



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



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

Essais de synthèse d'un biotensioactif en présence de biocatalyseurs d'origine végétale

Présenté par:

DAHRI Khaoula

Devant le Jury :

Dr. DIAF Ilham	MCB	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Présidente
Dr. SELAIMIA Ouassila	MCB	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Encadreur
Dr. BOUCHAREB Fouzia	MCA	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Examinatrice
Dr. FERDJANI Salim	MCB	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Co-encadreur

Année Universitaire 2019-2020

Dédicace

*Je dédie ce travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma chère mère **Ouassila**.*

*A mon père **Saddek**, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années d'études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à m'aider et à me protéger.*

Que Dieu les garde et les protège.

*A mon frère : **Nabil**.*

*A mes sœurs : **Sara, Rym, Safa et Bouthaina**.*

A toute ma famille.

Remerciements

La partie pratique de ce projet de fin d'étude a été réalisée au laboratoire de chimie de l'université Chadli Bendjedid El Tarf. J'exprime ma reconnaissance à M. KHERICI Sofiane, ingénieur au laboratoire de chimie et M. TAGUIDA Souhail, ingénieur au laboratoire de physique à l'Université d'El Tarf pour leurs précieuses aides et leur disponibilité. Ils m'ont permis d'effectuer ce travail de recherche dans de bonnes conditions.

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon encadreur, Mme **SELAIMIA FERDJANI Ouassila**, maître de conférences à l'Université Chadli Bendjedid, pour la confiance qu'elle m'a prodiguée sous sa direction, sans jamais cesser de m'encourager et me pousser vers les horizons de la recherche scientifique, pour toute l'aide qu'elle m'a apporté durant toutes les étapes de ce travail, ainsi que les orientations, le temps et les conseils, pour sa disponibilité, ainsi que pour sa patience.*

*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 Mme BOUCHAREB Fouzia, Maître de conférences à l'Université d'El-Tarf d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire et à Mme DIAF Ilham, maître de conférences à l'Université d'El-Tarf, d'avoir accepté de l'examiner.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous les enseignants qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenus dans la poursuite de nos études.

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Résumé

La catalyse enzymatique des esters de sucres et d'acides gras présente plusieurs avantages par rapport à la voie chimique classique. Cette étude est consacrée à l'extraction de lipases de la biomasse végétale et à leurs utilisations comme biocatalyseurs en vue de remplacer les lipases coûteuses principalement d'origine microbienne. Les extraits végétaux bruts de graines de maïs et de lin germées sont testés comme biocatalyseurs dans la synthèse du stéarate de *D*-glucose, biotensioactif non-ionique, à partir de ressources renouvelables. Les résultats de ces travaux ont montré que ces extraits bruts contiennent des lipases dont l'activité catalytique peut être exploitée sans aucune purification dans les réactions d'estérification des *D*-glucose avec l'acide stéarique.

Mots clés : tensioactif, ester de sucre, estérification, lipase.

Abstract

The enzymatic catalysis of esters of sugars and fatty acids has several advantages over the conventional chemical route. This study is devoted to the extraction of lipases from plant biomass and their use as biocatalysts to replace expensive lipases mainly of microbial origin. The raw plant extracts of germinated corn and flax seeds are tested as biocatalysts in the synthesis of D-glucose stearate, a nonionic biosurfactant, from renewable resources. The results of this work have shown that these crude extracts contain lipases whose catalytic activity can be exploited without any purification in the esterification reactions of D-glucose with stearic acid.

Keywords: surfactant, sugar ester, esterification, lipase

Liste des abréviations

°C :	Degré Celsius
C :	Conversion
CALB:	<i>Candida antarctica Lipase B</i>
CCM :	La chromatographie sur couche mince
CMC :	Concentration micellaire critique
DDE :	Diethyl ether
eq :	Equivalent
g :	Gramme.
h :	Heure
HLB :	<i>Balance hydrophile-lipophile</i>
LGL :	lipase des graines de lin
LGM :	lipase des graines de maïs
M :	Masse molaire
min :	Minute
mL :	Millilitre
mmol :	Millimole
R :	Rendement
Réf.	Référence
R_f:	Rapport frontal
T :	Température
TK :	Température de Krafft
TS :	la tension de surface

Liste des figures

Figure 1: représentation schématique d'une molécule tensioactive	3
Figure 2: structure générale d'un tensioactif anionique.....	3
Figure 3: structure générale d'un tensioactif cationique.....	4
Figure 4: structure générale de dérivés d'amines quaternaires	4
Figure 5: structure générale d'un tensioactif zwitterionique	4
Figure 6: structure générale d'un tensioactif non-ionique	5
Figure 7: propriétés des tensioactifs selon leur HLB	6
Figure 8: structure chimique d'un ester de saccharose	8
Figure 9 : schéma général de la synthèse d'esters de sucre	9
Figure 10: les graines sélectionnées pour l'étude.....	15
Figure 11: trempage des graines dans l'eau.....	16
Figure 12: graines germées	17
Figure 13: poudre des extraits des graines de lin et de maïs	18
Figure 14: schéma résumant la préparation de l'extrait lipasique des graines de maïs	19
Figure 15: schéma résumant la préparation de l'extrait lipasique des graines de lin	19
Figure 16: suivi cinétique de la conversion du <i>D</i> -glucose dans le cas de l'extrait de LGM...	21
Figure 17: analyse CCM de la réaction d'estérification catalysée par la LGM.....	22
Figure 18: suivi cinétique de la conversion du <i>D</i> -glucose dans le cas de LGL	23
Figure 19: analyse CCM de la réaction d'estérification catalysée par la LGL.....	24
Figure 20: les graines oléagineuses étudiées[originale].....	27
Figure 21: balance analytique	28
Figure 22: agitateur magnétique et barreaux magnétiques.....	28
Figure 23: étuve utilisée	28
Figure 24: dessiccateur utilisé.....	28

Figure 25: trempage des graines dans l'eau.....	29
Figure 26: séchage des graines germées à l'air libre	29
Figure 27: filtration des graines délipidées	30
Figure 29: montage expérimental de l'estérification enzymatique.....	31
Figure 30: dosage du mélange réactionnel par une solution de NaOH (0,1 M).....	31
Figure 28: structure chimique du stéarate de glucose	36

Liste des schémas

Schéma 1 : polycondensation d'oxyde d'éthylène sur un composé à hydrogène mobile	5
Schéma 2: réaction d'hydrolyse de triglycéride catalysée par une lipase en milieu aqueux ...	12
Schéma 3: estérification enzymatique du <i>D</i> -glucose avec l'acide stéarique	15
Schéma 4: estérification du <i>D</i> -glucose par l'acide stéarique en présence de LGM.....	20
Schéma 5: estérification du <i>D</i> -glucose avec acide stéarique en présence de LGL	22

Liste des tableaux

Tableau 1: quelques exemples de synthèses d'esters de sucres par voie chimique	9
Tableau 2: quelques exemples de synthèses d'esters de sucres par voie enzymatique.....	10
Tableau 3: comparaison entre la synthèse chimique et la synthèse enzymatique.....	11
Tableau 4: durée de germination des graines étudiées.....	17
Tableau 5: suivi des masses des graines germées lors du séchage des graines à l'air libre ...	17
Tableau 6: suivi des masses des graines lors du séchage dans l'étuve.....	18
Tableau 7 : résultats de la conversion du D-glucose en présence de l'extrait brut de LGM ..	21
Tableau 8: résultats de la conversion du <i>D</i> -glucose en présence de LGL	23

Sommaire

<i>Dédicace</i> -----	ii
<i>Remerciements</i> -----	iii
Résumé-----	iv
Abstract -----	v
Liste des abréviations -----	vi
Liste des figures -----	vii
Liste des schémas -----	ix
Liste des tableaux -----	x
Sommaire -----	xi
 Introduction générale -----	 1
 Chapitre I : Généralités sur les tensioactifs et les esters de sucres -	 3
 A. Généralités sur les tensioactifs -----	 3
I. Définition des tensioactifs -----	3
II. Classification de tensioactifs -----	3
II.1 Tensioactifs anioniques -----	3
II.2. Tensioactifs cationiques -----	4
II.3. Tensioactifs amphotères ou zwitterioniques -----	4
II.4 Tensioactifs non-ioniques -----	5
III. Propriétés physiques des tensioactifs-----	5
III.1. Balance hydrophyle-lipophile (HLB) -----	5
III.2. La concentration micellaire critique (CMC) -----	6
III.3. Tension de surface (TS) -----	6
III.4. Température de Krafft (TK) -----	6
IV. Les pouvoirs des tensioactifs -----	7
IV.1. Le mouillage-----	7
IV.2. Le moussage-----	7
IV.3. L'émulsion -----	7
IV.4. La dispersion-----	7
IV.5. La détergence -----	7

IV.6. La solubilisation -----	7
IV.7. L'anti-moussage-----	8
B. Généralités sur les esters de sucres -----	8
I. Introduction -----	8
III. Avantages et applications des esters des sucres -----	8
IV. voies de Synthèse des esters de sucres-----	9
IV. 1 Synthèse par voie chimique-----	9
III.1. Synthèse par voie enzymatique -----	9
III.2 Comparaison entre la synthèse chimique et la synthèse enzymatique -----	10
C- Conclusion -----	11
 Chapitre II: Essais de biocatalyse d'un tensio-actif non ionique -----	12
 I. Introduction -----	12
II. Généralités sur les lipases -----	12
III.1. Origines des Lipases -----	13
III-1_1- Lipases de mammifères-----	13
III-1-2- Lipases microbiennes -----	13
III-1-3- Lipases végétales-----	13
III. Résultats et Discussions -----	15
III.1. Préparation de l'extrait enzymatique -----	16
a- Trempage des graines dans l'eau -----	16
b- Germination des graines-----	16
c- Séchage et broyage des graines germées -----	17
d- Délipidation -----	18
III.3. Estérification en présence de LGM (lipase de graine de maïs) -----	20
III.4. Estérification en présence de LGL (lipase de graine de lin) : -----	22
IV- Conclusion -----	24
 Conclusion générale -----	25
 Partie expérimentale -----	27
I. Biomasse végétale et produits chimiques -----	27
I.1.Biomasse végétale -----	27
I.2. Produits chimiques : -----	27
II. Matériels-----	27
II.1. La chromatographie sur couche mince (CCM)-----	27
II.2. Agitateur magnétique -----	28

II.3. Balance analytique -----	28
II.4. Etuve -----	28
II.5. Dessiccateur -----	28
III. Méthodes -----	29
III.1 Préparation des extraits végétaux -----	29
a- Germination -----	29
b- Séchage et broyage de la biomasse végétale étudiée -----	29
c- Délipidation-----	30
III.2. Procédure d'estérification du <i>D</i> -glucose-----	30
III.3. Mesure de la conversion (C %) -----	31
III.4. La chromatographie sur couche mince (CCM)-----	32
Références bibliographiques -----	33

Introduction générale

Le marché des tensioactifs a connu une croissance régulière au cours des dernières années avec un taux de croissance de 3 à 4% par an et devrait atteindre une valeur de 40 milliards de dollars dans les années 2020 [1]. Les tensioactifs jouent un rôle important dans plusieurs domaines industriels et le type d'applications dépend notamment de leur structure (anionique, cationique, amphotère et non ionique) [2, 3].

Au cours des dernières décennies, la forte demande de tensioactifs a induit un intérêt croissant pour les tensioactifs renouvelables, en raison de leur faible impact environnemental et de leur faible consommation de ressources fossiles. Les esters d'acides gras et de sucre, tensioactifs non-ioniques, entrent dans ce contexte, car ils sont produits à partir de ressources renouvelables telles que les sucres et les acides gras. Ils sont donc biodégradables, inodores, non toxiques et non allergènes et de vastes applications dans les industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et l'industrie des détergents ont été trouvées [4-8].

Des efforts continus sont faits pour le développement de nouveaux procédés de production d'esters de sucres techniquement solides et surtout respectueux de l'environnement. La catalyse lipasique est le procédé le plus simple qui répond à ces exigences. Cependant le coût élevé des lipases commerciales principalement d'origine microbienne limite l'expansion de ce procédé à l'échelle industrielle. La biomasse végétale représente une source potentielle de lipases peu chères, très abondantes et facilement exploitables.

L'objectif du travail présenté dans ce mémoire est de tester la synthèse du stéarate de glucose, tensioactif non ionique, par estérification enzymatique en utilisant des extraits bruts d'enzymes issues de graines. Ainsi ce manuscrit s'articule autour de :

- **Chapitre I** qui est dédié à une mise au point bibliographique sur les notions de base concernant les tensioactifs et les esters de sucres, leurs définitions, classifications et applications.
- **Chapitre II** qui est consacré à des essais de synthèse du stéarate de glucose *via* une réaction d'estérification catalysée par des extraits bruts de lipases d'origine végétale. 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 tensioactifs et les esters de sucres

A. Généralités sur les tensioactifs

I. Définition des tensioactifs

Les molécules tensioactives, communément appelées tensioactifs, sont des composés à caractère amphiphile. Ils sont constitués de deux parties dont l'affinité avec l'eau est différente : la partie polaire et soluble dans l'eau est désignée comme « tête hydrophiles » tandis que la partie apolaire est appelée « chaîne lipophile » [9].

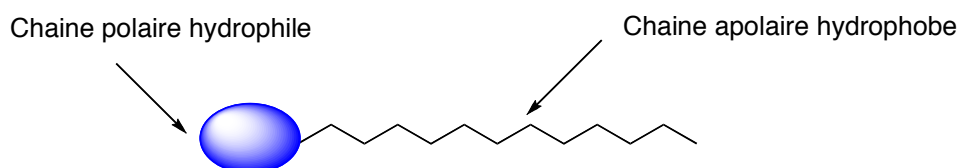


Figure 1: représentation schématique d'une molécule tensioactive

II. Classification de tensioactifs

Les tensioactifs sont classés selon la nature de leur pôle hydrophile en quatre grandes familles: les tensioactifs anioniques chargés négativement, les cationiques chargés positivement, les zwitterioniques ou amphotères possédant à la fois une charge positive et une charge négative et les non-ioniques, non chargés [9].

II.1 Tensioactifs anioniques

Les tensioactifs anioniques portent une charge nette négative localisée sur la tête. Ils sont les plus représentés car ils moussent et se rincent bien mais ils sont irritants (Figure 2). [10].



Figure 2: structure générale d'un tensioactif anionique

Ces composés possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en phase aqueuse pour donner des ions chargés négativement. Ces composés peuvent être subdivisés en trois principaux groupes [11] :

- Les savons dont la partie hydrophile est un sel de sodium ou de potassium d'un acide carboxylique.
- Les composés sulfonés de formule générale $\text{RSO}_3^-\text{Na}^+$ qui constituent la première matière tensioactive la plus utilisée dans les formulations détergentes.
- Les composés sulfatés proviennent de la sulfatation d'un alcool. Ils ont un pouvoir moussant très élevé mis à profit dans la préparation des shampoings et des bains moussants. Les alcools gras sulfatés ont pour formule générale $\text{ROSO}_3^-\text{Na}^+$.

II.2. Tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques portent une charge nette positive localisée sur la tête (Figure 3).



Figure 3: structure générale d'un tensioactif cationique

Ces composés possèdent un ou plusieurs groupements s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions tensioactifs chargés positivement. Les plus répandus sont les dérivés des amines quaternaires aliphatiques (Figure 4) [12] :

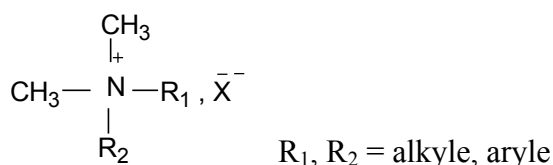


Figure 4: structure générale de dérivés d'amines quaternaires

II.3. Tensioactifs amphotères ou zwitterioniques

La recherche de nouveaux produits a naturellement conduit le chimiste à associer les charges anioniques et cationiques dans une seule et même espèce chimique «zwitterionique » (Figure 5). Selon le pH, elles peuvent libérer un ion positif ou négatif.

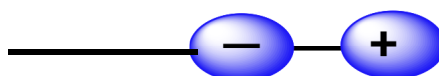


Figure 5: structure générale d'un tensioactif zwitterionique

Les tensioactifs amphotères ont une balance hydrophile-lipophile (HLB) élevée. Ils sont donc utilisés comme détergents. Ils présentent un caractère moins agressif que les tensioactifs anioniques et sont recommandés pour les peaux fragiles [13].

II.4 Tensioactifs non-ioniques

Ces agents de surface ne donnent aucun ion en solution aqueuse. Leur caractère hydrophile provient de la présence, dans leur molécule, de groupement polaire de type éther, alcool, carbonyle ou même amine.



Figure 6: structure générale d'un tensioactif non-ionique

90% de ces tensioactifs sont obtenus par polycondensation de molécules d'oxyde d'éthylène sur un composé à hydrogène mobile, selon la réaction générale (Schéma 1) [14] :

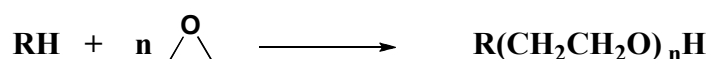


Schéma 1 : polycondensation d'oxyde d'éthylène sur un composé à hydrogène mobile

Les autres produits tensioactifs non ioniques sont principalement :

- Des esters de polyols : esters de sorbitanne, de glycérol, de polyglycérol, de sucre...
- Des éthers de polyols : éthers de glucose
- Des alcanolamines
- Des alkylpolyglucosides (APG).

III. Propriétés physiques des tensioactifs

Un agent tensioactif permet d'abaisser les tensions de surfaces aux interfaces. L'efficacité d'un tensioactif peut être évaluée à travers plusieurs propriétés : la balance hydrophile-lipophile -en anglais: *hydrophile-lipophile balance*- (HLB), la concentration micellaire critique (CMC), la tension de surface (TS) et la température de Krafft (TK).

III.1. Balance hydrophyle-lipophile (HLB)

L'équilibre hydrophile-lipophile (HLB) est l'équilibre entre la taille et la force des fractions hydrophiles et lipophiles d'une molécule de surfactant. L'échelle HLB va de 0 à 20, sa valeur est une fonction directe de l'importance de la partie hydrophile dans la molécule : elle est

élevée lorsque la fraction hydrophile est importante et faible si la molécule est majoritairement lipophile.

Par conséquent une valeur de HLB proche de 1 caractérise un produit très peu soluble alors qu'une valeur supérieure à 20 indique que le produit est très soluble. Les composés dont la HLB se situe entre 15 et 18 sont les plus efficaces pour détergence puisqu'ils sont relativement solubles dans l'eau tout en possédant un caractère lipophile important, favorable à l'émulsification (Figure 7). Il est nécessaire de préciser que la HLB est déterminée à une température donnée et qu'elle peut varier de façon considérable lorsque les conditions changent [15].

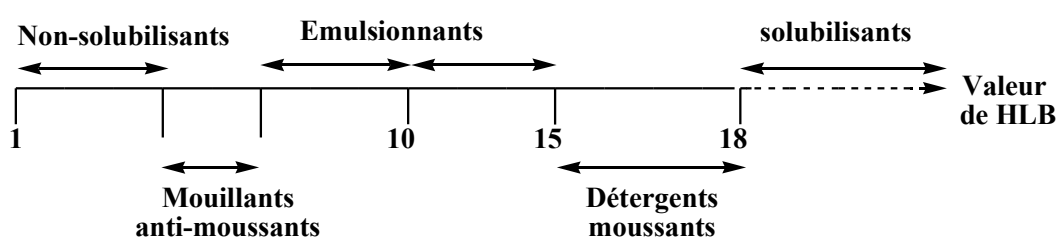


Figure 7: propriétés des tensioactifs selon leur HLB

III.2. La concentration micellaire critique (CMC)

La CMC est définie comme étant la concentration au-delà de laquelle les molécules de tensioactifs s'auto associent et s'arrangent sous forme d'agrégats particuliers appelés micelles. La valeur de la CMC mesurée varie légèrement suivant la méthode retenue pour la déterminer [16].

III.3. Tension de surface (TS)

La tension de surface ou tension superficielle est la tension qui existe à l'interface entre un gaz et un liquide. La tension interfaciale est la tension qui existe à l'interface entre deux liquides non miscibles ou entre un liquide et un solide. De par leur structure amphiphile, les tensioactifs sont capables de s'adsorber et de s'accumuler sur tous les types d'interface et d'abaisser la tension à l'interface [17].

III.4. Température de Krafft (TK)

Le point de Krafft est un paramètre caractéristique des tensioactifs ioniques : il s'agit de la température au-dessous de laquelle aucune micellisation n'intervient. Il correspond également à la température à laquelle la solubilité des tensioactifs ioniques atteint la valeur de

la concentration critique pour la formation de micelles. A partir de cette température, la solubilité augmente brusquement tandis que la CMC reste pratiquement constante [17].

IV. Les pouvoirs des tensioactifs

Le pouvoir d'un tensioactif est sa faculté et sa capacité de faire quelque chose. Les tensioactifs sont des agents : solubilisant, moussants, mouillants, dispersants, émulsifiants, détergents ou anti-moussants.

IV.1. Le mouillage

Grace au phénomène d'adsorption, les tensioactifs améliorent le mouillage qui est déterminé par la valeur appelé aussi angle de mouillage. Ce dernier diminue avec la tension superficielle de la solution tensioactive [18].

IV.2. Le moussage

La mousse est un ensemble de cellules gazeuses séparées par des lames fines de liquide et forment par juxtaposition des bulles qui donnent un gaz dispersé dans le liquide [19].

IV.3. L'émulsion

Ce phénomène d'adsorption fait également baisser la tension interfaciale. Cet effet favorise l'émulsification qui est la dispersion colloïdale de deux liquides non miscibles [20].

IV.4. La dispersion

Pour maintenir des particules dispersées, deux techniques sont possibles : on les enrobe d'un film colloïdal protecteur ou on utilise un électrolyte qui produit leur répulsion mutuelle [21].

IV.5. La détergence

La détergence est le processus selon lequel des salissures sont enlevées et mises en solution. La majorité des opérations de la vie courante concernant le lavage mettent en jeu un antagonisme existant entre les contaminants et l'eau [19].

IV.6. La solubilisation

La solubilisation consiste en une dissolution spontanée d'une substance grâce à des interactions réversibles avec les micelles d'un tensioactif présent dans un solvant donné, afin de former une solution isotrope et thermodynamiquement stable [21].

IV.7. L'anti-moussage

Les anti-mousses sont des produits susceptibles de se rassembler aux interfaces et de désorganiser les films superficiels en faisant chuter leurs propriétés mécaniques [22].

B. Généralités sur les esters de sucres

I. Introduction

Les esters de sucres constitués d'un groupement osidique hydrophile et d'une chaîne grasse hydrophobe, ils possèdent un caractère amphiphile. Cette caractéristique leur confère une affinité particulière pour les interfaces de type air/eau et eau/ huile et, en ces interfaces. Ce phénomène est à la base de la stabilisation de systèmes dispersés. Les esters de sucre sont des tensioactifs non ioniques et présentent des propriétés pertinentes telles que la diversité structurale et la sécurité environnementale et sanitaire [23].

Les premiers esters de sucres commercialisés sont les esters de saccharose (Figure 8).

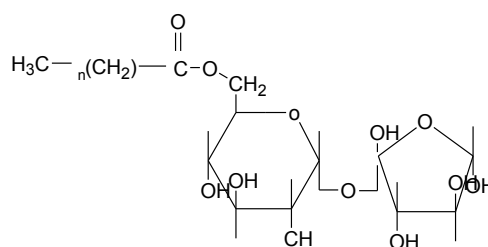


Figure 8: structure chimique d'un ester de saccharose

III. Avantages et applications des esters des sucres

Les esters de sucres sont des tensioactifs non-ioniques présentant de nombreux avantages [24]:

- ✓ Matières premières peu coûteuses et renouvelables.
- ✓ Biodégradabilité complète tant en aérobie qu'en anaérobie.
- ✓ Molécules ne présentant ni toxicité (lors de la digestion, les sucroesters sont convertis en sucres et en acides gras, donc en molécules métabolisables), ni caractère irritant.
- ✓ Certains groupes d'esters de sucres possèdent des activités biologiques intéressantes.
- ✓ Large gamme de structures disponibles.

Les applications potentielles des esters de sucre touchent des domaines variés tels que l'alimentation humaine, la formulation de médicaments et de produits phytosanitaires ou encore l'étude des protéines membranaires [25] [26].

IV. Voies de Synthèse des esters de sucres

Les esters de sucres de structures simples 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 (Figure 9).

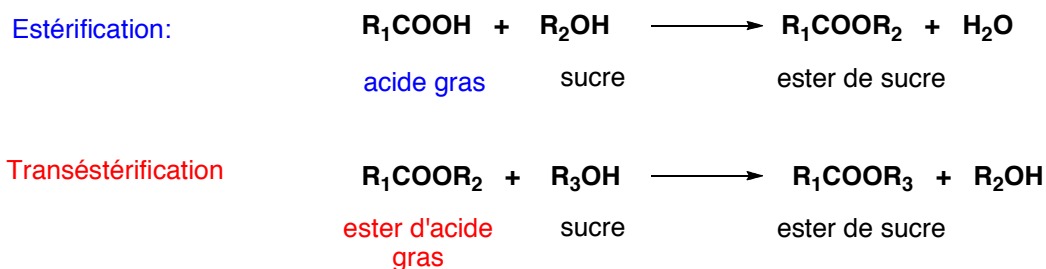


Figure 9 : schéma général de la synthèse d'esters de sucre

IV. 1 Synthèse par voie chimique

D'un point de vue général, la réaction envisagée est une estérification ou une transestérification réalisée à haute température en présence d'un catalyseur alcalin [27]. Les substrats nécessaires sont tout d'abord la source de sucre et ensuite un chlorure ou anhydride d'acide gras.

Ce type de synthèse ne permet de contrôler ni le site de réaction, ni le nombre de groupements hydroxyles qui seront estérifiés. Toutefois, un choix judicieux du catalyseur alcalin et des conditions de réactions de réaction permet d'orienter la réaction. Le Tableau 1 cite quelques exemples de synthèse d'esters de sucres par voie chimique.

Tableau 1: quelques exemples de synthèses d'esters de sucres par voie chimique

Sucre	Agent acylant	catalyseur	solvant	T(°C)	R (%)	Réf.
Saccharose	Mélange mono- di- et triglycéride	Carbonate de potassium	Sans solvant	140	25	[28]
Saccharose	Méthyl palmitate	Hydroxyde de potassium	Sans solvant	135	70	[29]
2,3,4-tri-O-acétyl- <i>D</i> -xylopyranose	chlorure d'un décénoyle	Triéthylamine	dichlorométhane	40	88	[30]

III.1. Synthèse par voie enzymatique

Le principe de la synthèse enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase, nom abrégé d'une triacylglycérol acylhydrolase) dans un milieu non

aqueux. Dans ces conditions, l'activité de la lipase est inversée, passant de l'hydrolyse à l'estérification [31]. La biocatalyse permet d'envisager la production sélective de structures complexes et originales.

La voie biotechnologique, exploitant les capacités d'enzymes dans la synthèse des esters de sucres, a été la plus étudiée ces dernières décennies ; le Tableau 2 en regroupe quelques exemples.

Tableau 2: quelques exemples de synthèses d'esters de sucres par voie enzymatique

Sucre	Agent acylant	Enzyme	Solvant	T(°C)	R(%)	Réf.
<i>D</i> -Glucose	Acide stéarique	<i>Rhizobium oryzae</i> -FeO ₄	Isooctane	25	87,2	[8]
<i>D</i> -Fructose	Acide stéarique	<i>CAL B</i>	Éthanol	40	78.13	[32]
<i>D</i> -Fructose	Acide stéarique	<i>CAL B</i>	Terbutanol	40	65	[33]
<i>D</i> -mannose	Myristate de vinyle	Novozym 435	Liquide ionique [Bmpyrr][TFO]	80	72	[34]
<i>D</i> -galactose	N-decanoylglycine	lipozyme (TLIM)	<i>tert</i> -butanol	40	94,5	[35]
<i>D</i> -Glucose	Acide hexanoïque	<i>CAL B</i>	DMSO / 2-méthylbutan-2-ol	55	>90	[36]

III.2 Comparaison entre la synthèse chimique et la synthèse enzymatique

Les deux voies de synthèse d'esters de sucre possèdent des avantages et des inconvénients. Le Tableau 3 récapitule les différents avantages et inconvénients des deux voies chimiques et biotechnologiques [37].

Tableau 3: comparaison entre la synthèse chimique et la synthèse enzymatique

Synthèse chimique	Synthèse enzymatique
Avantages : ✓ -Economique ✓ -Rapide ✓ -Bons rendements ✓ -Réalisable avec de nombreuses molécules	Avantages : ✓ -Sélectivité ✓ -Conditions de réaction douces ✓ -Label « naturel » ✓ -Purification aisée ✓ -Conditions « solvant free » possibles ✓ -Composition du produit définie
Inconvénients : ✓ Toxicité (solvant et catalyseur) ✓ Faible sélectivité ✓ Température élevée (caramélisation, formation d'artéfacts, cyclisation...) ✓ Composition du produit non définie	Inconvénients : ✓ Coûteuse au niveau industriel ✓ Problèmes de solubilité des substrats ✓ Rendements fort variables. ✓ Temps de réaction longs (≥ 24 h)

Il est à signaler que malgré ses désavantages, la voie de synthèse chimique reste actuellement la seule envisagée industriellement. Les coûts de production de molécules comme les esters de sucres par une voie enzymatique restent élevés et limitent les applications envisageables à des domaines où la valeur ajoutée de la formulation est élevée comme dans les domaines des cosmétiques et particulièrement des produits pharmaceutiques.

C. Conclusion

Les tensioactifs sont des composés à caractère amphiphile. Selon la nature de leur tête polaire ils sont classés en quatre types : cationiques, anioniques, zwitterioniques et non ioniques. Par ailleurs, les esters de sucre d'acides gras sont des tensioactifs non ioniques issus de ressources renouvelables, de plus ils sont biodégradables, non toxiques, non irritants et présentent une vaste gamme de structures avec de larges applications dans les industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et détergente. Leur synthèse par voie enzymatique présente plusieurs avantages par rapport à la voie chimique classique.

Chapitre II: Essais de biocatalyse d'un tensio-actif non ionique

I. Introduction

Les esters de sucres et d'acide gras 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. Leur synthèse se fait par voie chimique ou enzymatique, cependant malgré ses désavantages, la voie de synthèse chimique reste actuellement la seule envisagée industriellement à cause du coût élevé des lipases commerciales principalement d'origine microbienne.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un ester de sucre, le stéarate de glucose, en estérifiant le glucose par l'acide stéarique en présence d'extrait brut de lipase issue de la biomasse d'origine végétale comme alternative aux enzymes d'origine microbiennes onéreuses. Avant d'accéder à nos résultats, nous allons présenter un bref aperçu sur les lipases et spécifiquement les lipases d'origine végétale.

II. Généralités sur les lipases

Encore appelées triacylglycérols acyl hydrolases (EC.3.1.1.3), les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol (Schéma 2). L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques insolubles dans l'eau se produit à l'interface entre lipide et eau. Ces enzymes, présentes chez tous les organismes vivants, jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides.

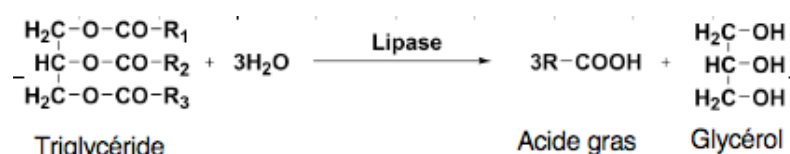


Schéma 2: réaction d'hydrolyse de triglycéride catalysée par une lipase en milieu aqueux

Les lipases ont également la capacité de catalyser des réactions de synthèse telles que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que les réactions de transfert du groupement acétyl d'un ester sur d'autres nucléophiles tels que des amines ou des thiols. [38]

III.1. Origines des Lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve dans le règne végétal, dans le règne animal et également chez de nombreux micro-organismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires. [39]

III.1.1. Lipases de mammifères

Les lipides constituent pour les mammifères une source énergétique essentielle et avantageuse de par leur faible densité. 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 produisant le lait maternel.

III.1.2. 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 de 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*.

III.1.3. Lipases végétales

Les lipases végétales se trouvent dans les différentes parties de la plante telles que les feuilles, les tiges, les huiles, 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.

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante et on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou *oil bodies*). 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.

Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes :

- Le premier groupe est constitué par les triacylglycérol hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de l'altération des graines pendant le stockage.
- Les constituants du second groupe, dénommés acylhydrolases, sont présents dans divers tissus de la plante. Ces enzymes présentent peu de spécificité pour leur substrat; elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides mais elles peuvent catalyser certaines réactions de transestérification (Hills et al. 1990). Les principales acylhydrolases sont les phospholipases A et B ; les glycolipases, les sulfolipases et les monoglycérides lipases.
- Le troisième groupe est constitué par les phospholipases C et D [39].

La polyvalence des lipases végétales pour catalyser différentes sortes de réactions associées à leurs différentes spécificités, confèrent à ces enzymes un potentiel d'application important et vaste. Dans ce contexte, nous prenons les deux exemples suivants :

R. Tambun et *coll.* ont étudiés l'hydrolyse des triglycérides directement à partir des graines d'avocat en activant l'enzyme lipase présente dans les graines pour produire des acides gras et du glycérol. Cette recherche est effectuée en ajoutant de l'eau à la poudre de graines, puis le mélange est agité à 35°C pendant 12 h pour obtenir une teneur en acides gras de 67% [40].

F. SFHA et *coll.* ont réalisé l'estérification enzymatique du glucose avec l'acide palmitique dans le *tert*-butanol en présence d'une lipase immobilisée des graines de ricin à 40°C pour obtenir le palmitate de glucose avec 65% de conversion [41].

III. Résultats et Discussions

Ce travail est réalisé au niveau du laboratoire de chimie à l'université Chadli-Bendjedid El Tarf. Il a pour objectif de tester l'activité catalytique d'extraits végétaux issus de graines oléagineuses dans la synthèse d'un ester de sucre et d'acide gras, le stéarate de glucose. D'après la littérature, l'estérification du glucose et d'acide gras se fait préférentiellement en position 6 du sucre (Schéma 3).

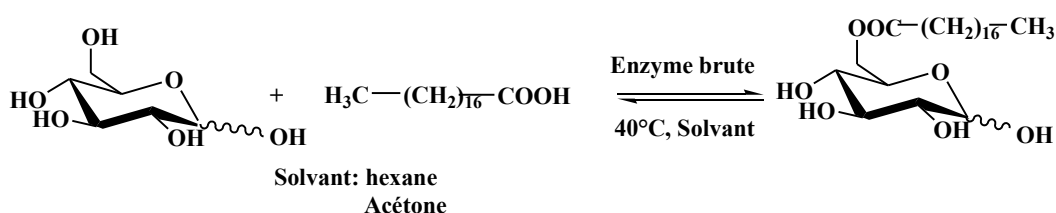


Schéma 3: estérification enzymatique du *D*-glucose avec l'acide stéarique

Il est à signaler que le stéarate de glucose est un bio-tensioactif non ionique, il est utilisé comme agent émulsifiant alimentaire et cosmétique. De plus il possède une activité antibactérienne élevée contre *E. coli* estimée à 50 % d'inhibition [8].

Quatre types de graines sont sélectionnés pour cette étude à savoir, les graines de maïs, les graines de lin, les graines de lupin et les graines de moutarde blanche, comme source de lipase. Ces graines sont présentées dans la Figure 10 suivante :



Figure 10: les graines sélectionnées pour l'étude

(a) : graines de maïs ; (b) : graines de lin ; (c) : graines de lupin doux ; (d) : graines de moutarde blanche

III.1. Préparation de l'extrait enzymatique

Les graines choisies sont utilisées à l'état germé car l'activité de la lipase est élevée pendant la germination. En effet, les graines sont généralement riches en triacylglycérols, qui servent de source d'énergie pour les nouvelles plantes émergentes. Lors de la germination de la graine, les triacylglycérols en réserve sont hydrolysés par les lipases pour libérer les acides gras dont l'oxydation fournit de l'énergie. [42]

La préparation de l'extrait lipasique se fait selon les étapes les étapes suivantes :

- Trempage dans l'eau
- Germination
- Séchage et broyage
- Délipidation

a- Trempage des graines dans l'eau

Afin de faciliter la germination, les graines sont mises à tremper dans l'eau pendant 12 heures à température ambiante (Figure 11).



Figure 11: trempage des graines dans l'eau

(a) : graines de lin ; (b) : graines de lupin ; (c) : graines de maïs ; (d) : graines de moutarde blanche

b- Germination des graines

Après 12 h de trempage dans l'eau, les graines sont récupérées et sont mises à germer à température ambiante sur un plateau recouvert de papier absorbant imbibé d'eau (voir partie expérimentale). La germination des graines est aboutie après un temps variant entre 40 et 56 heures selon la variété (Figure 12).

**Figure 12:** graines germées

(a) : graines de lin ; (b) : graines de lupin ; (c) : graines de maïs ; (d) : graines de moutarde blanche

Il est à rappeler que La germination est la phase de développement d'un embryon présent dans une **graine**. Pour borner temporellement la elle débute au moment où la graine est mise en contact avec de l'eau et se termine quand la radicule perce le cuticule. Le Tableau 4 indique le temps de germination pour chaque variété. Les graines de moutarde ont germé en premier (40 h) ensuite les graines de lin (48 h).

Tableau 4: durée de germination des graines étudiées

graines	Maïs	Lupin	Lin	Moutarde
Durée de germination (h)	56	50	48	40

c- Séchage et broyage des graines germées

Le séchage assure le bon stockage et un bon milieu non aqueux favorisant l'estérification au lieu de l'hydrolyse.

Afin d'éviter la dénaturation des lipases par les hautes températures du four, les graines germées sont séchées à l'air libre pendant 48 heures à température ambiante, le séchage des quatre variétés de graines s'est donc bien déroulé. Des pesées à des intervalles de temps sont faites pour vérifier et contrôler le séchage. Le Tableau 5 suivant montre le changement des masses au cours du séchage :

Tableau 5: suivi des masses des graines germées lors du séchage des graines à l'air libre

graines	Avant germination	Après germination	Après 24 h	Après 48 h
Maïs	50g	75g	70g	57.2g
Lupin	50g	120g	115g	97g
Moutarde	50g	90g	85g	80.8g
Lin	50g	105g	103g	76.7g

Les graines sont ensuite séchées dans l'étuve à 40°C pendant 22 heures avec un suivi de changement de la masse comme indiqué dans le (Tableau 6) :

Tableau 6: suivi des masses des graines lors du séchage dans l'étuve

Graines	2h	22h
Maïs	55.9g	52.8g
Lupin	94.4g	76.6g
Moutarde	78.6g	69.6g
Lin	73.9g	63.8g

Par manque de temps à cause de la situation sanitaire (confinement à cause du Covid-19), nous nous sommes limités à tester l'activité des lipases issues de deux variétés de graines seulement. Les deux graines les mieux germées et les mieux séchées (les graines de maïs et les graines de lin) sont choisies.

Les deux variétés de graines sélectionnées sont broyées à l'aide d'un moulin à café puis placées dans l'étuve une deuxième fois pendant 2 heures pour éliminer les traces d'eau. Les poudres ainsi obtenues sont ensuite stockées au frais dans des boîtes pétries.

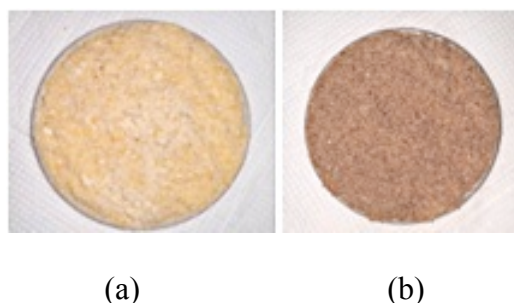


Figure 13: poudre des extraits des graines de lin et de maïs

(a): poudre des graines de maïs, (b) : poudre des graines de lin

d- Délipidation

La délipidation constitue une des étapes clé dans le processus de préparation des extraits végétaux. Cette étape importante permet l'élimination des lipides et les acides gras présents dans les extraits végétaux bruts à l'aide d'un solvant organique, car ces lipides peuvent réagissent avec notre substrat (le sucre). Les solvants les plus efficaces pour la délipidation d'extraits végétaux sont l'éther diéthylique, l'acétone et le n-hexane. [43]

20 g de poudre des graines de maïs et des graines de lin sont délipidées de deux manières différentes et en présence d'un des deux solvants, l'acétone pour les graines de maïs et l'hexane pour les graines de lin (voir partie expérimentale).

Les deux schémas (Figure 14 et Figure 15) suivants résument l'opération de préparation des extraits lipasiques bruts à partir des graines de lin et des graines de maïs du trempage jusqu'à l'obtention des poudres des extraits lipasiques bruts.

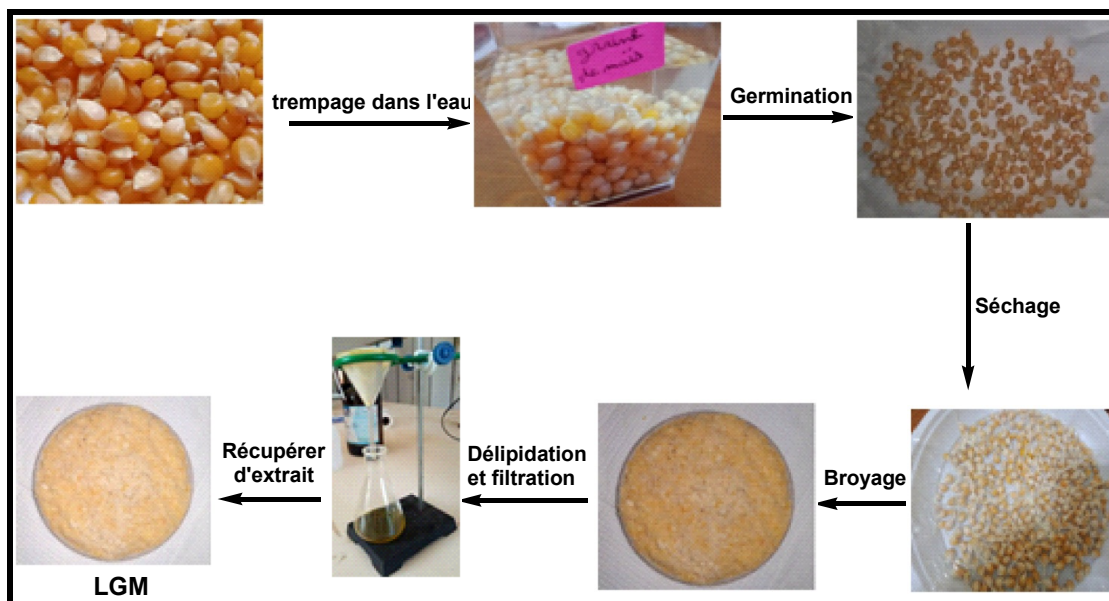


Figure 14: schéma résumant la préparation de l'extrait lipasique des graines de maïs (LGM)

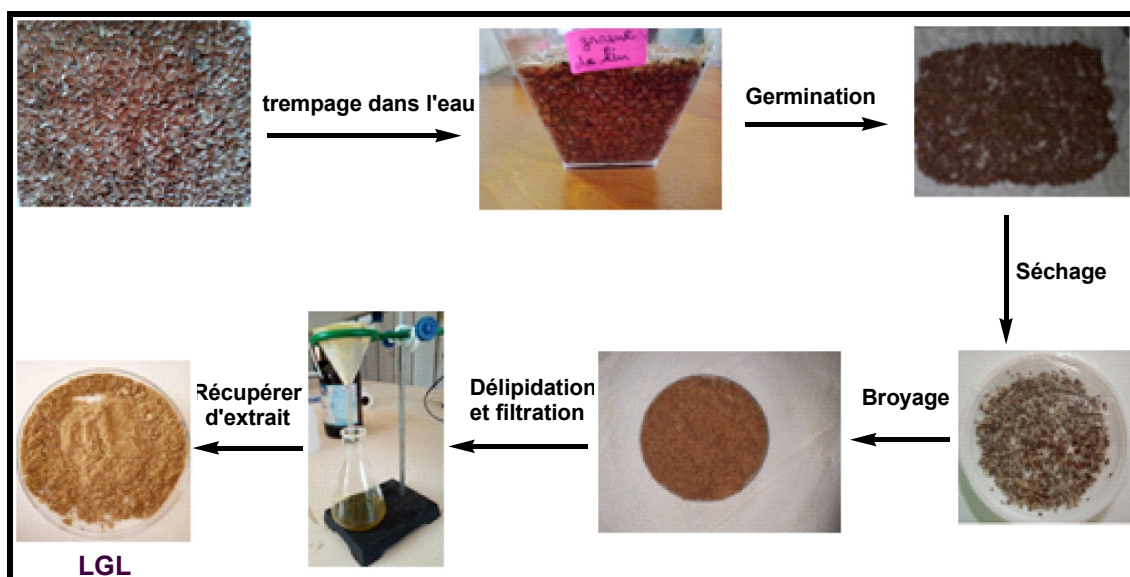


Figure 15: schéma résumant la préparation de l'extrait lipasique des graines de lin (LGL)

Les deux extraits de lipase bruts obtenus sont utilisés comme biocatalyseur dans la synthèse du stéarate de glucose.

III.3. Estérification en présence de LGM (lipase de graine de maïs)

La réaction d'estérification du *D*-glucose avec l'acide stéarique est réalisée en présence de l'extrait brut de la lipase des graines de maïs LGM comme biocatalyseur dans l'acétone sous agitation magnétique à 40°C (Schéma 4). Un suivi cinétique des réactions cibles est effectué par dosage acido-basique (voir partie expérimentale) et une analyse par CCM est également réalisée.

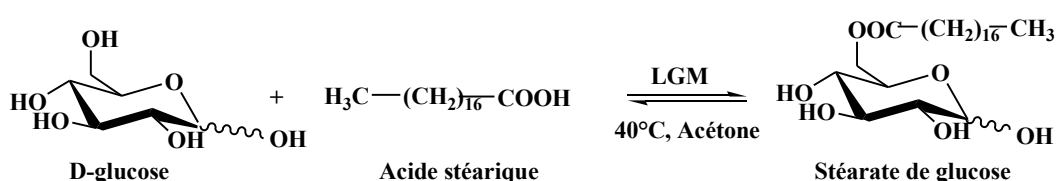


Schéma 4: estérification du *D*-glucose par l'acide stéarique en présence de LGM

Conditions réactionnelles : 2mmol de *D*-glucose, 1eq d'acide stéarique, 1g de LGM, dans 30 ml d'acétone à 40°C.

Cette estérification enzymatique est une réaction réversible qui se produit entre un acide gras et un alcool en présence d'une enzyme brute pour donner un ester et de l'eau. Pour favoriser la formation de l'ester il faut éliminer l'eau produite au cours de la réaction. En générale, un agent adsorbant est ajouté au milieu réactionnel pour éliminer cette eau. Dans nos essais, la réaction est menée sans tamis moléculaire afin de tester le pouvoir adsorbant de la poudre LGM et celui de la LGL pour le prochain essai.

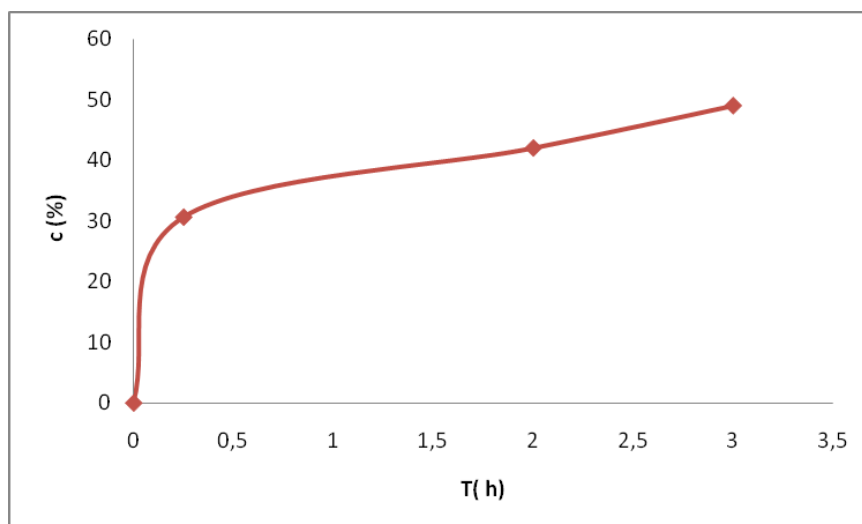
Il est à noter qu'une réaction à blanc (sans biocatalyseur) est réalisée, cependant aucune conversion n'a été observée.

Au cours de la réaction des échantillons du mélange réactionnel ont été prélevés à des intervalles réguliers, afin d'évaluer la conversion (C). Ces échantillons sont dosés par une solution basique pour déterminer la quantité d'acide stéarique qui n'a pas réagit, et les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau 7 suivant :

Tableau 7 : résultats de la conversion du D-glucose en présence de l'extrait brut de LGM

Temps (min)	0	16	60	90
Conversion C (%)	0	30.61	42	48.97

Le graphe ci-dessous illustre mieux le suivi cinétique de la conversion de la réaction d'estérification obtenue en présence de LGM (Figure 16).

**Figure 16:** suivi cinétique de la conversion du *D*-glucose dans le cas de l'extrait brut de LGM

Conditions réactionnelles : 2 mmol de *D*-glucose, 1eq. d'acide stéarique, 1g de LGM, 30 ml d'acétone à 40°C.

Il ressort de l'analyse du graphe de la Figure 16 que la réaction démarre avec une bonne vitesse initiale de 30 % de conversion, puis la vitesse de la réaction continue à croître pour atteindre une conversion maximale de 49 % après seulement 3h de réaction.

L'analyse qualitative du mélange réactionnel par CCM révèle la formation d'un nouveau produit de $R_f = 0,75$ attribué à l'ester attendu. La tâche avec un $R_f = 0.45$ correspond à l'acide stéarique alors que le glucose reste sur la ligne de dépôt car il est le plus polaire.

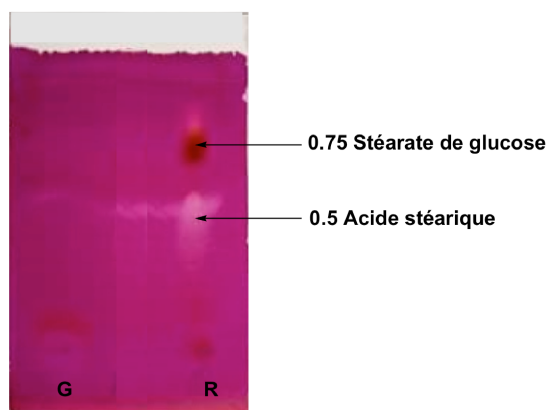


Figure 17: analyse CCM de la réaction d'estérification catalysée par la LGM

G : glucose, R : Mélange réactionnel.

Eluant : Hexane/DDE/acide acétique (7/3/0.1). **Révélateur** : solution de KMnO_4 (50mL de solution KMnO_4 à 2%+ 50 ml de solution Na_2CO_3 à 4%)

Le résultat obtenu est satisfaisant pour un premier essai, car l'extrait brut de LGM se révèle capable de catalyser l'estérification enzymatique du glucose dans les conditions utilisées. L'optimisation des conditions réactionnelles pourrait améliorer l'activité de LGM.

Par ailleurs, il a signaler les difficultés rencontrées lors des pesées des échantillons prélevés, et ce à cause de la volatilité de l'acétone, c'est pourquoi ce solvant de la réaction est remplacé par l'hexane dans le prochain essai de synthèse catalysée avec l'extrait de LGL.

III.4. Estérification en présence de LGL (lipase de graine de lin) :

La réaction d'estérification du *D*-glucose par l'acide stéarique en présence de l'extrait brut de LGL est réalisée dans l'hexane comme solvant sous agitation magnétique à 40°C (Schéma 5). La réaction est suivie par dosage volumétrique (voir partie expérimentale) et une analyse CCM est effectuée systématiquement pour confirmer la formation du produit attendu, le stéarate de glucose.

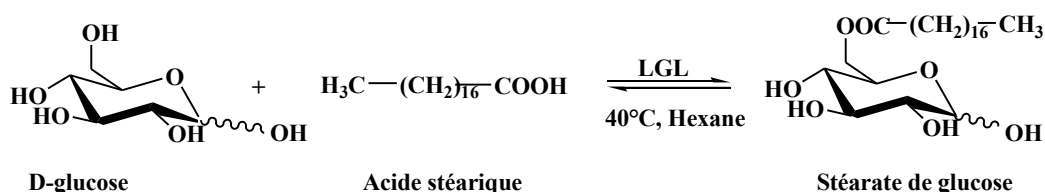


Schéma 5: estérification du *D*-glucose avec acide stéarique en présence de LGL

Conditions réactionnelles : 2mmol de *D*-glucose, 1eq. d'acide stéarique, 1g de LGL, 20 ml d'hexane à 40°C

Comme pour la réaction faite avec l'extrait brut de LGM, les conversions sont calculées après dosage acido-basique de l'acide stéarique qui n'a pas réagit contenu dans le mélange réactionnel. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 8 suivant :

Tableau 8: résultats de la conversion du *D*-glucose en présence de LGL

Temps	0	16 min	1 h	3 h
Conversion C (%)	0	4.08	8.16	12.24

La représentation graphique suivante (Figure 18), affiche mieux les résultats obtenus en présence de l'extrait brut de LGL :

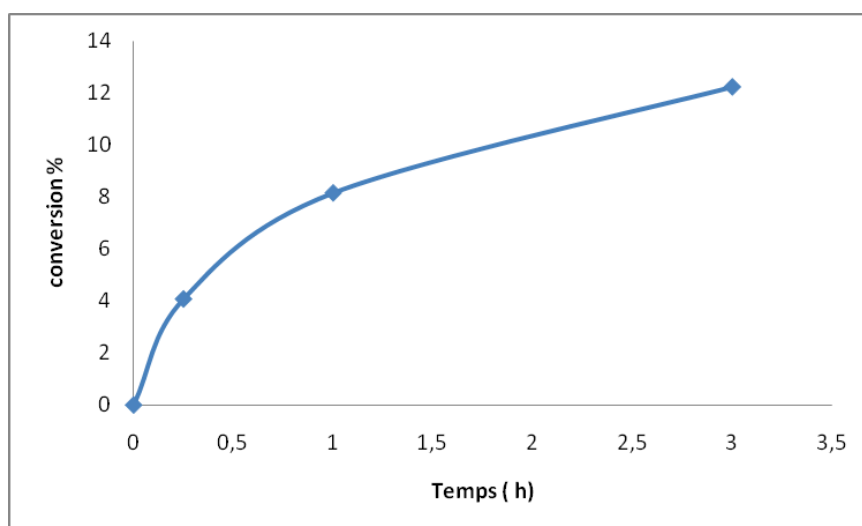


Figure 18: suivi cinétique de la conversion du *D*-glucose dans le cas de LGL

Conditions réactionnelles : 2mmol *D*-glucose, 1eq d'acide stéarique, 1g de LGL, 20 ml d'hexane à 40°C

D'après l'analyse de la Figure 18, une conversion modeste ($C=12.24\%$) est obtenue après 3 h de réaction. L'extrait brut de LGL possède une modeste activité lipasique pour la réaction d'estérification du *D*-glucose par l'acide stéarique dans les conditions utilisées.

L'analyse des plaques CCM réalisées pour suivre l'avancement des réactions de synthèse du stéarate de glucose révèle la formation d'un ester de sucre avec un R_f de 0.75.

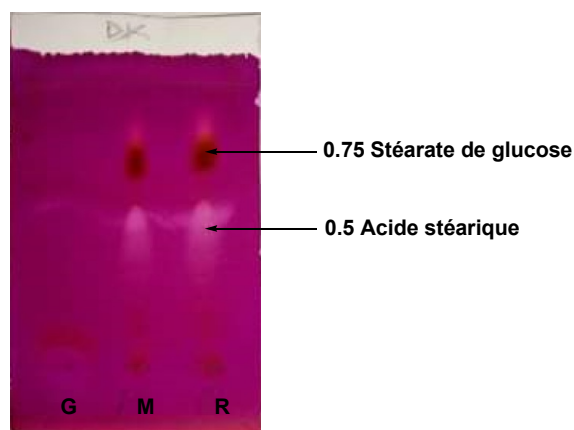


Figure 19: analyse CCM de la réaction d'estérification catalysée par la LGL

G : glucose ; R : Mélange réactionnel ; M= G + R

Eluant : Hexane/DDE/acide acétique (7/3/0.1). **Révéléateur** : solution de KMnO_4 (50mL de solution KMnO_4 à 2%+ 50 ml de solution Na_2CO_3 à 4%)

Il est à noter que l'obtention du stéarate de glucose peut être vérifiée par analyse infra-rouge (IR). En effet, l'apparition de la bande à 1703 cm^{-1} caractéristique de la liaison $\text{C}=\text{O}$ indique la formation de l'ester [8].

Comme pour les lipases microbiennes ou d'origine animale, la température, le temps réactionnel, la présence d'eau, le solvant, la quantité d'enzyme ainsi que, le type et la concentration de l'agent acylant sont des facteurs qui affectent les mécanismes mis en jeux et donc les performances des procédés d'estérification enzymatique.

Pour ce premier essai de catalyse par la LGL, le résultat obtenu est satisfaisant, car cet extrait brut d'origine végétal possède une activité lipasique pour catalyser la réaction d'estérification cible, il suffit de trouver les bonnes conditions opératoires. A cet effet, il faut, dans un premier temps, augmenter le temps réactionnel, puis chercher les autres conditions réactionnelles optimales dans un deuxième temps.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en œuvre la synthèse du stéarate de glucose par estérification catalysée par des extraits de lipases brutes d'origine végétale issues des graines de maïs et des graines de lin. Deux solvants, l'hexane et l'acétone ont été utilisés, Les résultats obtenus sont :

- ❖ C = 48.97 % obtenue avec l'acétone après 3 h de réaction (dans le cas de la LGM).
- ❖ C = 12.24 % obtenue avec l'hexane après 3h de réaction (dans les cas de la LDL).

Conclusion générale

Ce projet a été réalisé dans le but d'identifier une ou plusieurs biomasses végétales locales sources de lipases et leur mise en œuvre comme biocatalyseurs pour la production d'ester de sucre. A cet effet, quatre types de graines oléagineuses issues de la biomasse (maïs, lin, lupin et moutarde blanche) ont été germées et séchées. Faute de temps (confinement à cause de la pandémie du Covid 19), seulement les graines de maïs et de lin ont été broyées puis délipidées pour tester la capacité des extraits végétaux bruts obtenus à catalyser l'estérification du *D*-glucose par l'acide stéarique pour produire le stéarate de glucose à potentialité tensioactive et surtout respectueux de l'environnement.

Le suivi cinétique de la réaction cible par dosage volumétrique a permis de déterminer les conversions obtenues pour les deux extraits bruts de lipases. En effet, l'extrait brut de LGM a montré une activité lipasique appréciable avec 49 % de conversion au bout de seulement 3 h de réaction dans l'acétone à 40°C. Tandis qu'une conversion très modérée (12%) est obtenue avec l'extrait brut de LGL dans l'hexane à 40°C.

Les résultats de cette étude permettent de conclure que les extraits bruts LGM et LGL renferment une ou plusieurs lipases dont l'activité catalytique peut être exploitée sans purification préalable dans les réactions d'estérifications des sucres. Néanmoins des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les conditions réactionnelles optimales de cette synthèse à commencer par augmenter le temps réactionnel.

La biomasse végétale représente une source de biocatalyseurs peu chère, très abondante et facilement exploitable et peut par conséquent substituer les biocatalyseurs d'origine microbienne ou animale très onéreux.

Dans les perspectives de développement ultérieur, nous envisageons de:

- Optimiser les conversions de cette réaction en étudiant l'effet des différents facteurs réactionnels, à savoir le temps, la température, le solvant, la quantité de solvant, la

quantité d'extrait brut de lipase d'origine végétale et le rapport molaire sucre/agent acylant.

- Identifier de nouvelles lipases d'origine végétale à partir d'autres graines oléagineuses issues de la biomasse locale capables de catalyser des réactions d'estérification ou d'hydrolyse.

Partie expérimentale

I. Biomasse végétale et produits chimiques

I.1. Biomasse végétale

Les graines oléagineuses étudiées sont achetées du commerce local : les graines de maïs, les graines de lin, les graines de lupin doux et les graines de moutarde blanche (Figure 20)

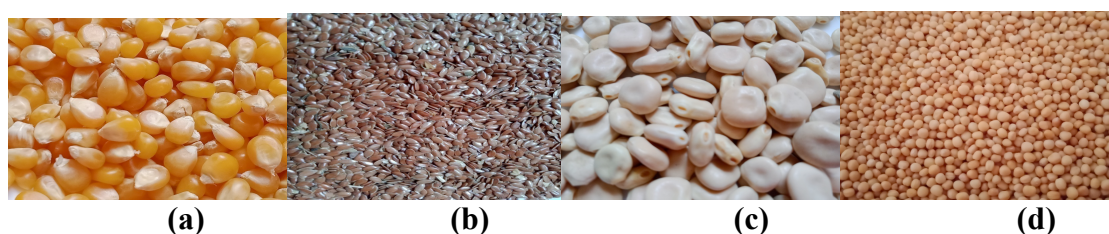


Figure 20: les graines oléagineuses étudiées[originale]

(a) : graines de maïs ; (b) : graines de lin ; (c) : graines de lupin doux ; (d) : graines de moutarde blanche

I.2. Produits chimiques :

Les solvants employés pour les extractions et la chromatographie possèdent un degré de pureté « analytique » et sont utilisés sans purification préalable. Les produits commerciaux (réactifs, solvants) employés lors de la synthèse organique proviennent essentiellement des sociétés Sigma-Aldrich, Fluka et Acros.

- ❖ Réactifs : le D-glucose et l'acide stéarique.
- ❖ Solvants: Hexane, DEE, MeOH, acétone, EtOH.
- ❖ Autres : Phénolphtaléine, NaOH, Na_2CO_3 , KMnO_4 , H_2SO_4 , acide acétique.

II. Matériels

II.1. La chromatographie sur couche mince (CCM)

L'évolution des réactions et la formation des produits sont suivies par chromatographie sur couche mince analytique (CCM), sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice (Merck 60 F254).

II.2. Agitateur magnétique

Pour réaliser la synthèse enzymatique d'ester de sucre, nous avons utilisé une plaque chauffante munie d'agitateur magnétique de type VELP SCIENTIFICA (Figure 21). Un barreau magnétique est joint au système réactionnel.



Figure 21: agitateur magnétique et barreaux magnétiques

II.3. Balance analytique

Toutes les pesées ont été réalisées sur une balance analytique de type OHAUS d'une précision de 0.0001 g (Figure 22).



Figure 22: balance analytique

II.4. Etuve

Pour le séchage des graines germées et poudres des extraits bruts issus des graines, une étuve de type Memmert a été utilisée (Figure 23).



Figure 23: étuve utilisée

II.5. Dessiccateur

Pour la protection des poudre des gaines contre l'humidité, un dessiccateur contenant du selica gel a été utilisé (Figure 24).



Figure 24: dessiccateur utilisé

III. Méthodes

III.1 Préparation des extraits végétaux

a- Germination

Cinquante grammes (50g) de chaque variété des graines sont mises à tremper dans l'eau pour une période de 12 heures.



Figure 25: trempage des graines dans l'eau

(a) : graines de lin ; (b) : graines de lupin ; (c) : graines de maïs ; (d) : graines de moutarde blanche

Les graines sont mises après à germer sur un plateau recouvert de papier absorbant imbibé d'eau pour faciliter la germination. Les graines sont étendues uniformément et recouvertes avec un autre papier absorbant. Les graines sont maintenues humides par pulvérisation d'eau quotidiennement. La germination est réalisée à une température ambiante pendant une période allant de 40 h à 56 h.

b- Séchage et broyage de la biomasse végétale étudiée

Les graines sont séchées dans des assiettes et recouvertes avec un papier film perforé pour permettre à l'air d'entrer, et faciliter le séchage, et laisser à l'air libre 48 h avec le suivie de changement des masses. Les graines sont, par la suite, placées dans l'étuve à 40 °C pendant 22 heures avec le contrôle de la masse des échantillons (Figure 26).

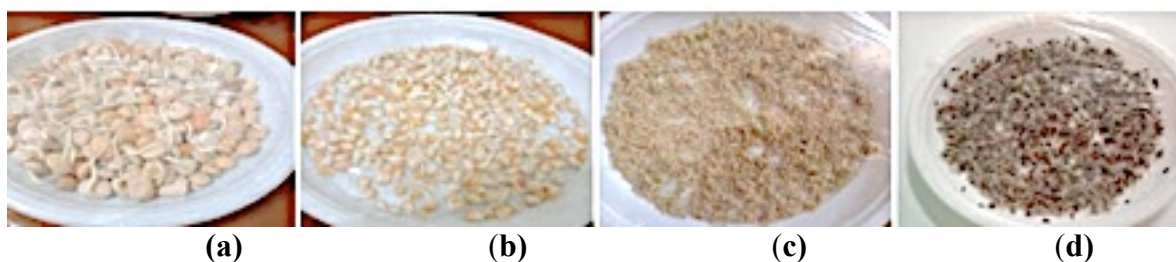


Figure 26: séchage des graines germées à l'air libre

(a) : graines de lupin doux ; (b) : graines de maïs ; (c) : graines de moutarde blanche ; (d) : graines de lin

Après le séchage les graines sont broyées à l'aide d'un moulin à café, et sont placées une autre fois dans l'étuve pendant 2 heures. Les poudres obtenues sont ensuite stockées dans des boîtes pétries.

c- Délipidation

La délipidation est faite de deux manières différentes pour les graines de lin et les graines de maïs.

- 20 g de poudre des graines de maïs sont broyées dans un mortier avec 25 ml d'acétone, le mélange est filtré à travers un papier filtre de 150 μm de diamètre puis lavé quatre fois avec 10 ml d'acétone jusqu'à ce que l'acétone devienne claire (Figure 27). Les poudres récupérées ont été séchées à température ambiante.

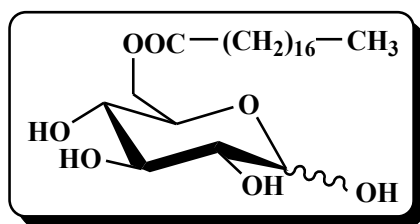


Figure 27: filtration des graines délipidées

- 20 g de poudre des graines de lin sont mis dans 50 ml d'hexane pendant 2 heures, le mélange est filtré à travers un papier filtre de 100 μm de diamètre et lavé deux fois avec 20 ml d'hexane jusqu'à ce que l'hexane devienne clair (Figure 27). Les poudres récupérées ont été séchées à température ambiante.

III.2. Procédure d'estérification du D-glucose

Dans un ballon 02 mmol (0.568g) d'acide gras (acide stéarique) et 02 mmol (0.360g) de D-glucose sont dissouts dans un volume (20 mL à 30mL) de solvant à 40°C. Le mélange est mis sous agitation magnétique pendant 02 heures. Après, on ajoute 1g d'enzyme brute (Figure 29). Des échantillons sont régulièrement prélevés dans le milieu réactionnel, afin d'évaluer la conversion par dosage. La réaction est stoppée une fois elle n'avance plus. Le produit majoritaire obtenu est le stéarate de glucose.



Formule brute: $C_{24}H_{46}O_7$

$M = 446 \text{ g/mol}$

$R_f[\text{Hexane/DEE/acideacétique}(7/3/0.1)] = 75$

Figure 28: structure chimique du stéarate de glucose

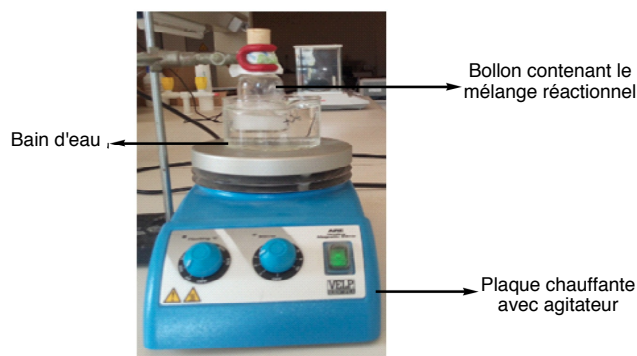


Figure 29: montage expérimental de l'estérification enzymatique

III.3. Mesure de la conversion (C %)

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

0.1 g de mélange réactionnel est dilué dans 10 ml d'une solution de phénophtaléine dans l'éthanol 0.1M. Une solution de NaOH est ensuite ajoutée goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistante (Figure 30).

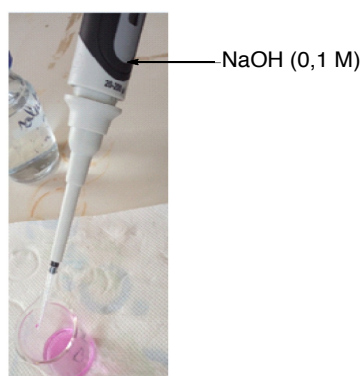


Figure 30: dosage du mélange réactionnel par une solution de NaOH (0,1 M)

La conversion est calculée par l'expression suivante:

$$C (\%) = \frac{V_{\text{NaOH(avant ajout de l'enzyme)}} - V_{\text{NaOH(après un temps t de réaction)}}}{V_{\text{NaOH(avant l'ajout de l'enzyme)}}}$$

III.4. La chromatographie sur couche mince (CCM)

L'évolution des réactions et la formation des produits sont suivies par chromatographie sur couche mince analytique (CCM), sur des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice).

L'élution est réalisée dans le mélange hexane /DEE/acide acétique (7/3/0.1). Les plaques ont été révélées au moyen de l'un des deux révélateurs suivants:

- Solution d'acide sulfurique 30%, puis chauffage. Solution KMnO_4 (50mL de solution KMnO_4 à 2%+ 50mL de solution Na_2CO_3 à 4%) puis chauffage.
- Le rapport frontal (R_f), qui représente le rapport de la distance parcourue par le produit (h) à la distance parcourue par le solvant (H), est spécifique à chaque substance.

$$R_f = h/H$$

Références bibliographiques

- [1]- *Acmite Market Intelligence*, Global Surfactant Market. **2016**, (Vol. I ,4th ed.). Ratingen, Germany.
- [2]- S. Le Guenic, L. Chaveriat, V. Lequart, N. Joly, P. Martin, J, *Surfact. Deterg.* **2019**, 22, 5–21.
- [3]- I. J. A. Baker, B. Matthews, H. Soares, I. Krodkiewska, D. N. Furlong, f. Grieser, C. J. Drummond, *Surf. J. Deterg.* **2000**, 3, 1-11
- [4]- F. Silvestre, J. M. Aubry, T. Benvegnu, J. Brendle, M. Durand, A. Lavergne, C. Len, V. Molinier, Z. Mouloungui, D. Plusquellec, Y. Zhu, *Actual. Chim.* **2010**, 28–40.
- [5]- K. F. Danyelle. Santos, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Valdemir A. Santos, Leonie A. Sarubbo, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 401.
- [6]- N. S. Neta, J. A. Teixeira, L. R. Rodrigues, *Food. Sci. Nutr.* **2015**, 55, 595–610.
- [7]- N. R. Khan, V. K. Rathod, *Process Biochem.* **2015**, 50, 1793–1806.
- [8]- A. M. Sebatini, M. Jain., P. Radha, S. Kiruthika, K. Tamilarasan., 3 *Biotech*, **2016**, 6, 184.
- [9]- N. Noiret, T. Benvegnu, D. Plusquellec , *L'Actualité Chimique.* **2002**, 70, 70-75.
- [10]-<http://ecosymaison.over-blog.com/comprendre-les-savons-et-tensioactifs-pourquoi-et-comment-les-utiliser>, consulté le 12/04/2020.
- [11]- C. Larpent, in *Techniques de l'ingénieur.* **1993**, K 342, 1-15.
- [12]- R. Cariline, *Thèse de Doctorat*, Université de Toulouse. **2009**.
- [13]- K. Holmberg, *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* **2001**, 6, 148-159
- [14]-C. Bonnevie C, Chambéry, *Thèse de Doctorat*, Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Chambéry, Université de Savoie. **1998**.
- [15]- S. Djedri-Bani, *Thèse de Doctorat*, Université de Blida. **2015**
- [16]- C. Ludont, *Thèse de Doctorat*, Université de Reims Champagne-Ardenne.**2013**.
- [17]- N. A. Lindemberg de Jesus, *Thèse de Doctorat*, Génie des procédés, Institut National Polytechnique de Toulouse, France **2005**.
- [18]-<https://sites.google.com/site/lestensioactifsவில்lets/fonctions/agents-mouillants>, consulté le 05/10/2020.

- [19]- M. J. Rosen., *Surfactants and interface phenomena*, Wiley J and Sons. **1978**.
- [20]- J. Port, *Les dispersions aqueuse, suspension, émulsion mousse*, Paris. **1975**.
- [21] – O. J. Rojas, C. Stubenrauch, L. A. Lucia, Y. Habibi, D. Kitamoto, D. Solaiman , D. R. AOCS Press Urbana. **2009**, 457-480.
- [22]- T. K. Mounanga, *Thèse de Doctorat* , Université d’Henri Poincaré, Nancy. **2008**.
- [23]- S. Piccicuto, C. Blecker, J. C. Brohée, A. Mbampara, G. Lognay , C. Deroanne, M. Paquot, M. Marlier, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2001**, **5**, 209–219.
- [24]- F. Juliette, Y. Queneau, J. P. Maitre, A. Bouchu, *Tetrahedron lett.*, **2016**, 48, 4111-4114.
- [25]- B. Pérez, S. Anankanbil, Z. Guo, Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters and Their Industrial Utilizations, in *Fatty Acids Chemistry, Synthesis, and Applications*, **2017**, Pages 329-354.
- [26]- S. Piccicuto, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2011**, 209–219.
- [27]- G. Fregapane, D. B. Sarney, S. G. Greenberg, D. J. Knight, *Journal of the American Oil Chemists' Society*.**1994**, 1, 87-91.
- [28]- B. Galleymore, R. Harry, B. Kenneth, J. Reading, F. Haydn. *United State Patent*, **1981** 4, 298-730.
- [29]- F. Juliette, Y. Queneau, J. P. Maitre, A. Bouchu, *Tetrahedron lett.* **2007**, 48, 4111-4114.
- [30]- S. Ortial, G. Durand, B. Poeggeler, Polidori A., Papolla M. A., Böker J., Hardeland R., *Pucci. Med. B. J., Chem*, **2006**, 49, 2812.
- [31]- M. Ferrer, J. Soliveri, F. J. Plou, N. Lopez-Cortés, D. Reyes-Duarte, M. Christensen, J. L. Cope-Patiño, A. Balle-Steros, *Enzyme and Microbial Technology*. **2005**, 391-398.
- [32]- N. Neta, J. Santos, S. Sancho, S. Rodrigues, L. Gonçalves, L. Rodrigues, J. Teixeira, *Food Hydrocolloids*. **2012**, 273, 24-31.
- [33]- S. Tukel, P. B. Sahin, D. Yildirim, *Artificial cells, Nanomedicine, and biotechnology*. **2013**, 41, 344-351.
- [34]- N. Galonde, Y. Brostaux, G. Richarda,, K. Notta,, C. Jérôme, M. Fauconnier, *Process Biochemistry*. **2013**, 48, 1914–1920.
- [35]- A. Dong, Z. Xiaohui, Y. Zhiwen. *Carbohydrate Research*. **2015**, 414, 32-38.
- [36]- K. Ren, P. Buddhi, P. B. Lamsal, *Food chemistry*, **2017**, 214, 556-563.
- [37]- S. Piccicuto, C. Blecker, J. C. Brohee, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deroanne, M. Paquot, M. Marlier, *Biotech. Agron. Soc. Environ*, **2001**, 5, 209-219.
- [38]- W. Aimée, M. Alloue, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008** 12 (1), 57-68.
- [39]- P. Fickers, J. Destain, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008** 12(2), 119-130.

- [40]- R. Tambun R, J. A. Tambun, I. A. A. Tarigan, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. **2020**, 725, 012075.
- [41]- F. Sefha, M. Abouseoud, *Maroccan journal of chemistry*. **2016**, 4, 1084-1095.
- [42]- P. P. Gadge, S. D. Madhikar, J. N. Yewle, U. U. Jadhav, A. D. Chougale, V. P. Zambare, M. V. Padul, *American journal of biochemistry and biotechnology*. **2011**, 7, 141-145.
- [43]- Rédéo Wilfried Mounghen, *Thèse de Doctorat*, Institut international d'ingénierie, Burkina Faso. **2014**.