

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahlab Blida 1**

**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 d'immobilisation sur l'activité enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* (CRL)**

---

**Réalisé par :**

**ZAHRA Sabrina et AISSOU Meriem**

**Président : Dr. OURADI Adel**

**Examineur: Dr. AIT YAHIA Ahmed**

**Promoteur : Dr. BELAFRIEKH Abderahmane**

**Promotion 2021-2022**

## ***Remerciement***

*Louange à Dieu le Tout-Puissant qui nous a donné la puissance, la santé et le pouvoir pour accomplir ce travail.*

*Au terme de ce travail, il nous sommes agréable de remercier avec gratitude l'encadreur de ce mémoire Dr. BELAFRIEKH ABDERAHMANE, pour nous avoir dirigé tout au long de ce travail pour son aide et ses conseils judicieux ainsi que pour sa disponibilité et ses qualités humaines, son suivi et sa compréhension afin de réaliser ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury de notre mémoire Dr. Ouradi Adel et Dr. Ait Yahia Ahmed, pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit et d'évaluer notre travail.*

*A ma très chère mère*

*Quoique je fasse que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force.*

*A mon père*

*Tu auras toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.*

*A nos frères et sœurs, Abdelhak, Youcef, Ali, Otmane, Hichame, Omar, Mohamed, Younes, Soumia, Fatma-Zohra, Samira, Mounira, Warda. À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.*

*A nos chères amies, Manel, Yasmine, Nesrine, Amina, Sarah, Rania, Lamia, Ryma, Fella, Souad, Soumia.*

*Nos remerciements vont aussi à tous qui de près ou de loin apporté aide et soutien dans la réalisation de ce mémoire.*

## Résumé

Les applications industrielles des enzymes en solution se trouvent parfois considérablement limitées par leur prix de revient et leur relative instabilité du fait de leur nature protéique (sensibles à la température, au pH, et aux ions). En solution, même si l'activité de l'enzyme est suffisante, sa récupération après utilisation nécessite un processus long et coûteux de purification. Par conséquent, ces enzymes sont perdues une fois la réaction effectuée. L'immobilisation des enzymes sur des supports solides, en augmentant leur stabilité opérationnelle et en permettant l'utilisation de réacteurs en flux continu permet de contourner cette difficulté.

Le présent travail a été consacré à l'étude de l'immobilisation par adsorption sur Célite de la lipase de *Candida rugosa* (CRL), l'influence sur le comportement de la lipase, en termes d'activité et d'énantiosélectivité dans la transestérification de l'alcool racémique (*R,S*)-2-butanol racémique, a été évalué. Nous nous sommes intéressés également à l'étude de l'effet de solvant, l'effet de température et le recyclage de la CRL immobilisée.

## **Abstract**

The industrial applications of enzymes in solution are sometimes considerably limited by their cost price and their relative instability due to their protein nature (sensitive to temperature, pH, and ions). In solution, even if the activity of the enzyme is sufficient, its recovery after use requires a long and costly process of purification. Therefore, these enzymes are lost once the reaction is done. The immobilization of enzymes on solid supports, increasing their operational stability and allowing the use of continuous flow reactors makes it possible to circumvent this difficulty.

The present work was devoted to the study of the immobilization by adsorption on Celite of the lipase of *Candida rugosa* (CRL), the influence on the behavior of the lipase, in terms of activity and enantioselectivity in the transesterification racemic (*R,S*)-2-butanol alcohol was evaluated. We are also interested in the study of the solvent effect, the temperature effect and the recycling of the immobilized CRL.

## ملخص

في بعض الأحيان التطبيقات الصناعية للإنزيمات في المحلول تكون محدودة بشكل كبير بالنسبة لتكلفته وعدم الاستقرار النسبي بسبب طبيعتها البروتينية (حساسة لدرجة الحرارة، pH، و الأيونات)، حتى لو كان نشاط الإنزيم جيد فان استرداده بعد استعماله يتطلب عملية طويلة ومكلفة لذلك تضيع هذه الإنزيمات بمجرد انتهاء التفاعل. تثبيت الإنزيمات على دعائم صلبة يزيد من استقرارها ويسمح باستخدامها في المفاعلات والتدفق المستمر.

كرس العمل الحالي لدراسة التثبيت عن طريق الإمتزاز لإنزيم *Candida rugosa* (CRL) ودراسة تأثير هذا التثبيت على سلوك الإنزيم من حيث النشاط والقدرة على الانتقائية الأيونومترية في أسترة الكحول الراسمي بوتانول-2، أيضا تم دراسة تأثير المذيب وتأثير درجة الحرارة وإعادة تدوير CRL المثبت.

# Sommaire

## Abréviations

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
------------------------------	----------

## Chapitre I

<b>1. Généralité sur les enzymes</b>	<b>4</b>
--------------------------------------	----------

1.1. Introduction	
1.2. Classifications des enzymes	4
1.3. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique	4
1.4. Propriétés générales des enzymes	5
1.5. Détermination de l'activité enzymatique	6
1.6. Mécanisme d'action des enzymes	6
1.7. La spécificité des enzymes	7
1.8. Les conditions opératoires influence l'activité enzymatique	7

## 2. Les lipases

2.1. Définition	8
2.2. Contexte et sources	8
2.3. Domaine d'application des lipases	9

## 3. Propriétés de sélectivité des lipases

3.1. Enantio-sélectivité	9
3.2. Régio-sélectivité	10
3.3. Chimio-sélectivité	11

## 4. L'immobilisation des enzymes

4.1. Enzyme immobilisée	12
4.2. Propriétés des enzymes immobilisées	12
4.3. Avantage des enzymes immobilisés	12
4.4. Domaines d'applications des enzymes immobilisées	13

## 5. Les principales méthodes d'immobilisations

5.1. Immobilisation d'enzymes par liaison chimique	14
5.1.1. Immobilisation Par adsorption	14
5.1.2. Immobilisation par liaison covalente	16
5.1.3. Immobilisation par réticulation	18

5.2. Immobilisation d'enzymes par rétention physique	18
5.2.1. Immobilisation par inclusion:	19
5.2.2. Microencapsulation	20
<b>4. La transestérification</b>	<b>22</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>23</b>
<b>Chapitre II Matériels et Méthodes</b>	
<b>1. Matériels</b>	<b>25</b>
1.1. Agitateur magnétique	25
1.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	25
1.3. Chromatographie sur couche mince	27
<b>2. Enzymes et Réactifs</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Lipases</b>	<b>28</b>
2.1.1. Lipase <i>candida rugosa</i> CRL	28
2.1.2. Lipase pancréatique du porc LPP	29
<b>2.2. Esters</b>	<b>29</b>
2.2.1. Acétate de vinyle	26
2.2.2. Acétate d'éthyle	30
<b>2.3. Alcools</b>	<b>30</b>
2.3.1. 2-butanol	30
<b>2.4. Solvants</b>	<b>31</b>
2.4.1. Hexane	31
2.4.2. Toluène	31
2.4.3. Ether diéthylique	31
2.4.4. Dichlorométhane	31
<b>3. Méthode</b>	<b>32</b>
3.1. Réaction sous agitation magnétique	32
3.1.1. Dosage de protéine par la méthode de Bradford	32
3.1.2. Préparation du réactif de Bradford	32
3.1.3. Préparation de la gamme d'étalonnage	32
3.1.4. Détermination de la concentration en protéines	32
3.1.5. Calcul le rendement d'immobilisation	33
3.1.6. Immobilisation de la lipase <i>Candida rugosa</i> sur Célite	33

3.2. Protocoles des réactions réalisées	33
3.2.1. Réaction sous agitation magnétique	33
3.3. Recyclage	34

### **Chapitre III Résultats et discussions**

1. Introduction	35
2. Effets du solvant sur la réaction enzymatique	35
3. Méthode de Calcul de conversion et l'énantiosélectivité	35
4. Effet du solvant sur le comportement des lipases dans la réaction transestérification du ( <i>R,S</i> )-2-butanol	36
a. Comparaison de conversion	37
b. Comparaison de l'énantiosélectivité	38
<b>5. La Transestérification par CRL immobilisée</b>	<b>39</b>
<b>5.1. Effet de solvant sur l'activité et la sélectivité d'enzyme</b>	<b>39</b>
a. Comparaison de conversion	39
b. Comparaison de l'énantiosélectivité	40
<b>5.2. Comparaison de l'activité et de la sélectivité des deux lipases Étudiées CRL libre et immobilisée.</b>	<b>39</b>
a. Comparaison de conversion	41
b. Comparaison d'énantiosélectivité	42
<b>5.3. Comparaison de la transestérification de la CRL immobilisée vis-à-vis les deux donneurs d'acyle</b>	<b>43</b>
a. Comparaison de la conversion	43
b. Comparaison d'énantiosélectivité	44
<b>5.4. Effet de Température</b>	<b>44</b>
a. Comparaison de la conversion	45
b. Comparaison de l'énantiosélectivité	46

<b>5.5. Effet de recyclage sur la transestérification par la CRL immobilisée</b>	<b>46</b>
a. Comparaison la Conversion	47
b. Comparaison d'énantiosélectivité	48
Conclusion	49
Bibliographie	50
<b>Conclusion générale</b>	<b>51</b>

## Liste des figures

<b>Figure1.</b> Représentation schématique d'une réaction enzymatique	5
<b>Figure2.</b> Energie d'activation avec et sans enzyme	5
<b>Figure3.</b> Energie libre d'activation	7
<b>Figure4.</b> Domaines d'application des lipases	9
<b>Figure5.</b> Enantio-sélectivité des lipases	9
<b>Figure6.</b> La régio-sélectivité des lipases	10
<b>Figure7.</b> La chimio-sélectivité des lipases	11
<b>Figure8.</b> Les méthodes d'immobilisation	14
<b>Figure9.</b> Immobilisation d'enzyme par adsorption	15
<b>Figure10.</b> Immobilisation par liaison covalente	17
<b>Figure11.</b> Immobilisation par réticulation	18
<b>Figure12.</b> Immobilisation par l'inclusion	20
<b>Figure13.</b> Immobilisation par microcapsulation	21
<b>Figure14.</b> Transestérification catalysée par une lipase	22
<b>Figure15.</b> Agitateur magnétique	25
<b>Figure16.</b> Principe de fonctionnement d'une CPG	26
<b>Figure17.</b> CPG utilisée, GC-17 SHIMADZU	26
<b>Figure18.</b> Montage de la CCM	28
<b>Figure 19.</b> Structure de l'acétate de vinyle	29
<b>Figure 20.</b> Structure de l'acétate d'éthyle	30
<b>Figure 21.</b> Structure chimique de 2-butanol	31
<b>Figure 22.</b> Effet de solvant sur la transestérification enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle	34
<b>Figure 23.</b> Réaction réalisée sous agitation magnétique	34
<b>Figure 24.</b> Histogramme de comparaison de la conversion entre les lipases LPP et CRL	37
<b>Figure 25.</b> Histogramme comparaison d'énantiosélectivité entre LPP et CRL	38
<b>Figure 26.</b> Histogramme comparaison de la conversion entre les solvants utilisés avec la CRL immobilisée	39

<b>Figure 27.</b> Histogramme comparaison d'énantiosélectivité entre les solvants utilisés avec la CRL immobilisée	<b>40</b>
<b>Figure 28.</b> Histogramme de comparaison de la conversion entre la CRL libre et immobilisée	<b>41</b>
<b>Figure 29.</b> Histogramme de comparaison d'énantiosélectivité entre la CRL libre et immobilisée	<b>42</b>
<b>Figure 30.</b> Histogramme comparaison de la conversion entre l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle	<b>43</b>
<b>Figure 31.</b> Histogramme comparaison de l'énantiosélectivité entre l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle	<b>44</b>
<b>Figure 32.</b> Effet de température sur la Conversion (C%) enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle	<b>45</b>
<b>Figure 33.</b> Effet de température sur L'énantiosélectivité enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle	<b>46</b>
<b>Figure 34.</b> Histogramme représente l'effet de recyclage sur la conversion	<b>47</b>
<b>Figure 35.</b> Histogramme représente l'effet de recyclage sur l'énantiosélectivité	<b>48</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau1.</b> Les différents types des enzymes	<b>6</b>
<b>Tableau 2.</b> Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation par adsorptions	<b>16</b>
<b>Tableau 3.</b> Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation par liaison covalente	<b>17</b>
<b>Tableau4.</b> Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation par réticulation	<b>18</b>
<b>Tableau 5.</b> Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation inclusion	<b>20</b>
<b>Tableau 6.</b> Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation micro-encapsulation	<b>21</b>
<b>Tableau7.</b> Les propriétés physico-chimiques d'acétate de vinyle	<b>29</b>
<b>Tableau8.</b> Les propriétés physico-chimiques d'acétate d'éthyle	<b>30</b>
<b>Tableau9.</b> Les propriétés physico-chimiques du 2-butanol	<b>31</b>
<b>Tableau10.</b> Les propriétés physico-chimiques des solvants	<b>31</b>
<b>Tableau 11.</b> Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (S.A.B)	<b>32</b>
<b>Tableau 12.</b> Comparaison de la conversion entre LPP et CRL	<b>37</b>
<b>Tableau 13.</b> Comparaison d'énantiosélectivité entre LPP et CRL	<b>38</b>
<b>Tableau 14.</b> Comparaison de la conversion entre les solvants utilisés en présence de la CRL immobilisée	<b>39</b>
<b>Tableau 15.</b> Comparaison de l'énantiosélectivité entre les solvants utilisés en présence de la CRL immobilisée	<b>40</b>
<b>Tableau 16.</b> Comparaison de la conversion entre la CRL libre et immobilisée	<b>41</b>
<b>Tableau 17.</b> Comparaison de la conversion entre la CRL libre et immobilisée	<b>42</b>
<b>Tableau 18.</b> Comparaison de la conversion entre l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle	<b>43</b>
<b>Tableau 19.</b> Comparaison de l'énantiosélectivité entre l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle	<b>44</b>
<b>Tableau 20.</b> Comparaison de la conversion (C%) enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle à différents température	<b>45</b>
<b>Tableau 21.</b> Comparaison d'énantiosélectivité enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle à différents température	<b>46</b>

**Tableau 22.** Comparaison de la conversion (C%) enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle à plusieurs recyclage **47**

**Tableau 23.** Comparaison de l'énantiosélectivité enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle à plusieurs recyclage **48**

## **Abréviations**

$C\%$  : Conversion

CCM : Chromatographie sur couche mince

CRL : Lipase de *Candida rugosa*

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

E : Enzyme

$E$  : Enantiosélectivité

$ee_p$  : excès énantiomérique du produit

$ee_s$  : excès énantiomérique du substrat

$\log P$  : Coefficient de partage dans le système à deux phases le n-octanol et l'eau

LPP : Lipase pancréatique de porc

P : Produit

$P_R$  et  $P_S$  : les concentrations des énantiomères produits de la réaction

$R,S$  : Enantiomères Rectus et Sinister

S : Substrat

T : Température

UV : la spectroscopie ultraviolet-visible

*Introduction*  
*générale*

# Introduction générale

---

## Introduction générale

Tous les organismes vivants, des bactéries jusqu'à l'être humaine. Dépendent pour leur existence de catalyseurs biologiques, appelés enzymes.

Après des millions d'années d'évolution, ces micromachines, composés des protéines sont capable de réaliser des taches biochimiques très précises, certaine enzymes ont été conçues par la nature pour fabriquer des composés chimiques tandis que d'autres jouent un rôle dans la décomposition ou la modification de tels composé[1].

De nos jours la demande de composés énantiomériquement purs est en forte augmentation dans l'industrie pharmaceutique, on peut réaliser la synthèse des énantiomères par plusieurs voies : chimique ou enzymatique. 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[2].

Les enzymes jouent un rôle très important dans la vie des êtres humains ; elles sont les catalyseurs de la cellule vivante, accélérant les nombreuses réactions métaboliques des matières végétales et animales et rendant aussi possible dans les industries d'alimentations, comme les industries des boissons. En raison de leur grande sélectivité et des conditions réactionnelles douces dans lesquelles elles opèrent, les enzymes sont maintenant incontournables[3].

Parmi ces enzymes, les lipases sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse d'esters glycéridiques en milieu aqueux et la synthèse d'esters en milieu non-aqueux. Elles sont de ce fait capables de catalyser un grand nombre de réactions d'intérêt industriel[4].

Cependant, l'activité et l'énantiosélectivité des lipases pour divers substrat 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[5].

# Introduction générale

---

Depuis 1965, l'immobilisation des enzymes a fait l'objet de plusieurs milliers d'articles originaux et de mises au point provenant de laboratoires du monde entier. Plusieurs manuels traitant de ce sujet sont parus ces vingt dernières années.

Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée, que ce soit par inclusion, par adsorption ou par liaison covalente, l'immobilisation des lipases vise à leur conférer une bonne stabilité, permettant une réutilisation des enzymes après une réaction et le développement de procédés en continu[4].

Au cours de ce travail nous avons étudié l'effet d'immobilisation de *Candida rugosa* sur son activité et son énantiosélectivité. Nous nous serons intéressés à l'acylation de 2-butanol par l'acétate de vinyle ou l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle, les conditions opératoires telles que les solvants, la température, et le recyclage vont être étudiés. Notre travail sera scindé en trois chapitres.

- Une mise au point bibliographique sur les enzymes, les lipases et l'immobilisation des enzymes, 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 de ce travail et leurs discussions.

## Introduction générale

---

- [1] B. V. M. Charnock, Simon J, “Les Enzymes des Protéines applications industrielles et médicales,” pp. 11–15, 2005.
- [2] H. Rouillard, *Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde* e Rouillard To cite this version : 2013.
- [3] Hussein Hamad, *Études des méthodes d’immobilisation d’enzyme (trypsine) sur un support solide pour la cartographie peptidique par microréacteur*. Montréal, 2003.
- [4] H. Ghalfi, “Les lipases immobilisées et leurs applications | Université de Liège,” 2007, [Online]. Available: <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=2125>
- [5] A. Belafriekh, F. Secundo, S. Serra, and Z. Djeghaba, “Enantioselective enzymatic resolution of racemic alcohols by lipases in green organic solvents,” *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 28, no. 3. pp. 473–478, 2017. doi: 10.1016/j.tetasy.2017.02.004.

*Etude  
bibliographique*

## 1. Généralité sur les enzymes

### 1.1. Introduction

Les enzymes sont des protéines qui agissent comme catalyseurs dans tous les organismes vivants : microorganismes, végétaux, animaux et êtres humains. Ces biocatalyseurs sont des composés qui augmentent le taux de réactions chimiques dans les systèmes biologiques[1]. De très petites quantités d'enzymes peuvent augmenter le taux de réactions jusqu'à dix millions de fois. Les enzymes fonctionnent au sein d'un ensemble restreint de conditions, comme la température et le pH (acidité), et elles peuvent faire l'objet d'une inhibition par divers moyens[2].

### 1.2. Classifications des enzymes

Les enzymes sont classées par le type de réaction qu'elles catalysent et la substance (appelée substrat) sur laquelle elles agissent. On ajoute habituellement le suffixe *ase* au nom du principal substrat sur lequel l'enzyme agit. Par exemple, la lactase agit sur le lactose, les protéases, sur les protéines et les lipases, sur les lipides. De plus, beaucoup d'enzymes utilisées de longue date portent des noms usuels comme la papaine, issue de la papaye, que l'on emploie pour attendrir la viande.

### 1.3. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique

On écrira une réaction enzymatique de la manière suivante :

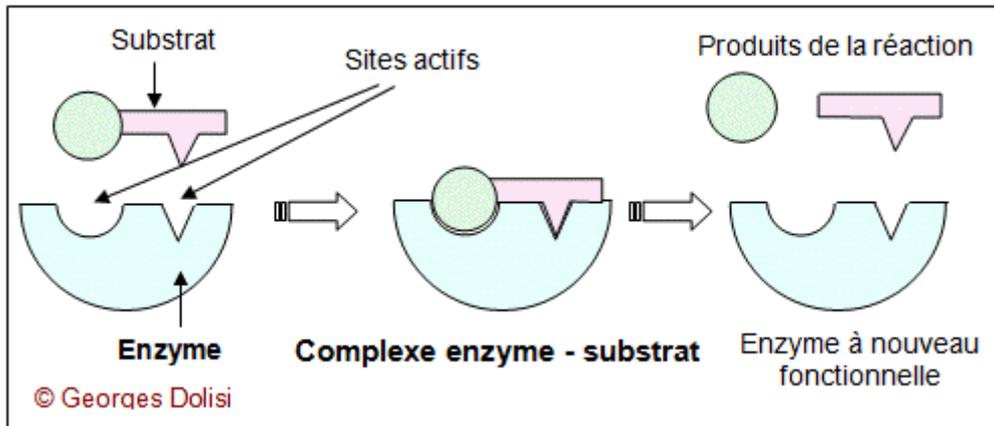


Il existe essentiellement deux grands types de réactions biochimiques :

- Les réactions de dégradation de la matière organique (catabolisme).
- Les réactions de synthèse de la matière organique (anabolisme).

**Substrat :** C'est une molécule transformée au cours d'une réaction chimique.

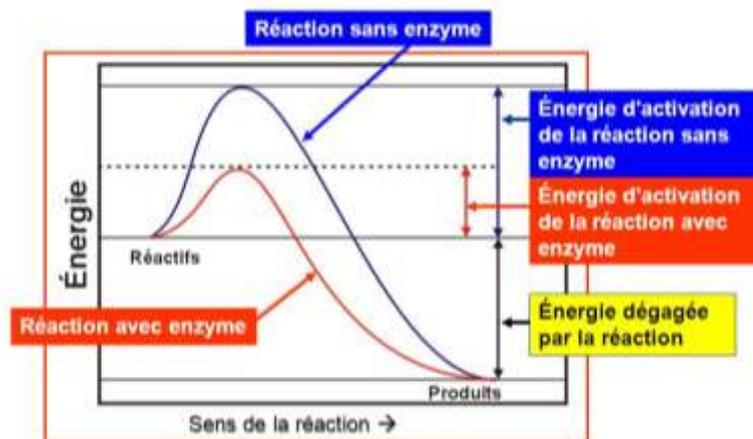
**Produit :** Dans une réaction enzymatique est la molécule résultante de la transformation d'un substrat au cours de cette réaction[3].



**Figure 1.** Représentation schématique d'une réaction enzymatique[4].

## 1.4. Propriétés des enzymes

1. Les enzymes modifient la réaction en accélérant sa vitesse.
2. L'enzyme agit à concentration très faible.
3. L'enzyme ne figure pas quantitativement parmi les produits de la réaction. Chaque molécule peut catalyser un nombre illimité de réaction.
4. L'enzyme ne modifie pas la nature de la réaction ni son équilibre ni son état thermodynamique, elle modifie la réaction en accélérant sa vitesse.
5. Les enzymes abaissent l'énergie libre d'activation du substrat.



**Figure 2.** Energie d'activation avec et sans enzyme[5].

6. Les enzymes sont des catalyseurs spécifiques, c'est-à-dire qu'en fonction de leur nature, elles n'agissent que sur des composés moléculaires bien précis.

Par exemple : les amylases n'agissent que sur les amidons, les protéases n'agissent que sur des protéines[3].

# Etude Bibliographique

**Tableau 1.** Les différents types des enzymes.

Type d'enzyme	Types de réaction catalysée
Oxydoréductases	catalysent les réactions d'oxydoréduction.
Transférases	catalysent le transfert d'un groupement fonctionnel.
Hydrolases	catalysent la coupure de liaisons avec consommation de H <sub>2</sub> O.
Lyases	catalysent la coupure de liaisons sans consommation de H <sub>2</sub> O.
Isomérasés	catalysent les réactions d'isomérisation dans une molécule.
Ligases	catalysent la formation de liaisons covalentes entre deux molécules.

## 1.5. Détermination de l'activité enzymatique

On appelle mélange réactionnel le milieu dans lequel l'enzyme est active.

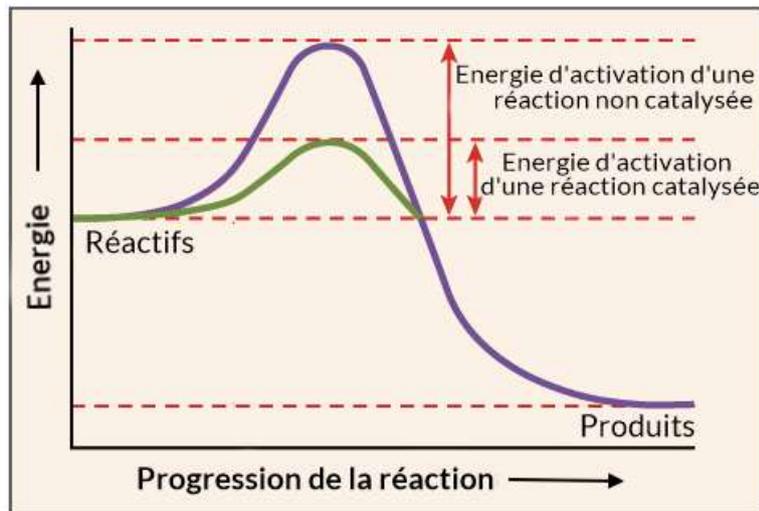
Il comprend : le substrat, les co-substrats, cofacteur et coenzyme éventuellement impliqués dans la réaction, le tampon, et bien sûr l'enzyme[3].

L'activité enzymatique se mesure :

- ✚ Soit par la vitesse de disparition d'un substrat.
- ✚ Soit par la vitesse d'apparition d'un produit.
- ✚ Soit par la vitesse d'utilisation d'un cofacteur.

## 1.6. Mécanisme d'action des enzymes

- L'énergie transmise au complexe Enzyme-substrat par la température du milieu est répartie statistiquement entre les molécules du complexe qui y sont dissoute.
- Plus la quantité d'énergie ainsi transmise est grande, plus nombreux seront les complexes Enzyme-Substrat activés ou la réaction enzymatique va se produire ;
- La vitesse de réaction va donc augmenter en fonction de l'énergie libre que le complexe peut recevoir du milieu.
- La présence de l'enzyme a pour effet de diminuer de façon très importante l'énergie d'activation d'une réaction chimique[6].



**Figure 3.** Energie libre d'activation[7].

### 1.7. La spécificité des enzymes

- Le substrat est le réactif sur lequel l'enzyme agit.
- Le substrat se lie à l'enzyme pour former le complexe enzyme-substrat et puis l'enzyme catalyse la réaction pour transformer le substrat en produit.
- Les enzymes sont des protéines et sont très spécifiques de leur substrat[8].

### 1.8. Les conditions opératoires influencent l'activité enzymatique

**La température :** la vitesse de réaction augmente avec la température, jusqu'à la température optimale. Au-delà, l'enzyme se dénature et perd son activité[9].

**Le pH** optimal de la plupart des enzymes se situe entre 6 et 8 sauf cas particuliers (ex : enzymes de l'estomac, enzymes du lysosome)[8].

**Les cofacteurs** sont des molécules non protéiques, nécessaires à l'activité enzymatique, souvent présentes dans le site actif (ex : ion fer, zinc, cuivre)[10].

## **2. Les lipases**

### **2.1. Définition**

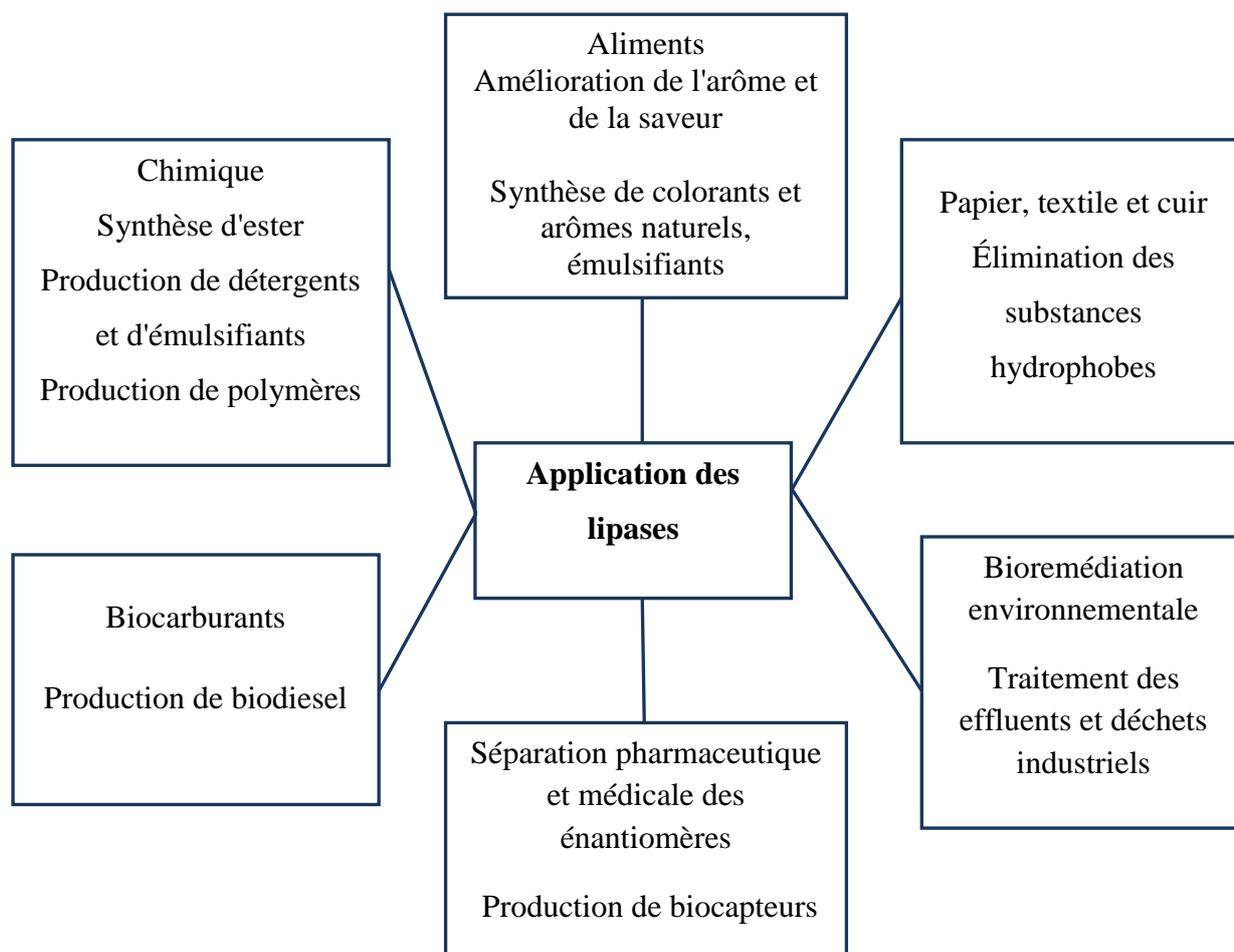
Les triacylglycérol acyl-hydrolases, ou lipases, sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du microenvironnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique[11]. En milieu solvant, elles peuvent catalyser un bon nombre de réactions allant de l'estérification à l'acidolyse ou l'alcoololyse tout en présentant une certaine énantio-, régio- et chimio-sélectivité. Les lipases forment une classe d'enzymes hétérogènes de par leur origine, qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes, ce qui augmente encore leurs potentialités. Toutes ces propriétés ont conduit au développement de nombreuses applications aussi bien au point de vue industriel, notamment dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie chimique[12].

### **2.2. Contexte et sources**

L'enzyme lipase est une enzyme naturelle présente dans l'estomac et le suc pancréatique. Sa fonction est de digérer les graisses et les lipides, aidant à maintenir le bon fonctionnement de la vésicule biliaire. La lipase est l'une de ces enzymes largement utilisées et polyvalentes. Ces enzymes sont obtenues à partir d'animaux, de plantes ainsi que de plusieurs micro-organismes et sont suffisamment stables[13].

Les lipases sont des catalyseurs très largement utilisés en synthèse organique, principalement en raison de leur stabilité et de leur activité en milieu solvant. Dans ce domaine, la plupart des lipases utilisées sont d'origine microbienne.

## 2.3. Domaines d'application des lipases



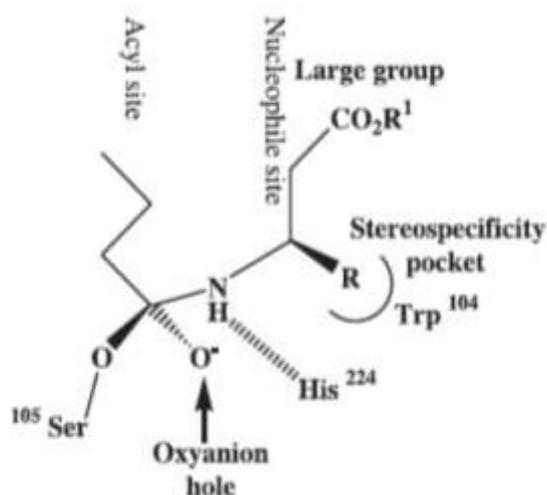
**Figure 4.** Domaines d'application des lipases.

## 3. Propriétés de sélectivité des lipases

Les dérivés de peptides provenant de l'acylation de molécules polyfonctionnelles, il est bien souvent nécessaire pour les produire que le procédé de synthèse soit énatio-sélectif, régio-sélectif ou encore chimio-sélectif.

### 3.1. Enantio-sélectivité

L'énantio-sélectivité se définit comme la spécificité d'une enzyme pour un substrat en fonction de sa stéréochimie. Des études récentes illustrent parfaitement la capacité des lipases à catalyser la N-acylation énatio-sélective de molécules aminées à centres. Ces propriétés d'énantio-sélectivité seraient dues à une conformation tridimensionnelle particulière des résidus aminés catalytiques de leur site actif[14].



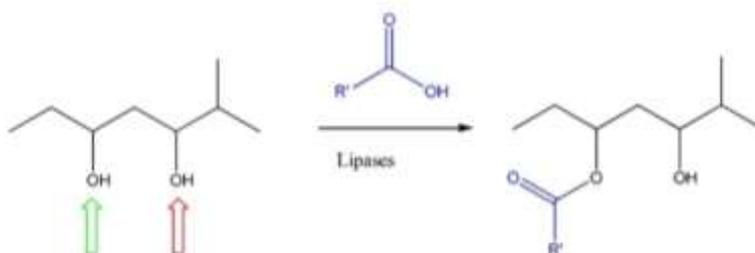
**Figure 5.** Enantio-sélectivité des lipases[15].

### 3.2. Régio-sélectivité

La régio-sélectivité qualifie la préférence d'une enzyme à interagir avec l'un des groupes fonctionnels identiques d'une molécule substrat. Les molécules de type peptides constituent souvent une problématique de régio-sélectivité enzymatique lors de leur acylation[16].

La régio-sélectivité de la lipase est la capacité de faire la distinction entre les fonctionnalités ester primaires (c'est-à-dire sn-1,3) et secondaires (sn-2) dans une molécule de triacylglycérol, ce qui est important dans la fabrication de lipides structurés. Contrairement aux méthodes d'évaluation existantes, qui utilisent des réactions d'hydrolyse, une technique alternative pour évaluer la régio-sélectivité des lipases dans les réactions de transestérification des triacylglycérols a été développée[17].

Des observations similaires ont été faites concernant l'acylation de la lysine biocatalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei* en solvant organique.



**Figure 6.** La régio-sélectivité des lipases[15].

### 3.3. Chimio-sélectivité

La chimio-sélectivité est la capacité d'une enzyme à interagir préférentiellement avec un groupe fonctionnel donné parmi des groupes fonctionnels distincts. Une étude consacrée à l'acylation enzymatique de la sérinamide, présentant une fonction amine primaire en position  $\alpha$  et une fonction hydroxyle sur la chaîne latérale, a montré la propriété de chimio-sélectivité de la lipase de *Candida rugosa* immobilisée à catalyser essentiellement la O-acylation en solvant organique. Récemment, une équipe a développé un procédé d'acylation en système sans solvant utilisant la lipase B de *Candida rugosa* et conduisant à la N-acylation chimio-sélective majoritaire de l'éthanol amine. Ces caractéristiques révèlent donc de nombreuses spécificités qui sont primordiales à étudier, particulièrement lorsque ce sont des substrats polyfonctionnels comme des peptides qui sont à acylé[18].

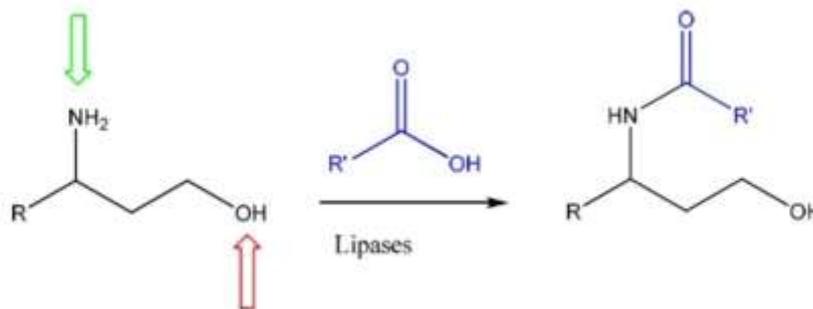


Figure 7. La chimio-sélectivité des lipases[15].

### 4. L'immobilisation des enzymes

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation de produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable[19]. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée. Du point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée, des changements dans l'activité enzymatique, le pH optimum et l'affinité pour le substrat ont été observés. Ces changements dépendent de la source de l'enzyme, du type de support et de la méthode d'immobilisation[20].

#### 4.1. Enzyme immobilisée

Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support solide.

#### 4.2. Propriétés des enzymes immobilisées

- ✚ Stabilité et résistance aux conditions du milieu (pH, T°, acidité,...).
- ✚ Activité catalytique préservée (site actif bien orienté).
- ✚ Fixation solide au support, permettant des lavages répétitifs sans perte de l'enzyme.

#### 4.3. Avantage des enzymes immobilisés

- Amélioration générale de la stabilité des enzymes.
- Durée de vie plus longue.
- Utilisation répétée de la même enzyme, dans la mesure du possible.
- Récupération d'un produit sans enzymes.
- Compensation du coût de purification (coût de purification des enzymes en solution).
- Possibilité de mettre fin à la réaction à tout moment par l'élimination de l'enzyme insoluble (enzyme immobilisé)[21].

### 4.4. Domaines d'applications des enzymes immobilisées

Grâce à leur grande spécificité d'action (bio spécificité), les enzymes immobilisées constituent un outil de fabrication et d'analyse important dans de nombreux secteurs, médical, la recherche et contrôle et de la production industrielle de métabolites[22].

#### a) Analytique

- En médecine, des papiers imprégnés de solutions enzymatiques sont utilisés dans certains tests cliniques (dosage du cholestérol, de l'acide urique, des hormones...).
- Les techniques ELISA utilisent également des enzymes fixées (liées à des anticorps eux-mêmes fixés par adsorption sur les parois de petites cuvettes en plastiques), destinées à des dosages cliniques[23].

#### b) Thérapeutique

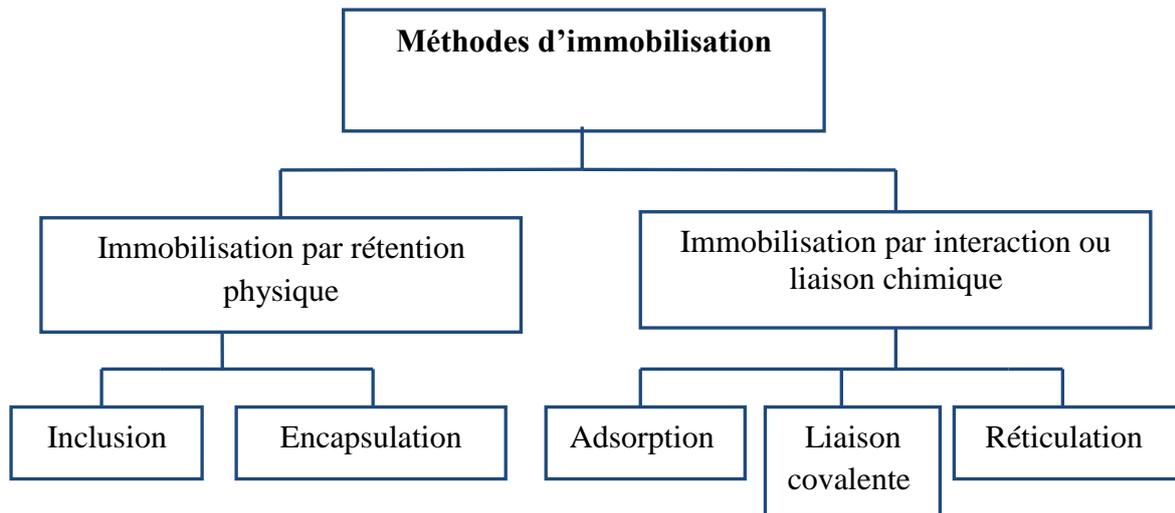
Le traitement de certains troubles pathologiques (dus à une déficience enzymatique) par l'administration d'enzymes se heurte à des difficultés: destruction par les protéases ou hydrolyse par les macrophages. Dans ce cas l'enzyme est associée à une molécule protectrice (albumine, dextrane, polyéthylène glycol), ou alors incluse dans des microcapsules[24].

#### c) Agro-alimentaire

- Amélioration des propriétés de boissons alimentaires: viscosité, clarification, digestibilité, goût, etc.
- Amélioration de la production de produits lactés[23].

## 5. Les principales méthodes d'immobilisations

Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée à l'enzyme et la capacité de la matrice ou la technique de liaison, ainsi que la stabilité mécanique et chimique de la matrice, son coût, la difficulté de l'activation du support sont aussi importants dans le développement d'un système d'enzyme immobilisée.



**Figure 8.** Les méthodes d'immobilisation.

### 5.1. Immobilisation d'enzymes par liaison chimique

Selon le mode de liaison de l'enzyme, il y a trois types de fixation :

- Fixation par adsorption
- Fixation par liaison covalente
- Fixation par réticulation.

#### 5.1.1. Par adsorption

C'est la méthode la plus simple et la plus rentable. Il s'agit de retenir l'enzyme à la surface d'un support insoluble, par interaction faible (intermédiaire ou secondaire) entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. L'interaction enzyme-support pourra impliquer l'ensemble des liaisons non covalentes ou secondaires de bas niveau énergétique tel que les liaisons de Vander Waals, les liaisons hydrogène ...)[25].

Les matières utilisées sont organiques (collagène, échangeurs d'ions: cellulose, albumine, chitine, dextrane, amidon) ou minérales (argiles, verre et silice poreux...).

### ➤ Les supports organiques

Comprennent les polysides comme l'acétate de cellulose, nitrate de cellulose, dextrane, agarose, alginate et les polymères comme le polystyrène, le polyéthylène.

### ➤ Les supports inorganiques (support minéraux)

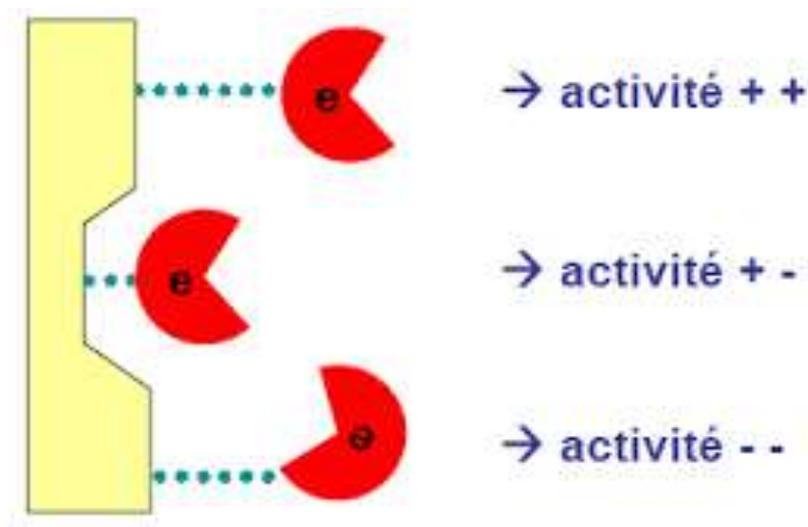
Sont généralement plus stables, résistent aux agents chimiques et aux bactéries . les matériaux actifs peuvent être des :

- Les argiles
- Verre poreux et silice poreuse

➤ **Autres supports:** le nylon, oxyde céramique, collagène et charbon actif[26].

### Les paramètres qui influencent l'adsorption

- La concentration de l'enzyme.
- Le temps de contact.
- Composition du milieu.
- La température[27].



**Figure 9.** Immobilisation d'enzyme par adsorption.

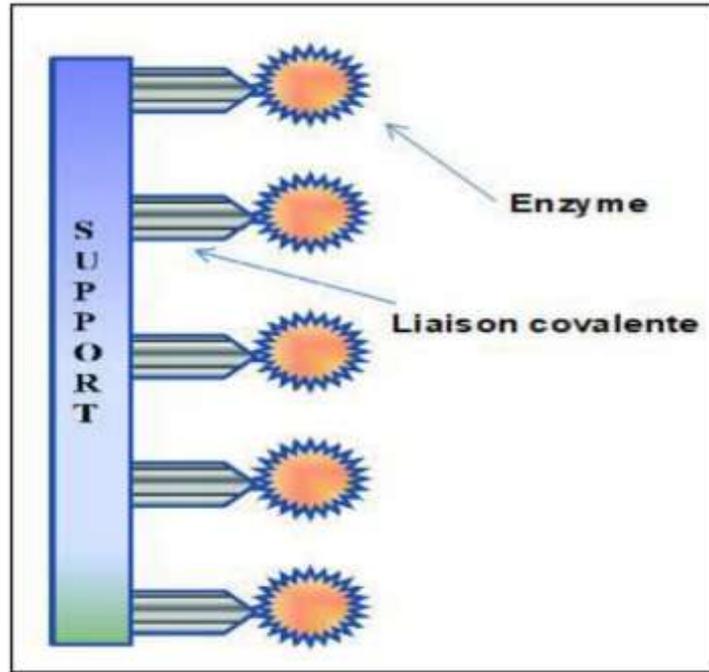
## Etude Bibliographique

**Tableau 2.** Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation par adsorptions[26].

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>• L'adsorption est facile à mettre en œuvre, il suffit de mettre en contact l'enzyme et le support.</li><li>• Possibilité de régénérer les complexes enzyme-support (si l'enzyme perd son activité en cours de son fonctionnement, il est possible de la remplacer par une préparation active).</li><li>• Fixation rapide du support et immobilisation simple et non dénaturante.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• La fragilité de la fixation (les enzymes peuvent facilement se désorber sous l'action de variation de pH, température...)</li><li>• L'orientation de l'enzyme est mauvaise accessibilité au site actif.</li></ul>

### 5.1.2. Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le souci d'obtenir des liaisons très solides entre enzymes et supports. Pour la réalisation de la liaison covalente, il faut une activation préalable soit du support soit de l'enzyme car les groupes fonctionnels de l'enzyme ne sont généralement pas suffisamment réactifs. Mais c'est surtout l'activation des supports d'adsorption qui a fait l'objet de nombreuses études car l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme est délicate et peut conduire à la dénaturation de l'enzyme. Un carbodiimide est un groupe fonctionnel de type  $N=C=N$ . En chimie organique synthétique, les composés contenant la fonctionnalité de carbodiimide sont des agents de déshydratation et sont souvent employés pour activer les acides carboxyliques vers la formation d'amide ou d'ester et ont l'avantage d'avoir une très faible toxicité pour l'enzyme[28].



**Figure 10.** Immobilisation par liaison covalente[29].

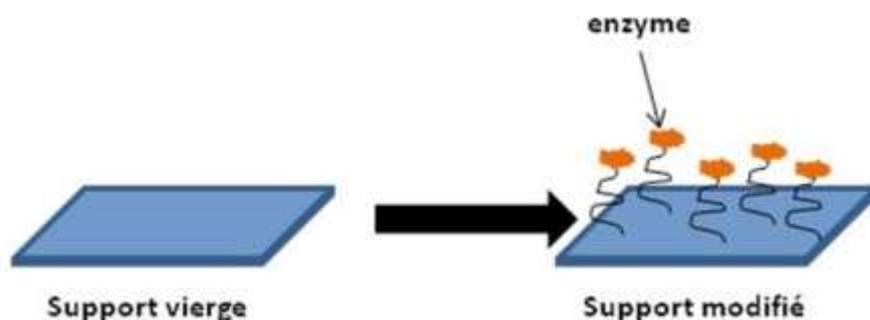
**Tableau 3.** Avantages et inconvénients de la méthodes d’immobilisation par liaison covalente[26].

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>• L’immobilisation des enzymes par des liaisons covalentes se caractérise par la solidité du lien entre la protéine et le support.</li><li>• Les quantités d’enzymes utilisées dans cette méthode d’immobilisation sont plus faibles que dans le cas de l’inclusion ou de la fixation par adsorption et les pertes par libération dans le milieu sont également minimales.</li><li>• Ce type d’immobilisation se traduit souvent par une résistance accrue aux facteurs de dénaturation,</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mise en œuvre de réactions chimiques souvent complexes.</li><li>• Longueur des expériences (étape de l’activation du support).</li><li>• Rendements de fixation inférieurs à 100%.</li><li>• Risques de modifications chimiques de l’enzyme (perte d’activité).</li><li>• Nécessite de purifier l’enzyme préalablement.</li><li>• Investissement important.</li></ul>

<p>propriété intéressante pour la mise en œuvre industrielle de réacteurs en continu.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Grande variété de support minéraux (verre, silice, céramique...) et organiques (cellulose, polymères synthétiques...).</li></ul>	
--	--

### 5.1.3. Immobilisation par réticulation

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulant qui vont permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques. Il existe deux méthodes de réticulation, soit les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant de façon directe, soit en plus de l'agent réticulant une protéine inerte peut être utilisée afin de faciliter ou améliorer la réticulation, on parle alors de co-réticulation. Les enzymes, après avoir été adsorbées sur un support, sont mises en contact avec un agent réticulant afin de donner un réseau enzymatique tridimensionnel et qui contrairement à l'enzyme seule est insoluble[30].



**Figure 11.** Immobilisation par réticulation.

## Etude Bibliographique

**Tableau 4.** Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation par réticulation[21].

avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>• Stabilité accrue à cause de la liaison covalente.</li><li>• Grand choix de méthodes différentes.</li><li>• Grande variété de support minéraux (verre, silice, céramique...) et organiques (cellulose, polymère synthétiques...).</li><li>• Possibilité d'effectuer l'immobilisation en présence de substrat pour éviter l'inactivation (protection du site actif).</li><li>• Solidité de la liaison enzyme-substrat.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mise en œuvre de réactions chimiques souvent complexes.</li><li>• Longueur des expériences (étape de l'activation du support).</li><li>• Risques de modifications chimiques de l'enzyme (perte d'activité).</li><li>• Nécessité de purifier l'enzyme préalablement.</li><li>• Immobilisation plus complexe à réaliser (choix des groupements à activer...).</li><li>• Les quantités d'enzymes immobilisées sont inférieures par rapport aux deux précédentes méthodes. Rendements de fixation inférieurs à 100%.</li></ul>

### 5.2. Immobilisation d'enzymes par rétention physique

#### 5.2.1. Immobilisation par inclusion

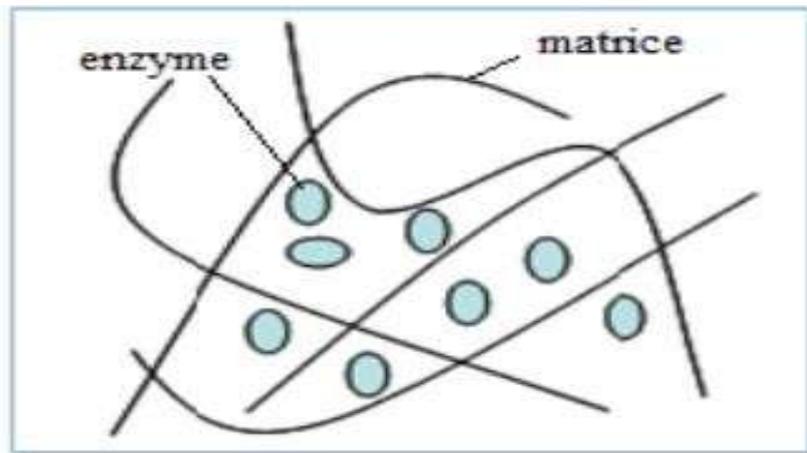
L'enzyme est incorporée dans un gel insoluble qui peut être constitué d'une matrice organique (polymère) ou inorganique. L'enzyme est solubilisée et dispersée dans une solution d'un monomère qui est ensuite polymérisé en présence d'un agent de réticulation et d'un colloïde protecteur : albumine, agarose, dextrane. Ensuite, ce gel peut former des billes ou des fibres. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme grâce à une porosité du gel suffisante[21].

Les matières les plus utilisées comme matrice dans la méthode d'inclusion sont les gels de polyacrylamide, d'alginate, d'amidon et les fibres de polyacétate de cellulose.

Le choix du type de polymères va être dépend de :

## Etude Bibliographique

- propriétés mécaniques du gel : compression, forces de cisaillement.
- propriétés chimiques : toxicité, condition de stabilité en fonction de pH.
- propriétés physiques : perméabilité du gel.



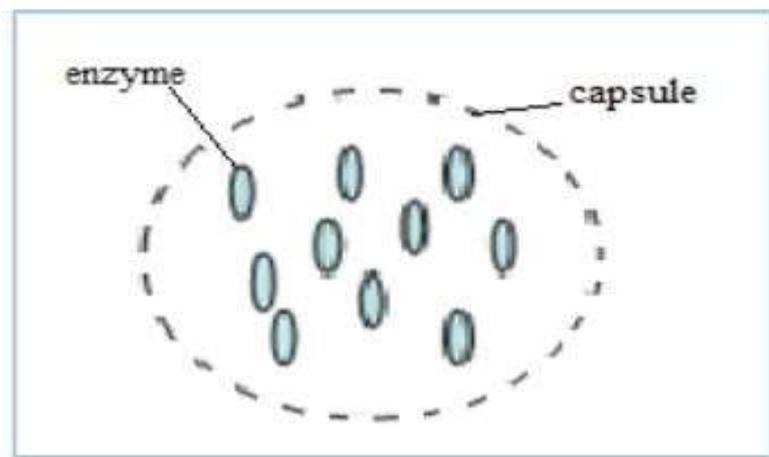
**Figure 12.** Immobilisation par inclusion[31].

**Tableau 5.** Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation par inclusion[31].

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pas de changement des propriétés intrinsèques des enzymes.</li><li>• Elle permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de l'enzyme.</li><li>• N'implique aucune modification chimique.</li><li>• Ne nécessite qu'un minimum d'enzymes.</li><li>• Les matrices soient disponibles sous différentes formes (gel, fibre,...).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Difficulté de mettre en œuvre,</li><li>• Fuite d'enzymes à travers la matrice au cours de l'utilisation.</li><li>• Seuls des substrats et produits de faible poids moléculaire peuvent être utilisés.</li><li>• Les groupements actifs de l'enzyme peuvent réagir avec la matrice et donc entraîner une diminution de l'activité catalytique de celle-ci.</li></ul>

### 5.2.2. Micro-encapsulation

C'est une méthode qui consiste à inclure l'enzyme dans des microcapsules délimitées par une membrane semi perméable dont les pores sont suffisamment larges pour permettre le passage des molécules du substrat ou des produits de la réaction. Les micro-capsules emprisonnant l'enzyme sont recueillies par centrifugation. Leur diamètre peut varier de quelques microns à une centaine de microns[32].



**Figure 13.** Immobilisation par micro-encapsulation[26].

**Tableau 6.** Avantages et inconvénients de la méthode d'immobilisation par micro-encapsulation[21].

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• De grandes quantités d'enzymes peuvent être immobilisées.</li><li>• Faible fuite d'enzymes.</li><li>• Une applicabilité très large (enzymes et autres molécules).</li><li>• Possède des surfaces extrêmement importantes, ce qui leur permet d'avoir une efficacité catalytique plus élevée.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Limitation de la diffusion à travers la paroi de la capsule.</li><li>• Limitation de la taille des pores seules les petites molécules de substrat/produit sont Capables de traverser la membrane.</li></ul>

### 6. La transestérification

En chimie organique, la transestérification est le processus d'échange du groupe organique R'' d'un ester par le groupe organique R' d'un alcool. Ces réactions sont souvent catalysées par l'ajout d'un catalyseur acide ou basique. La réaction peut également être accomplie à l'aide d'autres enzymes, en particulier des lipases. Dans le mécanisme de transestérification, le carbone carbonyle de l'ester de départ réagit pour donner un intermédiaire tétraédrique, qui soit revient au matériau de départ, soit passe au produit transestérifié (RCOOR2). Les différentes espèces existent en équilibre et la distribution du produit dépend des énergies relatives du réactif et du produit[33].



**Figure 14.** Transestérification catalysée par une lipase.

### Bibliographie

- [1] “Utilisation des enzymes dans la transformation des aliments - Canada,” 2014.
- [2] *Les enzymes en industrie* \_ 978-613-9-52389-4 \_ 9786139523894 \_ 6139523893. 2019. doi: 9786139523894.
- [3] “Chapitre 1 : Généralités sur les enzymes 1 . Les enzymes sont des protéines,” no. Figure 1, pp. 1–16.
- [4] I. Les and I. Double, “Chapitre 2 : Rôle des enzymes dans l’apport du glucose sanguin.,” *Termin. S Spécialité*, pp. 2–4.
- [5] E.FERAGA, *MTABOLISME DES PORPHYRINES SYNTHÈSE DES PORPHYRINES CATABOLISME DES*, U. Européenne. 2009.
- [6] E.FERAGA, “biochimie1an-structure\_enzymes2019feraga.pdf,” in *Structure des enzymes et mécanisme d’action*, p. 4.
- [7] “Révision sur les enzymes (leçon) | Khan Academy.” pp. 30–33. [Online]. Available: <https://fr.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-energy-and-transport/hs-enzymes/a/hs-enzymes-review>
- [8] A.BENSLAMA, “Réactions De Synthèse (Consomme De L’Énergie Ex La Synthèse D’Une Protéine),” p. 18, 2014.
- [9] “Facteurs qui influencent l’activité enzymatique — Biochem,” *Page créée pour Maricela Hlibocianu et modifiée par Melanie Bluteau en novembre 2021*.
- [10] “Cours ifsi - Biologie fondamentale - les tissus.” <https://www.infirmiers.com/etudiants-en-ifsu/cours/cours-ifsu-biologie-fondamentale-les-tissus.html>
- [11] R. Algérienne, D. Et, A. L. A. Faculte, and D. E. S. Sciences, “Utilisation des lipases dans l’industrie alimentaire”.
- [12] P. Fickers, J. Destain, and P. Thonart, “Les lipases sont des hydrolases atypiques: Principales caractéristiques et applications,” *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, vol. 12, no. 2. pp. 1805–1808, 2008.
- [13] P. Lévy, “Amylases et lipases,” *Hepato-Gastro*, vol. 20, no. 8, pp. 650–655, 2013, doi: 10.1684/hpg.2013.0918.
- [14] E. Husson, “Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique To cite this version : HAL Id : tel-01753057 soutenance et mis à disposition de l’ensemble de la Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr,” 2018.
- [15] M. Bianco, “Acylation enzymatique de lysine par la lipase B de candida antarctica en solvant CO2 supercritique et en réacteur à lit fixe : essais préliminaires To cite this version : HAL Id : hal-01931968 soutenance et mis à disposition de l’ensemble de la Contact ,” 2018.
- [16] F. Ferrari, “Étude de la sélectivité d’acylation enzymatique de peptides : prédiction de la sélectivité de la lipase B de Candida antarctica par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases,” 2017, [Online]. Available: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01614465>
- [17] I. C. Chandler, “Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions,” *JAACS, Journal of the American Oil Chemists’ Society*, vol. 78, no. 7. pp. 737–742, 2001. doi: 10.1007/s11746-001-0335-7.
- [18] P. Notion, “Chapitre : 1 Synthèse stéréo sélective Chapitre : 1 Synthèse stéréo sélective,” pp. 1–14.
- [19] S. BOUCHAGARA, “Immobilisation de la lipase de Candida rugosa sur la résine Amberjet 4200Cl Optimisation de l’énantioselectivité par la méthode des surfaces de réponse,” pp. 23–45, 2010.
- [20] HELLAL DJAMILA, “Optimisation de la réactivité dans la réaction d’estérification enzymatique du D-glucose,” 2011.

## Etude Bibliographique

---

- [21] M. Appliqu, “Enzymologie Appliquée,” *Développement d’un microréacteur à base d’enzyme microencapsulée en vue d’un couplage en ligne à un système d’électrophorèse capillaire*, no. Chapitre 4, p. 12, 2020.
- [22] Dr Boudoukha, *Domaines d’application des enzymes*. 2014.
- [23] AKZIZ Hakim, “Immobilisation d enzyme dans une matrice de silice - PDF Free Download.” p. 23, 2017.
- [24] Y. Bouatrous, “biochimie,” *génie Biochim. Valoris. des biomolécules*, p. 12.
- [25] M.-B. Secundo, F, (PDF) *Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition \_ Emil Dumitriu - Academia*. 2008.
- [26] A.BENSLAMA, *Génie enzymatique*. 2016.
- [27] B. Boualla ,Nabila Ahmed, “Étude expérimentale sur l ’ élimination des nitrates par adsorption sur des argiles activées et non activées de la sebka d ’ Oran Résumé,” *Afrique Sci.*, vol. 07, no. 2, pp. 56–73, 2011, [Online]. Available: <http://www.afriquescience.info>
- [28] Georgiana Gusetu, *Développement d’un microréacteur à base d’enzyme microencapsulée en vue d’un couplage en ligne à un système d’électrophorèse capillaire*. 2010.
- [29] H. KHADIR, “Enzymes immobilisées,” *Enzymol. Appliquée*, p. 11, 2017.
- [30] H. KHADIR, (PDF) *UNIVERSITE « Ammar Telidji » Laghouat \_ Habib Khadir - Academia*. 2017.
- [31] F. S. N. V Universit and C. Iv, “Enzymologie Appliquée Chapitre IV : Enzymes immobilisées,” pp. 1–13, 2022.
- [32] K. Gendron, *Immobilisation d’enzymes par microcapsules polymérisées pour le développement de biocapteurs*, vol. 59. 2017.
- [33] “Production De Biodiesel À Partir D ’ Une Huile Modèle De Microalgues Par Voie De Catalyse,” p. 24, 2014.

*Matériels  
et méthodes*

## 1. Matériels

### 1.1. 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 variable.



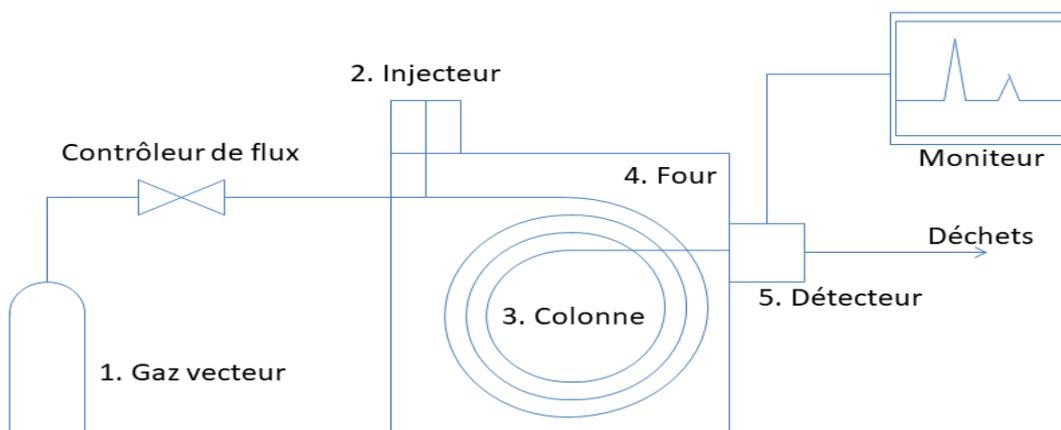
**Figure 15.** Agitateur magnétique.

### 1.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique analytique permettant de séparer les constituants présents dans un mélange afin de les identifier et les quantifier.

Elle s'applique essentiellement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage (substances volatiles). Après avoir été préparé, l'échantillon est d'abord vaporisé à l'entrée d'une colonne (compartiment visible à droite sur la photo), qui contient une substance active solide ou liquide appelée phase fixe *ou* stationnaire, puis il est transporté à travers la colonne à l'aide d'un gaz vecteur.

Les différents constituants de l'échantillon vont alors se séparer et sortir de la colonne les uns après les autres selon leur affinité avec la phase stationnaire et le gaz vecteur.



**Figure 16.** Principe de fonctionnement d'une CPG.

L'appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG) utilisé dans notre travail



**Figure 17.** CPG utilisée, GC-17 SHIMADZU.

### 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

## Matériels et Méthodes

---

- 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 : 5,01 min , (*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.

### 1.3. Chromatographie sur couche mince

Cette technique permet de séparer les espèces chimiques présentes dans un mélange homogène, donc de contrôler la pureté d'un échantillon. Elle permet également d'identifier les espèces chimiques présentes dans l'échantillon. Les échantillons à tester, ainsi que les échantillons témoins, sont disposés sur une plaque de chromatographie (phase fixe) plongée dans un éluant (phase mobile).

- 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 stationnaire.

### Protocole de la CCM

1. Introduire l'éluant jusqu'à une hauteur d'environ 0,5 cm dans la cuve à chromatographie, puis la fermer. Les vapeurs d'éluant vont alors saturer la cuve.

2. Préparation de la plaque :

- a. à environ 1 cm du bas de la plaque, tracer délicatement une ligne au crayon à papier ;
- b. indiquer sur cette ligne les positions des dépôts que vous allez effectuer ;
- c. effectuer les dépôts souhaités à l'aide de capillaires :
  - plonger une extrémité du capillaire dans la solution : quelques millimètres de solution entrent dans le capillaire.
  - sur la position choisie, poser verticalement, très peu de temps mais plusieurs fois, l'extrémité du capillaire (l'objectif est d'avoir un dépôt très concentré et peu étalé).

## Matériels et Méthodes

3. Placer verticalement la plaque dans la cuve, et la refermer rapidement. Au départ, l'éluant ne doit pas toucher les dépôts.
4. Sans Bouger La Cuve, attendre que l'éluant soit arrivé à environ 1 cm du bord supérieur.
5. Retirer la plaque et tracer rapidement au crayon à papier un trait indiquant la hauteur atteinte par l'éluant.

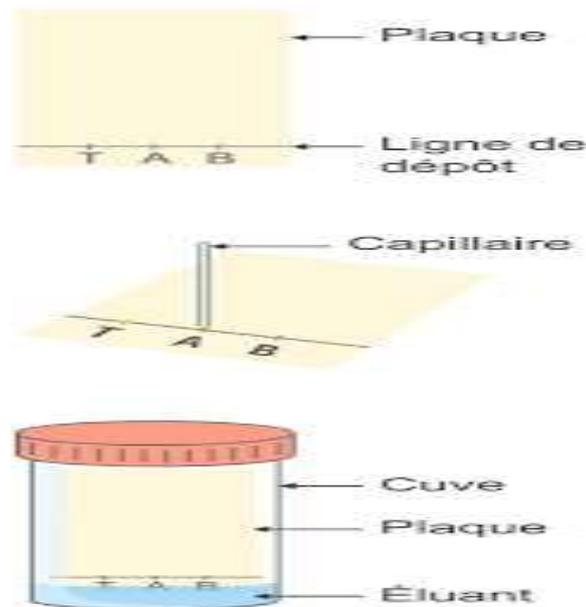


Figure 18. Montage de la CCM.

## 2. Enzymes et réactifs

### 2.1. Lipases

#### 2.1.1. CRL

La lipase de *Candida rugosa* a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir d'une poudre brute. CRL hydrolyse les triacylglycérols sans spécificité de longueur de chaîne. Une activité spécifique d'environ 800 U/mg a été mesurée avec la tri-oléine ou la tributyrine comme substrat à 37°C et pH 8. La CRL est une vraie lipase. Cette enzyme présente le phénomène d'activation inter faciale lorsque la tripropionine a été utilisée comme substrat. Contrairement à de nombreuses lipases, le CRL est capable d'hydrolyser son substrat en présence de détergents naturels. Synthétique les détergents agissent comme de puissants inhibiteurs de l'activité des CRL.

## Matériels et Méthodes

### 2.1.2. LPP

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-acylglycérols. Chez de nombreux êtres vivants, cette réaction est capitale de par son rôle physiologique majeur dans le métabolisme des graisses et des lipides.

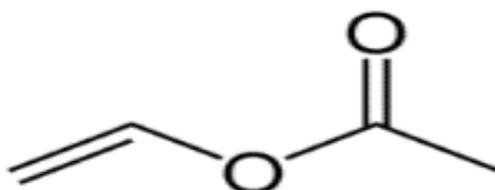
La lipase pancréatique est la principale enzyme responsable de la digestion des lipides dans le système digestif. L'hydrolyse des triglycérides est essentielle pour l'absorption de lipides par les entérocytes.

Lipase pancréatique porcine se présente sous deux formes: A et B. La lipase A est active en milieu plus acide que la lipase, mais à part cette différence, les deux enzymes sont pratiquement identiques. 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 B. 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 alcalin.

### 2.2. Esters

#### 2.2.1. 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 19.** Structure de l'acétate de vinyle.

**Tableau 7.** Les Propriétés physico-chimiques d'acétate de vinyle.

La formule brute	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$
Etat physique	Liquide
Masse molaire	86,09 g/mol
Point de fusion	-93 °C
Point d'ébullition	72 °C
Masse volumique	$0.9 \text{ g.cm}^{-3}$
Solubilité	Dans l'eau à 20 °C: 25g/l

## Matériels et Méthodes

### 2.2.2. Acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle, aussi appelé éthanoate d'éthyle, est un liquide organique, à l'odeur caractéristique fruitée. C'est un ester utilisé principalement comme solvant. On le trouve, à l'état naturel, en faibles quantités dans le rhum et dans les raisins endommagés par la grêle

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.

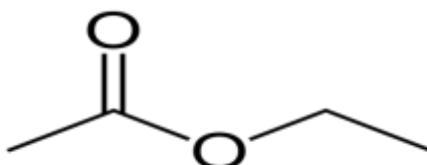


Figure 20. Structure de l'acétate d'éthyle.

Tableau 8. Les propriétés physico-chimiques d'acétate d'éthyle.

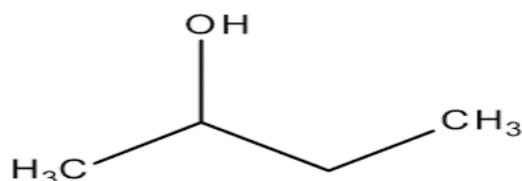
La formule brute	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Etat physique	Liquide
Masse molaire	88,10 g/mol
Point de fusion	-83.6 °C
Point d'ébullition	77.1 °C
Masse volumique	0.9245 g.cm <sup>-3</sup>
Solubilité	Dans l'eau à 20 °C: 81g/l

## 2.3. Alcools

### 2.3.1. 2-butanol

Le 2-butanol 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*)- 2-butanol et (*S*)- 2-butanol. Le 2-butanol est utilisé comme solvant, est synthétisé dans l'industrie par oxydation de la double liaison du but-2-ène.

## Matériels et Méthodes



**Figure 21.** Structure chimique de 2-butanol.

**Tableau 9.** Les Propriété physico-chimiques du 2-butanol.

La formule brute	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Etat physique	Liquide
Masse molaire	88,10 g/mol
Point de fusion	-83.6 °C
Point d'ébullition	77.1 °C
Masse volumique	0.9245 g.cm <sup>-3</sup>
Solubilité	Dans l'eau à 20 °C: 81g/l

### 2.4. Solvant

**Tableau 10.** Les Propriétés physico-chimiques des solvants.

Solvant	Formule	Masse molaire	T° fusion	T° ébullition	Masse Volumique
Hexane	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86.1754 g/mol	-95.3°C	68.73°C	0.6594g/cm <sup>3</sup>
Toluène	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92.1384 g/mol	-95.0°C	110.58°C	0.867g/cm <sup>3</sup>
Ether diéthylique	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74.1216 g/mol	-116 °C	35°C	0.714g/cm <sup>3</sup>
Dichloro-méthanes	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84.9330 g/mol	-95.1°C	40°C	1.4892g/cm <sup>3</sup>

## Matériels et Méthodes

### 3. Méthodes

#### 3.1. Préparation d'enzyme immobilisée

##### 3.1.1. Dosage de protéine par la méthode de Bradford

Dans la méthode de Bradford, le bleu de Coomassie (G250) forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorbance à 595 nm.

##### 3.1.2. 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
- H<sub>2</sub>O distillée q.s.p.....1000ml

##### 3.1.3. Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage indiquée dans le tableau, a été réalisée à partir d'une solution mère contenant 0.1 mg/ml de sérum albumine bovine (SBA) (Tableau 11).

**Tableau 11.** 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

##### 3.1.4. Détermination de la concentration en protéines

Dans un tube, on ajoute 4ml de réactif de Bradford à 100µl de la solution enzymatique, 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 effectue ce qui suit :

## Matériels et Méthodes

---

- On trace la courbe d'étalonnage absorbances en fonction de la quantité de SAB en  $\mu\text{g}$ .
- 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 ( $\mu\text{g}$ ).

### 3.1.5. Calcul le 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.

### 3.1.6. Immobilisation de la lipase *Candida rugosa* sur Célite

On dissout 0.5g de lipase dans 4 ml de solution tampon phosphate 0,2M (pH 7) pendant 30 min, on ajoute 1g de support, puis on rajoute 15 ml de l'acétone froid goutte à goutte.

Le mélange est agité (700 rpm) à la température de 20°C pendant 90 min. La lipase immobilisée est collectée par filtration sous vide et lavée avec 20ml de solution tampon phosphate.

Le produit extrait, est séché sous vide dans un dessiccateur, en présence de silica gel, jusqu'à stabilisation de sa masse.

Et nous avons obtenu un rendement de 67% d'immobilisation.

## 3.2. Protocole des réactions réalisées

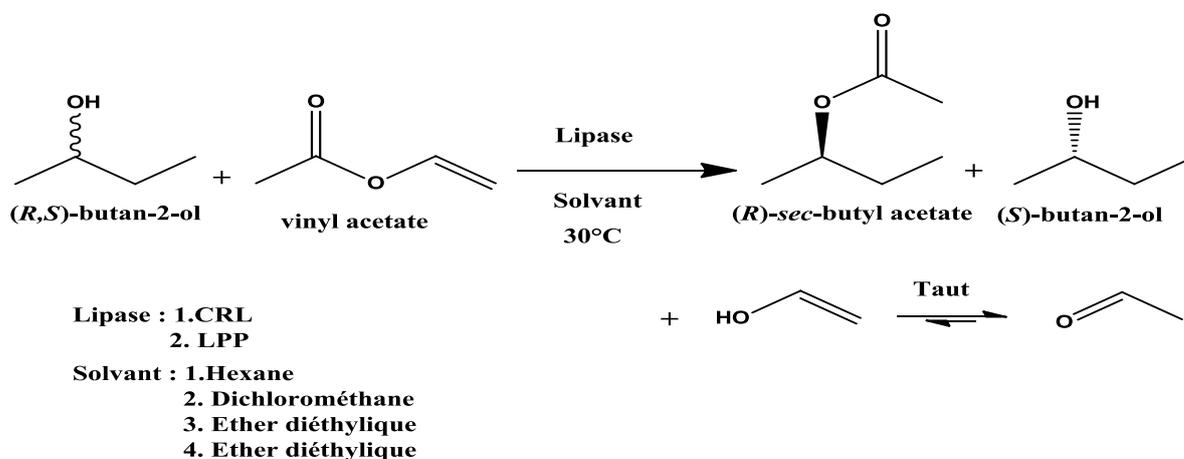
### 3.2.1. Réaction sous agitation magnétique

Dans un tube hermétiquement fermé, 10 Mm d'alcool secondaire racémique (2-butanol) et 10mM 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

## Matériels et Méthodes

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 22.** Effet de solvant sur la transestérification enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle.



**Figure 23.** Réaction réalisée sous agitation magnétique.

### 3.3. Recyclage

- On fait le même processus en utilisant la CRL immobilisé filtré de la première réaction à température de 45°C.
- Nous répétons le protocole 3 fois pour le recyclage.

*Résultats  
et discussion*

## 1. Introduction

La nature des milieux organiques non seulement influe sur l'activité de l'enzyme, mais aussi l'énantiosélectivité, et cela a été vérifié par des travaux de plusieurs groupes[1].  $LogP$  (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[2].

Notre travail a pour objectif l'étude de l'effet d'immobilisation des enzymes et l'effet du solvant sur l'activité de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) ou lipase pancréatique de porc (LPP) dans la résolution d'un alcool secondaire (*R,S*)-2-butanol racémique, avec l'acétate de vinyle ou l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle. 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.

## 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  $LogP$  ont été sollicités dans l'acylation d'alcool par la CRL et LPP à 45°.

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. Méthode de Calcul de conversion et l'énantiosélectivité

L'énantiosélectivité est généralement caractérisée au moyen de l'excès énantiomérique du substrat, noté ( $ee_s$ ) (équation 1) ou du produit ( $ee_p$ ) (équation 2). La variation des paramètres ( $ee_s$ ) et ( $ee_p$ ) est fonction du taux de conversion (équation 3).

$$\% ee_s = \frac{R - S}{R + S} \cdot 100 \text{----- (1)} \quad \% ee_p = \frac{P_R - P_S}{P_R + P_S} \cdot 100 \text{----- (2)}$$

$$\% C = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \cdot 100 \text{----- (3)}$$

$R$  et  $S$  représentent les concentrations des énantiomères substrats,  $P_R$  et  $P_S$  les concentrations des énantiomères produits de la réaction.

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

$$E = \frac{\text{Ln} \left[ 1 - C (1 + ee_p) \right]}{\text{Ln} \left[ 1 - C (1 - ee_p) \right]} \text{----- (4)} \quad \text{ou } E = \frac{\text{Ln} \left[ (1 - C)(1 - ee_s) \right]}{\text{Ln} \left[ (1 - C)(1 + ee_s) \right]} \text{----- (5)}$$

#### 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 CRL libre ou LPP et ensuite CRL immobilisée 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' $ee_s$  et  $ee_p$  (excès énantiomérique du substrat et du produit), la conversion ( $C\%$ ) et  $E$  (facteur d'énantioselectivité) en utilisant les équations précédentes 1, 2, 3, 4 ou 5 respectivement.

On fait une comparaison de l'activité et de la sélectivité des deux lipases étudiées CRL et LPP.

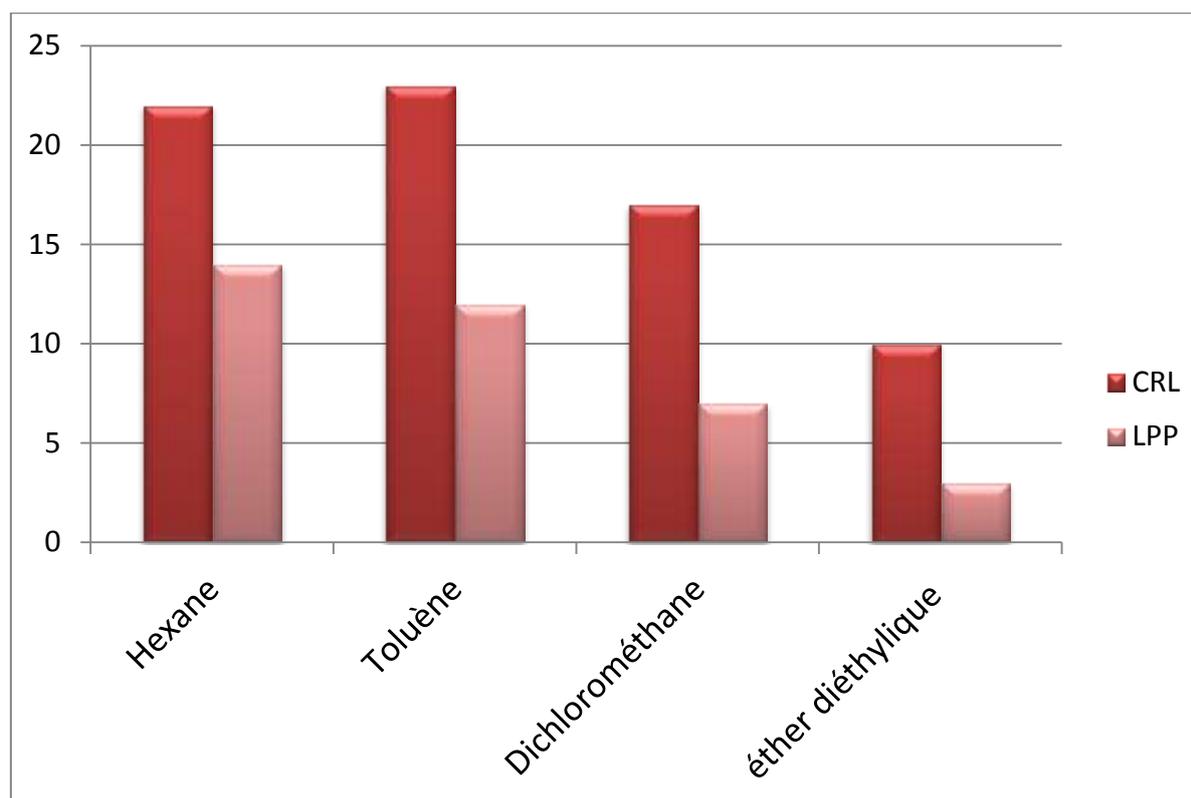
## Résultats et discussion

### a. 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 suivant.

**Tableau 12.** Comparaison de la conversion entre LPP et CRL.

Solvant	Log <i>P</i>	Conversion (C%)	
		CRL	LPP
Hexane	3.50	22	14
Toluène	2.73	23	12
Dichlorométhane	1.25	17	7
Ether di-éthylique	0.89	10	3



**Figure 24.** Histogramme de comparaison de la conversion entre les lipases LPP et CRL.

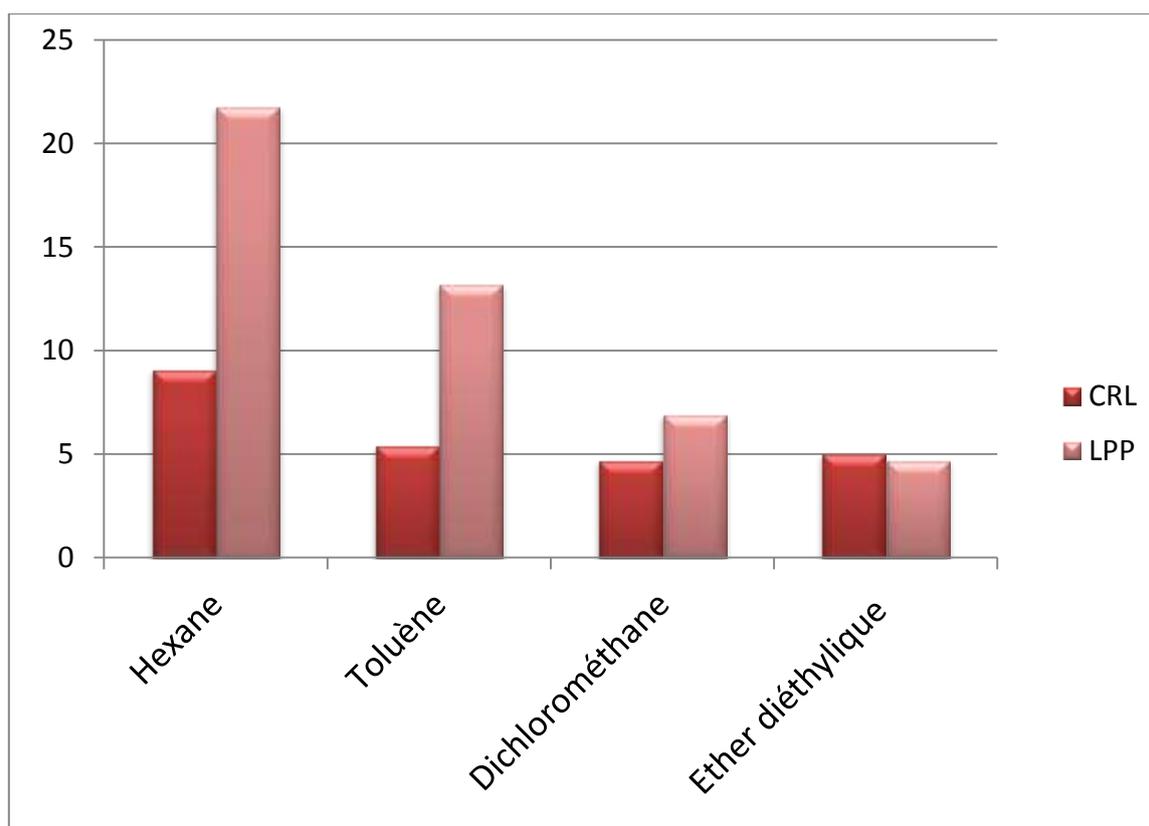
Les résultats montrent un avantage d'activité en termes de conversion dans le cas de CRL vis-à-vis le 2-butanol par rapport à la lipase pancréatique de porc LPP. D'autre part, le Toluène semble le meilleur milieu réactionnel pour les deux lipases.

### b. Comparaison de l'énantiosélectivité

L'analyse chromatographique permet d'identifier le facteur d'énantiosélectivité qui est l'élément le plus important pour l'étude des molécules bioactives. Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant.

**Tableau 13.** Comparaison d'énantiosélectivité entre LPP et CRL.

Solvant	Log <i>P</i>	Énantiosélectivité(E)	
		CRL	LPP
Hexane	3.50	9.1	21.8
Toluène	2.73	5.4	13.2
Dichlorométhane	1.25	4.7	6.9
Ether di-éthylique	0.89	5.0	4.7



**Figure 25.** Histogramme comparaison d'énantiosélectivité entre LPP et CRL.

## Résultats et discussion

Les résultats montrent que l'énantiosélectivité dans le cas de la lipase pancréatique LPP est meilleure que dans le cas de CRL, et cela pour tous les solvants étudiés et l'hexane nous donne la meilleure énantiosélectivité pour les deux lipases.

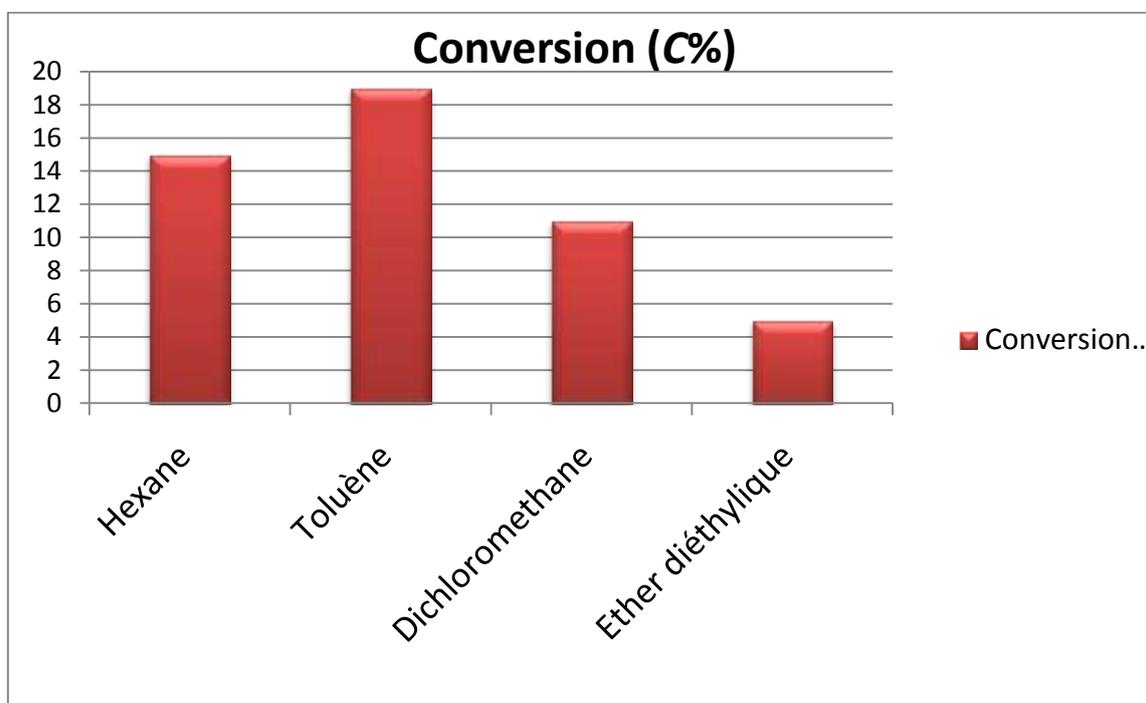
### 5. La Transestérification par CRL immobilisée

#### 5.1. Effet de solvant sur l'activité et la sélectivité d'enzyme

##### a. Comparaison de conversion

**Tableau 14.** Comparaison de la conversion entre les solvants utilisés en présence de la CRL immobilisée.

Solvant	LogP	Conversion (C° %)
Hexane	3.50	15
Toluène	2.73	19
Dichlorométhane	1.25	11
Ether di-éthylique	0.89	5



**Figure 26.** Histogramme comparaison de la conversion entre les solvants utilisés avec la CRL immobilisée.

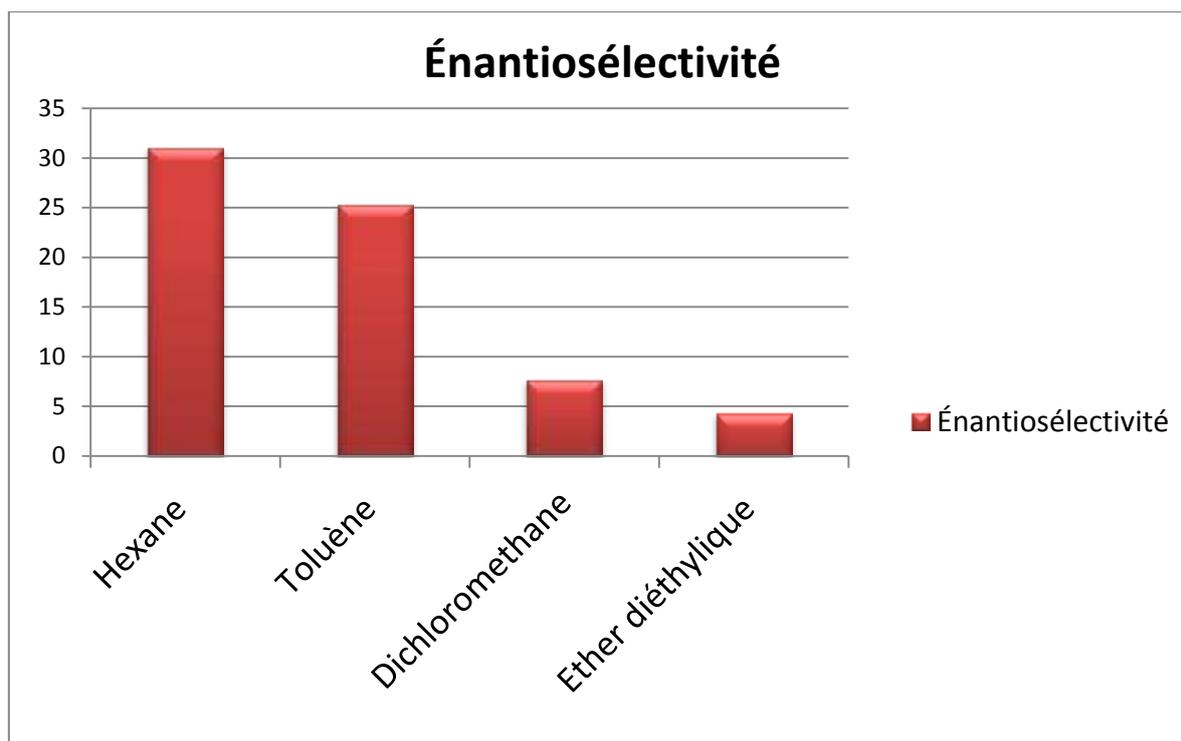
## Résultats et discussion

Les résultats montrent un avantage d'activité en termes de la conversion avec le toluène vis-à-vis le 2-butanol par rapport à les autres solvants en présence de la CRL immobilisée.

### b. Comparaison de l'énantiosélectivité

**Tableau 15.** Comparaison de l'énantiosélectivité entre les solvants utilisés en présence de la CRL immobilisée.

Solvant	LogP	Énantiosélectivité
Hexane	3.50	31.1
Toluène	2.73	25.3
Dichlorométhane	1.25	7.7
Ether di-éthylique	0.89	4.3



**Figure 27.** Histogramme comparaison d'énantiosélectivité entre les solvants utilisés avec la CRL immobilisée.

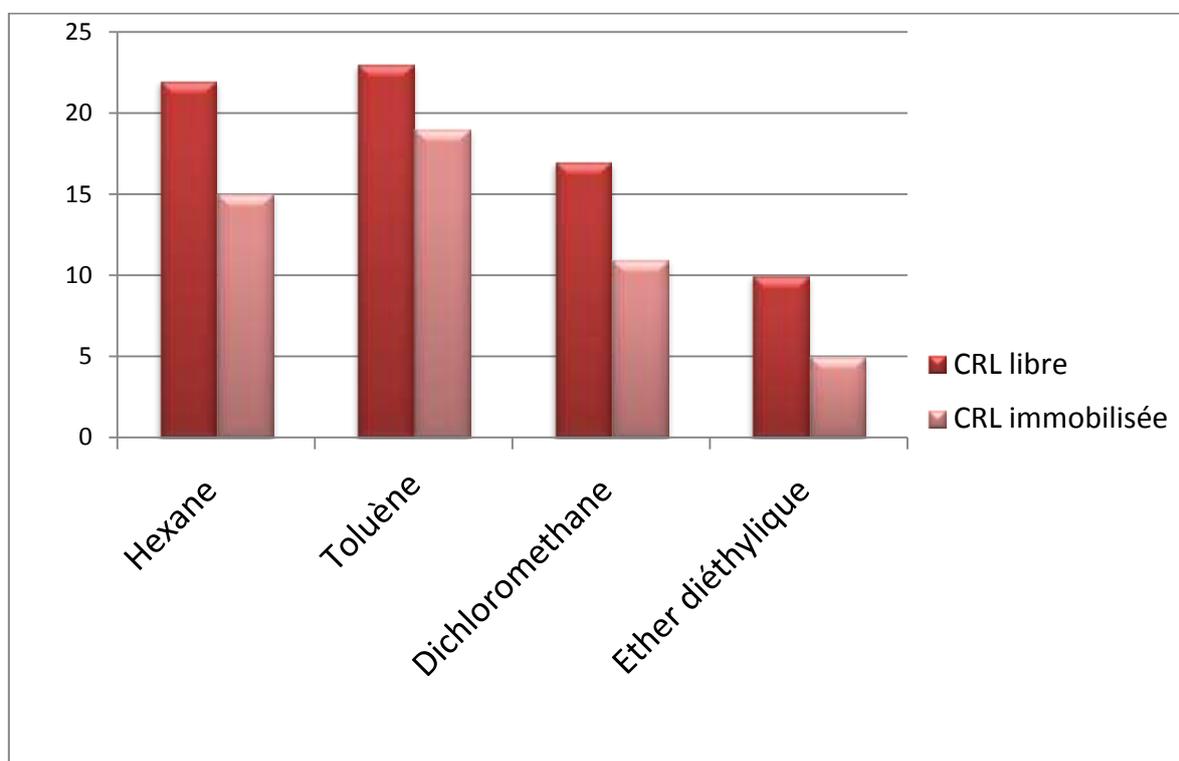
Les résultats montrent que l'hexane nous donne la meilleure énantiosélectivité pour la CRL immobilisée.

### 5.2. Comparaison de l'activité et de la sélectivité des deux lipases étudiées CRL libre et immobilisée.

#### a. Comparaison de conversion

**Tableau 16.** Comparaison de la conversion entre la CRL libre et immobilisée.

Solvant	Log <i>P</i>	Conversion (C %)	
		CRL immobilisée	CRL libre
Hexane	3.50	15	22
Toluène	2.73	19	23
Dichlorométhane	1.25	11	17
Ether di-éthylique	0.89	5	10



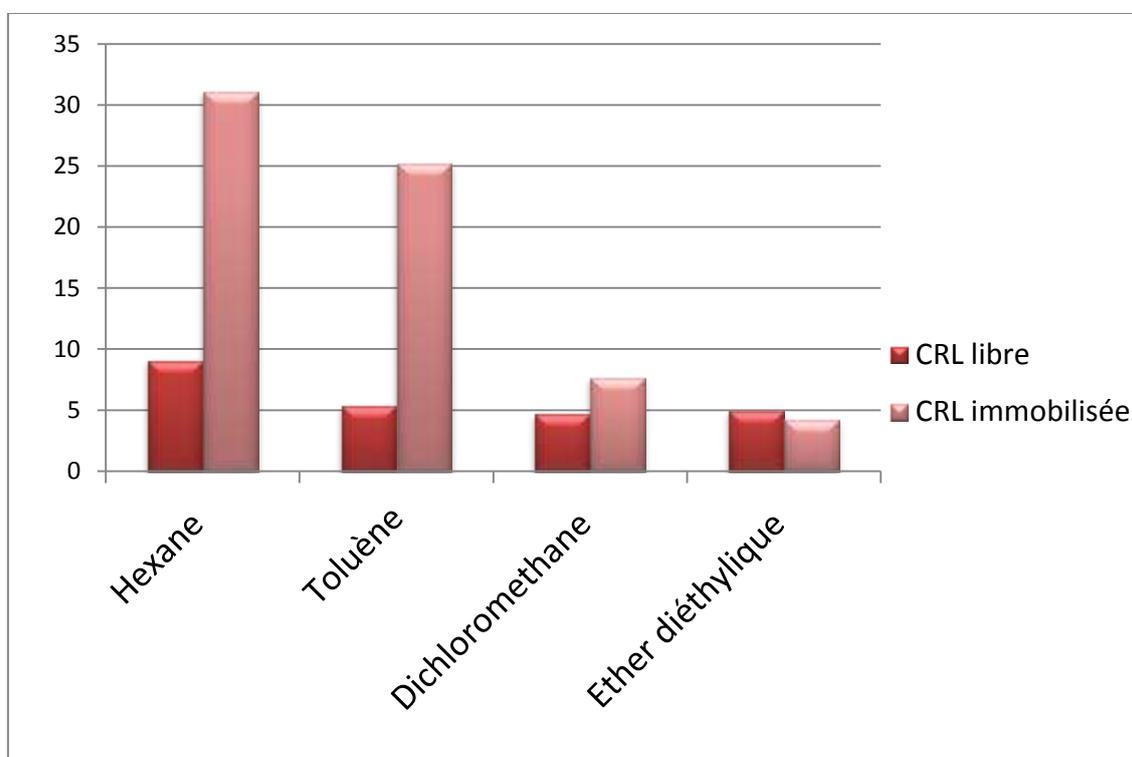
**Figure 28.** Histogramme de comparaison de la conversion entre la CRL libre et immobilisée.

Les résultats montrent un avantage d'activité en termes de conversion dans le cas de la CRL libre vis-à-vis le 2-butanol par rapport à la CRL immobilisée. Cela peut être expliqué par le nombre d'unité utilisée dans le cas de CRL libre (100% d'unité), cependant avec la CRL immobilisée on a un rendement l'immobilisation de 67% (67% d'unité seulement). D'autre part, le toluène semble le meilleur milieu réactionnel pour les deux lipases.

### b. Comparaison d'énantiosélectivité

**Tableau 17.** Comparaison de la conversion entre la CRL libre et immobilisée.

Solvant	<i>LogP</i>	Enantiosélectivité	
		CRL immobilisée	CRL libre
Hexane	3.50	31.1	9.1
Toluène	2.73	25.3	5.4
Dichlorométhane	1.25	7.7	4.7
Ether di-éthylique	0.89	4.3	5.0



**Figure 29.** Histogramme de comparaison d'énantiosélectivité entre la CRL libre et immobilisée.

Les résultats montrent un avantage d'énantiosélectivité dans le cas de la CRL immobilisée vis-à-vis le 2-butanol par rapport à la CRL libre. On peut expliquer cela par des modifications structurales au niveau du site actif par l'immobilisation, on améliorant la sélectivité vis-à-vis le substrat. D'autre part, l'Hexane semble le meilleur milieu réactionnel pour les deux lipases.

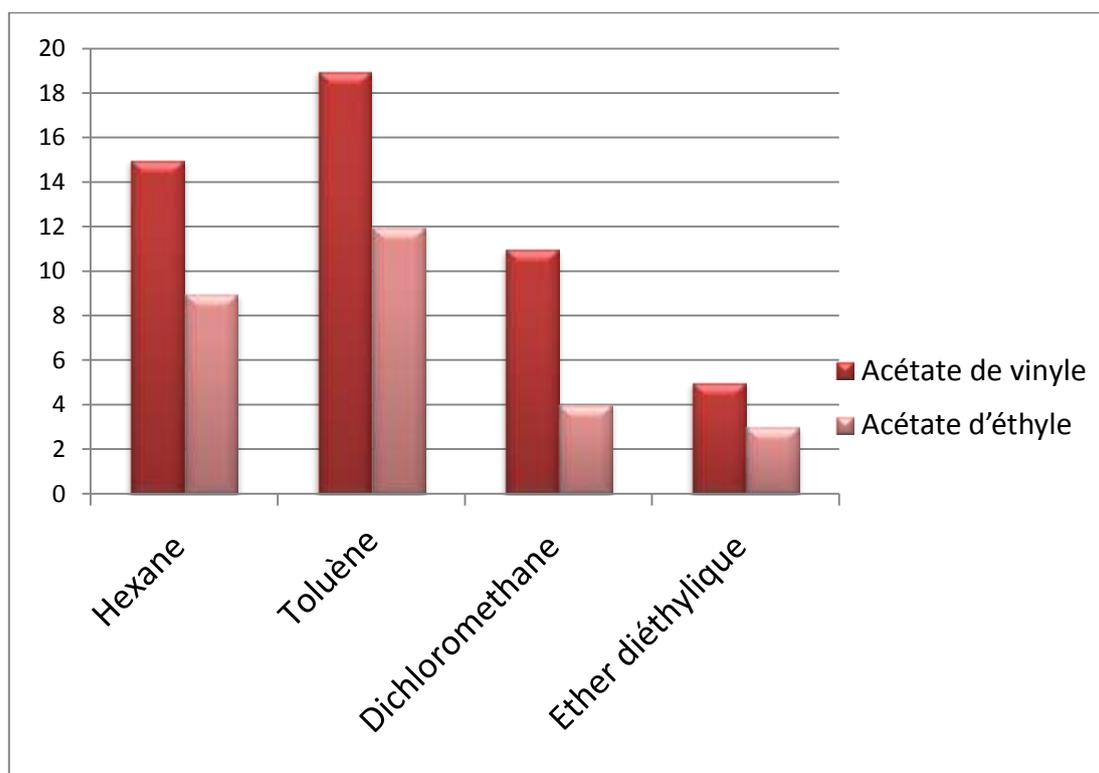
### 5.3. Comparaison de la transestérification de la CRL immobilisée vis-à-vis les deux donneurs d'acyle

L'influence du donneur d'acyle a été étudiée, deux donneurs d'acyle ont été utilisés l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle.

#### a. Comparaison de la conversion

**Tableau 18.** Comparaison de la conversion entre l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle.

Solvant	Log <i>P</i>	Conversion (C %)	
		Acétate de vinyle	Acétate d'éthyle
Hexane	3.50	15	9
Toluène	2.73	19	12
Dichlorométhane	1.25	11	4
Ether di-éthylique	0.89	5	3



**Figure 30.** Histogramme comparaison de la conversion entre l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle.

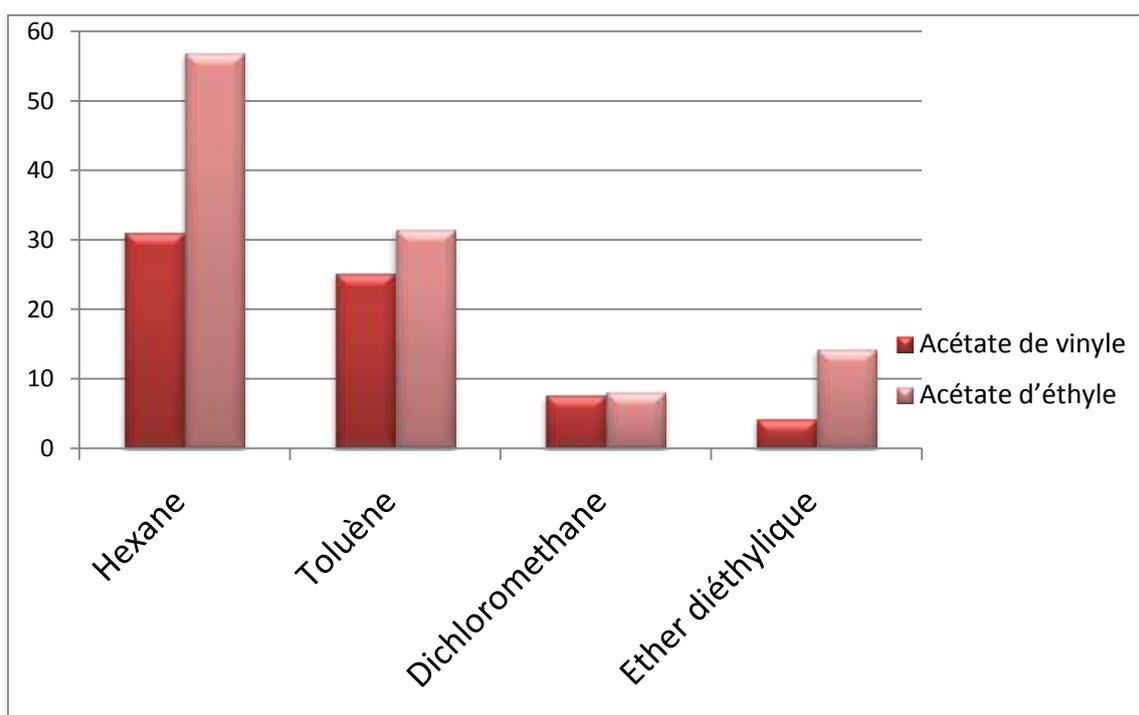
## Résultats et discussion

Les résultats présentés dans le tableau 18 montrent l'avantage de l'utilisation d'ester vinylique 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.

### b. Comparaison d'énantiosélectivité

**Tableau 19.** Comparaison de l'énantiosélectivité entre l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle.

Solvant	LogP	Énantiosélectivité	
		Acétate de vinyle	Acétate d'éthyle
Hexane	3.50	31.1	57.0
Toluène	2.73	25.3	31.6
Dichlorométhane	1.25	7.7	8.1
Ether di-éthylique	0.89	4.3	14.3



**Figure 31.** Histogramme comparaison de l'énantiosélectivité entre l'acétate de vinyle et l'acétate d'éthyle.

Les résultats montrent que la CRL est très sélective en présence de l'acétate d'éthyle comme donneur d'acyle par rapport à l'acétate de vinyle vis-à-vis le 2-butanol. Et on observe que l'Hexane est le meilleur milieu réactionnel pour la CRL immobilisée.

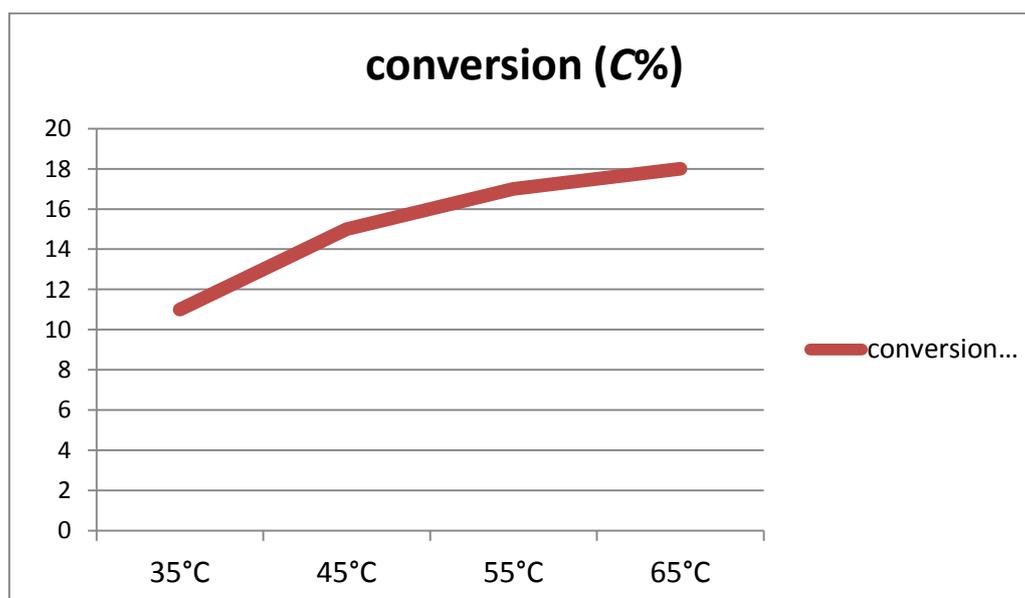
### 5.4. Effet de température

Effet de température sur la conversion et l'énantiosélectivité enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle dans l'hexane a été étudié.

#### a. Comparaison de la conversion

**Tableau 20.** Comparaison de (C%) enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle à différents température.

<i>LogP</i>	Température	Conversion (C° %)
3.50	35°C	<b>11</b>
2.73	45°C	<b>15</b>
1.25	55°C	<b>17</b>
0.89	65°C	<b>18</b>



**Figure 32.** Effet de température sur la Conversion (C%) enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle.

Les résultats obtenus et présentés dans les figures 32 et 33 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.

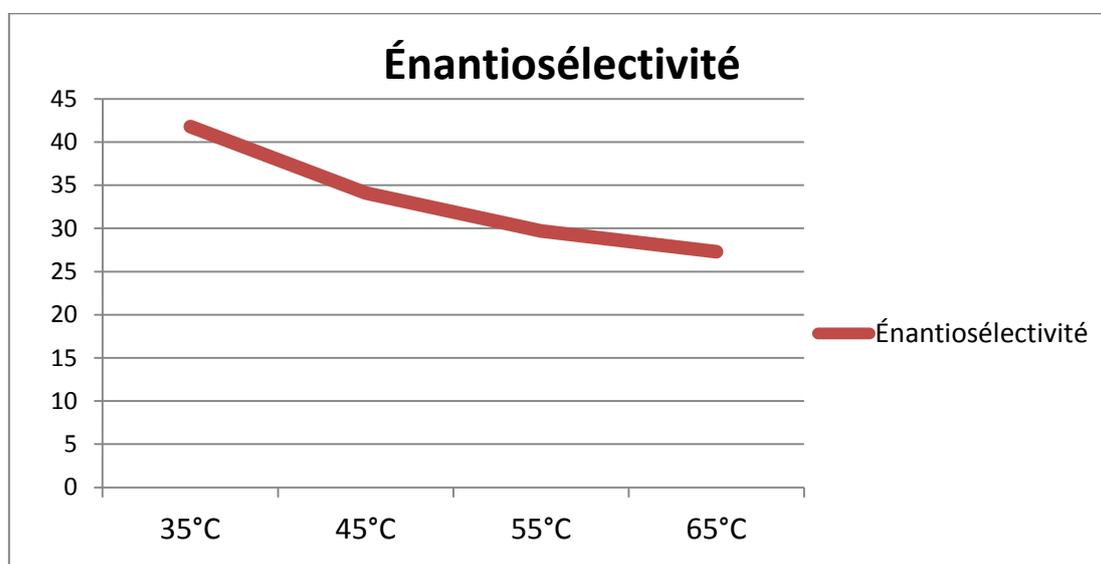
## Résultats et discussion

Il a été rapporté dans plusieurs recherches, qu'une fois la température dépasse 65°C, les enzymes commencent à se dénaturer à l'effet de température élevée à cause de leur nature protéique[3]. La dénaturation va modifier les structures tertiaire et quaternaire de la protéine globulaire et donc faire passer l'enzyme d'une conformation active à une conformation dépourvue d'activité[4]. On peut conclure que l'immobilisation a augmenté la stabilité de la CRL vis-à-vis la température.

### b. Comparaison de l'énantiosélectivité

**Tableau 21.** Comparaison d'énantiosélectivité enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle à différentes températures.

<i>LogP</i>	Température	Énantiosélectivité
3.50	35°C	<b>41.8</b>
2.73	45°C	<b>34.1</b>
1.25	55°C	<b>29.7</b>
0.89	65°C	<b>27.3</b>



**Figure 33.** Effet de la température sur l'énantiosélectivité enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle.

L'ensemble des résultats montrent que la température est un facteur qui peut potentiellement affecter l'énantiosélectivité des enzymes. En général, les enzymes présentent une plus grande sélectivité à basse température cela est confirmé par les résultats obtenus.

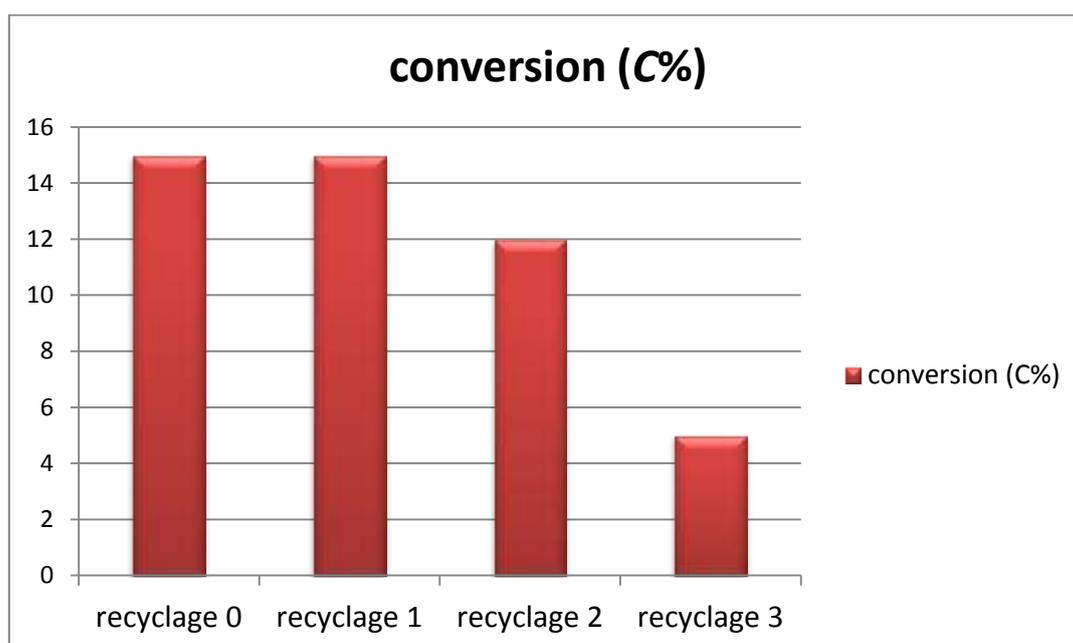
### 5.5. Effet de recyclage sur la transestérification par la CRL immobilisée

Effet de recyclage à 45 C° sur la transestérification enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle dans l'hexane.

#### a. Comparaison la Conversion

**Tableau 22.** Comparaison de la conversion du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle à plusieurs recyclage.

Recyclage	LogP	Conversion (C° %)
0	3.50	15
1	2.73	15
2	1.25	12
3	0.89	5



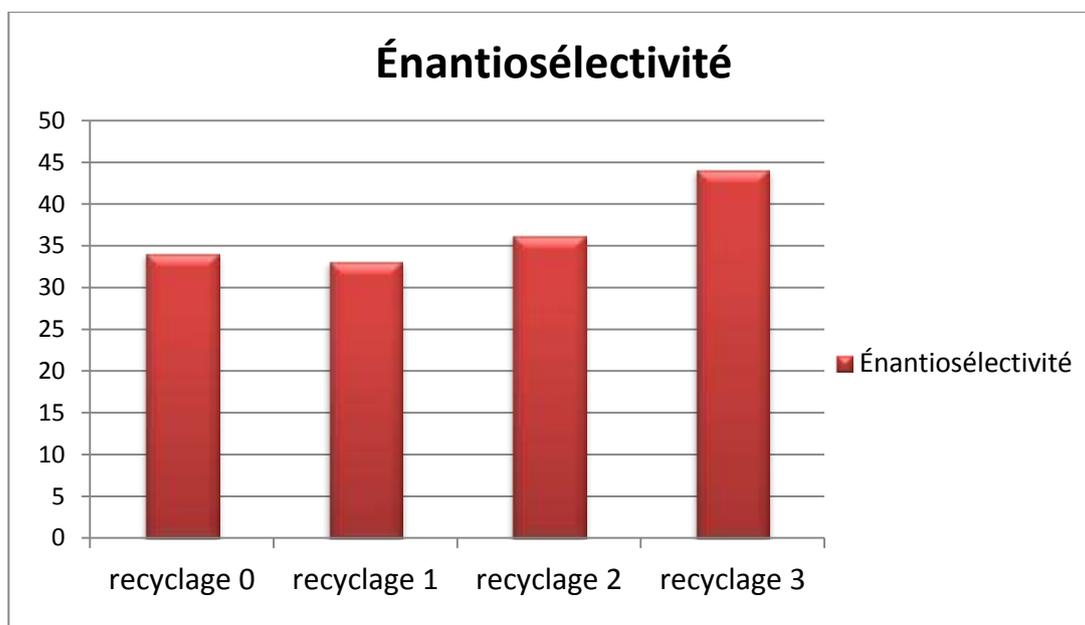
**Figure 34.** Histogramme représente l'effet de recyclage sur la conversion.

Les résultats montrent que l'activité de CRL reste bonne après les deux premiers recyclages et diminue à partir le 3ème recyclage. Ces résultats confirment que l'immobilisation de la CRL permette l'utilisation répétée de cet enzyme et facilite sa récupération.

### b. Comparaison d'énantiosélectivité

**Tableau 23.** Comparaison de l'énantiosélectivité enzymatique du 2-butanol racémique avec l'acétate de vinyle à plusieurs recyclages.

Recyclage	Log <i>P</i>	Énantiosélectivité
0	3.50	34.1
1	2.73	33.1
2	1.25	36.2
3	0.89	44.7



**Figure 35.** Histogramme représente l'effet de recyclage sur l'énantiosélectivité.

Les résultats montrent que l'énantiosélectivité n'est pas affecté par le recyclage, et on peut conclure que l'immobilisation maintient la stabilité des enzymes.

### Conclusion

Dans ce travail, nous avons étudié l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* par adsorption sur Célite. Ensuite nous avons fait une comparaison entre la forme libre et immobilisée dans la transestérification enzymatique du (*R,S*)-2-butanol. Nous avons examiné l'effet des différents paramètres : l'effet du solvant sur le comportement des enzymes, l'influence du donneur d'acyle, l'effet de température et le recyclage. Les résultats obtenus montrent que les lipases présentent une activité optimale en termes de conversion et d'énantiosélectivité dans des solvants hydrophobes avec un *LogP* élevé, l'avantage de l'utilisation d'ester vinylique, l'effet positif de l'augmentation de la température et l'immobilisation de la CRL permette l'utilisation répétée de cet enzyme et facilite sa récupération.

### **Bibliographie**

- [1] M. BOUGHANI Lazhar, *Etude théorique et expérimentale de l'effet du solvant sur le dédoublement enzymatique du menthol*. 2011.
- [2] “Coefficient de partage Introduction,” pp. 1–23.
- [3] “Fiche explicative de la leçon : Mouvement d'un projectile | Nagwa”, [Online]. Available: <https://www.nagwa.com/fr/explainers/160105648490/>
- [4] D. Mohand, *Suivi des paramètres physicochimiques d'une enzyme libre et immobilisée ; application dans le raffinage d'une huile alimentaire*. 2013.

*Conclusion  
générale*

## Conclusion générale

---

### Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire de fin d'étude concerne principalement l'étude de l'effet d'immobilisation par adsorption sur Célite de la CRL, et la détermination de la conversion et l'énantiosélectivité enzymatique. L'immobilisation est une des stratégies qui permet d'élargir le champ d'utilisation de ces enzymes. La biocatalyse à l'aide de lipases constitue une alternative aux procédés purement chimiques et permet de réduire l'utilisation de solvants.

Notre manuscrit débutera par une étude bibliographique centrée sur les enzymes, les lipases et l'immobilisation des enzymes et leurs principales méthodes, ainsi que la transestérification le principal processus réalisée au cours de ce travail, ensuite nous avons présenté une liste de références nécessaires.

Dans le 2<sup>ème</sup> chapitre, nous avons présenté les matériels et les méthodes utilisée au cours de notre travail réalisée dans le laboratoire, ainsi les réactifs et les lipases utilisée.

Dans Le 3<sup>ème</sup> chapitre, nous avons décrit les résultats obtenus et leurs discussions, nous avons présenté les résultats de l'objectif principal de cette étude qui est l'effet d'immobilisation sur l'activité enzymatique, ainsi que l'effet de solvant, l'effet du donneur d'acyle, l'effet de température et de recyclage, finalement nous avons présenté une liste de références nécessaires.

Les résultats de l'étude de l'immobilisation de l'enzyme sur Célite ont montré que le taux d'immobilisation est de 67%, Le produit extrait, est séché sous vide dans un dessiccateur, en présence de silica gel, jusqu'à stabilisation de sa masse, et ensuite utilisée dans les différentes réactions.

En conclusion, cette immobilisation de lipases par adsorption sur Célite a montré son efficacité en termes de stabilité des enzymes.