REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE Dr. YAHIA FARES MEDEA



Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE

Pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés Pharmaceutiques

Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème:

SYNTHÈSE ENZYMATIQUE D'OLÉATE DE FRUCTOSE PAR LA LIPASE DE *RICINUS COMMUNIS* L

Présenté par :

- ZERFAOUI Ahlem
- DOUKANI Zineb

Proposé et dirigé par :

- Dr. SEFHA Farida

2020-2021

Remerciements

Nous remercions ALLAH le tout puissant d'avoir nous donner le courage, la volonté et la patience de mener à terme le présent travail

Nous tenons à remercier nos parents qui sont à l'origine de notre réussite, car si en définitif ce travail a pu voir le jour, c'est grâce à leurs efforts et leurs sacrifices, qu'ils trouvent ici l'expression de toute notre reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent également à notre promotrice Dr. SEFHA Faria, Maître de conférences à l'Université de Médéa pour leur soutien, leurs conseils judicieux et leur grande bien vaillance durant l'élaboration de ce travail

Nous adressons nos respectueux remerciements à tous les membres du jury qu'ils nous ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de notre travail.

Nous remercions également l'ensemble des membres du Hall Technologique et plus particulièrement, Monsieur le directeur MOULOUDJ Sofiane et les ingénieurs des laboratoires : Melle BENHOUA Meriem et Mme BELFARAH Rachida.

Merci à tous ceux que n'ai pas pu citer, puisse Dieu les bénir et les récompenser, Amin

Dédicace

Avec l'aide d'ALLAH, ce modeste travail a pu être réalisé

Je dédie ce dernier à :

Mon père et Ma mère

Avec toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études,

Mes frères

Mohammed, Abdelhak

Mes sœurs

Sarah, Amira

Ma chère binôme Halouma

Tous mes amies spécialement Sihem ,Ramla ,Firouze

Pour leur présence de tous les instants,

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté,

Avec toute ma reconnaissance

Zineb

Dédicace

Avec l'aide d'ALLAH, ce modeste travail a pu être réalisé

Je dédie ce dernier à :

Mon père et Ma mère

Avec toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études,

Mes sœurs

Nadia, Zola,

Mon frère

MOHAMMED

MA Chère binôme Zinouba

Tous mes amies spécialement Sihem ,Ramla et Firouze sans oublier mon ami proche Ismail.

Pour leur présence de tous les instants,

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté,

Avec toute ma reconnaissance

Ahlam

الملخص

درسنا خلال هذا العمل تفاعل الأسيل للفركتوز بحمض الأوليك كعامل اسيلي في المذيبات ذات الأقطاب المختلفة (ثلاثي بيوتانول / أسيتات إيثيل / أسيتونتريل / أسيتون) في وجود ليباز نباتي مستخلص من بذور الخروع و مجمدة في الجينات الصوديوم. بعد ذلك ، تم فحص تأثيرات العوامل المختلفة على تفاعل تركيب أوليات الفركتوز (درجة الحرارة ، نشاط الماء ، الإنزيم ووقت التفاعل) باستخدام التصميم الكامل للعوامل الأربعة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الأسيتون هو أنسب مذيب لتركيب أوليات الفركتوز. تم الحصول على أفضل تحويل (91.56٪) في ظل الظروف المثلى: الإنزيم الثابت (12 جم) ، درجة الحرارة (25 درجة مئوية) ، زمن التفاعل (2 ساعة) والنشاط المائي (0). تم تأكيد الخصائص الهيكلية لأوليت الفركتوز عن طريق تحليل الصدى المغناطيسي النووي للبروتون و تحويل الأشعة تحت الحمراء لفوربيه.

الكلمات المفتاحية : تفاعل الأسيل , أوليات الفركتوز , بذور الخروع ,ليباز.

Résumé :

Au cours de ce travail nous avons étudiées la réaction d'acylation de fructose par l'acide oléique comme agent acylant dans des solvants à différentes polarités (tert-butanol /acétate d'éthyle /acétonitrile /acétone) en présence d'une lipase végétale extraite à partir des graines de ricin (*Ricinus communis* L) et immobilisée dans l'alginate de sodium. Par la suite les effets des différents paramètres sur la réaction de synthèse d'oléate de fructose (température, activité de l'eau, enzyme et temps de réaction) ont été étudiés en utilisant le plan d'expérience factoriel complet à quatre facteurs. Les résultats obtenus montrent que l'acétone est le solvant le plus adapté à la synthèse d'oléate de fructose. La meilleure conversion (91.56%) a été obtenue dans les conditions optimisées : l'enzyme immobilisée (12g), température (25°C), temps de réaction (2h) et l'activité de l'eau (0). Les caractéristiques structurales de l'oléate de fructose ont été confirmées par une analyse par FT-IR et RMN.

Mots clés : réaction d'acylation, oléate de fructose, *Ricinus communis* L, lipase.

Abstract

During this work we studied the acylation reaction of fructose by oleic acid as an acylating agent in solvents with different polarities (tert-butanol / ethyl acetate / acetonitrile / acetone) in the presence of a vegetable lipase extracted from castor beans (*Ricinus communis* L) and immobilized in sodium alginate. Subsequently, the effects of different parameters on the fructose oleate synthesis reaction (temperature, water activity, enzyme and reaction time) were investigated using the full four-factor factorial design. The results obtained show that acetone is the most suitable solvent for the synthesis of fructose oleate. The best conversion (91.56%) was obtained under the optimized conditions: immobilized enzyme (12g), temperature (25 ° C), reaction time (2h) and water activity (0). The structural characteristics of fructose oleate were confirmed by FT-IR and NMR analysis.

Key words: acylation reaction, fructose oleate, *Ricinus communis* L, lipase.

SOMMAIRE

Introduction générale….....1

Partie Théorique

I. TENSIOACTIFS 3

I.1. Définition 3

I.2. Classification.....3

I.2.1. Les tensioactifs anioniques 4

I.2.2. Les tensioactifs cationiques 5

I.2.3. Les tensioactifs zwitterioniques.....5

I.2.4. Les tensioactifs non ioniques.....6

I.3. Domaine d'application des tensioactifs.....6

I.3.1. Domaine pharmaceutique 6

I.3.2. Domaine cosmétique.....7

I.3.3. Domaine industriel.....7

I.4. Influence du milieu réactionnel sur la synthèse enzymatique des esters de sucre..... 8

I.4.1. Influence de la tenure en l'eau 8

I.4.2. Influence de solvant organique 8

I.4.3. Influence de lipase 8

I.4.4. Influence de la température.....8

II.ENZYME.....9

II.1. Définition 9

II.2. Classification des enzymes.....9

II.3. Lipases.....10

II.3.1. Origines des lipases : 11

II.3.2. Lipases végétales 11

II.3.3. Ricinus communis L 12

II.3.4. Modes d'application.....15

II.4. Immobilisation des lipases 15

II.4.1. Immobilisation par liaison : 16

II.4.2. Réticulation 19
II.4.3. Inclusion 19
II.4.4. Objectifs de l'immobilisation des enzymes 21
III. ESTERS DE SUCRE 21
III.1. Définition 21
III.2. Voies de synthèse des sucroesters 21
III.2.1. Synthèse par voie chimique 21
III.2.2. Synthèse par voie enzymatique : 23
III.3. Caractéristiques générales des sucroesters 25
III.4. Domaines d'applications des sucroesters 25
III.4.1. Domaine agro-alimentaire 25
III.4.2. Domaine pharmaceutiques et médicales : 26
III.4.3. Domaine des cosmétiques : 26

Partie Expérimentale

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES 28
IV.1. Matériels et réactifs : 28
V. METHODES EXPÉRIMENTALES 30
V.1. Extraction et purification de la lipase 30
V.2. Préparation de la lipase immobilisée 32
V.3. Synthèse d'un sucroester : 35
V.3.1. Optimisation de la synthèse de l'oléate de fructose : 36
V.3.2. Mise en œuvre du plan d'expérience: 37
V.4. Caractérisation structurale de l'oléate de fructose 39
V.4.1. FTIR : 39
V.4.1. RMN: 39
VI. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS : 40
VI.1. Choix du solvant adéquat : 40
VI.2. Optimisation de la synthèse de l'oléate de fructose 41
VI.2.1. Analyse statistique 41
VI.2.2. Analyse des courbes en surface de réponses 44
VI.3. Séparation du tensioactif synthétisé : 45
VI.4. Caractérisation structurale d'oléate de fructose par spectroscopie IR et RMN 46

Conclusion générale….....49
Références bibliographiques.....**50**

Liste des figures

Figure I.1: Schéma simplifiée d'un tensioactif……..3
Figure I.2: Tensioactif anionique……..4
Figure I.3: Tensioactif cationique…….....5
Figure I.4: Tensioactif zwitterionique……..6
Figure I.5: Tensioactif non ionique……..6
Figure II.1: Feuillage **(A)** et fruits **(B)** de ricin (*Ricinus Communis* L)……..13
Figure II.2: Fleur femelle **(1)** et male **(2)**de ricin……...14
Figure II.3: Capsules tricoques de ricin……..14
Figure II.4: Graines de ricin ……...15
Figure II.5: Schéma des différentes techniques d'immobilisation …….....16
Figure II.6: immobilisation par liaison ……..17
Figure II.7: immobilisation par réticulation……...19
Figure II.8: immobilisation par micro-encapsulation…….20
Figure II.9: emprisonnement dans une matrice …….20
Figure III.1: synthèse des esters de saccharose …….22
Figure III.2: transestérification chimique du saccharose ……..……...22
Figure III.3: Estérification chimique du (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose …….23
Figure III.4: Transésterification enzymatique du lactose …….24
Figure III.5: Estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique…….24
Figure V.1: Protocol d'extraction et de purification de la lipase ……..32
Figure V.2: Structure d'alginate de sodium……...33
Figure V.3: Structure du polymère alginate de calcium……33
Figure V.4: Schéma illustrant la sphérification des billes d'alginate dans la solution chlorure de calcium…….34
Figure V.5: Protocol d'immobilisation de la lipase dans l'alginate de sodium……..35
Figure V.6: Acylation de fructose……..36
Figure V.7: Montage de synthèse d'oléate de fructose……..37
Figure VI.1: Effet de la nature de solvant sur le rendement d'estérification de l'acide oléique en présence de la lipase de ricin…….....41
Figure VI.2: Effets des différents facteurs sur la réponse…….44

Figure VI.3: Effets des différents facteurs et interactions sur la réponse…….44

Figure VI.4 : Effets des différents facteurs et interactions sur la réponse……45

Figure VI.5 : surfaces de réponses des différents facteurs.....45

Figure VI.6 : Séparation d'oléate de fructose par centrifugation……..46

Figure VI.7: Spectre IR d'oléate de fructose…….46

Figure VI.9 : Structure d'oléate de fructose.....47

Liste des tableaux

Tableau I.1: Différents types de tensioactifs anioniques…….4
Tableau II.1: Les six classes d'enzymes……10
Tableau IV.1: Appareillages utilisés……..28
Tableau IV.2: Substances chimiques utilisées au cours de la synthèse de sucroester.....30
Tableau IV.3: Différents solvants utilisés lors de cette étude……..30
Tableau V.1: Variables indépendantes et leurs niveaux……..38
Tableau V.2: Plan d'expérience utilisé pour obtenir le point optimale…….38
Tableau VI.1: Tableau récapitulatif des expériences et résultats du plan d'expérience……...43

Abréviations

a_w : Activité de l'eau

$Cacl_2$: Chlorure de calcium

CH_2cl_2: Chlorure de méthylène

CAL B : Lipase de Candida antartica B

DMF : Diméthylformamide

DMSO: Diméthylsulfoxide

ED: Eau distillé

Eq: Equation

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

H/E : Huile dans Eau

HLB : Hydrophile-Lipophile-Balance

K_2CO_3 : Carbonate de potassium

LPP : Lipase partiellement purifiée

M : Molaire (mol /l)

m_e : masse d'enzyme (g)

n : nombre des atomes

n_e : Nombre de moles d'acides gras de l'essai (mmole)

n_i : nombre de moles initiale d'acide gras (mmole)

n_t : nombre de moles d'acide gras du témoin (mmole)

R : rendement (%)

RMN : Résonance magnétique nucléaire

rpm : Rotation par minute

T : température (c°)

t : temps (min)

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les tensioactifs sont des molécules d'intérêt dont le squelette amphiphile laisse apparaître des propriétés de surface spécifiques. Cette particularité structurale autorise leur usage pour la formulation des produits de consommation courante : les différentes émulsions alimentaires, les détergents et les cosmétiques, mais également dans de nombreuses industries comme le textile, le cuir, la métallurgie, ou encore les peintures. Compte-tenu des importants volumes produits chaque année et du développement des comportements respectueux de l'environnement, les tensioactifs doivent répondre de plus en plus à des impératifs de biodégradabilité [1]. Ces propriétés expliquent les nombreuses fonctions d'un tensioactif, en effet, ces molécules permettent la diminution de la tension superficielle entre deux surfaces. Leur faculté à s'organiser sous forme de micelles dans l'eau explique également l'importance de leur utilisation dans le domaine de la formulation (des savons, par exemples) [2].

Nous somme plus particulièrement intéressés aux tensioactifs non ioniques de type sucroester constituent la classe la plus récente de tensioactifs. Ces tensioactifs présentent de nombreux avantages dont notamment la diversité des structures disponibles et le caractère inoffensif, tant pour la santé que pour l'environnement, leurs applications potentielles touchent des domaines aussi variés que l'alimentation humaine (par exemple la mousse au chocolat), la formulation de médicaments et de produits phytosanitaires ou encore l'étude des protéines membranes **[**3].

Les esters de sucres sont des tensioactifs non-ioniques de structure simple, ils ne sont pas disponibles dans la nature. Leur synthèse est réalisée par la voie chimique, entraînant la production d'une quantité non négligeable de produits secondaires. Ces derniers doivent être éliminés, ce qui implique des coûts de purification relativement importants. Ce problème peut être contourné en optant pour une voie de synthèse beaucoup plus spécifique : la biocatalyse ; L'utilisation de lipases permet d'envisager le greffage d'un acide gras sur un sucre grâce à une liaison ester [4]. Les esters de sucres sont arrivés dans ce contexte, apportant de nouvelles solutions aux industriels du secteur des tensioactifs. L'accent sera placé sur cette dernière voie de synthèse tout en gardant à l'esprit que seule la voie chimique est exploitée à ce jour [5].

Dans ce travail, une première partie sera consacrée à l'étude bibliographique permettant de poser le contexte de l'étude et de donner une vue d'ensemble sur les tensioactifs et, en particulier, les esters de sucres. Une étude sur les enzymes sera également présentée dans cette partie.

La deuxième partie concernera la partie expérimentale, l'étude s'articule sur deux principaux axes :

Le premier consiste la liste des produits et appareillages utilisés, ainsi que les différents modes opératoires suivis par l'objet de ce travail qui est l'extraction de la lipase à partir des graines de *"Ricinus communis* L*"*, puis l'immobilisation de cette enzyme sur un support afin de leur utilisation dans la production de sucroester.

Le deuxième axe consiste à évaluer les performances du procédé de synthèse d'ester de sucre en étudiant les effets des principaux paramètres opératoires (nature du solvant, temps de réaction, l'effet de température…) sur le rendement de la réaction.

En fin nous terminons ce mémoire par une conclusion générale pour mètre en évidence les résultats de ce travail et l'objectif atteint.

Partie théorique

I. TENSIOACTIFS

I.1. Définition

Il existe un type de substance chimique bien particulier; qui est à la fois soluble dans l'eau et soluble dans les huiles hydrocarbonées ou végétales appelé les «tensioactif » ou « surfactant».

Les tensioactifs ou agents de surface sont des molécules d'origine naturelle ou synthétique possédant d'une part une chaîne à caractère lipophile (ou queue hydrophobe) et d'autre part un groupement à caractère hydrophile (aussi appelé tête polaire) comme illustré sur la **figure (I.1)**. Ces composés sont dits amphiphiles **[6].**

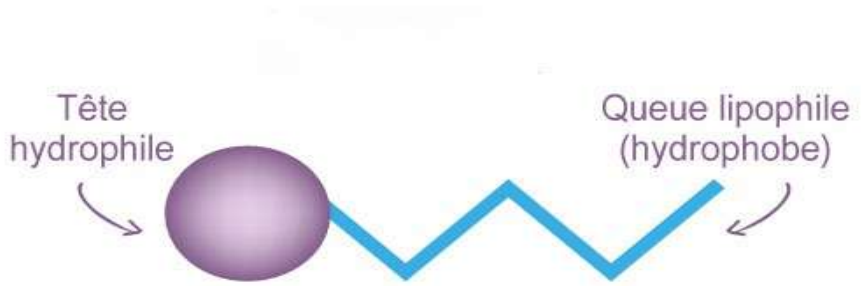


Figure I.1 : schéma simplifiée d'un tensioactif

Les surfactifs sont des substances dont la molécule possède à la fois un groupe polaire et un groupe apolaire ; le groupe polaire et un groupe fonctionnel qui comporte des hétéroatomes d'oxygène, de soufre, d'azote. Et le groupe apolaire est composé d'une longue chaîne carbonée saturée ou partiellement insaturée **[7].**

I.2. Classification

Les tensioactifs sont classés selon la nature de leur pôle hydrophile en quatre grandes familles : les tensioactifs anioniques chargés négativement, les cationiques chargés positivement, les zwitterioniques ou amphotères possédant à la fois une charge positive et une charge négative et les non ioniques, non chargés.

I.2.1. Les tensioactifs anioniques

Les tensioactifs anioniques sont historiquement les premiers tensioactifs utilisés sous la forme de savons. Ce sont des sels d'acides carboxyliques R-COO–M+, résultant de la saponification de triglycérides d'origine végétale (huile de palme, d'olive,...) ou animale **[8].**

Ce sont les tensioactifs les plus utilisés dans les applications industrielles en raison de leur coût de fabrication relativement bas et de leur utilisation dans pratiquement tous les types de détergents.

Les groupements hydrophiles les plus couramment utilisés sont les carboxylates, les sulfates, les sulfonates et les phosphates. Une formule générale peut être attribuée aux agents de surface anioniques selon le type de tête hydrophile (**tableau 1**) **[9].**

Tableau I.1: Différents types de tensioactifs anioniques **[4]**

Groupes hydrophiles	Formules générale
Carboxylates	$CnH2n+1COO-Na+$
Sulfates	$CnH2n+1OSO3-Na+$
Sulfonates	$CnH2n+1SO3-Na+$
Phosphates	$CnH2n+1O(OH)O-Na+$

Avec n = 8 à 16 atomes.

Exemple :

Les carboxylates (-COO-), les sulfonâtes (SO3-) et les sulfates (SO42-).

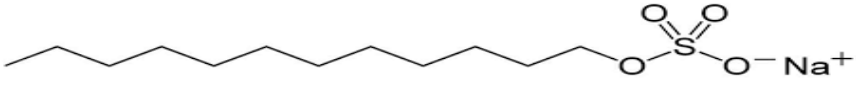


Figure I.2. Tensioactif anionique.

I.2.2. Les tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques sont caractérisés par une partie hydrophile chargée positivement. Le plus souvent ce sont des sels d'ammonium quaternaires triméthylés ou des sels de pyridinium **[3].**

Ils sont généralement stables aux variations de pH etont la capacité de tuer les micro-organismes ou au moins de retarder leur croissance. Ils sont compatibles avec les sels inorganiques alcalins et les non-ioniques et sont utilisés avec eux dans les agents de nettoyage pour détergents destinés au lavage de la vaisselle. Ils sont également utilisés en tant que revitalisants pour les cheveux, car ils s'adsorbent sur ces derniers enleur conférant douceur et propriétés antistatiques **[10].**

Exemple : bromure d'hexadécyle triméthyl ammonium

Groupes d'ammonium quaternaire (R4N+).



Figure I.3. Tensioactif cationique

I.2.3. Les tensioactifs zwitterioniques

Ce sont des tensioactifs qui ont à la fois un groupe fonctionnel anionique et un autre cationique, ils présentent une charge variable du positif au zwitterionique en passant par le négatif en fonction du pH de la solution dans laquelle ils se trouvent. Grâce à leurs capacité à supporter des charges positives et négatives ils ont généralement une grande partie hydrophile, ils sont généralement plus doux pour la peau et les yeux que les tensioactifs anioniques, cationiques et certains tensioactifs non ioniques. Les tensioactifs amphotères sont utilisés dans des formulations contenant des tensioactifs anioniques ou non ioniques pour modifier la solubilité, la taille des micelles, la stabilité des mousses et la viscosité de divers systèmes de nettoyage et émulsions **[11].**

Exemple : Carboxybétaine

Par exemple les carboxylates (-COO-) et les groupes d'ammonium quaternaire.

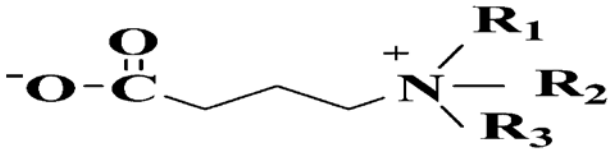


Figure I.4. Tensioactif zwitterionique

I.2.4. Les tensioactifs non ioniques

Les tensioactifs non-ioniques comportent une partie hydrophile non chargée, les groupements hydrophiles les plus courants sont le groupement hydroxyle (ROH), le groupement éther (R-OR') et ester (R-CO-O-R').Les propriétés de solubilisation dans l'eau d'un groupe hydroxyle ou d'un groupe éther sont faibles comparées aux sulfates ou sulfonates, si un seul groupe hydroxyle ou un groupe éther est présent, la longueur de la chaine de l'hydrocarbure R ne sera que de 6 à 8 atomes de carbones avant que le produit ne devienne insoluble et présente de mauvaises propriétés tensioactives **[12].**

Exemple : alkylpolyglycoside

Les alcools (OH), les éthers (-O-) et les carbohydrates.

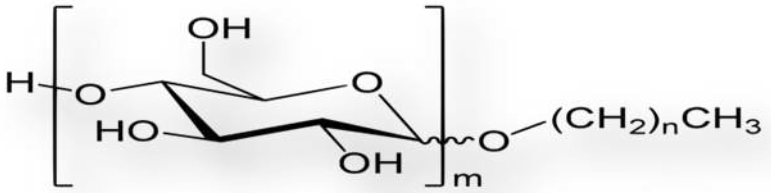


Figure I.5. Tensioactif non ionique

I.3. Domaine d'application des tensioactifs

I.3.1. Domaine pharmaceutique

Le nombre total de tensioactifs disponibles dans le monde est vraiment vaste mais le nombre utilisé dans le domaine pharmaceutique est très faible.

Les tensioactifs non-ioniques sont les plus importants et les plus largement utilisés pour les émulsions et les suspensions pharmaceutiques en raison de leur capacité à solubiliser

des substances peu solubles et de leur faible toxicité, cependant ils peuvent diminuer l'activité antimicrobienne de certains conservateurs. Les principaux groupes utilisés sont les dérivés des polyols et les polyoxyéthylène. Les tensioactifs anioniques sont reconnus comme de puissants irritants pour la peau tant disque les tensioactifs cationiques présentent une irritation pour la peau plus faible mais avec une plus grande cytotoxicité.

Les principales classes de tensioactifs anioniques utilisés dans ce domaine sont ceux contenant des groupements hydrophiles carboxylates, sulfates et sulfonates. Les stéarates sont sans doute les émulsifiants les plus largement utilisés dans les émulsions huile dans l'eau, le monostéarate d'aluminium est utilisé comme émulsifiant dans les crèmes et dans les suspensions injectables huileuses.

Les tensioactifs cationiques sont très importants dans le domaine pharmaceutique en raison de leurs propriétés bactéricides ils sont utilisés sur la peau notamment pour le nettoyage des plaies et des brulures et ils peuvent être utilisés comme agents conservateurs. Les principaux tensioactifs cationiques utilisés sont les sels d'ammonium quaternaires **[13].**

I.3.2. Domaine cosmétique

Parmi les produits utilisés en cosmétique, les tensioactifs sont très utiles pour accéder à des combinaisons stables d'ingrédients parfois antagonistes en termes de solubilité, et le marché cosmétique n'échappe pas au souhait toujours plus marqué de disposer de solutions naturelles et néanmoins performantes [**14**].

On distingue deux grands domaines, la cosmétique rincée (produits d'hygiène l'avants tels que les shampooings, gels douches, dentifrices) et la cosmétique blanche (produits de beauté tels que les crèmes, laits, maquillages et autres produits de soin) **[15].**

I.3.3. Domaine industriel

Les applications des tensioactifs dans le secteur industriel sont très diverses et ont une grande importance pratique. Les tensioactifs peuvent être utilisés avantageusement dans la production et la transformation d'aliments, de produits agrochimiques, dans l'industrie pétrolière ou ils sont utilisés à divers stades comme la récupération assistée qui consiste à utiliser une microémulsion pour améliorer le taux de récupération dans les gisements ou encore comme le traitement des eaux d'injection par des inhibiteurs de corrosion. On les retrouve aussi dans les industries du plastique favorisant la polymérisation et permettant la

mise en émulsion ou en suspension de divers constituants des peintures tels que les solvants, résines, pigments. On les trouve également dans un large éventail de systèmes biologiques et d'applications médicales, de techniques de dépollution des sols et d'autres applications liées à l'environnement, à la santé et à la sécurité [**16**].

I.4. Influence du milieu réactionnel sur la synthèse enzymatique des esters de sucre

I.4.1. Influence de la tenure en l'eau

La teneur en eau est le paramètre le plus important affectant l'activité enzymatique dans les solvants organiques indépendamment de la nature du solvant lui-même. Elle peut influencer le rendement de conversion des substrats à l'équilibre ainsi que la dispersion et la stabilité des enzymes. Plusieurs études indiquent, en effet, que la structure et l'activité des lipases dépendent fortement de l'eau liée **[17].**

I.4.2. Influence de solvant organique

La quantité de littératures sur la synthèse du sucroester catalysée par la lipase utilisant des solvants organiques croît rapidement. Lors de la synthèse enzymatique des sucroesters dans des solvants organiques, plusieurs paramètres influençant la réaction doivent être considérés. Bien que la plupart des conditions de réaction n'affectent pas seulement la synthèse elle-même, mais aussi interagissent les unes avec les autres. Pour obtenir une vitesse de réaction élevée et un rendement de conversion dans la synthèse d'ester, ces facteurs doivent être étudiés **[18].**

I.4.3. Influence de lipase

Les lipases catalysent généralement l'hydrolyse des huiles et des graisses. Dans des conditions spécifiques, ils catalysent également les réactions d'estérification, trans estérification, acidolyse, alcoolyse et aminolyse des solvants organiques.

Dans la synthèse de sucroesters, les lipases sont presque toujours utilisées sous une forme immobilisée **[19].**

I.4.4. Influence de la température

La température est un paramètre très important dans la réaction de synthèse des sucroesters car elle intervient à plusieurs niveaux et plus particulièrement sur:

- L'activation et la dénaturation de l'enzyme;

- La solubilité des différents substrats et produits
- La viscosité du milieu **[12].**

II. ENZYME

II.1. Définition

Les enzymes sont des protéines qui allient la capacité de reconnaitre très spécifiquement des molécules au pouvoir de catalyser efficacement leur transformation en composées utiles au métabolisme des organismes vivants **[20].**

Sans la catalyse enzymatique aucune forme de vie n'aurait pu exister. Par ailleurs, sans l'introduction des procédés enzymatiques dans la catalyse industrielle, l'innovation de plusieurs produits nécessaires à notre vie quotidienne, n'aurait jamais vu le jour **[21,22].**

Une enzyme est spécifique d'un substrat, molécule dont elle catalyse la transformation. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se trouve inchangée **[23].**

II.2. Classification des enzymes

Il existe un nombre très important d'enzymes et on en découvre encore aujourd'hui de nouvelles. Six classes d'enzymes sont répertoriées selon la réaction chimique qu'elles catalysent :

Tableau II.1. Les six classes d'enzymes **[24].**

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène)
Transférases	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérases	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères)
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP)

II.3. Lipases

Les triacylglycérol acyl-hydrolases, ou lipases, sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du micro-environnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycérol.

Chez de nombreux êtres vivants, cette réaction est capitale de par son rôle physiologique majeur dans le métabolisme des graisses et des lipides. De plus, certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques. En milieu solvant, elles peuvent catalyser bon nombre de réactions allant de l'estérification à l'acidolyse ou l'alcoolyse 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, elles sont très utilisées dans l'industrie **[25,26].**

Sont aussi capables d'hydrolyser des esters, mais le mécanisme d'action est différent dans le cas des lipases et donne quelques propriétés uniques.

Lipases jouent un rôle très important en biotechnologie, non seulement dans le traitement des aliments et des huiles, mais aussi dans la préparation des intermédiaires chiraux. **[27,28,29].**

II.3.1. Origines des lipases :

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux micro-organismes.

II.3.2. Lipases végétales

Elles sont présentes au sein de la plante bien qu'en les retrouve principalement dans les graines. Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes :

- Le premier groupe : est constitué par les triacylglycérol hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de l'altération des graines pendant le stockage.
- Les constituants du second groupe :dénommés acylhydrolases, sont présents dans divers tissus de la plante. Les principales acylhydrolases sont les phospholipases A et B ; les glycolipases, les sulfolipases et les monoglycéridelipases. Elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides mais elles peuvent catalyser certaines réactions de transestérification **[30,31].**
- Le troisième groupe : est constitué par les phospholipases C et D.

Certaines protéines végétales possédant une activité lipolytique peuvent avoir un effet cytotoxique pour les cellules animales. Par exemple, la ricine, une glycoprotéine isolée de la graine de *Ricinus communis*, induit le blocage de la synthèse des protéines par inactivation des ribosomes **[32,33]**.

Leur étude a permis leur utilisation comme immunotoxines dans le traitement de certains cancers **[34,35].**

II.3.3. Ricinus communis L

Ricinus Communis L fait partie de la famille des Euphorbiacées comportant 8100 espèces, cette plante est le seul représentant du genre Ricinus qui est un arbre à grandes feuilles palmée **[36].**

Euphorbiaceae vient du genre le plus important de la famille, Euphorbia, lui même dédié par le roi Juba II de Mauritanie à son médecin Euphorbos au 1er siècle avant Jésus Christ, et conservé par Linné. D'aspect très variable, les plantes de cette famille se caractérisent essentiellement par leur latex blanc, irritant la peau, collant et épais avec un fruit à trois loges **[37].**

II.3.3.1.Nomenclature

Le nom scientifique de l'espèce est *Ricinus communis* L **[38].** Le ricin est appelé également kharouâa en arabe, ricin en français et castor plant ou castor oil plant en anglais **[39].**

II.3.3.2.Origine et Habitat

L'origine du *Ricinus communis* L est l'Afrique tropicale, il est développé en tant que plante ornementale dans diverses régions de l'Asie, l'Amérique du Nord, l'Afrique et l'Europe **[40].**

Il est largement cultivé dans la plupart des régions tropicales et subtropicales sèches de même que dans de nombreuses régions tempérées dotées d'un été chaud **[41].**

Ricinus communis L est présenté dans tout le continent africain, de la côte atlantique à la mer Rouge et de la Tunisie à l'Afrique du Sud ainsi que dans les îles de l'océan Indien **[42].**

Plus de 95% de la culture de Ricinus dans le monde est concentrée en Inde, la Chine et le Brésil **[35].**

II.3.3.3.Caractéristiques botaniques

Ricinus Communis L est un arbuste à rameaux ultimes herbacés ou fistuleux ou arbre, pouvant atteindre 7m et plus, son feuillage est d'une beauté remarquable, parfois cultivé comme plante annuelle très vigoureuse, mais naturellement vivace **[43].**

❖ **Le feuillage et fruits**

Les feuilles sont palmatifides à palmatipartites c'est à dire découpées en lobe échancrés jusqu'au centre ou dépassant le centre sans atteindre le point d'insertion du limbe au pétiole (contrairement à la feuille palmatiséquée du Marronnier par exemple. Les lobes (7 en général) sont pointus et dentés. Dans son ensemble, la feuille ressemble à celle de certains Érables. Le feuillage à des couleurs variables (vert, violet, rouge) ce qui fait son intérêt décoratif.

Les fruits sont des capsules hérissées de piquants, à trois loges déhiscentes à maturité **[44].**



(A) **(B)**

Figure II.1. Feuillage **(A)** et fruits **(B)** de ricin (*Ricinus Communis* L) **[39]**

❖ **Les fleurs**

La plante est dioïque. Les fleurs sont regroupées dans des inflorescences mâles et femelles. Les fleurs mâles sont vers le bas et les femelles au dessus. Les fleurs mâles apparaissent en premier et ont une durée de vie d'une journée alors que les fleurs femelles qui arrivent à maturité plus tard restent fécondables pendant une quinzaine de jours **[45].**



(1) **(2)**

Figure II.2. Fleur femelle **(1)** et male **(2)**de ricin **[40]**

Fruits

Sont des capsules tricoques (formé de 3 lobes) hérissées de pointes et plus ou moins déhiscentes à maturité en saisons sèche. Les capsules renferment généralement 3 graines de couleur marron clair, marron rouge ou gris tacheté de blanc **[40].**

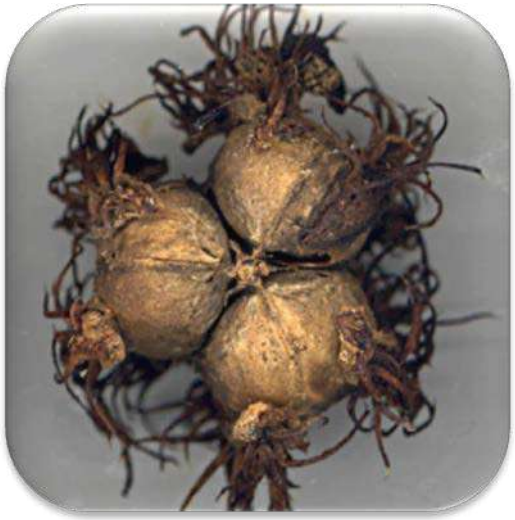


Figure II.3 : Capsules tricoques de ricin **[40]**

❖ **Graines**

Sont contenues dans chacune des loges du péricarpe, ont presque la forme d'un haricot moyen, sont piriformes, ovoïdes, allongées ou plates, luisantes marbrées de gris rougeâtre et de blanc. A l'intérieur de la graine se trouve une amende oléagineuse qui est très toxique **[46].**



Figure II.4 : Graines de ricin **[41]**

II.3.4. Modes d'application

Etant donné leur stabilité de manipulation, les lipases peuvent être utilisées sous différentes formes par exemple, comme enzyme naturelle, immobilisée par liaison covalente, absorbée sur des résines échangeuse d'ions ou des fibres creuses. Elles peuvent être également chimiquement modifiées avec du PEG (polyéthylène glycol). Enfin, elles sont compatibles avec des solvants organiques, biphasiques et aqueux **[18].**

II.4. Immobilisation des lipases

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation des produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des

processus médicinaux 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 **[47].**

De nombreuses méthodes d'immobilisation sont connues, dont les principales sont **[48]**:

-Immobilisation par liaison

-Inclusion

-Réticulation

Les différentes techniques d'immobilisation découlant des trois principales méthodes d'immobilisation sont résumées par le schéma II.01.

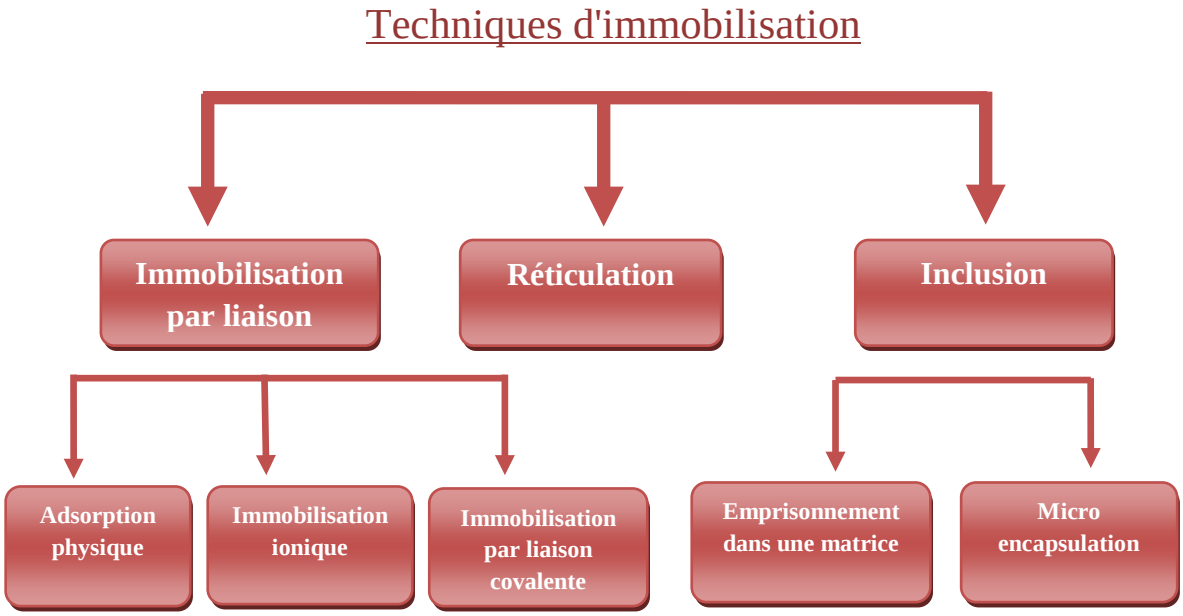


Figure II.5: Schéma des différentes techniques d'immobilisation **[43].**

II.4.1. Immobilisation par liaison :

C'est la plus ancienne méthode d'immobilisation. Elle consiste en la rétention d'enzyme sur une phase insoluble dans l'eau par une liaison chimique ou physique. Dans cette méthode la quantité d'enzyme retenue et l'activité sont extrêmement variables et sont

évidement fonction de la nature de support. Selon le mode de couplage, ce procédé peut être classifié de trois manières **[49]:**

- Immobilisation par adsorption physique
- Immobilisation par liaison ionique
- Immobilisation par liaison covalent

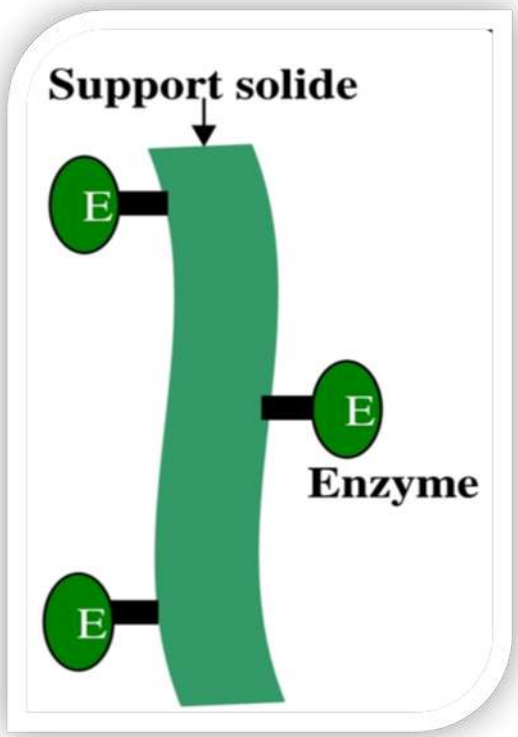


Figure II.6 : Immobilisation par liaison **[44].**

- **<u>Adsorption physique</u>**

L'adsorption physique demeure la méthode la plus simple et la plus rentable [**50**]. Dans ce procédé, l'enzyme est retenue à la surface d'un corps adsorbant minérale ou organique grâce à différents types de liaisons : interactions de Vander Wals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, transfert de charge, échange de ligands, chimiosorption.

Cette technique est simple, réversible, mais la fixation n'est pas spécifique et les risques de désorption sont importants [**51**].

- **Immobilisation ionique**

Les enzymes portent, par leurs résidus d'acide aminé, des charges ioniques. Elles peuvent donc se prêter aux phénomènes d'échange d'ion .Ces interactions seront très dépendantes du pH du milieu en raison du caractère amphotère des résidus d'acide aminés .La différence principale entre l'immobilisation par adsorption et l'immobilisation ionique est que la force de liaison entre le support et l'enzyme est beaucoup plus forte pour cette dernière .Différents polysaccharides et polymères synthétiques ayant des centres d'échange d'ion sont habituellement utilisés comme supports **[43].**

- **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.

La lipase de *Candida rugosa* a été immobilisée par liaison covalente sur les billes de chitosan dont les groupements hydroxyles ont été préalablement activés par le carbodiimide **[52].**

La lipase du pancréas de porc a été immobilisée sur polyacrylamide activé par le carbodiimide et a ainsi été appliquée à l'hydrolyse de l'huile d'olive **[53].** Le glutaraldéhyde (dialdéhyde comportant cinq atomes de carbone) est également utilisé pour former des liaisons covalentes. C'est un liquide visqueux et incolore qui se présente normalement en une solution aqueuse limpide et incolore. Pour l'immobilisation par liaison covalente, le glutaraldéhyde ayant deux sites réactifs, va servir de pont entre les

fonctions -NH2 du support et de l'enzyme. Les films de chitosan activés par le glutaraldéhyde ont été utilisés pour l'immobilisation de la lipase de *Candida cylindracea* et de *Syncephalastrum racemosum* **[54].**

II.4.2. Réticulation

En traitant un enzyme par un agent chimique hydrosoluble bi fonctionnel et susceptible de réagir sur les groupements fonctionnels libres de celui-ci, on obtient un réseau enzymatique tridimensionnel insoluble (**figure II.9)**. Le glutaraldehyde est un agent de réticulation parmi les plus utilisés.

Cette méthode a l'avantage de fournir des dérivés insolubles constitués presque exclusivement d'enzyme. Malheureusement les produits sont gélatineux est difficile à filtrer et leur propriétés mécaniques sont médiocre. En outre une très importante perte d'activité enzymatique accompagne la réticulation **[55].**

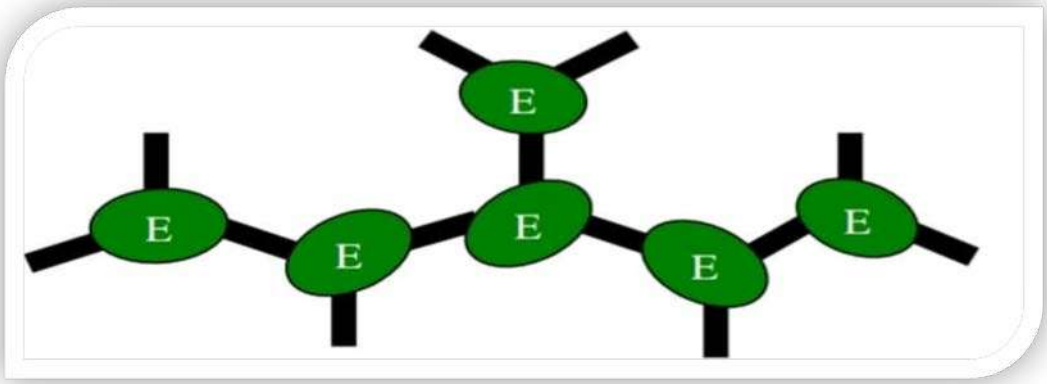


Figure II.7. Immobilisation par réticulation **[50].**

II.4.3. Inclusion

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière dans la matrice d'un polymère ou dans une micro capsule .Plusieurs polymères, entre autre l'alginate, le chitosan, le gel de polyacrylamide et le gel d'amidon sont utilisés.

- **<u>Immobilisation par Micro encapsulation</u>**

L'enzyme en solution aqueuse est enfermée dans des micro capsules sphériques, dont la paroi est une membrane semi-perméable qui peut être liquide ou solide (**Figure II.10**).Cette membrane retient l'enzyme mais laisse passer le substrat et le produit **[56].**

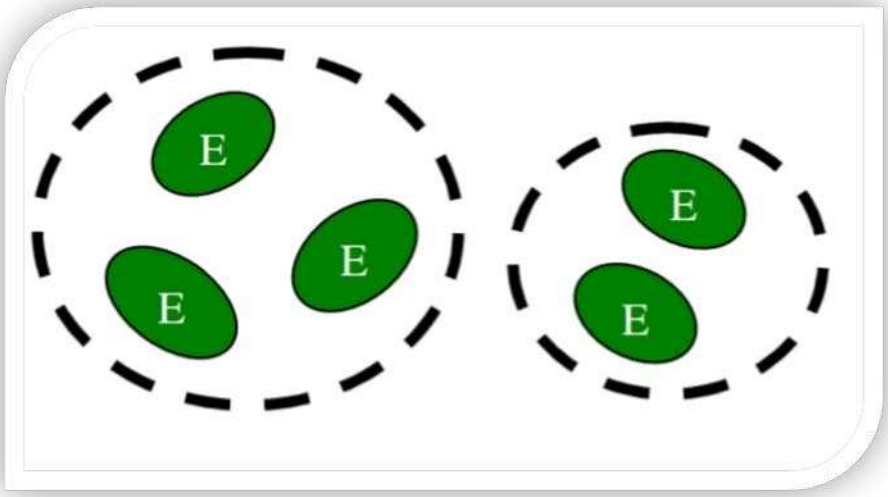


Figure II.8 : Immobilisation par Micro encapsulation **[51]**

- **Emprisonnement sur une matrice**

L'enzyme est dissoute dans une solution aqueuse d'un monomère et d'un réticulant .la polymérisation est ensuite effectuée à des conditions moins dénaturantes possibles, on obtient un réseau macro moléculaire tridimensionnel dans les mailles duquel l'enzyme se trouve retenu de façon plus ou moins efficace .Cette technique est simple et très utilisée pour diverses enzymes, mais les risques de fuite ne sont pas négligeables, si les mailles du réseau sont larges .De plus on observe souvent une dénaturation importante de l'enzyme due à une réaction du polymère avec les groupes fonctionnels responsables de la protéine **[51].**

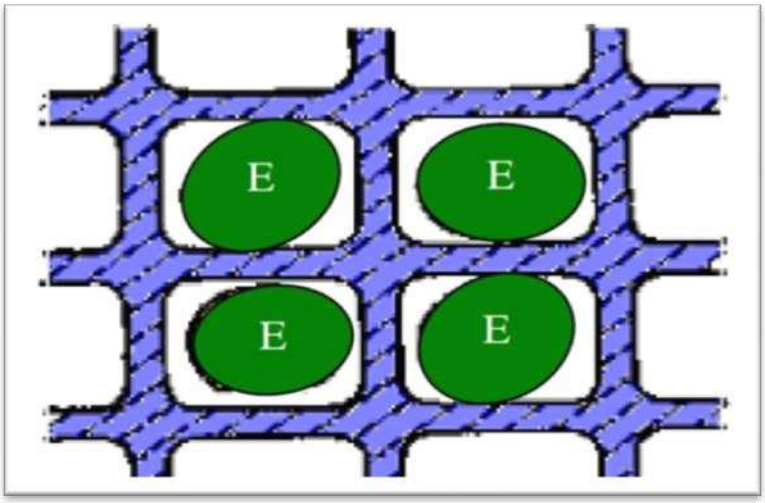


Figure II.9 : Emprisonnement dans une matrice **[51].**

II.4.4. Objectifs de l'immobilisation des enzymes

L'immobilisation d'une enzyme sur ou dans une structure solide condensée répond à deux objectifs principaux. En premier lieu, une enzyme étant un catalyseur, il est très important de pouvoir la séparer des substrats et des produits de réaction afin d'assurer un recyclage efficace. L'intérêt est évident dans l'optique d'un procédé réactionnel continu. Le deuxième avantage généralement admis est la stabilisation de la protéine**. [57,58].**

En particulier lors de sa fixation par liaison covalente à un support. De plus lorsqu'on met en œuvre des protéases, l'immobilisation permet de diminuer les phénomènes d'hydrolyse mutuelle des enzymes (autolyse) qui conduit à leur inactivation rapide en phase homogène. **[59,60].**

III. ESTERS DE SUCRE

III.1. Définition

Le terme sucroester regroupe l'ensemble des produits obtenus par réaction entre un sucre et un ou plusieurs acides gras **[61].**

Les sucres constituent sans aucun doute une matière première polaire de choix pour l'élaboration de biotensioactifs. Leur point commun est de posséder un nombre important de fonctions hydroxyles participant à la formation de réseaux de liaisons hydrogène en présence d'eau. Selon leur famille (hexose ou pentose) et/ou leurs poids moléculaires (mono-, di-, tri-,oligo- ou polysaccharides) **[62].**

III.2. Voies de synthèse des sucroesters

Les esters des sucres et d'acide gras sont des surfactants biodégradables et non toxiques dont des applications touchent a des domaines variés : industrie agroalimentaire, cosmétiques, détergents, pharmaceutiques, pesticides,…la synthèse de ces molécules peut être réalisé par voie chimique ou enzymatique **[63].**

III.2.1. Synthèse par voie chimique

La synthèse chimique des esters de sucre fut pour la première fois réalisée par Herzfeld dans les années 50 **[64]** .D'un point de vue général, la réaction envisagée est une estérification (**Figure III.1**) ou une transestérification réalisée à haute température (90 °C) en présence d'un catalyseur alcalin, dans différents solvants polaires tels que le DMSO ou

le DMF **[65].** Les substrats nécessaires sont tout d'abord la source de sucre et ensuite un chlorure ou un anhydride d'acide gras.

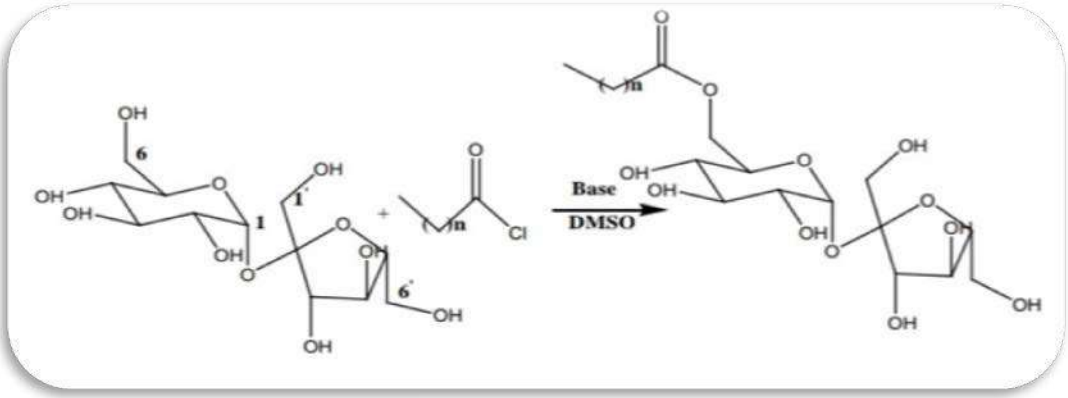


Figure III.1 : Synthèse des esters de saccharose **[66].**

Un autre exemple donné sur la **(figure III.2)**, est celui de la transestérification chimique du saccharose.

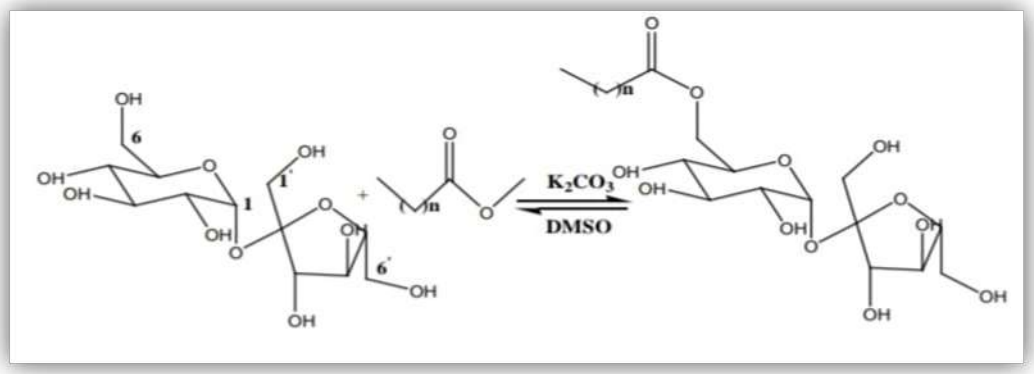


Figure III. 2 : Transésterification chimique du saccharose **[67].**

L'estérification du (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose (**Figure III.3**) a été réalisée en présence du chlorure d'un décènoyle et de triéthylamine dans le dichlorométhane pendant 20h pour donner un mélange α/β (30/70) d'un déc-10'-ènoyl (2,3,4-tri-O-acétyl)-Dxylopyranoside avec un rendement de 88% **[68].**

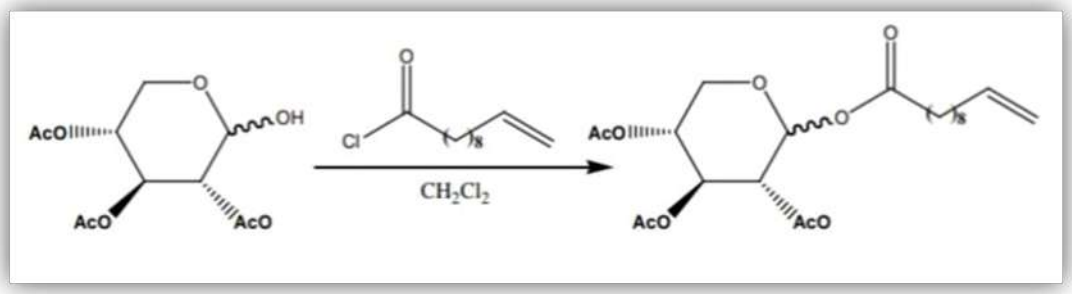


Figure III.3: Estérification chimique du (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose**[58]**

Cependant, la voie chimique rencontre plusieurs problèmes :

- Obtention de sous-produits indésirables (provoquant parfois une coloration).
- La toxicité des solvants utilisés.
- La caramélisation du mélange qui est due à l'élévation de la température.
- La faible sélectivité : Ce type de synthèse ne permet de contrôler ni le site de réaction, ni le nombre de groupements hydroxyles qui seront estérifiés **[69,70,71].**

III.2.2. Synthèse par voie enzymatique :

Ces dernières années, une alternative a été évoquée par de nombreux groupes de recherche l'utilisation d'enzymes afin d'orienter les réactions de synthèse **[72].**L'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions de synthèse permet de cibler le site de réaction et aussi d'opérer dans des conditions plus douces, limitant ainsi les réactions secondaires comme la caramélisation. Les seuls contaminants présents suite à la synthèse enzymatique sont le sucre et l'acide gras résiduels **[73].**

Le principe de la synthèse enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase) dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, l'activité de la lipase est inversée, passant de l'hydrolyse à l'estérification **[67]** .La biocatalyse permet d'envisager la production sélective de structures complexes et originales **[10].**

De nombreux essais de synthèse d'esters de sucres par voie enzymatique ont été réalisés à l'échelle du laboratoire, citons quelques exemples : La **(figure III.4)** illustre l'acylation enzymatique du D-glucose avec le vinyle caprylate catalysée par la lipase du *Candida antartica* B (CAL B) dans l'acétone, avec un rendement de 67% **[74].**

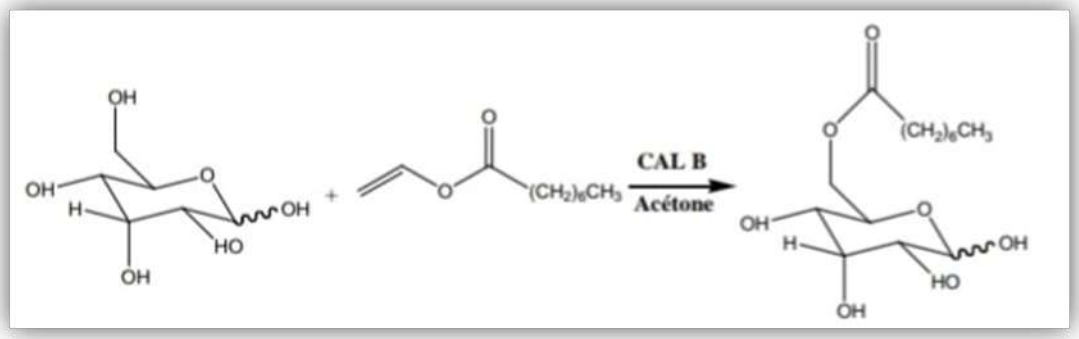


Figure III.4 :Transésterification enzymatique du lactose **[70].**

Razafindralambo et coll. ont réalisé l'estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique en présence de la CAL B **[75]** comme nous le montre la **(Figure III.5)** suivante :

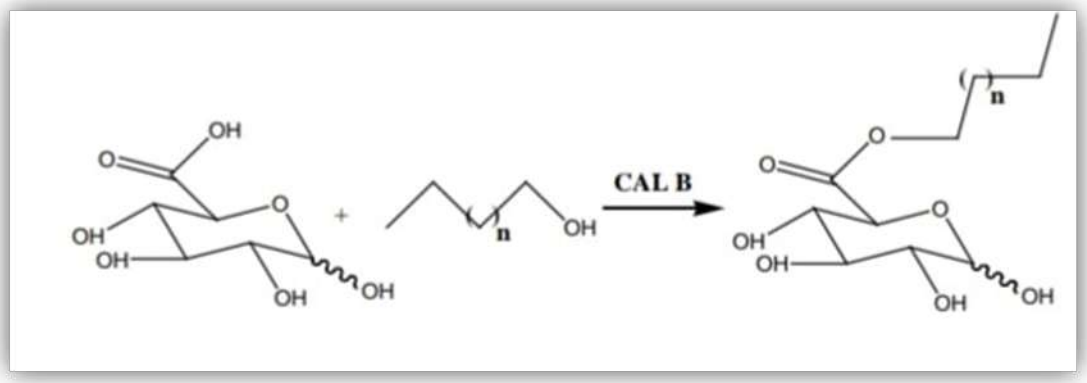


Figure III.5 : Estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique **[71].**

La voie enzymatique se distingue par plusieurs avantages qui sont la sélectivité, les conditions de réaction douces, la purification aisée, la composition du produit définie.

L'avenir de la synthèse par voie enzymatique semble assuré, mais cela n'empêche pas qu'elle présente des inconvénients qui sont :

- Synthèse couteuse au niveau industriel.
- Problèmes de solubilité des substrats.
- Rendements forts variables.
- Temps de réaction longs (>24h) **[10].**

III.3. Caractéristiques générales des sucroesters

Les esters de sucre synthétisés à partir des sources renouvelables peu coûteuses et facilement disponibles telles que les acides gras et les sucres. Ils constituent un groupe intéressant de tensioactifs non ioniques **[76,77].**

En contrôlant le degré d'estérification et la nature de l'acide gras et du sucre, il est possible de synthétiser une large gamme d'esters de sucres ayant des caractéristiques fonctionnelles, notamment les valeurs HLB, bien déterminées en vue d'une ou de plusieurs applications spécifiques **[78].**

Ceci peut être réalisé en faisant varier **[79] :**

- la longueur de chaîne alkyle des groupes acyle.
- le nombre de groupes ester par molécule.
- le degré d'instauration des chaînes acyle.

Les esters de saccharose ont une valeur de HLB très élevée, d'excellentes propriétés physiques et une bonne activité de surface. Les sucroesters ont été étudiés pour posséder une activité de stabiliser des émulsions, comme le laurate de saccharose et le palmitate de saccharose ont la capacité de stabiliser les émulsions H/E **[72].**Les sucroesters sont produits par transestérification d'un sucre avec des esters éthyliques d'acides gras ou par estérification entre un sucre et un acide gras **[1]**. Outre leurs propriétés émulsifiantes, ils ont des propriétés stabilisantes, détergentes et moussantes. Ils sont complètement biodégradables, inoffensifs pour l'environnement, non toxiques, compatibles avec la peau, sans odeur et sans goût **[80].**

III.4. Domaines d'applications des sucroesters

III.4.1. Domaine agro-alimentaire

La large gamme de structures des esters de saccharose leur confère un avantage fonctionnel important. Ils sont utilisés sous les codes E473 et E474 comme additifs dans une gamme de produits allant du café liquide conditionné aux chewing-gum en passant par les produits de boulangers et des boissons.**[81,82].**

Les intérêts applicatifs sont par exemple **[83]**:

- l'émulsification et la dispersion des arômes dans la formulation de chewing-gum

- la préparation plus facile des cakes et permettent d'accroître le volume du produit
- l'amélioration d'émulsion dans les laits concentrés et les boissons lactées
- ou encore l'inhibition de la précipitation des protéines lors de la stérilisation des laits de soja.

III.4.2. Domaine pharmaceutiques et médicales :

L'emploi des esters de sucres en tant qu'agents émulsifiants dans l'industrie pharmaceutique est favorisé par l'innocuité envers la peau et les muqueuses. Ces molécules à l'inverse des émulsifiants polyéthoxylés, ne réduisent pas l'activité des composés phénoliques et antibiotiques. La synthèse d'esters de sucres est également valorisable dans le domaine médical. Battaglia et collaborateurs **[84].** Exploitent l'existence de transporteur de glucose dans le sang : en greffant sur le glucose l'acide Kynurénique, la migration de ce dernier du sang vers le cerveau est améliorée. Cet acide possède un potentiel anti convulsant. Il a également été démontré que des esters de sucres et l'acide valproïque permettent de réduire l'intensité des crises d'épilepsie **[85].**

Exemple: Il a notamment été montré que les microémulsions stabilisées par des sucroesters constituent d'intéressants auxiliaires dans le transport transdermiques **[86].**

III.4.3. Domaine des cosmétiques :

Les sucroesters intéressent les chercheurs tout d'abord en raison de leur innocuité. En effet, ils sont facilement métabolisables, biodégradables, n'induisent pas d'allergies et ne provoquent aucune irritation de la peau ou des yeux. De plus, contrairement à d'autre composés, ils ne détruisent pas les lipides superficiels de la peau et ne perturbent que transitoirement ses constantes, notamment le pH.

Leur neutralité vis-à-vis des tissus constitue un avantage par rapport aux surfactants ioniques auxquels on peut facilement les combiner, ce qui permet de diminuer le caractère agressif de certaines formulations (comme par exemple les shampoings « ne piquant pas les yeux »).

Ainsi ils sont particulièrement indiqués dans la formulation des démaquillants, des produits de soins pour la peau, les lèvres et le contour des yeux, ainsi que dans les produits de soins pour bébés [**87**].

Partie expérimentale

IV.INTRODUCTION

Dans notre étude nous avons utilisé comme biocatalyseur une enzyme végétale, la lipase de *Ricinus communis* L. L'utilisation de cet enzyme pour réaliser la conversion d'un mélange d'un acide gras et un sucre en esters de sucres par une réaction d'estérification ou de transestérification est encore au stade de la recherche. L'objectif principal de cette étude est de réaliser le procédé d'acylation du sucre et de choisir les conditions les plus favorables afin d'obtenir le rendement maximal.

Pour cela, il nous a apparu judicieux après avoir extrait et purifié la lipase de *Ricinus communis*, de la conditionner en l'immobilisant dans un support afin de préserver son activité, faciliter la séparation du produit (ester de sucre) et voir enfin la possibilité de sa réutilisation dans le but de rentabiliser le procédé. La détermination des conditions optimales de la réaction de synthèse sera suivie par la séparation et la purification du produit synthétisé afin de pouvoir déterminer les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'ester de sucre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV.1. Matériels et réactifs :

A. Appareillages :

En plus de la verrerie de laboratoire de chimie, les différents matériels utilisés lors de cette étude sont présentés dans le **(tableau IV.1).**

Tableau IV.1 : Appareillages utilisés.

Appareil	Photo	Type et emploi
Balance électronique		**Type:**KERN **Emploi:** Pour faire la pesée des réactifs.
Agitateurs		**Type:** UC152-stuart **Emploi:** Agitation des milieux réactionnels.
Centrifugeuse		**Type:** Hettich EBA 20 **Emploi:** Centrifugation des préparations
Spectromètre IR		**Type** : FTIR 8400 SHIMADZU FOURIER transform infrared spectrophotometre
Spectromètre RMN		**Type** :Bruker Avance 300 MHz

IV.2.Produits utilisés

Les réactifs utilisés dans ce travail sont:

• **Enzyme**

La lipase (EC .3.1.1.3) utilisée est de source végétale extraire à partir les graines de ricin (*Ricinus communis* L). La méthode d'extraction et de purification est décrite dans le paragraphe **IV.2.**

Nous avons choisi les graines de ricin pour la production de lipase à la base des critères suivants:

- ✓ La disponibilité de la plante de *Ricinus communis L* (elle peut être cultivée à n'importe quel endroit du monde).
- ✓ Sa croissance végétale est très rapide et résiste aux conditions rudes de température et au stress hydrique.
- ✓ Possèdent un taux élève 40 à 60% en matière graisse (les lipases sont associées aux membranes lipidiques qui ce sont des petites organites intracellulaires stockent l'huile).
- ✓ Le ricin est une plante non alimentaire (pas de concurrence avec la culture alimentaire **[53].**

• **Réactifs :** un seul type de réaction enzymatique a été étudié dans ce travail, c'est la réaction de synthèse d'un sucroester. Selon ce type de réaction, on cite les réactifs utilisés :

Tableau IV.2 : Substances chimiques utilisées au cours de la synthèse de sucroester.

Produit	Fournisseur	Masse molaire (g/mol)
fructose	Riedel-de Haën	180.16
Acide oléique	Riedel-de Haën	282.46
Alginate de sodium	Louis François	198,1059
Chlorure de calcium	CHEM-LAB NV	147.02
Hydroxyde de sodium	CHEM-LAB	39,997

• **Solvants**

Le tableau **IV.3** présente les différents solvants utilisés :

Tableau IV.3: Différents solvants utilisés lors de cette étude.

Réactif chimique	Fournisseur
Acétone	Sigma-Aldrich
Tert-butanol	Fluka
Acétate d'éthyle	PA (Panreac)
Acétonitrile	Sigma-Aldrich

V. METHODES EXPÉRIMENTALES

V.1. Extraction et purification de la lipase

Dans notre travail, on utilise la lipase de *Ricinus communis* L, la préparation de cette enzyme passe par les étapes suivantes :

• **Décorticage** : Les graines sont couvertes d'une couche dure mais fine et facile à décortiquer à la main. Le concassage est réalisé manuellement.

• **Broyage** : Cette opération est réalisée juste avant l'extraction, les graines de ricin ont été broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier avec l'addition de l'eau distillée. On obtient ainsi un mélange pâteux.

• **Filtration** : Le mélange obtenu après le broyage à été filtré sur une gaze. Le filtrat obtenu est l'extrait brut de la lipase.

• **Purification** : La purification partielle de l'extrait brut de la lipase à été réalisée par précipitation à l'acétone à 4°C. Trois volumes d'acétone glacial sont versés goute à goute dans un volume de la solution aqueuse de lipase brut disposée sous agitation dans un bain glacé. Une fois l'acétone est totalement versée, le mélange (lipase brut-acétone) est laissé reposer dans le réfrigérateur pendant une heure [**88]**.

• **Séparation** : Après une heure le mélange forme un précipité blanc, sa récupération se fait dans des tubes à essais sont placés dans une centrifugeuse à 2000 tr/min pendant 3 min. Le culot récupéré à été séché à température ambiante, la poudre obtenue est la lipase

partiellement purifiée (**LPP**), qui doit être conservée sous des conditions la protégeant de la dégradation chimique et biologique, dans un récipient en verre fermé et enveloppé par l'aluminium **[2].**

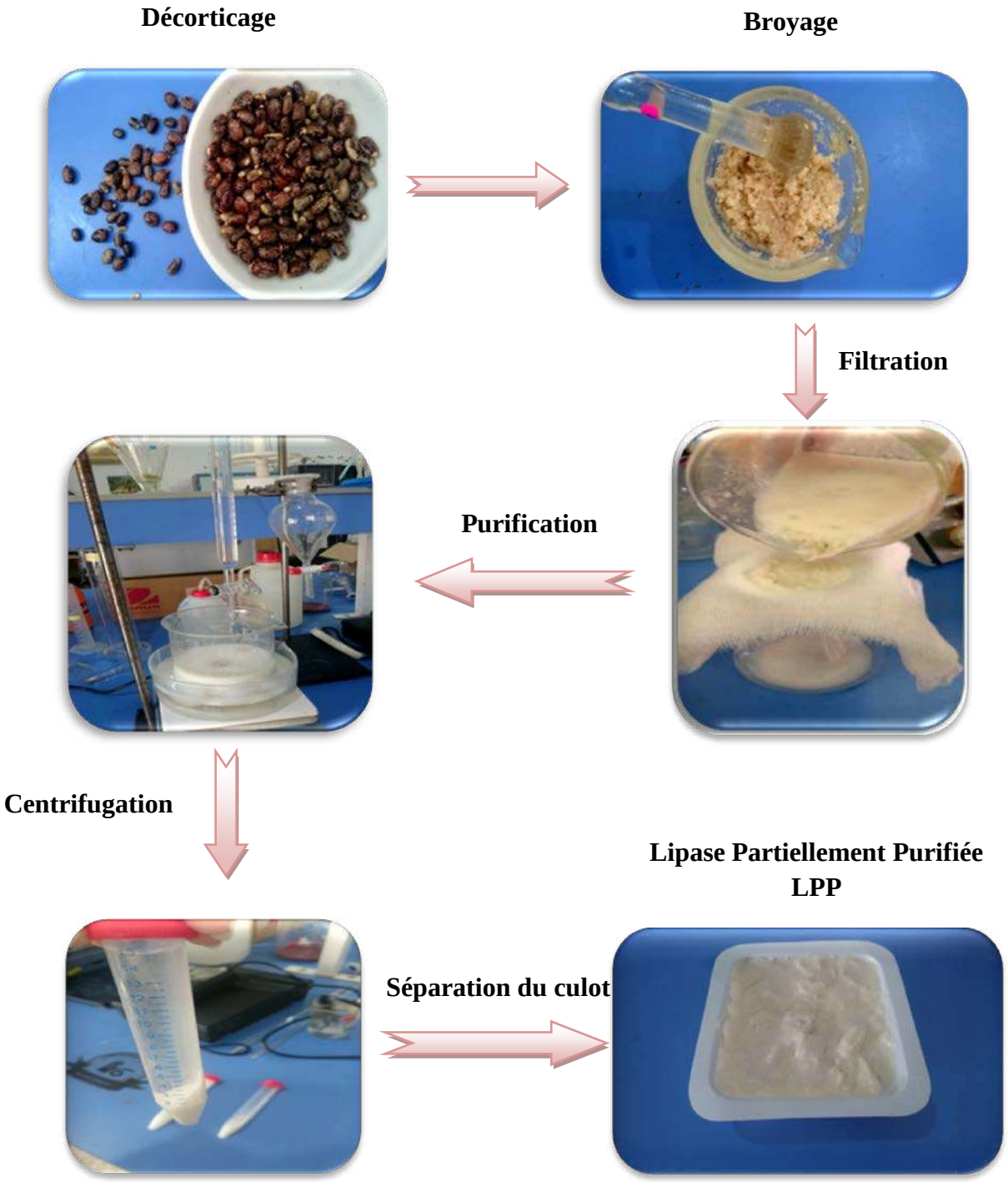


Figure V.1 : Protocol d'extraction et de purification de la lipase.

V.2. Préparation de la lipase immobilisée

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

L'emprisonnement des enzymes dans un polymère d'alginate est l'un des procédés classiques pour l'immobilisation des enzymes **[89]**.

Cette technique permet de prouver expérimentalement que les enzymes se retrouvent intactes en fin de réaction et sont donc réutilisables. L'alginate est un matériau non toxique, peu coûteux et polyvalent qui présente des propriétés thermostable et une stabilité enzymatique et des propriétés fonctionnelles améliorées.

Dans ce travail nous avons utilisé l'alginate de sodium pour immobiliser la lipase de ***Ricinus communis*** **L** en présence de cation de calcium (**Figure V.2**)

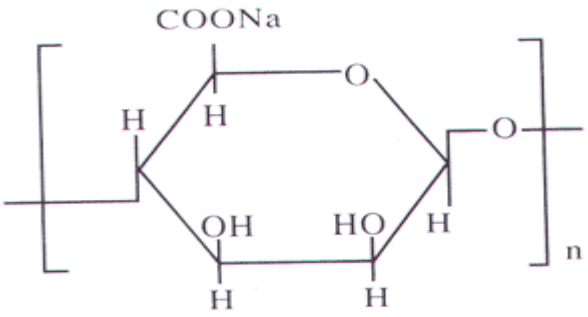


Figure V.2 : Structure d'alginate de sodium

La réticulation des molécules d'alginate de sodium en présence de l'ion calcium Ca2+ (nous avons utilisé le chlorure de calcium) crée la gélification du mélange (**Figure V.3**).

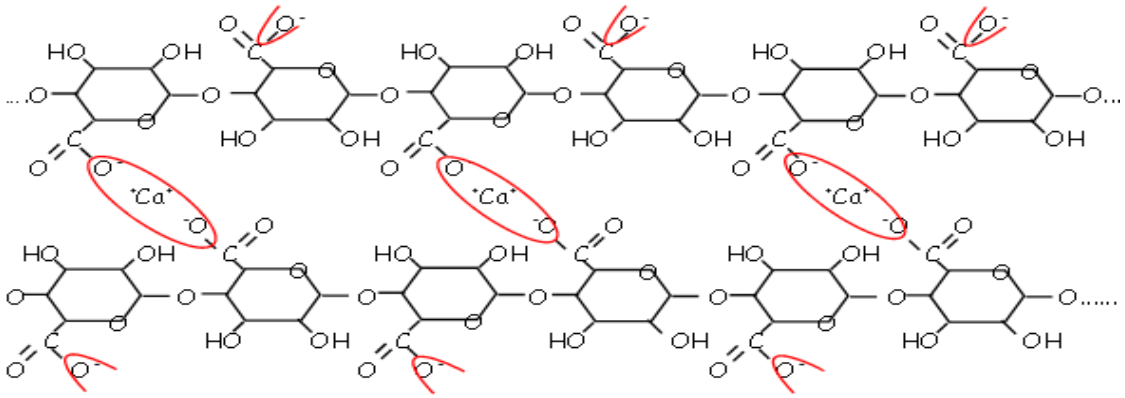


Figure V.3 : Structure du polymère alginate de calcium

L'immobilisation de la lipase sur un support permet de :

- Conserver l'activité de l'enzyme qui a tendance:
  - à diminuer après immobilisation du fait de possible gênes stériques et de limitations dans l'accessibilité au site actif.
  - à augmenter sa stabilité dans le temps.
  - Résistance aux conditions du milieu.
- la fixation solide au support, permettant des lavages répétitifs sans perte de l'enzyme.

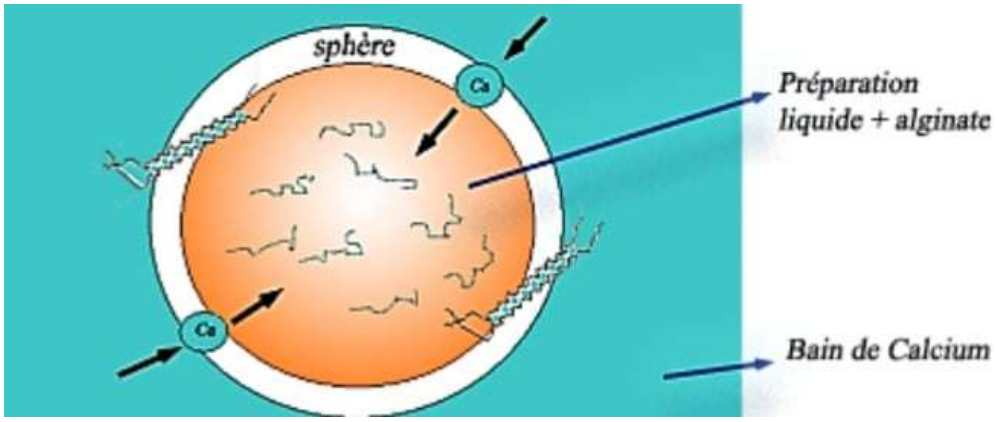


Figure V.4 : Schéma illustrant la sphérification des billes d'alginate dans la solution chlorure de calcium **[90].**

• Mode opératoire

Dans un bécher, on a dissous 0.1 g de la lipase partiellement purifiée **LPP** dans 10 ml de l'eau distillé, l'opération ce fait sous agitation et à température ambiante. Après la

dissolution complète de l'enzyme, 0.2g de l'alginate de sodium est ajoutée dans le mélange initial. Le mélange obtenu est maintenu sous agitation magnétique pendant une heure jusqu' à l'homogénéisation est laissé au repos pendant 30 min**.** À l'aide d'une seringue, on verse le mélange lipase/alginate goute à goute dans 50 ml d'une solution $CaCl_2$ (0.2M) maintenue sous agitation magnétique pour l'obtention des billes d'alginate de calcium. Après la récupération et le rinçage des billes, on les conserve dans une solution tampon pH=7 à 4°C dans un récipient en verre fermé par un bouchon en verre pour éviter la vaporisation du mélange **[2]**.

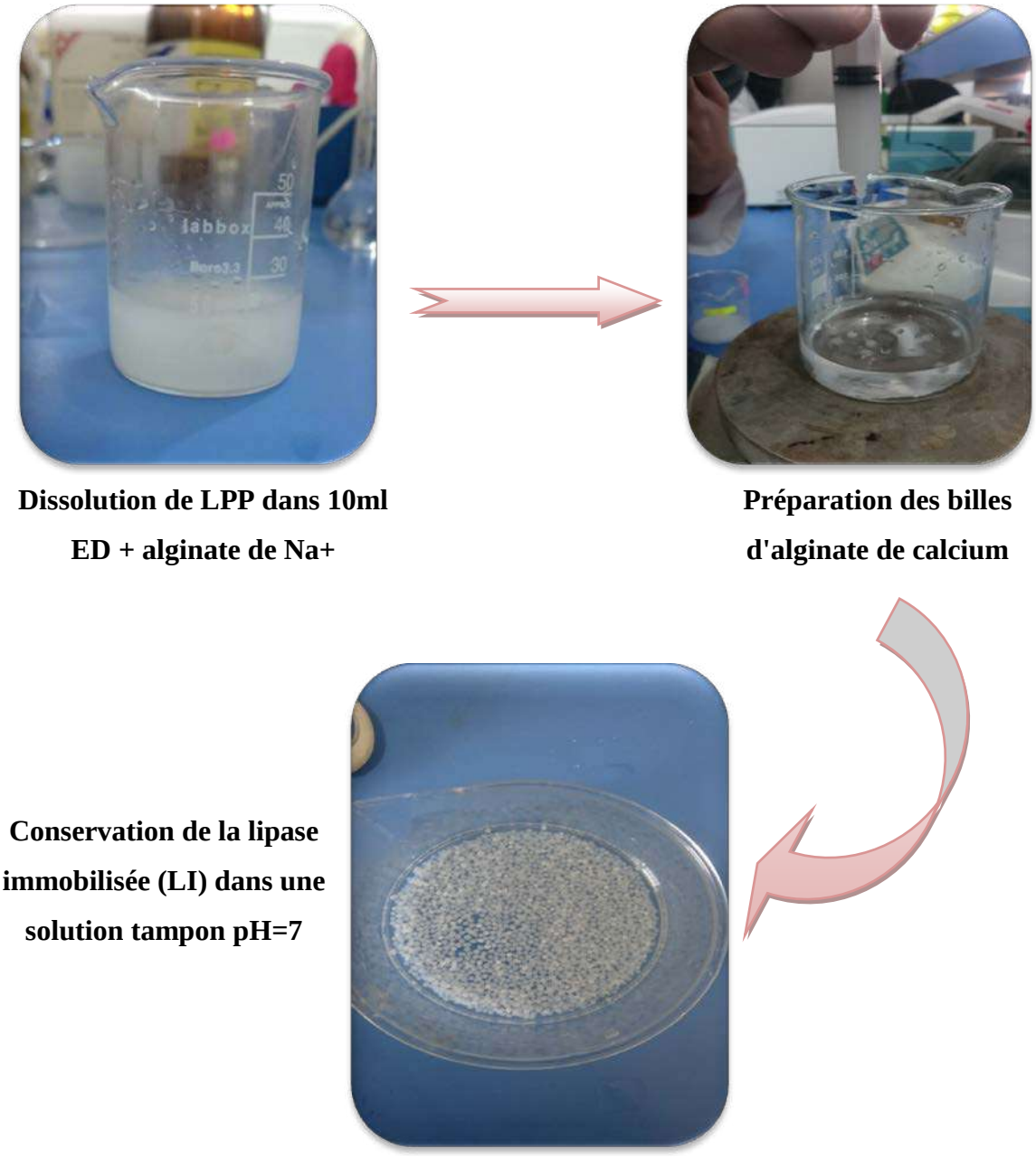


Figure V.5. Protocol d'immobilisation de la lipase dans l'alginate de sodium.

V.3. Synthèse d'un sucroester :

Les esters de sucre (sucroesters) sont des molécules amphiphiles résultant de l'acylation des sucres. Leur synthèse par la voie enzymatique est actuellement très répandue. L'utilité technologique des enzymes peut être grandement améliorée en les utilisant dans des solvants organiques. Les réactions catalysées par les enzymes dans les solvants organiques ont trouvé de nombreuses applications potentielles. Il est généralement admis qu'une enzyme placée dans un milieu organique exprime des nouvelles propriétés telles que l'augmentation de la thermo stabilité, la modification de la spécificité et surtout la capacité à catalyser des réactions impossibles cinétiquement et thermodynamiquement en milieux aqueux **[91,92,93,94]**. L'acylation dans les solvants organiques catalysées par des hydrolases présente un exemple de cette caractéristique **[95]**.

Dans le présent travail, on s'intéresse à la synthèse de l'oléate de fructose comme produit d'une réaction d'acylation de fructose par un donneur d'acyle qui est l'acide oléique (**Figure V.6**) en présence de la lipase du *"Ricinus communis* L*"* immobilisée dans l'alginate de sodium en milieu organique.

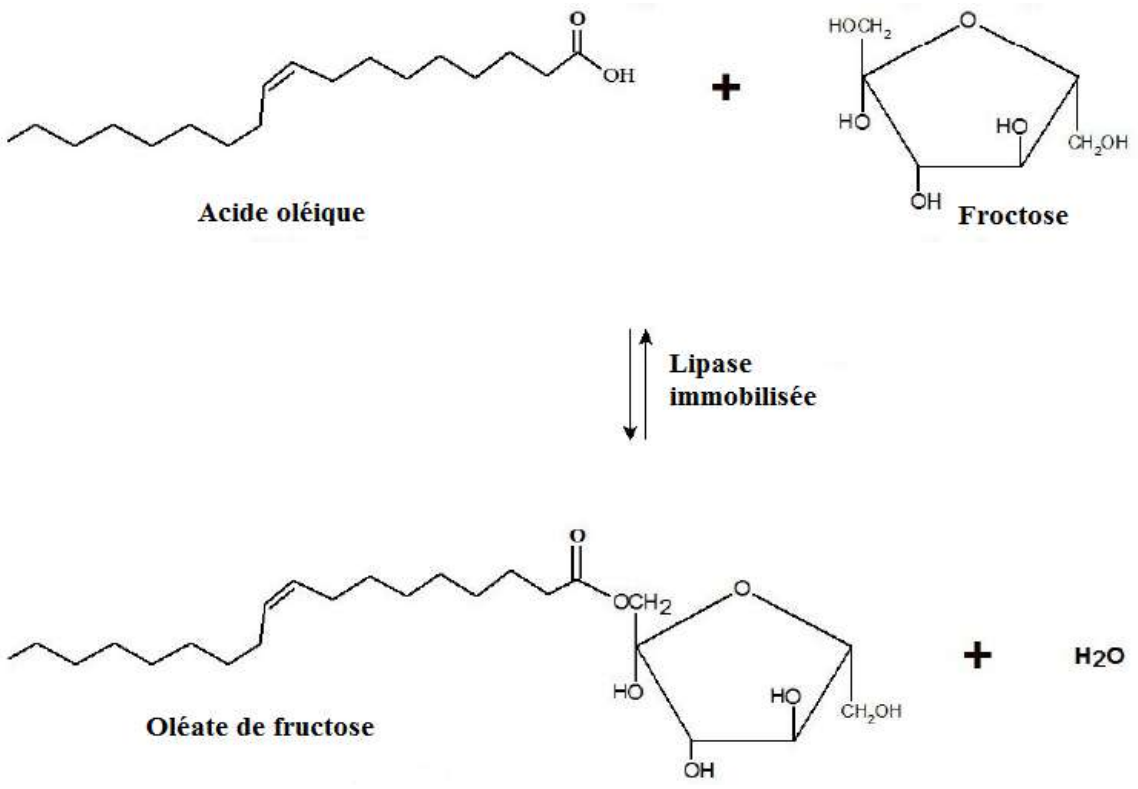


Figure V.6 : Acylation de fructose.

Dans le but de maximiser le rendement d'acylation, on a étudié les effets de divers paramètres tels que la nature du solvant organique, la température, le temps, la teneur de l'eau et l'activité enzymatique de la lipase afin de déterminer les conditions optimales.

V.3.1. Optimisation de la synthèse de l'oléate de fructose :

De nombreuses expériences ont été réalisées pour synthétiser un ester de fructose. Pour avoir un rendement élevé en oléate de fructose, les paramètres du procédé ont été optimisés. La méthodologie expérimentale classique vise à modifier un facteur indépendant, tout en maintenant les autres facteurs constants, mais cette méthode est très limitée, car elle demande beaucoup de travail et de temps, et ignore les interactions entre les différents facteurs. Pour éviter cette limitation, la conception d'expériences semble être une technique très prometteuse **[96]**. L'optimisation de tous les paramètres peut être faite par une conception expérimentale statistique en utilisant le logiciel ″**MODDE 6**″ qui possède les avantages de réduire le nombre d'expériences et de prendre en compte les interactions entre les facteurs. En utilisant cette conception, il est possible de déterminer les conditions optimales de fonctionnement.

- **Mode opératoire général :**

Dans un erlenmeyer fermé par un bouchon en verre, on a dissous un mélange équimolaire d'acide oléique et de fructose (0.5 mmole) dans 5 ml de solvant organique (acétone, tert-butanol, acétate d'éthyle et acétonitrile). L'activité de l'eau initiale du mélange réactionnel a été ajustée à 0. Le mélange réactionnel est agité grâce à un agitateur magnétique (400 rpm) pendant 30 minutes à 25 °C après l'addition de la lipase immobilisée.



Figure V.7 : Montage de synthèse d'oléate de fructose.

Après le choix de la nature de solvant et afin d'améliorer le rendement d'acylation, plusieurs facteurs ont été optimisés pour trouver les conditions réactionnelles optimales : Quatre facteurs ont été étudiés simultanément qui sont respectivement : **la température (T)**, **le temps de réaction (t)**, **l'activité de l'eau : (a_w)** et **la masse de la lipase immobilisée :** (m_{LI}). Le Tableau **V.1** résume les différents facteurs et leurs niveaux respectifs. L réponse mesurée est : le rendement d'acylation.

Tableau V.1: Variables indépendantes et leurs niveaux.

Facteurs	**Niveaux**	
	-1	**+1**
X1 **: T (°C)**	25	40
X2 **: t (min)**	30	120
X3 **: a_w**	0	0.3
X4 **: m_{LI} (g)**	3	12

V.3.2. Mise en œuvre du plan d'expérience:

Un plan factoriel complet à deux niveaux a été choisi : plan 2^k (k: nombre de facteurs). Cela correspond à 16 expériences.

Tableau V.2: Plan d'expérience utilisé pour obtenir le point optimale.

Essai	T (◦ C) = X1	a_w = X2	tem= X3	m_e = X4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1

❖ **Rendement d'acylation**

La progression de la réaction d'acylation a été suivie par détermination de la conversion d'acides gras qui a été estimée par une méthode titrimétrique en utilisant l'hydroxyde de sodium (0,1 M) en présence de phénolphtaléine **[69]**. Des tests blancs ont également été réalisés sous les mêmes conditions en l'absence d'enzyme. Le rendement d'acylation a été calculé comme le pourcentage de conversion d'acides gras comme suit (**Eq V.1)**:

$$\text{Conversion d'acide gras } (\%) = \frac{n_t - n_e}{n_i} * 100 \ (\mathbf{V.1})$$

Où

n_t : nombre de moles d'acide gras du témoin (mmole).

n_e : nombre de moles d'acides gras de l'essai (mmole).

n_i : nombre de moles initiale d'acide gras (mmole).

V.4. Caractérisation structurale de l'oléate de fructose

Pour identifier et confirmer le composé synthétisé, des analyses FTIR et RMN ont été réalisées :

V.4.1. FTIR :

Après la séparation de produit synthétisée (oléate de fructose) par centrifugation à 2000 tr/min pendant 5 min, l'analyse des groupements chimiques de l'oléate de fructose a été effectuée en utilisant des spectres FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy). C'est une technique spectroscopique basée sur l'absorption de photons infrarouges qui excitent les vibrations des liaisons moléculaires. Le spectre a été enregistré à l'aide d'un spectromètre Shimadzu FTIR-8300 de 4000-400 cm^{-1}.

V.4.2. RMN :

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique analytique puissante qui peut révéler des informations structurelles sur de nombreuses molécules organiques et inorganiques.

Les spectres RMN du proton « ^{1} H » de tensioactifs synthétisé (oléate de fructose) a été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 300 MHz, l'échantillon a été dissous dans le DMSO.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

VI. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS :

VI.1. Choix du solvant adéquat :

Avant de se lancer dans la synthèse, il nous a semblé important de déterminer le meilleur solvant notamment au niveau de la solubilisation des substrats. Le problème associé à cette étude est que le solvant doit à la fois solubiliser le sucre (fructose) et l'acide gras (acide oléique). L'effet du type de solvant sur le rendement d'acylation est présenté dans la **figure VI.1**.

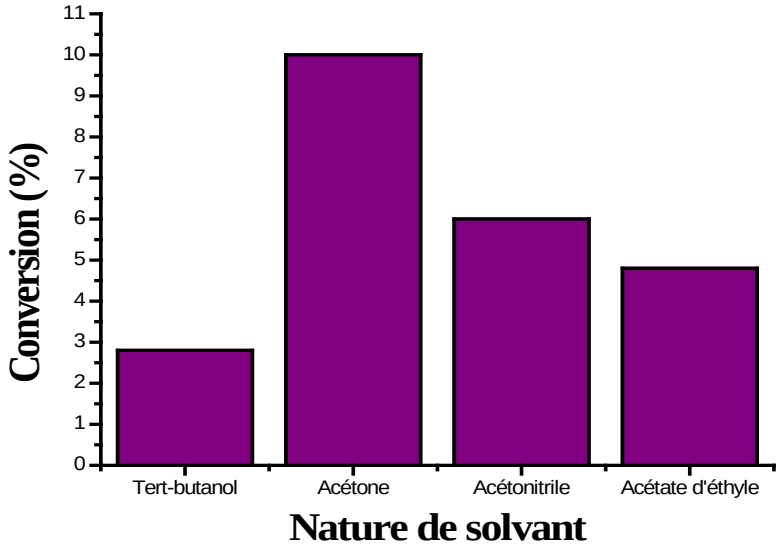


Figure VI.1: Effet de la nature de solvant sur le rendement d'estérification de l'acide oléique en présence de la lipase de ricin.

Conditions de la réaction: 0.5 mmol de fructose, 0.5 mmol d'acide oléique, aw=0, 400 rpm, t = 2 h et 0.1UI de lipase immobilisée dans 5 ml de solvant organique.

La conversion la plus élevée de l'acide oléique a été obtenue dans l'acétone, 10% après 30 minutes. Ces résultats peuvent être liés à plusieurs facteurs tels que la faible solubilité des sucres dans les solvants organiques apolaires. Ce résultat indique qu'un solvant organique approprié doit dissoudre suffisamment de substrat pour permettre à la lipase de catalyser l'estérification. Le transfert de matière solide-liquide. Est donc une étape limitante de la réaction. Plus de fructose solubilisé, plus l'oléate de fructose formé **[19].**

En outre, la plupart des enzymes sont rapidement inactivées ou précipités dans des solvants organiques hautement polaires, tels que l'acétone et l'éthanol qui sont capables de dissoudre des concentrations élevées de sucres et d'acides gras **[97].**

Donc l'acétone semble être le choix optimal car il présente une polarité modérée par rapport aux autres solvants et alors la lipase est moins désactivée.

VI.2. Optimisation de la synthèse de l'oléate de fructose

VI.2.1. Analyse statistique

La matrice d'expériences de la synthèse de l'oléate de fructose est donnée dans le Tableau VI.1. Le calcul des paramètres de modèle polynomiale de surface de réponse est effectué par la méthode de régression linéaire (MLR), la validation statistique de l'équation polynomiale générée par le plan d'expérience est établie sur la base de l'ANOVA.

En utilisant l'analyse de régression multiple, la réponse Y a été corrélée avec les quatre facteurs de conception en utilisant un modèle polynomial du second ordre selon l'équation (VI.1) :

$$Y=a_0 + \sum_{i=1}^{n} a_i X_i + \sum_{i,j=1\ i\neq j}^{n} a_{ij} X_i X_j \qquad (VI.1)$$

Où Y est la réponse, a_0, a_1 … sont les coefficients du polynôme et le produit X_iX_j représente les interactions entre les facteurs.

Le modèle de plan factoriel complet avec 4 facteurs est le suivant :

$$Y=a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{14}X_1X_4 + a_{23}X_2X_3 + a_{24}X_2X_4 + a_{34}X_3X_4 \qquad (VI.2)$$

Les coefficients de l'équation (VI.1) sont déterminés à partir le **tableau VI.1.**

Tableau VI.1: Tableau récapitulatif des expériences et résultats du plan d'expérience

Essai	T (◦ C) = X1	a_w = X2	tem= X3	m_e = X4	Rendement (%)
1	-1	-1	-1	-1	**10**
2	+1	-1	-1	-1	**38**
3	-1	+1	-1	-1	**25**
4	+1	+1	-1	-1	**33.2**
5	-1	-1	+1	-1	**25**
6	+1	-1	+1	-1	**34.4**
7	-1	+1	+1	-1	**36**
8	+1	+1	+1	-1	**52**
9	-1	-1	-1	+1	**72.4**
10	+1	-1	-1	+1	**79.6**
11	-1	+1	-1	+1	**46**
12	+1	+1	-1	+1	**73**
13	-1	-1	+1	+1	**93.2**
14	+1	-1	+1	+1	**90**
15	-1	+1	+1	+1	**96**
16	+1	+1	+1	+1	**90.4**

Le modèle de régression quadratique est donné par l'équation suivante :

$$R = 55.8938 + 5.44375 * T + 8.74375 * t + 0.556251 * a_w + 24.1812 m_e - 3.35625\, Tt + 0.256251 * Ta_w - 2.26875 * Tm_e + 3.40625 * ta_w + 3.58125 * tm_e - 4.28125 * a_w m_e \quad (VI.3)$$

D'après les résultats du modèle obtenu, il est clair que les quatre facteurs X_1, X_2, X_3 et X_4 présentent des effets positifs sur la réponse mais, ils ne sont pas les mêmes. On constate bien que l'effet de X_4 sur la réponse Y possède un effet majeur sur le rendement de synthèse. Tandis que l'effet de facteur X_2 sur le rendement de la synthèse est presque nul (**figure VI.2)**.

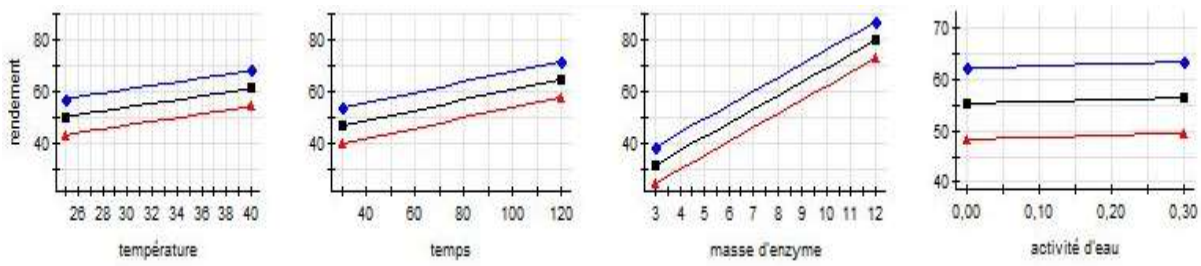


Figure VI.2 : Effets des différents facteurs sur la réponse

Une valeur positive des coefficients des équations représente un effet qui favorise l'optimisation par contre une valeur négative indique une relation inverse entre le facteur et la réponse. Effets des différents facteurs et interactions sur la réponse sont présentés dans la **figure VI.3**.

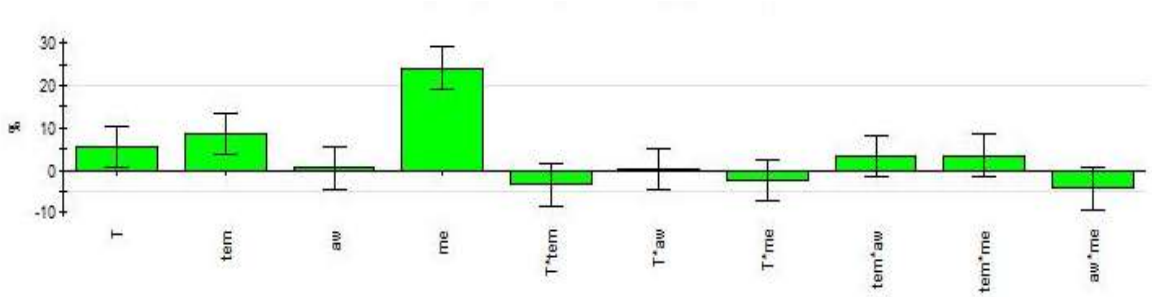


Figure VI.3 : Effets des différents facteurs et interactions sur la réponse

Les effets d'interaction de X_2X_3 et X_3X_4 sont favorables à la réponse Y, alors que les effets d'interaction X_1X_3, X_1X_4 et X_2X_4 présentent des effets négatif presque semblable la réponse.

La qualité de ce modèle et leur pouvoir de prédiction sont liés aux coefficients de variance. L'analyse de la variance permet de calculer le R^2 (le rapport de la somme des carrés des réponses calculées à la somme des carrées des réponses mesurée) **[98]**, elle donne une valeur élevée de R^2 (0,976) ce qui indique la bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et ceux prédits par le modèle choisi **(figure VI.4)**.

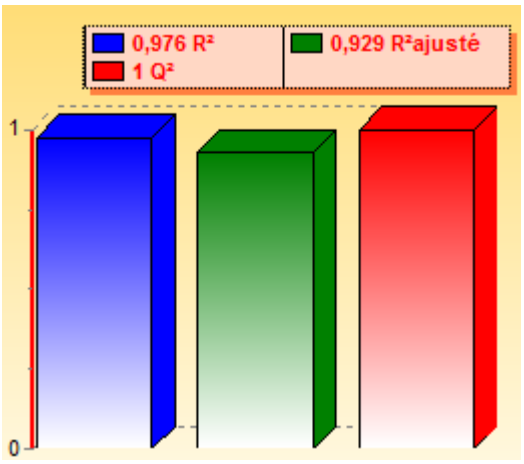


Figure VI.4 : Effets des différents facteurs et interactions sur la réponse

VI.2.2. Analyse des courbes en surface de réponses

L'effet des facteurs et leurs interactions sur la réponse peuvent être déduits par simulation. L'étude de l'interaction des facteurs X1, X2, X3 et X4 sur le rendement de conversion d'acide oléique, présenté par les surfaces de réponses **figure VI.5**, donne une relation proportionnelle entre ces facteurs et le rendement. Leurs L'augmentation engendre l'augmentation de la conversion d'acide oléique. Après le traitement des résultats par le logiciel **Modde 6,** les conditions optimales de la synthèse d'oléate de fructose sont les suivants : Température : 25 °C, temps : 120 min, Activité d'eau : 0 et la masse d'enzyme immobilisée : 12g avec un rendement maximal de 91,562%

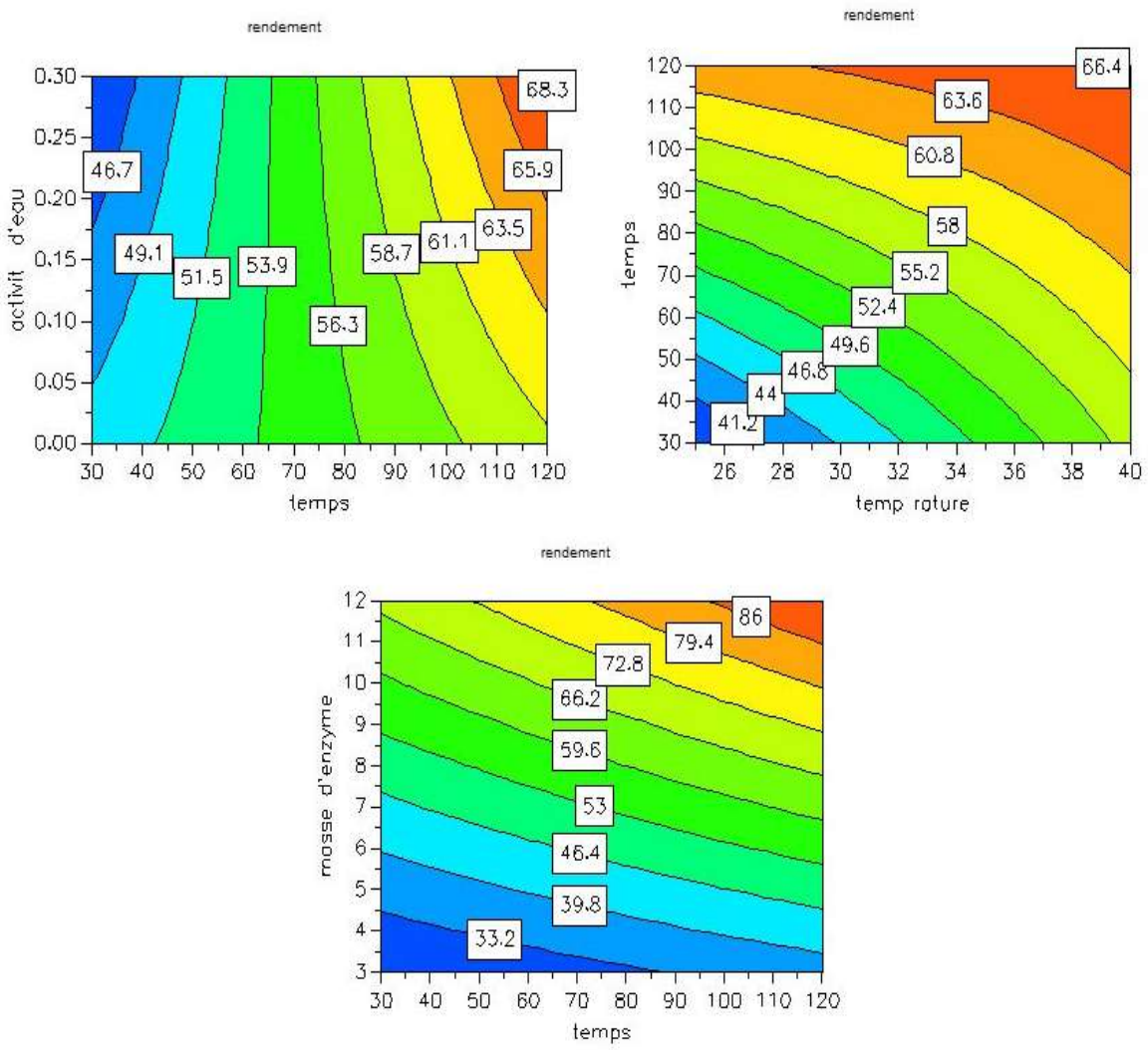


Figure VI.5 : surfaces de réponses des différents facteurs.

VI.3. Séparation du tensioactif synthétisé :

A la fin de la réaction, les billes d'alginate de calcium contenant l'enzyme ont été séparées du mélange réactionnel. La suspension a été titrée par l'hydroxyde de sodium (0,1 M) en présence de phénolphtaléine, afin d'éliminer l'acide oléique non réagi. Le mélange est laissé au repos afin de séparer le sucoester formé (oléate de fructose). Après un certain temps, le mélange est séparé en deux phases liquides immiscibles. Le tensioactif ou le sucroester synthétisé est un liquide de couleur jaune pâle insoluble a été séparé par centrifugation à 2000 tr/min pendant 5 min.

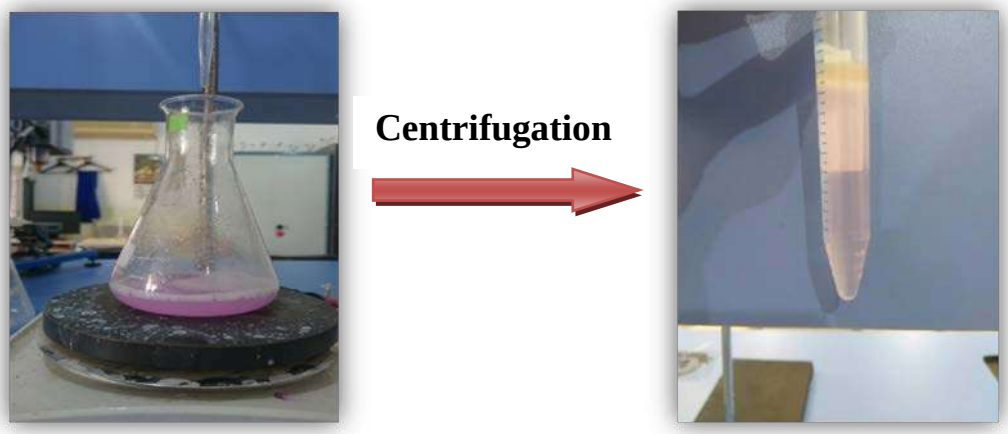


Figure VI.6 : Séparation d'oléate de fructose par centrifugation.

VI.4. Caractérisation structurale d'oléate de fructose par spectroscopie IR et ^{1}H-RMN

i) Spectroscopie IR

Le spectre FT-IR d'oléate de fructose synthétisé est présenté sur le **(figures VI.2)**

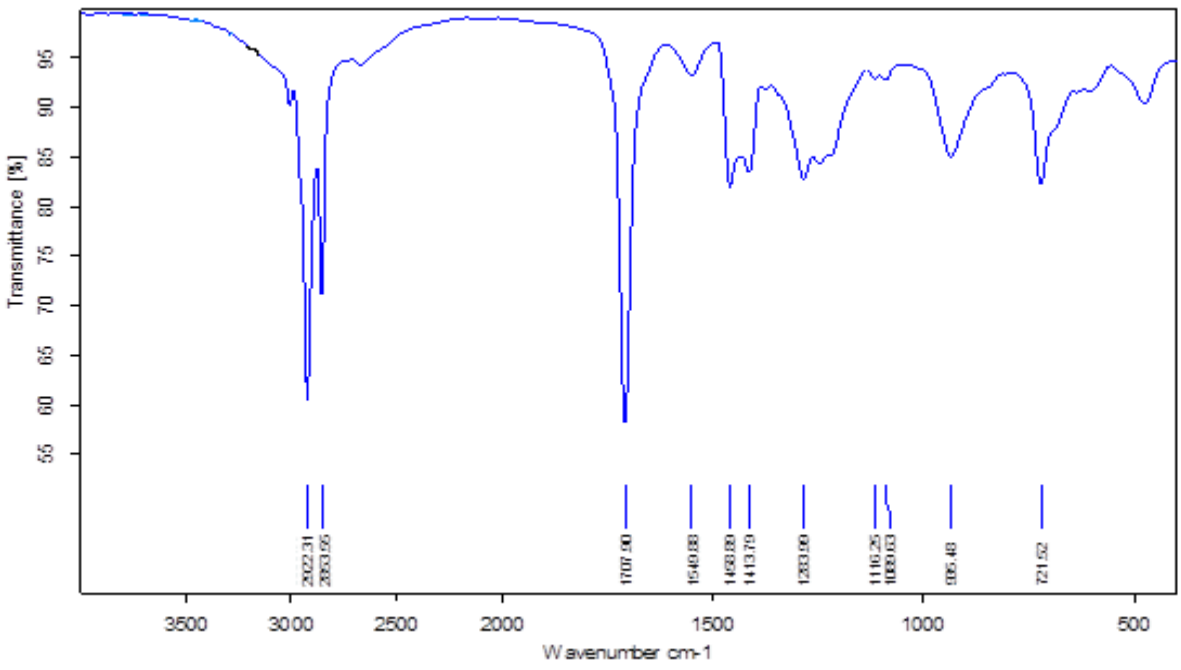


Figure VI.7 : Spectre IR d'oléate de fructose.

D'après le spectre d'infrarouge de palmitate de glucose, on constate : les bandes dans la région de 2922.31 cm^{-1} et 2853.66 cm^{-1} sont dues à des vibrations d'étirement C-H de groupes CH_3. Alors que dans la région 1707.90 cm^{-1} suggère la présence de groupes

carboxyle C = O d'oléate de fructose. L'absorption des groupes =C-H est détectée à 1413.79 cm^{-1}1458.99. La liaison C-H de CH_2 est détectée à 721.52 (pour une chaine de CH_2 supérieure à 4). L'absorption caractéristique à 1283.99 cm^{-1} dans le spectre FT-IR était indicative d'une liaison C-O-C dans l'oléate de fructose **[99,100 ,101] .**

ii) Analyse RMN

Après la séparation de produit, l'échantillon a été analysé par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Le spectre RMN du proton « ^1H » est représenté sur les **figures VI.8 :**

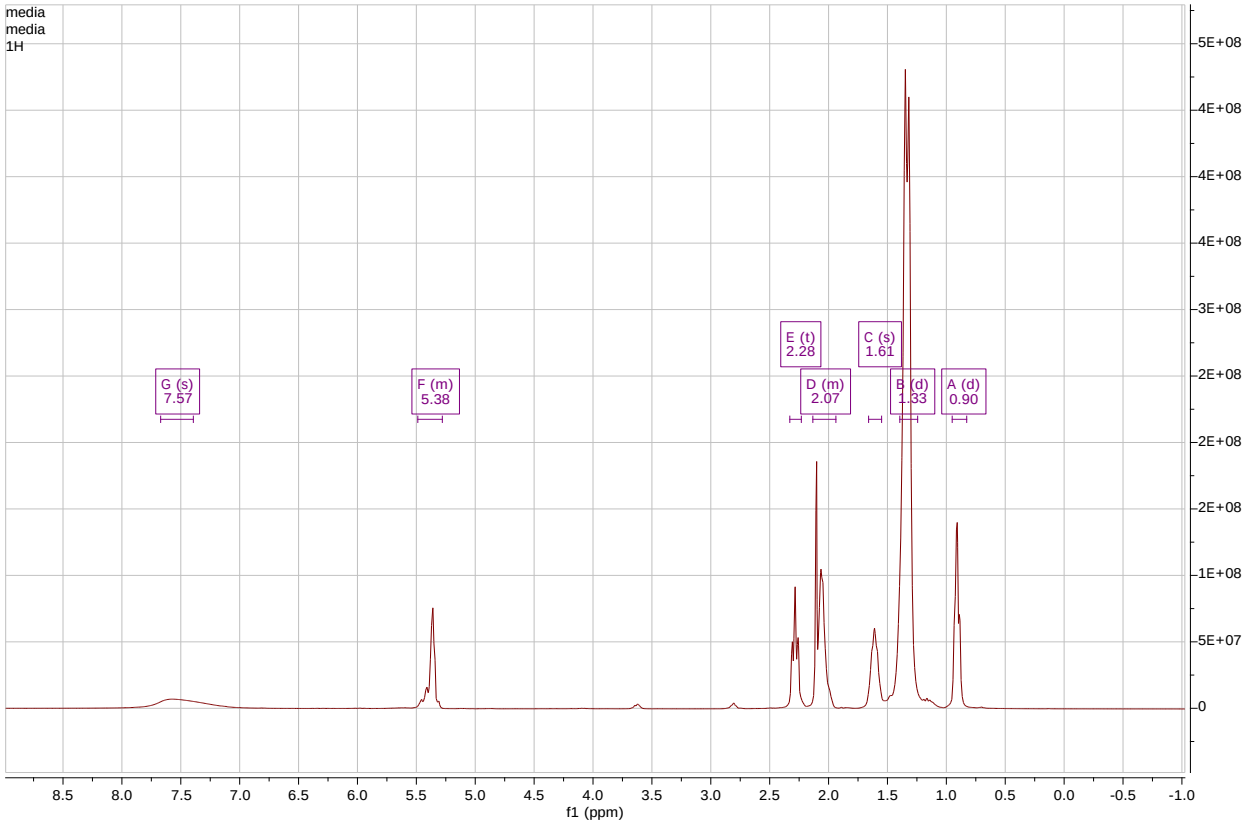


Figure VI.8 : Spectre RMN 1H de la première fraction dans l'acétone deutérée.

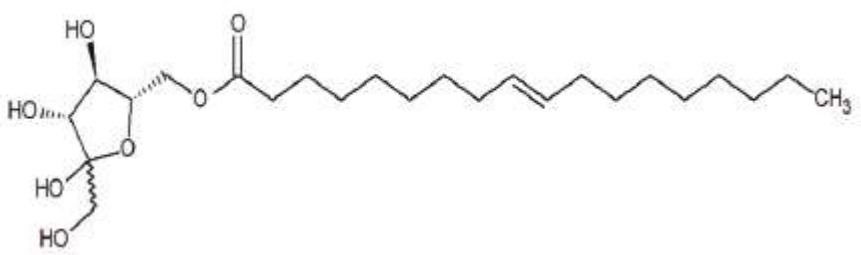


Figure VI.9 : Structure d'oléate de fructose.

L'analyse de produit synthétisé par Résonance Magnétique Nucléaire du proton nous amène à tirer les résultats suivants :

Le déplacement chimique de 0.9 ppm correspond au signal H du H_3C lié au C_{18}), 1.33 ppm (H de C-CH2-C des carbones C_3 à C_{16}), 1.61 ppm (H de CH_2-C du carbone C_{17}) et 2.07 ppm (H de CH2-CO-OR du carbone C_2). La présence de signaux à 5.38 ppm qui seraient dus à la résonnance des protons des groupements hydroxyles (OH). Et le déplacement chimique 2.28 ppm correspondrait à la résonnance du solvant acétone.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

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

Nous avons tout d'abord présenté la synthèse d'un tensioactif non ionique en partant d'un sucre simple, le fructose qui sera transformé en ester de fructose par une estérification enzymatique en présence de la lipase du *Ricinus Comminus* L.

Nous avons travaillé sur un plan et avec des conditions particulières pour obtenir des résultats satisfaisants et cohérents avec le sujet abordé, tous les conditions mise en jeu ont été optimisées pour l'élaboration d'un procédé durable. Tous d'abord nous avons préparé l'enzyme de la lipase à partir des graines de ricin, puis nous avons le séparé et purifié afin d'être immobilisé par l'alginate de sodium pour préserver leur propriété et leur stabilité, conserver leur activité optimal et à la fin faciliter leur séparation.

Les conditions de la réaction mise en jeu ont été optimisées pour aboutir aux meilleures conversions. En effet, la lipase du *Ricinus Comminus* L immobilisée est plus efficace que la lipase libre

La préparation d'oléate de fructose a réussi en présence de solvant organique (acétone) grâce à la solubilité élevée de fructose dans ce solvant ainsi qu'une teneur d'eau est importante pour l'activité de l'enzyme et aussi pour solubiliser le fructose. L'ajout de la lipase immobilisé favorise cette réaction sous une température de 25°C et une vitesse d'agitation d'environ 400 rpm.

La structure des groupes actifs d'oléate de fructose synthétisé a également été prouvée par analyse structurale avec FTIR, ^{1}H RMN.

La poursuite de l'étude approfondie des tests physico-chimiques de ce tensioactif (oléate de fructose) ainsi que des essais de biodégradabilité seraient nécessaire afin de certifier les potentialités de son intégration dans les formulations industrielles pharmaceutiques et alimentaires.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

[1] : NETO, Virginie. Nouvelles méthodes d'élaboration de tensioactifs glycosylés par métathèse croisée et cycloaddition 1,3-dipolaire.Thése de doctorat, Chimie Appliquée – Chimie des Substances Naturelles. Université de limoges : École doctorale sciencetechnologie-santé, 2007,244p.

[2] : ANDRIEU A, BLANCFUNEY C, CUNY A, THEFFO A, Synthèse de tensioactifs, identification et caractérisation Projet de physique P6, l'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES, L'UNIVERSITÉ de SAINT- ÉTIENNE-DU-ROUVRAY**,** 2019.

[3] : PICCICUTO S, BLECJER C, BROHÉEJ.C, MBAMPARA A, LOGNAY G, DERANNE C, PAQUOT M, MARLIER M, Les esters de sucres: V oies de synthèse et potentialités d'utilisation, Biotechnol. Argon. Soc. Environ., 5 (4), 09-219, 2001.

[4] : EPOUNE LINGOME, Cédric. Nouveaux agrotensioactifs glycolipidiques: synthèse, propriétés physico-chimiques et application en polymérisation. Thèse de doctorat, Chimie. Lyon : l'institut national des sciences appliquées, 2011,289p.

[5] : PICCICUTO, Salvator; BLECKER, Christophe; BROHÉE, Jean-Christophe et al. Les esters de sucres: voies de synthèse et potentialités d'utilisation. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.2001, vol.5, n°4, pp.209-219.

[6] : VANDEPUTTE, Jacky. Les agro-tensioactifs. Lipochimie, 2012, vol.12, n°2, pp. 133-137.

[7] : BOUGUETTAYA, Abdallah. Synthèse d'un produit cosmétique "Shampoing antipelliculaire".Rapport de soutenance En vue de l'obtention du diplôme de Licence professionnelle en : Génie de la formulation. Université Akli Mohand Oulhadj BOUIRA. Institut de Technologie.

[8] : MAMERI, yazid. phototransformation de tensioactif anioniqueinduite par un oxyhydroxyde de fer (goethite) en solution aqueuse. memoire de magister en chimie. chimie analytique et physique. universite mentouri-constantine .faculte des sciences exactes .departement de chimie.2010.163p.

[9] : Tarik, OUADDAR. Etudedes proprietes emulsifiantes de melanges de tensioactifs vis-à-vis d'huiles utilisees en cosmetologie. Mémoire de Master en Chimie Pharmaceutique. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Faculté des Sciences .Département de Chimie.2019.76p.

[10] : Rosen.M «Surfactans and Interfacial Phenomena»,Third Edition, Wiley-Interscience, (2004).

[11] : Farn.R.J«Chemistry and Technology of Surfactants», Wiley-Blackwell, (2006).

[12] :Porter.M.R«Handbook of Surfactants», Springer US, (1991).

[13] : Nielloud.F, Marti-Mestres.G «Pharmaceutical emulsions and suspensions»Marcel Dekker, (2000).

[14] : Hervé Rolland. Alain Milius. Article « l'actualité chimique - novembre 2016 - n° 412 ».

[15] : HELLAL, Djamila. Optimisation de la réactivité dans la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose. Mémoire de Magister, Chimie organique. Badji Mokhtar Annaba: Faculté des Sciences, Département de Chimie, 2011,79p.

[16] : KOUMBI MOUNANGA.T, «Tensioactifs antioxydants originaux pour la formulation de produits de préservation du bois», thèse de doctorat, Université Henri Poincaré Nancy 1, (2008).

[17] : Samia, SOULTANI. Synthèse enzymatique d'esters de fructose et d'acide gras : Cinétique, purification et caractérisation des propriétés tensioactives. thèse doctorat. Spécialité: Biotechnologies et Industries Alimentaires.2001.345p.

[18] :Liang J., Zeng W., Yao P. and Wei Y., Lipase-catalyzed regioselective synthesis of palmitolyglucose ester in ionic liquids, Advances in Biological Chemistry, 2, 226-232, 2012.

[19] : Rajendran A., Palanisamy A. and Thangavelu V., Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries, Braz. Arch. Biol. Technol., 52, 1, 207-219, 2009.

[20] : Melle Samah Bouchagra. Memoire demagister en chimie organique et bioorganique. Immobilisation de lalipase decandida rugosasur la résine amberjet 4200cloptimisation de l'énantioselectivité par laméthode dessurfacesde réponse. Université badji mokhtar-annaba.84p.2010.

[21] :Cornish-Bowden A., Jamin M., Saks V., Cinétique enzymatique, EDP sciences, 2005.

[22] : Lepage J.F., Catalyse de contact : conception, préparation et mise en œuvre des catalyseurs industriels, Editions Technip – Paris, 1978.

[23] : Toufik Taalibi BOUKERCHE.memoire de magister .en chimie organique. Synthèse de nouvelles molécules tensioactives non ioniques par voie enzymatique. Université d'Oran Es-Senia.140p.2007.

[24] : BELMESSIKH Aicha.MEMOIRE DE MAGISTER . En Microbiologie Appliquée. Optimisation de la production de la protéase neutre par Aspergillus oryzae sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Université Mentouri Constantine.2011.

[25] :P. Desnuelle, The lipase, In : The enzyme, Boyer Po(ed),1972, 17, p 575.

[26] : Patrick Fickers, Jacqueline Destain & Philippe Thonart. «Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications», *BASE* [En ligne], numéro 2, volume 12 (2008), 119-130 URL : https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=2307.

[27] :Macrae, J. Am. Chem. Soc.1984, 60, p 291.

[28] : M.Hanson, Olsfets Int,1990, 5, p 29.

[29] : T.Nielsen, Fette, Seilfen Anstrichmittel,1985, 85, p 15.

[30] : Beisson F., Oil-bodies as substrates for lipolytic enzyme, Biochim. Biophys. Acta, 1531, 2001.

[31] : Hills M.J., Mukherjee K.D., Triacylglycerol lipase from rape (*Brassica* napus) suitable for biotechnological purposes, Appl. Biochem. Biotechnol., 26, 1990.
[32] : Lord J.M., Roberts L.M., Robertus J., Ricin: structure, mode of action, and some current applications. FASEB J., 8, 201-208, 1994.

[33] : Lombard S., Helmy M.E. & Pieroni G., Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *Biochem. J*., 358, 773-781,2001.
[34] : Morlon-Guyot J. et al., Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 278, 17006-17011,2003.

[35] : Girbes T. et al., Recent advances in the uses and applications of ribosome-inactivating proteins from plants. *Cell Mol. Biol*., 42, 461-471, 1996.
[36] : (Witchard, 1997; Paul et Tanigoshi, 1999 ; Malathi et al., 2006 ; Ledent et Mairesse, 2008).
[37] : Latifou LAGNIKA .Thèse de Doctorat Université Louis Pasteur de Strasbourg.Université d'Abomey-calavi, Bénin . Etude Phytochimique et Activité Antipaludique de Substances Naturelles issues de Plantes Béninoises.280p.2005 .
[38] : Armstrong, W.P. 1982. The Castor bean. http://waynesword.palomar.edu/plmar99.htm.
[39] : Gharbi, I., Issaoui, M., Mehri, S., Cheraief, I., Sifi, S., & Hammami, M. (2015). Agronomic and technological factors affecting Tunisian olive oil quality. *Agricultural Sciences*, 6(05), 513-526. http://dx.doi.org/10.4236/as.2015.65051.
[40] : GUERGOUR, HASSINA. Thèse magister. Etude de la toxicité d'huile de Ricinus communis L sur les animaux de laboratoire. BIOCHIMIE. UNIVERSITE FARHAT ABBAS –SETIF.2011.97p.
[41] : (Ziyu et al ., 1992; Gerard et al ., 2008; Sujatha et al., 2008; Cheema et al., 2010).
[42] : Maroyi A. 2007. Ricinus communis L. In Ressources Végétales de l'Afrique Tropicale 14. Oléagineux, van der Vossan, HAM, MKamilo GS (eds). Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas / Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas / CTA : Wageningen, Pays-Bas ; 163-170.
[43] : Kadambi , k., dabral, s.n.(1955) the silviculture of ricinus communis l. Ind. Forester. 8(1):53-58.
[44] : Roger Prat et Jean-Pierre Rubinstein. *Biologie et Multimédia - Sorbonne Université - UFR des Sciences de la Vie.*
[45] : M^{elle} Hadj Benrezig Mahdjouba. mémoire de master . L'effet bio-insecticide de l'extrait méthanoïque du Ricinus communis L. Sur les larves de Tuta absoluta. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.2016.

[46] : Little, E.L ., Woodbury, R.O ., Wadsworth, F.H. (1974). Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. Agriculture Handbook. 449. U.S. Depart. Agricul. Forest. Serv. Washington, DC. 2.

[47] : ALLOUE W.A.M., Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*.).Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux,Belgique., 165p., 20 tabl., 22fig, 2008.

[48] : Ozturk.B,Immobilization of lipase Candida rugosa on hydrophobic and hydrophilicsupports,Master of Science , İzmir Institute of Technology,Turkey,2001, 35-39.

[49] : Gill.I. I, Das.J,Patel,R. N,Tetrahedron: Asymmetry,18(11),2007,1330-1337

[50] : Alloue, W.A.M,Aguedo.M,Destain.J,Ghalfi.H,Blecker.C,Wathelet.J.P,Thonart.P,Biotechnol, Agon, Soc,Environ, 12(1),2008,57-68.

[51] : Durand.G,Monson. P,les enzymes immobilisées,05,1974,22-24.

[52] : SHAO-HUA C., WEN-TENG W., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, Biomaterial, 25 (2), p.197-204, 2004

[53] : BAGI K., SIMON LM., SZAJANI B, Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. Enzyme Microb. Technol., 20, p.531-535, 1997.

[54] : AMORIM RVS., MELO ES., CARNEIR-DA-CUNHA MG., LEDINGHAM WM., CAMPOS-TAKAKI GM. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. Bioresour. Technol., 89 (1), 35-39, 2003.

[55] : Coloowick.S-P, Kaplan.N.O,Methods in enzymologie,vol-44:immobilized enzymes andcells (parts),584.p.bibl, Academic press,1987.

[56] : E.BrownJ–F,Biellmann,Techniques de l'Ingénieur.TraitéGénie des procédés.J 1240.

[57] : Cao L., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Cross-Linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase; Organic Letter, 2, 2000.

[58] : Schoevaart R., Wolbers M.W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A.P.G., Van Rantwijk F., Van der Wielen L.A.M., Sheldon R.A., Preparation, optimization and structure of cross-linked enzyme aggregates CLEAs, Biotechnology and bioengineering, 87, 2004.

[59] : Mozhaev V.V., Melik-Nubarov N.S., Sergeeva M.V., Siksnis V., Martinek K., Strategy for stabilizing enzyme. Part one: Increasing stability of enzyme via their multi-point interaction with a support, Biocatalysis, 3, 1990.

[60] : Yamada K., Nakasone T., Nagano R., Hirata M., Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto grafted polyethylene plates, Journal of Applied Polymer Science, 89, 2003.

[61] : ALAIS C., LINDEN G., Biochimie alimentaire, deuxième édition, Paris : Masson, 245p ,1993.

[62] : Mlle. DJILALI Naïma .MrOUANAS Hocine. Essai de synthèse d'esters de sucre à partir de la biomasse végétale. memoire de fin d'etudes en master. universite akli mohand oulhadj – bouira .65p.2017

[63] : PICCICUTO, Salvator; BLECKER, Christophe; BROHÉE, Jean-Christophe *et al*. Les esters de sucres: voies de synthèse et potentialités d'utilisation. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.2001, vol.5, n°4, pp.209-219.

[64] : FREGAPANE G., SARNEY D.B., Greenberg SG., Knight DJ., Vulfson E.N., Enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their comparison with conventional products. J. Am. Oil. Chem. Soc., 71, 87-9, 1994.

[65] : Poehnlein Martin Stefan M. Sc., Investigations on the Enzymatic Synthesis of Novel Glycolipids, Thèse de doctorat, 2014.

[66] : Thévenet S., Wernicke A., Belniak S., Descotes G., Bouchu A., Queneau Y., *Carbohydr. Res., 318*, 52-66, 1999.

[67] : Epoune L. C., Nouveaux Agrotensioactifs Glycolipidiques: Synthèse, Propriétés Physico-chimiques et Application en Polymérisation, Thèse de doctorat, Ecole Doctorale de Chimie de Lyon, 2012.

[68] : DAMEZ C., transformation d'agro-ressource régionale et étude de leurs propriétés amphiphiles, Thèse de Doctorat, UNIVERSITÉ de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE, 2006.

[69] : Plou F.J., Cruces M.A., Bernabe M., Martin-Lomas M . , Parra J.L. et Ballesteros A. Enzymatic synthesis of partially acylated sucroses. Enzyme Eng. XII - Ann. N Y Acad. Sci., 750, 332–337. 1995.

[70] : Sin YM., Cho KW. et Lee TH. Synthesis of fructoseesters by Pseudomonas sp. lipase in anhydrous pyridine. Biotechnol. Lett., 20, 91–94, 1998.

[71] : Spiliotis N., Voustas E., Magoulas K. et Tassios D. Recovery of fructose laurate produced through enzymatic esterification. Separ. Purif. Technol., 19, 229–236, 2000.

[72] : FERRER M., ANGELES CEUCES M., BERNABÉ M., BALLESTEROS A., plou FJ, Lipase-catalysed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. Biotechnol. Bioeng., 65 (1), 10–16,1999.

[73] : CAO L., BORSCHEUER U T., SCHMID RD. Lipase-catalysed solid-phase synthesis sugar ester: selectivity of lipase towards primary and secondary hydroxyl group carbohydrates. Biocatal. Biotransform., 16, 249–257,1998.

[74] : GHNAWA A., YASUHIRO K., KEN I., Synthesis of d-allose fatty acid esters via lipase-catalyzed regioselective transesterifiaction Biotechnol. Biochem, 69 (4), 833-835, 2005.

[75] : RAZAFINDRALAMBO H. and al., Counterion- Induced changes to the micellization, of surfactin C16 aqueous solution, Journal of Physical Chemistry, 113, 8872-8877, 2009.

[76] : Matev G., Petkova N., Vrancheva R., Ivanov I., Pavlov A. and Denev P., Characterization and Application of Sucroesters as Antimicrobial Agents, University of Plovdiv "Paisii Hilendarski", Scientific Studies–Chemistry,p.1-7,ISSN ;0204-5346,2014.

[77] : Nair S. N., José A. T. and Ligia R., Sugar Ester Surfactants: Enzymatic Synthesis and Applications in Food Industry, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55, 595–610, 2015.

[78] : Francisco J. P., Angeles M. C., Ferrer M., Gloria F., Pastor E., Manuel B., Morten C., Francisco C., José L. P. and Antonio B., Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent, Journal of Biotechnology, 96, 55-66, 2002.

[79] : Cruces M. A., Francisco J. P., Ferrera M., Manuel B. and Antonio B., Improved Synthesis of Sucrose Fatty Acid Monoesters, JAOCS 78 (5), 541–546, 2001.

[80] : Tarahomjoo S. and Alemzadeh I., Surfactant production by an enzymatic method, Enzyme and Microbial Technology, 33, 33–37, 2003.

[81] : Akoh C.C., J. Am. Oil Chem. Soc. 1994, 71, 319–323.

[82] : Liu X., Gong L., Xin J., J. Mol. Catal. A: Chemical, 1999,147, 37–40.

[83] : Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation. En ligne : <http://www.mfc.co.jp>, consulté le 13 juillet 2011.

[84] : G. Battglia, M. La Russa., V Bruno,L. A r e n a r e . , R Ippolito, A.Copani,F.Bonina.,F Nicoletti . BrainsRes 2000.860, p. 149-156.

[85] : Armand et al. Epilepsy Res,1998, 32, P.345-355. Redecher et al. Neuropharmacology 2000.39,P, 267-281.

[86] : Thevinin et al. Int. J. PHARM, 1996,137, P. 177-186. Ferrer et al. Biotechnol. Bioeng, 1999.65 p.10-16.

[87] : CECCHIN, Mireille. *Domaines d'application des sucroesters et sucroglycérides*. Rapport de recherche, Lyon: DESS ingénierie documentaire-Enssib, 2001,87p.

[88] : SEFHA F., ABOUSEOUD M., Synthèse enzymatique d'un tensioactif non ionique de type sucroester par la lipase de *Ricinus communis*, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ YAHIA FARÈS MÉDÉA, **2017**.

[89] : MATTHIEU B., Acylation enzymatique de lysine par la lipase B de candida antarctica en solvant CO2 Supercritique et en réacteur a lit fixe : Essais préliminaires, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE LORRAINE**, 2017**.

[90] : https://tpe-cuisine-mol.wixsite.com/site/la-spherification.

[91] : Doumèche B., Fundamental phenomenological description and experimental optimization of gel-stabilized biocatalysts in a two-phase system, Thèse de doctorat, Département de biotechnologie de la RWTH-Aachen, Allemagne, **2002.**

[92] : Carrea G., Ottolina G., Riva S., Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media, Trends in Biotechnology, 13, 63-70, **1995.**

[93] : Jonathan S. D., Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents, Enzyme and Microbial Technology, 11, 194-211, **1989.**

[94] : Wescott C. R., Klibanov A. M., The solvent dependence of enzyme specificity, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1206 (1), 1-9, **1994.**

[95] : Klibanov, A.M., Improving enzymes by using them in organic solvents, Nature 409 , 6817, 241-246, **2001.**

[96] : Lefnaoui, S., Moulai-Mostefa, N., " Investigation and optimization of formulation factors of a hydrogel network based on kappa carrageenan – pregelatinized starch blend using an experimental design", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 458 (2014) 117-125.

[97] : Ganske F., Bornscheuer U.T., Optimization of lipase catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH, J. Mol. Catal. B: Enzym, 36, 40–42, 2005.

[98] : Goupy, J., Creighton, L., "Synthèse et Conseils In Introduction Aux Plans d'Expériences", (2006), Dunod Edition, pp 272-280.

[99]:Schott A., ValentinJ., Magadur G., Clède S., Lefèvre A-L. et Altmayer-Henzien A., Chimie PCSI-1ère année : Tout en un, 1ère édition, De Boeck supérieur s.a., Paris, **2014.**

[100] : Rebstein M. et Soerensen C., Chimie avancée, Presses polytechniques et universitaires romandes, **2011.**

[101]:Biémont E., Spectroscopie moléculaire : Structures moléculaires et analyse spectrale, 1ère édition, Groupe DE Boeck s.a., Editions De Boeck Université, Bruxelles, **2008.**