasher, J. S.; Kirichenko, Combustible ionic liquids by design: is laboratory safety another ionic liquid myth. *Chemical Communications*, **2006**, 2554.

¹⁶¹ P. Joan Brennecke. P. Kenneth Seddon. P. Kenneth Marsh. Dr. Joe Magee, Workshop on Ionic Liquids: Properties of Ionic Liquids and their Application in Chemical Engineering. *IAC/IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics*, **2002**.

intéressante aux solvants moléculaires classiques. La sécurité des procédés a été grandement améliorée car tous les liquides ioniques sont ininflammables. De plus la contamination atmosphérique devient négligeable, ce qui réduit considérablement les conséquences pour la santé des opérateurs. Cependant, alors que la plupart des liquides ioniques ont une faible toxicité, il est difficile d'admettre que des sels dont l'anion est un cyanure ou un mercurate soient qualifiés d'écocompatibles.

1. Biocatalyse

La biocatalyse est une méthode particulièrement attrayante en raison de la grande activité et la grande stéréospécificité des enzymes. En revanche, les enzymes ne sont actifs que sur un nombre limité de substrats qui doivent être soluble en milieu aqueux pour pouvoir être transformés¹⁶².

Dès lors de nombreuses équipes se sont tournées vers l'utilisation d'autres solvants pour effectuer des réactions enzymatiques. Les premiers exemples de biocatalyse dans les liquides ioniques datent du début des années 2000, principalement liés à l'utilisation de sels d'ammonium et d'imidazolium.

L'intérêt principal au début était tout simplement de remplacer les solvants organiques par d'autres liquides non volatils pouvant être recyclés. Les enzymes sont des objets biologiques dont l'activité est extrêmement liée à la structure tridimensionnelle¹⁶³. Les LIs de par leurs structures leur offrent une meilleure stabilité. En effet, les études ont récemment montré que les liquides ioniques pouvaient stabiliser de manière impressionnante les enzymes. En effet il a été possible de conserver une activité enzymatique importante à 150°C sous 100 MPa. Cela ouvre la voie à de nombreuses applications industrielles de la biocatalyse qui étaient jusqu'ici écartées du fait des temps de réactions prohibitifs¹⁶⁴. En effet, l'augmentation de température s'accompagne d'une augmentation drastique de la vitesse de réaction mais conduit généralement à une inactivation tout aussi rapide. En présence de liquide ionique, les enzymes peuvent être stabilisés ce qui engendre des réductions importantes de temps de réactions (quelques heures vs quelques jours).

¹⁶² E. Abdulmalek, H.S.M. Saupi, B.A. Tejo, M. Basri, A.B. Salleh, R.N.Z.R.A. Rahman, M.B.A. Rahman, Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2012**, 76, 37.

¹⁶³ Zang, S., Fang, D.-W., Li, J., Zhang, Y.-Y., Yue, S. The estimation of physico-chemical properties of ionic liquid N-propylpyridine rheniumate. *Fluid phase equilibria*. **2009**, 283, 93.

¹⁶⁴ P. Lozano, T. Diego, M. Larnicol, M. Vaultier, J.L. Iborra. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1 phenylethanol in ionic liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems. *Biotech Lett*. **2006**, 28, 1559.

2. En électrochimie

Les propriétés des liquides ioniques telles que leur très large domaine d'électroactivité, leur forte conductivité, et leur grande stabilité thermique ont fait de ces nouveaux milieux des candidats de choix dans la recherche de nouveaux systèmes d'énergie (cellule photovoltaïque, batterie...). Caja et *al.* ont montré, dans la recherche des batteries aux ions Li⁺ qui constitue un axe très important des batteries rechargeables, que les liquides ioniques, utilisés comme électrolyte, permettraient d'avoir une conductivité cinq fois supérieure aux électrolytes à base de solvant organique et de sel¹⁶⁵. De plus, leurs domaines d'électro-activité peuvent atteindre 4,5V comparé à 1,2 V pour les électrolytes aqueux et ils offrent une très bonne stabilité thermique et une meilleure solubilité que les composés usuels à base d'ammonium quaternaire.

3. Catalyse chimique

La synthèse organique et la catalyse sont des domaines en pleine extension dans l'utilisation des liquides ioniques. Il existe de nombreuses applications des liquides ioniques dans ces domaines¹⁶⁶. D'un point de vue chimique, le principal potentiel des liquides ioniques est d'augmenter le rendement et la cinétique de la réaction et d'améliorer la chimio- et la régio-sélectivité par rapport aux solvants organiques.

D'un point de vue pratique et économique, la grande variété des liquides ioniques permet d'améliorer les réactions selon les propriétés propres à chaque liquide ionique. De plus, il est possible de séparer plus facilement le produit de la réaction et le catalyseur utilisé permettant ainsi un possible recyclage des liquides ioniques (aspect environnemental). Une des premières applications des liquides ioniques fut naturellement l'utilisation de chloroaluminates à la fois en tant que solvant et acide de Lewis⁴⁴.

3. Influence de la nature de la lipase

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 à leur spécificité, leur biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. On observe ces dernières années un intérêt grandissant pour l'utilisation des

¹⁶⁵ P.J. Dyson, Metal catalysed reactions in ionic liquids, *Kluwer Academic Pub*, **2005**, 15, 122.

¹⁶⁶ S. Ding, M. Radosz, Y. Shen, Ionic liquid catalyst for biphasic atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate. *Macromolecules*, **2005**, 38, 5921. ¹⁶⁶ P. Lozano, T. Diego, M. Larnicol, M. Vaultier, J.L. Iborra. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1 phenylethanol in ionic liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems. *Biotech Lett.* **2006**, 28, 1559.

¹⁶⁶ P.J. Dyson, Metal catalysed reactions in ionic liquids, *Kluwer Academic Pub*, **2005**, 15, 122.

¹⁶⁶ S. Ding, M. Radosz, Y. Shen, Ionic liquid catalyst for biphasic atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate. *Macromolecules*, **2005**, 38, 5921.

lipases en catalyse en milieu organique. De par sa nature la lipase peut avoir une influence significative sur l'évolution des réactions chimiques lors de son utilisation en tant que biocatalyseur. Sa stabilité et son activité vis-à-vis des réactifs peuvent être améliorées par plusieurs procédés.

Une approche possible pour stabiliser les enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée. La modification des enzymes change leur stabilité, leur activité enzymatique, leur pH optimum et leur réactivité vis-à-vis des substrats. Ces changements dépendent de la source de l'enzyme, du type de support et de la méthode de modification utilisée.

L'amélioration de la stabilité des enzymes peut être obtenue par leur immobilisation sur un support insoluble approprié notamment via les fonctions amines ou acides de l'enzyme qui conduisent à la création des liaisons physiques ou chimiques entre le support et l'enzyme¹⁶⁷.

L'immobilisation est la méthode la plus utilisée pour assurer la stabilité des enzymes au sein d'un procédé industriel¹³⁷.

a. Immobilisation des enzymes

Le développement de nouvelles méthodes analytiques pour la recherche et l'industrie fait de plus en plus appel à l'utilisation d'enzymes spécifiques. Il est donc essentiel de trouver une méthode pour stabiliser les enzymes contre leur dénaturation.

Les travaux concernant l'immobilisation des enzymes ne se sont en réalité développés qu'à partir des années soixante lorsque ces dernières sont devenues disponibles^{168,169,170,171}.

Pour qu'une réaction enzymatique ait lieu dans les meilleures conditions possibles, il faut que cette dernière soit stable. Ainsi, au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques. Une des approches permettant d'augmenter la stabilité de ces enzymes est l'immobilisation sur une matrice appropriée en raison de la préservation de la structure tridimensionnelle active.

L'enzyme peut avoir une conformation plus contraignante dans son état immobilisé, provoquant une diminution de son activité ou bloquant son site catalytique. Les matrices de confinement doivent donc permettre la libre diffusion du substrat vers le site actif et favoriser une conformation spatiale suffisamment libre pour préserver son activité biologique. Si ces

¹⁶⁷ E.N. Vulfson, P.J. Halling, H.L. Holland, Enzymes in nonaqueous solvents: methods and protocols, *Humana Press*, **2001**, 701.

¹⁶⁸ B. Eric, B. Jean-François. Catalyse enzymatique. *Techniques de l'ingénieur*, **1992**, 240, 1.

¹⁶⁹ C. Didier, M. Pierre. Biocatalyse ou catalyse enzymatique. *Techniques de l'ingénieur*, **2009**, 590, 1.

¹⁷⁰ C. Blecker, M. Christophe, Les lipases immobilisées et leurs application. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **2008**, 12, 57

¹⁷¹ MF. Chaplin, C. Bucke. Enzyme Technology. *Cambridge University Press*, **1990**.

conditions sont respectées, les avantages de l'immobilisation sont la limitation du relargage provoqué par les rinçages, une enzyme plus stable et une durée de vie accrue.

D'un point de vue industriel, il a été observé que les biocatalyseurs immobilisés présentaient une meilleure stabilité et dans certains cas pouvait induire des changements au niveau l'activité enzymatique, du pH optimum et de l'affinité vis-à-vis du substrat.

D'autre part, l'immobilisation de l'enzyme permet soit de l'utiliser en réacteur continu ; soit de pouvoir la récupérer et la réutiliser (ces deux aspects peuvent également être combinés). Il est ainsi très simple d'augmenter de manière significative l'économie d'un procédé enzymatique et ceci d'autant plus que le coût de l'enzyme est élevé^{172,173,174,175}.

Il est également important de rappeler que dans les systèmes vivants ou dans la nature, les enzymes n'agissent pratiquement qu'à l'état immobilisé comme par exemple à la surface des structures membranaires d'une cellule ou d'un organite cellulaire. L'immobilisation d'une enzyme permet donc de mieux contrôler et déterminer l'effet du microenvironnement sur son activité catalytique^{176,177}.

L'immobilisation des enzymes se révèle indispensable à la mise en œuvre de réactions catalytiques à l'échelle industrielle et les différents processus se doivent d'être maîtrisés par les industriels.

1. Les différentes techniques d'immobilisation

L'immobilisation consiste à ajouter à l'enzyme des composés différents tels que des protéines, des sucres, des supports solides etc... Ceci permet d'aboutir à différents types de préparations enzymatiques sous forme de poudre ou de liquide pour donner une enzyme enrobée ou sous forme de microgranulés.

Le choix du type d'immobilisation dépend fortement de la nature de l'application désirée. Par exemple le couplage covalent de l'enzyme est souvent utilisé pour l'élaboration de biocapteurs, alors que l'encapsulation de biomolécules est adaptée aux relargages dans des cellules vivantes afin de libérer la molécule active au niveau de sa cible lors de traitements thérapeutiques. En outre, les propriétés physico-chimiques de l'enzyme doivent être prises en

¹⁷² I. Alexander, S. Manfred. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *Journal of Molecular Catalysis*, **1997**, 3, 303.

¹⁷³ D. Sumitra, R. Christena, R. Yamuna, R. Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*, **2013**, 3, 1.

¹⁷⁴ M. Eisenmenger, J. Reyes-De-Corcuera. High hydrostatic pressure increased stability and activity of immobilized lipase in hexane. *Enzyme and Microbial Technology*, **2009**, 45, 118.

¹⁷⁵ Z. Dijkstra, R. Merchant, J.T.F. Keurentjes. Stability and activity of enzyme aggregates of CALB in supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, **2007**, 41, 102.

¹⁷⁶ D. Combes, P. Monsan. Biocatalyse ou catalyse enzymatique. *Techniques de l'ingénieur*, **2009**, 11, 1.

¹⁷⁷ M.F. Chaplin., C. Bucke. Enzyme Technology. *Cambridge University Press*, **1990**.

compte. Les enzymes sont sensibles aux changements de température et de pH et présentent une activité optimale dans un domaine précis de ces paramètres. Il est donc nécessaire de les associer à la matrice dans les conditions favorables à leur préservation, c'est-à-dire d'élaborer des matériaux hybrides dans des conditions douces de synthèse (procédés de Chimie Douce). Dans cette partie, nous présentons les différents modes d'immobilisation de l'enzyme et les différentes matrices de confinement utilisées¹⁷⁸¹⁷⁹.

Il existe quatre principales méthodes d'immobilisation faisant appel à des processus physiques et chimiques différents comme le présente la Figure 5.

- a) Immobilisation par adsorption.
- b) Immobilisation par liaison covalente.
- c) Immobilisation par inclusion.
- d) Immobilisation par encapsulation.

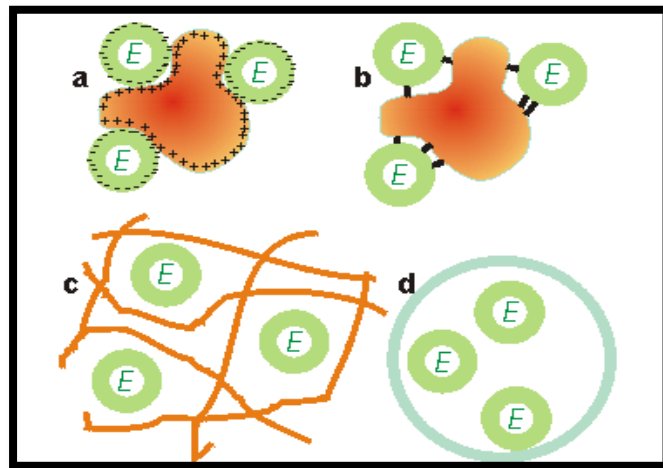


Figure 5- *Les différentes techniques d'immobilisation d'enzymes*
(a) Immobilisation par adsorption ; (b) Immobilisation par liaison covalente ;
(c) Immobilisation par inclusion ; (d) Immobilisation par encapsulation¹⁸⁰.

a. Immobilisation par adsorption

L'adsorption d'enzymes sur des matrices insolubles est la méthode la plus simple d'immobilisation. La procédure implique l'incubation de la protéine avec l'adsorbant dans des conditions appropriées (pH, température). Le matériau hybride est récupéré après filtration ou centrifugation. Les interactions qui existent entre l'enzyme et l'adsorbant, sont des interactions faibles de type électrostatiques ou Van der Waals. Cependant, le procédé

¹⁷⁸ J. M. Guisan. Immobilization of Enzymes and Cells. *Methods Biotechnol*, **2006**, 22.

¹⁷⁹ U. Hanefeld, L. Gardossi and E. Magner, Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 468.

¹⁸⁰ M.F. Chaplin., C. Bucke. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press, **1990**.

d'adsorption est réversible et peut conduire dans certaines conditions d'utilisation à la désorption de la biomolécule et donc à l'altération du matériau. Toutefois des différents modes d'immobilisation, l'adsorption est la méthode qui induit le moins de modification de la conformation de l'enzyme ce qui en fait une technique préférée pour l'immobilisation des enzymes^{181,182}.

Un autre avantage important de l'immobilisation des enzymes est que les enzymes immobilisées peuvent présenter des propriétés qui peuvent être exploitées dans les réactions réalisées dans des milieux non aqueux. Typiquement, les enzymes natives sont actives dans les milieux aqueux. Cependant, lorsqu'elles sont immobilisées, les enzymes peuvent voir leurs propriétés catalytiques modifiées de manière à leur permettre de conserver leur activité catalytique dans des conditions autres qu'aqueuses. Ceci est important car de telles enzymes peuvent être utilisées pour les transformations de substrats pouvant être effectuée uniquement dans des solvants organiques¹⁸³. D'autre part, les enzymes immobilisées peuvent présenter des propriétés catalytiques dans les solvants organiques différentes de celles observées en milieu aqueux¹⁸⁴.

Les supports adsorbants utilisés sont très variés tant du point de vue de leur structure chimique que de celui de leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité). Ces derniers peuvent être classés en deux catégories¹⁸⁵.

- **Supports inorganiques** : aluminosilicates, silice, verre poreux, oxydes métalliques, charbon actif, argiles (bentonite, kaolin), carbonate de calcium
- **Supports organiques** : ils peuvent être naturels (collagène, cellulose, amidon, agarose) ou synthétiques (polymères acryliques, méthacryliques, polystyrène, copolymères, résines échangeuses d'ions)

Les quantités d'enzymes immobilisées par adsorption sont extrêmement variables et sont évidemment dépendantes de la nature du support utilisé. Même si ce procédé reste simple tant au niveau technologique qu'au niveau de sa mise en œuvre, plusieurs paramètres influencent l'efficacité de l'adsorption.

-Concentration en enzyme

¹⁸¹ M. M. Zheng, Y. Lu, L. Dong, P. M. Guo, Q. C. Deng, W. L. Li, Y. Q. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Bioresource technology*, **2012**, 115, 141.

¹⁸² A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernandez-Lafuente, J. Hugué and J. M. Guisan, A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and bioengineering*, **1998**, 58, 486.

¹⁸³ V. Iyer, S. Padma, L. Ananthanarayan. Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. *Process biochemistry*. **2008**, 43, 1019.

¹⁸⁴ Klibanov, M. Alexander. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **2001**, 409, 241.

¹⁸⁵ E. Brown, B. Jean-François. Catalyse enzymatique. *Techniques de l'ingénieur*, **1992**, 240, 1.

- L'aire spécifique disponible par unité de masse de support
- Le temps de contact
- Le milieu

b. Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le but d'obtenir des liaisons très solides entre enzymes et support¹⁸⁶. C'est ainsi le meilleur moyen d'éviter tout risque de libération des molécules d'enzymes dans le milieu. Pour la réalisation d'une immobilisation par liaison covalente, il est nécessaire d'activer au préalable le support de fixation ou l'enzyme elle-même. Il faut pour cela impliquer les groupes fonctionnels réactifs (-NH₂, -OH, -SH, -CO₂H) des acides aminés tels que la lysine, l'histidine, la tyrosine, le glutamate ou l'aspartate, présents à la surface de la molécule d'enzyme dont la réactivité chimique est très limitée. La liaison covalente doit s'établir dans des conditions douces afin d'éviter toute dénaturation de l'enzyme et empêcher qu'un groupement fonctionnel ne soit altéré.

On peut ainsi distinguer deux groupes de méthodes d'immobilisation par liaison covalente : sur un support insoluble ou par réticulation¹⁸⁷.

- **Immobilisation par réticulation:** le principe est de ponter les molécules d'enzymes entre elles ou entre elles et d'autres protéines à l'aide d'un agent de réticulation comme le glutaraldéhyde afin d'obtenir des macrostructures insolubles.

- **Immobilisation sur support:** mise en contact de l'enzyme avec un support activé portant des groupes suffisamment réactifs pour réagir avec ceux de l'enzyme dans des conditions compatibles avec la préservation de l'activité catalytique.

L'immobilisation d'enzymes par ce mode de préparation peut être adaptée à une grande diversité de matrices et d'agents de fixation, en particulier pour le développement de biocapteurs.

La tyrosinase (PPO)¹⁸⁸ a été immobilisée sur un film de polymère par liaisons covalentes entre l'enzyme et un polymère conducteur, le poly-(3-aminopropyl pyrrole) pour élaborer un biocapteur à phénol, molécule toxique pour l'environnement. La liaison se crée par couplage peptidique entre les groupements amines libres présents à la surface du polymère et les groupes acides carboxyliques de l'enzyme (Schéma 13), pendant une heure dans une solution

¹⁸⁶ L. Ren, J. He, S. Zhang, D.G. Evans, X. Duan, Immobilization of penicillin G acylase in layered double hydroxides pillared by glutamate ions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2002**, 183, 11,

¹⁸⁷ D. Combes, P. Monsan. Biocatalyse ou catalyse enzymatique. *Techniques de l'ingénieur*. **2009**,11, 590.

¹⁸⁸ K. R. Kaneto, A new tyrosinase biosensor based on covalent immobilization of enzyme on N-(3-aminopropyl) pyrrole polymer film. *Current Applied Physics*, **2005**, 5, 178.

de tampon phosphate (0,1 M, pH=7,2). Ces résultats montrent que le polymère peut être une plate-forme d'immobilisation dans le but d'élaborer des électrodes modifiées pour biocapteurs. De plus, le coût faible et la simplicité de la méthode d'immobilisation montrent des avantages complémentaires à ce type d'utilisation.

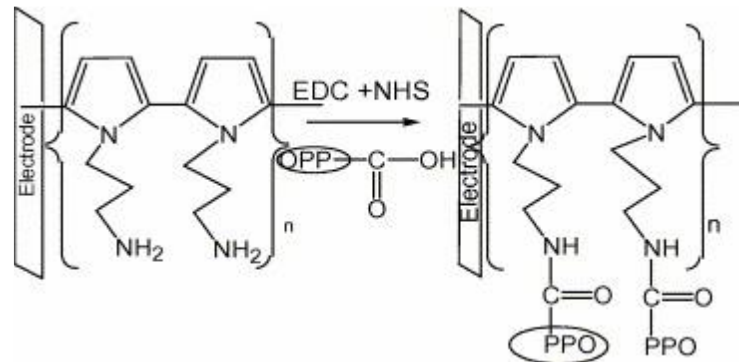


Schéma 13- Etapes impliquées dans la formation du biocapteur

c. Immobilisation par inclusion

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière dans la matrice d'un polymère ou dans une microcapsule. Plusieurs polymères sont fréquemment rencontrés comme l'alginate, le chitosane, le gel de polyacrylamide ou encore le gel d'amidon. Pour ce faire, l'enzyme est dissoute dans une solution aqueuse de monomères contenant également un agent réticulant. La polymérisation des co-monomères est ensuite effectuée à basse température et on obtient de cette façon un réseau tridimensionnel dans les mailles duquel l'enzyme se retrouve retenue. La réalisation de cette immobilisation doit bien entendu pouvoir laisser le site actif libre et accessible au substrat^{189,190}.

d. Immobilisation par encapsulation

Cette technique consiste à emprisonner les enzymes dans un matériau perméable et flexible qui les isole partiellement du milieu extérieur et les protège. Le catalyseur peut être confiné dans un gel de polymère ou à l'intérieur d'une capsule¹⁹¹.

L'immobilisation se fait ici de manière physique et non par voie chimique contrairement à l'immobilisation par liaison covalente par exemple. La matrice doit permettre la diffusion des petites molécules seulement (notamment les substrats et les produits de la réaction) mais ne doit en aucun cas permettre la diffusion des plus grosses molécules dont les enzymes. Ces

¹⁸⁹ E. Brown, B. Jean-François. Catalyse enzymatique. *Techniques de l'ingénieur*, **1992**, 240, 1.

¹⁹⁰ B. Christophe. Les lipases immobilisées et leurs application, *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **2008**, 12, 68.

¹⁹¹ D. Sumitra, R. Christena, R. S. R. Yamuna. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*, **2013**, 3, 9.

matrices peuvent être inorganiques (gels de silice), organique (nafion), polymères (polyacrylamide, polyuréthanes) ou encore composite (pâte de carbone).

Cette méthode d'immobilisation présente de nombreux avantages : elle s'avère économique, facile à mettre en oeuvre et peut s'appliquer à un grand nombre d'enzymes^{192,193,194}.

Chen *et al.* ont piégée la lipase¹⁹⁵ dans une matrice hybride sol-gel organique-inorganique préparée par polymérisation du tétraméthoxysilane ($\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$) avec de l'alkyltriméthoxysilane ($\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$). Les conditions optimales de préparation ont été déterminées afin d'obtenir la meilleure dispersion des enzymes. Les interactions lipophiles entre les domaines hydrophobes de l'enzyme et les groupements alkyls fonctionnalisés dans le gel ($\text{RSi}(\text{O}^-)_3$) jouent un rôle clé pour une fixation de la biomolécule dans une conformation plus active. Pour comparaison, la lipase libre a été lyophilisée à partir d'une solution tampon (0,1M) à pH= 7,2 et conservée à -20°C . Le pourcentage de protéine immobilisée est de 95% et l'activité spécifique résultante de la lipase est 59 fois plus importante que celle de la lipase lyophilisée et non immobilisée. L'enzyme immobilisée montre une stabilité envers la température et le stockage par rapport à l'enzyme libre.

Livage *et al.*¹⁹⁶ ont montré la faisabilité d'encapsuler une bactérie dans un gel de silice élaboré par voie sol-gel (Figure 6). Ces travaux ont révélé le maintien de l'intégrité cellulaire dans un gel humide et l'amélioration de l'activité enzymatique due à une dispersion de la bactérie dans la matrice. Cependant, le séchage du gel entraîne une perte de l'activité enzymatique.

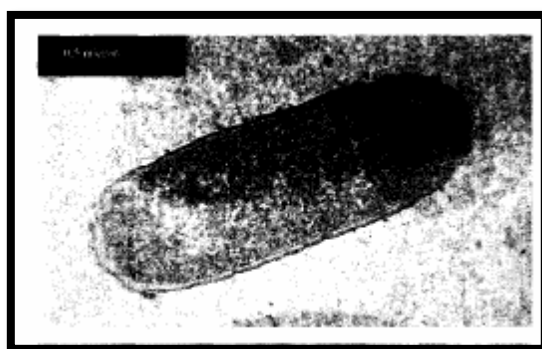


Figure 6- Bactérie piégée dans un gel humide¹⁷⁴

¹⁹² G. Iqbal, A. Ballesteros. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part1): sol-gel encapsulated biologicals. *Tibtech*, **2000**, 18, 296.

¹⁹³ M. Maciej, A. Krywko-Cendrowska, P. Krysinski, J. Rogalski. Encapsulation of laccase in a conducting polymer matrix: A simple route. *Synthetic Metals*, **2009**, 159, 1738.

¹⁹⁴ L. Zhang, Y. Jiang, Sh. Jiafu, S. Xiaohui, Li Jian, Biomimetic polymer-inorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation. *Reactive & Functional Polymers*, **2008**, 68, 151.

¹⁹⁵ J.P. Chen, W.S. Lin, Sol-gel powders and supported sol-gel polymers for immobilization of lipase in ester synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, **2003**, 32, 801.

¹⁹⁶ S. Fennouh, S. Guyon, C. Jourdat, J. Livage, C. Roux, Encapsulation of bacteria in silica gels. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIC-Chemistry*, **1999**, 625.

L'immobilisation peut aussi être réalisée dans des capsules sphériques de matériaux dont les tailles du nanomètre au micromètre peuvent être ajustées selon la dimension des biomolécules à immobiliser. La biomolécule peut être confinée, par exemple, dans des billes d'alginate, des liposomes, des particules d'or. La préparation de ces matériaux est très ciblée, elle s'oriente principalement vers la recherche médicale pour le relargage contrôlé de molécules thérapeutiquement actives dans des cellules cibles.

La microscopie électronique à transmission permet de vérifier l'efficacité du piégeage des enzymes ou des cellules à l'intérieur des capsules. Comme par exemple, dans le cas d'immobilisation de cellules Myoblaste C₂C₁₂ dans une microcapsule d'alginate (Figure 7).

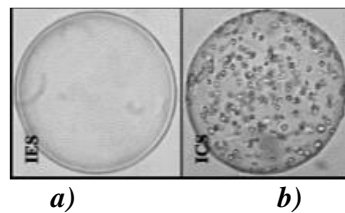


Figure 7 - Capsule a) sans et b) avec cellules¹⁹⁷

Le dernier exemple concerne l'immobilisation de la horseradish peroxydase (HRP) dans des particules d'or creuses. La méthode de préparation implique i) la formation de micelles inverses encapsulant l'HRP, ii) la croissance de particules d'or à la surface des micelles puis iii) la solubilisation des micelles organiques laissant les nanoparticules d'or creuses à l'intérieur desquelles se trouve l'enzyme. La figure 8 montre le schéma réactionnel de ce type de synthèse. La diffusion des petites molécules de substrat à travers les pores des particules d'or est effective. L'enzyme reste chimiquement active permettant les réactions catalytiques.

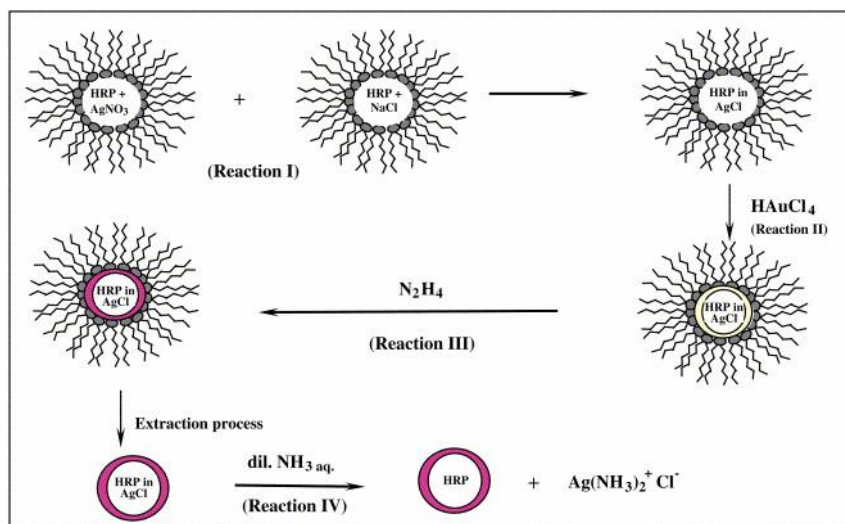


Figure 8- Encapsulation d'enzyme dans une particule d'or creuse¹⁹⁸

¹⁹⁷ G. Orive, R. M Hernandez, A.R. Gascon, M. Igartua, J. P. Pedraz, Microcapsules prepared with different biomaterials to immobilize GDNF secreting 3T3 fibroblasts. *International journal of pharmaceutics*, **2003**, 259, 68.

L'amélioration de la stabilité des enzymes peut également être obtenue par l'utilisation de tensio-actifs (formation de micelles)¹⁹⁹ comme agent de confinement. C'est la technique de l'enrobage.

L'enrobage des enzymes est une technique qui permet de protéger les protéines des contraintes du milieu réactionnel (pression, solvant, cisaillement mécanique... etc.). Il peut en général se faire par emprisonnement ou par encapsulation des enzymes dans une matrice de tensioactifs ou de polymères, les polymères employés sont très variés parmi eux les alginates de sodium aux polymères de silice.

La plupart des procédures de préparation sont relativement simples et se font dans des conditions douces souvent à température ambiante et consiste principalement à mélanger une solution aqueuse de la lipase avec une solution alcoolique de l'agent de surface en utilisant l'ultrason. Le résultat est une enzyme confinée dans une micelle (Figure 9). La question la plus critique dans la préparation des lipases enrobées par les tensioactifs est le choix de l'agent tensioactif. Il convient de noter que certains d'entre eux contiennent des fonctions ester, ce qui signifie qu'il y a un risque qu'ils soient dégradés par les lipases utilisées. De ce point de vue, les tensioactifs sans fonction ester sont un choix plus sûr, surtout lorsque la réaction dure dans le temps. Les esters de sorbitant ont fréquemment été utilisés pour préparer des lipases enrobées par les surfactants, le monostéarate de sorbitan (span 60) étant le plus populaire.

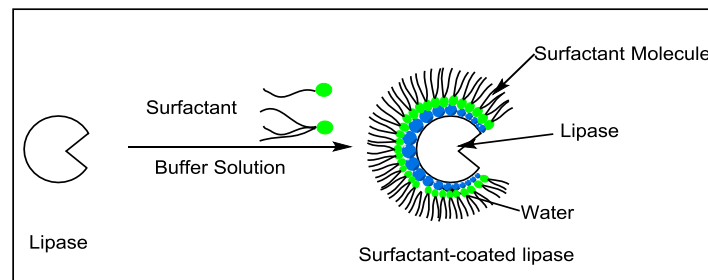


Figure 9- *Enrobage des enzymes*

A ce jour, l'emprisonnement constitue le meilleur moyen d'éviter les impacts négatifs des milieux réactionnels sur la structure des enzymes. La simplicité des processus et les conditions douces associées en font aussi des procédés commercialement intéressants même si le coût des précurseurs s'ajoute à celui des enzymes à immobiliser.

¹⁹⁸ R. Kumar, A. N Maitra, P. K. Patanjali *et al.* Hollow gold nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase. *Biomaterials*. **2005**, 26, 6743.

¹⁹⁹ P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, Enzyme stability and stabilization: Aqueous and nonaqueous environment, *Process Biochemistry*, **2008**, 43, 1019.

4. Influence d'autres facteurs

D'autres facteurs peuvent également influencer l'avancement de la réaction enzymatique.

a. Influence de la longueur de la chaîne de l'agent acylant

L'avancement de la réaction de synthèse enzymatique des esters de sucre est également influencé par la nature des agents acylants et la longueur de leurs chaînes²⁰⁰. Zaidan *et al.* ont synthétisé l'ester de lactose avec des acides à différentes longueurs de chaîne en présence de d'une lipase immobilisée à base de mica (Schéma 14).

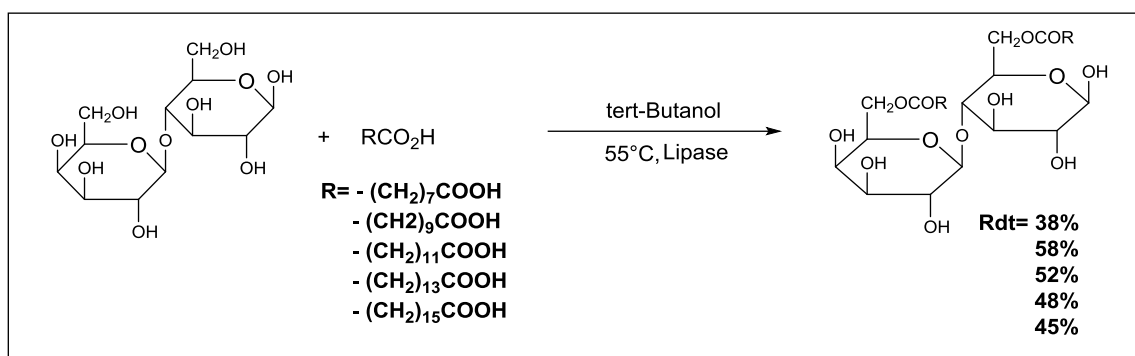


Schéma 14- Influence de la longueur de la chaîne de l'agent acylant

b. Influence de la température

La température influe sur la vitesse de la réaction soit par activation ou désactivation de l'enzyme²⁰¹. Sinthuwat *et al.*, 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 lyophilisée AL-89 (Schéma 15).

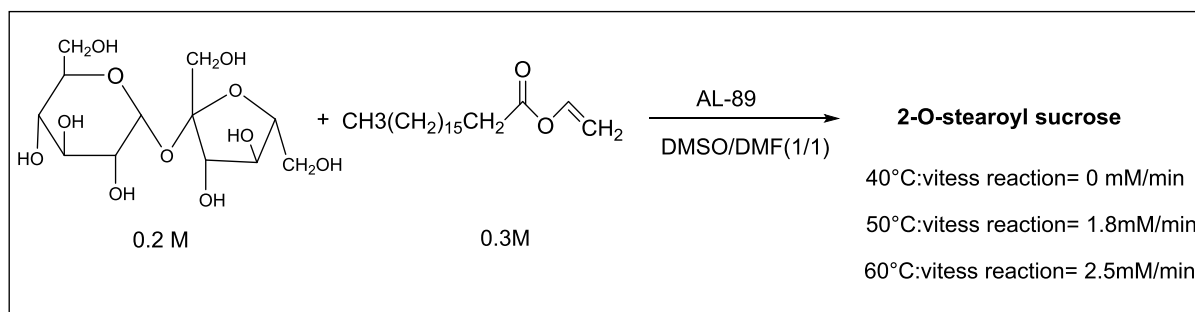


Schéma 15- Influence de la température sur la vitesse de la réaction

²⁰⁰ U.H. Zaidan, M.B. Abdul Rahman, A.B. Salleh, S.S. Othman. Effect of Time Course, Fatty Acid Chain Length and Organic Solvent on Enzymatic Synthesis of Lactose Ester by Mica-based Immobilized Lipases. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **2015**, 9, 352.

²⁰¹ S. Ritthitham, R. Wimmer, A. Stensballe, L. H. Pedersen, Selectivity and stability of alkaline protease AL-89 in hydrophilic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 5, 266.

c. Influence du rapport molaire entre les substrats

L'influence du rapport molaire entre les substrats a une grande influence sur la conversion. En effet, la conversion dépend de la quantité d'acide présente dans le milieu réactionnel. X. Zhang *et al.*²⁰² ont montré que la conversion évolue lors de l'estérification du D-sorbitol avec l'augmentation de la quantité de l'acide palmitique dans le *t*-BuOH (Schéma 16).

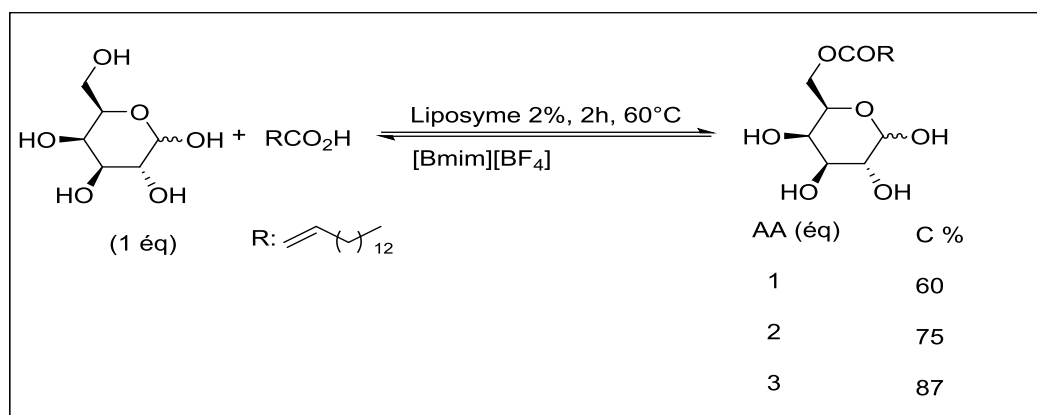


Schéma 16- Influence du rapport molaire entre les substrats.

²⁰² X. Zhang, K. Nie, Y. Zheng, F. Wang, L. Deng, T. Tan, Enzymatic production and functional characterization of D-sorbitol monoesters with various fatty acids. *Catalysis Communications*. **2015**, 72, 138.

*Chapitre I- Acylation enzymatique du
D-glucose. Etude préliminaire.*

I. Introduction

Les tensioactifs à base de sucre sont des composés amphiphiles non ioniques étudiés de manière intensive en raison de leurs applications répandues²⁰³. Parmi eux, les esters de sucres et d'acides gras représentent une classe de tensioactifs non toxiques et biodégradables avec une large gamme d'applications dans de nombreux domaines tels que l'alimentation²⁰⁴, les cosmétiques, les détergents²⁰⁵ et les produits pharmaceutiques^{206,207}. La synthèse chimique d'esters de sucres nécessite l'utilisation de catalyseurs alcalins, de températures élevées, des solvants dangereux et produit généralement des mélanges d'esters^{208,209}. La synthèse enzymatique d'esters de sucres catalysée par des lipases est une alternative plus douce et plus verte aux voies chimiques classiques^{210,211}. Une enzyme placée dans des milieux organiques exprime de nouvelles propriétés telles que l'augmentation de la thermo-stabilité, la modification de la spécificité et surtout la capacité à catalyser des réactions impossibles cinétiquement et thermodynamiquement en milieux aqueux²¹². L'utilisation de lipases dans des solvants organiques est un procédé en un "seul pot" avec un degré élevé de régio-sélectivité et la réaction enzymatique conduit généralement à la production de mono-esters.

En plus du mono ester, des traces de di- et de tri esters peuvent également être détectés lors de l'acylation enzymatique des sucres avec des acides gras. Quelques exemples sont donnée dans la littérature^{213,214}.

Le milieu dans lequel a lieu la réaction influe considérablement sur l'activité enzymatique²¹⁵. La préférence du site d'acylation d'un substrat est par exemple fortement dépendante du

²⁰³ J. Kovensky, E. Grand. Recent advances in the synthesis of sugar-based surfactants. *RSC Green Chem. Ser.* **2016**, 44, 159.

²⁰⁴ N.S. Neta, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues. Sugar ester surfactants: enzymatic synthesis and applications in food industry *Crit. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **2015**, 55, 595.

²⁰⁵ N.R. Kahn, V.K. Rathod. Enzyme-catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. *Process Biochem.* **2015**, 50, 1793.

²⁰⁶ S.W. Hsieh, M.R. Lee, C.W. Tsai, L.Y. Lai, T. Yeh, C.W. Hsieh, T.J. Yang, S. W. Chang. Enzymatic synthesis, purification and identification of bioactive trehalose ester derivatives for health applications. *Food Bioprod. Process.* **2015**, 95, 163.

²⁰⁷ Y. Queneau, S. Chambert, C. Besset, R. Cheaib. Recent progress in the synthesis of carbohydrate-based amphiphilic materials: the example of sucrose and isomaltulose. *Carbohydrate Research.* **2008**, 343, 1999.

²⁰⁸ X. Liu, L. Gong, M. Xin, J. Liu. The synthesis of sucrose esters and selection of its catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical.* **1999**, 147, 37.-

²⁰⁹ M. Pohnlein, R. Hausmann, S. Lang, C. Syldatk. Enzymatic synthesis and modification of surface-active glycolipids. *European Journal of Lipid Science and Technology.* **2015**, 117, 145.

²¹⁰ K.H. Zhao, Y.Z. Cai, X.Sh. Lin, J. Xiong, P.J. Halling, and Z.Yang. Enzymatic Synthesis of Glucose-Based Fatty Acid Esters in Bisolvent Systems Containing Ionic Liquids or Deep Eutectic Solvents. *Molecules,* **2016**, 21, 1294.

²¹¹ A.M. Gumel, M.S.M. Annuar, T. Heidelberg, Y. Chisti. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochem.* **2011**, 46 2079.

²¹² A.M. Klibanov., Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature,* **2001**, 409, 241.

²¹³ S.V. Kempen, H.A. Schols, E.V. Linden, L.M.C. Sagis. The effect of diesters and lauric acid on rheological properties of air/water interfaces stabilized by oligofructose lauric acid monoesters. *Journal of agricultural and food chemistry.* **2013**, 61, 7829.

²¹⁴ D. Gérard, T.Méline, M.Muzard, M.Deleu, R.Plantier-Royon, C.Rémond. Enzymatically synthesized xylo-oligosaccharides laurate esters as surfactants of interest. *Carbohydrate Research.* **2020**, 495, 108090.

²¹⁵ E. Wehtje, P. Adlercreutz, Lipases have similar water activity profiles in different reactions. *Biotechnology letters.* **1997**, 11, 540.

solvant et de la lipase utilisée²¹⁶. L'effet de solvation des substrats agit également sur la régiosélectivité des enzymes comme cela a été montré par Mac Manus *et al.*²¹⁷ Le phényl-6-O-trityl-P-D-glucopyranoside s'oriente différemment au niveau du site actif de la lipase de *Pseudomonas cepacia* selon qu'on travaille dans un solvant hydrophile (acétone) ou hydrophobe (cyclohexane). Des résultats similaires ont été obtenus par Scheckermann *et al.*²¹⁸ qui ont montré que la lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei* acyle le fructose en position 1 et 6 dans le méthyl-2 butanol-2 et en position 1 uniquement dans un solvant plus hydrophobe comme l'hexane. Klibanov²¹⁹ a montré que la préférence de la désacylation enzymatique du 1,4-dibutyryloxy-2-octylbenzène dépend de la nature du solvant organique utilisé. Les positions 4 et 1 sont favorisées dans les solvants hydrophobes et hydrophiles, respectivement. Plus récemment, Rich *et al.*²²⁰ ont étudié l'acylation du saccharose catalysée par la subtilisine et ont montré que le rapport des deux principaux produits de la réaction, l'acetyl- et le 6-O-acylsaccharose, dépend fortement de l'hydrophobicité du solvant. Le choix du milieu réactionnel est donc primordial pour la mise en œuvre de l'acylation enzymatique des sucres.

II. Réaction d'acylation des sucres

La réaction d'acylation²²¹ 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.

1. Acylation par voie chimique

Les principaux avantages de cette méthode résident dans le fait qu'elle est économique, rapide et donne de bons rendements. Cependant cette voie présente plusieurs inconvénients. La réaction a lieu à haute température ($\geq 100^\circ\text{C}$) dans des solvants toxiques difficiles à éliminer²²². Un autre phénomène de caramélisation peut avoir lieu. Les produits sont ainsi colorés²²³ ce qui implique la réalisation d'une étape de décoloration. L'obtention d'un

²¹⁶ A. M. Klibanov. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. **2001**, 409, 246.

²¹⁷ D.A. Mac Manus, E.N. Vulfson. Reversal of regioselectivity in the enzymatic acylation of secondary hydroxyl groups mediated by organic solvents. *Enzyme and microbial technology*. **1997**, 20, 228.

²¹⁸ C. Scheckermann, A. Schlotterbeck, M. Schmidt, V. Wray, S. Lang. Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures. *Enzyme and microbial technology*. **1995**, 17, 162.

²¹⁹ A. M. Klibanov. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. **2001**, 409, 241.

²²⁰ J. O. Rich, V. V. Mozhaev, J. S. Dordick, D. S. Clark, Y. L. Khmelnsky. Molecular imprinting of enzymes with water-insoluble ligands for nonaqueous biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 5254.

²²¹ A.M. Gumel, M.S. Annuar, T. Heidelberg, Y. Christi. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry*. **2011**, 46, 2079.

²²² J.A. Arcos, M. Bernabé, C. Otero. *Enzyme and microbial technology*. **1998**, 22, 27.

²²³ D. Coulon, M. Girardin, J.-M. Engasser, M. Ghoul. Investigation of key parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. *Industrial Crops and Products*. **1997**, 6, 375.

mélange de molécules et des sous-produits nocifs²²⁴ engendre plusieurs étapes de purification. La régio-sélectivité est également difficilement contrôlable à cause de la présence de plusieurs groupements hydroxyles dans le sucre²²⁵.

Pour pallier à ces problèmes, les catalyseurs chimiques peuvent être remplacés par les enzymes. Ce sont des biocatalyseurs qui permettent une acylation sélective d'un groupement hydroxyle de la molécule de sucre et la régio-sélectivité du produit final est ainsi contrôlée par la sélectivité de l'enzyme.

2. Acylation par voie enzymatique

Le principe de l'acylation enzymatique²²⁶ est d'utiliser une enzyme dans un milieu non conventionnel. Les principaux avantages de l'utilisation de cette méthode sont les conditions douces de la mise en œuvre de la réaction et la forte sélectivité des biocatalyseurs. 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 amine²²⁷.

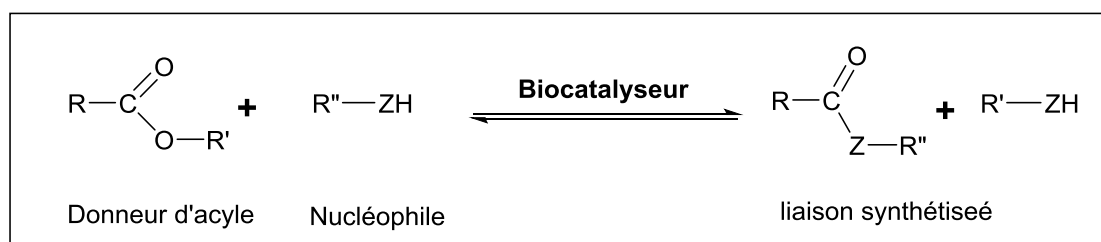


Schéma 17- Schéma général de la réaction d'acylation par voie enzymatique

Par exemple, l'acylation enzymatique de l' α -(+)-D-glucose peut se faire soit par une estérification (schéma 18) ou par une transestérification (schéma 19) sur la position la plus réactive.

²²⁴ R. Gulati, P. Arya, B. Malhotra, A. K. Prasad, R. K. Saxena, J. Kumar, A. C. Watterson, V. S. Parmar *Arkivoc. Investigation of keys parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. Industrial Crops and Products.* **2003**, 159, 1551.

²²⁵ N. Spiliotis, E. Voutsas, K. Magoulas, D. Tassios. Recovery of fructose laurate produced through enzymatic esterification. *Separation and Purification Technology.* **2000**, 19, 229.

²²⁶ F. AbdManan, N. Attan, Z. Zakaria, A.emi s. Abdul Keyon, R. Abdul Wahab. Enzymatic esterification of eugenol and benzoic acid by a novel chitosan-chitin nanowhiskers supported *Rhizomucor miehei* lipase: Process optimization and kinetic assessments. *Enzyme and Microbial Technology.* **2018**, 108, 42.

²²⁷ Husson E. Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique. *Thèse de doctorat de l'Université de Paris.* **2008**.

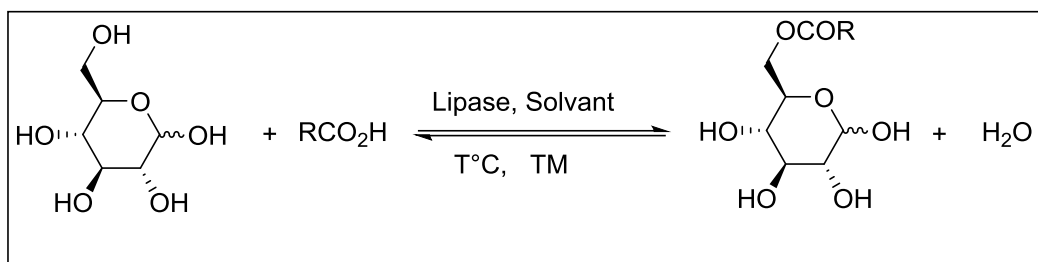


Schéma 18- Estérification de l'α-(+)-D-glucose

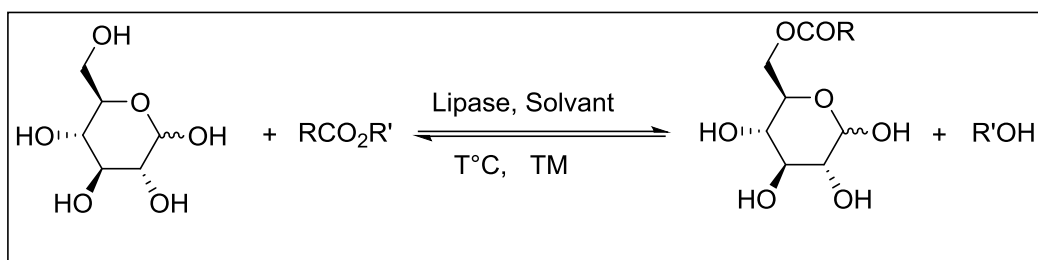


Schéma 19- Transestérification de l'α-(+)-D-glucose

III. Synthèse du 6-O-Dodecanoyl-D-glucopyranose

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. La modification sélective à l'aide des enzymes permet de réaliser la réaction en "one pot". Les étapes de protection et de déprotection des différents hydroxyles sont ainsi évitées. De plus et afin d'assurer la substitution sélective de l'α-(+)-D-glucose les conditions réactionnelles doivent être optimisées : le catalyseur, l'agent acylant, le solvant, la température, le temps etc... Une étude préliminaire concernant l'optimisation des conditions réactionnelles est d'abord entreprise.

L'obtention du 6-O-Dodecanoyl-D-glucopyranose se fait par une réaction d'estérification enzymatique du D-glucose par l'acide laurique en présence de la lipase de *Candida antarctica* B immobilisée sur résine et commerciale (CAL B). L'avancement de la réaction est suivi par CCM. Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers puis analysés par titrage volumétrique²²⁸ afin d'évaluer la conversion qui est quantifiée en calculant la quantité d'acide gras résiduel dans le milieu. En fin de réaction le mélange réactionnel est récupéré puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane/méthanol : 90 /10).

Le schéma suivant illustre la réaction d'estérification enzymatique de l'α-(+)-D-glucose.

²²⁸ M. Leitgeb, Z. Knez. The influence of water on the synthesis of nbutyl oleate by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1990, 67, 775.

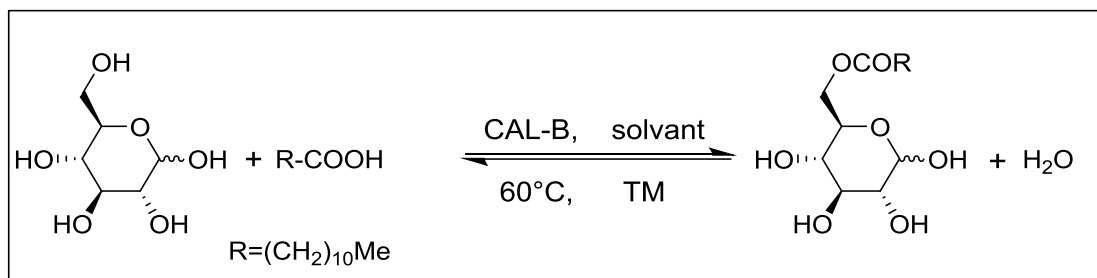


Schéma 20- Estérification enzymatique de l'α-(+)-D-glucose

IV. Résultats et Discussion

Plusieurs études sur les réactions catalysées par la lipase de *Candida Antarctica B* montrent des résultats impressionnants dans son application dans les réactions d'hydrolyse, d'estérification et de transestérification²²⁹. Sa capacité à fonctionner avec une large gamme de substrats est amplement exploitée par les industriels des secteurs agroalimentaires et biotechnologiques²³⁰, en particulier pour des réactions de synthèse dans des milieux à faible teneur en eau. Une explication au niveau moléculaire donne une chemo-, régio- et énantiosélectivité élevée, puisque la structure cristalline de l'enzyme a montré une activité interfaciale élevée²³¹, son pH isoélectrique se situe à 6.

Parmi les réactions les plus étudiées ces dernières années, la synthèse des esters de sucres et d'acides gras par la lipase de *Candida antarctica*²³² en milieu organique occupe une place de choix^{233,234}. C'est une alternative plus douce et plus verte aux voies chimiques classiques^{235,236}. Ces molécules sont des agents tensioactifs non ioniques dont la structure est composée de deux groupements : le sucre, qui constitue la tête hydrophile et l'acide gras qui constitue la queue lipophile. La plupart des travaux menés actuellement dans ce domaine sont focalisés sur l'étude de la faisabilité de ces réactions sans tenir compte des contraintes imposées par une éventuelle industrialisation de ces procédés. En l'occurrence, la simplicité

²²⁹ C. Orrenius, N. Ohrner, D. Rotticci, A. Mattson, K. Hult, T. Norin. *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolutions: Substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols. *Tetrahedron : Asymmetry*. **1995**, 6, 1217.

²³⁰ A. Ghanem. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*. **2007**, 38, 1721.

²³¹ P. L. A. Overbeeke, G. C. N. Khalaf, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen. Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2000**, 10, 385.

²³² U. H. Zaidan, Abdul M. B. Rahman, S. S. Othman, M. Basri, E. Abdulmalek, R. N. Z. R. Abdul Rahman et al. Biocatalytic production of lactose ester catalysed by mica-based immobilised lipase. *Food Chemistry*. **2012**, 131, 199.

²³³ Z. Findrik, G. Megyeri, L. Gubicza, K. Bélafi-Bakó, N. Nemestóthy, M. Sudar. Lipase catalyzed synthesis of glucose palmitate in ionic liquid. *Journal of Cleaner Production* **2015**, 07, 098.

²³⁴ D. Gérard, T. Méline, M. Muzard, M. Deleu, R. Plantier-Royon, C. Remond. Enzymatically synthesized xylo-oligosaccharides laurate esters as surfactants of interest. *Carbohydrate Research*. **2020**, 495, 108090

²³⁵ M. Pohnlein, R. Hausmann, S. Lang, C. Syldatk. Enzymatic synthesis and modification of surface-active glycolipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2015**, 117, 145.

²³⁶ A.M. Gumel, M.S.M. Annuar, T. Heidelberg, Y. Chisti. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochem*. **2011**, 46, 2079.

de mise en œuvre, la compatibilité avec l'environnement et l'efficacité de récupération des molécules synthétisées avec des degrés de pureté adaptés aux applications visées^{237,238}.

Ci-après un exemple d'utilisation de la CAL B pour la synthèse d'ester de sucres.

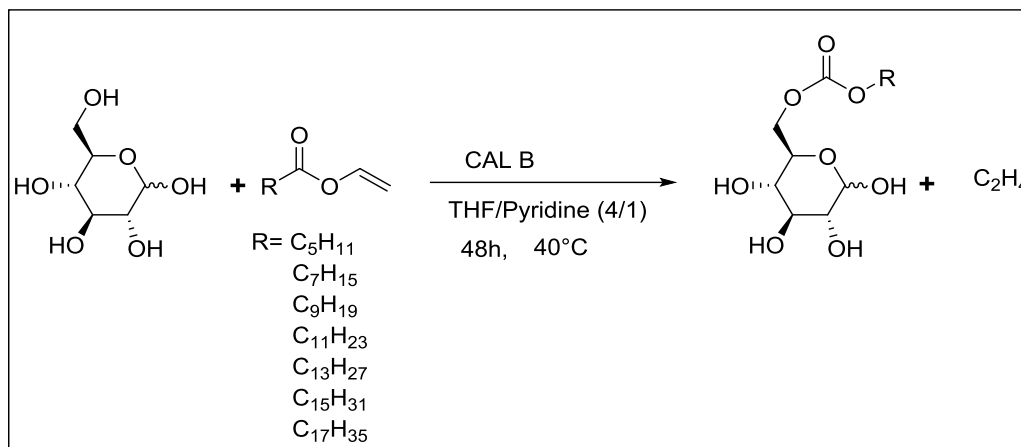


Schéma 21- Synthèse d'une série de 6-O-acylglucose²³⁹.

1. Influence du milieu réactionnel

L'objectif de l'étude préliminaire est de fournir des données cinétiques nécessaires à la compréhension des effets des différents paramètres qui affectent la réaction de synthèse du laurate de glucose en milieu organique.

a. Influence du solvant

Lors du choix du solvant, le critère à prendre en compte est sa polarité. Les réactions sont menées dans différents solvants organiques (EMC, THF et le 2M2B) avec l'acide l'aurique à 60°C en présence de la CAL B.

Les conversions obtenues sont illustrées dans le tableau ci-dessous. Elles sont dépendantes de la solubilité du sucre et de la polarité du solvant utilisé. Celle-ci peut être évaluée par le logarithme du coefficient de partition (log P) du solvant dans un système biphasique octanol/eau²⁴⁰.

²³⁷ R. Kangzi, P. B. Lamsal. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida Antarctica* and their emulsion functions. *Food Chemistry*. **2017**, 214, 556.

²³⁸ H.Y. Zhang, X.L. Zhou, Y. Xu, S.Y. Yu. Production of xylo-oligosaccharides from waste xylan, obtained from viscose fiber processing, by selective hydrolysis using concentrated acetic acid. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **2017**, 37, 1.

²³⁹ M.Y. Liang, Y. Chen, M.G. Banwell, Y. Wang, P. Lan. Enzymatic preparation of a homologous series of long-chain 6-O-Acylglucose esters and their evaluation as emulsifiers. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2018**, 66, 3949.

²⁴⁰ S. Piccicuto, C. Belker, J. C. Brohé, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deranne, M. Paquot, M. Marlier. Les esters de sucres : voies de synthèse et potentialités d'utilisation. *BASE*. **2001**, 5, 209.

Tableau 4- Influence du solvant sur la conversion.

Solvant (log p)	Conversion(%)			
	2h	24h	48h	72h
EMC (0.29)	10	44,5	50,5	52,5
THF (0.46)	13,5	27,8	44,40	50,50
2M2B (0.89)	3,30	8,20	25	42

Conditions réactionnelles : 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 μ g Al, 5ml (EMC, THF, 2M2B), 30 mg CAL B, 30 mg TM, T°=60°C.

D'après les résultats illustrés dans ce tableau les conversions obtenues sont (C = 52,5%, 24h) dans l'EMC, (C = 50,5 %, 72h) dans le THF et (C = 42 %, 72h) dans le 2M2B.

Une première approche de ces résultats montre que les réactions peuvent avoir lieu dans les trois solvants utilisés. Ceci est probablement dû à leur polarité²⁴¹. Si le Log P est positif élevé, cela exprime son caractère lipophile, et inversement, si le Log P est négatif cela signifie que le solvant considérée est hydrophile.

L'EMC est un solvant présentant une polarité intermédiaire dans lequel un bon contact entre les deux substrats est assuré, le sucre serait mieux solubilisé (24 heures). De plus c'est un solvant qui respecte la législation concernant l'utilisation des solvants dans le domaine alimentaire, donc non toxique²⁴². C'est également un solvant dans lequel les lipases se sont avérées avoir une bonne stabilité²⁴³. Les solvants organiques polaires peuvent en effet avoir un effet sur la stabilité des enzymes. Les enzymes ont besoin d'une couche d'eau sur leur surface supérieure afin de conserver la conformation nécessaire à leur activité catalytique d'où l'importance de la présence d'une quantité minimale d'eau dans le milieu réactionnel^{244,245}.

La quantité du solvant est également importante pour une meilleure cohésion des substrats²⁴⁶. Ce solvant est donc conservé pour la suite de cette étude.

²⁴¹ R.A. Sheldon, A.M.P. Koskinen. Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. In *Enzymatic Reactions in Organic Media*. Springer Netherlands. **1996**, 266, 307.

²⁴² S. Sabeder, M. Habulin, Z. Knez, Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering*. **2006**, 77, 880.

²⁴³ M. V. Flores, K. Naraghi, J.-M.Engasser, P. J. & Halling. Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl 2-butanol. *Biotechnology and Bioengineering*, **2002**, 78, 814

²⁴⁴ K. Griebenow, A.M.Klibanov. On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*. **1996**, 118, 11695.

²⁴⁵ X. Yong-mei, W. Qi, C. Ying, L. Xian-fu. Ultrasound accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. *Carbohydrate Research*. **2005**, 340, 2097.

²⁴⁶ K.Nadia, Synthèse des esters et des éthers du D-Xylose amphiphiles. Evaluation physico-chimique de leurs propriétés tensioactives. *Thèse de doctorat, Université BaDadji Mokhtar Annaba*. **2016**.

b. Influence de l'agent acylant**1. Effet de la nature de l'agent acylant**

La longueur de la chaîne de l'agent acylant influe de manière importante sur la conversion du sucre. Nous avons utilisé trois acides gras avec différentes longueurs de chaînes afin d'évaluer cet effet sur la synthèse de l'ester de glucose.

- Acide Laurique Al (C12).
- Acide Palmitique Ap (C16).
- Acide Stéarique As (C18).

Une variation de la conversion dépendant de la nature de l'agent acylant utilisé est observée. Les résultats sont réunis sur le **Tableau 5**.

Tableau 5- Influence de la nature de l'agent acylant sur la conversion.

Agent Acylant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
Acide Laurique C ₁₂ H ₂₄ O ₂	10	44,5	50,5	52,5
Acide Palmitique C ₁₆ H ₃₂ O ₂	15	30,5	51,5	46
Acide Stéarique C ₁₈ H ₃₆ O ₂	10	35	55	40

Conditions réactionnelles : 0.5 mmol α -(+)-D-glucose, 1 éq de (Al, Ap et As), 30 mg CAL B, 30 mg TM, 5ml EMC à T°=60°C.

D'après le tableau, les conversions obtenues avec l'acide palmitique (C16) et l'acide stéarique (C18) sont respectivement C=51,5 % et 55% après 48h de réaction et C=52,5% avec l'acide laurique (C12) après 72h. Les résultats montrent que la longueur de la chaîne du donneur d'acyle a un impact sur le taux de conversion, le facteur temps ayant également son importance. Ceci peut s'expliquer par l'hydrophobicité des acides gras à longue chaîne (C18), ce qui entraînerait une mauvaise solubilisation du réactif et par conséquent une diminution de la conversion²⁴⁷ dans le temps. Pederson *et al.*²⁴⁸ ont trouvé que les meilleures conversions sont obtenues avec les donneurs d'acyles portant des longueurs de chaînes moyennes (C12-C14). Klai *et al.*²⁴⁹ ont montré que la longueur de la chaîne du donneur d'acyle a un impact sur la conversion, celui-ci étant respectivement de 63%, 31% et 25% pour les acides laurique, stéarique et caproïque lors de l'estérification enzymatique du xylose.

²⁴⁷ S. Soutani, J. M. Engasser, M. Ghoul. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**, 11, 725.

²⁴⁸ N. Pederson, N. Wimmer, R. Emmerson, J. Degn, P. Pederson. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase catalysed esterification of disaccharides. *Carbohydrate research*. **2002**, 337, 1178.

²⁴⁹ C. Bidjou-Haiour N. Klai., Lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose esters and their surfactant properties. *Asian Journal of Chemistry*., **2013**, 25, 4347

La diminution de la conversion peut également être attribuée à la réversibilité de la réaction d'estérification. L'eau formée durant l'estérification affecte beaucoup la réaction et perturbe l'équilibre thermodynamique²⁵⁰. La solubilité du produit formé à cette température peut orienter la réaction vers l'hydrolyse²⁵¹.

- Avec les acides palmitique (C16) et stéarique (C18) la réaction inverse est observée au bout de 48h (C= 46%, 72h), (C= 40%, 72h).
- Avec l'acide Laurique la réaction continue d'avancer même après 72h (C= 52.5%, 72h).

De ce fait l'acide laurique est utilisé comme agent acylant pour la suite de l'étude.

2. Effet de la proportion Glucose /Agent Acylant (Glc/AA)

Une étude se rapportant à l'influence du nombre d'équivalents de l'acide gras utilisé sur la conversion de la réaction d'acylation a été réalisée et les résultats sont donnés ci-après (Tableau 6).

Tableau 6- Influence de la proportion d'agent acylant sur la conversion

Glucose /Agent Acylant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
1 /0.5	0	15	30	20
1 /1	10	44,5	50,5	52,5
1 /1.5	5	25	38	45
1 /2	15	36,5	40	35,5
1 /2.5	15	36,5	38	30,5
1 /3	10	30,5	35	31,5

Conditions réactionnelles : 0.5 mmol α -(+)-D glucose, Al (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3) *éq.*, 30 mg CAL B, 30mg TM, 5ml de EMC à T°=60°C.

Les résultats du tableau 6 montrent qu'une augmentation de la quantité de l'acide laurique dans le milieu entraîne une diminution de la conversion. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature²⁵².

²⁵⁰ B. C. Koops, H. M. Verheij, A. J. Slotboom, M. R. Egmond. Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. **1999**, 25, 622.

²⁵¹ Y. Yan. Enzymatic production of sugar fatty acids. *Thèse de doctorat d'université de stuttgart*. **2001**.

²⁵² G. Sekeroglu, S. Fadiloglu, E. Ibanoglu. Production and characterisation of enzymatically produced lauric acid esters of fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2002**, 82, 1516.

Les lipases d'origine fongique ont en effet un pH neutre ou légèrement acide²⁵³. Et peuvent donc être inhibées dans des milieux acides²⁵⁴ par la formation d'une barrière hydrophobe empêchant le substrat hydrophile d'accéder au site actif de l'enzyme²⁵⁵.

Avec 1équivalent d'Al on obtient une conversion de 52,5% au bout de 72h. L'utilisation de 1,5éq d'acide gras donne une conversion de (45%, 72h). Avec 2éq on observe déjà une diminution de la conversion au bout de 48 h (C=40 %). Avec 2,5 et 3éq on obtient respectivement 38%, 35% de conversion au bout de 48h. La conversion continue donc à diminuer.

Ces résultats nous permettent de conclure que le rapport molaire Glc/AA : 1/1 donne la meilleure conversion (C = 52,5 %, 72h).

c. Influence de la quantité de lipase

Pour être efficaces, les lipases nécessitent une activation interfaciale qui est liée à la quantité utilisée. C'est une particularité catalytique de ces enzymes. Nous avons donc varié la quantité de la CAL B de 5, 10, 20, 30et 50 mg (w/w) par rapport au sucre de départ puis réalisé une étude cinétique afin d'optimiser la quantité de la lipase. Le tableau suivant montre l'influence de la quantité de la lipase utilisée sur la conversion.

Tableau 7- Influence de la quantité d'enzyme sur la conversion

Quantité de lipase	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
5mg	0	12	30	25,5
10mg	05	18	35	29
20mg	15	26,5	38	32,5
30mg	10	44,5	50,5	52,5
50mg	20	25	40	15,5

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D-glucose, 1éq d'Al, CAL B (5, 10, 20, 30 et 50) mg, 30 mg TM dans 5ml EMC à 60°C.

D'après le tableau 7, avec 5mg d'enzyme, aucune évolution n'est observée après 2h de temps et ce, pendant 48 h. Des conversions de l'ordre de 38% et 40% sont obtenues avec 20 et 50 mg de lipase au bout de 48h de réaction. Au-delà de cette valeur, on constate que plus la

²⁵³ P. Fickers, J. Destain, Ph. Thonart. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. **2008**, 2, 119.

²⁵⁴ M. Karra-chaabouni, S. Pulvin, D. Touraud. Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. *Biotechnology letters*. **1996**, 18, 1083.

²⁵⁵ D. Coulon. Etude d'un procédé de synthèse enzymatique d'ester de sucre et d'acide gras. *Thèse de l'INPL, Nancy*. **1997**.

quantité d'enzyme augmente plus la conversion augmente, jusqu'à 30 mg. Avec 50 mg d'enzyme on observe une diminution franche de conversion, l'enzyme devient presque inactive (C=15,5%, 72h).

Avec 30 mg de CAL B, le mono-ester commence à se former après 2h de temps et la meilleure conversion (52,5%) est observée avec cette quantité de lipase au bout de 72h. Ceci est probablement dû à un bon contact entre les réactifs et la lipase²⁵⁶.

D'autre par l'inhibition observée en augmentant la quantité de lipase peut être expliquée par le phénomène de la limitation de la diffusion et du transfert de masse lors de l'acte catalytique. Les molécules d'eau libérées lors de la réaction²⁵⁷ sont également susceptibles d'orienter la réaction vers l'hydrolyse. Des résultats similaires, ont été reportés pour l'estérification du glucose avec l'acide palmitique dans l'hexane²⁵⁸, ainsi que pour la synthèse du palmitate de glucose dans l'acétone en présence de la CAL B²⁵⁹.

L'étude en fonction du rapport molaire permet de conclure que la quantité optimale de la lipase est liée à une certaine concentration critique en substrat pour qu'il y ait une activation interfaciale²⁶⁰ de cette lipase.

Lorsque la concentration micellaire critique est atteinte, les lipases situées à l'interface de la phase eau/lipide voient leur activité d'hydrolyse des acylglycérols fortement augmenter. En milieu organique, le site actif des lipases n'est généralement pas accessible au solvant. En effet, il est recouvert par une boucle amphiphile appelée volet amphiphile ou "lid" ou "flap". Il s'agit de la forme fermée ou inactive de l'enzyme (Figure 10). Certains auteurs ont mis en évidence l'existence d'une forme ouverte active de l'enzyme. Dans ce cas, la face hydrophobe du volet, orienté auparavant vers l'intérieur du site actif, s'expose alors au solvant, créant une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface lipide-eau²⁶¹. Du fait de sa proximité avec le site actif, des études ont montré que l'on ne retrouve pas ce phénomène chez cette enzyme²⁶². Les travaux d'Uppenberg *et al.*²⁶³ sur la structure de l'enzyme concluent à

²⁵⁶ P. Fichers, J. Destain, P. Thonart. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et application. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. **2008**, 12, 119.

²⁵⁷ F. Chamouveau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**, 11, 949.

²⁵⁸ A.M. Gumel, M.S.M. Annuar, T. Heidelberg. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 2079.

²⁵⁹ J. A. Acros, C. G. Hill, C. Otero. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 73, 104.

²⁶⁰ R. D. Schmid, R. Verger. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*. **1998**, 37, 1608.

²⁶¹ a. Y. Gargouri, S. Ransac, R. Verger. Covalent inhibition of digestive lipases: an in vitro study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* **1997**, 6, 1344.

b. T. Maruyama, M. Nakajima, S. Ichikama, H. Nabetani, S. Furusaki, M. Seki. Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2000**, 77, 1121.

²⁶² P. L. A. Overbeeke, G. C. N. Khalaf, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen. Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2000**, 10, 385.

l'absence de volet amphiphile. Des études plus récentes ont montré l'existence du "lid" pour la CAL B en présence de substrats volumineux²⁶⁴.

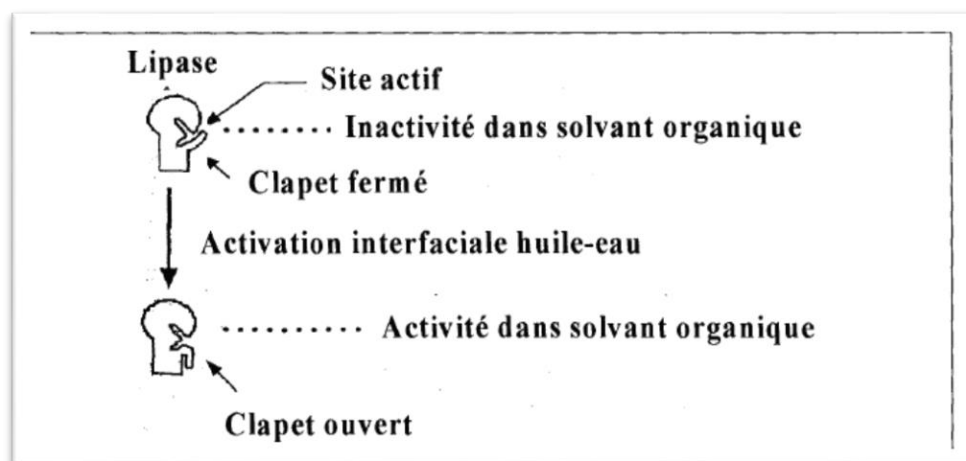


Figure 10- Représentation schématique du volet amphiphile et du phénomène d'activation interfaciale en milieu organique.

d. Influence de la quantité de 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 nécessaire²⁶⁵. L'utilisation de tamis moléculaire a été reportée dans la littérature comme étant une technique très efficace dans le contrôle par adsorption de l'eau dans le milieu de synthèse. Il ne faut cependant pas perdre de vue qu'un minimum d'eau est quand même nécessaire pour que l'enzyme soit active. 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 le tableau 8.

²⁶³ J. Uppenberg, N. Oehrner, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonen. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *J. T. Alwyn, Biochemistry*. **1995**, 34, 16838.

²⁶⁴ T. Zisis, P. L. Freddolino, P. Turunen, M. C. van Teeseling, A. E. Rowan, K. G. Blank, Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation. *Biochemistry*. **2015**, 54, 5969.

²⁶⁵ M. Liaquat, R.K. Owusu Apenten. Synthesis of low molecular weight flavour esters using plant seedling lipase in organic media. *Journal of food science*. **2000**, 65, 295–299.

Tableau 8- Influence de la quantité de tamis moléculaire sur la conversion.

Quantité du TM	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
5mg	0	20	15	6
10mg	0	20	25	8,5
15mg	5	25	33	10
20mg	5	30	35	15
30mg	10	44,5	50,5	52,5
50mg	15	44,4	30	20

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D-glucose, 1 μ eq d'Al, 30 mg CAL B, (5, 10, 15, 20, 30 et 50) mg de TM, 5 ml EMC, T°= 60°C.

D'après les résultats, une variation de conversion dépendant de la quantité du tamis moléculaire utilisée est observée. La meilleure conversion (52,5%) est obtenue avec 30 mg de tamis moléculaire au bout 72h. On observe qu'avec les différentes quantités de tamis moléculaire utilisées la vitesse initiale ne change pratiquement pas.

Au-delà de ces résultats, on observe que l'augmentation de la quantité de tamis moléculaire fait diminuer la conversion, qui est probablement dû à la formation du diester²⁶⁶.

En comparant les résultats obtenus dans les différents cas étudiés, on observe que la quantité du tamis moléculaire mise en jeu influe considérablement sur la conversion,

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 la 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^{267,268}.

e. Influence de la température

Nous avons effectué la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose avec l'acide laurique dans l'EMC en présence de la CAL B à trois températures différentes 40°C, 60°C et 80°C. L'influence de la température sur la conversion est illustrée dans le tableau 9.

²⁶⁶ M. Ferrer, M. Angeles Cruces, M. Bernabé, A. Ballesteros, F.J. Plou. Acylation of sucrose in solvent mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*. **1999**, 65, 10.

²⁶⁷ M. Liaquat, R.K.Owusu Apenten. Synthesis of low molecular weight flavour esters using plant seedling lipase inorganic media. *Journal of food science*. **2000**, 65, 295.

²⁶⁸ E. Wahtej, P. Adlercreutz. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, 55, 798.

Tableau 9- Influence de la température sur la conversion

Température	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
40°C	15	31,8	45,5	45,5
60°C	10	44,5	50,5	52,5
80°C	8	45	50	30

Conditions réactionnelles : 0,1mmol α -(+)-D-glucose, 1 μ g d'Al, 30mg CAL B, 30 mg TM, 5ml EMC, T°= 40, 60 et 80°C.

D'après les résultats du tableau 9, le monoester est obtenu avec une conversion de l'ordre de 45,5% à 40°C. A 80°C la conversion maximale obtenue est de 50%. Au bout de 48h celle-ci est diminuée jusqu'à 30%. La meilleure conversion (52,5 %) est observée au bout de 72h à 60°C²⁶⁹. Les auteurs ont observé lors de l'augmentation de la température, que la conversion du laurate de glucose était diminuée en présence de la Novozyme 435²⁷⁰. Ils ont également observé en présence de la même lipase, la chute de la conversion du laurate de glucose dans le 2M2B et dans les liquides ioniques à 80°C. Ceci peut être expliqué par la réversibilité de la réaction et la solubilité du monoester formé. En effet, à des températures supérieures à 60°C, le produit est soluble dans le milieu réactionnel ce qui favorise la réaction inverse.

Au regard des résultats obtenus lors de l'étude cinétique préliminaire réalisée ci-dessus sur l'influence du milieu réactionnel dans la synthèse enzymatique du 6-O-Dodecanoyl-D-glucopyranose, les paramètres suivants sont retenus pour la suite de notre étude de l'optimisation de la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose en présence de lipases.

- Solvant : EMC
- Proportion d'agent acylant : (Glc/AA)/(1/1)
- Quantité de lipase : 30 mg
- Tamis moléculaire : 30 mg
- Température : 60 °C.

V. Caractérisation spectroscopique du 6-O-Dodecanoyl-D-glucopyranose

L'estérification enzymatique de l' α -(+)-D-glucose avec l'acide laurique donne un seul régio-isomère, le mono Laurate de glucose.

²⁶⁹ X.S. Lin, K.H. Zhao, Q.L. Zhou, K.Q. Xie, P. J. Halling, Z. Yang. *Aspergillus oryzae* lipase-catalyzed synthesis of glucose laurate with excellent productivity. *Bioresources and Bioprocessing*. **2016**, 3, 2.

²⁷⁰ Z. Findrik, G. Megyeri, L. Gubicza, K. BelafiBako, N. Nemestothy, M. Sudar. Lipase catalyzed synthesis of glucose palmitate in ionic liquid. *Journal of Cleaner Production*. **2016**, 112, 1106.

Le produit récupéré est sous forme pyranose avec un rapport $\alpha/\beta = 84,31\%/15,68\%$. En solution, les sucres peuvent co-exister en équilibre sous au moins cinq formes: ouverte, furanose (α/β) ou hémiacétalique cyclique pyranose (α/β) comme indiqué sur le schéma 22²⁷¹. Le fait d'avoir exclusivement des formes pyranoses peut s'expliquer par la température de réaction (60°C) correspondant à des conditions thermodynamiques qui conduisent généralement à des pyranoses^{272,273} et non à des furanoses.

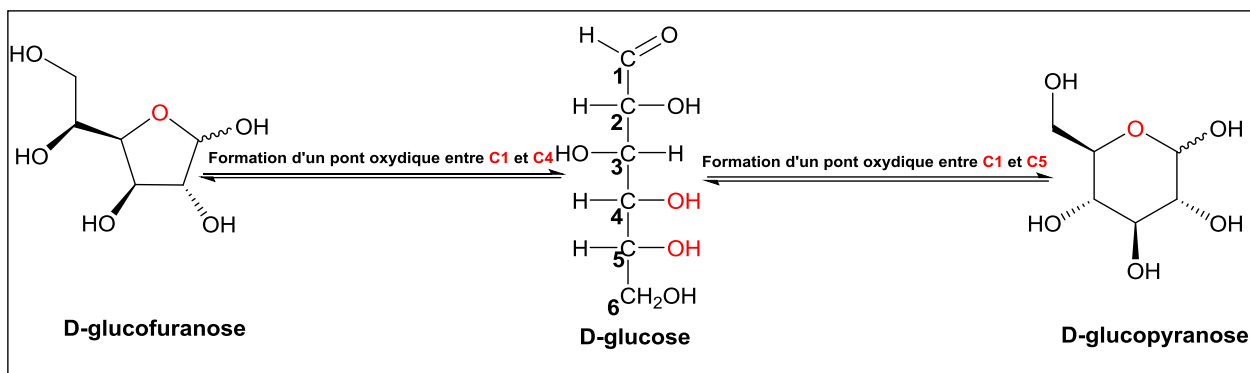


Schéma 22- Les différentes formes du D-glucose en équilibre.

La structure du 6-O-Dodecanoyl-D-glucopyranose (Schéma 23) synthétisé a été identifiée à l'aide des techniques spectroscopiques usuelles : RMN ¹H, RMN ¹³C et IR.

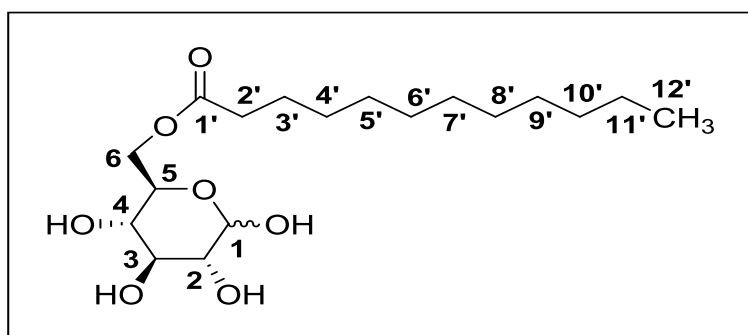


Schéma 23- Structure du 6-O-Dodecanoyl-D-glucopyranose

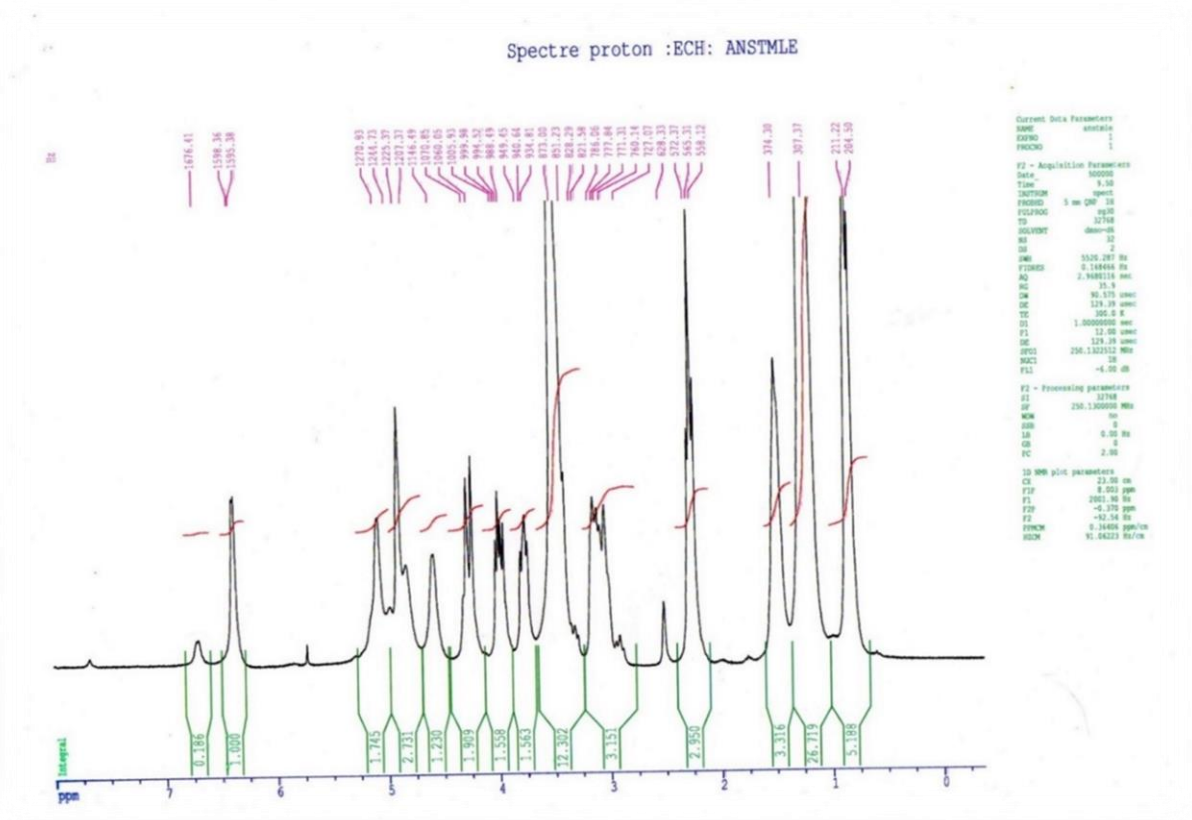
En RMN ¹H, le produit synthétisé est caractérisé par la présence d'un multiplet vers $\delta = 1.25$ ppm correspond aux protons de la chaîne aliphatique CH₂ (m, 24H, H-4'-11') et à $\delta = 3.76$ ppm avec un autre multiplet correspond aux deux protons (m, 2H, H-5 α , H-5 β), les deux protons portés par le carbone C6' (dd, 2H, J=5.95, 6.03, H-6') apparaît sous la forme de

²⁷¹ J. N. Bertho. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. *Thèse de doctorat de l'université de Rennes I*. 1994.

²⁷² G. Debroux. Etude fondamentale de la conversion du D-glucose en 5 hydroxyméthylfurfural dans des solvants eutectiques profonds. *Master Bioingénieur en Chimie et Bioindustries*, 2019.

²⁷³ J. Wang, X. Jinxu, X. Qineng, L. Xiaohui, W. Yanqin. Recent advances in heterogeneous catalytic conversion of glucose to 5-hydroxymethylfurfural via green routes. *Science china Chemistry*, 2017, 60, 870.

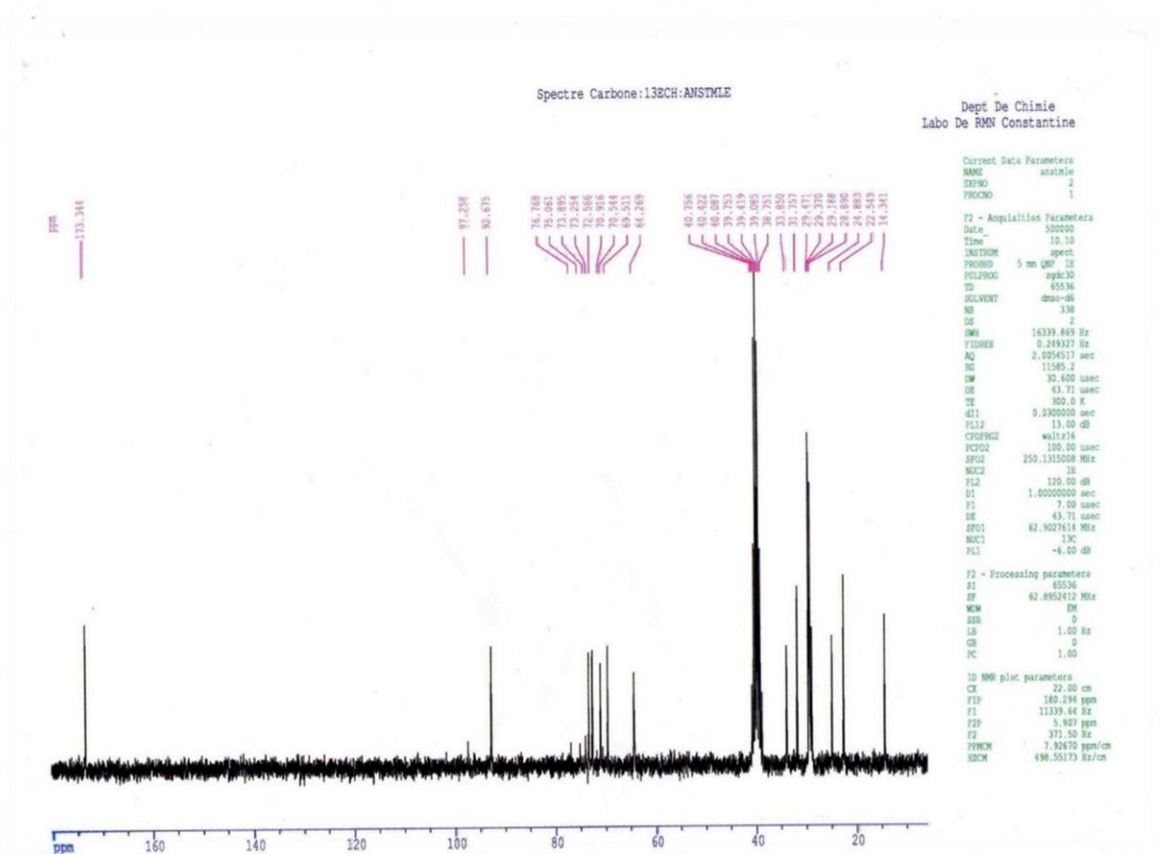
doublet de doublets avec une constante de couplage $J=5.95, 6.03 \text{ Hz}$, Un multiplet vers 1.50 ppm correspond aux quatre proton porté par le carbone C_3' (m, 4H, **H-3'**), un pic résonne vers 2.27 se forme d'un triplet correspond aux quatre protons du carbone C_2' (t, 4H, **H-2'**). Un multiplet résonne vers $\delta = 2.95-3.20$ correspond aux 6H des anomères α, β des carbones C_2, C_3, C_4 (m, 6H, **H-2 α , H-2 β , H-3 α , H-3 β , H-4 α , H-4 β), Un pic sous forme de doublet de doublets avec les protons caractéristiques de la fonction OH sont confirmées par les pics résonne vers $\delta = 6.35 \text{ ppm}$ et $\delta = 6.65 \text{ ppm}$ sous forme d'un doublet avec une constante de couplage $J=2.98 \text{ Hz}$ correspond à la fonction **OH** des anomères α et β respectivement [**C1-(OH-1 α , OH-1 β)**]. Le multiplet résonne entre $\delta = 4.72-5.20 \text{ ppm}$ correspond aux cinq protons de l'hydroxyle (**OH**) des anomères α et β , (**OH-2 α , OH-2 β , OH-3 α , OH-3 β , H-1 α**). Le multiplet résonne vers $\delta = 4.56 \text{ ppm}$ correspond aux deux protons de la position C_4 des anomères α et β , (**OH-4 α , OH-4 β**). Un doublet vers 4.24 ppm avec une constante de couplage $J=10.8 \text{ Hz}$ correspond aux deux protons de la position C_6 et C_1 de l'anomère β . Un triplé vers $\delta = 0.85 \text{ ppm}$ correspond aux trois protons de méthyle porté par le Carbone **C12**.**



Spectre RMN¹H du 6-0-Dodécanoyl-D-glucopyranose

En RMN ¹³C, la structure de 6-O-Dodecanoyl-D-glucopyranose est confirmée par l'apparition d'un signal vers $\delta = 172.83 \text{ ppm}$ correspond au carbone de la fonction ester (**C-1'**,

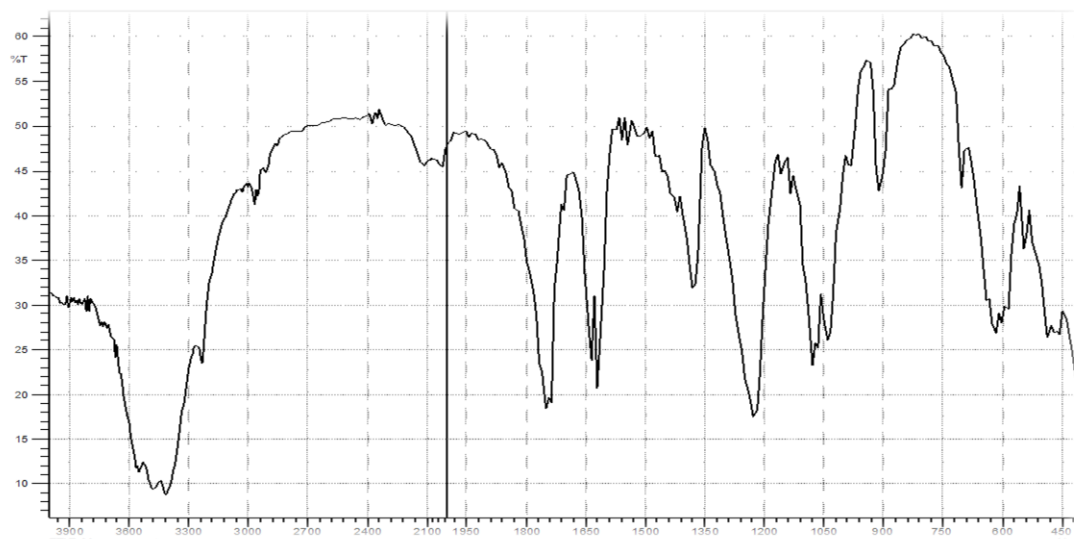
C=O), Des signaux entre $\delta = 63.78- 92.19$ ppm confirment la structure du cycle du sucre (C-1 et C-6), Les carbones de la chaine aliphatique résonnent entre 13.87 -33.38 ppm.



Spectre RMN¹³C du 6-O-Dodécanoyl-D-glucopyranose

En IR, la structure est confirmée par les bandes d'absorption suivantes :

Une bande vers 3340cm^{-1} , correspond au groupement O-H, une bande vers 1735cm^{-1} , correspond au carbonyle de fonction ester ($-\text{O}-\text{C}=\text{O}$), une bande vers 1149cm^{-1} , correspond au bande C-O, Une bande vers 1468cm^{-1} correspond au C-H, la bonde vers 1058cm^{-1} correspond au (C-OH).



Spectre IR du 6-O-Dodécanoyl-D-glucopyranose

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons rapporté une étude préliminaire sur l'acylation enzymatique de l' α -(+)-D glucose en présence de la lipase de *Candida antarctica* B (CAL B). Cette étude a montré que la conversion du sucre de départ est influencée par chaque facteur mis en jeu (le solvant, la proportion et la nature de l'agent acylant, la température, le tamis moléculaire et la quantité de la lipase). Pour cela, nous avons fait une optimisation de ces paramètres réactionnels pour aboutir aux meilleures conversions.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la nature du solvant sur la réaction d'acylation de l' α -(+)-D-glucose. La meilleure conversion est observée dans l'EMC (C = 52,5 %), au bout de 72h.

Dans un deuxième temps, l'étude de l'influence de la quantité et de la nature de l'agent acylant est mise en place. La meilleure conversion observée est 52,5% avec l'acide laurique dans un rapport molaire (1/1 : Glc/AA).

D'autre part, l'étude de l'influence de la quantité de la lipase sur la conversion du sucre montre que la réaction peut avoir lieu avec une faible proportion d'enzyme (30mg). La quantité optimisée du tamis moléculaire nécessaire pour une conversion maximale est de l'ordre de 30 mg. Une autre étude se rapportant à l'influence de l'élévation de la température sur la stabilité et l'activité catalytique de la CAL B montre que les réactions avancent mieux à 60°C.

A partir de ces résultats et pour la suite de notre étude toutes les réactions ont lieu dans l'EMC comme solvant en présence de l'acide laurique comme agent acylant, avec 30 mg de CAL B, 30 mg de tamis moléculaire, un rapport molaire substrat/agent acylant (1éq/1éq) et à 60°C.

***Chapitre II-Influence du milieu réactionnel
sur l'acylation enzymatique du D-glucose.
Etude de l'effet de la modification des
lipases.***

I. Introduction

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. Dans ce cas, les lipases offrent un avantage distinct à leur spécificité, leur biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Une approche possible pour stabiliser les lipases dans les solvants organiques est leur immobilisation sur une matrice appropriée par les processus d'adsorption sur un support solide²⁷⁴ et d'enrobage par des tensioactifs^{275,276} non ioniques. De ce fait leur stabilité, leur activité enzymatique et leur réactivité vis-à-vis des substrats se voient changés. Ces changements dépendent de la source de l'enzyme, du type de support et de la méthode utilisée.

Dans ce travail, nous avons modifié la lipase *Pancréatique de porc* (PPL) et la lipase de *Candida cylindracea* (CCL) libres par les processus cités plus haut. Les supports utilisés dans le processus d'adsorption sont de type inorganique à savoir la cérite et la silice. L'enrobage ou l'encapsulation de ces mêmes lipases est réalisé avec des esters de sorbitan, des tensioactifs non ioniques. Les lipases ainsi modifiées sont par la suite testées dans la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose dans le but de comparer leurs activités catalytiques avec celles de l'enzyme libre et une enzyme immobilisée commerciale, la lipase de *Candida antarctica* B (CAL B).

II. Résultats et discussions

1. Modification des lipases

Récemment, la recherche sur les réactions enzymatiques dans les milieux organiques a attiré plus d'attention en tant que nouvelle procédure de synthèse organique²⁷⁷. Les lipases sont également largement utilisées dans diverses synthèses organiques notamment en estérification^{278,279}. On rapporte qu'elles ont une stabilité et une activité élevées et sont conventionnellement employés dans des milieux aqueux et organiques^{280,281}. Cependant,

²⁷⁴ N. Bouzaouit, C. Bidjou-Haiour. Response surface methodological study of glucose laurate synthesis catalyzed by immobilized lipase from candida cylindracea. *Biological Forum-An Intern. J.* **2016**, 81, 420.

²⁷⁵ S. Okazaki, M. Goto, H. Wariishi, H. Tanaka, S. Furusaki. Characterization and catalytic property of surfactant-laccase complex in organic media. *Biotechnology Progress*, **2000**, 16, 583.

²⁷⁶ V. Dandavate, D. Madamwar. Novel approach for the synthesis of éthyl iso valerate using surfactant coated *Candida rugosa* lipase immobilized in microemulsion based organogels. *Enzyme and microbial technology*. **2007**, 41, 265.

²⁷⁷ N. Kamiya, M. Goto, F. Nakashio. Surfactant-Coated Lipase Suitable for the Enzymatic Resolution of Menthol as a Biocatalyst in Organic Media. *Biotechnologie. Progresse*. **1995**, 11, 270.

²⁷⁸ K.P. Dhake, D.D. Thakare. B.M. Bhanage. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Fragr. J.* **2013**, 28, 71.

²⁷⁹ M.J. Ferrer, J.P. Francisco, N. López-Cortés, D. Reyes-Duarte, M. Christensen, J.L. Copa-Patiño, A. Ballesteros. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B and their antimicrobial properties. *Enzyme and microbial technology*. **2005**, 36, 391.

²⁸⁰ A.M. Klivanov. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **2001**, 108, 241.

l'utilité de ces enzymes dans les procédés industriels est limitée par leur tendance à être dénaturées et inactivées lorsqu'elles sont exposées à des solvants organiques. Des approches pour surmonter ce problème ont été développées avec succès^{282,283}. L'immobilisation de la lipase libre sur des supports appropriés par divers processus tel que l'adsorption²⁸⁴ ou l'encapsulation dans des tensioactifs^{285,286} non ioniques sont des techniques qui donnent généralement de bons résultats et une augmentation considérable de l'activité catalytique^{287,288}. Ils permettent également de prolonger l'existence de ces enzymes. Les avantages les plus significatifs des enzymes modifiées sont leurs procédures de préparation simples et leur bonne solubilité dans une large gamme de solvants organiques.

a. Modification des lipases par immobilisation (adsorption)

Les lipases *Pancréatique de porc* et de *Candida cylindracea* sont immobilisées sur la cérite et la silice qui sont des supports microporeux par le processus d'adsorption²⁸⁹. L'adsorption physique est la méthode la plus simple d'immobilisation des enzymes. Elle consiste en une solution enzymatique, généralement aqueuse, simplement mise en contact avec un matériau sélectionné utilisé comme support. L'adsorption se produira à condition que les interactions enzyme-support soient suffisamment fortes. Dans le cas des lipases, l'interaction hydrophobe est la plus courante, mais les interactions ioniques avec les échangeurs d'ions des matériaux peuvent également être utiles²⁹⁰.

Etant donné que les lipases s'adsorbent spontanément en solutions aqueuses sur les surfaces hydrophobes à un degré plus élevé que la plupart des autres protéines, cette méthode peut être utilisée pour l'immobilisation des lipases^{291,292}. Il est intéressant de noter que l'adsorption sur

²⁸¹ A. Zaks, A.M. Klivanov, Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1985**, 82, 3192.

²⁸² D. Feng-Xia, L. Zhang, T. Xiao-Zuo, Ch. Hong-Bing, W. Xiu-Li and W. Yu-Zhong, Ionic liquid coated lipase: Green synthesis of high molecular weight poly (1,4-dioxan-2-one). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2012**, 77, 46.

²⁸³ T. Mori, S. Kishimoto, K. Ijio, A. Kobayashi and Y. Okahata. A Lipid-Coated Lipase as an Efficient Hydrolytic Catalyst in the Two-Phase Aqueous-Organic System, *Biotechnology and bioengineering*. **2001**, 76, 157.

²⁸⁴ N. Bouzaouit, C. Bidjou-Haiour. Response Surface Methodological Study of Glucose Laurate Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipase from *Candida cylindracea* *Biological Forum—An International Journal*. **2016**, 81, 420.

²⁸⁵ V. Dandavate and D. Madamwar, Novel approach for the synthesis of ethyl isovalerate using surfactant coated *Candida rugosa* lipase immobilized in microemulsion based organogels, *Enzyme and microbial technology*. **2007**, 41, 265.

²⁸⁶ Y. Okahata and T. Mori, Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media, *Trends in Biotechnology*. **1997**, 4, 15.

²⁸⁷ N. Klai, C. Bidjou-Haiour. S. Bouquillon. D-Xylose-based surfactants: Synthesis, characterization and molecular modeling studies, *Comptes Rendus Chimie*. **2015**, 18, 599.

²⁸⁸ A.M. Klivanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, **2001**, 108, 241-246.

²⁸⁹ N. Bouzaouit, C. Bidjou-Haiour. Response surface methodological study of glucose laurate synthesis catalyzed by immobilized lipase from *Candida cylindracea*, *Forum—An International Journal*. **2016**, 81, 420.

²⁹⁰ M. M. Zheng, Y. Lu, L. Dong, P. M. Guo, Q. C. Deng, W. L. Li, Y. Q. Feng and F. H. Huang, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Bioresource technology*, **2012**, 115, 141.

²⁹¹ T. Gitlesen, M. Bauer and P. Adlercreutz, Biochim. Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, **1997**, 1345, 188.

le support conduit souvent à une augmentation de l'activité catalytique de la lipase²⁹³. Ceci est interprété comme étant dû à des interactions hydrophobes entre le support et une partie de la molécule de la lipase provoquant l'ouverture du couvercle pour donner la conformation active, en analogie avec l'activation interfaciale provoquée par une phase de substrat hydrophobe.

b. Modification des lipases par encapsulation (enrobage)

Une autre façon d'obtenir des préparations enzymatiques hautement actives dans des milieux organiques consiste à préparer des microcristaux recouverts de protéines (enzymes) (PCMC)²⁹⁴. Les mêmes lipases (CCL et PPL) sont donc dans un deuxième temps enrobé par des tensioactifs non ioniques.

Dans cette méthode, une solution enzymatique aqueuse est mélangée à une solution concentrée d'un excipient, qui est normalement un composé inorganique ou organique, sel, esters de sorbitant (span, twin...) ou un acide aminé. La solution mélangée est ajoutée lentement à un solvant organique miscible à l'eau pour induire la précipitation de l'enzyme. Le phénomène de surface fait que l'enzyme conserve son activité et permet un transfert de masse efficace des substrats et des produits. Le propanol ou l'éthanol à faible teneur en eau sont de bons solvants pour la préparation des PCMC, mais d'autres solvants peuvent également être utilisés²⁹⁵. Les PCMC des lipases expriment des activités jusqu'à 200 fois plus élevées que les mêmes enzymes sous forme libres²⁹⁶. Dans la plupart des études rapportées, les molécules d'enzyme dans les PCMC n'étaient pas réticulées. Cependant, la réticulation avec le glutaraldéhyde a été évaluée, produisant des microcristaux réticulés recouverts de protéines. On pourrait s'attendre à ce que cette procédure fournisse un biocatalyseur plus résistant aux fuites enzymatiques mais de manière surprenante, l'activité catalytique s'est avérée supérieure à celle de la PCMC correspondante sans réticulation pour les CRL et BCL dans quatre solvants organiques différents²⁹⁷.

²⁹² R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernandez-Lorente and J. M. Guisan, Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and physics of lipids*, **1998**, 93, 185.

²⁹³ A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernandez-Lafuente, J. Huguet and J. M. Guisan, A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and bioengineering* **1998**, 58, 486.

²⁹⁴ M. Kreiner, B. D. Moore and M. C. Parker, Chem. Commun. Enzyme-coated micro-crystals: a 1-step method for high activity biocatalyst preparation, *Chemical communications*. **2001**, 1096–1097.

²⁹⁵ M. Kreiner, J. F. A. Fernandes, N. O'Farrell, P. J. Halling and M.-C. Parker, Stability of protein-coated microcrystals in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2005**, 33, 65–72.

²⁹⁶ J. J. Zheng, L. Xu, Y. Liu, X. Y. Zhang and Y. J. Yan, Lipase-coated K₂SO₄ micro-crystals: preparation, characterization, and application in biodiesel production using various oil feedstocks. *Bioresource Technology*. **2012**, 110, 224.

²⁹⁷ S. Shah, A. Sharma, M. N. Gupta, Cross-linked protein-coated microcrystals as biocatalysts in non-aqueous solvents. *Biocatalysis and Biotransformation*. **2008**, 26, 266.

2. Mesure de la concentration des lipases modifiées par la méthode de Bradford

Les lipases libres, CCL et PPL sont immobilisées sur deux supports solides, la célite et la silice. Elles sont ensuite encapsulées avec quatre types d'esters de sorbitan : le monostéarate de sorbitan (span 60), le tristéarate de sorbitan (span 65), le monooléate de sorbitan (span 80), et le trioléate de sorbitan (span 85). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique qui consiste à utiliser un colorant, le bleu de Coomassie brillant G-256 qui se lie aux protéines (notre enzyme) par des interactions non-covalentes dans un pH acide. Elle est basée sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur après liaison (complexation) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

La concentration inconnue de l'enzyme est alors déterminée en lisant l'absorbance correspondant. L'équation de la courbe d'étalonnage permet de calculer sa valeur^{298,299}.

a. Calcul des concentrations des enzymes modifiés

Selon la méthode de dosage des protéines de Bradford³⁰⁰ on peut déterminer la concentration inconnue de protéine grâce à la courbe d'étalonnage du BSA (*Bovine Serum Albumin*) qui donne l'équation suivante : $f(C) = a A + b$.

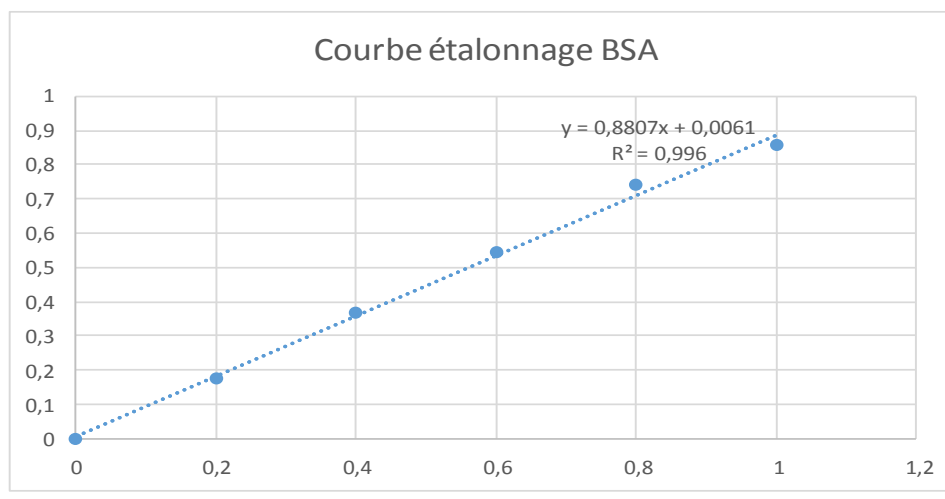


Figure 11- Courbe d'étalonnage du BSA

²⁹⁸ M.A. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, **1976**, 72, 248.

²⁹⁹ S.M. Gotham, P.J. Fryer, W. Paterson, The measurement of insoluble proteins using a modified Bradford assay, *Analytical biochemistry*, **1988**, 173, 353.

³⁰⁰ M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **1976**, 72, 248.

En utilisant la relation dérivée de la courbe d'étalon « $Y = 0.8807 X + 0.0061$ » on calcule la concentration des lipases modifiées :

Y: absorbance à $\lambda = 595 \text{ nm}$

X : concentration de protéine

Les résultats obtenus sont renseignés sur les tableaux suivants.

Tableau 10- Influence de la modification dans le cas de la CCL.

Lipase	C (mg/ml)	TP (%)
CCL Ic	X=0,650	32,5
CCL Is	X=0,565	28,25
CCL C80	X=0,700	35
CCL C85	X=0,500	25
CCL C60	X=0,580	29
CCL C65	X=0,825	41,25

C- Concentration, TP- Teneur en protéine, Rdt_{im} - Rendement d'immobilisation, Ic- Immobilisation sur celite, Is- Immobilisation sur silice, C80- Coted span 80, C85-Coted span 85, C60- Coted span 60, C65- Coted span 65.

Tableau 11- Influence de la modification dans le cas de la PPL.

Lipase	C (mg/ml)	TP (%)
PPL Ic	X=0,570	28,5
PPL Is	X=0,520	26
PPL C80	X=0,835	41,75
PPL C85	X=0,750	37,5
PPL C60	X=0,780	39
PPL C65	X=0,860	43

C- Concentration, TP- Teneur en protéine, Rdt_{im} - Rendement d'immobilisation, Ic- Immobilisation sur celite, Is- Immobilisation sur silice, C80- Coted span 80, C85-Coted span 85, C60- Coted span 60, C65- Coted span 65.

La modification des enzymes libres par adsorption sur la cérite donne des teneurs en protéine de 32,5% dans le cas de la CCL et 28,5% pour la PPL. Avec la silice on obtient respectivement 28% et 26% pour la CCL et la PPL. Ceci montre que la cérite peut être un support adéquat pour l'immobilisation des lipases libres³⁰¹.

Ces matériaux offrent des caractéristiques intéressantes. Ils possèdent des pores d'un diamètre uniforme, une très grande surface spécifique et un volume poreux important. Ils sont

³⁰¹ R. Reshmi, S. Sugunan, Superior activities of lipase immobilized on pure and hydrophobic clay supports: Characterization and catalytic activity studies, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, 97, 36.

également inertes et stables à température élevée. Les lipases possèdent une surface avec un caractère hydrophobe, les interactions hydrophobes ont probablement un rôle important dans le processus d'adsorption. Des liaisons physiques telles que les forces de Van der Waals peuvent également intervenir et favoriser le contact entre la lipase et le support. La technique consiste donc à confiner l'enzyme dans un espace ou dans un réseau en vue de restreindre sa mobilité. Le confinement des enzymes en surface de macropores (diamètres de plusieurs micromètres) les rend accessibles aux réactifs en solution, de façon continue. D'autre part la nature du support d'immobilisation permettrait de retenir l'eau du milieu, augmentant ainsi l'activité de l'enzyme³⁰².

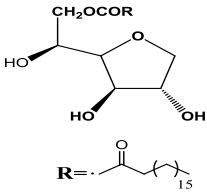
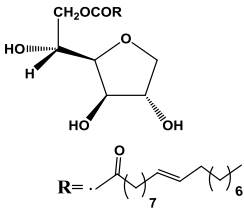
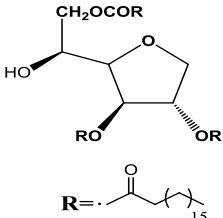
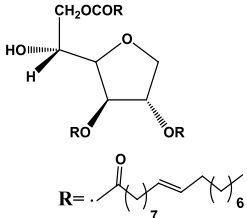
La modification des enzymes libres par enrobage donne des teneurs variées en protéine. Les valeurs les plus élevées sont celles obtenues avec le span 65, 41% et 43% respectivement avec la CCL et la PPL.

Les nouvelles lipases enrobées ont été obtenues par l'agrégation de la lipase et du tensioactif dans une solution tampon suivie d'une sonication³⁰³. La concentration en protéines est égale dans toutes les expériences et est dispersée dans un système aqueux. La poudre jaune obtenue est insoluble dans l'eau. L'effet de la source du span sur la teneur en protéines du complexe tensioactif-lipase est étudié. La teneur en protéines du complexe lipase-tensioactif dépend de manière significative de la source du span utilisé pour l'enrobage. Elle est influencée par la texture du span. Elle est également influencée par la longueur et le nombre de chaînes du résidu d'acide gras de l'ester de sorbitan. Les caractéristiques structurales des tensioactifs utilisés sont répertoriées dans le tableau suivant.

³⁰² L. F. Garcia, V. Gotor, Lipase-catalyzed transesterification in organic media: Solvent effects on equilibrium and individual rate constants. *Biotechnology and bioengineering*.**1998**, 59, 684.

³⁰³ M. Persson, I. Mladenoska, E. Wehtje, P. Adlercreutz, Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, 31, 833.

Tableau 12- Caractéristiques physico-chimiques des spans

Ester de sorbitan	Caractéristiques	BHL	TP _{CCL} (%)	TP _{PPL} (%)
	Span 60 Trois groupes hydroxyles et une chaîne saturée.	4,7	29	39
	Span 80 Trois groupes hydroxyles et une chaîne insaturée.	4,3	35	41,75
	Span 65 Un groupe hydroxyle et Trois chaînes Saturées.	2,1	42	43
	Span 85 Un groupe hydroxyle et Trois chaînes insaturées.	1,8	25	37,5

D'après les chiffres obtenus la teneur en protéines (TP) du complexe résultant dépend de la balance hydrophobe-lipophile (BHL) du tensioactif utilisé pendant le processus de modification. Les résultats montrent que des quantités plus élevées du complexe enzyme-tensioactif sont obtenues lorsque la lipase est enrobée avec un ester de sorbitan comportant un résidu d'acide gras à trois chaînes du tensioactif. Plus basse est la BHL du tensioactif, plus élevée est son hydrophobie, donc la teneur en protéines est élevée.

Ceci est probablement dû au caractère hydrophobe de la lipase dont la surface est principalement constituée d'acides aminés non polaires³⁰⁴. Les molécules non polaires et faiblement polarisables ont tendance à se regrouper pour former des complexes dans lesquels

³⁰⁴ V.V. Mozhaev, I.V. Berezin, K. Martinek. Structurestability relationship in proteins: fundamental tasks and strategy for the development of stabilized enzyme catalysts for biotechnology, *Critical Reviews in Biochemistry*. **1988**, 3, 235.

des interactions hydrophobes se produisent entre certaines fractions protéiques et le tensioactif³⁰⁵. Les liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles et les groupements amines libres de la lipase peuvent également jouer un rôle important pour stabiliser le complexe³⁰⁶.

L'immobilisation permet de conserver des quantités assez importantes en protéine dans le cas de l'immobilisation et celui de l'encapsulation.

3. Etude structurale de la lipase de *Candida cylindracea* modifiée

a. Par encapsulation avec les span 60 (CCL C60) et 65 (CCL C65)

Afin de caractériser la lipase de *Candida cylindracea* modifiée par les span 60 (CCL C60) et 65 (CCL C65) nous avons utilisé les techniques de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) associée à la microanalyse par Energie Dispersive de rayon X (EDX) et de la Diffraction des Rayons X (DRX).

1. Microscopie Electronique à Balayage (MEB) couplée à l'EDX

La microscopie électronique à balayage est une technique qui permet d'observer la surface d'espèces biologiques de grandes tailles à l'échelle nanométrique. Couplée à l'EDX, elle nous permet de visualiser la morphologie extérieure des lipases modifiées ainsi que la détermination de leurs compositions chimiques. A la fin du processus d'immobilisation de la lipase sur le support choisi la confirmation de l'adsorption est effectuée d'abord à l'aide du MEB puis du DRX³⁰⁷.

Les images obtenues pour la CCL libre, les span 60, 65 et le biocatalyseur enrobé par le tensioactif sont représentés par les figures suivantes :

³⁰⁵ Okahata Y. and Mori T., Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media, *Trends Biotechnology.*, **1997**, 4, 15.

³⁰⁶ Y. Okahata, K. Ijro. A lipid-coated lipase as a new catalyst for triglyceride synthesis in organic solvents, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications.* **1988**, 1, 1392.

³⁰⁷ K. Ramani., S. Karthikeyan., R. Boopathy, L. John Kennedy, A.B. Mandala, G. Sekaran. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. *Process biochemistry.* **2012**, 47, 435.

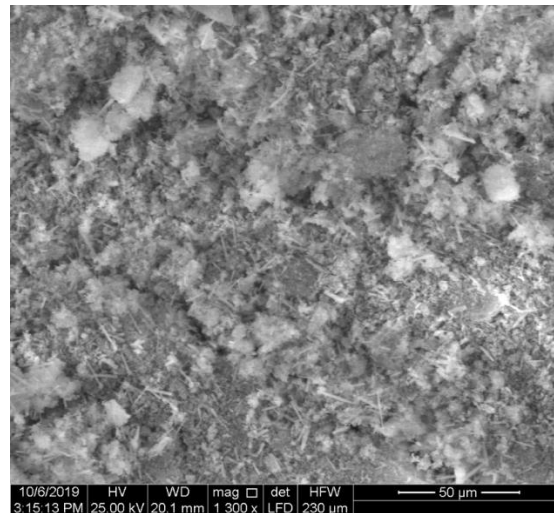
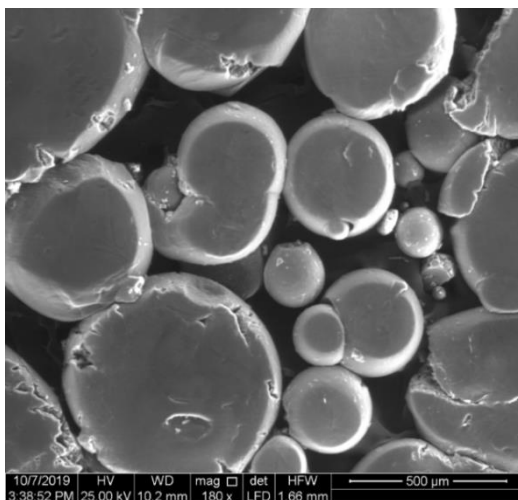
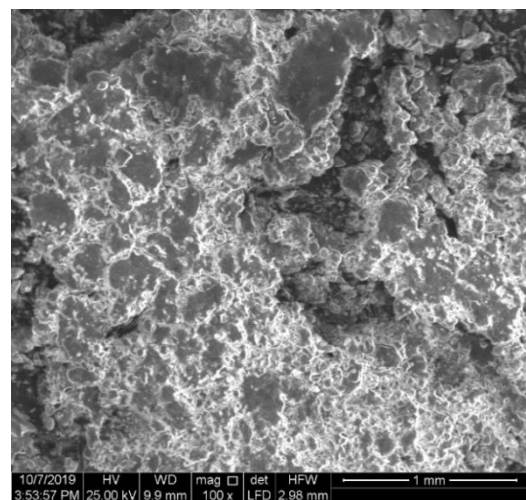


Figure 12- Observation microscopique MEB de la CCL libre

La Figure 12 présente l'image MEB d'un agrégat de la poudre lipasique native de la *Candida cylindracea* qui est majoritairement cristallin.



(a)



(b)

Figure 13- Observations microscopiques MEB de (a) span 60 et (b) CCL C60

Les figures 13a et 13b représentent respectivement les images MEB du span 60 avant et après complexation avec la lipase.

Il paraît évident en analysant l'image MEB présentée par la figure 13b que la lipase est bien intergréé sur le span³⁰⁸. Des résultats similaires sont obtenus dans la littérature³⁰⁹. Les

³⁰⁸ N. Rezgui, C. Bidjou-Haiour. Physical and chemical study of coated *Candida cylindracea* with sorbitan esters. *Research Journal of Chemistry and Environment*. **2021**, 25, 10.

³⁰⁹ K. Ramani. S. Karthikeyan. R. Boopathy., L. John Kennedy. A.B. Mandala., G. Sekaran. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies", *Process biochemistry*. **2012**, 47, 435.

résultats de la microanalyse EDX suggèrent également que la lipase a bien été enrobée par le span 60 (Tableau 13).

Tableau 13- Données de l'analyse EDX de la CCL C60.

Elément	CCL		Span 60		CCL C60	
	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique
C K	10.91	13.71	81.48	85.37	47.14	54.02
N K	17.01	18.32			4.02	3.95
O K	72.08	67.98	18.51	14.63	48.85	42.03

La micrographie montre clairement une différence de morphologie qui est dû à la présence de petites formes adsorbés sur la surface du support. Ceci est encore mieux suggéré par les résultats de l'analyse EDX effectuée sur ces points où nous avons eu des pourcentages massiques en éléments : carbone, azote et oxygène compris entre ceux obtenus pour le support et le biocatalyseur séparément.

Les résultats des analyses EDX présentés dans le tableau 23 donne les compositions élémentaires des différents éléments présents dans les échantillons étudiés. La microanalyse de la poudre lipasique native ressort trois pics majoritaires spécifiques du carbone, de l'azote et de l'oxygène respectivement 10.91%, 17,01% 72,08%.

- On obtient pour le span 60 les pics du carbone (81.48%) et de l'oxygène (18.51%)
- On obtient pour la lipase modifiée CCL C60, les pics du carbone (47.14%), de l'azote (4.02%) et de l'oxygène (48.85%) (Tableau 13).

On note clairement dans la composition de la lipase modifiée la présence du pic d'azote qui n'existe pas dans la composition du support ce qui permet de confirmer l'encapsulation.

Les Figures 14a et 14b représentent respectivement les images MEB du span 65 avant et après complexation avec la lipase.

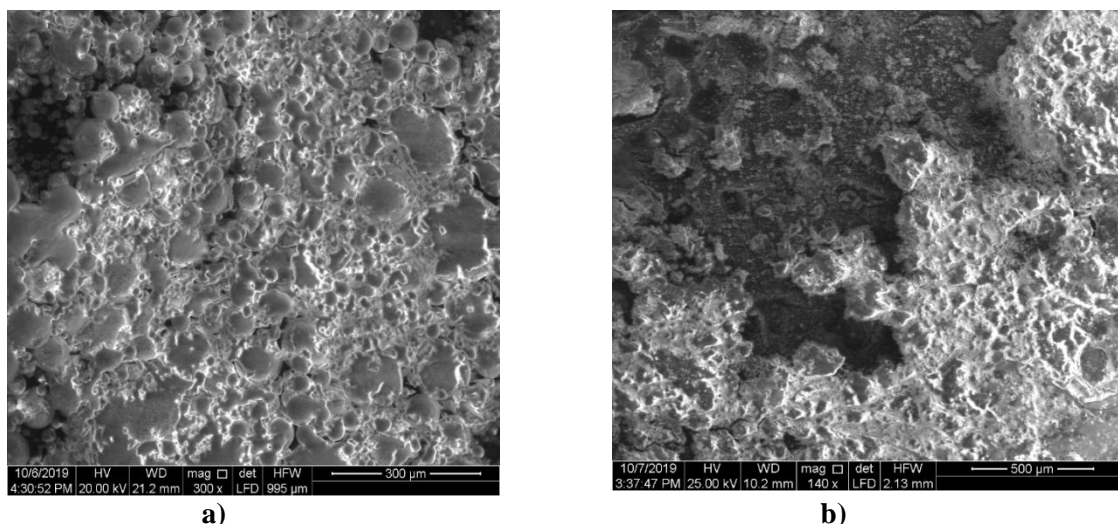


Figure 13- Observations microscopiques MEB de a) span 65 et b) CCL C65

Les mêmes constatations sont faites concernant la CCL C65, à savoir la bonne intégration de la lipase sur son support confirmé par les images MEB.

Les résultats de la microanalyse EDX suggèrent également que la lipase a bien été enrobée par le span 65 (Tableau 14).

Tableau 14- Données de l'analyse EDX de la CCL C65.

Elément	CCL		Span 65		CCL C65	
	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique
C K	10.91	13.71	83.98	86.21	48.82	55.53
N K	17.01	18.32			6.22	6.07
O K	72.08	67.98	16.01	13.79	44.97	38.40

Ce tableau représente la composition élémentaire en pourcentages des poudres obtenues par EDX. Ces résultats montrent clairement la présence d'oxygène, carbone et d'azote. Comme nous pouvons le voir, la microanalyse de la poudre lipasique native ressort trois pics majoritaires spécifiques du carbone, de l'azote et de l'oxygène respectivement 10.91%, 17,01% 72,08%.

- On obtient pour le span 65 les pics du carbone (83.98%) et de l'oxygène (16.01%).
- Pour la lipase modifiée CCL C65, les valeurs pour ces mêmes atomes sont respectivement (48.82%) et (44.97%) (Tableau 14).

Des pourcentages massiques en éléments : carbone, azote et oxygène compris entre ceux obtenus pour le support et le biocatalyseur séparément sont observés avec l'apparition du pic d'azote (6.22%) pour le biocatalyseur enrobé. Ce qui confirme que la CCL libre a été encapsulée par le span 65 avec succès.

2. Diffraction des Rayons X (DRX)

La Diffraction des Rayons X nous a permis de déterminer l'emplacement de l'enzyme adsorbée³¹⁰. Les diffractogrammes obtenus pour les différentes enzymes synthétisées ainsi que pour la lipase libre sont représentés sur les figures 15 et 16. Les spectres XRD sont enregistrés dans des fichiers de type RAW. Ils montrent que les esters de sorbitan sont intégrés avec succès dans la structure de la lipase.

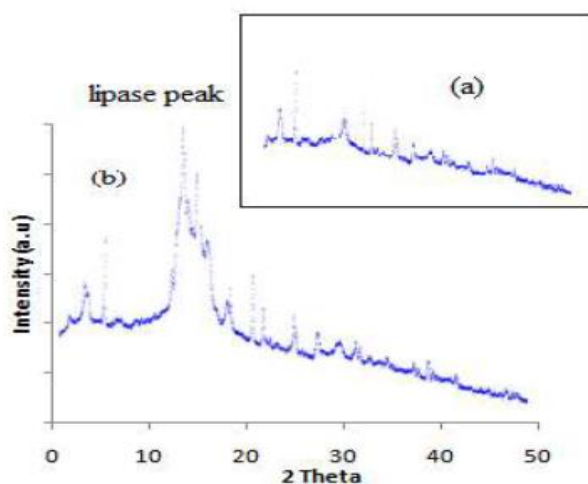


Figure 15- Spectres DRX de (a) span 65 et (b) CCL C65

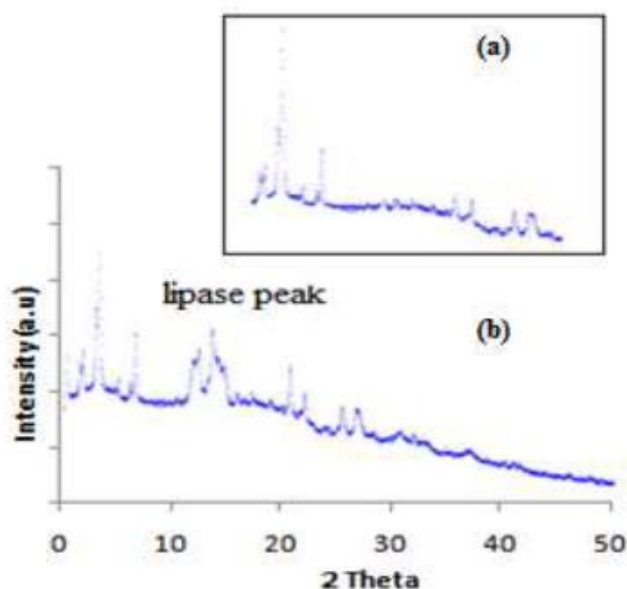


Figure 16- Spectres DRX de (a) span 60 et (b) CCL C60.

³¹⁰ S. Gupta., S. Yogesh, S. Javiya, M. Bhambi, C.S. Pundir, K. Singh and A. Bhattacharya. Comparative study of performances of lipase immobilized asymmetric polysulfone and polyether sulfone membranes in olive oil hydrolysis. *International journal of biological macromolecules*. 2008, 42, 145.

D'après les figures ci-dessus, l'enrobage de la lipase par les esters de sorbitan est prouvé par le pic de lipase supplémentaire sur les figures 15 et 16. Ces figures montrent également l'intensité du pic de lipase qui est plus élevée pour l'adsorption sur le span 65 (figure 15), ce qui est probablement dû à une quantité de lipase plus élevée. Cette teneur en protéines du complexe lipase-tensioactif dépend de manière significative de la source du span. Elle est également influencée par la longueur et le nombre de chaînes du résidu d'acide gras de l'ester de sorbitan, donc de la balance hydrophile-lipophile (BHL) du tensioactif comme expliqué plus haut.

D'autre part, on constate également que la fixation de la lipase sur les supports n'affecte pas la structure des phases qui constituent les span 60 et 65. Aucun changement n'est observé au niveau des pics caractéristiques sauf l'apparition du pic supplémentaire de la lipase.

b. Par immobilisation sur la celite (CCL Ic)

Afin de prouver l'adsorption de la lipase de *Candida cylindracea* sur la célite (CCL Ic) nous avons utilisé la technique de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) associée à la microanalyse par Energie Dispersive de rayon X (EDX)

Les images obtenues pour le support solide ainsi que la lipase adsorbée sur la célite sont représentés par les figures suivantes :

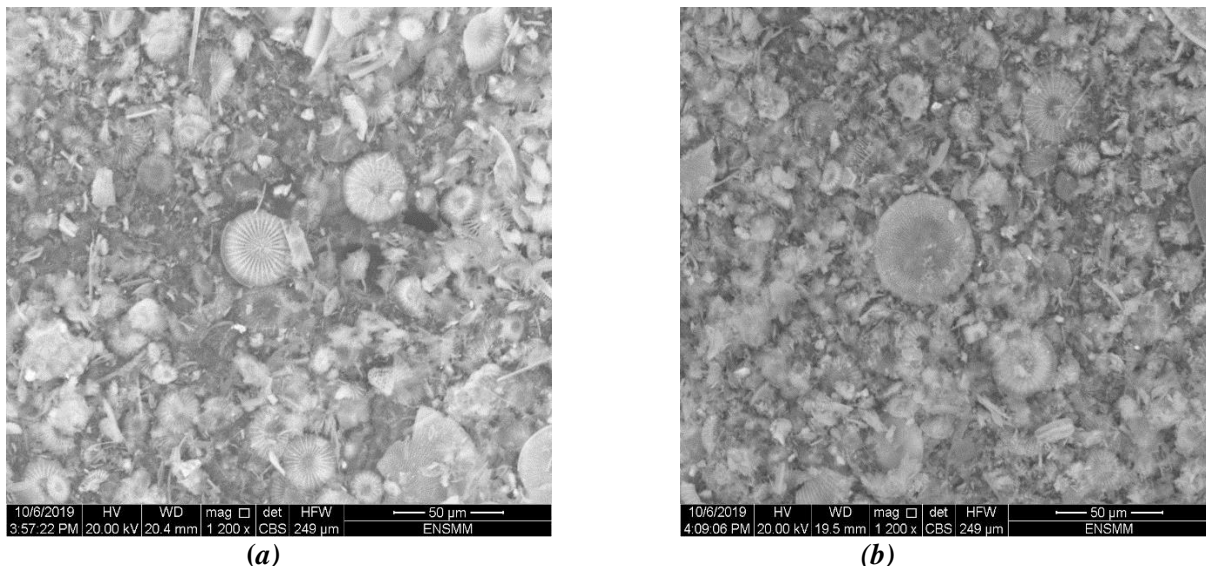


Figure 17- Observations microscopiques MEB de (a) celite et (b) CCL Ic

En comparant l'image MEB obtenue pour la lipase libre (Figure 17) et les images des figures a pour le support vierge et b pour le support chargé avec la lipase on constate bien l'adsorption du biocatalyseur sur la célite. Ceci est également confirmé par les résultats de l'analyse EDX (Tableau 15).

Tableau 15- Données de l'analyse EDX de la CCL.

Elément	CCL		Célite		CCL Ic	
	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique
C K	10.91	13.71	10.78	13.54	6.83	8.80
N K	17.01	18.32	17.17	18.50	8.65	9.54
O K	72.08	67.98	72.05	67.96	84.52	81.66

Les résultats EDX présentés dans le tableau 15- sont obtenus par le traitement des RX qui permettent une analyse en énergie (KeV) des raies afin d'identifier les atomes présents dans la zone pointée par la sonde et d'obtenir les compositions atomiques élémentaires des différentes poudres. Ces résultats montrent clairement la présence d'oxygène, de carbone et d'azote.

Le spectre dispersif de la poudre lipasique native ressort trois pic majoritaire intenses et spécifiques du carbone, de l'azote et de l'oxygène respectivement 10,91%, 17,01% 72,08%. Pour la célite les pics sont : C (10,78%), N (17,17%) et O (72,05%). Pour la lipase modifiée CCL Ic, les valeurs pour ces mêmes atomes sont respectivement : (6,83%), (8,65%) et (84,5%). Les pourcentages massiques en éléments carbone, azote et oxygène compris entre ceux obtenus pour le support et le biocatalyseur séparément montrent la réussite de l'immobilisation de la lipase sur son support.

4. Etude structurale de la lipase *Pancréatique de porc* modifiée

a. Par encapsulation par le span 65 (PPL C65)

Afin de caractériser la lipase *Pancréatique de porc* modifiée par le span 65 (PPL C65) nous avons utilisé la technique de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) associée à la microanalyse par Energie Dispersive de rayon X (EDX).

Les images obtenues pour la PPL libre, le span 65 et le biocatalyseur enrobé par le tensioactif sont représentés par les figures suivantes :

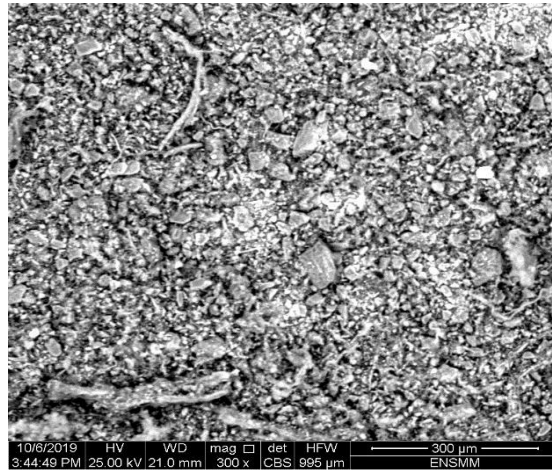
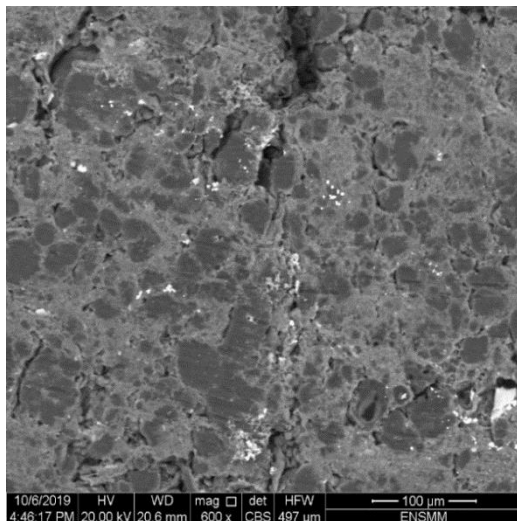
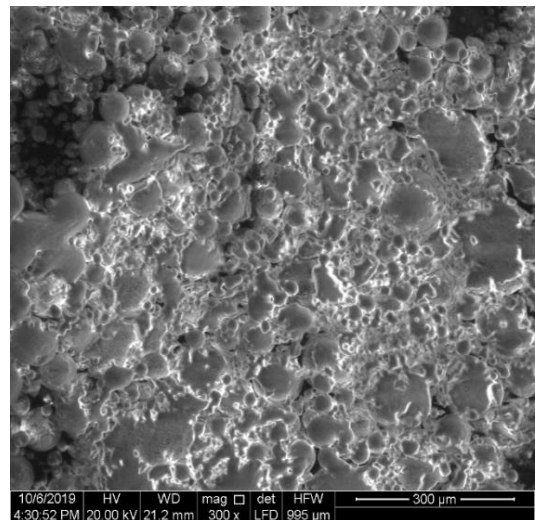


Figure 18-Observation microscopique MEB de la PPL libre

La figure 18 présente l'image MEB d'un agrégat de la poudre lipase *Pancréatique de porc* qui est majoritairement cristallin.



(a)



(b)

Figure 19-Observations microscopiques MEB de (a) span 65 et (b) PPL C65

Les figures 19a et 19b représentent respectivement les images MEB du span 65 vierge et de la lipase après enrobage.

La microscopie électronique à balayage couplée à l'EDX nous a permis de visualiser la morphologie extérieure de la cérite vierge et de la cérite chargée par la PPL, ce dans le but de confirmer l'adsorption de la lipase sur le support.

Les résultats de la microanalyse EDX confirment que la lipase a bien été enrobée le par le span 65 (Tableau 16).

Tableau 16- Données de l'analyse EDX de la PPL C65.

Elément	PPL		Span 65		PPL C65	
	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique
C K	17.60	20.97	21.93	25.16	19.23	22.63
N K	42.18	43.08			47.91	48.34
O K	40.21	35.96	78.06	74.84	32.86	29.03

L'analyse EDX présentée dans le tableau 16- nous a permis d'identifier les atomes présents dans la zone pointée et d'obtenir les compositions atomiques élémentaires des différentes poudres. Ces résultats montrent clairement la présence d'oxygène, de carbone et d'azote.

Le spectre dispersif de la poudre lipasique native ressort trois pic majoritaire spécifiques du carbone, de l'azote et de l'oxygène respectivement 17.60%, 42.18% 40.21% .

Pour le span 65 les pics sont : carbone (21.93%) et oxygène (78.06%). Pour la lipase modifiée CCL Ic, les valeurs pour ces mêmes atomes sont respectivement : (19.23%), (47.91%) et (32.86).

L'apparition du pic de l'azote pour la lipase modifiée et les pourcentages massiques en éléments carbone, azote et oxygène compris ou proches de ceux obtenus pour le support et le biocatalyseur séparément, montrent la réussite de l'immobilisation de la lipase sur son support.

b. Par immobilisation sur la celite (PPL Ic)

Afin de prouver l'adsorption de la lipase *Pancréatique de porc* sur la célite (CCL Ic) nous avons utilisé la technique de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) associée à la microanalyse par Energie Dispersive de rayon X (EDX)

Les images obtenues pour le support solide ainsi que la lipase adsorbée sur la célite sont représentés par les figures suivantes :

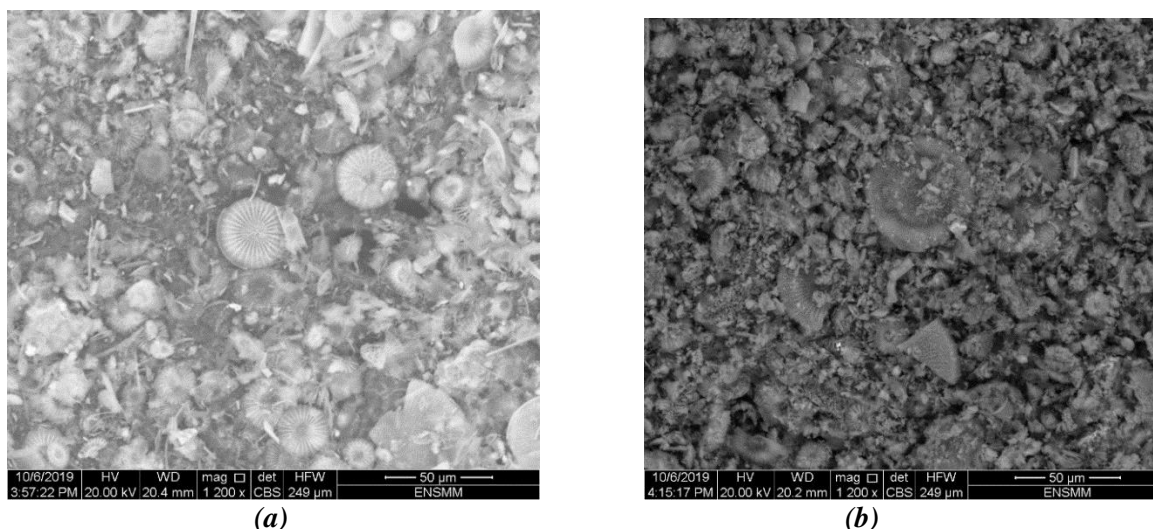


Figure 20- Observations microscopiques (a) celite, (b) PPL Ic par MEB

Tableau 17- Données de l'analyse EDX de la PPL Ic.

Elément	PPL		Célite		PPL Ic	
	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique	% de masse	% atomique
C K	17.60	20.97	10.78	13.54	1.43	1.63
N K	42.18	43.08	17.17	18.50	98.57	98.37
O K	40.21	35.96	72.05	67.96		

L'analyse EDX présentée dans le tableau 17 nous a permis d'identifier les atomes présents dans la zone pointée et d'obtenir les compositions atomiques élémentaires des différentes poudres. Ces résultats montrent clairement la présence d'oxygène, de carbone et d'azote.

Le spectre dispersif de la poudre lipasique native ressort trois pic majoritaire spécifiques du carbone, de l'azote et de l'oxygène respectivement 17.60%, 42.18% 40.21%.

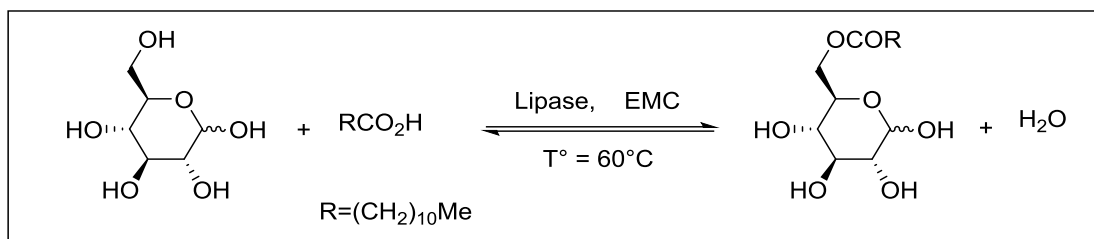
Pour la célite les pics sont : C (10.78%), N (17.17%) et O (72.05%).

Pour la lipase modifiée PPL Ic, les valeurs pour les atomes du carbone et de l'azote sont respectivement : (101.43%), (98.57%).

Les pourcentages massiques en éléments carbone, azote et oxygène compris ou proches de ceux obtenus pour le support et le biocatalyseur séparément, montrent la réussite de l'immobilisation de la lipase sur son support.

5. Effet de la modification des lipases sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique de l' α -(+)-D-glucose

Afin d'évaluer l'efficacité des enzymes modifiées, elles sont également testées dans la réaction d'estérification enzymatique de l' α -(+)-D-glucose dans les conditions opératoires définies préalablement.

Réaction*Schéma 24- Réaction d'estérification enzymatique de l' α -(+)-D-glucose*

L'avancement de la réaction d'estérification est basé sur la nature de la lipase utilisée comme biocatalyseur. L'activité enzymatique des différentes lipases modifiées à l'échelle du laboratoire est d'abord comparée avec celle de la lipase libre puis avec celle de la lipase en "one pot". Les réactions ont eu lieu dans l'EMC à 60°C, avec 30 mg de lipase et 30 mg tamis moléculaire.

Les résultats obtenus sont réunis dans les tableaux suivants.

a. Cas de la CCL

Les cinétiques obtenues avec les différentes formes de la CCL sont illustrées dans le tableau suivant.

Tableau 18- Influence de de la lipase sur la conversion dans le cas de la CCL.

Enzyme	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
CCL libre	3	8	8	14
CCL Ic	0	11	19	45
CCL Is	0	17,5	21	21,50
CCL C80	18	17	10	7
CCL C85	5	20	24,50	22
CCL C60	12,50	28,50	31,70	31,70
CCL C65	10,50	31,70	36,50	50
CCL + span80	0	10	12	15
CCL + span85	3	10	11	12
CCL + span60	5	12	12	18
CCL + span65	5	15	14	15

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 μ eq Al, 5 ml EMC, 30mg TM, T°=60°C.

D'après les résultats présentés dans le tableau 18 et en comparant les conversions obtenues pour la CCL libre et modifiée dans les mêmes conditions, on constate que la conversion

atteint un taux de 45% pour la CCL immobilisée sur célite (CCL Ic) et 50% pour la CCL enrobée par le span 65 (CCL C65). A noter que la conversion avec l'enzyme libre CCL n'est que de 14%. Les deux méthodes sont donc efficaces et augmentent significativement l'activité enzymatique de la CCL.

Les réactions ont également été effectuées en présence de la lipase et du tensioactif en un seul pot et les conversions obtenus ne dépassent pas les 18%. Ceci est une preuve supplémentaire de l'efficacité de la CCL modifiée.

b. Cas de la PPL

Les cinétiques obtenues avec les différentes formes de la PPL sont illustrées dans le **Tableau 19**.

Tableau 19-Influence de de la lipase sur la conversion dans le cas de la PPL.

Enzyme	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
PPL libre	0	0	10	12
PPL I c	0	22	20	20
PPL Is	0	18	20	20
PPL C80	10	10	28	48
PPL C85	15	18,2	30	42
PPL C60	5	23	38,5	44,5
PPL C65	10	26,70	36	50
PPL + span80	5	8	10	12
PPL + span85	0	0	15	15
PPL + span60	0	5	5	5
PPL + span65	5	8	8	8

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 \acute{e} q Al, 5 ml EMC, 30mg TM, T°=60°C.

Dans le cas de la PPL, l'immobilisation augmente légèrement la conversion par rapport à la lipase libre. La conversion est de 20 % quel que soit le support d'immobilisation (silice ou célite).

L'enrobage de la PPL par les span aboutit à l'amélioration de l'activité enzymatique par rapport l'immobilisation, on constate des conversions importantes, la plus élevée étant celle obtenue pour la PPL enrobée dans le span 65 (50%).

L'ajout de span (80, 85, 60, 65) à l'enzyme libre dans son milieu réactionnel n'a aucun effet sur son activité. Les valeurs de conversion obtenues en présence de spans en one pot avec la lipase montre l'importance de l'enrobage. L'enzyme encapsulée devient stable et active en milieu organique.

Les résultats obtenus prouvent que l'enrobage est la meilleure technique pour renforcer l'activité catalytique tout en conservant la structure enzymatique. La teneur en protéine obtenue par cette méthode reste la plus élevée par rapport à l'immobilisation.

La catalyse de la réaction d'estérification de D-glucose par les biocatalyseurs modifiées dans les mêmes conditions opératoires indique donc que les enzymes enrobées ont la plus grande activité catalytique avec une conversion de 50% pour la CCL et la PPL enrobées par le span 65.

6. Comparaison des lipases modifiées avec la CAL B

Les activités enzymatiques de la CCL et de la PPL enrobées par le span 65 sont dans un deuxième temps comparées à celle de la lipase de *Candida antractica* B, une lipase commerciale^{311,312}, immobilisée sur résine.

Tableau 20- Comparaison des lipases modifiées avec la CAL B.

Enzymes	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
CAL B	10	44,5	50,5	52,5
PPL C65	10	26,70	36	50
CCL C65	10,50	31,70	36,50	50

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 μ eq Al, 5 ml EMC, 30mg TM, T°=60°C.

On peut voir qu'après 72h de réaction à 60°C, 52.50% de conversion est obtenue lors de la réaction d'acylation enzymatique du glucose avec la CAL B. La comparaison avec les meilleurs résultats obtenus avec les lipases modifiées dans la même réaction a montré des activités similaires à celles observées avec la lipase de *Candida antarctica* B (PPL C65, 50%, CCL C65, 50%) cependant, après 72h.

³¹¹ R. BenSalah, H. Ghamghui, N. Miled, H. Mejdoub, Y. Gargouri, Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. *Journal of bioscience and bioengineering*. **2007**, 103, 368.

³¹² a. P. Degn, W. Zimmerma, Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnology and bioengineering* **2001**, 74, 483.

b. Y. Li, D. Rethwisch, Scale-up of pseudo solid-phase enzymatic synthesis of α -methyl glucoside acrylate. *Biotechnology and bioengineering*, **2002**, 79, 15.

Les enzymes modifiées obtenues lors de cette étude présentent donc une activité catalytique comparable avec celle de la CAL B qui est la lipase la plus employée pour la synthèse enzymatique d'esters de sucres.

Ces lipases montrent une activité catalytique et une stabilité thermique élevées par rapport à l'enzyme native dont la température de fonctionnement n'excède pas 40°C³¹³. D'autre part, un système de protection a été développé pour minimiser le contact direct du solvant organique et des substrats avec la lipase afin de faciliter l'estérification lipolytique des sucres, le but étant de rendre ces biocatalyseurs (PPL et CCL) plus attractifs d'un point de vue synthétique. Les activités catalytiques élevées obtenues sont probablement dues à une meilleure dispersion du catalyseur dans les milieux organiques.

³¹³ P. Adlercreutz. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews*, **2013**, 42, 6406.

III. Conclusion

Ce chapitre concerne la synthèse et la caractérisation de nouvelles lipases qui par la suite sont testées dans la synthèse d'esters de sucres à potentialité tensioactive. Les techniques utilisées pour l'obtention des lipases modifiées à partir des lipases libres sont l'immobilisation sur un support solide et l'encapsulation par des tensioactifs non ioniques.

La caractérisation des lipases synthétisées est réalisée avec les techniques de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) associée à la microanalyse par Energie Dispersive de rayon X (EDX) et de la Diffraction des Rayons X (DRX).

Les images obtenues pour les différentes formes de lipases nous ont permis de caractériser les nouveaux biocatalyseurs et de prouver l'intégration des lipases sur les supports choisis.

L'immobilisation de la PPL et de la CCL a permis d'optimiser les conversions obtenues pour les lipases libres. Dans le cas de la lipase de *Candida cylindracea* immobilisée sur la céélite une activité triplement supérieure par rapport à l'activité de la lipase libre est observée. Il a été montré que la CCL présente une surface avec une très haute hydrophobicité³¹⁴ et les interactions hydrophobes ont probablement un rôle important dans le processus d'adsorption. Cette enzyme semble s'adsorber facilement sur le support poreux afin de limiter sa mobilité ce qui la rend accessible aux réactifs en solution, la céélite est donc un bon support d'adsorption pour la CCL. La lipase *Pancréatique de porc* immobilisée présente une activité catalytique faible, une désorption doit probablement avoir lieu à un moment ou à un autre.

L'encapsulation ou l'enrobage des lipases avec des tensioactifs non ioniques donne de bons résultats. C'est une technique qui a priori fonctionne mieux que celle de l'immobilisation. Les spans sont insolubles dans les milieux aqueux ce qui permet l'adsorption de la lipase sur l'agent de surface qui fonctionne en tant que matériau de support.

La lipase *Pancréatique de porc* modifiée par les spans présente une activité qui est quatre fois supérieure à l'activité de la lipase libre.

La lipase de *Candida cylindracea* enrobée par les spans 80 et 85, présente une activité catalytique faible. Son activité est cependant améliorée par encapsulation avec les spans 60 et 65. Elle est multipliée par quatre dans le cas du span 65.

L'étude comparative de l'activité catalytique des enzymes modifiées avec la CAL B³¹⁵, une enzyme immobilisée disponible dans le commerce, montre que les lipases modifiées

³¹⁴ Y. Sugimura, K. Fukunaga, T. Matsuno, K. Nakao, M. Goto, F. Nakashio. A study on the surface hydrophobicity of lipases, *Biochemical Engineering Journal*, **2000**, 5, 123–128.

³¹⁵ D. Coulon, Girardin M., Rovel B., Ghoul M., Comparison of direct esterification and transesterification of fructose by *Candida antarctica* lipase, *Biotechnology Letters*, **1995**, 17, 2, 183-186.

présentent des activités catalytiques comparables avec celle obtenue en présence de CAL B (PPL C65=50%, CCL C65=50%).

Ces résultats démontrent invariablement que les lipases modifiées fonctionnent mieux que celles libres. D'autre part, la modification nous a permis d'augmenter la stabilité thermique de ces enzymes dont la température optimum de fonctionnement se situe aux alentours de 40°C.

Au-delà de ces propriétés, il existe des compatibilités environnementales, l'utilisation de biocatalyseurs étant considérée comme une chimie verte.

Spectres EDX

- EDX des lipases libres

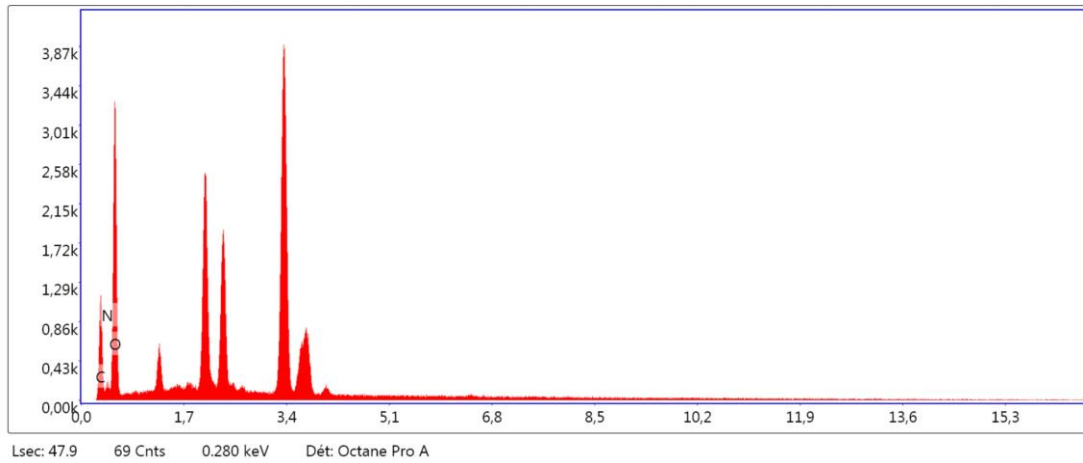


Figure 21- Spectre électronique par microanalyse EDX de la CCL

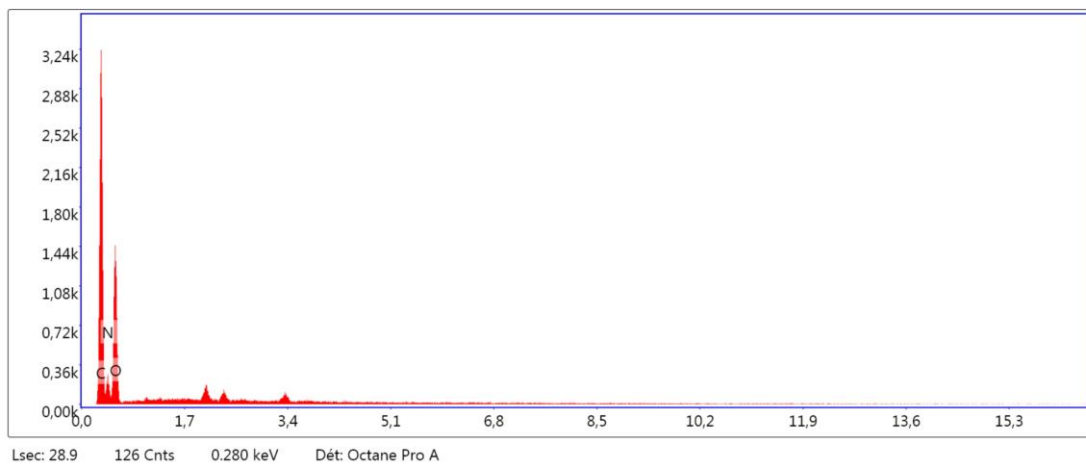
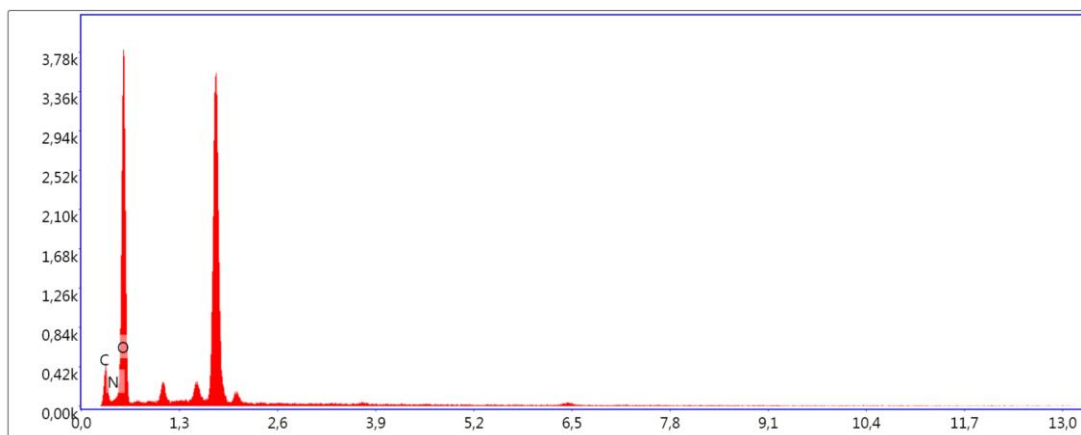


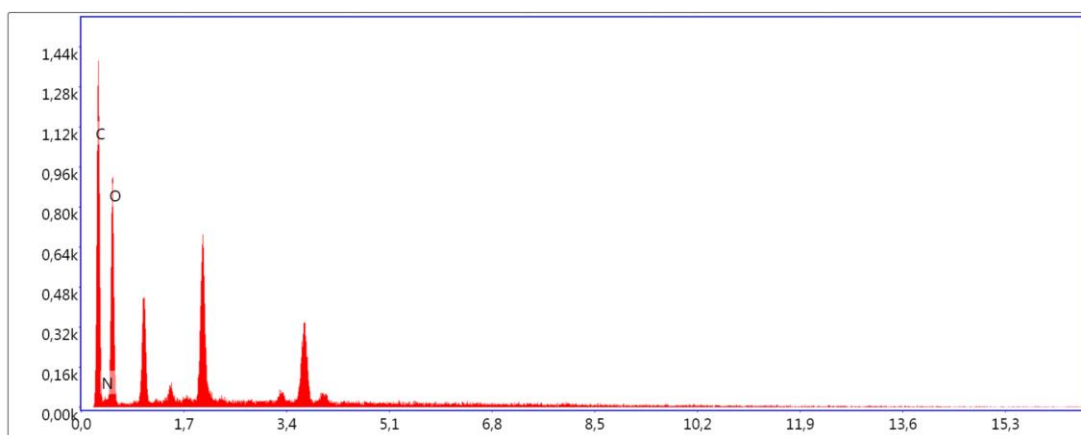
Figure 22- Spectre électronique par microanalyse EDX de la PPL

- EDX des enzymes modifiées



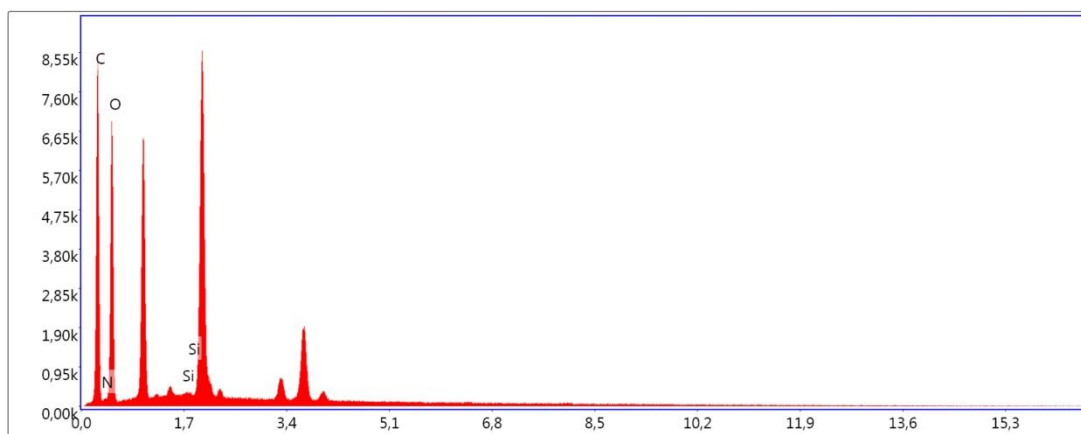
Lsec: 29.2 3.559K Cnts 1.800 keV Dét: Octane Pro A

- **Figure 23-** Spectre électronique par microanalyse EDX de la CCL Ic



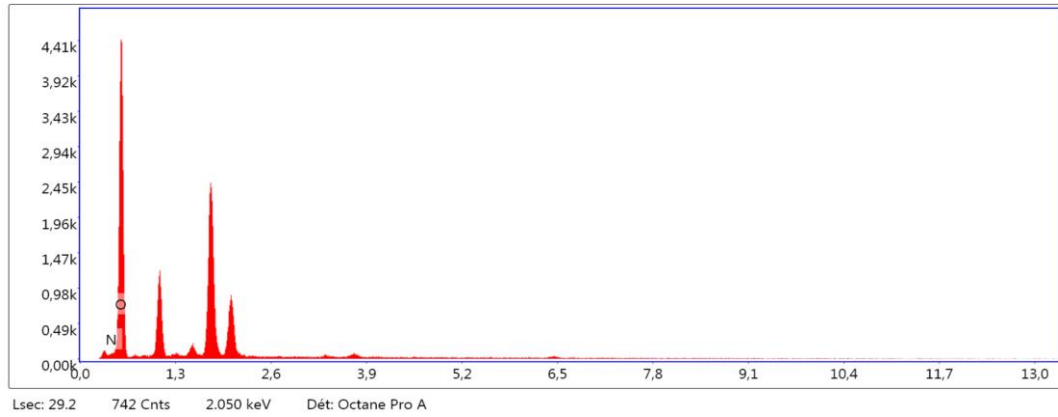
Lsec: 28.9 0 Cnts 0.000 keV Dét: Octane Pro A

- **Figure 24-** Spectre électronique par microanalyse EDX de la CCL C65



Lsec: 45.8 0 Cnts 0.000 keV Dét: Octane Pro A

- **Figure 25-** Spectre électronique par microanalyse EDX de la CCL C65



- **Figure 26-** Spectre électronique par microanalyse EDX de la PPL Ic.

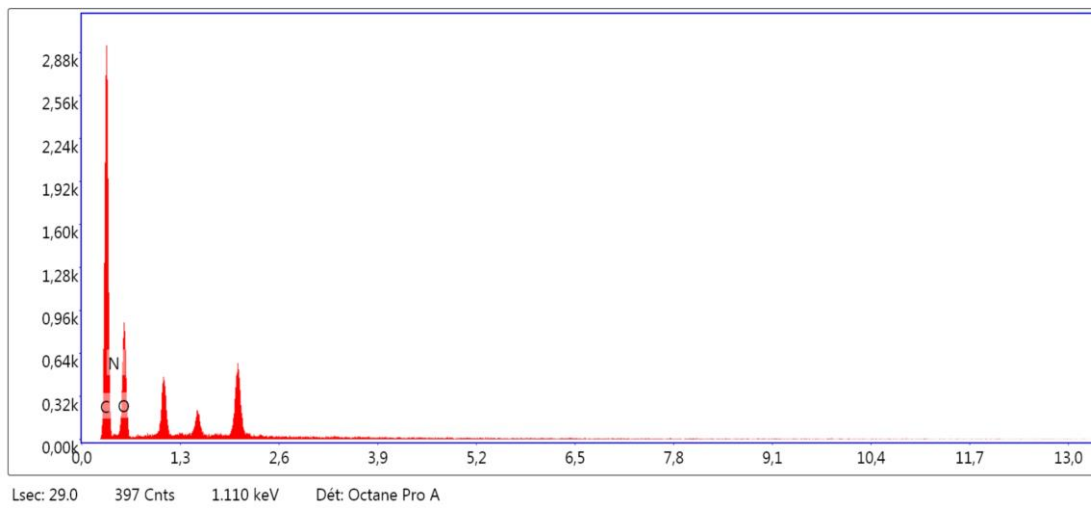


Figure 27- Spectre électronique par microanalyse EDX de PPL C65

***Chapitre III- Influence du milieu réactionnel
sur l'acylation enzymatique du D-glucose.
Etude de l'effet de solvant***

I. Introduction

Un solvant approprié est essentiel pour la synthèse des esters de sucre catalysée par les lipases^{316,317,318}. Le solvant doit pouvoir dissoudre des quantités suffisantes des deux substrats lors de la réaction d'estérification enzymatique. Le problème associé à cette étude est donc de trouver un compromis pour que le solvant solubilise à la fois le sucre (polaire) et l'acide gras (apolaire). De plus il ne doit pas compromettre la stabilité de l'enzyme et son activité.

Dans ce chapitre la réaction d'estérification est effectuée dans un premier temps dans des solvants organiques avec différentes polarités. Les liquides ioniques sont ensuite examinés pour remplacer les solvants organiques³¹⁹. Ils constituent en effet une nouvelle classe de solvants offrant une opportunité pour une chimie plus propre.

L'addition d'un co-solvant peut aider à améliorer la solubilité et par conséquent la conversion³²⁰. En conséquence, nous avons choisi le DMSO, qui est un solvant très polaire et qui peut complètement dissoudre l' $\alpha(+)$ D-glucose.

II. Influence de la solubilité sur la réaction d'estérification

1. Test de solubilité

Afin de comprendre la solubilité du sucre et son importance dans la synthèse, différents types de solvants avec différentes polarités ont été testés³²¹. A savoir, des solvants organiques : le tétrahydrofurane (THF), le 2-méthylbutan-2-ol (2M2B), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthylméthylcétone (EMC) ; des liquides ioniques imidazolium : le 1-butyl-3-méthyl-imidazolium tétrafluoroborate (LI1) et le 1-éthyl-3-méthyl-imidazolium tétrafluoroborate (LI2),

Le tableau 21 donne la solubilité des solvants utilisés lors de l'estérification enzymatique du D-glucose.

³¹⁶ M. K. Walsh, R. A. Bombyk, A. Wagh, A. Bingham, L. M. Berreau, Synthesis of lactose monolaurate as influenced by various lipases and solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 60, 171.

³¹⁷ T. Kobayashi, Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media, *Biotechnology Letters*. **2011**, 33, 1911.

³¹⁸ Z. Yang, Z.-L. Huang, Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids, *Catalysis Science & Technology*. **2012**, 2, 1767.

³¹⁹ L. Xiao-Sheng, W. Qing, H. Ze-Lin, C. Yu-Zheng, J. Peter. Z. Hallingc, Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology. *Process Biochemistry*, **2015**, 50, 1852.

³²⁰ A. Ghanem, Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1721–54.

³²¹ L. Xiao-Sheng, W. Qing, H. Ze-Lin, C. Yu-Zheng, J. Peter. Z. Hallingc, Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology. *Process Biochemistry*, **2015**, 50, 1852.

Tableau 21- Solubilité du D-glucose.

Solvants	LogP (pH=7, 20°C) (ECHA)	Solubilité (100mg/2ml)
DMSO	-1,35	Très bonne
EMC	0,29	Bonne
THF	0,52	Bonne
2M2B	0,89	Mauvaise
LI1	4,13	Mauvaise
LI2	5,06	Mauvaise

ECHA: European Chemicals Agency.

Les résultats du test de solubilité du D-glucose montrent que le meilleur solvant qui permet la dissolution quasiment complète du sucre est le DMSO. Les autres solvants organiques le dissolvent plus ou moins bien (Tableau 21).

La solubilité du sucre dans les liquides ioniques n'est pas bonne, cependant ces solvants sont souhaitables en synthèse enzymatique car ils n'affectent généralement pas l'activité catalytique de l'enzyme.

III. Influence du milieu réactionnel

Les réactions sont d'abord effectuées en milieu solvant organique seul, puis en milieu liquide ionique. Afin d'optimiser encore la conversion du sucre, nous avons introduit dans le milieu réactionnel une quantité adéquate de DMSO. Une étude cinétique est menée avec différentes quantités de ce solvant polaire : (solvant /DMSO) : (1ml/10 μ l, 1ml/20 μ l, 1ml/30 μ l, 1ml/40 μ l, 1ml/50 μ l, 1ml/60 μ l, 1ml/70 μ l, 1ml/80 μ l, 1ml/90 μ l, 1ml/100 μ l).

Les résultats préliminaires de cette étude montrent que le meilleur rapport est (v/v) : (1ml/20 μ l) et (1ml/50 μ l). Ceci est confirmé par la littérature³²². Les conversions obtenues avec les autres rapports étudiés ne sont pas concluantes et ne sont donc pas rapportés.

Les résultats obtenus sont illustrés sur les tableaux qui suivent.

³²² X.Sh. Lina, Q. Wenb, Z.L. Huang, C. Yu-Zheng, J. Peter. Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surfacemethodology. *Process Biochemistry*. **2015**, 50, 1852.

1. Résultats**a. Cas de la CCL Ic****i. Réactions en milieu solvant seul**

Les résultats obtenus pour l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du glucose avec les différents solvants sont illustrés sur le tableau suivant.

Tableau 22- Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la CCL Ic.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC	0	11	19	45
THF	14	24,5	35,71	40
2M2B	0	5	9,5	20
LI1	16,66	33,33	41,66	43
LI2	8,2	25	36,5	40,5

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 \acute{e} q Al, 30 mg CCL Ic, 30mg TM, T°=60°C.

En milieu organique ou sels fondus en présence de la CCL Ic, les conversions obtenues sont de l'ordre de 40% pour tous les solvants. Dans le 2M2B cette lipase fonctionne moins bien (C=20%). Ceci peut être dû à la polarité de ce solvant qui affecte la solubilité du sucre.

ii. Influence du co-solvant

Afin d'améliorer la solubilité du sucre de départ, différentes quantités de DMSO sont introduites dans le milieu réactionnel.

Tableau 23- Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la CCL Ic.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC/ DMSO (1 ml: 20µl)	3	17	20	35
EMC/ DMSO (1 ml: 50µl)	14,3	21,42	28,6	47,2
THF/ DMSO (1 ml: 20µl)	10	25	37	39
THF/ DMSO (1 ml: 50µl)	21,42	28	39,57	41
2M2B/DMSO (1 ml: 20µl)	0	8	8	16,5
2M2B/DMSO (1 ml: 50µl)	0	9	11,7	25,2
LI1/ DMSO (1 ml: 20µl)	12	29,50	40	44,20
LI1/ DMSO (1 ml: 50µl)	17	39,16	42,3	50
LI2/ DMSO (1 ml: 20µl)	6,8	25,5	35	41
LI2/ DMSO (1 ml: 50µl)	9,5	27,8	38,2	45,5

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 éq Al, 30 mg CCL Ic, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$.

Par ajout du DMSO avec un rapport de (1ml solvant/50µl DMSO) la conversion atteint 50 % dans le LI1 et 45,5 % dans le LI2.

On n'observe pas de changements significatifs dans la conversion lors de la réaction d'estérification enzymatique dans les autres solvants par ajout du même co-solvants.

b. Cas de la CCL Is

i. Réactions en milieu solvant seul

Les résultats obtenus pour l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du glucose avec les différents solvants sont illustrés sur le tableau suivant.

Tableau 24- Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la CCL Is.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC	0	17,5	21	21,50
THF	10,2	13	24,71	34
2M2B	0	4,6	8,9	17,5
LI1	12,25	20,20	30,50	36
LI2	8,2	15,7	25,3	31

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 éq Al, 30 mg CCL Is, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$.

En présence de la CCL Is, en milieu organique la meilleure conversion est observée dans le THF. En milieu sel fond, les conversions obtenues sont de l'ordre de 36% et 31% respectivement pour LI1 et LI2.

ii. Influence du co-solvant

Afin d'améliorer la solubilité du sucre de départ, différentes portions de DMSO sont introduites dans le milieu réactionnel.

En comparaison avec les solvants seuls et par ajout du DMSO avec un rapport de (1ml/50 μ l), (solvants/DMSO), la conversion atteint 39% dans l'EMC et 42,5 % dans le LI1.

On n'observe pas de changements significatifs dans la conversion lors de la réaction d'estérification enzymatique dans les autres solvants par ajout du même co-solvants.

Tableau 25- Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la CCL Is.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC/ DMSO (1 ml: 20 μ l)	5	15	22	30
EMC/ DMSO (1 ml: 50 μ l)	3,15	21,5	27,77	39
THF/ DMSO (1 ml: 20 μ l)	9	16,50	23,5	28,5
THF/ DMSO (1 ml: 50 μ l)	17,0	20,3	30	34,5
2M2B/DMSO (1 ml: 20 μ l)	0	5	10	20
2M2B/DMSO (1 ml: 50 μ l)	2,20	5,0	12,4	23
LI1/ DMSO (1 ml: 20 μ l)	13,3	20	35	37,0
LI1/ DMSO (1 ml: 50 μ l)	16,60	23,2	38,30	42,5
LI2/ DMSO (1 ml: 20 μ l)	10,1	19,0	28,2	33
LI2/ DMSO (1 ml: 50 μ l)	12	19,2	32	38

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 \acute{e} q Al, 30 mg CCL Is, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$.

L'étude de l'effet du solvant sur la réaction d'estérification catalysée par la CCL Is indique que la lipase fonctionne mieux dans le LI1 et le THF.

L'effet de l'ajout du co-solvant a un effet positif sur la solubilité du sucre.

c. Cas de la PPL Ic

i. Réactions en milieu solvant seul

Les résultats obtenus pour l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du glucose avec les différents solvants sont illustrés sur le tableau suivant.

Tableau 26- Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la PPL Ic.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC	0	22	20	20
THF	5	5	8,75	11,0
2M2B	2	5,70	10,1	20,0
LI 1	0	12,5	18,75	25,0
LI 2	3	11,5	15,8	23

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 éq Al, 30 mg PPL Ic, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$.

En présence de la PPL Ic, l'avancement des réactions enzymatique reste faible en milieu organique ou en milieu liquide ionique. La meilleure conversion observée est dans le LI1 (25%).

i. Influence du co-solvant

Afin d'améliorer la solubilité du sucre de départ, différentes portions de DMSO sont introduites dans le milieu réactionnel.

Tableau 27- Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la PPL Ic.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC/ DMSO (1 ml: 20µl)	5	18	20	21,5
EMC/ DMSO (1 ml: 50µl)	5,3	20	24	23,5
THF/ DMSO (1 ml: 20µl)	0	5	10	18,3
THF/ DMSO (1 ml: 50µl)	5	10,75	12	24
2M2B/DMSO (1 ml: 20µl)	0	0	8	13
2M2B/DMSO (1 ml: 50µl)	2	5,70	10,1	22
LI1/ DMSO (1 ml: 20µl)	5	10,66	19	28,5
LI1/ DMSO (1 ml: 50µl)	0	6,25	19,5	30,5
LI2/ DMSO (1 ml: 20µl)	0	12	16,2	24,0
LI2/ DMSO (1 ml: 50µl)	3,2	12	18	25,5

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 éq Al, 30 mg PPL Ic, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$.

En comparaison avec les solvants seuls et par ajout du DMSO avec un rapport de (1ml / 50µl) (solvants/DMSO), les conversions obtenues sont 24% dans le THF et 30,5 % dans le LI1.

On n'observe pas de changements significatifs dans la conversion lors de la réaction d'estérification enzymatique dans les autres solvants par ajout du même co-solvant.

d. Cas de la PPL Is

i. Réactions en milieu solvant seul

Les résultats obtenus pour l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du glucose avec les différents solvants sont illustrés sur le tableau suivant.

Tableau 28- Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la PPL Is.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC	0	18	21	20
THF	5	3	7,2	10
2M2B	0	2,7	6,8	16
LI1	3,5	10,1	15	23,5
LI2	3	7,5	13	20,5

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 éq Al, 30 mg PPL Is, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$.

En présence de la PPL Is, l'avancement des réactions enzymatique reste toujours faible en milieu organique ou en milieu liquide ionique. La meilleure conversion observée est dans le LI1 (23,5%).

ii. Influence du co-solvant

Afin d'améliorer la solubilité du sucre de départ, différentes quantités de DMSO sont introduites dans le milieu réactionnel.

Tableau 29- Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la PPL Is.

solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC/ DMSO (1 ml: 20µl)	0	9	13,50	16,5
EMC/ DMSO (1 ml: 50µl)	0	17,3	19,2	23
THF/ DMSO (1 ml: 20µl)	0	3	6,5	9,5
THF/ DMSO (1 ml: 50µl)	5	7	9,3	11,5
2M2B/DMSO (1 ml: 20µl)	0	0	9	16
2M2B/DMSO (1 ml: 50µl)	0	4,1	9	22,5
LI1/ DMSO (1 ml: 20µl)	0	5	16,5	24,0
LI1/ DMSO (1 ml: 50µl)	4,3	11,2	12,2	28,5
LI2/ DMSO (1 ml: 20µl)	3	8,2	14	20,5
LI2/ DMSO (1 ml: 50µl)	2,5	10	14,5	23

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 éq Al, 30 mg PPL Is, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$.

En comparaison avec les solvants seuls et par ajout du DMSO avec un rapport de (1ml / 50µl) (solvant/DMSO), les conversions obtenues sont 21,5% dans le THF et 28,5 % dans le LI1.

On n'observe pas de changements significatifs dans la conversion lors de la réaction d'estérification enzymatique dans les autres solvants par ajout du même co-solvants.

e. Cas de la PPL C65

i. Réactions en milieu solvant seul

Les résultats obtenus pour l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du glucose avec les différents solvants sont illustrés sur le tableau suivant.

Tableau 30- Influence du solvant sur la conversion dans le cas de la PPL C65.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC	10	26,70	36	50
THF	10	20	32	45
2M2B	10	18	30	40,5
ILS1	5	28	34	43,5
ILS2	8	22	32	42

Conditions réactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 $\acute{e}q$ Al, 30 mg PPL C65, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}C$.

En milieu organique la PPL C65 donne un maximum de conversion dans l'EMC de 50%. En milieu sels fondus avec la m\^eme lipase, les conversions obtenues sont de l'ordre de 40% pour tous les solvants.

ii. Influence du co-solvant

Afin d'am\^eliorer la solubilit\^e du sucre de d\^epart, diff\^erentes portions de DMSO sont introduites dans le milieu r\^eactionnel.

En comparaison avec les solvants seuls et par ajout du DMSO avec un rapport de (1ml / 50 μ l) (solvant/DMSO), les conversions obtenues pour les LIs sont 54,5% et 50,5 % respectivement pour LI1 et LI2.

Tableau 31- Influence du co-solvant sur la conversion dans le cas de la PPL C65.

Solvant	Conversion %			
	2h	24h	48h	72h
EMC/ DMSO (1 ml: 50 μ l)	15	20	38	51,5
EMC/ DMSO (1 ml: 20 μ l)	5	18	25	41,2
THF/ DMSO (1 ml: 50 μ l)	10	22	22	45,5
THF/ DMSO (1 ml: 20 μ l)	8	19	28	42
2M2B/DMSO (1 ml: 20 μ l)	8	10	20	35
2M2B/DMSO (1 ml: 50 μ l)	5	20	28	40,5
LI1/ DMSO (1 ml: 20 μ l)	18	30	40	48
LI1/ DMSO (1 ml: 50 μ l)	20	35	45,5	54,5
LI2/ DMSO (1 ml: 20 μ l)	10	26	36	43
LI2/ DMSO (1 ml: 50 μ l)	15	29	40,5	50,5

Conditions r\^eactionnelles: 1 mmol α -(+)-D-glucose, 1 $\acute{e}q$ Al, 30 mg PPL C65, 30mg TM, $T^{\circ}=60^{\circ}C$.

On n'observe pas de changements significatifs dans la conversion lors de la réaction d'estérification enzymatique dans les autres solvants par ajout du même co-solvants.

III. Discussion

La structure 3D catalytiquement active des enzymes dépend de nombreuses liaisons hydrogène, effets hydrophobes, forces de Van der Waals et interactions dipolaires, qui se produisent dans la molécule de la protéine et entre la protéine et le solvant. Ainsi, les conditions préalables à la catalyse homogène non aqueuse enzymatique sont la solubilité et la stabilité des biocatalyseurs dans le solvant organique utilisé

D'après les tableaux ci-dessus, une reproductibilité concernant les résultats obtenus avec LI1 et L'EMC est observée. Une variation de conversion dépendant de la nature du milieu et de la lipase utilisés est observée.

- Les meilleures conversions sont celles dans les solvants organiques seuls soit 50% et 45% avec la PPL C65 et la CCL Ic respectivement dans l'EMC au bout 72h.
- Dans les LIs la meilleure conversion obtenue est 43.5% avec la PPL C65.

En comparant les résultats obtenus dans les différents cas étudiés, on observe que le milieu réactionnel influe sur la conversion de manière significative.

Les conversions obtenues avec les solvants organiques dépendent de la nature du solvant (polarité, capacité de dénaturation)³²³. Le statut de l'enzyme (modifiée ou non) affecte la conversion en produit de l'estérification catalysée par la lipase ; les conversions en esters sont augmentées lorsque les réactions sont effectuées dans des solvants moyennement polaires. Des solvants polaires ont un effet significatif sur la solubilité des substrats, cependant ils peuvent déformer la couche aqueuse constitutive de la lipase, provoquant éventuellement une dénaturation de l'enzyme^{324,325}.

En milieu organique, le solvant quel que soit sa polarité peut restreindre la flexibilité conformationnelle de l'enzyme en modifiant la couche d'eau nécessaire à son activité et dénaturer ainsi sa microstructure. Ceci peut conduire à une dénaturation réversible ou irréversible de la lipase³²⁶. Il a également été constaté que les différentes lipases se

³²³ S. Soutani, J-M. Engasser, M. Ghoul. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**, 11, 31.

³²⁴ S. Hari Krishna, N. G. Karanth, Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews*. **2002**, 44, 499.

³²⁵ M. M. Soumanou, U. T. Bornscheuer. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and microbial technology*, **2003**, 33, 97.

³²⁶ S. Torres, G. R. Castro. Non-aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems. *Food Technol Biotechnol*, **2004**, 42, 271.

comportent différemment dans différents milieux organiques avec différents niveaux de résistance dans différents systèmes de réaction³²⁷.

Dans un souci de chimie verte et afin d'optimiser le fonctionnement des lipases modifiées, les LIs sont utilisés à la place des solvants organiques.

Nous avons observé dans un premier temps que le remplacement des solvants organiques par les liquides ioniques n'a pas une influence significative sur l'avancement de la réaction, ce avec toutes les lipases. Les conversions obtenues sont probablement dues à la faible solubilité du sucre et des substrats d'acyle à longue chaîne dans les liquides ioniques imidazolium (Tableau solubilité) conduisant à un système à deux phases qui diminue la disponibilité des substrats pour l'enzyme et réduit ainsi l'acylation biocatalysée.

Au-delà de ces résultats, nous avons pensé qu'une meilleure conversion serait obtenue si les substrats étaient entièrement solubles dans le milieu. Pour cela nous avons introduit une quantité minimale d'un solvant polaire, le DMSO, afin d'assurer la solubilité du sucre et le bon fonctionnement de la lipase. Une étude cinétique est mise en place afin d'évaluer le meilleur rapport de solvant/DMSO à utiliser.

Dans un premier temps un screening de quantité de DMSO est effectué. (solvant/DMSO) : (1ml/10µl, 1ml/20µl, 1ml/30µl, 1ml/40µl, 1ml/50µl, 1ml/60µl, 1ml/70µl, 1ml/80µl, 1ml/90µl, 1ml/100µl). Cependant seules les proportions (1ml/20µl, 1ml/50µl) fournissent de bonnes conversions.

L'ajout de DMSO avec des portions (solvant/DMSO) : (1ml/20µl, 1ml/50µl) augmente considérablement la conversion, dans les solvants organiques. La meilleure conversion obtenue est 51,5% dans (l'EMC/DMSO) : (1ml/50µl) et 54.5% dans (LI1/DMSO) : (1ml/50µl) avec la PPL C65.

Dans le cas de la CCL Is, PPL Ic, PPL Is les conversions obtenues dans les liquides ioniques et l'EMC sont assez rapprochées.

En comparant LI1 et LI2 en présence de la même lipase, la viscosité élevée du milieu réactionnel peut augmenter la limitation du transfert de masse, comme observé pour la benzoylation de la floxuridine catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) dans THF/[Bmim][PF₆] où 98 % de conversion sont atteints en 82 h avec 25 % de [Bmim][PF₆] tandis que 5 % de [Bmim][PF₆] permettent plus de 99 % de conversion après 48,5 h³²⁸.

³²⁷ J. Yu, J. Zhang, A. Zhao, X. Ma, Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. *Catalysis Communications*, **2008**,9, 1369.

³²⁸ N. Li, D. Ma, M. H. Zong. Enhancing the activity and regioselectivity of lipases for 3'-benzoylation of floxuridine and its analogs by using ionic liquid-containing systems. *Journal of biotechnology*, **2008**, 133, 103.

Ceci est vérifié pour LI1 (C= 54,5%) qui est moins visqueux et donc plus hydrophobe que LI2 (C=50,5%). La lipase est moins affectée dans le premier cas. En termes d'activité et de stabilité, les enzymes peuvent préférer les LIs hydrophobes par rapport aux LIs hydrophiles. En effet, le milieu hydrophobe a pu protéger la couche d'eau essentielle autour des molécules de protéines, ce qui augmente la stabilité de l'enzyme vis-à-vis de l'environnement dénaturant et diminue les interactions directes protéine-ion³²⁹. La conformation des protéines sera également maintenue active puisque les LI hydrophobes construisent une matrice ionique pour préserver les molécules d'enzymes dans des microenvironnements tolérables³³⁰.

³²⁹ A.J. Carmichael, K.R. Seddon, Polarity study of some 1-alkyl-3-methylimidazolium ambient-temperature ionic liquids with the solvatochromic dye, Nile Red. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **2000**, 13, 591.

³³⁰ L. Cao, U.T. Bornscheuer, R.D Schmid. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **1999**, 6, 85.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre une approche concernant la solubilité des sucres, un problème majeur rencontré lors de la synthèse d'ester de sucre est traitée. Pour cela, nous avons mené les réactions dans des solvants organiques différentes tels que le THF, le 2M2B et l'EMC. Des essais ont été réalisés avec les liquides ioniques imidazolium (LI1 et LI2). Nous avons également fait une combinaison avec le DMSO comme co-solvant.

Avant l'ajout du co-solvant, le meilleur taux de conversion est obtenu dans l'EMC dans le cas de la CCL Ic et la PPL C65.

Dans le cas de la CCL Is, la PPL Ic et la PPL Is les meilleures conversions sont données dans les liquides ioniques et restent proches de celles dans l'EMC.

L'ajout du co-solvant (DMSO) entraîne une baisse de la conversion dans le cas de l'EMC, THF, 2M2B, cela s'explique par l'augmentation de la polarité du milieu, ce qui dénature l'enzyme bien qu'il permette de bien dissoudre les substrats.

Dans le cas des LIs, le DMSO améliorent la solubilité des réactifs sans altérer la structure de l'enzyme donc le milieu est moins polaire que dans le cas des réactions précédentes.

On conclut que l'ajout de DMSO avec différentes proportions (20 μ l et 50 μ l) comme co-solvant avec les liquides ioniques est plus efficace car le sucre a été dissous après une courte période d'agitation. Cependant, cette quantité reste faible pour conserver l'hydrophobie du milieu afin de maintenir l'activité enzymatique. En effet, le milieu hydrophobe est essentiel pour protéger la couche d'eau autour des molécules de protéines qui augmentent la stabilité de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation. En termes d'activité et de stabilité, la conversion augmente à mesure que le rapport du DMSO augmente raisonnablement.

Les résultats préliminaires de cette étude montrent que la réaction avance mieux autant en milieu liquide ionique qu'organique. Cela peut être expliqué par la solubilité du substrat et la polarité du milieu, Ces facteurs ont été améliorés en ajoutant le DMSO.

Au regard de ces résultats, la meilleure conversion observée est de 54,5 % en présence de la CCL C65 à 60°C au bout de 72 h dans le (LI1/DMSO) : (1ml/50 μ l).

Conclusion générale

Cette étude se rapporte à l'optimisation de la réaction d'estérification enzymatique du D-glucopyranose catalysée par la lipase *Pancréatique de porc* et la lipase de *Candida cylindracea* modifiées.

Une étude préliminaire sur l'acylation enzymatique de l' α -(+)-D glucose en présence de la lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) est effectuée. Cette mise au point a montré que la conversion du sucre de départ en ester est influencée par chaque facteur mis en jeu (le solvant, la proportion et la nature de l'agent acylant, la température, le tamis moléculaire et la quantité de la lipase). Ces paramètres réactionnels sont optimisés pour aboutir aux meilleures conversions. Ils sont utilisés dans la suite de notre étude, à savoir : rapport molaire (1/1 : Glc/AA), (30 mg) d'enzyme et (30 mg) de tamis moléculaire sont nécessaires pour une conversion maximale dans l'EMC, à 60°C au bout de 72h (C = 52,25 %).

Dans un but d'optimisation, des lipases peu onéreuses telles que la lipase *Pancréatique de porc* et la lipase de *Candida cylindracea* sont modifiées par immobilisation sur un support adéquat. Les techniques utilisées sont l'immobilisation sur un support solide tels que la célite et la silice ou l'encapsulation par des tensioactifs non ioniques tels que les spans 80, 85, 60 et 65. Ces nouvelles lipases sont caractérisées par les techniques de la microscopie électronique à balayage associée à la microanalyse par énergie dispersive de rayon X et de la diffraction des rayons X. Les microgrammes des nouvelles lipases comparés avec ceux des lipases libres et des supports, nous ont permis de caractériser les nouveaux biocatalyseurs et de prouver l'intégration des lipases sur les supports choisis.

Ces lipases sont par la suite testées dans la réaction de synthèse enzymatique du laurate de glucose à potentialité tensioactive afin d'évaluer leurs nouvelles activités.

L'immobilisation de la PPL et de la CCL a permis d'optimiser les conversions par rapport à celles obtenues avec les lipases libres. Dans le cas de la lipase de *Candida cylindracea* immobilisée sur la célite une activité triplement supérieure par rapport à l'activité de la lipase libre est observée. La lipase *Pancréatique de porc* immobilisée présente une activité catalytique faible, une désorption doit probablement avoir lieu à un moment ou à un autre. L'encapsulation des lipases fonctionne donc mieux que celle de l'immobilisation.

La lipase *Pancréatique de porc* modifiée par les spans présente une activité qui est quatre fois supérieure à l'activité de la lipase libre.

La lipase de *Candida cylindracea* enrobée par les spans 80 et 85, présente une activité catalytique faible. Son activité est cependant améliorée par encapsulation avec les spans 60 et 65. Elle est multipliée par quatre dans le cas du span 65.

Les résultats obtenus au cours de ce travail démontrent que les lipases modifiées sont plus actives que celles libres.

La stabilité thermique de ces enzymes est également augmentée par rapport à leurs températures optimums de fonctionnement qui se situent aux alentours de 40°C.

L'étude comparative de l'activité catalytique des enzymes modifiées avec la CAL B, une enzyme immobilisée disponible dans le commerce, montre que les lipases modifiées présentent des activités catalytiques comparables avec celle obtenue en présence de CAL B (PPL C65=50%, CCL C65=50%).

La solubilité des sucres dans les solvants organiques est un problème majeur dans la chimie des sucres. Une étude de solvant est entreprise afin d'améliorer la dissolution du sucre dans le solvant et par conséquent sa conversion.

Des solvants organiques tels que le THF, le 2M2B et l'EMC sont testés. Les conversions obtenues sont variables et n'excède pas les 20% (EMC) avec la CCL Is, la PPL Ic, la PPL Is dans les trois solvants utilisés.

- Avec la CCL IC ; C= 40% (THF), C= 20% (2M2B), C= 45% (EMC).
- Avec la PPL C65 ; C= 45% (THF), C= 40.5% (2M2B), C= 50% (EMC).

Avant l'ajout du co-solvant, la meilleure conversion est obtenu dans l'EMC avec la CCL Ic et la PPL C65.

Des essais ont été réalisés avec les liquides ioniques imidazolium, dans un souci de chimie verte. Les conversions obtenues sont :

- Avec la CCL IC ; C= 43% (LI 1), C= 40,5% (LI 2).
- Avec la CCL Is ; C= 36% (LI 1), C= 31% (LI 2).
- Avec la PPL Ic ; C= 25% (LI 1), C= 23% (LI 2).
- Avec la PPL Is ; C= 23,5% (LI 1), C= 20,5% (LI 2).
- Avec la PPL C65 ; C= 43,5% (LI 1), C= 42% (LI 2).

Dans le cas de la CCL Is, la PPL Ic et la PPL Is les meilleures conversions sont celles dans les liquides ioniques et restent proches de celles dans l'EMC.

Le DMSO (1ml/50µl) est par la suite ajouté comme co-solvant afin d'améliorer l'avancement de la réaction d'estérification. Les conversions améliorées sont :

- Avec la CCL IC ; C=41,5% (THF/DMSO), C=47% (EMC/DMSO), C= 50% (LI 1/DMSO),

C= 45.5% (LI 2/DMSO).

- Avec la PPL C65 ; C=45,5% dans THF/DMSO, C=40.5% dans 2M2B/DMSO, C=51,5% dans EMC/DMSO, C=54,5% dans LI 1/DMSO, C=50,5% dans LI 2/DMSO) (1ml/50µl).

Le sucre est mieux dissous (visuel) dans le cas de l'EMC, THF, 2M2B, mais les conversions ne sont pas améliorées, ceci est probablement dû à la polarité du DMSO ajoutée à celle du solvant organique qui doit probablement jouer un rôle dans l'inhibition de la lipase.

L'ajout du DMSO en faible quantité (20µl et 50µl) dans le cas des liquides ioniques est plus efficace car le sucre a été dissous après une courte période d'agitation (visuel). Cependant, cette quantité reste faible pour conserver l'hydrophobie du milieu afin de maintenir l'activité enzymatique. Le milieu est moins polaire que dans le cas des solvants organiques. En effet, le milieu hydrophobe est essentiel pour protéger la couche d'eau autour des molécules de protéines qui augmentent la stabilité de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation. La meilleure conversion (54.5%) est celle observée en présence de la PPL C65 à 60°C au bout de 72 h dans le (LI1/DMSO) : (1ml/50µl).

Les résultats de cette étude sont applicables dans le domaine de la glycochimie. En effet les nouvelles lipases synthétisées à partir des lipases libres, matières premières peu coûteuses se sont avérées très actives et présentent des activités enzymatiques similaires à celles de la CAL B, la lipase la plus utilisée dans la synthèse d'esters de sucres³³¹.

En perspectives, cette étude sera poursuivie en examinant :

- Des sucres tels que le rhamnose ou le xylose afin de généraliser l'étude et de l'étendre à d'autres oses.
- D'autres supports pour les lipases étudiées.
- D'autres techniques d'immobilisation des enzymes.

³³¹ P. Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. M. Papamichael, Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology advances*, **2013**, *31*, 1846.

Partie expérimentale

I. Généralités et appareillages

1. Solvants et réactifs commerciaux

Les solvants employés possèdent un degré de pureté « analytique » et sont utilisés sans purification préalable. Les produits commerciaux (réactifs, solvants, enzyme) employés lors des synthèses organiques proviennent essentiellement des sociétés Sigma-Aldrich, Fluka et Acros.

2. Méthodes chromatographiques

Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (Merck Art 5554 DC Alufolien Kieselgel 60, F-254) révélées par un spray d'une solution méthanolique d'H₂SO₄ à 10% suivie du brûlage de la plaque. Les chromatographies sur gel de silice ont été effectuées sur silice (0.063-0.200 mm, 70-230 mesh).

3. Analyse par Résonance magnétique nucléaire RMN

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil BRUKER de type AC 250 (¹H : 250 MHz, ¹³C : 62,9 MHz) dans le DMSO-d₆.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm), le TMS étant pris comme référence interne. Les constantes (J) sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux est explicitée en utilisant les abréviations suivantes: singulet (s), doublet (d), triplet (t), multiplet ou massif (m), doublet de doublet (dd), doublet de triplet (dt).

4. Spectroscopie infrarouges (IR)

Les spectres 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.

5. Diffraction des Rayons X (DRX)

Les analyses de diffraction des rayons X ont été effectuées sur un appareil de type ULTIMA IV Rigaku en utilisant la raie K α_1 du cuivre de longueur d'onde $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. Les diffractogrammes ont été enregistrés de 10° à 100° (2 θ) avec un pas de 0,020° et un temps de pas de 4 s (vitesse de balayage 0,15°min⁻¹).

6. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La morphologie de surface des lipases modifiées a été caractérisée par microscopie électronique à balayage (MEB). L'analyse a été réalisée sur un appareil FEI QUANTA 250 SEM avec une tension d'accélération de 200 V à 30 kV, couplé à un système de micro-analyse Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy avec sélection d'énergie (EDX) et avec un détecteur SDD (BRUKER AXS-30mm²).

II. Protocoles opératoires

1. Immobilisation de la lipase Pancréatique de porc (PPL) et de la lipase de Candida cylindracea (CCL)

a. Préparation des solutions mères

Solution (a) : Solution 0,2 M de phosphate monosodique ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) : 27,8 sont dissout dans 1000 ml d'eau distillée.

Solution (b) : Solution 0,2 M de phosphate de sodium disodique hexahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) : 52,65 g sont dissout dans 1000 ml d'eau distillée.

b. Préparation des solutions tampons (pH = 8 ; 0.2 M)

Mélanger 5.3 ml de solution (a) et 94.7 ml de la solution (b).

c. Protocole opératoire de l'immobilisation

Dans un ballon sont dissous 0.5g de lipase et 80 mg de célite dans 250 ml de solution tampon (pH= 8 ; 0,2 M) sous agitation pendant 30 minutes à 4°C, puis 20 ml d'acétone froide (-15°C) sont ajoutés. Après 2 heures d'agitation, la réaction est arrêtée, l'enzyme filtrée sous vide et lavée deux à trois fois avec de l'acétone. La lipase est ensuite séchée dans un dessiccateur sous vide, puis conservée à -18°C.

	m_{exp} (mg)	Rdt_{im} (%)
CCL Ic	290	58
CCL Is	200	40
PPL Ic	225	45
PPL Is	200	40

2. Enrobage de la lipase *Pancréatique de porc* (PPL) et de la lipase de *Candida cylindracea* (CCL)

a. Protocole opératoire de l'enrobage des lipases par les tensioactifs (*Coated lipase*)

Dans un ballon de 500 ml contenant 250 ml d'une solution tampon 0,1M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaHPO}_4$, pH=6,9) on dissout 0.5g de lipase (CCL, PPL) puis on ajoute goutte à goutte sous agitation 0,5g de tensioactifs (span80, span85, span60, span65) dissous dans 10ml d'éthanol. A la fin de l'addition le mélange est plongé dans un bain à ultrason pendant 30min à basse température (8-10°C). Le mélange est ensuite mis dans un bain de glace (0°C) pendant 3 heures de temps.

La solution est ensuite centrifugée (10000 tour/min), pendant 30 min. La fraction solide est récupérée et ensuite séchée sous vide. On obtient une poudre jaune pâle, insoluble dans l'eau.

	m_{exp} (mg)	Rdt _{enr} (%)
<i>CCL C80</i>	150	30
<i>CCL C85</i>	90	18
<i>CCL C60</i>	100	20
<i>CCL C65</i>	125	25
<i>PPL C80</i>	175	35
<i>PPL C85</i>	50	10
<i>PPL C60</i>	90	18
<i>PPL C65</i>	100	20

3. Dosage des protéines

a. Préparation de Réactif de Bradford

Dissoudre 100 mg de la poudre du bleu de Coomassie (BBC) dans 50 ml d'éthanol à 95%. Agiter la solution pendant 2 heures, ensuite ajouter 100 ml d'acide phosphorique à 85%, compléter le volume à 1 litre par l'eau distillée. La solution résultante sera filtrée et protégée de la lumière. Le réactif est stable pendant deux semaines à 4°C.

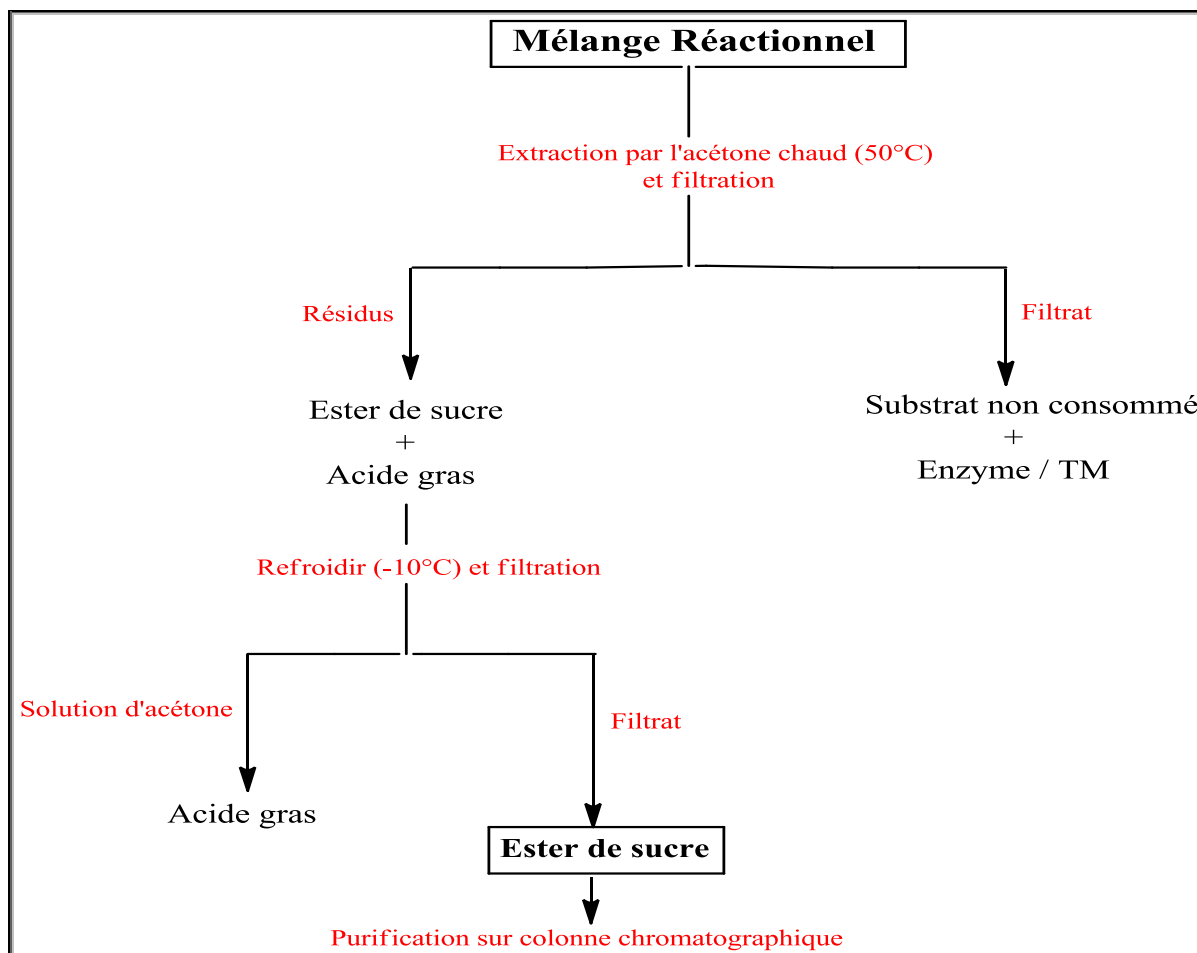
b. Mode opératoire

Prélever 0.05 ml de l'homogénat. Ajouter 2.5 ml du réactif coloré (BBC). Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de la couleur. Mesurer l'absorbance optique à 595 nm contre un blanc contenant l'eau distillée à la place de l'homogénat. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage (0 - 1 mg/ml de sérum albumine de bovin BSA).

4. Estérification enzymatique des sucres

a. Procédure générale

Le sucre (200 mg, 1,33 mmol) est dissous dans 5 ml de solvant et mis sous agitation pendant 24 heures. L'agent acylant est alors additionné. On laisse sous agitation magnétique pendant 15 mn. La lipase est ensuite ajoutée en quantité adéquate ainsi que le tamis moléculaire (4 Å) en quantité équimolaire de la lipase. Afin de contrôler la libération de l'eau dans le milieu, les tamis moléculaires sont activés pendant une nuit à haute température et laissés dans un dessiccateur avant leur utilisation. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. A la fin de la réaction, le mélange est filtré et évaporé sous pression réduite. Les esters de sucres obtenus sont purifiés suivant le protocole opératoire décrit sur le diagramme suivant.



b. Mesure de la conversion (C%)

La conversion est évaluée par titrage colorimétrique par la mesure de la quantité d'acide gras non réagissant 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 à 0.1%. Une solution de NaOH 0.1M est ensuite ajoutée goutte à goutte jusqu'à obtention d'une coloration rose.

La conversion est donnée par l'expression suivante:

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

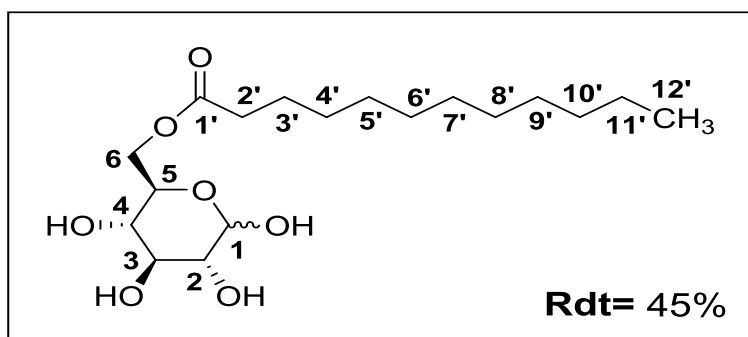
c. Caractérisation du 6-O-Dodécanoyl-D-glucopyranose

M = 362 g.mol⁻¹ [C₁₈H₃₄O₇]

R_f = 0.27 [CH₂Cl₂/MeOH: 90/10]

P_f = 146°C

Poudre blanche.



RMN¹ H (DMSO_d₆) : 0.85 (t, 6H, H-12'), 1.25 (m, 24H, H-4'-11'), 1.50 (m, 4H, H-3'), 2.27 (t, 4H, H-2'), 2.95-3.20 (m, 6H, H-4β, H-4α, H-2α, H-2β, H-3β, H-3α), 3.76 (m, 1H, H-5β), 3.98 (m, 3H, H-6αα, H-6αβ, H-5α), 4.25 (m, 3H, H-1β, H-6bα, H-6bβ), 4.55 (m, 2H, OH-4β, OH-4α), 4.78-5.20 (m, 5H, OH-2β, OH-2α, H-1α, OH-3β, OH-3α), 6.40 (d, 1H, J=2.98, OH-1α), 6.65 (d, J= 5.4, 1H, OH-1β).

RMN¹³ C (DMSO_d₆): 13.87 (C-12', CH₃), 22.01 (C-11', CH₂), 24.38 (C-3', CH₂), 28.35 (C-4', CH₂), 28.63 (C-5', C6', 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 64.36 (C-6α), 64.38 (C-6β), 69.54 (C-5α), 74.00 (C-5β), 71.05 (C-4α), 70.50 (C-4β), 73.36 (C-3α), 76.65 (C-3β), 72.69 (C-2α), 75.18 (C-2β), 92.78 (C-1α), 96.76 (C-1β).

IR: (KBr)

- O-H 3340cm^{-1} , C-H $2960\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$
- C=O (ester) 1735cm^{-1}
- C-O 1149 cm^{-1}
- -CH_2 1468 cm^{-1}