

## Chapitre 2. Matériels et méthodes

### 1. Réactifs et enzymes

#### 1.1. Lipases

Novozym® 435 (lipase de *Candida antarctica* B immobilisée sur des billes de résine acrylique macroporeuse,  $\geq 5000$  U/mg). Société Novo.

CRL (lipase de *Candida rugosa* type VII,  $\geq 700$  U/mg), ROL (lipase de *Rhizopus oryzae*,  $\geq 30$  U/mg), PCL (lipase de *Pseudomonas cepacia*,  $\geq 30$  U/mg) et PPL (lipase de pancréas du porc type II, 100-500 U/mg) provenant de Sigma.

Lipase AK (lipase de *Pseudomonas fluorescens*,  $\geq 20$  U/g), Lipase PS (lipase de *Burkholderia cepacia*,  $\geq 30$  U/g) et Lipase G (lipase de *Penicillium camemberti*,  $\geq 20$  U/g) issues Amano.

Lipozyme® IM (lipase de *Mucor miehei* immobilisée sur une résine macroporeuse échangeuse d'anions,  $\geq 30$  U/g) issue de Novo.

*U/g* : 1 unité correspond à la quantité d'enzyme qui permet la libération d'1  $\mu\text{mol}$  d'un acide gras par heure à pH 7,2 à 30 °C lors de l'hydrolyse d'un triglycéride (souvent l'hydrolyse de la trioléine en acide oléique).

#### 2.2. Réactifs et solvants

Alcools : (*R,S*)-1-phenylethanol (pureté  $>99\%$ ), (*R*)-1-phenylethanol, (*R,S*)-2-Pentanol ( $>99\%$ ), (*S*)-2-Pentanol, ( $\pm$ )-Menthol, ( $-$ )-Menthol; ( $\pm$ )-Sulcatol ( $>99\%$ ) et ( $-$ )-Sulcatol issus de Sigma Aldrich.

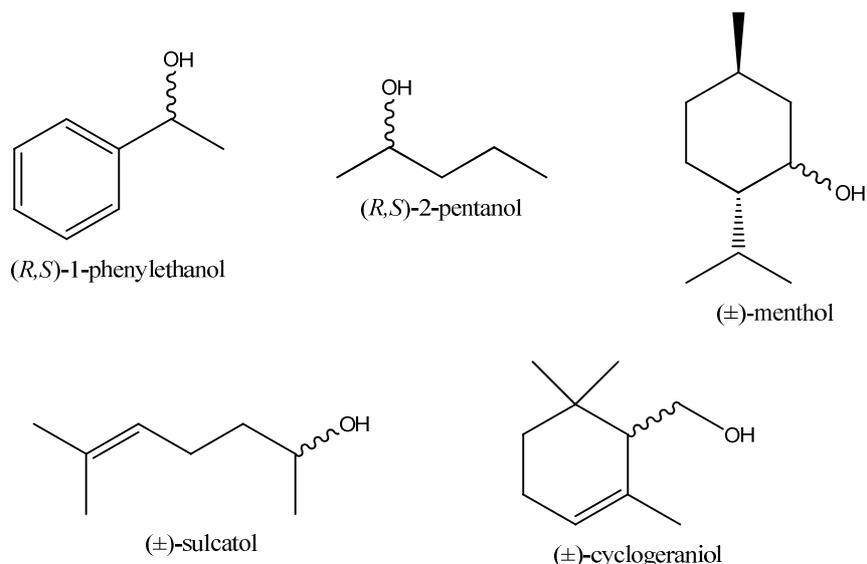
$\alpha$ -cyclogeraniol ((2,6,6-triméthylcyclohex-2-ényl) méthanol) racémique préparé par réduction avec  $\text{LiAlH}_4$  de  $\alpha$ -cyclogeraniate d'éthyle<sup>1</sup>.

Donneurs d'acyle : Acétate de vinyle ( $>99\%$ ), propionate de vinyle ( $>99\%$ ), Butyrate de vinyle ( $>99\%$ ), Laurate de vinyle ( $>98\%$ ), Acétate d'éthyle ( $>99\%$ ) et Butyrate de butyle ( $>99\%$ ) provenant de Sigma Aldrich.

Solvants : Cyclopentyl méthyle éther ( $>99\%$ ) and 2-méthyltetrahydrofurane (99%) issus de Alfa Aesar.

THF, éther diéthylique, dichlorométhane, chloroforme, toluène, hexane et tert-butyle méthyle éther provenant de Sigma Aldrich.

Liquides ioniques : 1-butyl-3-méthylimidazolium bis(trifluorométhylsulfonyle)imide ([BMIM] [TFSI],  $\geq 98\%$ ), 1-butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate ([BMIM] [BF<sub>4</sub>],  $\geq 98.5\%$ ) et 1-méthyl-3-octylimidazolium tétrafluoroborate ([OMIM][BF<sub>4</sub>],  $\geq 98\%$ ) issus de Sigma Aldrich.



**Figure 1.** Structures des alcools racémiques utilisés.

## 2. Matériels

### 2.1. Ultrasons

Deux systèmes d'ultrasons ont été utilisés dans cette étude :

- Bain à ultrasons : Branson 1510E-MTH (Branson Ultrasonics Corporation, États-Unis), équipé essentiellement d'un conteneur rectangulaire (14,0 cm x 15,0 cm x 10,0 cm). La puissance maximale de cet appareil est de 143 W et la fréquence de 40 kHz. La température de l'eau dans le bain a été contrôlée avec une précision de  $\pm 1$  °C.

- Sonde à ultrasons : Microson Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix XL2000), équipé d'un générateur (33,0 cm x 19,0 cm x 17,0 cm) et une sonde (17,0 cm x 3,0 cm). La puissance maximale générée par cet appareil est de 100 W avec une fréquence de 22,5 kHz.



**Figure 2.** Système à ultrasons utilisé, Branson 1510E-MTH et Misonix XL2000.

## 2.2. Chromatographie phase gazeuse (CPG)

Deux appareils de Chromatographie phase gazeuse (CPG) ont été utilisés dans cette étude :

- GC-17, SHIMADZU : équipé d'un détecteur d'ionisation de flamme d'hydrogène (FID) et d'une colonne capillaire chirale Beta-dex™ 325 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) pour l'analyse GC des alcools racémiques (*R,S*)-1-phényléthanol, (*R,S*)-2-pentanol et ( $\pm$ )-menthol.
- Agilent Technologies 6850 : équipé d'un détecteur d'ionisation de flamme d'hydrogène (FID) et d'une colonne capillaire chirale DMePentil-BETACDX (25 m x 0,25 mm x 0,15 µm) pour l'analyse GC du ( $\pm$ )-sulcatol et d'une colonne Beta-MEGA-DEX DAC (25m x 0.25mm x 0.25µm) pour l'analyse de ( $\pm$ )-menthol et ( $\pm$ )- $\alpha$ -cyclogeraniol.



**Figure 3.** CPG utilisée, GC-17 SHIMADZU et Agilent Technologies 6850.



### 3.2. Réactions dans les solvants « verts »

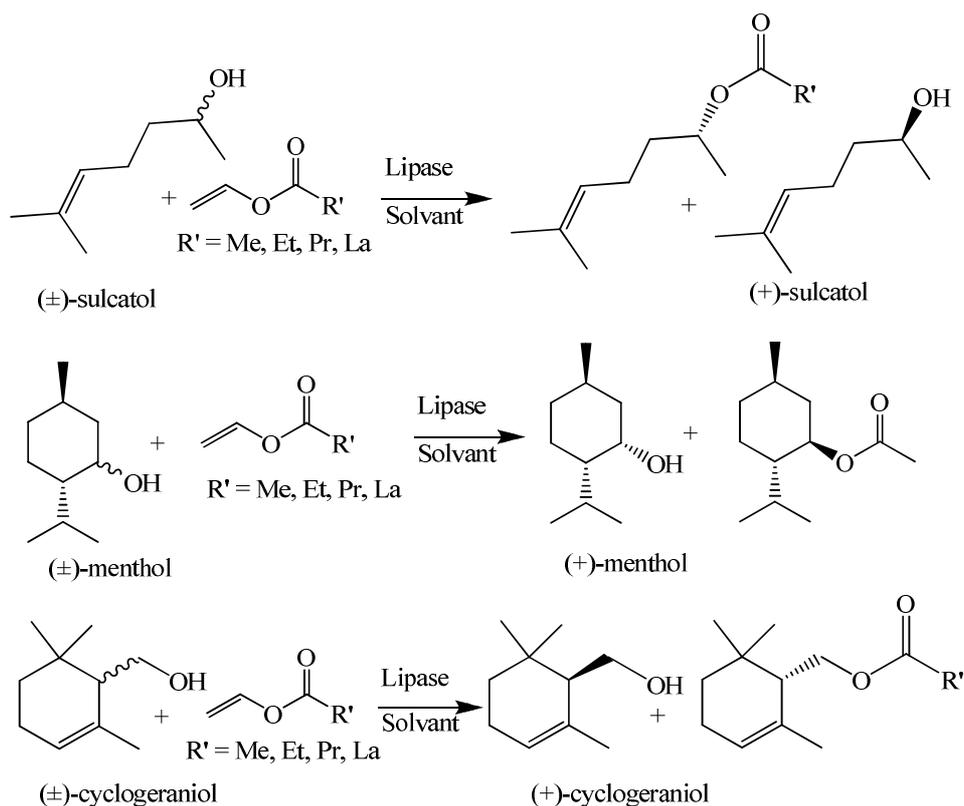
#### 3.2.1. Transestérification des alcools racémiques

Afin de contrôler l'activité de l'eau ( $a_w$ ) et préalablement à leur utilisation, l'ensemble des réactifs, solvants et lipases utilisé dans ce cas, sont équilibrés séparément pendant au moins 24h en les mettant dans des solutions salines saturées à 25°C dans des récipients scellés.<sup>2</sup> Le mélange réactionnel est préparé en ajoutant 1 ml de solvant organique (MeTHF, CPME, toluène ou MTBE) contenant des alcools racémiques ( $\pm$ )-menthol (32 mM), ( $\pm$ )-sulcatol (35 mM) ou ( $\pm$ )- $\alpha$ -cyclogeraniol (32 mM) et de donneur d'acyle (325 mM) au 10 mg à 50 mg de lipases dans un flacon de 3 ml. Ensuite, le mélange réactionnel est agité à 150 tr/min à différentes température. Un échantillon de 5  $\mu$ L de surnageant est ponctionné à la fin de la réaction et analysé par CPG.

#### 3.2.2. Transestérification en présence des liquides ioniques

Afin de tester l'effet des liquides ioniques, les réactions sont effectuées selon le protocole précédent en milieu liquides ioniques en ajoutant au solvant organique 5% ou 1% (v: v) de [BMIM] [TFSI] ou [BMIM] [BF<sub>4</sub>], respectivement. Les vitesses initiales de réaction ( $\mu\text{mol h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) sont calculées en début de réaction (conversion < 15%). Dans cette étude, la quantité de lipases se réfère à la poudre brute.

La configuration absolue des énantiomères transformés est attribuée par rapport à des références optiquement pures et confirmée par comparaison avec les données de la littérature.



**Schéma 2.** Réactions modèles étudiées dans les solvants verts.

## 4. Techniques de formulation des lipases

### 4.1. Immobilisation

Immobilisation par adsorption : Les lipases immobilisées sur Celite ou Bentonite sont obtenues par adsorption physique en utilisant une méthode décrite dans la littérature avec de légères modifications<sup>3</sup>. La lipase (0,5 g) est solubilisée dans 4 ml de solution tampon phosphate (20 mmol, pH 7,0). Le support solide d'immobilisation (1 g) est alors ajouté dans la solution enzymatique. Le mélange est ensuite agité à température ambiante pendant 1 h, la lipase immobilisée est filtrée, séchée pendant une nuit sous vide.

Immobilisation par liaison covalente : Les lipases immobilisées sur résine échangeuse d'ions (Amberjet) sont obtenues par liaison ionique en utilisant une méthode précédemment optimisée dans notre laboratoire<sup>4</sup>. Le support solide (1 g) est mis en suspension dans un volume de solution enzymatique et, après cela, la solution tampon phosphate (pH 8,0) y est ajoutée pour obtenir un volume final de 30 ml. La suspension est ensuite agitée à 40 °C pendant 5 h. La lipase immobilisée est récupérée suivant la même procédure que celle utilisée précédemment.

## 4.2. Lyophilisation

Les lipases lyophilisée sont préparées par congélation des solutions d'enzyme à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  : 20 mg de poudre d'enzyme commerciale sont solubilisés dans un 1 ml de tampon phosphate de potassium (20 mM, pH 8) ou le même tampon contenant 5% (p/V) d'additif (saccharose, D-mannitol ou méthoxy poly (éthylène glycol). Après, on sèche l'ensemble dans un dessiccateur à pression réduite.

## 5. Méthodes analytiques

### 5.1. Dosage des protéines

Pour le dosage des protéines, nous avons fait appel à la méthode de Bradford<sup>5</sup> utilisant le bleu de Coomassie. Le bleu de Coomassie (G250) forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorbance à 595 nm.

#### Préparation du réactif de Bradford

Dans une fiole jaugée 1 litre, on dissout :

- Bleu de coomassie G250.....100mg
- Ethanol 95 %.....50ml

Agitation pendant 2 heures puis, on ajoute :

- Acide orthophosphorique 85%.....100ml
- H<sub>2</sub>O distillée q.s.p.....1000ml

#### Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage indiquée dans le tableau 1, est réalisée à partir d'une solution mère contenant 0.1mg/ml de sérum albumine bovine (SBA).

**Tableau 1.** Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (S.A.B).

Tubes	1	2	3	4	5	6
SAB (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée µl	100	80	60	40	20	0
Réactif (ml)	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

**Détermination de la concentration en protéines**

Dans un tube, on ajoute 4ml de réactif de Bradford à 100 µl de la solution enzymatique qu'on mélange. Après 5 minutes on mesure l'absorbance à 595 nm sur le spectrophotomètre.

Pour déterminer la quantité des protéines présente dans les échantillons à doser, on opère comme suit :

- On trace la courbe d'étalonnage absorbance en fonction de la quantité de SAB en µg.
- On détermine à partir de cette courbe d'étalonnage la quantité de protéine correspondante aux absorbance trouvées pour chaque échantillon de la solution enzymatique à doser (µg).

**Calcul du rendement d'immobilisation**

Le degré de l'immobilisation est exprimé par le rapport en pourcentage suivant :

$$DI = (P_T - P_L) / P_T * 100$$

Où

$P_T$  : représente la quantité totale de protéine utilisée.

$P_L$  : représente la quantité de protéine dans l'eau de lavage.

**5.2. Analyse chromatographique en phase gazeuse**

Pour analyse CPG avec l'appareil (GC- 17, SHIMADZU), les conditions d'analyse utilisées pour identifier les produits et séparer les énantiomères *S* et *R* ainsi que ceux des deux énantiomères alcools sont :

- température initiale : 120°C
- temps initiale : 12 min
- température finale : 200°C
- temps finale : 30 min
- vitesse : 6°C/min

Les temps de rétention pour les deux énantiomères des esters racémiques et la séparation de ces énantiomères *S* et *R* ainsi que ceux des deux énantiomères alcools, ont été déduites par rapport à des références optiquement pures :

**Tableau 2.** Temps de rétention des substrats et produits en GC chirale (GC- 17, SHIMADZU).

Substrat	Temps de rétention (min)							
	Alcools		Esters					
	<i>R</i>	<i>S</i>	Alkyl acetate		Alkyl propionate		Alkyl butyrate	
<i>R</i>			<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	
( <i>R,S</i> )-1-phényléthanol	10.15	10.31	11.40	11.64	13.15	13.44	14.96	15.39
( <i>R,S</i> )-2-pentanol	5.07	5.29	7.02	7.24	8.80	9.15	10.92	11.16
	-	+	-	+	-	+	-	+
(±)-menthol	12.92	13.23	14.50	14.74	16.62	16.87	18.48	18.73

Pour les analyses CPG effectuées avec l'appareil Agilent 6850, les conditions d'analyse sont les suivantes :

- températures de l'injecteur et du détecteur : 250 °C,
- gaz vecteur : azote.
- Les programmes de température du four :
  - 80° (2min)-2°/min-110°-15°/min-150°(2min) pour séparer les énantiomères de sulcatol et leurs esters correspondants.
  - 80° (2min)-5°/min-150°(2min) pour la séparation des énantiomères du menthol et ceux du  $\alpha$ -cyclogeraniol et leurs esters correspondants. Les temps de rétention sont donnés par le tableau 3 suivant :

**Tableau 3.** Temps de rétention des substrats et produits en GC chirale (Agilent Technologies 6850).

Substrat	Temps de rétention (min)									
	Alcools		Esters							
	-	+	Alkyl acetate		Alkyl propionate		Alkyl butyrate		Alkyl laurate	
-			+	-	+	-	+	-	+	
(±)-sulcatol	5.44	5.79	8.33	8.69	9.65	9.84	11.07	11.39	23.84	24.02
(±)-menthol	8.63	8.83	9.27	9.62	10.87	11.03	12.69	12.94	28.63	28.88
(±)- $\alpha$ -cyclogeraniol	7.26	7.37	9.21	9.35	11.31	11.55	12.94	13.18	31.22	31.41

### Références bibliographiques

- (1) Serra, S.; Gatti, F. G.; Fuganti, C. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20* (11), 1319–1329.
- (2) G. Bell, P. J. Halling, B. D. Moore, J. Partridge, D. G. R. *Elsevier Sci. Ltd* **1995**, *13*, 468–473.
- (3) Belbachir M, B. A. *US Pat.* **2001**, *6*, 274–527.
- (4) Benamia F, Bouchagra S, Saihi Y, Djeghaba Z, R. N. *Prep Biochem Biotechnol* **2013**, *43*, 33–47.
- (5) Bradford.MM. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248–254.