



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشاذلي بن جديد - الطارف

Université Chadli Bendjedid – El Tarf

كلية العلوم والتكنولوجيا

Faculté des Sciences et de la Technologie

قسم الكيمياء

Département de Chimie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Spécialité: Chimie Analytique

Thème

Etude de l'effet de l'eau sur l'acylation enzymatique

du 2-aminobutan-1-ol

Présenté par:

BEKKAR Djihene

Devant le Jury :

Dr. <i>DIAF Ilhem</i>	MCB	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Promotrice
Dr. <i>FERDJANI Salim</i>	MCB	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Président
Dr. <i>SELAIMIA Ouassila</i>	MCB	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Examinatrice

Année Universitaire 2019-2020

Dédicaces

Je dédie ce mémoire de fin d'étude à :

Mes parents,

Ma grand-mère,

Mon frère et mes sœurs,

Ceux et celles qui occupent dans mon cœur une énorme place,

B. Djihene

Remerciements

A l'issue de ce travail, je tiens tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste mémoire de fin d'étude.

La partie pratique de ce mémoire de fin d'étude a été réalisée au sein de l'équipe de synthèse asymétrique et biocatalyse, laboratoire de catalyse asymétrique écoresponsable (LCAE) à l'université Badji Mokhtar Annaba, dirigé par Pr. BOUZEMI Nassima. que je remercie de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire me permettant ainsi d'effectuer ce travail de recherche dans les meilleures conditions.

Ce travail n'aurait jamais abouti, sans le savoir et la disponibilité de ma directrice de mémoire Dr. DIAF Ilhem, qui a bien voulu diriger ce travail. Elle m'a fait profiter de ses conseils, de son soutien constant et de son indéfectible bonne humeur.

Je remercie également Pr. Louisa Arribi Zouioueche et Dr. Merabet Mounia maître de conférences à l'université Badji Mokhtar Annaba pour leurs conseils et leur encouragement qui ont été d'une grande aide.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce mémoire de fin d'étude en acceptant de l'examiner, l'évaluer et de l'enrichir par leurs propositions.

Et enfin je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ES	Complexe enzyme-substrat
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
[Bmim][PF6]	1-Butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate
PSL	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
CCL	Lipase de <i>Candida cylindracea</i>
CAL B	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
A.A	Agent acylant
AV	Acétate de vinyle
AI	Acétate d'isopropényle
EtOAc	Acétate d'éthyle
a_w	Activité de l'eau
TMBE	Tert-butyl methyl ether
MeOH	Méthanol
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
Eq	Equivalent
mmol	Milli mole
Rdt	Rendement
CCM	Chromatographie sur couche mince
R_f	Rapport frontal
RMN	Spectrométrie de Résonance magnétique nucléaire
MHz	Méga Hertz
Hz	Hertz
CDCl₃	Chloroforme deutéré
TMS	Tétraméthylsilane
δ	Déplacement chimique
ppm	Partie par million
s	Singulet
d	Doublet
t	Triplet
m	Multiplet
J	Constante de couplage
IR	Spectrométrie Infrarouge
ν	Nombre d'onde

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Classification des enzymes et type de réaction catalysée.	16
2	Comparaison des performances et de la chimio-sélectivité de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol en présence d'acide oléique catalysée par différentes enzymes dans le 2-méthyl-2-butanol en réacteur Syncore®.	26
3	Constantes catalytique de <i>N</i> - et <i>O</i> -acylation d'aminoalcools avec l'acide myristique catalysée par la CAL B.	28
4	Acylation du 2-aminobutan-1-ol 1 catalysée par différentes lipases.	43
5	Caractéristiques physicochimiques des composés 2 et 3 .	46
6	Acylation du 2-aminobutan-1-ol par différents agents acylants.	46
7	Exemples des desséchants adaptés ou incompatibles avec les familles organiques courantes (+ : compatible, - : non compatible).	48
8	Description des réactifs utilisés pour cette étude.	53

Liste des schémas

N°	Titre	Page
1	Mode d'action des lipases.	18
2	Acylation énantiosélective de la phényléthylamine en présence CAL B.	19
3	Acylation régiosélective du glucose catalysée par la CAL B.	20
4	Acylation chimiosélective du N-méthyl-glucamine avec l'acide oléique catalysée par la CAL B.	20
5	Exemples d'aminoalcools d'intérêt biologique.	24
6	Aminoalcools utilisés comme auxiliaires ou ligands chiraux.	24
7	Schéma général de la réaction d'acylation enzymatique.	25
8	Exemples de donneurs d'acyle.	27
9	Acylation chimiosélective de 2-aminopropanol avec un acide gras catalysée par la lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> .	29
10	Acylation chimiosélective du 6-aminohexan-1-ol avec l'acide oléique catalysée par la lipase B de <i>Candida antarctica</i> sans solvant.	30
11	Structure de l'Ethambutol.	40
12	Structure des agents acylants choisis.	41
13	Acylation lipasique du (\pm)-2-aminobutan-1-ol.	41

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	(a) Une enzyme, (b) Action d'une enzyme sur l'énergie d'activation d'une réaction chimique.	14
2	Structure des enzymes.	14
3	Modes d'action des enzymes.	15
4	Représentation schématique d'une isotherme de sorption.	31
5	Influence de l'activité de l'eau initiale du milieu réactionnel sur la vitesse initiale de réaction de N-acylation d'un alcool aminé dans le 2-méthyl-2-butanol à 70 °C catalysée par la lipase QL d' <i>Alcaligenes</i> sp. D'après Furutani et al., (1996).	33
6	Effet de l'activité thermodynamique de l'eau sur l'activité alcool déshydrogénase de la levure de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> déshydratée en phase gaz et sur la teneur en eau (Maugard et al., 2001).	35
7	Influence de l'activité thermodynamique de l'eau, a_w , (1) sur l'énantiosélectivité de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> pour l'acylation du pentan-2-ol (\blacktriangle) et de l'hexan-3-ol (\square) A du butan-2-ol (\circ) et de l'octan-4-ol (\blacklozenge) B avec le méthyl propanoate comme donneur d'acyle. (2) sur l'activité acyltransferase l'échelle de droite se réfère à l'octan-4-ol.	36
8	Démonstration de l'élution des produits réactionnels de l'acylation de 1 .	42
9	Spectre RMN ¹ H du composé N,O-diacylé 2 .	44
10	Spectre RMN ¹ H du composé N-acylé 3 .	45

Table des matières

Introduction générale	10
-----------------------------	----

Chapitre I : Généralités sur la catalyse enzymatique

Introduction.....	13
I. Généralités sur les enzymes	13
1. Définition	13
2. Structure des enzymes.....	14
3. Mécanisme d'action d'une enzyme	15
4. Classification des enzymes	16
II. Les hydrolases	17
1. Généralités sur les lipases	17
2. Mode d'action des lipases	17
3. Réactions catalysées par les lipases	18
4. Sélectivité des lipases	19
• <i>Enantiosélectivité</i>	19
• <i>Régiosélectivité</i>	19
• <i>Chimiosélectivité</i>	20
Conclusion	21

Chapitre II: Acylation enzymatique des aminoalcools

Introduction.....	23
I. L'intérêt des aminoalcools	23
1. En pharmacie	23
2. En synthèse	24
II. Acylation enzymatique des aminoalcools	25
1. Principe	25
2. Paramètres influençant l'acylation enzymatique des aminoalcools	26
a) <i>Influence de la nature d'enzyme</i>	26
b) <i>Influence de la nature du donneur d'acyle</i>	27
c) <i>Influence de la structure de l'accepteur d'acyle (le substrat)</i>	28

d) <i>Influence de la nature du solvant</i>	29
e) <i>Autres paramètres affectant l'acylation enzymatique : L'eau dans le milieu réactionnel</i>	30
Conclusion	36

Chapitre III: Acylation enzymatique du 2-aminobutan-1-ol

Introduction.....	39
1. Objectifs de l'étude	39
2. Choix des modèles de l'étude	39
a) Choix du substrat	39
b) Choix des lipases.....	40
c) Choix des agents acylants	40
3. Etude des paramètres influençant la chimiosélectivité lipasique lors de l'acylation du 2-aminobutan-1-ol.....	41
a) Effet de la nature d'enzyme	42
b) Effet de la nature de l'agent acylant utilisé	46
c) Effet de l'eau dans le milieu réactionnel	47
Conclusion	48
Conclusion générale	50
Partie expérimentale	52
Annexe	58

Introduction générale

Introduction générale

Durant ces dernières décennies, le développement des procédés industriels ne se limite plus aux innovations technologiques et à l'efficacité économique, mais doit absolument tenir compte des impératifs environnementaux, garants d'un développement durable, cela est encore plus vrai pour l'industrie chimique, accusée, parfois à tort, d'être le pollueur par excellence de la planète. C'est pour cette raison qu'on assiste actuellement à l'émergence de ce qui est communément appelé « *chimie verte* ». Ce concept s'articule sur des règles mettant en œuvre des procédés et des voies de synthèse plus propres, réduisant au maximum l'utilisation et la génération de produits néfastes pour l'environnement. Pour respecter au mieux les principes de la chimie verte¹ et faire face aux problématiques environnementales actuelles, il y a un intérêt à concevoir de nouveaux processus beaucoup plus éco-compatibles. Le développement de nouvelles méthodologies, faciles à mettre en œuvre, sélectives, est ainsi de plus en plus recherché. Parmi les approches les plus attractives qui permettent d'atteindre de tels objectifs figurent les réactions catalysées par des biocatalyseurs notamment les enzymes.²

Les voies de synthèse mettant en jeu des enzymes constituent une alternative intéressante aux méthodes de synthèse classiques. En effet, les réactions évoluent dans des conditions opératoires douces, pas de sous-produits formés ce qui réduit donc le nombre d'étapes nécessaires à la purification des produits obtenus.³ De plus, ces derniers sont étiquetés d'un label naturel par les législations internationales ce qui les distingue des produits obtenus par synthèse chimique et leur donne une valeur ajoutée supérieure grâce à la demande croissante des produits à label naturel dans le marché.

Les molécules polyfonctionnelles telles que les aminoalcools sont d'une grande importance notamment dans le secteur industriel, particulièrement dans le domaine de la pharmacie et le développement de nouveaux médicaments.⁴ Le nombre de travaux

¹ Anastas, P.; Eghbali, N; *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 301.

² Blinkovsky, A. M.; Martin, B. D., Dordick, J. S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, 3 (2), 124–129.

³ (a) Xie, C.; Wu, B.; Qin, S.; He, B. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2016**, 39 (1), 59–66. (b) Shimomura, K.; Harami, H.; Matsubara, Y.; Nokami, T. *Catal.* **2015**, 255, 41–48

⁴ Białecka-florja, E.; Krzyczkowska, J.; Stolarzewicz, I.; Kapturowska, A. *J. Mol. Catal. B.* **2012**, 74, 241–245.

concernant l'acylation enzymatique des aminoalcools reste modéré,⁵ et ce à cause de la nécessité des étapes de protection / déprotection soit de la fonction amine, soit celle d'hydroxyle. Ainsi, lors de ce travail de fin d'étude, nous nous sommes intéressés à l'étude des paramètres influençant la chimiosélectivité de la réaction d'acylation d'un β -aminoalcool, à savoir le (\pm)-2-aminobutan-1-ol, catalysé par les lipases en mettant l'accent sur l'effet de l'eau sur cette réaction.

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres :

- ❖ **Chapitre I** : introduit l'état de l'art de la catalyse enzymatique en particulier avec des lipases.
- ❖ **Chapitre II** : présente les aminoalcools et leurs intérêts dans différents secteurs.
- ❖ **Chapitre III** : décrit les travaux portant sur la réaction d'acylation des aminoalcools catalysés par des lipases et les résultats obtenus suite à l'étude des paramètres influençant l'acylation enzymatique du 2-aminobutan-1-ol.

A la fin du manuscrit, les différents aboutissements de ce travail et les perspectives seront évoqués dans une **conclusion générale** qui sera suivie d'une **partie expérimentale** et d'un **annexe** regroupant les spectres RMN et IR des produits obtenus.

⁵ (a) Kanerva.T, Vanttinen. E, Huuhtanen.T, Dahlqvist. M, *Acta. Chem. Scand.* **1992**, 46, 1101; (b) Gotor.V, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2189; (c) Fernandez-Perez. M ; Otero. C ; *Enzyme. Microb.Technol.* **2001**, 28, 527; (d) Husson. E ; « *Synthèse des dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique* » ; Thèse de doctorat, Institut national polytechniques de Lorraine, Nancy, **2008**.

Chapitre I
Généralités sur la catalyse
enzymatique

Introduction

Au cours de ces dernières années, la demande en produits d'intérêt thérapeutique, agroalimentaire ou cosmétique s'est fortement accrue. Les voies de synthèse principalement utilisées à l'échelle industrielle font appel aux catalyseurs chimiques. Cependant, dans le contexte de développement durable actuel, les recherches fondamentales ou plus appliquées s'orientent de plus en plus vers les procédés de synthèse respectueux de l'environnement. Ainsi, pour améliorer la sélectivité des procédés chimiques, on a opté pour l'emploi de biocatalyseurs telle que les enzymes. L'utilisation de ces derniers pour catalyser des réactions de synthèse organique suscite aujourd'hui un intérêt grandissant pour les industriels. Ces biocatalyseurs sont utilisés comme alternative aux catalyseurs chimiques généralement toxiques et polluants. La biodégradabilité, la limitation de formation de sous-produits et la sélectivité de ces biocatalyseurs, envers les substrats mais aussi envers les produits ont fait de la catalyse enzymatique une méthode de choix pour l'obtention de produit pur et avec de bon rendement.

i. Généralités sur les enzymes :

• Définition :

Le mot *enzyme* vient des racines grecques *en* (*dans*) *zume* (*levain*) car les premières enzymes identifiées ont été extraites des levures. Ce sont de grosses molécules de nature protéique, agissant comme catalyseurs dans les réactions biologiques. Comme tous les catalyseurs, les enzymes n'agissent pas sur les constantes d'équilibre des réactions, elles abaissent leur énergie d'activation en augmentant ainsi leur vitesse (*Figure 1*) en revanche, à la différence des catalyseurs conventionnels utilisés par les chimistes, les enzymes présentent une action spécifique. En effet, elles peuvent catalyser un seul type de réaction pour un substrat donnée, mais il existe d'autres enzymes qui opèrent sur une famille de substrats. Les enzymes sont des biocatalyseurs chimio-, régio- et stéréo-sélectifs, utilisées dans les industries : alimentaires, textiles, pharmaceutiques, cosmétiques et hygiéniques souvent pour obtenir des molécules chirales à haute pureté optique.⁶ Elles augmentent la vitesse d'une réaction chimique jusqu'à 10^{20} fois. La partie active de l'enzyme, est une sorte de poche ou crevasse constituée de trois à quatre acides aminés, et est directement

⁶ Copeland. R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2^{ème} édition, Wiley-VCH, Inc. 2000, 62, 149, 175.

impliquée dans la catalyse, c'est ce qu'on appelle « le site actif ». Plusieurs enzymes ne peuvent être fonctionnelles que si une substance particulière, vient s'y fixer appelée « le cofacteur ». Ce dernier est une petite molécule organique dite *coenzyme* ou un ion métallique (cuivre, zinc, manganèse, etc.).⁷

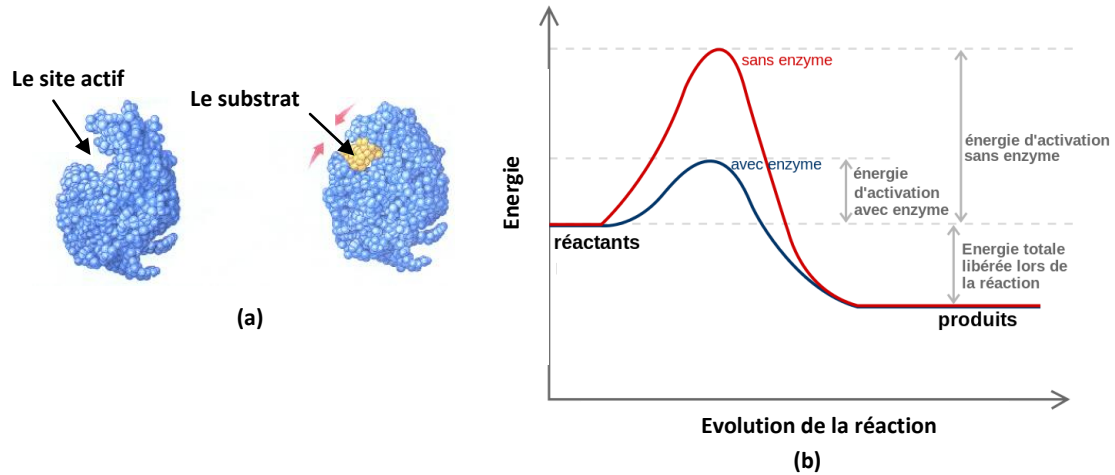


Figure 1 : (a) Une enzyme, (b) Action d'une enzyme sur l'énergie d'activation d'une réaction chimique.

1. Structure des enzymes :

Les enzymes sont des protéines composées par l'enchaînement de plusieurs centaines d'acides aminés (**Figure 2**).

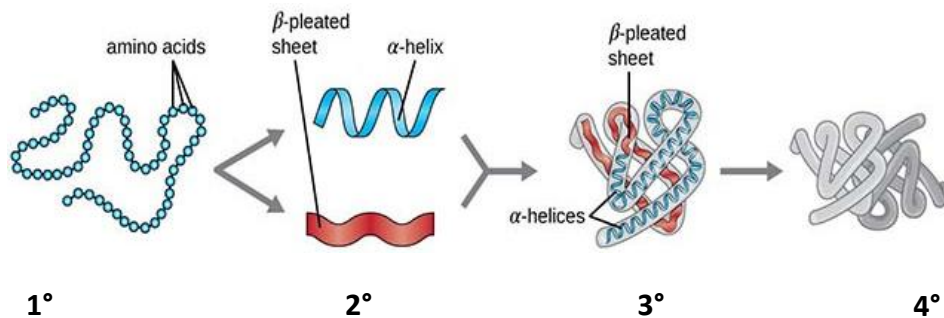


Figure 2 : Structure des enzymes.⁸

Chaque chaîne d'acides aminés liés entre elles par des liaisons peptidiques en donnant naissance à **la structure primaire (1°)**, des plissements donnent lieu à **la structure secondaire (2°)** et d'autres repliements et phénomènes d'agrégation aboutissent à une forme plus compacte : **la structure tertiaire (3°)**. La combinaison de plusieurs chaînes

⁷ Mcmurry. J ., *Chimie organique les grands principes* , Dunod, Paris. **2000**, 615, 497.

⁸ Copeland. R. A., *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2^{ème} édition, Wiley-VCH, Inc., **2000**, 62, 149.

polypeptidiques donne lieu à une structure plus volumineuse : **la structure quaternaire (4°)**.⁹

2. Mécanisme d'action d'une enzyme:

Le schéma réactionnel minimal pour une réaction enzymatique à un substrat **S** et un produit **P** est : $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$. plusieurs modèles¹⁰ ont été suggérés afin d'expliquer la manière dont le substrat s'insère dans l'enzyme pour former le complexe **ES** (Enzyme-Substrat) : (**Figure 3**).

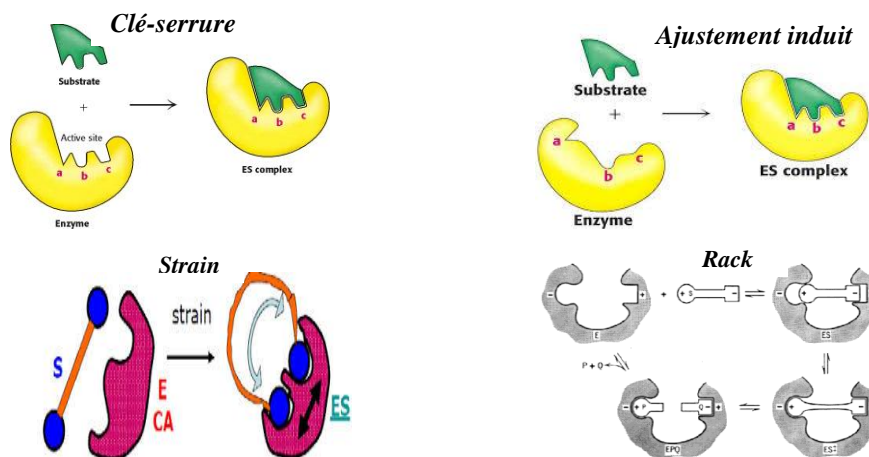


Figure 3: Modes d'action des enzymes.

- **Modèle Clé-serrure** (Emil Fisher, 1894)

Ce modèle repose sur le principe selon lequel les formes des substrats et le site actif de l'enzyme s'emboîtent comme une clé dans la serrure pour laquelle elle est conçue.

- **Modèle « Rack »** (Henry Eyring et Rufus Lumry, 1954)

Dans ce modèle, la structure de l'enzyme étant considérée comme rigide, c'est le substrat qui subit ainsi, un changement conformationnel pour pouvoir s'insérer dans le site actif de l'enzyme.¹²

- **Ajustement induit** (Daniel Koshland, 1958)

Dans ce modèle l'association enzyme-substrat est permise après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat.

- **Modèle « Strain »** (Williams Jenks, 1966)

⁹ Vollhardt. C, *Traité de Chimie organique*, DeBoeck université, Traduit par Depovere.P, 2^{ème} édition, Bruxelles, **1994**.

¹⁰ Polaina. J, MacCabe. A. P, *Enzymes, Structure, Function and Applications*, Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands , **2007**.

¹² Segel. I ., *Enzyme kinetics*, edition, Wiley-sons, Inc, **1975**.

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

3. Classification des enzymes :

Plus de trois milles enzymes différentes ont été reconnues par l'union internationale de biochimie,¹⁹ et environ 60% d'eux sont des hydrolases. Certaines enzymes sont d'origine animale ou végétale, mais les 100 dernières années et surtout depuis le milieu des années **1960**, les microorganismes sont devenus la plus importante source d'enzymes. Selon les réactions catalysées, la commission des enzymes et l'union internationale en biochimie a établi une classification, comportant six grandes catégories (*Tableau 1*).²⁰

Tableau 2 : Classification des enzymes et type de réaction catalysée.

Nom du groupe	Type de réaction catalysée
Oxydoréductases ou déshydrogénases (EC1)	Réactions d'oxydoréductions
Transférases (EC2)	Transfert de groupes fonctionnels
Hydrolases (EC3)	Réactions d'hydrolyse
Lyases (EC4)	Addition des groupements fonctionnels sur les doubles liaisons ou son inverse.
Isomérases (EC5)	Réactions d'isomérisation
Ligases ou synthétases (EC6)	Formation de liaisons avec le clivage de l'ATP

Au cours de notre stage de Master, nous nous sommes intéressés uniquement aux hydrolases, et particulièrement aux lipases.

¹⁹ International Union of Biochemistry, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press.USA, **1992**.

²⁰(a) Polaina.J, MacCabe.A.P., *Enzymes, Structure, Function and Applications*, Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands **2007**. (b) Faber, K., *Biotransform. Org. Chem-* A text book. 2^{ème} édition. Springer Verlag Berlin Heibelberg. Allemagne. **1995**.

ii. Les hydrolases :

Les hydrolases constituent la troisième classe d'enzyme, ils catalysent les réactions d'hydrolyse d'ester, de liaison peptidique, de liaison phosphodiester et de liaison osidique et englobe les protéases, les nucléases, les glycosidases, les estérases, les acylases et les lipases. Les hydrolases constituent la classe la plus sollicitée par le fait de leur énatio- et régiosélectivité remarquables, notamment les lipases.²¹

1. Généralités sur les lipases :

Les lipases sont des hydrolases d'esters carboxyliques²² et appartiennent au niveau de la classification internationale à la classe des triacylglycérol acyl-hydrolases (**EC.3.1.1.3**). Ce sont des enzymes largement répandues dans la nature. Elles ont des origines diverses (bactérienne, fongique, végétale, pancréatique, hépatique...) et présentent un panel de spécificités de substrat très large par rapport à d'autres classes. Un autre avantage intéressant est que ces biocatalyseurs ne nécessitent pas la présence d'un coenzyme contrairement à beaucoup d'autres.²³

2. Mode d'action des lipases :

Le mode d'action des lipases est basé sur une complémentarité *enzyme-substrat* qui explique la haute spécificité enzymatique envers un seul type de réaction pour un substrat.²⁴ Ils font intervenir trois acides aminés, la sérine, l'aspartate (ou glutamate) et l'histidine connus sous le nom de « triade catalytique ». ²⁵

Les lipases sont utilisées dans l'eau comme solvant, mais ils peuvent également fonctionner dans des milieux réactionnels non aqueux dits « non conventionnels » dans ce type de milieu la disponibilité en eau est faible. Ces milieux réactionnels peuvent-être des solvants organiques, des liquides ioniques, des solvants eutectiques profonds ou encore des fluides supercritiques tels que le CO₂ supercritique.

²¹ (a) Bomscheuer.U.T; Kazlauskas.R.J, *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, New York , **1999**; (b) Hasan. F, Ali Shah. A, Hameed.A , *Enzyme.Microb.Technol*, **2006**, 39, 235; (c) Ghanem.A, *Tetrahedron*. **2007**, 63, 1721; (c) Watanabe.K, Koshiba.T, Yasufuku.Y, Miyazawa.T, *Bioorg.Chem*. **2001**, 29, 65.

²² Alloue.W.A.M, Aguedo.M, Destain.J, Ghalfi.H, Blecker.C, Wathelet.J.P, Thonart.P, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. **2008** ,12(1), 57.

²³ Macrae, A. R., Hammond, R. C. *Biotechnol.Bioprocess.Eng*. **1985**, 3(1), 193.

²⁴ (a) Zaks.A, Klivanov.A.M, *Proc. Nalt. Acad. Sci*. **1985**, 82, 3192.

²⁵ Norin et al., *Biocatal*. **1933**, 7, 131.

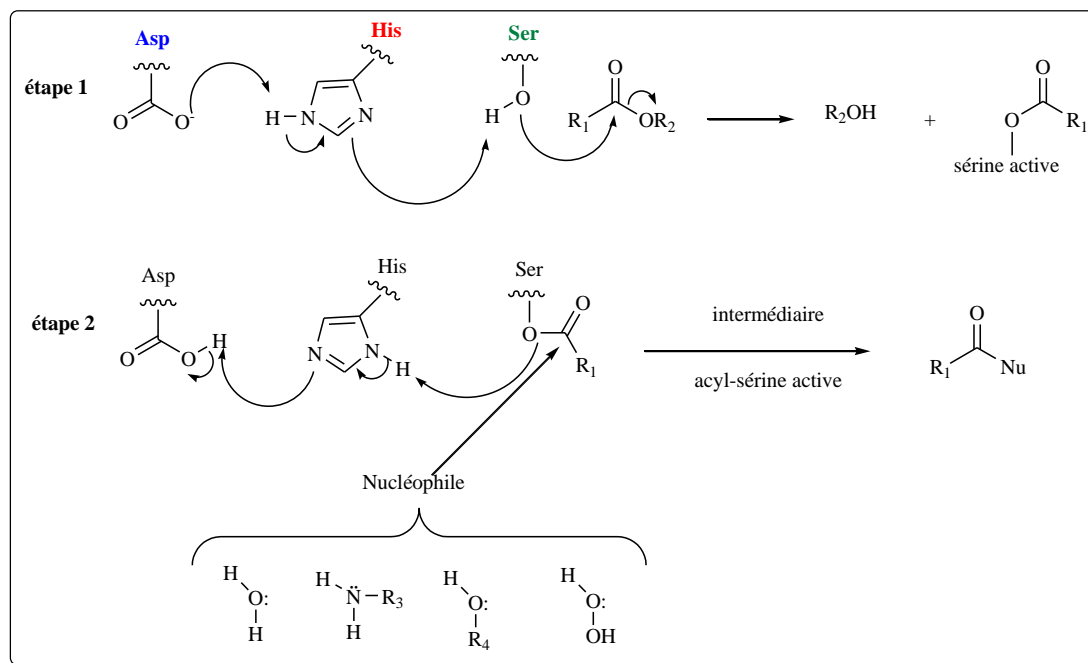
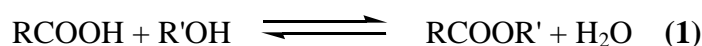


Schéma 1 : mode d'action des lipases.

3. Réactions catalysées par les lipases :

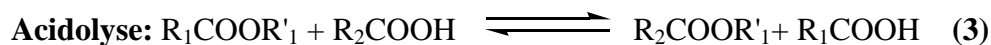
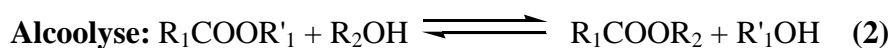
Les lipases constituent des catalyseurs de choix pour de nombreuses réactions en synthèse organique, telles que l'estérification (1), l'alkoolyse (2), l'acidolyse (3), et l'interestérification (4). En fonction du microenvironnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique.²⁶

- **La réaction d'estérification par hydrolyse inverse :**

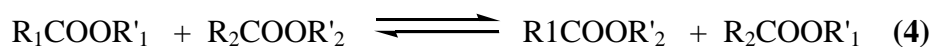


- **La réaction de transestérification :**

La transestérification regroupe la réaction d'alkoolyse et d'acidolyse:



- **L'interestérification :**



²⁶ (a) Chamouleau F., Coulon D., Girardin M. Ghoul M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 11, 949. (b) Vidya P., Chadha A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 65, 68,72.

4. Sélectivité des lipases :

Les lipases sont bien connues pour leurs propriétés d'énantio-, de régio- et de chimiosélectivités particulièrement intéressantes²⁷ lors d'une réaction catalysée par ces enzymes.

- **Enantiosélectivité :**

Les lipases sont capables de faire la différence entre deux molécules énantiomères ; par exemple, lors de la N-acylation du phényléthylamine catalysée par la lipase B de candida antarctica (*CAL B*), un des deux énantiomères de l'amine est préférentiellement acylé. En effet 97% de l'amide synthétisée provient de l'énantiomère *R* avec un taux de conversion de substrat de 34% (*Schéma 2*).²⁸

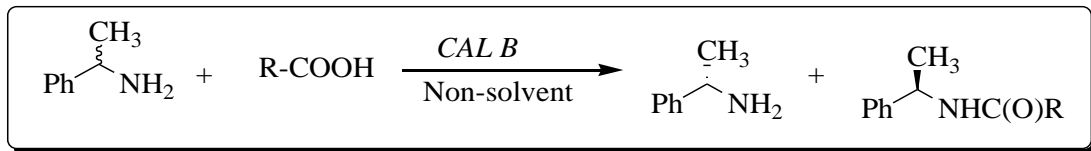


Schéma 2: Acylation énantiosélective de la phényléthylamine en présence CAL B.

- **Régiosélectivité :**

La sélectivité des enzymes peut également se manifester en terme de régiosélectivité. En effet une enzyme peut interagir avec un groupement fonctionnel parmi plusieurs identiques, se trouvant à différentes positions sur une molécule de substrat.²⁹

A titre d'exemple, la *CAL B* a démontré une plus grande affinité pour les alcools primaires que les alcools secondaires lors de la production sélective de sucroester à partir de glucose et d'acide octanoïque. Cette enzyme a catalysé l'acylation régiosélective de la fonction alcool primaire en position 6 sur le glucose avec un rendement de 90% (*schéma 3*).³⁰

²⁷ (a) Faber, K., *Biotransform. Org. Chem.* 2nd Edition, Springer, Berlin, 1996 ; (b) Carrea. G; Riva.S ; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, 39, 2226.

²⁸ Irimescu , M.R.; kato. k. *Tetrahydron Lett.*, 2004, 45, 523.

²⁹ Chebil.L. *Process.Biochem*, 2006, 2237-2251.

³⁰ Ljunger G., Adlercreutz P., Mattiasson B., *Biotechnol. Lett.* 1994, 16, 1167.

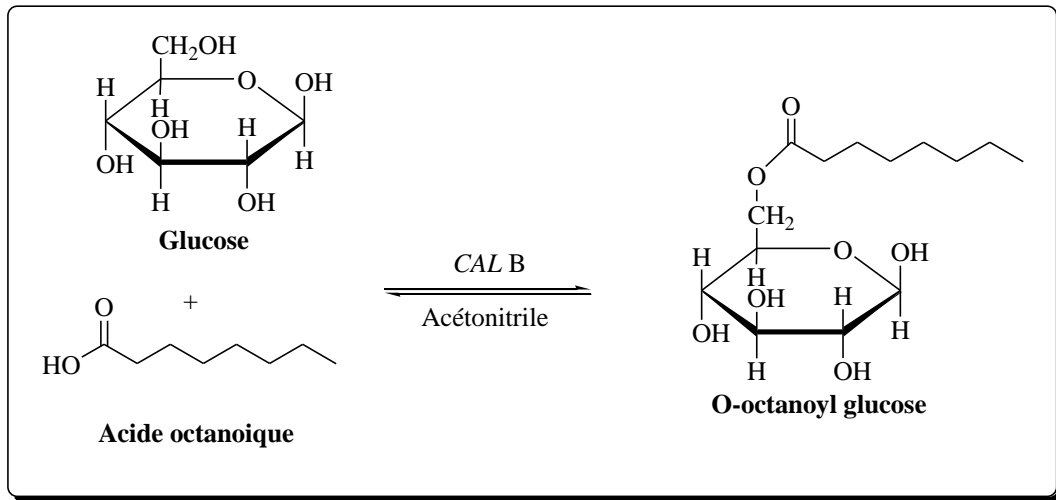


Schéma 3 : Acylation régiosélective du glucose catalysée par la CAL B.

- **Chimiosélectivité :**

La chimiosélectivité est la capacité d'une enzyme à interagir préférentiellement avec un groupe fonctionnel donné parmi des groupes fonctionnels distincts présents sur un substrat. A titre d'exemple, la CAL B s'est également montrée chimiosélective lors de l'acylation du N-méthyl-glucamine avec l'acide oléique. En effet le N-oléyle N-méthyl-glucamine, un tensioactif biodégradable a été sélectivement formé par rapport au O-oléyle N-méthyl-glucamine produit résultant de la O-acylation du substrat et avec des rendements pouvant atteindre 96% (schéma 4).³¹

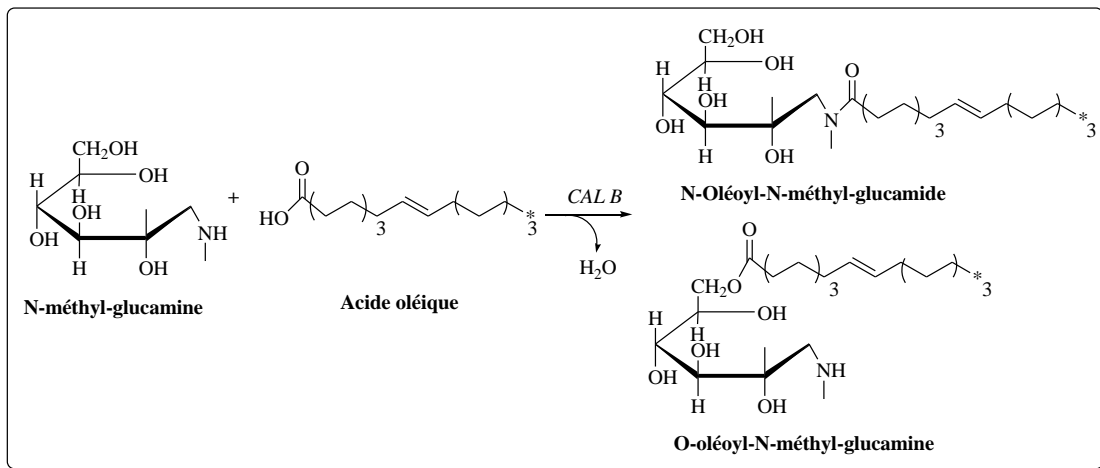


Schéma 4 : Acylation chimiosélective du N-méthyl-glucamine avec l'acide oléique catalysée par la CAL B.

³¹(a) Maugard, T., Remaud-Simeon, M. Monsan, P. *Biochimica. Biophysica. Acta – Protein. Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, 1387(1-2), 177.

Conclusion :

On parle de la catalyse enzymatique lorsqu'une réaction est catalysée par une enzyme. Les enzymes sont des protéines globulaires douées d'activité catalytique spécifique. La synthèse par voie enzymatique s'est développée depuis ces dernières années car elle est respectueuse de l'environnement devant l'attrait des industries pour les procédés de chimie verte. La polyvalence réactionnelle des enzymes notamment les lipases et la diversité de leurs propriétés catalytiques leur confèrent une place de choix pour des applications industrielles potentielle. Vu l'intérêt potentiel que révèle les spécificités lipasiques, au cours de ce stage Master nous nous sommes intéressés à l'étude des paramètres influençant la réaction d'acylation enzymatique des aminoalcools, notamment l'effet de l'eau.

Chapitre II
Acylation enzymatique des
aminoalcools

Introduction

Les aminoalcools constituent une classe très utile et polyvalente de composés naturels et synthétiques. Leur nom varie de β -aminoalcool, 1,2-aminoalcool au β -hydroxy amine. Ces composés sont utilisés en synthèse asymétrique comme auxiliaires chiraux, et plusieurs d'entre eux ont manifesté des activités biologiques intéressantes et sont devenus ainsi des cibles de choix pour les chimistes organiciens. De plus ils sont généralement importants dans le cadre de la recherche pharmaceutique³² et le développement de nouveaux médicaments.³³ La partie aminoalcool se trouve dans une large variété d'alkaloïdes et de peptides biologiquement actifs, les groupements amine et/ou alcool peuvent former des systèmes cycliques avec des réactifs appropriés ou être alkylé ou également acylé par voie chimique ou enzymatique.

i. L'intérêt des aminoalcools :

1. En pharmacie :

En pharmacologie, les aminoalcools apparaissent sous forme de groupes pharmacophoriques dans plusieurs médicaments, par exemple les inhibiteurs de la protéase antirétrovirale, le saquinavir (Fortovase), le ritonavir (Norvir), l'indinavir (Crixivan), le nelfinavir (Viracept) et l'amprénavir (Prozei). Ces médicaments sont utilisés pour bloquer la réplication du virus VIH en inactivant spécifiquement les enzymes protéases, qui sont essentielles à la survie du virus.³⁴

De plus, les aminoalcools se sont révélés très efficaces dans le traitement de maladies du cœur³⁵, d'asthme³⁶ et l'hypertension³⁷, ils sont également utilisés comme antifongiques³⁸ et antidépresseurs³⁹ pour le traitement des troubles psychiatriques.

³² (a) Sekar.G; Kamble.R.M; Singh.V.K; *Tetrahedron :Asymmetry*. **1999**, 10, 3663; (b) Masui.M; Shioii.T; *Tetrahedron Lett*. **1998**, 39, 5195; (c) Torre.O; Gotor-Fernandez.V; Gotor.V, *Tetrahedron Asymmetry*. **2006**, 17, 860.

³³ (a) Banfi.L; Beretta.M. G; Colombo.L; Gennari.C; Scolastico.C; *J. Chem. Soc. Perkin Trans*. **1983**, 1, 1614; (b) Fujita.T; Yoneta.M; Hirose.R; Sasaki.S; Inoue.K; Kiuchi.M; Hirase.S, Adachi.K; Arita.M; Chiba.K; *BioMed. Chem. Lett*, **1995**, 5, 847.

³⁴ Vasconcelos, T. R. A.; Ferreira, M. L.; Goncalves, R. S. B.; da-Silva, E. T.; de Souza, M. V. N. *Lamivudine, J. Sulfur Chem*. **2008**, 29, 559.

³⁵ (a) Lefkowitz, R. J. *Ann.Rep.Med.Chem*. **1980**, 15, 217. (b) Friishman, W. H. *New Engel.J.Med*. **1981**, 305, 500. (c) Miyano, S.; Lu, L. D. L.; Viti, S. M.; Sharpless, K. B. *J.Org.Chem*. **1983**, 48, 3608.

³⁶ Konzett, H. *Arch.Exp.Pathol.Pharmakol*. **1940**, 197, 27.

³⁷ Hanson, G. J.; Baran, J. S.; Lindberg, T.; Walsh, G. M.; Papiouannou, S. E.; Babler, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1985**, 132, 155.

³⁸ Searle, P. A.; Molinski, T. F. *J. Org. Chem* **1993**, 58, 7578.

³⁹ (a) Bagli, J. F.; Kluepfel, D.; St Jacques, M. *J. Org. Chem*. **1973**, 38, 1253; (b) Hirose, R.; Hamamichi, N.; Kitao, Y.; Matsuzaki, T.; Chiba, K. *Biomed. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 2647.

La *Bestatine* et la *Swainsconine*, qui possèdent toutes deux des activités anti-cancer ainsi que d'autres activités biologiques intéressantes, en sont des exemples.⁴⁰ Un autre exemple, la quinine qui est utilisée pour le traitement du paludisme (*Schéma 5*).⁴¹

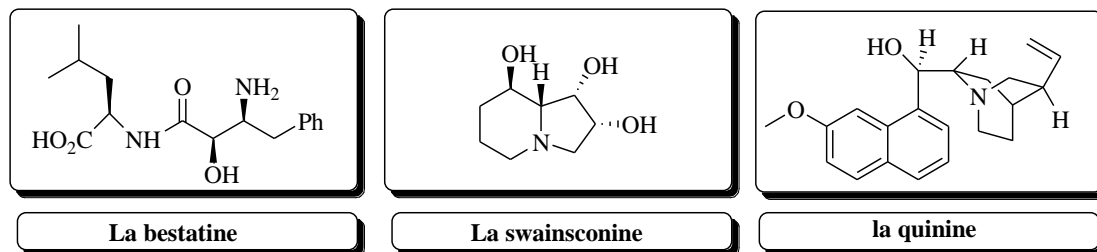


Schéma 5 : Exemples d'aminoalcools d'intérêt biologique

2. En synthèse :

L'importance des aminoalcools est aussi reconnue dans la chimie synthétique. En effet, certains aminoalcools ont été utilisés comme auxiliaires chiraux dans : la synthèse asymétrique,⁴² la résolution des mélanges racémiques,⁴³ la synthèse des hétérocycles et comme éléments constitutifs des médicaments.⁴⁴

L'*Oxazaborolidine* par exemple est utilisée pour la réduction asymétrique des composés carbonylés,⁴⁵ et le dérivé de la *Pseudoéphédrine* est utilisé dans la protonation énantiosélective d'énolate⁴⁶ (*Schéma 6*).

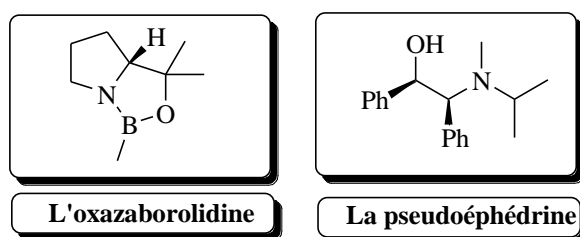


Schéma 6 : Aminoalcools utilisés comme auxiliaires ou ligands chiraux.

⁴⁰ Bergmeier.S.C, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 2561.

⁴¹ Nicolaou, K. C.; Boddy, C. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10451.

⁴² (a) Kano, T.; Ueda, M.; Maruoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3728; (b) Hobuss, D.; Baro, A.; Laschat, S.; Frey, W. *Tetrahedron*. **2008**, 64, 1635; (c) Metro.T, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 707.

⁴³(a) Sawayama, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 1382;(b) Horiuchi, F; Matsui, M. *Agr,D; Biol. Chem.* **1973**, 37, 1713; (c) Kawai. M; *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 3, 1019.

⁴⁴(a) Ella-Menye, J.R.; Wang, G. *Tetrahedron*. **2007**, 63, 10034; (b) Breuning, M.; Winnacker, M.;Steiner, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 13, 2100; (c) Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 835.

⁴⁵.Parker.K.A., Ledebor.M.W, *J.Org.Chem.* **1996**, 61, 3214.

⁴⁶Fehr.C, Galindo.J, *J. Angew.Chem.,Int. Ed. Engl.*, **1997**, 33, 1888.

ii. **Acylation enzymatique des aminoalcools :**

1. **Principe :**

Le principe de l'acylation enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase) dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, la réaction réverse de l'hydrolyse est favorisée et permet ainsi l'attachement covalent d'un groupe acyle sur une fonction nucléophile telle qu'une amine -NH₂ (N-acylation), une fonction thiol -SH (S-acylation) ou une fonction alcool -OH (O-acylation).⁴⁷

Le schéma général de synthèse consiste soit à catalyser la formation d'une liaison ester lorsque l'accepteur d'acyle comporte une fonction hydroxyle soit la formation d'une liaison amide lorsque celui-ci comporte une fonction amine (*Schéma 7*).

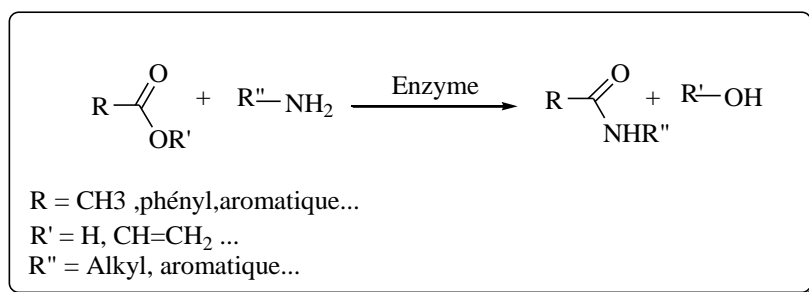


Schéma 7: Schéma général de la réaction d'acylation enzymatique.

Cette voie comporte plusieurs avantages par rapport à la voie chimique :

- Des vitesses de réaction plus grandes : les vitesses des réactions catalysées par des enzymes sont multipliées par des facteurs compris entre 10⁶ et 10¹² par rapport aux réactions correspondantes sans catalyseur.
- Des conditions de réaction plus douces : les réactions catalysées par des enzymes peuvent avoir lieu dans des conditions relativement douces : température en dessous de 100°C, pression atmosphérique, et pH proche de la neutralité.
- Une spécificité de réaction plus grande : les enzymes ont des propriétés de spécificité beaucoup plus grandes vis-à-vis de leurs substrats que les catalyseurs chimiques ; ainsi, les réactions enzymatiques ne donnent que rarement des produits secondaires (*voir le chapitre précédent*).

⁴⁷ Furutani.T, Su.R, Ooshima.H, Kato.J, *Enzyme. Microb. Technol.*, **1995**, 17(12), 1067.

2. Paramètres influençant l'acylation enzymatique des aminoalcools :

L'acylation enzymatique de composés de type « aminoalcools » a été décrite dans divers travaux par plusieurs enzymes ayant des propriétés acyltransférases en particulier des lipases (E.C. 3.1.1.3).⁴⁸ Différents facteurs peuvent influencer la réaction d'acylation enzymatique de ces molécules bifonctionnelle qui comportent à la fois des groupes amine et alcool, tels que : la nature d'enzyme, la nature du donneur d'acyle, la structure d'accepteur d'acyle et la nature du solvant.

a) Influence de la nature d'enzyme :

L'enzyme utilisée, son origine et son mode d'obtention, constituent un facteur primordial et déterminant pour l'acylation enzymatique, car chaque lipase possède sa propre caractéristique. Dans ce contexte, Une étude concernant l'influence de l'origine du biocatalyseur sur la sélectivité et les performances de l'acylation du 6-amino-1-hexanol a été réalisée³¹ par l'acide oléique en réacteur Syncore® avec un rapport molaire de 1 : 2. Trois lipases ont été testées : la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435®), la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée et la lipase de *Rhizomucor miehei* immobilisée (Lipozyme®) (**Tableau 2**). Les réactions catalysées par ces dernières sont mises en œuvre en solvant organique polaire (le 2-méthyl-2-butanol) étant donné leur aptitude à catalyser la synthèse de liaison ester et amide en milieu anhydre.⁴⁹

Tableau 2 : Comparaison des performances et de la chimio-sélectivité de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol en présence d'acide oléique catalysée par différentes enzymes dans le 2-méthyl-2-butanol en réacteur Syncore®.

Milieux réactionnels	Température (°C)	Enzymes	[ester] (mM)	[amide-ester] (mM)	taux de conversion de l'aminohexanol (%)
2-méthyl-2-butanol	55	Novozym 435®	7,5	73	86
		Lipozyme®	15	< 1	12
		Lipase de <i>P. cepacia</i> immobilisée	41	10	42

⁴⁸ Montet, D., Graille, J., Servat, F., Marcou, L. Renard, G. *Rev. Fr.*, **1989**, 36, 79.

⁴⁹ Fernandez-Perez, M. Otero, C. *Enzym. Microb. Technol.*, **2003**, 33(5), 650.

Le Novozym 435® s'est révélé être l'enzyme la plus performante lors de ce procédé d'acylation directe. En effet, il permet d'atteindre un taux de conversion du substrat de 86 % en 70 h. Avec ce biocatalyseur, le produit majoritaire synthétisé est le N, O-dioléyl aminohexanol. Tandis que, la lipase de *P. cepacia* conduit à un taux de conversion de 42 % avec une sélectivité en faveur de la O-acylation, et le Lipozyme® ne semble pas adéquat pour catalyser cette réaction. La sélectivité est en faveur de l'O-acylation avec cette enzyme.

b) Influence de la nature du donneur d'acyle :

En changeant le type d'agent acylant et dans les mêmes conditions, lors d'une acylation enzymatique, cela pourra affecter la réaction.⁵⁰

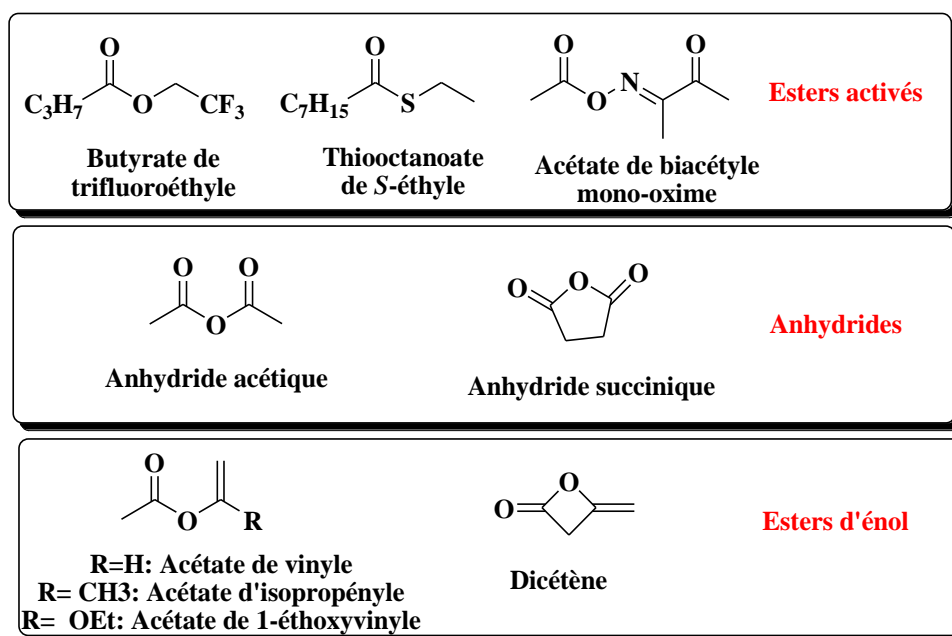


Schéma 8 : Exemples de donneurs d'acyle.

Il existe donc une spécificité entre l'agent acylant et l'enzyme. Sachant que les lipases donnent des meilleurs rendements pour les agents acylants ayant des chaînes grasses de longueurs intermédiaires.⁵¹

Différents types de donneurs d'acyles, tel que : les esters activés, les anhydrides⁵² et esters d'énol, sont présentés sur le **schéma 8**.

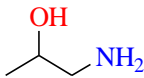
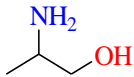
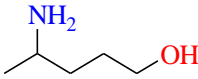
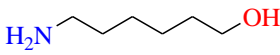
⁵⁰ Yadav.R.P, Saxena.R.K, Gupta.R, Davidson.W.S., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1998**, 28, 243.

⁵¹ Kawase.M, Sonomoto.K, Tanaka.A. *Biocatal.*, **1992**, 6, 43.

Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant comme agents acylants les vinyl esters (ester d'énol). Ce pendant, ces derniers sont coûteux et sont donc généralement remplacés par des esters méthyliques ou éthyliques.⁵³

c) Influence de la structure de l'accepteur d'acyle (le substrat) :

Tableau 3 : Constantes catalytique de N- et O-acylation d'aminoalcools avec l'acide myristique catalysée par la CAL B.⁵⁴

Accepteur d'acyle	Constante catalytique de N-acylation (mn ⁻¹)	Constante catalytique d'O-acylation (mn ⁻¹)
 1-amino-2-propanol	29	Non détecté
 Alaninol	50	Non détecté
 4-amino-1-pentanol	13	85
 6-amino-1-hexanol	12	130

Plusieurs études ont montré que la spécificité d'acylation de molécules dépend de la structure de l'accepteur d'acyle.⁵⁵ Plus précisément, il a été montré que le nombre de carbone constituant la chaîne carbonée séparant un groupe OH et un groupe NH₂ influence la chimiosélectivité lipasique.⁵⁶ Une chaîne carbonée courte (inférieure ou égale à trois carbones) comme celle de l'alaninol ou de l'éthanolamine induit majoritairement une N-acylation, alors qu'une chaîne carbonée plus longue (4 atomes de carbone et plus) comme celle du 4-amino-1-pentanol ou du 6-amino-1-hexanol

⁵² (a) Bianchi.D, Cesti.P, Battistel.E, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5531; (b) Terao.Y, Tsuji.K, Murata.M, Achiwa.K, Noshio.T, Watanabe.N, Seto.K, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 165; (c) Gutman.A, Brenner.L, Boltanski.D, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 839.

⁵³ Hyum.G.P, HoNam C. *Biotechnol. Lett.*, **2000**, 22, 39.

⁵⁴ Syren.P.O., Le Joubioux, F., Ben Henda, Y., Maugard, T., Hult, K., Graber, M. *Chemcatchem.* **2013**, 5, 1842.

⁵⁵ Furutani, T., Furui, M., Ooshima, H., and Kato, J. *Enzyme. Microb. Technol.* **1996**, 19, 578.

⁵⁶ Gotor.V., Brieva.R, Rebolledo.F. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1988**, 957.

induit une catalyse plus importante d'O-acylation. Ces résultats ont été confirmés lors de l'acylation chimiosélective des différents aminoalcools par la lipase *CAL B* avec l'acide myristique (**Tableau 3**).⁵⁷

d) Influence de la nature du solvant :

Les auteurs montrent que le solvant joue un rôle dans la chimiosélectivité de l'acylation des aminoalcools. Par exemple, La lipase de *Rhizomucor miehei* lors de l'acylation chimiosélective de l'aminopropanol⁵⁸ avec un acide gras dans un mélange n-hexane/chloroforme est retenue comme étant l'enzyme la plus efficace parmi celles testées.

Dans le chloroforme pur, seule la N-acylation du 2-aminopropan-1-ol est réalisée avec un rendement de 30% en 24 heures (**schéma 9**). Dans le n-hexane pur, les auteurs obtiennent 88% d'acylation dont 60 % de di-O, N-acylation, 15% d'O-acylation et 25% de N-acylation.

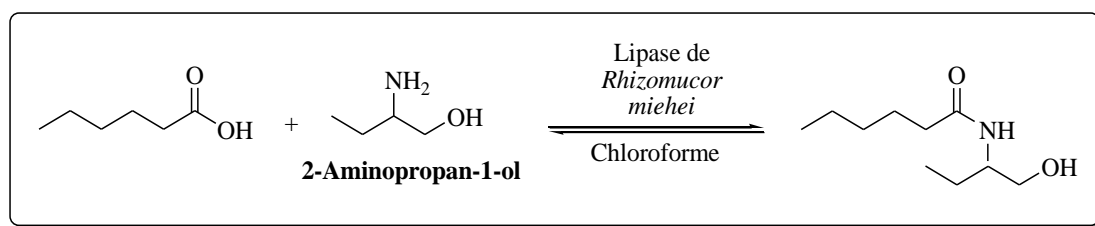


Schéma 9 : Acylation chimiosélective de 2-aminopropanol avec un acide gras catalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei*.

Un autre exemple impliquant la *CAL B* lors d'une étude portant sur l'acylation du 6-aminohexan-1-ol. Dans cette étude ils ont montré que le milieu réactionnel joue un rôle dans la chimiosélectivité de l'acylation.⁵⁹ En effet, dans le cas de réactions réalisées sans solvant (le donneur d'acyle joue le rôle du solvant), la *CAL B* catalyse la O-acylation majoritairement (**schéma 10**) avec un rendement de 91%. Tandis que, dans des solvants organiques et des liquides ioniques, le produit issu de la di-O-N-acylation a été obtenu (O-acylation suivie d'une N-acylation) avec des

⁵⁷ (b) Le Joubioux, F., Henda, Y.B., Bridiau, N., Achour, O., Graber, M., Maugard, T. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, 85–86, 193.

⁵⁸ (a) Montet, D., Graille, J., Servat, F., Marcou, L. *Rev. Fr.* **1989**, 36, 79.

⁵⁹ Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I. Chevalot. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 55 (3-4), 110.

rendements atteignant au maximum 94% dans un milieu de type liquide ionique : le [Bmim][PF6].

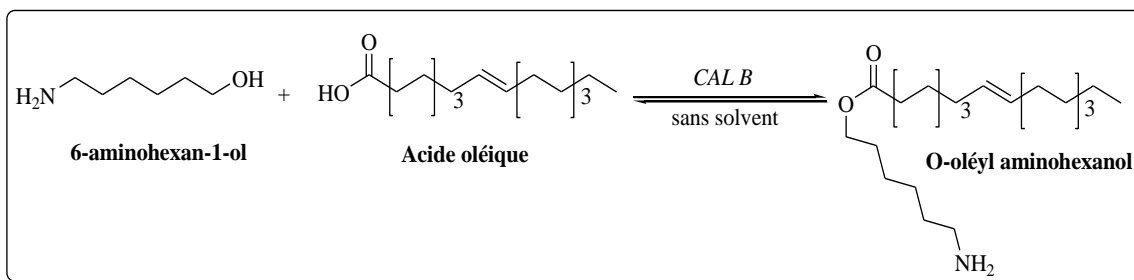


Schéma 10 : Acylation chimiosélective du 6-aminohexan-1-ol avec l'acide oléique catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* sans solvant.

e) Autres paramètres affectant l'acylation enzymatique :

• **L'eau dans le milieu réactionnel :**

La quantité d'eau disponible pour l'enzyme dans des milieux dits « non conventionnels », joue un rôle important dans les réactions de synthèse catalysées par les hydrolases et en particulier par les lipases (E.C. 3.1.1.3). Les effets possibles de l'eau sur l'activité catalytique des enzymes s'exercent selon plusieurs mécanismes et sont généralement dus à un manque ou un excès d'eau.⁶⁰

Plusieurs études ont montré que l'eau est indispensable à l'initiation d'une réaction, car elle contribue aux liaisons non-covalentes qui stabilisent la structure de l'enzyme et permet le maintien de la mobilité protéique, souvent associé à la quantité d'eau adsorbée sur le biocatalyseur. L'eau liée aux protéines est essentielle pour la catalyse et sert de lubrifiant pour l'enzyme.⁶¹ En effet, l'eau, en fonction de sa disponibilité pour l'enzyme, semble influencer la flexibilité de cette dernière.⁶² Elle permet donc une certaine mobilité intramoléculaire. De ce fait en absence totale d'eau, l'enzyme est comme figée et ne peut effectuer la catalyse. Par contre, il a également été observé que les enzymes dans des solvants organiques à forte teneur en eau présentent une dénaturation.⁶³

⁶⁰ Zaks, A. Klivanov, A.M. *Science*. **1984**, 224, 1249.

⁶¹ Zaks, A. Klivanov, A.M. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (17), 8017.

⁶² Simon, L.M., László, K., Vértesi, A., Bagi, K. Szajáni, B. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, 4 (1-2), 41.

⁶³ Klivanov, A.M. *Nature*. **2001**, 409, 241.

La quantité d'eau disponible, susceptible d'intervenir dans la réaction, est donnée par une mesure d'activité de l'eau (a_w).⁶⁴ L' a_w est le paramètre thermodynamique d'équilibre permettant de définir l'état de l'eau dans des systèmes, il est ainsi possible de définir l'état d'hydratation de toutes les composantes d'un système. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance d'une (a_w) initiale du solvant organique inférieure à 0.1 afin que l'efficacité de l'acylation enzymatique soit optimale.⁶⁵

Valivety *et al.*, en 1992 ont étudié dans différents milieux l'effet de l'eau sur la réaction de O-acylation entre l'acide décanoïque et le dodécanol par la lipase de *Rhizomucor miehei* immobilisée. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont clairement démontré la différence entre l'impact de la teneur en eau et de l' a_w . En effet, dans les différents milieux testés (*n*-hexane, trichloroéthylène, éther isopropylique, 3-pentanone et sans solvant) des optima différents ont été mis en évidence, si les résultats sont exprimés en fonction de la teneur en eau, et à l'inverse le même optimum à savoir $a_w = 0,5$ a été mis en évidence si les résultats sont exprimés en fonction de l' a_w du système.⁶⁶

Robert *et al.*, en 1992 ont caractérisé l'état d'hydratation d'un biocatalyseur par une façon traditionnelle consiste à déterminer l'isotherme de sorption.⁶⁷ Pour montrer la relation entre l'activité catalytique et l'état d'hydratation du catalyseur. Une certaine masse d'échantillon est placée dans une enceinte où l' a_w est contrôlée et une fois l'équilibre atteint entre une phase gazeuse (eau sous forme de vapeur) et une phase solide (eau adsorbée par le solide), la teneur en eau est déterminée par différentes méthodes de dosage : gravimétrique ou coulométrique.⁶⁸ La **Figure 4** présente les isothermes de sorption permettent de distinguer les différents états

⁶⁴(a) Wehtje, E. Adlercreutz, P. *Biotechnol. Lett.* **1997**, 19(6), 537. (b) Wehtje, E. Adlercreutz, P. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, 55(5), 798.

⁶⁵(a) Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B. Miclo, A. *J. Biotechnol.* **1998**, 63(1), 1. (b) Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M. Ghoul, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 11(4-6), 949.

⁶⁶ (a) Valivety, R. H., Halling, P. J. Macrae, A. R. *Biochimica. Biophysica. Acta – Protein. Struct. Mol. Enzymol.*, **1992**, 1118(3), 218.

⁶⁷ Robert, H., Lamare, S., Parvaresh, F. Legoy M.D. *Prog. Biotechnol.* **1992**, 8, 23.

⁶⁸ (a) MacLeod, S. K. *Anal. Chem.* **1991**, 63 (10), 557. (b) Bernetti, R., Kochan, S.J., Pienkowski, J.J., Hendrikse, P.W., Holme, R.A., Kielbaskiski, R., Lin, S.W., Manning R.G., Olah, I., Pike, M., Pocklington, W.D., Prins, W.F., Priss, A., Somkaite, R., Steele, W.M., Trautschold, E.W., Wijnsman, J.A. Wolff, P. Karl Fischer. *J. A. off. Anal. Chem.* **1984**, 67 (2), 299.

de l'eau.⁶⁹ La courbe présente 2 point d'inflexion caractéristiques (A et B) correspondant à deux états de l'eau.⁷⁰

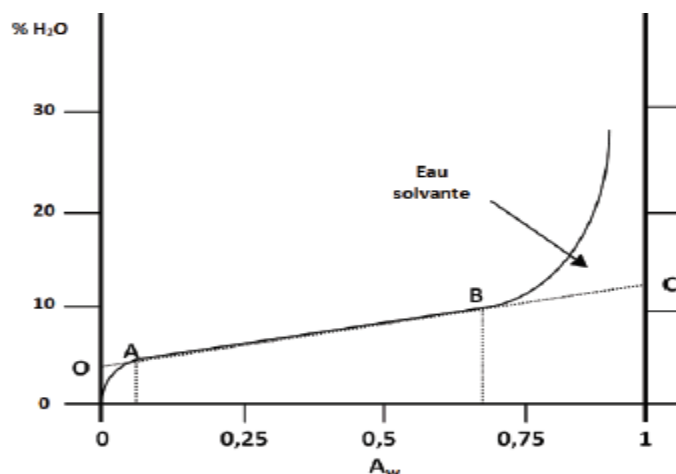


Figure 4 : Représentation schématique d'une isotherme de sorption.

Les molécules d'eau fixées sur l'échantillon correspondant à la partie située avant le point A sur la courbe, sont les molécules très fortement liées. Elles sont positionnées majoritairement sur les sites polaires et les résidus ionisés. Ces molécules constituent la première « couche » d'hydratation. Par extrapolation, le point O correspond à la quantité d'eau très fortement liée à l'échantillon.

Entre les points A et B, la teneur en eau varie de façon linéaire avec a_w . C'est la formation d'une nouvelle couche d'hydratation, au niveau de la protéine. Les molécules d'eau sont alors liées à la protéine par des liaisons de plus faible énergie et la teneur en eau du milieu réactionnel est donc proportionnelle à la couche d'hydratation du biocatalyseur.

Le deuxième point d'inflexion B correspond alors à l'apparition d'eau solvante (non liée au biocatalyseur) et une fois dépassée la valeur d' a_w qui lui correspond, une phase aqueuse, distincte de la couche d'hydratation, prend naissance. Par extrapolation de la partie AB linéaire, nous pouvons déterminer le point C correspondant à la quantité totale d'eau non solvante, structurée par l'échantillon (quantité totale d'eau fixée sur le biocatalyseur).

⁶⁹ Drapon, R., *Enzyme activity as a function of water activity*. in: Simatos, D. Multon, J.L. (Eds) *Properties of Water in Foods*. Nyhoff, Dordrecht, The Netherlands. 1985

⁷⁰ Hahn-Hagerdal, B. *Enzym. Microb. Technol.* 1986, 8, 322.

La courbe de sorption montre que l'eau solvant apparaît au-delà de B. C'est pour cette valeur qu'est observée la plus forte activité catalytique. Cependant, la stabilité est fortement affectée pour des a_w supérieures. La présence d'eau solvante est responsable d'une importante dénaturation des protéines. Le bon compromis entre une bonne stabilité et une bonne activité catalytique se situe généralement lorsque le catalyseur est entouré d'une première couche d'hydratation, juste avant l'apparition d'eau solvante (B).

Furutani *et al.*, en 1996 en étudiant l'acylation enzymatique d'alcool aminé dans le 2-méthyl-2-butanol catalysée par différentes lipases ont suggéré qu'une a_w minimale était tout de même requise afin de conserver l'activité enzymatique optimale. Le graphique ci-dessous (**Figure 5**) décrit cette influence.⁷¹

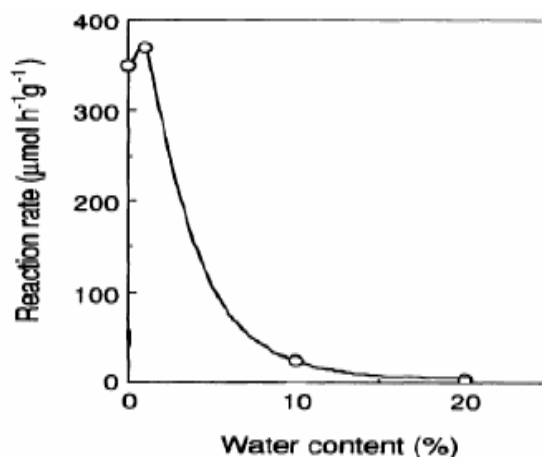


Figure 5 : Influence de l'activité de l'eau initiale du milieu réactionnel sur la vitesse initiale de réaction de N-acylation d'un alcool aminé dans le 2-méthyl-2-butanol à 70 °C catalysée par la lipase QL d'*Alcaligenes sp.* D'après Furutani *et al.*, (1996).

Ces résultats s'expliquent par l'effet de l'eau sur la polarité du site actif de la protéine, sur sa flexibilité et sur l'équilibre thermodynamique de la réaction. Les molécules d'eau sont engagées dans de multiples liaisons hydrogènes et apportent la mobilité conformationnelle indispensable à l'activité enzymatique.⁷² Une très faible a_w résiduelle entraînerait une rigidification de la protéine induisant alors son inactivité.⁷³ En opposition à cela, une trop grande a_w entraînerait une accumulation de molécules

⁷¹ Furutani.T, Furui.M, Ooshima.H, J. Kato. *Enzym. Microb. Technol.*, **1996**, 19(8), 578.

⁷² Klibanov, A. M. *Nature*. **2001**, 409(6817), 241.

⁷³ Klibanov, A. *Trends. Biotechnol.* **1997**, 15(3), 97.

d'eau autour de l'enzyme constituant alors une barrière diffusionnelle pour les substrats hydrophobes et induirait une activité hydrolytique résiduelle conséquente.⁷⁴

Remarquons que dans le cas d'une acylation directe catalysée par une lipase, les molécules d'eau libérées sont susceptibles d'orienter la réaction vers l'hydrolyse si les concentrations en substrats utilisés sont de l'ordre du molaire.⁷⁵ Pour limiter cette réaction indésirable d'hydrolyse, plusieurs solutions peuvent être envisagées : ajout de tamis moléculaire ou procédé sous pression réduite.⁷⁶

En 2001 Chamouleau *et al.*, ont démontré que pour une faible (a_w), la lipase B de *Candida antarctica* conserve une activité élevée lors d'une étude portant sur l'acylation du fructose par l'acide palmitique dans le 2-méthylbutan-2-ol.⁷⁷ Lors de cette étude, les vitesses initiales et les rendements diminuent avec l'augmentation de l' a_w , les meilleurs taux de synthèse sont obtenus pour une $a_w = 0,1$ qui correspond à une hydratation du biocatalyseur inférieure à 10%. Ces résultats ont été confirmés par le groupe de Lamare en obtenant également une activité catalytique optimale de la lipase B de *Candida antarctica* pour une $a_w = 0,1$ lors de la O-acylation d'alcools à partir d'acides dits « naturels ».⁷⁸

L'effet de l'activité de l'eau a aussi fait l'objet d'études avec des cellules entières en phase gazeuse.⁷⁹ Contrairement aux enzymes libres, les cellules entières déshydratées nécessitent une hydratation relativement élevée pour être actives.⁸⁰ En effet, Maugard *et al.*, en 2001 ont montré que l'activité de la levure de *Saccharomyces cerevisiae* est nulle pour une a_w inférieure à 0,4.⁸¹ Lorsque l' a_w augmente, l'activité de la levure augmente jusqu'à une a_w égale à 0,7 qui correspond à l'apparition de l'eau solvante (**Figure 6**).

⁷⁴ (a) Valivety, R. H., Halling, P. J. Macrae, A. R. *Biochimica. Biophysica. Acta – Protein. Struct. Mol. Enzymol.* **1992**, 1118(3), 218.

⁷⁵ Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M. Ghoul, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 11(4-6), 949.

⁷⁶ Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Moussou, P., Pauly, G. Ghoul, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, 29(1-6), 63.

⁷⁷ Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M. Ghoul, M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 11 (4-6), 949.

⁷⁸ Lamare, S., Caillaud, B., Roule, K., Goubet, I. Legoy, M.D. *Biocatal. Biotransform.* **2001**, 19 (5-6), 361.

⁷⁹ Hamstra, R.S., Murriss, M.R. Tramper, *J. Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 29, 884.

⁸⁰ Van-Ginkel, C.G. De-Bont J.A.M. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 30, 799.

⁸¹ Maugard, T., Lamare, S. Legoy, M.D. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 73 (2), 164.

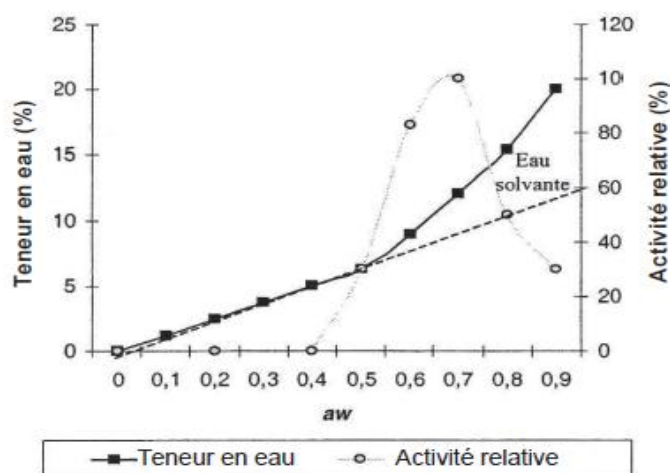


Figure 6 : Effet de l'activité thermodynamique de l'eau sur l'activité alcool déshydrogénase de la levure de *Saccharomyces cerevisiae* déshydratée en phase gaz et sur la teneur en eau (Maugard et al., 2001).

En 2009 Léonard-Nevers et al., ont effectué une étude portant sur l'effet de l' a_w sur l'activité et l'énantiosélectivité de la *CAL B*.⁸² Ils ont évalué l'influence de la teneur en eau ($0 < a_w < 0,5$) sur des réactions d'acylation d'alcools secondaires avec comme donneur d'acyle du propanoate de méthyle dans un réacteur lit fixe séché avec de l'azote avant de faire passer le solvant, et avec injection en continu des substrats. Les résultats obtenus ont montré un effet de l' a_w important sur l'activité et l'énantiosélectivité de la *CAL B*.

La (Figure 7.1) représente le ratio énantiomérique en fonction de l'activité de l'eau avec différents alcools comme accepteur d'acyle. Ces résultats montrent une augmentation de l'énantiosélectivité lorsque l' a_w est très faible pour le pentan-2-ol et l'hexan-2-ol. Lorsque l'activité de l'eau augmente au-delà d'un certain seuil, l'énantiosélectivité diminue excepté pour le butan-2-ol. Dans cette étude, il a été montré que la diminution de l'énantiosélectivité était due à une augmentation défavorable du terme entropique et donc à une différence d'énergie libre d'activation. L'observation d'une augmentation puis d'une diminution de l'énantiosélectivité pour le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol serait induite par le passage par un seuil d' a_w permettant le recouvrement complet des groupements polaires du biocatalyseur immobilisé.

Sur la (Figure 7.2) sont représentés les rendements des réactions d'acylation en fonction de la teneur en eau. Pour le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol, on observe une

⁸² Léonard-Nevers, V., Marton, Z., Lamare, S., Hult, K., Graber, M. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, 59, 90.

augmentation de l'activité lorsque la teneur en eau est comprise entre 0 et 0,02 puis une diminution de celle-ci. Ces résultats représentent bien l'action de l'eau comme un nucléophile compétitif voire un inhibiteur compétitif d'alcools au-delà d'un certain seuil. Ce phénomène a été confirmé par une étude de modélisation moléculaire.⁸³

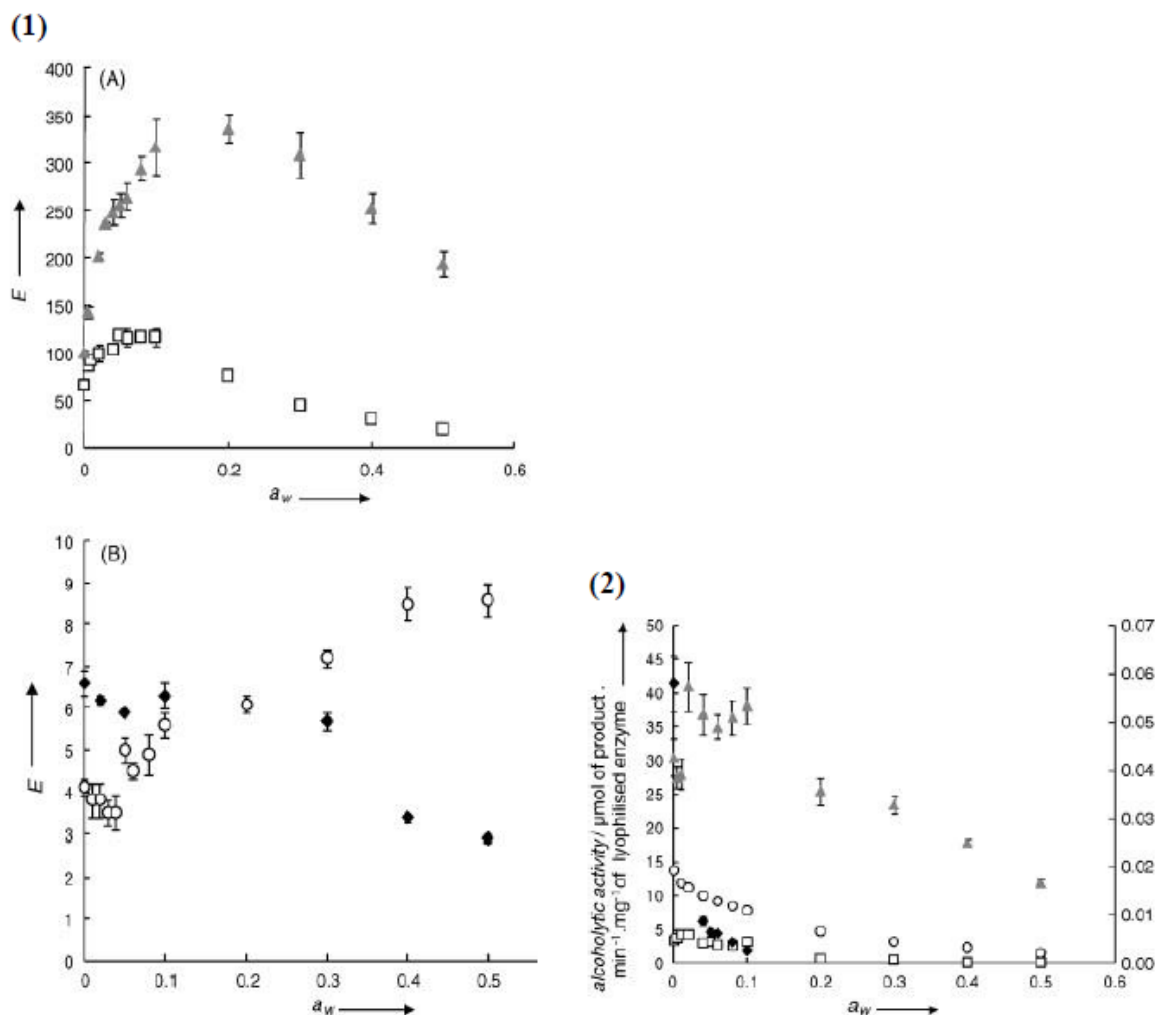


Figure 7: Influence de l'activité thermodynamique de l'eau, a_w , (1) sur l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* pour l'acylation du pentan-2-ol (▲) et de l'hexan-3-ol (□) A du butan-2-ol (○) et de l'octan-4-ol (◆) B avec le méthyl propanoate comme donneur d'acyle. (2) sur l'activité acyltransferase l'échelle de droite se réfère à l'octan-4-ol.

Conclusion :

Les aminoalcools sont des composés bifonctionnels très importants en synthèse et en pharmacie. Dans ce chapitre nous avons abordée l'acylation enzymatique de ces

⁸³ Léonard, V., Fransson, L., Lamare, S., Hult, K., Graber, M. *ChemBioChem*. **2007**, 8, 662.

Chapitre II: Acylation enzymatique des aminoalcools

molécules bifonctionnelles ainsi que les différents paramètres susceptible d'influencer cette réaction tels que : la nature de l'enzyme, du donneur d'acyle, et celle du substrat, ainsi que la nature du solvant. Ces derniers ne sont pas les seuls paramètres influençant la réaction d'acylation enzymatique, en effet il y a d'autre paramètre tel que l'eau présent dans le milieu réactionnel. En effet, Il a été démontré que la teneur en eau dans ce dernier est l'un des principaux facteurs qui doit être maîtrisé. Pour cela au cours de notre stage de Master, nous nous sommes intéressés à l'examen de effet de l'eau sur la chimio-sélectivité de la réaction d'acylation d'un aminoalcool, a savoir le 2-aminobutan-1-ol.

Chapitre III
Acylation enzymatique du
(±)-2-aminobutan-1-ol

Introduction

Comme nous avons pu le constater suite à l'étude bibliographique, l'étude des réactions catalysées par les enzymes constitue un domaine de recherche en pleine expansion notamment dans le secteur de l'agroalimentaire, de la pharmacie et cosmétique. Les lipases constituent l'une des catégories d'enzymes les plus sollicitées pour catalyser les réactions enzymatiques. L'étude de ce type de réactions doit tenir compte des différents paramètres susceptibles de régir le procédé enzymatique telle que : la nature de la lipase, du donneur d'acyle et aussi celle du solvant...

Dans ce chapitre nous allons étudier les paramètres influençant la réaction d'acylation d'un β -aminoalcool, à savoir le **(\pm)-2-aminobutan-1-ol**, catalysé par les lipases en mettant l'accent sur l'effet de l'eau sur cette réaction.

1. Objectifs de l'étude :

Suite aux travaux préalablement menés dans notre équipe dont le but était de mieux comprendre le rôle des différents facteurs pouvant influencer la chimio sélectivité de la réaction d'acylation enzymatique d'une molécule bifonctionnelle, tels que : l'origine de la lipase, la nature du donneur d'acyle, et la nature du solvant, dans ce mémoire de Master, nous souhaitons, d'étudier la chimiosélectivité de la réaction d'acylation du **(\pm)-2-aminobutan-1-ol**, catalysé par les lipases tout en mettant en avant l'effet de l'eau sur cette même réaction. La maîtrise de ce paramètre pourra nous aider à limiter les étapes de distillation préalable et/ou séchage de solvant, ainsi que la nécessité d'une atmosphère anhydre pour effectuer la réaction d'acylation, ce qui permettra de mettre en évidence des modes de conception des molécules d'intérêt potentiel, en quantités substantielles dans les conditions écologiques.

Pour réaliser notre objectif, plusieurs investigations ont été menées :

- ↳ Dans une première étape, l'étude de l'effet de différents paramètres peuvent influencer la chimiosélectivité de l'acylation, tels que l'origine de la lipase et du donneur d'acyle a été réalisée dans un solvant organique.
- ↳ Dans une deuxième étape une étude de l'effet de l'eau sur la réaction d'acylation a été réalisée.

2. Choix des modèles de l'étude :

a) Choix du substrat :

Notre choix est porté sur le (\pm)-2-aminobutan-1-ol vue son usage important notamment en thérapie, en effet ce dernier permet d'accéder, au (*S*)-2-aminobutan-1-ol énantiomériquement enrichie, produit d'utilisation industrielle majeure, pour l'obtention de l'Ethambutol⁸⁴(schéma 11), antibiotique bactériostatique et antimycobactérien, utilisé pour le traitement privilégié contre la tuberculose et d'autres infections provoquées par des mycobactéries.

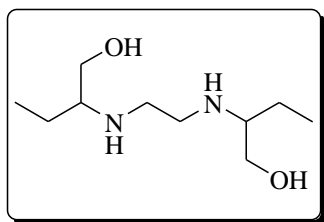


Schéma 11 : Structure de l'Ethambutol.

b) Choix des lipases :

Nous avons choisi trois lipases de nature microbienne ayant des activités différentes; deux libres sous leurs formes sauvages et une immobilisée :

- ↳ La lipase de *Pseudomonas cepacia* (PSL), (*Ps. Amano*) d'une activité de plus de 30000 unités/g.
- ↳ La lipase de *Candida cylindracea* (CCL) d'une activité de 3.48 unités/g, de chez *Fluka*.
- ↳ La lipase de *Candida antarctica* (CAL B) immobilisée sur résine acrylique d'une activité plus de 10000 unités/g, de chez *Sigma*.

c) Choix des agents acylants :

Nous avons choisis trois agents acylants, dont deux sont des esters d'énol, qui sont les donneurs d'acyle les plus utilisés dans les réactions enzymatique, par le fait qu'ils sont considérés comme agents acylants irréversibles. Le troisième est l'acétate d'éthyle considéré comme donneur d'acyle quasi irréversible⁸⁵ utilisé essentiellement lors des réactions de dédoublement cinétique enzymatique des amines. Les agents acylants sélectionnés sont donc (schéma 12) :

- ↳ L'acétate d'éthyle (EtOAc).
- ↳ L'acétate de vinyle (AV).

⁸⁴ Fadnavir.N.W; Sharfuffin.M; Vadivel.S.K; *Tetrahedron:Asymmetry*. **1999**, 10, 4495.

⁸⁵ (a) Degueil-Castaing.M, De Jeso.B, Drouillard.S, Maillard.B , *Tetrahedron. Lett.*, **1987**, 28 (9), 953. (b) Wang.Y.F, Wong.C.H , *J. Org. Chem.* , **1988**, 53, 3129; (c) Hanefeld.U, *Org. Biomol.*, **2003**, 1, 2405.

↳ L'acétate d'isopropényle (AI).

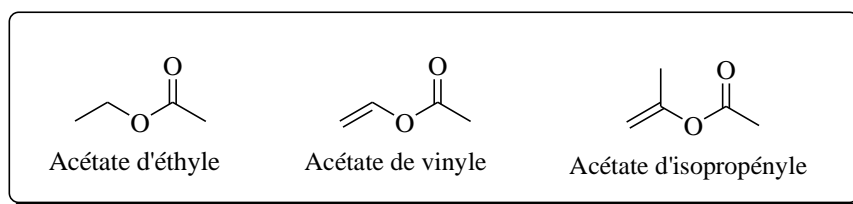


Schéma 12 : Structure des agents acylants choisis.

L'acétate de vinyle est plus actif que l'acétate d'éthyle par la présence de la double liaison vinylique, tandis que l'acétate d'isopropényle est encombré par la présence du méthyle.

3. Etude des paramètres influençant la chimiosélectivité lipasique lors de l'acylation du 2-aminobutan-1-ol :

Nous avons envisagé d'étudier l'influence de quelques paramètres essentiels qui peuvent intervenir directement sur le processus catalytique enzymatique : l'enzyme, l'agent acylant et le solvant organique, lors de l'acylation chimiosélective du (\pm)-2-aminobutan-1-ol.

Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné un β -aminoalcool d'intérêt potentiel, le (\pm)-2-aminobutan-1-ol. Cette molécule, de part sa structure est susceptible d'être *N*- et/ou *O*-acylée (**schéma 13**), et constitue donc un modèle intéressant pour l'étude de la sélectivité réactionnelle lors de son acylation enzymatique dans un solvant organique.

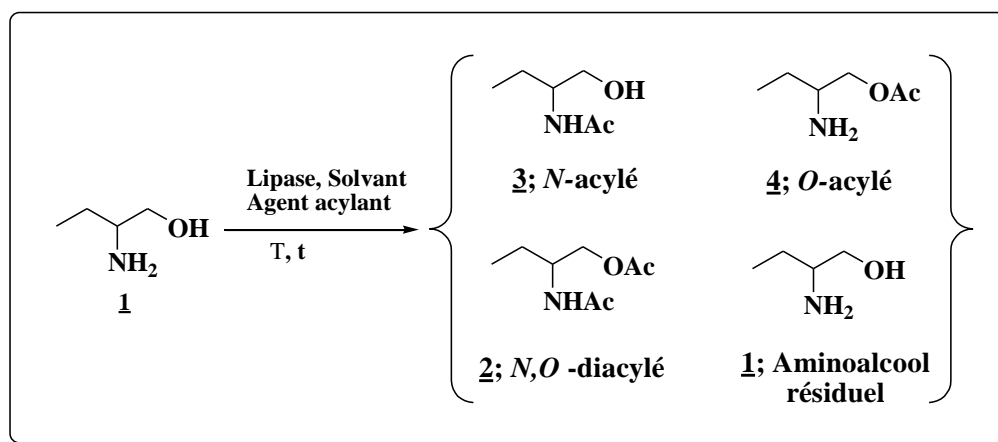
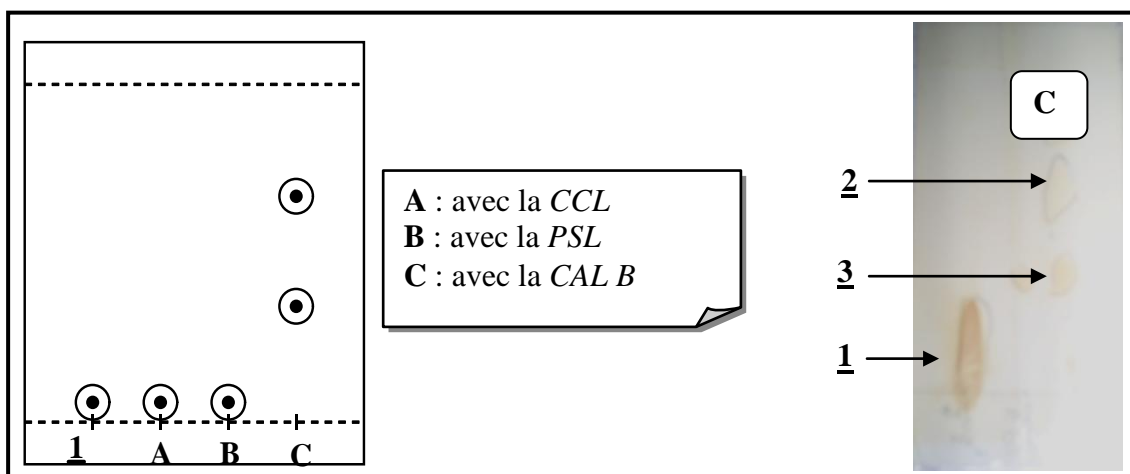


Schéma 13: Acylation lipasique du (\pm)- 2-aminobutan-1-ol.

a) Effet de la nature d'enzyme :

L' aminoalcool **1** (1 mmol) est acylé par 2 équivalents d'acétate d'éthyle comme agent acylant en présence d'une quantité catalytique de lipase : la *CCL* (100 mg), la *PSL* (80 mg) et la *CAL B* (12 mg) dans 1 mL de TBME.⁸⁶ La réaction est menée sous agitation magnétique thermostaté à 30 °C durant 24 heures. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) (*Figure 8*).



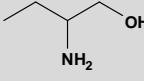
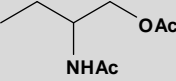
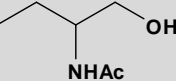
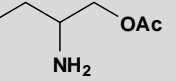
*Figure 8 : Démonstration de l'élution des produits réactionnels de l'acylation de **1**.*

D'après l'analyse qualitative du mélange réactionnel par CCM, seule la *CAL B* s'est montrée active. On effet, une consommation totale de l' aminoalcool de départ est notée avec la formation de deux nouveaux produits révélés à la ninhydrine (réactif spécifique aux fonctions amines) moins polaires que l' aminoalcool de départ. Les mélanges réactionnels sont filtrés sur célite puis évaporées sous vide. Les produits obtenus sont par la suite séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice, avec un mélange d'éluants : CH₂Cl₂/MeOH (90/10). Le produit **2** est sous forme cristalline blanche, ayant un point de fusion de 74 °C, et le produit **3** est sous forme d'une huile limpide jaunâtre.

Les résultats obtenus suite à l'étude de l'effet de la nature d'enzyme sur la réaction d'acylation de l' aminoalcool **1** sont réunis dans le **tableau 4**. Ces essais visaient à trouver l'enzyme la plus efficace pour réaliser la réaction d'acylation enzymatique de l' aminoalcool **1** choisi pour effectuer notre étude.

⁸⁶ Suite à une étude préalablement réalisée dans notre laboratoire, le TBME s'est avéré le meilleur solvant pour effectuer la réaction d'acylation du 2-aminobutan-1-ol.

Tableau 4: Acylation du 2-aminobutan-1-ol **1** catalysée par différentes lipases.

Entrée ^(a)	Lipase (mg)	Rdt 1 (%) ^(b) 	Rdt 2 (%) ^(b) 	Rdt 3 (%) ^(b) 	Rdt 4 (%) ^(b) 
1	<i>CCL (100mg)</i>	-	-	-	-
2	<i>PSL (80 mg)</i>	-	-	-	-
3	<i>CAL B (12mg)</i>	-	05	63	-
4	<i>CAL B (20mg)</i>	-	08	84	-

a) 1 mmol d' aminoalcool avec 2 mmol d'AcOEt dans 1 mL de TBME. 24 heures de réaction à 30°C (condition réactionnelles préalablement optimisées par notre équipe).

b) Rendements chimiques isolés déterminés après la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Le **tableau 4**, montre que les résultats obtenus varient selon la nature de la lipase mise en jeu lors de l'acylation de **1** :

- Tout d'abord, seule la *CAL B* (**entrée 3**), qui est une lipase immobilisée, se montre réellement, performante pour cette réaction, le produit qui se forme majoritairement est le *N*-acylé **3** avec un rendement chimique isolé de **63%**, ce rendement est nettement amélioré en augmentant la quantité de la lipase de 12 mg à 20 mg (**entrée 3 versus 4**) ; le *N*-acylé **3** est ainsi récupéré avec un rendement chimique isolé de **84 %**. Ceci constitue un résultat intéressant pour l'acylation du 2-aminobutanol.
- Les deux autres lipases (*PSL* et *CCL*) (**entrées 1 et 2**) utilisées sous forme libre, étaient totalement inactives lors de l'acylation de cet aminoalcool, elles ne sont pas alors adéquates pour notre étude.

Ces résultats confirment la performance des lipases immobilisés par rapport à celles libres en termes de stabilité⁸⁷.

❖ **Détermination des structures des produits obtenus :**

La formation des produits obtenus a été confirmée par l'étude des analyses spectrales usuelles (IR, RMN ¹H et RMN ¹³C).

⁸⁷ Alloue.W.A.M; Aguedo.M; Destain.J; Ghalfi.H; Blecker.C; Wathelet.J.P; Thonart.P; *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008**, 12 (1), 57.

Composé 2 (N,O-diacylé) :

✚ En RMN ¹H :

La formation du produit N,O-diacylé est confirmée par l'apparition de deux singulets vers $\delta = 1.95$ ppm et $\delta = 2.10$ ppm caractéristique des groupements méthyles de l'ester et de l'amide respectivement ($-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{CH}_3, -\text{NHC}(\text{O})-\text{CH}_3$), ainsi qu'un large singulet plus déblindé vers $\delta = 5.90$ ppm qui correspond au $-\text{NH}$ (*Figure 9*).

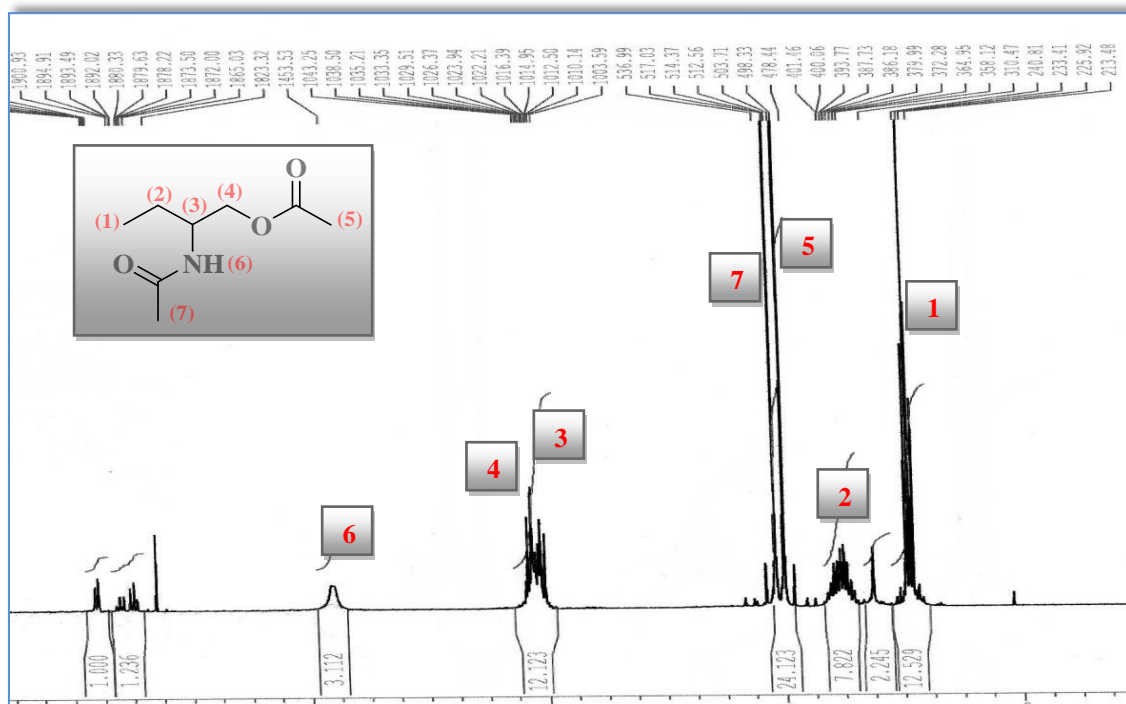


Figure 9 : Spectre RMN ¹H du composé N,O-diacylé 2.

✚ En RMN ¹³C :

En résonance magnétique nucléaire du carbone 13, la structure du composé N,O-diacylé 2 est élucidée par l'apparition de deux signaux à $\delta = 169,95$ ppm et à $\delta = 171,13$ ppm, caractéristiques du carbone du groupement C=O de l'ester et celui de l'amide, respectivement (voir l'annexe).

✚ En IR :

La formation de ce produit N,O-diacylé est bien claire sur le spectre IR. En effet, on observe deux bandes caractéristiques d'élongation et de vibration l'une de la liaison C=O de la fonction ester vers $\nu = 1724$ cm^{-1} et celle de la fonction amide vers $\nu = 1629$ cm^{-1} , une bande caractéristique de la vibration d'élongation de la liaison C-O de la fonction ester à $\nu = 1269$ cm^{-1} ainsi que la disparition de la bande de vibration de valence de l'hydroxyle a $\nu = 3300$ cm^{-1} .

Composé 3 (N-acylé) :

✚ En RMN ¹H :

La formation de ce produit est confirmée par l'apparition d'un doublet vers $\delta = 2.9$ ppm caractéristique du groupement méthyle de l'amide et le maintien du signal du proton de la fonction alcool vers $\delta = 3.60$ ppm (**Figure 10**).

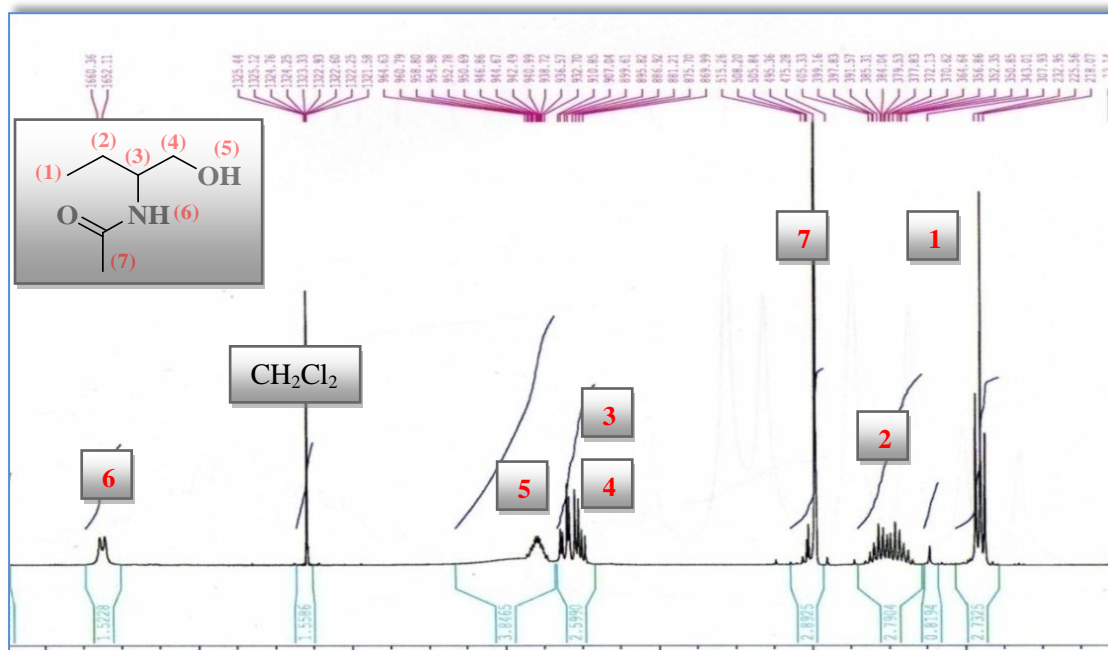


Figure 10 : Spectre RMN ¹H du composé N-acylé 3.

✚ En RMN ¹³C :

En résonance magnétique nucléaire du carbone 13, la structure du composé N-acylé 3 est élucidée par l'apparition d'un signal caractéristique de l'amide à $\delta = 171,45$ ppm (voir l'annexe).

✚ En IR :

La formation de ce produit N-acylé est bien claire sur le spectre IR. En effet, on observe l'apparition d'une bande caractéristique de la vibration d'élongation et de la fonction C=O de l'amide à $\nu = 1629$ cm⁻¹ ainsi que le maintien de la bande d'absorption de la fonction hydroxyle à $\nu = 3300$ cm⁻¹(voir l'annexe).

❖ **Caractérisation :** Les caractéristiques physico-chimiques des composés 2 et 3 sont rassemblées dans le **tableau 5**.

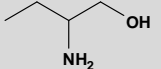
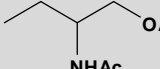
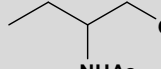
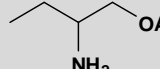
Tableau 5: Caractéristiques physicochimiques des composés 2 et 3.

Composé	M [g/mol]	Formule brute	F [°C]	R _f
<u>2</u>	131	C ₆ H ₁₃ NO ₂	huile	0,25
<u>3</u>	173	C ₈ H ₁₅ NO ₃	74	0,53

b) Effet de la nature de l'agent acylant :

Cette étude a été mise en œuvre selon les conditions mises au point auparavant : 20 mg de CAL B à 30°C durant 24 h, dans le TBME (1 mL); et ce on utilisant trois agents acylants ayant des réactivités différentes vis-à-vis l'aminoolcool 1 : l'acétate d'éthyle et deux esters d'énol : l'acétate de vinyle et l'acétate d'isopropényle. Les résultats obtenus sont réunis dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Acylation du 2-aminobutan-1-ol par différents agents acylants.

Entrée	AA ^(a)	Rdt <u>1</u> (%) ^(b) 	Rdt <u>2</u> (%) ^(b) 	Rdt <u>3</u> (%) ^(b) 	Rdt <u>4</u> (%) ^(b) 
1	<i>EtOAc</i>	-	8	84	-
2	<i>AI</i>	-	39	8	-
3	<i>AV</i>	-	-	-	-

a) 1 mmol d'aminoolcool avec 2 mmol de l'agent acylant dans 1 mL de TBME. 24 heures de réaction à 30 °C.

b) Rendements chimiques isolés déterminés après la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Le **tableau 6** montre une grande variété des résultats en fonction de la nature de l'agent acylant.

↳ Avec l'acétate de vinyle, après 5 heures d'agitation à température ambiante, la réaction est devenue marron. Après 24 heures de réaction, l'analyse par CCM révèle une traînée marron, que nous n'avons pas pu séparer sur colonne de gel de silice ni d'identifier la composition du mélange réactionnel, pour cela cet agent a été écarté de notre étude.

↳ Avec les deux autres agents acylants a savoir l'acétate de ethyle et l'acétate d'isopropényle , nous n'avons obtenus que deux produits parmi ceux attendus, le *N*-acylé (**3**) et *N, O*-diacylé (**2**).

- ↳ L'EtOAc révèle être le meilleur agent acylant, la réaction était quasi chimiosélective envers le *N*-acylé (**3**). ce dernier a été isolé avec un rendement de **84%** (*entrée 1*).
- ↳ Avec l'acétate d'isopropényle, comme donneur d'acyle, une faible sélectivité a été observée qui se traduit par des faibles rendements (*entrée 2*), seulement **39%** en produit (**2**) et **8%** en (**3**). Ce résultat peut être expliqué par la structure de l'AI qui présente une insaturation et un encombrement stérique.

c) Autres paramètres affectant l'acylation chimiosélective du 2-aminobutan-1-ol :

Une fois les conditions réactionnelles optimisées ,nous avons ensuite envisagé d'étudier l'influence de l'eau sur la réaction d'acylation chimiosélective du (\pm)-2-aminobutan-1-ol.

c) Effet de l'eau dans le milieu réactionnel :

Afin d'étudier l'impacte de l'eau sur la réaction d'acylation du 2-aminobutan-1-ol, soit on ajoute l'eau soit on enlève celle susceptible d'être présent dans le milieu réactionnel. Pour ce faire, plusieurs techniques sont envisageables⁸⁸ :

1. La diminution de la pression pour respectivement piéger ou évaporer les molécules d'eau résiduelles⁸⁹
2. L'ajout de l'eau au milieu réactionnel.
3. L'ajout des agents desséchants ou de tamis moléculaire au milieu réactionnel.

(*Tableau 7*).

Pour réaliser cette étude nous avons en premier lieu ajouté différentes quantités d'eau au milieu réactionnel. Puis nous avons tenté de sécher la réaction et ce-on ajoutant des agents desséchants sélectionnés parmi une liste de desséchants chimiques (voir tableau 7).

A noter que les conditions opératoires appliquées pour cette étude sont celles optimisés préalablement (1 mmol d'aminoalcool avec 2 mmol de l'agent acylant (EtOAc) dans 1 mL de TBME, 24 heures de réaction à 30°C).

⁸⁸ Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M., Ghoul, M. *J. Mol.Catal. B Enzym., Proceedings of the 4th International Symposium on Biocatalysis.* **2001**, 11, 949.

⁸⁹ Valivety, R.H., Halling, P.J., Macrae, A.R. *Biochim. Biophys. Acta: BBA-Protein. Struct. Mol. Enzymol.* **1992**, 1118, 218.

Tableau 7 : Exemples des desséchants adaptés ou incompatibles avec les familles organiques courantes (+ : compatible, - : non compatible)⁹⁰.

Famille/ Desséchant	P ₂ O ₅	Na	CaO	Na ₂ SO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂	Na ₂ CO ₃	NaOH / KOH	Gel de silice, tamis moléculaire
Hydrocarbures	+	+			+	+			+
Étheroxydes	+	+			+	+			+
Alcools	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Amines	-	-	+			-	+	+	+
Halogénures	+	-	-	+	+	+		-	+
Aldéhydes, cétones, esters, amides	-	-	-	+	+	-	+	-	+

Vu que le substrat est une molécule bifonctionnelle, comportant à la fois une fonction amine et une fonction alcool, pour notre étude nous avons choisi des desséchants compatibles avec ces deux fonctions à savoir le : oxyde de calcium (CaO), carbonate de sodium Na₂CO₃, Gel de silice ou tamis moléculaire.

Conclusion :

Cette étude préliminaire nous a permis d'effectuer la réaction d'acylation enzymatique de 2-aminobutan-1-ol racémique et de déterminer les paramètres majeurs influencent la chimiosélectivité lipasique lors de cette réaction. La *CAL B* s'est avérée la plus performante parmi les lipases testées, elle exprime une propriété de chimiosélectivité en vers le produit N-acylé, qui se forme majoritairement. La nature de l'agent acylant à également un impact sur la chimiosélectivité de cette réaction, l'EtOAc semble le meilleur parmi ceux testés.

Nous avons également tenté d'examiner l'effet de l'eau sur cette réaction mais la situation sanitaire actuelle du pays et la fermeture des universités et des laboratoires de recherche du à la propagation du virus COVID-19 l'avait interdit.

⁹⁰ <https://www.lachimie.fr/organique/technique/dessechant.php>.

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives :

Ce travail s'inscrit dans le cadre général du développement de procédés chimiques écocompatibles, respectant au mieux les règles et les impératifs de ce qui est appelé actuellement chimie verte. Dans ce contexte, notre objectif était d'étudier les voies possibles d'amélioration de la réaction d'acylation enzymatique d'un β -aminoalcool.

L'intérêt des aminoalcools a déjà été largement décrit. En effet, ces molécules sont utilisés en synthèse asymétrique comme auxiliaires chiraux, et plusieurs d'entre eux ont manifesté des activités biologiques intéressantes. Ce qui rend intéressant la maîtrise des différents paramètres susceptibles d'influencer la réaction d'acylation de ce type de molécules et sa sélectivité.

Afin de réaliser notre objectif, une étude préliminaire consacrée à l'acylation chimiosélective d'une molécule modèle, le 2-aminobutan-1-ol catalysé par les lipases a été effectué, en mettant l'accent sur les différents paramètres susceptibles de régir ce procédé enzymatique telle que : la nature de la lipase et du donneur d'acyle et notamment l'effet de l'eau présente dans le milieu réactionnel sur cette réaction.

L'ensemble des résultats obtenus et les principales conclusions tirées de cette étude se résument comme suit :

- ◆ Suite à une étude portée sur l'effet de la nature de lipase sur la chimio-sélectivité de cette réaction nous avons remarqué que la *CAL B* la plus performante parmi les lipases testées, elle exprime une propriété de chimiosélectivité en vers le produit N-acylé, qui se forme majoritairement.
- ◆ La nature de l'agent acylant a également un impact sur la chimiosélectivité de cette réaction, l'EtOAc semble être le meilleur parmi ceux testés.
- ◆ Enfin, l'étude bibliographique de l'effet de l'eau sur la réaction d'acylation nous a permis de tirer la conclusion suivante : en fonction de sa disponibilité, l'eau semble influencer la flexibilité de l'enzyme, elle a ainsi un impacte sur la réaction d'acylation. En effet, l'eau permet une certaine mobilité intramoléculaire. En absence totale d'eau, l'enzyme est comme figée et ne peut effectuer la catalyse. Par contre, c'est dans les solvants organiques à forte teneur en eau , elle intervient comme solvant pour faciliter la dissolution et la diffusion des substrats miscibles, elle influence l'équilibre réactionnel au cours d'une réaction de synthèse en

Conclusion générale

intervenant comme substrat de la réaction inverse. Elle intervient même au niveau du processus d'inactivation enzymatique. Une certaine quantité d'eau est donc nécessaire à l'activité enzymatique et ainsi à la faisabilité de la réaction d'acylation.

Comme perspectives, l'orientation vers les procédés biocatalytiques donc permettent d'offrir une nouvelle voie pour la synthèse de molécules acylées, ce qui constitue une solide alternative aux procédés chimiques classiques.

Partie expérimentale

I. Remarques générales :

- Toutes les réactions ont été réalisées à température ambiante (30°C), dans des verreries séchées à la flamme et des solvants anhydres ont été utilisés exclusivement.
- Tout le matériel utilisé que ce soit en verre ou en plastique a été rincé, séché et stérilisé et toutes les procédures de sécurité en laboratoire ont été pris en considération.

II. Solvants et réactifs :

1. Réactifs utilisés :

Le tableau ci-dessous (**tableau 8**), donne un descriptif exhaustif de l'ensemble des produits utilisés pour cette étude :

Tableau 8 : Description des réactifs utilisés pour cette étude.

Produit	Fournisseur
Substrat	
2-aminobutan-1-ol (97 %) (M=89.14 g.mol ⁻¹)	ACROS ORGANICS
Agents acylants	
Acétate d'éthyle (99.5%) (M=74.079 g.mol ⁻¹)	Riedel-de Haën
Acétate d'isopropényle (99%), (M=100.12 g.mol ⁻¹)	ACROS ORGANICS
Acétate de vinyle (M=86.09 g.mol ⁻¹)	SIGMA-ALDRICH
Milieux réactionnels	
TBME	SIGMA-ALDRICH
Solvants organiques	
Méthanol	CARLO-ERBA
Dichlorométhane	SIGMA-ALDRICH

2. Descriptif des biocatalyseurs utilisés :

- ✚ **La CCL** : est une lipase issue d'un champignon « *Candida cylindracea* », commercialisée par *Fluka*. Elle est sous forme d'une poudre blanche, et possède une activité de 3.48 U/g.
- ✚ **La PSL** : *Pseudomonas cepacia* Lipase (**Amano**); sous forme de poudre beige, fournie avec une activité de plus de 30000 U/g (une unité correspond à

la quantité d'enzyme qui permet la libération d'un μmol d'acide oléique par minute à $\text{pH} = 8$ à $40\text{ }^\circ\text{C}$ lors de l'hydrolyse de la Trioléine).

- ✚ **La CAL B** : *Candida antarctica* Lipase, immobilisée sur une résine acrylique, commercialisée par *Sigma*, fournie avec une activité de plus de plus de 10000 U/g où 1 unité est définie comme 1 μmol d'acide laurique transformée en propyl laurate par minute sous les conditions standards (1-propanol / acide laurique = 1/1).

III. Méthodes analytiques :

- ✚ **Analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :**
 - **Les spectres de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN^1H) :** ont été enregistrés sur le spectromètre *Brüker-250*, dans une solution de chloroforme deutéré (CDCl_3) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence standard. Les déplacements chimiques " δ " sont exprimés en partie par million (ppm). Le déplacement chimique du solvant deutéré sert de référence interne ($\delta = 7,24$ ppm pour CDCl_3). Les abréviations suivantes ont été utilisées : s = singulet, sl = singulet large, d = doublet, dd = doublet de doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet et m_a = massif. Les constantes de couplage (J) (valeurs absolues) sont mentionnées en Hertz (Hz).
 - **Les spectres de résonance magnétique nucléaire de carbone (RMN^{13}C) :** ont été enregistrés à l'aide de spectromètre *Brüker*, de type AC 250 à 62,9 MHz, dans une solution de chloroforme deutéré (CDCl_3) avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence standard. Les déplacements chimiques " δ " sont exprimés en partie par million (ppm).
- ✚ **Analyses par Spectroscopie Infrarouge (IR) :** Les spectres IR des deux produits ont été élaborés à l'aide d'un spectromètre à transformées de Fourier de type SHIMADSU, dans le domaine du moyen IR (4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1}). Le produit liquides (*N*-acyl 2-aminobutanol) a été déposé en film entre deux pastilles de KBr (méthode sandwich), tandis que le produit solide (*N,O*-diacyl 2-aminobutanol) a été préparé en pastille de KBr anhydre.
- ✚ **Analyses qualitatives par chromatographie sur couche mince :** le suivi des réactions a été réalisé par prélèvement directe dans le mélange réactionnel sur

des plaques de gel de silice (*Fluka* 60 F₂₅₄) en aluminium. L'éluant utilisé : CH₂Cl₂/MeOH (90/10).

- ✚ **Séparation et analyse quantitative par chromatographie liquide sur colonne** : les séparations sont effectuées sur une colonne de gel de silice, en utilisant comme éluant : CH₂Cl₂/MeOH (90/10).

IV. Détermination des caractéristiques physico-chimiques :

- ✚ **Mesure de point de fusion** : la mesure du point de fusion du produit *N,O*-diacyl 2-aminobutanol a été effectué à l'aide de BUCHI Melting Point de type B-540, produite par Buchi Labartechni KAG.

V. Acylation enzymatique du (+/-)-2-aminobutanol :

VI-1- Etude de l'effet de la nature d'enzyme :

✚ **Mode opératoire :**

Dans un petit ballon muni d'un barreau aimanté on introduit 2 ml de TBME, 2 mmol de l' aminoalcool **1**, 4 équivalents EtOAc, et une quantité adéquate d'enzyme (24 mg pour la *CAL B*, 160 mg pour la *PSL* et 200 mg pour la *CCL*). Le mélange est soumis sous agitation magnétique durant 24h à 30°C. La solution est ensuite filtrée sur célite et le TBME est évaporé. Les rendements chimiques sont évalués après séparation des produits obtenus sur colonne de gel de silice avec un mélange d'éluant CH₂Cl₂ /MeOH (90/10).

✚ **Aminoalcool (1) + CAL B :**

Après 24 heures de réaction :

- **Produit 2:** m= 12.30 mg **Rdt= 5%**
- **Produit 3:** m= 165.05 mg **Rdt= 63%**

✚ **La PSL :** inactive.

✚ **La CCL :** inactive.

VI-2- Etude de l'effet de la nature de l'agent acylant :

✚ **Mode opératoire :**

Dans un petit ballon muni d'un barreau aimanté on introduit 2 ml de TBME , 2 mmol de l' aminoalcool **1**, 4 équivalents EtOAc, et 24 mg pour la *CAL B*. Le mélange est soumis sous agitation magnétique durant 24h à 30°C. La solution est ensuite filtrée sur célite et le TBME est évaporé. Les rendements

chimiques sont évalués après séparation des produits obtenus sur colonne de gel de silice avec un mélange d'éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10).

✚ Aminoalcool (I) + CAL B+ EtOAc :

Après 24 heures de réaction :

- **Produit 2:** m= 28.00 mg **Rdt= 8%**
- **Produit 3:** m= 220.00 mg **Rdt= 84%**

✚ Aminoalcool (I) + CAL B+ AI :

Après 24 heures de réaction :

- **Produit 2:** m= 138.00 mg **Rdt= 39%**
- **Produit 3:** m= 22.00 mg **Rdt= 8%**

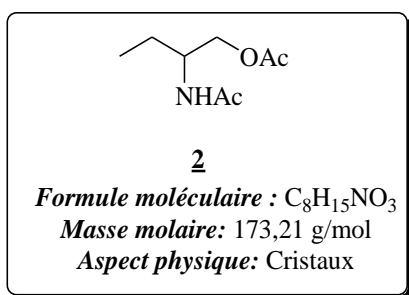
✚ Aminoalcool (I) + CAL B+ AV :

Après 24 heures de réaction : un mélange marron, aucune séparation n'est effectuée.

- **Produit 2:** m= -
- **Produit 3:** m= -

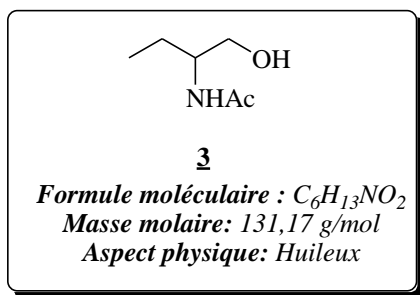
VI. Caractérisation des produits :

✚ **Le 2-acétamidobutyl acétate :**



$R_f = 0,25$, éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90/10). **Point de fusion :** 74°C . **RMN ^1H :** (250 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 0.95 (t, $J=7.49$ Hz, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 1.50 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$) ; 1.95 (s, 3H, $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$) ; 2.10 (s, 3H, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$) ; 4.00 - 4.13 (m, 3H, $-\text{CHNHC}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$) ; 5.90 (sl, 1H, $-\text{NH}$). **RMN ^{13}C :** (62.9 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 10.27(1C, $-\text{CH}_3$), 20.8(1C, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{O}-$); 23.36 (1C, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{N}-$); 24.48 (1C, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$) ,49.73 (1C, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$); 65.54 (1C, $-\text{CHNHC}(\text{O})-$); 169.95(1C, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$); 171.13 (1C, $\text{H}_3\text{C C}(\text{O})\text{NH}-$); **IR :** ν (cm^{-1}) = 1724 (C=O ester) ; 1640 (C=O amide) ; 2360 (NH amide).

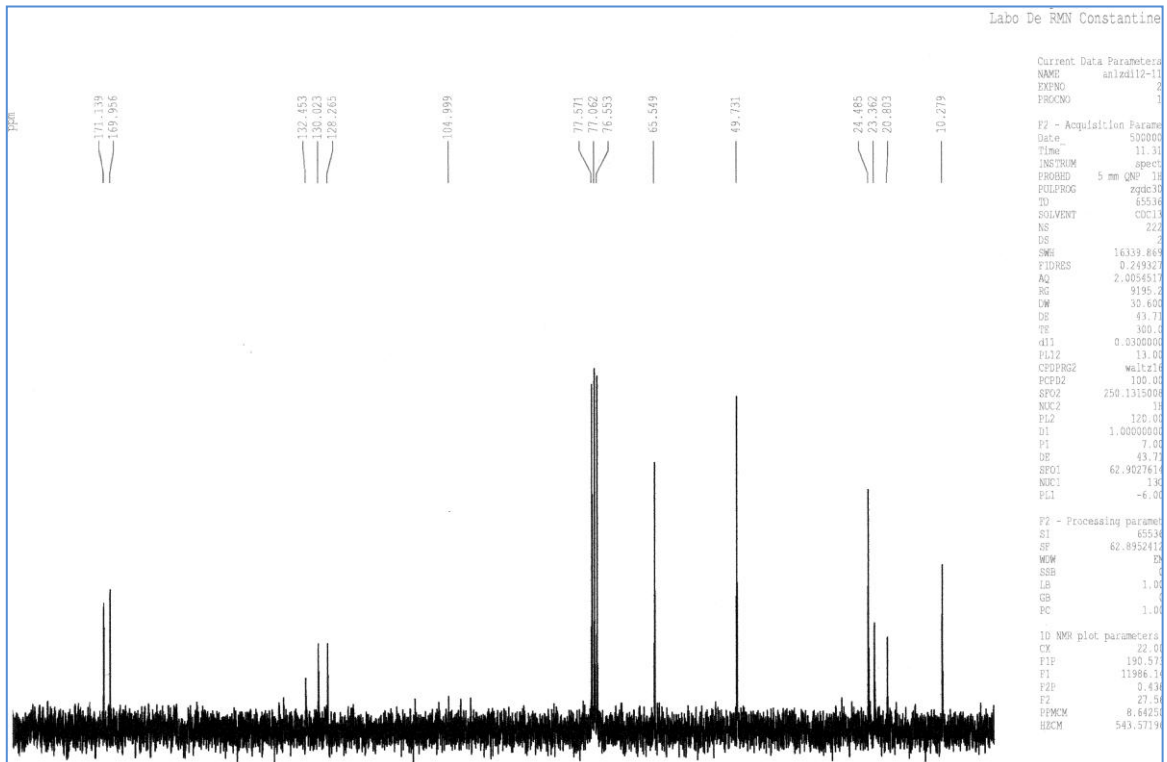
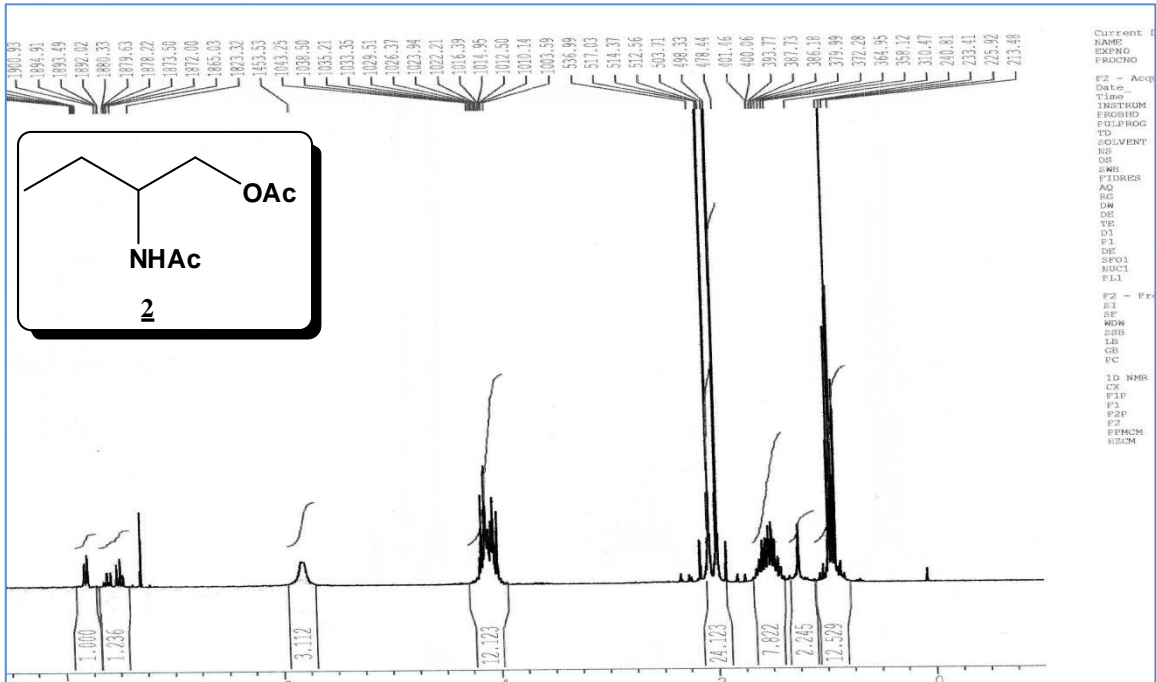
✚ Le *N*-(1-hydroxybutan-2-yl) acétamide :



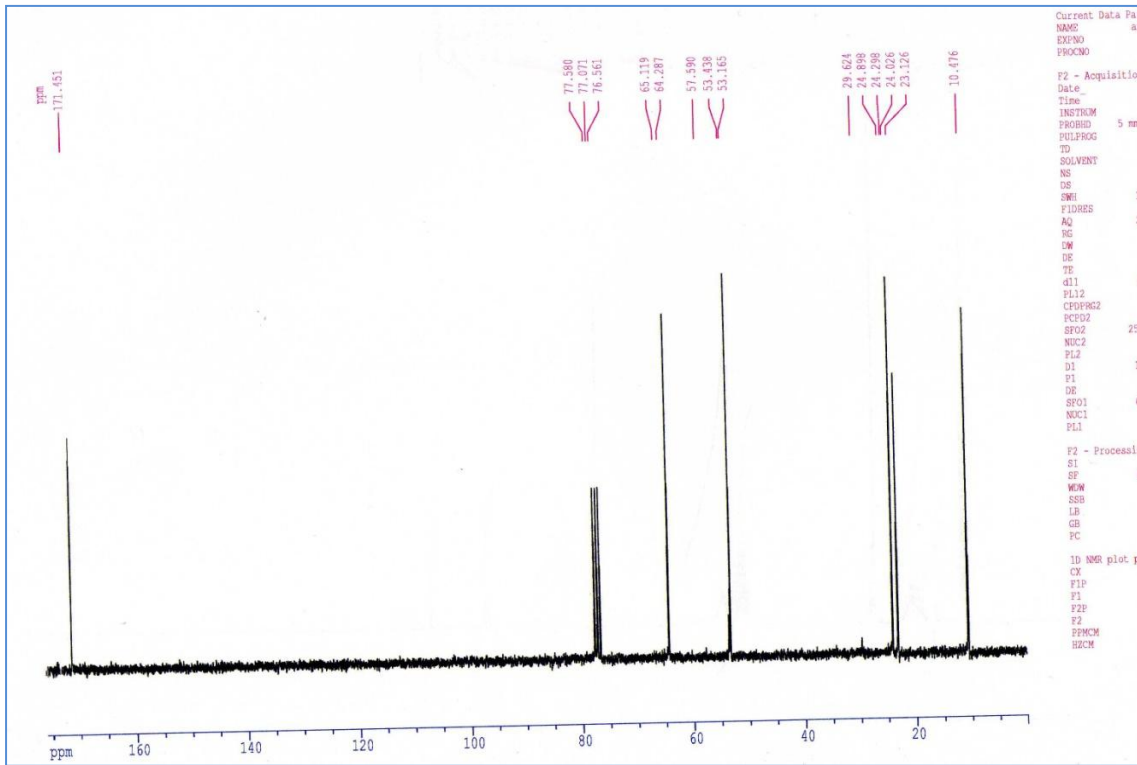
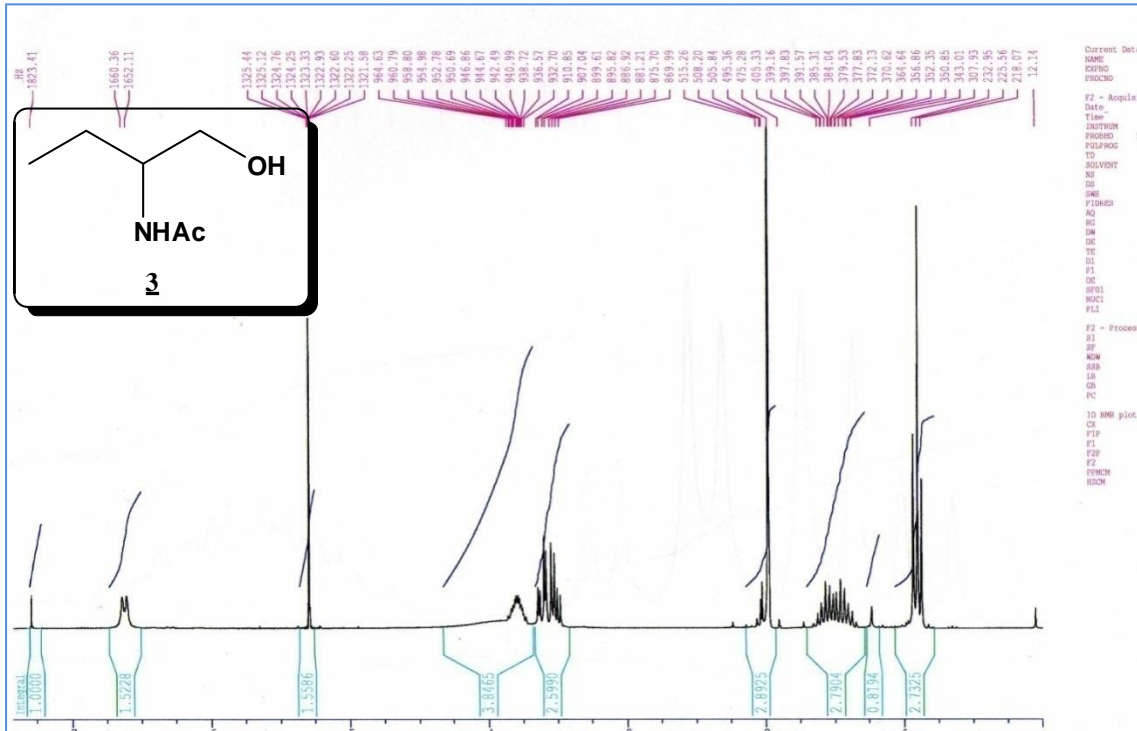
R_f = 0,53 , éluant : CH₂Cl₂/MeOH (90/10). **RMN ¹H** : (250 MHz, CDCl₃) ; **δ (ppm)** = 0.95 (t, *J*=7.49 Hz, 3H, -CH₂CH₃) ; 1.50 (m, 2H, -CH₂CH₃), 1.95 (s, 3H, -C(O)CH₃) ; 3.35-3.70 (m, 3H, -CHNHC(O)-, CH₂OH), 3.79 (sl ,1H, -OH), 6.70 (d, *J*=8,25 Hz, 1H, -NH). **RMN ¹³C** : (62.9 MHz, CDCl₃); **δ (ppm)** = 10.47 (1C, -CH₃), 23.12 (1C, CH₃C(O)-); 24.29 (1C, -CH₂CH₃) ; 53.16 (1C, -CH₂OH)); 64.28 (1C, -CHNHC(O)-); 171.45(1C, H₃C C(O)NH-); **IR** : **v (cm⁻¹)** = 1056.92 (C-O alcool) ,1629.74 (C=O amide) , 2360.00 (NH amide), 3288.40 (OH alcool).

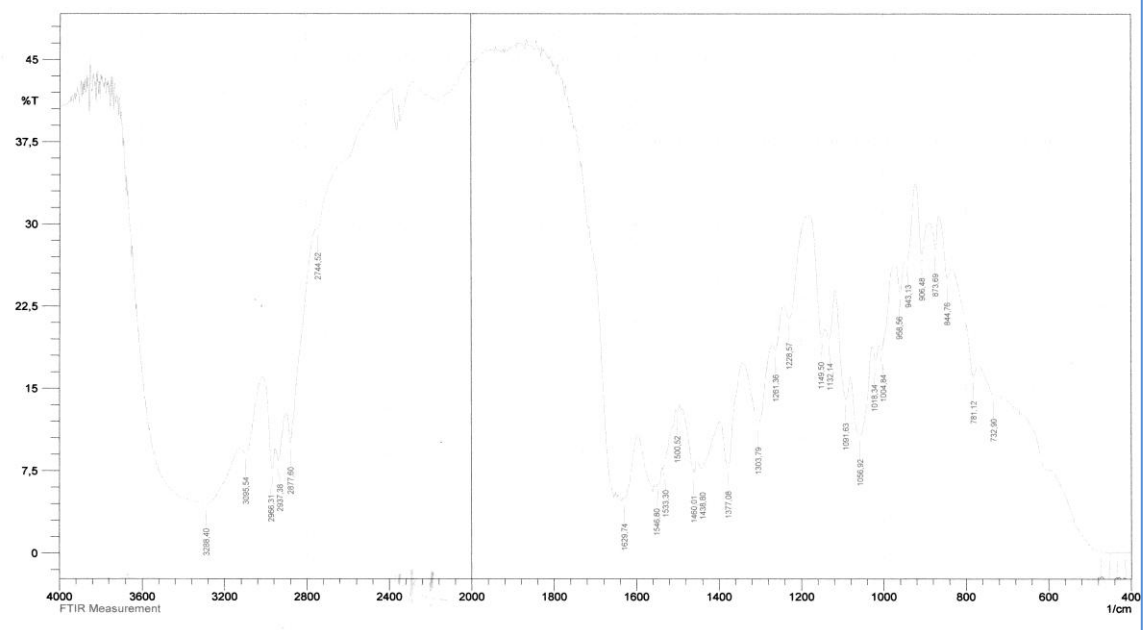
Annexe

◆ Le 2-acétamidobutyl acétate :



◆ Le *N*-(1-hydroxybutan-2-yl) acétamide :





Comment;
FTIR Measurement

No. of Scans; 30
Resolution; 4 [1/cm]

Date/Time; 03/05/2011 11:23:35
User; [REDACTED]

Etude de l'effet de l'eau sur de l'acylation enzymatique du 2-aminobutan-1-ol

Résumé: Ce travail de fin d'étude s'inscrit dans le cadre de la chimie verte, nous nous sommes intéressés à la mise en œuvre d'un procédé biocatalytique efficace et respectueux de l'environnement catalysé par des lipases qui sont bien connues pour leurs propriétés d'énantio-, de régio- et de chimiosélectivités intéressantes.

Une étude préliminaire consacrée à l'acylation chimiosélective d'une molécule modèle, le 2-aminobutan-1-ol a été effectuée afin de déterminer les facteurs clés influençant la chimiosélectivité de cette réaction tels que : la nature d'enzyme et de l'agent acylant. Une étude théorique sur l'effet de l'eau présent dans le milieu réactionnel sur la réaction d'acylation a été réalisée. Les résultats ont démontré la capacité de la lipase *CAL B* à catalyser l'acylation de ce substrat. Ce biocatalyseur exprime une propriété de chimiosélectivité en vers le produit N-acylé, qui se forme majoritairement notamment en utilisant l'acétate d'éthyle comme agent acylant et qu'une certaine quantité d'eau doit être présente dans le milieu réactionnelle pour assurer l'activité enzymatique.

Mots clés : chimie verte, biocatalyse, lipases, chimiosélectivité, acylation, 2-aminobutan-1-ol, eau.

Study of the effect of water on the enzymatic acylation of 2-aminobutan-1-ol

Abstract: This work is part of green chemistry; we are interested in the implementation of an efficient and environmentally friendly biocatalytic process catalysed by lipases which are well known for their interesting enantio-, regio- and chemoselectivities.

A preliminary study devoted to the chemoselective acylation of a model molecule, 2-aminobutan-1-ol was carried out in order to determine the key factors influencing the chemoselectivity of this reaction such as: the enzyme and acylating agent. A theoretical study of the effect of water on the reaction was carried out. The result demonstrated the capacity of the *CAL B* lipase to catalyze the acylation of this substrate, and expresses a property of chemoselectivity towards the N-acylated product, which forms mainly, especially using ethyle acetate as acylating agent. And that a few amount of water is needed to ensure the enzymatic activity of the catalyst.

Key words: green chemistry, biocatalysis, lipases, chemoselectivity, acylation, 2-aminobutan-1-ol, water.

دراسة تأثير الماء على تفاعل الاستلة الانزيمية لمركب 2-أمينوبوتان-1- اول

ملخص : هذا العمل يندرج في اطار الكيمياء الخضراء ، حيث اهتمنا بتنفيذ عملية تحفيز حيوي فعالة وصديقة للبيئة بواسطة انزيم الليباز المعروف جيداً بقدرته على التحفيز و بانتقائه الكيميائي المثير للاهتمام.

تم إجراء دراسة أولية مكرسة للأسيتيل الانتقائي الكيميائي لجزيء 2-أمينوبوتان-1- اول ، لتحديد العوامل الرئيسية المؤثرة في الانتقائية الكيميائية لهذا التفاعل مثل: طبيعة الإنزيم و عامل الأسيل. كما تم إجراء دراسة نظرية حول تأثير الماء المتواجد في الوسط التفاعلي على تفاعل الاستلة. أظهرت النتائج قدرة الليباز *CAL B* على تحفيز استلة هذا المركب ، اذ يعبر هذا المحفز الحيوي عن خاصية الانتقاء الكيميائي تجاه المنتج N-اسيل ، والذي يتكون بشكل خاص عند استخدام ايثيل الاسيتات كعامل اسيل. كما تبين ان كمية من الماء ضرورية لضمان فعالية الانزيم.

الكلمات الدالة : الكيمياء الخضراء ، التحفيز الحيوي ، الليباز ، الانتقائية الكيميائية ، تفاعل الأسيلة ، 2-أمينوبوتان 1- اول، ماء.
