



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 و التكنولوجيا

Faculté des Sciences et de la Technologie

قسم الكيمياء

Département de Chimie



## Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

**Domaine :** Sciences de la matière

**Filière :** Chimie

**Spécialité:** Chimie Analytique

### Thème

# Essais de synthèse d'oléate de glucose catalysée par une lipase d'origine végétale

Présenté par: AMMI Chaima

#### Devant le Jury :

<b>Dr. TOUDERT Nadia</b>	<b>MCB</b>	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Présidente
<b>Dr. SELAIMIA Ouassila</b>	<b>MCB</b>	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Encadrant
<b>Dr. KLAI Nadia</b>	<b>MCB</b>	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Examinatrice
<b>Dr. FERDJANI Salim</b>	<b>MCB</b>	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Co-encadreur

Année Universitaire 2021-2022

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

- Aux deux âmes les plus chères au monde, mon père Mahmoud et ma mère Hadda que dieu les protège ;*
- A Mes chères sœurs Douaa et Radja, et mon beau frère Tarek, et mon cher neveu Mohamed Racim ;*
- A Mes chers frères Hamza et Zine eddine ;*
- A Toute ma famille AMMI et FELLAH ;*
- A mes chers amies Bochra, Sabrina et Ghada ;*
- A Toute la promotion chimie 2022 ;*
- A Tous ceux qui m'ont soutenue tout au long de la période de la réalisation de ce modeste travail.*

## Remerciements

*Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire de chimie, du département de chimie de l'Université Chadli Ben Djedid El Tarf. Je tiens à témoigner ma reconnaissance aux personnes suivantes, de leur aide pour la réalisation de ce mémoire.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à ma directrice de mémoire, madame **Ouassila SELAIMIA**, maître de conférences à l'Université d'El Tarf. Je la remercie de m'avoir encadrée, orientée, aidée, et surtout pour ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

*Je remercie également mon co-encadreur monsieur **Salim FERDJANI**, maître de conférences à l'université d'El-Tarf, de son aide, ses conseils et sa disponibilité.*

*Mes remerciements vont aussi à tous les membres du jury, Dr.**TOUDERT Nadia** et Dr **KLAI Nadia**, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

*Mes sincères remerciements vont aux personnes qui ont contribué au bon déroulement et à l'aboutissement de ce travail. Je remercie monsieur **Sofiane KHERICI** et madame **Nadra BOUDINA** pour leurs aide et soutien lors de la réalisation de la partie pratique.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr.**AIT BARRA Adel**, pour son aide à l'acquisition de produits chimiques indispensables à la réalisation de la partie pratique.*

*J'adresse mes sincères remerciements à mes très chers parents **Mahmoud** et **Hadda**, pour leurs soutiens constants et leurs encouragements.*

*Enfin, je remercie mes amies **Sabrine** et **Bochra**, pour leur aide, leur soutien et leurs encouragements. Elles ont toujours été là pour moi.*

## Résumé

Ce travail a porté sur l'extraction de lipase à partir de graines de maïs pour l'utiliser en tant que biocatalyseurs comme alternative aux lipases coûteuses principalement d'origine microbienne et animale. L'extrait végétal brut de graines de maïs (LGM) est testé comme biocatalyseur dans la synthèse de l'oléate de *D*-glucose, un ester de sucre à potentialité tensioactive, à partir de ressources renouvelables. L'étude de l'effet de rapport sucre/acide et l'utilisation des ultrasons (US) sur la conversion de cette réaction d'estérification ont été étudiés. Le suivi cinétique de la réaction cible par dosage volumétrique a permis de déterminer les conversions des réactions réalisées. La meilleure conversion ( $C = 57,14 \%$ ) a été obtenue en absence d'US, en utilisant un rapport *D*-glucose/acide oléique 1éq/ 1éq et 0,125g d'extrait brut de lipase de graines de maïs.

**Mots clés:** lipase végétale, estérification, oléate de glucose, graines de maïs.

## Abstract

This work focused on the extraction of lipase from maize seeds to use it as biocatalysts as an alternative to expensive lipases mainly of microbial and animal origin. The raw vegetable extract of maize seeds (LGM) is tested as a biocatalyst in the synthesis of *D*-glucose oleate, a sugar ester with surfactant potential, from renewable resources. The study of the effect of sugar/acid ratio and the use of ultrasounds (US) on the conversion of this esterification reaction have been studied. Kinetic monitoring of the target reaction by volumetric titration made it possible to determine the conversions of the reactions carried out. The best conversion ( $C = 57.14\%$ ) was obtained in the absence of US, using a *D*-glucose/oleic acid ratio of 1eq/1eq and 0.125g of crude lipase extract from maize seeds.

**Key words:** vegetable lipase, esterification, glucose oleate, maize seeds.

## Liste des abréviations et symboles

<b>AGL :</b>	Acide Gras Libre
<b>AO :</b>	Acide Oléique
<b>TCCA :</b>	Acide TriChloroisoCyanurique
<b>AS :</b>	Activité enzymatique Spécifique
<b>ATP :</b>	Adénosine Tri Phosphate
<b>°C :</b>	Degré Celsuis
<b>C :</b>	Conversion
<b>CALB :</b>	<i>Candida Antarctica B Lipase</i>
<b>CCM :</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>EC :</b>	<i>Enzyme Commission</i>
<b>eq :</b>	Equivalent
<b>LMWE :</b>	<i>Low Molecular Weight Ester</i>
<b>ES :</b>	Ester de Sucre
<b>g :</b>	Gramme
<b>h :</b>	Heure
<b>KDa :</b>	Kilo Dalton
<b>LGM :</b>	Lipases des Graines de Maïs
<b>μmol :</b>	Micro Mole
<b>mg :</b>	Miligramme
<b>mL :</b>	Mililitre
<b>min :</b>	Minute
<b>n :</b>	Nombre de mole
<b>R<sub>f</sub> :</b>	Rapport frontale
<b>R<sub>S/A</sub> :</b>	Rapport Sucre/Acide
<b>Réf :</b>	Référence
<b>R :</b>	Rendement
<b>T :</b>	Température
<b>Ta :</b>	Température ambiante
<b>TG :</b>	Triglycérides

))) :	Irradiations ultrasonores
<b>UI :</b>	<b>Unité International</b>
<b>US :</b>	<b>Ultrasons</b>

## Liste des schémas

<b>SCHEMA 1.</b> REACTIONS CATALYSEES PAR LES LIPASES. ....	7
<b>SCHEMA 2.</b> REACTION D'ESTERIFICATION CATALYSEE PAR LA LGM.....	12
<b>SCHEMA 3.</b> REACTION D'HYDROLYSE DE TG PAR LA LGM .....	12
<b>SCHEMA 4.</b> SYNTHESE DE N-ACYLCYANAMIDES SOUS US .....	17
<b>SCHEMA 5.</b> SCHEMA REACTIONNEL DE L'AUTO-EPOXYDATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE OLEIQUE.....	18
<b>SCHEMA 6.</b> ESTERIFICATION DE D-GLUCOSE AVEC L'ACIDE OLEIQUE EN PRESENCE DE LGM.....	18
<b>SCHEMA 7.</b> REACTION D'HYDROLYSE DES TG D'HUILE D'OLIVE.....	21
<b>SCHEMA 8.</b> ESTERIFICATION EN PRESENCE DE LA LGM .....	22
<b>SCHEMA 9.</b> ESTERIFICATION DU D-GLUCOSE AVEC L'ACIDE OLEIQUE EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE CALB <sup>[29]</sup> .....	26
<b>SCHEMA 10.</b> ESTERIFICATION DU D-GLUCOSE PAR L'ACIDE STEARIQUE SOUS US EN PRESENCE DE LGM .....	26

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU 1.</b> LES DIFFERENTES CLASSES D'ENZYME.....	5
<b>TABLEAU 2.</b> QUELQUES APPLICATIONS DES LIPASES DANS LES SECTEURS INDUSTRIELS <sup>[7]</sup> .....	6
<b>TABLEAU 3.</b> APPLICATION DE QUELQUES LIPASES VEGETALES .....	10
<b>TABLEAU 4.</b> APPLICATION DES US .....	16
<b>TABLEAU 5.</b> RESULTATS DU TEST D'ACTIVITE HYDROLYTIQUE DE LA LGM.....	22
<b>TABLEAU 6.</b> EFFET DU RAPPORT S/A SUR LA CONVERSION DE L'ESTERIFICATION DU D-GLUCOSE.....	23
<b>TABLEAU 7.</b> SUIVI CINETIQUE DE L'ESTERIFICATION SANS ENZYME DU D-GLUCOSE. ....	24
<b>TABLEAU 8.</b> SUIVI CINETIQUE DE L'ESTERIFICATION DU D-GLUCOSE ASSISTEE PAR US. ....	26

## Liste des figures

<b>FIGURE 1.</b> STRUCTURE PRIMAIRE D'UNE ENZYME.....	3
<b>FIGURE 2.</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE STRUCTURE SECONDAIRET .....	3
<b>FIGURE 3.</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE STRUCTURE TERTIAIRE D'ENZYME .....	3
<b>FIGURE 4.</b> EXEMPLE DE STRUCTURE QUATERNAIRE (GLUCOSE PHOSPHATE DESHYDROGENASE HUMAINE) .....	4
<b>FIGURE 5.</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE CATALYTIQUE D'UNE ENZYME .....	5
<b>FIGURE 6.</b> ANATOMIE D'UNE GRAINE DE MAÏS .....	11
<b>FIGURE 7.</b> STRUCTURE GENERALE D'UN TENSIOACTIF NON IONIQUE.....	15
<b>FIGURE 8.</b> STRUCTURE DE L'OLEATE DE 6-O-GLUCOSE.....	15
<b>FIGURE 9.</b> SCHEMA D'IMPLOSION D'UNE BULLE DE CAVITATION AUX ABORDS D'UNE PAROI.....	17
<b>FIGURE 10.</b> RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ETAPES DE L'EXTRACTION DE LA LGM .....	20
<b>FIGURE 11.</b> SUIVI CINETIQUE DE L'ESTERIFICATION ENZYMATIQUE DU <i>D</i> -GLUCOSE. EFFET DU RAPPORT <i>S/A</i> SUR <i>C</i> .....	23
<b>FIGURE 12.</b> HISTOGRAMME DE L'ESTERIFICATION ENZYMATIQUE DU <i>D</i> -GLUCOSE. EFFET DU RAPPORT <i>S/A</i> SUR <i>C</i> .....	24
<b>FIGURE 13.</b> SUIVI CINETIQUE DE LA REACTION A BLANC .....	25
<b>FIGURE 14.</b> SUIVI CINETIQUE DE L'ESTERIFICATION ENZYMATIQUE DU <i>D</i> -GLUCOSE ASSISTEE PAR US.....	27
<b>FIGURE 15.</b> HISTOGRAMME DE LA CONVERSION DE L'ESTERIFICATION DU <i>D</i> -GLUCOSE ASSISTEE PAR US .....	28
<b>FIGURE 16.</b> CCM DE LA REACTION D'ESTERIFICATION DU <i>D</i> -GLUCOSE AVEC L'ACIDE OLEIQUE .....	29
<b>FIGURE 17.</b> GRAINES DE MAÏS ETUDIEES.....	32
<b>FIGURE 18.</b> BALANCE ANALYTIQUE .....	32
<b>FIGURE 19.</b> PLAQUE CHAUFFANTE AVEC AGITATEUR MAGNETIQUE ET UN BARREAU AIMANTE .....	33
<b>FIGURE 20.</b> CUVE D'ELUTION DE CCM.....	33
<b>FIGURE 21.</b> BAIN A ULTRASONS J.P SELECTA, 40K, 5L .....	33
<b>FIGURE 22.</b> MONTAGE EXPERIMENTAL DE LA REACTION D'ESTERIFICATION .....	35
<b>FIGURE 23.</b> DOSAGE DU MELANGE REACTIONNEL.....	36

# Sommaire

<b>Dédicace</b>	.....	<b>ii</b>
<b>Remerciements</b>	.....	<b>iii</b>
<b>Résumé</b>	.....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b>	.....	<b>iv</b>
<b>Liste des abréviations et symboles</b>	.....	<b>v</b>
<b>Liste des schémas</b>	.....	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux</b>	.....	<b>vi</b>
<b>Liste des figures</b>	.....	<b>vii</b>
<b>Sommaire</b>	.....	<b>viii</b>
<b>Introduction générale</b>	.....	<b>1</b>
<b>Chapitre I. Généralités sur les lipases</b>	.....	<b>2</b>
I. Introduction	.....	2
II. Enzymes	.....	2
II.1. structure des enzymes	.....	2
a- structure primaire	.....	2
b- Structure secondaire	.....	3
c- Structure tertiaire	.....	3
d- Structure quaternaire	.....	4
II.2. Cycle catalytique des enzymes	.....	4
II.3. Classification des enzymes	.....	5
III. Lipases	.....	6
III.1. Structure des lipases	.....	6
III.2. Applications des lipases	.....	6
III.3. Réactions catalysées par les lipases	.....	7
III.4. Origine des lipases	.....	7
a-Lipases de mammifères	.....	7
b- Lipases microbiennes	.....	8



2. Biomasse : .....	32
<b>II. Matériels utilisés .....</b>	<b>32</b>
<b>III. Méthodes .....</b>	<b>33</b>
III.1. Procédures d'extraction des lipases végétales .....	33
a- Germination.....	33
b-Séchage et broyage.....	34
c- Délipidation.....	34
III.2. Test d'activité de la LGM.....	34
III.3. Procédure d'estérification du D-glucose .....	35
a- 1ère procédure : agitation magnétique .....	35
b- 2 <sup>ème</sup> procédure : prétraitement ultrasonique.....	35
c- 3 <sup>ème</sup> procédure : irradiation ultrasonique sans agitation magnétique .....	36
d- Mesure de la conversion par titrage :.....	36
b-. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) :.....	36
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>38</b>

## *Introduction générale*

Ces dernières décennies sont marquées par de grands efforts afin d'élaborer de nouvelles stratégies de développement durable et de trouver des moyens novateurs de mobiliser des ressources éco-compatibles. De ce fait, Le recours à la biocatalyse dans le secteur de la production d'esters de sucre, composés biodégradables très utilisés dans différentes industries, représente une alternative aux procédés purement chimiques qui nécessitent l'usage de produits chimiques potentiellement nocifs et mettent souvent en œuvre des conditions opératoires dures.

Pendant le coût élevé des lipases commerciales principalement d'origine microbienne limite l'expansion de ce procédé à l'échelle industrielle. Le recours à la biomasse végétale comme source potentielle de lipases peu chères, très abondantes et facilement exploitables constitue une alternative intéressante aux lipases industrielles onéreuses.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'extraction de lipase végétale à partir de graines de maïs pour l'utiliser comme catalyseur dans la synthèse de l'oléate de glucose, un ester de sucre à potentialité tensioactive. L'étude de l'effet de rapport sucre/acide et l'utilisation d'ultrasons sur l'avancement et la conversion de la réaction cible constitue le second volet de l'objectif de ce travail. Ce mémoire s'articule autour de :

\* **Chapitre 1** qui vise à apporter des notions générales sur les enzymes et les lipases, leurs structures, leurs classifications et leurs applications. Un intérêt particulier est porté aux lipases végétales issues de graines ainsi qu'à leurs utilisations comme biocatalyseurs dans les réactions de synthèses organiques.

\* **Chapitre 2** est consacré à la préparation d'un extrait brut de lipase végétale à partir de graines de maïs (LGM) et son utilisation comme catalyseur dans la synthèse de l'oléate de *D*-glucose. L'étude de l'effet du rapport sucre/acide et l'utilisation d'ultrasons (US) sur la conversion de la réaction d'estérification est également rapportée. Les résultats obtenus sont présentés et discutés.

\* **Conclusion générale** et perspectives.

\* **Partie expérimentale** qui regroupe le matériel et les méthodes utilisés.

# Chapitre I. Généralités sur les lipases

## I. Introduction

Les enzymes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne. Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes. Les enzymes sont capables de dégrader et de transformer différents composés se trouvant dans l'environnement du vivant.

## II. Enzymes

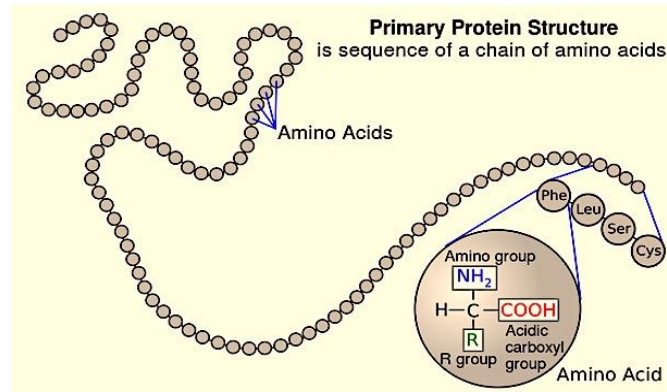
Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire allant de 10 à 100 kDa. Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires. Les enzymes sont des catalyseurs naturels hautement spécifiques au type de substrat et fonctionnent dans des conditions douces de température, de pression et de pH avec des taux de conversion élevés, ce qui les rend plus efficaces que les catalyseurs chimiques conventionnels<sup>[1]</sup>.

### II.1. structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines qui sont des enchaînements d'acides aminés de configuration L. Leur structure est définie à plusieurs niveaux d'organisation, **primaire**, **secondaire**, **tertiaire** et **quaternaire**.

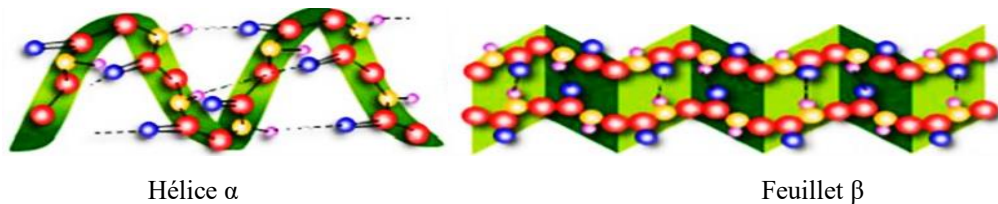
#### a- structure primaire

C'est la séquence dans laquelle les acides aminés sont disposés linéairement dans la chaîne protéique (Figure 1).

Figure 1. Structure primaire d'une enzyme<sup>a</sup>

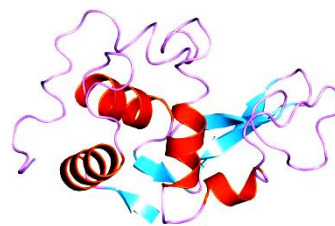
### b- Structure secondaire

Dès que la structure primaire s'enroule sur elle-même elle constitue la structure secondaire formant principalement des hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  (Figure 2).

Figure 2. Représentation schématique d'une structure secondaire<sup>b,t</sup>

### c- Structure tertiaire

Elle se rapporte aux relations dans l'espace des différentes structures : hélices et feuillets. Le repliement et la stabilisation de protéines à structure tertiaire dépend de plusieurs types de liaisons faibles qui stabilisent l'édifice moléculaire (Figure 3).

Figure 3. Représentation schématique d'une structure tertiaire d'enzyme<sup>c</sup>

Les hélices  $\alpha$  (en rouge) et les feuillets  $\beta$  (en bleu)

<sup>a</sup> [www.en.wikiversity.org/wiki/Enzyme\\_structure\\_and\\_function](http://www.en.wikiversity.org/wiki/Enzyme_structure_and_function), consulté le 27/05/2022

<sup>b</sup> <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/BCM/2020/Chapitre%201-Enzymologie.pdf>, consulté le 27/05/2022

<sup>c</sup> [www.en.wikiversity.org/wiki/Enzyme\\_structure\\_and\\_function](http://www.en.wikiversity.org/wiki/Enzyme_structure_and_function), consulté le 27/05/2022

### d- Structure quaternaire

C'est l'assemblage de deux ou plus de la structure tridimensionnelle. Les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation de cette structure. Le principal élément de stabilisation des structures quaternaires est l'interaction hydrophobe entre les acides aminés non polaires (Figure 4).

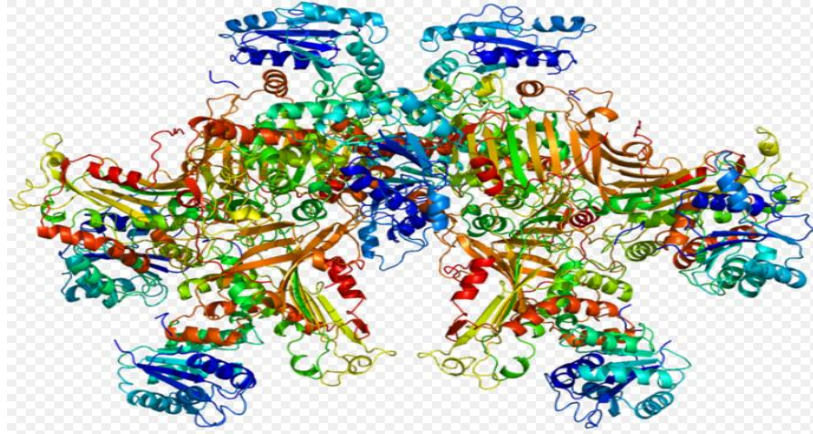


Figure 4. Exemple de structure quaternaire (glucose phosphate déshydrogénase humaine) a

## II.2. Cycle catalytique des enzymes

Lorsqu'une enzyme est formée, elle se replie spontanément afin d'adopter la conformation native. Le cycle actif de cette enzyme prend la forme d'un sillon à la surface de la protéine. La forme de ce sillon détermine la spécificité de l'enzyme et son substrat. Ce dernier se lie au site actif de l'enzyme qui change de forme pour épouser le contour son contour. L'enzyme catalyse la réaction et libère les produits. Son site actif redevient disponible pour une autre molécule de substrat et le cycle recommence<sup>[2]</sup>. La majorité des réactions métaboliques sont réversibles, et une enzyme peut catalyser la réaction dans les deux sens<sup>[2]</sup>.

---

<sup>a</sup>: Shannon W. N. Au, Sheila Gover, Veronica M. S. Lam, Margaret J. Adams, « *Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP<sup>+</sup> molecule and provides insights into enzyme deficiency* », *Structure*, vol. 8, n° 3, mars 2000, p. 293-303

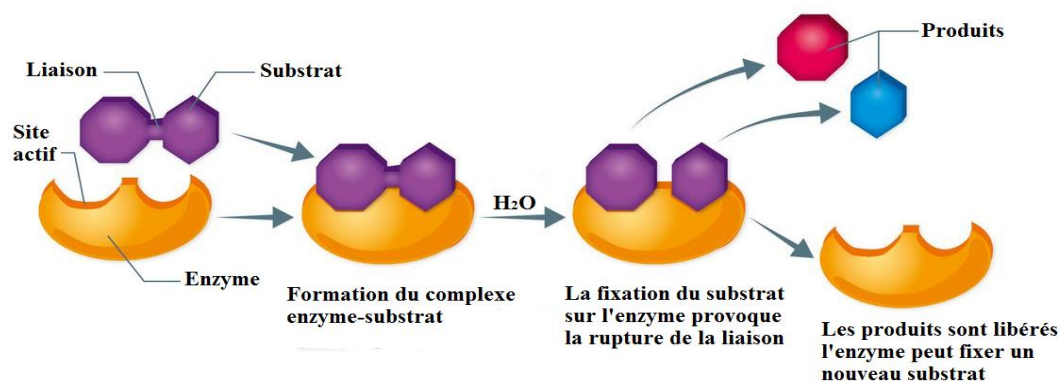


Figure 5. Représentation schématique du cycle catalytique d'une enzyme <sup>a</sup>

### II.3. Classification des enzymes

Il existe un nombre très important d'enzymes et on en découvre encore aujourd'hui de nouvelles. Six classes d'enzymes sont répertoriées selon la réaction chimique qu'elles catalysent (Tableau 1). Selon cette classification à chaque enzyme correspond un numéro EC « enzyme commission ». En 1961 <sup>[3]</sup> La commission des enzymes et l'union internationale en biochimie (UIB) a établi une classification et une nomenclature systématique des enzymes (qui attribue à chaque catégorie un nombre : E.C.a.b.c.d.). Ces 4 chiffres (a, b, c, d) désignent respectivement la classe de l'enzyme, sa sous-classe, sa sous-sous classe et enfin un numéro propre à l'enzyme<sup>[4]</sup>.

Tableau 1. Les différentes classes d'enzyme.

N°	Classe d'enzyme	Type de réaction catalysée
EC1	Oxydoréductases	Réaction d'oxydoréduction
EC2	Transférases	Transfert de groupes fonctionnels
EC3	Hydrolases	Coupe hydrolytique des liaisons C-O, C-N et C-C
EC4	Lyases	Elimination de groupe pour former des doubles liaisons
EC5	Isoméras	Réaction d'isomérisation
EC6	Ligases	Formation de liaison couplée à l'hydrolyse d'ATP

<sup>a</sup> [https://manuelnumeriquemax.belin.education/svt-premiere/topics/svt1-ch05-088-a\\_le-mode-d-action-des-enzymes](https://manuelnumeriquemax.belin.education/svt-premiere/topics/svt1-ch05-088-a_le-mode-d-action-des-enzymes), consulté le 06/06/2022

En aout 2018, Une nouvelle classe d'enzyme E.C.7: Translocases, a été ajoutée. Ces enzymes catalysent la translocation des hydrons (nom général de H<sup>+</sup>), des cations et anions inorganiques, des acides aminés et des peptides, des hydrates de carbone et leurs dérivés<sup>[5]</sup>.

Dans ce travail, nous nous intéressons aux lipases et à leurs utilisations en tant que biocatalyseurs en synthèse organique.

### III. Lipases

Les lipases ou triacyl glycérol hydrolases EC : 3.1.1.3, sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse des graisses et des huiles avec libération d'acides gras, diglycérides, monoglycérides et glycérol<sup>[6]</sup>. Elles sont largement distribuées dans les plantes, les animaux et les microbes, où leur rôle physiologique est de métaboliser les lipides. Ces enzymes sont obtenus soit par extraction à partir de tissus animaux ou végétaux, soit par culture de micro-organismes<sup>[6]</sup>.

#### III.1. Structure des lipases

Les structures tridimensionnelles de nombreuses lipases ont été déterminées par cristallographie aux rayons X, sur la base de ces études, toutes les lipases sont membres de la famille  $\alpha/\beta$  hydrolase c'est-à-dire qu'ils ont une structure qui est composé d'un feuillet  $\beta$  central formé de brins majoritairement parallèles sur-arrondi par des hélices  $\alpha$ <sup>[6]</sup>.

Le site actif des lipases est formé par une triade catalytique composée d'acides aminés sérine, histidine et acide aspartique/acide glutamique<sup>[6]</sup>.

#### III.2. Applications des lipases

Les lipases jouent un rôle prédominant au niveau de plusieurs processus et ce depuis bien longtemps. Les principaux domaines d'utilisation sont les suivants (Tableau 2):

**Tableau 2. Quelques applications des lipases dans les secteurs industriels<sup>[7]</sup>**

Domaines	Utilisation
Aliments	- Amélioration des arômes et des saveurs. - Synthèse de colorants et d'arômes naturels. - Emulsifiants.
Papier, textile et cuir	- Élimination des substances hydrophobes.

<b>Environnement</b>	- Bioremédiation. - Traitement des effluents et déchets industriels.
<b>Pharmaceutique et médical</b>	- Séparation des énantiomères. - production de biocapteurs.
<b>Biocarburants</b>	- Production de biodiesel.
<b>Chimique</b>	- Synthèse d'ester. - Production de détergents et d'émulsifiants. - Production de polymères.

### III.3. Réactions catalysées par les lipases

Les lipases agissent, par définition en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En effet, elles ont également la capacité de catalyser une panoplie de réactions de synthèse telles que l'hydrolyse, l'estérification ou la transestérification (Schéma 1).

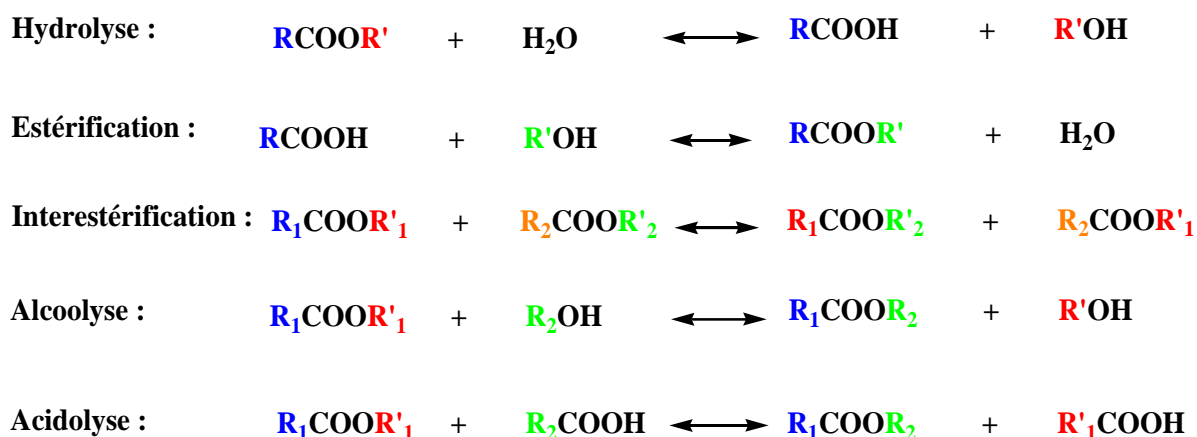


Schéma 1. Réactions catalysées par les lipases.

La capacité des lipases à catalyser ces réactions avec une grande efficacité, stabilité et polyvalence rend ces enzymes très attractives d'un point de vue commercial<sup>[8]</sup>.

### III.4. Origine des lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux micro-organismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires<sup>[9]</sup>.

#### a-Lipases de mammifères

Les lipides constituent pour les mammifères une source énergétique essentielle et avantageuse. Chez l'homme, ainsi que chez d'autres vertébrés, les lipases interviennent dans le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses. Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes.

- Le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique.
- Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, la langue, le foie et les tissus adipeux.
- Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes<sup>[10]</sup>.

### **b- Lipases microbiennes**

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries *Gram* + telles que celles des genres *Bacillus* et *Staphylococcus* que par des bactéries *Gram* – telles que *Pseudomonas*. Elles sont également largement répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces*<sup>[9]</sup>.

Bien que les premières lipases étudiées étaient d'origine animale, l'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans des domaines très variés<sup>[9]</sup>.

### **c- Lipases végétales**

Les lipases se retrouvent dans les différentes parties de la plante telles que les feuilles, les tiges, les graines des plantes oléagineuses et des céréales. En théorie, Les lipases végétales constituent un potentiel alternatif aux lipases microbiennes pour leur faible coût, la forte disponibilité de la biomasse végétale source de lipases et leur forte spécificité de substrat.

Cependant dans la pratique, les lipases végétales ne sont pas très utilisées en biosynthèse pour le fait qu'elles sont généralement en faible quantité dans leurs sources. On les retrouve particulièrement dans les graines où elles sont facilement isolables. Les lipases végétales ont un poids moléculaire variable 19 – 270 kDa et sont stables à pH 4-9 et T 25-60°C. Les plus utilisées sont les lipases extraites du latex et des graines des plantes oléagineuses<sup>[11]</sup>.

Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes :

- Le premier groupe est constitué par les triacylglycérol hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de l'altération des graines pendant le stockage<sup>[9]</sup>.
- Les constituants du second groupe : dénommés acylhydrolases, sont présents dans divers tissus de la plante. Ces enzymes présentent peu de spécificité pour leur substrat ; elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides mais elles peuvent catalyser certaines réactions de transestérification<sup>[12]</sup>. Les principales acylhydrolases sont les phospholipases A et B ; les glycolipases, les sulfolipases et les lipases des monoglycérides.
- Le troisième groupe est constitué par les phospholipases C et D<sup>[9]</sup>.

D'un point de vue industriel, l'intérêt des lipases végétales n'a cessé de s'accroître depuis quelques années, notamment dans le domaine de la biotransformation de lipides. En effet, les lipases végétales sont facilement isolées à partir de graines<sup>[13]</sup> et elles présentent des spécificités de substrat atypique comparées aux lipases microbiennes<sup>[14]</sup>.

Dans cette étude, nous nous intéressons aux lipases d'origine végétale issues de graines.

## VI. Lipases végétales issues de graines

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides (TG) sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou *oil bodies*)<sup>[15]</sup>. Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante<sup>[16]</sup>.

La polyvalence des lipases dans la catalyse de différents types de réactions associées à leurs différentes spécificités confère à ces enzymes un potentiel d'application important et vaste. Le Tableau 3 suivant résume les applications de quelques lipases végétales issues de différentes graines.

Tableau 3. Application de quelques lipases végétales

Sources de lipases	Applications	R(%)	Réf.
<b>Orge</b>	Production d'esters de faible poids moléculaire	40	[17]
<b>Maïs</b>	Production d'esters de faible poids moléculaire	40	[17]
<b>Lin</b>	Production d'esters de faible poids moléculaire	63	[17]
<b>Colza</b>	Production d'esters de faible poids moléculaire	90	[18]
<b>Ricin</b>	Synthèse de lipides structurés	53	[19]
<b>Blé</b>	Estérification	99	[20]
<b>Avocat</b>	Production d'acides gras	40	[21]
<b>Haricot</b>	Hydrolyse	*	[8]
<b>Noix de coco</b>	Hydrolyse	*	[8]
<b>Ricin</b>	Hydrolyse	87	[22]
<b>Jatropha</b>	Interestérification	50	[23]

\* : Rendement non mentionné dans la référence.

Les lipases se trouvent dans les graines pour certains végétaux, pour d'autres dans le latex ou les feuilles. Les lipases végétales peuvent être utilisées comme biocatalyseurs soit directement sous forme d'extraits végétaux bruts, soit partiellement ou totalement purifiées.

### VI.1. Lipases de graines oléagineuses

Pour étudier les lipases de graines, il faut comprendre leurs fonctions physiologiques. En effet, dans les graines oléagineuses germées, la mobilisation d'acides gras est essentiel pour fournir de l'énergie pour la croissance embryonnaire<sup>[8]</sup>.

Fondamentalement, les graines oléagineuses sont composées de deux parties fondamentales : l'enveloppe ou tégument et le noyau. Le tégument ou enveloppe est la couche externe de la graine recouvrant l'amande, cette dernière étant considéré comme la partie principale de la graine. Le noyau a deux parties : l'embryon ou le germe qui formera la nouvelle plante lorsque la graine germe; et l'albumine ou l'endosperme qui stocke les nutriments de réserve qui nourrira la plante dans les premiers stades de développement<sup>[8]</sup>.

De 20 à 50 % du poids sec des graines oléagineuses est essentiellement des triacylglycérols stockés. Pendant la période de germination, les triacylglycérols stockés dans des « corps huileux » ou les « oléosomes » sont rapidement consommés dans la production d'énergie pour la synthèse des sucres, acides aminés<sup>[8]</sup>.

Dans ce travail, nous nous intéressons aux lipases extraites des graines de Maïs.

## V. Graines de maïs

Le maïs (*Zea mays*) est une plante tropicale herbacée annuelle de la famille des Poacées, largement cultivée comme céréale pour ses grains riches en amidon, mais aussi comme plante fourragère. Le terme désigne aussi le grain de maïs lui-même de la taille d'un petit pois<sup>[24]</sup> qui est formé principalement de trois parties (Figure 6):

- l'embryon, couramment appelé « germe »,
- l'albumen, tissu de réserve, essentiellement composé de grains d'amidon,
- l'enveloppe extérieure, fine membrane translucide et fibreuse <sup>[24]</sup>

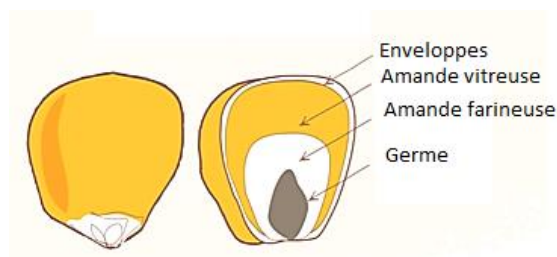


Figure 6. Anatomie d'une graine de Maïs<sup>a</sup>

### V.1. Exemples de réactions catalysée par des lipases de graines de maïs

#### -Exemple 01 (Estérification)

En 2000, M Liaquat et *al.* ont utilisé les lipases de blé, orge, colza, maïs et lin pour produire des esters de faible poids moléculaire (LMWE) dans un milieu organique. Les LMWE se sont formés par estérification directe des acides acétique, butyrique, acide hexanoïque avec de l'éthanol, le butanol, l'iso-pentanol ou le (Z)-3- hexen-1-ol dans

---

<sup>a</sup> <https://www.vivescia.com/grand-format/le-grain-des-semis-au-temps-des-moissons/le-grain-de-cereale-a-la-loupe>, consulté le 22/05/2022

l'hexane (Schéma 2). Concernant le maïs, les auteurs ont observé que les extraits bruts de lipase de ces graines (LGM) étaient efficaces pour la synthèse d'esters de faible poids moléculaire (LMWE) avec un rendement de 40 %<sup>[17]</sup>.

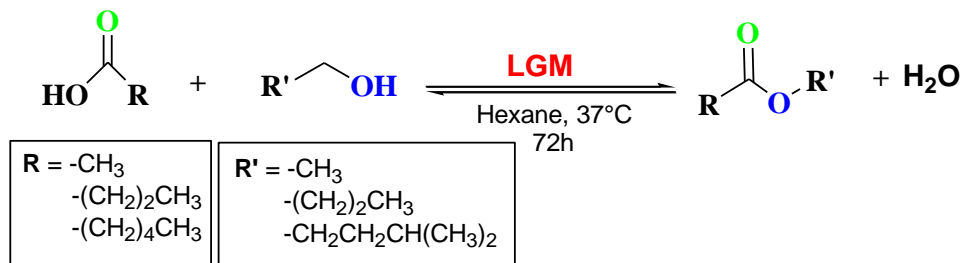


Schéma 2. Réaction d'estérification catalysée par la LGM

#### -Exemple 02 (Hydrolyse)

En 2007, S.EZE et *al.* ont étudié l'activité lipasique dans quatre variétés de maïs.<sup>[25]</sup> L'activité de la lipase (LGM) a été testée pour sa capacité à hydrolyser différentes huiles émulsionnées telles que l'huile d'olive, l'huile d'arachide, l'huile de palme et l'huile de soja dans un solvant organique pour donner des acide gras (acide oléique, acide linoléique, acide palmitique, mélange d'acide gras) et le glycérol (Schéma 3).

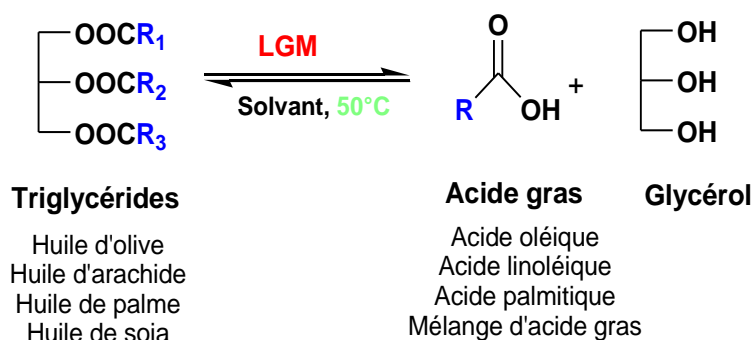


Schéma 3. Réaction d'hydrolyse de TG par la LGM

Les études d'inactivation thermique ont montré que l'enzyme était stable jusqu'à 50°C et a montré une inactivation rapide au-dessus de cette température, (son pH optimal étant 8,0)<sup>[25]</sup>.

## VI. Conclusion

Les enzymes sont des catalyseurs naturels hautement spécifiques au type de substrat et fonctionnent dans des conditions douces de température, de pression et de pH, Il existe six classes d'enzyme et on en découvre encore aujourd'hui de nouvelles. Les lipases ou triacyl glycérol hydrolases sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse des graisses et des

huiles. Elles lipases peuvent être obtenues à partir de diverses sources, animales, microbiennes et végétales. Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines oléagineuses telles que les graines de maïs. Elles sont capables de catalyser les réactions d'hydrolyse ainsi que les réactions d'estérification, de transestérification et d'interestérification.

# Chapitre II. Synthèse d'oléate de glucose catalysée par une lipase extraite de graines de maïs

## I. Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des lipases extraites de graines de maïs pour la synthèse d'un ester de sucre à savoir l'oléate de glucose. Un intérêt particulier est accordé à l'effet du rapport sucre/acide et l'effet de l'irradiation par ultrasons (US) sur la conversion de la réaction d'estérification. Avant d'accéder à nos résultats, nous allons présenter un bref aperçu sur les esters de sucres et les réactions assistées par US.

## II. Esters de sucre

Les esters de sucres (ES) sont des tensioactifs non ioniques présentant de nombreux avantages dont notamment la diversité des structures disponibles et le caractère inoffensif, tant pour la santé que pour l'environnement.<sup>[26]</sup>

Il est à rappeler que les tensioactifs (que l'on appelle aussi agents de surface, le terme anglais étant surfactants) sont des substances solubles dans l'eau et ayant la propriété de se concentrer, de s'agréger aux interfaces entre l'eau et d'autres substances peu solubles dans l'eau, les corps gras notamment. Ces molécules présentent au moins deux parties d'affinité différente, l'une est hydrophile (affinité pour l'eau) et l'autre lipophile (affinité pour les graisses) ; de telles substances sont dites amphiphiles (du grec *amphi*, "des deux cotés" et *philos*, "ami")<sup>[27]</sup> voir (Figure 7).

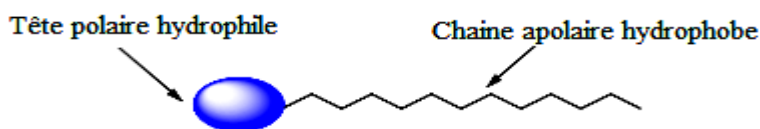


Figure 7. Structure générale d'un tensioactif non ionique

Les ES présentant de nombreux avantages dont notamment la diversité des structures disponibles et le caractère inoffensif, tant pour la santé que pour l'environnement. Leurs applications potentielles touchent des domaines aussi variés que l'alimentation humaine (avec par exemple la mousse au chocolat), la formulation de médicaments et de produits phytosanitaires ou encore l'étude des protéines membranaires<sup>[28]</sup>.

Les ES de structure simple ne sont pas disponibles dans la nature, leur synthèse est réalisée soit par voie chimique ou par voie enzymatique, via une réaction d'estérification ou une transestérification entre un sucre et un acide gras ou un sucre et un ester gras respectivement <sup>[28]</sup>.

Dans ce travail, la synthèse de l'oléate de glucose (Figure 8) constitue notre principal objectif. Il est rappeler que l'oléate de glucose est un ester de sucre à potentiel tensioactif. En 2020, Serap Çetinkaya et al <sup>[29]</sup>. ont étudié l'estérification du D-glucose avec les acides oléique et palmitique a été réalisée en l'absence et présence d'un biocatalyseur, la lipase de *Candida Antarctica B*. Le milieu réactionnel était un mélange de diméthyl sulfoxyde et tert-butanol (1:4, v/v). Les produits de la réaction ont été analysés par FTIR, 1H-RMN et 13C-RMN, HSQC et par ESI-MS. Les résultats ont indiqué que les produits d'ester formés étaient l'oléate de 6-O-glucose et Palmitate de 6-O-glucose aussi bien en l'absence qu'en présence du biocatalyseur, avec des rendements supérieurs à 90 %.

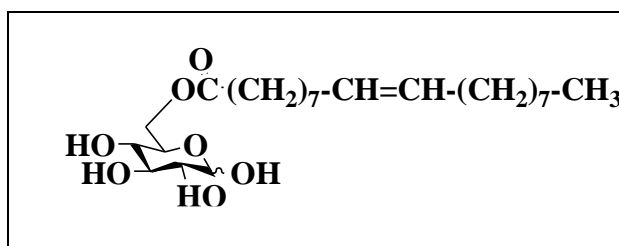


Figure 8. Structure de l'oléate de 6-O-glucose

### III. Généralités sur les ultrasons

Le terme ultrasons, il montre que la simple description d'une onde qui transporte de l'énergie mécanique à travers la vibration locale de particules à des fréquences de 20 kHz ou plus, sans transport net des particules elles-mêmes, peut à tous égards être trompeuse ou même incorrecte. Pour expliquer les complexités responsables de cela, la description des ultrasons est d'abord construite à partir des propriétés fondamentales de ces vibrations locales des particules<sup>[30]</sup>. Généralement elle est notée par « US » ou représentée schématiquement par quatre parenthèses «)))) ». Les ultrasons ont également de nombreuses applications lorsqu'ils se propagent dans un liquide ; celles-ci sont le plus souvent basées sur un phénomène physique surprenant appelé la cavitation. Le tableau suivant (Tableau 4) résume les différentes applications des US dans différents domaines :

**Tableau 4. Application des US**

Domaine	Exemple d'application
Biologie	Rompres les parois cellulaires
Ingénierie	Assister la découpe ou le soudage
Hygiène dentaire	Nettoie les dents
Géologie	Localisation de minéraux SONAR
Industrie	Aide l'homogénéisation des peintures
Médecine	Échographie (2-10 MHz)
Chimie	Extraction, synthèse organique

#### III.1. Sonochimie

La sonochimie est une spécialité de la chimie qui vise à étudier les effets des ondes ultrasonores sur les réactions chimiques. Les effets généralement observés en sonochimie ne sont pas liés à une interaction directe entre les ondes ultrasonores et les molécules du milieu traité, mais résultent du phénomène de cavitation acoustique.

#### III.2. Phénomène de cavitation

Cavitation acoustique comporte trois étapes : la nucléation (formation de la bulle), croissance et implosion rapide de microbulles de cavitation. La propagation d'ondes ultrasonores dans un milieu fluide induit un mouvement des molécules le constituant

autour de leur position d'équilibre qui permet de vaincre les forces de cohésion du liquide, et ainsi la nucléation de microbulles. Ces microbulles croissent en taille tout en se remplissant de gaz et de vapeur de liquide jusqu'à atteindre une taille critique (ou taille de résonance,  $\sim 150 \mu\text{m}$  à 20 kHz) ; elles implosent alors violemment (en  $\sim 1 \mu\text{s}$  à 20 kHz), concentrant localement l'énergie pour atteindre des conditions extrêmes en termes de température et pression<sup>[31], [32]</sup> (Figure 9).

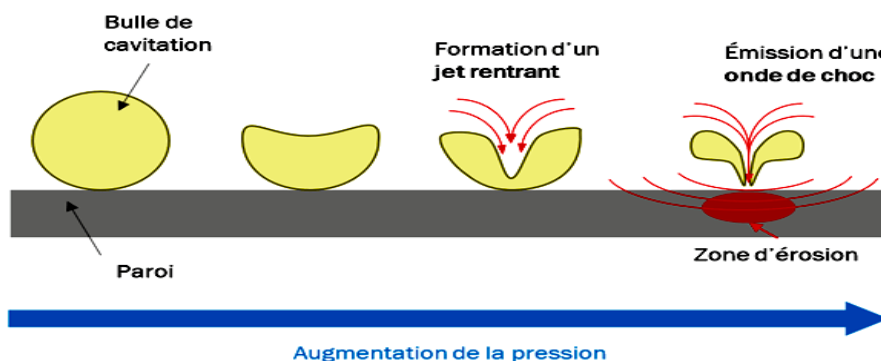


Figure 9. Schéma d'implosion d'une bulle de cavitation aux abords d'une paroi<sup>i</sup>

La sonochimie est basée sur l'énergie acoustique et le phénomène de cavitation<sup>[33]</sup>.

### III.3. Exemples de réactions assistées par US

Exemple 1 : En 2020, Phakhodee et *al.* ont développé une synthèse en un seul pot assistée par ultrasons de N-acylcyanamides à partir d'acides carboxyliques et de cyanamide de sodium. Lors de l'activation en présence d'acide trichloroisocyanurique (TCCA) et de triphénylphosphine, l'acide carboxylique a été converti en N-acylcyanamides avec de bons rendement à température ambiante en 10 minutes seulement (Schéma 4)<sup>[34]</sup>.

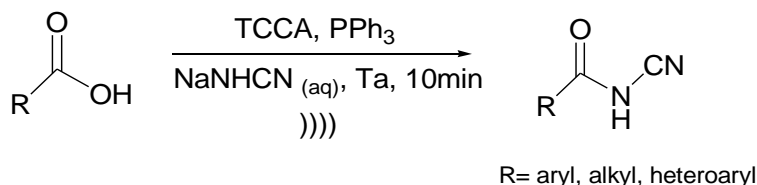


Schéma 4. Synthèse de N-acylcyanamides sous US

<sup>i</sup> <https://experts-insitu.com/billet/cours-98-les-phenomenes-de-cavitation-dans-les-circuits-hydrauliques/>, consulté le 17/06/2022

En 2022, Aguilera et al. [35] ont réalisé l'époxydation directe de l'acide oléique (AO) catalysée par la lipase immobilisée Novozym 435 en présence de l'hydrogène peroxyde (HP) comme agent d'époxydation (Schéma 5). Une irradiation acoustique a été mise en place pour l'intensification de la réaction et différentes amplitudes ultrasonores (0–90 %) ont été examinées. La réaction a été favorisée par un excès de HP et la sélectivité en époxyde la plus élevée était d'environ 80 % avec une conversion complète de l'acide oléique atteinte en 200 min. L'irradiation Ultrasonore (90 % d'amplitude) a amélioré la vitesse de réaction initiale d'un facteur deux par rapport aux conditions silencieuses et des conversions d'acide oléique plus élevées ont été atteintes par rapport aux expériences silencieuses. [35].

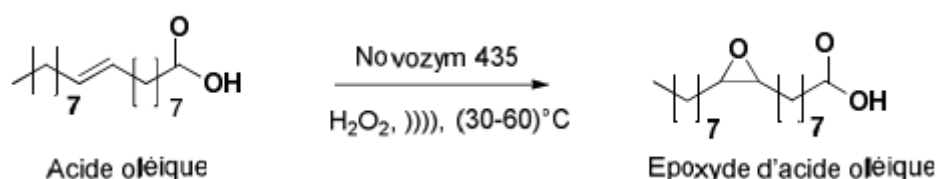


Schéma 5. Schéma réactionnel de l'auto-époxydation enzymatique de l'acide oléique

## IV. Résultats et discussions

Ce travail concerne l'étude de l'effet du rapport sucre/ acide et celui des US sur la conversion de la synthèse de l'oléate de *D*-glucose catalysée par une lipase végétale brute extraite de graines de maïs (LGM) (Schéma 6).

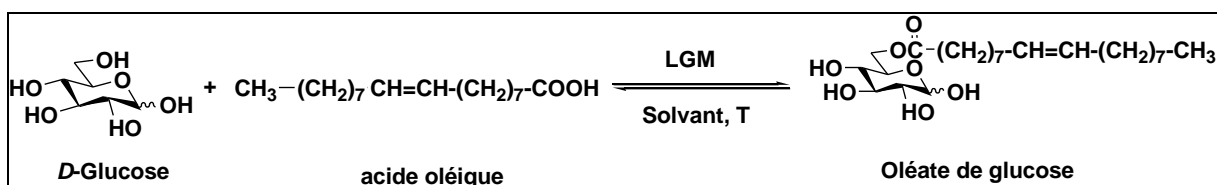


Schéma 6. Estérification de D-Glucose avec l'acide oléique en présence de LGM

Cette estérification enzymatique est une réaction réversible qui se produit entre un acide gras, l'acide oléique et un sucre (*D*-glucose) en présence d'une lipase pour donner un ester et de l'eau. Pour éliminer l'eau formée et favoriser ainsi la formation de l'ester il faut éliminer l'eau produite au cours de la réaction. Un agent desséchant, tels que les tamis moléculaire, le gel de silice ou  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  est généralement ajouté au milieu réactionnel pour adsorber cette eau. Dans ce travail, aucun agent desséchant n'a été utilisé afin d'évaluer le pouvoir déshydratant de l'extrait brut LGM.

## IV. 1. Préparation de l'extrait enzymatique (LGM)

Les graines de maïs germées ont été utilisées comme source de lipase. L'obtention de l'extrait enzymatique se fait généralement en 5 étapes successives : trempage dans l'eau, germination, séchage et broyage et délipidation.

### a. Trempage dans l'eau

Le trempage des graines de maïs dans l'eau constitue la première étape de l'extraction de lipases. Cette trempage permet le gonflement des graines et l'élimination de matières solubles hautement fermentescibles contenues dans ces graines<sup>[36]</sup>. Pour faciliter la germination (prochaine étape), les graines de maïs sont mises dans l'eau pendant 12 h à température ambiante (voir partie expérimentale).

### b. Germination

C'est la deuxième étape d'extraction, selon Barros, et *al.*<sup>[8]</sup>, l'activité des lipases dans les graines n'est observée que pendant et après la période de germination. L'activité lipolytique dans les graines de maïs n'est observée que deux jours après la germination des graines, et commence à diminuer avec la diminution du taux total des lipides stockés. Le pic d'activité lipolytique est d'environ 5 à 6 jours après la germination.

Après 12 h de trempage dans l'eau, les graines sont récupérées et sont mises à germer. Cette étape clé est réalisée dans des conditions favorables (milieu humide, et température convenable). Les graines de maïs sont placées entre deux feuilles de papier absorbant humides pour amorcer la germination (Voir partie expérimentale).

### c. Séchage et broyage

Le séchage permet de conserver la qualité du produit, assure un bon stockage, une excellente délipidation et assurer un milieu non aqueux favorisant l'estérification au lieu de l'hydrolyse<sup>[11]</sup>. Dans ce but, un séchage doux à l'air libre est réalisé pour les graines de maïs germées pendant 48 heures à température ambiante. Après le séchage, les graines sont broyées à l'aide d'un moulin à café pour obtenir une poudre homogène et très fine, ensuite les poudres obtenues sont tamisées à travers un tamis et stockés au frais à 4 °C dans des flacons hermétiques.

#### d. Délipidation

La délipidation est le processus d'éliminer les lipides des extraits végétaux par un solvant organique car ces lipides peuvent réagir avec notre substrat (sucre). Ce processus, améliore également l'activité de la lipase et la stabilité thermique de ce dernier<sup>[37]</sup>.

Plusieurs solvants peuvent être utilisés pour délipider les extraits végétaux, les plus utilisés sont l'éther diéthylique, l'acétone, le *n*-hexane, l'éthanol, le *n*-butanol et le *n*-heptane. L'acétone peut induire des modifications de la conformation active des lipases mais elle est très efficace lorsqu'elle est utilisée à froid<sup>[37]</sup>.

Pour notre part, la poudre de maïs LGM a été divisée en deux lots pour être délipidées de deux manières différentes (voir partie expérimentale):

- ✓ Lot 01 délipidé par l'acétone froid à (- 20°C)
- ✓ Lot 02 délipidé par le n-hexane à (40°C)

La poudre de maïs (LGM) délipidée a été séchée à l'air à température ambiante pour évaporer le solvant, puis stockée dans des flacons hermétiques en verre à (4°C) jusqu'à son utilisation. La Figure 10 suivante résume les différentes étapes de l'extraction de lipases à partir des graines de maïs (LGM).

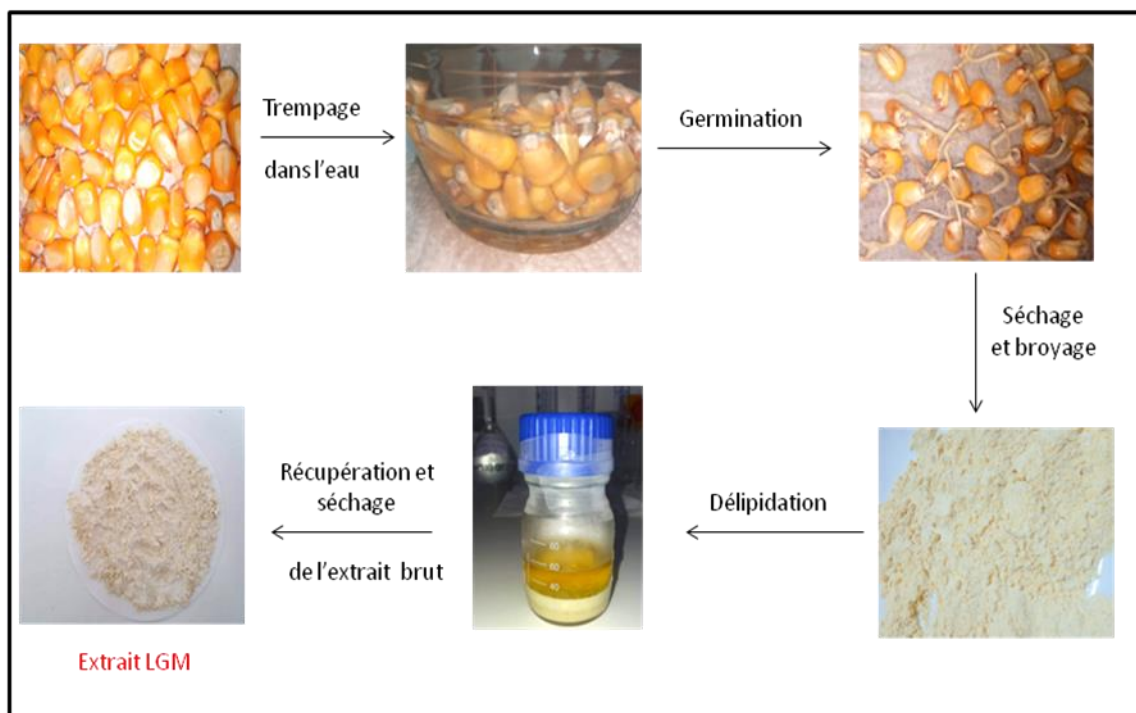


Figure 10. Récapitulatif des différentes étapes de l'extraction de la LGM

L'extrait brut LGM, ainsi obtenu, a fait l'objet de test d'activité hydrolytique avant son utilisation comme biocatalyseur dans l'estérification de *D*-glucose par l'acide oléique.

## IV.2. Test d'activité hydrolytique de la LGM

Avant d'être utilisé comme biocatalyseur dans la synthèse d'oléate de glucose, l'extrait LGM obtenu est testée en hydrolyse de l'huile d'olive afin d'estimer son activité hydrolytique ou lipasique.

Le test hydrolytique est réalisé en incubant le mélange 5 g d'huile d'olive dans 2,5 mL d'éther de pétrole en présence de 1g de LGM à 50°C pendant une heure sous agitation magnétique continue. La réaction d'hydrolyse est arrêtée par ajout de 25 mL d'un mélange n-hexane/éthanol (50/50). En parallèle, un test à blanc est mené pour s'assurer que l'hydrolyse ne se fasse pas sans enzyme.

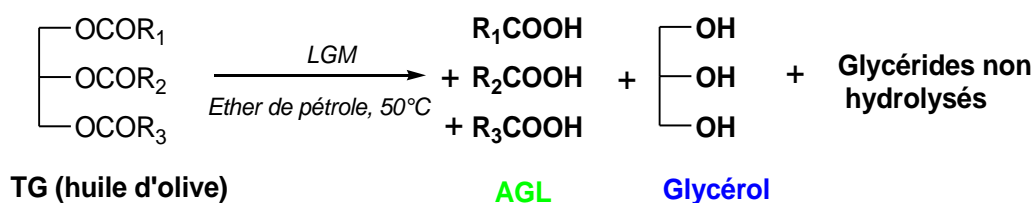


Schéma 7. Réaction d'hydrolyse des TG d'huile d'olive.

TG : triglycérides ; AGL : acides gras libres

Il est à noter que l'activité enzymatique spécifique AS [en  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$  ou UI/mg] est définie en terme de quantité d'AGL formés par unité de temps par unité de masse d'enzyme<sup>[11]</sup>. L'activité enzymatique spécifique est déterminée par l'équation suivante :

$$AS \text{ (UI/g)} = \frac{n(\text{AGL})}{X(\text{g}) * t(\text{min})}$$

Où :

- **AS** : activité enzymatique spécifique en [ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ ] ou en [UI/mg]
- **UI** : unité internationale en [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]
- **n(AGL)** : nombre de moles d'acide gras libre en [ $\mu\text{mol}$ ].
- **X(g)** : masse d'extrait végétale brut LGM en [mg]
- **t** : temps de la réaction en [min]

Les acides gras libérés ont été quantifiés par dosage avec une solution de NaOH 0,1M ; et le calcul de l'activité enzymatique spécifique (AS) de la LGM est résumé dans le Tableau 5 suivant :

**Tableau 5. Résultats du test d'activité hydrolytique de la LGM.**

Test	Test à blanc	Lot 1*	Lot 2**
V <sub>NaOH</sub> [ml]	1,800	7,500	2,000
AS [μmol/mg/min]	0	0,0095	0,0033

\* : Lot 01 : LGM délipidée par l'acétone (-20°C).

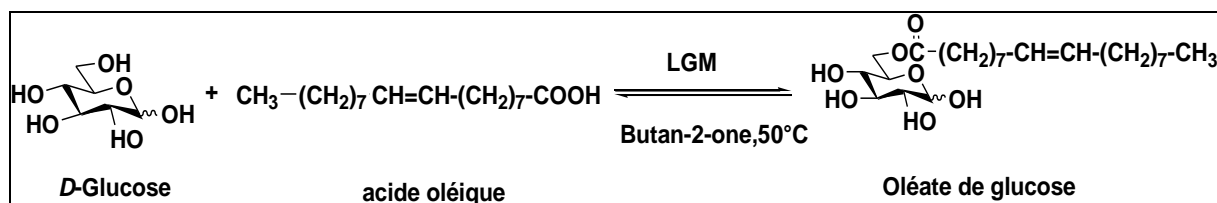
\*\* : Lot 02 : LGM délipidée par le *n*-hexane (40°C).

Les résultats des tests d'activité montrent que l'extrait LGM délipidé par l'acétone froide (lot 1) possède une meilleure activité hydrolytique spécifique de 0,0095 μmol/mg/min que celui délipidé par l'hexane (lot 2). La LGM du lot 1 sera, donc, utilisée pour catalyser l'estérifications du *D*-glucose avec l'acide oléique.

### IV. 3. Estérification en présence de la LGM

La synthèse de l'oléate de *D*-glucose est réalisée à partir de l'estérification de *D*-glucose avec l'acide oléique en présence de l'extrait brut de LGM comme biocatalyseur dans la butan-2-one (Schéma 8). Cette synthèse est effectuée en présence de différents rapports de sucre/acide afin d'étudier l'influence de ce paramètre sur la conversion *C* de la réaction cible. Par ailleurs, nous avons testé l'effet des ultrasons sur l'activité catalytique de LGM dans la réaction de synthèse de l'oléate de glucose.

Selon la littérature, l'estérification du glucose par des acides gras a lieu préférentiellement en position 6 du sucre.<sup>[29]</sup> Un suivi cinétique de tous les essais est réalisé par dosage acido-basique (voir partie expérimentale).



**Schéma 8. Estérification en présence de la LGM**

Conditions opératoires : 0,125g de LGM ; S/A ; 5 ml de butan-2-one ; 50°C.

### 1- Effet du rapport sucre/acide

L'estérification est effectuée entre l'acide oléique et le *D*-glucose dans la butan-2-one en présence de 0,125g de LGM, et en présence de différentes quantités de sucre/acide. La réaction est menée sous agitation magnétique thermostatée à 50°C. L'évolution de la réaction est suivie par dosage acido-basique. Les résultats du dosage volumétrique par une solution de NaOH (0,1 M) sont résumés dans le Tableau 6 suivant :

Tableau 6. Effet du rapport S/A sur la conversion de l'estérification du *D*-glucose

Entrée	S/A	t (h)	0	2	4	6	10	24
			$V_{NaOH}$ [ $\mu$ L]	700	650	500	450	450
1	1éq/1éq	C (%)	0	7,14	28,57	35,71	35,71	<b>57,14</b>
2	1éq/3éq	$V_{NaOH}$ [ $\mu$ L]	1700	1500	1350	1350	1200	1100
		C (%)	0	11,76	20,58	20,58	29,41	<b>35,29</b>
3	3éq/1éq	$V_{NaOH}$ [ $\mu$ L]	700	600	600	600	450	450
		C (%)	0	14,28	14,28	14,28	<b>35,71</b>	<b>35,71</b>

Le graphe ci-dessous (Figure 11) illustre mieux le suivi cinétique des expériences réalisées et permet de comparer les résultats obtenus.

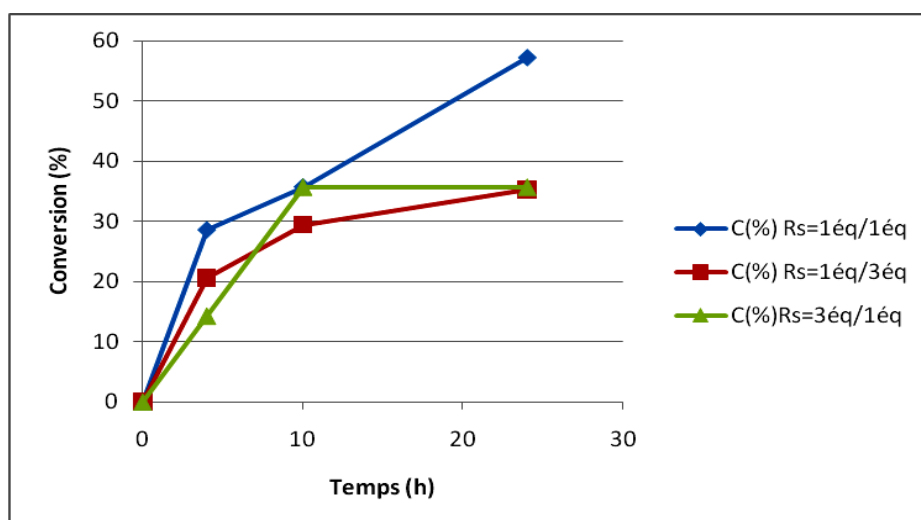


Figure 11. Suivi cinétique de l'estérification enzymatique du *D*-glucose. Effet du rapport S/A sur C

L'analyse de la Figure 11, montre que les trois courbes représentant les trois expériences conduites, en présence de 0.125g de LGM et différents rapports de sucre et

acide, ont presque la même allure. En ce qui concerne l'expérience avec un rapport S/A de 3/1 (courbe en vert) et 1/3 (courbe en rouge), les réactions démarrent avec une bonne vitesse puis commencent à ralentir après 4 h et 10 h respectivement. Par contre pour l'essai effectué avec 1éq/1éq de S/A (courbe en bleue), la réaction commence avec une meilleure vitesse initiale qui commence à diminuer après 4h.

L'histogramme ci-dessous Figure 12 illustre mieux les conversions obtenues pour les réactions d'estérification conduites avec différents rapports S/A.

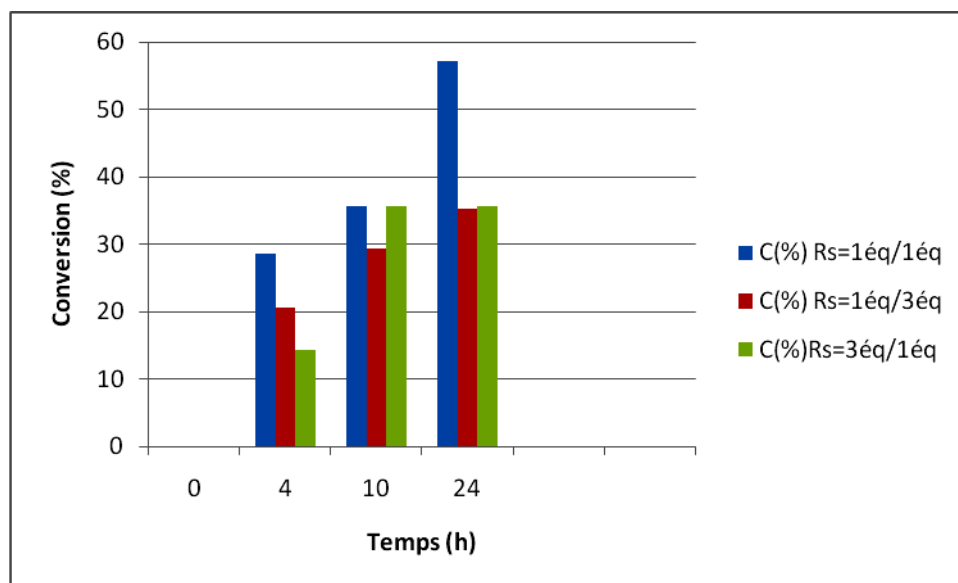


Figure 12. Histogramme de l'estérification enzymatique du *D*-glucose. Effet du rapport S/A sur C

Il ressort de cet histogramme (Figure 12) que la meilleure conversion de 57,14% est obtenue dans le cas où 1éq de sucre /1éq d'acide est utilisé. Les réactions de 1éq/3éq et 3éq/1éq ont permis d'obtenir l'oléate de glucose avec 35,29% et 35,71% de conversions respectivement.

En parallèle, une réaction à blanc (sans LGM) a été menée dans les mêmes conditions opératoires que celles effectuées avec un rapport 1/1 en présence de la LGM, les résultats obtenus sont explicités dans le Tableau 7 suivant :

Tableau 7. Suivi cinétique de l'estérification sans enzyme du *D*-glucose.

t (h)	0	2	4	21	24
V <sub>NaOH</sub> [μl]	650	500	450	400	350
C(%)	0	23,07	30,76	38,46	46,15

Le graphe ci-dessous illustre mieux le suivi cinétique de la réaction réalisée (Figure 13).

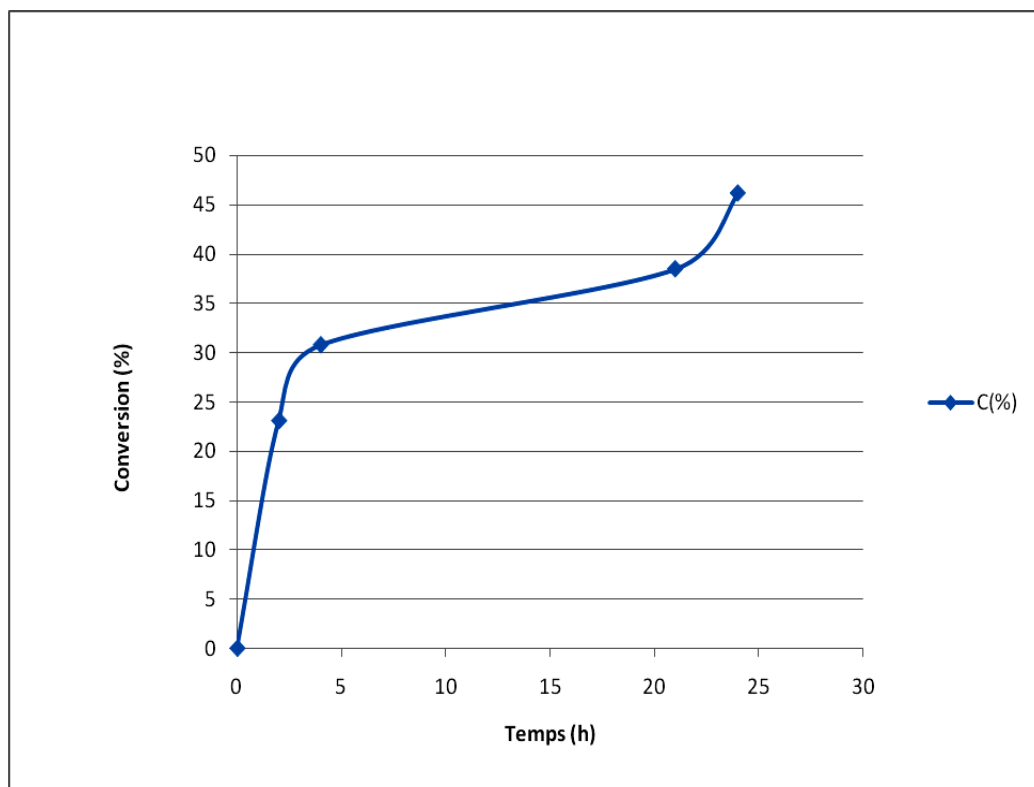
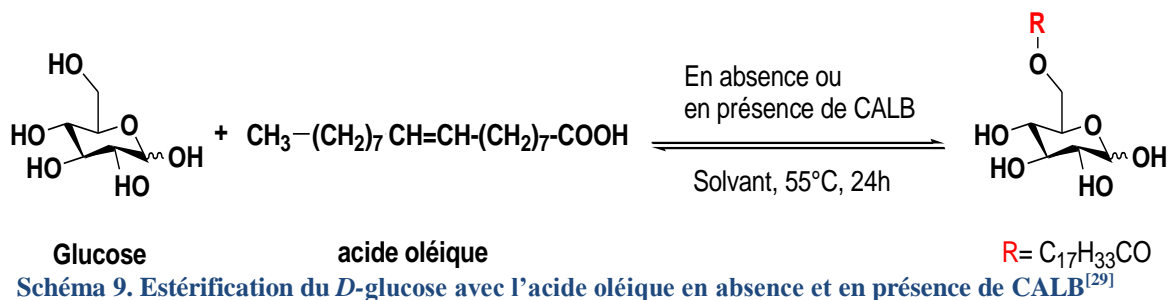


Figure 13. Suivi cinétique de la réaction à blanc

**Conditions:** 1éq de *D*-glucose, 1éq d'acide oléique, dans 5ml de butan-2-one à 50°C.

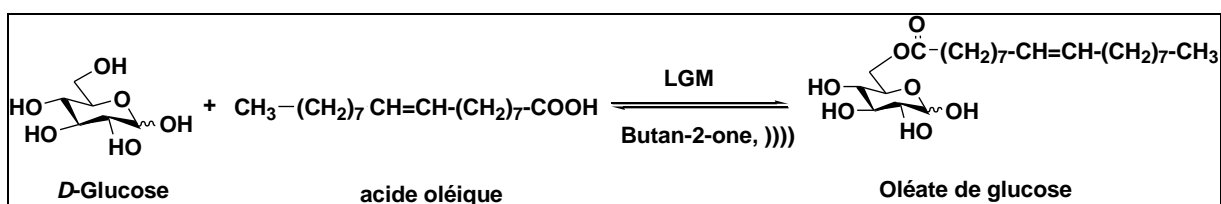
D'après l'analyse de la Figure 13, révèle que l'estérification du *D*-glucose avec l'acide oléique sans LGM s'effectue avec une conversion moyenne de 46,15 % en 24 h de temps réactionnel. DE plus, cette réaction démarre avec une vitesse importante jusqu'à 4 h de réaction. Ce résultat est en concordance avec les travaux de S. Çetinkaya et al<sup>[29]</sup>. qui en 2020 ont réalisé l'estérification du *D*-glucose avec les acides oléique et palmitique en l'absence et en présence d'un biocatalyseur, la lipase de *Candida Antarctica B* (CAL B), le milieu réactionnel étant un mélange (1:4, v/v) de diméthylsulfoxyde et de tert-butanol (Schéma 9). Les résultats ont indiqué que l'ester formé l'oléate de 6-O-glucose, à la fois en l'absence et en présence du biocatalyseur, est obtenu avec des rendements supérieurs à 90 % au bout de 24h de réaction.



## 2- Effet des US sur l'estérification du D-glucose

Les réactions d'estérification ont été menées en présence de 0,125g de LGM et la butan-2-one à température ambiante dans un bain à ultrasons selon deux approches différentes:(Schéma 10).

- irradiation ultrasonique sans agitation magnétique
- prétraitement ultrasonique de l'extrait LGM pendant 1 h puis agitation magnétique du mélange réactionnel.



**Schéma 10. Estérification du D-glucose par l'acide stéarique sous US en présence de LGM**

**Conditions:** 1éq de D-glucose, 1éq d'acide oléique, 0,125 de LGM, 5ml de butan-2-one, 25-40°C.

Le Tableau 8 suivant regroupe les résultats du suivi cinétique des expériences effectuées sous US.

**Tableau 8. Suivi cinétique de l'estérification du D-glucose assistée par US.**

	t (h)	0	2	4	6	10	24
1	C(%) sonication sans LGM	0	6,25	18,75	18,75	18,75	/
2	C(%) prétraitement US 1h	0	0	6,25	18,75	25	25
3	C(%) sonication sans agitation	0	12,5	12,5	12,5	12,5	/
4	C (%) agitation sans US	0	7,14	28,57	35,71	35,71	<b>57,14</b>

La représentation graphique suivante illustre mieux le suivi cinétique des réactions réalisées (Figure 14).

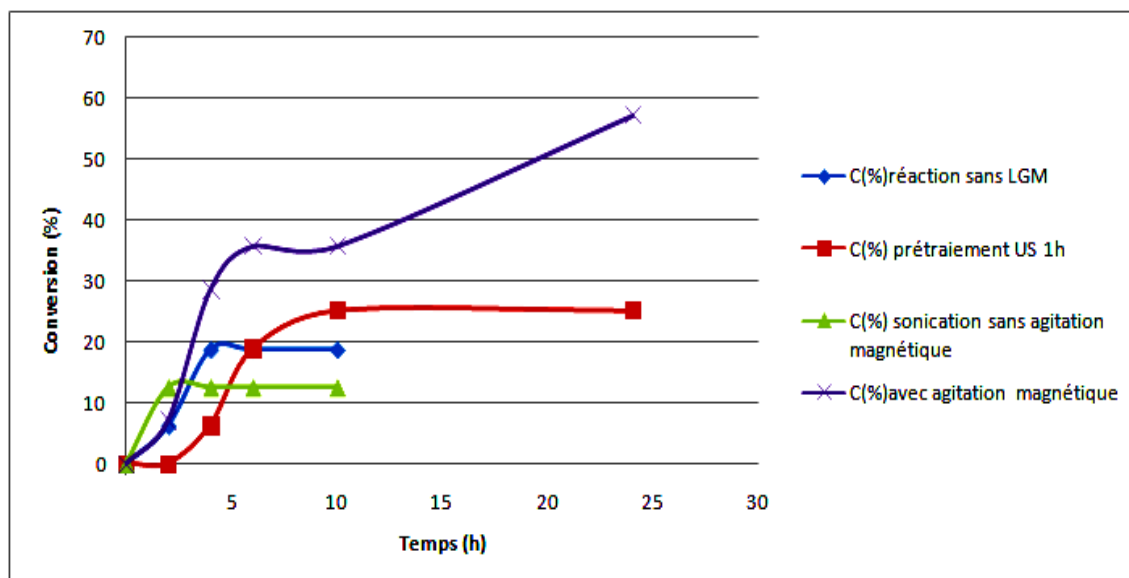


Figure 14. Suivi cinétique de l'estérification enzymatique du *D*-glucose assistée par US

Il ressort de l'examen de (Figure 14) que les deux réactions réalisées sous US sans agitation magnétique avec LGM (courbe en vert) ou sans LGM (courbe en bleu) démarrent avec une vitesse relativement faible pour ne plus avancer après 2 h et 4 h respectivement. La conversion atteinte est de 12,5% et 18,75%

Par contre, la réaction avec un prétraitement de LGM pendant 1 h (courbe en rouge), ne commence qu'après 2h d'agitation magnétique du mélange réactionnel avec une très faible vitesse initiale puis commence à accélérer jusqu'à atteindre une conversion de 25 % après 6 h de réaction pour ne plus avancer après 10 h de réaction.

L'histogramme ci-dessous illustre mieux les conversions obtenues pour toutes réactions d'estérification avec et sans US.

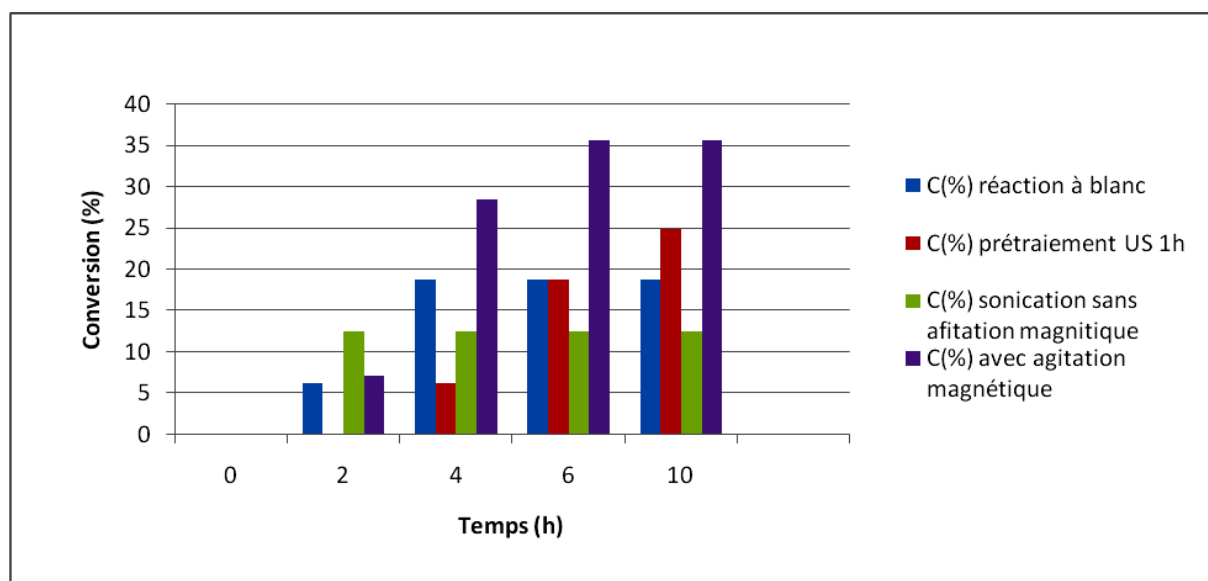


Figure 15. Histogramme de la conversion de l'estérification du *D*-glucose assistée par US

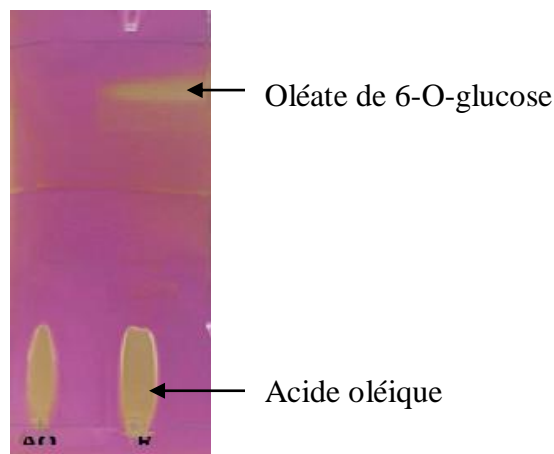
Il ressort de cet histogramme (Figure 15) que :

- L'agitation conventionnelle sans US (courbe en violet) s'est montrée supérieure à aux deux méthodes sous US avec ses deux variantes c'est-à-dire la pré-irradiation US de la lipase (courbe en rouge) ou l'irradiation US pendant la réaction enzymatique (courbe en vert). En effet, le meilleur résultat a été obtenu pour la réaction sans US (sous agitation magnétique avec 35,71 % de conversion dans 10h et 57,14 en 24 h de réaction).
- La meilleure conversion de 35,71 % et 57.14 % ont été obtenues pour la réaction d'estérification enzymatique du *D*-glucose sous agitation magnétique sans US pendant 10 h et 24 h de temps réactionnels respectivement.
- Un prétraitement ultrasonore de LGM pendant 1 h suivi d'agitation magnétique de la réaction d'estérification a permis d'obtenir une conversion modeste de 25% au bout de 10 h de temps réactionnel.
- Une conversion très modeste de 12,5% est obtenue pour la réaction sous irradiation ultrasonore pendant 10 h de temps réactionnel.

### 3- Analyse par CCM

L'analyse des plaques CCM (Figure 16) réalisées dans le cyclo-hexane/chloroforme (50/ 50) comme éluant, dénote la formation d'un produit qui est probablement l'ester de

sucre attendu avec un  $R_f$  de 0,91. L'autre tâche possédant un  $R_f$  de 0,17 correspond à l'acide oléique.



**Figure 16. CCM de la réaction d'estérification du *D*-glucose avec l'acide oléique**

Eluant : cyclo-hexane/chloroforme (50/50), révélateur : solution de  $KMnO_4$

AO: acide oléique ; R : mélange réactionnel

## V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en œuvre l'extraction de lipase à partir des graines de maïs (LGM) pour l'utiliser en tant que biocatalyseur dans la synthèse d'oléate de *D*-glucose par estérification enzymatique à partir du *D*-glucose et l'acide oléique. Dans ce cadre, l'étude de l'impact du rapport glucose/acide oléique et celui des ultrasons sur l'avancement de la synthèse a été réalisée. Le suivi cinétique de la réaction cible par dosage volumétrique a permis de déterminer les conversions des différentes expériences réalisées.

L'étude de l'effet de rapport sucre/acide et celui des US sur l'avancement de la synthèse d'oléate de glucose a été effectuée. Le suivi cinétique de la réaction cible par dosage volumétrique a permis de déterminer les conversions des différentes expériences:

- ✓ Les résultats ont indiqué que l'oléate de 6-O-glucose à la fois en l'absence et en présence de 1,25 g de LGM, avec des conversions de 57,14 et 46,15% respectivement en 24 h de réaction à 50°C eu utilisant Rapport S/A de 1éq/éq.

Concernant les US, les deux méthodes employées, c'est-à-dire la pré-irradiation ultrasonore de la lipase suivie par agitation magnétique ou l'irradiation pendant la réaction enzymatique, se sont montrées inefficaces pour améliorer la conversion et la réaction s'arrête au bout de quelques heures seulement.

## Conclusion générale

L'objectif de ce travail était d'évaluer le potentiel catalytique de lipase issue de la biomasse végétale dans la synthèse de l'oléate de glucose, un ester de sucre à potentialité tensioactive et surtout respectueux de l'environnement. Pour ce faire, l'extraction de la lipase de graines de maïs a été mise en œuvre ; et le test hydrolytique de l'extrait brut LGM révèle que cette lipase possède une activité enzymatique spécifique appréciable de l'ordre de 0,009  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ .

En vue d'étudier l'effet du rapport sucre/acide sur notre synthèse cible catalysée par la LGM dans la butan-2-one à 50°C, trois expériences ont été effectuées en présence de différents rapport sucre/acide, à savoir 1éq/1éq, 1éq/3éq et 3éq/1éq ; et une quatrième expérience est menée sans LGM. Le suivi cinétique de la réaction cible par dosage volumétrique a permis de déterminer les conversions atteintes pour les différents essais réalisés. Il ressort de l'analyse des résultats que :

- ✓ l'estérification du *D*-glucose avec l'acide oléique s'effectue à la fois en l'absence et en présence du biocatalyseur.
- ✓ La meilleure conversion de 57,14 % a été obtenue après 24 h, lorsque un rapport S/A de 1éq/1éq est utilisé.

Nous avons également étudié l'impact des US sur la conversion de notre synthèse cible. Pour ce faire, les réactions ont été conduites selon différentes approches :

- ✓ sonication dans un bain à ultrasons pendant toute la réaction enzymatique sans agitation magnétique
- ✓ prétraitement de la lipase par ultrasons pendant une heure avant la réaction suivi par agitation magnétique

L'utilisation des US, avec ses deux variantes, s'est montrée inefficace pour améliorer la conversion. En effet, lorsque la LGM a subi un prétraitement ultrasonore pendant 1 h suivi par agitation magnétique du mélange réactionnel une conversion modeste de 25% a été

obtenue au bout de 10 h de temps réactionnel. Cette valeur de C est de loin inférieure à celle obtenue dans les conditions classiques d'agitation magnétique sans US (57,14 %).

Ce comportement pourrait être expliqué par la déformation de site actif de l'enzyme par US. Néanmoins, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour améliorer la conversion de cette synthèse enzymatique. Dans une perspective de développement ultérieur, nous prévoyons de :

- Changer le solvant de la réaction et optimiser sa quantité notamment dans les conditions US.
- Compléter l'étude en considérant l'effet d'autres facteurs comme la longueur de la chaîne de l'acide gras et la quantité de l'enzyme.

# Partie expérimentale

## I. Produits chimiques et biomasse

### 1. Produits chimiques :

- **Substrats** : *D*-glucose et acide oléique.
- **Solvants** : Butan-2-one, hexane, acétone, éthanol, éther de pétrole, méthanol, chloroforme.
- **Autres** : Phénolphtaléine, NaOH,  $\text{KMnO}_4$  et  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

### 2. Biomasse :

Les graines de maïs utilisées dans ce travail (Figure 17) comme sources éventuelles de lipase pour la catalyse de la réaction d'estérification, sont disponibles sur le marché local d'El-Tarf.

**Nom commun** : Graines de maïs jaunes

**Nom scientifique** : *Zea mays*

**Famille** : Poaceae



Figure 17. Graines de maïs étudiées

## II. Matériels utilisés

### ➤ Balance analytique:

Toutes les pesées ont été réalisées sur une balance analytique de précision de 0.0001 g de la marque « OAHUS » (Figure 18).



Figure 18. Balance analytique

➤ **Agitateur magnétique:**

Pour réaliser la synthèse enzymatique, nous avons utilisé une plaque chauffante avec agitateur magnétique de la marque « Stuart » et un barreau aimanté est joint au système réactionnel (Figure 19).



Figure 19. Plaque chauffante avec agitateur magnétique et un barreau aimanté

➤ **Cuve d'élution pour l'analyse par CCM :**

L'élution des plaques CCM est réalisée dans une cuve en verre munie d'un couvercle (Figure 20).



Figure 20. Cuve d'élution de CCM

➤ **Bain à ultrasons :**

L'irradiation ultrasonore a été réalisée dans un bain marie thermostatique, pour gamme ultrasonique de puissance 195 W et de fréquence activée 50/60 KHz « J.P.SELECTA s.a/3000865 » (Figure 21).



Figure 21. Bain à ultrasons J.P SELECTA, 40K, 5L.

### III. Méthodes

#### III.1. Procédures d'extraction des lipases végétales

##### a- Germination

40 g de graines sont mis dans l'eau pendant 12 h à température ambiante. Les graines sont, ensuite, récupérées puis mises sur un plateau recouvert de papier absorbant

ou de coton imbibé d'eau afin de faciliter la germination. Les graines sont étendues uniformément et recouvertes avec une deuxième couche de coton. Cette étape se fait pendant 3 à 7 jours selon la nature des graines. L'humidification des graines se fait périodiquement à chaque fois qu'un léger dessèchement est observé.

### **b-Séchage et broyage**

Les graines germées sont séchées à une température ambiante pendant 48 h. La vérification du séchage est contrôlée en effectuant périodiquement des pesées jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Après le séchage, les graines sont broyées à l'aide d'un moulin à café.

### **c- Délipidation**

Deux méthodes ont été réalisées pour la délipidation des graines :

**1<sup>ère</sup> méthode :** 20 g de la poudre des graines de maïs sont broyées dans un mortier contenant 40 ml d'acétone froid (-20°C) et est laissés macérer pendant 2h à -20°C, puis le mélange est filtré à travers un papier filtre de 150 µm de diamètre ensuite lavé 5 à 7 fois avec 20 ml d'acétone froid jusqu'à ce que l'acétone de lavage devienne claire.

**2<sup>ème</sup> méthode :** 20 g de la poudre des graines sont laissés pendant 1h dans 25 ml d'hexane à T= 40°C sous une agitation magnétique. Le mélange est filtré puis lavé 1 fois avec l'hexane et 1 fois avec l'acétone froide.

Le résidu a été séché à l'air libre à température ambiante, ensuite la poudre est stockée dans des boîtes à 0°C.

## **III.2. Test d'activité de la LGM**

5g de substrat (huile de l'olive) et 1 g d'enzyme LGM dans 2.5 ml d'éther de pétrole sont mis sous agitation magnétique pendant 1h à 50°C. Ensuite, 25 ml du mélange (50/50) acétone / phénolphtaléine 0,1% dans l'éthanol sont ajoutés pour stopper la réaction d'hydrolyse. En parallèle, un test à blanc est réalisé sans enzyme pour s'assurer que la réaction ne se fait pas sans enzyme. Le dosage du mélange réactionnel avec la solution de NaOH (0.1M) permet de calculer l'activité spécifique de l'enzyme en utilisant la formule suivante :

$$AS(UI/g) = \frac{n(AGL)}{X(g) * t(min)}$$

Où :

- **AS** : activité enzymatique spécifique en [ $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ ]
- **n(AGL)** : nombre de moles d'acide gras libre en [ $\mu\text{mol}$ ].
- **X(g)** : masse d'extrait végétale brut LGM en [ $\text{mg}$ ]
- **t** : temps de la réaction en [ $\text{min}$ ]

### III.3. Procédure d'estérification du D-glucose

#### a- 1ère procédure : agitation magnétique

Dans un petit ballon, 1éq de *D*-glucose (1,25 mmol) et 1éq d'acide oléique (1,25 mmol) sont dissouts dans 5 ml de butan-2-one. Après 5 min d'agitation magnétique à  $T=50^{\circ}\text{C}$ , une quantité d'extrait LGM est ajouté (Figure 22). Des échantillons sont régulièrement prélevés du milieu réactionnel, afin d'évaluer la conversion. La réaction est stoppée lorsque la conversion reste constante.

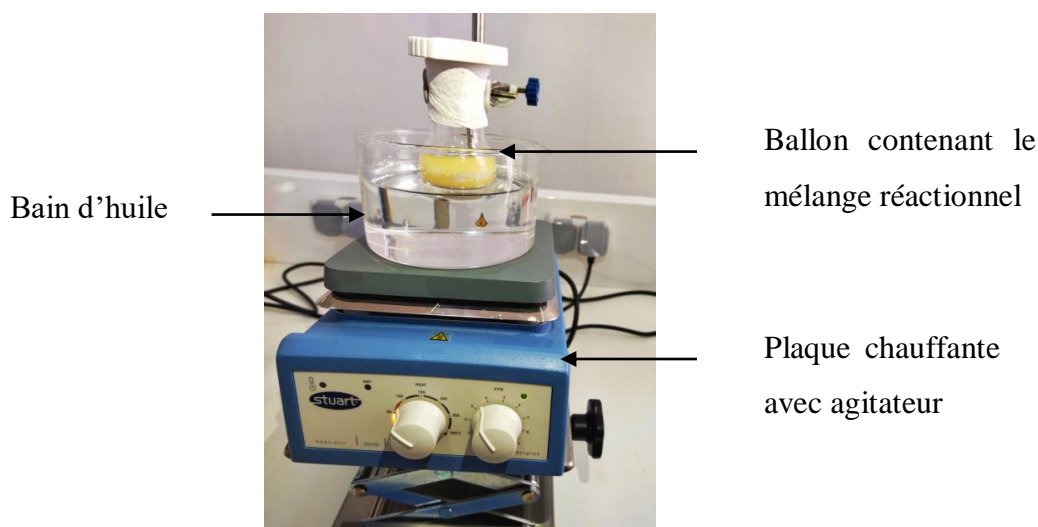


Figure 22. Montage expérimental de la réaction d'estérification

#### b- 2<sup>ème</sup> procédure : prétraitement ultrasonique

0,125 g d'extrait enzymatique et 5 ml de butan-2-one sont introduits dans un ballon, le mélange est soumis à une irradiation ultrasonique pendant 1 h. Ensuite, 1éq de *D*-glucose et 1éq d'acide oléique sont ajoutés à la lipase prétraitée par US. Le mélange, ainsi obtenu, est soumis à une agitation magnétique pendant 10 h.

### c- 3<sup>ème</sup> procédure : irradiation ultrasonique sans agitation magnétique

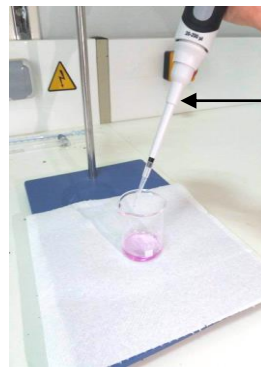
1éq de D-glucose et 1éq d'acide oléique sont dissouts dans 5 ml de butan-2-one dans un ballon. Après 5 min d'agitation, 0,125g d'extrait enzymatique sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ensuite soumis à une irradiation ultrasonique pendant 10h.

### d- Mesure de la conversion par titrage :

La conversion (C %) est mesurée par la quantité d'acide gras non réagit dans le milieu réactionnel selon le mode opératoire suivant :

0.2 g de mélange réactionnel est dilué dans 5 ml d'une solution de phénophtaléine dans l'éthanol (0.1%). Une solution de NaOH (0,1M) est ensuite ajoutée goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistante (Figure 23). La conversion est donnée par l'expression suivante :

$$C(\%) = \frac{V_{NaOH}(\text{avant l'ajout de l'enzyme}) - V_{NaOH}(\text{après l'ajout de l'enzyme})}{V_{NaOH}(\text{avant l'ajout de l'enzyme})} \times 100$$



← Micropipette contenant NaOH (0,1M)

Figure 23. Dosage du mélange réactionnel

### b-. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) :

La formation des produits est vérifiée par chromatographie sur couche mince (CCM). L'analyse par CCM est réalisée sur feuilles d'aluminium recouverte de gel de silice (Merck 60 F254) par migration dans le mélange cyclo-hexane/ Chloroforme (50/50). Les plaques ont été révélées au moyen d'un des deux révélateurs suivants :

- Solution méthanolique d'acide sulfurique 30 %, puis chauffage.
- solution KMnO<sub>4</sub> (50 ml de solution KMnO<sub>4</sub> à 2% + 50 ml de solution Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 4%) puis chauffage.

**Le rapport frontal (R<sub>f</sub>) :** est la distance parcourue entre la ligne de dépôt (H) et le centre de la tache (h) dans des conditions données (phase fixe et éluant connus) est

caractéristique de l'espèce chimique : elle est identique que l'espèce soit pure ou dans un mélange.

$$R_f = h/H$$

## Références bibliographiques

- [1] D. G. Filho, A. G. Silva, C. Z. Guidini, *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, 18, 7399-7423.
- [2] [http://rea.deccllic.qc.ca/dec\\_virtuel/Biologie/101-NYA-05/Cellule\\_et\\_evolution/I.La\\_Cellule/Cycle\\_Catalytique/](http://rea.deccllic.qc.ca/dec_virtuel/Biologie/101-NYA-05/Cellule_et_evolution/I.La_Cellule/Cycle_Catalytique/), consulté le 06/06/2022.
- [3] *Internationnal Union of Biochemistry Enzyme Nomenclature Academic Press: Orlando* **1984**.
- [4] D. Combes, P. Monsan, *Techniques de l'ingénieur* **2009**, 11, 1-18.
- [5] <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>, consulté le 23/05/2022.
- [6] M. Kapoor, M. N. Gupta, *Process Biochemistry* **2012**, 47, 555-569.
- [7] D. G. Filho, A. G. Silva, C. Z. Guidini, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2019**, 18, 7399–7423.
- [8] M. Barros, L. F. Fleuri, G. A. Macedo, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2010**, 27, 15-29.
- [9] P. Fickers, J. Destain, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **2008**, 12, 119-130.
- [10] T. Baba, D. Downs, K. Jackson, J. Tang, C. Wang, *Biochemistry* **1991**, 30, 500-510.
- [11] K. C. Santos, D. M. J. Cassimiro, M. H. M. Avelar, D. B. Hirata, H. F. de Castro, R. Fernández-Lafuente, A. A. Mendes, *Industrial Crops and Products* **2013**, 49, 462-470.
- [12] M. J. Hills, K. D. Mukherjee, *Appl. Biochem. Biotechnol* **1990**, 26, 629-632.
- [13] F. Hassanien, J. Mukherjee, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1986**, 63, 893-897.
- [14] V. M. Pahoja, m. A. Sethar, *Journal of Applied Sciences* **2002**, 2, 474-484.
- [15] F. Beisson, N. Ferté, S. Bruley, R. Vouloury, R. Verger, V. Arondel, *Biochim Biophys Acta* **2001**, 1531, 47-58.
- [16] P. Adlercreutz, T. Gitlesen, I. Ncube, J. Read, *Methods Enzymol* **1997**, 284, 220-231.

- [17] M. LIAQUAT, R. K. O. APENTEN, *Food Chemistry and Toxicology* **2000**, 65, 295-299.
- [18] M. Liaquat, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, 68, 59–65.
- [19] M. Tüter, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1998**, 75, 417- 420.
- [20] X. Xia, Y. H. Wang, B. Yang, X. Wang, *Biotechnology letters* **2009**, 31, 83 - 87.
- [21] R. Tambun, J. A. Tambun, I. A. A. Tarigan, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* **2020**, 725.
- [22] F.Tavares, J.PetryP.R.Sackser, C.E.Borba, E.A.Silva, *Industrial Crops and Products* **2018**, 124, 254-264.
- [23] R. Staubmann, I. Neube, G. Gubitz, W. Steiner, *Journal of Biotechnology* **1999**, 26.
- [24] <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Mais.html>, consulté le 15/03/2022.
- [25] E. S. Onyebuchi, C. F. Chiemeka, A. C. Uzoma, *Animal Research International* **2007**, 2, 650–652.
- [26] N. S. Neta, J. A. Teixeira, L. R. Rodrigues, *Crit Rev Food Sci Nutr* **2015**, 5, 595-610.
- [27] <https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille/TENSIOACTIFS>, consulté le 24/05/2022.
- [28] S. Piccicuto, C. Blecker, J.-C. Brohée, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deroanne, M. Paquot, M. Marlier, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **2001**, 4, 209–219.
- [29] S. Çetinkaya, A. F. Yenidünya, F. Başoğlu, K. Saraç, *Journal of Oleo Science* **2020**, 7, 737-742.
- [30] T. G.Leighton, *ELSEVIER* **2007**, 93, 3-83.
- [31] [https://new.societechimiquedefrance.fr/wp-content/uploads/2019/12/2015-397-398-juin-juillet-p135-pflieger\\_hd.pdf](https://new.societechimiquedefrance.fr/wp-content/uploads/2019/12/2015-397-398-juin-juillet-p135-pflieger_hd.pdf), consulté le 17/06/2022.
- [32] <https://experts-insitu.com/billet/cours-98-les-phenomenes-de-cavitation-dans-les-circuits-hydrauliques/>, consulté le 04/06/2022.
- [33] <https://new.societechimiquedefrance.fr/numero/quest-ce-que-la-sonochimie-p11->, consulté le 17/06/2022.
- [34] W. Phakhodee, D. Yamano, M. Pattarawarapan, *Synlett* **2020**, 7, 703-707.
- [35] A. F. Aguilera, P. Lindroos, J. Rahkila, M. M. Klimov, P. Tolvanen, T. Salmi, *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* **2022**, 174.
- [36] <https://patents.google.com/patent/EP0026125A1/fr>, consulté le 15/01/2022.

- [37] Y. T. KOUADIO, *Mémoire de master, Institut International d'Ingénierie* **2015**.