

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLAB BLIDA –

Faculté des Sciences

Département de Chimie



Mémoire de fin d'étude

Pour L'obtention du diplôme de Master en chimie

Option : *Chimie appliquée*

THEME : ETUDE DE L'EFFET DU SOLVANT SUR LE
COMPORTEMENT DES LIPASES CRL ET LPP DANS DES
REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION

Réalisé par :

Guelai Wissam et **Kahia Meriem**

Président : Dr ABDALLAH EL HADJ Abdallah

Examineur : Dr CHAFAA Fouad

Promoteur : Dr BELAFRIEKH Abderahmane

2020/2021

Remerciements

Nul doute que personne n'est né avec le savoir, il doit ainsi
toujours quelque chose à quelqu'un, et c'est pour
cette raison que nous tenons à remercier
Dieu de nous avoir aidés pour la réalisation de notre

Mémoire

A nos chers parents pour leur soutien , leur patience leur encouragements durant nos
parcours scolaire

A nos sœurs et frères ainsi nos familles

A tous nos amis.

On remercie notre promoteur **Dr BELAFRIEKH Abderahmane** pour son support, ses
conseils, sa confiance, et son orientation dans la conception de ce travail, merci pour le savoir
précieux qu'il a aimablement voulu partagé avec nous.

On présentons sincères remerciements à **Dr ABDALLAH EL HADJ Abdallah** d'avoir
accepté de présider ce jury.

Nous adressons nos remerciements à **Dr CHAFAA Fouad** d'avoir accepté d'examiner ce
mémoire.

Enfin, on remercie tous ceux qui nous ont aidés pour que ce travail voie le jour.

Résumé

La séparation des énantiomères est un procédé d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique, agrochimique et d'autres industries de chimie fine. En effet, souvent un seul des énantiomères exerce l'activité biologique requise. Cette séparation peut être réalisée par voie chimique ou enzymatique. Les voies enzymatiques reposent sur l'utilisation d'enzymes. L'emploi d'enzymes présente de nombreux avantages : elles sont moins dangereux à manipuler, moins polluants, moins consommateurs d'énergie. Parmi ces enzymes, les lipases, triacylglycérols hydrolases (EC 3.1.1.3), elles sont capables de catalyser des réactions d'estérification, de transestérification ou d'amidification, avec, dans de nombreux cas, une excellente spécificité énantiomérique. Le présent travail a été consacré à l'étude de l'effet du solvant sur le comportement des lipase de *Candida rugosa* (CRL) ou lipase pancréatique de porcine (LPP) en termes d'activité et d'énantiosélectivité dans la transestérification de l'alcool(*R,S*)-2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle ou l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle.

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que l'activité et d'énantiosélectivité des deux lipases étudiées sont favorisés par des solvants hydrophobes.

Abstract

The separation of enantiomers is a process of interest to the pharmacy, agro-chemistry and other industries of fine chemistry. Indeed, often only one of the enantiomers exerts the required biological activity. This separation can be carried out chemically or enzymatically. The enzymatic methods are based on the use of enzyme. The use of enzymes has many advantages : they are less dangerous to handle, less polluting, less energy consuming. Among these enzymes, lipases, triacylglycerol hydrolases (EC 3.1.1.3), they are able of catalyzing esterification, transesterification or amidification reactions, with, in many cases, excellent enantiomeric specificity. The present work was devoted to the study of the effect of solvent on the behavior of *Candida rugosa* lipase (CRL) or porcine pancreatic lipase (LPP) in terms of activity and enantioselectivity in the transesterification of racemic alcohol(R,S)-2-butanol with vinyl acetate or ethyl acetate as an acyl donor.

The results obtained, during this work, show that the activity and enantioselectivity of the two lipases studied are favored by hydrophobic solvents.

ملخص

يعد فصل المتماكبات عملية ذات أهمية للصناعات الدوائية والكيمائية الزراعية والصناعات الكيمائية الدقيقة الأخرى. في الواقع ، غالبًا ما يمارس واحد فقط من المتماكبين النشاط البيولوجي المطلوب. يمكن إجراء هذا الفصل كيميائيًا أو إنزيميًا. تعتمد المسارات الأنزيمية على استخدام الإنزيمات. لاستخدام الإنزيمات العديد من المزايا: فهي أقل خطورة في التعامل معها، وأقل تلويثًا، وأقل استهلاكًا للطاقة. من بين هذه الإنزيمات، الليباز، هيدروليسات الجلوسرين ثلاثي الأسيل (EC3.1.1.3)، فهي قادرة على تحفيز تفاعلات الأسترة أو الأسترة التبادلية أو التوسط، مع خصوصية تماثلية ممتازة في كثير من الحالات. تم تخصيص العمل الحالي لدراسة تأثير المذيب على سلوك المبيضات روجوزا ليباز (CRL) وليباز البنكرياس الخنازير (LPP) من حيث النشاط والانتقائية الكهربائية في ترانسسترة الراسيمي، كحول البوتانول-2- (R,S) مع أسيتات الفينيل أو أسيتات الإيثيل كمانح أسيل.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها خلال هذا العمل أن النشاط والانتقائية الضوئية للليباز المدروسين يتم تعزيزهما بواسطة المذيبات الكارهة للماء .

Sommaire

Sommaire

Liste des figure

Liste des tableaux

Abréviation

Introduction générale 1

Chapitre 1

1. Généralité sur les enzymes	3
1.1 .Structure des enzymes	3
1.2. Rôles des enzymes en industrie	4
1.3. Nomenclature et classifications des enzymes	5
1.4. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique	6
1.5. Propriétés générales des enzymes	7
1.6. Avantage des enzymes	7
2. Les lipases	8
2.1. Définition	8
2.1.1. Lipase candida rugosa	9
2.1.2. Lipase pancréatique	9
2.2. Mode d'action des lipases	9
2.3. Origine des lipases	10
2.3.1. Origine Animale	10
2.3.2. Origine Végétale	10
2.3.3 .Origine Microbienne	11
2.3.4. Origine bactérienne	11
2.4. Intérêt industriel des lipases	11
2.4.1. Application dans les détergents	11
2.4.2. Application dans l'industrie alimentaire	12
2.4.3. Application dans l'environnement	12
2.5. Réactions réalisables par lipase	12

2.5.1 .L'estérification	13
2.5.2. La transestérification	13
2.6. Mécanisme d'action des lipases	14
2.7. En synthèse organique	15
2.8. Propriétés de sélectivité des lipases	15
2.9. Chimiosélectivité et Régiosélectivité	15
2.10. Enantiosélectivité	16

Chapitre 2. Méthode et matériels

Matériels	17
1.1. Les réactifs	17
1.1.1. Acétate de vinyle	17
1.1.2. Acétate d'éthyle	18
1.1.3. L'alcool	19
1.1.4. Les solvants	20
1.2. Agitateur magnétique	20
1.3. Chromatographie sur couche mince	21
1.3.1. Présentation de matériel	21
1.4. La chromatographie en phase gazeuse	22
Méthode	23
2.1. Réaction sous agitation magnétique	23
2.2. L'analyse par la chromatographie sur couche mince	24
2.3. L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse	25

Chapitre 3. Résultats et discussions

1. Introduction	26
2. Effets du solvant sur la réaction enzymatique	26
3. Généralité sur l'énantiosélectivité	27
4. L'effet du solvant sur le comportement des lipase dans la réaction de transestérification du (R,S)-2-butanol	28
4.1. Effet du solvant sur l'activité de la CRL et LPP dans la transestérification du (R,S)-2-butanol	28

4.2. Effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la CRL et LPP dans la transestérification du (R,S)-2-butanol	29
3.5. Comparaison de E et C entre les lipases	30
5.1. Comparaison de conversion	30
5.2. Comparaison de l'énantiosélectivité	31
Conclusion	32
Conclusion générale	33
Les perspectives	34
Bibliographie	

Liste des figures

Figure 1. Hiérarchie structurale d'une enzyme	4
Figure 2. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique	6
Figure 3. Structure dimensionnelle d'hélice (site active d'une lipase)	8
Figure 4. Différentes réactions possibles par utilisation de lipases	13
Figure 5. Transestérification catalysée par une lipase	14
Figure 6. Mécanisme catalytique proposé pour les lipases	15
Figure 7. Chimiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels de natures différentes présents au même substrat	16
Figure 8. Régiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels identiques présents au même substrat	17
Figure 9. Structure chimique de l'acétate de vinyle	17
Figure 10. Structure chimique de l'acétate d'éthyle	18
Figure 11. Structure chimique de butan-2-ol	19
Figure 12. Agitateur magnétique	20
Figure 13. Montage de la CCM	21
Figure 14. Schéma d'un chromatographie	22
Figure 15. Transestérification enzymatique du (<i>S,R</i>)-2-butanol avec deux donneurs d'acyles dans différents solvants	23
Figure 16. Réaction réalisée sous agitation magnétique	24
Figure 17. Analyse par CCM	24
Figure 18. CPG utilisé, GC -17SHIMADZU	25
Figure 19. Histogramme de comparaison de la conversion entre les lipase	30
Figure 20. Histogramme de comparaison de l'énantiosélectivité entre les lipase	31

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différents types d'enzymes	5
Tableau 2. Propriétés physique et chimique d'acétate de vinyle	17
Tableau 3. Les propriétés physique et chimique d'acétate d'éthyle	18
Tableau 4. Propriété physique et chimique du butan-2-ol	20
Tableau 5. Propriétés chimique des solvants	22
Tableau 6. Effet du solvant sur l'activité de la CRL dans la transestérification du (<i>R,S</i>)-2-butanol	29
Tableau 7. Effet du solvant sur l'activité de la LPP dans la transestérification du (<i>R,S</i>)-2-butanol	29
Tableau 8. Effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la CRL dans la transestérification du (<i>R,S</i>)-2-butanol	29
Tableau 9. Effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la LPP dans la transestérification du (<i>R,S</i>)-2-butanol	29
Tableau 10. Comparaison de la conversion entre CRL et LPP	30
Tableau 11. Comparaison d'énantiosélectivité entre CRL et LPP	31

Les Abréviations

E : Enzyme

S : le substrat

P : le produit

CRL : Lipase de *Candida rugosa*

LPP : lipase pancréatique de porc

C : Conversion

E : facteur d'énantiosélectivité

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CCM : Chromatographie sur couche mince

E : Enantiosélectivité

ees : Excès énantiomérique du substrat

eep : Excès énantiomérique du produit

PR et PS : les concentrations des énantiomères produits de la réaction

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

R, S : Enantiomères Rectus et Sinister

T : Température

Introduction générale

La demande de composés énantiomériquement purs est en forte augmentation dans l'industrie pharmaceutique . A titre d'exemple, la vente de médicaments énantiomériquement purs était de 225 milliard d'euros en 2005, représentant 37% du marché de l'industrie pharmaceutique ¹ .

La synthèse d'énantiomères peut être réalisée par voie chimique ou enzymatique². Les voies enzymatiques reposent sur l'utilisation d'enzymes purs ou de préparations d'enzymes immobilisés. L'emploi d'enzymes présente de nombreux avantages : ils sont moins dangereux à manipuler, moins polluants, moins consommateurs d'énergie que les catalyseurs traditionnels à base de métaux comme le ruthénium, le titane ou l'iridium^{3,4} . Les enzymes peuvent aussi être utilisés à température ambiante, ce qui les rend attractifs en terme de coût énergétique⁵.

Les enzymes d'une manière générale et les lipases en particulier, sont devenues des outils de choix pour le chimiste organicien. En raison de leur grande sélectivité et des conditions réactionnelles douces dans lesquelles elles opèrent, les enzymes sont maintenant incontournables, en particulier dans la synthèse de composés chiraux qui sont très demandés par l'industrie pharmaceutique ⁶.

Par ailleurs, en raison principalement des restrictions de plus en plus fortes en matière de pollution et de protection de l'environnement, d'autres industries intègrent les biotechnologies dans leurs processus de production. Parmi les biocatalyseurs utilisés, les lipases constituent le groupe le plus important. Elles sont non seulement capables d'assurer leur fonction naturelle d'hydrolyse des esters, mais peuvent également catalyser des réactions de transestérification, d'estérification, d'interestérification et d'aminolyse, en milieu non aqueux. Ces propriétés, ajoutées au label « naturel » qu'elles confèrent aux produits issues des processus biotechnologiques, permettent de retrouver les lipases impliquées dans la synthèse de nombreux produits aussi variés que les médicaments, les biopolymères, le biodiesel, les arômes, etc..⁶.

De plus, les enzymes présentent une spécificité élevée (chimio-, régio-, diastéréo- et énanti-), pour cibler des groupes fonctionnels particuliers.

A ce titre, la recherche de moyens permettant d'améliorer la sélectivité des enzymes est d'actualité. Parmi ces moyens, les solvants peuvent jouer un rôle non négligeable dans ce sens. En effet, il est maintenant connu que la nature du solvant peut avoir une influence sur le fonctionnement de l'enzyme et particulièrement sur l'énantiosélectivité du biocatalyseur.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail qui est consacré à l'étude de l'influence des solvants organiques sur la transestérification énantiosélective du racémique butanol-2 par l'acétate de vinyle ou acétate d'éthyle en présence de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) ou lipase pancréatique de porcine (LPP) . Notre travail sera scinder en trois chapitres.

Une mise au point bibliographique généralité sur les enzymes, les enzymes et quelques exemples de réactions organiques et enzymatiques fera l'objet du premier chapitre.

Le deuxième chapitre décrit la partie expérimentale qui regroupe le matériel et les méthodes utilisés.

Le chapitre troisième regroupe les résultats obtenus au cours ce travail et leurs discussions.

1. Généralité sur les enzymes

Les enzymes, catalyseurs biologiques ou biocatalyseurs, sont des macromolécules permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire ; elles agissent à de faibles concentrations et se retrouvent intactes en fin de réaction.

Ces biocatalyseurs jouent un rôle important; du fait qu'ils sont responsables des transformations biochimiques des molécules du vivant; par conséquent cette méthode de catalyse possède un fort potentiel pour des applications industrielles, tels que les détergents, le traitement de l'amidon et la production d'aliments pour animaux, aussi que le blanchiment biologique du papier et l'extraction du pétrole et du gaz naturel⁷.

1.1. Structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires constituées d'enchaînements d'acides α -aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques covalentes. La disposition linéaire de ces unités de base dans la chaîne protéique détermine la structure primaire qui, en se courbant et en s'enroulant sur elle-même en forme d'hélices alpha et de feuillets bêta, adopte la structure secondaire qui conduit à son tour à la structure tertiaire par d'autres enroulements plus importants.

L'association de deux (ou plus) de ces structures tridimensionnelles entraîne la formation de la structure finale dite structure quaternaire qui dépend exclusivement de la séquence primaire des acides aminés et définit la fonction biologique de l'enzyme⁸.

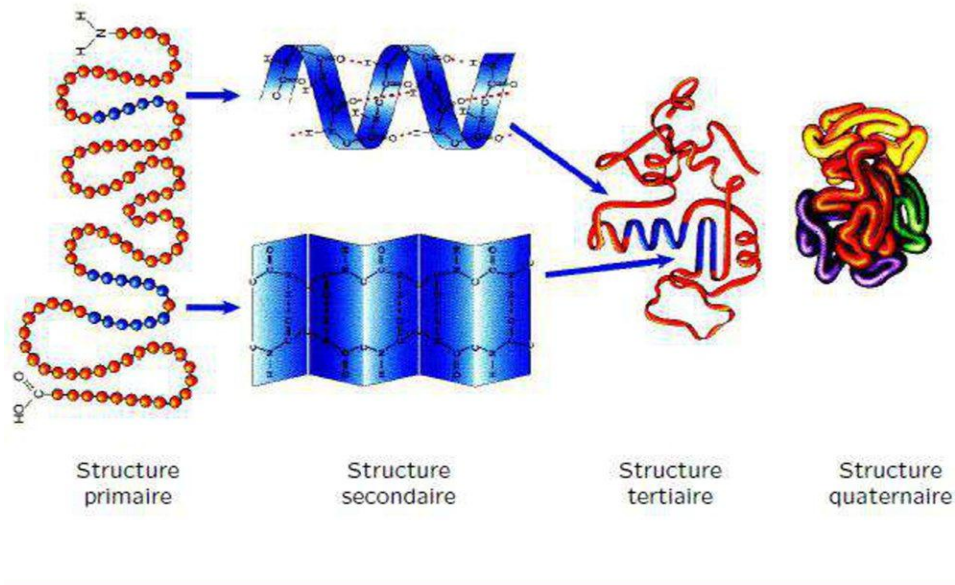


Figure 1. Hiérarchie structurale d'une enzyme.

Les premières enzymes isolées furent d'abord nommées ferments solubles, diastases ou zymases et il existe aujourd'hui plus de 3500 enzymes différentes répertoriées en deux grandes catégories :

- Les enzymes purement protéiques qui ne sont constituées que d'acides aminés et qui sont connues sous le nom de "holoenzymes"
- Les enzymes hétéroprotéiques dites "hétéroenzymes" qui sont constituées de deux parties l'une protéique, "l'apoenzyme", et l'autre non protéique, la(ou le) coenzyme sans laquelle la réaction ne saurait avoir lieu⁸

1.2. Rôles des enzymes en industrie

Les biocatalyseurs, considérés comme de mini usines ou de chaînes de production, travaillent avec grande rapidité, contrairement aux catalyseurs chimiques c'est pourquoi l'utilisation de la biocatalyse remplace à grande échelle de nombreux procédés chimiques⁹.

Le marché des enzymes industrielles, quant à lui est en pleine croissance grâce, notamment à l'apparition de nouveaux domaines d'application; l'industrie des détergents où

on utilise les protéases et les lipases, l'agroalimentaire on utilise par exemple l'alpha acétolactate oxydase¹⁰. Et le domaine pharmaceutique où on utilise plusieurs enzymes comme l'alpha-amylase pancréatique¹¹.

1.3. Nomenclature et classifications des enzymes

Le nom de la plupart des enzymes se compose du nom de la substance initiale (substrat) et de la réaction chimique accélérée suivi du suffixe "ase"¹².

on peut classer les enzymes en six catégories suivant la réaction biochimique qu'elles réalisent :

Tableau 1. Les différents types d'enzymes.

n° attribué la classe	Enzymes	Fonction	Exemple
Classe 1	Oxydo-Réductase	Transfert de protons ou d'électrons	Peroxydase
Classe 2	Transférase	Transfert d'atome ou de groupement d'atomes	Méthyltrasférase
Classe 3	Hydrolase	Coupage de molécules en présence d'eau	Lipase
Classe 4	Lyase	Rompent des liaisons mais en produisent de nouvelles	Adénylate cyclase : ATP → AMPc
Classe 5	Isomérase	réarrangent intramoléculaire	Glucose 6-phosphate isomérase G6P ↔ F6P
Classe 6	Ligase ou synthétase	Formation de nouvelles liaisons (avec consommation d'énergie: ATP)	ADN polymérase

1.4. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique

Quel que soit le type de réaction catalysé, un cycle catalytique enzymatique se déroule généralement en quatre étapes¹³ :

a. Diffusion des réactifs dans le milieu.

b. Reconnaissance enzyme substrat :

Elle est réalisée grâce à la complémentarité structurale entre le substrat et le site actif. La formation du complexe enzyme-substrat (E-S) peut s'expliquer soit par le modèle de simple

complémentarité stérique, soit par celui de l'ajustement induit. La fixation E-S est réalisée par établissement des liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, et liaisons de VanderWals. Cette approche du substrat vers l'enzyme, peut induire une modification de la géométrie du site actif pour une meilleure orientation du groupe réactionnel.

c. Mécanisme catalytique :

L'enzyme et son substrat sont associés par diverses forces d'interaction ils constituent alors un ou plusieurs intermédiaires réactionnels instables qui permettent d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction et d'aller vers la formation des produits. C'est la reconnaissance enzyme substrat qui permet le rapprochement de certains groupes fonctionnels et facilite ainsi la rupture et la formation de certaines liaisons du substrat.

d. Expulsion des produits :

Une fois l'étape catalytique proprement dite effectuée, le produit formé reste transitoirement fixé à l'enzyme par des interactions de faible énergie. Il est en suite libéré pour permettre à l'enzyme de retrouver sa conformation native plus stable. la figure (2) suivant résume l'ensemble de ces étapes :

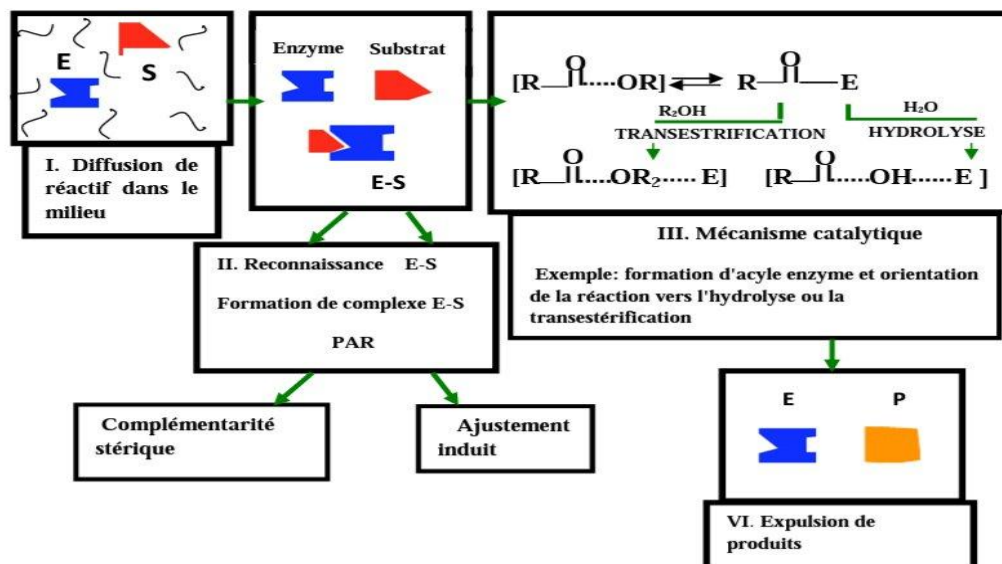


Figure 2. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique.

1.5. Propriétés générales des enzymes

Les enzymes possèdent des caractéristiques qui les rendent uniques :

- **Propriétés d'un catalyseur chimique :**
 - Un catalyseur augmente la vitesse d'une réaction, mais la présence de catalyseur ne provoque pas de réaction, ou rend possible une réaction qui ne l'est pas sur le plan thermodynamique ($\Delta G < 0$)
 - Un catalyseur abaisse l'énergie d'activation
 - Il se trouve intacte a la fin de la réaction
 - Au cours des réactions chimiques réversibles, le catalyseur accélère de la même manière les deux vitesses de réaction évoluant simultanément en sens inverse.
 - Il ne modifie pas l'équilibre final de la réaction¹⁴.

1.6. Avantages des enzymes

Étant des catalyseurs protéiniques de masse moléculaire relative très élevée (de quelques dizaines de mille à quelques millions), les enzymes accélèrent le cours réactionnel des processus chimiques ou biochimiques dans les métabolismes des organismes vivants jusqu'à des millions de fois comparativement aux réactions où l'enzyme n'intervient pas.

Aussi, placées dans un milieu qui n'est pas le leur (l'eau), les enzymes, outils puissants que détiennent les chimistes et les biologistes, acquièrent de nouvelles propriétés telles que la thermostabilité (qui est nettement augmentée) ainsi que différentes spécificités dont notamment la stéréosélectivité qui en fait des biocatalyseurs phares pour la conception d'un éventail de produits chiraux d'utilités diverses. Ce sont des catalyseurs très spécifiques qui n'interviennent que dans des réactions bien déterminées et qui peuvent être actifs dans les solvants organiques contenant peu ou pas d'eau⁸.

2. Les lipases

2.1. Définition

Les lipases ou triacylglycérols hydrolases (EC 3.1.1.3) sont une classe particulière des hydrolases d'esters carboxylique . Ces enzymes catalysent, en présence d'eau, le clivage des liaisons esters des triglycérides libérant des acides gras et successivement des diglycérides, des monoglycérides et dans certains cas du glycérol. Ils peuvent aussi, dans les conditions appropriées, catalyser la réaction inverse d'estérification . Les lipases sont parmi les enzymes les plus actives, avec une vitesse de catalyse de l'ordre de milliers de molécules de substrat hydrolysées par seconde par molécule d'enzyme¹⁵ .

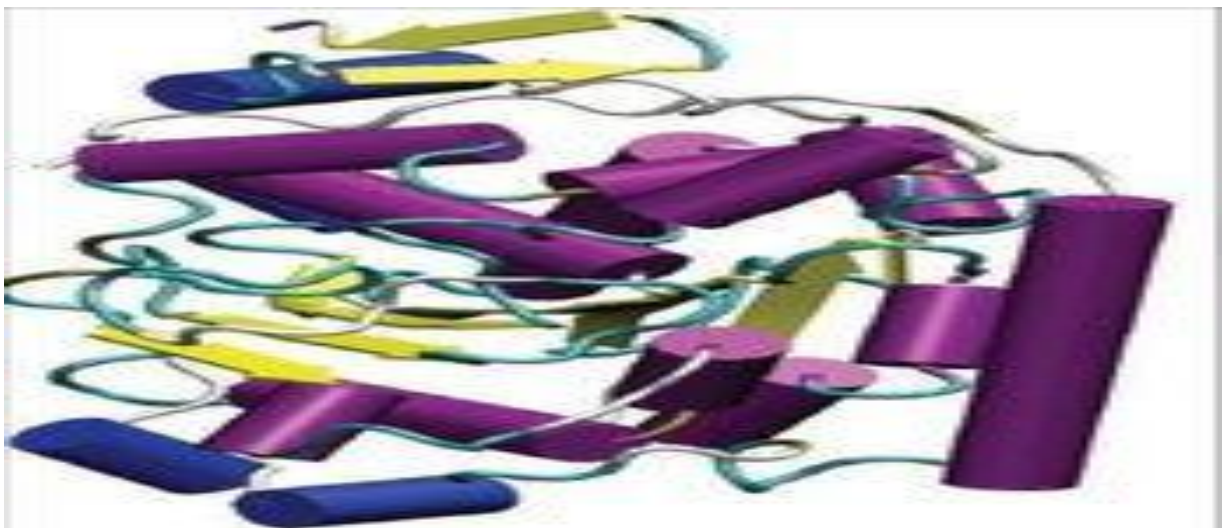


Figure 3. Structure dimensionnelle d'hélice (site active d'une lipase) .le feuillet beta en jaune, les hélices alpha en violet, les hélices alpha 310 en bleu, et les motifs 'turn' en cyan

2.1.1. Lipase *Candida rugosa*

Lipase de *Candida cylindracea* (qui est l'ancien nom de *Candida rugosa*) a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir de poudre brute. CRL hydrolyse les triacylglycérols sans spécificité de longueur de chaîne. Une activité spécifique d'environ 800U / mg était mesurée avec la trioléine ou la tributyrine comme substrat à 37 °C et pH 8. La CRL est une vraie lipase. Cette enzyme présente le phénomène d'activation interfaciale lorsque la tripropionine a été utilisée comme substrat¹⁶.

2.1.2. Lipase pancréatique

La lipase pancréatique (ou triacylglycérols lipase) catalyse l'hydrolyse des triglycérides aux positions 1 et 3 pour donner successivement des 1,2-diacylglycérols et des 2-acylglycérols¹⁷. Chez de nombreux êtres vivants, cette réaction est capitale de par son rôle physiologique majeur dans le métabolisme des graisses et des lipides¹⁸.

La lipase pancréatique (EC 3.1.1.3) est la principale enzyme responsable de la digestion des lipides dans le système digestif. L'hydrolyse des triglycérides est essentielle pour l'absorption de lipides par les entérocytes.

- **La lipase pancréatique porcine :**

Se présente sous deux formes: A et B. La lipase A est active en milieu plus acide que la lipase B, mais à part cette différence, les deux enzymes sont pratiquement identiques¹⁹. Leurs masses moléculaires se situent entre 45 et 50 kilo daltons (kDa) et leurs points isoélectriques sont de 4,9 pour la lipase A et 5,0 pour la lipase B²⁰. Le pH auquel la lipase montre son activité optimale (6,5 et 9,0) varie dépendamment du substrat utilisé mais demeure dans le domaine légèrement alcalin²¹.

2.2. Mode d'action des lipases

Le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice à amphiphile et d'une quinzaine d'acide aminés qui agit comme un volet; lorsque l'hélice alpha recouvre le site actif l'enzyme, il est donc dans sa forme fermée ou inactive²².

Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme, suite au mécanisme d'activation interfaciale, il y'a un déplacement de l'hélice constituant le volet, la face hydrophobe de l'hélice orientée au pare avant vers l'intérieur du site actif s'expose au solvant créé une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface eau/corps gras.

Le site actif de l'enzyme est dès lors accessible aux substrats²³. Les analyses cristallographiques ont mis en évidence l'absence de hélice amphiphile recouvrant le site actif; ces lipases sont classées comme étant des estérases bien qu'étant capables d'hydrolyser des triglycérides à longues chaînes d'acides gras insolubles en phase aqueuse²⁴. Certaines autres lipases mettent en œuvre des activités très complexes avec l'intervention d'une Co lipase pour assurer la fixation de l'enzyme sur le substrat, le mécanisme d'activation interfaciale est dans ce cas sujet à controverse; Ce système est activé dans l'eau avant de rejoindre l'interface²³.

2.3. Origines des lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses; on les retrouve chez de nombreux organismes vivants²⁵.

2.3.1. Origine Animale

Les lipases animales représentent une source énergétique essentielle et avantageuse qui intervient dans le contrôle, de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses; elles se divisent en trois grands groupes²⁶:

- **Les lipases gastriques**

Secrétées par la muqueuse gastrique et hydrolysent les lipides alimentaires dans l'estomac²².

- **Les lipases pancréatiques**

Secrétées dans le duodénum; responsable de la digestion des lipides alimentaires²⁷.

- **Les lipases hépatiques**

Jouent un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines où elles sont capables d'hydrolyser les glycérides ; les phospholipides et les esters de cholestérol.

2.3.2. Origine Végétale

Les lipases se trouvent au sein de la plante, principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes.

Ces derniers contiennent des lipases capables d'être utilisées dans la biotransformation des lipides dans les domaines suivants la papeteries, l'oléo chimie, la farine de blé et les huiles essentielle²⁸.

2.3.3. Origine Microbienne

Les lipases sont largement ré pondues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux ; L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours de ces dernières années principalement en raison du grand nombre d'application qu'elles offrent dans les domaines très variée²⁹.

Ces lipases possèdent des procédés de fabrication simples avec une grande stabilité vis-à-vis la température, les détergents et les enzymes protéolytiques³⁰.

2.3.4. Origine bactérienne

Les bactéries ré pondues dans la production de lipases sont plusieurs, et vu que la classification des microorganismes peut changer à l'issue de nouvelles découvertes taxonomique ; le nom des lipases microbiennes souvent été modifié à titre d'exemple la lipase de *Pseudomonas fluorescens* est devenue lipase de *Pseudomonas cepaci* ; la lipase de *Candida cylindracea* est devenue lipase de *Candida rugosa*³¹. La lipase de *Serratia marcescens* est utilisée pour la production de Méthyl-glycidate, employée dans la synthèse d'un antagoniste du calcium²⁹. Dans le domaine laitier, on utilise *Pseudomonas fluorescens* pour la variation du goûts et de l'odeurs qu'elle donne au lait³².

2.4. Intérêt industriel des lipases

Les lipases sont souvent perçues comme une des plus importantes classes d'enzymes pour le monde industriel ,cet intérêt provient principalement du fait que les lipases possèdent des propriétés catalytiques atypique d'une part, et que d'autre part les technologies à mettre en œuvre par les produits relativement simple ; leur domaines d'application sont donc très vastes et variés²⁹.

2.4.1. Application dans les détergents

L'utilisation des lipases dans les détergents est le champ d'application le plus important de ces enzymes. La lipase produite par *Pseudomonas mendocina* appelée 'lumafast' possède un large spectre de substrat et elle est capable de tolérer les conditions de lavage, telle que les

valeurs de pH 10 et 11, température de 30 à 60°C ; une fois que les lipides sont partiellement ou totalement hydrolysés par l'enzyme, ils deviennent plus faciles à extraire du tissu lavé³¹.

2.4.2. Application dans l'industrie alimentaire

Un grand nombre d'applications hydrolytiques additionnelles ont été décrites pour les lipases microbiennes y compris le développement de stém pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques), réalisé par l'hydrolyse sélective de gros triglycérides pour libérer des acides gras, ceux-ci peuvent agir en tant que saveurs ou précurseurs de saveur, dans l'industrie agro-alimentaire. Les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie³³. Elles ont aussi une application dans le domaine de développement des arômes par les lipases exogènes (lipase pré gastrique ou microbienne), comme les lipases de *Candida antarctica* et de *Rhizomucor miehei* synthétisent des arômes par réaction de transestérification comme pour le 3,7-diméthyl-4,7 octadien-1-ol qui présente un arôme de Rose²². Les lipases sont aussi utilisées dans le secteur des farines de blé pour renforcer les pâtes et dans le beurre de cacao.

2.4.3. Application dans l'environnement

Les lipases sont également utilisées en environnement dans le domaine de la bioremédiation qui est devenue la méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués à l'exemple de lipases végétales utilisées contre les effluents des industries agroalimentaire riche en lipides et en graisses ; ces dernières entraînent le colmatage des canalisations. Les lipases sont également utilisées lors de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures³¹.

2.5. Réactions réalisables par les lipases

Les lipases peuvent être employées en synthèse organique en tant que catalyseurs de choix. En effet, elles présentent l'avantage de réaliser une multitude de réactions chimiques, allant de l'estérification (1)³⁴, à l'acidolyse (2)³⁵, en passant par l'amidification (3)³⁶, l'hydrolyse (4)³⁷ ou la transestérification (5)³⁸. En fonction du microenvironnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique.

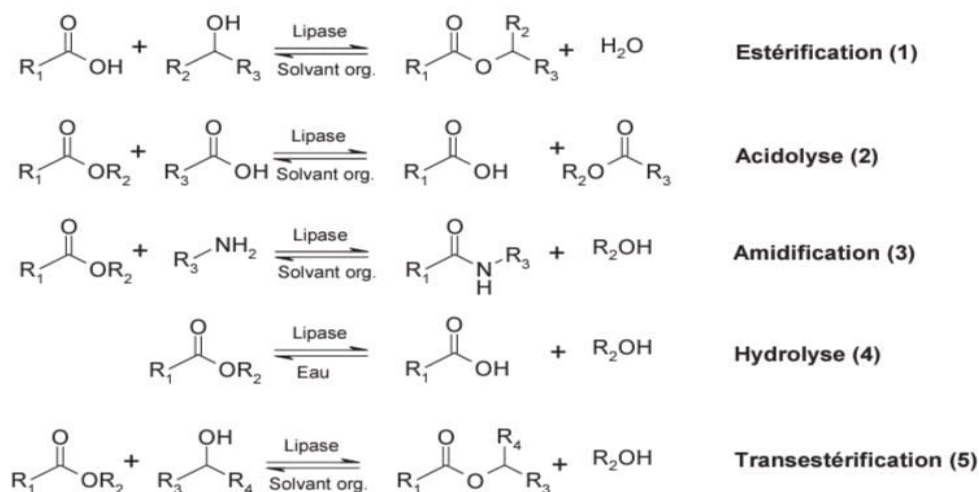


Figure 4. Différentes réactions possibles par utilisation de lipases.

Les lipases offrent tout un panel de réactions possibles, directement utilisables en synthèse organique.

2.5.1. L'estérification

Il y a eu au cours de ces dernières années un développement important des applications des lipases pour la production d'esters dans les domaines agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Les lipases immobilisées sont particulièrement intéressantes pour ces utilisations industrielles, puisqu'elles peuvent être facilement manipulées.

Une large gamme d'esters d'acide gras est maintenant produite commercialement en utilisant une lipase immobilisée, en présence de solvants non-aqueux. Par exemple, des esters ont été synthétisés à partir d'acides gras à longue chaîne (12-20 atomes de carbone) et d'alcools à courte chaîne, afin de servir dans la confection de produits alimentaires ou cosmétiques, tandis que ceux issus d'acides gras à longue chaîne et d'alcools à longue chaîne sont utilisés dans la fabrication de plastifiants et de lubrifiants. Ainsi la lipase de *C. rugosa* immobilisée sur du nylon a permis la synthèse d'oléyl butyrate à partir d'acide butanoïque et de n-butanol en présence de n-hexane³⁹.

2.5.2. La transtestérification

Implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolyse) ou avec le glycérol (glycérolyse). Il existe plusieurs applications industrielles de la transtestérification par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides

gras poly insaturés, des substitués de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorique. L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final³⁹.

2.6. Mécanisme d'action des lipases

Mécanisme d'action des lipases Le mécanisme réactionnel des réactions enzymatiques est commun à toutes les sérines hydrolases. Prenons l'exemple général d'une transestérification.

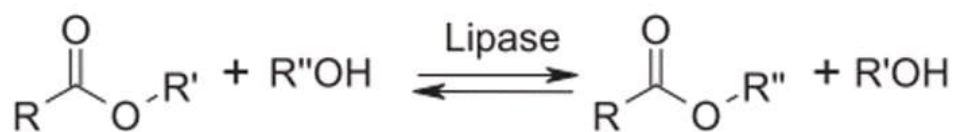


Figure 5. Transestérification catalysée par une lipase.

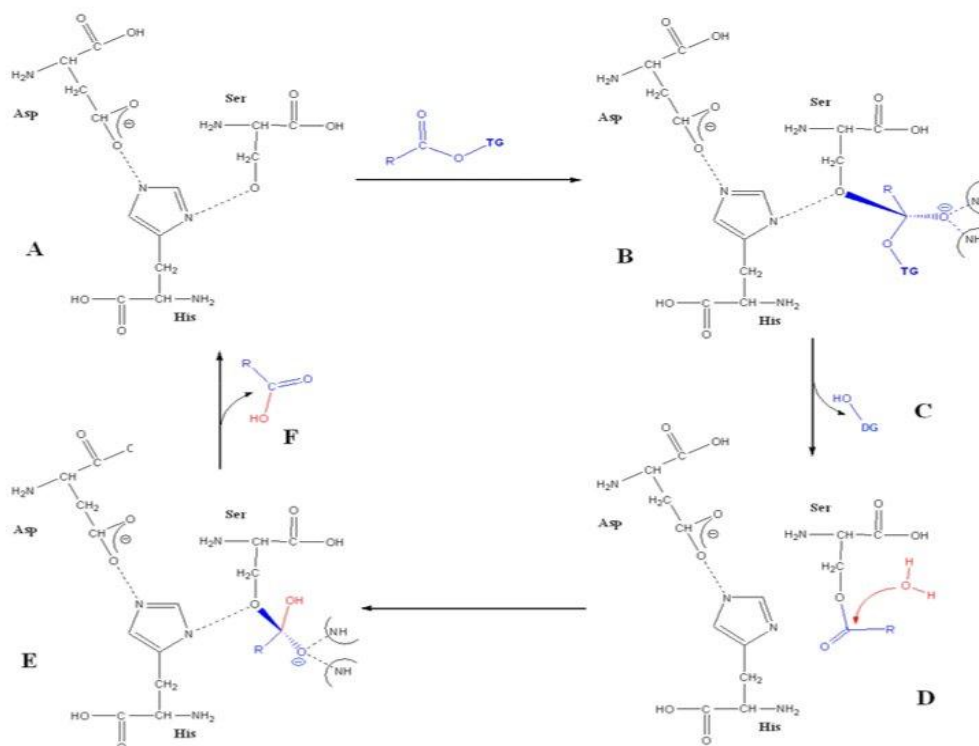


Figure 6. Mécanisme catalytique proposé pour les lipases, modèle extrapolé à partir de celui des protéases à sérine.

A l'état de transition, la géométrie de l'intermédiaire tétraédrique est stabilisée dans le trou de l'oxyanion. (A) Conformation initiale de l'enzyme. (B) Formation du premier

intermédiaire tétraédrique après attaque nucléophile de la sérine catalytique sur le carbone du groupement carbonyle cible du substrat, et stabilisation de la charge négative créée par deux résidus constitutifs du « trou de l'oxyanion ».

(C) Libération du groupe partant (alcool, diglycéride si le substrat est le TG) et formation de l'acyl-enzyme. (D) Attaque nucléophile par une molécule d'eau du carbone du carbonyle de l'acyl-enzyme. (E) Formation du second intermédiaire tétraédrique. (F) Libération de l'acide carboxylique qui régénère l'enzyme libre. Les groupements NH des résidus du trou de l'oxyanion sont indiqués schématiquement⁴⁰.

2.7. En synthèse organique

Les lipases sont des catalyseurs très largement utilisés en synthèse organique, principalement en raison de leur stabilité et de leur activité en milieu solvant. De plus, elles présentent une grande chimiosélectivité, régiosélectivité et stéréosélectivité. Dans ce domaine, la plupart des lipases utilisées sont d'origine microbienne.

2.8. Propriétés de sélectivité des lipases

Du point de vue catalyseurs en synthèse organique, les lipases possèdent plusieurs propriétés intéressantes. Comme on la mentionnés au paravent elles peuvent catalyser une grande variété de réactions 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 ce qui les rend vraiment spéciales et pour cela on les utilise souvent en synthèse organique car ces caractéristiques permettent d'éviter les réactions indésirables qui peuvent être de nature dangereuse pour l'environnement ⁴¹.

2.9. Chimiosélectivité et Régiosélectivité

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. . .), cette propriété importante des lipases trouve un domaine d'application dans plusieurs études, surtout l'acylation des substrats polyfonctionnels tels que les aminoalcools des thioalcools ou des peptides⁴².

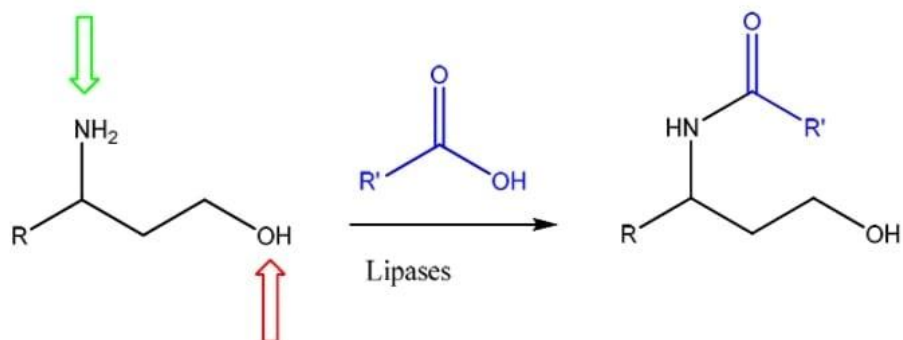


Figure 7. La chimiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels de natures différentes présents au même substrat.

La régiosélectivité c'est la capacité d'une lipase à réagir préférentiellement avec certains sites d'un autre réactif parmi plusieurs possibilités, conduisant préférentiellement à certains produits parmi plusieurs possibles. Dans de nombreuses études, les lipases sont utilisées pour catalyser sélectivement et avec des rendements élevés la O-acylation de nombreux substrats poly-hydroxylés, tels que des sucres, des polyalcools⁴¹.

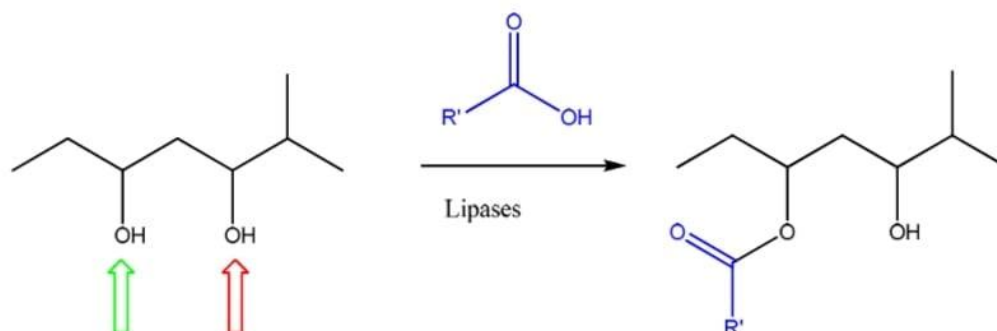


Figure 8. La régiosélectivité des lipases vis-à-vis de groupes fonctionnels identiques présents au même substrat.

2.10. Énantiosélectivité

Une des principales utilisations des lipases en synthèse organique c'est pour leur chimio et régiosélectivité mais aussi pour leur énantiosélectivité lors de la résolution des mélanges racémiques d'alcools et d'amines secondaires ou des esters chiraux⁴³.

Méthode et Matériel

Matériels

1.1. Les réactifs

1.1.1. Acétate de vinyle

L'acétate de vinyle est l'ester de l'acide acétique (acide éthanoïque) avec le tautomère alcoolique de l'éthanal (acétaldéhyde) et de formule semi-développée, $\text{CH}_3\text{COO}-\text{CH}=\text{CH}_2$.

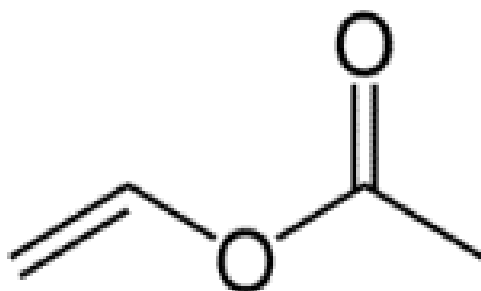


Figure 9. La structure chimique de l'acétate de vinyle.

Tableau 2. Propriétés physique et chimique d'acétate de vinyle.

La formule Brute	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$
Etat physique	Liquide
Masse molaire	$86,0892 \pm 0,0042 \text{ g/mol}$
Point de fusion	$-93 \text{ }^\circ\text{C}$
Point d'ébullition	$72 \text{ }^\circ\text{C}$
masse volumique	$0,9 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
Solubilité	dans l'eau à $20 \text{ }^\circ\text{C}$: 25 g/l

1.1.2. Acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est un solvant de polarité moyenne, peu toxique et non hygroscopique, qui possède une grande volatilité. C'est un accepteur faible en raison de liaisons hydrogène. Il peut dissoudre jusqu'à 3 % d'eau et possède une solubilité dans l'eau de 8 % à température normale

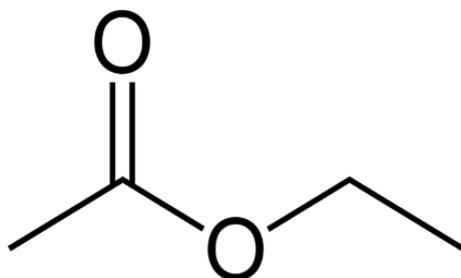


Figure 10. la structure chimique de l'acétate d'éthyle.

Tableau 3. les propriétés physique et chimique d'acétate d'éthyle.

La formule Brute	C ₄ H ₈ O ₂
Etat physique	Liquide
Masse molaire	88.1051 ± 0,0044 g/mol
Point de fusion	-83.6 °C
Point d'ébullition	77.1 °C
Masse volumique	0.9245 g·cm ⁻³
Solubilité	81 g/l (eau, 20 °C)

1.1.3 .L'alcool

Le butan-2-ol ou sec-butanol est un des isomères du butanol. C'est un alcool secondaire, et une molécule chirale, présentant donc 2 énantiomères, appelés classiquement (R)-butan-2-ol et (S)-butan-2-ol. On le trouve en général sous la forme d'un racémique.

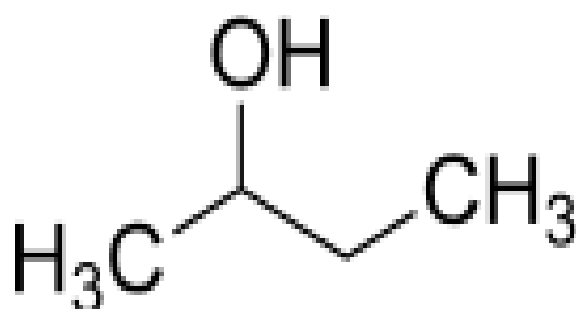


Figure 11. La structure chimique de butan-2-ol.

Tableau 4. Propriété physique et chimique du butan-2-ol.

La formule brute	C ₄ H ₁₀ O
Etat physique	liquide
Masse molaire	74,1216 ± 0,0042 g/mol
Point de fusion	-115 °C
Point d'ébullition	100 °C
Masse volumique	0,8 g·cm ⁻³
Solubilité	dans l'eau à 20 °C : 125 g/l

1.1.4. Les solvants

Tableau 5. Propriétés chimique des solvants.

Solvant	Formule	Masse molaire	T° fusion	T° ébullition	Masse volumique
Hexane	C ₆ H ₁₄	86,1754g/mol	-95,3°C	68,73 °C	0,6594 g/cm ³
Toluène	C ₇ H ₈	92,1384 g/mol	-95 °C	110,58 °C	0,867 g/cm ³
Ether diéthylique	C ₄ H ₁₀ O	74,1216 g/mol	-116 °C	35°C	0,714 g/cm ³
dichlorométhanes	CH ₂ Cl ₂	84,933 g/mol	-95,1°C	40°C	1,4892 g/cm ³

1.2. Agitateur magnétique

Un agitateur est un équipement de laboratoire ayant pour but d'assurer l'homogénéisation d'un milieu (homogénéisation du point de vue des composants du milieu et/ou de la température)

Son utilisation peut être remplacée par un barreau magnétique en association (ou non) avec une plaque chauffante. L'agitateur est alors le bloc qui permet d'agiter le barreau magnétique. Il est constitué d'un aimant mis en rotation par un moteur à vitesse variable⁴⁴.



Figure 12. Agitateur magnétique.

1.3. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM, en anglais TLC pour Thin layer chromatography) est une technique de chromatographie planaire dont la phase mobile est liquide. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative).

- une phase stationnaire : une couche mince de matériel adsorbant (usuellement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose) ;
- une phase liquide, dite phase mobile ou éluant : un solvant ou un mélange de solvants qui va entraîner les composés à se séparer le long de la phase stationnaire⁴⁵.

1.3.1_ présentation de matériel

- La cuve
- La plaque CCM (silice)
- Tube capillaire
- L'éluant :
- Au cours de cette séquence nous verrons le principe de cette technique sur deux exemples :
 - ✓ la séparation de colorants visibles à l'œil nu
 - ✓ la séparation de composés non colorés qu'il faudra révéler par un autre moyen

Montage de la chromatographie

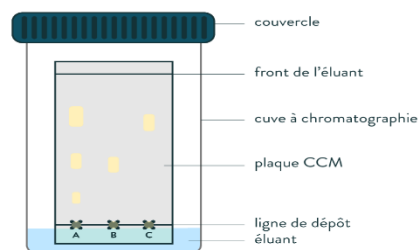


Figure 13. Montage de la CCM.

1.4. La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, appelées ici « analytes ».

La CPG repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile⁴⁶.

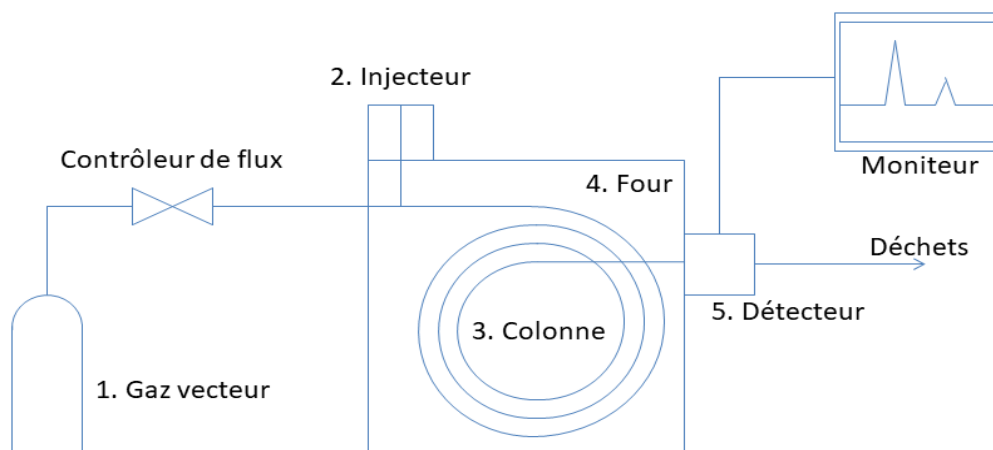


Figure 14. Schéma d'un chromatographe.

Méthode

2.1. Réaction sous agitation magnétique

Dans un tube hermétiquement fermé, 10 mM d'alcool secondaire racémique (butan-2-ol) et 10 mM de l'ester (acétate de vinyle ou acétate d'éthyle) sont solubilisés dans 3.5 ml de solvant organique (Ether diéthylique, Hexane, Toluène, Dichlorométhane). La réaction est ensuite initiée par addition de 0.3 g de lipase (lipase de *Candida rugosa* CRL ou lipase pancréatique de porc LPP) mise sous agitateur magnétique pendant 5 heures à une température ambiante. La réaction a été suivie dans un premier temps par CCM. A la fin de la réaction, nous prélevons des échantillons pour analyser par CPG.

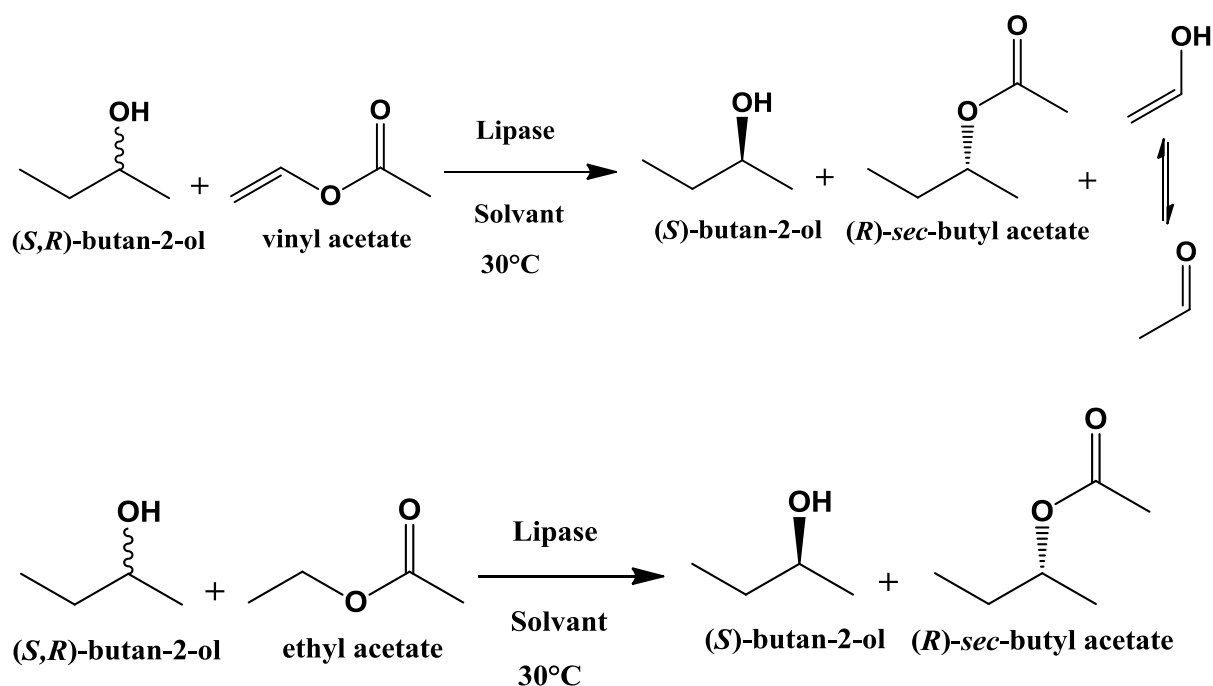


Figure 15. Transestérification enzymatique du (S,R)-2-butanol avec deux donneurs d'acyles dans différents solvants.

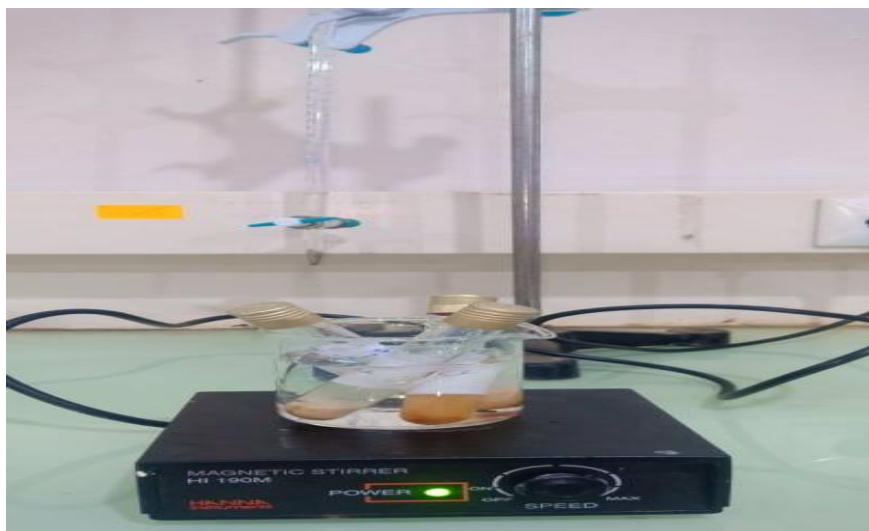


Figure 16. Réaction réalisée sous agitation magnétique.

2.2. L'analyse par la chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange réactionnelle. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. Les analyses sont réalisées sur des feuilles d'aluminium recouvertes de silice.

- les échantillons sont incolores, donc il faut passer par la révélation en utilisant une lampe à ultraviolet
- phase mobile : éther de pétrole / éther diéthylique : 20/80 %



Figure 17. Analyse par CCM.

2.3. L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse

Des prélèvements ont été pris à la fin des réactions et analysés à l'aide d'un appareil chromatographique en phase gazeuse (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 substrats 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 de l'ester racémique et la séparation de ces énantiomères *S* et *R* ainsi que ceux des deux énantiomères alcool, ont été déduites par rapport à des références optiquement pures :

- **(*R,S*)-2-butanol** : (*R*)-2-butanol : 5,01min , (*S*)-2-butanol : 5,22min
- **(*R,S*)-acétate de sec-butyl** : (*R*)-acétate de sec-butyl : 6,56min , (*S*)-acétate de sec-butyl : 7,18min



Figure 18. CPG utilisé, GC -17SHIMADZU.

Résultats et discussions

1. Introduction

La nature des milieux organiques non seulement influe sur l'activité de l'enzyme, mais aussi l'énantiosélectivité, qui a été vérifiée par les travaux de plusieurs groupes^{47,48}. LogP (logarithme du coefficient de partition d'un solvant donné entre le n-octanol et l'eau) est maintenant largement utilisé pour exprimer la polarité ou l'hydrophobicité d'un solvant.

Notre travail a pour objectif l'étude de l'effet du solvant sur la résolution enzymatique d'un alcool secondaire, du (R, S)-2-butanol, avec l'acétate de vinyle ou l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle présence de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) ou lipase pancréatique de porcine dans différents solvants organiques. Pour avoir un élément de comparaison sur l'effet du solvant sur le comportement des lipases, les réactions ont été effectuées sous agitation magnétique classique. Ensuite, nous avons fait des prélèvements des réactions, pour faire des analyses par CPG avec une colonne chirale. Dans ce chapitre nous allons présenter nos résultats de l'effet du solvant sur la réaction enzymatique, en particulier sur son activité énantiosélectivité.

2. Effets du solvant sur la réaction enzymatique :

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. Plusieurs solvants organiques avec différents log P ont été sollicités dans l'acylation des alcools par la CRL et LPP à 35 °⁴³.

Le solvant joue un rôle important dans le fonctionnement des enzymes. L'activité et la sélectivité de l'enzyme peuvent être affectées de manière très importante selon la nature du solvant réactionnel. Cependant, pour préserver l'intégrité conformationnelle de l'enzyme, celle-ci doit garder un niveau minimal d'hydratation. Ainsi, le solvant utilisé ne doit pas être strictement anhydre ni être trop polaire.

3. Généralité sur l'énantiosélectivité

Un grand nombre d'enzymes présentent un caractère énantiosélectif, c'est-à-dire la catalyse préférentielle d'une des deux formes chirales d'un substrat et permettent donc le dédoublement cinétique de mélanges racémiques. L'énantiosélectivité est généralement caractérisée au moyen de l'excès énantiomérique du substrat, noté (ees) (équation 1) ou du produit (eep) (équation 2). La variation de conversion (équation 3).

$$\%ee_s = \frac{R-S}{R+S} * 100 \dots\dots\dots (1)$$

$$\%ee_p = \frac{P_R-P_S}{P_R+P_S} * 100 \dots\dots\dots (2)$$

$$\%C = \frac{ees}{ees+eep} * 100 \dots\dots\dots (3)$$

R et S représentent les concentrations des énantiomères substrats, P_R et P_S les concentrations des énantiomères produits de la réaction. Le facteur de sélectivité (E) qui caractérise l'affinité spécifique d'une enzyme pour un énantiomère donné, est le rapport de vitesse de formation des deux énantiomères en compétition soit :

$$E = \frac{K_R}{K_S}$$

En tenant compte des équations (1) et (2), le facteur d'énantiosélectivité (E) peut alors s'exprimer comme suit :

$$E = \frac{\ln[1-C(1+eep)]}{\ln[1-C(1-ees)]} \dots\dots\dots (4) \text{ ou}$$

$$E = \frac{\ln[1-C(1-ees)]}{\ln[1-C(1+eep)]} \dots\dots\dots (5)$$

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

4. L'effet du solvant sur le comportement des lipases dans la réaction de transestérification du (*R, S*)-2-butanol

La réaction de transestérification du (*R, S*)-2-butanol avec l'acétate de vinyle ou l'acétate d'éthyle en présence de lipase (CRL) ou (LPP) a été réalisée sous agitation magnétique. Cette réaction a été effectuée dans quatre solvants différents (Ether diéthylique, Hexane, Toluène, Dichlorométhane). La réaction a été suivie par CCM, en suite par CPG. Grâce à cette technique, nous avons également déterminé les valeurs d'ees et eep (excès énantiomérique du substrat et du produit), la conversion (%C) et E (facteur d'énantiosélectivité) en utilisant les équations précédentes 1, 2, 3, 4 ou 5 respectivement.

4.1. Effet du solvant sur l'activité de la CRL et LPP dans la transestérification du (*R, S*)-2-butanol

A. Effet du solvant sur l'activité de la CRL

Les résultats obtenus présentés dans le tableau ci-dessous montrent que la conversion du 2-butanol racémique varie entre 12 et 24% avec l'acétate de vinyle et entre 6 et 15% avec l'acétate d'éthyle et cela pendant 5 heures de réaction.

Tableau 6. Effet du solvant sur l'activité de la CRL dans la transestérification du (*R, S*)-2-butanol.

Solvant	Log <i>P</i>	Conversion (C%)	
		Acétate de vinyle	Acétate d'éthyle
Ether diéthylique	0,89	12	6
Dichlorométhane	1,25	19	9
Toluène	2,73	25	13
Hexane	3,50	24	15

Le tableau montre que l'activité de la CRL augmente avec l'augmentation de *Log P* c'est-à-dire avec l'hydrophobicité de solvant et cela avec les deux donneur acyles utilisés.

D'autre part, un avantage d'utilisation de l'acétate de vinyle par rapport à l'acétate d'éthyle exprimé par des conversions plus élevées. Cela peut être expliqué par l'irréversibilité de la réaction dans le cas de l'acétate de vinyle par la formation d'un énol qui se tautomérise en cétone.

B. Effet du solvant sur l'activité de la LPP

Les résultats présentés dans le tableau 7, montrent également une augmentation proportionnelle de l'activité de la LPP avec l'hydrophobicité du solvant. Et les meilleurs résultats de conversion ont été obtenus avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle.

Tableau 7. Effet du solvant sur l'activité de la LPP dans la transestérification du (*R,S*)-2-butanol.

Solvant	Log P	Conversion (C%)	
		Acétate de vinyle	Acétate d'éthyle
Ether diéthylique	0,89	5	1
Dichlorométhane	1,25	9	5
Toluène	2,73	14	5
Hexane	3,50	16	8,5

4.2. Effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la CRL et LPP dans la transestérification du (*R, S*)-2-butanol

A. Effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la CRL

Tableau 8. Effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la CRL dans la transestérification du (*R, S*)-2-butanol.

Solvant	Log P	Enantiosélectivité (<i>E</i>)	
		Acétate de vinyle	Acétate d'éthyle
Ether diéthylique	0,89	5	6
Dichlorométhane	1,25	4,7	4
Toluène	2,73	5,5	7
Hexane	3,50	9	9

B. L'effet du solvant sur l'énantiosélectivité de LPP

Tableau 9. Effet du solvant sur l'énantiosélectivité de la LPP dans la transestérification du (*R, S*)-2-butanol.

Solvant	Log P	Enantiosélectivité (<i>E</i>)	
		Acétate de vinyle	Acétate d'éthyle
Ether diéthylique	0,89	4	3
Dichlorométhane	1,25	7	1,3
Toluène	2,73	13	14
Hexane	3,50	22	17

Les résultats obtenus et présentés dans les tableaux précédents, montrent que les meilleures énantiosélectivité ont été obtenues dans les solvants apolaires et cela pour les deux lipases

étudiées CRL et LPP conversions sont dans le cas des solvants qui possèdent un $Log P$ élevé c'est-à-dire les solvants apolaire. Egalement, l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle a donné les meilleurs résultats avec tous les solvants étudiés sauf dans le cas de toluène.

5. Comparaison de l'activité et de la sélectivité des deux lipases étudiées

5.1. Comparaison de conversion

Afin de réaliser une comparaison entre le comportement de la lipase vis-à-vis la réaction transestérification du (R,S)-2-butanol avec l'acétate de vinyle sous agitation magnétique. nous avons rassemblé l'ensemble des résultats obtenus dans le tableau et la figure suivant :

Tableau10. Comparaison de la conversion entre CRL et LPP.

Solvant	LogP	Conversion (C%)	
		LPP	CRL
Ether diéthylique	0,89	5	12
Dichlorométhane	1,25	24	19
Toluène	2,73	14	25
Hexane	3,50	16	24

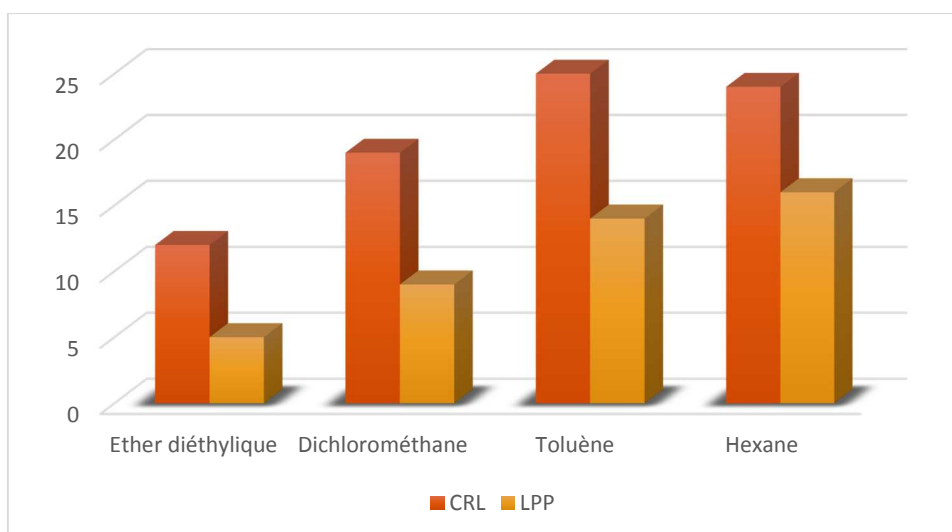


Figure 19. Histogramme de comparaison de la conversion entre les lipase.

On analysant l'histogramme ci-dessus, les résultats montrent un avantage d'activité en termes de conversion dans le cas de la lipase candida rugosa vis-à-vis le (R,S)-butanol par rapport à la

lipase pancréatique de porc. D'autre part, le toluène semble le meilleur milieu réactionnel pour les deux lipases.

5.2. Comparaison de l'énantiosélectivité

L'analyse chromatographique permet d'identifier le facteur d'énantiosélectivité (E) qui est l'élément le plus important pour l'étude des molécules bioactives. Les résultats sont donnés dans le tableau et la figure suivants :

Tableau 11. Comparaison d'énantiosélectivité entre CRL et LPP.

Solvant	Log P	Enantiosélectivité (E)	
		LPP	CRL
Ether diéthylique	0,89	4	5
Dichlorométhane	1,25	7	4.7
Toluène	2,73	13	5.5
Hexane	3,50	22	9

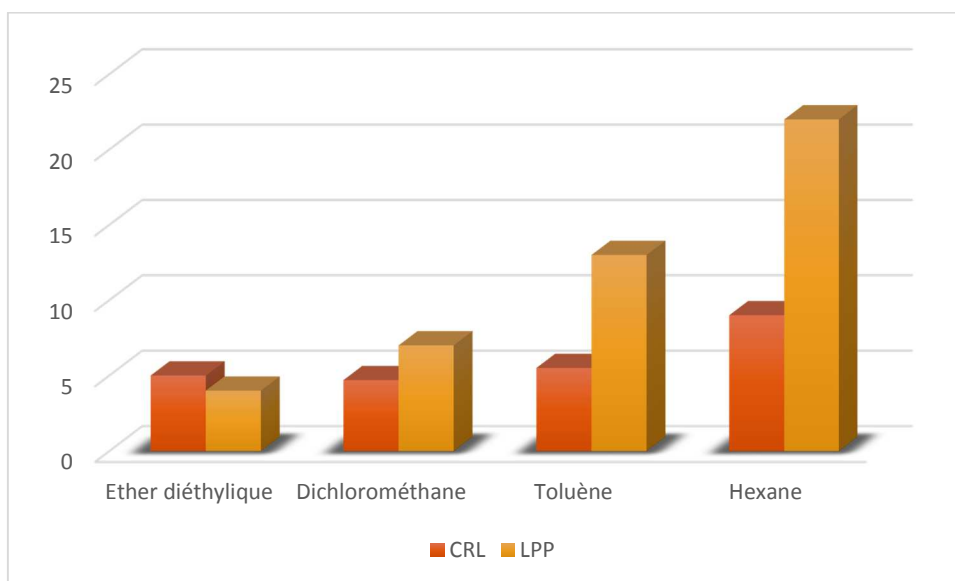


Figure 20. Histogramme de comparaison de l'énantiosélectivité entre les lipases .

Ces résultats indiquent que l'énantiosélectivité dans le cas de la lipase pancréatique est meilleure, et cela pour tous les solvants étudié sauf dans le cas d'éther diéthylique. D'autre part, l'hexane a donné la meilleure sélectivité pour les deux lipases.

6. Conclusion

Dans ce travail, nous avons étudié la réaction de transestérification enzymatique du (R,S)-2-butanol avec l'acétate de vinyle ou acétate d'éthyle en présence de différents solvants organiques.

Nous avons examiné l'effet du solvant sur le comportement de lipase, Les résultats obtenus montrent l'influence du solvant organique sur l'activité et la sélectivité du biocatalyseur. Les lipases de CRL et LPP ont montré plus de performance dans milieux hydrophobes.

Egalement, le vinyle acétate semble être le meilleur donneur d'acyle dans ce genre de réaction en raison de l'irréversibilité résultant de la formation d'un énol en équilibre tautomérique avec la forme cétone.

D'autre part, la CRL a montré plus d'efficacité en termes de conversion vis-à-vis le substrat étudié par rapport à la LPP. Cependant, la LPP a montré plus sélectivité envers ce dernier par rapport à la CRL.

En conclusion, le facteur de l'hydrophobicité du solvant joue un rôle très important dans les réactions enzymatiques.

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons cherché à connaître l'effet de solvants sur le comportement des enzymes. Etant donné la complexité du phénomène, à savoir les nombreuses interactions entre ce dernier et les différents acteurs du milieu réactionnel, nous avons décidé de focaliser sur l'hydrophobicité exprimé par le coefficient de partage Log P.

La résolution enzymatique du (R,S)-2-butanol avec acétate de vinyle ou acétate d'éthyle comme des donneurs d'acyle en présence de la lipase *Candida Rugosa* (CRL) ou lipase pancréatique de porc sous agitation magnétique a été étudié, les réactions ont été suivis par analyse chromatographique en phase gazeuse. Les résultats confirment l'influence du solvant sur la conversion (C) et l'énantiosélectivité (E) des lipases. On peut conclure que les lipases présentent une activité optimale en termes de conversion et d'énantiosélectivité dans des solvants hydrophobes avec un Log P élevé.

Le manuscrit de ce mémoire a été organisé comme suit : le premier chapitre a été consacré à une étude bibliographique sur les enzymes d'une manière générale et les lipases en particulier, les enzymes qui ont une large étendue dans ces dernières décennies particulièrement les hydrolytiques telles que les lipases sont fréquemment utilisées en raison de leur compatibilité avec une large gamme de substrats et présentent souvent une grande énantiosélectivité et plusieurs avantages, ce qui leur permet d'être utilisées dans différents domaines.

Dans le deuxième chapitre, le matériel utilisé ainsi les protocoles opératoires réalisés ont été décrit de manières simple, et efficace reproductible.

Finalement, dans le dernier chapitre, nous avons présentées les résultats obtenus et leurs discussions.

Les perspectives

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

Bibliographies

- [1] Patel R. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. 2008, 252, 659-701.
- [2] Erb S. Single-enantiomer drugs poised for further market growth. *Pharmaceutical Technology*. 2006, Oct 3.
- [3] Caprio V., Williams, J. *Catalysis in asymmetric synthesis*. Wiley-Backwell. Chichester. 2009.
- [4] Ghanem A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*. 2007, 63, 1721-1754.
- [5] Govindaraju K., Kiruthiga V., Manikandan R., Ashokkumar T., Singaravelu G. β -glucosidase assisted biosynthesis of gold nanoparticles: A green chemistry approach. *Materials Letters*. 2011, 65, 256-259.
- [6] F. Hasan, A. A. Shah, A. Hameed. *Enz. Microb. Technol.* 2006, 39, 235-251.
- [7] Simon, J; Charnock Barry, V; Mcclary. (2005). *Les enzymes : applications industrielles et analytiques* (2005). [en ligne](page consultée le 17/03/17) <http://www.Megaenzyme.com>.
- [8] Hanane DEBBECHE, 'Réactivité de Quelques Anhydrides Cycliques Dans La Réaction d'acylation Enzymatique d'alcools Chiraux', 2011.
- [9] Bacchi, M. (2006). *Hydrogénases artificielles : Nouveaux catalyseurs biosynthétiques pour la production d'hydrogène : Thèse de Doctorat : Université de Grenoble*, 245p.
- [10] Ben Ameer Villain, S. (2012). *Conception et Etude d'un réacteur enzymatique à membrane fonctionnant en milieu supercritique : Application à la synthèse enzymatique d'esters*. Thèse de doctorat. Génie des procédés : Ecole Nationale Supérieure de chimie de Montpellier, p131.
- [11] Bustos, I.J. (2013). *Formes pharmaceutiques à base d'enzymes sans excipients*. Mémoire Exigence partielle de maîtrise en biochimie : Biochimie. Québec : Université du Québec à Montréal .95P.
- [12] Bloner, TH. (2005). *Des solutions hypoallergiques pour une meilleure qualité de vie*. France.

- [13] Djeghaba. Z, Document d'appui au cours sur la biocatalyse en chimie organique, 16-18, 2008, Université Badji Mokhtare Annaba.
- [14] Dr Hallal S, 'Enzymologie Enzymologie', 2012, p 2.
- [15] Amal NAJJAR, 'Etude Quantitative de La Sécrétion de Lipase, de La Lipolyse et Du Stockage de Lipides Chez *Yarrowia Lipolytica* Lors de Sa Croissance En Présence d'huile d'olive', 2010.
- [16] Hounaida Mtibaa and others, 'La Lipase de *Candida Rugosa*: Caractérisation Biochimique', *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides*, 9.1 (2002), 49–53 <<https://doi.org/10.1051/ocl.2002.0043>>.
- [17] Voet, D., et Voet J.G. 2005. «Les mécanismes de l'action enzymatique». *Biochimie 2*• édition, (G. Rousseau et L. Domenjoud Trad.) p. 457-496, Bruxelles : De Boeck Université.
- [18] Fickers P., J. Destain et P. Thonart. 2008. «Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vo1.12, p.119-130
- [19] Verger, R., G.H. de Hass, L. Sarda et P. Desnuelle. 1969. «Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity». *Biochim Biophys Acta*, vol.188, p. 272-282
- [20] Brokerhoff H. et R.G. Jensen. 1974. «Lipases». In *Lipolytic Enzymes* (Brokerhoff H. , Jensen R. , Eds.) , p.25-34, New York: Academie Press.
- [21] Best, C.H. et N.B. Taylor. 1961. «Pancreas, liver and bili ary system». In *The physiological basis of medical practice* (Taylor N.B., Ed.), p. 629-661, Baltimore: The Williams & Wilkins company.
- [22] Fickers, P; Destain, J; Thonart, Ph. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principale caractéristique et application. *biotechnol. agron. Soc. Environ* 12(2) 119-130
- [23] Reis, P; Holmberg, K; Liser, M.E; Miller, R. (2008). Lipases at interfaces: A review advances in colloid and interface science.
- [24] Scharg, J.D; and Cygler, M. (1993). 1.8 A refined structure of the lipase from *geotrichum candidum* *J.Mol. biol* 230: 575-591.
- [25] Gilhan, D; Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methodes*.36: 139-147.
- [26] Gargouri, Y ; Julien, R ; Pieroni, G ; Verger, R ; Sarda, L. (1984). Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *Journal of lipid research*.25: 1214-1221p.

- [27] Aggoune wissem et Marouf sabrine. L ' Optimisation de la production de lipases par *Aspergillus* sp. Published online 2017.
- [28] Wilfried, R; Moussavou, M; Brunschwig, Ch; Villeneuve, P; Blin, J. (2011). 6eme urnée scientifique du 2iE. Screening de l'activité lipasique dans des extraits végétaux de la biomasse burkinabé pour la synthèse d'esters éthylique d'huile végétale (EEHV). 4-8 Campus 2iE Ouagadougou, 6P.
- [29] Rihani, A. (2012). Screening de microorganismes producteurs de lipases : application dans la biodécontamination de surface. Magister : Microbiologie. Annaba : Université Badji mokhtar, 55P.
- [30] Jeager, K.E; Ransac, S; Dijkstra, B.W. et al. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15(1): 29-63.
- [31] Najjar, A. (2010). Etude quantitative de la sécrétion de lipase. de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse de doctorat : Microbiologie et biotechnologies : Université de la méditerranée (Aix Marseille II) 132P.
- [32] Alifax, R. (1972). Activité lipolytique de quelques micro-organismes (1 bactéries). *Le lait* inra Edition, 52 (515-516), P 283-296.
- [33] Boukaa, M. (2015). Isolement des microorganismes producteurs de lipases à intérêt biotechnologique. Mémoire Master : Biotechnologie Microbienne. Fès, Maroc : Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. 37p
- [34] Vidya P., Chadha A. *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester: A comparison in ionic liquids vs hexane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010, 65, 68-72.
- [35] Foresti M.L., Ferreira M.L. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses.. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010, 46, 419-429.
- [36] Prasad A., Husain M., Singh B., Gupta R., Manchanda V., Olsen C., Parmar V. Solvent-free biocatalytic amidation of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*. 2005, 46, 4511-4514.

- [37] Zhang Y., Liu J. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochemical Engineering Journal*. 2011, 54, 40– 46.
- [38] Singh M., Singh S., Singh R.S., Chisti Y., Banerjee U. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Bioresource Technology*. 2008, 99, 2116-2120.
- [39] Jean-Paul Wathelet & Christophe Blecker Wazé Aimée Mireille Alloue, Jacqueline Destain, Hakim Ghalfi, Philippe Thonart, Mario Aguedo, ‘Les Lipases Immobilisées et Leurs Applications | Université de Liège’, 2008 <<https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=2125>> [accessed 9 July 2021].
- [40] NAJJAR A. Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d’huile d’olive. Published online 2010.
- [41] Touil Mohamed and Maizi Hakim, ‘Mémoire de Fin d ’ Étude Thème : Effet Des Ultrasons et Du Solvant Sur La Résolution Enzymatique Du (R , S)’, 2020, p 15.
- [42] Karl Erich Jaeger and Thorsten Eggert, ‘Lipases for Biotechnology’, *Current Opinion in Biotechnology*, 13.4 (2002), 390–97 <[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5)>.
- [43] Mr. BELAFRIEKH Abderahmane Directeurs, ‘Etude de l ’ Activité et de La Sélectivité Des Lipases Dans Des Milieux Non Conventionnels’, 2017, p 20.
- [44] Agitateur de Laboratoire — Wikipédia’<https://fr.wikipedia.org/wiki/Agitateur_de_laboratoire> [accessed 7 July 2021].
- [45] Réaliser Une Chromatographie Sur Couche Mince (CCM) | SchoolMouv’ <<https://www.schoolmouv.fr/savoir-faire/realiser-une-chromatographie-sur-couche-mince-ccm-fiche-pratique>> [accessed 7 July 2021].
- [46] La Chromatographie En Phase Gazeuse: Principe | CultureSciences-Chimie’ <<https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/chromatographie/la-chromatographie-en-phase-gazeuse-principe>> [accessed 7 July 2021].
- [47] A. Schmid, J.S.Dordick, B. Hauer, A.Kiener, M. Wubbolts. *Nature*. 2001,409, 258.
- [48] G. Carrea, G. Ottolina, Sergio Riva. *Trends in Biotechnology*. 1995, 13, 63-70.