

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR - ANNABA UNIVERSITY

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Année 2017

Faculté des Sciences
Département de Chimie

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de DOCTORAT en sciences

Option : Chimie organique

THEME

Etude de l'activité et de la sélectivité des lipases dans
des milieux non conventionnels

Présentée Par:

Mr. BELAFRIEKH Abderahmane

Directeurs de Thèse : Mr. DJEGHABA Zeineddine Professeur à l'Université de Annaba

Devant le jury suivant :

Président :	Mr. FRKOUS Fouad	Professeur à l'Université de Annaba
Examineurs :	Mr. REGAINIA Zine	Professeur à l'Université de Souk Ahras
	Mr. GOUASMIA Abdelkrim	Professeur à l'Université de Tébessa
	Mr. KADRI Mekki	Professeur à l'Université de Guelma
	Mme. BOUZEMI Nassima	Professeur à l'Université de Annaba

A :
Mes parents,
Mon grand-père,
Mes frères et sœurs,
Mes amis,
Et tous ceux qui m'ont soutenu durant ces années,
Je dédie ce travail.

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du laboratoire de chimie organique appliquée (LCOA) à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba (Algérie). Une partie du travail a été faite à l'institut de chimie de la reconnaissance moléculaire (CNR) (Italie).

Tout d'abord je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur **Zeineddine Djeghaba** pour m'avoir encadré et soutenu au cours de ces travaux, pour sa disponibilité ainsi que pour son aide lors de la rédaction de cette thèse. Je tiens également à le remercier de m'avoir permis de collaborer avec des laboratoires extérieurs ce qui m'a permis d'évaluer dans des domaines variés. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé, pour tous les conseils que vous m'avez donné durant toutes les années passées au laboratoire.

Mes meilleurs remerciements s'adressent à Monsieur **Fouad Ferkous** Professeur à l'université de Annaba pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je remercie vivement Monsieur le professeur **Zine Regainia** qui me fait l'honneur d'être présent dans ce jury pour examiner et évaluer ce travail.

Je tiens à remercier également Monsieur **Abdelkrim Gouasmia** professeur à l'université de Tébessa pour avoir accepté d'être membre de ce jury et d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur **Mekki Kadri** professeur à l'université de Guelma pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce manuscrit et d'être membre de ce jury.

Je tiens à remercier vivement madame **Nassima Bouzemi** professeur à l'université de Annaba pour avoir accepté d'être membre de ce jury et d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Je voudrais adresser mes chaleureux remerciements au docteur **Francesco Secundo** à l'institut de chimie de la reconnaissance moléculaire (Italie) et au docteur **César Mateo** à l'institut de catalyse et pétrochimie (Espagne) pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes durant mes stages de courte durée.

Mes vifs remerciements vont aussi à madame **Fatiha Benamia** et à monsieur **Youcef Saihi** Maitres de conférences à l'université de Annaba, je les remercie pour leur sympathie et pour leurs précieux conseils.

J'adresse également mes remerciements à mes collègues du laboratoire et mes amis tout particulièrement, Aicha, Saoussen, Lazher, Fouad, Hakim, Fateh et Hichem. Je leur souhaite une bonne continuation.

Finalement, un grand merci tout spécial à mes chers parents qui ont toujours été là une source de réconfort et d'énergie permanente aux moments difficiles et plus particulièrement mon père, ses conseils et ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Résumé

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'utilisation des biocatalyseurs dans la synthèse organique, nous nous sommes intéressés à la mise en œuvre d'un procédé biocatalytique efficace et respectueux de l'environnement par les lipases pour la résolution énantiosélective des alcools racémiques en utilisant les ultrasons comme outil pour l'activation des réactions et des solvants verts comme milieux réactionnels. L'étude s'articule sur deux principaux axes :

Le premier a été consacré à l'étude de l'effet des ultrasons sur le comportement de différentes lipases en termes d'activité et d'énantiosélectivité dans la transestérification de quelques alcools racémiques de différentes structures avec différents donneurs d'acyles. Les expériences ont été conduites avec deux approches : ultrasons sans agitation et agitation après prétraitement de lipase par ultrasons. Les mêmes expériences ont été conduites sous agitation conventionnelle pour évaluer l'effet d'ultrasons. Les résultats ont montré un avantage des ultrasons avec les deux approches sur l'agitation conventionnelle. Par exemple la conversion a été multipliée par un facteur de 3-fois et l'énantiosélectivité de 5-fois dans la résolution du menthol par l'acétate de vinyle catalysée par la lipase de *Candida rugosa* sous l'effet des ultrasons.

Le second volet a été dédié à l'évaluation de l'effet du solvant de deux solvants respectueux de l'environnement, le 2-méthyltétrahydrofurane (MeTHF) et le cyclopentyle méthyle éther (CPME) sur l'activité enzymatique et l'énantiosélectivité d'une série des lipases commerciales et des lipases formulées par immobilisation et lyophilisation dans la résolution de quelques alcools racémiques, les réactions ont été effectuées à différentes activités de l'eau. Les résultats ont montré que l'activité des lipases dans le CPME était similaire à celle observée dans d'autres solvants organiques largement utilisés (toluène et tert-butyl méthyl éther (MTBE)), et était légèrement plus faible dans MeTHF. Cependant, pour la plupart des lipases testées, l'énantiosélectivité était plus élevée dans ces solvants verts. Par exemple, La CALB a été trouvée un biocatalyseur utile pour la résolution du sulcatol racémique dans le CPME, où une activité élevée et une énantiosélectivité ont été obtenues ($E > 400$).

Mots clés : Lipase, acylation enzymatique, énantiosélectivité, alcools racémiques, milieux non-conventionnels, ultrasons, solvants verts.

Abstract

The work presented in this thesis is in the field of biocatalysts applications in organic synthesis. The main aim of this work was achieving an efficient and eco-friendly biocatalytic process by lipases for the enantioselective resolution of racemic alcohols using ultrasound as source energy to activate reactions and green solvents as reactions media. The study focuses on two main axes :

The first one was devoted to study the effect of ultrasound on the behavior of different lipases in terms of activity and enantioselectivity in the enantioselective transesterification of some racemic secondary alcohols with different acyl donors. The experiments were conducted with two different approaches: ultrasonic irradiation without stirring and stirring after ultrasonic pre-irradiation of lipase. The same experiments were conducted under conventional stirring to evaluate the effect of the ultrasound. With the two approaches, the ultrasound has advantage over the conventional stirring. For example, in the resolution of the menthol by vinyl acetate catalyzed by *candida rugosa* lipase, the conversion was increased 3-fold and the enantioselectivity 5-fold.

The second was an evaluation of the effects of two eco-friendly solvents, 2-methyltetrahydrofuran (MeTHF) and cyclopentyl methyl ether (CPME), on the enzyme activity and enantioselectivity of a series of commercial lipases and lipases formulated by immobilization and lyophilization in the resolution of some racemic alcohols, reactions were carried out at different water activity. Results showed that the activity of lipases in CPME was similar to that observed in other largely employed organic solvents [toluene and tert-butyl methyl ether (MTBE)], and was slightly lower in MeTHF. However, for most of the lipases tested, the enantioselectivity was higher in the eco-friendly solvents. For example, CALB was found to be a useful biocatalyst for the resolution of racemic sulcatol, where high activity and enantioselectivity were obtained ($E > 400$).

Keywords : Lipase, enzymatic acylation, enantioselectivity, racemic alcohols, non-conventional media, ultrasound, green solvents.

ملخص

يندرج العمل المنجز في هذه الأطروحة في إطار استعمال المحفزات البيولوجية في التصنيع العضوي، و كان العمل يهدف إلى إنجاز طريقة فعالة، ونظيفة من الناحية البيئية في التحفيز البيولوجي بواسطة الليبازات في أسيلة الكحولات الراسمية باستخدام الموجات فوق الصوتية كأداة للتفعيل، و المذيبات الخضراء كوسائط للتفاعلات الإنزيمية، و قد تركزت الدراسة حول محورين رئيسيين:

المحور الأول خصص لدراسة تأثير الموجات فوق الصوتية على سلوك مختلف الليبازات من حيث النشاط و الانتقائية الانانتيوميرية في أسترة بعض الكحولات الراسمية مع مختلف المركبات مانحة الأسيل. وقد أجريت التجارب باستخدام منهجين: أولاً بواسطة الموجات فوق الصوتية من دون التفعيل بواسطة التخليط، ثانياً بواسطة التخليط بعد معالجة الليبازات بالموجات فوق الصوتية. وقد أجريت نفس التجارب بواسطة التخليط التقليدي لتقييم تأثير الموجات فوق الصوتية. أظهرت النتائج فعالية الموجات فوق الصوتية بكلا المنهجين مقارنة بالطريقة التقليدية للتخليط. على سبيل المثال تم ارتفاع نشاط الليباز 3 أضعاف و 5 أضعاف بالنسبة لانتقائية الانانتيوميرية في أسترة المنثول مع خلاص الفينيل محفزة بليباز الكنديدة ريغوزة تحت تأثير الموجات فوق الصوتية.

وقد تطرق المحور الثاني لتقييم تأثير المذيب، متمثلاً في مذيبين صديقين للبيئة 2-مثنيلثيراهيدروفوران (MeTHF) و سيكلوبنتيل ميتيل أثير (CPME) على نشاط الإنزيم و انتقائيته الانانتيوميرية عند مجموعة من الليبازات التجارية و ليبازات معادة التشكيل بواسطة التثبيت أو بالتجفيد، و قد تم إجراء التفاعلات في نشاطات مياه مختلفة. وقد أظهرت النتائج أن نشاط الليباز في CPME كان مماثلاً لتلك التي لوحظت في المذيبات العضوية الأخرى المستخدمة على نطاق واسع (مثل التولوين و MTBE)، وكانت منخفضة قليلاً في MeTHF. ومن الناحية الأخرى، أظهرت معظم الليبازات انتقائية الانانتيوميرية مرتفعة في هذه المذيبات الخضراء. على سبيل المثال، أظهرت الليباز كندية انتراكتيكة بفعالية مرتفعة في أسترة السلكيتول في مذيب CPME. حيث تم الحصول على النشاط و انتقائية الانانتيوميرية مرتفعين ($E > 400$).

الكلمات المفتاحية : الليباز، الأسيلة الإنزيمية، الانتقائية الانانتيوميرية، الكحولات الراسمية، الموجات فوق صوتية، المذيبات الخضراء.

Publications et communications

Publications :

- 1- **A. Belafriekh**, F. Secundo, S. Serra, Z. Djeghaba. Enantioselective enzymatic resolution of racemic alcohols by lipases in green organic solvents, *Tetrahedron: Asymmetry*, 28 (2017) 473-478.
- 2- F. Benamia, S. Benouis, **A. Belafriekh**, N. Semache, N. Rebbani, Z. Djeghaba. Efficient *Candida rugosa* lipase immobilization on Maghnite clay and application for the production of (1R)-(-)-Menthyl acetate, *chemical paper*, 71 (2017) 785–793.
- 3- **A. Belafriekh**, F. Benamia, Z. Djeghabaa. Ultrasound effects on the activity and enantioselectivity of *candida rugosa* lipase in organic solvents, *International Journal of Chemical and Petroleum Sciences*, 4 (2015) 34-41.

Communications :

- 1- Journées Internationales de Biotechnologie, 18-22 Décembre 2016, Sousse, Enzymatic resolution of racemic alcohols via lipases under ultrasound irradiations.
- 2- VI^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, 24-27 Mars 2016, Hammamet, Amélioration de la performance de *Candida Rugosa* lipase dans la résolution enzymatique du (R,S)-2-pentanol sous ultrasons.
- 3- 3^{ème} Journées Internationales de Chimie Organique, 05-07 Décembre 2015, Annaba, Cross-linked enzyme aggregates of *candida antractica lipase B*: robust catalysts for the synthesis of propyl caffeate.
- 4- 1^{er} Séminaire National Des Sciences D'interfaces Chimie-Biologie, 22-23 Octobre 2014, Souk Ahras, Transesterification enzymatique des alcools secondaires assistée par ultrason dans des milieux non-aqueux.
- 5- 2^{ème} Journées Nationales de Chimie, 9-11 Avril 2013, Annaba, Modélisation et optimisation de l'immobilisation de la lipase de *Candida Rugosa* par RSM et réseaux de neurones.

Sommaire

Remerciement	ii
Résumé	iv
Sommaire	viii
Liste des figures	xii
Liste des tableaux	xv
Abréviations et symboles	xvii
Introduction générale	2
Références bibliographiques	6
Chapitre 1. Etude bibliographique	8
1. Les lipases	9
1.1. Généralités sur les lipases	9
1.2. Les réactions catalysées par les lipases	9
1.2.1. Réaction d'hydrolyse	9
1.2.2. Réactions de synthèse	10
1.2.2.1. L'estérification	10
1.2.2.2. La transestérification	11
1.2.2.3. L'interestérification	11
1.2.2.4. L'aminolyse	12
1.3. Structure et mécanisme d'action des lipases	12
1.3.1. Généralités	12
1.3.2. Notion de site actif	15
1.3.3. Mécanisme d'action des lipases	16
1.4. Propriétés de sélectivité des lipases	17
1.4.1. Chimiosélectivité	17
1.4.2. Régiosélectivité	19
1.4.3. Enantiosélectivité	20
1.4.3.1. Chiralité et énantiosélectivité	20
1.4.3.2. Détermination de l'énantiosélectivité	22
1.4.3.3. Aspect cinétique et thermodynamique de l'énantiosélectivité	24

1.5. Techniques d'amélioration de la performance des lipases	25
1.5.1. Immobilisation	26
1.5.2. Lyophilisation	28
Références bibliographiques	31
2. L'acylation enzymatique	36
2.1. Définitions	36
2.2. Paramètres influençant l'acylation enzymatique	37
2.2.1. La nature d'enzyme	37
2.2.2. La structure de substrat	38
2.2.3. Le donneur d'acyle	39
2.2.4. La température	40
2.2.5. L'activité de l'eau (a_w)	41
2.3. Les milieux non conventionnels des lipases	43
2.3.1. Introduction	43
2.3.2. Les solvants organiques	44
2.3.3. Les liquides ioniques	48
2.3.4. Solvants respectueux de l'environnement	52
2.3.5. Influence du milieu sur le comportement de la lipase	54
Références bibliographiques	55
3. Les ultrasons : alternatifs dans les procédés de synthèse	59
3.1. Généralités sur les ultrasons	59
3.1.1. Définition	59
3.1.2. Principaux types d'ultrasons	60
3.2. Paramètres physicochimiques des ultrasons	60
3.2.1. Vitesse	60
3.2.2. Propagation	61
3.3. Application des ultrasons	61
3.3.1. Applications médicales	61
3.3.2. Application au laboratoire	62
3.3.3. Application synthétiques des ultrasons	62
3.4. La sonochimie	63
3.4.1. Définition	63
3.4.2. Matériels utilisés en sonochimie	63
3.5. Phénomène de la cavitation	65

3.5.1. Définition	65
3.5.2. Dynamique d'une bulle de cavitation	66
3.5.3. Type de la cavitation	68
3.5.4. Paramètres influençant la cavitation	68
Références bibliographiques	71

Chapitre 2. Matériel et méthodes

1. Réactifs et enzymes	74
1.1. Lipases	74
2.2. Réactifs et solvants	74
2. Matériels	75
2.1. Ultrasons	75
2.2. Chromatographie phase gazeuse (CPG)	76
3. Protocole des réactions réalisées	77
3.1. Réactions sous ultrasons	77
3.1.1. Prétraitement des lipases par ultrasons	77
3.1.2. Transestérification des alcools secondaires	77
3.2. Réactions dans les solvants verts	78
3.2.1. Transestérification des alcools racémiques	78
3.2.2. Transestérification en présence des liquides ioniques	78
4. Techniques de formulation des lipases	79
4.1. Immobilisation	79
4.2. Lyophilisation	80
5. Méthodes analytiques	80
5.1. Dosage des protéines	80
5.2. Analyse chromatographique en phase gazeuse	81
Références bibliographiques	83

Chapitre 3. Résultats et discussion

1. Résolution énantiosélective des alcools racémique par les lipases sous ultrasons	85
1.1. Introduction	85
1.2. Influence du système à ultrasons	85
1.3. Effet de prétraitement de la lipase par ultrasons	88
1.4. Effet de la nature de lipase	89

1.5. Effet du solvant	91
1.6. Influence du donneur d'acyle	92
1.7. Effet de la température	93
1.8. Effet des ultrasons sur les lipases immobilisées	94
1.9. Conclusion	96
Références bibliographiques	98
2. Résolution enzymatique d'alcools racémiques dans des solvants « verts »	99
2.1. Introduction	99
2.2. Criblage de lipases	100
2.3. Influence de l'activité de l'eau	101
2.4. Influence de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle	103
2.5. Effet de formulation des lipases	104
2.5.1. Effet de la lyophilisation	104
2.5.2. Effet de l'immobilisation	105
2.6. Effet des liquides ionique dans le milieu	106
2.7. Effet de la température	107
2.8. Conclusion	109
Références bibliographiques	111
Conclusion générale et Perspectives	113
Annexe	115

Liste des figures

Figure	Tite	Page
Chapitre 1.		
Figure 1.1.	Structure secondaire d'une protéine. Hélice α et feuillets plissés β .	13
Figure 1.2.	Structure tertiaire d'une protéine.	13
Figure 1.3.	Schéma du repliement α/β .	14
Figure 1.4.	Topologie des sites actifs de la CRL, PCL et CALB.	16
Figure 1.5.	Règles de Kazlauskas présentant l'énantiosélectivité des lipases pour les alcools secondaires.	21
Figure 1.6.	Dépendance des excès énantiomériques ee_s et ee_p de la conversion dans une résolution cinétique irréversible.	24
Figure 1.7.	Résolution enzymatique, R et S représentent les énantiomères du substrat, P et Q représentent les énantiomères du produit.	24
Figure 1.8.	Diagrammes énergétiques d'une réaction énantiosélective catalysée par une lipase.	25
Figure 1.9.	Méthodes d'immobilisation des enzymes.	27
Figure 2.1.	Schéma général d'une réaction d'acylation catalysée par une enzyme.	36
Figure 2.2.	Effet de la température sur le ratio énantiomérique (E) lors la résolution cinétique catalysée par la lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> de quelques alcools allylique racémiques.	41
Figure 2.3.	Variation de l'activité de la lipase <i>Candida rugosa</i> en fonction de l'activité de l'eau (a_w) dans l'isooctane.	43
Figure 2.4.	Classification des solvants organiques.	45
Figure 2.5.	Énantiosélectivité (E) en fonction de $\log P$ de quelques solvants organiques dans la résolution de (R,S)-2-octanol avec l'acétate de vinyle catalysée par la lipase QLM.	47
Figure 3.1.	Domaines de fréquence des sons.	59
Figure 3.2.	Système du bain à ultrason.	64
Figure 3.3.	Système de la sonde à ultrason.	65
Figure 3.4.	Dynamique d'une microbulle soumise aux ultrasons.	67
Figure 3.5.	Évolution de la taille d'une bulle de cavitation transitoire.	68

Chapitre 2.

- Figure 1.** Structures des alcools racémiques utilisés. 75
- Figure 2.** Système à ultrasons utilisé, Branson 1510E-MTH et Misonix XL2000. 76
- Figure 3.** CPG utilisée, GC-17 SHIMADZU et Agilent Technologies 6850. 76

Chapitre 3.

- Figure 1.1.** Influence de système à ultrason sur la conversion (*C*) dans l'acylation enzymatique des alcools racémiques par CALB et CRL. 86
- Figure 1.2.** Influence de système à ultrason sur l'énantiosélectivité (*E*) dans l'acylation enzymatique des alcools racémiques par CALB et CRL. 87
- Figure 1.3.** Effet du temps de pré-irradiation par ultrasons sur l'acylation enzymatique de (*R,S*)-1-phényléthanol avec de l'acétate de vinyle dans l'hexane par CRL. 88
- Figure 1.4.** Effet du de pré-traitement par ultrasons sur la transestérification enzymatique du (\pm)-2-pentanol avec l'acétate de vinyle dans l'hexane. 89
- Figure 1.5.** Effet du temps de de pré-traitement par ultrasons sur l'acylation enzymatique du (\pm)-menthol avec l'acétate de vinyle dans l'hexane par CRL. 89
- Figure 1.6.** Effet de la température sur l'acylation enzymatique du (*R,S*)-1-phényléthanol avec l'acétate de vinyle par la CALB dans l'hexane sous US. 93
- Figure 1.7.** Effet de la température sur l'acylation enzymatique du (*R,S*)-2-pentanol avec l'acétate de vinyle par la CALB dans l'hexane sous US. 94
- Figure 1.8.** Effet de la température sur l'acylation enzymatique du (\pm)-menthol avec l'acétate de vinyle par la CRL dans l'hexane sous US. 94
- Figure 2.2.** Effet de l'activité d'eau (a_w) sur l'activité des lipases dans la transestérification des alcools racémiques dans MeTHF, CPME. 103
- Figure 2.2.** Effet de la température sur l'activité de la lipase AK lyophilisée avec saccharose dans la transestérification du (\pm)-menthol par l'acétate de vinyle dans CPME. 108
- Figure 2.3.** Effet de la température sur l'activité de la CRL immobilisée sur résine dans la transestérification du (\pm)-Sulcatol par l'acétate de vinyle dans MeTHF. 108

Liste des schémas

Schéma	Titre	Page
Chapitre 1.		
Schéma 1.1.	Résolution énantiosélective du (<i>R,S</i>)-mandelate de méthyl par la CRL.	10
Schéma 1.2.	Synthèse de l'acétate de butyle catalysé par ROL.	10
Schéma 1.3.	La lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> catalyse la résolution (<i>R,S</i>)-1-phénylethanol.	11
Schéma 1.4.	L'interestérisation de triglycérides par CRL pour la production de biodiesels.	11
Schéma 1.5.	L'aminolyse énantiosélective du <i>trans</i> -2-phenylcyclopentanamine par CALB.	12
Schéma 1.6.	Mécanisme d'action catalytique des lipases : intervention de la triade (Ser, Hist et Asp).	17
Schéma 1.7.	La chimiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels de natures différentes présents au même substrat.	18
Schéma 1.8.	La régiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels identiques présents au même substrat.	19
Schéma 2.1.	Modèle empirique pour prédire l'énantiomère à réagir plus vite des alcools secondaires racémiques.	38
Chapitre 2.		
Schéma 1.	Réactions modèles étudiées sous ultrasons.	77
Schéma 2.	Réactions modèles étudiées dans les solvants verts.	79
Chapitre 3.		
Schéma 1.1.	Transestérisation enzymatique d'alcools secondaires avec différents donneurs d'acyle.	85

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Chapitre 1.		
Tableau 1.1.	Exemples de la chimiosélectivité de la lipase <i>Candida antarctica</i> B avec différents substrats.	18
Tableau 1.2.	Exemples de la régiosélectivité de la lipase <i>Candida antarctica</i> B avec différents substrats.	20
Tableau 1.3.	Exemples de l'énantiosélectivité de la lipase <i>Candida antarctica</i> B avec quelques substrats racémique.	22
Tableau 1.4.	Immobilisation de la lipase KM sur différents supports.	27
Tableau 1.5.	Comparaison de transestérification activité et totale activité dans solvant organique de la lipase CALB et la lipase PC en différente forme de formulation.	30
Tableau 2.1.	Activité hydrolytique de quelques lipases commerciales vis-à-vis de l'huile d'olive.	37
Tableau 2.2.	Exemples issus de la littérature de l'activité de la CALB en fonction de la structure du substrat.	39
Tableau 2.3.	Enantiosélectivité de la CALB dans l'acylation enzymatique du 3-méthyl-2-butanol avec différent donneurs d'acyle vinyliques.	40
Tableau 2.4.	Valeurs de l'activité d'eau pour quelques solutions saturées de sel à 25 °C et 50 °C.	42
Tableau 2.5.	Valeurs de Log <i>P</i> pour quelques solvants organiques.	46
Tableau 2.6.	Effet du solvant sur l'acylation enzymatique cordycepin catalysée par lipase.	47
Tableau 2.7.	Cations et anions des LIs les plus utilisés dans la biocatalyse.	49
Tableau 2.8.	Résolution cinétique des alcools racémiques : Exemples issus de la littérature de l'effet des LIs comme additifs sur l'énantiosélectivité enzymatique (<i>E</i>).	51
Tableau 2.9.	Propriétés physique de MeTHF et CPME.	53
Tableau 2.10.	La lipase de <i>P. stutzer</i> (lipase TL) catalyse la résolution énantiosélective de racémique benzoin avec le butyrate de vinyle comme donneur d'acyle.	53
Tableau 3.1.	Comparaison des résultats d'acylation de benzylamine et 1-phényléthanol obtenus par chauffage et activée par ultrasons.	63

Chapitre 2.

Tableau 1. Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (S.A.B).	80
Tableau 2. Temps de rétention des substrats and produits en GC chirale (GC- 17, SHIMADZU).	82
Tableau 3. Temps de rétention des substrats and produits en GC chirale (Agilent Technologies 6850).	82

Chapitre 3.

Tableau 1.1. Influence de la nature de lipase sur l'acylation enzymatique des alcools racémiques avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle.	90
Tableau 1.2. Effet du solvant sur l'acylation enzymatique des alcools secondaires racémiques avec de l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle pal la CRL.	91
Tableau 1.3. Effet du donneur d'acyle sur l'acylation enzymatique des alcools secondaires racémiques par la CRL dans l'hexane.	92
Tableau 1.4. Effet des ultrasons sur la CRL immobilisée par différentes méthodes dans l'acylation enzymatique des racémiques alcools.	95
Tableau 2.1. Criblage d'une série de lipases dans la réaction de transestérification du (\pm)-menthol, (\pm)-sulcatol ou (\pm)- α -cyclogeraniol dans MeTHF, CPME, toluène ou MTBE comme solvant.	100
Tableau 2.2. L'influence de donneur d'acyle sur la réaction de transestérification du (\pm)-menthol par Lipase AK, (\pm)-sulcatol par CALB ou (\pm)- α -cyclogeraniol par CRL dans MeTHF, CPME, toluène ou MTBE comme solvant.	104
Tableau 2.3. Activité de la lipase AK lyophilisée sans et avec différents additifs dans la transestérification du (\pm)-menthol par l'acétate de vinyle dans CPME.	105
Tableau 2.4. Activité et énantiosélectivité de la CRL immobilisée par différente méthode dans la transestérification du (\pm)-sulcatol par l'acétate de vinyle dans le MeTHF.	106
Tableau 2.5. Effet des liquides ioniques sur l'activité et énantiosélectivité des lipases dans la transestérification du (\pm)-menthol.	107

Abréviations et symboles

a_w : Activité d'eau

C : Conversion

CALB : Lipase de *Candida antarctica* B

CLEA : Cross-linking enzyme aggregates

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPME : Cyclopentyle méthyle éther

CRL : Lipase de *Candida rugosa*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E : Enantiosélectivité

ee : Excès énantiomérique

LIs : Liquides ioniques

LPP : Lipase pancréatique de porc

Log P : Le coefficient de partage dans le système à deux phases le n-octanol et l'eau

MeTHF : 2-méthyltétrahydrofurane

PEG : Poly(éthylène)glycol

R, S : Enantiomères *Rectus et Sinister*

ROL : Lipase de *Rhizopus oryzae*

T : Température

TBME : Tert-butyle méthyle éther

THF : Tétrahydrofurane

US : Ultrasons

V_0 : Vitesse initiale

Introduction générale

Introduction générale

Durant ces dernières décennies, le développement des procédés industriels ne se limite plus aux innovations technologiques et à l'efficacité économique, mais doit absolument tenir compte des impératifs environnementaux, garants d'un développement durable. Cela est encore plus vrai pour l'industrie chimique, accusée, parfois à tort, d'être le pollueur par excellence de la planète. C'est pour cette raison qu'on assiste actuellement à l'émergence de ce qui est communément appelé « chimie verte ». Ce concept s'articule sur des règles mettant en œuvre des procédés et des voies de synthèse plus propres, réduisant au maximum l'utilisation et la génération de produits néfastes pour l'environnement.

Le secteur de la production de produits énantiomériquement purs est d'un intérêt capital. Il en est ainsi des composés de type esters¹ qui constituent une classe de composés biologiquement actifs très répandue dans la nature et très utilisée dans l'industrie, particulièrement dans les domaines de la pharmacie, de l'agrochimie, des cosmétiques et de la parfumerie². Cependant, les procédés classiques de la synthèse chimique de ces composés nécessitent l'usage de solvants potentiellement nocifs et mettent souvent en œuvre des conditions opératoires dures (haute température, pH extrême). De plus, ces procédés génèrent beaucoup de produits secondaires, donnent des mélanges racémiques dans le cas des substrats chiraux et nécessitent de nombreuses étapes supplémentaires pour la séparation et la purification du produit final³.

Le recours à la voie biologique, par l'utilisation d'enzymes⁴ par exemple, constitue une alternative intéressante aux méthodes de synthèse classiques et permet de travailler dans des conditions plus éco-compatibles : conditions opératoires plus douces, pas de produits secondaires et donc réduction du nombre d'étapes nécessaires à la purification du produit^{5,6}. De plus, les produits ainsi obtenus sont étiquetés d'un label naturel par les législations internationales ce qui les distingue des produits obtenus par synthèse chimique et leur donne une valeur ajoutée supérieure grâce à la demande croissante des produits à label naturel dans le marché.

Parmi les enzymes industrielles utilisées, les lipases sont les plus importantes pour les préparations de composés énantiomériquement purs^{7,8}. Elles ont une capacité remarquable à catalyser une grande variété de réactions dans les milieux hydrophobes tels que l'estérification, la transestérification et l'aminolyse avec une activité élevée, et avec une chimio, régio et énantiosélectivité très intéressantes⁹⁻¹¹. Cependant, leur activité et énantiosélectivité pour divers substrats synthétiques ne sont pas toujours suffisantes. Il est

alors nécessaire de chercher des moyens afin d'améliorer leur fonctionnement. Plusieurs méthodes ont été développées à cette fin : l'ingénierie des solvants, l'immobilisation enzymatique, la lyophilisation de l'enzyme, l'application d'ondes mécaniques, etc¹²⁻¹⁵.

Actuellement, les ultrasons ont été introduits dans la chimie organique et la biotechnologie comme un moyen efficace pour activer les transformations chimiques¹⁶⁻¹⁸. L'utilisation des ultrasons pour les réactions enzymatiques peut améliorer la solubilisation des substrats et le transfert de masse à l'intérieur et à l'extérieur du site actif de l'enzyme^{19,20}. Les ultrasons peuvent également affecter les interactions faibles dans la protéine induisant des changements conformationnels, ce qui peut améliorer dans certains cas les réactions enzymatiques²¹. De nombreuses études disponibles dans la littérature rapportent que les ultrasons à basse fréquence (environ 40 kHz) ne sont pas capables de dénaturer les enzymes^{22,23}. Par conséquent, avec une faible fréquence et une puissance optimale, les ultrasons peuvent être efficaces pour le biocatalyseur.

Lors de la mise en œuvre d'une réaction de synthèse par voie enzymatique, il est indispensable de travailler en milieu non-conventionnel (non aqueux) pour éviter la réaction d'hydrolyse qui est alors indésirable²⁴. L'utilisation de solvants organiques⁹ comme milieu pour les réactions catalysées par les lipases offre de nombreux avantages tels que la possibilité de solubiliser des substrats insolubles dans l'eau, faciliter la récupération des produits par une simple filtration du biocatalyseurs et la possibilité d'augmenter la stabilité thermique de l'enzyme²⁵. En outre, les solvants organiques peuvent affecter fortement la sélectivité enzymatique, ce qui rend la sélection du solvant d'une importance cruciale^{26,27}. Cependant la toxicité des solvants organiques reste l'inconvénient majeur pour leur utilisation en synthèse enzymatique. C'est ainsi que d'autres alternatives ont été développées, comme l'utilisation des liquides ioniques où il a été remarqué leur compatibilité avec les catalyseurs biologiques et leur impact positif sur le fonctionnement du biocatalyseur²⁸. Plus récemment encore, Le 2-méthyltétrahydrofurane (MeTHF), un solvant dérivé de la biomasse et le cyclopentyl méthyl éther (CPME) ont été rapportés comme des milieux prometteurs pour les réactions enzymatiques en raison de leurs caractéristiques favorables^{29,30}. MeTHF (point d'ébullition 80 °C) et CPME (point d'ébullition 106 °C) peuvent remplacer leurs analogues généralement utilisé, le tétrahydrofurane (THF) le tert-butyle méthyle éther (TBME) avec l'avantage d'une faible évaporation du solvant pendant la réaction. De plus, en raison de la miscibilité limitée dans l'eau (4,1% et 1,1% w/w pour MeTHF et CPME, respectivement, à 23 °C), ces solvants peuvent être utilisés dans des systèmes de réaction à deux phases, ce qui facilite la

récupération du produit^{31,32}. D'autre part, le MeTHF est considéré comme un solvant vert parce que (i) il peut être produit à partir de sources renouvelables telle que coquille de maïs, conformément au 7^{ème} principe de la chimie verte, et (ii) il peut être dégradé abiotiquement en présence de la lumière du soleil et de l'air³³. Comparé à d'autres solvants classiques éthers le CPME s'est avéré très utile dans de nombreuses synthèses organiques car il possède une hydrophobicité élevée, donc très facile à sécher, et une possibilité de formation des peroxydes par les produits très limitée^{34,35}.

C'est dans ce contexte général de « chimie verte » que rentrent les travaux réalisés dans cette thèse. En effet, dans le cadre de nos recherches sur l'accès à des produits énantiomériquement purs, nous nous sommes astreints à travailler dans les conditions les plus éco-compatibles possible. C'est ainsi que nous avons développé un procédé respectueux de l'environnement sur au moins trois points : catalyse par voie biologique, emploi des ultrasons et utilisation de solvants classés « verts ». Au-delà de leur éco-compatibilité, l'impact des ultrasons et des solvants verts sur la performance des enzymes utilisées dans cette étude a été également étudié. Cette étude a été menée sur des réactions d'acylation d'alcools secondaires racémiques.

La présentation générale de notre travail sera la suivante :

Un premier chapitre a été consacré à une analyse bibliographique permettant de mieux appréhender la problématique ainsi que les divers aspects de notre étude. Il comporte trois parties. Dans une première partie, nous présenterons des généralités sur les lipases, leurs applications, leurs caractéristiques structurales et leur mécanisme d'action, les propriétés de sélectivité des lipases seront présentées aussi, en insistant sur les fondements de leur énantiosélectivité, on terminera cette partie par les techniques d'amélioration de la performance des lipases. La deuxième partie sera consacrée à l'acylation enzymatique le domaine d'application des lipases étudié dans cette thèse, nous donnerons des définitions et nous aborderons les paramètres influençant l'acylation enzymatique et les milieux non conventionnels des lipases. Dans la troisième partie, nous présenterons des généralités sur les ultrasons, un alternatif dans les procédés de synthèse, et leurs applications, la sonochimie sera aussi présentée et le phénomène de la cavitation.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit concernera la partie « matériel et méthodes » dans laquelle les réactifs ainsi que les matériels utilisés dans cette étude seront présentés. Les différentes approches des réactions enzymatiques, les protocoles de préparation des lipases

par formulation (immobilisation et lyophilisation), et les méthodes d'analyse seront également décrits.

Le troisième chapitre regroupera les résultats obtenus au cours de cette thèse qui seront présentés et discutés. L'étude s'articule sur deux principaux axes. Le premier consiste à étudier l'effet des ultrasons sur le comportement des lipases en termes d'activité et d'énantiosélectivité dans la résolution énantiosélective des alcools secondaires racémiques. Le second axe consiste à étudier l'effet de deux solvants respectueux de l'environnement (solvants verts) sur l'activité et l'énantiosélectivité des lipases dans la résolution énantiosélective des alcools secondaires racémiques. Dans les deux axes l'effet des principaux paramètres opératoires sera étudié.

A la fin du manuscrit, les différents aboutissements de ce travail et les perspectives seront évoqués dans une conclusion générale.

Références bibliographiques

- (1) Rajendran, A.; Palanisamy, A. *Brazilian Arch.* **2009**, *52* (February), 207–219.
- (2) Białecka-florja, E.; Krzyczkowska, J.; Stolarzewicz, I.; Kapturowska, A. *J. Mol. Catal. B* **2012**, *74*, 241–245.
- (3) Kourist, R. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (43), 12547.
- (4) Blinkovsky, A. M.; Martin, B. D.; Dordick, J. S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, *3* (2), 124–129.
- (5) Xie, C.; Wu, B.; Qin, S.; He, B. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, *39* (1), 59–66.
- (6) Shimomura, K.; Harami, H.; Matsubara, Y.; Nokami, T. *Catal. Today* **2015**, *255*, 41–48.
- (7) Whalen, L. J.; Morrow, C. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1279–1288.
- (8) Hoyos, P.; Quezada, M. A.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *72* (1–2), 20–24.
- (9) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *40* (3–4), 111–120.
- (10) Frings, K.; Koch, M.; Hartmeier, W. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25* (3–5), 303–309.
- (11) Berglund, P. *Biomol. Eng.* **2001**, *18* (1), 13–22.
- (12) Jia, R.; Hu, Y.; Liu, L.; Jiang, L.; Zou, B.; Huang, H. *ACS Catal.* **2013**, *3* (9), 1976–1983.
- (13) Hsieh, H. J.; Nair, G. R.; Wu, W. T. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (16), 5777–5781.
- (14) Hua, W.; Shen, D.; Fang, M.; Shao, P.; Hui, C. *Journal Mol. Catal. B, Enzym.* **2015**, *111*, 43–50.
- (15) Zhang, Y.; Ge, J.; Liu, Z. *ACS Catal.* **2015**, *5* (8), 4503–4513.
- (16) Lin, G.; Liu, H. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (34), 6067–6068.
- (17) Batistella, L.; Lerin, L. A.; Brugnerotto, P.; Danielli, A. J.; Trentin, C. M.; Popiolski, A.; Treichel, H.; Oliveira, J. V.; Oliveira, D. De. *Ultrason. - Sonochemistry* **2012**, *19* (3), 452–458.
- (18) Ceni, G.; Costa, P.; Lerin, L.; Oliveira, J. V.; Toniazzo, G.; Treichel, H.; Guillermo, E.; Oliveira, D. De. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48* (2), 169–174.
- (19) Barbara Kwiatkowska, B.; Bennett, J.; Akunna, J.; Walker, G. M.; Bremner, D. H. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (6), 768–780.
- (20) Zhu, K.; Liu, H.; Han, P.; Wei, P. *Front. Chem. Eng.* **2010**, *4* (3), 367–371.

- (21) Adulkar, T. V.; Rathod, V. K. *Ultrason. Sonochem.* **2014**, *21* (3), 1083–1089.
- (22) Delgado-Povedano, M. M.; Luque de Castro, M. D. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *889*, 1–21.
- (23) Martins, A. B.; Schein, M. F.; Friedrich, J. L. R.; Fernandez-lafuente, R.; Ayub, M. A. Z.; Rodrigues, R. C. *Ultrason. Sonochem.* **2013**, *20*, 1155–1160.
- (24) Vrutika, P.; Datta, M. *Appl Biochem Biotechnol* **2015**, *177*, 1313–1326.
- (25) Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S. S.; Arora, P. K. *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 1–11.
- (26) Secundo, F.; Riva, S.; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3* (2), 267–280.
- (27) Ke, T.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (14), 3334–3340.
- (28) Potdar, M. K.; Kelso, G. F.; Schwarz, L.; Zhang, C.; Hearn, M. T. W. *Molecules* **2015**, *20* (9), 16788–16816.
- (29) Gao, W. L.; Li, N.; Zong, M. H. *J. Biotechnol.* **2013**, *164*, 91–96.
- (30) Mine, Y.; Zhang, L.; Fukunaga, K.; Sugimura, Y. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27* (6), 383–388.
- (31) Chen, Z. G.; Zhang, D. N.; Cao, L.; Han, Y. Bin. *Bioresour. Technol.* **2013**, *133*, 82–86.
- (32) Simeó, Y.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R. *Green Chem.* **2009**, *11*, 855–862.
- (33) Pace, V.; Hoyos, P.; Castoldi, L.; Domínguez De María, P.; Alcántara, A. R. *ChemSusChem* **2012**, *5* (8), 1369–1379.
- (34) Watanabe, K. *Molecules* **2013**, *18* (3), 3183–3194.
- (35) Watanabe, K.; Yamagiwa, N.; Torisawa, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (2), 251–258.

Chapitre 1. Etude bibliographique

1. Les lipases

1.1. Généralités sur les lipases

Les lipases (triacyl glycérol hydrolases (EC 3.1.1.3) sont des α/β -hydrolases d'esters du glycérol, elles appartiennent à la famille des hydrolases. Elles sont présentes aussi bien dans des tissus animaux, de végétaux, que chez de nombreux micro-organismes¹. *In vivo*, les lipases catalysent, en milieu aqueux, la décomposition, par hydrolyse, des triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. Leur utilisation *in vitro* permet non seulement d'effectuer des réactions d'hydrolyse, en milieu aqueux, mais également de nombreuses autres réactions en milieu organique, comme les estérifications, les transestérifications et les amidations^{2,3}. Comme la plupart des autres biocatalyseurs, les lipases présentent souvent une très grande chimio-, régio- et énantiosélectivité⁴. Mais l'avantage essentiel des lipases est qu'elles ne nécessitent pas la présence d'un cofacteur, contrairement à beaucoup d'autres biocatalyseurs^{5,6}.

1.2. Les réactions catalysées par les lipases

En fonction du milieu réactionnel, conventionnel (milieu aqueux) ou non-conventionnel (solvants organiques), des substrats mis en jeu et des conditions réactionnelles, les lipases peuvent catalyser un très large éventail de réactions. Ces réactions ont lieu avec tous les avantages inhérents à l'utilisation des biocatalyseurs en général : douceur des conditions réactionnelles, activité et surtout sélectivité exceptionnelles.

1.2.1. Réaction d'hydrolyse

En milieu aqueux, les lipases catalysent l'hydrolyse de la fonction ester. La réaction s'effectue à l'interface entre le substrat hydrophobe et le milieu aqueux, formant ainsi un système réactionnel biphasique. Ce dernier résulte de la présence d'une phase organique non miscible à l'eau, constituée soit de l'ester seul, soit de l'ester dissout dans un solvant non miscible à l'eau. Quand il s'agit d'un substrat asymétrique, les lipases présentent souvent une grande sélectivité. A cause cette activité hydrolytique, les lipases trouvent des applications dans de nombreux secteurs industriels comme l'industrie des détergents et l'industrie laitière pour la production d'arômes, ainsi dans la résolution d'esters racémiques.

1.2.2.2. La transestérification

La transestérification regroupe deux réactions : l'alcoolyse (la réaction d'un groupe d'acyle avec alcool) et l'acidolyse (la réaction d'un groupe d'acyle avec acide). Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification, parmi lesquelles, la production de biodiesels et la résolution des mélanges racémiques.

L'exemple suivant illustre la résolution du (*R,S*)-1-phényléthanol par acylation énantiosélective, utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle et l'hexane comme solvant. La lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL) a été employée dans cette étude.

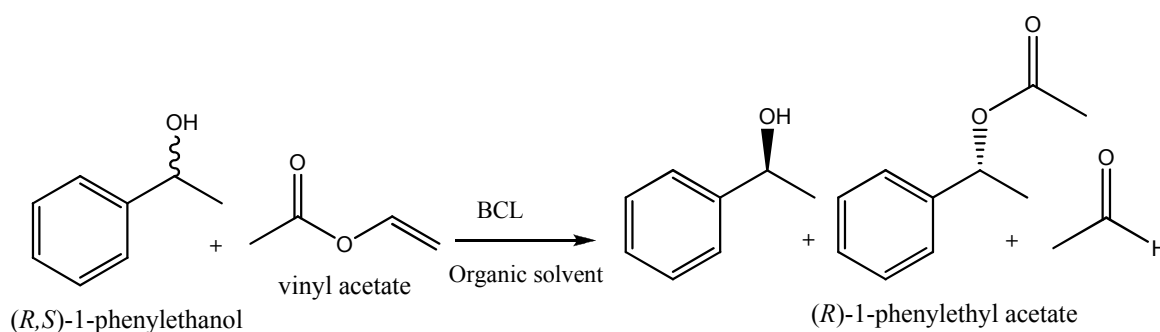


Schéma 1.3. La lipase de *Burkholderia cepacia* catalyse la résolution (*R,S*)-1-phényléthanol⁹.

1.2.2.3. L'interestérification

La réaction d'interestérification 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 de lipides¹⁰. Dans l'exemple ci-dessous, la lipase de *Candida rugosa* (CRL) a été employée pour la production de biodiesels par l'interestérification de triglycérides avec l'acétate de méthyle.

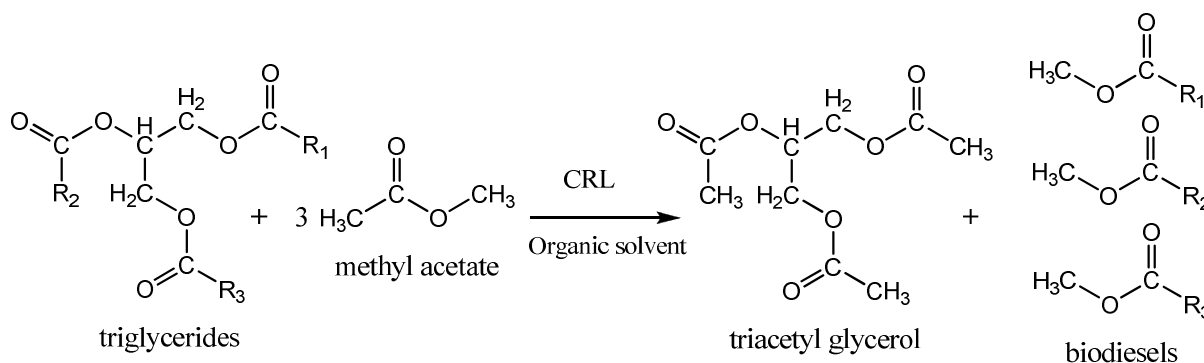


Schéma 1.4. L'interestérification de triglycérides par CRL pour la production de biodiesels¹¹.

1.2.2.4. L'aminolyse

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 aminoalcools chiraux.

L'aminolyse du *trans*-2-phenylcyclopentanamine par la lipase de *Candida antarctica* B (CALB), présentée dans l'exemple suivant, donne un produit avec un bon rendement et d'excellents excès énantiomériques :

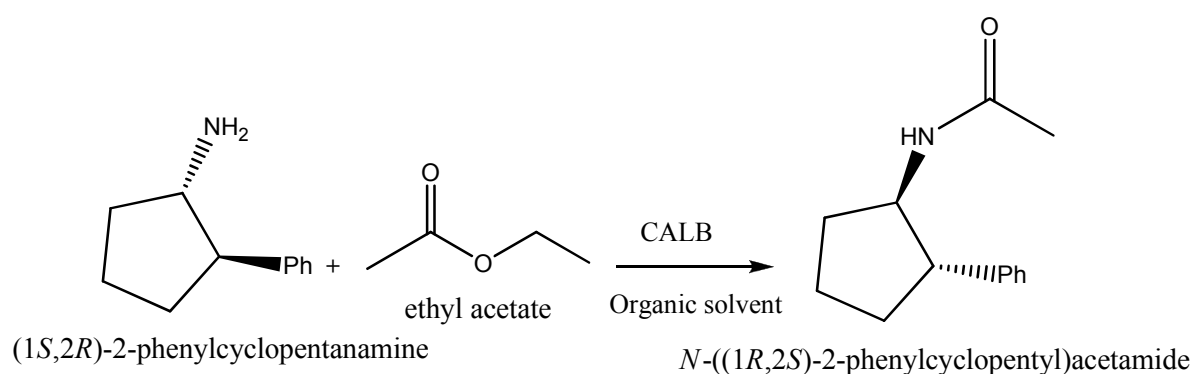
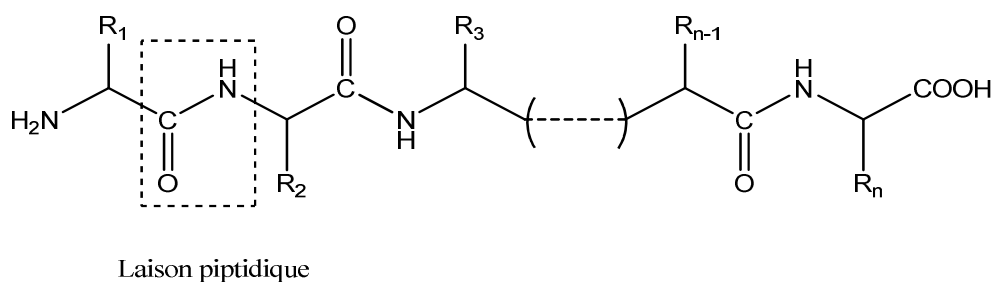


Schéma 1.5. L'aminolyse énantiosélective du *trans*-2-phenylcyclopentanamine par CALB¹².

1.3. Structure et mécanisme d'action des lipases

1.3.1. Généralités

Comme toutes les protéines, les lipases sont constituées d'enchaînement d'acides aminés, qui sont reliés les uns aux autres par des liaisons peptidiques qui se forment entre le groupement carboxylique du premier acide aminé et le groupement aminé suivant :



Cette chaîne d'acides aminés détermine la structure primaire de l'enzyme. La structure secondaire des protéines est classiquement définie par le repliement de la chaîne polypeptidique en hélice α ou en feuillet β (figure 1.1).

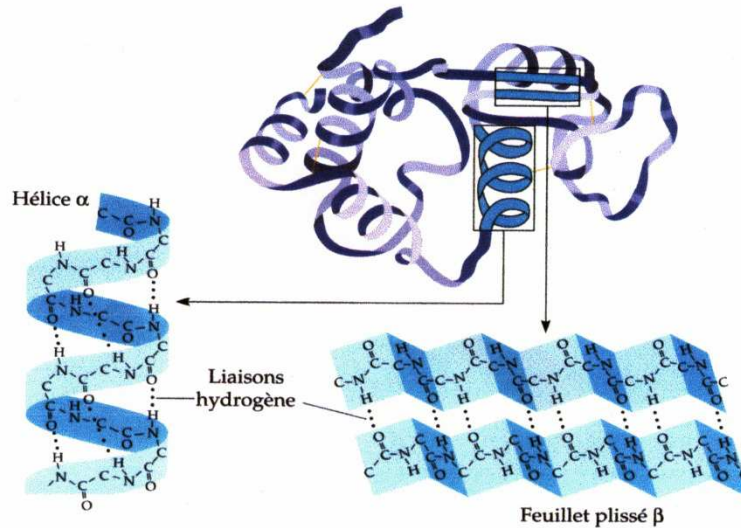


Figure 1.1. Structure secondaire d'une protéine. Hélice α et feuillets plissés β .

La structure tertiaire est due à la formation de différentes liaisons intramoléculaires et interactions, dont les ponts disulfures, les liaisons hydrogène, liaisons ioniques et les interactions hydrophobes (figure 1.2).

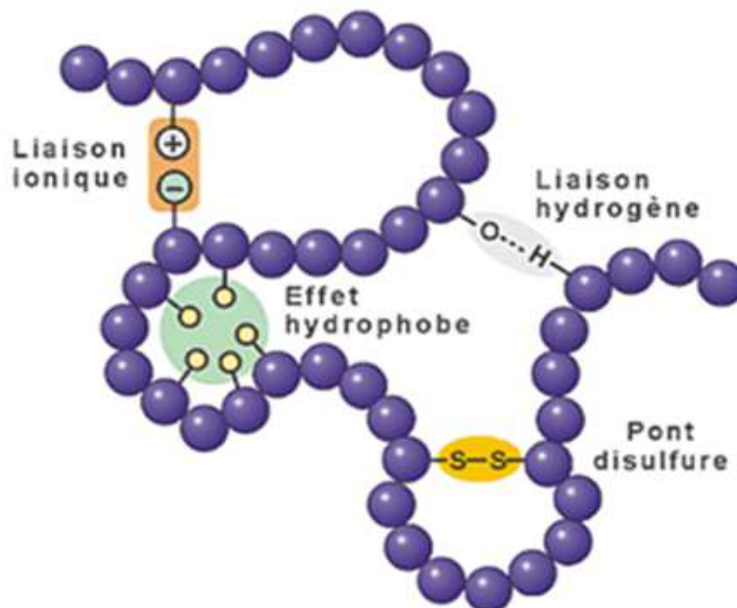


Figure 1.2. Structure tertiaire d'une protéine.

L'étude structurale cristallographique des lipases, par diffraction aux rayons X, révèle trois caractéristiques principales :

a. Un repliement α/β :

Le repliement α/β est la structure de base commune de toutes les lipases connues, formé d'un corps central de 8 feuillets β connectés aux 6 hélices par un coude nucléophile appelé "gamma turn" contenant le résidu catalytique sérine (nucléophile, Nu). Ce dernier est la caractéristique la plus importante et la plus conservée des α/β hydrolases^{13,14}.

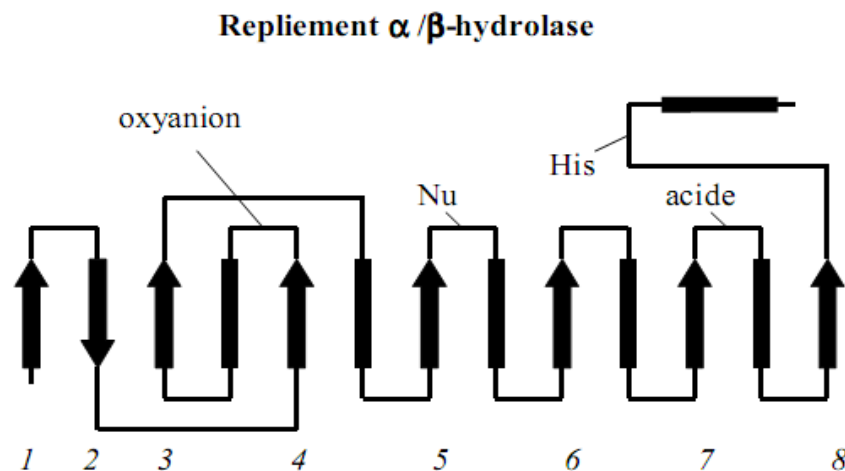


Figure 1.3. Schéma du repliement α/β . Flèches: feuillets β ; Rectangles: hélices α ; Lignes: coudes¹⁵.

b. Une triade catalytique :

Le site catalytique des lipases se compose essentiellement de trois acides aminés (triade catalytique) : Sérine, Histidine, Acide Aspartique (ou Acide Glutamique) et du trou oxyanion. Ce dernier (intermédiaire tétraédrique) est formé de quelques résidus intervenant dans la stabilisation au cours de la catalyse¹⁶.

c. Un couvercle amphiphile :

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, lorsque l'enzyme est sous sa forme inactive. Lorsque l'enzyme se trouve à l'interface

lipide/eau, l'hélice α couvrant le site actif s'ouvre, rendant accessible le site actif au solvant et au substrat, l'enzyme est sous sa forme ouverte, activée^{17,18}.

1.3.2. Notion de site actif

Le site actif d'une lipase est la région tridimensionnelle tapissée de groupes fonctionnels, appelée également poche enzymatique. C'est une cavité de caractère non polaire dans laquelle le substrat s'insère pour être transformé. Cette poche enzymatique est constituée de deux zones fonctionnelles :

- (i) un site de fixation : constitué de résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liaisons chimiques. Ce dernier est lui-même divisé en deux compartiments : une large poche hydrophobe et une poche plus petite en aval. Cette petite poche serait responsable de la stéréo-sélectivité des lipases pour les alcools secondaires.
- (ii) un site de reconnaissance du substrat : constitué de certains acides aminés qui sont associés avec l'orientation du substrat, et donc, avec la spécificité de la lipase^{15,16}.

Pleiss et al.¹⁹ ont réussi à identifier la topographie générale des sites actifs en se basant sur des structures de lipases cristallisées en présence et en absence d'analogues d'états de transition. Ils les classent ainsi en trois sous-groupes :

- les lipases avec site actif en forme de crevasse, près de la surface de la protéine. C'est le cas des lipases de *Rhizomucor* et de *Rhizopus*,
- les lipases avec site actif en forme d'entonnoir. C'est le cas de la lipase de *Burkholderia cepacia* et celle de *Candida antarctica* B,
- les lipases avec site actif en forme de tunnel. Cas de la lipase de *Candida rugosa*.

Si toutes les lipases se ressemblent au niveau du site de fixation de la de la partie alkyle, en revanche, le site de fixation de la partie acyle, varie d'une lipase à une autre. Par exemple celui de la lipase de *Candida rugosa* est un long tunnel pouvant accueillir une chaîne carbonée longue d'au moins 18 atomes de carbone. Dans le cas de la lipase *Rhizomucor miehei*, le site de fixation est plus court et situé à la surface de la protéine. La profondeur de site actif de la lipase de *Candida antarctica* se situe entre celui de la lipase de *Rhizomucor miehei* et lipase de *Candida rugosa*¹⁹.

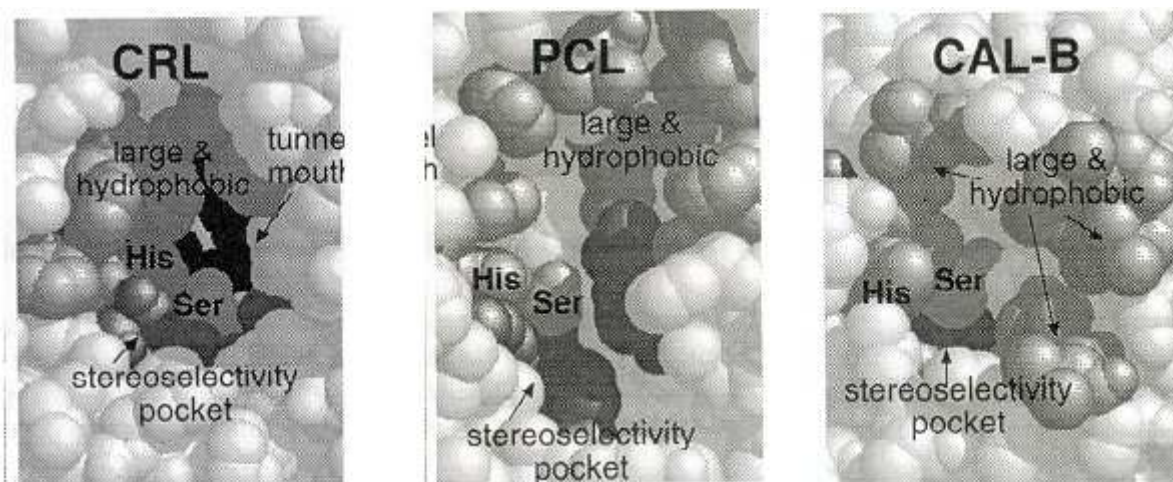


Figure 1.4. Topologie des sites actifs de la CRL, PCL et CALB¹⁵.

1.3.3. Mécanisme d'action des lipases

Le mécanisme d'action catalytique des lipases fait intervenir la triade catalytique située à l'intérieur du site actif. La disposition particulière des 3 résidus formant la triade permet, dans une première étape, le transfert de proton entre l'acide aspartique, l'histidine et la sérine catalytique, entraînant l'attaque nucléophile de l'hydroxyle de la sérine sur le carbonyle du substrat pour former le premier intermédiaire tétraédrique appelé acyl-enzyme avec libération de l'alcool. Cet intermédiaire est stabilisé par des liaisons hydrogène entre l'oxygène du substrat chargé négativement et les acides aminés du trou oxyanion. Dans une seconde étape, cet intermédiaire acyl-enzyme subit une attaque nucléophile qui peut être exercée par une molécule d'eau (réaction d'hydrolyse) ou par une molécule d'alcool (réaction de synthèse) pour former le second intermédiaire tétraédrique. Cette étape de déacylation 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 native.

Le mécanisme d'intervention de la triade (Ser, Hist et Asp) est donné par le schéma suivant (schéma 1.6).

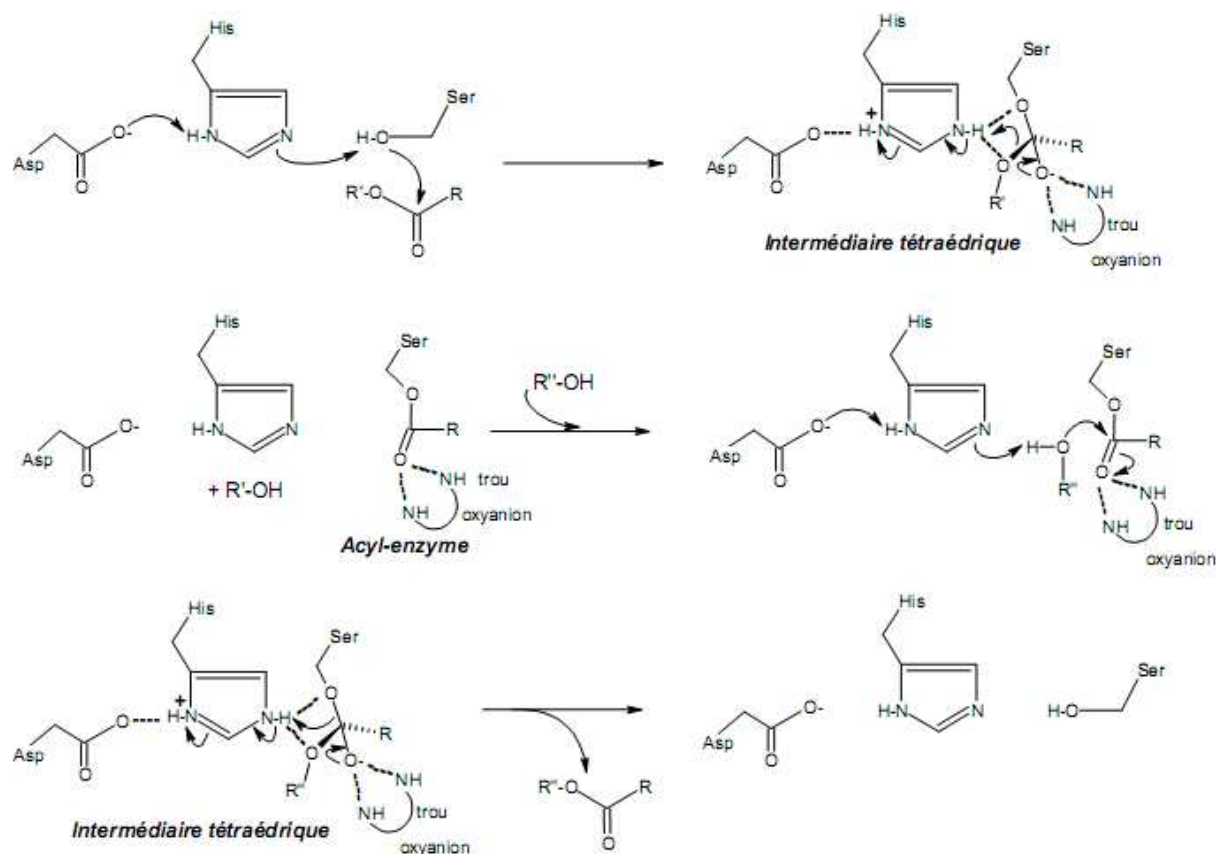


Schéma 1.6. Mécanisme d'action catalytique des lipases : intervention de la triade (Ser, Hist et Asp)²⁰.

1.4. Propriétés de sélectivité des lipases

En tant que catalyseurs en synthèse organique, les lipases ont plusieurs propriétés intéressantes. Elles peuvent catalyser une grande variété de réactions (mentionné dans la section 1.2), tout en acceptant des substrats divers, différents même de leur substrat naturel. De plus, les lipases possèdent souvent différents types de sélectivité envers ces substrats. C'est la principale raison de leur utilisation en synthèse organique, car ces caractéristiques permettent d'éviter les réactions de protection des fonctions qui compliquent les synthèses.

1.4.1. Chimiosélectivité

La chimiosélectivité d'une lipase est sa capacité de catalyser spécifiquement la transformation d'une fonction donnée, lorsqu'un substrat présente plusieurs fonctions de natures différentes susceptibles de réagir (OH, NH, SH...) (schéma 1.7). Cette caractéristique primordiale des lipases trouve un domaine d'application dans des nombreuses études, particulièrement

l'acylation des substrats polyfonctionnels tels que des aminoalcools, des thioalcools ou des peptides^{21,22}.

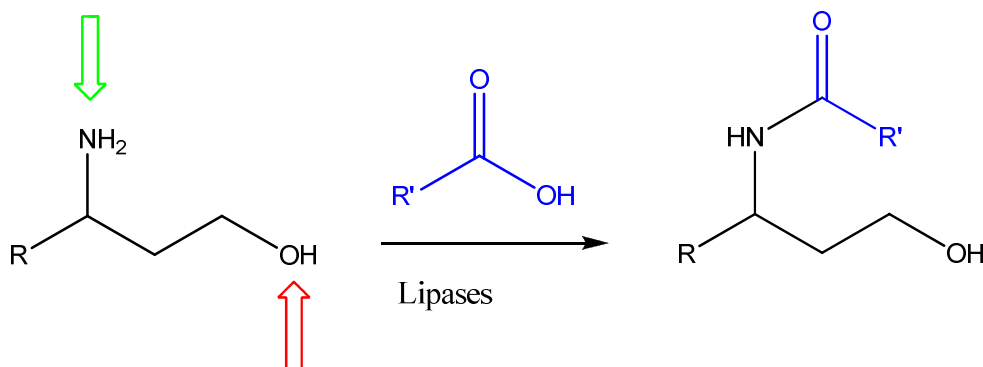


Schéma 1.7. La chimiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels de natures différentes présents au même substrat.

Une étude, menée par Maugard et *al.*²³ sur la synthèse de N-oléyl-N-méthyl-glucamine, un tensioactif biodégradable, a montré la chimiosélectivité de la lipase de *Candida antarctica*B, lors de la réaction de de la N-méthyl-glucamine avec l'acide oléique dans le 2-méthylbutan-2-ol comme solvant. L'étude de la cinétique de la réaction montre qu'en présence de N-méthyl-glucamine en excès, la CALB catalyse préférentiellement l' N- acylation²³.

Le tableau 1.1 illustre quelques exemples issus de la littérature, la chimiosélectivité de la lipase de *Candida antarctica* B avec différents substrats. On remarque clairement que l'enzyme est fortement chimiosélective pour de nombreuses réactions.

Tableau 1.1. Exemples de la chimiosélectivité de la lipase *Candida antarctica* B avec différents substrats.

Substrats A	Substrats B	Fonctions acylés	Conversion	Références
Acide Laurique	L-sérinamide	-OH	93%	²⁴
Prop-2-enoate	Propanolamine	-NH ₂	89%	²⁵
Acide Laurique	Ethanolamine	-NH ₂	95%	²⁶
Linoleate d'éthyle	1,3-diamino-2-propanol	-NH ₂	89%	²⁷
Acide oléique	Lys-Ser, Ser-Leu	-NH ₂	57%	²⁸
		-OH	45%	

1.4.2. Régiosélectivité

La régiosélectivité qualifie la préférence d'une lipase à interagir avec l'une des fonctions spécifiquement, lorsqu'un substrat présente plusieurs fonctions identiques dans des positions différentes (schéma 1.8). Dans de nombreuses études, les lipases sont utilisées pour catalyser sélectivement et avec des rendements élevés la O-acylation de nombreux substrats polyhydroxylés, tels que des sucres, des polyalcools ou des flavonoïdes^{29,30}.

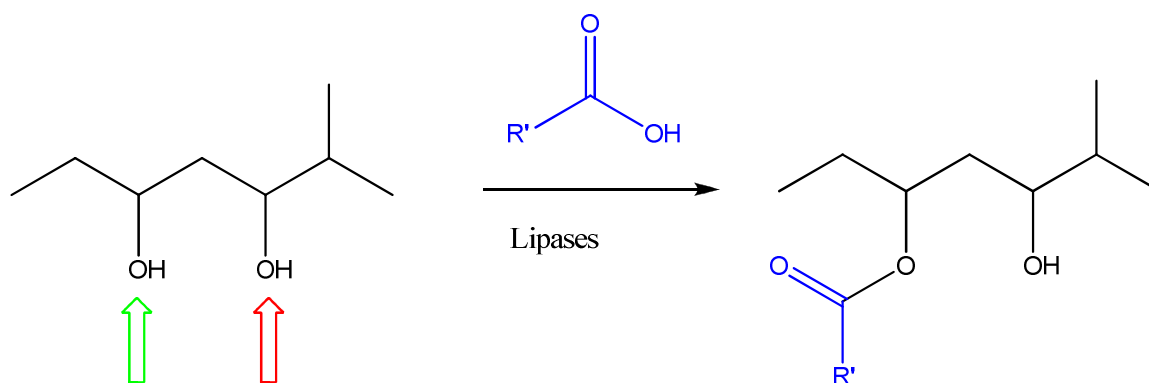


Schéma 1.8. La régiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels identiques présents au même substrat.

La lipase de *Candida antarctica* B par exemple, montre une plus grande affinité pour les alcools primaires par rapport aux alcools secondaires. Chen et *al.*³¹ ont utilisé cette propriété de la CALB pour acyler un analogue synthétique de la cytidine, la 5-azacytidine avec laurate de vinyle, en position 5 -OH permettant ainsi d'avoir La 5'-O-lauryl-5-azacytidine qui est plus liposoluble et plus stable dans l'organisme que la 5-azacytidine³¹.

Le tableau 1.2 donne quelques exemples de la régiosélectivité de la lipase de *Candida antarctica* B avec différents substrats. On remarque que l'enzyme est fortement régiosélective pour les fonctions alcools primaires.

Tableau 1.2. Exemples de la régiosélectivité de la lipase *Candida antarctica* B avec différents substrats.

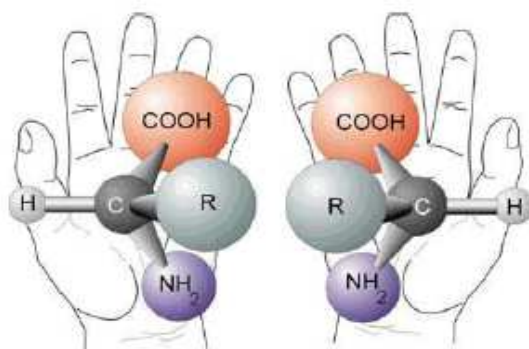
Substrats A	Substrats B	Fonctions acylés	Conversion	Références
Butanoate de vinyle	Propane-1,2-diol	-OH position 1	100%	32
Caprylate de vinyle	D-allose	-OH position 6	90%	33
Laurate de vinyle	Naringine	-OH position 6	70%	34
Acide laurique	Propane-1,2-diol	-OH position 1	54%	35
Acétate de vinyle	Andrographolide	-OH position 14	96%	36

1.4.3. Enantiosélectivité

Les lipases sont utilisées en chimie organique pour leur chimio- et régiosélectivité mais surtout pour leur énantiosélectivité lors de la résolution des mélanges racémiques d'alcools et d'amines secondaires ou des esters chiraux.

1.4.3.1. Chiralité et énantiosélectivité

Dans la nature, de nombreuses molécules sont chirales. Bien que les énantiomères aient des propriétés physiques essentiellement identiques dans un environnement non chiral, leur manque de symétrie leur confère des propriétés uniques.



Les énantiomères génèrent différentes réponses physiques dans nos corps. Par exemple, (*S*)-limonène est perçu comme un parfum de citron, tandis que l'autre énantiomère, la forme (*R*), est détecté comme un parfum orange.

La configuration absolue de la molécule est souvent importante dans les processus biologiques. Pour cette raison, la FDA (Food and Drug Administration) exige à toute société

pharmaceutique qui souhaiterait mettre sur le marché un nouveau composé racémique, de mettre en évidence, séparément, les caractéristiques de chaque énantiomère de ce composé racémique³⁷. De cet effet, l'énantiosélectivité des lipases pour la synthèse des molécules énantiomériquement pures trouve une large application dans ce domaine³⁸.

L'énantiosélectivité d'une enzyme est sa capacité à discriminer entre deux énantiomères d'un mélange racémique. Les lipases sont capables de faire la différence entre deux molécules énantiomères comme par exemple des alcools secondaires. La reconnaissance moléculaire entre l'enzyme et les énantiomères a été identifiée comme un paramètre clé responsable de l'énantiosélectivité des lipases. Selon le modèle de Kazlauskas et al.³⁹ l'énantiopréférence est basée sur les différentes tailles des deux poches qui constituent le site actif, la différence de taille entre les deux substituants de l'alcool secondaire et sur leur positionnement distinct dans les poches du site actif des lipases de *Pseudomonas cepacia* et de *Candida rugosa* (figure 1.5)³⁹.

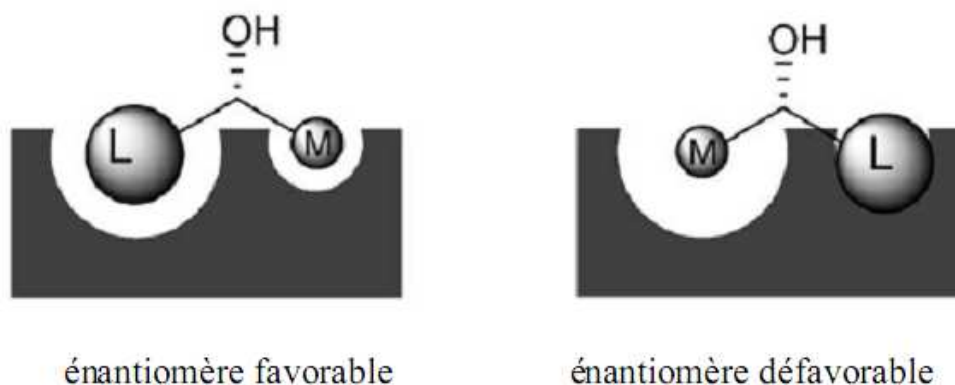


Figure 1.5. Règles de Kazlauskas et al. présentant l'énantiosélectivité des lipases pour les alcools secondaires⁴⁰.

Ohrner et ses collaborateurs,⁴¹ ont utilisé la lipase de *Candida antarctica* B pour la résolution énantiosélective de l'octan-2-amine et la 1-phényléthyl amine, pour synthétiser un groupe de produits aminés constituent des synthons importants pour l'industrie pharmaceutique^{41,42}.

Le tableau 1.3 illustre quelques exemples issus de la littérature concernant l'énantiosélectivité de la lipase de *Candida antarctica* B dans la résolution de quelques substrats racémiques.

Tableau 1.3. Exemples de l'énantiosélectivité de la lipase *Candida antarctica* B avec quelques substrats racémiques.

Substrats A	Substrats B	Produits	Enantio-préférence	Excès énantiomérique	Références
Carbonate de 2-butylvinyle	benzylamine	2-Butyl N-benzyl carbamate	<i>S</i>	99%	43
β -aminobutyrate d'éthyle	benzylamine	Amidoester	<i>R</i>	95 %	44
Butanoate de vinyle	1-Phenoxy-2-pentanol	1-Phenoxy-2-pentyl butanoate	<i>R</i>	>99 %	45
Acétate de vinyle	1-(furan-2-yl)ethanol	1-(furan-2-yl)éthyl acétate	<i>R</i>	>97 %	46
Méthoxyacetate d'éthyle	1-Naphtalenylylamine	Amide	<i>R</i>	>99,9%	47

1.4.3.2. Détermination de l'énantiosélectivité

Dans le cas de la résolution cinétique d'un mélange racémique par les lipases, l'énantiosélectivité peut être caractérisée par la détermination des excès énantiomériques du substrat (ee_s) (1) ou du produit (ee_p) (2) grâce à des relations mathématiques décrites par Sih et al.⁴⁸ en 1982. La variation des paramètres (ee_s) et (ee_p) est fonction du taux de conversion (c) (3).

Soit l'excès énantiomérique du substrat (ee_s), qui détermine la pureté optique du substrat en un énantiomère.

$$ee_s = \frac{B - A}{A + B} \quad (1)$$

Soit l'excès énantiomérique du produit (ee_p), qui détermine la pureté optique du produit en un énantiomère.

$$ee_p = \frac{P - Q}{P + Q} \quad (2)$$

Soit la conversion chimique de la réaction (c), qui représente le taux d'avancement de la réaction ($1 > c > 0$).

$$c = 1 - \frac{A + B}{A_0 + B_0} = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (3)$$

(Ou, A_0 et B_0 représentent les concentrations initiales des énantiomères du substrat, A et B représentent les concentrations des énantiomères du substrat après un certain temps de réaction, P et Q représentent les concentrations des énantiomères du produit après un certain temps de réaction).

Afin de disposer d'un paramètre permettant de décrire le degré d'énantioselectivité d'une enzyme, Chen et al.⁴⁹ ont introduit la notion de facteur d'énantioselectivité (E), qui caractérise l'affinité spécifique d'une enzyme pour un énantiomère donné, définit comme étant le rapport des vitesses de formation des deux énantiomères en compétition^{49,50}.

$$E = \frac{V_R}{V_S} \quad (4)$$

Le facteur E peut également être obtenu par rapport aux excès énantiomériques de substrat et produit et au taux de conversion (c), en tenant compte les équations (1), (2) et (3) le facteur E s'exprime comme suit :

$$E = \frac{\ln [1 - c(1 + ee_p)]}{\ln [1 - c(1 - ee_p)]} \quad (5) \quad E = \frac{\ln [(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln [(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (6)$$

Ces équations sont valables uniquement dans le cas d'une réaction de résolution cinétique enzymatique irréversible.

Les lipases très énantioselectives donnent des valeurs très élevées de facteur d'énantioselectivité (E), le cas idéal est d'avoir une pureté optique optimale des deux énantiomères à une conversion de 50%.

- $E = 1$: pas de discrimination entre les énantiomères, la lipase est non énantioselective;
- $E < 10$: la discrimination entre les énantiomères est faible, mais l'énantiomère de substrat qui n'ayant pas réagi peut être obtenu avec pureté élevée ($ee_s > 99\%$) au-delà de 50% de conversion;
- $10 < E < 100$: la lipase est énantioselective, permettant ainsi l'obtention d'un énantiomère de substrat et d'un énantiomère de produit avec une pureté (ee_s, ee_p) allant de 80 à 98%, en fonction du degré d'avancement de la réaction;

- $E > 100$ et E tendant vers l'infini : rendent compte respectivement de la sélectivité excellente et absolue de la lipase. Ces valeurs de E conduisent à l'obtention d'un énantiomère de substrat et d'un énantiomère de produit purs à 50% de conversion du mélange racémique.

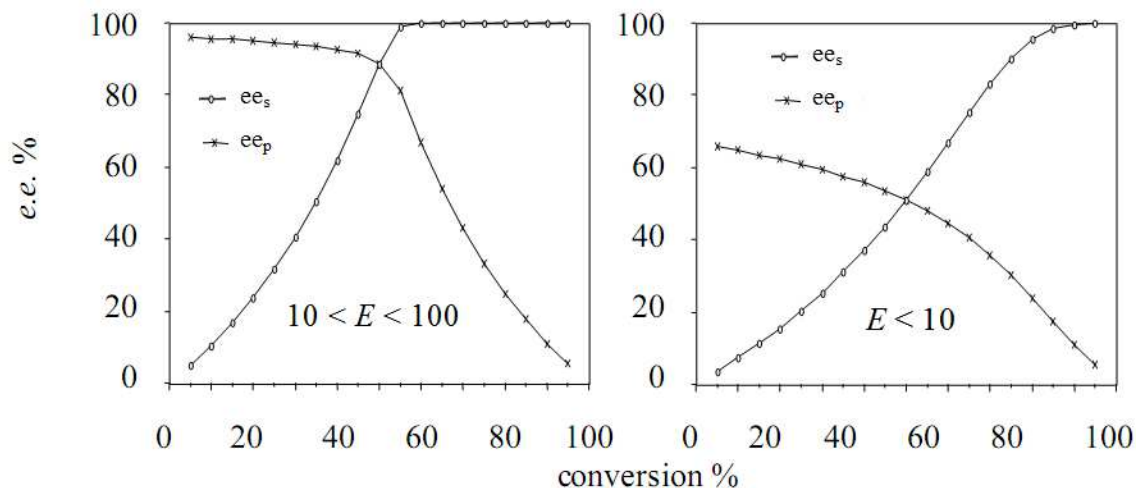


Figure 1.6. Dépendance des excès énantiomériques ee_s et ee_p de la conversion dans une résolution cinétique irréversible (simulation de E avec $E < 10$ et $10 < E < 100$)⁵¹.

1.4.3.3. Aspect cinétique et thermodynamique de l'énantiosélectivité

Lors d'une résolution cinétique catalysée par les lipases, la variation des excès énantiomériques est en fonction du taux de conversion. À des faibles taux de conversion et avec une lipase énantiosélective, l'un des énantiomères composant le mélange racémique réagit plus rapidement (celui le mieux reconnu par la lipase) par rapport à l'autre énantiomère, conduisant ainsi à un ee_p très élevé. Au fur et à mesure de l'avancement de la réaction, la quantité d'énantiomère le mieux reconnu diminue dans le mélange racémique, au profit de l'autre énantiomère. Ce dernier sera alors à son tour transformé par la lipase, entraînant une diminution de ee_p et une augmentation de ee_s ⁵².

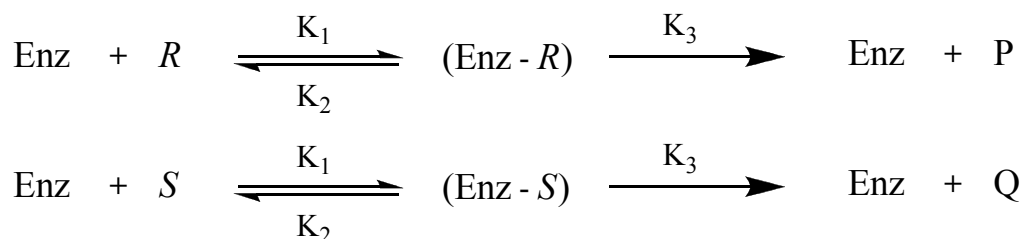


Figure 1.7. Résolution enzymatique, R et S représentent les énantiomères du substrat, P et Q représentent les énantiomères du produit.

De point de vue thermodynamique, l'énantiosélectivité est le résultat d'une différence d'énergie libre d'activation ($\Delta_{R-S}\Delta G$) entre les deux énantiomères *R* et *S*, en se basant sur l'hypothèse que l'état de transition de plus faible énergie doit correspondre à l'énantiomère qui est le plus vite transformé par la lipase (Figure 8). Cette différence d'énergie libre d'activation est elle-même reliée à la différence entre l'enthalpie d'activation et l'entropie (équation 7)⁵³.

$$\Delta_{R-S}\Delta G = -RT\ln E = \Delta_{R-S}\Delta H - T\Delta_{R-S}\Delta S \quad (7)$$

La différence en terme enthalpique d'activation ($\Delta_{R-S}\Delta H$) peut se traduire par la différence de complémentarité stérique de chaque énantiomère dans l'état de transition, prenant en compte les interactions stériques et électrostatiques entre l'enzyme, son substrat, les composants de la réaction et le solvant. Plus la complémentarité entre l'énantiomère et l'enzyme sera optimale, plus l'enthalpie sera faible^{54,55}.

La variation entre les deux énantiomères en terme entropique est dépendante de plusieurs facteurs, tels que la liberté spatiale du substrat dans le site actif (volume hydrodynamique), les différences de degré de liberté des résidus de la protéine et les différences de solvation entre les deux énantiomères⁵⁶⁻⁵⁹.

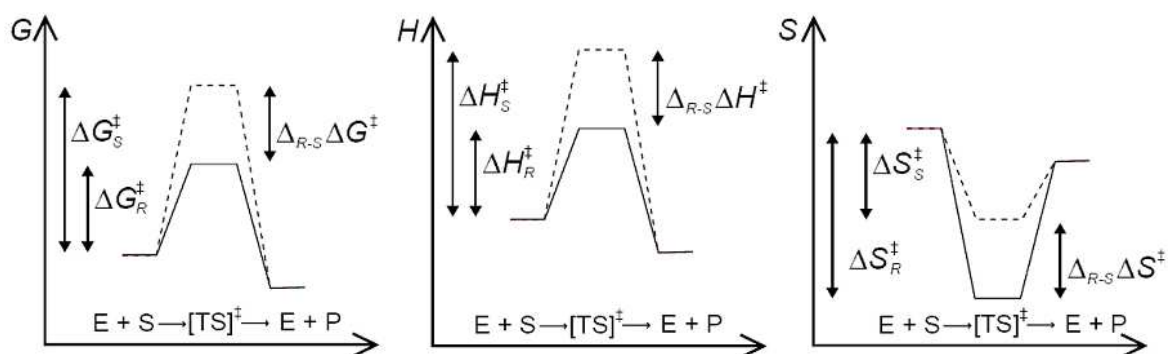


Figure 1.8. Diagrammes énergétiques d'une réaction énantiosélective catalysée par une lipase. *R* et *S* sont les énantiomères, *G* : énergie libre de Gibbs, *H* : enthalpie et *S* : entropie⁶⁰.

1.5. Techniques d'amélioration de la performance des lipases

L'utilisation des lipases pour des applications biocatalytiques au niveau industriel, en particulier dans des solvants organiques, est largement établie en raison de ses nombreux avantages, y compris la possibilité de transformer ou de synthétiser d'innombrables composés d'intérêt dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire et la chimie fine,

particulièrement ceux insolubles ou instables dans l'eau. Cependant, leur activité et leur énantiosélectivité pour divers substrats synthétiques ne sont pas toujours suffisantes. Différentes méthodes, telles que l'ingénierie des solvants, l'immobilisation enzymatique et la formulation enzymatique ont été exploitées afin d'améliorer la performance des lipases.

1.5.1. Immobilisation

L'immobilisation des enzymes dans des supports ou par réticulation est une approche pour les stabiliser qui a pour but d'augmenter le recyclage du biocatalyseur. Cette technique consiste à confiner l'enzyme dans un espace ou dans un réseau en vue de restreindre sa mobilité. Il existe différentes techniques d'immobilisation pouvant être aussi bien physiques que chimiques. Les principales techniques d'immobilisation sont classées en quatre catégories :

a. Adsorption physique : Cette technique consiste à fixer l'enzyme par liaisons physiques à la surface d'un corps adsorbant, minéral ou organique grâce à des liaisons hydrogènes ou des interactions faibles comme les forces de van der Waals. Cette méthode est la plus économique et la plus simple d'immobilisation des enzymes.

b. Adsorption chimique (liaison covalente) : l'immobilisation par liaison covalente permet de remédier au problème de désorption de l'enzyme (présent dans l'adsorption physique) est de la lier au support de façon covalente, conduit ainsi à la formation des liaisons très solides entre enzyme support. Dans cette méthode, une modification (activation) de la surface du support est souvent nécessaire.

c. Encapsulation : Cette technique consiste à inclure l'enzyme dans un réseau de natures diverses (polymérique ou inorganique: gel de polyacrylamide, d'amidon, de gélatine, d'alginate). Le procédé est très simple et universel, mais les risques de fuite ne sont pas négligeables si les mailles du réseau sont larges. La différence entre l'adsorption physique et l'encapsulation n'est pas très claire car les interactions sont les mêmes à la seule différence qu'en encapsulant l'enzyme, elle ne peut plus se désorber⁶¹.

d. Cross-linking (réticulation) : La réticulation consiste à lier les enzymes entre elles par leurs groupes terminaux et par des agents réticulant. Des agrégats et des cristaux sont ainsi formés et sont appelés respectivement "cross-linking enzyme aggregates" (CLEA) et "cross-linking enzyme crystals" (CLEC). Cette technique offre plusieurs avantages puisque la concentration d'enzyme dans le catalyseur est élevée, l'enzyme est bien protégée et enfin le coût de production dû à l'absence de support devrait être faible.

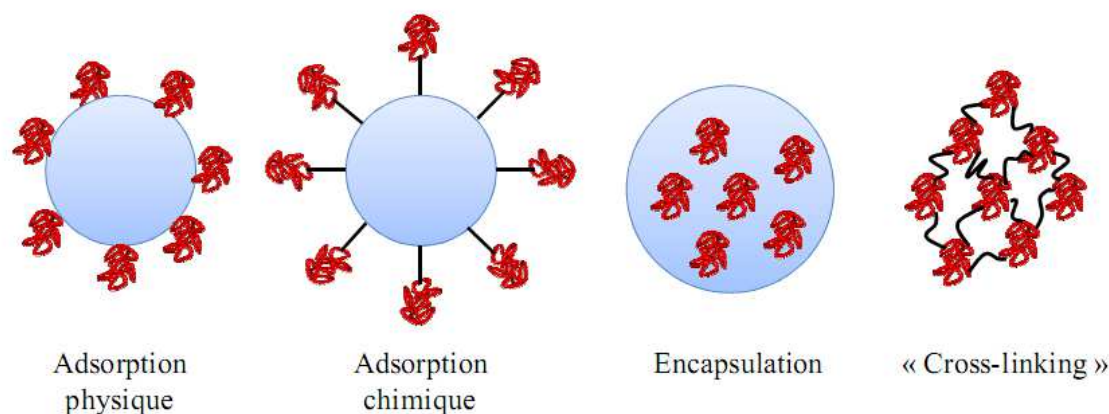


Figure 1.9. Méthodes d'immobilisation des enzymes.

Dans les applications industrielles, les lipases sont souvent utilisées dans leurs états immobilisés pour de nombreux avantages qui facilitent la mise en œuvre de procédé, principalement une simple récupération du catalyseur et des produits, une réutilisation rapide du catalyseur, une possibilité de fonctionnement continu, mais également il est rapporté dans plusieurs recherches que l'immobilisation peut augmenter l'activité et la sélectivité des lipases^{62,63}.

Le tableau 1.4 illustre un exemple issu de la littérature, l'amélioration de l'activité et de l'énantiosélectivité de la lipase de *Arthrobacter sp* (lipase KM) par son immobilisation sur différents supports. On remarque clairement l'effet positif de l'immobilisation sur la performance de la lipase.

Tableau 1.4. Immobilisation de la lipase KM sur différents supports : utilisation de la lipase immobilisée dans la résolution cinétique du 4-hydroxy-3-méthyl-2-(2-propényl)-2-cyclopentén-1-one (HMPC) par vinylacétate⁶³.

Lipase dérivatives	Taux d'immobilisation	Activité (U)	Activité spécifique (U/g protéine)	Enantiosélectivité
KM non-immobilisée	-	3.7	0.10	85
Methacryl-KM	57	29.2	1.14	≥400
Vinyl-KM	43	9.8	0.51	≥400
Dodecyl-KM	76	24.0	0.70	≥400
Aminopropyl-KM	65	7.4	0.25	≥400

1.5.2. Lyophilisation

Les réactions sensibles à l'eau, telle que la transtérification catalysée par les lipases en milieu organique, nécessite d'utiliser les enzymes en présence de faible quantité d'eau. La lyophilisation est la méthode la plus courante pour la préparation de biocatalyseurs pour ce genre de réactions⁶⁴. Cette technique permet une plus longue durée de conservation des protéines et leur stabilisation en les gardant dans des conditions anhydres et dans une atmosphère inerte⁶⁵. Elle basée sur la sublimation de la glace contenue dans des solutions ou des suspensions, préalablement solidifiées par congélation, que l'on souhaite « assécher ». Elle conserve le produit dans des conditions anhydres, évitant ainsi les processus d'hydrolyse. Le principe de séchage par lyophilisation repose sur des variations de pression et température⁶⁶. La formulation des lipases par lyophilisation est souvent réalisée par deux approches :

a. Lyophilisation (Mémoire pH)

Zaks et Klivanov sont les premiers qu'ont rapportés, dans l'une de leurs études portée sur la catalyse enzymatique dans les solvants organiques^{67,68}, que les enzymes ont une activité catalytique plus élevée s'ils sont récupérés après une lyophilisation, à partir une solution tampon aqueuse ajustée sur le pH optimal des enzymes données. Ils ont appelé ce phénomène « mémoire pH » et ont mentionné que la protéine maintienne dans le solvant organique le même état de protonation qu'elle a eu dans la solution tampon. Néanmoins, si les espèces chimiques acides ou bases (réactants, produits ou impuretés) sont présentes dans le milieu réactionnel, une variation de l'état ionique d'enzymes pourrait se produire, entraînant des variations d'activité catalytique. Pour surmonter cet inconvénient, des tampons solubles dans les solvants organiques (par exemple triisooctylamine avec son chlorhydrate et acide triphenylacétique avec son sel de sodium)⁶⁹ et même des tampons à semi-conducteurs (par exemple, AMPSO, les LAVETTES, les PIPES, et leur sodium sel)⁷⁰ peuvent être ajoutés au milieu pour garder l'ionisation optimale d'enzymes.

b. Lyophilisation avec additifs (Lyoprotection)

L'activité enzymatique dans les solvants organiques peut également être améliorée par l'utilisation des additifs appropriés.

Les molécules telles que des ligands ressemble au substrat, des sucres, poly(éthylène)glycol (PEG), des éthers couronnes et des sels inorganiques, ajoutées à une solution aqueuse

d'enzymes avant lyophilisation, augmentent l'activité catalytique jusqu'à plusieurs ordres de grandeur. Le mécanisme d'activation dépend de la nature de l'additif. Des inhibiteurs compétitifs ou des analogues de substrat (enlevés de l'enzyme, après lyophilisation, par extraction avec des solvants anhydres) peuvent agir par ce qu'on appelle « effet d'impression »^{71,72}. Dans ce cas, des changements conformationnels induits dans l'eau par la liaison du ligand au site actif d'enzymes, qui sont maintenus après élimination du ligand et la suspension du biocatalyseur dans des solvants organiques, en raison de la rigidité élevée d'enzymes dans les milieux anhydres. Lorsque des analogues de substrat peu hydrosolubles sont employés comme ligands, leur concentration dans l'eau peut être augmentée par une modification chimique appropriée ou par l'ajout des co-solvants organiques dans le milieu de lyophilisation⁷³. Pour d'autres additifs tels que les éthers couronnes^{74,75}, PEG^{76,77} et sucres (sucrose, sorbitol, etc.)⁷⁸, il a été suggéré que l'augmentation de l'activité enzymatique est due à la lyoprotection. Des analyses conformationnelles réalisées par plusieurs groupes de recherche sur différentes protéines au moyen de FT/IR⁷⁹⁻⁸¹ ont montré que la lyophilisation peut affecter la structure secondaire des protéines. La présence de lyoprotecteurs semble empêcher de tels changements conformationnels. Par exemple, Griebenov et Klibanov⁸² ont démontré que l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine conserve une structure secondaire proche à celle native par co-lyophilisation avec le sorbitol. Le même phénomène a été observé par De Paz et al.⁸⁰ avec subtilis ajouté au saccharose ou au tréhalose et par Vecchio et al.⁸¹ avec lipase PC ajouté avec PEG. Différents mécanismes d'activation ont été mis en évidence pour différentes enzymes co-lyophilisées avec des éthers couronnes. Van Unen et al.⁸³ ont suggéré que l'activation par les éthers couronnes de la chymotrypsine et de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* est principalement due à un effet de lyoprotection.

Le tableau 1.5 illustre un exemple issu de la littérature de la formulation par lyophilisation avec additifs de la lipase CALB et la lipase PC utilisée par la suite dans la transestérification de 1-octanol avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle. On remarque clairement que l'activité des lipases utilisées a été améliorée.

Tableau 1.5. Comparaison de transestérification activité et totale activité dans solvant organique de la lipase CALB et la lipase PC en différente forme de formulation⁸⁴.

La forme d'enzyme	Transestérification activité dans solvant organique^(a)	Totale activité dans solvant organique^(b)
CALB brute	0.003	0.004
Novozym 435	0.29	0.44
CALB+PEG	0.51	0.70
CALB+OA	0.26	0.42
PC brute	0.04	0.12
PC+PEG	0.26	0.39
CLEC-PC	0.02	0.02

^(a)la transestérification activité a été mesurée on utilisant 1-octanol comme nucléophile et vinyle acétate comme donneur d'acyle.

^(b)totale activité est la transestérification activité plus l'hydrolytique activité, elle a été mesurée dans une solution tampon de phosphate de potassium (0.05 M, pH 7) on utilisant l'acétate de vinyle comme substrat.

Références bibliographiques

- (1) Taipa, M. A.; Aires-Barros, M. R.; Cabral, J. M. S. *J. Biotechnol.* **1992**, *26* (2–3), 111–142.
- (2) Sharma, R.; Chisti, Y.; Chand, U. *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627–662.
- (3) Klivanov, A. M. *Nature* **2001**, *409* (January), 786–790.
- (4) Gupta, R.; Gupta, N.; Rathi, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64* (6), 763–781.
- (5) Reetz, M. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6* (2), 145–150.
- (6) Dumitriu, E.; Secundo, F.; Patarin, J.; Fechete, I. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *22* (3–4), 119–133.
- (7) Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Ortiz, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31* (6), 775–783.
- (8) Ben Salah, R.; Ghamghui, H.; Miled, N.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y. *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *103* (4), 368–372.
- (9) Wang, J. Y.; Ma, C. L.; Bao, Y. M.; Xu, P. S. *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, *51* (1), 40–46.
- (10) Lee, K. T.; Akoh, C. C. *Biotechnology Techniques*. 1998, pp 381–384.
- (11) Lee, J. H.; Lee, D. H.; Lim, J. S.; Um, B. H.; Park, C.; Kang, S. W.; Kim, S. W. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18* (12), 1927–1931.
- (12) González-Sabín, J.; Gotor, V.; Rebolledo, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (3), 481–488.
- (13) Nardini, M.; Dijkstra, B. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9* (6), 732–737.
- (14) Schrag, J. D.; Li, Y.; Cygler, M.; Lang, D.; Burgdorf, T.; Hecht, H. J.; Schmid, R.; Schomburg, D.; Rydel, T. J.; Oliver, J. D.; Strickland, L. C.; Dunaway, C. M.; Larson, S. B.; Day, J.; McPherson, A. *Structure* **1997**, *5* (2), 187–202.
- (15) Uwe Theo Bornscheuer, R. J. K. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations, 2nd Edition*; Wiley-Blackwell: University of Edinburgh, 2006.
- (16) Pleiss, J.; Fischer, M.; Peiker, M.; Thiele, C.; Schmid, R. D. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2000**, *10* (5), 491–508.
- (17) Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenbourg, J. P.; Christiansen, L.; Huge-Jensen, B.; Norskov, L.; Thim, L.; Menge, U. *Nature* **1990**, *343* (6260), 767–770.
- (18) Derewenda, Z. S.; Derewenda, U.; Dodson, G. G. *J. Mol. Biol.* **1992**, *227* (3), 818–839.

- (19) Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93* (1–2), 67–80.
- (20) Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (8), 3180–3186.
- (21) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *40* (3–4), 111–120.
- (22) Jaeger, K.-E.; Eggert, T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13* (4), 390–397.
- (23) Maugard, T.; Remaud-Simeon, M.; Petre, D.; Monsan, P. *Tetrahedron* **1997**, *53* (14), 5185–5194.
- (24) Zhang, X.; Adachi, S.; Watanabe, Y.; Matsuno, R. *Food Res. Int.* **2005**, *38* (3), 297–300.
- (25) Rustoy, E. M.; Baldessari, A. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *39* (1), 50–54.
- (26) Tufvesson, P.; Annerling, A.; Hatti-Kaul, R.; Adlercreutz, D. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97* (3), 447–453.
- (27) Couturier, L.; Taupin, D.; Yvergnaux, F. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *56* (1), 29–33.
- (28) Husson, E.; Humeau, C.; Paris, C.; Vanderesse, R.; Framboisier, X.; Marc, I.; Chevalot, I. *Process Biochem.* **2009**, *44* (4), 428–434.
- (29) Simeó, Y.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R. *Green Chem.* **2009**, *11*, 855–862.
- (30) Gao, W. L.; Li, N.; Zong, M. H. *J. Biotechnol.* **2013**, *164*, 91–96.
- (31) Chen, X.-Y.; Zong, M.-H.; Lou, W.-Y.; Wu, H. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *151* (1), 21–28.
- (32) Ciuffreda, P.; Alessandrini, L.; Terraneo, G.; Santaniello, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (20), 3197–3201.
- (33) AFACH, G.; KAWANAMI, Y.; IZUMORI, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69* (4), 833–835.
- (34) Mellou, F.; Lazari, D.; Skaltsa, H.; Tselepis, A. D.; Kolisis, F. N.; Stamatis, H. *J. Biotechnol.* **2005**, *116* (3), 295–304.
- (35) Yadav, G. D.; Lathi, P. S. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *38* (6), 814–820.
- (36) Chen, Z.-G.; Zhu, Q.; Zong, M.-H.; Gu, Z.-X.; Han, Y.-B. *Process Biochem.* **2011**, *46* (8), 1649–1653.
- (37) Strong, M. *Food Drug Law J.* **1999**, *54* (3), 463–487.
- (38) Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *64* (1–2), 1–22.
- (39) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (8), 2656–2665.

- (40) Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4* (1), 81–88.
- (41) Frykman, H.; Öhrner, N.; Norin, T.; Hult, K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34* (8), 1367–1370.
- (42) Uppenberg, J.; Oehrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T. A. *Biochemistry* **1995**, *34* (51), 16838–16851.
- (43) Pozo, M.; Gotor, V. *Tetrahedron* **1993**, *49* (20), 4321–4326.
- (44) Sánchez, V. M.; Rebolledo, F.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8* (1), 37–40.
- (45) Jacobsen, E. E.; Andresen, L. S.; Anthonsen, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (4), 847–850.
- (46) Mavrynsky, D.; Päiviö, M.; Lundell, K.; Sillanpää, R.; Kanerva, L. T.; Leino, R. *European J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (9), 1317–1320.
- (47) Knežević, A.; Landek, G.; Dokli, I.; Vinković, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22* (9), 936–941.
- (48) Chen, C.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc. New York* **1982**, *104*, 1294–1299.
- (49) Chen, C. S.; Wu, S. H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (9), 2812–2817.
- (50) Ducret, A.; Trani, M.; Lortie, R. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22* (4), 212–216.
- (51) Rotticci, D. Understanding and Engineering the Enantioselectivity of *Candida antarctica* Lipase B towards sec -Alcohols, Stockholm, 2000.
- (52) Anthonsen, T.; Jongejan, J. A. In *Lipases Part B: Enzyme Characterization and Utilization*; Enzymology, B. T.-M. in, Ed.; Academic Press, 1997; Vol. Volume 286, pp 473–495.
- (53) Schulz, T.; Pleiss, J.; Schmid, R. D. *Protein Sci.* **2000**, *9* (6), 1053–1062.
- (54) Zuegg, J.; Hönl, H.; Schrag, J. D.; Cygler, M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1997**, *3* (1–4), 83–98.
- (55) Tafi, A.; van Almsick, A.; Corelli, F.; Crusco, M.; Laumen, K. E.; Schneider, M. P.; Botta, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (12), 3659–3665.
- (56) Ottosson, J.; Fransson, L.; Hult, K. *Protein Sci.* **2002**, *11* (6), 1462–1471.
- (57) DeTar, D. F. *Biochemistry* **1981**, *20* (7), 1730–1743.
- (58) Philips, R. S. *Enzym. Microbiol. Biotechnol* **1992**, *14*, 417–419.
- (59) Ottosson, J.; Hult, K. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11* (4–6), 1025–1028.
- (60) Ottosson, J. Enthalpy and Entropy in Enzyme Catalysis - A Study of Lipase Enantioselectivity, Royal Institute of technology Stokholm, 2001.

- (61) Sheldon, R. A.; Van Pelt, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (42), 6223–6235.
- (62) Bustos-jaimés, I.; García-torres, Y.; Santillán-uribe, H. C.; Montiel, C. *Journal Mol. Catal. B, Enzym.* **2013**, 89, 137–141.
- (63) Yang, G.; Wu, J.; Xu, G.; Yang, L. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, 57 (1–4), 96–103.
- (64) Serdakowski, A. L.; Dordick, J. S. *Trends Biotechnol.* **2008**, 26 (1), 48–54.
- (65) Ugwu, S.; Zhang, A.; Parmar, M.; Miller, B.; Sardone, T.; Peikov, V.; Ahmad, I. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2005**, 31 (2), 223–229.
- (66) Nail, S. L.; Jiang, S.; Chongprasert, S.; Knopp, S. A. *Pharm. Biotechnol.* **2002**, 14, 281–360.
- (67) Zaks, a; Klivanov, a M. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (1), 8017–8021.
- (68) Zaks, A.; Klivanov, A. M. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (7), 3194–3201.
- (69) Blackwood, A. D.; Curran, L. J.; Moore, B. D.; Halling, P. J. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1994**, 1206 (2), 161–165.
- (70) Partridge, J.; Halling, P. J.; Moore, B. D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, No. 3, 465–471.
- (71) Mingarro, I.; Gonzalez-Navarro, H.; Braco, L. *Biochemistry* **1996**, 35 (30), 9935–9944.
- (72) Dai, L.; Klivanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96 (17), 9475–9478.
- (73) M. T. Ru, S. Y. Hirokane, A. S. Lo, J. S. Dordick, J. A. Reimer, D. S.; Clark. *J. Am. Chem. Soc* **2000**, 122, 1565–1571.
- (74) van Unen, D.-J.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 59 (5), 553–556.
- (75) Santos, A. M.; Vidal, M.; Pacheco, Y.; Frontera, J.; Baez, C.; Ornellas, O.; Barletta, G.; Griebenow, K. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 74 (4), 295–308.
- (76) Secundo, F.; Spadaro, S.; Carrea, G.; Overbeeke, P. L. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 62 (5), 554–561.
- (77) Secundo, F.; Carrea, G.; Soregaroli, C.; Varinelli, D.; Morrone, R. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 73 (2), 157–163.
- (78) Debulis, K.; Klivanov, A. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 41 (5), 566–571.
- (79) S.J. Prestrelski, . T. Arakawa, J. F. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 303 (2), 465–473.
- (80) DePaz, R. A.; Dale, D. A.; Barnett, C. C.; Carpenter, J. F.; Gaertner, A. L.; Randolph, T. W. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 31 (6), 765–774.
- (81) Vecchio, G.; Zambianchi, F.; Zacchetti, P.; Secundo, F.; Carrea, G. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 64 (5), 545–551.
- (82) Griebenow, K.; Klivanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92 (24), 10969–

10976.

- (83) van Unen, D.-J.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77* (3), 248–255.
- (84) Secundo, F.; Carrea, G. *Chemistry* **2003**, *9* (14), 3194–3199.

2. L'acylation enzymatique

2.1. Définitions

La réaction d'acylation est une réaction dans laquelle un donneur d'acyle réagit avec un nucléophile tel qu'une amine ou un alcool. La fonction thiol est également susceptible d'être acylée pour donner une liaison thioester. Ainsi l'acylation enzymatique se fait par l'utilisation d'une hydrolase, plus souvent une lipase, dans un milieu non aqueux. Dans ce milieu hydrophobe, la réaction inverse de l'hydrolyse est favorisée et permet ainsi l'établissement d'une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile. L'enzyme est capable de catalyser la formation d'une liaison ester lorsque le nucléophile comporte une fonction hydroxyle ou bien la formation d'une liaison amide lorsque celui-ci comporte une fonction amine (figure 2.1).

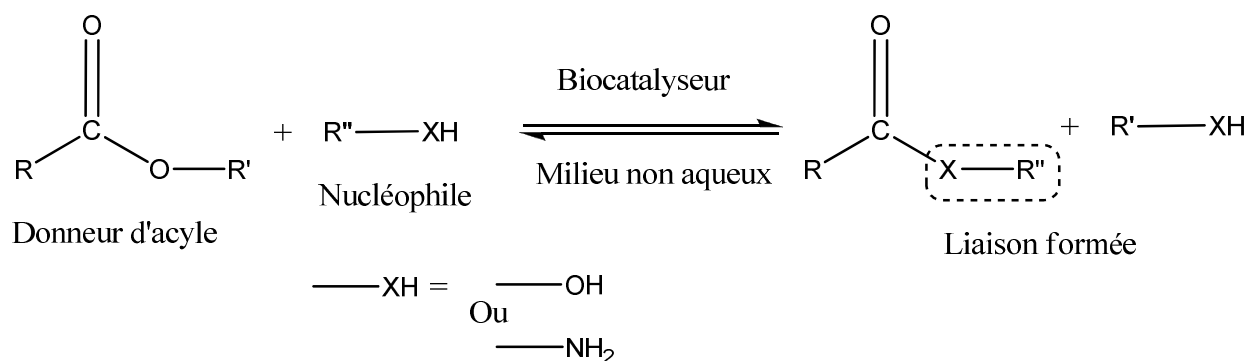


Figure 2.1. Schéma général d'une réaction d'acylation catalysée par une enzyme.

L'acylation par voie enzymatique présente beaucoup d'avantages par rapport à la voie chimique, notamment dans les points suivants :

1. Vitesse de réaction : les vitesses des réactions enzymatiques sont multipliées par des facteurs compris entre 10^6 et 10^{12} par rapport aux réactions correspondantes non-catalysées.
2. Conditions de réaction : les réactions enzymatiques peuvent avoir lieu dans des conditions douces de température ambiante de pression atmosphérique et de pH.
3. Spécificité réactionnelle : cette propriété singularise les biocatalyseurs par rapport aux catalyseurs chimiques et permet d'éviter la formation de produits secondaires et leur corollaire, des étapes de purification fastidieuses.

Les travaux réalisés en catalyse enzymatique pour synthétiser les dérivés acylés sont nombreux. Ils concernent de nombreux types de substrats aussi bien monofonctionnels,

comme les alcools et les amines, que polyfonctionnels tels que les polyols, les amino-alcools et les flavonoides¹⁻³. Généralement, à travers ces réactions, c'est l'énantiosélectivité qui est recherchée et c'est ainsi que de nombreuses biomolécules énantiomériquement enrichies sont produites par la voie biocatalytique⁴.

2.2. Paramètres influençant l'acylation enzymatique

La réactivité et la sélectivité de l'acylation enzymatique sont influencées par plusieurs facteurs, notamment la nature d'enzyme, la structure des substrats, la température et l'activité de l'eau (a_w).

2.2.1. La nature d'enzyme

L'enzyme utilisée, son origine et son mode d'obtention, constituent un facteur primordial et déterminant pour l'acylation enzymatique, car chaque lipase possède sa propre caractéristique. Dans ce contexte, nous citons l'exemple suivant issu de la littérature⁵ où de différences notables ont été observées dans l'activité hydrolytique de quelques lipases commerciales. Comme le montre le tableau ci-dessous, les activités enzymatiques changent non seulement avec l'origine de l'enzyme mais également, pour une même enzyme, avec le procédé ayant permis d'y accéder, les procédés diffèrent selon le fabricant.

Tableau 2.1. Activité hydrolytique de quelques lipases commerciales vis-à-vis de l'huile d'olive⁵.

Lipase	Code de fabricant	Vitesse initiale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Régiosélectivité	Sélectivité
<i>Aspergillus niger</i> , 1	Amano AP	0.154	1,3	18
<i>Aspergillus niger</i> , 2	Amano K	11.2	1,2,3	10
<i>Candida rugosa</i>	Enzeco	9.82	1,2,3	18
	Sigma	9.70	1,2,3	18
<i>Mucor miehei</i>	Amano MAP	2.67	1,3	<12
	Gist Brocades-S	40.0	1,3	<12
	Novo	5.33	1,3	<12
Porcine pancréatique	Sigma	15.6	1,3	<12
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Gist Brocades	33.4	1,3	<12

2.2.2. La structure de substrat

La structure du substrat joue un rôle majeur dans la faisabilité de la réaction d'acylation enzymatique, particulièrement sur l'énantiopréférence des lipases. La règle empirique décrite par Kazlauskas et *al.*⁶ explique la sélectivité de la CALB vis-à-vis les alcools racémiques. Les substituants du carbone chiral (le grand et le moyen) sont placés dans les deux poches du site actif selon leur taille. L'énantiomère qui peut être placé de façon favorable (tel que représenté dans le schéma 2.1) réagit plus rapidement selon cette règle.

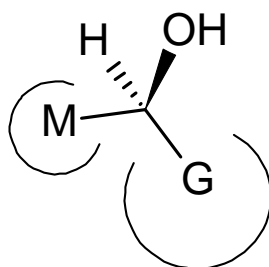


Schéma 2.1. Modèle empirique la prédiction de l'énantiosélectivité des alcools secondaires racémiques. G et M représentent les substituants grand et moyen liés au centre asymétrique⁶.

Ce modèle est simple basé sur la taille des substituants au centre asymétrique utilisable pour estimer l'énantiosélectivité vis-à-vis les alcools secondaires⁷. En règle générale, une sélectivité élevée ($E > 100$) et une vitesse de réaction relativement élevée peuvent être attendues pour les substrats avec le petit substituant du centre asymétrique de taille inférieur à un radical propyle et supérieur à un éthyle pour le grand substituant.

A titre d'illustration, le tableau suivant rassemble deux études sur l'influence de la structure du substrat sur l'activité et l'énantiosélectivité de la CALB. Dans la première, Overbeeke et *al.*⁸ ont trouvé que l'énantiosélectivité a augmenté avec longueur de la chaîne de l'alcool aléphasique, au contraire de l'activité qui a diminué. Dans la deuxième étude, Johnson et *al.*⁹ ont étudié l'influence de la taille du cycle et du substituant en position α d'un alcool cyclique, la CALB a exhibé une énantiopréférence élevée avec l'alcool dont le substituant est volumineux.

Tableau 2.2. Exemples issus de la littérature de l'activité de la CALB en fonction de la structure du substrat.

Substrat	Structure	Temps (h)	C(%)	E	Enantio-préférence	Référence
1	R=Pr	0.20	34	>500	R	
2	R=i-Pr	2.48	35	>500	R	8
3	R=hexyl	0.21	28	>900	R	
4	n=1 X=I	1.30	49	>700	R	
5	n=2 X=I	18.00	50	>450	R	
6	n=2 X=Br	18.00	48	>110	R	9
7	n=2 X=H	1.30	48	1.6	R	
8	n=3 X=I	96.00	49	>240	R	

2.2.3. Le donneur d'acyle

L'acylation enzymatique d'alcools racémiques par les lipases implique la présence de deux substrats dans leur site actif, un alcool chiral et un donneur d'acyle. Les parties acyle et alcool se positionnent dans le site actif pour former l'intermédiaire tétraédrique. Il n'est donc pas surprenant que la taille et la forme de la chaîne acyle intervienne dans la discrimination des énantiomères. D'autre part, l'utilisation d'un excès de donneur d'acyle dans l'acylation enzymatique permet de maintenir constant le rapport acyl-enzyme/enzyme libre, et d'orienter ainsi la réaction dans le sens de la synthèse.

Dans ce contexte, Ottosson et *al.*¹⁰ ont montré expérimentalement que la longueur de la chaîne acyle d'esters vinyliques employés comme donneurs d'acyle avait une grande influence sur l'énantiosélectivité (E est proportionnel à la longueur de la chaîne carbonée de la partie acyle qui passe de 4 à 8 atomes de carbone) (tableau 2.3). L'étude, réalisée par modélisation moléculaire, a révélé que le volume accessible dans le site actif pour la chaîne acyle du donneur d'acyle, lors de l'état de transition, est différent pour chacun des énantiomères. Parmi les donneurs d'acyle vinyliques utilisés dans cette étude, le propionate de vinyle donne la meilleure énantiosélectivité.

Tableau 2.3. Enantiosélectivité de la CALB dans l'acylation enzymatique du 3-méthyl-2-butanol avec différent donneurs d'acyle vinyliques¹⁰.

Donneur d'acyle	Enantiosélectivité (<i>E</i>)	$\Delta\Delta G^\#$ (KJ.mole ⁻¹)
Propionate de vinyle	470	-15.3
Butanoate de vinyle	390	-14.8
Hexanoate de vinyle	720	-16.3
Octanoate de vinyle	810	-16.6

2.2.4. La température

Il est connu que la vitesse de la plupart des réactions chimiques s'élève quand la température s'accroît. Les réactions enzymatiques n'échappent pas à cette règle. Dans le cas d'une acylation enzymatique, la vitesse de la réaction s'élève jusqu'à une valeur maximale, puis décroît rapidement, car la chaleur dénature l'enzyme, et la vitesse de sa dénaturation augmente avec la température. La température affecte également la viscosité du milieu ainsi que la solubilité des substrats et des produits.

Il existe une température optimale qui permet d'obtenir une vitesse constante pendant toute la durée de l'expérience. Il en résulte l'existence d'une température critique T_c , au-delà de laquelle il se produit le phénomène de dénaturation. D'autre part, la résistance de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation thermique dépend d'autres paramètres tels que le pH ou la force ionique et de la présence de ligands. La fixation du substrat protège généralement l'enzyme. Concernant l'énantiosélectivité, celle-ci augmente généralement avec la diminution de la température. Cela peut être expliqué par la modification de la structure tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique sous l'effet de la chaleur et toucherait les liaisons de faible énergie de type liaison hydrogène, intervenant dans le maintien de la structure tridimensionnelle et la formation du complexe acyl-enzyme.

Les enzymes de faible masse moléculaire portant une seule chaîne polypeptidique et des liaisons disulfures sont plus sensibles à la dénaturation que les enzymes à grande masse moléculaire. Mais, en général, elles sont plus stables dans l'extrait brut en présence d'autres protéines ou immobilisées à l'état insoluble.

Plusieurs études sur l'influence de la température sur les réactions enzymatiques menées avec des lipases ont été rapportées. Olsen et *al.*¹¹ ont étudié l'estérification du lavandulol par

CALB, une augmentation de la vitesse de réaction a été observée en passant de 50 à 60°C; une forte diminution de celle-ci a lieu à partir de 80°C. Moure et al.¹² ont mesuré le ratio énantiomérique à différentes températures dans la résolution cinétique d'alcools allyliques secondaires via la transestérification avec l'acétate de vinyle. Les réactions ont été effectuées à 29, 37 et 45 °C (figure 2.2). Les résultats ont montrés que la valeur de E a augmenté avec une augmentation de la température de 29 à 37 °C, mais a ensuite diminué avec une augmentation supplémentaire de la température à 45 °C.

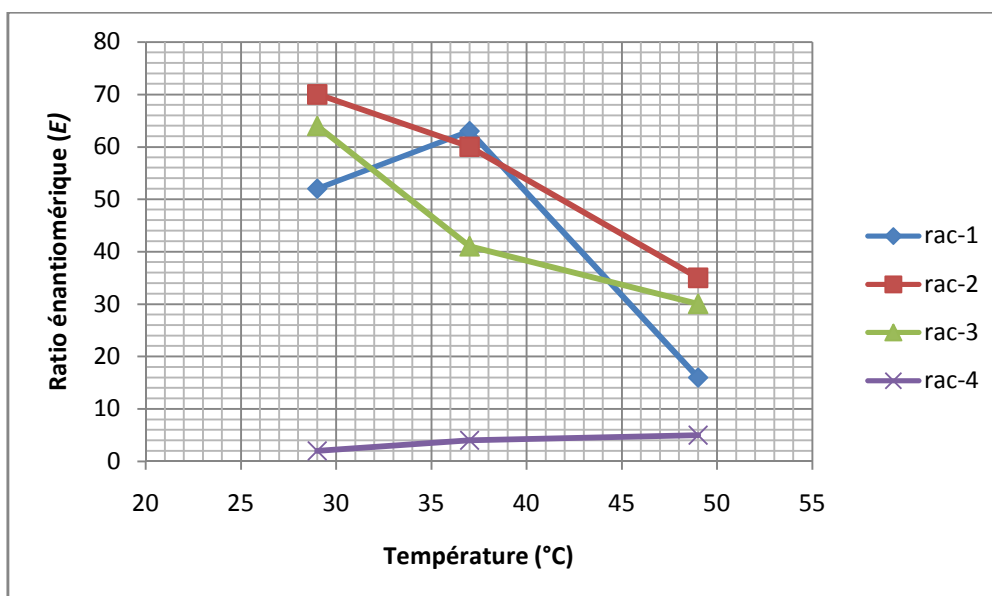


Figure 2.2. Effet de la température sur le ratio énantiomérique (E) lors la résolution cinétique catalysée par la lipase de *Burkholderia cepacia* de quelques alcools allyliques racémiques¹². (1-phenylprop-2-en-1-ol (rac-1), 1-(4-chlorophenyl)prop-2-en-1-ol (rac-2), 1-(3-methoxyphenyl)prop-2-en-1-ol (rac-3) et 5-methylhex-1-en-3-ol (rac-4))

2.2.5. L'activité de l'eau (a_w)

L'activité de l'eau (a_w) constitue un facteur crucial qui influence l'activité enzymatique¹³. En effet, pour maintenir son activité, une enzyme nécessite la présence d'une quantité minimale d'eau dans son microenvironnement¹⁴. Cette quantité d'eau joue le rôle d'un « lubrifiant » pour l'enzyme, elle intervient principalement dans le maintien de sa conformation active via des liaisons non-covalentes et des liaisons hydrogène¹⁵. Ceci concerne donc l'eau directement liée à l'enzyme. De plus, la valeur de a_w module directement l'équilibre entre le procédé hydrolytique et le procédé synthétique de l'enzyme^{16,17}. Plusieurs recherches ont été réalisées sur l'effet de a_w pour optimiser l'efficacité du biocatalyseur et le rendement des produits^{18,19}.

L'activité de l'eau a_w décrit la distribution de l'eau entre différentes phases pouvant entrer en compétition pour sa fixation. Elle permet de définir l'état d'hydratation de toutes les composantes d'un système, y compris la quantité d'eau dissoute dans le solvant, l'état d'hydratation de l'enzyme et la pression partielle de vapeur d'eau au-dessus du système. Elle est décrite selon l'équation (8) et correspond au rapport de la pression de vapeur de l'eau d'une substance (solution ou mélange, (p)) donnée à la pression de vapeur de l'eau pure (p_0).

$$a_w = \frac{p}{p_0} \quad (8)$$

Sur une échelle de 0 à 1, l'activité de l'eau est décrite comme la disponibilité de l'eau dans un mélange²⁰. Généralement, les enzymes sont faiblement solubles dans les solvants organiques non miscibles à l'eau. Dans ce type de solvants, l'activité de l'eau est proche de 1 et cela en présence de faibles quantités d'eau. Par exemple, l'activité de l'eau du toluène en présence d'une fraction molaire d'eau de 0,1 est de 0,99. Inversement plus le solvant est miscible à l'eau, et par conséquent entrera en interaction avec cette dernière, et moins l'activité de l'eau sera importante pour une même fraction molaire. Par exemple, l'activité de l'eau de l'éthanol en présence d'une fraction molaire d'eau de 0,1 est de 0,2²⁰.

Pour contrôler l'activité de l'eau des milieux réactionnels, généralement les composantes de système (biocatalyseurs, solvants et réactifs) sont mis en contact avec des solutions saturées en sels de point de fusion relativement bas, un équilibre de la pression de vapeur d'eau s'établit dans le système²¹. Les paires de sels hydratés vont capter ou libérer des molécules d'eau et ainsi réguler l'activité de l'eau dans le milieu²². Le tableau 2.4 résume les valeurs de l' a_w correspondent aux quelques sels utilisés²³.

Tableau 2.4. Valeurs de l'activité d'eau pour quelques solutions saturées de sel à 25 °C et 50 °C.

Sels	$a_w[25\text{ °C}]^{(a)}$	$a_w[50\text{ °C}]^{(a)}$
LiCl	0.11	0.11
KAc	0.23	0.19
MgCl ₂	0.33	0.31
KCO ₃	0.43	0.43
Mg(NO ₃) ₂	0.53	0.45

NaBr	0.58	0.51
NaCl	0.75	0.74
KCl	0.84	0.81
K ₂ SO ₄	0.97	0.96

^(a)L. Greenspan (1977)²⁴.

Chowdary et Prapulla,¹⁷ ont étudié l'influence de l'activité de l'eau sur la synthèse du butyle butyrate catalysée par différentes lipases par acylation, un rapport direct entre l'activité de l'eau et le taux de réaction a été observé. D'autres chercheurs ont rapporté des résultats semblables²⁵⁻²⁷.

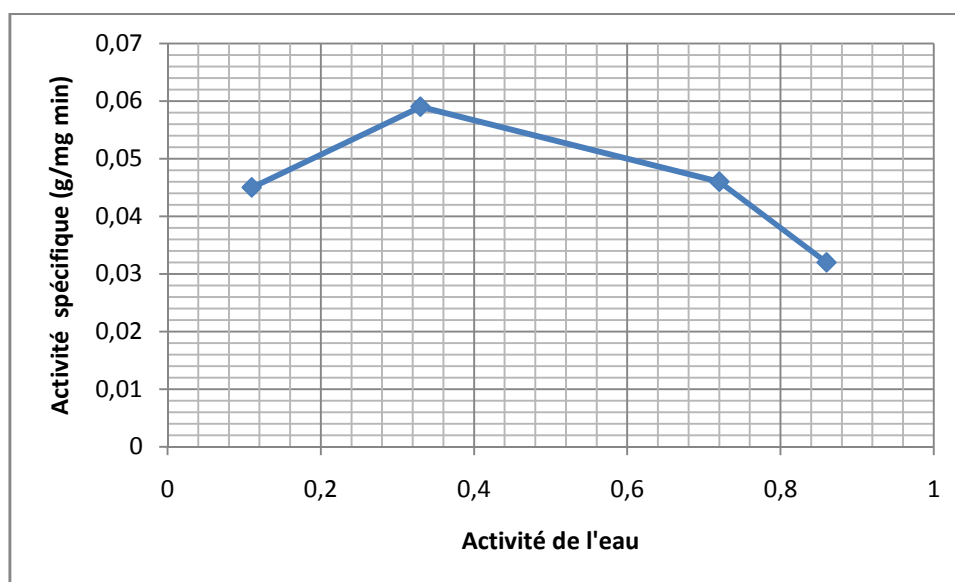


Figure 2.3. Variation de l'activité de la lipase *Candida rugosa* en fonction de l'activité de l'eau (a_w) dans l'isooctane²⁵.

2.3. Les milieux non conventionnels des lipases

2.3.1. Introduction

Tout au début de la biocatalyse, l'eau étant le solvant naturel des enzymes, seules les réactions d'hydrolyse étaient étudiées. Par la suite, il a été montré que certaines enzymes, telles que les lipases, pouvaient également fonctionner en milieu solvant organique. Ces enzymes se retrouvent essentiellement au niveau des membranes cellulaires, et sont actives dans la cellule dont la concentration en eau est faible, ce qui permet d'expliquer la conservation de leur activité dans un milieu organique²⁸. La première étude des enzymes en

milieux dit « non conventionnels » revient à la fin des années 1970. La disponibilité de l'eau dans ce type de milieu est faible, et la réaction de synthèse est alors favorisée²⁹. Plusieurs milieux réactionnels pour les enzymes rentrent sous la dénomination « non conventionnels », tels que les solvants organiques, les liquides ioniques, les milieux fondus, le milieu CO₂ supercritique³⁰⁻³³. Ces milieux peuvent se trouver sous différents états physiques : liquide ou gazeux.

2.3.2. Les solvants organiques

Le travail révolutionnaire réalisé par Klivanov au le début des années 1980 a montré clairement que les enzymes peuvent être utilisées dans des solvants organiques hydrophobes. Plus tard, il s'est avéré que beaucoup de lipases ainsi que quelques protéases et acylases, sont si stables et qu'elles maintiennent leur activité dans des solvants organiques anhydres. Cette dernière caractéristique est à la base de nombreuses applications de ces hydrolases dans des réactions synthétiques, telles que l'acylation des alcools et des amines.

Les solvants organiques sont des composés organiques à l'état liquide contenant des atomes de carbones dans leur structure. Ils sont facilement évaporables et possèdent habituellement des températures de fusion faibles. Dans les milieux organiques, les lipases sont insolubles et se trouvent en suspension dans un solvant anhydre ou faiblement hydraté. Les lipases solubilisées étant plus actives que celles en suspension, des modifications peuvent être apportées à la protéine pour augmenter sa solubilité. Deux méthodes, nommées modifications covalentes et non-covalentes, sont communément utilisées pour atteindre ce but. Les modifications covalentes ou chimiques s'effectuent par la formulation des lipases avec des agents tels que le polyéthylène glycol (PEG) et le polystyrène. Les modifications non-covalentes des lipases se font par la fixation des différents tensioactifs sur les lipases par adsorption. L'utilisation des solvants organiques dans les réactions enzymatiques a ouvert de larges potentialités pour la synthèse des produits de grands intérêts à l'échelle industrielle. Les solvants organiques peuvent être classés en deux grandes classes selon leur capacité à former des liaisons hydrogène ou bien selon leur composition chimique (figure 2.4).

Trois types de solvants organiques rentrent sous la première classe :

1. Les solvants protiques polaires : ils sont capables de former des liaisons hydrogène, miscibles à l'eau et possèdent des faibles moments dipolaires (alcools comme le méthanol).

2. Les solvants aprotiques polaires : ils sont très peu miscibles dans l'eau car ils ne peuvent pas établir de liaisons hydrogènes et présentent de moments dipolaires (solvants halogénés comme le chloroforme).
3. Les solvants aprotiques apolaires : ils ne sont pas miscibles à l'eau et présentent des moments dipolaires nuls (alcanes comme l'hexane).

La deuxième classe regroupe également trois types de solvants organiques :

1. Les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques tels que l'hexane et le benzène
2. Les solvants oxygénés tels que l'éther diéthylique et le dioxane
3. Les solvants halogénés tels que le dichlorométhane et le chloroforme

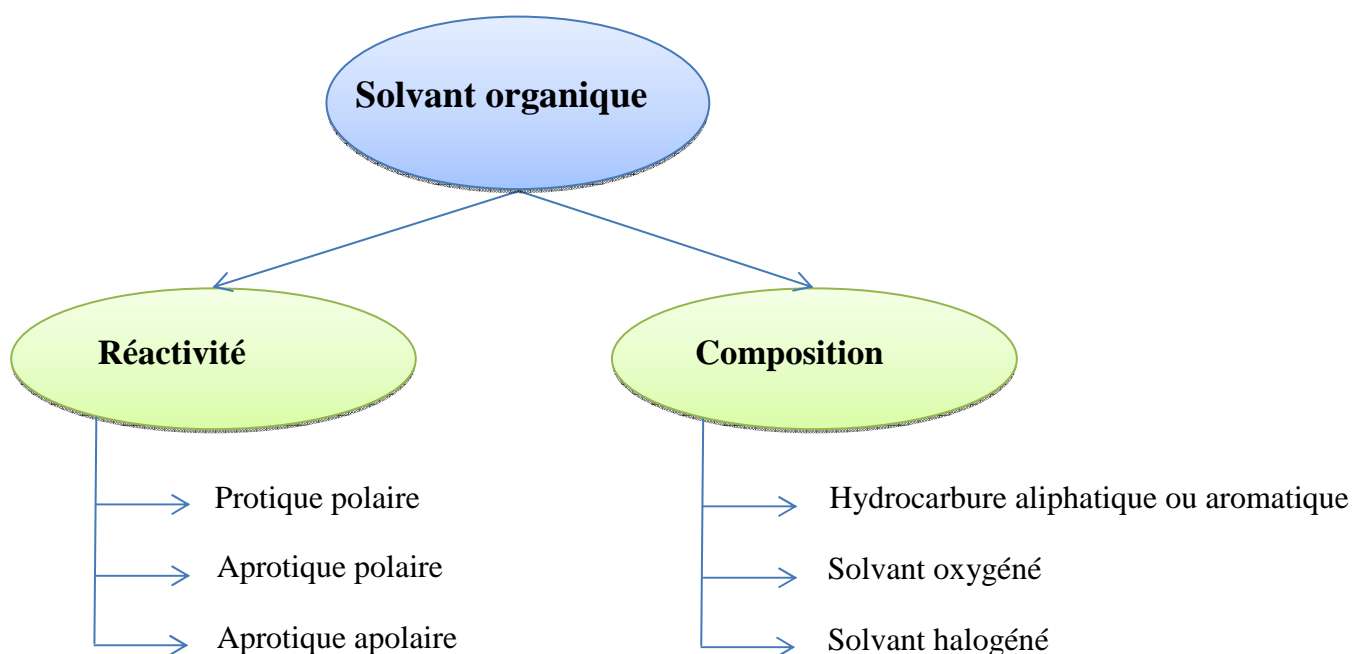


Figure 2.4. Classification des solvants organiques.

La polarité du solvant, sa capacité à dissoudre les substrats et sa volatilité sont les propriétés physiques principales pour considérer un solvant organique comme un bon milieu réactionnel pour les réactions enzymatiques. Le paramètre le plus couramment utilisé pour classer les solvants en termes de polarité ou d'hydrophobicité et par conséquent en leur biocompatibilité, est la valeur $\log P$, qui est définie comme le coefficient de partage d'un composé donné dans le système à deux phases le n-octanol et l'eau. Ce coefficient peut être déterminé empiriquement ou bien par la méthode de Nys³⁴ qui est basée sur les constantes fragmentales d'hydrophobie. Plus tard, cette méthode a été améliorée permettant ainsi une

prédiction et une estimation plus rigoureuse³⁵. Le tableau 2.5 présente des valeurs de $\log P$ de quelques solvants organiques souvent utilisés dans le cadre de la catalyse enzymatique.

Tableau 2.5. Valeurs de $\log P$ pour quelques solvants organiques³⁵.

Solvant organique	$\log P$
Dioxane	-1.12
Diméthylformamide (DMF)	-1.00
Acétonitrile	-0.33
<i>Tert</i> -butanol	0.37
Tétrahydrofurane (THF)	0.49
Pyridine	0.71
Ether diéthylique	0.89
Dichlorométhane	1.25
Chloroforme	1.97
Benzène	2.00
Toluène	2.73
Pentane	3.39
Hexane	3.50
Heptane	4.00
Isooctane	4.50

L'étude concernant l'influence des solvants organiques sur le comportement des lipases a sollicité beaucoup d'attention dans les années précédentes. En général, l'activité enzymatique et la stabilité de l'enzyme augmentent avec l'hydrophobicité du solvant en termes de $\log P$. Cela est expliqué par la déshydratation de l'enzyme dans les solvants polaires (la valeur de $\log P$ inférieure à 2) et par conséquent un changement de conformation de la protéine se traduit par une perte du pouvoir catalytique entraînant une diminution du taux de conversion et de la vitesse initiale de la réaction. Par exemple, Chen et *al.*³⁶ en étudiant l'acylation enzymatique de la cordycépine par l'acétate de vinyle, ont montré la forte influence de la nature du solvant organique sur la vitesse initiale (V_0) et le rendement de la réaction. (tableau 2.6). Comme prévu, aucune biotransformation n'a eu lieu dans le DMSO ou le DMF et l'activité enzymatique était proportionnelle à l'hydrophobicité du solvant.

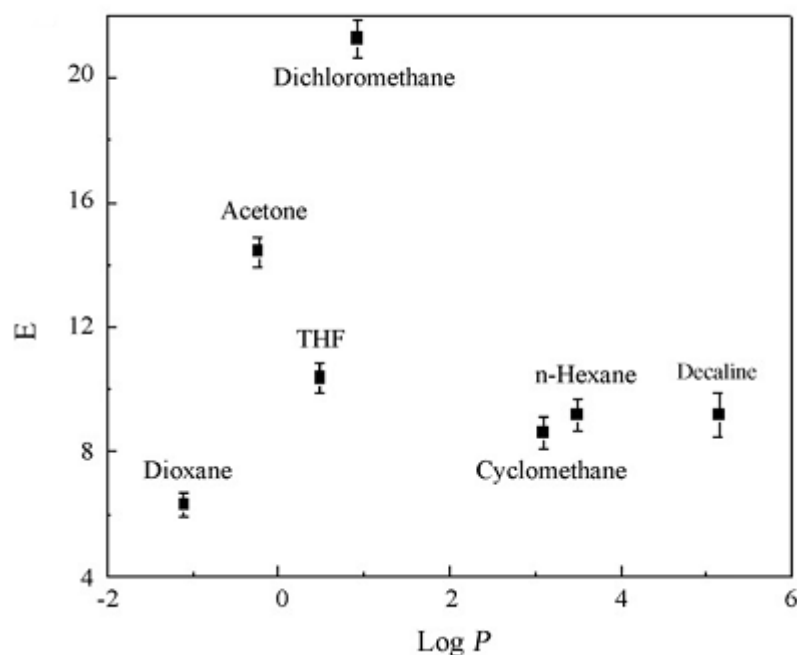
Tableau 2.6. Effet du solvant sur l'acylation enzymatique cordycepine catalysée par la lipase^{a,36}.

Solvant organique	Log <i>P</i>	Temps (h)	<i>V</i> ₀ (mM h ⁻¹)	Rendement (%)
DMSO	-1.3	12	- ^b	- ^b
DMF	-1.0	12	- ^b	- ^b
Acétone	-0.23	24	5.0 ± 0.5	17.0 ± 1.2
THF	0.49	4	16.0 ± 1.9	88.5 ± 1.3
MeTHF	0.99	3	31.5 ± 1.2	96.5 ± 1.6

^a Les réactions ont été effectuées à 45 °C et 150 rpm en ajoutant 0,1 mmol de cordycepin, Novozym 435 et 1,0 mmol d'acétate de vinyle dans 5 ml de solvant organique.

^b Pas de réaction.

Outre l'activité, les solvants influencent également la sélectivité enzymatique et particulièrement l'énantiosélectivité. Cependant, aucune corrélation claire n'a été trouvée entre Log *P* et le facteur d'énantiosélectivité *E*. Wang et al.³⁷ ont étudié l'effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la lipase de *Alcaligenes sp* (Lipase QLM) dans la résolution de racémique 2-octanol avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle, le dichlorométhane (log *P*=1.25) a donné la valeur de *E* la plus élevée parmi les solvants étudiés (figure 2.5).

**Figure 2.5.** Enantiosélectivité (*E*) en fonction de log *P* de quelques solvants organiques dans la résolution de (*R,S*)-2-octanol avec l'acétate de vinyle catalysée par la lipase QLM³⁷.

La taille moléculaire est une autre caractéristique des solvants utilisée pour rationaliser la relation solvant-enzyme. Il a ainsi été rapporté une corrélation négative entre la taille du solvant et l'énantiosélectivité des lipases³⁸.

Cependant, l'inconvénient majeur des solvants organiques reste leur toxicité et leur impact néfaste sur l'environnement. La recherche d'autres milieux éco-compatibles est alors axe très important.

2.3.3. Les liquides ioniques

Depuis une vingtaine d'années, les liquides ioniques (LIs) sont considérés comme une alternative intéressante aux solvants organiques³⁹⁻⁴¹. Les réactions dans les LIs sont essentiellement biocatalysées par des enzymes préalablement utilisées en milieu organique, les lipases étant les plus représentées^{42,43}. L'utilisation de LIs dans le domaine de la biocatalyse présente de nombreux avantages, tels qu'une activité élevée, une stabilité thermique et opérationnelle des biocatalyseurs, une bonne énantiosélectivité de la biotransformation par rapport aux milieux réactionnels classiques^{44,45}. De plus, les LIs sont considérés comme des solvants verts principalement à cause de leur excellente stabilité thermique, leur nature non-inflammable et leur pression de vapeur négligeable dues aux fortes interactions ioniques dans ces liquides, qui permettent d'utiliser les LIs sans problème d'émission de solvant dans l'atmosphère⁴⁶.

Les LIs sont des sels, composés d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique, dont des points de fusions inférieurs à la température ambiante et une température d'ébullition souvent comprise entre 300 et 400°C^{32,47}. Les cations les plus utilisés dans la biocatalyse sont imidazolium, pyridinium, pyrrolidinium, ammonium, phosphonium ou piperidinium. Et les anions les plus fréquemment utilisés sont l'héxafluorophosphate, le tétrafluoroborate, le tosylate, Bis[(trifluorométhyl)sulfonyl]imide, (trifluorométhyl)sulfonyl ou le diméthylphosphate (tableau 2.7)^{48,49}. Les propriétés physicochimiques des LIs sont modulables en fonction du choix du cation et de l'anion constitutifs du LIs, on trouve ainsi une grande diversité de LIs par différentes combinaisons cation/anion⁴⁸. Le cation est généralement à l'origine de la stabilité et des propriétés physiques du liquide ionique, alors que l'anion définit plutôt ses propriétés chimiques et sa fonctionnalité⁵⁰.

Tableau 2.7. Cations et anions des LIs les plus utilisés dans la biocatalyse⁵¹.

Cations			Anions		
Nom	Abréviation	Structure	Nom	Abréviation	Structure
Imidazolium	[IM] ⁺		Tetrafluoro- borate	[BF ₄] ⁻	
Pyridinium	[Pyr] ⁺		Héxafluoro- phosphate	[PF ₆] ⁻	
Pyrrolidinium	[PL] ⁺		Tosylate	[TOS] ⁻	
Ammonium	[N _{a b c d}] ⁺		Bis- [(trifluoro- methyl)- sulfonyl]- imide	[NTf ₂] ⁻	
Phosphonium	[P _{m n o p}] ⁺		(Tri- fluoromethyl)- sulfonyl	[OTf] ⁻	
Piperidinium	[PI] ⁺		di-alkyl- phosphate	[DAP] ⁻	

Les propriétés physiques des LIs (telles que la polarité, l'hydrophobicité, la viscosité et la basicité des liaisons hydrogène) peuvent être parfaitement conçues par la sélection appropriée des cations et des anions. Par exemple, les LIs peuvent être synthétisés pour être miscibles dans l'eau, partiellement miscibles ou non miscibles, avec des polarités différentes, et peuvent également être synthétisés avec différentes viscosités ciblant des applications spécifiques⁵². Toutes ces propriétés accordables sont très importantes pour la stabilisation et l'activation des enzymes. Par conséquent, de nombreuses réactions enzymatiques ont été étudiées dans différents types de LIs^{44,53}. Bien que certaines LIs (telles que celles basées sur BF₄⁻, PF₆⁻ et Tf₂N⁻) soient moins dénaturantes que les solvants organiques et qu'une activité catalytique élevée et une énantiosélectivité aient été rapportées pour de nombreuses réactions⁵⁴, de nombreuses enzymes présentent la même amplitude d'activités dans les LIs que dans les solvants organiques, qui restent considérablement inférieurs à ceux des solutions aqueuses.

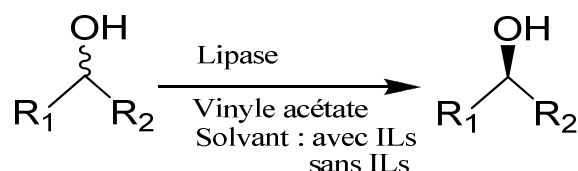
En se basant sur des études solvatochromiques, des LIs ont été trouvés modérément polaires proches à celles des alcools inférieurs^{55,56} ou du formamide⁵⁷. Park et Kazlauskas⁵⁸ ont observé une augmentation de l'activité de la lipase de *Pseudomonas cepacia* avec la polarité de LIs pendant l'acylation du 1-phényléthanol racémique avec l'acétate de vinyle (par exemple, la vitesse initiale de réaction en moins polaire [BMIM][PF₆] est trois fois plus lente que celle en plus polaire [EMIM][BF₄]). Dans une autre étude, on a également obtenu des activités synthétiques inférieures d' α -chymotrypsine dans des LIs moins polaires⁵⁹. Au cours de l'estérification catalysée par Novozym® 435 de méthyl- α -D-glucopyranoside avec des acides gras, Mutschler et al.⁶⁰ ont observé que la conversion des esters augmentait avec la polarité des LIs lorsqu'ils ont été utilisés comme additifs à des solvants organiques, mais diminué avec la polarité des LIs lorsque les LIs ont été utilisés comme solvants. Cependant, la corrélation entre la polarité de LIs et l'activité enzymatique n'a pas été établie pour d'autres réactions enzymatiques réalisées dans les LIs^{61,62}.

Les LIs sont des fluides plus visqueux par rapport aux solvants organiques classiques⁵². De plus, de nombreuses réactions enzymatiques dans les LIs sont hétérogènes à cause de la faible solubilité des enzymes dans la plupart des LIs. Par conséquent, les limites internes et externes de transfert de masse doivent être prises en considération⁵³. Lozano et al.⁵⁹ ont indiqué qu'en plus de la polarité des LIs, l'activité de l' α -chymotrypsine dépend également de leur viscosité. Une activité enzymatique plus élevée a été observée dans [EMIM][Tf₂N] que dans [MTOA][Tf₂N] (MTOA = méthyl trioctylammonium) car le premier IL (34 mPa s) est

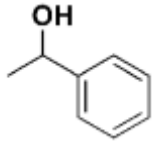
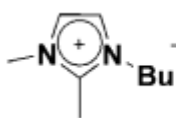
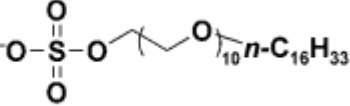
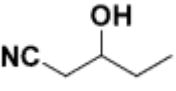

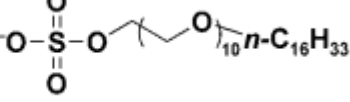
moins visqueux que le dernier (574 mPa s). Eckstein et *al.*⁶³ ont expliqué que l'énantiosélectivité supérieure de la lipase dans [BMIM] [Tf₂N] à une faible activité de l'eau ($a_w < 0,53$) que dans l'éther méthylique de tert-butyle (MTBE) était pour deux raisons: (1) la viscosité plus élevée de LI (52 mPas) que celle du MTBE (0,34 mPa) peut entraîner des limitations de transfert de masse et diminuer la vitesse de réaction; (2) la faible solubilité des substrats dans les LIs que dans le MTBE peut provoquer une énergie d'activation plus faible dans les LIs. Van Rantwijk et Sheldon⁴⁸ ont expliqué que la viscosité élevée des LIs ralentit les changements conformationnels des protéines, permettant aux enzymes de maintenir leurs structures et leur activité natives. Une étude récente⁶⁴ de la transesterification catalysée par lipase de 1-butanol avec le butyrate d'éthyle dans plus de 20 LIs confirme entre autre que la viscosité des LIs peut affecter les taux de réaction dans certains cas, mais n'est pas le principal facteur de contrôle de l'activité de l'enzyme.

Le tableau suivant illustre quelques exemples issus de la littérature, de l'effet des LIs sur l'énantiosélectivité des lipases dans la résolution cinétique de quelques alcools racémiques. On remarque clairement l'amélioration de l'énantiosélectivité des lipases en présence des LIs.

Tableau 2.8. Résolution cinétique des alcools racémiques : Exemples issus de la littérature de l'effet des LIs comme additifs sur l'énantiosélectivité enzymatique (*E*).



Substrat	IL additif	<i>E</i>	Référence
		Sans LI : 265 Avec LI : 532	⁶⁵
		Sans LI : 293 Avec LI : 574	⁶⁵
		Sans LI : 107 Avec LI : 156	⁶⁵

			Sans LI : 17 Avec LI : 96	66
			Sans LI : 39 Avec LI : 40	67

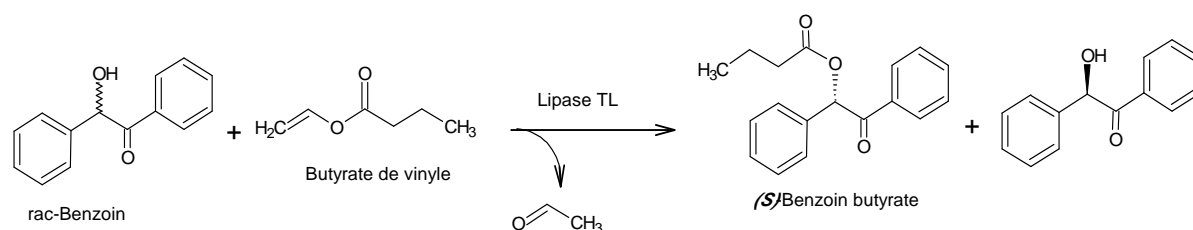
2.3.4. Solvants respectueux de l'environnement

Dernièrement, les solvants 2-méthyltétrahydrofurane (MeTHF)⁶⁸ et cyclopentyl méthyl éther (CPME)⁶⁹ sont de plus en plus utilisés aussi bien au niveau laboratoire qu'à celui industriel, comme alternative à leurs analogues éthers tels le THF et le TBME. Le MeTHF a été utilisé dans diverses réactions organiques comme solvant respectueux de l'environnement, en raison de ses propriétés éco-favorables. Par exemple, le point d'ébullition plus élevé du MeTHF (80 °C contre 66 °C pour le THF) pourrait considérablement réduire l'évaporation du solvant pendant la réaction. Il est partiellement miscible à l'eau et peut former un azéotrope avec l'eau. À 60 °C, la phase organique MeTHF contient environ 4,5% d'eau et la solution aqueuse contient environ 6,6% de MeTHF. A cette température, le MeTHF et l'eau forment un azéotrope (environ 10,4% d'eau), et donc les deux phases peuvent être séparées par distillation classique, utile pour les réactions à deux phases et la récupération du produit. Plus important encore, le MeTHF peut être produit à partir de la biomasse (coquille de maïs, bagasse de la canne à sucre et coques d'avoine) et donc satisfaisant au 7^{ème} principe de la chimie verte. Autre avantage, le MeTHF peut être dégradé abiotiquement en présence de la lumière du soleil et de l'air, vraisemblablement par oxydation et par ouverture du cycle. Par conséquent, l'utilisation de MeTHF rendra les processus plus écologique. De même, le cyclopentyle methyl éther (CPME) a été évalué comme une alternative favorable à l'environnement par rapport aux solvants organiques classiques. Le CPME est commercialement disponible depuis 2005. Il peut être fabriqué par méthylation du cyclopentanol ou par addition de méthanol au cyclopentène qui est facilement disponible. Le premier procédé est une substitution nucléophile qui produit des sous-produits en tant que déchets, tandis que le dernier (réaction d'addition) ne produit aucun produit secondaire. Le CPME possède plusieurs caractéristiques avantageuses telles que : (1) une hydrophobicité élevée et donc très facile à sécher, (2) la formation du peroxyde par les produits est nulle, (3) relativement stable dans des conditions acides et basiques, (4) une faible chaleur d'évaporation et (5) une gamme d'explosion étroite.

Tableau 2.9. Propriétés physique de MeTHF et CPME.

Propriétés	CPME	MeTHF
Densité (20 °C) [g/cm ³]	0.86	0.85
Viscosité (20 °C) [cP]	0.55	0.6
Point d'ébullition [°C]	106	80
Point de fusion [°C]	-140	-136
Chaleur d'évaporation (bp) [kcal/kg]	69.2	89.7
Moment dipolaire [D]	1.27	-
Constante diélectrique (25 °C)	4.76	7
Point azéotrope avec l'eau [°C]	83	71
Solubilité du solvant à l'eau (23 °C) [g/100 g]	1.1	14
point d'inflammabilité [°C]	-1	-14.5
Log <i>P</i>	1.59	0.99

Parmi le peu d'exemples qui existent dans la littérature sur l'effet de ces solvants verts sur l'activité des lipases, le travail de Hoyos et *al.*⁷⁰ a montré l'activité et l'énantiosélectivité élevée exhibées par la lipase de *pseudomonas stutzeri* dans la résolution du benzoïne avec le butyrate de vinyle dans le CPME et MeTHF.

Tableau 2.10. La lipase de *P. stutzeri* (lipase TL) catalyse la résolution énantiosélective de racémique benzoïne avec le butyrate de vinyle comme donneur d'acyle : comparaison entre CPME, Toluène et MeTHF⁷⁰.


Solvant organique	Temps (h)	conversion	ee (%)
CPME		98.2	99.0
Toluène	5	98.4	98.5
MeTHF		96.9	97.0

2.3.5. Influence du milieu sur le comportement de la lipase

L'énorme potentiel des lipases comme des biocatalyseurs pratiques est bien reconnu^{71,72}. En particulier, ils sont très exploités dans les biotransformations en synthèse asymétriques⁷³, à cause de la demande croissante de produits pharmaceutiques énantiopures⁷⁴. Leur utilité technologique est grandement améliorée en les utilisant dans des milieux organiques plutôt que leurs milieux réactifs aqueux naturels. Des études au cours des 25 dernières années ont révélé non seulement que cette modification du solvant est réalisable, mais aussi que dans ces milieux qui peuvent apparaître hostiles, les lipases peuvent catalyser des réactions impossibles dans l'eau, devenir plus stables et présenter de nouveaux comportements tels que la «mémoire moléculaire»⁷⁵. Une importance particulière a été la découverte que la sélectivité enzymatique, y compris la stéréo, la régio et la chimiosélectivité vis-à-vis les substrats, peuvent être fortement affectées, et parfois même inversées, par le solvant. Les réactions catalysées par les lipases dans les solvants organiques, les liquides ioniques et même dans les fluides supercritiques, ont trouvé de nombreuses applications potentielles, dont certaines sont déjà commercialisées⁷⁵.

Références bibliographiques

- (1) Chebil, L.; Humeau, C.; Falcimaigne, A.; Engasser, J.-M.; Ghoul, M. *Process Biochem.* **2006**, *41* (11), 2237–2251.
- (2) Tacias-Pascacio, V. G.; Virgen-Ortíz, J. J.; Jiménez-Pérez, M.; Yates, M.; Torrestiana-Sanchez, B.; Rosales-Quintero, A.; Fernandez-Lafuente, R. *Fuel* **2017**, *200*, 1–10.
- (3) Alalla, A.; Merabet-Khelassi, M.; Riant, O.; Aribi-Zouiouèche, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27* (24), 1253–1259.
- (4) Brahmachari, G. Academic Press, 2017; pp 325–346.
- (5) Sonnet, P. E.; Baillargeon, M. W. *J. Chem. Ecol.* **1987**, *13* (5), 1279–1292.
- (6) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (8), 2656–2665.
- (7) Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (8), 3180–3186.
- (8) Overbeeke, P. L. A.; Ottosson, J.; Hult, K.; Jongejan, J. A.; Duine, J. A. *Biocatal. Biotransformation* **1999**, *17* (1), 61–79.
- (9) Johnson, C. R.; Sakaguchi, H. *Synlett* **1992**, *1992* (10), 813–816.
- (10) Ottosson, J.; Hult, K. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11* (4–6), 1025–1028.
- (11) Olsen, T.; Kerton, F.; Marriott, R.; Grogan, G. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39* (4), 621–625.
- (12) Moure, V. R.; Fabrício, C.; Frensch, G.; Marques, F. A.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2014**, *3* (2), 146–153.
- (13) G. Bell, P. J. Halling, B. D. Moore, J. Partridge, D. G. R. *Elsevier Sci. Ltd* **1995**, *13*, 468–473.
- (14) SJ, S. *Adv. Protein Chem.* **1962**, *17*, 1–68.
- (15) Tanford C, D. P. U. *J. Biol. Chem.* **1961**, *263* (6), 1711–1715.
- (16) Valivety, R. H.; J. Halling, P.; Macrae, A. R. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1992**, *1118* (3), 218–222.
- (17) Chowdary, G. V; Prapulla, S. G. *Process Biochem.* **2002**, *38* (3), 393–397.
- (18) Mikolajek, R.; Spiess, A. C.; Pohl, M.; Lamare, S. **2007**, *1*, 1063–1070.
- (19) Secundo, F.; Carrea, G. *Chemistry* **2003**, *9* (14), 3194–3199.
- (20) Halling, P. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16* (3), 178–206.
- (21) Kuhl, P.; Halling, P. J.; Jakubke, H.-D. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (36), 5213–5216.
- (22) Lise Kvittingen, Birte Sjørsnes, and T. A. *Tetrahedron* **1992**, *48* (13), 2793–2802.

- (23) Petrenz, A.; Maria, P. D. De; Ramanathan, A.; Hanefeld, U.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Kara, S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *114*, 42–49.
- (24) Greenspan, L. *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A Phys. Chem.* **1977**, *81A* (1), 89.
- (25) Yu, H. W.; Chen, H.; Yang, Y. Y.; Ching, C. B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2005**, *35*, 28–32.
- (26) Ujang, Z.; Vaidya, A. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50* (3), 318–322.
- (27) Svensson, I.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *44* (5), 549–556.
- (28) S, D. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11* (4), 194–211.
- (29) L.G, B. *Enzyme Microb. Technol.* **1979**, *1* (4), 253–259.
- (30) J.O, M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1998**, *37* (21), 2975–2978.
- (31) Hudson, E.P., Eppler, R.K. & Clark, D. S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16* (6), 637–643.
- (32) Hernández-Fernández, F. J.; Ríos, A. P. de los; Lozano-Blanco, L. J.; Godínez, C. J. *Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85* (11), 1423–1435.
- (33) Doukyu, N. & Ogino, H. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48* (3), 270–282.
- (34) G, N. G. *Chim. thérapeutique* **1973**, *5*, 521–535.
- (35) Mannhold R. Rekker R. *prespectives drug Discov. Des.* **2000**, *18*, 1–18.
- (36) Chen, Z. G.; Zhang, D. N.; Cao, L.; Han, Y. Bin. *Bioresour. Technol.* **2013**, *133*, 82–86.
- (37) Wang, Y.; Li, Q.; Zhang, Z.; Ma, J.; Feng, Y. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *56* (2–3), 146–150.
- (38) Vrutika, P.; Datta, M. *Appl Biochem Biotechnol* **2015**, *177*, 1313–1326.
- (39) Ghaedizadeh, S.; Emamzadeh, R.; Nazari, M.; Rasa, S. M. M.; Zarkesh-Esfahani, S. H.; Yousefi, M. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *105*, 505–513.
- (40) Yuan, Y.; Bai, S.; Sun, Y. *Food Chem.* **2006**, *97* (2), 324–330.
- (41) Lin, X. S.; Wen, Q.; Huang, Z. L.; Cai, Y. Z.; Halling, P. J.; Yang, Z. *Process Biochem.* **2015**, *50* (11), 1852–1858.
- (42) Shimomura, K.; Harami, H.; Matsubara, Y.; Nokami, T. *Catal. Today* **2015**, *255*, 41–48.
- (43) Domínguez De María, P. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (37), 6960–6968.
- (44) Park, Seongsoon; Romas J, K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *4* (14), 432–437.
- (45) van Rantwijk, F.; Madeira Lau, R.; Sheldon, R. A. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (3), 131–138.

- (46) Sheldon, R. A.; Lau, R. M.; Sorgedraeger, M. J.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R. *Green Chem.* **2002**, *4* (2), 147–151.
- (47) Koo, Y.-M.; Ha, S. H. *J. Biotechnol.* **2008**, *136*, Suppl, S6–S7.
- (48) van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (6), 2757–2785.
- (49) De Diego, T.; Lozano, P.; Abad, M. A.; Steffensky, K.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *J. Biotechnol.* **2009**, *140* (3–4), 234–241.
- (50) Zhao, H. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, No. 85, 891–907.
- (51) Xu, P.; Zheng, G. W.; Du, P. X.; Zong, M. H.; Lou, W. Y. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (2), 371–386.
- (52) Peter Wasserscheid, T. W. *Ionic Liquids in Synthesis*, 2nd Editio.; 2008.
- (53) Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13* (6), 565–571.
- (54) Abe, Y.; Kude, K.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Tsunashima, K.; Itoh, T. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2008**, *51* (3–4), 81–85.
- (55) Carmichael, A. J.; Seddon, K. R. *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13* (10), 591–595.
- (56) Aki, S. N. V. K.; Brennecke, J. F.; Samanta, A. *Chem. Commun.* **2001**, No. 5, 413–414.
- (57) Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (8), 2319–2358.
- (58) Park, S.; Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (25), 8395–8401.
- (59) Lozano, P.; de Diego, T.; Guegan, J.-P.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *75* (5), 563–569.
- (60) Mutschler, J.; Rausis, T.; Bourgeois, J.-M.; Bastian, C.; Zufferey, D.; Mohrenz, I. V.; Fischer, F. *Green Chem.* **2009**, *11* (11), 1793–1800.
- (61) Zhao, H.; Olubajo, O.; Song, Z.; Sims, A. L.; Person, T. E.; Lawal, R. A.; Holley, L. A. *Bioorg. Chem.* **2006**, *34* (1), 15–25.
- (62) Schofer, S. H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. *Chem. Commun.* **2001**, No. 5, 425–426.
- (63) Eckstein, M.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24* (10), 763–767.
- (64) Zhao, H.; Baker, G. A.; Song, Z.; Olubajo, O.; Zanders, L.; Campbell, S. M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *57* (1–4), 149–157.
- (65) Lee, J. K.; Kim, M.-J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (19), 6845–6847.
- (66) Itoh, T.; Matsushita, Y.; Abe, Y.; Han, S. H.; Wada, S.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Takai, S.; Morimoto, M.; Hirose, Y. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (36), 9228–9237.
- (67) Itoh, T.; Han, S.; Matsushita, Y.; Hayase, S. *Green Chem.* **2004**, *6* (9), 437–439.
- (68) Aycock, D. F. *Org. Process Res. Dev* **2007**, *11* (1), pp 156–159.
- (69) Watanabe, K.; Yamagiwa, N.; Torisawa, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (2), 251–

258.

- (70) Hoyos, P.; Quezada, M. A.; Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, 72 (1–2), 20–24.
- (71) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry 4th edn*; Springer: Berlin, 2000.
- (72) Roberts, S. M., Turner, N. J., Willetts, A. J. & Turner, M. K. *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganisms*, Cambridge.; Univ. Press: New York, 1995.
- (73) Zaks, A. & Dodds, D. R. *Drug Disc. Today* **1997**, 2, 513–531.
- (74) Stinson, S. C. *Chem. Eng. News* **1998**, 76, 83–96.
- (75) Klibanov, A. M. *Nature* **2001**, 409 (January), 786–790.

3. Les ultrasons : alternatifs dans les procédés de synthèse

3.1. Généralités sur les ultrasons

3.1.1. Définition

Les ultrasons sont des ondes acoustiques (mécaniques) dont la fréquence est située entre le son audible 16 kHz et les hypersons 10 MHz (figure 3.1). Dans cette gamme de fréquence le son est imperceptible par l'oreille humaine, en revanche des animaux comme les éléphants et les chauves souris utilisent communément ces ondes pour communiquer ou pour se diriger^{1,2}. La puissance (W) et la fréquence (Hz) sont les principaux paramètres pour classifier les ultrasons³. Selon une échelle de fréquence, le domaine ultrasonore est divisé entre des ultrasons de basse fréquence (16 à 100 kHz), des ultrasons de haute (100 kHz à 1000 kHz) et enfin des ultrasons de très haute fréquence. Et selon l'échelle de la puissance, les ultrasons sont dits de faible puissance lorsqu'elle est inférieure à 1 W, dans ce cas les ultrasons n'induisent pas de modification du milieu qu'ils traversent, et lorsque la puissance ultrasonore est supérieure à 10 W, l'émission ultrasonore est susceptible de modifier le milieu traversé, on est alors dans le domaine des ultrasons de puissance.

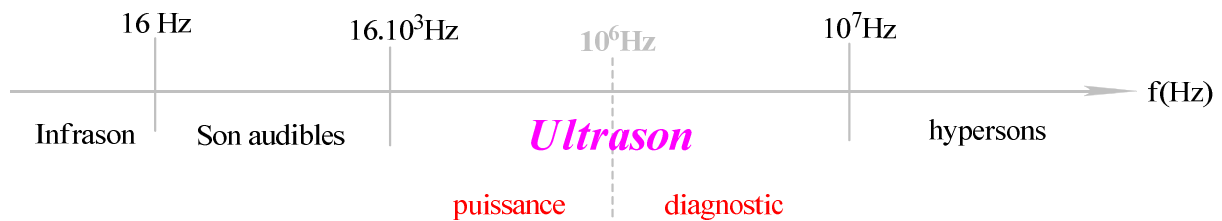


Figure 3.1. Domaines de fréquence des sons.

Les ultrasons possèdent toutes les propriétés générales des ondes sonores telles que la propagation et l'absorption en milieu dans lequel elles traversent. L'onde ultrasonore consiste en une succession répétitive de compression et de raréfaction, des phénomènes tels que la réflexion, la diffusion et l'interférence peuvent être générés par ces ondes acoustiques. Elles sont caractérisées par une longueur d'onde λ (m), et aussi par sa célérité (vitesse) c ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), d'autre part par la perte d'énergie qu'elle subit par unité de longueur de milieu traversé, c'est-à-dire par un coefficient d'absorption⁴.

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (1)$$

Ou : λ correspond à la longueur d'onde en m, c à la vitesse en $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et f à la fréquence Hz.

3.1.2. Principaux types d'ultrasons

Étant donné le large spectre de fréquence occupé par les ultrasons (16 kHz-10 MHz) on en différencie deux types :

a. Les ultrasons de puissance : caractérisés par une forte intensité et faible fréquence, de 16 à 1000 kHz. Une gamme étendue est utilisée en sonochimie. Ici, les ultrasons sont capables de produire une modification du milieu grâce à la cavitation, cette modification est de type physique (décapage, dégazage, émulsification) et/ou chimique (modification du mécanisme réactionnel, production de radicaux libres...) ^{5,6}. Parmi les exemples d'utilisation des ultrasons de puissance : le nettoyage par ultrasons fonctionnant à des fréquences inférieures à 50 kHz et la sono-dégradation de polluants chimiques.

b. Les ultrasons de diagnostic : caractérisés par une faible intensité et haute fréquence, de 1 à 10 MHz. Contrairement au premier cas, l'objectif ne vise pas la modification du milieu traversé, mais d'observer l'impact du milieu sur l'onde ultrasonore. Lorsqu'un son traverse un milieu (peu importe sa fréquence), il en ressort modifié : l'amplitude et la phase de l'onde sinusoïdale sont modifiées. Amplitude et phase dépendent de l'atténuation de l'onde (absorption par le milieu), des propriétés acoustiques du milieu (réflexion, transmission), ainsi que de l'angle d'incidence de l'onde et de la topographie de l'interface ⁷. L'analyse de ces modifications de l'onde (transmise ou réfléchi) donne des informations sur les caractéristiques du milieu traversé. Les ultrasons de diagnostic sont utilisés en médecine pour effectuer des diagnostics, dans les contrôles non destructifs et en métallurgie pour la détection de défauts dans les soudures ou la présence d'inclusions ⁸.

3.2. Paramètres physicochimiques des ultrasons

3.2.1. Vitesse

La vitesse de propagation de l'onde ultrasonore varie selon le milieu qu'elle traverse, et elle dépend de l'élasticité et de la masse volumique du milieu de propagation, par exemple dans l'eau pure à 25 °C, elle est égale à 1435 m.s⁻¹ ⁹. Elle peut être calculée en fonction du coefficient de l'élasticité (χ) et de la masse volumique du milieu (ρ) selon l'équation suivante :

$$v \approx \sqrt{\frac{1}{\rho\chi}} \quad (2)$$

De nombreux travaux ont permis d'estimer la vitesse de l'onde ultrasonore dans différents liquides notamment dans des solvants organiques.

3.2.2. Propagation

Les ultrasons sont des ondes vibratoires de compression longitudinale dont la propagation induit à la fois une variation spatiale et temporelle de la pression, une observation semblable à celle dans le cas d'un piston oscillant¹⁰. Il en résulte donc deux formes d'agitation du milieu. Du fait de la compressibilité du liquide, il apparaît un mouvement d'oscillation des éléments de liquide autour de leur position d'équilibre. À cela s'ajoute un mouvement d'ensemble provoqué par la propagation de l'onde. La transmission des ultrasons est un phénomène vibratoire pour lequel se retrouvent les problèmes classiques de transmission, de réflexion et d'ondes stationnaires.

3.3. Application des ultrasons

Les ultrasons actuellement sont d'une grande importance et possèdent des nombreuses applications dans des divers domaines.

3.3.1. Applications médicales

Les ultrasons sont devenus un outil essentiel dans la médecine, et trouvent des applications diagnostiques et thérapeutiques.

L'utilisation des ultrasons de faible puissance permet d'explorer les corps humains et de faire des diagnostics par échographie, cette technique d'imagerie permet via l'outil informatique de générer des images reçues par une sonde ayant auparavant émis une onde ultrasonique qui se réfléchit sur les différentes interfaces et peuvent montrer les organes en mouvement ainsi que le flux des vaisseaux sanguins dans le corps humain¹¹.

Dans le cas thérapeutique, les ultrasons sont exploités pour des approches interventionnelles directes utilisant des fortes puissances, ils permettent de détruire des substances ou tissus indésirables et pulvérisent des calculs rénaux. Ils sont également utilisés en kinésithérapie pour diminuer les douleurs, favoriser la circulation, aussi pour rendre des articulations moins raides. Les ultrasons sont mis en œuvre en télémétrie pour la mesure des distances et aussi la mesure des propriétés élastiques des matériaux.

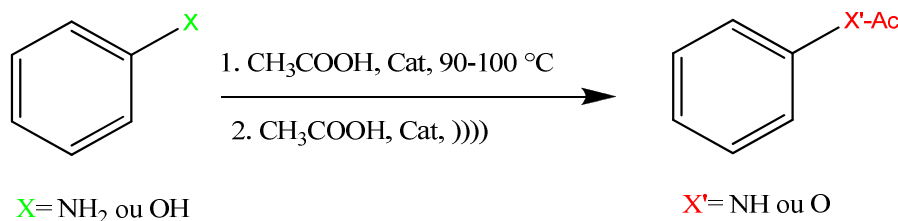
3.3.2. Application au laboratoire

Le domaine d'application le plus répandu au niveau du laboratoire est celui du nettoyage et du dégraissage des solides par les bacs à ultrasons. L'utilisation des ultrasons offre un nettoyage en douceur, permet d'éliminer complètement la saleté, l'huile et les contaminants de toutes les surfaces de l'objet qui sont en contact avec le liquide de nettoyage. Ce liquide peut pénétrer grâce à l'effet d'ultrasons à l'intérieur de toutes les crevasses, même les plus petites. Les ultrasons sont utilisés également pour dégazer des liquides, tels que les solvants et liquides visqueux types huile, gélatine¹². Cet effet de dégazage a été testé avec succès dans de nombreuses branches de l'industrie car il permet d'atteindre une concentration en gaz dissous plus faible et plus rapidement. Le dégazage par ultrasons est reconnu comme plus efficace et moins coûteux que les procédés classiques de dégazage sous vide poussé ou par ébullition qui requièrent en plus l'utilisation d'un condenseur¹³.

3.3.3. Application synthétique des ultrasons

L'application synthétique des ultrasons est en plein essor depuis une vingtaine d'année dans différents secteurs d'activités, tels que le domaine pharmaceutique, cosmétique et l'industrie agroalimentaire¹⁴, grâce aux avantages qu'elle présente par rapport aux méthodes traditionnelles, notamment l'augmentation de la vitesse réactionnelle, l'amélioration du rendement de la réaction et l'utilisation efficace de l'énergie.

B. Sreedhar *et al.*¹⁵ ont montré l'influence favorable des irradiations ultrasoniques sur les temps de réaction et les rendements lors des réactions d'acylation d'alcool ou d'amine en utilisant la chamosite ferreuse en tant que catalyseur hétérogène, et l'acide acétique comme agent acylant. Le rendement est passé de 85 à 99 % et de 85 à 95%, tandis le temps de réaction est passé de 90 à 5min et 150 à 4min, dans l'acylation de benzylamine et 1-phényléthanol respectivement

Tableau 3.1. Comparaison des résultats d'acylation de benzylamine et 1-phényléthanol obtenus par chauffage et activée par ultrasons.¹⁵

Substrat	T (°C)		Ultrasons	
	Rendement (%)	Temps (min)	Rendement (%)	Temps (min)
Benzylamine	85	90	99	5
1-Phényléthanol	85	150	95	4

3.4. La sonochimie

3.4.1. Définition

La sonochimie est un domaine de la chimie où les réactions se produisent en solution grâce à l'énergie apportée par les ultrasons. Généralement elle est notée par « **US** » ou représentée schématiquement par quatre parenthèses «)))) ». Les effets des ultrasons sur les réactions chimiques sont liés au phénomène de cavitation acoustique qui correspond à la formation, à la croissance et à l'implosion de microbulles de gaz dans les liquides.

3.4.2. Matériels utilisés en sonochimie

Tous les systèmes à ultrasons sont composés d'un transducteur, un dispositif qui produit les ultrasons. Le transducteur est un matériau possédant des propriétés piézoélectriques permettant de convertir l'énergie électrique en énergie mécanique. Cette vibration mécanique est alors transmise dans le milieu sous forme d'onde ultrasonore. Les équipements d'ultrason ont été développés à la fois pour l'échelle industrielle et celle du laboratoire. Pour l'une ou l'autre application, il existe deux systèmes.

a. Système du bac à ultrason

Les bacs à ultrason sont les plus répandus dans les laboratoires car ils sont peu chers et très utilisés dans de nombreuses applications, telles que le dégazage de solvants, la dissolution de composés et le nettoyage de verreries. Ils sont composés d'une cuve possédant plusieurs

transducteurs dans la base et les parois qui génèrent des fréquences comprises entre 20 et 60 KHz à de faibles puissances acoustiques, généralement comprises entre 1 et 5 W.cm⁻² afin de ne pas endommager le bac lors de la cavitation¹⁶.

L'irradiation ultrasonore passe par un liquide, généralement l'eau, qui sert à transmettre l'énergie depuis les transducteurs jusqu'au récipient ou se produit la réaction chimique. Cependant, le champ ultrasonore n'est pas homogène dans tout le volume de liquide, par conséquent, l'effet des ultrasons sur le milieu réactionnel dépend de sa position dans le bac¹⁷.

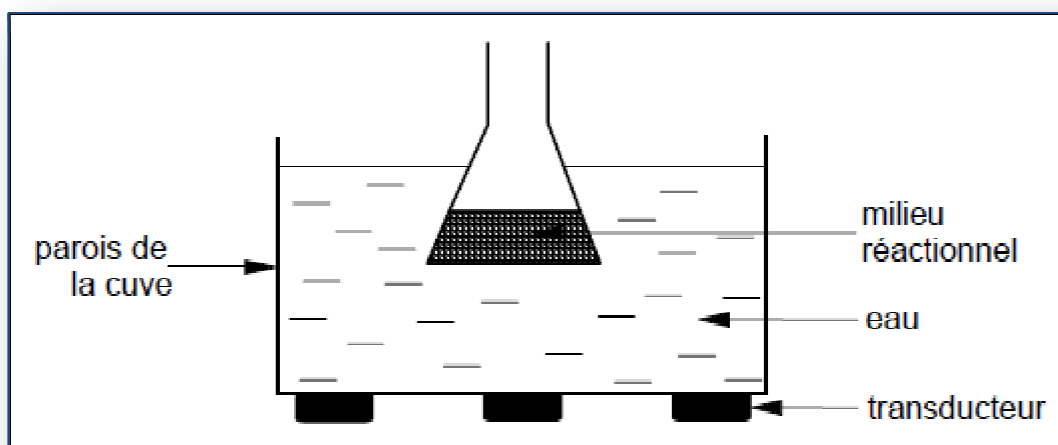


Figure 3.2. Système du bain à ultrason.

La forme du récipient contenant le milieu réactionnel entre également en jeu : elle intervient dans le transfert d'intensité sonore entre l'eau de la cuve et le milieu réactionnel. Le rendement de ce transfert d'intensité est bien meilleur dans le cas de flacons à fond plat que dans le cas de ballons de forme sphérique. Pour améliorer le rendement sonochimique (rendement du transfert entre l'énergie fournie par les transducteurs et l'énergie développée par la cavitation dans le milieu réactionnel), on peut aussi jouer sur la tension de surface de l'eau contenue dans la cuve. En ajoutant un tensioactif, on la diminue et on améliore d'autant le rendement¹⁸.

b. Système de la sonde à ultrason

La sonde à ultrason est composée de quatre parties distinctes qui sont le générateur, le convertisseur ultrasonore, l'amplificateur ultrasonore et la sonde sonore avec une pointe métallique vibrante. Le processus consiste à immerger directement la pointe métallique dans

la solution à traiter. L'irradiation ultrasonore se propage le long de l'émetteur jusqu'au milieu réactionnel. Ce système est largement utilisé pour des réactions chimiques, mais comme la cavitation est concentrée dans une zone très petite, la température du milieu réactionnel pourrait augmenter rapidement, par conséquent, on utilise souvent un procédé de contrôle de la température.

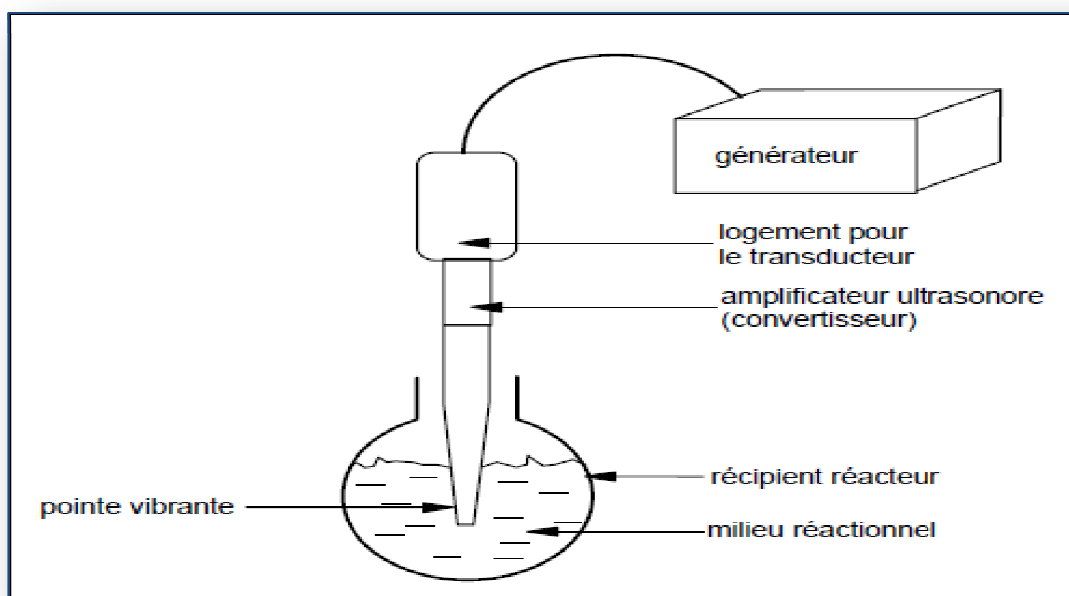


Figure 3.3. Système de la sonde à ultrason.

Les puissances acoustiques dans le cas de sonde à ultrason peuvent atteindre jusqu'à 100 fois supérieures à celles des bacs (plusieurs centaines de $W.cm^{-2}$). Le convertisseur électromécanique ou transducteur contient l'élément piézoélectrique qui est, en général, conçu à base de céramiques du type titanate de baryum. Il permet de transformer l'énergie électrique de haute fréquence en énergie de vibration mécanique de même fréquence.

3.5. Phénomène de la cavitation

3.5.1. Définition

Lorsque des ultrasons sont émis dans un milieu liquide, un phénomène physique peut être induit : il s'agit de la cavitation acoustique, les molécules du milieu subissent alternativement des compressions et des dépressions. Quand l'énergie est capable de vaincre les forces d'attraction entre les molécules du liquide, la cohésion du liquide est rompue et on assiste donc à la création, la croissance puis l'implosion de microbulles de gaz. L'implosion des

bulles est un changement brutal de la phase gaz-vapeur à la phase liquide, qui a pour effet la libération de forces moléculaires élevées provoquant une onde de choc dans le milieu. La cavitation entraîne des effets violents et imprévisibles qui provoquent une augmentation de la température et génère une grande énergie qui est à l'origine de diverses applications des ultrasons.

3.5.2. Dynamique d'une bulle de cavitation

La cavitation ultrasonore comporte trois étapes : la formation de la bulle, puis sa croissance et enfin son implosion.

- **Naissance**

Il existe une pression minimale à partir de laquelle une bulle peut se former dans le liquide : c'est le seuil de cavitation. Les liquides très purs sont capables de résister à des dépressions de plusieurs dizaines de mégapascals et la cavitation semble difficile à générer dans ce cas¹⁹. Il est rapporté dans une étude, que grâce aux impuretés présentes dans le liquide qu'elle apparaît. Il s'agit de minuscules particules solides ou de gaz dissous, appelés nucléi, qui favorisent l'apparition de la cavitation à des tensions plus faibles²⁰.

- **Croissance**

Une fois les bulles de cavitation formées, la majeure partie d'entre elles oscillent dans le champ ultrasonore, quand la pression à l'intérieur de la bulle est supérieure à celle de l'extérieur du liquide, la surface de la bulle augmente, la différence de concentration entre la bulle et le liquide constitue une force motrice du transfert de matière vers l'intérieur de la bulle. Ainsi, les bulles ont une durée de vie de plusieurs cycles acoustiques pendant lesquels elles croissent par diffusion rectifiée, coalescent puis remontent à la surface du liquide²¹. C'est ce que l'on appelle la cavitation stable. Il existe un autre type de cavitation dit transitoire du fait que les bulles ont une durée de vie très courte, guère plus d'un cycle acoustique²².

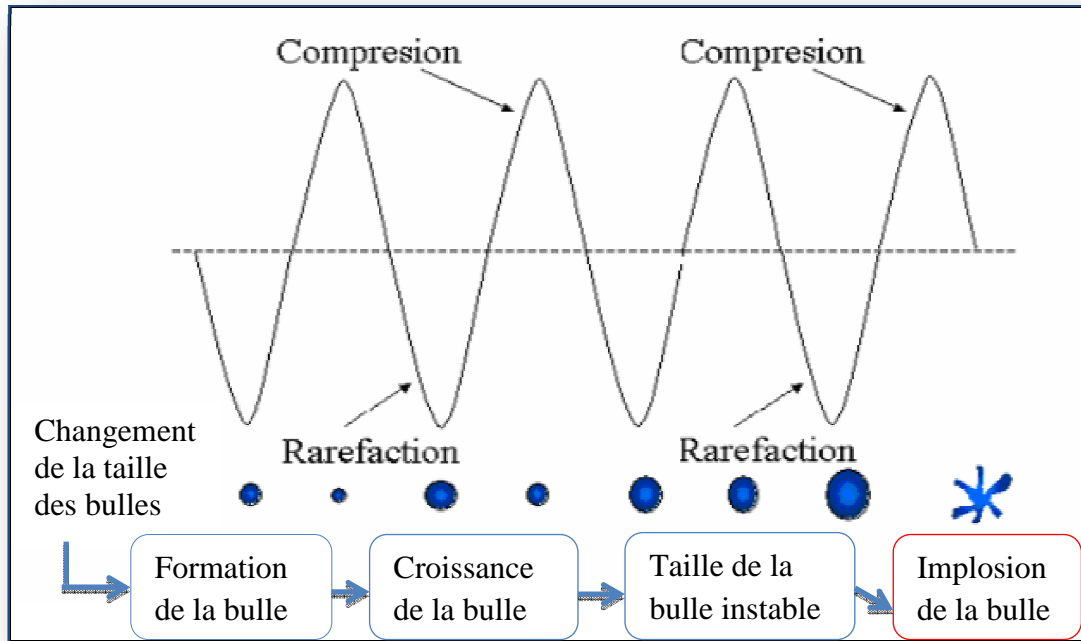


Figure 3.4. Dynamique d'une microbulle soumise aux ultrasons.

- **Implosion et sonoluminescence**

Sous l'action de la pression, les bulles transitoires s'effondrent brusquement. La bulle de cavitation libère alors toute l'énergie accumulée et concentrée durant sa croissance. L'implosion s'accompagne des jets de liquide se déplaçant à une vitesse de 100 m.s^{-1} ²³. De même, la cavitation acoustique s'accompagne de l'émission d'un flash lumineux dont le spectre se situe dans la lumière ultraviolette jusqu'à 193 nm ^{24,25}.

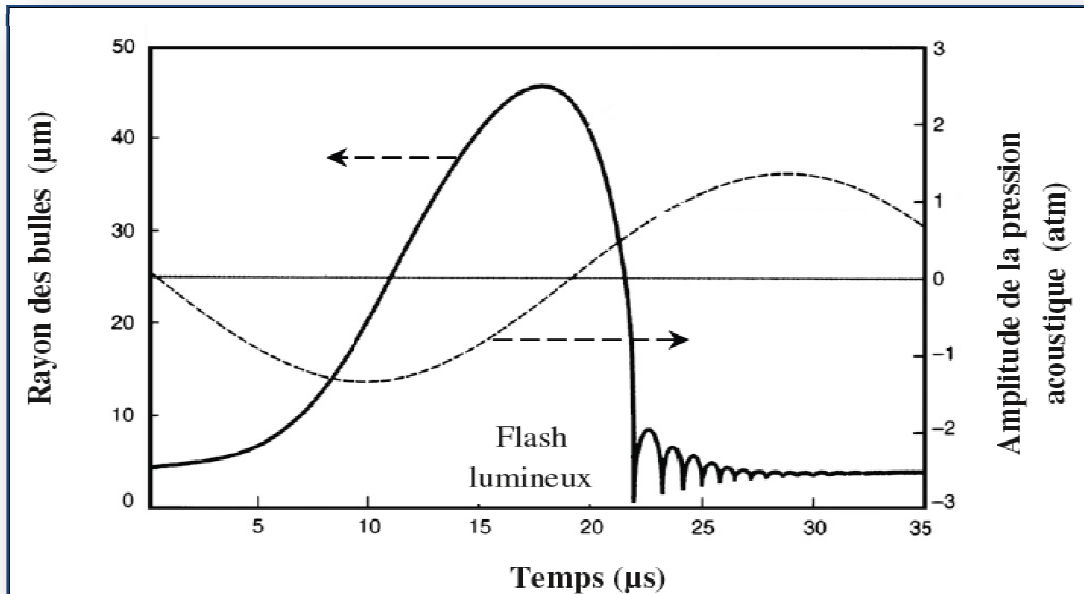


Figure 3.5. Évolution de la taille d'une bulle de cavitation transitoire²⁴.

3.5.3. Type de la cavitation

Il existe quatre types de cavitation :

- La cavitation thermique : plus connue sous le nom d'ébullition.
- La cavitation optique : crée par application d'un faisceau laser de forte intensité, cette méthode est utilisée pour l'étude des effets de la cavitation.
- La cavitation hydrodynamique : Ce type de cavitation est provoqué par l'écoulement d'un liquide à forte vitesse.
- La cavitation acoustique : crée par un son d'intensité très fort, généralement par les ultrasons de puissance, qui est le domaine d'intérêt de cette étude.

Ces différents types de cavitation, bien que provoqués par des phénomènes différents ont des origines similaires²⁶. Physiquement, pour qu'un tel phénomène se produise, il faut fournir une énergie capable de vaincre les forces de cohésion du liquide, c'est-à-dire que la pression du liquide doit devenir inférieure à sa tension de vapeur^{27,28}.

3.5.4. Paramètres influençant la cavitation

La cavitation est influencée par des paramètres propres à l'onde (fréquence, puissance), mais aussi par les propriétés du milieu irradié et les conditions opératoires.

- **Puissance**

La puissance est le paramètre qui a l'effet le plus important. Pour que la cavitation ait lieu une puissance minimale est requise (seuil de cavitation). L'effet des ultrasons augmente avec la puissance fournie. Cependant, il existe une limite physique : lorsque la cavitation devient trop intense, un bouclier de bulles de cavitation se forme sur la surface émettrice²⁹.

- **Fréquence**

Etant donné le large domaine de fréquence ultrasonore couvert par les ultrasons, le choix de la fréquence est primordial. D'une manière générale, les auteurs ne sont pas tous d'accord sur l'effet de la fréquence^{2,16}. Une tendance est souvent admise que les basses fréquences favorisent les effets physiques et les hautes fréquences les effets chimiques des ultrasons. Augmenter la fréquence diminue la profondeur de pénétration de l'onde, donc le volume soniqué, mais elle diminue aussi la pression maximale atteinte lors de l'implosion et donc la violence de la cavitation.

- **Température**

La température également a une influence sur la cavitation. L'augmentation de la température diminue la solubilité des gaz dans les liquides, et augmente la tension de la pression de vapeur saturante du solvant, donc le seuil de cavitation est abaissé ce qui facilite la création de bulles. Cependant il est prouvé qu'une augmentation de la température diminue l'efficacité des ultrasons³⁰.

- **Pression**

L'augmentation de la pression conduit à l'augmentation des forces de cohésion du liquide et donc l'énergie nécessaire pour vaincre ces forces est accrue résultant une augmentation du seuil de cavitation. Cependant, augmenter la pression intensifie l'effet de l'implosion³¹. Par conséquent la température et la pression maximales lors du collapse sont accrues, et l'implosion a des effets plus violents³².

- **Liquide**

Les propriétés du liquide en termes de la tension de vapeur, la tension interfaciale et la viscosité peuvent influencer sur la cavitation acoustique. Une augmentation de la tension de vapeur du liquide facilite l'apparition de bulles, la tension interfaciale et la viscosité affectent

aussi le seuil de cavitation. Plus elles sont élevées, plus la cohésion du fluide est forte et donc la cavitation sera plus difficile à obtenir^{1,33}.

- **Géométrie**

La géométrie du réacteur : sa forme et la hauteur de liquide sont de premier ordre ; Il en va de même pour la position et le type d'appareillage ultrasonore choisi. Tout cela a un effet principalement sur la propagation de l'onde dans le milieu et sa réflexion sur les parois et donc la répartition de l'onde dans le réacteur^{34,35}.

Références bibliographiques

- (1) Henglein A., Herburger D., G. M. *J. Phys. Chem.*, **1992**, 96, 1126–1130.
- (2) Ashokkumar M., G. F. *Ultrasound assisted chemical processes*; Reviews in chemical engineering, 1999.
- (3) Leonelli, C., Mason, T. J. *Chem Eng. Process* **2010**, 49, 885–900.
- (4) Bouziane. A. Effet des ultrasons sur des réactions de transfert de phase solide- liquide et liquide-liquide, INPT, Toulouse, 1995.
- (5) Cadwell, F. S. *CEP Symp. Ser.* **1971**, 67, 124–127.
- (6) Tuan, L. N.; Chau, P. N. *Chem Eng. Process* **2014**, 52 (3), 373–388.
- (7) Shweta, S., Munishwar, N. G. *Chem Cent J.* **2008**, 36, 561–570.
- (8) Adulkar, T. V.; Rathod, V. K. *Ultrason. Sonochem.* **2014**, 21 (3), 1083–1089.
- (9) Hafez, Z. The role of microstreaming in ultrasound-enhanced thrombolysis, 2008.
- (10) Richards W.T., L. A. . *Am. Chem. Soc* **1927**, 49, 3086–3100.
- (11) Pedersen, M. H. *New Digital Techniques in Medical Ultrasound Scanning*, University of Copenhagen, 2003.
- (12) Kumar A., Wilhelm A.M., Delmas H., Gogate P.R., P. A. B. In *9th congress of European Society of Sonochemistry in Badajoz; Spain, 2004*; p 152.
- (13) O.A., K. *Degassing of liquids in Physical principle of ultrasonic technology*, Plenum pre.; L.D.Rosenberg, Ed.; New-York, 1973.
- (14) Mulet, A.; Cárcel, J. A.; García-pérez, J. V.; Riera, E. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*; 2011.
- (15) Sreedhar, B.; Arundhati, R.; Amarnath Reddy, M.; Parthasarathy, G. *App Clay Sci* **2009**, 43, 425–431.
- (16) Cum G., Gallo R., S. A. *Ultrasonics* **1992**, 30, 267–270.
- (17) Pugin, B. *Ultrasonics* **1987**, 25, 49–55.
- (18) T. J. Mason. *Sonochemistry*, Chemistry.; Oxford, 1999.
- (19) F.G. Blake. Acoustics Research Laboratory, Harvard University: Massachusetts, 1949.
- (20) Cravotto, G., Cintas, P. *Chem. Soc. Rev* **2006**, 35, 180–196.
- (21) Crum, L. A. *Ultrasonics* **1984**, 22, 215–223.
- (22) Eller A., F. H. G. *J. Acoust. Soc. Am.* **1964**, 37, 493–503.
- (23) K. Yasuda, T. Torii, K. Yasui, Y. Iiad, T. Tuziuti, M. Nakamura, Y. A. *Ultrason. Sonochem.* **2007**, 14, 699–704.
- (24) Putterman, S. J. *Sci. Am.* **1995**, 14, 32–37.

- (25) R. Hiller, S.J. Putterman, B. B. *Am. Phys. Soc.* **1992**, *69*, 1182–1184.
- (26) Zhao, H.; Baker, G. A.; Song, Z.; Olubajo, O.; Zanders, L.; Campbell, S. M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *57* (1–4), 149–157.
- (27) Huang, J.; Liu, Y.; Song, Z.; Jin, Q.; Liu, Y.; Wang, X. *Ultrason. Sonochem.* **2010**, *17* (3), 521–525.
- (28) Disselkamp R.S., Hart Ya-Huei Chin, P. C. H. F. *J Catal.* **2004**, *227*, 552–555.
- (29) Gole, V. L.; Gogate, P. R. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2012**, *53*, 1–9.
- (30) Mason T.J., L. J. . *Sonochemistry: theory, application and uses of ultrasound in chemistry*, Ellis Horw.; 1988.
- (31) Neppiras. E.A. *Ultrasonics* **2008**, *18*, 201–209.
- (32) Chendke P. K., F. H. S. *J. Phys. Chem.*, **1983**, *87*, 1644–1648.
- (33) LAUGIER, F. Les Ultrasons En Procédés Polyphasiques: Transfert Gaz-Liquide Et Réaction Liquide-Liquide., National, D E L Institut Toulouse, Polytechnique D E Anne-marie, Mme Wilhelm, 2007.
- (34) S. I. Nikitenko, C. Le Naour, P. M. *Ultrason. Sonochem.* **2007**, *14*, 330–336.
- (35) S. Rochebrochard, J-F. Blais, E. N. *Ultrason. Sonochem.* **2010**, *17*, 547–554.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Chapitre 2. Matériels et méthodes

1. Réactifs et enzymes

1.1. Lipases

Novozym® 435 (lipase de *Candida antarctica* B immobilisée sur des billes de résine acrylique macroporeuse, ≥ 5000 U/mg). Société Novo.

CRL (lipase de *Candida rugosa* type VII, ≥ 700 U/mg), ROL (lipase de *Rhizopus oryzae*, ≥ 30 U/mg), PCL (lipase de *Pseudomonas cepacia*, ≥ 30 U/mg) et PPL (lipase de pancréas du porc type II, 100-500 U/mg) provenant de Sigma.

Lipase AK (lipase de *Pseudomonas fluorescens*, ≥ 20 U/g), Lipase PS (lipase de *Burkholderia cepacia*, ≥ 30 U/g) et Lipase G (lipase de *Penicillium camemberti*, ≥ 20 U/g) issues Amano.

Lipozyme® IM (lipase de *Mucor miehei* immobilisée sur une résine macroporeuse échangeuse d'anions, ≥ 30 U/g) issue de Novo.

U/g : 1 unité correspond à la quantité d'enzyme qui permet la libération d'1 μmol d'un acide gras par heure à pH 7,2 à 30 °C lors de l'hydrolyse d'un triglycéride (souvent l'hydrolyse de la trioléine en acide oléique).

2.2. Réactifs et solvants

Alcools : (*R,S*)-1-phenylethanol (pureté $>99\%$), (*R*)-1-phenylethanol, (*R,S*)-2-Pentanol ($>99\%$), (*S*)-2-Pentanol, (\pm)-Menthol, ($-$)-Menthol; (\pm)-Sulcatol ($>99\%$) et ($-$)-Sulcatol issus de Sigma Aldrich.

α -cyclogeraniol ((2,6,6-triméthylcyclohex-2-ényl) méthanol) racémique préparé par réduction avec LiAlH_4 de α -cyclogeraniate d'éthyle¹.

Donneurs d'acyle : Acétate de vinyle ($>99\%$), propionate de vinyle ($>99\%$), Butyrate de vinyle ($>99\%$), Laurate de vinyle ($>98\%$), Acétate d'éthyle ($>99\%$) et Butyrate de butyle ($>99\%$) provenant de Sigma Aldrich.

Solvants : Cyclopentyl méthyle éther ($>99\%$) and 2-méthyltetrahydrofurane (99%) issus de Alfa Aesar.

THF, éther diéthylique, dichlorométhane, chloroforme, toluène, hexane et tert-butyle méthyle éther provenant de Sigma Aldrich.

Liquides ioniques : 1-butyl-3-méthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyle)imide ([BMIM] [TFSI], $\geq 98\%$), 1-butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate ([BMIM] [BF₄], $\geq 98.5\%$) et 1-méthyl-3-octylimidazolium tétrafluoroborate ([OMIM][BF₄], $\geq 98\%$) issus de Sigma Aldrich.

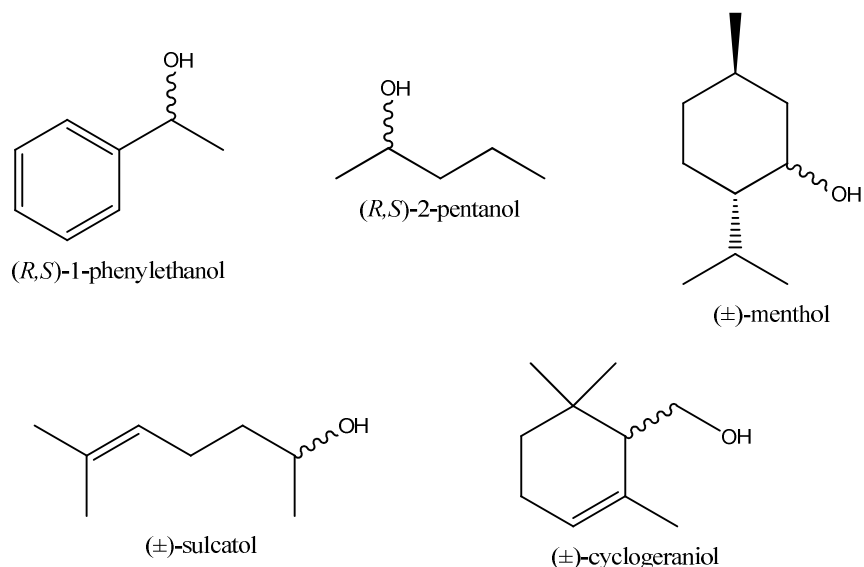


Figure 1. Structures des alcools racémiques utilisés.

2. Matériels

2.1. Ultrasons

Deux systèmes d'ultrasons ont été utilisés dans cette étude :

- Bain à ultrasons : Branson 1510E-MTH (Branson Ultrasonics Corporation, États-Unis), équipé essentiellement d'un conteneur rectangulaire (14,0 cm x 15,0 cm x 10,0 cm). La puissance maximale de cet appareil est de 143 W et la fréquence de 40 kHz. La température de l'eau dans le bain a été contrôlée avec une précision de ± 1 °C.

- Sonde à ultrasons : Microson Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix XL2000), équipé d'un générateur (33,0 cm x 19,0 cm x 17,0 cm) et une sonde (17,0 cm x 3,0 cm). La puissance maximale générée par cet appareil est de 100 W avec une fréquence de 22,5 kHz.



Figure 2. Système à ultrasons utilisé, Branson 1510E-MTH et Misonix XL2000.

2.2. Chromatographie phase gazeuse (CPG)

Deux appareils de Chromatographie phase gazeuse (CPG) ont été utilisés dans cette étude :

- GC-17, SHIMADZU : équipé d'un détecteur d'ionisation de flamme d'hydrogène (FID) et d'une colonne capillaire chirale Beta-dex™ 325 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) pour l'analyse GC des alcools racémiques (*R,S*)-1-phényléthanol, (*R,S*)-2-pentanol et (\pm)-menthol.
- Agilent Technologies 6850 : équipé d'un détecteur d'ionisation de flamme d'hydrogène (FID) et d'une colonne capillaire chirale DMePentil-BETACDX (25 m x 0,25 mm x 0,15 µm) pour l'analyse GC du (\pm)-sulcatol et d'une colonne Beta-MEGA-DEX DAC (25m x 0.25mm x 0.25µm) pour l'analyse de (\pm)-menthol et (\pm)- α -cyclogeraniol.



Figure 3. CPG utilisée, GC-17 SHIMADZU et Agilent Technologies 6850.

3.2. Réactions dans les solvants « verts »

3.2.1. Transestérification des alcools racémiques

Afin de contrôler l'activité de l'eau (a_w) et préalablement à leur utilisation, l'ensemble des réactifs, solvants et lipases utilisé dans ce cas, sont équilibrés séparément pendant au moins 24h en les mettant dans des solutions salines saturées à 25°C dans des récipients scellés.² Le mélange réactionnel est préparé en ajoutant 1 ml de solvant organique (MeTHF, CPME, toluène ou MTBE) contenant des alcools racémiques (\pm)-menthol (32 mM), (\pm)-sulcatol (35 mM) ou (\pm)- α -cyclogeraniol (32 mM) et de donneur d'acyle (325 mM) au 10 mg à 50 mg de lipases dans un flacon de 3 ml. Ensuite, le mélange réactionnel est agité à 150 tr/min à différentes température. Un échantillon de 5 μ L de surnageant est ponctionné à la fin de la réaction et analysé par CPG.

3.2.2. Transestérification en présence des liquides ioniques

Afin de tester l'effet des liquides ioniques, les réactions sont effectuées selon le protocole précédent en milieu liquides ioniques en ajoutant au solvant organique 5% ou 1% (v: v) de [BMIM] [TFSI] ou [BMIM] [BF₄], respectivement. Les vitesses initiales de réaction ($\mu\text{mol h}^{-1}\text{mg}^{-1}$) sont calculées en début de réaction (conversion < 15%). Dans cette étude, la quantité de lipases se réfère à la poudre brute.

La configuration absolue des énantiomères transformés est attribuée par rapport à des références optiquement pures et confirmée par comparaison avec les données de la littérature.

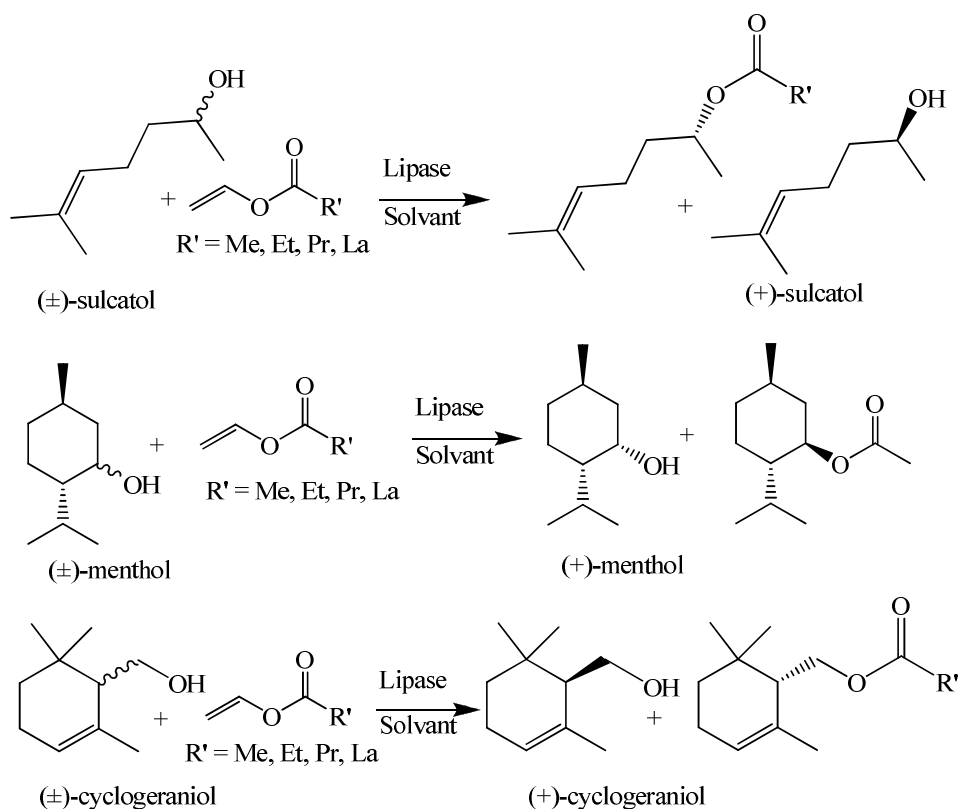


Schéma 2. Réactions modèles étudiées dans les solvants verts.

4. Techniques de formulation des lipases

4.1. Immobilisation

Immobilisation par adsorption : Les lipases immobilisées sur Celite ou Bentonite sont obtenues par adsorption physique en utilisant une méthode décrite dans la littérature avec de légères modifications³. La lipase (0,5 g) est solubilisée dans 4 ml de solution tampon phosphate (20 mmol, pH 7,0). Le support solide d'immobilisation (1 g) est alors ajouté dans la solution enzymatique. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 1 h, la lipase immobilisée est filtrée, séchée pendant une nuit sous vide.

Immobilisation par liaison covalente : Les lipases immobilisées sur résine échangeuse d'ions (Amberjet) sont obtenues par liaison ionique en utilisant une méthode précédemment optimisée dans notre laboratoire⁴. Le support solide (1 g) est mis en suspension dans un volume de solution enzymatique et, après cela, la solution tampon phosphate (pH 8,0) y est ajoutée pour obtenir un volume final de 30 ml. La suspension est ensuite agitée à 40 °C pendant 5 h. La lipase immobilisée est récupérée suivant la même procédure que celle utilisée précédemment.

4.2. Lyophilisation

Les lipases lyophilisée sont préparées par congélation des solutions d'enzyme à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$: 20 mg de poudre d'enzyme commerciale sont solubilisés dans un 1 ml de tampon phosphate de potassium (20 mM, pH 8) ou le même tampon contenant 5% (p/V) d'additif (saccharose, D-mannitol ou méthoxy poly (éthylène glycol). Après, on sèche l'ensemble dans un dessiccateur à pression réduite.

5. Méthodes analytiques

5.1. Dosage des protéines

Pour le dosage des protéines, nous avons fait appel à la méthode de Bradford⁵ utilisant le bleu de Coomassie. Le bleu de Coomassie (G250) forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorbance à 595 nm.

Préparation du réactif de Bradford

Dans une fiole jaugée 1 litre, on dissout :

- Bleu de coomassie G250.....100mg
- Ethanol 95 %.....50ml

Agitation pendant 2 heures puis, on ajoute :

- Acide orthophosphorique 85%.....100ml
- H₂O distillée q.s.p.....1000ml

Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage indiquée dans le tableau 1, est réalisée à partir d'une solution mère contenant 0.1mg/ml de sérum albumine bovine (SBA).

Tableau 1. Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (S.A.B).

Tubes	1	2	3	4	5	6
SAB (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée µl	100	80	60	40	20	0
Réactif (ml)	4	4	4	4	4	4

Détermination de la concentration en protéines

Dans un tube, on ajoute 4ml de réactif de Bradford à 100 µl de la solution enzymatique qu'on mélange. Après 5 minutes on mesure l'absorbance à 595 nm sur le spectrophotomètre.

Pour déterminer la quantité des protéines présente dans les échantillons à doser, on opère comme suit :

- On trace la courbe d'étalonnage absorbance en fonction de la quantité de SAB en µg.
- On détermine à partir de cette courbe d'étalonnage la quantité de protéine correspondante aux absorbance trouvées pour chaque échantillon de la solution enzymatique à doser (µg).

Calcul du rendement d'immobilisation

Le degré de l'immobilisation est exprimé par le rapport en pourcentage suivant :

$$DI = (P_T - P_L) / P_T * 100$$

Où

P_T : représente la quantité totale de protéine utilisée.

P_L : représente la quantité de protéine dans l'eau de lavage.

5.2. Analyse chromatographique en phase gazeuse

Pour analyse CPG avec l'appareil (GC- 17, SHIMADZU), les conditions d'analyse utilisées pour identifier les produits et séparer les énantiomères *S* et *R* ainsi que ceux des deux énantiomères alcools sont :

- température initiale : 120°C
- temps initiale : 12 min
- température finale : 200°C
- temps finale : 30 min
- vitesse : 6°C/min

Les temps de rétention pour les deux énantiomères des esters racémiques et la séparation de ces énantiomères *S* et *R* ainsi que ceux des deux énantiomères alcools, ont été déduites par rapport à des références optiquement pures :

Tableau 2. Temps de rétention des substrats et produits en GC chirale (GC- 17, SHIMADZU).

Substrat	Temps de rétention (min)							
	Alcools		Esters					
	<i>R</i>	<i>S</i>	Alkyl acetate		Alkyl propionate		Alkyl butyrate	
<i>R</i>			<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	
(<i>R,S</i>)-1-phényléthanol	10.15	10.31	11.40	11.64	13.15	13.44	14.96	15.39
(<i>R,S</i>)-2-pentanol	5.07	5.29	7.02	7.24	8.80	9.15	10.92	11.16
	-	+	-	+	-	+	-	+
(±)-menthol	12.92	13.23	14.50	14.74	16.62	16.87	18.48	18.73

Pour les analyses CPG effectuées avec l'appareil Agilent 6850, les conditions d'analyse sont les suivantes :

- températures de l'injecteur et du détecteur : 250 °C,
- gaz vecteur : azote.
- Les programmes de température du four :
 - 80° (2min)-2°/min-110°-15°/min-150°(2min) pour séparer les énantiomères de sulcatol et leurs esters correspondants.
 - 80° (2min)-5°/min-150°(2min) pour la séparation des énantiomères du menthol et ceux du α -cyclogeraniol et leurs esters correspondants. Les temps de rétention sont donnés par le tableau 3 suivant :

Tableau 3. Temps de rétention des substrats et produits en GC chirale (Agilent Technologies 6850).

Substrat	Temps de rétention (min)									
	Alcools		Esters							
	-	+	Alkyl acetate		Alkyl propionate		Alkyl butyrate		Alkyl laurate	
-			+	-	+	-	+	-	+	
(±)-sulcatol	5.44	5.79	8.33	8.69	9.65	9.84	11.07	11.39	23.84	24.02
(±)-menthol	8.63	8.83	9.27	9.62	10.87	11.03	12.69	12.94	28.63	28.88
(±)- α -cyclogeraniol	7.26	7.37	9.21	9.35	11.31	11.55	12.94	13.18	31.22	31.41

Références bibliographiques

- (1) Serra, S.; Gatti, F. G.; Fuganti, C. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, 20 (11), 1319–1329.
- (2) G. Bell, P. J. Halling, B. D. Moore, J. Partridge, D. G. R. *Elsevier Sci. Ltd* **1995**, 13, 468–473.
- (3) Belbachir M, B. A. *US Pat.* **2001**, 6, 274–527.
- (4) Benamia F, Bouchagra S, Saihi Y, Djeghaba Z, R. N. *Prep Biochem Biotechnol* **2013**, 43, 33–47.
- (5) Bradford.MM. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248–254.

Chapitre 3. Résultats et discussion

1. Résolution énantiosélective des alcools racémiques par les lipases sous ultrasons

1.1. Introduction

Comme nous l'avons déjà montré précédemment, c'est l'énergie produite par le phénomène de cavitation généré par les ultrasons qui est responsable de l'amélioration de la réactivité. Cette propriété des ultrasons est également mise à profit dans les réactions enzymatiques^{1,2}. De nombreuses études disponibles dans la littérature rapportent que les ultrasons à basse fréquence (environ 40 kHz) ne dénaturent pas les enzymes³. Leur utilisation avec une faible fréquence et une puissance adéquate, peut, au contraire optimiser le fonctionnement du biocatalyseur.

Dans cette première partie des travaux réalisés dans cette thèse, l'effet des ultrasons sur l'acylation enzymatique de trois alcools racémiques, 1-phényléthanol, 2-pentanol et menthol, avec différents donneurs d'acyle a été évalué. Une série des lipases commerciales, la CALB, la CRL, la ROL et la LPP, largement utilisées dans l'hydrolyse et la synthèse des esters a été employé. L'objectif de ce travail est focalisé sur la possibilité d'augmenter l'activité et l'énantiosélectivité de ces lipases en les utilisant sous irradiation ultrasonore. Généralement, les expériences ont été menées dans un bain à ultrasons et/ou un agitateur magnétique avec trois approches différentes: irradiation par ultrasons sans agitation conventionnelle (US), agitation conventionnelle après pré-irradiation de la lipase (P-I), et sous agitation conventionnelle uniquement (Conv). Les effets du système générateur des ultrasons, du temps de pré-irradiation par ultrasons de la lipase, des solvants organiques, des donneurs d'acyle, de la température et sur les lipases immobilisées ont été étudiés.

1.2. Influence du système à ultrasons

L'effet de la source des ultrasons (système à ultrasons) a été étudié et comparé avec l'agitation conventionnelle. Un bain et une sonde à ultrason ont été utilisés dans les mêmes conditions opératoires. Comme le montrent les figures 1.1 et 1.2, lors de l'acylation enzymatique des trois alcools racémiques étudiés, les conversions et les énantiosélectivités les plus élevées ont été obtenues lorsque les réactions sont effectuées dans le bain à ultrason, et ce pour les deux enzymes utilisées (CALB et CRL). Lorsque les ultrasons sont générés par une sonde à ultrasons, les valeurs de conversion et d'énantiosélectivité obtenues sont nettement plus faibles, aussi bien par rapport au bain à ultrasons que par rapport à l'agitation mécanique classique.

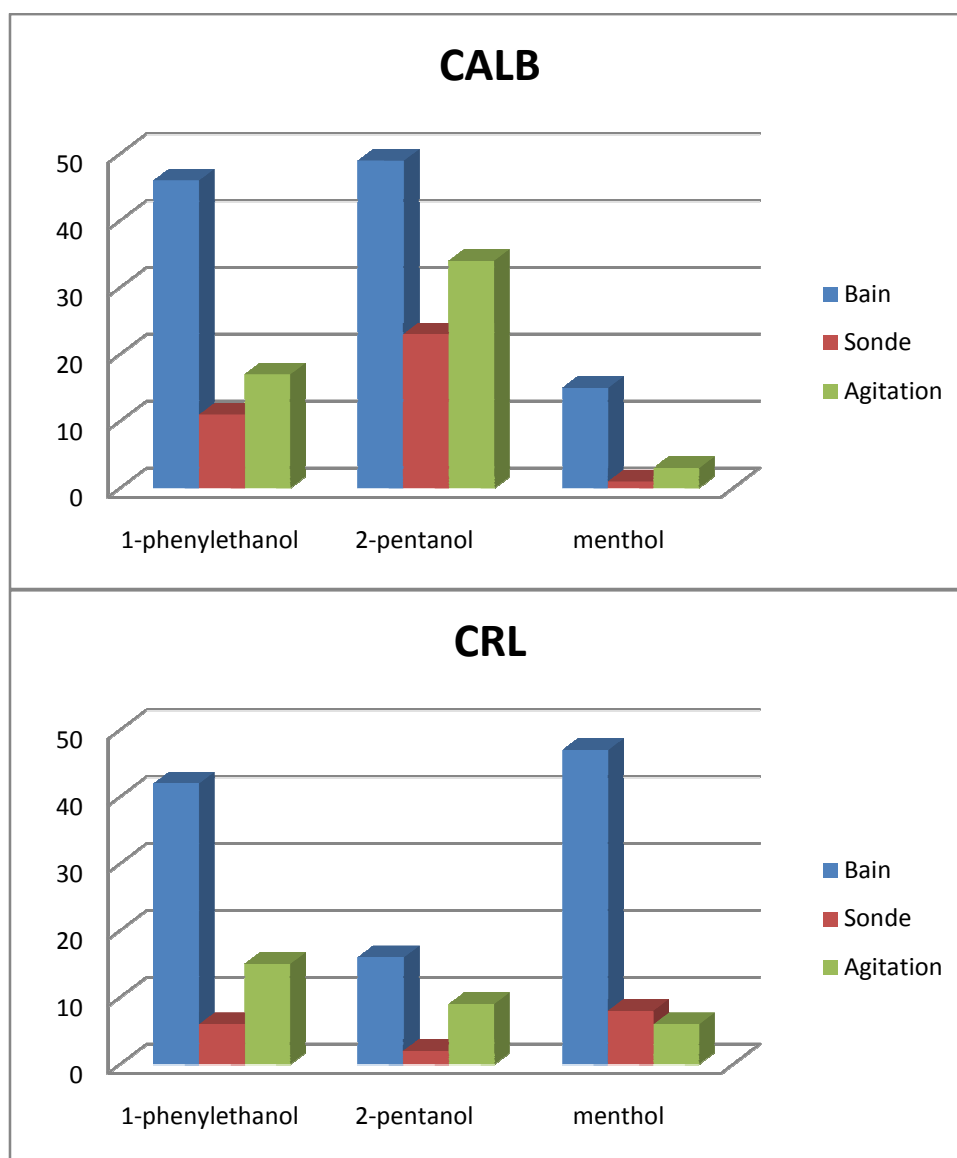


Figure 1.1. Influence de système à ultrason sur la conversion (C) dans l'acylation enzymatique des alcools racémiques par CALB et CRL.

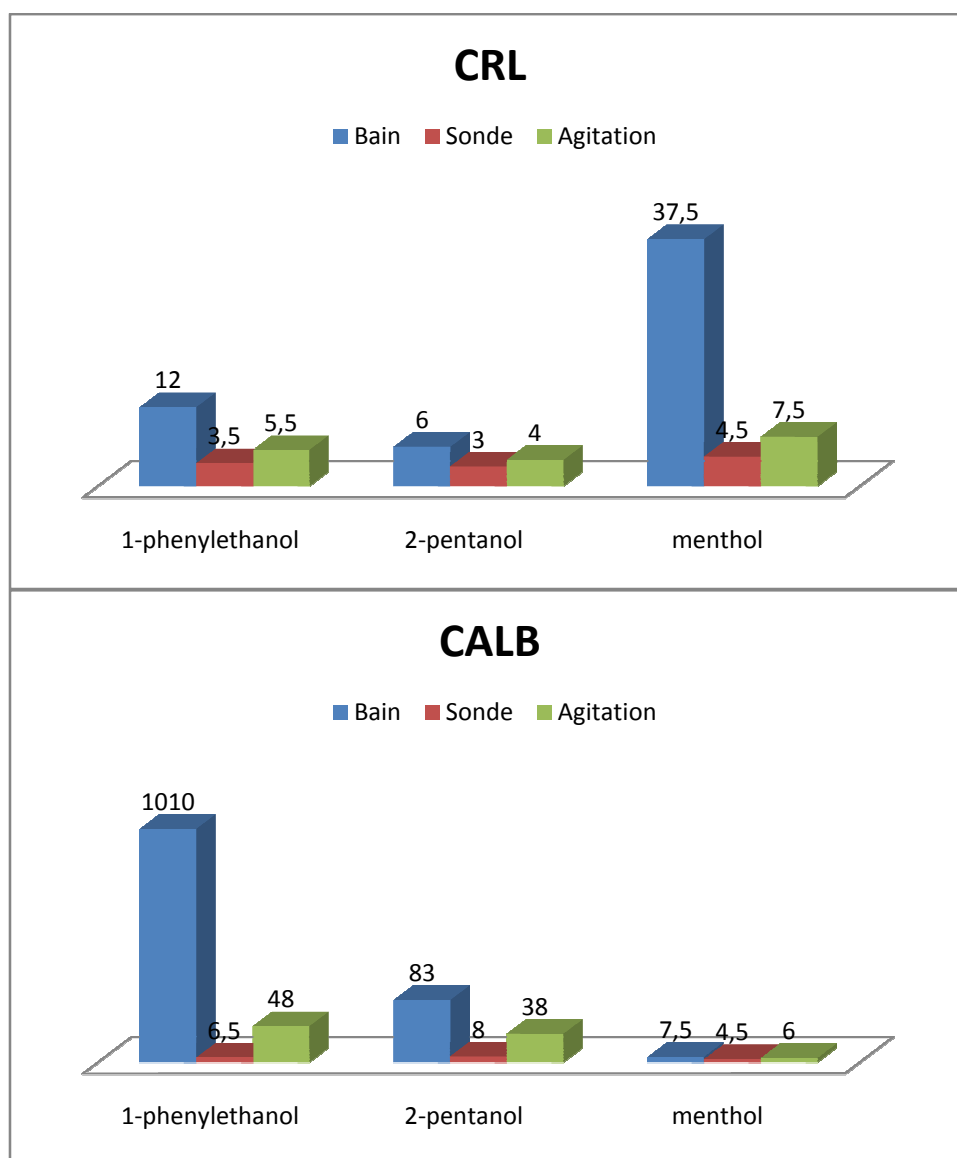


Figure 1.2. Influence de système à ultrason sur l'énantiosélectivité (E) dans l'acylation enzymatique des alcools racémiques par CALB et CRL.

Il est donc clair que l'utilisation d'une sonde à ultrasons n'est pas le moyen approprié pour activer des réactions enzymatiques. Par rapport au bain à ultrasons, une sonde produit des ondes concentrées sur une petite zone⁴ et en contact direct avec le milieu réactionnel et plus particulièrement avec la protéine qui se dénaturerait alors rapidement par rupture des différentes liaisons faibles maintenant la cohésion tridimensionnelle de la protéine.

1.3. Effet de prétraitement de la lipase par ultrasons

Il a été rapporté^{5,6} que lorsque on utilise des poudres enzymatiques pour catalyser les réactions dans un solvant organique, la pré-irradiation enzymatique par ultrasons peut réduire la taille des particules et, par conséquent, augmenter la surface entre l'enzyme et le substrat, ce qui peut contribuer à réduire les limitations de transfert de masse et améliorer l'activité catalytique de l'enzyme. Les effets du temps de pré-irradiation ultrasonore avec les trois alcools ont été étudiés. Les résultats présentés dans les figures 1.3, 1.4 et 1.5 montrent que la conversion augmente avec l'augmentation du temps de pré-irradiation par ultrasons de 0,5 à 1 h dans le cas du 1-phényléthanol et du 2-pentanol, et de 0,5 à 2 h dans le cas du menthol. Cependant, au delà de ces durées, la conversion commence à chuter. Ces mêmes observations sont également valables dans le cas de l'énantiosélectivité où le facteur E subit des fluctuations similaires. De ce fait, pour la suite de nos expériences, nous avons choisi de prendre une durée prétraitement de 1 heure.

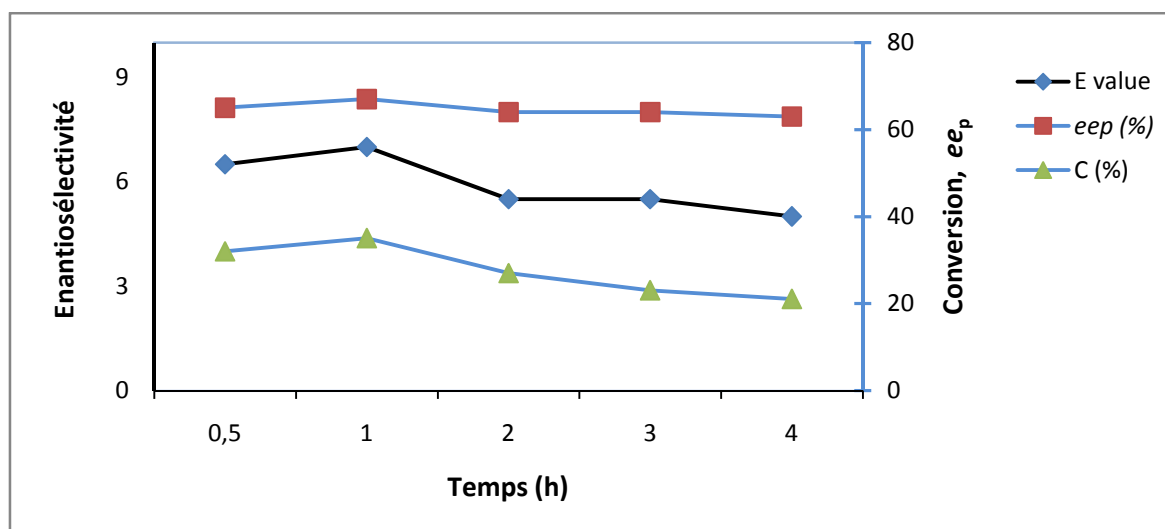


Figure 1.3. Effet du temps de pré-irradiation par ultrasons sur l'acylation enzymatique de (R,S)-1-phényléthanol avec de l'acétate de vinyle dans l'hexane par CRL.

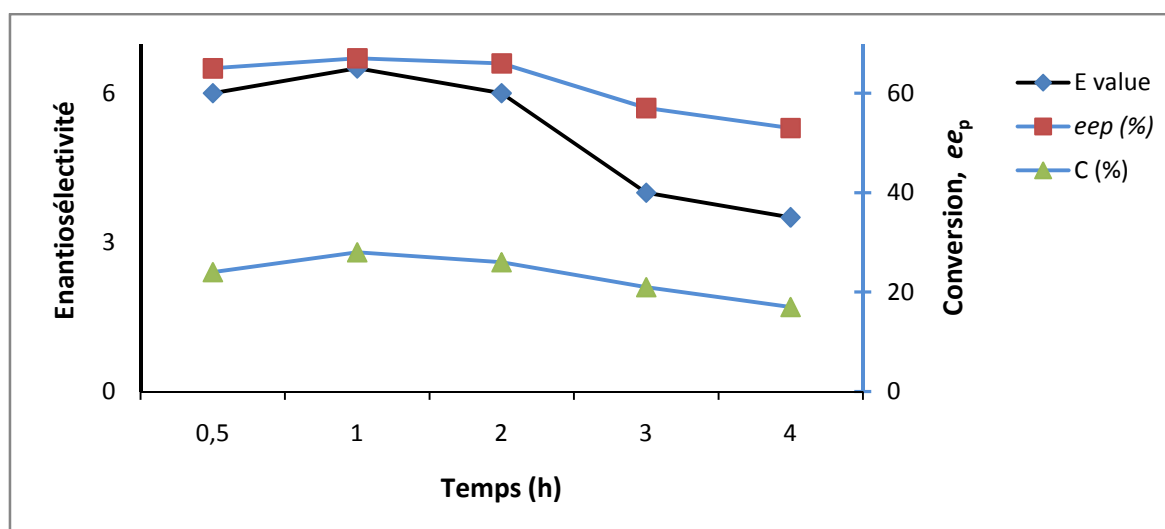


Figure 1.4. Effet du temps de pré-irradiation par ultrasons sur l'acylation enzymatique du (*R,S*)-2-pentanol avec l'acétate de vinyle dans l'hexane par CRL.

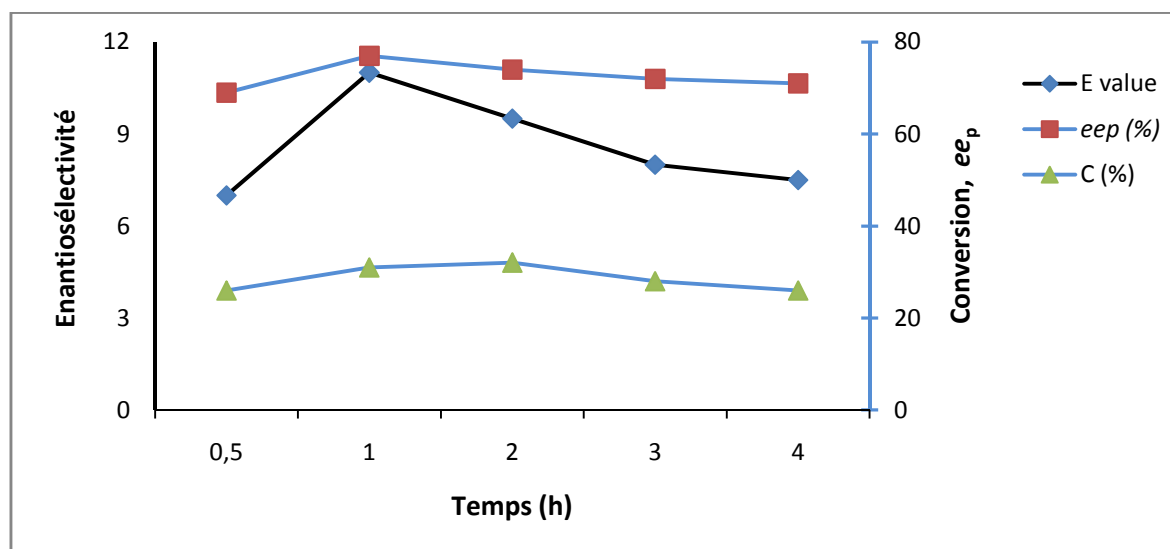


Figure 1.5. Effet du temps de de pré-traitement par ultrasons sur l'acylation enzymatique du (\pm)-menthol avec l'acétate de vinyle dans l'hexane par CRL.

1.4. Effet de la nature de lipase

L'influence de la nature du biocatalyseur sur la sélectivité et les performances de l'acylation des 3 alcools racémiques, 1-phényléthanol, 2-pentanol et menthol a été étudiée. Les réactions y afférentes ont été mises en œuvre par trois modes différents : ultrasons pendant toute la réaction (US), agitation après pré-irradiation de la lipase (P-I) et agitation conventionnelle (Conv). Quatre lipases commerciales différentes ont été testées : la lipase de *Candida antarctica* B (CALB), la lipase de *Candida rugosa* (CRL), la lipase de *Rhizopus oryzae* (ROL) et la lipase pancréatique de porc (LPP). Les réactions catalysées par les quatre lipases

ont été effectuées en solvant organique hydrophobe (hexane) à 35 °C avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle (tableau 1.1). Sous ultrasons, la CALB a donné les meilleurs résultats pour l'acylation enzymatique du 1-phényléthanol et du 2-pentanol où une excellente conversion et une bonne énantiosélectivité ont été obtenues. Cependant, l'efficacité de cette lipase vis-à-vis du menthol a été faible. Concernant la CRL, elle a présenté une bonne activité pour la résolution du 1-phényléthanol et le menthol pour les deux modes d'ultrasons, mais n'a montré une certaine énantiosélectivité que pour le menthol. D'autre part, elle a présenté une faible activité vis-à-vis de l'alcool aliphatique en termes d'activité et d'énantiosélectivité. Une faible activité enzymatique de la ROL a été observée dans l'acylation des trois alcools racémiques, à l'exception d'une légère amélioration sous l'effet des ultrasons dans le cas du 1-phényléthanol et le menthol. Elle a également présenté une énantiosélectivité modérée vis-à-vis du 1-phényléthanol. La dernière lipase étudiée, la LPP, a donné les plus faibles conversions dans l'acylation des trois alcools chiraux pour les trois modes réactionnels, avec, cependant, une énantiosélectivité relativement élevée.

Tableau 1.1. Influence de la nature de lipase sur l'acylation enzymatique des alcools racémiques avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle.

Substrat	Lipase	Temps (h)	ee_p (%)			C (%)			E		
			US	P-I	Conv	US	P-I	Conv	US	P-I	Conv
1-phenylethanol	CALB	0.5	99	98	95	46	42	17	1010	289	48
	CRL	4	75	67	67	42	35	15	12	7	5.5
	ROL	7	91	90	86	17	12	8	25	21	14
	LPP	8	90	78	52	5	5.5	3	21	8.5	3
2-pentanol	CALB	2	93	91	92	49	46	34	83	50	38
	CRL	6	68	62	57	16	12	9	6	4.5	4
	ROL	8	65	63	60	6	4	1	5	4.5	4
	LPP	8	94	92	95	8	4	2	35	25	40
menthol	CALB	7	74	74	71	15	9	3	7.5	7	6
	CRL	5	89	77	73	45	31	16	37.5	11	7.5
	ROL	6	82	85	76	19	14	8	12	14	8
	LPP	8	93	88	90	13	6	4	31.5	16.5	20

1.5. Effet du solvant

Le choix du solvant organique approprié pour une réaction catalysée par une lipase est connu pour être un facteur crucial pour l'activité et l'énantiosélectivité de l'enzyme^{7,8}. Plusieurs solvants organiques avec différents $\log P$ ont été sollicités dans l'acylation des alcools par la CRL à 35 °C. Les réactions ont été menées selon les trois modes cités précédemment. Dans

les trois cas, et pour les trois alcools racémiques testés, la lipase présente une activité et une énantiosélectivité similaires en fonction de la variation de $\log P$. D'après les résultats présentés dans le tableau 1.2, on remarque que la conversion et l'énantiosélectivité augmentent avec l'augmentation de $\log P$. La CRL semble donc être favorisée par les solvants hydrophobes ($\log P$ élevé). Une exception cependant pour l'éther diéthylique ($\log P = 0,89$) qui permet une bonne conversion et une énantiosélectivité modérée pour le 1-phényléthanol et bonne pour le menthol. Ces observations de comportement de la lipase dans ces solvants organiques sont en accord avec d'autres recherches rapportées dans la littérature⁹. Dans notre cas, les valeurs les plus élevées ont été obtenues lorsque l'hexane a été utilisé comme milieu réactionnel et sous mode ultrasons (US) avec les trois alcools. Par conséquent, l'hexane est choisi comme solvant approprié et utilisé pour étudier les autres effets dans cette partie.

Tableau 1.2. Effet du solvant sur l'acylation enzymatique des alcools secondaires racémiques avec de l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle par la CRL.

Substrat	Solvant	Log P	Temps (h)	ee_p (%)			C (%)			E		
				US	P-I	Conv	US	P-I	Conv	US	P-I	Conv
1-phenylethanol	THF	0.49	4	69	61	60	9	8	4	6	4.5	4
	Diéthylique	0.89		71	63	60	33	19	14	8.5	5	4.5
	Dichlorométhane	1.25		74	67	65	21	20	13	8	6	5
	Chloroforme	1.97		56	50	51	17	15	10	4	3.5	3
	Toluène	2.73		72	66	61	37	35	13	9	5	4.5
	Hexane	3.50		75	69	67	42	35	15	12	8	5.5
2-pentanol	THF	0.49	6	64	56	54	11	7	6	5	3.5	3.5
	Diéthylique	0.89		68	62	57	16	12	9	6	4.5	4
	Dichlorométhane	1.25		63	57	53	24	22	16	5.5	4.5	3.5
	Chloroforme	1.97		60	54	55	13	7	5	4.5	3.5	3.5
	Toluène	2.73		68	59	57	32	29	22	7	5	4.5
	Hexane	3.50		74	67	66	36	28	21	10	6.5	6
menthol	THF	0.49	5	82	73	70	13	8	7	11.5	7	6
	Diéthylique	0.89		87	76	69	34	25	20	22.5	9.5	6.5
	Dichlorométhane	1.25		91	84	77	26	18	11	29	14	8.5
	Chloroforme	1.97		57	55	54	14	12	9	4	4	3.5
	Toluène	2.73		86	71	71	39	26	18	23	7.5	7
	Hexane	3.50		89	77	73	45	31	16	37.5	11	7.5

1.6. Effet du donneur d'acyle

La longueur de la chaîne du donneur d'acyle et sa nature, influencent la conversion et l'énantiosélectivité dans la résolution des alcools chiraux par les lipases¹⁰. Nous avons étudié trois longueurs de chaînes de carbone différentes (C2, C3, C4) dont trois esters vinyliques et deux aliphatiques comme donneurs d'acyle. Les résultats obtenus dans les trois modes d'acylation enzymatique avec les alcools sont présentés dans le tableau 1.3. Comme on peut le voir dans ce tableau, la CRL a présenté une activité et une énantiométrie plus élevées vis-à-vis l'acétate de vinyle dans l'acylation du 2-pentanol et menthol et vis-à-vis du propionate de vinyle dans l'acylation du 1-phényléthanol pour tous les modes utilisés. Ensuite, la conversion et la valeur *E* ont diminué avec l'allongement de la longueur de chaîne des donneurs d'acyle. Cela pourrait être expliqué par un accès plus facile au site actif de la lipase par des donneurs d'acyle possédant une courte chaîne carbonée. D'autre part, ces résultats montrent l'avantage de l'utilisation des esters vinyliques, notamment en termes d'activité enzymatique, à cause de l'irréversibilité de la réaction par la formation d'un énol lors de la réaction qui est en tautomérie avec la forme aldéhyde. Le tableau 1.3 montre également l'effet positif des ultrasons pour les deux modes utilisés par rapport à l'agitation conventionnelle.

Tableau 1.3. Effet du donneur d'acyle sur l'acylation enzymatique des alcools secondaires racémiques par la CRL dans l'hexane.

Substrat	Donneur d'acyle	Temps (h)	<i>ee_p</i> (%)			<i>C</i> (%)			<i>E</i>		
			US	P-I	Conv	US	P-I	Conv	US	P-I	Conv
1-phenylethanol	Acétate de vinyle	4	75	67	67	42	35	15	12	7	5.5
	Propionate de vinyle	6	85	82	75	37	25	18	21	13	8
	Butyrate de vinyle	8	78	72	69	22	16	9	10	7	6
	Acétate d'éthyle	8	76	69	65	13	9	5	8	6	5
	Butyrate de butyle	8	81	70	79	8	5	2	10	6	8.5
2-pentanol	Acétate de vinyle	6	74	67	66	36	28	21	10	6.5	6
	Propionate de vinyle	8	71	62	60	24	13	7	7.5	4.5	4
	Butyrate de vinyle	8	63	58	61	13	9	5	5	4	4
	Acétate d'éthyle	8	66	61	56	8	7	4	5	4.5	4
	Butyrate de butyle	8	73	71	63	6	6	2	7	6	4.5
menthol	Acétate de vinyle	5	89	77	73	45	31	16	37.5	11	7.5
	Propionate de vinyle	7	86	73	68	39	31	17	23	9	6
	Butyrate de vinyle	8	80	69	64	27	19	11	12	6.5	5
	Acétate d'éthyle	8	87	65	60	18	15	13	17	5.5	4.5
	Butyrate de butyle	8	83	71	75	11	7	8	12	6	7.5

1.7. Effet de la température

L'effet de la température de réaction sur l'activité et l'énantiosélectivité de la CALB dans l'acylation du 1-phényléthanol et 2-pentanol et de la CRL dans l'acylation du menthol a été évalué sous mode ultrasons et dans un intervalle passant de 25 à 55 °C. Les résultats obtenus et présentés dans les figures 1.6, 1.7 et 1.8, montrent que l'activité enzymatique est influencée par la température. L'élévation de température peut augmenter la solubilité des substrats et améliorer le transfert de masse à l'intérieur et à l'extérieur du site actif. Cependant pour les lipases, il existe une température optimale au-delà de laquelle la conformation active de l'enzyme est perturbée conduisant à une perte d'activité enzymatique¹¹. Dans cette étude, la conversion du 1-phényléthanol et du 2-pentanol par la CALB a graduellement augmentée entre 25 et 45 °C, pour chuter au-delà. Concernant l'énantiosélectivité, pour la CALB celle-ci est à son maximum à 35 °C. Des observations similaires ont été observées dans l'acylation du menthol par la CRL. On peut conclure d'après cette étude, en tenant compte des meilleures conversions et énantiométries, que la température optimale pour le fonctionnement de la CALB et la CRL est 35 °C.

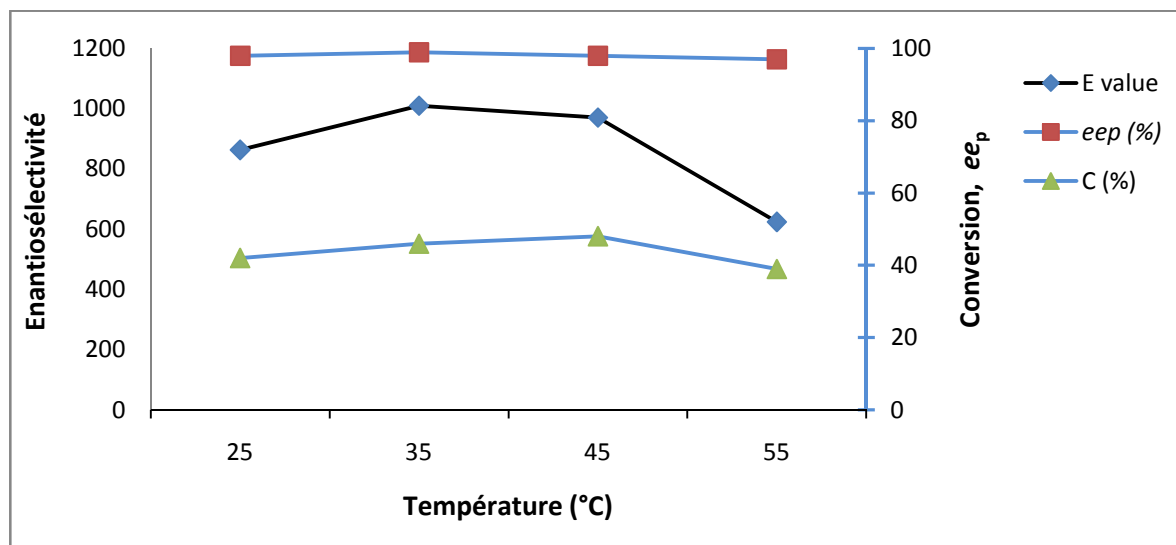


Figure 1.6. Effet de la température sur l'acylation enzymatique du (*R,S*)-1-phényléthanol avec l'acétate de vinyle par la CALB dans l'hexane sous US.

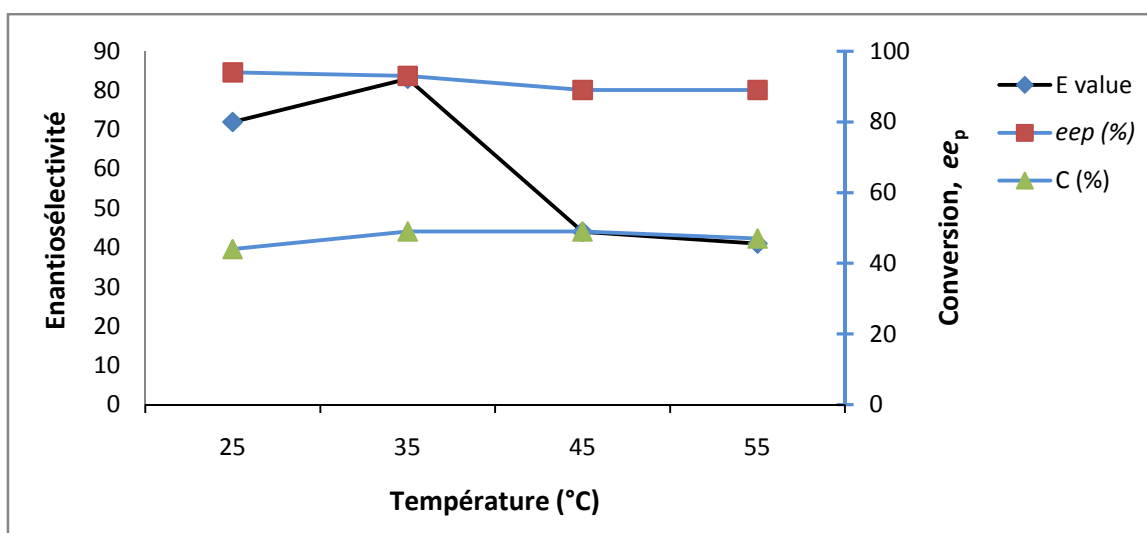


Figure 1.7. Effet de la température sur l'acylation enzymatique du (*R,S*)-2-pentanol avec l'acétate de vinyle par la CALB dans l'hexane sous US.

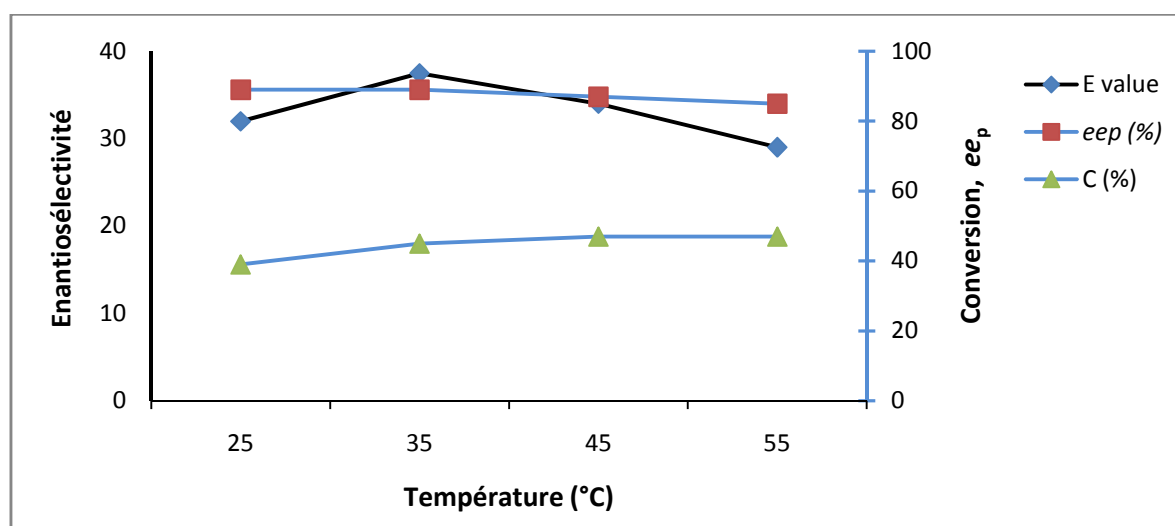


Figure 1.8. Effet de la température sur l'acylation enzymatique du (\pm)-menthol avec l'acétate de vinyle par la CRL dans l'hexane sous US.

1.8. Effet des ultrasons sur les lipases immobilisées

L'immobilisation des enzymes est un facteur important non seulement pour leur stabilité, mais également pour améliorer leur performance en qualité d'énantiosélectivité^{12,13}. Dans cette étude, la CRL a été immobilisée selon trois différentes méthodes : (i) par adsorption sur deux supports Célite et Bentonite, (ii) par liaison covalente avec Amberjet et (iii) par cross-linked enzyme aggregate (CLEA), avec de bons rendements d'immobilisation (tableau 1.4). Les résultats obtenus montrent que, d'une manière générale, l'immobilisation améliore de manière notable l'énantiosélectivité de la lipase dans l'acylation des trois alcools racémiques

étudiés. Cependant, excepté la CLEA de CRL, une diminution de l'activité enzymatique exprimée par la conversion a été observée, pour l'ensemble des supports et notamment l'Amberjet.

Ensuite, l'effet des ultrasons sur l'acylation enzymatique des alcools racémiques, avec les différentes lipases immobilisées, et par les deux approches a été étudié et comparé avec l'agitation conventionnelle. Les résultats présentés dans le tableau 1.4 montrent l'effet positif des ultrasons (US) sur la conversion de tous les alcools chiraux étudiés par rapport à l'agitation conventionnelle. L'énantiosélectivité a également été améliorée sous l'effet des ultrasons notamment avec les lipases immobilisées par adsorption. Cependant, l'effet de pré-irradiation des lipases (P-I) a été négatif sur l'acylation avec lipases immobilisées par adsorption où une diminution de conversion a été observée. Cela peut être expliqué par une désorption de la lipase sous l'effet de l'irradiation, et avec la lipase immobilisée par liaison covalente et CLEA, une légère amélioration de la conversion a été observée avec cette approche de pré-irradiation. En revanche, cette approche a été favorable pour l'énantiosélectivité pour l'acylation de tous les alcools étudiés avec toutes les lipases immobilisées par les différentes méthodes.

Tableau 1.4. Effet des ultrasons sur la CRL immobilisée par différentes méthodes dans l'acylation enzymatique des racémiques alcools.

Substrat	Lipase	Rdt immobilisation (%)	Temps (h)	C (%)			E		
				US	P-I	Conv	US	P-I	Conv
1-phényléthanol	CRL libre	/	4	42	35	15	12	8	5.5
	CRL sur Céliste	55.1	4	34	10	14	26	9	13
	CRL sur Bentonite	67.4	4	39	13	16	38	14	27
	CRL sur Amberjet	34.3	5	20	15	6	19	18	7
	CLEA de CRL	83.7	2	44	39	35	9	9	6
2-pentanol	CRL libre	/	6	36	28	21	10	6.5	6
	CRL sur Céliste	55.1	5	31	13	16	17	12.5	8
	CRL sur Bentonite	67.4	6	35	19	20	15	14	10
	CRL sur Amberjet	34.3	7	24	14	11	12	11	7
	CLEA de CRL	83.7	2	39	32	27	10	7	6
menthol	CRL libre	/	5	45	31	16	37.5	11	7.5
	CRL sur Céliste	55.1	5	28	10	13	52	48	34
	CRL sur Bentonite	67.4	5	30	12	15	47	39	28
	CRL sur Amberjet	34.3	6	21	19	5	25	21	15
	CLEA de CRL	83.7	2	38	35	33	12	10	9

1.9. Conclusion

Au cours de cette partie, nous avons pu montrer que les ultrasons pouvaient être utilisés avantageusement par rapport à l'agitation classique dans les réactions biocatalysées. Les deux méthodes employées, c'est-à-dire la pré-irradiation ultrasonique de la lipase ou l'irradiation pendant la réaction enzymatique, se sont montrées supérieures à l'agitation conventionnelle, aussi bien en termes de conversion que d'énantiosélectivité.

L'effet positif des ultrasons est apparu clairement sur l'activité enzymatique exprimée par la conversion où elle a été au moins doublée dans toutes les réactions d'acylation. L'énantiosélectivité des lipases également, a présentée une amélioration notamment dans le cas d'acylation du 1-phényléthanol et 2-pentanol par la CALB où elle est passée de 48 à 1010 et de 38 à 83, respectivement et dans le cas d'acylation du menthol par la CRL où elle est passée de 7.5 à 37.5. La seule exception observée est la désorption des lipases immobilisées par adsorption sous l'effet de pré-irradiation ce qui a causé une perte d'activité enzymatique. D'autre part, l'utilisation de système de sonde à ultrasons s'est avérée inappropriée pour les réactions enzymatiques, l'explication peut être la dénaturation des lipases par l'immersion de la sonde dans le milieu réactionnel et son contact direct avec le biocatalyseur.

L'étude de l'effet du solvant sur l'acylation enzymatique des alcools a montré que la lipase présente des activités et des énantiosélectivités plus élevées dans des solvants apolaires avec $\log P$ élevé. Les meilleures performances des lipases en termes de conversion et de valeur de E ont été observées dans l'hexane comme solvant et sous mode ultrasons. Pour l'influence de la longueur de chaîne du donneur d'acyle, les résultats ont démontré que les lipases transforment mieux les donneurs d'acyle avec une petite chaîne carbonée. D'autre part, l'irréversibilité des réactions par l'utilisation des esters vinyliques a donné à ceux derniers un grand avantage sur les esters aliphatiques. La température optimale pour le fonctionnement la CALB et la CRL a été trouvée à 35 °C. Finalement, l'immobilisation de la CRL par différentes méthodes a été très bénéfique pour son fonctionnement que ce soit en termes d'activité ou d'énantiosélectivité.

Comme conclusion à cette première partie, l'utilisation des ultrasons pour activer les réactions enzymatiques a montré un grand potentiel pour l'amélioration de l'activité catalytique de l'enzyme par rapport aux techniques conventionnelle. Au regard du cout relativement abordable des appareillages utilisée (bain à ultrasons) et leur efficacité, cette stratégie peut

être une alternative intéressante aux méthodes d'agitation conventionnelles, et ce d'autant plus qu'elle obéit au sixième principe de la chimie verte.

Références bibliographiques

- (1) Disselkamp R.S., Hart Ya-Huei Chin, P. C. H. F. *J Catal.* **2004**, *227*, 552–555.
- (2) Cravotto, G., Cintas, P. *Chem. Soc. Rev* **2006**, *35*, 180–196.
- (3) Adulkar, T. V., Rathod, V. K. *Ultrason. Sonochem.* **2014**, *21*, 1083–1089.
- (4) Tian, Z. M.; Wan, M. X.; Wang, S. P.; Kang, J. Q. *Ultrason. Sonochem.* **2004**, *11* (6), 399–404.
- (5) Zheng, M. M.; Wang, L.; Huang, F. H.; Dong, L.; Guo, P. M.; Deng, Q. C.; Li, W. L.; Zheng, C. *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19* (5), 1015–1020.
- (6) Shah, S.; Gupta, M. *Chem. Cent. J.* **2008**, *2* (1), 1.
- (7) van Unen, D.-J.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *77* (3), 248–255.
- (8) Ghanem, A.; Schurig, V. *Monatshefte fur Chemie* **2003**, *134* (8), 1151–1157.
- (9) Petrenz, A.; Maria, P. D. De; Ramanathan, A.; Hanefeld, U.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Kara, S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *114*, 42–49.
- (10) Chen, Z. G.; Zong, M. H.; Gu, Z. X.; Han, Y. Bin. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31* (4), 351–356.
- (11) Xia, X.; Wang, Y. H.; Yang, B.; Wang, X. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31* (1), 83–87.
- (12) Abderahmane, B. Modélisation et optimisation des conditions d’immobilisation de la lipase de candida rugosa sur célite par RSM et réseaux de neurones, Badji Mokhtar Annaba university, 2012.
- (13) Soler, L.; Illanes, A.; Wilson, L. *Catal. Today* **2016**, *259*, 177–182.

2. Résolution enzymatique d'alcools racémiques dans des solvants « verts »

2.1. Introduction

Actuellement, l'application des processus chimiques à grande échelle nécessite l'utilisation de produits et de processus à faible impact environnemental car la protection de la planète est devenue une priorité capitale. Dans ce cadre, la biocatalyse est une des voies permettant de répondre à ces impératifs. Cependant, dans de nombreuses réactions biocatalysées, l'utilisation de solvants organiques est malheureusement nécessaire¹. En effet, les solvants organiques, s'ils sont effectivement toxiques et néfastes pour l'environnement, ils ont, par contre, permis d'élargir la palette d'intervention des biocatalyseurs et ouvert la voie à de nombreuses applications en synthèse organique². Des solvants alliant respect de l'environnement et propriétés intrinsèques aux solvants organiques seraient l'idéal. Tel est le cas des solvants 2-méthyltétrahydrofurane (MeTHF) et cyclopentyl méthyle éther (CPME) qui sont considérés comme «solvants verts»^{3,4}. Des travaux relativement récents ont montré que ces solvants peuvent être des milieux prometteurs pour les réactions biocatalysées⁵. Cependant, à notre connaissance, peu de recherches ont été effectuées sur l'influence de ces solvants sur les lipases, enzymes les plus utilisées en chimie organique.

C'est de ce constat que nous avons décidé de développer cette problématique, objet de la deuxième partie de ce travail. Pour ce faire, nous avons étudié la résolution enzymatique de quelques alcools racémiques industriellement intéressants dans les solvants verts mentionnés ci-dessus, catalysée par des lipases largement employées au niveau industriel. Les résultats obtenus avec ces solvants ont été comparés avec d'autres solvants organiques plus classiques comme le toluène et le t-butyle méthyle éther (MTBE). Les trois modèles de substrats étudiés dans cette partie possèdent des caractéristiques structurales différentes concernant le groupe fonctionnel alcool : (i) le (\pm)-menthol, un alcool secondaire cyclique et stériquement encombré ; (ii) le (\pm)-sulcatol, un alcool secondaire linéaire et (iii) le (\pm)- α -cyclogeraniol, un alcool primaire possédant un stéréocentre stériquement encombré en position α . D'autre part, dans l'intention de vérifier si les stratégies couramment utilisées pour améliorer l'activité enzymatique peuvent être exploitées avec ces solvants verts, le rôle de la formulation enzymatique par la lyophilisation et l'immobilisation de l'enzyme, et de l'addition de liquides ioniques au milieu réactionnel, ont été évalués. L'influence de l'activité de l'eau dans le système réactionnel, de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle et de la température ont été également étudiés.

2.2. Criblage de lipases

Dans un premier criblage, une série des lipases commerciales la CRL, la lipase AK, la CALB, la lipase PS, la lipozyme et la LPP ont été testées dans l'acylation enzymatique des alcools racémiques par l'acétate de vinyle. Les réactions ont été menées dans les deux solvants verts (MeTHF et CPME) et, à titre de comparaison, dans deux autres solvants classiques (toluène et MTBE). Les conversions des alcools racémiques présentées dans le tableau 2.1 sont mesurées après 24 h de réaction et l'énantiosélectivité a été calculée à 20% de conversion. Comme on peut le voir dans le tableau, l'activité enzymatique dépend de la lipase et du solvant organique.

Tableau 2.1. Criblage d'une série de lipases dans l'acylation enzymatique du (\pm)-menthol, (\pm)-sulcatol et (\pm)- α -cyclogeraniol avec le l'acétate de vinyle dans MeTHF, CPME, toluène ou MTBE comme solvant.

Substrat	Lipase	c (%) ^b ; vitesse initiale (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹); E ^c			
		MeTHF	CPME	Toluene	MTBE
(\pm)-menthol	CRL ^d	35; 36; 91	47; 144; 119	41; 146; 58	53; 158; 101
	Lipase AK ^e	5; 2; 121	9; 3; 232	8; 2; 103	7; 4; 106
	CALB ^f	0.4	0.5	0.4	0.7
	Lipase PS ^e	0.5	0.9	1.4	1.1
	Lipozyme ^e	1.3	1.7	1.2	1.4
	LPP ^d	0.1	0.2	0.3	0.2
(\pm)-sulcatol	CRL ^d	51; 160; 4	84; 350; 5	99; 340; 6	92; 344; 8
	Lipase AK ^e	38; 40; 28	51; 40; 35	53; 55; 21	56; 40; 26
	CALB ^f	66; 1690; 222	70; 1490; 422	83; 1800; 58	79; 1700; >1000
	Lipase PS ^e	11; 7; 37	26; 20; 25	31; 19; 46	22; 16; 12
	Lipozyme ^e	13; 10; 49	20; 15; 58	20; 12; 43	22; 16; 61
	LPP ^d	6; 1.6; 25	12; 2; 15	7; 1.8; 21	12; 3; 19
(\pm)- α -cyclogeraniol	CRL ^d	96; 161; 1	97; 496; 1	99; 632; 1	86; 484; 1
	Lipase AK ^e	29; 6; 6	27; 10; 11	25; 10; 9	16; 10; 6
	CALB ^f	32; 14; 8	46; 50; 12	38; 90; 6	29; 34; 7
	Lipase PS ^e	18; 4; 11	23; 10; 18	19; 5; 7	16; 10; 19
	Lipozyme ^e	7; 1.5; 1	9; 5; 2	8; 5; 1	78; 5; 1
	LPP ^d	1; 0.4; 1	2.5; 0.6; 2	8; 0.8; 1	4; 1.2; 2

^a Conversion, vitesse initiale et E sont en normal, italique et caractère gras, respectivement.

^b Valeur de conversion après 24 h de réactions.

^c Toute les lipases testée transforment préférentiellement le (-)-menthol, (R)- α -cyclogeraniol et (R)-sulcatol, à l'exception de la CRL qui possède une énantiopréférence pour (S)-sulcatol. E a été calculée à 20% de conversion selon les formules (3) et (5) en utilisant l'excès énantiomérique du produit (voir partie bibliographique).

Quantité de lipase était (^d) 50 or (^e) 20 or (^f) 10 mg.

Parmi toutes les lipases testées pour la transestérification du (\pm)-menthol, la CRL est la meilleure en termes de conversion, où des valeurs élevées ont été observées avec des temps de réaction plus courts. Cependant, l'énantiosélectivité obtenue est faible. La lipase AK a présenté la meilleure énantiosélectivité mais avec peu d'activité et taux de réaction. La CALB, la lipase PS, la lipozyme et la PPL sont inactives, même après 72 h de réaction aucun produit n'a été détecté pour la LPP. D'autre part, l'activité la plus élevée de la CRL est observée dans le MTBE. Dans le CPME l'activité est relativement bonne et est similaire à celle dans le toluène. Dans MetTHF, l'activité est modérée. Concernant l'énantiosélectivité de la CRL, celle-ci est bonne (facteurs E d'environ 100) pour les trois solvants CPME, MetTHF et MTBE et faible dans le toluène. Remarquons que pour la lipase AK, si les taux de conversion sont faibles, les énantiosélectivités observées sont bonnes à excellente dans le CPME ($E=232$).

Pour la transestérification du racémique sulcatol, la CALB, la CRL et la lipase AK ont montré des vitesses initiales de réaction très élevées ainsi que de très bonnes conversions. La lipase PS et le lipozyme ont présenté des activités modérées, et avec la LPP une très faible activité a été observée. Concernant l'énantiosélectivité des lipases, la CALB a donné le meilleur facteur E ($E>1000$ dans le MTBE). Les autres lipases ont présenté une énantiosélectivité modérée à l'exception de la CRL dont l'énantiosélectivité est très faible quel que soit le solvant ($E<8$). D'autre part, et pour l'évaluation de l'effet du solvant, les lipases testées ont montré une activité et énantiosélectivité dans le CPME et MetTHF, similaires à celles observées dans le MTBE et le toluène. En revanche, dans les deux solvants verts, l'énantiosélectivité de la CALB est excellente et est nettement supérieure à celle observée dans le toluène.

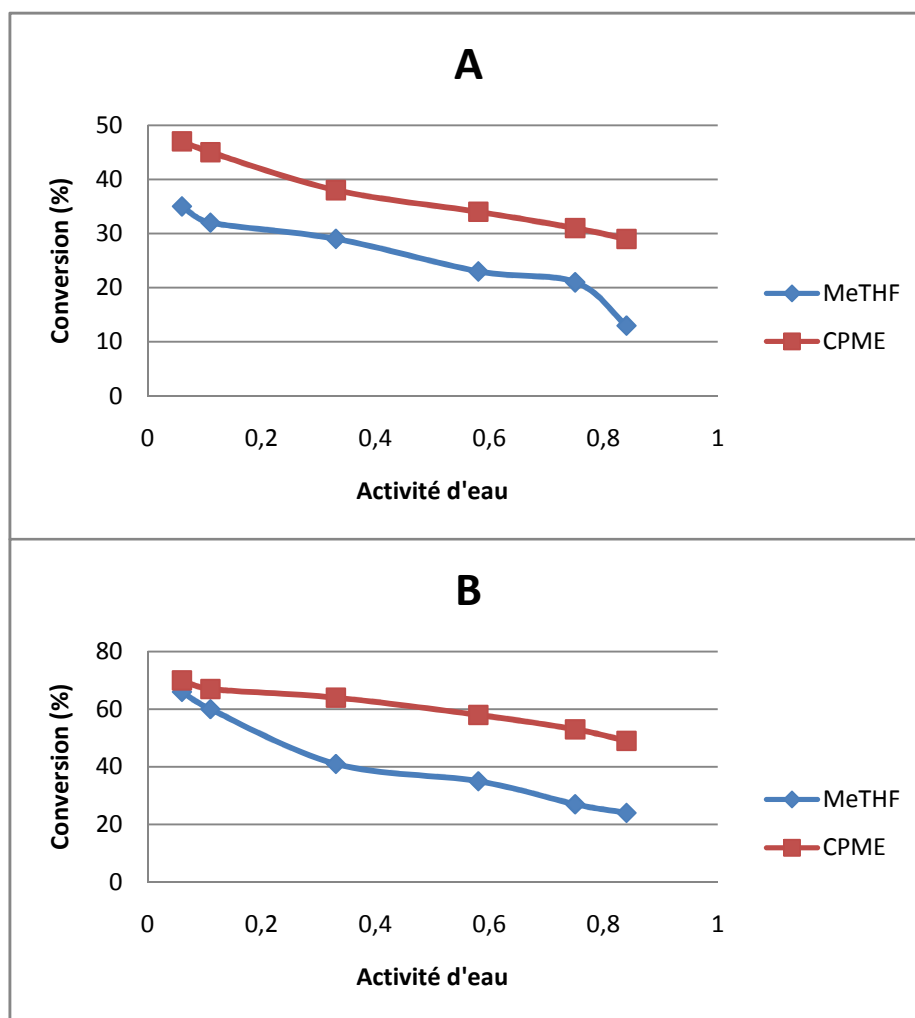
Dans l'acylation du racémique α -cyclogeraniol, les deux énantiomères ne sont pas discriminés et l'énantiosélectivité de l'ensemble des lipases testées reste faible à modérée quel que soit le solvant utilisé. Notons également que, contrairement aux autres lipases, la lipozyme et la LPP montrent des activités négligeables.

2.3. Influence de l'activité de l'eau (a_w)

Il est connu que, d'une manière générale, l'eau peut influencer la performance de l'enzyme dans les solvants organiques^{6,7}.

Un ensemble d'expériences d'acylation enzymatique des alcools racémiques dans le MeTHF et CPME a été effectué à 25 °C à différentes valeurs de l'activité de l'eau (a_w) comme décrit dans le chapitre matériels et méthodes.

L'effet de l' a_w sur l'activité des lipases dans la transestérification du menthol par la CRL, du sulcatol par CALB et du α -cyclogeraniol par lipase AK été évalué (figure 2.1). Avec les deux solvants verts, les activités les plus élevées sont obtenues pour une valeur d' a_w de 0,06 et diminuent au fur et à mesure que celle-ci augmente. Dans le cas de la transestérification du α -cyclogeraniol par lipase AK dans le MeTHF, la diminution a été très forte (conversion de 3% pour $a_w = 0,84$). Ces résultats montrent que si une quantité minimale d'eau est nécessaire au fonctionnement de la protéine, au-delà, celle-ci pourrait avoir un impact négatif sur l'activité enzymatique. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature⁸. En effet, l'eau libre dans le système réactionnel va rentrer en compétition avec l'alcool et provoquer l'hydrolyse du substrat ester.



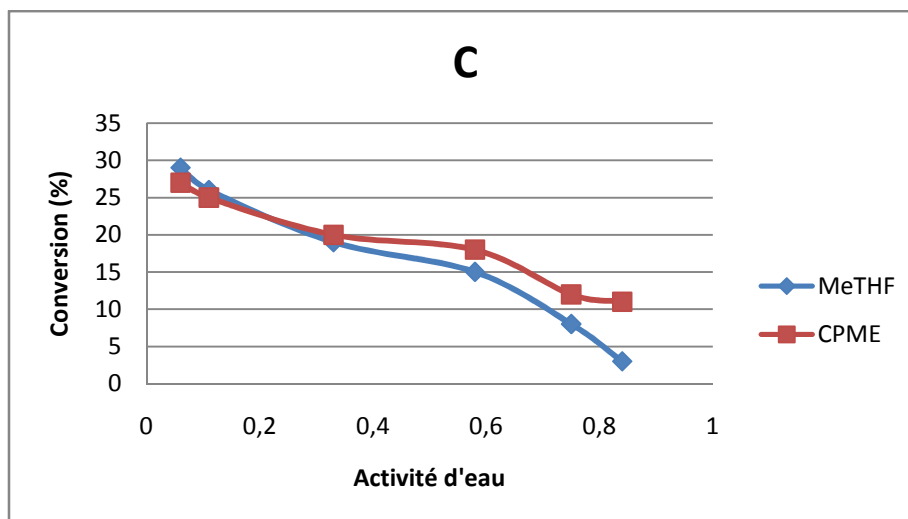


Figure 2.1. Effet de l'activité d'eau (a_w) sur l'activité des lipases dans la transestérification des alcools racémiques dans MeTHF, CPME : (A) la transestérification du (\pm)-menthol par la CRL ; (B) la transestérification du (\pm)-sulcatol par CALB ; (C) transestérification du (\pm)- α -cyclogeraniol par lipase AK.

2.4. Influence de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle

L'influence de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle a été étudiée.

Nous avons utilisé quatre donneurs d'acyle avec différentes longueurs de chaînes de carbone : C2 (acétate de vinyle), C3 (propionate de vinyle), C4 (butyrate de vinyle) et C12 (laurate de vinyle) (tableau 2.2). Pour les trois lipases utilisées, l'activité de la lipase AK étant trop faibles à négligeables, seules les résultats donnés par la CRL et la CALB sont rationnellement exploitables.

Pour la CALB, pour les deux solvants verts, la longueur de la chaîne du donneur d'acyle est inversement proportionnelle à l'activité enzymatique. Ceci est également vrai pour l'énantiosélectivité, exception faite pour le propionate de vinyle où celle-ci est la plus élevée. Notons également que cette énantiosélectivité de la CALB est favorisée lorsque la réaction est réalisée dans le CPME, et ce, quel que soit le donneur d'acyle.

Dans le cas de la CRL, seule l'activité est influencée. Si la longueur de la chaîne impacte négativement l'activité, l'énantiosélectivité quant à elle n'est pas du tout influencée et reste très faible dans tous les cas.

Tableau 2.2. L'influence de la longueur de la chaîne du donneur dans l'acylation du (±)-menthol par Lipase AK, (±)-sulcatol par CALB et (±)- α -cyclogeraniol par CRL dans MeTHF ou CPME comme solvant.

Substrat	Lipase	Donneur d'acyle	c (%) ^b ; vitesse initiale (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹); E ^c	
			MeTHF	CPME
(±)-menthol	Lipase AK	Acétate de vinyle	5; 2; 121	9; 3; 232
		Propionate de vinyle	3; 1.3; 130	6; 1.7; 221
		Butyrate de vinyle	1; 0.5; 104	2; 0.9; 205
		Laurate de vinyle	/	/
(±)-sulcatol	CALB	Acétate de vinyle	66; 1690; 222	70; 1490; 422
		Propionate de vinyle	45; 1035; 375	64; 1257; 523
		Butyrate de vinyle	39; 847; 186	52; 1026; 422
		Laurate de vinyle	17; 238; 129	24; 894; 361
(±)- α -cyclogeraniol	CRL	Acétate de vinyle	96; 161; 1	97; 496; 1
		Propionate de vinyle	81; 136; 2	86; 329; 3
		Butyrate de vinyle	63; 94; 1	63; 254; 2
		Laurate de vinyle	37; 44; 1	28; 97; 3

^a Conversion, vitesse initiale et E sont en normal, italique et caractère gras, respectivement.

^b Valeur de conversion après 24 h de réactions.

^c Toute les lipases testée transforment préférentiellement le (-)-menthol, (*R*)- α -cyclogeraniol et (*R*)-sulcatol. E a été calculée à 20% de conversion selon les formules (3) et (5) en utilisant l'excès énantiomérique du produit.

2.5. Effet de formulation des lipases

2.5.1. Effet de la lyophilisation

La lyophilisation des enzymes a été rapportée dans plusieurs recherches comme une stratégie efficace pour augmenter l'activité enzymatique^{9,10}. Dans cette étude, la lipase AK a montré une énantiosélectivité très élevée dans l'acylation du racémique menthol. Cependant, son activité en termes de vitesse initiale de réaction et de conversion est restée faible. En vue de pallier cet inconvénient, nous avons utilisé cette stratégie afin d'améliorer les performances de cette lipase que nous avons testé dans la transestérification du racémique menthol dans le CPME. Les résultats présentés dans le tableau 2.3 montrent que la dissolution de la lipase dans une solution tampon à pH 8 suivi par une lyophilisation a amélioré la vitesse initiale de la réaction de la transestérification dans le CPME par rapport à l'enzyme commerciale non traitée par un facteur de 3,6 fois. Cette augmentation de la vitesse initiale est légèrement supérieure (jusqu'à 4,5 fois) lorsque la lyophilisation de la lipase AK est effectuée en présence d'additifs (MeOPEG, saccharose ou D-mannitol). Cette amélioration de l'activité est

généralement expliquée par l'effet «mémoire du pH»^{11,12}, le pH de lyophilisation étant optimal pour l'activité de l'enzyme, et par l'effet «lyoprotecteur» des additifs comme décrit dans la littérature, en particulier pour le MeOPEG¹⁰. De plus, en dehors de l'effet positif des additifs, les molécules enzymatiques sont plus dispersées dans l'échantillon lyophilisé que dans la poudre commerciale non traitée, contribuant ainsi à l'amélioration de l'activité catalytique par l'augmentation du contact enzyme-substrat.

Concernant l'énantiosélectivité, celle-ci est affectée négativement par rapport à la lipase non lyophilisée. Cependant, des taux d'énantiosélectivité très bons sont obtenus lorsque la lyophilisation est réalisée en présence de saccharose ($E=102$) ou de D-mannitol ($E=100$). Le meilleur rapport conversion-énantiosélectivité est donné par la lyophilisation en présence de saccharose.

Tableau 2.3. Activité et énantiosélectivité de la lipase AK lyophilisée sans et avec différents additifs dans la transestérification du (\pm)-menthol par l'acétate de vinyle dans CPME.

Catalyseur	CPME			
	ee_p (%)	C (%)	E^a	v (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹)
Lipase AK ^{b,e}	98.9	23.0	232	3
Lipase AK lyophilisé sans additifs ^{b,f}	93.3	44.1	64	11
Lipase AK + Saccharose ^{c,f}	95.1	46.3	102	13
Lipase AK + MeOPEG ^{c,f}	87.2	43.3	29	13
Lipase AK + D-Mannitol ^{d,f}	97.0	31.1	100	7
Lipase AK + MePEG ^{d,f}	91.0	29.6	31	7

^a Dans toute les cas l'énantiopréférence était pour (-)-menthol;

Quantité de lipase était (^{b,c}) 20 ou (^d)10 mg;

Lipase/additive ratio (w/w) était (^c) 4/1 ou (^d) 2/1;

Temps de réaction (^c) 120 ou (^f) 72 h.

2.5.2. Effet de l'immobilisation

De nombreuses recherches rapportent l'efficacité de l'immobilisation des enzymes comme stratégie pour améliorer la sélectivité des lipases^{13,14}. De même, les résultats obtenus et décrits dans la première partie de cette thèse confirment cette théorie. Dans cette étude, la CRL a montré une activité très élevée, où une bonne conversion est obtenue avec une grande vitesse initiale, dans la transestérification du racémique sulcatol par l'acétate de vinyle dans le MeTHF. Cependant, son énantiosélectivité reste faible. Afin d'améliorer la sélectivité de cette lipase, nous l'avons immobilisée par différentes méthodes : (i) par adsorption sur deux différents supports, Célite et Bentonite, (ii) par liaison covalente avec la résine Amberjet et (iii) par liaison croisée ou cross-linked enzyme aggregate (CLEA). Les résultats présentés

dans le tableau 2.4 montrent que la méthode et la nature du support d'immobilisation possèdent une grande influence sur l'activité de la lipase. L'énantiosélectivité obtenue avec toutes les formes de la CRL immobilisée est dans tous les cas supérieure à celle obtenue avec la CRL libre. La valeur la plus élevée de E ($E=115$) est observée avec la CRL immobilisée sur résine. La CRL sous forme de CLEA a montré une énantiosélectivité moyenne (40), et pour la lipase immobilisée par adsorption, les valeurs de E restent modestes (13 pour la céélite et 29 pour la bentonite). D'autre part, une légère diminution de la conversion dans le MeTHF a été observée sous l'effet de l'immobilisation dans le cas d'immobilisation par adsorption et par liaison covalente, mais les valeurs obtenues restent bonnes. En revanche, la CRL par CLEA a montré une remarquable amélioration d'activité en termes de conversion et de vitesse initiale.

Tableau 2.4. Activité et énantiosélectivité de la CRL immobilisée par différente méthode dans la transestérification du (\pm)-sulcatol par l'acétate de vinyle dans le MeTHF.

Catalyseur	MeTHF			
	ee_p (%)	C (%)	E^a	v (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹)
CRL libre ^e	47.7	51.0	4	160
CRL sur Céélite ^{b,e}	76.3	44.5	13	195
CRL sur Bentonite ^{b,e}	86.7	42.7	29	238
CRL sur résine ^{c,f}	96.9	38.2	115	174
CRL par CLEA ^{d,f}	77.7	56.0	40	406

^a Dans toute les cas l'énantiopréférence était pour (S)-sulcatol;

Quantité de lipase était (^b) 76%, (^c) 58% ou (^d) 83%;

Temps de réaction (^e) 90 ou (^f) 42 h.

2.6. Effet des liquides ionique dans le milieu

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont été focalisées sur l'utilisation des liquides ioniques (LIs) comme milieux «verts» pour les lipases^{15,16}. Dans d'autres recherches, les LIs ont également été suggérés comme additifs dans des réactions biocatalysées pour augmenter la solubilité des substrats et améliorer les performances des enzymes^{17,18}.

Dans notre présent travail, nous avons voulu connaître l'effet de l'ajout des LIs dans les solvants «verts» utilisés. Pour ce faire, nous avons sélectionné deux LIs : [BMIM] [TFSI] et [BMIM] [BF₄]. Dans le cas de la transestérification du (\pm)-menthol par la CRL et par la lipase AK, l'ajout de ce deux Lis ([BMIM] [TFSI] (1%) et [BMIM] [BF₄] (5%)) a provoqué une diminution de la vitesse initiale de ma réaction (tableau 2.5). L'énantiosélectivité de la CRL a été, quant à elle, légèrement améliorée dans le MeTHF pour les deux Lis et dans le CPME dans le [BMIM] [TFSI]. Dans le cas de la lipase AK, son énantiosélectivité diminué en

présence des deux liquides ioniques, excepté dans le CPME avec [BMIM] [TFSI] où la valeur de E a passée de 232 à 254.

Ces résultats sont différents de ceux rapportés par d'autres groupes de recherches avec d'autres lipases. Par exemple, Itoh et *al.*¹⁹ ont trouvé que l'addition de petites quantités des différents LIs dans des solvants organiques, a provoqué une amélioration remarquable de l'énantiosélectivité de l'acylation du racémique 1-phényléthanol catalysée par le lipase PS, en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle. Filice et *al.*²⁰ ont montré que l'activité de la lipase de *Rhizomucor miehei* a été améliorée, en maintenant sa régiosélectivité élevée, par addition des LIs dans l'hydrolyse de la lactate hexa-O-acétylé.

Tableau 2.5. Effet des liquides ioniques sur l'activité et énantiosélectivité des lipases dans la transestérification du (\pm)-menthol.

Lipase	Milieu	Solvant							
		MeTHF				CPME			
		ee_p (%)	c (%)	E^a	v (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹)	ee_p (%)	c (%)	E^a	v (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹)
CRL ^b	Without Ionic Liquid	97.3	19.2	91	36	97.1	36.5	119	144
	[BMIM] [TFSI] (1%)	97.6	17.8	103	42	97.0	34.0	108	134
	[BMIM] [BF ₄] (5%)	98.1	11.9	120	34	97.7	27.3	121	76
Lipase AK ^c	Without Ionic Liquid	98.0	16.7	121	2	98.9	23.0	232	3
	[BMIM] [TFSI] (1%)	97.4	11.9	87	1.5	99.1	16.6	254	2
	[BMIM] [BF ₄] (5%)	95.3	10.1	46	1.5	98.3	16.0	138	1.5

^a Dans toute les cas l'énantiopréférence était pour (-)-menthol;

Temps de réactions était ^(b) 4 ou ^(c) 120 h.

2.7. Effet de la température

L'effet de la température a été étudié sur deux modèles de réaction dans un intervalle allant de 25 à 55°C :

- (i) transestérification du (\pm)-menthol en présence de la lipase AK lyophilisée et adjuvée par le saccharose dans le CPME.
- (ii) transestérification du (\pm)-sulcatol en présence de la CRL immobilisée sur résine dans le MeTHF..

Comme le montre la figure 2.2, la conversion du racémique menthol par la lipase AK augmente pour atteindre un maximum à 45 °C puis diminue nettement à 55°C. En revanche, l'augmentation de la température impacte négativement l'énantiosélectivité puisque celle-ci a sa valeur maximale à 25°C et va en diminuant au-delà de cette température.

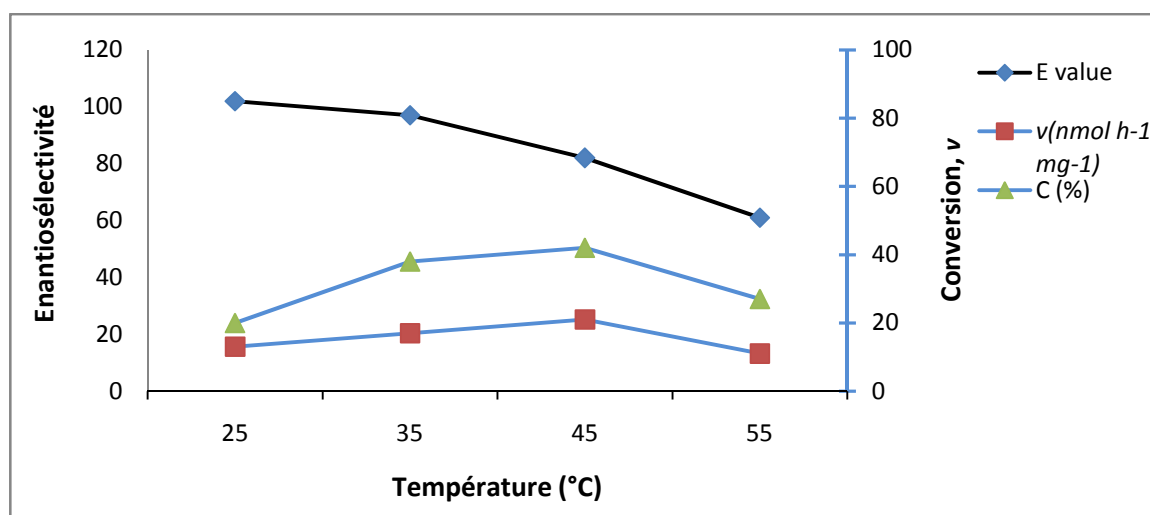


Figure 2.2. Effet de la température sur l'activité de la lipase AK lyophilisée avec saccharose dans la transestérification du (±)-menthol par l'acétate de vinyle dans CPME.

Concernant la CRL immobilisée sur résine en fonction de la température, la figure 2.3 montre que la vitesse initiale de la réaction et la conversion augmentent graduellement avec la température et cela dans tout l'intervalle de température étudié. Cependant, pour l'énantiosélectivité, les résultats sont analogues à ceux obtenus précédemment avec la lipase AK.

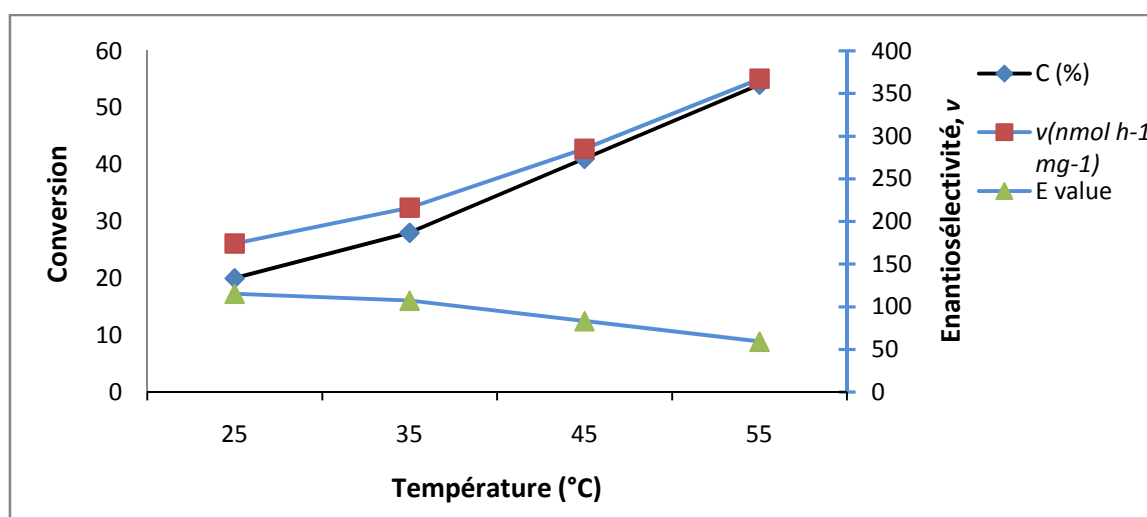


Figure 2.3. Effet de la température sur l'activité de la CRL immobilisée sur résine dans la transestérification du (±)-Sulcatol par l'acétate de vinyle dans MeTHF.

Globalement, ces résultats sont logiques et conformes au comportement des lipases. L'activité enzymatique est toujours favorisée par la température mais au-delà d'une certaine température, généralement sa température physiologique, celle-ci chute jusqu'à s'annuler. De

même pour l'énantiosélectivité, puisque la résolution du racémique dans ce cas est sous contrôle cinétique, il est clair qu'une élévation de température va défavoriser l'énantiosélectivité.

2.8. Conclusion

Dans cette partie, deux solvants MeTHF et CPME classés « solvants verts », respectueux de l'environnement, ont été utilisés pour la première fois comme milieu réactionnel pour l'acylation enzymatique de trois alcools racémiques industriellement intéressants, le menthol, le sulcatol et le α -cyclogeraniol catalysés par une série de lipases largement employées dans le domaine de la biotechnologie. Dans ces deux solvants « verts », les lipases testées ont donné de bonnes activités et énantiosélectivités, globalement similaires à celles observées dans deux autres solvants plus classiques, le toluène et le MTBE, voire une performance supérieure dans certains cas.

La lipase AK a été le meilleur biocatalyseur pour la résolution du racémique menthol en termes d'énantiosélectivité dans le CPME. La vitesse initiale de la réaction était faible, mais elle a été améliorée par la suite par la lyophilisation de lipase.

Dans la résolution du sulcatol, la CALB est la lipase qui a donné les meilleurs résultats en termes d'activité et d'énantiosélectivité, dans les deux solvants verts utilisés.

Pour la résolution du racémique α -cyclogeraniol, en dehors de la lipase PS, les autres lipases se sont avérées non énantiosélectives.

D'une manière générale, les résultats obtenus montrent que les deux solvants « verts » objets de cette partie du travail, peuvent être considérés comme d'excellents substituts aux solvants organiques classiquement utilisés dans ce type de réaction.

Au niveau industriel, pour développer un processus biocatalytique, généralement les enzymes sont formulées (lyophilisées et/ou immobilisées) afin de faciliter leur récupération et réutilisation mais également pour améliorer leurs propriétés (activité, stabilité et sélectivité).

L'étude de la lyophilisation de la lipase AK avec et sans additifs a montré l'amélioration de son activité dans le CPME au minimum 3,6 fois par rapport à lipase non-traitée. De même, la CRL immobilisée par les différentes méthodes a montré aussi une activité et énantiosélectivité supérieures par rapport à celle libre dans le MeTHF. L'immobilisation a également amélioré la stabilité thermique de la CRL par rapport à la protéine libre. Par contre, l'ajout des LIs dans ces solvants verts, et contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature avec d'autres solvants, n'a pas apporté une grande amélioration à l'activité des lipases.

En conclusion à cette deuxième partie, les résultats obtenus montrent que les deux solvants verts utilisés dans ce travail, peuvent remplacer avantageusement les solvants organiques généralement utilisés mais fortement décriés au regard de leur impact négatif sur l'environnement. Au-delà de l'échelle du laboratoire, ces solvants seraient très intéressants pour le développement de procédés biocatalytiques industriels cadrant avec les impératifs de la chimie verte.

Références bibliographiques

- (1) Vrutika, P.; Datta, M. *Appl Biochem Biotechnol* **2015**, *177*, 1313–1326.
- (2) Ke, T.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (14), 3334–3340.
- (3) Watanabe, K.; Yamagiwa, N.; Torisawa, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11* (2), 251–258.
- (4) Antonucci, V.; Coleman, J.; Ferry, J. B.; Johnson, N.; Mathe, M.; Scott, J. P.; Xu, J. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15* (4), 939–941.
- (5) Petrenz, A.; Maria, P. D. De; Ramanathan, A.; Hanefeld, U.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Kara, S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *114*, 42–49.
- (6) Ma, L.; Persson, M.; Adlercreutz, P. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31* (7), 1024–1029.
- (7) Wehtje, E.; Costes, D.; Adlercreutz, P. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1997**, *3* (5), 221–230.
- (8) Chowdary, G. V; Prapulla, S. G. *Process Biochem.* **2002**, *38* (3), 393–397.
- (9) Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S. S.; Arora, P. K. *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 1–11.
- (10) Secundo, F.; Barletta, G.; Mazzola, G. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101* (2), 255–262.
- (11) Klibanov, A. M. *Nature* **2001**, *409* (January), 786–790.
- (12) Secundo, F.; Carrea, G. *Chemistry* **2003**, *9* (14), 3194–3199.
- (13) Cai, C.; Gao, Y.; Liu, Y.; Zhong, N.; Liu, N. *Food Chem.* **2016**, *212*, 205–212.
- (14) Cui, C.; Guan, N.; Xing, C.; Chen, B.; Tan, T. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *146*, 490–497.
- (15) Domínguez De María, P. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (37), 6960–6968.
- (16) Potdar, M. K.; Kelso, G. F.; Schwarz, L.; Zhang, C.; Hearn, M. T. W. *Molecules* **2015**, *20* (9), 16788–16816.
- (17) Gao, W. L.; Li, N.; Zong, M. H. *J. Biotechnol.* **2013**, *164*, 91–96.
- (18) Lozano, P.; Bernal, J. M.; Gómez, C.; García-verdugo, E.; Burguete, M. I.; Sánchez, G.; Vaultier, M.; Luis, S. V. *Catal. Today* **2015**, *255*, 54–59.
- (19) Itoh, T.; Matsushita, Y.; Abe, Y.; Han, S. H.; Wada, S.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Takai, S.; Morimoto, M.; Hirose, Y. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (36), 9228–9237.
- (20) Filice, M.; Guisan, J. M.; Palomo, J. M. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1365–1369.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail rentre dans le cadre général du développement de procédés chimiques éco-compatibles, respectant au mieux les règles et les impératifs de ce qui est appelé actuellement chimie verte. Dans ce cadre général et dans celui plus restreint de la biocatalyse et l'accès à la chiralité, thème de recherche de notre laboratoire, nous avons comme objectif de rechercher des voies biocatalytiques innovantes par l'utilisation de moyens et/ou de milieux non conventionnels par rapport aux enzymes utilisés. Nous avons ainsi fait appel aux ultrasons et à des solvants classés « verts » que nous avons utilisés dans la résolution de quelques alcools racémiques en présence de différentes lipases. Le travail réalisé est présenté en deux parties distinctes.

Dans la première partie, l'impact des ultrasons sur la résolution énantiosélective du (*R,S*)-1-phenyléthanol, (\pm)-menthol et (*R,S*)-2-pentanol a été évalué. Les expériences ont été réalisées selon différentes approches : ultrasons pendant la réaction, prétraitement de la lipase par ultrasons avant la réaction et en absence des ultrasons au cours de la réaction. Toutes les lipases étudiées ont présenté une activité plus élevée sous l'effet des ultrasons. Ce comportement peut être expliqué par l'amélioration du transfert de masse dans le système réactionnel par la destruction des agrégats protéiniques sous l'effet de l'énergie générée par le phénomène de cavitation. Il semble, cependant, que les ultrasons n'ont pas un effet systématique sur l'énantiosélectivité. En effet, seule la CALB a vu son énantiosélectivité nettement améliorée en passant de $E=48$ à $E=1010$ lors de l'acylation du 1-phényléthanol. Nous avons également montré qu'en milieu solvant organique et sous ultrasons, les lipases gardent la même préférence pour des solvants hydrophobes que sous agitation classique. L'influence de la longueur de la chaîne du donneur d'acyle a révélé que l'activité enzymatique est inversement proportionnelle avec celle-ci, cela peut être expliqué par l'accès facile au site actif de l'enzyme par un donneur d'acyle à chaîne courte.

La seconde partie de cette étude a consisté à étudier pour la première fois deux solvants respectueux de l'environnement, MeTHF et CPME, en tant que milieu réactionnel pour les lipases dans la résolution énantiosélective du (\pm)-menthol, (\pm)-sulcatol et (\pm)- α -cyclogeraniol. Il a été montré la compatibilité des lipases utilisées avec ces deux solvants. Au-delà de leur qualité de « solvants verts », il a été montré qu'ils pouvaient participer à l'amélioration du fonctionnement des lipases dans les deux volets activité et énantiosélectivité. Ainsi, la lipase AK a donné la meilleure énantiosélectivité dans la résolution du menthol racémique mais a

montré une faible activité. La CALB s'est avérée être le meilleur choix pour la résolution du sulcatol racémique dans le MeTHF et le CPME, grâce à son excellente énantiosélectivité et son taux de réaction élevé. Nous avons également observé que le CPME a donné de meilleurs résultats par rapport au MeTHF, à la fois en termes d'activité catalytique enzymatique et d'énantiosélectivité.

D'une manière générale, les résultats obtenus ont montré que le CPME et le MeTHF peuvent être considérés comme d'excellents substituts pour les solvants organiques très nocifs à l'environnement.

Ce travail de thèse a permis de mettre en avant d'une part, les potentialités des ultrasons comme outil efficace pour activer l'acylation des alcools racémiques par voie enzymatique comparées à l'agitation classique. L'effet des ultrasons est intéressant sur l'activité des lipases mais également dans certains cas sur l'énantiosélectivité. D'autre part, les caractéristiques intéressantes du MeTHF et du CPME offrent l'opportunité de les appliquer comme alternatifs aux solvants organiques conventionnels pour des processus industriels durables à grande échelle.

Comme perspectives, il est intéressant d'élargir cette étude en faisant intervenir d'autres substrats d'intérêt biologique et d'autres biocatalyseurs bénéficiant de l'efficacité des ultrasons pour accélérer les biotransformations et la non-toxicité de solvants verts. Il serait également intéressant de faire une étude théorique par la modélisation moléculaire pour mieux comprendre l'influence de ces solvants verts au niveau structurel de la lipase.

Annexe



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron: Asymmetry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetasy

Enantioselective enzymatic resolution of racemic alcohols by lipases in green organic solvents

Abderahmane Belafriekh^a, Francesco Secundo^{b,*}, Stefano Serra^b, Zeineddine Djeghaba^a

^a Laboratory of Applied Organic Chemistry, Sciences Faculty, Chemistry Department, University of Badji Mokhtar, P.O. Box 12, 23000 Annaba, Algeria

^b Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, via Mario Bianco 9, 20131 Milan, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2017

Revised 27 January 2017

Accepted 8 February 2017

Available online xxx

ABSTRACT

The effects of two eco-friendly solvents, 2-methyltetrahydrofuran (MeTHF) and cyclopentyl methyl ether (CPME), on the enzyme activity and enantioselectivity of Novozym 435, *Candida rugosa* lipase (CRL), Porcine pancreas lipase (PPL), Lipase AK, Lipase PS, and Lipozyme, a series of commercial lipases, in the enantioselective transesterifications of racemic menthol, racemic sulcatol and racemic α -cyclogeraniol were studied. Vinyl acetate was chosen as the acyl donor and the reactions were carried out at water activity 0.06. The activity of lipases in CPME was similar to that observed in other largely employed organic solvents [toluene and *tert*-butyl methyl ether (MTBE)], and was slightly lower in MeTHF. However, for most of the lipases tested, the enantioselectivity was higher in the eco-friendly solvents. Lipase AK exhibited a high enantioselectivity ($E = 232$) for the resolution of racemic menthol but the reaction rate was low. Lipase formulation (the enzyme was frozen and lyophilized in potassium phosphate buffer without and with 5% (w/v) of sucrose, D-mannitol, or methoxy poly(ethylene glycol)) was tested with this lipase in order to improve its activity, which increased up to 4.5 times, compared to the untreated enzyme. CALB was found to be a useful biocatalyst for the resolution of racemic sulcatol, where high activity and enantioselectivity were obtained ($E \geq 1000$). For the resolution of the racemic primary alcohol α -cyclogeraniol, most of the lipases tested were active but not enantioselective, except lipase PS which displayed a moderate enantioselectivity ($E = 19$). The effect of the presence of a low percentage of two ionic liquids (ILs) 1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([BMIM][TFSI]) (5% (v/v)) and 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([BMIM][BF₄]) (1% (v/v)) in the medium was also investigated. Only in the case of CRL the ILs slightly increased the enantioselectivity from $E = 91$ to $E = 103$ and $E = 120$ for [BMIM][TFSI] and [BMIM][BF₄], respectively. However, in all cases ILs caused a decrease of enzyme activity.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Among industrial enzymes, lipases are one of the most important for the preparations of enantiomerically pure compounds.^{1,2} They have a remarkable ability to catalyze a variety of reactions in organic solvents such as esterification, transesterification, and aminolysis with high activity, chemo-, regio-, and enantioselectivity for various synthetic substrates.^{3–5} Moreover, they can operate in mild and simple reaction conditions. The use of organic solvents as reaction media offer many advantages such as the possibility to solubilize water-insoluble substrates, to facilitate the recovery of reaction products removing the biocatalysts by simple filtration, and the possibility to increase the enzyme thermal stability.^{6,7} Furthermore, organic solvents for lipase catalysis can markedly

affect enzyme enantioselectivity, thus making the selection of solvent of crucial importance.^{6,8}

A prerequisite for the application of biocatalysts on the large scale is the sustainability and low environmental impact, reducing the detrimental effects of the developed industrial process and of the chemicals used on the environment. From this perspective, the use of solvents derived from renewable resources (bio-solvents) and environmentally friendly (green) solvents is a necessity.^{9,10} Recently, solvents such as 2-methyltetrahydrofuran (MeTHF), a biomass-derived solvent, and cyclopentyl methyl ether (CPME) have been reported as promising media for biocatalysis reactions due to their favorable characteristics. MeTHF (boiling point 80 °C) and CPME (boiling point 106 °C) may replace the commonly used THF with the advantage of a reduced solvent evaporation during the reaction. Moreover, because of the limited miscibility in water (4.1% and 1.1% w/w for MeTHF and CPME, respectively, at 23 °C), these solvents can be used in two-phase

* Corresponding author.

E-mail address: francesco.secundo@icrm.cnr.it (F. Secundo).

reaction systems, which favors product recovery.^{11–14} Furthermore, MeTHF is considered a green solvent because (i) it can be produced from renewable sources such as furfural or levulinic acid, in accordance with the 7th principle of Green Chemistry, and (ii) it is environmentally degraded in air and by sunlight.¹⁵ Antonucci et al. reported the toxicological response of MeTHF in rats, resulting in a permitted daily exposure in humans of 6.2 mg/day, making it an appropriate green solvent for pharmaceutical and chemical purposes.¹⁶ Compared to the classical ether solvents CPME has proven to be quite useful as a process solvent in numerous organic synthesis because it is free from drawbacks like low boiling point, easy peroxide (formation, and solubility in water, thus resulting in inefficient recovery.¹⁷

In spite of the interesting features of these environmentally friendly solvents, to the best of our knowledge, there is a lack of systematic studies on their influence on the enantioselectivity of some frequently used commercial lipases. In the present study, we investigated the enzymatic kinetic resolution of some industrially interesting racemic alcohols in the above mentioned green solvents, carried out with some widely used lipases, comparing the outcome with that previously obtained using the most commonly used organic solvents.

In particular, we studied three model substrates that possess different structural features regarding the alcohol functional group: (i) a cyclic and sterically hindered secondary alcohol; (ii) a linear secondary alcohol and (iii) a primary alcohol possessing a sterically hindered stereocentre in the α -position. More specifically we singled out the cyclic secondary alcohol (\pm)-menthol, the linear secondary alcohol (\pm)-sulcatol and the primary alcohol (\pm)- α -cyclogeraniol (Fig. 1).

(–)-Menthol is one of the most important flavor compounds and it is used extensively as a food additive. Racemic menthol is a cheap commodity produced by Haarman and Raimer process but the desired organoleptic properties are related only to (1*R*,3*R*,4*S*) isomer. Therefore a number of resolution processes, including one based on lipase-mediated esterification, have been developed.¹⁸ In spite of this, a study on the use of environmentally friendly solvents in such a process is still lacking.

Sulcatol has been used as model compound for a number of studies on enzyme-catalysis¹⁹ and its selection as a substrate for the present research can afford experimental data that can be compared with those previously obtained.

α -Cyclogeraniol (namely (2,6,6-trimethylcyclohex-2-enyl)methanol) is a relevant chiral building block that has been employed for the synthesis of carotenoids and carotenoid-deriving natural products.^{20,21} To date, only one enzymatic resolution procedure for the preparation of enantioenriched α -cyclogeraniol has been described.²² We have already investigated the lipase-mediated resolution of primary alcohols possessing a stereocentre in the α -position.^{23,24} Since the esterification of the latter substrates is highly dependent both on the enzyme used and on the experimental conditions, we decided to investigate the influence of the solvent on the enantioselectivity of the α -cyclogeraniol resolution.

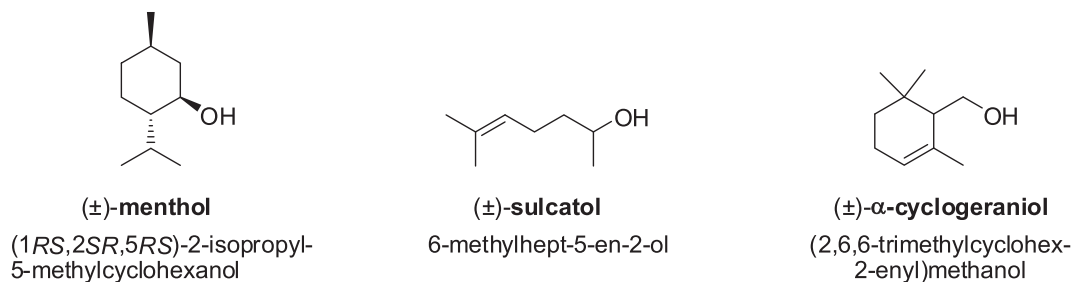


Figure 1. The three model substrates investigated. Menthol, sulcatol and α -cyclogeraniol.

Moreover, with the intent to verify if commonly adopted strategies useful to improve enzyme activity in organic solvents can also be exploited with these eco-friendly solvents,^{25,26} the role of the enzyme formulation^{27,28} and the addition of ionic liquids (ILs)^{29–32} were also evaluated. Thanks to a low vapor pressure, ILs have attracted significant attention as “green solvents” in biocatalysis.^{33,34} In fact, the use of lipases in ionic liquids as solvent or (co)-solvent has presented many advantages, such as high conversion rates, high enantioselectivity and better enzyme stability.³⁵ Moreover, ionic liquids exhibit excellent physical characteristics (melting point, polarity, and miscibility with water or organic solvents) including the ability to dissolve polar and nonpolar organic, inorganic, and polymeric compounds.³⁶

2. Results and discussion

2.1. Rates of lipase catalyzed transesterification of racemic alcohols in organic solvents

In a first screening, lipases were tested in the transesterification of racemic alcohols to see their efficiency with the two green solvents (MeTHF and CPME) against two other conventional solvents (toluene and MTBE) for comparison. The conversion of racemic alcohols was calculated after 24 h as shown in Table 1. It was observed that the conversion degree is dependent on the lipase and on the organic solvent.

Among all the lipases screened for transesterification with (\pm)-menthol, CRL was found to be the best in terms of conversion, where high values were observed in shorter times; however, the enantioselectivity was low. Lipase AK exhibited the best enantioselectivity but with low activity and reaction rate. CALB, lipase PS, lipozyme, and PPL were inactive, with no product being detected even after 72 h reaction. On the other hand, CRL and lipase AK were more active in CPME, toluene, and MTBE compared to MeTHF. CALB, CRL, and lipase AK showed a higher reaction rate with (\pm)-sulcatol leading to a higher conversion. Lipozyme and lipase PS showed moderate activity and PPL very low activity. For the resolution of the primary alcohol all lipases (except PPL) were active in all solvents tested, and the highest reaction rate was displayed by CRL.

2.2. Enantioselectivity of lipase catalyzed transesterification of racemic alcohols in organic solvents

The use of organic solvents as media for reactions catalyzed by lipases is a well-established procedure. Moreover, it is known that by modifying solvent composition it is possible to modulate lipases activity and enantioselectivity.^{6,27,28} However, no data have been reported on the activity and enantioselectivity of lipases in MeTHF and CPME with respect to other organic solvents. For a comparison, in this study we selected toluene and MTBE, two solvents that are extensively used, for the resolution of racemic menthol, sulcatol,

Table 1

Substrate conversion, initial rate and enantiomeric ratio (*E*) of lipase catalyzed transesterification reaction with (±)-menthol, (±)-sulcatol or (±)-α-cyclogeraniol as substrate and MeTHF, CPME, toluene or MTBE as reaction media^a

Substrate	Lipase	<i>c</i> (%) ^b ; initial rate (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹); <i>E</i> ^c			
		MeTHF	CPME	Toluene	MTBE
(±)-menthol	CRL ^d	35; 36; 91	47; 144; 119	41; 146; 58	53; 158; 101
	Lipase AK ^e	5; 2; 121	9; 3; 232	8; 2; 103	7; 4; 106
	CALB ^f	0.4	0.5	0.4	0.7
	Lipase PS ^e	0.5	0.9	1.4	1.1
	Lipozyme ^e	1.3	1.7	1.2	1.4
	PPL ^d	0.1	0.2	0.3	0.2
(±)-sulcatol	CRL ^d	51; 160; 4	84; 350; 5	99; 340; 6	92; 344; 8
	Lipase AK ^e	38; 40; 28	51; 40; 35	53; 55; 21	56; 40; 26
	CALB ^f	66; 1690; 222	70; 1490; 422	83; 1800; 58	79; 1700; >1000
	Lipase PS ^e	11; 7; 37	26; 20; 25	31; 19; 46	22; 16; 12
	Lipozyme ^e	13; 10; 49	20; 15; 58	20; 12; 43	22; 16; 61
	PPL ^d	6; 1.6; 25	12; 2; 15	7; 1.8; 21	12; 3; 19
(±)-α-cyclogeraniol	CRL ^d	96; 161; 1	97; 496; 1	99; 632; 1	86; 484; 1
	Lipase AK ^e	29; 6; 6	27; 10; 11	25; 10; 9	16; 10; 6
	CALB ^f	32; 14; 8	46; 50; 12	38; 90; 6	29; 34; 7
	Lipase PS ^e	18; 4; 11	23; 10; 18	19; 5; 7	16; 10; 19
	Lipozyme ^e	7; 1.5; 1	9; 5; 2	8; 5; 1	78; 5; 1
	PPL ^d	1; 0.4; 1	2.5; 0.6; 2	8; 0.8; 1	4; 1.2; 2

Lipase amount was (d) 50 or (e) 20 or (f) 10 mg.

^a Conversion, initial rate and *E* are in normal, italic and bold character, respectively.

^b Conversion values after 24 h of reactions.

^c All the lipases tested transformed preferentially (–)-menthol, (*R*)-α-cyclogeraniol and (*R*)-sulcatol, except CRL that had enantioselectivity for (*S*)-sulcatol. *E* was calculated at 20% conversion according to the formula (1) and (2) using the enantiomeric excess of product in the case of racemic menthol and sulcatol and the enantiomeric excess of substrate in the case of the primary alcohol.

and α-cyclogeraniol at low water activity, using lipases as biocatalysts.

The data of Table 1 show that although CRL exhibited with (±)-menthol the highest activity in MTBE, a relatively good activity was observed in CPME, which was similar to that found in toluene, while a moderate activity was obtained in MeTHF. However, the enantioselectivity of CRL in both CPME and MeTHF, was similar to that observed in MTBE, but higher than that in toluene. Lipase AK showed the highest enantioselectivity in the kinetic resolution of (±)-menthol in CPME (*E* = 232). However, this enzyme had a lower activity than CRL in all the solvents tested.

It can also be seen from Table 1 that with (±)-sulcatol in MeTHF and CPME the lipases tested had similar activity and enantioselectivity to that observed with toluene and MTBE. Interestingly, in the two green solvents CALB had an enantioselectivity significantly higher than that observed in toluene.

The enantioselectivity of most lipases with (±)-α-cyclogeraniol was low in all solvents except moderate values in the case of lipase PS in CPME and MTBE *E* = 18 and *E* = 19, respectively (Table 1). However, these lipases seem very active with this primary alcohol where high conversions were obtained except with lipozyme and PPL.

2.3. Effects of lipase formulation and ionic liquids on the performance of lipases

Numerous studies have shown that lipase behavior may be greatly altered by the formulation.^{28,37,38} Therefore we adopted this strategy to increase the transesterification activity of lipases in CPME. In particular, in the present study it has been shown that Lipase AK has high enantioselectivity in the kinetic resolution of (±)-menthol, that is a prerequisite for the scaling up of this kinetic resolution. Nevertheless, the low catalytic activity of the enzyme might be a drawback. Therefore, in order to improve the performance of the catalyst, the influence of the enzyme formulation on the reaction rate and enantioselectivity was evaluated. Table 2

indicates that enzyme dissolution in buffer at pH 8, followed by lyophilization, increased 3.6 times the initial rates of the transesterification reaction in CPME, compared to the non-treated commercial enzyme. The increase was slightly higher (up to 4.5-fold) when lipase AK was lyophilized in the presence of MeOPEG or sucrose or D-mannitol. The increase of activity could be due both to the “pH-memory” effect,^{7,39} being the enzyme lyophilized from a solution at the optimal pH for activity⁴⁰ and to the lyoprotectant effect of the additives, particularly MeOPEG, as previously reported for lipases.³⁷ Beyond these effects, the fact that with the additives the enzyme molecules are more dispersed in the lyophilized sample than in the commercial untreated powder, also contributes to the increase of catalytic activity. Thus, besides formulation with additives, from the perspective of further improving the catalytic activity of lipase AK in organic solvents, enzyme immobilization on suitable supports might be a valid approach.⁴¹ However, lyophilization in the presence of this latter additive caused a plunge of the enantioselectivity of lipase AK. A decrease of enantioselectivity was also observed with lipase AK lyophilized with the sugars sucrose and D-mannitol, even though high values (102 and 100) were still obtained.

In the last decade, numerous studies have focused on the use of ionic liquids (ILs) as green media for lipases. In addition, ILs have also been suggested as additives, in biocatalyzed reactions, for improving the performance of enzymes.^{30,42–44} Herein, the effect of the presence of a low percentage of ionic liquid in the green solvents was also investigated. In particular, we selected the two ionic liquids [BMIM][TFSI] and [BMIM][BF₄]. Analogously to organic solvents, these ILs do not dissolve lipases. Therefore, their use does not interfere with some of the advantages of using organic solvents (e.g., easy recovery of the products and increase of the enzyme thermal stability).^{45,46} The use of [BMIM][TFSI] (1%) and [BMIM][BF₄] (5%) caused a decrease of the initial reaction rates for CRL and lipase AK in transesterification of (±)-menthol (Table 3). However, the enantioselectivity of CRL was slightly improved in the MeTHF with [BMIM][TFSI] and [BMIM][BF₄], and in CPME with [BMIM][BF₄]. Instead, Lipase AK showed a decrease of

Table 2
Transesterification activity of lipase AK lyophilized with different additives in transesterification of (\pm)-menthol

Catalyst	CPME			
	ee_p (%)	C (%)	E^a	ν (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹)
Lipase AK ^{b,e}	98.9	23.0	232	3
Lipase AK lyophilized without additives ^{b,f}	93.3	44.1	64	11
Lipase AK + Saccharose ^{c,f}	95.1	46.3	102	13
Lipase AK + MeOPEG ^{c,f}	87.2	43.3	29	13
Lipase AK + D-Mannitol ^{d,f}	97.0	31.1	100	7
Lipase AK + MeOPEG ^{d,f}	91.0	29.6	31	7

Lipase amount was (^{b,c}) 20 or (^d) 10 mg.Lipase/additive ratio (w/w) was (^c) 4/1 or (^d) 2/1.Reactions time was (^c) 120 or (^f) 72 h.^a In all cases the enantioselectivity was for (–)-menthol.**Table 3**
Effect of ionic liquids on the activity and enantioselectivity of lipases in the transesterification of (\pm)-menthol

Lipase	Medium	Solvent							
		MeTHF				CPME			
		ee_p (%)	c (%)	E^a	ν (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹)	ee_p (%)	c (%)	E^a	ν (nmol h ⁻¹ mg ⁻¹)
CRL ^b	Without Ionic Liquid	97.3	19.2	91	36	97.1	36.5	119	144
	[BMIM][TFSI] (1%)	97.6	17.8	103	42	97.0	34.0	108	134
	[BMIM][BF ₄] (5%)	98.1	11.9	120	34	97.7	27.3	121	76
Lipase AK ^c	Without Ionic Liquid	98.0	16.7	121	2	98.9	23.0	232	3
	[BMIM][TFSI] (1%)	97.4	11.9	87	1.5	99.1	16.6	254	2
	[BMIM][BF ₄] (5%)	95.3	10.1	46	1.5	98.3	16.0	138	1.5

Reactions time was (^b) 4 or (^c) 120 h.^a In all cases the enantioselectivity was for (–)-menthol.

enantioselectivity in the presence of ionic liquids except in CPME with [BMIM][TFSI]. These results differ from those reported by other research groups with other lipases. In fact, Itoh et al.^{47,48} found that the addition of small amounts of different ILs in organic solvents, caused a remarkable enhancement of enantioselectivity of lipase PS-catalyzed acetylation of 1-phenylethanol, using vinyl acetate as an acyl donor. Filice et al.⁴⁹ showed that *Rhizomucor miehei* lipase activity was enhanced, maintaining a high regioselectivity, by addition of ILs in the hydrolysis of hexa-O-acetyl lactal.

3. Conclusions

Herein, the eco-friendly solvents MeTHF and CPME were used for the first time as reaction media for the lipase-catalyzed kinetic resolution of (\pm)-menthol, (\pm)-sulcatol and (\pm)- α -cyclogeraniol. Lipase AK was found to be the best catalyst for the resolution of racemic menthol in terms of enantioselectivity. The reaction rate, which was low, could be improved in CPME, at least 2.5-fold by lipase formulation. CALB should be the best choice for the resolution of racemic sulcatol in MeTHF and CPME, thanks to its excellent enantioselectivity and reaction rate. However, it has to be emphasized that although the increase of activity obtained is valid only for the exact formulations utilized, at an industrial level the goal is to develop biocatalytic processes always with formulated and immobilized enzymes that can facilitate enzyme reuse and improve their properties (activity, stability, selectivity). In fact, just for lipases, the catalytic activity depends on the conformation of a α -helix fragment, named “lid”, which regulates the entrance to the catalytic active site (e.g., moving from a “close” to an “open” position). Thus, the formulation and immobilization method are crucial to favor and maintain the open position, which has been correlated to the activation of lipases.⁵⁰

In the resolution of the primary alcohol, the lipases tested showed a low or, at most, moderate enantioselectivity, as in the case of lipase PS in CPME and MTBE. A very high reaction rate was observed with CRL. The presence of a low percentage of ILs in the reaction medium increased slightly the enantioselectivity but decreased the reaction rate. The results highlight that both CPME and MeTHF can be considered as excellent and greener substitutes of toluene and MTBE. We also observed that CPME gave better results compared to MeTHF, both in terms of enzyme catalytic activity and of enantioselectivity. It should be mentioned that, as already shown, the enantioselectivity of a given enzyme can change, sometimes dramatically, as a function of the nature of the solvents and of the substrates.⁸ The results obtained in this study strongly encourage the use of green solvents as media for the kinetic resolution of secondary alcohols, especially in the perspective to develop sustainable large scale industrial processes.

4. Experimental

4.1. Materials and reagents

Novozym 435 (immobilized lipase from *Candida antarctica* B) was donated by Novozymes, CRL (lipase from *Candida rugosa*) and PPL (lipase from porcine pancreas) were purchased from Sigma, Lipase AK (lipase from *Pseudomonas fluorescens*), Lipase PS (lipase from *Burkholderia cepacia*), Lipozyme IM from Novo. (\pm)-Sulcatol (purity > 99%), (\pm)-menthol, vinyl acetate (>99%), vinyl laurate, toluene, *tert*-butyl methyl ether (MTBE), 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([BMIM][TFSI], \geq 98%), and 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([BMIM][BF₄], \geq 98.5%) were purchased from Sigma–Aldrich. Cyclopentyl methyl ether (>99%) and 2-methyltetrahydrofuran (99%) were purchased from Alfa Aesar. Racemic α -cyclogeraniol ((2,6,6-

trimethylcyclohex-2-enyl)methanol) was prepared by LiAlH₄ reduction of ethyl α -cyclogeraniate.²³ (–)-menthol, (S)-sulcatol were purchased from Sigma–Aldrich; (–)-(S)- α -cyclogeraniol $\{[\alpha]_D^{20} = -106.5$ (*c* 2.1, EtOH), 95% ee) was prepared by resolution of the racemic alcohol.²² Other chemicals were from commercial sources and were of the highest purity available.

4.2. Lipase catalyzed transesterification of racemic alcohols

For all reactions tested, all reagents, solvents, and lipases, before use, were separately equilibrated for at least 24 h at water activity (*a_w*) value of 0.06 in sealed vessels in the presence of LiBr saturated salt solution at 25 °C.⁵¹ The reaction mixture was prepared by adding 1 mL of organic solvent (MeTHF, CPME, toluene, or MTBE) containing racemic alcohols (\pm)-menthol (32 mM), (\pm)-sulcatol (35 mM) or (\pm)- α -cyclogeraniol (32 mM) and vinyl acetate (325 mM) to 10–50 mg of lipases in a 3 mL vial. Then the reaction mixture was shaken at 150 rpm at 25 °C and at scheduled times a sample from the supernatant was withdrawn and analyzed by GC. When the effect of ionic liquids was tested, the reaction was carried out by adding to the organic solvent 5% or 1% (v:v) of [BMIM][TFSI] or [BMIM][BF₄], respectively. Initial reaction rates (nmol h⁻¹ mg⁻¹) were calculated only from conversion values lower than 15%. In this study, the amount of lipases refers to crude powder unless otherwise specified.

Absolute configuration of the transformed enantiomers was assigned by comparison of the chiral chromatographic analyses of the various lipase catalyzed reaction with literature data that reported studies with the same substrate and lipase.^{8,22,52,53}

4.3. Formulation of lipase AK

Lipase AK formulations were prepared freezing (at –80 °C) and lyophilizing enzyme solutions obtained by dissolving 20 mg of the commercial enzyme powder in 1 mL of 20 mM potassium phosphate buffer (pH 8) or the same buffer containing 5% (w/v) of additive (sucrose, D-mannitol, or methoxy poly(ethylene glycol)).

4.4. Chiral GC analysis

The enantiomeric purity and conversion were determined by a gas chromatograph (Agilent Technologies 6850) equipped with a hydrogen flame ionization detector (FID) and a chiral capillary column DMEPentilBETACDX (25 m \times 0.25 mm \times 0.15 μ m) for GC analysis of (\pm)-sulcatol and a MEGA-DEX DAC Beta column (25 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) for analysis of (\pm)-menthol and (\pm)- α -cyclogeraniol. The temperature of the injector and the detector was 250 °C. Nitrogen was used as carrier gas. The temperature programs were: 80°(2 min)-2°/min-110°-15°/min-150°(2 min) for separating sulcatol enantiomers and 80°(2 min)-5°/min-150°(2 min) for separating menthol enantiomers and α -cyclogeraniol enantiomers. The following retention times were (in min): (S)-sulcatol 5.44; (R)-sulcatol 5.79; (S)-sulcatyl acetate 6.68; (R)-sulcatyl acetate 8.33; (+)-menthyl acetate 8.63; (–)-menthyl acetate 8.83; (–)-menthol 9.27; (+)-menthol 9.62; (R)- α -cyclogeraniol 7.26; (S)- α -cyclogeraniol 7.37; (R) and (S)- α -cyclogeraniol acetate 9.21.

The enantioselectivity value (*E*) was calculated from the conversion (*c*) and the enantiomeric excess of the product (*ee_p*) or of the remaining substrate (*ee_s*), based on the following equations:

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_p)]}{\ln[1 - c(1 - ee_p)]} \quad (1)$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (2)$$

Where

$$c = 1 - \frac{A + B}{A_0 + B_0} \quad (3)$$

$$ee_s = \frac{B - A}{A + B} \quad (4)$$

$$ee_p = \frac{P - Q}{P + Q} \quad (5)$$

where *A*₀ and *B*₀ represent the initial enantiomers concentration of substrate, *A* and *B* represent the substrate enantiomers concentrations after a certain time of reaction, *P* and *Q* represent the product enantiomers concentrations after a certain time of reaction,⁵⁴ in a reaction where *A* is the faster reacting enantiomer that produces *P*.

Acknowledgements

Francesco Secundo acknowledges the funding of COST Action CM1206 EXIL “Exchange on Ionic Liquids”, for supporting participation at meetings on ionic liquids and allowing discussion of the results presented in this work.

References

- Vrutika, P.; Datta, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *177*, 1313–1326.
- Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. J. *Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *64*, 1–22.
- Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. J. *Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *40*, 111–120.
- Frings, K.; Koch, M.; Hartmeier, W. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 303–309.
- Berglund, P. *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 13–22.
- Ke, T.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3334–3340.
- Klibanov, A. M. *Nature* **2001**, *409*, 786–790.
- Secundo, F.; Riva, S.; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 267–280.
- Petrenz, A.; De Maria, P. D.; Ramanathan, A.; Hanefeld, U.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Kara, S. J. *Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *114*, 42–49.
- Hoyos, P.; Quezada, M. A.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *72*, 20–24.
- Simeó, Y.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R. *Green Chem.* **2009**, *11*, 855–862.
- Pace, V.; Alcántara, A. R.; Holzer, W. *Green Chem.* **2011**, *13*, 1986.
- Mine, Y.; Zhang, L.; Fukunaga, K.; Sugimura, Y. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 383–388.
- Watanabe, K. *Molecules* **2013**, *18*, 3183–3194.
- Pace, V.; Hoyos, P.; Castoldi, L.; Domínguez De María, P.; Alcántara, A. R. *ChemSusChem* **2012**, *5*, 1369–1379.
- Antonucci, V.; Coleman, J.; Ferry, J. B.; Johnson, N.; Mathe, M.; Scott, J. P.; Xu, J. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 939–941.
- Watanabe, K.; Yamagiwa, N.; Torisawa, Y. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 251–258.
- Vorlová, S.; Bornscheuer, U. T.; Gatfield, I.; Hilmer, J.; Bertram, H.; Schmid, R. D. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1152–1155.
- Secundo, F.; Carrea, G. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *92*, 438–446.
- Bovolenta, M.; Castronovo, F.; Vadalà, A.; Zanoni, G.; Vidari, G. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8959–8962.
- Serra, S. *Molecules* **2015**, *20*, 12817–12840.
- Luparia, M.; Boschetti, P.; Piccinini, F.; Porta, A.; Zanoni, G.; Vidari, G. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 1045–1057.
- Serra, S.; Gatti, F. G.; Fuganti, C. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 1319–1329.
- Serra, S. *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22*, 619–628.
- Roy, I.; Gupta, M. N. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2004**, *39*, 165–177.
- Zacharis, E.; Halling, P. J.; Rees, D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 1201–1205.
- Secundo, F.; Carrea, G.; Soregaroli, C.; Varinelli, D.; Morrone, R. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 157–163.
- Secundo, F.; Barletta, G. L.; Parini, G.; Roda, G. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *84*, 128–131.
- Zhao, H. J. *Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 891–907.
- Domínguez De María, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6960–6968.
- Park, Seongsoo; Romas, J. K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *4*, 432–437.
- De Diego, T.; Lozano, P.; Abad, M. A.; Steffensky, K.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *J. Biotechnol.* **2009**, *140*, 234–241.
- Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757–2785.
- Lozano, P.; Diego, T. De; Carrié, D.; Iborra, J. L. *Chem. Commun.* **2002**, 692–693.
- Zhao, H. J. *Chem. Technol. Biotechnol.* **2016**, *91*, 25–50.
- Noël, M.; Lozano, P.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 301–306.
- Secundo, F.; Barletta, G.; Mazzola, G. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 255–262.
- Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S. S.; Arora, P. K. *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 1–11.
- Secundo, F.; Carrea, G. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3194–3199.

40. Kojima, Y.; Yokoe, M.; Mase, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 1564–1568.
41. Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2216–2238.
42. Potdar, M. K.; Kelso, G. F.; Schwarz, L.; Zhang, C.; Hearn, M. T. W. *Molecules* **2015**, *20*, 16788–16816.
43. Gao, W. L.; Li, N.; Zong, M. H. *J. Biotechnol.* **2013**, *164*, 91–96.
44. Lozano, P.; Bernal, J. M.; Gómez, C.; Garcia-verdugo, E.; Burguete, M. I.; Sánchez, G.; Vaultier, M.; Luis, S. V. *Catal. Today* **2015**, *255*, 54–59.
45. Lau, R. M.; Sorgedrager, M. J.; Carrea, G.; Van Rantwijk, F.; Secundo, F.; Sheldon, R. A.; Delft, B. L.; Bianco, V. M.; Sheldon, R. *Enzyme* **2004**, 483–487.
46. Abe, Y.; Yagi, Y.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Itoh, T. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51*, 9952–9958.
47. Itoh, T.; Han, S.; Matsushita, Y.; Hayase, S. *Green Chem.* **2004**, *6*, 437–439.
48. Itoh, T.; Matsushita, Y.; Abe, Y.; Han, S. H.; Wada, S.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Takai, S.; Morimoto, M.; Hirose, Y. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 9228–9237.
49. Filice, M.; Guisan, J. M.; Palomo, J. M. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1365–1369.
50. Secundo, F. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6250–6261.
51. Bell, G.; Halling, P. J.; Moore, B. D.; Partridge, J.; Rees, D. G. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 468–473.
52. Brady, D.; Reddy, S.; Mboniswa, B.; Steenkamp, L. H.; Rousseau, A. L.; Parkinson, C. J.; Chaplin, J.; Mitra, R. K.; Moutlana, T.; Marais, S. F.; Gardiner, N. S. J. *Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *75*, 1–10.
53. Guncheva, M.; Dimitrov, M.; Napoly, F.; Draye, M.; Andrioletti, B. J. *Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *102*, 72–80.
54. Chen, C.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc. New York* **1982**, *104*, 1294–1299.

ULTRASOUND EFFECTS ON THE ACTIVITY AND ENANTIOSELECTIVITY OF CANDIDA RUGOSA LIPASE IN ORGANIC SOLVENTS

A.Belafriekh, F.Benamia, Z.Djeghaba*

Laboratory of Applied Organic Chemistry, Sciences Faculty, Chemistry Department, University of Badji Mokhtar, P.O. Box 12, 23000, Annaba, Algeria

ABSTRACT

This work reports a study on the effect of ultrasound on the behavior of *Candida rugosa* lipase in the enantioselective transesterification of some racemic secondary alcohols (1-phenylethanol, 2-pentanol, menthol) with different acyl donors (vinyl acetate, vinyl propionate, vinyl butyrate) in the presence of organic solvents. The experiments were conducted with two different approaches: ultrasonic irradiation without stirring and stirring after ultrasonic pre-irradiation of lipase. The same experiments were conducted under conventional stirring to evaluate the effect of the ultrasound. The influence of pre-irradiation time, organic solvents, acyl donors and temperature were investigated. With the two approaches, the ultrasound has advantage over the conventional stirring. The best results were, however, obtained when the reactions were conducted under ultrasound without stirring. In the resolution of the menthol by vinyl acetate in hexane, the conversion increased 3-fold and the enantioselectivity 5-fold.

Keywords: *Candida rugosa* lipase; ultrasound; secondary alcohols; enantioselectivity; transesterification;

© 2015 IJCPS. All rights reserved

1. INTRODUCTION

Lipases as biocatalysts for the production of enantiomerically pure compounds have great interest because they can catalyze variety of reactions such as: esterification, hydrolysis, aminolysis and transesterification, under milder and simpler process conditions, and with ability to recognize chirality [1-4]. However, their activity and enantioselectivity for various synthetic substrates are not always sufficient [5]. Various methods, such as solvent engineering, enzyme immobilization, lyophilization of the enzyme, and application of mechanical waves, have been done in attempts to enhance activity and to improve enantioselectivity [6-9].

Currently, ultrasound irradiation has been introduced into organic chemistry and biotechnology as an efficient way to accelerate chemical transformations [10, 11]. The effect of ultrasound is based on the cavitation phenomenon: a liquid subjected to ultrasonic field expands and creates bubbles that grow and then implode. The energy generated by this implosion can enhance mass transfer and thus increase the reaction rate and also help to increase the catalytic activity [12, 13]. Ultrasound is also a useful tool in enzymatic reactions. It can enhance substrate dissolution and improve mass transfer

* Corresponding author.

E-mail addresses: zin.djeghaba@univ-annaba.org

© 2015 IJCPS. All rights reserved.

within and outside the active site of the enzyme [14, 15], it can also affect weak interactions in protein and induce its conformational change, which may improve some enzymatic reactions. Many studies available in the literature reports that the low frequency ultrasound (around 40 kHz) is not able to inactivate enzymes [16-18], and with the use of low frequency and optimum power input, ultrasound can be effective for the biocatalyst. The lipase from *Candida rugosa* is a relatively cheap commercial enzyme widely used in hydrolysis and synthesis of esters, and it is well known for its remarkable stability inorganic solvents [8, 19-22]. The present work focuses on the possibility to increase the activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase by using ultrasound irradiation. We studied a transesterification of three racemic secondary alcohols, 1-phenylethanol, 2-pentanol and menthol, by vinyl esters as acyl donors. Starting from reaction parameters, temperature, substrate molar ratio, and enzyme loading optimized previously, the experiments were conducted in an ultrasonic water bath and/or magnetic stirrer with three different approaches: ultrasonic irradiation without stirring, stirring after ultrasonic pre-irradiation of lipase, and under conventional stirring. The effect of the time of ultrasonic pre-irradiation of lipase, organic solvents, acyl donors, and temperature were investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials and reagents

Lipase from *Candida rugosa* (CRL, Type VII, 760 U/mg), (*R,S*)-1-phenylethanol, (*R*)-1-phenylethanol, (*R,S*)-2-pentanol, (*S*)-2-pentanol, (\pm)-Menthol, ($-$)-menthol, vinyl acetate, vinyl propionate, vinyl butyrate, were purchased from Sigma-Aldrich. All other chemicals were purchased from local sources and were of the highest purity commercially available. The ultrasonic bath, Branson 1510E-MTH (Branson Ultrasonics Corporation., USA), was basically a rectangular container (14.0 cm \times 15.0 cm \times 10.0 cm). The maximum rating power was 143 W, frequency 42 kHz. The temperature of water in bath was controlled with accuracy of $\pm 1^\circ\text{C}$.

2.2. Ultrasonic pre-irradiation of lipase in organic solvents

The lipase from *Candida rugosa* (50 mg) in 4 mL of organic solvent was ultrasonicated for different time periods (i.e. 0.5, 1, 2, 3 and 4 h). The temperature of the sample could be kept constant at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ throughout. Secondary alcohol (5 mM) and acyl donor (10 mM) were added to the ultrasonically pre-irradiated lipase, and incubated at 35°C with constant shaking at 200 rpm for different times according to alcohol and acyl donor.

2.3. Transesterification of secondary alcohols

Racemic secondary alcohol (5 mM) and acyl donor (10 mM) were solubilized in 4 ml of organic solvent and then the reaction was initiated by the addition of 50 mg of lipase for different times according to alcohol and acyl donor (Scheme 1). Shaking experiments with lipase or pre-irradiated lipase were carried out over an oil bath under magnetic stirring (200 rpm). Experiments under ultrasound irradiations were carried out by placing the reaction mixture at the center of the ultrasonic water bath. In all cases, the temperature of the reaction mixture was maintained at 35°C .

$$ee_s = \frac{|A_R - A_S|}{A_R + A_S} \quad (3)$$

$$ee_p = \frac{|B_R - B_S|}{B_R + B_S} \quad (4)$$

Where A_R and A_S represent the concentrations of the (R)-enantiomers and (S)-enantiomers of secondary alcohol, B_R and B_S represent the concentration of the (R)-enantiomers and (S)-enantiomers of ester corresponding.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Here, we evaluated the effect of ultrasound by two approaches: ultrasound throughout the reaction (US) and the enzymatic pre-irradiation (P-I). The same reactions were performed under conventional stirring (Conv) in order to compare the activity and enantioselectivity displayed by *Candida rugosa* lipase for the transesterification of secondary alcohols. Various organic solvents and acyl donor were investigated to find the most appropriate reaction system.

3.1. Effect of ultrasonic pre-irradiation time

It was reported that when using enzyme powders to catalyze reactions in organic solvent, the enzymatic pre-irradiation by ultrasound can reduce the size of particles and consequently enhance the surface area between the enzyme and the substrate, which can contribute to reduce mass transport limitations and improve catalytic activity of enzyme [14, 23]. The effects of ultrasonic pre-irradiation time with the three alcohols were investigated. The results presented in figures 1-3 show that the conversion increase with increasing ultrasonic pre-irradiation time from 0.5 to 1 h in the case of 1-phenylethanol and 2-pentanol, and from 0.5 to 2 h in the case of menthol, but a decrease of conversion was observed beyond these times. The enantioselectivity had also similar changes with ultrasonic pre-irradiation time where E value was increased from 0.5 to 1 h, and decreased when the time exceeded 1 h with the three alcohols. Considering the best conversion and E value obtained, the ultrasonic pre-irradiation time of 1 h was selected for the approach of the enzymatic pre-treatment reaction in the subsequent experiments.

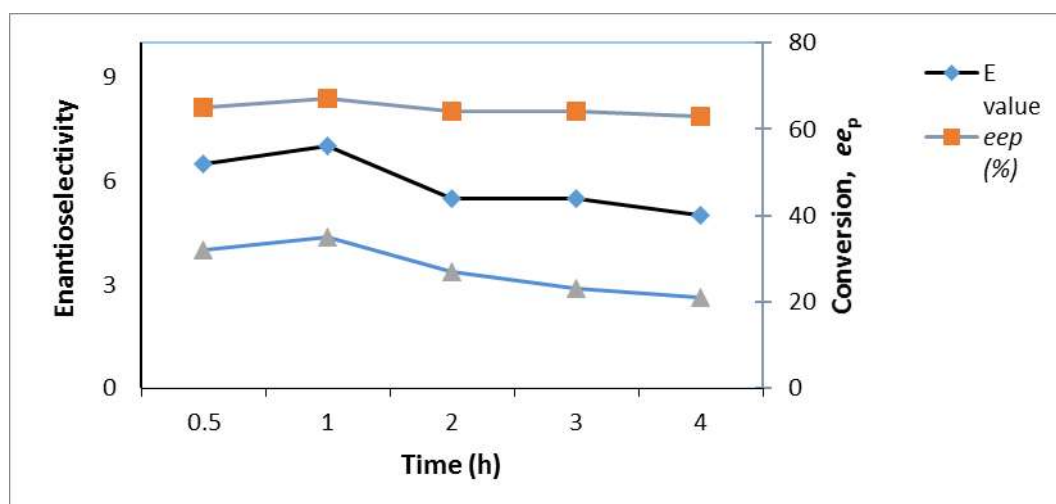


Figure 1. Effect of ultrasonic pre-irradiation time on the enzymatic transesterification of (R, S)-1-phenylethanol with vinyl acetate in hexane.

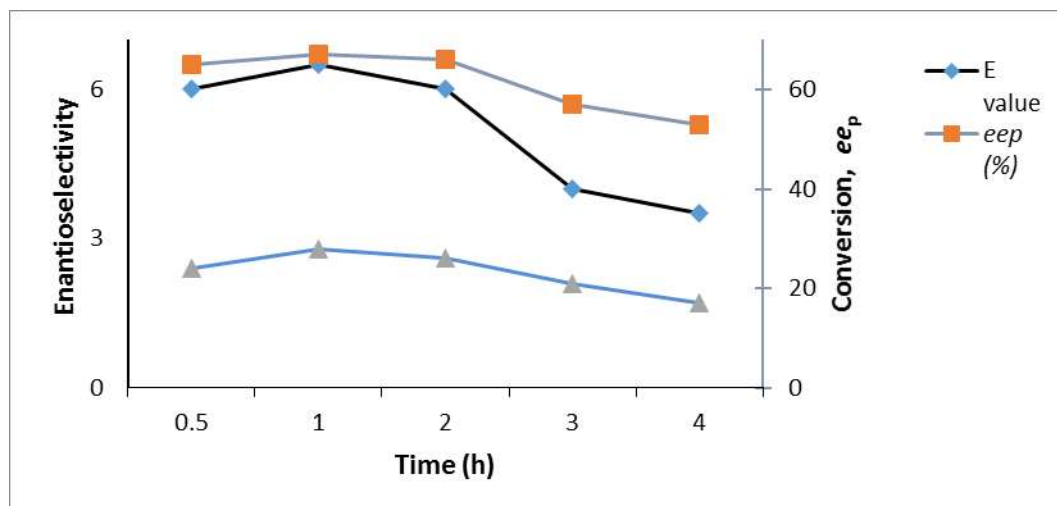


Figure.2. Effet of ultrasonic pre-irradiation time of on the enzymatic transesterification of (R, S)-2-pentanol with vinyl acetate in hexane.

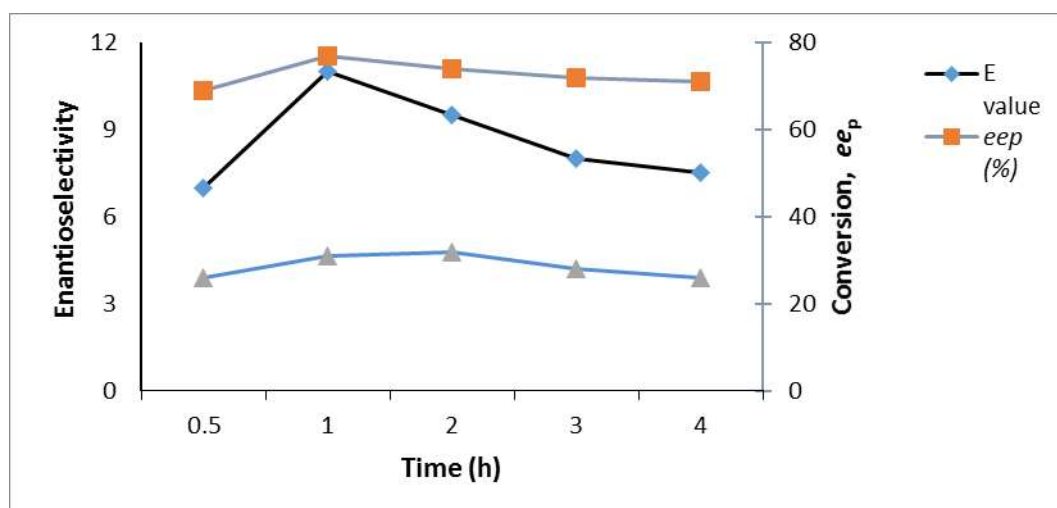


Figure.3. Effet of ultrasonic pre-irradiation time of on the enzymatic transesterification of (±)-menthol with vinyl acetate in hexane.

3.2. Effect of organic solvent

The choice of the appropriate organic solvent for a lipase-catalyzed reaction is known to be a crucial factor in determining the activity [24]. Several solvents with different $\log P$ were investigated for the transesterification of alcohols at 35°C, $\log P$ defined as the partitioning coefficient of solvent between 1-octanol and water, characterizing the polarity or hydrophobicity of the solvent. The reactions were conducted under three different conditions: ultrasound throughout the reaction (US), stirring using a lipase pre-irradiated for one hour (P-I), and under conventional stirring (Conv) with alcohols. All modes of enzymatic transesterification revealed similar features in terms of changes in $\log P$. Except the diethylether ($\log P = 0.89$), the results indicate that the conversion and enantioselectivity were favored in solvents with higher $\log P$ values (table 2). These observations are in accordance with many researchers reported in the literature [4, 25, and 26]. The highest values were obtained when hexane was used as the reaction media

and under the effect of ultrasound with the three alcohols. Therefore, hexane was chosen as an appropriate solvent.

Table.2. Effect of solvent on the enzymatic transesterification of racemic secondary alcohols with vinyl acetate.

Substrate	Solvent	Log P	Time (h)	ee _p (%)			C (%)			E		
				US	P-I	Conv	US	P-I	Conv	US	P-I	Conv
1-phenylethanol	THF	0.49	4	69	61	60	9	8	4	6	4.5	4
	Diethylether	0.89		71	63	60	33	19	14	8.5	5	4.5
	Dichloroethane	1.25		74	67	65	21	20	13	8	6	5
	Chloroform	1.97		56	50	51	17	15	10	4	3.5	3
	Toluene	2.73		72	66	61	37	35	13	9	5	4.5
	Hexane	3.50		75	69	67	42	35	15	12	8	5.5
2-pentanol	THF	0.49	6	64	56	54	11	7	6	5	3.5	3.5
	Diethylether	0.89		68	62	57	16	12	9	6	4.5	4
	Dichloroethane	1.25		63	57	53	24	22	16	5.5	4.5	3.5
	Chloroform	1.97		60	54	55	13	7	5	4.5	3.5	3.5
	Toluene	2.73		68	59	57	32	29	22	7	5	4.5
	Hexane	3.50		74	67	66	36	28	21	10	6.5	6
menthol	THF	0.49	5	82	73	70	13	8	7	11.5	7	6
	Diethylether	0.89		87	76	69	34	25	20	22.5	9.5	6.5
	Dichloroethane	1.25		91	84	77	26	18	11	29	14	8.5
	Chloroform	1.97		57	55	54	14	12	9	4	4	3.5
	Toluene	2.73		86	71	71	39	26	18	23	7.5	7
	Hexane	3.50		89	77	73	45	31	16	37.5	11	7.5

3.3. Effect of acyl donor

The type of acyl donor can also influence transesterification reactions catalysed by lipases. We studied three different carbon chain lengths (C₂, C₃, C₄) of vinyl esters as acyl donors. The results under the three modes of transesterification with alcohols are presented in table 3. As can be seen in table 3, *Candida rugosa* lipase had a higher activity and enantioselectivity toward: vinyl acetate with 2-pentanol and menthol, and vinyl propionate with 1-phenylethanol in all modes of transesterification. Moreover, the conversion and E value decreased with the elongation of chain length of the acyl donors. It might be explained by easier access to the active site of the lipase with a short chain length.

Table.3. Effect of acyl donor on the enzymatic transesterification of racemic secondary alcohols in hexane

Substrate	Acyl donor	Time (h)	ee _p (%)			C (%)			E		
			US	P-I	Conv	US	P-I	Conv	US	P-I	Conv
1-phenylethanol	Vinyl acetate	4	75	67	67	42	35	15	12	7	5.5
	Vinyl propionate	6	85	82	75	37	25	18	21	13	8
	Vinyl butyrate	8	78	72	69	22	16	9	10	7	6
2-pentanol	Vinyl acetate	6	74	67	66	36	28	21	10	6.5	6
	Vinyl propionate	8	71	62	60	24	13	7	7.5	4.5	4
	Vinyl butyrate	8	63	58	61	13	9	5	5	4	4
menthol	Vinyl acetate	5	89	77	73	45	31	16	37.5	11	7.5
	Vinyl propionate	7	86	73	68	39	31	17	23	9	6
	Vinyl butyrate	8	80	69	64	27	19	11	12	6.5	5

3.4. Effect of temperature

The effect of reaction temperature on activity and enantioselectivity, in the transesterification of menthol with vinyl acetate as acyl donor, was carried out under ultrasonic irradiation in a range of 25 to 55°C. The results obtained show that the conversion increased with increase in temperature (figure 4). Elevation of temperature may enhance solubility of substrates, and improve mass transfer within and outside of site active. However, the increase of temperature beyond 35°C caused a decrease in enantioselectivity, which might be explained by disruption of the active conformation of enzyme at higher temperatures which leads to loss of enantioselectivity. The optimum temperature selected was 35°C.

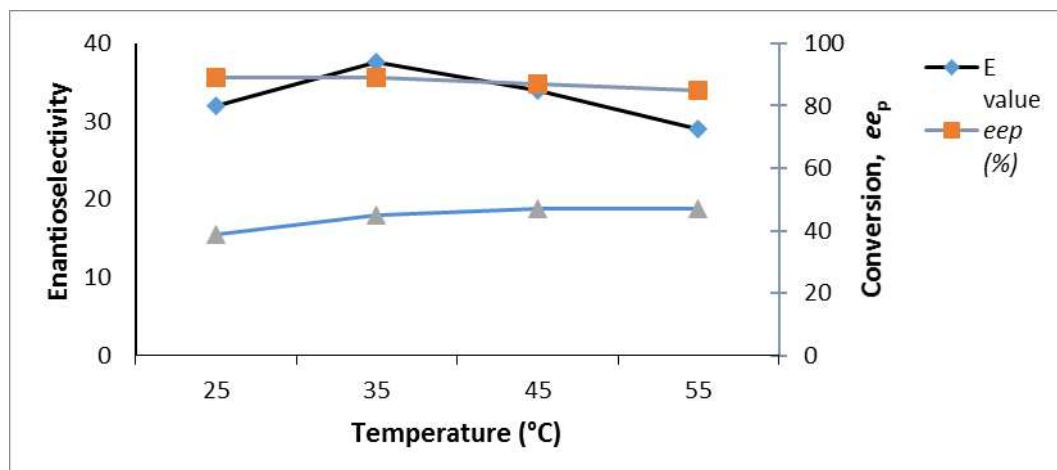


Figure.4. Effect of temperature on the enzymatic transesterification of (±)-menthol with vinyl acetate in hexane under ultrasound.

4. CONCLUSIONS

In this work an enantioselective transesterification of some racemic secondary alcohols under ultrasound irradiation using *Candida rugosa* lipase was investigated. Among various alcohols and acyl donors studied, menthol with vinyl acetate as acyl donor and hexane as solvent had the best results regarding conversion degree and enantioselectivity. Our results confirm the improvement of lipases activity and enantioselectivity by ultrasound reported in other researches. Therefore, the ultrasound could be an alternative in “green” enzymatic processes due to its high efficiency, low instrumental requirement and significant enhancement of enzyme catalytic activity compared with conventional techniques.

5. REFERENCES

- [1] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V. T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl Biochem.* 29: 119–131.
- [2] C. Rodriguesa, R., Fernandez-Lafuente, R. (2010) Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 64: 1–22.
- [3] Frings, K., Koch, M., Hartmeier, W. (1999) Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. *Enzym. Microb. Technol.* 25: 303–309.

- [4] Ghanem, A., Schurig, V., Ashraf, S. (2001) Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification of 1-(2-Furyl) ethanol Using Isopropenyl Acetate. *Chirality*. 13: 118–123.
- [5] Berglund, P. (2001) Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomolecular Engineering*. 18: 13–22.
- [6] T. Bornscheuer, U. (2002) Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 543–547.
- [7] Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzym. Microb. Technol.* 40: 1451–1463.
- [8] Yu, H. W., Chen, H., Yang, Y. Y., Ching, C. B. (2005) Effect of salts on activity, stability and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in isooctane. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 35: 28–32.
- [9] Leonelli, C., Mason, T. J. (2010) Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. *Chem Eng. Process.* 49: 885–900.
- [10] Mason, T. J. (1997) Ultrasound in synthetic organic chemistry. *Chem Soc Rev.* 26: 443–451.
- [11] Mason, T. J. (2007) Developments in ultrasound-non-medical. *Prog Biophys Mol Biol.* 94: 166–75.
- [12] Cintas, P., Luche J. L. (1999) Green Chemistry: The sonochemical approach. *Green Chem.* 1: 115–125.
- [13] Cravotto, G., Cintas, P. (2006) Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications. *Chem. Soc. Rev.* 35: 180–196.
- [14] Lerin, L., Loss, R., Remonatto, D., Zenevich, M., Balen, M., Netto, V., Ninow, J., Trentin, C., Oliveira, J. V., de Oliveira, D. (2014) A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37: 2381–2394.
- [15] Xiao, Y. M., Wu, Q., Cai, Y., Lin, X. F. (2005) Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. *Carbohydr. Res.* 340: 2097–2103.
- [16] Kwiatkowska, B., Bennett, J., Akunna, J., Walker, G. M., Bremner, D. H. (2011) Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnol. Adv.* 29: 768–780.
- [17] Adulkar, T. V., Rathod, V. K. (2014) Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy waste water. *Ultrasonics Sonochemistry.* 21: 1083–1089.
- [18] Shweta, S., Munishwar, N. G. (2008) The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. *Chem Cent J.* 2 doi: 10.1186/1752-153X-2-1
- [19] Lundell, K., Raijola, T., Kanerva, L. (1998) Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida rugosa* lipases for the resolution of secondary alcohols: The effect of *Candida rugosa* isoenzymes. *Enzym. Microb. Technol.* 22: 86–93.
- [20] Dominguez de Maria, P., Sanchez-Montero, J. M., Sinisterra, J., Alcantara, A. (2006) Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* 24: 180–196
- [21] Sabbani, S., Hedenstroma, E., Nordin, O. (2006) The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 42: 1–9.
- [22] Benamia, F., Bouchagra, S., Saihi, Y., Djeghaba, Z., Rebbani, N. (2013) Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in optimization of the immobilization conditions for lipase from *Candida rugosa* on AMBERJET 4200-Cl. *Prepar. Biochem. Biotechnol.* 43: 33–47.
- [23] Adulkar, V. T., Rathod, K. V. (2014) Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy waste water. *Ultrasonics Sonochemistry.* 21: 1083–1089.
- [24] Salihua, A., Alam, Md. Z. (2015) Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochem.* 50: 86–96.
- [25] Mander, P., Cho, S. S., Simkhada, J. R., Choi, Y. H., Park, D. J., Yoo, J. C. (2012) An organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. CS133 for enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media. *Process Biochem.* 47: 635–42.
- [26] Bose, A., Keharia, H. (2013) Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2: 255–66.