

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

BADJI MOKHTAR- ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR - ANNABA



جامعة باجي مختار- عنابة

Faculté Des Sciences
Département De Chimie

Année 2016

Laboratoire de synthèse *Organique*, *Modélisation* et *Optimisation*
des *Procédés chimiques* (LOMOP)

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT en Sciences

*Optimisation de la synthèse enzymatique d'esters de sucres par la
méthodologie des plans d'expériences.*

Option : Chimie Organique

Par : Mme BOUZAOUT- BOUDJENIBA Nadia

Devant le jury :

M. BOUKHARI Abbas	Professeur	Président	U.B.M. Annaba
M ^{me} BIDJOU-HAIOUR Chahra	Professeur	Directrice de thèse	U.B.M. Annaba
M. REGAINIA Zine	Professeur	Examineur	U. Souk-Ahras
M ^{me} BOUGUessa Sabrina	M.C.A	Examineur	U. Tébessa
M. ISMAIL Fadhel	Professeur	Examineur	U.B.M. Annaba
M ^{me} HALLADJA Sabrina	M.C.A	Examineur	U. Skikda

ملخص

- يهدف هذا العمل إلى نمذجة و تحسين تحضير الأسترة الإنزيمية لسكر اللكسيلوز و الغلوكوز بإستعمال طريقة مخططات التجارب ، حيث أن أسترة السكريات من المركبات الغير أيونية لها خصائص محددة مما يسمح بإستخدامها في العديد من الصناعات (المنظفات ،المستحضرات الصيدلانية و التجميل و الأطعمة ...إلخ).

- في موضوع بحثنا أجرينا تفاعل أسترة بين حمض اللوريك كمانح الاسيل و السكريات التالية : اللكسيلوز و الغلوكوز في مذيبات عضوية ذات قطبية مختلفة و بوجود إنزيم فطري (CCL) الذي تم تجميده عبر الإمتزاج مع السليبت على مستوى المخبر.

- التحسين من درجة الحموضة (pH) لتجميد الليباز هو هدفنا الأول في هذا البحث قصد تطبيقه فيما بعد في الأسترة الإنزيمية للكسيلوز و الغلوكوز.

- طبقنا نوعين من مخططات التصميم (Plakett- Burman و Box-Behnken) في الأسترة الإنزيمية للكسيلوز مخطط Plakett- Burman طبق قصد التعرف على العوامل الأكثر تأثير على التحول و هي : درجة الحرارة ، الوقت ، كمية المنخل الجزيئي، كمية الإنزيم و ما يعادل حمض اللوريك . التصميم أظهر ثلاثة عوامل أكثر تأثير و هي : درجة الحرارة، كمية المنخل الجزيئي و الزمن ، هذه العوامل يتم دراستها بتطبيق مخطط Box-Behnken لتحديد الشروط التجريبية المثلى لتحول أقصى للكسيلوز.

- تحسين و نمذجة تفاعل أسترة الغلوكوز حيث يتم بدراسة العوامل التالية : درجة الحرارة و المذيبات العضوية و الوقت و ذلك بتطبيق منهجية استجابة السطح (RSM) وفقا لمصفوفة (Box-Behnken) حيث يعتبر جد فعال لتقديم علاقة رياضية تربط كل من تحول الغلوكوز و المعايير التجريبية.

- المعالجة الإحصائية لنتائج المحصل عليها تمت بإستعمال برنامج MINITAB النسخة 14

الكلمات المفتاحية:

أسترات الإنزيمات ،السكر ، مخططات التجارب، إستجابة السطح (RSM) ، إنزيم (CCL) .

Résumé

Ce travail concerne l'optimisation et la modélisation de la synthèse enzymatique d'esters de D-Xylose et de D-Glucose par la méthodologie des plans d'expériences. Les esters de sucre sont en effet des tensioactifs non-ioniques possédant une grande particularité structurale qui autorise leur utilisation dans divers domaines (détergence, cosmétique, pharmaceutique, alimentaire etc...).

Nous avons d'abord mis en œuvre la réaction d'estérification des sucres par l'acide laurique comme agent acylant dans des solvants possédant différentes polarités en présence d'une enzyme fongique, la lipase de *Candida cylindracea* (CCL) immobilisée sur célite à l'échelle du laboratoire. Une optimisation du pH d'immobilisation de la lipase est entreprise.

Deux types de plans d'expériences (Plackett- Burman et Box-Behnken) ont été utilisés. Le plan de criblage de Plackett-Burman est mis à profit afin d'identifier les facteurs les plus influents sur la conversion dans la réaction d'estérification enzymatique du D-Xylose à savoir, la température, le temps, la quantité du tamis moléculaire, la quantité d'enzyme et l'équivalent de l'acide laurique. Les résultats du criblage font apparaître trois facteurs importants. Ces facteurs sont ensuite étudiés par la méthodologie de surfaces de réponses (RSM) en accord avec la matrice de Box-Behnken afin de déterminer les conditions optimales pour une conversion maximale. L'optimisation de la synthèse d'ester de D-Glucose est également entreprise en utilisant la RSM en accord avec le plan de Box-Behnken qui est très efficace pour évaluer et modéliser les effets des facteurs suivant: la température, le solvant et le temps sur la conversion du sucre de départ.

Le traitement statistique des données à l'aide du logiciel MINITAB version 14 qui offre un large éventail de fonctions d'analyse statistique et d'outils graphiques, a permis la présentation de résultats précis. Dans les deux cas le modèle obtenu est significatif avec $P < 0,05$ et $R^2 > 90\%$. La région du point optimal pour une valeur élevée de la conversion est obtenue à l'aide des courbes de contour lorsque trois facteurs sont fixés aux niveaux hauts.

Mots clés: Plans d'expériences, RSM, Estérification enzymatique, Immobilisation, Lipase de *Candida cylindracea*, sucres.

Abstract

This work deals with the optimization and modelling of the enzymatic synthesis of sugar esters starting from D-Xylose and D-Glucose using the methodology of design of experiments. These attractive compounds, known for their biodegradability, are commonly employed in cleansing agents, cosmetics, pharmaceutical, food etc ...

Enzymatic esterification of sugars was performed with lauric acid in different solvent having different polarity. Lipase from *Candida cylindracea* immobilized on Celite in the laboratory was used. A study of the pH immobilization of the lipase is first investigated.

Two experimental designs (Plackett- Burman and Box-Behnken) were used. The screening design of Plackett-Burman is realized to identify the most important factors in the enzymatic esterification of D-Xylose, such as temperature, time, amount of molecular sieves, the amount of enzyme and the amount of lauric acid. Results of the screening design are three important factors. These factors are then studied by the response surface methodology (RSM) in agreement with the Box-Behnken design to find the optimum conditions for maximum conversion. Optimization of ester synthesis of D-Glucose is also undertaken using the RSM under Box-Behnken design. This design is an effective tool to evaluate and to model the effects of the following factors: temperature, solvent and the time on the conversion of the starting sugar.

The statistical analysis of data using the software MINITAB 14 offers a wide range of statistical functions and graphical tools and has allowed us the presentation of accurate results. In both cases the resulting model is significant with $P < 0.05$ and $R^2 > 90\%$. The optimum point for a high value of the conversion is obtained by using contour curves when three factors are fixed to high levels.

Keywords: Design of experiments, RSM, enzymatic esterification, immobilization, Lipase from *Candida cylindracea*, sugars.

Dédicaces

À mes chers parents,

À mon mari Abdellah,

À mes filles Imane et Wafa,

À toute ma famille,

À tous ceux qui me sont chers.

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au Laboratoire de Synthèse Organique, Modélisation et Optimisation des Procédés chimiques (LOMOP), à l'université Badji-Mokhtar de Annaba au sein du Groupe de Synthèse Bio-Organique et Modélisation, dirigé par le Professeur *Chahra BIDJOU-HAIOUR*.

Je remercie vivement Madame *Chahra BIDJOU-HAIOUR*, Professeur à l'Université d'Annaba, d'avoir accepté de me diriger tout au long de ce travail, qu'elle trouve ici le témoignage de toute ma gratitude. Elle a su me guider tout au long de ce parcours et a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Je remercie Monsieur *Abbes BOUKHARI*, Professeur à l'Université d'Annaba, de l'honneur qu'il me fait aujourd'hui de bien vouloir présider le jury de cette thèse.

Monsieur *Ismail FADHEL*, Professeur au département de génie chimique, à l'Université d'Annaba, a bien voulu accepter de faire partie de ce jury. Je le prie de croire en mes sincères remerciements.

Je remercie également Monsieur *Zine REGAINIA*, Professeur à l'Université de Souk-Ahras, d'avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime également mes remerciements à Mesdames *Sabrina HALLADJA* et *Sabrina BOUGUESSA*, Maitres de conférences A aux Universités respectivement de Skikda et de Tébessa, pour l'honneur qu'elles me font d'être dans mon jury de thèse.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble des membres du laboratoire qui, par leur gentillesse et leur disponibilité, ont rendu le quotidien de ces années de thèse agréable et chaleureux.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près tout au long de ce travail.

Liste des abréviations

Qe	Quantité d'enzyme
AL	Acide laurique
Cat	Catalyseur
CAL B	Lipase de <i>Candida Antractica B</i>
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMC	Concentration Micellaire Critique
C	Conversion
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
Li	Liquide ionique
	1-Butyl-1-méthylpyrrolidinium
[Bmpyrr][TFO]	trifluoromethanesulfonate
Bmim][BF ₄]	[1-Butyl-3-méthylimidazolium][tetrafluoroborate]
[Bmim][PF ₆]	[1Butyl-3-méthylimidazolium][hexafluorophosphate]
CCL	Lipase de <i>Candida cylindracéa</i>
CCL I	Lipase de <i>Candida cylindracé</i> immobilisée sur célite
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
MML	Lipase de <i>Mucor miehei</i>
CAL	Lipase de <i>Candida antarctica</i>
CRL	Lipase de <i>Candida regouza</i>
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
DCM	Dichlorométhane
éq	Equivalent
EMC	Ethyl methylcetone
EtOH	Ethanol
E, Enz	Enzyme
h	Heure
HLB	Balance hydrophile/hydrophobe
HMDS	Hexaméthylidisilazane
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol
IR	Infrarouge
KDa	Kilodalton
min	Minute
Rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SM	Spectrométrie de masse
T.A	Température ambiante
<i>t</i> -BuOH	Tertiobutanol
THF	Tétrahydrofurane
TM	Tamis moléculaire
TMS	Triméthylsilyl
UV	Ultraviolet

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différents types de tensioactifs	6
Tableau 2: Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs	39
Tableau 3: Principaux logiciels des plans d'expériences	41
Tableau 4: Analyse ANOVA sur l'ajustement du modèle	42
Tableau 5: Conversions maximales à $T = 40^{\circ}\text{C}$, à $t = 72\text{h}$.	49
Tableau 6: Conversions maximales à $T = 60^{\circ}\text{C}$, à $t = 72\text{h}$.	50
Tableau 7: Conversion maximale à $T = 80^{\circ}\text{C}$, à $t = 72\text{h}$.	52
Tableau 8: Propriétés physicochimiques des esters de D-Glucose et de D-Xylose	54
Tableau 9: Facteurs et domaine d'étude du plan de Plackett-Burman	58
Tableau 10: Plan de Plackett-Burman d'après la matrice d'expérimentation	58
Tableau 11: Effets et coefficients estimés pour la conversion (unités codées)	60
Tableau 12: Effets et coefficients estimés pour la conversion (unités non codées)	61
Tableau 13: Analyse de la variance pour la réponse $C(\%)$	63
Tableau 14: Facteurs et domaine d'étude du plan de Box-Behnken	64
Tableau 15: Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales	65
Tableau 16: Coefficients de régression estimés pour la conversion $C(\%)$	65
Tableau 17: Analyse de la variance pour la conversion $C(\%)$	66
Tableau 18: Coefficients de régression estimés pour la $C(\%)$ après exclusion des termes non significatifs (unité codée)	67
Tableau 19: Analyse de la variance pour la $C(\%)$ après exclusion des termes non significatifs	68
Tableau 20: Comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées	69
Tableau 21: Facteurs et domaine d'étude du plan de Box-Behnken	76
Tableau 22: Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales	77
Tableau 23: Coefficients de régression estimés pour la conversion $C(\%)$	78
Tableau 24: Analyse de la variance pour la conversion $C(\%)$	78
Tableau 25: Coefficients de régression estimés pour la $C(\%)$ après exclusion des termes non significatifs	79
Tableau 26: Analyse de la variance pour la $C(\%)$ après exclusion des termes non significatifs	79

Liste des figures

Figure 1: Consommations mondiales des produits dérivés de sucres	2
Figure 2: Représentation schématique d'un monomère de tensioactif	5
Figure 3: Structure des enzymes	11
Figure 4: Site actif d'une enzyme	12
Figure 5: Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique	14
Figure 6: Adsorption des enzymes sur un support	15
Figure 7: Inclusion des enzymes sur une matrice de support	16
Figure 8: Réticulation des enzymes	16
Figure 9: Immobilisation des enzymes par liaison covalente	17
Figure 10: Définition du domaine d'étude	31
Figure 11: Illustration de l'effet d'un facteur	32
Figure 12: Illustration d'une interaction	32
Figure 13: Plan de Doehlert pour 3 facteurs	37
Figure 14: Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan composite centré à trois facteurs	38
Figure 15: Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs	39
Figure 16: Différents écarts	42
Figure 17: Courbe d'iso-réponse et surfaces de réponses	46
Figure 18: Influence du pH à T = 40°C	49
Figure 19: Influence du pH à T = 60°C	50
Figure 20: Influence du pH à T = 80°C	51
Figure 21: Diagramme de Pareto des effets normalisés	59
Figure 22: Diagramme des effets principaux sur la conversion	60
Figure 23: Effets des facteurs sur la conversion	61
Figure 24: Représentation graphique des réponses théoriques fonction de réponses mesurées	62
Figure 25: Réponses théoriques en fonction des réponses estimées	69
Figure 26: Diagrammes de contour au niveau bas des facteurs	71
Figure 27: Diagrammes de contour au niveau moyen des facteurs	72
Figure 28: Diagrammes de contour au niveau haut des facteurs	73

Figure 29: Diagramme des effets d'interactions des facteurs sur la conversion	80
Figure 30: Réponses théoriques en fonction des réponses estimées	81
Figure 31: Droite de Henry	82
Figure 32: Valeurs Résiduelles en fonction des valeurs ajustées pour la conversion	82
Figure 33: L'histogramme des valeurs résiduelles de la conversion	83
Figure 34: Valeurs Résiduelles en fonction de l'ordre d'observation pour la conversion	83
Figure 35: Diagrammes de surface de réponse et de contour pour X_1 - X_2 à X_3 max, moyen et min	85
Figure 36: Diagrammes de surface de réponse et de contour pour X_1 - X_3 à X_2 max, moyen et min	86
Figure 37: Diagrammes de surface de réponse et de contour pour X_2 - X_3 à X_1 max, moyen et min	87

Liste des schémas

Schéma 1: Quelques exemples d'esters des sucres	2
Schéma 2: Exemple de tensionactifs anionique sulfoné	7
Schéma 3: Exemple de tensionactifs cationique	7
Schéma 4: Exemple de tensionactifs amphotère	8
Schéma 5: Exemple de tensionactifs nonionique	8
Schéma 6: Schéma du repliement α/β . Les flèches représentent les feuillets β et les rectangles les hélices α . Le rectangle noir représente le volet amphiphile	18
Schéma 7: Structure de la lipase de <i>Mucor miehei</i> dans sa forme fermée (A) et ouverte (B)	19
Schéma 8: Mécanisme réactionnel de la triade catalytique	20
Schéma 9: Ensemble des différentes réactions catalysées par des lipases	20
Schéma 10: Synthèse de 6- <i>O</i> -monoesters de galactose	22
Schéma 11: Estérification enzymatique du D-Galactose avec N-decanoylglycine	22
Schéma 12: Transestérification enzymatique du D-Mannose par le vinyle myristate	23
Schéma 13: Influence de la nature du solvant organique	24
Schéma 14: Influence de la nature de l'enzyme	24
Schéma 15: Influence de la température	25
Schéma 16: Influence de la quantité de l'enzyme	25
Schéma 17: Influence du temps	26
Schéma 18: Influence du tamis moléculaire	26
Schéma 20: Estérification enzymatique de l' α -(+)-D-Xylose	56
Schéma 21: Estérification enzymatique de l' α -(+)-D-Glucose	75
Schéma 22: Schéma de purification générale des esters de sucre d'acide gras	99

Sommaire

<i>Introduction générale</i>	1
------------------------------	---

1^{ère} Partie : Etude bibliographique

Chapitre 1: Synthèse enzymatique d'esters de sucres à potentialité tensioactive.

I. Introduction	5
II. Tensioactifs	5
II.1. Définition.	5
II.2. Différentes classes de tensioactifs	6
II.2.1. Les tensioactifs anioniques	6
II.2.2. Les tensioactifs cationiques	7
II.2.3. Les tensioactifs amphotères	7
II.2.4. Les tensioactifs non ioniques	8
II.3. Domaine application des tensioactifs	8
II.3.1. Secteur de la détergence	9
II.3.2. Secteur de la cosmétique	9
II.3.3. Secteur industriel	9
III. La catalyse enzymatique	9
III.1. Structure des enzymes et fonction	10
III.2. classification	11
III.3. Dénaturation des enzymes	12
III.4. Facteur influençant l'activité enzymatique	13
III.4.1. La température	13
III.4.2. Le PH	13
III.5. Enzymes immobilisées	14
III.6. Différentes méthodes d'immobilisation	14
III.6.1. L'immobilisation par adsorption	15
III.6.2. L'immobilisation par inclusion	15
III.6.3. la réticulation	16
III.6.4. L'immobilisation par liaison covalente	16
IV. Les lipases	17
IV.1. Structure des lipases	17
IV.2. Mécanisme d'action des lipases	19
IV.3. Réaction catalysées par les lipases	20
V. Esters des sucres	21
V.1. Synthèse d'esters de sucres	21
V.2. Synthèse d'esters de sucres par voie enzymatique	21

V.3. Influence du milieu réactionnel sur la synthèse enzymatique des esters de sucres	23
V.3.1. Influence du solvant	23
V.3.2. Influence de la nature de l'enzyme	24
V.3.3. Influence de la température	24
V.3.4. Influence de la quantité de la lipase	25
V.3.5. Influence du temps de la réaction	26
V.3.6. Influence de la quantité du tamis moléculaire	26
VI. Conclusion	27

Chapitre 2: Généralités sur les plans d'expériences et les notions de statistiques

I. Introduction	28
II. Historique	29
III. Définition et domaine d'application des plans d'expériences	30
IV. Vocabulaire	30
IV.1. Facteur	30
IV.2. Réponses	30
IV.3. Domaine expérimental et domaine d'étude	31
IV.4. Matrice d'expérience	31
IV.5. Effet d'un facteur	31
IV.6. Interaction	32
IV.7. Modèle mathématique	32
V. Différents types des plans d'expériences	32
V.1. Plans de mélanges	32
V.2. Plans de criblage	32
V.2.1. Plans factoriels complets à 2 niveaux	32
V.2.2. Plans fractionnaires à deux niveaux	34
V.2.3. Les plans de Plackett-Burman	35
V.3. Plans de modélisation	35
V.3.1. Les plans de Doehlert	36
V.3.2. Les plans composites centrés	37
V.3.3. Les plans de Box-Behnken	38
V.3.3.1. Avantage du modèle de Box-Behnken	39
VI. Logiciels des plans d'expériences	40
VII. Technique d'analyse	41
VII.1. Analyse de la variance	41
VII.2. Probabilité P	43
VII.3. Coefficients de détermination (R^2 , $R^2_{\text{ajusté}}$)	43
VII.4. Validation du modèle	43
VII.5. Courbes d'isoréponses et surfaces de réponses	45
VIII. Conclusion	46

2^{ème} Partie: Optimisation et modélisation de la synthèse d'esters de sucres par les plans d'expériences.

Chapitre 1: Optimisation de l'immobilisation de la lipase de *Candida cylindracea*.

I. Introduction	47
II. Immobilisation de la lipase de <i>Candida cylindracea</i> (CCL)	47
III. Estérification enzymatique de l' α -(+)-D-Glucose	48
IV. Résultats et discussion	48
IV.1. Résultats	48
IV.1.1. Influence du pH d'immobilisation de la CCL sur la conversion à T = 40°C	48
IV.1.2. Influence du pH d'immobilisation de la CCL sur la conversion à T = 60°C	49
IV.1.3. Influence du pH d'immobilisation de la CCL sur la conversion à T = 80°C	51
IV.2. Discussion	52
V. Intérêts des esters de sucres synthétisés	54
VI. Conclusion	54

Chapitre 2: Optimisation de la synthèse d'esters de D-Xylose par les plans d'expériences.

I. Introduction	56
II. Préparation du plan d'expériences	56
II.1. Objectifs	56
II.2. Réponse	57
II.3. Détermination des facteurs et du domaine d'étude	57
II.4. Choix du Plan d'expérience	58
III. Plan de criblage (Plackett-Burman)	58
III.1 Réalisation des essais	58
III.2. Analyse statistique des résultats	59
III.2.1. Représentation graphique des effets	59
a. Diagramme de Pareto	59
b. Diagramme des effets principaux	59
III. 2.2. Détermination des effets significatifs et des coefficients du modèle	60
III.2.3. Equation du modèle mathématique	62
III.2.4. Analyse de la variance (ANOVA)	63
IV. Plan de Box-Behnken	63
IV.1. Résultats statistiques et interprétation	63
IV.2. Détermination du modèle mathématique	65
IV.3. Validation du modèle	67
IV.3.1. Validation primaire du modèle	68

IV.3.2. Représentation graphique des réponses théoriques en fonction des réponses mesurées	69
IV.4. Optimisation de la conversion	70
IV.5. Vérification	73
V. Conclusion	74

Chapitre 3: Optimisation de la synthèse d'esters de D-Glucose par les plans d'expériences.

I. Introduction	75
II. Préparation du plan d'expériences	75
II.1. Objectifs	75
II.2. Réponse	75
II.3. Détermination des facteurs et du domaine d'étude	75
II.4. Choix du Plan d'expérience	76
III. Plan de Box-Behnken	76
III.1 Réalisation des essais	77
IV. Résultats statistiques et interprétation	77
IV.2. Détermination du modèle mathématique	78
IV.3. diagramme des effets d'interactions des facteurs sur la conversion	80
V. Validation du modèle	80
V.1. Représentation graphique des réponses théoriques en fonction des réponses Mesurées	80
V.2. Test de la normalité du plan Box-Behnken	81
V.2.1. Droite de Henry des valeurs résiduelles	81
V.2.2. Valeurs Résiduelles en fonction des valeurs ajustées pour la conversion	82
V.2.3. L'histogramme des valeurs résiduelles de la conversion	82
V.2.4. Valeurs Résiduelles en fonction de l'ordre pour la conversion	83
VI. Optimisation de la conversion	84
VII. Vérification	88
VIII. Conclusion	89

Conclusion générale 90

Références bibliographiques 92

Partie expérimentale 97

Introduction générale

Introduction générale

La formation d'esters d'acides gras et de sucres par voie enzymatique est un procédé très recherché, notamment la production d'agro-tensioactifs¹. Ces molécules à squelette amphiphile sont biodégradables, non toxiques et possèdent des propriétés physicochimiques qui permettent leurs applications dans des domaines variés tels que la détergence² ou la cosmétique³, l'industrie alimentaire⁴, l'industrie du cuir, des peintures ou encore du textile. Jusque dans les années 1980, les tensioactifs étaient synthétisés à partir de ressources fossiles. De nos jours l'utilisation des ressources végétales pour la synthèse de produits chimiques s'intègre parfaitement dans le concept de chimie verte. Parmi ces ressources, les sucres sont particulièrement étudiés comme précurseurs de molécules plateformes, de tensioactifs verts. Dans ce contexte les esters de sucres⁵ sont des molécules tensioactives de type non-ioniques produites à partir du greffage d'un sucre (hydrate de carbone) sur un acide gras. Dans ce système, la synthèse par une enzyme est possible. La catalyse enzymatique est en effet de plus en plus appréciée des industriels du fait des conditions douces de mise en œuvre. De plus, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée, des changements dans l'activité enzymatique, le pH optimum et l'affinité pour le substrat ont été observés.⁶

Les premiers esters de sucres décrits dans la littérature sont : les esters de saccharose⁷, les esters de sorbitan⁸ et les alkylpolyglycosides, APGLy⁹ (schéma 1).

¹ M. Manuel Cruz Silva, S. Riva, M. Luisa. *Tetrahedron*. **2005**, 61, 3065-3073.

² T. Kosaka, T. Yamada, *Sucrochemistry*, ACS Symposium series, New plant and new applications of sucrose esters. **1997**, 41, 84-96.

³ S. Piccicuto, C. Blecker, J-C. Brohée, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deranne, M. Paquot, M. Marlier. *Biotechnol. Agronom. Soc. Environ.* **2001**, 5, 209.

⁴ (a) Y.G. Shi, J.R. Li, Y. H. Chu, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2011**, 86, 1457-1468. (b) S.W. Chang, J.F. Shaw, *New Biotechnol.* **2009**, 26, 109-116. (c) J. F. Kennedy, H. Kumar, P. S. Panesar, S. S. Marwaha, R. Goyal, A. Parmar, S. Kaur, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, 81, 866-876. (d) S. Riva, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19, 43-54. (e) T. Polat, R.J. Linhardt, *J. Surfact. Deterg.* **2001**, 4, 415-421. (f) D.K. Allen, B.Y. Tao, *J. Surfact. Deterg.* **1999**, 2, 383-390.

⁵ Y. Yan, U.T. Bornscheuer, G. Stadler, S. Lutz-Wahl, M. Reuss, R. D. Schmid, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **2001**, 78(2), 147-152.

⁶ (a) V. M. Balco, A. L. Paiva, F. X. Malcata, *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 18, 392.

(b) A. E. Ivanov, M. P. Schneider, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1997**, 3, 303.

⁷ S. Piccicuto, C. Blecker, J. C. Brohée, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deroanne, M. Paquot, M. Marlier, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2001**, 5, 209.

⁸ Y. Queneau, S. Chambert, C. Besset, R. Cheaib, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 1999.

⁹ a.W. von Rybinski, K. Hill, G. Stoll, *Alkyl Polyglucosides. Technology, Properties and Applications. Verlag Chemie, Weinheim.* **1996**.

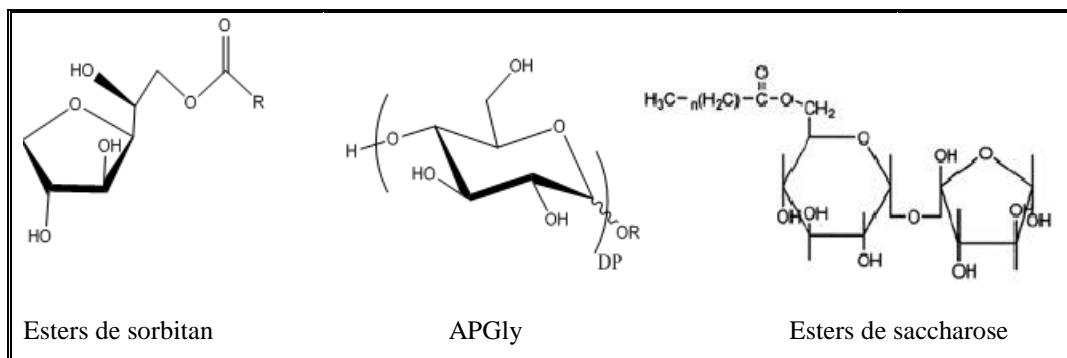


Schéma 1. Quelques exemples d'esters des sucres.

Dans les années 1980, la stratégie de valorisation des ressources agricoles et la prise en compte de l'impact environnemental des produits chimiques ont entraîné un regain d'intérêt pour cette catégorie de composés. Depuis le début des années 1990, plusieurs entreprises japonaises telles que Kao Corp ¹⁰ et Hüls ¹¹ se sont alors lancées dans la fabrication des esters de sucres. Le volume mondial de consommation de ce type de produit était de l'ordre de 200.000 tonnes/an. La **Figure 1** englobe la répartition de leur consommation dans le monde.

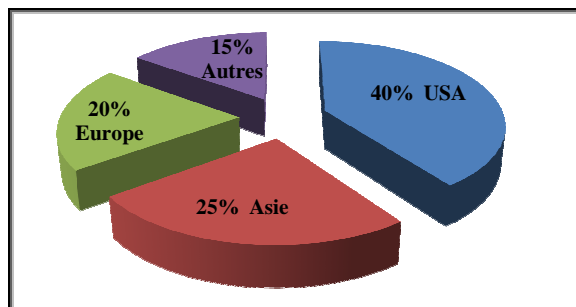


Figure 1. Consommations mondiales des produits dérivés de sucres.

Ce travail concerne donc une famille d'esters des sucres, des tensioactifs monocaténaires, obtenus à partir de deux glucides, le xylose et le glucose. Pour cela, nous disposons d'une réaction modèle, l'estérification enzymatique dans le but de développer un procédé de synthèse efficace de sucroesters.

Afin de connaître l'évolution des variables caractéristiques de notre système, leurs interactions et leurs influences sur les grandeurs étudiées, nous avons appliqué la méthodologie des plans

¹⁰ H. Oka, K. Aimono, S. Tsuyutani, T. Fujita, K. Hashiba K, Eur. Patent EP 492397, Kao Corp. **1992**.

¹¹ H. Lüders, Eur. Patent EP 252241, Hüls AG, **1987**.

d'expériences. Cette méthode permet notamment d'établir des modèles quadratiques faisant intervenir des paramètres de différentes natures. Ce sont des méthodes de modélisation basées sur l'expérimentation. Le but des plans d'expériences est donc d'obtenir un maximum d'informations en ne réalisant qu'un minimum d'essais, ce qui répond parfaitement au défi qu'impose le contexte économique actuel.

Dans ce cadre, nous avons étudié l'influence des différents paramètres réactionnels sur l'avancement de la réaction d'acylation enzymatique de substrats osidiques. Cette étape consiste à déterminer la fonction mathématique permettant de décrire le phénomène étudié avec les facteurs influents. Une démarche basée sur l'utilisation de la méthodologie de surface de réponse (RSM)¹² a été proposée pour aborder les problèmes d'optimisation. Cette méthodologie est simple, efficace et facile à utiliser. Elle permet d'extraire le maximum d'informations avec un minimum d'essais expérimentaux (l'expérience coûte cher en temps et en moyens) afin de caractériser un processus de manière la plus précise possible. La RSM constitue le second volet de la méthode des plans d'expériences, qui permet de mieux comprendre et d'optimiser les paramètres de la réaction afin d'atteindre des réponses souhaitables. Ce comportement de la surface de réponse a été expliqué par un modèle polynomiale complet du second degré qui permet l'estimation des effets linéaires, quadratiques et des effets d'interaction. Pour cela, un logiciel de plan d'expériences, MINITAB version 14, offrant une multitude de possibilités statistiques et graphiques a été utilisé pour planifier les expérimentations, identifier les facteurs influents et optimiser les modèles.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent pleinement dans le contexte cité plus haut et sont subdivisés en deux parties.

La première partie est consacrée à une revue bibliographique sur les tensioactifs et la catalyse enzymatique dans le cadre de la synthèse d'esters de sucres à potentialité tensioactive. Un aspect général sur les plans d'expériences et les notions statistiques concernant la méthode est également abordé.

Le contenu de cette première partie servira de base théorique aux développements exposés dans la partie suivante. La deuxième partie est en effet consacrée aux résultats obtenus pour la modélisation et l'optimisation de la synthèse enzymatique d'esters de sucres par la méthode des plans d'expériences. Elle est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre concerne une

¹² a D.C. Montgomery. Response Surface Methodology: Design and Analysis of Experiments. *New York: Wiley.* **2002**, 445-474. b R.H. Myers, D.C. Montgomery & Anderson-Cook, C.M. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. *New York: John Wiley & Sons.* **2009** 219–265.

Introduction générale

étude préliminaire du comportement de la lipase de *Candida cylindracea* (CCL) pour la recherche des meilleures conditions pour l'immobilisation. Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de l'effet des différents paramètres (température, temps, quantité du tamis moléculaire, quantité de lipase etc...) sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-Xylose par l'acide laurique en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. Dans le troisième chapitre la méthodologie des surfaces de réponses est mise à profit par l'utilisation du plan de Box et Behnken pour la synthèse d'ester de D-Glucose afin de déterminer les conditions optimales pour une conversion maximale.

Le manuscrit est terminé par une conclusion générale et la présentation des perspectives envisagées. Toutes les informations concernant l'ensemble des synthèses effectuées sont rassemblées dans la partie expérimentale.

Partie 1

Etude bibliographique.

Chapitre 1

*Synthèse enzymatique d'esters de sucres à
potentialité tensioactive.*

I. Introduction

Les tensioactifs sont des molécules utilisées dans de nombreuses industries. Dans ce contexte, une élaboration à partir de ressources naturelles présentes dans la biomasse répond à des enjeux permanents. Les esters de sucres répondent à ces critères. De plus, leurs caractéristiques fonctionnelles, comme la Concentration Micellaire Critique (CMC) et la Balance Hydrophile-Lipophile (BHL), peuvent être formulées en modifiant la partie sucre et / ou la partie acide gras des esters de sucres. En effet, en variant la nature du sucre et la longueur de la chaîne grasse, il est possible d'obtenir un ensemble de molécules possédant une gamme très large de propriétés fonctionnelles intéressantes (tensioactifs moussants, fluidifiants, solubilisants, émulsionnants). Ils présentent également des avantages en matière de pureté, d'activité biologique (effet bactéricide), de biocompatibilité et de biodégradabilité. Actuellement, les esters de sucres sont employés dans les domaines agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

II. Tensioactifs

II.1. Définitions

Les tensioactifs ou surfactants sont des molécules possédant deux parties opposées, une chaîne à caractère lipophile (ou queue hydrophobe) liée à un groupement à caractère hydrophile (appelée tête polaire). C'est l'antagonisme de cette structure qui lui donne son caractère amphiphile (Figure 2).

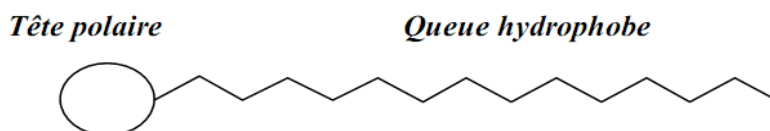
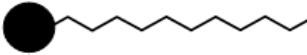
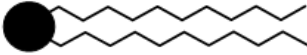
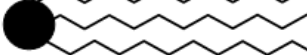
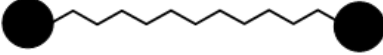
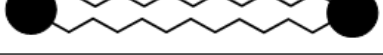
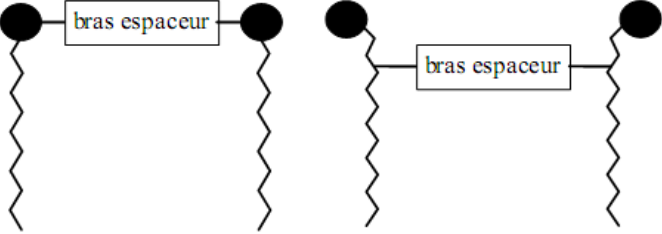


Figure 2 : Représentation schématique de tensioactif

On peut diviser les tensioactifs en plusieurs catégories (nombre, nature et disposition des têtes hydrophiles et des queues hydrophobes au sein de la molécule). On peut avoir des tensioactifs mono-, bi- ou tri- caténaux selon le nombre de chaînes hydrophobes greffées sur la même tête polaire. Plusieurs têtes hydrophiles peuvent être reliées à une ou plusieurs chaînes hydrophobes donnant ainsi les tensioactifs bolaformes ou géminés (tableau 1) ¹.

¹ I. Rico-Lattes, *Actualité Chimique* **2007**, 305, 3-11.

Tableau 1: Les différents types de tensioactifs.

<i>structure du tensioactif</i>	<i>nom</i>
	monocaténaire
	bicaténaire
	tricaténaire
	bolaforme simple chaîne
	bolaforme double chaîne
	gémisés

II.2. Différentes classes de tensioactifs

Dans la littérature, on rencontre diverses structures de tensioactifs, variant notamment selon la nature de leur tête polaire. Il existe quatre grandes familles^{2,3} qui sont les tensioactifs anionique, cationique, amphotères (zwitterionique) et non ionique.

II.2.1. Les tensioactifs anioniques

Les tensioactifs anioniques⁴ possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels. En solution aqueuse, ils se dissocient pour donner des ions amphiphiles chargés négativement. Ces composés sont les plus utilisés à l'échelle industrielle, on les retrouve principalement dans les produits cosmétiques comme le savon, dont la partie hydrophile est un sel de sodium ou de potassium d'un acide carboxylique ($R-COO^- M^+$). A titre d'exemples, on peut citer les composés sulfonés (RSO_3^-, Na^+) tels que les sulfates d'alkyles et les sulfonates

² (a) J. J. Morelli, G. Szajer, *J. Surfact. Deterg.* **2000**, 3, 539-552.

(b) Y. Yu, J. Zhao, A.E. Bayly, *Chin. J. Chem. Eng.* **2008**, 16, 517-527.

³ W. M. Linfield, dans "Anionic Surfactants", M. Dekker Eds. **1976**.

⁴ P. Wang, A. A. Keller. *Water Research.* **2009**, 43, 706-714.

d'alkylbenzène, qui constituent la matière première tensioactive la plus utilisée dans la détergence (Schéma 2).

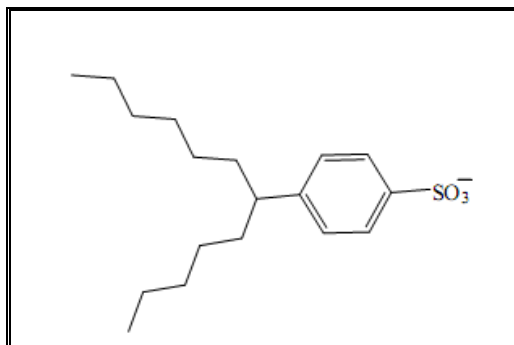


Schéma 2 : Exemple de tensioactif anionique sulfoné : alkyl benzène sulfonate.

II.2.2. Les tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques sont caractérisés par une partie hydrophile chargée positivement. Le plus souvent ce sont des sels d'ammonium quaternaires triméthylés par exemple le bromure de cétyltriméthylammonium CTAB utilisé dans le domaine de la détergence⁵ (Schéma 3).

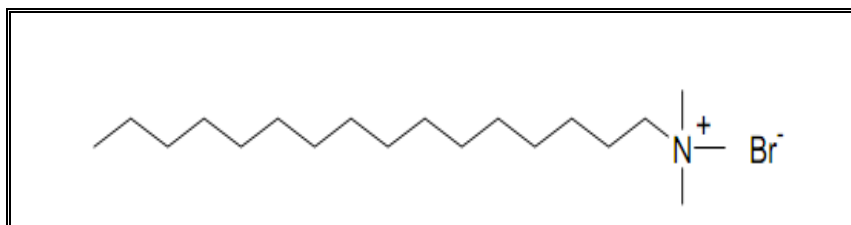


Schéma 3 : Exemple de tensioactif cationique: bromure de cétyltriméthylammonium CTAB.

II.2.3. Les tensioactifs amphotères

Les tensioactifs zwitterioniques, ou amphotères, possèdent sur la partie hydrophile à la fois une charge positive et une charge négative. Ils sont par conséquent électriquement neutres. Cette structure dipolaire peut alors aisément devenir cationique ou anionique selon le pH de la solution. De nombreuses substances naturelles comme les bêtaïnes entrent dans cette classe de tensioactifs (Schéma 4).

⁵ Y. Ono, T. Shikata, *J. Physical Chem.* **2005**, 109, 7412-7419.

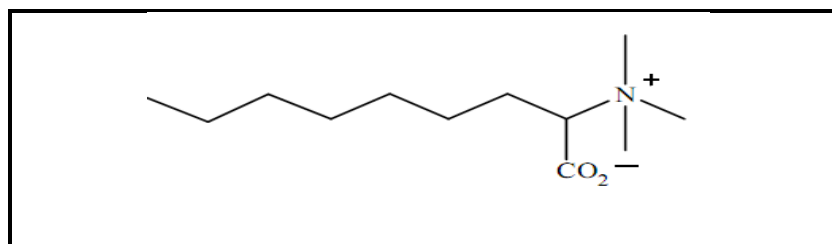


Schéma 4: Exemple de tensioactif amphotère : carboxybétaine.

II.2.4. Les tensioactifs non ioniques

Les tensioactifs non ioniques ne se dissocient pas en solution aqueuse. Ils constituent la classe la plus récente de surfactants. Leur caractère hydrophile provient de la présence, dans leur molécule, d'un groupement polaire de type éther, alcool ou même amine⁶. Les polyoxyéthylènes tels que le Brij ® 35⁷ ou les polyglucosides d'alkyle (APG), utilisés en détergence ou en cosmétique en sont des exemples (Schéma 5).

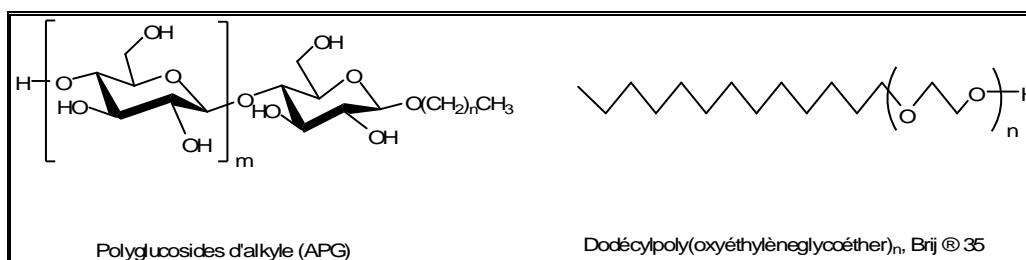


Schéma 5: Exemple de tensioactif non ionique: polyglucosides d'alkyle (APG) et polyoxyéthylènes (Brij ® 35).

L'utilisation de la réaction d'estérification d'un acide gras par des polyalcools naturels comme les sucres a permis l'émergence des tensioactifs issus de matières premières naturelles.

II. 3 Domaines d'application des tensioactifs

Les domaines d'application des tensioactifs sont multiples. Ils jouent le rôle soit de matière première de base pour la formulation de produits détergents ou cosmétiques, soit de produits auxiliaires dans les procédés de fabrication de l'industrie textile, des métaux, du cuir ou du pétrole. Trois grands secteurs d'activité se partagent le marché, à savoir les secteurs de la détergence, de la cosmétique et des usages industriels.

⁶ C. Giardi, V. Lapinte, C. Charnay, J.J. Robin, *Reactive and Functional Polymers*, **2009**, 69, 643–649.

⁷ Dossier Tensio-Actifs Information Chimie **1993**, 67, 347-351.

II.3.1. Secteur de la détergence

Les tensioactifs entrent dans la formulation de tous les détergents et représentent en moyenne 20% de leur composition. Il convient de distinguer la détergence ménagère et la détergence industrielle, cette dernière concernant en grande partie le secteur de l'agroalimentaire. La détergence ménagère quant à elle regroupe plusieurs classes de produits tels que les lessives, les adoucissants, les produits vaisselle et les produits d'entretien. À noter que le secteur des lessives est le plus gros consommateur de tensioactifs avec plus de 50% du marché.

II.3.2. Secteur de la cosmétique

On distingue deux grands domaines, la cosmétique rincée (produits d'hygiène lavant tels que les shampooings, gels douches, dentifrices) et la cosmétique blanche (produits de beauté tels que les crèmes, laits, maquillages et autres produits de soin). La cosmétique rincée utilise les tensioactifs pour leur propriété détergente tandis que la cosmétique blanche privilégie le pouvoir adoucissant et émulsifiant.

II.3.3. Secteur industriel

Outre la détergence et la cosmétique, les domaines d'application des tensioactifs sont nombreux: les industries des additifs alimentaires, des céramiques, des matières plastiques, des peintures, du cuir, du papier, du pétrole, du phytosanitaire, des engrais mais également la métallurgie et le textile.

III. La catalyse enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de masse moléculaire élevée de nature protéique et chirale ⁸. Elles accélèrent d'une manière phénoménale la vitesse des réactions d'un facteur supérieur à 10^{15} sans modifier leur état d'équilibre.

Les biocatalyseurs possèdent une grande spécificité, ils transforment un substrat donné (spécificité de substrat) grâce à une réaction donnée (spécificité de réaction). Ils agissent à des concentrations très faibles et fonctionnent en solution aqueuse, dans des conditions de température et de pH généralement très douces ⁹.

⁸ O. H. Housse, B. M. Trost, *J. Org. Chem.* **1964**, 30, 2502.

⁹ T. Hayashi, Y. Ikada, *Biotechnology and Bioengineering.* **1990**, 35 (5), 518-524.

Toute enzyme est reconnue sur le plan fonctionnel par une région spécifique appelée « site actif ou site catalytique » qui est localisée au fond d'une poche de la zone interne de la protéine et joue le rôle de site de fixation du substrat.

III. 1. Structure des enzymes

Comme toute protéine l'enzyme est constituée d'enchaînement d'acides aminés, qui sont reliés les uns aux autres par des liaisons peptidiques qui se forment entre le groupement carboxylique du premier acide aminé et le groupement aminé suivant.



Cette chaîne d'acides aminés détermine la structure primaire de l'enzyme. La structure secondaire des protéines est classiquement définie par le repliement de la chaîne polypeptidique en hélice α ou en feuillet β .

La structure tertiaire se rapporte aux relations dans l'espace des différentes structures, hélices et feuillets. Cette structure est due à la formation de différentes liaisons et interactions, dont les ponts disulfures, les liaisons hydrogène, les liaisons ioniques et les interactions hydrophobes.

Les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique présentent un niveau supplémentaire d'organisation, on parle de structure quaternaire. Les quatre structures sont illustrées dans la (figure 3).

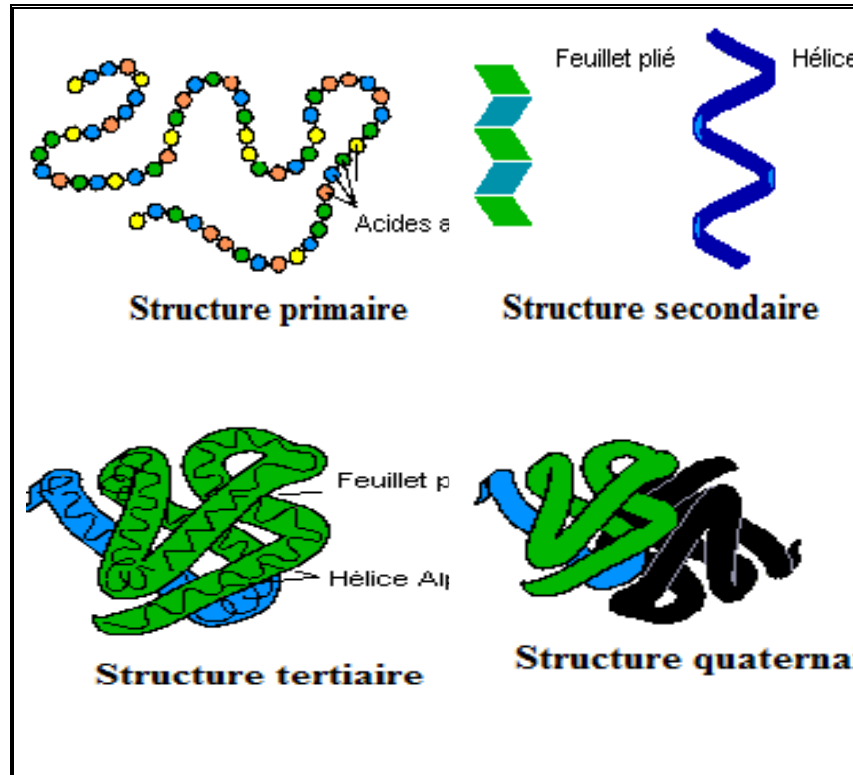


Figure 3: Structure des enzymes

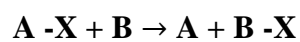
III. 2. Classification

Une classification officielle des enzymes a été adoptée en 1961 par la commission internationale sur les enzymes. Elle permet de classer les enzymes en six groupes selon le type de réaction catalysée (oxydoréductases, hydrolases, lyases, isomérasés, ligases).

-Oxydoréductases: enzymes catalysant les réactions d'oxydoréduction en transférant les ions H^+ et des électrons. Elles sont associées à des coenzymes d'oxydoréduction.

-Transférases: enzyme dont le rôle est de catalyser le transfert d'un groupe fonctionnel d'une molécule (appelée donneur) à une autre (appelée accepteur)

Exemple:



ou A est le donneur et B l'accepteur

-Hydrolase: forment une classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse d'esters, et de liaisons osidiques. Ces enzymes ne nécessitent généralement pas de coenzyme.

-Lyase: enzyme qui catalyse la rupture de différentes liaisons chimiques par des moyens autres que l'hydrolyse ou l'oxydation.

-**Isomérase** : enzyme qui catalyse les changements au sein d'une molécule, souvent par réarrangement des groupements fonctionnels et conversion de la molécule en l'un de ses isomères.

-**Ligases « synthèses »**: enzyme qui catalyse la jonction de deux molécules par de nouvelles liaisons.

Un grand nombre d'enzymes telles que des lipases, des estérases, des protéases, et cellulases obtenues à partir d'animaux, de plantes et de microorganismes peuvent être utilisées comme biocatalyseurs de réactions régiosélectives dans différents systèmes de solvants¹⁰.

Parmi toutes les classes d'enzymes, les lipases attirent actuellement beaucoup l'attention. Ce sont une classe très importante de biocatalyseurs pour des réactions biotechnologiques. Leur stéréo-, chimio- et régio-sélectivité en font un outil, extrêmement intéressant pour le chimiste organicien et les industriels¹¹.

III. 3. Dénaturation des enzymes

La conformation d'une enzyme est liée à la structure secondaire et tertiaire, elle est réalisée par l'intermédiaire de liaisons de faible énergie. La sensibilité des enzymes en fonction de leur environnement physico-chimique comme la température, le pH et la force ionique ont un impact profond sur la stabilité générale de la structure protéique¹².

La dénaturation se définit comme la perte de la conformation native d'une protéine lorsque les interactions entre résidus sont perturbées, cette modification de conformation affecte généralement la géométrie du site actif, ce qui a un impact directe sur l'activité catalytique (Figure 4).

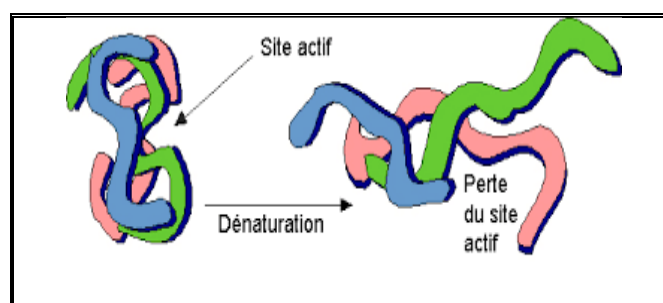


Figure 4: Site actif d'une enzyme

¹⁰ L. Cao, Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design, Wiley-VCH, 2005,334.

¹¹ V.M. Balcão, A.L. Paiva, F. Xavier Malcata, *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18, 392-416.

¹² S. Kumar, C.J. Tsai, R. Nussinov, *Biochemistry*, 2001, 40(47), 14152-65.

III. 4. Facteurs influençant l'activité enzymatique

Il est connu que la température, le pH et la concentration du substrat sont les principaux facteurs qui influencent l'activité enzymatique en milieu aqueux tout comme en milieu non aqueux.

III. 4. 1. La température

Chaque enzyme possède un niveau de stabilité thermique qui lui est propre. Cette stabilité thermodynamique s'exprime à l'aide de deux paramètres, soit par l'énergie libre (ΔG) d'une protéine qui représente la somme des interactions au sein de sa structure et par sa température de fusion qui correspond à la température où 50% de l'intégrité de la structure de la protéine est compromise. Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) à une température donnée est également un paramètre couramment utilisé pour caractériser la stabilité d'une protéine. La stabilité thermodynamique dépend de la quantité d'énergie à fournir pour outrepasser les barrières énergétiques régissant le maintien de la structure tertiaire de la protéine¹³. Plus ces barrières sont élevées, meilleure est la résistance de la structure de la protéine face à un traitement à la chaleur.

III. 4. 2. Le pH

Le pH et la température agissent en synergie sur la conformation de l'enzyme et sa structure tridimensionnelle modifiant ainsi son activité autour de sa température et son pH optimaux. Le pH et la température ont un effet non monotone sur l'activité enzymatique avec la présence d'un optimum comme le montre la figure 5¹⁴.

¹³ C. Vieille, G.J. Zeikus. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2001**, 65(1), 1-43.

¹⁴ J. Pelmont, *Enzymes Catalyseurs du monde vivant Grenoble Sciences*, **2000**, 1040.

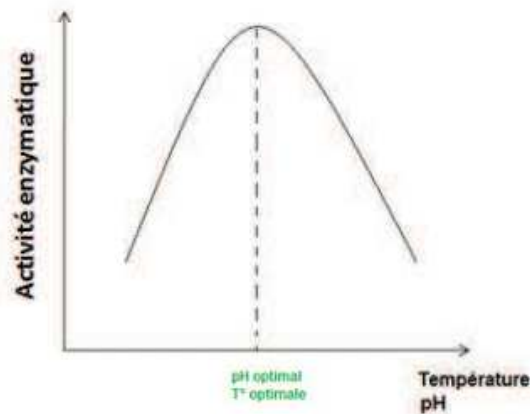


Figure 5: Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique

III. 5. Enzymes immobilisées

Les enzymes présentent un fort intérêt dans le domaine de la biocatalyse, un avantage distinct dû à leur spécificité, leur biodégradabilité et la limitation de la formation de sous produits. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel cette stabilité limite souvent son application pratique surtout à l'échelle industrielle. Pour compenser les problèmes liés à l'instabilité des enzymes, il est nécessaire de les immobiliser.

Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support solide. On cherche généralement à conserver son activité enzymatique. L'immobilisation des enzymes permet par ailleurs d'améliorer le contrôle des opérations, de faciliter la récupération du produit final, d'éviter la contamination du biocatalyseur et augmenter sa stabilité dans le temps, ce qui est souvent le cas du fait de la structure plus rigide conférée par l'immobilisation aux enzymes. Tous ces avantages font de l'immobilisation la méthode la plus utilisée pour assurer la stabilité des enzymes au sein d'un procédé ¹⁵.

III. 6. Différentes méthodes d'immobilisation

Plusieurs méthodes d'immobilisation des enzymes ont été décrites dans la littérature ^{16,17}. Les principales possibilités d'immobilisation des enzymes sont:

- 1- L'adsorption sur un support inerte (Immobilisation par adsorption)

¹⁵ P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 1019-1032.

¹⁶ B. Ozturk. Immobilization of lipase *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports, Master of Science, İzmir Institute of Technology, Turkey. **2001**, 35-39.

¹⁷ P.J. Worsfold, *Enzymes, Pure & Appl. Chem.* **1995**, 67 (4), 597-600.

- 2- Le piégeage physique dans des gels (Immobilisation par inclusion).
- 3- La réticulation avec des réactifs bi ou multivalents (Immobilisation par réticulation).
- 4- La liaison covalente entre un porteur et des groupes fonctionnels de l'enzyme (Immobilisation par liaison covalente).

III. 6. 1. L'immobilisation par adsorption

L'immobilisation par adsorption est une méthode physique qui consiste à fixer l'enzyme au support via des interactions hydrophobes (liaison de Van Der Waals) et hydrophiles (liaison électrostatique, liaison hydrogène) (Figure 6).

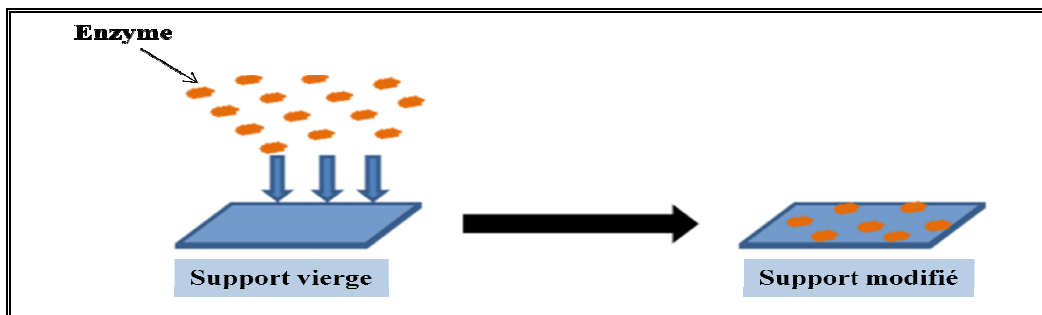


Figure 6: Adsorption des enzymes sur un support

L'efficacité de l'immobilisation est donc tributaire des propriétés de surface à la fois du support et de l'enzyme, qui, elles mêmes sont dépendantes des conditions opératoires (pH, milieu aqueux ou organique etc...) ²³. Dans ce procédé la fixation de l'enzyme peut être réalisée sur plusieurs types de supports (naturel, synthétique, organique, inorganique) ce qui fait d'elle la méthode la plus utilisée à l'échelle industrielle ^{23, 24}.

III. 6. 2. L'immobilisation par inclusion

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière dans la matrice d'un polymère ou dans une micro capsule. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme grâce à une porosité du gel suffisante (Figure 7).

Plusieurs polymères, entre autre l'alginate, le chitosan, le gel depolyacrylamide et le gel d'amidon sont utilisés. Cette technique d'immobilisation a été appliquée sur plusieurs

types d'enzymes par exemple la lipase de *Candida rugosa* et la lipase Pancréatique du porc qui ont été encapsulées dans un gel d'alginate pour la synthèse d'esters ¹⁸.

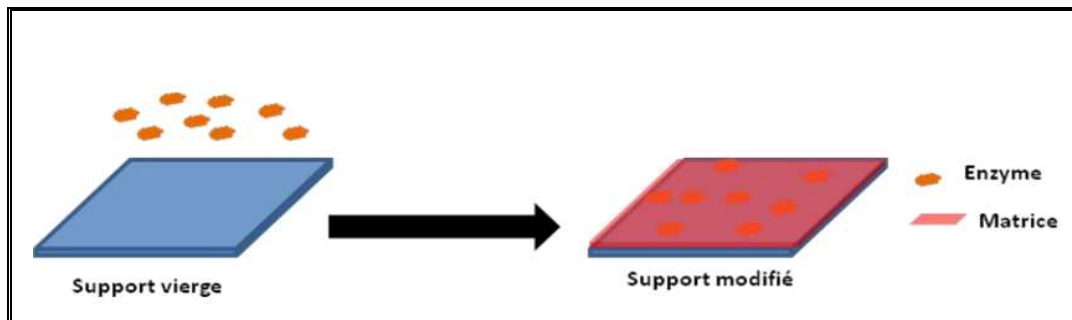


Figure 7: Inclusion des enzymes sur une matrice de support

III. 6. 3. La réticulation

La réticulation consiste à établir des liens covalents entre molécules d'enzymes ou entre molécules d'enzymes et de protéines inertes par des liaisons chimiques ^{19,20} à l'aide d'un réactif polyfonctionnel tel que le glutaraldéhyde. On obtient un réseau enzymatique tridimensionnel qui contrairement à l'enzyme seule est insoluble.

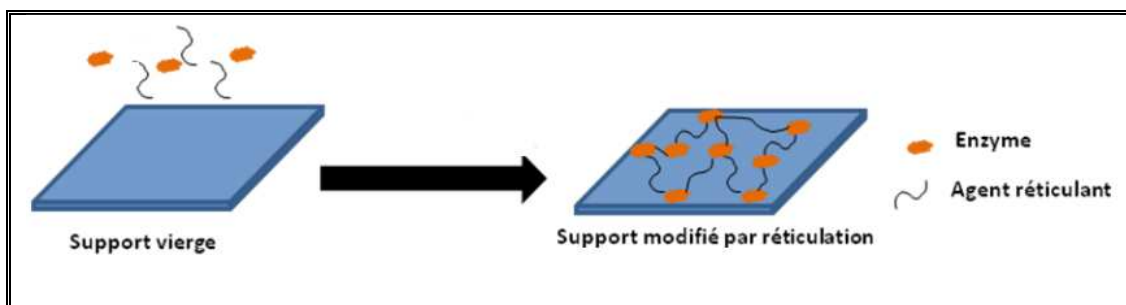


Figure 8: Réticulation des enzymes

III. 6. 4. L'immobilisation par liaison covalente

Cette immobilisation est réalisée par l'intermédiaire des liaisons covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support. A priori, il faut activer soit l'enzyme, soit le support. On choisit généralement d'activer le support, car

¹⁸ G. Ozyilmaz, E. Gezer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 64, 140-145.

¹⁹ S.V. Dzyadevych, V. N. Arkhypova, A. P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future.* IRBM 29 171-180.

²⁰ W. Mindt, P. Racine, P. Schlapfer. *Enzyme electrode.* US Patent 3.838.033. **1974.**

l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme peut conduire à la dénaturation de l'enzyme. Cette méthode est considérée comme une méthode irréversible non seulement pour sa capacité à rigidifier la conformation de l'enzyme et à en modifier les caractéristiques chimiques, mais aussi parce qu'elle peut impliquer des changements drastiques des performances de l'enzyme en termes d'activité, de sélectivité et de stabilité²¹.

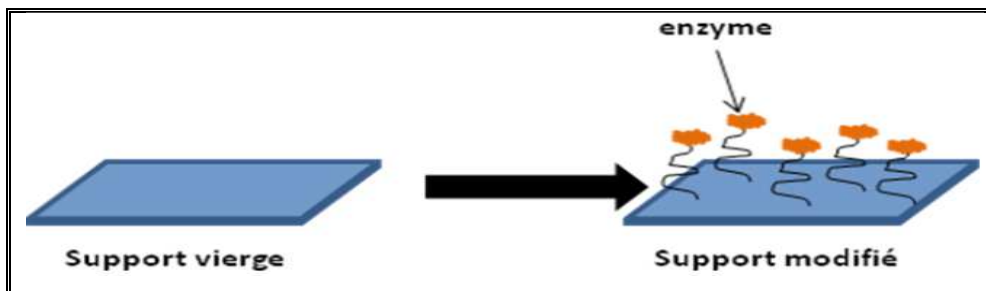


Figure 9: Immobilisation des enzymes par liaison covalente

IV. Les lipases

La majorité des biocatalyseurs utilisés pour l'acylation de divers substrats et en particulier les peptides appartient à la famille des lipases. Ce sont des hydrolases d'esters carboxyliques et appartiennent à la classe des triacylglycérols acyl-hydrolases (EC/3.1.1.3). Ce sont des enzymes largement répandues dans la nature. Elles ont des origines diverses (bactérienne, fongique, végétale, animale, ...) et présentent un panel de spécificités de substrat très large par rapport à d'autres classes²².

IV.1. Structure des lipases

Toutes les lipases de structure connue à ce jour présentent une base structurale commune composée de 8 feuillets β hydrophobes reliés entre eux par 6 hélices α amphiphiles (Schéma 6) formant un repliement dit α/β ²³. Elles possèdent un site actif composé d'une triade catalytique constituée de sérine, histidine et d'acide aspartique protégée par une boucle amphiphile appelée volet.

Le site actif des lipases n'est généralement pas accessible au solvant et au substrat, lorsque l'enzyme est sous sa forme inactive. La face hydrophobe de ce volet est orientée vers l'intérieur du site actif, on parle de conformation fermée. Le passage de la forme inactive à la

²¹ L. Cao, Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design, Wiley-VCH, 2005,334.

²² F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2001, 11, 949-954.

²³ D. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. Franken, M. Harel, S. Remington, L. Silman, J. Shrag, J. Sussman, K. Verschueren, A. Goldman, A. *Protein Engineering*, 1992, 5, 197-211.

forme active s'accompagne d'un mouvement de ce volet exposant ainsi sa face hydrophobe vers l'extérieur du site actif et créant une surface supposée interagir avec l'interface « lipide-eau ». Ce phénomène est appelé activation interfaciale. L'activation est une étape essentielle lors de la catalyse. Des études montrent que des liaisons hydrogène entre un acide aminé (arginine 86 noté Arg 86) et la surface de l'enzyme stabilisent la conformation du « lid » dit ouvert^{24,25}. A l'interface « eau-lipide », il y a un phénomène de désolvatation de cet acide aminé (Arg 86) qui joue un rôle clé dans le processus d'activation^{26,27}.

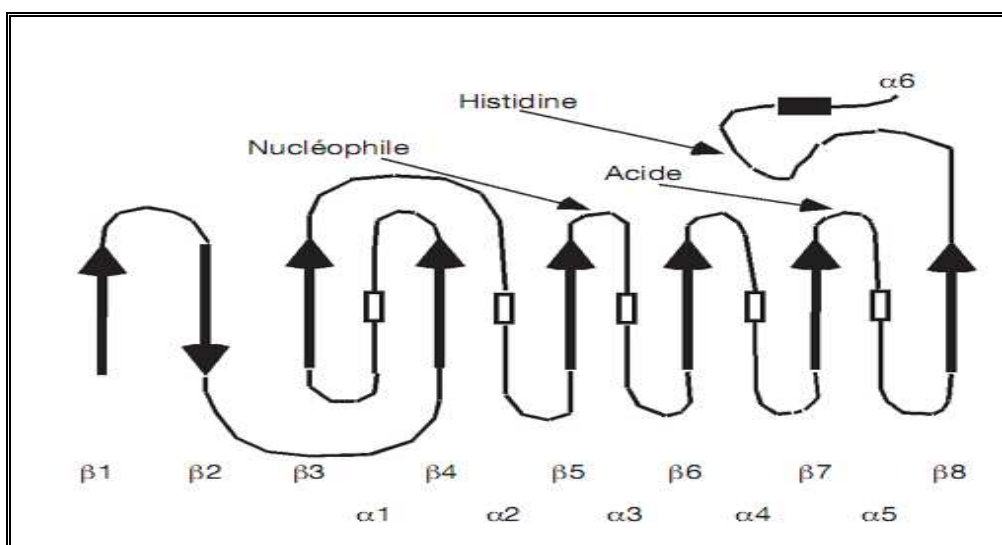


Schéma 6 : Schéma du repliement α/β . Les flèches représentent les feuillets β et les rectangles les hélices α . Le rectangle noir représente le volet amphiphile

Ci-après à titre d'exemple la structure de la lipase de *Mucor meihei* (Schéma 7).

²⁴ R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 66, 15–32.

²⁵ M. Holmquist, M. Nodn, K. Hult, *Lipids.* **1993**, 28, 721-726.

²⁶ P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser, R. Miller, Lipases at interfaces: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2009**, 147, 237-250.

²⁷ M. P. Egloff, *Protein Sci.* **1995**, 4, 44-57.

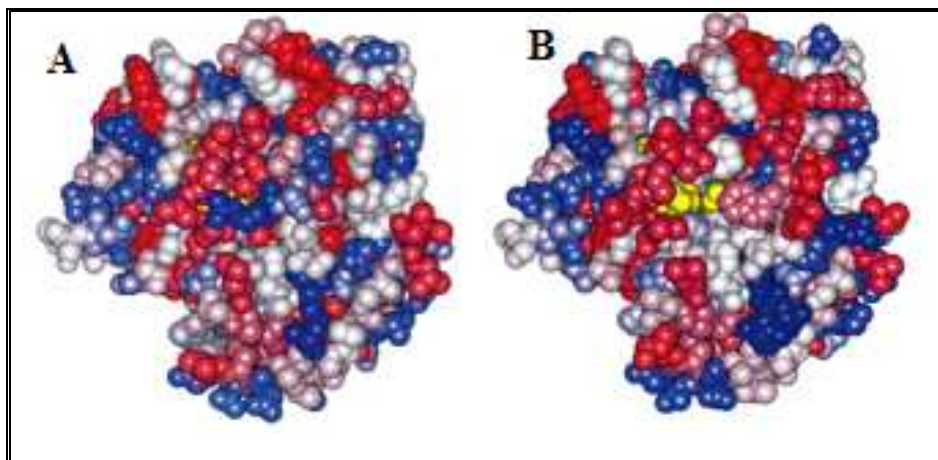


Schéma 7: Structure de la lipase de *Mucor miehei* dans sa forme fermée (A) et ouverte (B).

IV.2. Mécanisme d'action des lipases

Le mécanisme d'acylation à deux substrats catalysés par la lipase selon le modèle bi-bi ping-pong²⁸ (Schéma 8).

Le site actif des lipases est formé par une triade d'acidoamine. L'acide aspartique (Asp), l'histidine (His) et la sérine (Ser).

-Dans une première étape : La combinaison entre Asp-His augmente la densité électronique de l'hydroxyle primaire de la sérine ceci permet une attaque nucléophile sur le carbone de la fonction carboxyle du donneur d'acyle (R_1COOR_2). La moitié acyle du substrat est liée d'une manière covalente à l'enzyme en formant l'intermédiaire acyl-enzyme avec libération de l'alcool R_2OH .

-Dans une deuxième étape : Cet intermédiaire acyl-enzyme est attaqué, par une molécule nucléophile (eau, alcool, amine, par exemple), pour donner un deuxième intermédiaire. Ce dernier se dissocie en libérant le groupe acyle partant (R_1-CO) désormais lié au nucléophile ($R_1-CO-Nu$) restituant ainsi la lipase dans son état initial.

²⁸ (a) F. X. Malcata, H. R. Reyes, H.S. Garcia, C. G. Hill, C. H. Amundson, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 426-446. (b) K. Faber. "Biotransformations in organic chemistry", 5th edition. Springer, 22. **2004**. (c) D. Reyes, N. Lopez, M. Ferrer, F. Plou, A. Ballesteros. *Biocatalysis and biotransformation*. **2005**. 23 (1), 19-27.

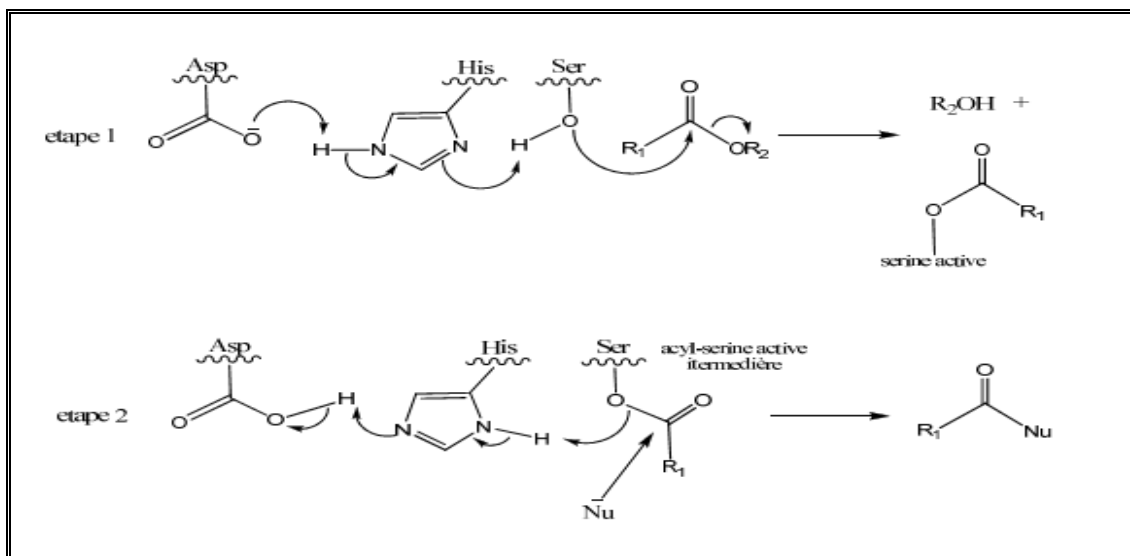


Schéma 8: Mécanisme réactionnel de la triade catalytique.

IV.3. Réactions catalysées par les lipases

Selon le mécanisme de catalyse décrit précédemment, les lipases peuvent catalyser différents types de réactions (Schéma 9).

- En milieu aqueux, les lipases catalysent spécifiquement l'hydrolyse de la liaison esters.
- Dans les milieux pauvres en eau, les lipases catalysent la réaction inverse, c'est-à-dire la synthèse de liaisons esters. La synthèse d'une liaison ester, peut se faire selon trois types de réactions comme l'estérification, la tran estérification et l'interestérification dans des solvants organiques.

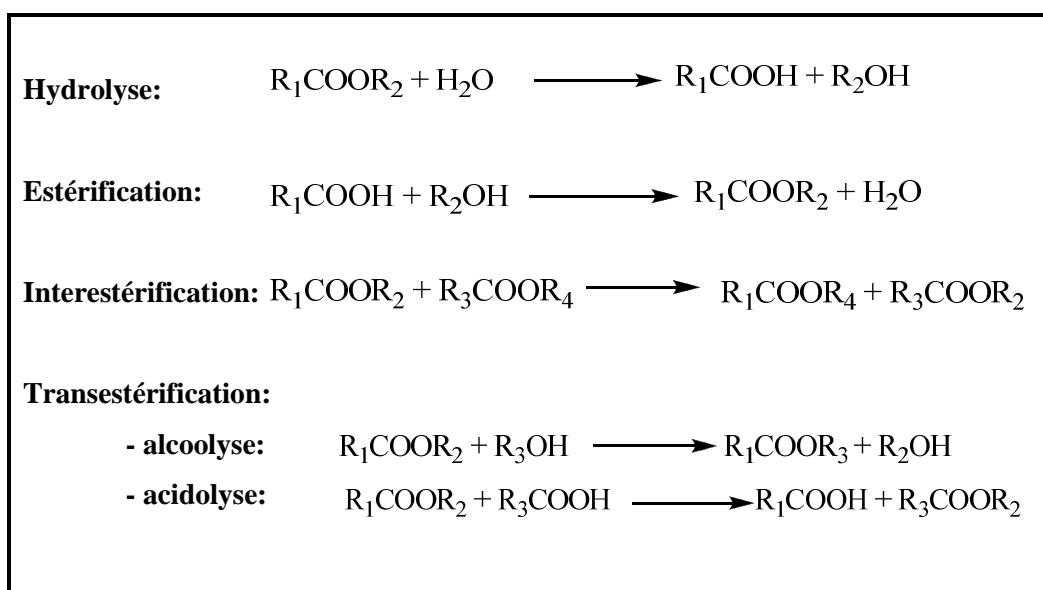


Schéma 9: Ensemble des différentes réactions catalysées par des lipases.

V. Les esters des sucres

Les esters d'acides gras et de sucres sont des tensioactifs non-ioniques dont la partie hydrophobe est une chaîne grasse (apolaire) et la partie hydrophile un sucre (polaire). Grâce à leur structure amphiphile, ces composés possèdent des propriétés spécifiques (détergent, émulsifiant, dispersant, agent moussant et solubilisant). Ceci permet leur utilisation dans l'industrie agro-alimentaire, cosmétique, détergente et pharmaceutique. Plus récemment, des propriétés antibiotique, antitumorale et insecticides ont été mises en évidence, impliquant ainsi une production beaucoup plus importante.

V.1. Synthèse d'esters de sucres

Les esters de sucres amphiphiles et de structures simples ne sont pas disponibles dans la nature. Leur synthèse est réalisée par voie chimique ou par voie enzymatique. La réaction envisagée est une estérification ou une trans estérification entre un sucre et un acide gras ou un ester gras (schéma 9).

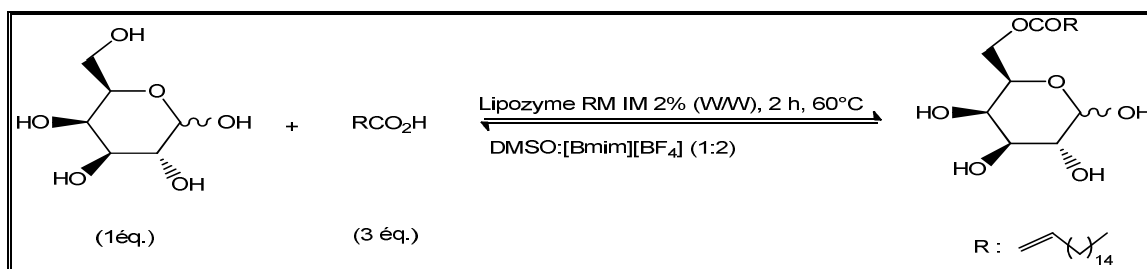
V. 2. Synthèse d'esters de sucres par voie enzymatique

Au cours de ces dernières années, le recours aux biocatalyseurs en synthèse organique a augmenté de façon considérable pour effectuer des réactions chimiques très sélectives. Parmi les principaux avantages liés à l'utilisation de cette méthode biocatalytique citons :

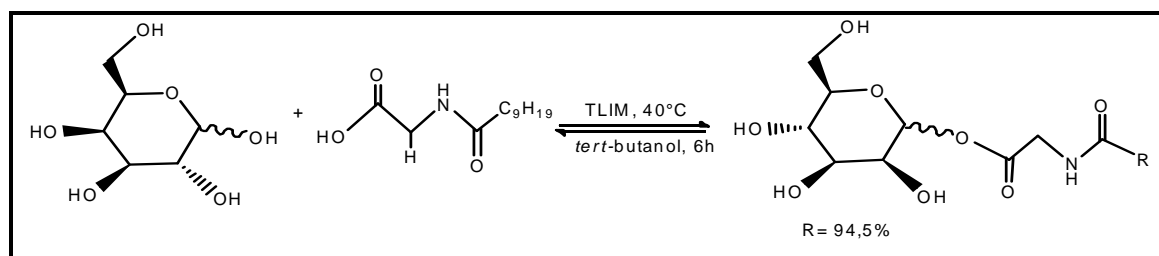
- 1- Une mise en œuvre facile.
- 2- Des conditions réactionnelles douces: température en dessous de 100°C, pression atmosphérique, et pH proche de la neutralité, ce qui entraîne la formation de produits ultra-pure, incolore et sans odeur. Ces conditions sont aussi intéressantes dans le cas de la synthèse de molécules fragiles.
- 3- Grande spécificité catalytique : chimio-, régio-, et énantio- sélectivités élevées. Les réactions enzymatiques ne donnent que rarement des produits secondaires.
- 4- Les vitesses des réactions catalysées par des enzymes sont multipliées par des facteurs compris entre 10^6 et 10^{12} par rapport aux réactions correspondantes sans catalyseur.
- 5- Protection de l'environnement.

Exemple de synthèse enzymatique:

- E. Abdulmalek et coll ²⁹ ont utilisé la Lipozyme RM IM, pour la synthèse du monoester de galactose, par estérification avec l'acide oléique dans un mélange de solvant (DMSO: [Bmim][BF₄] / 1: 20) à 60°C pendant 2 h . Le produit est obtenu avec une conversion de 67% (Schéma 10).

**Schéma 10:** Synthèse de 6-O-monoester de galactose.

- A. Dong et coll ³⁰ ont utilisé la lipozyme (TLIM), pour réaliser la réaction d'estérification enzymatique de D-Galactose avec le N-décanoylglycine dans le *tert*-butanol. Après 6h on obtient un excellent rendement 94,5% (Schéma 11).

**Schéma 11:** Estérification enzymatique de D-Galactose avec N-décanoylglycine.

- N. Galonde et coll ³¹ ont décrit la synthèse d'esters de D-Mannose avec le vinyle myristate en présence la CAL B, en milieu liquide ionique [Bmpyr][TFO] à 80°C. Le produit est obtenu avec un rendement de 72,2% comme illustré sur le schéma suivant.

²⁹ E. Abdulmalek, H. Salami Mohd Saupi, M. Basri, A. B. Salleh, R. N. Zaliha, R. Abd Rahman, M. B. Abdul Rahman, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, 76, 37.

³⁰ A. Dong, Z. Xiaohui, Y. Zhiwen, *Carbohydrate Research.* **2015**, 414, 32-38.

³¹ N. Galondea, Y. Brostauxb, G. Richarda, K. Notta, C. Jérômed, M. L. Fauconniera. *Process Biochemistry.* **2013**, 48, 1914–1920.

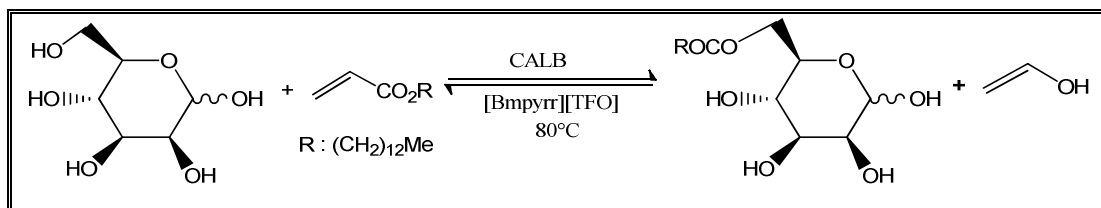


Schéma 12: Transestérification enzymatique du D-Mannose par le vinyle myristate

V.3. Influence du milieu réactionnel sur la synthèse enzymatique des esters de sucre

L'optimisation de la synthèse enzymatique des esters de sucres doit tenir compte de nombreux paramètres qui peuvent influencer sur la réactivité du substrat et l'activité enzymatique. Notamment, la nature de l'enzyme, la température, le solvant, la quantité d'eau, le rapport molaire entre les substrats ect...

V.3.1. Influence du solvant

Généralement, les hydrolases catalysent des réactions d'hydrolyse en milieu aqueux. Mais depuis, en 1986 les travaux de Klibanov³² ont montré que les hydrolases peuvent être actives dans le milieu organique. Pour de telles synthèses le choix du solvant organique est primordial^{33,34}, lors de la mise au point d'un procédé biocatalytique. Le solvant doit être non toxique et facilement séparable des autres constituants du milieu. Il doit surtout être compatible avec l'activité enzymatique, il ne doit pas affecter la structure tridimensionnelle de l'enzyme ainsi que la couche d'hydratation indispensable à l'activité enzymatique. Le solvant doit en effet être moyennement polaire pour pouvoir solubiliser les substrats et maintenir l'activité de la lipase. Dans les solvants polaires la plupart des lipases sont désactivées, car les solvants polaires absorbent l'eau constitutive de la lipase qui joue le rôle d'un lubrifiant pour que l'enzyme garde sa forme active. D'autre part la solubilité des sucres est augmentée dans les solvants polaires. Enfin le volume de solvant doit également être optimisé afin de ne pas diminuer le contact des réactifs avec l'enzyme.

- L. Li et coll³⁵ ont décrit la synthèse d'esters de fructose avec l'acide laurique en présence de la CAL B) dans plusieurs solvants organiques les conversions obtenues sont illustrées sur le schéma suivant.

³² (a) A. M. Klibanov, *Chltech.* **1986**, 16, 354. (b) A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2767.

³³ F. Chamouveau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul. *J. Mol. Cata. B-Enzy.* **2001**, 11, 949-954.

³⁴ D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul. *Process Biochem.* **1999**, 34, 913-918.

³⁵ L. Li, F. Ji, J. Wang, Y. Li, Y. Bao. *Enzyme and Microbial Technology.* **2015**, 69, 46-53.

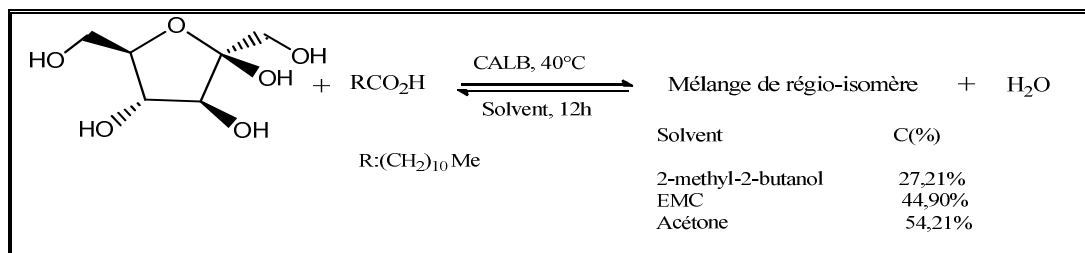


Schéma 13 : Influence de la nature du solvant organique.

V.3.2. Influence de la nature de l'enzyme

L'activité catalytique et la sélectivité sont directement liées à la nature de l'enzyme. D'autre part la forme libre ou immobilisée de l'enzyme joue un rôle très important sur son activité, sa stabilité et, parfois sur sa spécificité³⁶. Des modifications dans l'activité enzymatique ont été observées pour des biocatalyseurs immobilisées³⁷.

➤ L'exemple suivant montre l'influence de la nature de l'enzyme sur la réaction de transestérification du D-Lactose avec le laurate de vinyle³⁸ (Schéma 14).

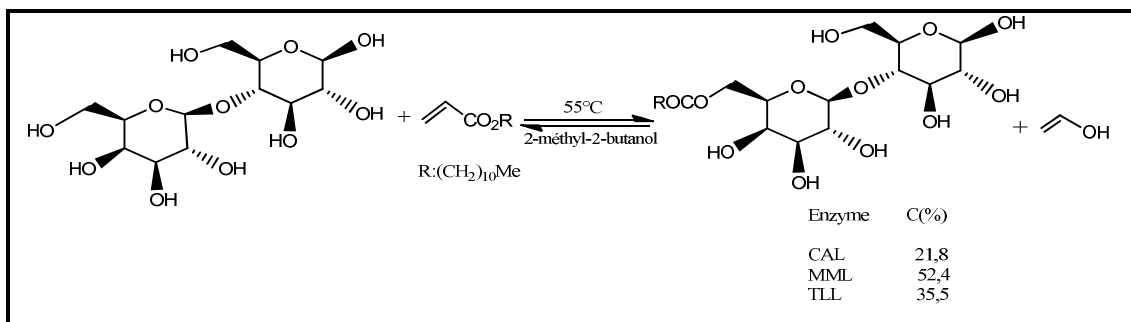


Schéma 14 : Influence de la nature de l'enzyme.

V.3.3. Influence de la température

La température est un des paramètres non négligeables qui affectent l'avancement et le rendement des réactions enzymatiques. En jouant sur la structure et la stabilité de l'enzyme et également sur la cinétique de la réaction on observe des changements dans l'activité

³⁶ W. A. M. Alloue, M. Aguedo, J. Destain, H. Ghalfi, C. Blecker, J. P. Wathelet, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008**, 12, 57-68

³⁷ A. E. Ivanov, M. P. Schneider, *J. Mol. Catal. B: Enzy.* **1997**, 3, 303-309.

³⁸ M. K. Walsh, R. A. Bombyka, A. Wagha, A. Bingham, L. M. Berreau. *J. Mol. Catal. B: Enzy*, **2009**, 60, 171-177.

catalytique³⁹. L'effet de la température est donc très important afin de favoriser la solubilité des réactifs d'une part, et moduler l'activité enzymatique d'une autre part.

- Z.H.Uswatun et coll⁴⁰ ont réalisé une étude concernant l'influence de la température sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du lactose par l'acide caproïque en présence de la lipase de *Candida rugosa* (CRL) immobilisée. Ceci est illustré sur le schéma 15.

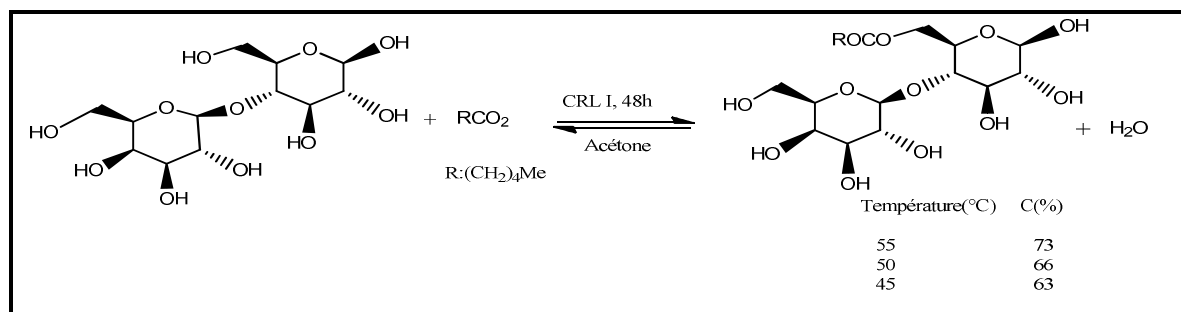


Schéma 15 : Influence de la température.

V.3.4. Influence de la quantité de la lipase

L'avancement de la réaction dépend de la quantité d'enzyme utilisée. Il est donc nécessaire de déterminer la quantité optimale d'enzyme afin d'améliorer les taux de conversion des substrats.

- Emilia et coll. ont réalisé une étude, qui relie la quantité de la lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) et la conversion de l'hexanoyl-D-Xylopyranoside⁴¹ formée lors de la réaction suivante (Schéma 16).

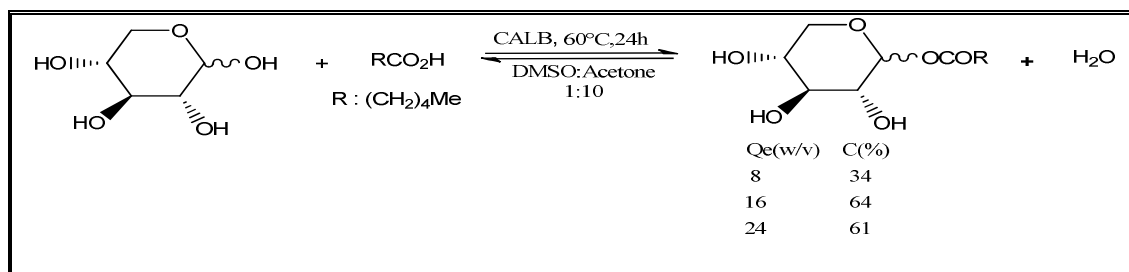


Schéma 16 : Influence de la quantité de l'enzyme.

³⁹ M. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes*. Academic Press, New-York. **1979**.

⁴⁰ Z. H. Uswatun, E. Abdulmalek, S. O. Siti, M. Basri, A. B. Salleh, R. N. Zaliha, M. B. Abdul Rahman, *Food Chemistry*. **2012**, 131,199-205.

⁴¹ E. Abdulmalek, N. Fazriyana Hamidon, M. B. Abdul Rahman, *J. Mol.Catal. B: Enzym.* **2016**, 16, 30109-6.

V.3.5. Influence du temps de la réaction

Dans la littérature, les temps longs sont généralement favorables à la synthèse des esters de sucres et donne des taux de conversions élevées ⁴².

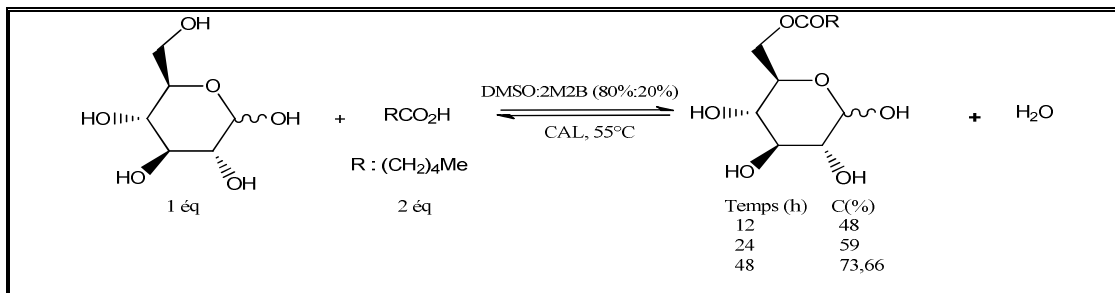


Schéma 17 : Influence du temps.

V.3.6. Influence de la quantité du tamis moléculaire

L'élimination de l'eau produite au cours de la réaction d'estérification par l'ajout du tamis moléculaire, permet le déplacement de l'équilibre thermodynamique vers la formation de l'ester. L'utilisation du tamis moléculaire avec des quantités adéquates conduit ainsi à l'amélioration du taux de conversion des substrats.

- S. Tarahomjoo et I. Alemzadeh ⁴³ ont réalisé l'estérification enzymatique du D-Glucose avec l'acide palmitique en présence de la lipase de *Rhizomucor miehei* dans l'hexane. Après 96 h de réaction, le produit est obtenu avec un taux de conversion fonction de la quantité du tamis moléculaire (Schéma18).

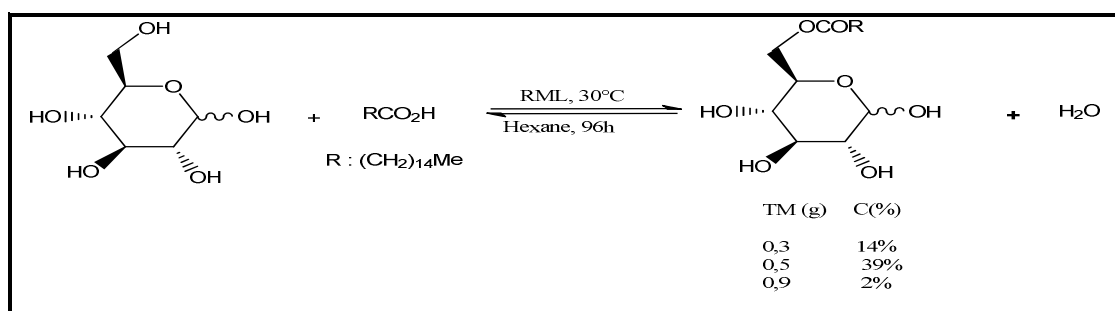


Schéma 18 : Influence du tamis moléculaire.

⁴² Y. Yan, U.T. Bornscheuer, G. L.W. Stadler, *Lipid. Sci. Technol.* **2001**.

⁴³ S. Tarahomjoo, I. Alemzadeh . *J.Enzy. Micro. Tech.* **2003**, 33, 33 -37.

VI. Conclusion

Dans cette partie sont présentés les tensioactifs et particulièrement les esters de sucres qui sont des molécules amphiphiles résultant de l'acylation des oses par une modification structurale prometteuse pour valoriser au mieux le potentiel thérapeutique, cosmétique ou encore agro-alimentaire de ces composés. Ils sont connus pour être des bio-tensioactifs non-ioniques, présentant diverses applications. Leur synthèse par la voie enzymatique est actuellement très répandue. Il est en outre admis qu'une enzyme immobilisée placée en milieu organique exprime de nouvelles propriétés telles que l'augmentation de la thermostabilité et de la spécificité.

Dans ce qui suit, l'optimisation de la synthèse enzymatique d'esters de sucres et d'acides gras avec une lipase immobilisée est réalisée. L'influence des principaux paramètres réactionnels sur l'avancement de la réaction enzymatique est étudiée par la méthodologie des plans d'expériences dans la deuxième partie de ce mémoire.

Chapitre 2

Généralités sur les plans d'expériences et les notions de statistiques.

I. Introduction

Dans toutes les disciplines, il est fréquent de souhaiter étudier un phénomène dépendant de différents paramètres. La méthode intuitive n'est pas toujours la meilleure. Elle consiste généralement à fixer le niveau de toutes les variables sauf une et de mesurer la réponse pour plusieurs valeurs de la variable mobile. Si plusieurs paramètres doivent être étudiés, il faut répéter cette technique pour chaque paramètre. Par exemple, si l'on souhaite étudier 7 paramètres à 4 niveaux il faut donc réaliser 16384 (4^7) expériences. Ce nombre d'expériences représente un travail gigantesque et souvent irréalisable.

Pour résoudre ce problème, il faut donc réduire le nombre d'expériences à effectuer sans pour autant perdre sur la qualité des résultats recherchés. L'utilisation d'un plan d'expériences donne alors une stratégie dans le choix des méthodes d'expérimentation. Leur succès dans la recherche et l'industrie est lié au besoin de compétitivité des entreprises, ils permettent une amélioration de la qualité et une réduction des coûts.

L'objectif principal de l'expérimentation est d'établir le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt y , et des variables x_i de type: $y = f(x_i)$.

Pour cela il existe deux approches :

La première est une application classique intuitive adoptée par les chercheurs pendant plusieurs années. Elle consiste généralement à fixer le niveau de tous les facteurs sauf un, puis on recommence la procédure jusqu'au dernier facteur. Malheureusement cette méthode a des inconvénients¹ :

- Les interactions entre les facteurs ne sont pas estimées.
- Beaucoup d'expériences sont exigées quand le nombre des facteurs augmente.
- Seulement une petite partie du domaine expérimental est examinée.
- Les conditions optimums globales ne sont pas trouvées.

Donc cette méthode ne permet pas d'étudier l'évolution du système par rapport à la variation d'un seul facteur (Le modèle mathématique est impossible à ajuster).

La seconde est une approche multivariée qui consiste à varier plusieurs facteurs simultanément. Cette approche est subdivisée en approches séquentiels et simultanés^{2,3}.

¹ B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *J. Phar. Biome. Analy*, **2011**, 56, 141– 158.

² D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Elsevier, Amsterdam, **1997**.

³ Y. Vander Heyden, C. Perrin, D.L. Massart, *Handbook of Analytical Separations*, K. Edition Valkó, **2000**, 163–212.

- L'approche séquentiel consiste à conduire quelques expériences initiales et utilise leurs résultats pour définir les expériences qui suivent ⁴. Cette approche peut être appliquée quand le domaine expérimental contient un optimum inconnu.
- L'approche simultanée donne une représentation du nombre d'expérience prédéfini, d'après une organisation expérimentale précise. Par exemple un plan expérimental ^{5,6,7}. La méthode des plans d'expériences est introduite principalement pour évaluer plusieurs facteurs simultanément et pour prévoir les interactions entre les facteurs.

II. Historique

Les méthodes rigoureuses d'expérimentation, basées sur l'utilisation des plans d'expériences, sont dues aux travaux de Sir Ronald Fisher (1890-1962). Ce brillant mathématicien, très productif dans le domaine de la statistique, a été amené à s'intéresser aux techniques d'expérimentation suite à son emploi, en 1919 à la " Rothamsted Experimental Station" ⁸. On trouve dans les travaux de Fisher les notions de répétition, de constitution de blocs, d'expérience factorielle, d'interactions, d'effets principaux et d'expériences en parcelles divisées ^{9,10}. Les idées de Fisher furent reprises par des spécialistes des sciences agronomiques.

En 1931, Fisher est rejoint à Rothamsted par Frank Yates (1902-1993). De leur collaboration, résultent entre autres de nouveaux développements en ce qui concerne les expériences factorielles, ainsi que les notions d'expériences en blocs aléatoires incomplets et d'expériences factorielles fractionnaires ^{11,12}.

A partir des années 1935-1940, les notions d'expérimentation, qui jusque-là avaient été conçues et appliquées essentiellement dans le secteur agronomique, interviennent également dans le secteur industriel. Des concepts nouveaux apparaissent alors, tels que les plans de Plackett et Burman ¹³, la notion des surfaces de réponses ^{14,15}, l'application de cette notion au cas particulier des mélanges ¹⁶, les plans optimaux ¹⁷.

⁴ B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *Comprehensive Chemometrics*. **2009**, (Chapitre 17), 547–575

⁵ B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *Acta Chromatogr.* **2009**, 21, 161–201.

⁶ B. Dejaegher, A. Durand, Y. Vander Heyden, *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*. **2010**, (Chapitre 2), 11–74.

⁷ D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 4th edition, John Wiley, New York, **1997**.

⁸ W. Tinson, *Plans d'expériences. Constructions et analyses statistiques*, **2010**.

⁹ R. A. Fisher, *Statistical methods for research workers*, Edinburgh, Edition Oliver and Boyd. **1925**, 239.

¹⁰ R. A. Fisher, *J. Ministry. Agric.* **1926**, 33, 503-513.

¹¹ F. Yates, complex experiments (with discussion), *J. R. Statist.* **1935**, 181-247.

¹² W. G. Cochran, *J. Dairy. Sci.* **1941**, 24, 937-951.

¹³ R. L. Plackett, J. P. Burman, *Biomertika*, **1946**, 33 (4), 305-325.

III. Définition et domaine d'application des plans d'expériences

Un plan d'expériences est une méthode pour planifier ou organiser les expériences scientifiques et industrielles dans le but de retirer l'information correspondante à l'objectif fixé préalablement^{18,19}. Leur but est d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expérimentations par rapport à l'objectif que l'on s'est fixé. Les plans d'expériences sont appliqués dans différents domaines des sciences : agronomie, biologie, calcul numérique, chimie, électronique, marketing, mécanique, physique... et cela, à tous les niveaux, depuis la recherche fondamentale jusqu'à la satisfaction du client¹⁸.

IV. Vocabulaire

IV.1. Facteur

Les facteurs sont les variables que l'on désire étudier et qui sont supposées avoir une influence sur le système. Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continues ou discrets, contrôlables ou non contrôlables. Généralement, on prend en compte les facteurs caractérisés par une seule variable naturelle qualitative ou quantitative que l'on contrôle. Les facteurs sont limités par deux bornes, inférieure (bas) et supérieure (haut). On désigne le niveau bas par le signe (-1) et le niveau haut par le signe (+1)²⁰.

IV.2. Réponses

Une réponse expérimentale est une manifestation mesurable que l'on observe lorsque l'on fait varier les paramètres étudiés. Un phénomène peut être éventuellement décrit par plusieurs réponses expérimentales²¹.

¹⁴ G. E. P. Box, *Biomertika*, **1952**, 39 (1), 49-57.

¹⁵ G. E. P. Box, K. B. Wilson, *Journal of Statistical Royal Society*, **1951**, 13 (1), 1-45.

¹⁶ H. Scheffé, *J. R. Statist*, **1958**, 20 (2), 344-360.

¹⁷ J. Kiefer, *J.R. Statist.Soc*, **1959**, 21 (2), 272-319.

¹⁸ C. Pierre, Les plans d'expériences partie 1: Principes généraux, *Revue: Contrôles- Essais- Mesures*, **2005**, 69-72.

¹⁹ P. Dagnelie, Le plan d'expérience évolue, *Revue MODULAD*, N° 38, **2008**.

²⁰ J.J. Rousselle, Thèse de doctorat. Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale. Université François Robelais, **2003**.

²¹ J. J. Dreesbeke, J. Fine, G. Saporta, Plans d'expériences: applications à l'entreprise. Editions *TECHNIP*, **1997**.

IV.3. Domaine expérimental et domaine d'étude

Une interprétation géométrique permet de mieux comprendre la construction des plans d'expériences et de mieux interpréter les résultats. Lorsqu'il y a n facteurs, il faut raisonner dans des espaces à n dimensions. Pour fixer les idées, on prend l'exemple de deux facteurs x et y à deux niveaux (+1) et (-1). Le domaine expérimental est le plan x - y dans lequel toutes les valeurs de x et de y sont possibles. Mais, en général, un expérimentateur limite les variations des facteurs étudiés. On appelle domaine d'étude tous les points de la surface délimitée par les niveaux bas et haut de chaque facteur (surface en tramé bleu de la figure 10)²².

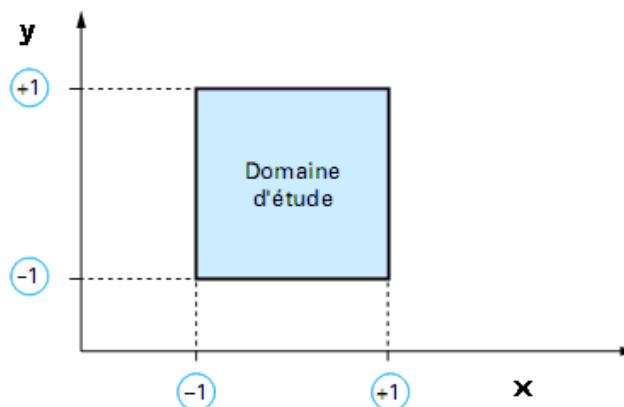


Figure 10: Définition du domaine d'étude

IV.4. Matrice d'expérience

La matrice d'expérience est un objet mathématique qui représente, sous forme codée ou non codée, l'ensemble des expériences à réaliser. C'est un tableau constitué de n lignes correspondant aux n expériences à réaliser et de k colonnes, correspondant aux k variables étudiées. L'élément X_{ij} de la matrice ainsi formée correspond à la valeur des niveaux que prend la $j^{\text{ième}}$ variable à la $i^{\text{ième}}$ expérience²³.

IV.5. Effet d'un facteur

L'effet d'un facteur x correspond à la variation de la réponse y lorsque x passe d'une valeur au niveau -1 à une autre valeur au niveau +1, comme indiqué sur la (figure 11). Graphiquement, plus l'inclinaison est forte, plus l'effet est important, et cela donne déjà des indications

²² J. Goupy, Plans d'expériences, Techniques de l'Ingénieur, Analyse et Caractérisation. **1998**, 1-28.

²³ J.J. Rousselle, Thèse de doctorat. Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale. Université François Robelais, **2003**.

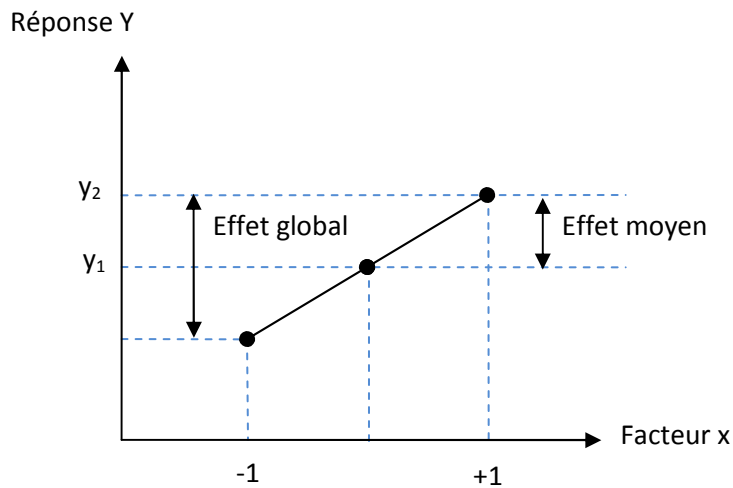


Figure 11: Illustration de l'effet d'un facteur

IV.6. Interaction

L'effet d'un facteur dépendant de la valeur prise par un autre facteur est appelé interaction. Cette interaction se traduit sur un diagramme (Figure 12) par le fait que les deux droites ne sont pas parallèles. Plus les droites s'écartent de la parallèle, plus le degré d'interaction est élevé.

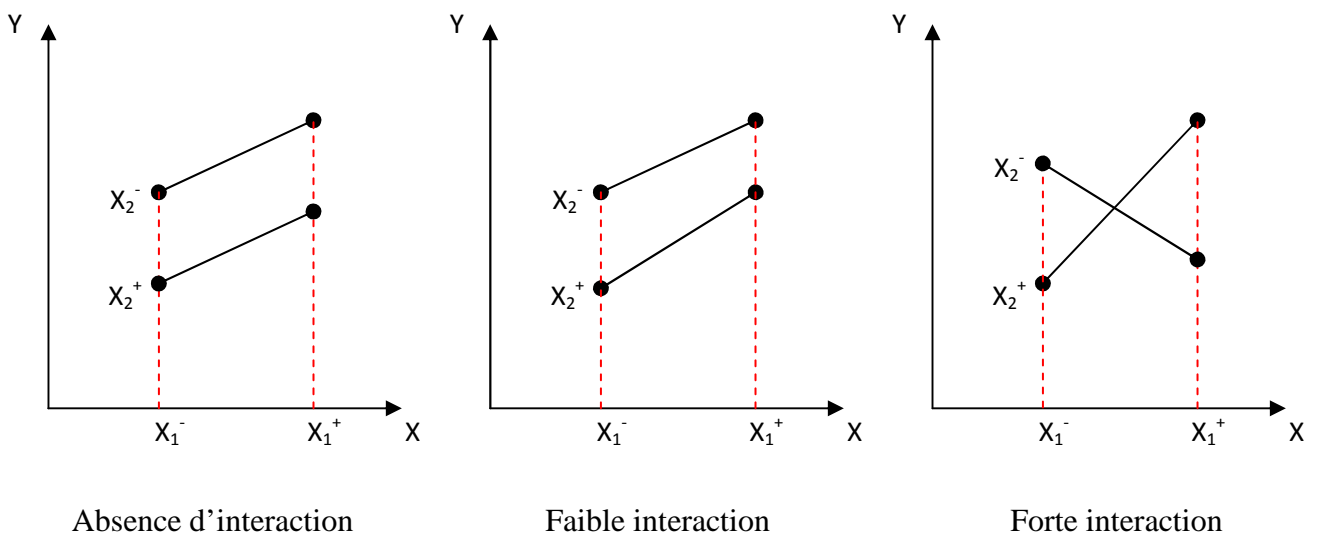


Figure 12: Illustration d'une interaction

IV.7. Modèle mathématique

C'est une relation mathématique qui montre le changement dans une réponse produit par le changement d'un ou plusieurs facteurs ²⁴. Le but de modéliser la réponse par un modèle mathématique est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences. Ce modèle est appelé *modèle postulé* ou *à priori* ²⁵.

V. Différents types des plans d'expériences

Il existe trois grandes familles de plans d'expériences, plans de mélange, plans de criblage et plans de modélisation ou surfaces de réponses.

V.1. Plans de mélanges

Les plans de mélange sont des plans particuliers adaptés à l'étude des facteurs dépendants. Ils sont principalement utilisés pour l'étude de l'influence des proportions des constituants d'un produit sur une réponse donnée ²⁶.

V.2. Plans de criblage

L'objectif de ces plans est de découvrir les facteurs les plus influents sur une réponse donnée. Aucune relation précise entre les variations des facteurs et celle de la réponse n'est établie. Parmi les plans proposés : plans factoriels complets à deux niveaux, plans factoriels fractionnaires et plans de Plackett-Burman ²⁷.

V.2.1. Plans factoriels complets à 2 niveaux

Les plans factoriels complets en tant que plans d'expériences sont issus des travaux de R.A.Fischer. Chaque facteur a 2 niveaux. On aura donc 2^k (k est le nombre de facteurs) essais au total. Un plan factoriel permet d'estimer, non seulement les effets des facteurs (A, B, C, \dots), mais également toutes leurs interactions deux à deux, trois à trois, ..., jusqu'à $A.B.C.D.E, \dots$, qui fait intervenir les k facteurs de l'étude ²⁸.

²⁴Engineering statistics handbook, Process Improvement, (Chapitre 5), 2006.
<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/pri.htm>

²⁵ Goupy J., Les plan d'expérience, *revue MODULAD*, 2006, 34, 74-116.

²⁶ Goupy J., Pratiquer les plans d'expériences. Editions DUNOD, 2005.

²⁷ H. Angellier, Thèse doctorat. Nanocristaux d'amidon de maïs cireux pour applications aux composites. Université Grenoble 1, 2005.

²⁸ J. Goupy, Etude comparative de divers plans d'expériences, *Revue statistiques appliquées*. 1990, tome 38, N°4, 5-44. http://www.numdam.org/item?id=RSA_38450

Les avantages des plans factoriels complets sont nombreux et nous n'en citerons que les principaux:

- Comme chaque facteur ne prend que deux niveaux les essais sont faciles à contrôler et les risques d'erreurs sont minimisés.
- Les plans factoriels complets sont des plans d'expériences optimaux qui étudient toutes les combinaisons possibles des niveaux des facteurs traités et qui nous garantissent les meilleurs résultats.
- La modélisation mathématique est immédiate.
- Les résultats obtenus avec un premier plan peuvent être utilisés en partie ou en totalité soit, pour explorer une zone du domaine expérimental soit, pour établir un modèle mathématique de degré plus élevé.

Le seul inconvénient de ces plans est qu'ils obligent à faire beaucoup d'essais. Par exemple, pour étudier simplement sept facteurs il faut réaliser 128 expériences. Cependant, de nombreuses interactions sont nulles et certains facteurs sont sans influence. C'est pourquoi les plans factoriels fractionnaires ont été développés.

V.2.2. Plans fractionnaires à deux niveaux

Les plans fractionnaires permettent de réduire la charge expérimentale en focalisant l'attention sur les effets les plus intéressants puisqu'en physico-chimie et comme dans beaucoup d'autres domaines les interactions d'ordre 2 (A.B, A.C, B.C) et au-delà (A.B.C) sont bien souvent négligeables.

Lorsque le nombre de facteurs augmente, la solution proposée par les plans fractionnaires, consiste à utiliser pour l'étude de k facteurs les matrices des effets des plans complets 2^{k-1} , ou 2^{k-2} , ..., ou 2^{k-p} . Les plans fractionnaires sont appelés pour cette raison plans 2^{k-p} ²⁸.

Les plans fractionnaires sont alors indispensables pour réduire le nombre d'essais.

Ils sont basés sur la théorie des alias que nous allons présenter ci-dessous à partir d'un exemple simple à 3 facteurs.

Le modèle mathématique de la réponse d'un plan factoriel complet à 3 facteurs comporte 8 coefficients :

$$y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{123}X_1X_2X_3$$

Si on effectue 4 essais, on obtient un système de quatre équations à 8 inconnues. Pour réduire le nombre des inconnues, on introduit 4 contrastes (l_0, l_1, l_2, l_3), les coefficients sont aliés dans les contrastes. On adopte le modèle ²⁹ :

$$y = l_0 + l_1x_1 + l_2x_2 + l_3x_3$$

Avec: $l_0 = a_0 + a_{123}$, $l_1 = a_1 + a_{23}$, $l_2 = a_2 + a_{13}$, $l_3 = a_3 + a_{12}$

Dans un plan factoriel fractionnaire, les effets principaux sont toujours aliés avec des interactions.

V.2.3. Les plans de Plackett-Burman

R.L. Plackett et JP. Burman ont publié leur étude en 1946 dans *Biometrika*. Ils expliquent comment construire des plans permettant d'étudier un grand nombre de facteurs avec peu d'essais. Ils attribuent deux niveaux à chaque facteur et supposent que toutes les interactions entre facteurs sont négligeables devant les effets principaux ²⁸. Le plan de Plackett-Burman est basé sur la matrice d'Hadamard qui présente les propriétés suivantes ³⁰:

- 1) les éléments sont +1, -1 ;
- 2) les matrices sont carrées et possèdent un nombre de ligne (ou de colonne) égale à 2 ou un multiple de 4 ;
- 3) ces matrices sont orthogonales, c'est-à-dire que le produit scalaire de deux lignes (ou colonne) est à égale à zéro.

L'inconvénient remarquable concernant les plans fractionnaires est la faiblesse dans l'hypothèse de linéarité des variables (la variation de la réponse est linéaire lorsque le facteur passe du niveau -1 au niveau +1). La modélisation mathématique n'est qu'une première approximation du modèle physique réel. Il faut passer à des plans contenant un plus grand nombre de niveaux par facteurs pour obtenir des modèles du second degré ²⁸.

V.3. Plans de modélisation

L'objectif de ce plan est de trouver la relation mathématique du second degré qui lie les réponses mesurées aux facteurs. Elle est du type :

$$Y = b_0 + \sum b_i x_{ik} + \sum \sum b_{ij} x_{ik} x_{jk} + \sum b_{ik} x_{ik}^2 + \xi_k$$

²⁹ G. Sad, M.C. Sado, Les plans d'expériences, de l'expérimentation à l'assurance qualité. Collection AFNOR, **1991**.

³⁰ J. Goupy, Modélisation par les plans d'expériences, *Techniques de l'ingénieur, mesures et contrôles*. R 275, 1-23.

Les plans factoriels complets sont également utilisables pour la modélisation mais, étant donné qu'il n'y a que deux niveaux par facteur, seuls des modèles du premier degré peuvent être utilisés. L'intérêt de ces plans est de faciliter le développement séquentiel d'une étude. On peut commencer par un plan factoriel et poursuivre l'expérimentation par un plan étoile. On aboutit alors à un plan composite interprétable à l'aide d'un modèle du deuxième degré²⁷.

Il existe plusieurs types de plans du second degré, les plus employés sont :

- Les plans de Doehlert
- les plans composites centrés
- Les plans de Box-Behnken

V.3.1. Les plans de Doehlert

Les points d'expériences des plans proposés par David H. Doehlert^{31, 32} en 1970 remplissent de manière uniforme l'espace expérimental. Pour deux facteurs, les points expérimentaux sont situés aux sommets d'un hexagone régulier et il y a un point au centre (figure 13). Ayant sept points expérimentaux, ce plan permet de calculer au moins sept inconnus, donc sept coefficients. Comme les points expérimentaux sont régulièrement répartis dans l'espace expérimental, il sera facile d'étendre le plan vers n'importe quelle direction de l'espace en ajoutant des points qui seront, eux aussi, régulièrement répartis.

Ces plans permettent également l'introduction facile de nouveaux facteurs. Les nouvelles expériences viendront compléter les premières et aucune expérience ne sera perdue. Le seul inconvénient est de maintenir les facteurs non étudiés à une valeur constante (niveau 0) pendant l'étude des facteurs actifs.

³¹ S. L. C. Ferreira, W. N. L. dos Santos, M. A. Bezerra, V. A. Lemos, J. M. Bosque -Sendra, *Anal Bioanal Chem.* **2003**, 375, 443–449.

³² S. Trabelsi, N. Oturan, N. Bellakhal, M. A. Oturan, *J. Mater. Environ. Sci.* **2012**, 3 (3), 426-433.

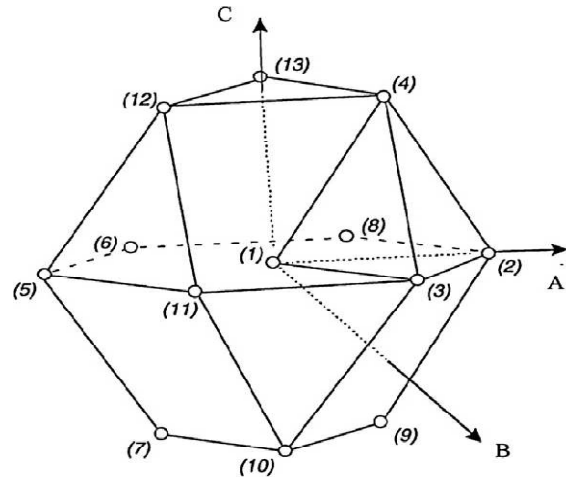


Figure 13 : Plan de Doehlert pour 3 facteurs

V.3.2. Les plans composites centrés

Les plans composites présentent trois parties:

- Les deux niveaux $(-1, +1)$ du plan factoriel complet, 2^f expériences (f , nombre de facteurs).
- Les deux niveaux $(-\alpha, +\alpha)$ du plan étoile, $2f$ expériences.
- Le point au centre du domaine d'étude.

Le nombre total de N essais à réaliser pour f facteur est donné par la relation suivante :

$$N=2^f+2f+1^{2, 5-7, 33}.$$

La valeur de α doit être égale à : $\alpha=(2^f)^{\frac{1}{4}}$. Ces plans présentent l'avantage de se prêter au déroulement séquentiel d'une étude et d'exiger un nombre d'expériences relativement peu élevé³⁰. Le plan composite pour 3 facteurs possède 15 expériences. Le lieu géométrique des points expérimentaux est représenté sur la (figure 14)¹.

³³ G. A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, Edition Marcel Dekker, New York, 1999.

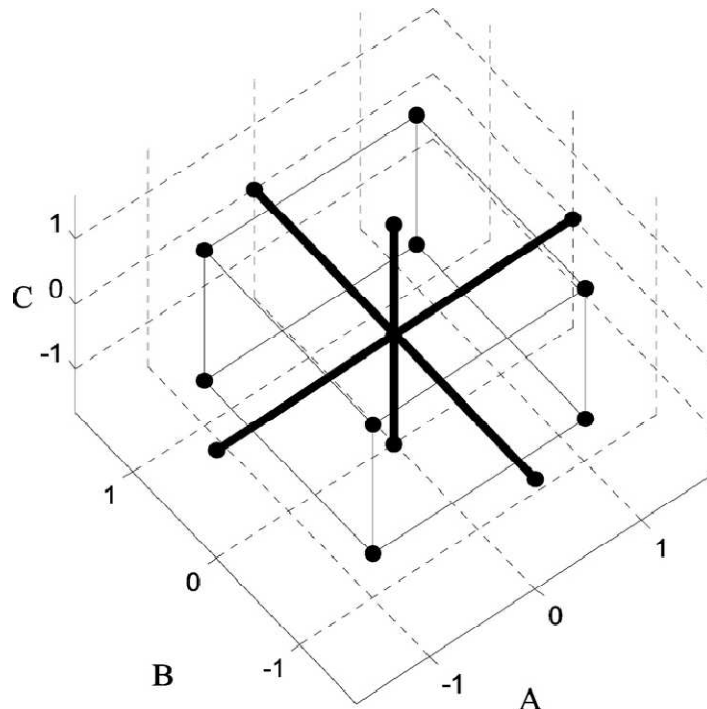


Figure 14 : Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan composite centré à 3 Facteurs.

V.3.3. Les plans de Box-Behnken

Les plans de Box-Behnken sont de mise en œuvre aisée car tous les facteurs ne prennent que trois niveaux : - 1, 0 et + 1, en variables codées ³⁴.

Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (Figure 15). Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point central. La matrice du tableau 1 indique ces douze essais accompagnés d'un seul point central. Dans la pratique on réalise souvent 3 ou 4 points au centre .

³⁴ A. Kamoun, M. M. Chaabouni, H.F. Ayedi, *Techniques de l'ingénieur*, Doc. M 1429, 1-24.

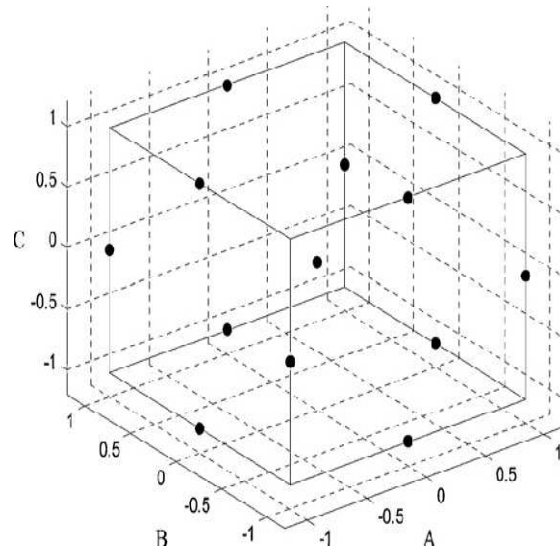


Figure 15: Lieu géométrique des points expérimentaux d'un plan de Box-Behnken à trois facteurs.

Tableau 2: Plan de Box-Behnken pour 3 facteurs

N° essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3
1	1	1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	-1	-1	0
5	1	0	1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	-1	0	-1
9	0	1	1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	-1	-1
13-15.	0	0	0

V.3. 3.1. Avantage du modèle de Box-Behnken

Le modèle de Box-Behnken (BB) présente donc l'avantage d'être moins coûteux en temps (nombre d'essais réduits) et ressources à investir pour l'expérimentation. Le modèle de BB ne permet pas de tester les traitements pour lesquels tous les facteurs sont placés

simultanément à leur niveau élevé ou bas. La matrice de Box-Behnken minimise donc les combinaisons situées dans les extrémités du domaine de variation des facteurs où l'on observe en général une réponse non satisfaisante (réponse élevée ou faible). Ceci peut être avantageux lorsque les points situés sur les coins du cube représentent des combinaisons de niveaux de facteurs qui sont chères ou impossible de tester en raison des contraintes physiques du processus^{35, 36, 37}.

Le plan de BB connaît de nombreuses applications dans plusieurs domaines scientifiques. Il a été utilisé, dans plusieurs branches de la chimie (chimie analytique, spectrophotométrie, chromatographie etc...) dans le but d'optimiser plusieurs processus chimique et physique^{38,39}. En microbiologie⁴⁰ et en phytopathologie⁴¹, le plan de BB est utilisé pour évaluer l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance des micro-organismes agroalimentaires.

VI. Logiciels des plans d'expériences

Les logiciels des plans d'expériences possèdent des bibliothèques de plans classiques et ils permettent aussi de construire les plans particuliers. On peut réaliser le calcul des coefficients avec un tableur, mais cela nécessite de la programmation et du temps. Il est donc préférable d'utiliser un logiciel adapté qui effectue non seulement le calcul des coefficients mais aussi les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité du modèle mathématique. Les logiciels des plans d'expériences sont aussi programmés pour calculer des réponses dans tous les domaines d'étude, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes d'isoreponses, pour construire les surfaces de réponses et pour déterminer les zones d'intérêt. Cet ensemble de possibilités permet d'effectuer de multiples analyses et de regarder ces données sous tous les angles. On arrive ainsi à extraire, en peu de temps, toute l'information présente dans les résultats d'un plan d'expériences³⁰.

³⁵ S. Nosrati, N. S. Jayakumar, M. A. Hashim, *Desalination*. **2011**, 266, 286–290.

³⁶ E.Y. Yazici, H. Deveci, *Hydrometallurgy*. **2013**, 139, 30–38.

³⁷ M. Cobas, M. A. Sanromán, M. Pazos, *Bioresource Technol.* **2014**, 160, 166–174.

³⁸ S. L. C. Ferreira, R. E. Bruns, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brand, E. G. P da Silva, L. A. Portugal, P.S. dos Reis, A. S. Souza, W. N. L., *Analytica Chimica Acta*. **2007**, 597, 179–186.

³⁹ C. H. Dong, X. Q. Xie, X. L. Wanga, Y. Zhan, Y. J. Yao, *Food and bioproducts processing*, **2009**, 87, 139–144.

⁴⁰ M. Sautour, P. Mary, N. E. Chihib, J. P. Hornez, *Journal of Applied Microbiology*, **2003**, 95, 807–813.

⁴¹ R. Lahlali, S. Massart, M. N. Serrhini, M. H. Jijakli, *International Journal of Food Microbiology*. **2008**, 122, 100–108.

Nous indiquons ci-dessous les principaux logiciels des plans d'expériences et les sites internet correspondants. Quelques uns d'entre eux mettent à disposition des personnes intéressées des versions de démonstration et certains des versions complètes simplement limitées dans le temps ²⁵.

Tableau 3 : Principaux logiciels de plans d'expériences.

Logiciels	Sites internet
JMP	http://www.jmpdiscovery.com
Minitab	http://www.minitab.fr
Statistica	http://www.intesoft.com/produits/tech/statistica
Statgraphics	http://www.sigmaplus.fr
Unscrambler	http://www.camo.no
Pirouette	http://www.infometrix.com
Modde	http://www.umetrics.com

VII. Technique d'analyse

VII.1. Analyse de la variance

L'analyse de la variance (ANOVA) est un outil essentiel dans la détermination de la signification d'un effet ou d'un modèle mathématique. Le principe de l'analyse de la variance est basé sur le calcul de l'écart total entre les différentes mesures y_i du plan d'expériences et la moyenne de ces mesures. Cet écart se décompose en différentes composantes comme l'illustre la (figure 16) ²⁷.

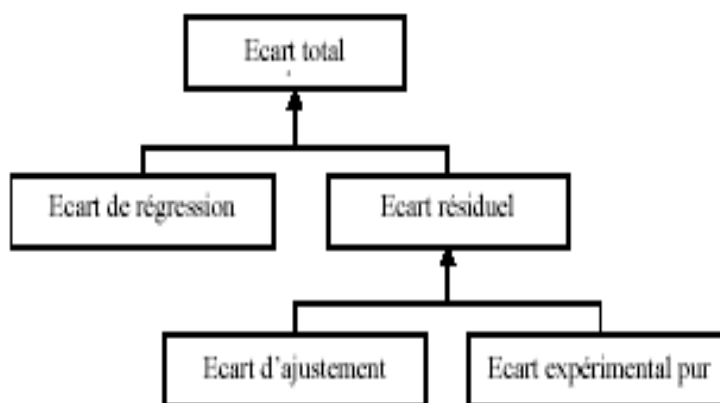


Figure 16: Différents écarts.

Une partie de l'écart total est modélisable par le modèle mathématique, c'est l'écart de régression. Une autre partie de l'écart total n'est pas modélisable, c'est l'écart résiduel. Celui-ci correspond à la différence entre la réponse mesurée expérimentalement et la même réponse modélisée. Cet écart, considéré comme une erreur, est donc la somme de deux composantes : l'erreur expérimentale pure σ_i et l'erreur d'ajustement Δ_i . L'écart expérimental pur correspond à l'erreur aléatoire de l'expérimentation. Cet écart est dû au fait que si l'on répète un certain nombre de fois la même expérience, on obtiendra à chaque fois une mesure y_i de valeur différente. L'écart dû au manque d'ajustement correspond à un choix inadapté du type de modèle postulé.

L'ensemble de l'analyse de la variance et les différentes relations utilisées sont donnés dans le tableau 3 où y_i est la valeur de la $i^{\text{ème}}$ réponse, \bar{Y} la moyenne des réponses du plan, η_i la réponse prédite d'après le modèle mathématique pour la $i^{\text{ème}}$ expérience, y_i^0 une mesure au centre du domaine, \bar{Y}^0 la moyenne de l'ensemble des expériences au centre du domaine et n_0 le nombre d'expériences répétées au centre du domaine d'étude.

Tableau 4 : Analyse ANOVA sur l'ajustement du modèle.

	Somme des carrés (notée SS)	Degré de liberté (noté ν)	Variance (%) notée (V)	F	P
Ecart total	$SS_{tot} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2$	$\nu_{tot} = n-1$	$V_{tot} = \frac{SS_{tot}}{\nu_{tot}}$	•	•
Ecart résiduel	$SS_{res} = \sum_{i=1}^n (\eta_i - y_i)^2 = \sum_{i=1}^n e_i^2$	$\nu_{res} = n - \nu_{modèle}$	$V_{res} = \frac{SS_{res}}{\nu_{res}}$	F ₁	P ₁
Ecart de régression	$SS_{reg} = SS_{tot} - SS_{res}$	$\nu_{reg} = p-1$	$V_{reg} = \frac{SS_{reg}}{\nu_{reg}}$		
Ecart expérimental pur	$SS_{exp} = \sum_{i=1}^{n_i} (y_i^0 - \bar{Y}^0)^2$	$\nu_{exp} = n_0 - 1$	$V_{exp} = \frac{SS_{exp}}{\nu_{exp}}$	F ₂	P ₂
Ecart d'ajustement	$SS_{aju} = SS_{res} - SS_{exp}$	$\nu_{aju} = \nu_{res} - \nu_{exp}$	$V_{aju} = \frac{SS_{aju}}{\nu_{aju}}$		

VII.2. Probabilité P

La statistique la plus importante dans le tableau de l'analyse de la variance est la valeur de P. Cette valeur peut prendre des valeurs comprises seulement entre 0 et 1. Si elle est inférieure à 0.05, on conclut que l'effet est significatif et si elle est inférieure à 0.01, il est possible de conclure que le facteur est hautement significatif.

VII.3. Coefficients de détermination (R^2 , $R^2_{\text{ajusté}}$)

- On définit le coefficient de détermination R^2 comme étant la fraction des variations de la réponse expliquée par le modèle seul. Ce coefficient est donné par la relation ci-dessous:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\eta_i - \bar{Y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2}$$

Le R^2 est donc une mesure de la qualité du modèle qui prend des valeurs comprises entre 0 et 1. S'il est proche de 1, le modèle permet de retrouver les valeurs des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'explique rien.

- On définit de la même façon le coefficient de détermination ajusté R^2_{aju} comme étant la fraction des variations de la réponse expliquée par le modèle seul, relativement aux degrés de liberté correspondants. L'expression de R^2_{aju} est donnée par :

$$R^2_{\text{aju}} = 1 - \frac{\frac{\sum_{i=1}^n (\eta_i - y_i)^2}{n - v_{\text{modèle}}}}{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2}{n - 1}}$$

Du fait de la prise en compte des degrés de liberté, on a toujours $R^2_{\text{aju}} \leq R^2$.

VII.4. Validation du modèle

Dans la pratique, trois méthodes de validation sont utilisées :

- Test de signification globale de la régression (Teste de validation 1).
- l'analyse du manque d'ajustement (Teste de validation 2).
- l'utilisation de points tests.

Test de validation 1

La qualité globale du modèle mathématique ajusté permet de savoir si ce modèle résume correctement les résultats des essais du plan d'expériences et si cela aide la

comparaison de la variance attribuable à la régression de la variance résiduelle, au moyen du test de Fisher, pour ce faire, on calcule ainsi ³⁴ :

$$F_1 = \frac{SS_{reg}/v_{reg}}{SS_{res}/v_{res}}$$

Avec

\bar{Y} valeur moyenne des réponses mesurées,

v_{reg} : nombre de degrés de liberté (ddl) associé à la somme des carrés des écarts à la moyenne de la régression,

v_{res} : nombre de degrés de liberté associé à la somme des carrés des résidus.

La valeur de ce rapport doit être supérieure à la valeur critique de Fisher à un niveau de confiance supérieur à 95% ($F_{0,05}(v_{reg}, v_{res})$) pour que la régression soit significative.

Test de validation 2

Il nécessite une analyse de la variance qui consiste à évaluer et comparer entre elles les variances du manque d'ajustement, expérimentales et résiduelles. Ces variances ont, en désignant par v le nombre de degrés de liberté associé à une somme de carrés (SS), les expressions suivantes ³⁴ :

- variance résiduelle

$$SS_{res}/v_{res}$$

- variance expérimentale

$$SS_{exp}/v_{exp}$$

- variance du manque d'ajustement

$$SS_{aju}/v_{aju}$$

La somme des carrés de la variance due au manque d'ajustement (SS_{aju}) et le nombre de degrés de liberté (v_{aju}), qui lui est associé, sont calculés par :

$$SS_{aju} = SS_{res} - SS_{exp}$$

$$v_{aju} = v_{res} - v_{exp}$$

Le modèle est validé si la variance due au manque d'ajustement, est non significative, c'est-à-dire si la valeur du rapport F défini par:

$$F_2 = \frac{SS_{aju}/v_{aju}}{SS_{exp}/v_{exp}}$$

est inférieure à la valeur critique de Fisher : $F_{0,05}(v_{aju}, v_{exp})$.

Validation par les points tests

Elle consiste à réaliser des expériences supplémentaires en des points situés à l'intérieur du domaine d'étude, et à comparer les valeurs mesurées à celles calculées à partir du modèle. Ce dernier est validé si les différences $(y_i - \eta_i)$ entre les valeurs mesurées y_i et calculées η_i ne sont pas statistiquement significatives³⁴.

Meilleur est l'ajustement du modèle si :

- ✓ R_2 proche de 1
- ✓ R_2 maximum
- ✓ $\text{Prob}F_1 < 5\%$ F_2 le plus petit possible
- ✓ $\text{Prob}F_2 > 5\%$ F_1 le plus grand possible.

VII.5. Courbes d'isoréponses et surfaces de réponses

L'exploitation du modèle validé est aussi réalisée graphiquement en traçant en 2D¹ les courbes d'isoréponses (Figure 17 a). Pour ce faire, on choisit, à chaque fois, deux variables à étudier. Les niveaux des autres variables étant fixés (par exemple, à leur valeur moyenne). En ajoutant une troisième dimension au graphe des courbes d'isoréponses, pour indiquer les valeurs de la réponse, on obtient une surface de réponses (Figure 17 b) illustrant l'évolution de la réponse en fonction des niveaux des deux facteurs choisis³⁴.

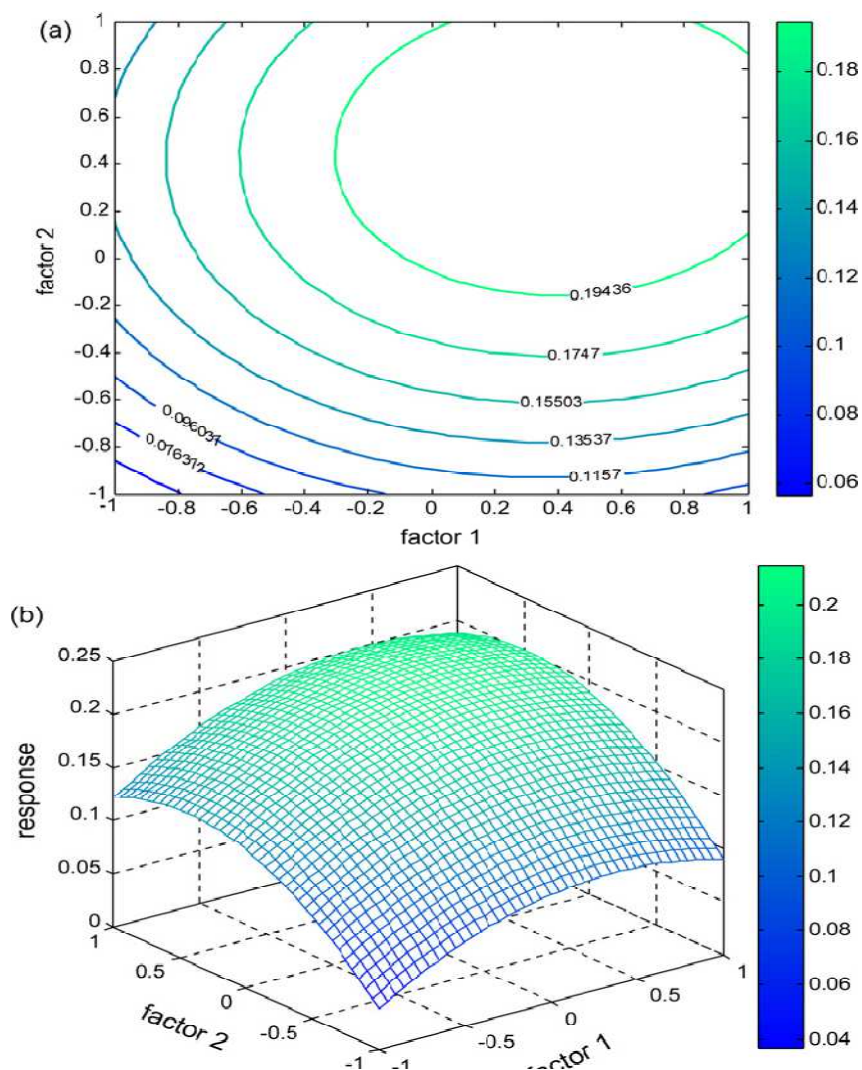


Figure 17 : Courbes d'iso-réponse et surfaces de réponses.

VIII. Conclusion

L'approche par les plans d'expériences, consiste à organiser la démarche expérimentale et l'analyse décisionnelle en appliquant plusieurs outils et tests statistiques. L'utilisation et l'intérêt des plans d'expériences conduit à établir un plan comportant le maximum de précision dans les résultats avec un minimum d'expériences.

Dans ce travail, nous avons utilisé les plans d'expériences afin d'étudier l'influence des différents paramètres réactionnels sur l'avancement de la réaction d'acylation enzymatique du D-Xylose et du D-Glucose.

Partie 2

*Optimisation et modélisation de la synthèse
d'esters de sucres par les plans d'expériences.*

Chapitre 1

*Optimisation de l'immobilisation de la lipase
de *Candida cylindracea*.*

I. Introduction

Les molécules tensioactives glycolipidiques obtenues à partir du greffage d'un polyol de type saccharidique sur un acide gras sont largement décrites dans la littérature¹. Il existe entre autres les polyglycosides d'alkyle², les glucosamides³, les éthers⁴ et les esters de sucres⁵. Ces derniers peuvent être préparés par estérification des sucres avec les acides gras. Dans ce travail, nous avons synthétisé le 6-*O*-Dodecanoyl-D-Glucopyranose par estérification enzymatique avec l'acide laurique, en présence d'une enzyme élaborée au laboratoire par immobilisation de la lipase de *Candida cylindracea* libre (CCL) sur un support poreux, la célite. L'immobilisation de cette enzyme est réalisée à plusieurs pH afin de comparer les activités catalytiques des lipases ainsi synthétisées. Une étude se rapportant à l'influence du pH d'immobilisation sur l'avancement de la réaction enzymatique est réalisée.

II. Immobilisation de la lipase de *Candida cylindracea* (CCL)

L'immobilisation des enzymes consiste en un ensemble de méthodes chimiques ou physiques par lesquelles l'enzyme est fixée à un support adéquat. Ce processus est mis en œuvre afin d'augmenter la stabilité de ces enzymes et d'en prolonger l'existence en les immobilisant pour en conserver l'activité. L'immobilisation des enzymes fait modifier leur pH optimum et par conséquent leur stabilité et leur activité enzymatique. Ces changements dépendent souvent de la méthode d'immobilisation utilisée.

La lipase libre de *Candida cylindracea* (CCL) est immobilisée par adsorption sur la célite, pour donner la forme immobilisée de la lipase (CCL I).

Une étude de la variation du pH d'immobilisation de la lipase est entreprise afin d'optimiser le fonctionnement de cette nouvelle enzyme. La gamme de pH utilisée est : pH = 5.7, 6.7, 7.3, 8, 9.

¹ M. G. Megahed. *Grasas y Aceites*. **2000**, 51(6), 457.

² S. Matsumura, Y. Kinta, K. Sakiyama, K. K. Toshima, *Biotechnol. Lett.*, **1993**, 18 (11), 1335.

³ Y. Sugimura, K. Fukunaga, T. Matsuno, K. Nakao, M. Goto, F. Nakashio, *J. Biochem. Eng.* **2000**, 5, 123.

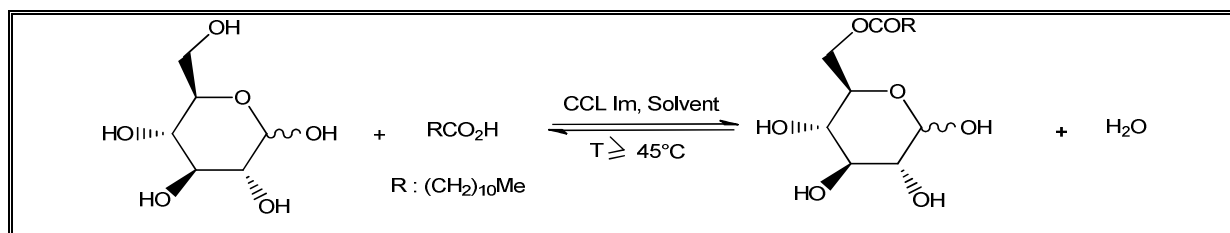
⁴ T. Serradj, C. Bidjou-Haiour, *Alg. J. Adv. Mater.* **2008**, 5, 297.

⁵ G. Fregapane, D. B. Sarney, S. G. Greenberg, D. J. Knight. E. N. Vulfson, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, 71, 87.

III. Estérification enzymatique de l' α -(+)-D-Glucose

L' α -(+)-D-Glucose est estérifié par l'acide l'aurique en présence de la lipase de *Candida cylindracea* (CCL) immobilisée sur célite (CCL I). Les réactions ont lieu dans l'EMC à différentes températures. Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers afin d'évaluer la conversion.

Réaction



IV. Résultats et discussion

IV.1. Résultats

L'estérification enzymatique de l' α -(+)-D-Glucose avec l'acide l'aurique dure 72 heures et donne un seul régioisomère, le monolaurate de D-Glucose. Dans ce qui suit, l'influence de la température du milieu réactionnel et du pH d'immobilisation de la CCL, sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-Glucose est discutée.

L'immobilisation permet d'améliorer la résistance de l'enzyme aux conditions qui lui sont normalement néfastes. Nous avons donc testé les effets de la température et du pH sur l'activité de la lipase immobilisée. L'intervalle de température étudié est compris entre 40-80°C. L'intervalle du pH d'immobilisation est compris entre 5.7-9. Les résultats relatifs à cette étude sont illustrés sur les figures 1, 2 et 3

IV.1.1. Influence du pH d'immobilisation de la CCL sur la conversion à $T = 40^\circ\text{C}$

Les cinétiques obtenues avec la CCL I à différents pH pour l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-Glucose à 40°C sont illustrées sur la figure 18.

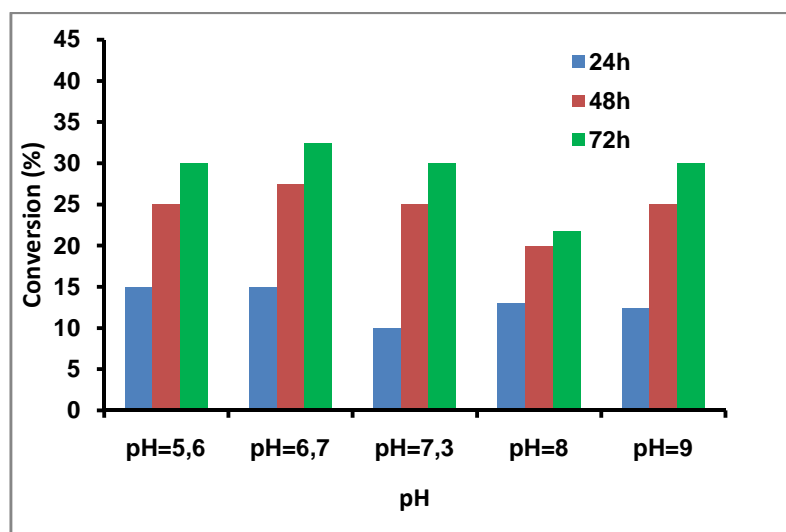


Figure 18: Influence du pH à T = 40°C

A T=40°C, une variation non significative de la conversion aux différents pH étudiés est observée. Les conversions maximales obtenues pour le D-Glucose à 40°C sont réunies dans le tableau suivant :

Tableau 5. Conversions maximales à T = 40°C, à t = 72h.

CCL I	Conversion max (%)
pH = 5,6	30,00
pH = 6,7	32,50
pH = 7,3	30,00
pH = 8,0	31,73
pH = 9,0	35,00

Les conversions obtenues pour le sucre de départ sont de l'ordre de 30% avec la toute la gamme de pH utilisée.

IV.1.2. Influence du pH d'immobilisation de la CCL sur la conversion à T = 60°C

La figure suivante résume les résultats obtenus avec les différentes formes immobilisées de la CCL à 60°C.

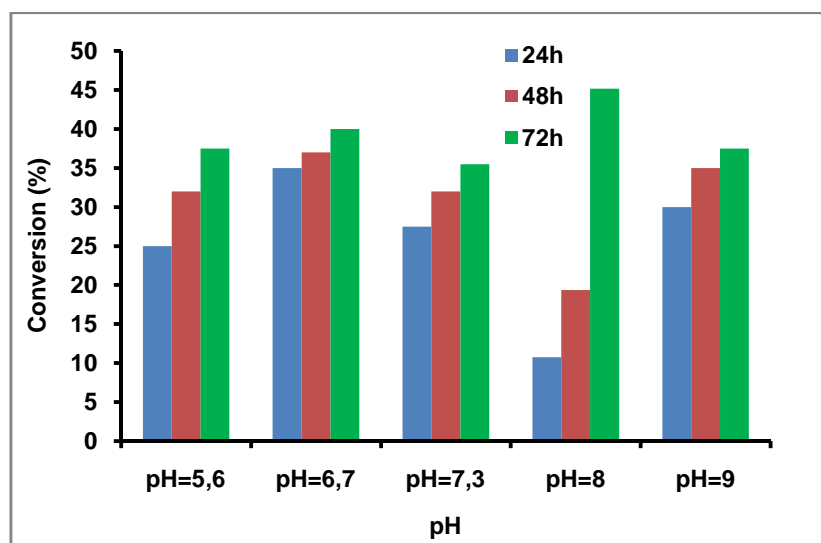


Figure 19 : Influence du pH à T = 60°C

A T=60°C, une variation de la conversion en fonction du pH d'immobilisation de la lipase est enregistrée. D'autre part, on observe une augmentation constante de la conversion en fonction du temps et une activité spécifique de la CCL I à pH=8. En effet, une conversion de 45% est obtenue à ce pH, au bout de 72 h de réaction. A partir de ce seuil de pH, une acidification du milieu d'immobilisation ou une augmentation de la basicité, diminue moyennement la conversion du sucre de départ.

Les meilleures conversions sont à celles obtenues au bout de 72 h.

Les conversions maximales obtenues pour le D-Glucose à 60°C sont données dans le tableau suivant :

Tableau 6. Conversions maximales à T = 60°C, à t = 72h.

CCL I	Conversion max (%)
pH = 5,6	37,50
pH = 6,7	40,00
pH = 7,3	35,50
pH = 8,0	45,16
pH = 9,0	37,50

IV.1.3. Influence du pH d'immobilisation de la CCL sur la conversion à T = 80°C

La figure 20 représente les résultats obtenus pour l'estérification enzymatique du D-Glucose à 80°C et avec la CCL I immobilisée sur célite aux pH précités.

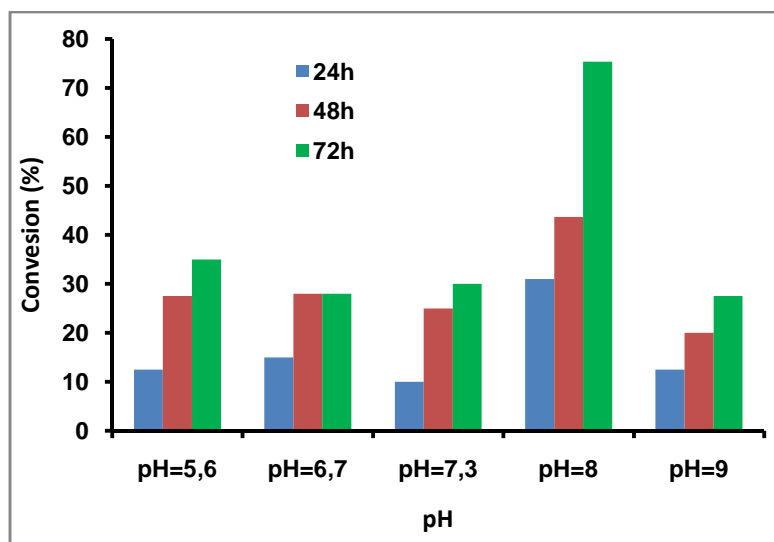


Figure 20: Influence du pH à T = 80°C

A T=80°C, une variation de la conversion en fonction du pH d'immobilisation de la lipase est également enregistrée. Une augmentation constante de la conversion en fonction du temps est observée. La meilleure conversion (75,35%) obtenue est celle à pH =8, dans un milieu moyennement basique. L'enzyme exprime dans ces conditions sa plus haute activité catalytique. A partir de ce pH, une acidification du milieu d'immobilisation ou une augmentation de la basicité, diminue considérablement la conversion du sucre de départ.

Les meilleures conversions sont à celles obtenues au bout de 72 h.

A T=80°C les conversions maximales obtenues pour le D-Glucose sont données dans le tableau suivant :

Tableau 7. Conversion maximale à T = 80°C, à t = 72h.

CCL I	Conversion max (%)
pH = 5,6	35,00
pH = 6,7	30,00
pH = 7,3	32,00
pH = 8,0	75,35
pH = 9,0	27,50

IV.2. Discussion

En comparant les résultats obtenus pour chaque température avec la gamme de pH étudiée, il en ressort une température de réaction optimale (T = 80°C) et un pH optimum d'immobilisation (pH = 8) de la lipase de *Candida cylindracea* sur la célite qui est un support poreux.

Les résultats obtenus pour l'immobilisation montrent qu'à bas pH, on observe de faibles taux de fixation de protéine et par conséquent de faibles taux de conversion, cela peut être expliqué par la valeur du point isoélectrique (pI = 4) de l'enzyme (CCL) qui est proche du niveau bas du pH du tampon utilisé. A ces valeurs de pH la protéine est faiblement ionisée et son adsorption sur la surface de la célite est donc faible. A pH = 8 ou la densité de la charge négative est prédominante, la liaison avec la surface du support est par conséquent plus forte. Dans la littérature ⁶ il a été trouvé que la température optimale et le pH optimum de la CCL libre sont respectivement 35°C et 8.

D'après les résultats obtenus dans la réaction d'estérification enzymatique du D-Glucose avec la CCL I synthétisée au laboratoire, le pH optimum de son fonctionnement est 8. Ce résultat est donc conforté par la littérature. D'un autre côté, une résistance de la CCL I aux élévations de la température est observée. Elle devient active à des températures supérieures à 35°C.

Les conversions obtenues pour la lipase libre CCL, dans la réaction d'estérification du D-Glucose sont faibles ⁷.

⁶ A. Salihu, Md. Zahangir Alam, M. I. Abdul Karim, H. M. Salleh, *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*. **2012**, 2, 24.

L'augmentation de la stabilité thermique est liée au confinement de l'enzyme qui limite ses possibilités de dépliements pour cause de gêne stérique⁸

Un autre phénomène semble intervenir ici comme le démontre l'augmentation de l'activité avec la température, cet effet a déjà été observé avec d'autres enzymes immobilisées⁹. Il a été suggéré que l'enzyme existe sous une forme inactive et une forme active, l'équilibre entre les deux étant régulé par la température.

Le site actif des lipases n'est généralement pas accessible au substrat. En effet, il est recouvert par une boucle appelée volet amphiphile ou "lid". Il s'agit de la forme fermée ou inactive de l'enzyme. Certains auteurs ont mis en évidence l'existence d'une forme ouverte active de l'enzyme. Dans ce cas, la face hydrophobe du volet, orientée auparavant vers l'intérieur du site actif, s'expose alors au substrat¹⁰.

L'activité enzymatique est spécialement dépendante du pH. En général, le pH peut agir sur plusieurs facteurs :

- L'ionisation des résidus de l'enzyme et du substrat et/ou du produit
- La structure tertiaire des protéines et donc la stabilité de l'enzyme
- La liaison du substrat avec l'enzyme
- L'activité catalytique de l'enzyme

Le pH intervient de deux manières différentes : soit en modifiant la structure secondaire ou tertiaire de l'enzyme, soit en modifiant les charges électriques des radicaux des acides aminés du site actif. Le pH du milieu peut en effet modifier les degrés d'ionisation des acides aminés de la CCL. L'état d'ionisation du site actif de la protéine influence par conséquent la conformation adoptée par cette lipase. Les propriétés catalytiques intrinsèques de l'enzyme peuvent donc être différentes selon le pH utilisé.

A pH voisin de la neutralité, une très grande majorité de ces radicaux à fonctions ionisables sont chargés ce qui facilite les liaisons enzyme-substrat de type électrostatique. Il existe donc un pH du milieu réactionnel où les charges électriques des radicaux du site actif de l'enzyme

⁷ D. Hellal. Thèse de Magister. Optimisation de la réactivité dans la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose. **2011**.

⁸ J. Livage, T. Coradin. C. Roux, *J. Phys. Condens. Matter*, **2001**, 13, 673.

⁹ P. L. A. Overbeeke, G. C. N. Khalaf, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen, *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2000**, 10, 385.

¹⁰ (a). Y. Gargouri, S. Ransac, R. Verger, *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, 1344, 6.

(b). T. Maruyama, M. Nakajima, S. Ichikama, H. Nabetani, S. Furusaki, M. Seki, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, 77, 1121.

seront les plus favorables à la liaison enzyme-substrat : on appelle ce pH le pH optimum de la lipase synthétisée au laboratoire.

V. Intérêts des esters de sucres synthétisés.

Les esters de sucres synthétisés dans ce travail sont le 6-*O*-Dodecanoyl-D-Glucopyranose et le 1-*O*-Dodecanoyl-D-Xylopyranose. Les propriétés fonctionnelles de ces composés sont liées à leur caractère tensioactif lié à leur amphiphilie qui est exprimée par la notion de la BHL (Balance hydrophile -hydrophobe).

La valeur de la HLB obtenue (après calcul) pour ces deux tensioactifs ⁴ ainsi que leurs propriétés physicochimiques ¹¹ sont donnés dans le tableau suivant. Ils sont classés en qu'émulsifiant huile dans eau. Un émulsifiant facilite la formation d'une émulsion entre deux liquides non miscibles (par exemple de l'eau et de l'huile). Dans une émulsion, le premier liquide (appelé phase discontinue) est dispersé dans le second liquide (appelé phase continue) sous forme de petites gouttelettes. Le rôle du tensioactif est de diminuer la tension de surface entre les deux phases liquides, en formant un film autour des gouttelettes dispersées.

Tableau 8 : Propriétés physicochimiques des esters de D-glucose et de D-xylose.

Tensioactif	HLB	CMC (mmol.L ⁻¹)	γ (mN.m ⁻¹)
1- <i>O</i> -Dodecanoyl- D-Xylopyranose ^{4, 11}	11,02	0,18	25
6- <i>O</i> -Dodecanoyl- D-Glucopyranose ¹²	10,11	1,50	30,5

VI. Conclusion

Il y a eu au cours de ces dernières années un développement important des applications des lipases pour la production d'esters de sucres dans les domaines agro-alimentaires, cosmétique et pharmaceutique.

¹¹ (a) C. Bidjou-Haiour; N. Klai, *Asian. J. Chem.* **2013**, 25 (8), 4347. (b) N. Klai, C. Bidjou-Haiour, S. Bouquillon, *C. R. Chimie*, **2015**, 18, 599- 606.

¹² A. Ducret, A. Giroux, M. Trani, R. Lortie, *J. Am. Oil chem. Soc.* **1996**, 73, 109-1

Les lipases immobilisées sont particulièrement intéressantes puisqu'elles peuvent être facilement manipulées.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse des esters de D-Glucose d'intérêt potentiel. Nous avons immobilisé la lipase de *Candida cylindracea* (CCL) par adsorption sur la célite (CCL I). Cette lipase est ensuite testée dans la réaction d'estérification enzymatique du D-Glucose par l'acide laurique. Une large gamme de pH d'immobilisation (5.7, 6.7, 7.3, 8, 9.) à été utilisée afin d'optimiser le fonctionnement de cette enzyme.

De très bonnes performances ont été enregistrées pour la CCL immobilisée à pH = 8.

Chapitre 2

*Optimisation de la synthèse d'esters de D-
Xylose par les plans d'expériences.*

I. Introduction

Les travaux présentés dans cette partie du présent mémoire concernent la modélisation de la réaction d'estérification enzymatique du D-Xylose par l'acide laurique, en présence de la lipase de *Candida cylindracea* immobilisée (CCL I) préalablement synthétisée au laboratoire. Le but étant d'optimiser la synthèse du 1-O-Dodécanoyle-D-Xylopyranose, un tensioactif non ionique. Pour réaliser cette modélisation, nous avons opté pour les méthodes des plans d'expériences. Ces méthodes de modélisation permettent notamment d'établir des modèles mathématiques faisant intervenir différents paramètres qui affectent l'avancement de la réaction cible. Elles sont basées sur l'expérimentation.

II. Préparation du plan d'expériences

II.1. Objectifs

L'influence des différents paramètres réactionnels sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-Xylose (Schéma 20) est étudiée.

Réaction

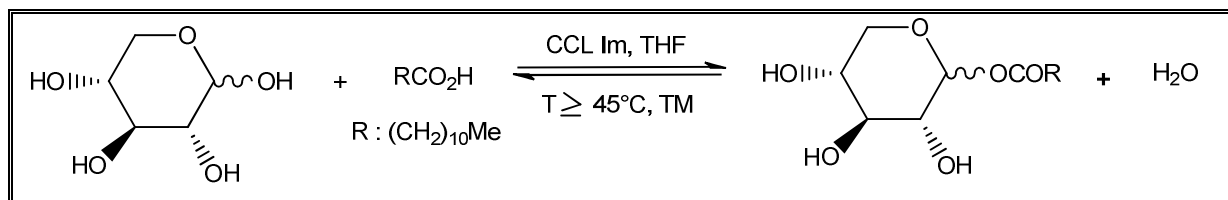


Schéma 20: Estérification enzymatique de l'α-(+)-D-Xylose.

L'enzyme utilisée est la lipase de *Candida cylindracea* (CCL) immobilisée sur la célite à l'échelle du laboratoire. La détermination des conditions opératoires optimales permettant d'atteindre une conversion maximale du sucre de départ est réalisée à l'aide la méthodologie des plans d'expériences. Ce qui revient à réaliser une série de N expériences et à déterminer la valeur de la fonction réponse pour ces N configurations. Une relation de modélisation en est alors déduite.

II.2. Réponse

La réponse choisie est le taux d'avancement de la réaction d'estérification, c'est la conversion (C%). Elle est mesurée par titrage de la quantité de l'acide laurique présente dans le milieu réactionnel ¹.

II.3. Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Les facteurs examinés lors de cette étude sont:

- La température de la réaction (T°) : la solubilité du sucre et la stabilité des enzymes dépendent fortement de la température du milieu réactionnel. La température est donc un facteur important. Pour confirmer la signification de l'effet de ce facteur sur la conversion du sucre, nous avons réalisé les réactions à 40°C et à 60°C.
- Le temps de la réaction (t) : dans la littérature, les temps longs sont généralement favorables à la synthèse des esters de sucres et donnent des taux de conversions élevées ². Nous avons choisi comme valeur inférieure 24 h, et comme valeur supérieure 72 h.
- La quantité du tamis moléculaire (TM) : l'estérification enzymatique est une réaction réversible qui se produit entre un acide gras et un alcool en présence d'une lipase 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. Le tamis moléculaire sert à absorber cette eau. Afin d'étudier l'influence de la quantité du tamis moléculaire sur la conversion, nous avons choisi 10 mg comme valeur minimale et 30 mg comme valeur maximale.
- La quantité d'enzyme (Qe): pour confirmer la signification de l'effet de la quantité d'enzyme sur la conversion, nous avons choisi 10 mg comme valeur inférieure et 30 mg comme valeur supérieure.
- L'équivalent de l'acide laurique (Eq): est un des paramètres importants dans les réactions d'estérification enzymatique. Nous avons choisi deux valeurs de l'équivalent de l'acide laurique : 0,5eq et 1eq.

Les cinq facteurs étudiés et leur domaine d'étude sont regroupés dans le tableau 9.

¹ M. Leitgeb, Z. Knez, *J. Ame. Oil Chem. Soc.* **1990**, 67, 775-778.

² Y. Yan, U.T. Bornscheuer, G. L.W. Stadler, *Lipid Sci. Technol.* **2001**.

Tableau 9. Facteurs et domaine d'étude du plan de Plackett-Burman

Facteurs	Symbole	Unités	Niveaux	
			-1	+1
La température	T	°C	40	60
Le temps	t	h	24	72
La quantité du tamis moléculaire	TM	mg	10	30
La quantité de l'enzyme	Qe	mg	10	30
L'équivalent de l'acide laurique	Eq	eq	0,5	1

II.4. Choix du plan d'expériences

Dans un premier temps un plan de criblage est utilisé. C'est un plan du premier degré qui permet de trier les facteurs en faisant ressortir les plus influents.

Nous avons choisi le plan de Plackett-Burman car c'est généralement le plus employé dans des études similaires en raison de son économie en termes de nombre d'essais.

III. Plan de criblage de Plackett-Burman

III.1 Réalisation des essais

Les essais sont menés conformément au plan de Plackett-Burman pour les 5 facteurs. Les expériences se sont déroulées selon la matrice de ce plan. Elle représente la fixation des facteurs à différents niveaux, comme il est montré dans le tableau 10.

Tableau 10. Plan de Plackett-Burman d'après la matrice d'expérimentation.

Ordre d'essai	Facteurs					Réponse	
	Eq	Qe	TM	T°	t	C(%) _{mesuré}	C(%) _{théorique}
1	0,5	30	30	60	24	35	38,66
2	0,5	10	10	40	24	20	18,33
3	1,0	30	10	60	24	40	46,33
4	0,5	30	10	40	24	20	18,66
5	0,5	10	30	60	72	50	53,66
6	1,0	10	30	40	24	10	10,00
7	1,0	30	30	40	72	20	25,66
8	1,0	10	30	60	24	45	38,00
9	1,0	10	10	40	72	30	33,33
10	0,5	30	30	40	72	32	26,00
11	1,0	30	10	60	72	70	61,66
12	0,5	10	10	60	72	60	61,66

III.2. Analyse statistique des résultats

Le traitement des données expérimentales a été effectué par régression linéaire multiple à l'aide du logiciel MINITAB14.

III.2.1. Représentation graphique des effets

a. Diagramme de Pareto

Ce diagramme (figure 21) permet d'extraire les paramètres les plus importants. Parmi tous les facteurs étudiés et au niveau de confiance choisi ($\alpha = 0,05$), la température (T°) et le temps (t) apparaissent comme des facteurs très influents, la quantité de tamis moléculaire (TM) peut d'après ce même diagramme avoir un effet sur la réponse. L'équivalent de l'acide laurique (Eq) et la quantité d'enzyme (Qe) n'ont pas d'effets significatifs sur la réponse.

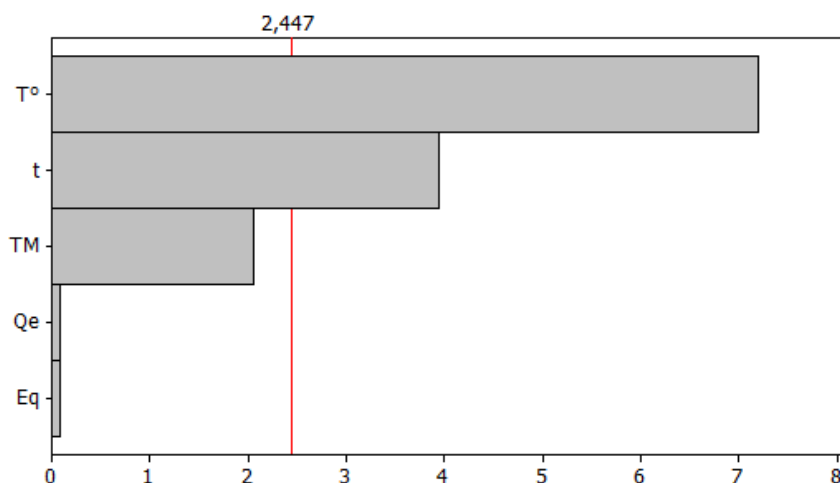


Figure 21 : Diagramme de Pareto des effets normalisés.

b. Diagramme des effets principaux

Le diagramme des effets principaux nous renseigne sur l'influence simultanée de tous les facteurs sur la conversion. Nous pouvons d'après ce diagramme (Figure 22) conclure que la température, le temps et la quantité du tamis moléculaire, sont les facteurs les plus influents sur le taux d'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-Xylose. Pour les deux facteurs (T° , t) le sens de la variation est le même par la réponse, c'est-à-dire, lorsque la température et le temps augmentent la conversion augmente. Le facteur tamis moléculaire (TM), agit de manière opposée sur la réponse. Pour les deux facteurs, équivalent de l'acide laurique (Eq) et quantité d'enzyme (Qe), on n'observe pas d'influence importante sur la conversion.

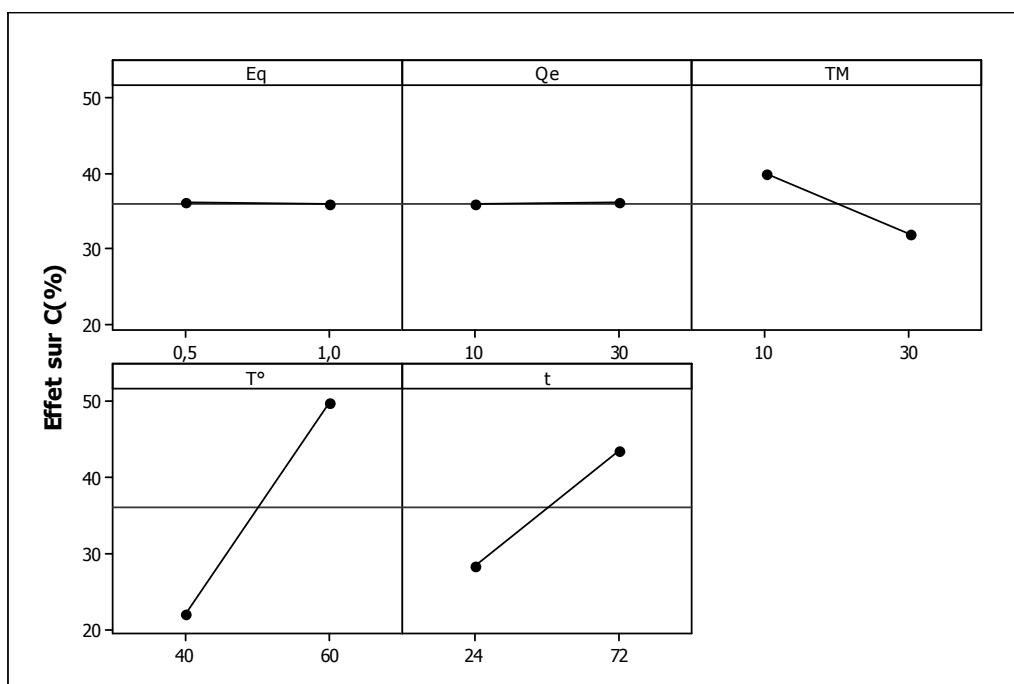


Figure 22: Diagramme des effets principaux sur la conversion

III. 2.2. Détermination des effets significatifs et des coefficients du modèle

Les valeurs des effets et des coefficients de régression du modèle sont donnés dans les tableaux 11 et 12.

Tableau 11. Effets et coefficients estimés pour la conversion (unités codées)

Terme	Effet	Coefficient	P ($\alpha < 0,05$)
Constante	-	36,000	0,000
Eq	-0,333	-0,167	0,934
Qe	0,333	0,167	0,934
TM	-8,000	-4,000	0,085
T°	28,000	14,000	0,000
t	15,333	7,667	0,008

$$R^2 = 92,28\% , R^2 (\text{adj}) = 85,84\% .$$

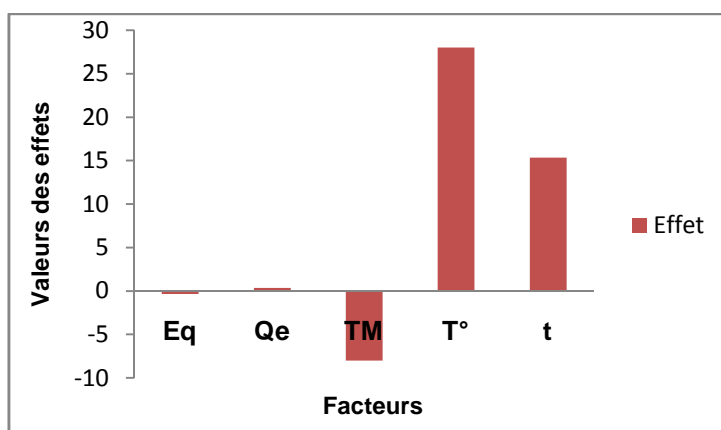
Tableau 12: Effets et coefficients estimés pour la conversion (unités non codées)

Terme	Coefficient
Constante	-41,166
Eq	-0,666
Qe	0,016
TM	-0,400
T°	1,400
t	0,319

La signification statistique des facteurs est déterminée suivant la valeur obtenue de P (Probabilité).

D'après le tableau 11, l'effet de la température sur la conversion est très fortement significatif, (P=0,000). Il est suivi de l'effet du temps de la réaction qui lui aussi est très significatif (P=0,008). Pour la quantité du tamis moléculaire la valeur de P est de 0,085. L'équivalent de l'acide laurique et la quantité d'enzyme sont non significatifs, et n'ont pas d'influence sur la réponse au niveau de confiance choisi ($\alpha = 0,05$).

Le signe positif de chacun des facteurs (T°, t, Qe) indique que la valeur maximale de ces facteurs entraîne une réponse plus élevée qu'avec la valeur minimale. Les facteurs (Eq, TM) possèdent des signes négatifs ce qui indique que la valeur minimale de ce facteur se traduit par une réponse plus élevée. On peut visualiser (figure 23) les différents niveaux qui augmentent ou diminuent la réponse.

**Figure 23:** Effets des facteurs sur la conversion

D'autres parts les coefficients du modèle permettent d'évaluer l'influence des facteurs sur la réponse. On constate que les coefficients avec des valeurs élevées sont les facteurs les plus importants.

III.2.3. Equation du modèle mathématique

Pour construire l'équation du modèle représentant la relation entre la conversion et les cinq facteurs étudiés, on utilise les coefficients de régression représentés dans les tableaux 11 et 12. Ce modèle a été simplifié, et le classement des facteurs se fait selon le diagramme de Pareto (Figure 21).

Unités codées :

$$C (\%) = 36,000 + 14,000 \cdot T^{\circ} + 7,667 \cdot t - 4,000 \cdot TM + 0,167 \cdot Q_e - 0,167 \cdot E_q \quad (1)$$

Unités non codées :

$$C (\%) = -41,166 + 1,400 \cdot T^{\circ} + 0,319 \cdot t - 0,400 \cdot TM + 0,016 \cdot Q_e - 0,666 E_q \quad (2)$$

Par ailleurs, l'examen du diagramme des réponses estimées en fonction des réponses mesurées (figure 24) montre un bon coefficient de détermination $R^2 = 92,3 \%$. Cela veut dire qu'il y a une bonne corrélation entre les réponses théoriques et mesurées. Cette corrélation est confirmée par la valeur de R carré ajusté ($R^2_{aju} = 91,5\%$).

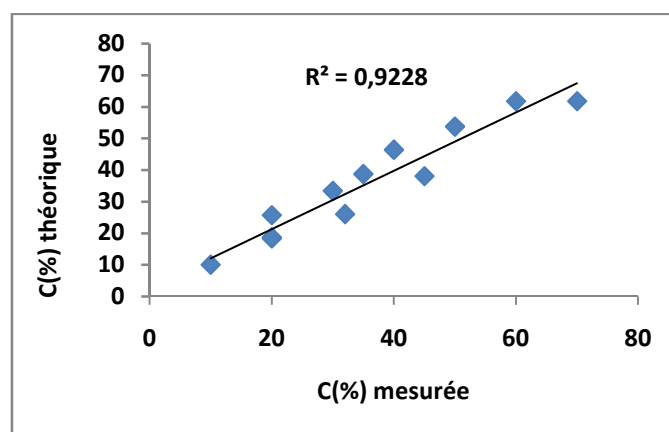


Figure 24: Représentation graphique des réponses théoriques en fonction des réponses mesurées.

III.2.4. Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de la variance (tableau 13), montre une valeur de P des effets principaux de 0,003 (<0,05). Cette valeur indique que le modèle est significatif. C'est-à-dire au moins un facteur a un effet significatif sur la réponse.

Tableau 13. Analyse de la variance pour la réponse C(%)

Source	DL	SC	CM	F	P
Effets principaux	5	3250,0	650,00	14,34	0,003
Erreur résiduelle	6	272,0	45,33		
Total	11	3522,0			

En conclusion, nous pouvons dire que le modèle trouvé est significatif ($R^2 = 92,3 \%$). Ceci nous permet d'avoir une idée préliminaire sur l'influence des différents facteurs sur l'avancement de la réaction mise en jeu.

Le plan de Plackett-Burman, nous a permis d'établir une relation linéaire entre les facteurs étudiés et la réponse sans faire intervenir les interactions entre ces facteurs. Ce plan ne peut donc pas de décrire correctement le phénomène malgré la valeur élevée du R carré obtenu, puisque il existe d'autres termes importants, tels que les termes aux carrés et les interactions. Pour cela il faut passer à des plans contenant un nombre de niveaux supérieur à deux par facteur. Un tel plan peut être celui de Box-Behnken.

IV. Plan de Box-Behnken

La méthodologie des surfaces de réponses (RSM) permet d'établir un modèle de régression polynomiale d'ordre 2. Dans ce travail nous avons choisi le plan de Box-Behnken. Ce choix est notamment motivé par le faible coût demandé : 15 expériences doivent être calculées. Ce nombre est faible par rapport à un plan factoriel complet, à 3 niveaux par facteur, qui nécessite 27 expériences.

Concernant le choix des facteurs, nous nous sommes basés sur les résultats du plan de criblage mais également sur des critères expérimentaux ³.

³ J. Goupy, Pratiquer les plans d'expériences, éditions DUNOD, 2005.

Les trois facteurs retenus pour le plan de Box-Behnken (tableau 15) sont le temps (t), la température (T°) et la quantité du tamis moléculaire (TM). Concernant ce dernier facteur, bien qu'il soit donné statistiquement comme peu influent, il a quand même été conservé dans l'étude. Sachant que l'estérification enzymatique est réversible, l'eau formée durant la réaction perturbe l'équilibre thermodynamique et l'ester de sucre formé peut s'hydrolyser. Pour cela l'introduction d'une certaine quantité de tamis moléculaire dans le milieu réactionnel est nécessaire pour absorber l'eau formée durant la réaction. Nous avons par conséquent conservé la quantité du tamis moléculaire dans l'étude qui suit.

Nous avons fixé les deux autres facteurs, l'équivalent de l'acide laurique à 0,5 éq (niveau bas) et la quantité d'enzyme à 30 mg (niveau haut).

Le plan de Box-Behnken nous permet d'examiner les trois facteurs (T° , t et TM) avec plus de détails afin de déterminer les conditions optimales pour une conversion maximale. Les résultats de ce plan subiront un traitement statistique nécessaire.

Tableau 14. Facteurs et domaine d'étude du plan de Box-Behnken.

Facteur	Bas	Niveau	
		moyen	Haut
T°	40	50	60
t	24	48	72
TM	10	20	30

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs, composé de quinze essais dont trois au centre du domaine (essais 13, 14 et 15) et des réponses expérimentales (C%) est représenté ci-après (tableau 15).

Tableau 15: Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales.

Ordre d'essai	T°	t	TM	C(%) _{mesurée}
1	60	48	10	10
2	40	48	30	22
3	50	72	30	48
4	50	48	20	25
5	40	72	20	41
6	50	72	10	29
7	50	48	20	35
8	60	48	30	80
9	40	24	20	25
10	50	48	20	35
11	50	24	30	55
12	60	72	20	61
13	40	48	10	12
14	60	24	20	30
15	50	24	10	12

Les données de ce tableau subiront un traitement statistique pour estimer les coefficients du modèle mathématique.

IV.1. Résultats statistiques et interprétation

Le calcul des coefficients de régression avec les données codées est fourni par le logiciel MINITAB version 14 (Tableau 16).

Tableau 16: Coefficients de régression estimés pour la conversion C(%)

Terme	Coefficient	T	P
Constant	31,667	6,144	0,002
T°	10,125	3,208	0,024
t	7,125	2,258	0,074
TM	17,750	5,624	0,002
T°•T°	1,292	0,278	0,792
t•t	6,292	1,354	0,234
TM•TM	-1,958	-0,422	0,691
T°•t	3,750	0,840	0,439
T°•TM	15,000	3,361	0,020
T°•TM	-6,000	-1,344	0,237

$$R\text{-Sq} = 92,65\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 79,41\%$$

Le logiciel, MINITAB 14, nous fournit également l'analyse de la variance (Tableau 17).

Tableau 17: Analyse de la variance pour la conversion C(%)

Source	DL	SC	CM	F	P
Régression	9	5018,92	557,66	7,00	0,023
Linéaire	3	3746,75	1248,92	15,67	0,006
Carré	3	171,92	57,31	0,72	0,582
Interaction	3	1100,25	366,75	4,60	0,067
Erreur résiduelle	5	398,42	79,68	-	-
Inadéq. de l'ajus	3	331,75	110,58	3,32	0,240
Erreur pure	2	66,67	33,33	-	-
Totale	14	5417,33	-	-	-

Interprétations

Nous avons utilisé comme indicateur statistique les valeurs de P pour évaluer quels sont les termes du modèle qui sont importants. D'après l'ANOVA (tableau 17), la valeur $P=0,023$ indique que le modèle est significatif. D'autre part, l'ensemble des effets linéaires avec la valeur de $P = 0,006 (< 0,05)$ indique qu'il existe un effet linéaire significatif pour les facteurs principaux (T° , t et TM). La conversion varie donc selon les termes linéaires. Pour les effets quadratiques, on obtient des valeurs de $P > 0,05$:

- $T^\circ \cdot T^\circ = 0,792$
- $t \cdot t = 0,234$
- $TM \cdot TM = 0,691$

Il s'ensuit en fonction de la valeur de P qu'il n'y a pas d'effet significatif pour le carré de la température, du temps et de la quantité de tamis moléculaire. C'est-à-dire qu'on ne prévoit pas de courbure dans les surfaces de réponses.

D'après l'analyse de la variance, les valeurs de P obtenues pour les interactions du type $T^\circ \cdot t$ et $t \cdot TM$ sont respectivement de 0,439 et 0,237 ($> 0,05$). Il n'y a donc pas d'effet significatif, sauf pour l'interaction $T^\circ \cdot TM$ ou $P = 0,020 (< 0,05)$. La conversion varie donc selon cette interaction, chacun des deux facteurs T° et TM dépend donc du niveau l'un de l'autre.

Par ailleurs la valeur du coefficient de détermination $R^2 = 92,65\%$ est bonne et R^2 ajusté = $79,41\%$, ce qui indique que le modèle est relativement bien ajusté. Donc il existe une bonne corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées.

IV.2. Détermination du modèle mathématique

L'équation de régression polynomiale pour le modèle primaire (avant d'exclure les termes non significatifs), s'écrit comme suit:

Unités codées :

$$C(\%) = 31,667 + 10,125T^\circ + 7,125t + 17,750TM + 1,292T^{\circ 2} + 6,292t^2 - 1,958TM^2 + 3,750T^\circ \cdot t + 15T^\circ \cdot TM - 6t \cdot TM \quad (1)$$

Unités non codées :

$$C(\%) = 144,416 - 4,029T^\circ - 1,033t - 3,741TM + 0,012T^{\circ 2} + 0,010t^2 - 0,019TM^2 + 0,015T^\circ \cdot t + 0,150T^\circ \cdot TM - 0,025t \cdot TM \quad (2)$$

Le but est donc de trouver l'équation polynômiale optimale. D'après l'analyse statistique précédente, en éliminant les termes quadratiques et les deux interactions $T^\circ \cdot t$, $TM \cdot t$, on obtient un nouveau modèle avec un ajustement de bonne qualité. Ces résultats sont résumés dans les tableaux 18 et 19.

Tableau 18: Coefficients de régression estimés pour la C(%) après exclusion des termes non significatifs (unité codée).

Terme	Coefficient	T	p
Constant	34,667	15,295	0,000
T°	10,125	3,262	0,009
t	7,125	2,296	0,045
TM	17,750	5,719	0,000
T°•TM	15,000	3,418	0,007

$$R\text{-carré} = 85,78\% \quad R\text{-carré (adj)} = 80,09\%$$

Nous remarquons d'après le tableau 18, que tous les paramètres estimés pour ce modèle sont significatifs. L'équation de régression polynômiale optimale pour le nouveau modèle s'écrit comme suit :

$$\text{Unités codées : } C(\%) = 34,667 + 10,125T^\circ + 7,125t + 17,750TM + 15T^\circ \cdot TM \quad (3)$$

$$\text{Unités non codées : } C(\%) = 84,291 - 1,987T^\circ + 0,296t - 5,725TM + 0,150T^\circ \cdot TM \quad (4)$$

L'analyse de la variance (ANOVA) après exclusion des termes non significatifs (tableau 19), montre que tous les termes sont hautement significatifs. On conclut donc que le modèle amélioré est meilleur du point de vue statistique.

Tableau 19: Analyse de la variance pour la C(%) après exclusion des termes non significatifs.

Source	DL	SC	CM	F	p
Régression	4	4646,75	1161,69	15,08	0,000
Linéaire	3	3746,75	1248,92	16,21	0,000
Interaction	1	900,00	900,00	11,68	0,007
Erreur résiduelle	10	770,58	77,06	-	-
Inadéq.de l'ajus	8	703,92	87,99	2,64	0,304
Erreur pure	2	66,67	33,33	-	-
Totale	14	5417,33	-	-	-

D'autre part, la probabilité d'inadéquation systématique de l'ajustement augmente de 0,240 à 0,304, ce qui signifie un meilleur ajustement du modèle. L'analyse de la variance indique que la variance due au manque d'ajustement est non significative.

IV.3. Validation du modèle

La validation du modèle est une des étapes fondamentales des plans d'expériences. Elle consiste à comparer le résultat théorique d'une expérience calculée par le modèle, avec le résultat réel d'un essai.

- Si la réponse réelle est très proche de la réponse prédite, le modèle est validé.
- Si la réponse réelle est éloignée de la réponse prédite, le modèle est non validé.

IV.3.1. Validation primaire du modèle

La validation primaire du modèle consiste à s'assurer que les réponses calculées et mesurées sont corrélées (tableau 20).

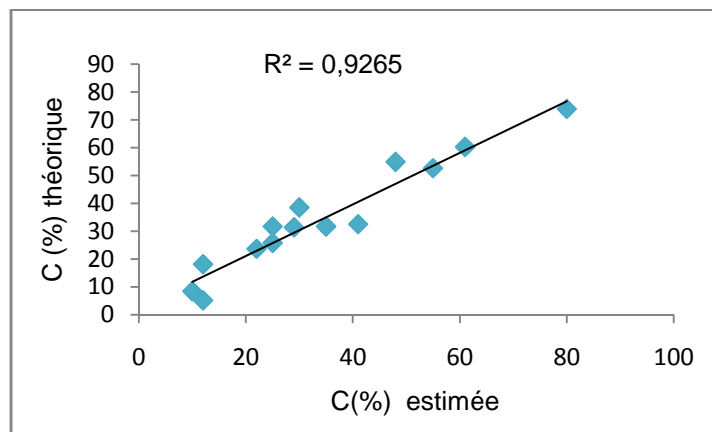
Tableau 20: comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées

Ordre d'essai	C(%) _{mesuré}	C(%) _{théorique}
1	10	08,37
2	22	23,62
3	48	54,87
4	25	31,66
5	41	32,50
6	29	31,37
7	35	31,66
8	80	73,87
9	25	25,75
10	35	31,66
11	55	52,62
12	61	60,25
13	12	18,12
14	30	38,50
15	12	05,12

Ce tableau permet de juger de manière plus précise de la qualité de l'ajustement réalisé. La comparaison entre les colonnes Y_{exp} (réponses mesurées) et Y_{cal} (réponses prédites par le modèle) confirme que l'ajustement est de bonne qualité.

IV.3.2. Représentation graphique des réponses théoriques en fonction des réponses mesurées

Cette corrélation peut aussi être illustrée en traçant les réponses mesurées, en fonction des réponses estimées. Ceci est donné par la figure 25, qui montre une forte corrélation entre celles-ci.

**Figure 25:** Réponses théoriques en fonction des réponses estimées.

D'après la figure 25, les points sont répartis autour de la droite de régression. Le modèle peut donc être jugé de qualité suffisante, puisqu'il y a 92,65% de chance qu'il explique effectivement les variations mesurées de la réponse. Le modèle rend bien compte du phénomène étudié.

IV.4. Optimisation de la conversion

L'étape finale consiste à trouver les valeurs des facteurs qui donnent la réponse optimale ⁴. A partir du modèle mathématique validé et à l'aide du logiciel, on réalise graphiquement les contours 2D. Ces graphiques permettent de rechercher des solutions optimales plus désirables avec une meilleure précision possible. Cela nous permet d'examiner les résultats plus nettement. Les courbes de contour sont générées à l'aide du logiciel MINITAB 14 par la combinaison des trois facteurs induits. Nous avons choisi à chaque fois un des facteurs fixé aux 3 niveaux, haut, moyen et bas. Les deux autres facteurs étudiés sont représentés sur les axes X et Y. La valeur de la réponse est représentée par une région ombragée dans la courbe de contour 2D. Les figures 26, 27, et 28 représentent les graphiques 2D qui illustrent l'évolution de la réponse en fonction des niveaux des deux facteurs.

⁴ J. Goupy, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 554, 184-190.

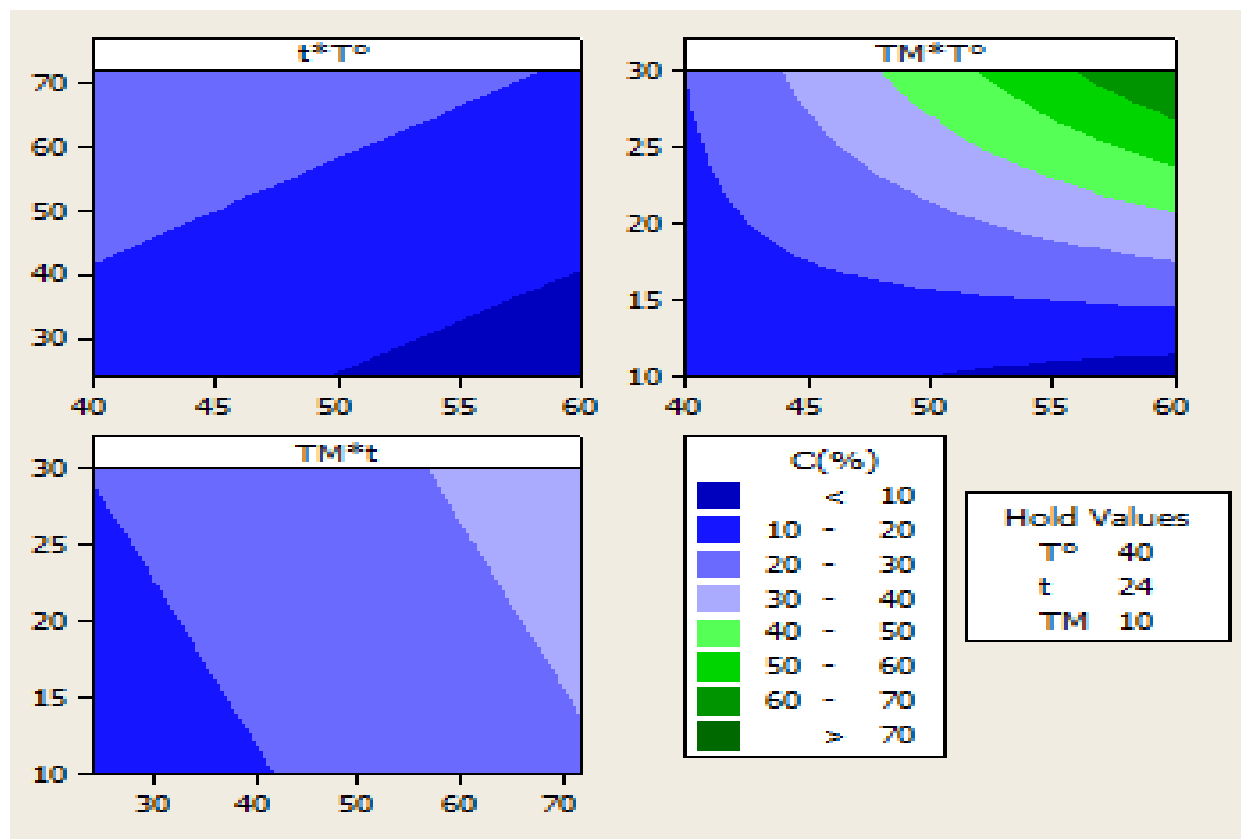


Figure 26: Diagrammes de contour au niveau bas des facteurs.

La figure 26 représente les diagrammes de contour des trois facteurs maintenus à leurs niveaux bas. A chaque fois un des facteurs est fixé à son niveau bas, les deux autres nous renseignent sur l'évolution de la réponse. Pour la combinaison des facteurs température et tamis moléculaire, il apparaît une région (verte) dans laquelle la conversion est augmentée par rapport à la combinaison des autres facteurs (t.T° et TM.).

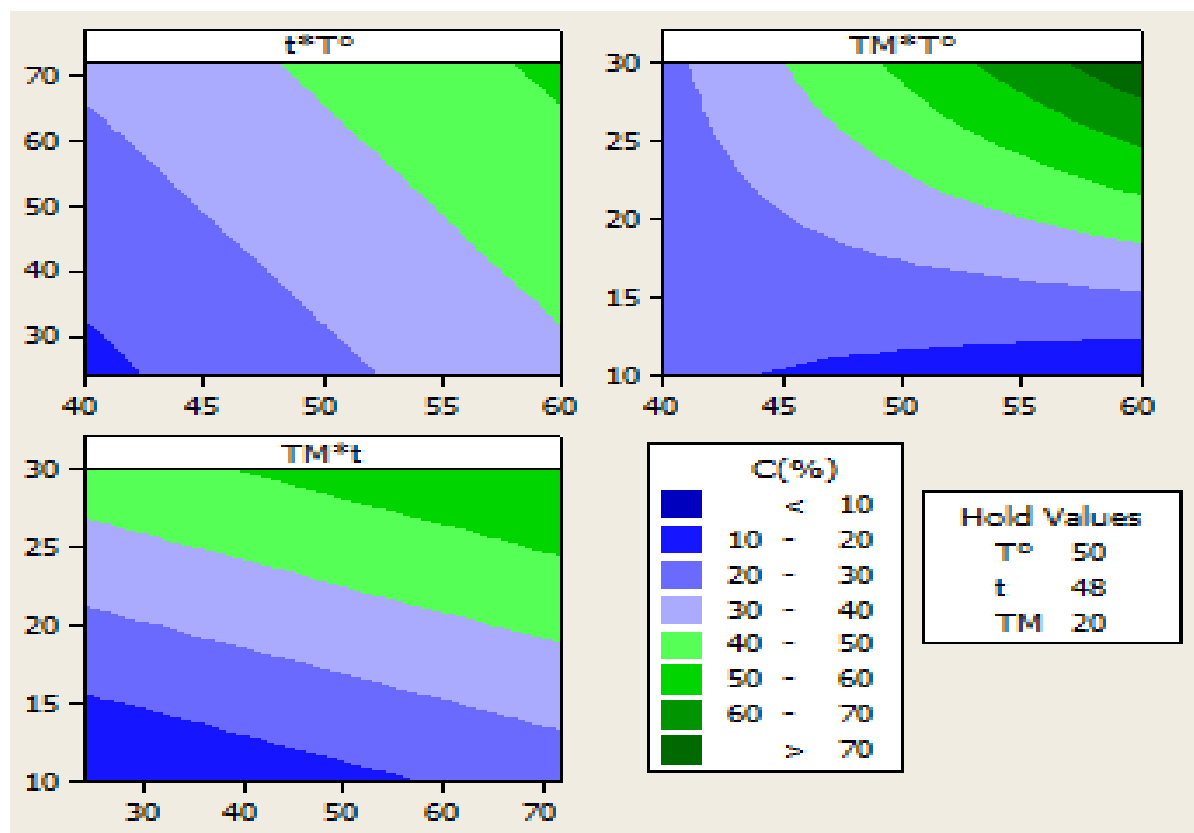


Figure 27:Diagrammes de contour au niveau moyen des facteurs.

La figure 27 représente les diagrammes de contour des trois facteurs maintenus à leurs niveaux moyens. A chaque fois un des facteurs est fixé à son niveau moyen, les deux autres nous renseignent sur l'évolution de la réponse. On observe que pour la combinaison des différents facteurs il apparaît une région (verte) dans laquelle la conversion est augmentée.

Pour la combinaison des facteurs température et tamis moléculaire, cette région verte devient plus foncée, la conversion est comprise entre 60 -70 %.

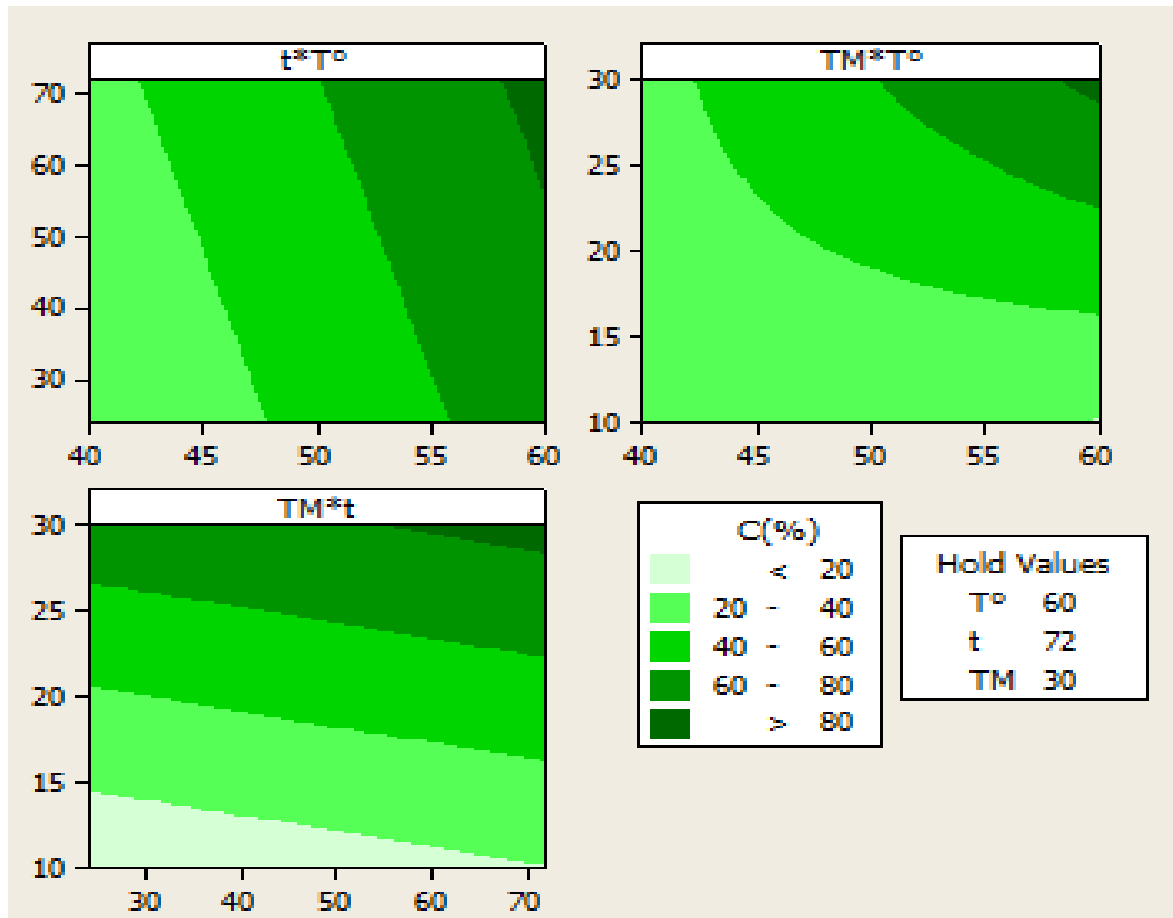


Figure 28: Diagrammes de contour au niveau haut des facteurs.

La figure 28 représente les diagrammes de contour des trois facteurs maintenus à leurs niveaux hauts. A chaque fois un des facteurs est fixé à son niveau haut, les deux autres nous renseignent sur l'évolution de la réponse. On observe que pour la combinaison des différents facteurs il apparaît une région verte foncée dans laquelle la conversion est augmentée. D'après l'interprétation des diagrammes de contour, les plus fortes valeurs de la conversion ($C > 80\%$) sont obtenues lorsque les trois facteurs sont fixés aux niveaux hauts.

L'examen de l'ensemble des graphes a permis la sélection des coordonnées du point optimal, soit : $T^\circ = 60^\circ\text{C}$, $t = 72$ h, $TM = 30\text{mg}$ et la valeur de la conversion en ce point est égale à $C = 85,041\%$. Cela a été déterminé à l'aide de la fonction désirabilité du logiciel MINITAB version 14.

IV.5. Vérification

On effectue une vérification des coordonnées du point optimal :

- Ce point ($T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$, $t=72\text{ h}$, $TM=30\text{mg}$) est situé dans le domaine expérimental donc il constitue bien la solution recherchée au problème.
- On vérifie ce point critique par un simple calcul de la réponse moyenne prédite par le modèle. Ce point est donné par l'équation (3)

$$C(\%)=34,667+10,125\cdot(+1) +7,125\cdot(+1) +17,750\cdot(+1) +15\cdot(+1)\cdot(+1)$$

$$C(\%)=84,667\%.$$
- Une telle valeur pour la conversion n'a jamais été obtenue lors des 15 expériences réalisées. Ce résultat est a priori très intéressant.

V. Conclusion

Dans ce travail, nous avons d'abord utilisé comme étape préliminaire le plan de criblage de Plackett-Burman, réalisé afin de sélectionner les facteurs les plus influents sur la réponse. Parmi les différents facteurs étudiés, la température, le temps et la quantité du tamis moléculaire apparaissent comme les paramètres les plus influents sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-Xylose. Ces facteurs sont ensuite examinés par la méthodologie des surfaces de réponses en utilisant le plan de Box-Behnken.

Pour étudier l'effet des variables indépendantes : la température, le temps et le tamis moléculaire sur la conversion du sucre, nous avons modélisé la réponse sous forme d'un polynôme en fonction de ces paramètres.

D'après l'étude statistique on peut conclure que:

- ✓ le modèle obtenu est significatif $P = 0,023 (< 0,05)$.
- ✓ Il existe une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées, $R^2 = 92,65\%$ et $R^2_{\text{ajus}} = 79,41\%$.
- ✓ La région du point optimal pour une valeur élevée de la conversion est obtenue lorsque les trois facteurs sont fixés au niveau haut.
- ✓ la valeur optimale de la conversion est $C = 85,041\%$. Celle-ci correspond aux valeurs suivantes des facteurs : température à 60°C , temps à 72 heures, et tamis moléculaire à 30 mg.

Chapitre 3

Optimisation de la synthèse d'esters de D-Glucose par les plans d'expériences.

I. Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons étudié la modélisation de l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-Xylose et cerné ainsi les différents facteurs qui peuvent influencer de manière significative sur la conversion. Dans un but de généralisation, notre étude portera dans ce chapitre sur l'optimisation et la modélisation de la production d'esters de sucres à partir d'un autre monosaccharide, le D-Glucose. La méthodologie des surfaces de réponse (RSM) en accord avec la matrice de Box-Behnken (BB) est appliquée afin d'optimiser la synthèse du 1-O-Dodécanoyl-D-Glucopyranose, un tensioactif non ionique, par estérification enzymatique du D-Glucose avec l'acide laurique.

II. Préparation du plan d'expériences

II.1. Objectifs

L'optimisation des différents paramètres réactionnels à savoir, la température, le solvant et le temps, sur l'avancement de la réaction d'estérification enzymatique du D-Glucose (schéma 21) est étudiée.

Réaction

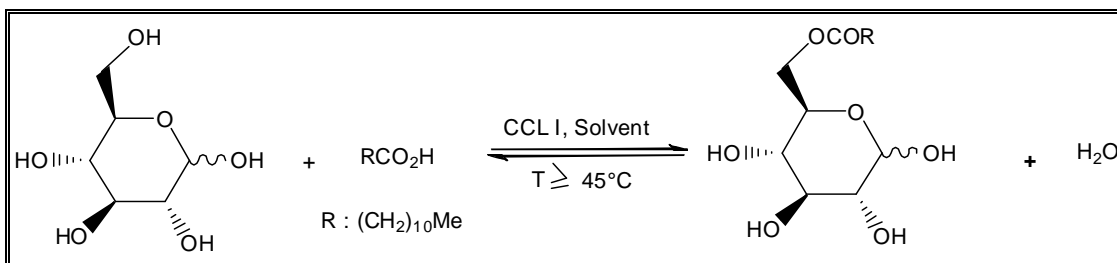


Schéma 21: Estérification enzymatique de l'α-(+)-D-glucose.

II.2. Réponse

La réponse choisie est le taux d'avancement de la réaction d'estérification, c'est la conversion (C%).

II.3. Détermination des facteurs et du domaine d'étude

Concernant le choix des facteurs, nous nous sommes basés sur des critères expérimentaux relatifs à la catalyse enzymatique et sur des résultats antérieurs ¹.

¹ N. Bouzaouit, C. Bidjou-Haiour, *Der Pharma Chemica*. **2015**, 7(1), 261-269.

Les facteurs examinés lors de cette étude sont:

- ✓ Le solvant (X_1) : le choix d'un solvant approprié pour l'acylation enzymatique est primordial^{2,3}.

Le solvant doit en effet être moyennement polaire pour pouvoir solubiliser le sucre (polaire) et l'acide gras (apolaire) et pour que l'enzyme garde sa forme active. Pour cela, nous avons effectué les réactions dans trois solvants avec différentes polarité (EMC, THF, et *t*-BuOH).

- ✓ La température de la réaction (X_2) : La vitesse d'une réaction enzymatique est généralement augmentée par une élévation de température. D'autre part la forme tridimensionnelle de l'enzyme est modifiée par la température.
- ✓ Le temps de la réaction (X_3) : La durée d'évolution des systèmes enzymatique est variable.

Le tableau suivant représente les facteurs étudiés et la plage de variations autorisées pour chaque facteur (domaine d'étude).

Tableau 21. Facteurs et domaine d'étude du plan de Box-Behnken.

Facteurs	Niveaux des facteurs		
	bas (-1)	Moyen (0)	Haut (+1)
Solvant (X_1 , logP)	THF	<i>t</i> -BuOH	EMC
Temperature (X_2 , °C)	40	60	80
Temps (X_3 , h)	24	48	72

II.4. Choix du plan d'expériences

Pour réaliser cette partie du travail, nous avons choisis de mettre en œuvre le plan de Box-Behnken qui est un plan du second degré.

III. Plan de Box-Behnken

Un plan de Box-Behnken est un type de plan de surface de réponse dans lequel les points se situent à des combinaisons des niveaux de facteurs supérieur et inférieur et de leurs points centraux. Il possède des combinaisons de traitement qui sont situées aux points

² F.Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, *J. Mol. Cata. B – Enzymatic*. **2001**, 11, 949-954.

³ D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, *Process Biochem*. **1999**, 34, 913-918.

centraux des bords de l'espace expérimental et qui requièrent au moins trois facteurs continus et permet une estimation efficace des coefficients de premier et de second ordre.

Dans ce travail nous avons appliqué le plan de Box-Behnken. Il comporte moins de points et son coût peut être par exemple moins élevé que celui d'un plan composite centré pour le même nombre de facteurs. Quinze expériences doivent être calculées.

III. 1. Réalisation des essais

Le plan de Box-Behnken pour trois facteurs, composé de quinze essais et des réponses expérimentales (C%) sont représenté dans le tableau suivant. Les données de ce tableau subiront un traitement statistique pour estimer les coefficients du modèle mathématique.

Tableau 22: Plan de Box-Behnken avec les réponses expérimentales.

Ordre d'essai	Valeurs codées			Valeurs réelles			Réponse (conversion)		
	X ₁	X ₂	X ₃		X ₁	X ₂	X ₃	C(%) _{mesuré}	C(%) _{théorique}
1	1	0	-1	EMC	60	24		10,75	12,37
2	-1	0	1	THF	60	72		50,00	48,37
3	0	1	1	t-buOH	80	72		57,74	58,73
4	0	0	0	t-buOH	60	48		10,00	09,12
5	-1	1	0	THF	80	48		37,14	37,77
6	0	1	-1	t-buOH	80	24		01,40	01,47
7	0	0	0	t-buOH	60	48		08,69	09,12
8	1	0	1	EMC	60	72		45,16	45,87
9	-1	-1	0	THF	40	48		23,47	25,17
10	0	0	0	t-buOH	60	48		08,69	09,12
11	0	-1	1	t-buOH	40	72		19,13	19,05
12	1	1	0	EMC	80	48		43,66	41,95
13	-1	0	-1	THF	60	24		12,22	11,50
14	1	-1	0	EMC	40	48		20,00	19,36
15	0	-1	-1	t-buOH	40	24		06,95	05,95

IV. Résultats statistiques et interprétation

Au cours de cette étude nous avons utilisé le plan d'expériences de Box-Behnken pour mettre en œuvre la méthodologie des surfaces de réponses. Le calcul des coefficients de régression avec les données codées est fourni par le logiciel MINITAB version 14 (Tableau 23). C'est un logiciel de traitement statistique, qui comprend un grand nombre de fonctionnalités. Il prend en charge les calculs d'analyse de la variance à un ou plusieurs facteurs, les comparaisons de résultats statistiques et de nombreux types de graphiques. L'analyse de la variance (Tableau 24) est également fournie par ce logiciel.

Tableau 23: Coefficients de régression estimés pour la conversion C(%)

Termes	Coefficients	T	P
Constant	9,1267	8,821	0,000
X ₁	-0,4075	-0,643	0,548
X ₂	8,7988	13,887	0,000
X ₃	17,5888	27,760	0,000
X ₁ •X ₁	15,0842	16,174	0,000
X ₂ •X ₂	6,8567	7,352	0,001
X ₃ •X ₃	5,3217	5,706	0,002
X ₁ •X ₂	2,4975	2,787	0,039
X ₁ •X ₃	-0,8425	-0,940	0,390
X ₂ •X ₃	11,0400	12,321	0,000
R ² (%) = 99,70%	R ² (%)adj =99,00%		

Tableau 24: Analyse de la variance pour la conversion C(%)

Source	DL	SC	CM	F	P
Régression	9	4624,17	513,80	159,98	0,000
Linéaire	3	3095,59	1031,86	321,29	0,000
Carré	3	1013,27	337,76	105,17	0,000
Interaction	3	515,32	171,77	53,48	0,000
Erreur résiduelle	5	16,06	3,21	-	-
Inadéq. de l'ajus	3	14,91	4,97	8,69	0,105
Erreur pure	2	1,14	0,57	-	-
Totale	14	4640,23	-	-	-

Les valeurs de probabilité inférieures à 0,05 indiquent que les termes du modèle sont statistiquement significatifs.

D'après l'ANOVA (tableau 24), la valeur P=0,00 indique que le modèle est significatif.

Les valeurs du coefficient de détermination R²=99,70% et celle de R² ajusté=99,00% indiquent que le modèle est relativement bien ajusté. Donc il existe une bonne corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées.

IV.2. Détermination du modèle mathématique

L'équation de régression polynomiale pour le modèle primaire (avant d'exclure les termes non significatifs), s'écrit comme suit:

$$C(\%) = 9,126 - 0,407X_1 + 8,798X_2 + 17,588X_3 + 15,084X_1^2 + 6,856X_2^2 + 5,321X_3^2 + 2,497X_1 \cdot X_2 - 0,842X_1 \cdot X_3 + 11,040X_2 \cdot X_3 \quad (1)$$

Dans le but d'affiner le modèle et de trouver l'équation polynômiale optimale, les termes non significatifs sont éliminés. Cependant le terme X_1 , dont le carré X_1^2 et l'interaction X_1X_2 ne sont pas négligeables, est pris en compte. On obtient ainsi un nouveau modèle avec un ajustement de bonne qualité. Ces résultats sont résumés dans les tableaux 25 et 26.

Tableau 25: Coefficients de régression estimés pour la C(%) après exclusion des termes non significatifs .

Termes	Coefficients	T	P
Constant	9,1267	8,907	0,000
X_1	-0,4075	-0,649	0,540
X_2	8,7988	14,023	0,000
X_3	17,5888	28,032	0,000
$X_1 \cdot X_1$	15,0842	16,332	0,000
$X_2 \cdot X_2$	6,8567	7,424	0,000
$X_3 \cdot X_3$	5,3217	5,762	0,001
$X_1 \cdot X_2$	2,4975	2,815	0,031
$X_2 \cdot X_3$	11,0400	12,442	0,000
R^2 (%) = 99,60%	R^2 (%) adj=99,00%		

Tableau 26: Analyse de la variance pour la C(%) après exclusion des termes non significatifs.

Source	DL	SC	CM	F	P
Régression	8	4621,33	577,67	183,41	0,000
Linéaire	3	3095,59	1031,86	327,62	0,000
Carré	3	1013,27	337,76	107,24	0,000
Interaction	2	512,48	256,24	81,36	0,000
Erreur résiduelle	6	18,90	3,15	-	-
Inadéq.de l'ajus	4	17,75	4,44	7,76	0,117
Erreur pure	2	1,14	0,57	-	-
Totale	14	4640,23	-	-	-

Tous les paramètres estimés pour ce modèle sont significatifs avec $p < 0,05$ (tableau 26). L'équation de régression polynômiale optimale pour le nouveau modèle s'écrit comme suit :

$$C(\%) = 9,126 - 0,407 X_1 + 8,798X_2 + 17,588X_3 + 15,084X_1^2 + 6,856X_2^2 + 5,321X_3^2 + 2,497X_1 \cdot X_2 + 11,040X_2 \cdot X_3 \quad (2)$$

IV.3. Diagramme des effets d'interactions des facteurs sur la conversion

Les diagrammes des interactions sont généralement utilisés pour visualiser les interactions pendant une ANOVA, dans laquelle l'effet d'un facteur dépend du niveau d'un autre facteur.

Le diagramme suivant montre que les droites parallèles indiquent l'absence d'interactions. Plus la différence de pente est grande entre les lignes, plus le degré d'interaction est élevé.

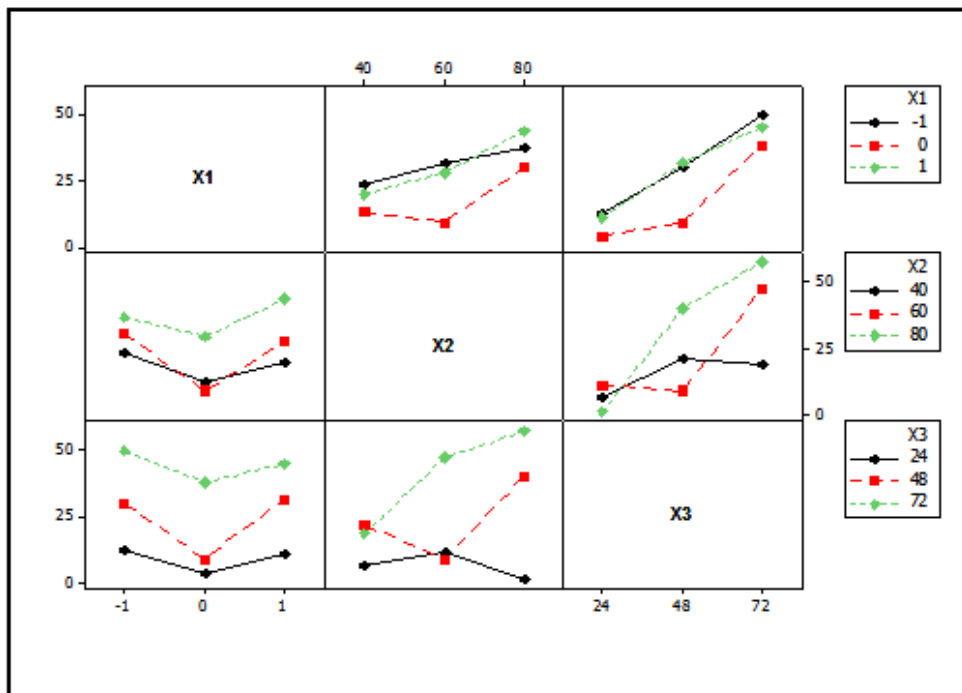


Figure 29: Diagramme des effets d'interactions des facteurs sur la conversion

Par exemple pour l'interaction entre le facteur X₁ dans le niveau de facteur X₂ le diagramme montre que la conversion augmente lorsque X₁ est maintenu dans le niveau haut de X₂.

V. Validation du modèle

V.1. Représentation graphique des réponses théoriques en fonction des réponses mesurées

Cette corrélation peut aussi être illustrée en traçant les réponses mesurées, en fonction des réponses estimées. Ceci est donné par la figure 30, qui montre une forte corrélation entre celles-ci.

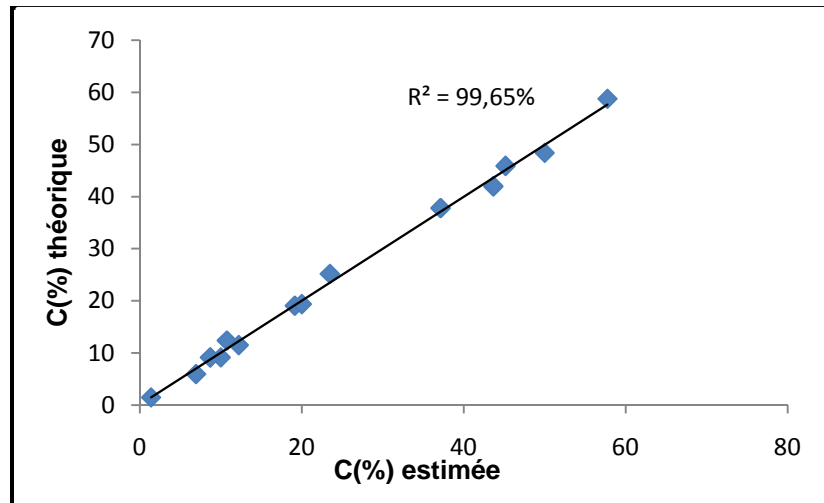


Figure 30: Réponses théoriques en fonction des réponses estimées.

D'après la figure 30, les points sont répartis autour de la droite de régression. Le modèle peut donc être jugé de qualité suffisante, puisqu'il y a 99,65% de chance qu'il explique effectivement les variations mesurées de la réponse. Le modèle rend bien compte du phénomène étudié.

V.2. Test de la normalité du plan de Box-Behnken

De nombreux graphiques fournis par le MINITAB permettent de vérifier les hypothèses statistiques et à valider les résultats obtenus. Les tests de normalité permettent de vérifier si des données réelles suivent une loi normale ou non. Pour compléter l'analyse statistique du modèle on peut étudier l'analyse des valeurs résiduelles. Un autre intérêt des techniques d'analyse de la variance est d'obtenir une estimation de la dispersion inconnue des résidus. L'analyse des résidus complète l'analyse statistique.

V.2.1. Droite de Henry des valeurs résiduelles

Généralement une droite de Henry est utile pour vérifier la normalité des données. C'est une technique graphique pour évaluer si ces données sont distribuées normalement ou pas. Le résidu est la différence entre la valeur observée et la valeur prédite de la régression. Si les points sont près d'une ligne droite on dit que les données sont distribuées normalement. Les droites de Henry sont utiles pour évaluer la normalité d'un fichier de données, même lorsque le nombre d'observations est assez faible.

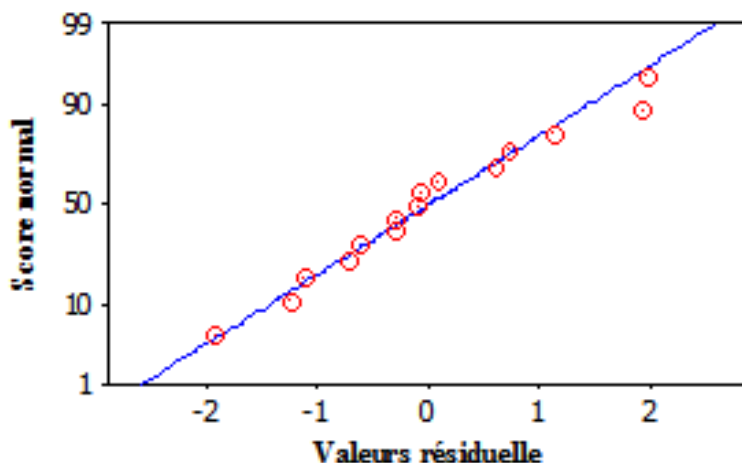


Figure 31: Droite de Henry

Sur ce graphique fournit par le logiciel, les points apparaissent assez bien alignés, cela laisse à penser que la distribution est normale.

V.2.2. Valeurs Résiduelles en fonction des valeurs ajustées pour la conversion

Les valeurs résiduelles normalisées > -2 et < 2 sont généralement considérées comme importantes. Sur la base de la figure 32, on remarque que les valeurs résiduelles sont éparpillées autour du zéro. Les valeurs résiduelles ne présentent pas des schémas particuliers ou des points situés à l'écart des autres points.

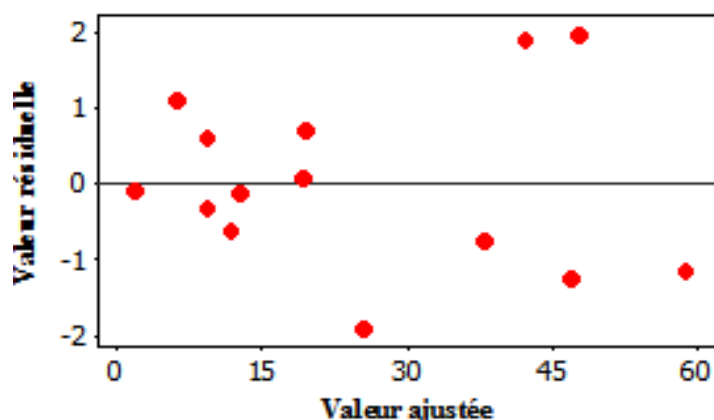


Figure 32: Valeurs Résiduelles en fonction des valeurs ajustées pour la conversion

V.2.3. L'histogramme des valeurs résiduelles de la conversion

Ce graphique permet de repérer un non normalité, un histogramme normal doit être à peu près symétrique et avoir la forme d'une cloche.

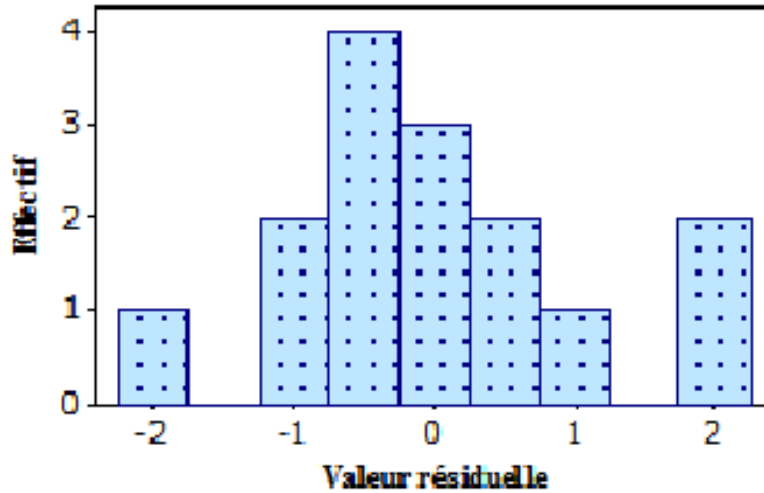


Figure 33: Histogramme des valeurs résiduelles de la conversion

V.2.4. Valeurs Résiduelles en fonction de l'ordre des observations pour la conversion

Ce diagramme présente une bonne dispersion des points des deux côtés du zéro. Il n'existe donc pas d'effet systématique dû à l'ordre de collecte des données. Les valeurs résiduelles ne présentent pas des schémas particuliers ou des points éloignés des autres points.

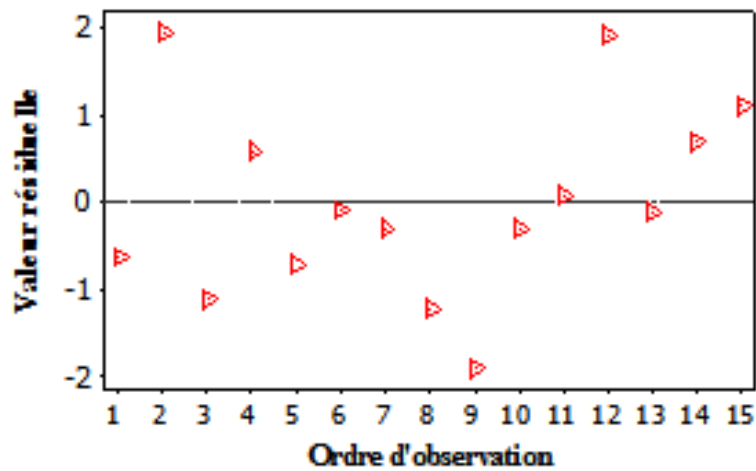


Figure 34: Valeurs Résiduelles en fonction de l'ordre d'observation pour la conversion.

On peut conclure d'après ces résultats que les graphiques des valeurs résiduelles sont satisfaisants et ne remettent pas l'analyse en question.

VI. Optimisation de la conversion

Pour la recherche des conditions optimales, c'est-à-dire les valeurs des facteurs permettant d'aboutir à une meilleure conversion, on utilise les fonctionnalités de traçage des plans de surfaces de réponses de MINITAB pour nous aider à visualiser les effets mutuels des facteurs. Nous pouvons générer deux types de graphiques de surface de réponse : le graphique de contour et le diagramme de surface. Ces graphiques montrent les relations entre une variable de réponse et deux facteurs à partir d'un modèle d'équation, les facteurs supplémentaires éventuels étant maintenus constants. Ils permettent aussi d'obtenir les valeurs de réponses et les conditions d'utilisation souhaitables. Comme un graphique de contour ne montre que deux facteurs à la fois, tout facteur supplémentaire est maintenu à un niveau constant. Par conséquent, les graphiques de contour ne seront valables que pour des niveaux fixes des facteurs supplémentaires. Si on modifie ces niveaux de maintien, la surface de réponse varie également, parfois de manière radicale. Le diagramme de surface, qui est une grille graphique en trois dimensions, représente la relation fonctionnelle entre la réponse et les facteurs expérimentaux. La surface de réponse nous aide à visualiser la réaction de la réponse à des modifications des facteurs expérimentaux. L'optimisation a été réalisée par l'analyse des diagrammes de contour (figures 35, 36 et 37) qui sont les projections des courbes tridimensionnelles des surfaces de réponse. Ces dernières sont générées par le logiciel MINITAB version 14 par la combinaison des 3 facteurs. A chaque fois un des facteurs est fixé aux 3 niveaux, haut, bas et moyen, et la réponse (axe z) est évaluée par rapport aux deux autres (axe x et axe y).

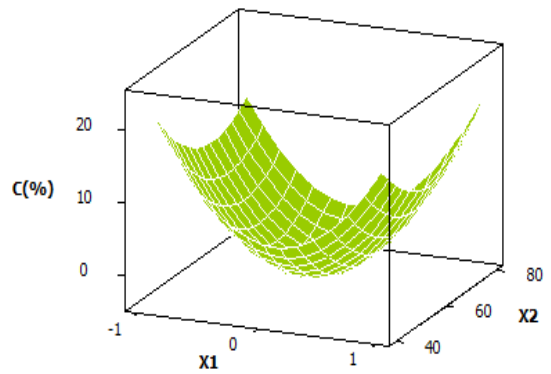
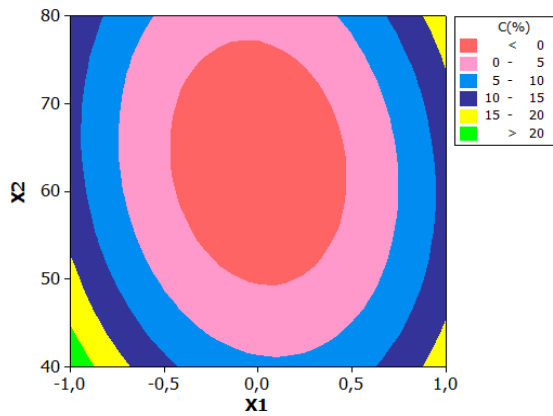
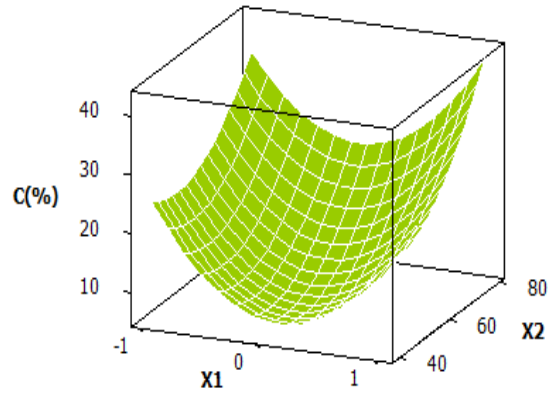
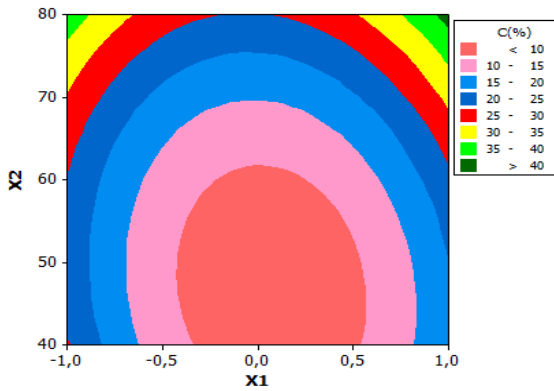
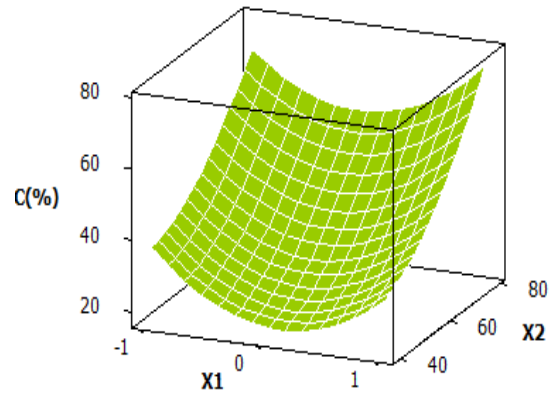
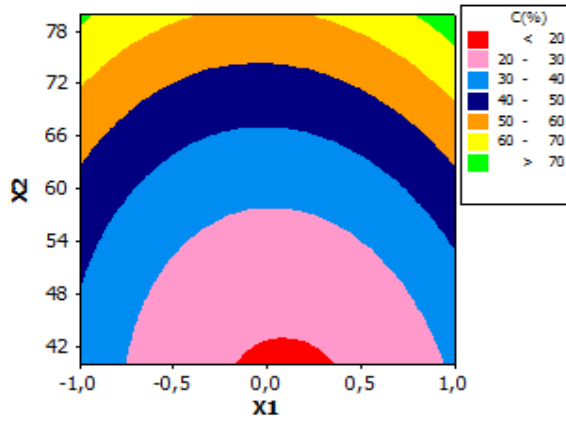


Figure 35: Diagrammes de surface de réponse et de contour pour X_1 - X_2 à X_3 max, moyen et min.

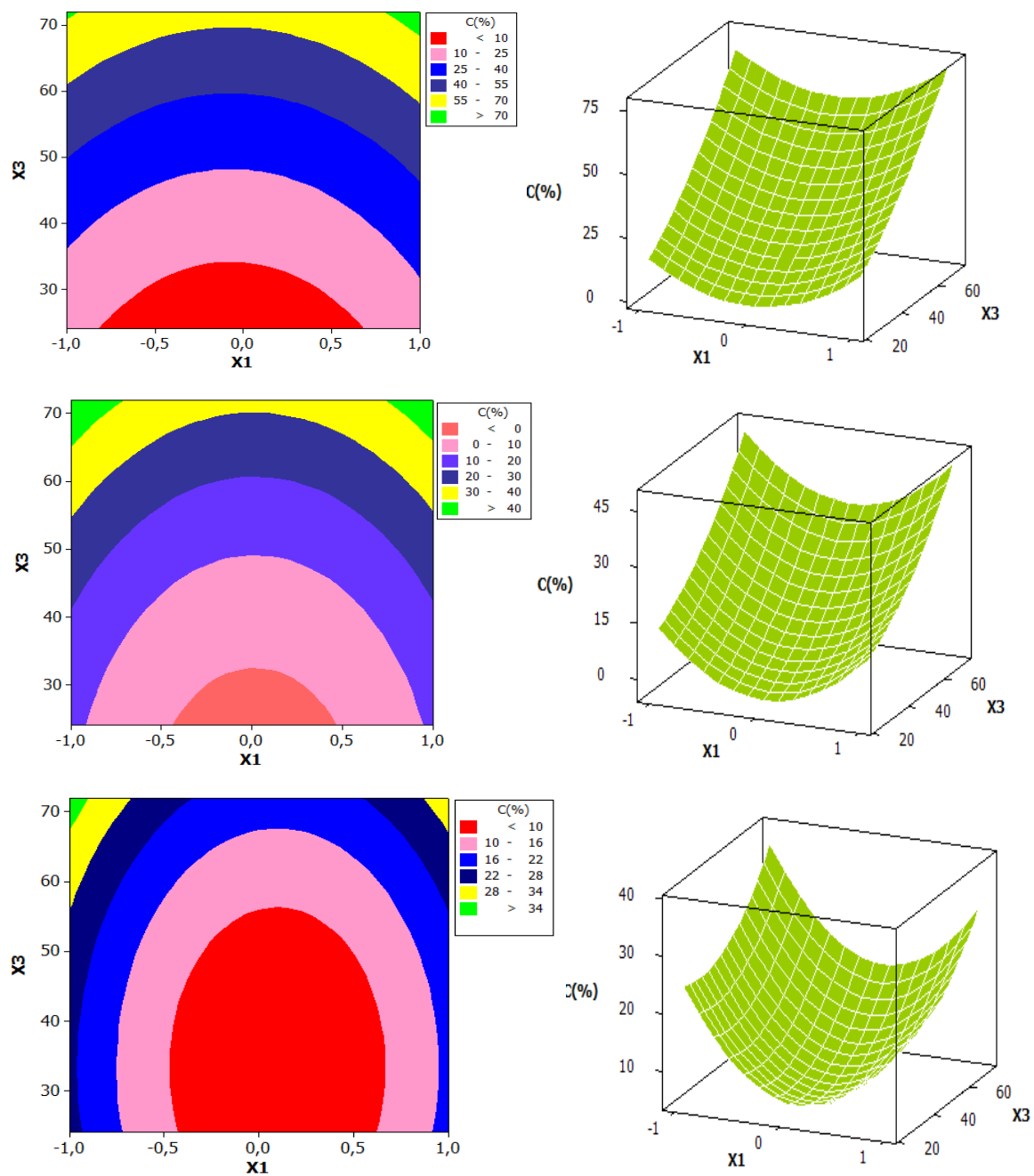


Figure 36: Diagrammes de surface de réponse et de contour pour X_1 - X_3 à X_2 max, moyen et min.

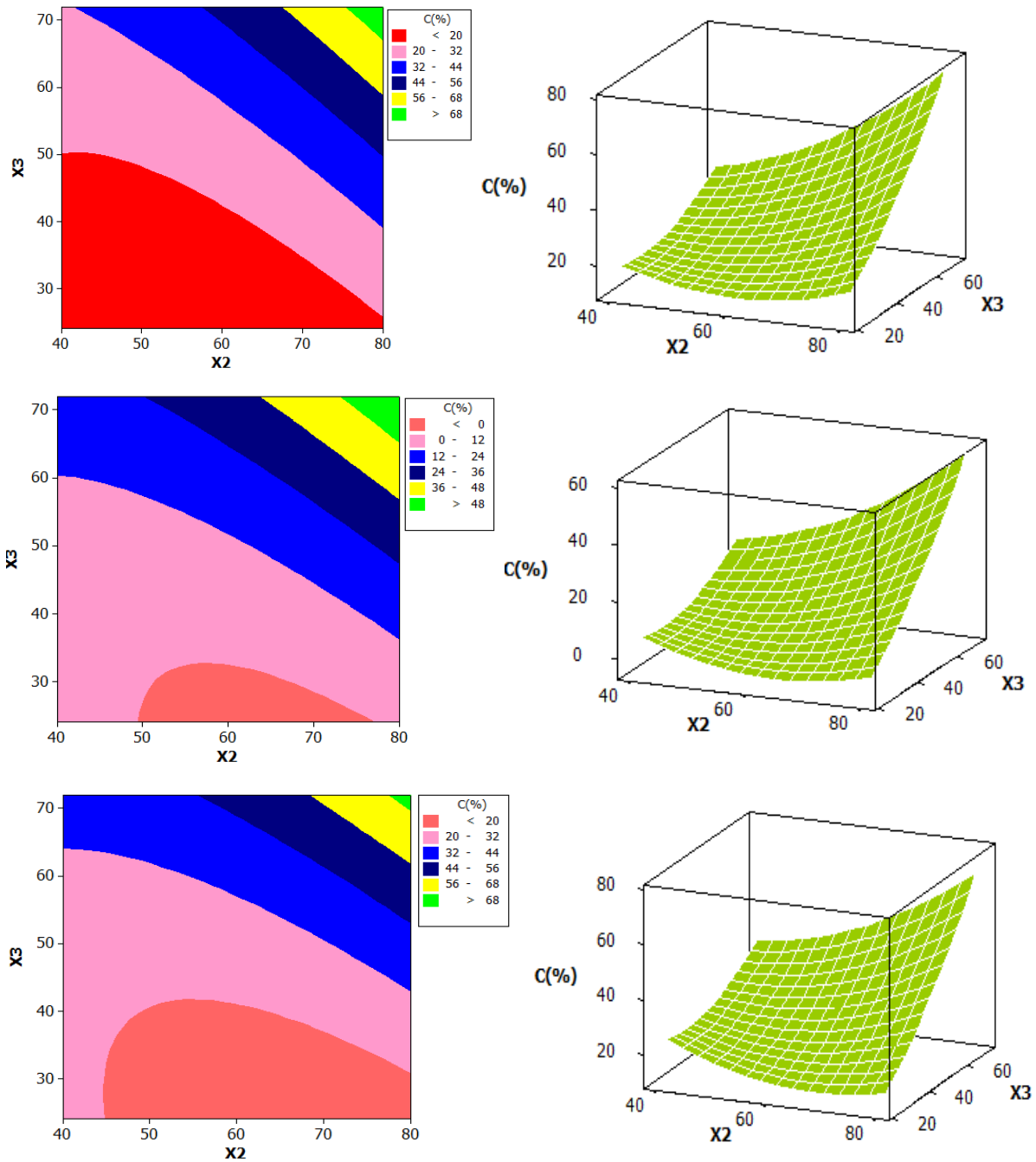


Figure 37: Diagrammes de surface de réponse et de contour pour X_2 - X_3 à X_1 max, moyen et min.

La figure 35 représente la combinaison des deux facteurs X_1 et X_2 , X_3 fixé aux niveaux haut, moyen et bas. Ici, la meilleure conversion est obtenue quand le facteur temps est fixé à son niveau haut (72h).

La figure 36 représente la combinaison des deux facteurs X_1 et X_3 , X_2 fixé aux niveaux haut, moyen et bas. Ici, la meilleure conversion est obtenue quand le facteur température est fixé à son niveau haut (80°C).

La figure 37 représente la combinaison des deux facteurs X_2 et X_3 , X_1 fixé aux niveaux haut, moyen et bas. Ici, la meilleure conversion est obtenue quand le facteur solvant est fixé à son niveau haut (EMC).

Les valeurs élevées de la conversion apparaissent dans la région verte de ces diagrammes.

Les plus fortes valeurs de la conversion ($C > 70\%$) sont obtenues lorsque les trois facteurs sont fixés aux niveaux hauts.

L'examen de l'ensemble des graphes a permis la sélection des coordonnées du point optimal, soit : $X_1=EMC$, $X_2=80^\circ C$, $X_3=72h$ et la valeur de la conversion en ce point est égale à $C=75,90\%$. Cela a été déterminé à l'aide de la fonction désirabilité du logiciel MINITAB version 14.

VII. Vérification

Il convient maintenant de réaliser concrètement une ou plusieurs expériences en fixant ces niveaux afin de vérifier si la conversion obtenue correspond bien à la valeur prédite par le modèle, c'est-à-dire qu'on effectue une vérification des coordonnées du point optimal :

- Ce point ($X_1=EMC$, $X_2=80^\circ C$, $X_3=72 h$.) est situé dans le domaine expérimental donc il constitue bien la solution recherchée au problème.
- Ces conditions réactionnelles de la synthèse d'ester de D-Glucose ont été par la suite appliquées expérimentalement. La valeur de la conversion trouvée ($C = 75,35\%$) est proche de la valeur théorique.

Ce résultat valide donc le modèle obtenu.

- On vérifie ce point critique par un simple calcul de la réponse moyenne prédite par le modèle. Ce point est donné par l'équation (1)

$$C(\%) = 9,126 + 8,798 \cdot (+1) + 17,588 \cdot (+1) + 15,084 \cdot (+1)^2 + 6,856 \cdot (+1)^2 + 5,321 \cdot (+1)^2 + 2,497 \cdot (+1) \cdot (+1) + 11,040 \cdot (+1) \cdot (+1)$$

$$C(\%) = 76,31\%$$

- Une telle valeur pour la conversion n'a jamais été obtenue lors des 15 expériences réalisées. Ce résultat est a priori très intéressant.

VIII. Conclusion

Cette étude a montré qu'un modèle polynomial d'ordre deux semble modéliser correctement le phénomène étudié ici. Il apparaît que les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire celles permettant de maximiser la réponse, ici la conversion du sucre de départ, sont obtenues pour les niveaux hauts des facteurs. Ces variables sont, la température, le temps et le solvant. La réponse est modélisée sous forme d'un polynôme en fonction des paramètres précités par l'application du plan de Box-Behnken et de la RSM. D'après l'étude statistique nous pouvons conclure que :

- ✓ Le modèle obtenu est statistiquement significatif $P = 0,000 (< 0,05)$.
- ✓ Il existe une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées, $R^2 = 99,70\%$ et $R^2_{\text{ajus}} = 99,00\%$.
- ✓ La région du point optimal pour une valeur élevée de la conversion est obtenue lorsque les trois facteurs sont fixés au niveau haut.
- ✓ La valeur optimale de la conversion est $C = 76\%$. Celle-ci correspond aux valeurs suivantes des facteurs : température à 80°C , temps à 72 heures dans l'EMC.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux est d'utiliser des outils autant théoriques que pratiques pour l'optimisation et la modélisation de la réaction d'estérification enzymatique des sucres par l'acide laurique en présence de la lipase de *Candida cylindracea* immobilisée sur célite. Ce processus enzymatique dépend de plusieurs paramètres. Pour cela les effets directs des différents facteurs sur l'avancement de la réaction précitée sont étudiés à l'aide de la méthodologie des plans d'expériences. C'est une méthode rigoureuse en vue d'un objectif précis et ceci avec un minimum d'essais.

Le choix du plan dépend des objectifs de l'expérience et du nombre de facteurs étudiés. Parmi la multitude de plans qui existent, le plan de criblage de Plackett et Burmann, le plan de modélisation de Box et Behnken et les plans d'optimisation par la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) ont été employés.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'optimisation de la synthèse des esters de D-xylose et D-glucose d'intérêt potentiel par la méthode des plans d'expériences.

La synthèse enzymatique est menée en utilisant la réaction d'estérification d'un sucre sur un acide gras en présence d'une nouvelle lipase élaborée au laboratoire, la lipase de *Candida Cylindracea* (CCL) immobilisée sur célite par la méthode d'adsorption.

Tout d'abord, nous avons optimisé le pH de fonctionnement de la (CCL I) afin de moduler son activité catalytique. Pour cela, la lipase libre est immobilisée sur un support poreux et résistant aux températures élevées. L'immobilisation est réalisée par la méthode de l'adsorption physique en variant le pH de la solution tampon. Une large gamme de pH (5,7, 6,7, 7,3, 8, 9) est utilisée. Au regard des résultats obtenus, la lipase ainsi synthétisée exprime sa plus haute activité catalytique à pH = 8.

L'influence des paramètres réactionnels tels que : le temps, la température, le tamis moléculaire, la quantité d'enzyme et l'équivalent de l'acide laurique sur l'avancement de la réaction d'acylation enzymatique du D-Xylose et du D-Glucose en présence de la CCL immobilisée est par la suite étudiée par la méthodologie des plans d'expériences.

Nous avons ainsi développé une étude en deux volets : une approche qualitative correspondant à l'analyse de screening permettant d'extraire les facteurs les plus influents à laquelle succède une analyse quantitative (RSM) fondée sur la construction et l'analyse des surfaces de réponses. Un minimum d'expériences pratiques est requis pour un maximum d'informations telles que l'estimation des effets d'interaction linéaires et quadratiques des

facteurs étudiés, la modélisation et l'optimisation des procédés par la méthodologie des surfaces de réponses (RSM) cela dans le but d'atteindre la meilleure conversion possible pour ce type de synthèse.

Nous avons dans un premier temps mis en œuvre un plan de criblage dit de Plakett-Burman, afin de dégager les facteurs les plus influents sur la réponse. L'application de ce plan a ressorti trois facteurs importants : la température, le temps et le tamis moléculaire. Dans un deuxième temps, ces trois facteurs ont été étudiés par la méthodologie des surfaces de réponses. Nous avons appliqué un plan de Box-Behnken, basé sur un modèle du second degré. La conversion a été ainsi modélisée en fonction de ces trois facteurs. D'après les analyses statistiques, le modèle obtenu est significatif, $P = 0,023 (< 0,05)$ et il y'a une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées, $R^2 = 92,65\%$ et $R^2_{ajus} = 79,41\%$. La recherche des conditions optimales, effectuée par l'analyse des diagrammes des surfaces de réponses et de contours, a permis de localiser la valeur optimale de la conversion, $C = 85,041\%$. Celle-ci correspond aux valeurs suivantes des facteurs : température à 60°C , temps à 72 heures, et quantité de tamis moléculaire à 30 mg.

Dans un deuxième volet de cette thèse, nous avons fixé les valeurs optimales des facteurs préalablement étudiés et introduits d'autres facteurs tels que la polarité du solvant et l'élargissement du domaine d'étude de la température utilisée, dans le but de la recherche des conditions optimales dans la réaction d'estérification enzymatique de substrats osidiques.

La synthèse enzymatique d'ester de D-Glucose est ainsi modélisée par la méthodologie des surfaces de réponses en utilisant le plan de Box-Behnken avec trois facteurs (la température, la polarité du solvant et le temps). Le traitement statistique des données nous permet de conclure que le modèle obtenu est statistiquement significatif $R^2 = 99,65\%$, il existe une corrélation satisfaisante entre les valeurs mesurées et les valeurs ajustées.

La valeur optimale de la conversion est $C = 76\%$, celle-ci correspond aux valeurs suivantes des facteurs : température à 80°C , temps à 72h dans l'éthyle méthyle cétone, solvant adéquat pour ce type de synthèse.

La modélisation et l'optimisation par cette méthodologie ont été effectuées à l'aide du logiciel MINITAB version 14.

En perspectives, nous envisageons de compléter ce travail en faisant varier d'autres facteurs. Ces facteurs pourraient également être introduits dans la recherche des conditions optimales de la réaction d'acylation enzymatique d'autres substrats osidiques.

Références bibliographiques

Introduction générale

1. M. Manuel Cruz Silva, S. Riva, M. Luisa. *Tetrahedron*. **2005**, 61, 3065-3073.
2. T. Kosaka, T. Yamada, *Sucrochemistry*, ACS Symposium series, New plant and new applications of sucrose esters. **1997**, 41, 84-96.
3. S. Piccicuto, C. Blecker, J-C. Brohée, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deranne, M. Paquot, M. Marlier. *Biotechnol. Agronom. Soc. Environ.* **2001**, 5, 209.
4. (a) Y.G. Shi, J.R. Li, Y. H. Chu, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2011**, 86, 1457-1468. (b) S.W. Chang, J.F. Shaw, *New Biotechnol.* **2009**, 26, 109–116. (c) J.F. Kennedy, H. Kumar, P.S. Panesar, S.S. Marwaha, R. Goyal, A. Parmar, S. Kaur, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, 81, 866–876. (d) S. Riva, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19, 43–54. (e) T. Polat, R.J. Linhardt, *J. Surfact. Deterg.* **2001**, 4, 415–421. (f) D.K. Allen, B.Y. Tao, *J. Surfact. Deterg.* **1999**, 2, 383–390.
5. Y. Yan, U.T. Bornscheuer, G. Stadler, S. Lutz-Wahl, M. Reuss, R.D. Schmid, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **2001**, 78(2), 147-152.
6. (a) V. M. Balco, A. L. Paiva, F. X. Malcata, *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 18, 392. (b) A. E. Ivanov, M. P. Schneider, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1997**, 3, 303.
7. S. Piccicuto, C. Blecker, J. C. Brohée, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deranne, M. Paquot, M. Marlier, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2001**, 5, 209.
8. Y. Queneau, S. Chambert, C. Besset, R. Cheaib, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 1999.
9. W. von Rybinski, K. Hill, G. Stoll, Alkyl Polyglucosides. Technology, Properties and Applications. *Verlag Chemie, Weinheim.* **1996**.
10. H. Oka, K. Aimonio, S. Tsuyutani, T. Fujita, K. Hashiba K, Eur. Patent EP 492397, Kao Corp. **1992**.
11. H. Lüders, Eur. Patent EP 252241, Hüls AG, **1987**.
12. (a) D.C. Montgomery, *New York: Wiley.* **2002**, 445-474. (b) R.H. Myers, D.C. Montgomery, C.M. Anderson-Cook, C.M, *New York: John Wiley & Sons.* **2009** 219–265.

Partie 1

Chapitre 1

1. I. Rico-Lattes, *Actualité Chimique.* **2007**, 305, 3-11 J. J. Morelli, G. Szajer, *J. Surfact. Deterg.* **2000**, 3, 539-552.
2. (a) J. J. Morelli, G. Szajer, *J. Surfact. Deterg.* **2000**, 3, 539-552. (b) Y. Yu, J. Zhao, A.E. Bayly, *Chin. J. Chem. Eng.* **2008**, 16, 517-527.
3. W.M. Linfield, dans "Anionic Surfactants", M. Dekker Eds., **1976**.
4. P.Wang, A. A. Keller. *Water Research.* **2009**, 43, 706-714.
5. Y. Ono, T. Shikata *J. Physical Chem.* **2005**, 109, 7412-7419.
6. C. Giardi, V. Lapinte, C. Charnay, J.J. Robin, *Reactive and Functional Polymers.* **2009**, 69, 643–649.
7. Dossier Tensio-Actifs Information Chimie. **1993**, 67, 347-351.

8. O. H. Housse, B. M. Trost, *J. Org. Chem.* **1964**, 30, 2502.
9. T. Hayashi, Y. Ikada, *Biotechnology and Bioengineering.* **1990**, 35 (5), 518-524.
10. L. Cao, Carrier-bound immobilized enzymes : principles, applications and design, Wiley-VCH, **2005**,334.
11. V.M. Balcão, A.L. Paiva, F. Xavier Malcata, *Enzyme and Microbial Technology.* **1996**, 18, 392-416.
12. S. Kumar, C.J. Tsai, R. Nussinov, *Biochemistry.* **2001**, 40(47), 14152-65.
13. C. Vieille, G.J. Zeikus. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2001**, 65(1), 1-43.
14. J. Pelmont, Enzymes Catalyseurs du monde vivant Grenoble Sciences. **2000**, 1040.
15. P.V. Iyer, L. Ananthanarayan, *Process Biochemistry.* **2008**, 43, 1019-1032.
16. B. Ozturk. Immobilization of lipase Candida rugosa on hydrophobic and hydrophilic supports, Master of Science, İzmir Institute of Technology, Turkey. **2001**, 35-39.
17. P.J. Worsfold, *Enzymes, Pure & Appl. Chem.* **1995**, 67 (4), 597-600.
18. G. Ozyilmaz, E. Gezer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 64, 140-145.
19. S.V. Dzyadevych, V. N. Arkhypova, A. P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. IRBM 29, 171-180.
20. W. Mindt, P. Racine, Schlapfer, P. Enzyme electrode. US Patent 3.838.033. **1974**.
21. L. Cao, Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design, Wiley-VCH, **2005**, 334.
22. F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 11, 949-954.
23. D. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolova, S. Franken, M. Harel, S. Remington, L. Silman, J. Shrag, J. Sussman, K. Verschueren, A. Goldman, A. Protein Engineering. **1992**, 5, 197-211.
24. R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 66, 15–32.
25. M. Holmquist, M. Nodn, K. Hult, *Lipids.* **1993**, 28, 721-726.
26. P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser, R. Miller, Lipases at interfaces: A review, Adv. Colloid Interface Sci., **2009**, 147, 237-250
27. M. P. Egloff, *Protein Sci.* **1995**, 4, 44-57.
28. (a) F. X. Malcata, H. R. Reyes, H.S. Garcia, C. G. Hill, C. H. Amundson, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 426-446. (b) K. Faber. "Biotransformations in organic chemistry", 5th edition. Springer, 22. **2004**. (c) D. Reyes, N. Lopez, M. Ferrer, F. Plou, A. Ballesteros. *Biocatalysis and biotransformation.* **2005**. 23 (1), 19-27.
29. E. Abdulmalek, H. Salami Mohd Saupi, M. Basri, A. B. Salleh, R. N. Zaliha, R. Abd Rahman, M. B. Abdul Rahman, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, 76, 37.
30. A. Dong, Z. Xiaohui, Y. Zhiwen. *Carbohydrate Research.* **2015**, 414, 32-38.
31. N. Galondea, Y. Brostauxb, G. Richarda, K. Notta, C. Jerôme, M. L. Fauconniera. *Process Biochemistry.* **2013**, 48, 1914–1920.
32. (a) A. M. Klivanov, *Chltech.* **1986**, 16, 354. (b) A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2767.
33. F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul. *J. Mol. Catal. B-Enzymatic.* **2001**, 11, 949-954.

34. D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul. *Process Biochem.* **1999**, 34, 913-918.
35. L. Li, F. Ji, J. Wang, Y. Li, Y. Bao. *Enzyme and Microbial Technology.* **2015**, 69, 46-53.
36. W. A. M. Alloue, M. Aguedo, J. Destain, H. Ghalfi, C. Blecker, J. P. Wathelet, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008**, 12, 57-68.
37. A. E. Ivanov, M. P. Schneider, *J. Mol. Catal. B: Enzy.* **1997**, 3, 303-309.
38. M. K. Walsh, R. A. Bombyka, A. Wagha, A. Bingham, L. M. Berreau, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **2009**, 60, 171-177.
39. M. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes.* Academic Press, New-York. **1979**.
40. Z. H. Uswatun, E. Abdulmalek, S. O. Siti, M. Basri, A. B. Salleh, R. N. Zaliha, M. B. Abdul Rahman, *Food Chemistry.* **2012**, 131, 199-205.
41. E. Abdulmalek, N. Fazriyana Hamidon, M. B. Abdul Rahman, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2016**, 16, 30109-6.
42. Y. Yan, U.T. Bornscheuer, G. L.W. Stadler, *Lipid. Sci. Technol.* **2001**.
43. S. Tarahomjoo, I. Alemzadeh . *J.Enzy. Micro. Tech.* **2003**, 33, 33 -37.

Chapitre 2

1. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *J. Phar. Biome. Analy.* **2011**, 56, 141- 158.
2. D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Elsevier, Amsterdam, **1997**.
3. Y. Vander Heyden, C. Perrin, D.L. Massart, *Handbook of Analytical Separations*, K. Edition Valkó. **2000**, 163-212.
4. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *Comprehensive Chemometrics.* **2009**, 547-575
5. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *Acta Chromatogr.* **2009**, 21, 161-201.
6. B. Dejaegher, A. Durand, Y. Vander Heyden, *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis.* **2010**, (Chapitre 2), 11-74.
7. D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 4th edition, John Wiley, New York, **1997**.
8. W. Tinsson, *Plans d'expériences. Constructions et analyses statistiques*, **2010**.
9. R. A. Fisher, *Statistical methods for research workers*, Edinburgh, Edition Oliver and Boyd. **1925**, 239.
10. R. A. Fisher, *J. Ministry. Agric.* **1926**, 33, 503-513.
11. F. Yates, complex experiments (with discussion), *J. R. Statist.* **1935**, 181-247.
12. W. G. Cochran, *J. Dairy . Sci.* **1941**, 24, 937-951.
13. R. L. Plackett, J. P. Burman, *Biomertika*, **1946**, 33 (4), 305-325.
14. G. E. P. Box, *Biomertika*, **1952**, 39 (1), 49-57.
15. G. E. P. Box, K. B. Wilson, *Journal of Statistical Royal Society*, **1951**, 13 (1), 1-45.
16. H. Scheffé, *J. R. Statist.* **1958**, 20 (2), 344-360.
17. J. Kiefer, *J.R. Starust.Soc.* **1959**, 21 (2), 272-319.
18. C. Pierre, Les plans d'expériences partie 1: Principes généraux, *Revue: Contrôles-Essais- Mesures*, **2005**, 69-72.
19. P. Dagnelie, Le plan d'expérience évolue, *Revue MODULAD*, N° 38, **2008**.
20. J.J. Rousselle, Thèse de doctorat. Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale. Université François Robelais, **2003**.

21. J. J. Droesbeke, J. Fine, G. Saporta, Plans d'expériences: applications à l'entreprise. Editions *TECHNIP*, **1997**.
22. J. Goupy, Plans d'expériences, Techniques de l'Ingénieur, Analyse et Caractérisation. **1998**, 1-28.
23. J.J. Rousselle, Thèse de doctorat. Les contours actifs, une méthode de segmentation application à l'imagerie médicale. Université François Robelais, **2003**.
24. Engineering statistics handbook, Process Improvement, (Chapitre 5), **2006**. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/pri.htm>
25. Goupy J., Les plan d'expérience, *revue MODULAD*, **2006**, 34, 74-116.
26. Goupy J., Pratiquer les plans d'expériences. Editions *DUNOD*, **2005**.
27. H. Angellier, Thèse doctorat. Nanocristaux d'amidon de maïs cireux pour applications aux composites. Université Grenoble 1, **2005**.
28. J. Goupy, Etude comparative de divers plans d'expériences, *Revue statistiques appliquées*. **1990**, tome 38, N°4, 5-44. http://www.numdam.org/item?id=RSA_38450
29. G. Sad, M.C. Sado, Les plans d'expériences, de l'expérimentation à l'assurance qualité. Collection AFNOR, **1991**.
30. J. Goupy, Modélisation par les plans d'expériences, *Techniques de l'ingénieur, mesures et contrôles*. R 275, 1-23.
31. S. L. C. Ferreira, W. N. L. dos Santos, M. A. Bezerra, V. A. Lemos, J. M. Bosque - Sendra, *Anal Bioanal Chem*. **2003**, 375, 443-449.
32. S. Trabelsi, N. Oturan, N. Bellakhal, M. A. Oturan, *J. Mater. Environ. Sci*. **2012**, 3 (3), 426-433.
33. G. A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, Edition Marcel Dekker, New York, **1999**.
34. A. Kamoun, M. M. Chaabouni, H.F. Ayedi, *Techniques de l'ingénieur*, Doc. M 1429, 1-24.
35. S. Nosrati, N. S. Jayakumar, M. A. Hashim, *Desalination*. **2011**, 266, 286-290.
36. E.Y. Yazici, H. Deveci, *Hydrometallurgy*. **2013**, 139, 30-38.
37. M. Cobas, M. A. Sanromán, M. Pazos, *Bioresource Technol*. **2014**, 160, 166-174.
38. S. L. C. Ferreira, R. E. Bruns, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brand, E. G. P da Silva, L. A. Portugal, P.S. dos Reis, A. S. Souza, W. N. L., *Analytica Chimica Acta*. **2007**, 597, 179-186.
39. C. H. Dong, X. Q. Xie, X. L. Wang, Y. Zhan, Y. J. Yao, *Food and bioproducts processing*, **2009**, 87, 139-144.
40. M. Sautour, P. Mary, N. E. Chihib, J. P. Hornez, *Journal of Applied Microbiology*, **2003**, 95, 807-813.
41. R. Lahlali, S. Massart, M. N. Serrhini, M. H. Jijakli, *International Journal of Food Microbiology*. **2008**, 122, 100-108.

Partie 2

Chapitre 1

1. M.G. Megahed. *Grasas y Aceites*. **2000**, 51(6), 457.
2. S. Matsumura, Y. Kinta, K. Sakiyama, K. K. Toshima. K.. *Biotechnol. Lett.*, **1993**, 18 (11), 1335.

3. Y. Sugimura, K. Fukunaga, T. Matsuno K. Nakao, M. Goto, F. Nakashio. *Biochem. Eng. J.* **2000**, 5:123.
4. T. Serradj, C. Bidjou-Haiour, *Alg. J. Adv. Mater.* **2008**, 5, 297.
5. G. Fregapane, D. B. Sarney, S. G. Greenberg, D. J. Knight. E. N. Vulfson, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, 71, 87
6. A. Salihu, Md. Zahangir Alam, M. I. Abdul Karim, H. M. Salleh. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences.* **2012**, 2, 24.
7. D. Hellal. Thèse de Magister. Optimisation de la réactivité dans la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose. **2011**.
8. J. Livage, T. Coradin. C. Roux, *J. Phys. Condens. Matter*, **2001**, 13, 673.
9. P. L. A. Overbeeke, G. C. N. Khalaf, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen, *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2000**, 10, 385.
10. (a). Y. Gargouri, S. Ransac, R. Verger, *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, 1344, 6.
(b). T. Maruyama, M. Nakajima, S. Ichikama, H. Nabetani, S. Furusaki, M. Seki, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, 77, 1121.
11. (a) C. Bidjou-Haiour; N. Klai, *Asian. J. Chem.* **2013**, 25 (8), 4347. (b) N. Klai, C. Bidjou-Haiour, S. Bouquillon, *C. R. Chimie*, **2015**, 18, 599- 606.
12. A. Ducret, A. Giroux, M. Trani, R. Lortie, *J. Am. Oil chem. Soc.* **1996**, 73, 109-1

Chapitre 2

1. M. Leitgeb, Z. Knez, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, 67, 775-778.
2. Y. Yan, U.T. Bornscheuer, G. L.W. Stadler, *Lipid Sci. Technol.* **2001**.
3. J. Goupy, *Pratiquer les plans d'expériences*, éditions DUNOD. **2005**.
4. J. Goupy, *Analytica Chimica Acta.* **2005**, 554, 184-190.

Chapitre 3

1. N. Bouzaouit, C. Bidjou-Haiour, *Der Pharma Chemica.* **2015**, 7(1), 261-269.
2. F. Chamouveau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, *J. Mol. Catal. B – Enzymatic.* **2001**, 11, 949-954.
3. D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, *Process Biochem.* **1999**, 34, 913-918.

Partie expérimentale

Généralités et appareillages

- Solvants et réactifs commerciaux

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 des synthèses organiques proviennent essentiellement des sociétés Sigma-Aldrich, Fluka et Acros. Dans une moindre mesure, les sociétés Strem et Merck ont également été sollicitées.

- Méthodes chromatographiques

Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (Merck Art 5554 DC Alufolien Kieselgel 60, F₂₅₄) révélées par un spray d'une solution méthanolique d'H₂SO₄ à 10% suivie du brûlage de la plaque. Les chromatographies sur gel de silice ont été effectuées sur silice (0.063-0.200 mm, 70-230 mesh).

- Analyse par Résonance magnétique nucléaire RMN

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil BRUKER de type AC 250 (¹H : 250 MHz, ¹³C : 62,9 MHz) dans le DMSO-d₆.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm), le TMS étant pris comme référence interne. Les constantes (J) sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux est explicitée en utilisant les abréviations suivantes: singulet (s), doublet (d), triplet (t), multiplet ou massif (m), doublet de doublet (dd), doublet de triplet (dt).

- Spectroscopie de masse (SM)

Les spectres de masse ont été enregistrés au moyen d'un appareil GCMS (QP2010s, Shimadzu) après silylation des produits, soit par impact électronique soit par la méthode électrospray ionisation (ESI+ 30eV).

- Spectroscopie infrarouges (IR)

Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer FT-1600. Les échantillons liquides sont déposés en film entre deux pastilles de NaCl, et en présence de KBr dans le cas des échantillons solides. Le nombre d'onde est exprimé en cm⁻¹.

Protocoles opératoires

1 Immobilisation de la lipase de *Candida cylindracea*

1. Préparation des solutions mères

Solution (a) : Solution 0,2 M de phosphate monosodique ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) : 27,8 sont dissout dans 1000 ml d'eau distillée.

Solution (b) : Solution 0,2 M de phosphate de sodium disodique hexahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) : 52,65 g sont dissout dans 1000 ml d'eau distillée.

2. Préparation des solutions tampons

On mélange x ml de la solution (a) et y ml de la solution (b) et on dilue le tout à un total de 200 ml avec de l'eau distillée.

- Solution tampon pH = 9 ; 0.2 M

A 50 ml de (b) on ajoute la solution (a) jusqu'un pH=9.

- Solution tampon pH=6.7 ; 0.2M

A 43.5 ml de solution (b) on ajoute 56.5 ml la solution (a).

- Solution tampon pH=5.7 ; 0.2M

A 6.5 ml de (b) on ajoute 93.5 ml de la forme basique (a).

- Solution tampon pH=7.3 ; 0.2M

A 77 ml de (b) on ajoute 23 ml de la forme basique (a).

- Solution tampon pH = 8 ; 0.2 M

Dans 1000 ml d'eau distillée sont dissous 13.8 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 24.9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3. Protocole opératoire de l'immobilisation

Dans un ballon sont dissous 60 mg de lipase et 180 mg de célite dans 10 ml de solution tampon (pH = 5,7 - 9) sous agitation pendant 30 minutes à 4°C, puis 20 ml d'acétone froide (-15°C) sont ajoutés. Après 2 heures d'agitation, la réaction est arrêtée, l'enzyme filtrée sous vide et lavée deux à trois fois avec l'acétone. La lipase est ensuite séchée dans un dessiccateur sous vide, puis conservée à -18°C.

Rdt = 45%.

2 Estérification enzymatique des sucres

Procédure générale

Le sucre (200 mg, 1,33 mmol) est dissous dans 5 ml de solvant et mis sous agitation pendant 24 heures. L'agent acylant est alors additionné. On laisse sous agitation magnétique pendant 15 mn. La lipase est ensuite ajoutée en quantité adéquate ainsi que le tamis moléculaire (4 Å) en quantité équimolaire de lipase. Afin de contrôler la libération de l'eau dans le milieu, les tamis moléculaires sont activés pendant une nuit à haute température et laissés dans un dessiccateur avant leur utilisation. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. A la fin de la réaction, le mélange est filtré et évaporé sous pression réduite. Les esters de sucres obtenus sont purifiés suivant le protocole opératoire décrit sur le schéma suivant.

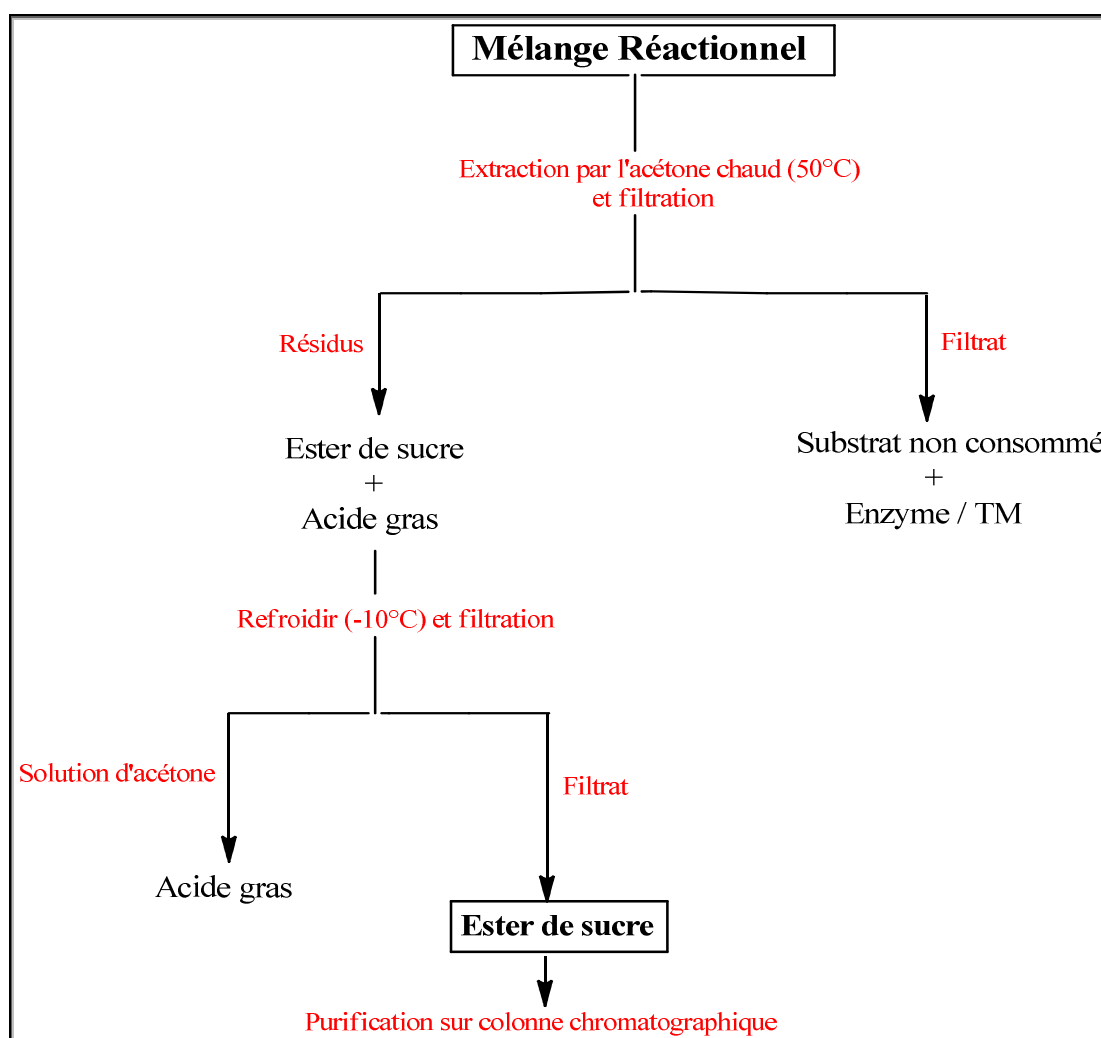
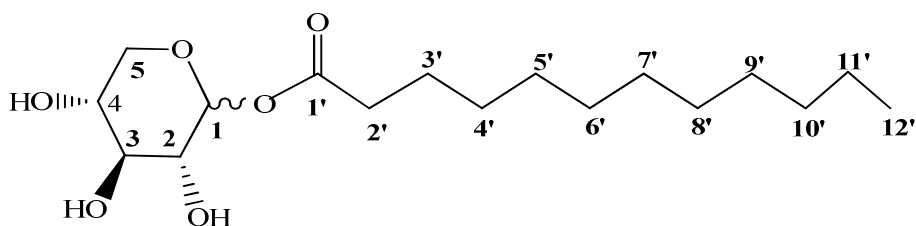


Schéma 22: Schéma de purification générale des esters de sucre d'acide gras.

➤ **1-O-Dodecanoyl- α,β -D-Xylopyranoside**



Formule brute : C₁₇H₃₂O₆.

Masse molaire : 332 g/mol.

Rf : 0.66 (DCM/MeOH, 9:1).

Rdt : 52%.

Solide blanc.

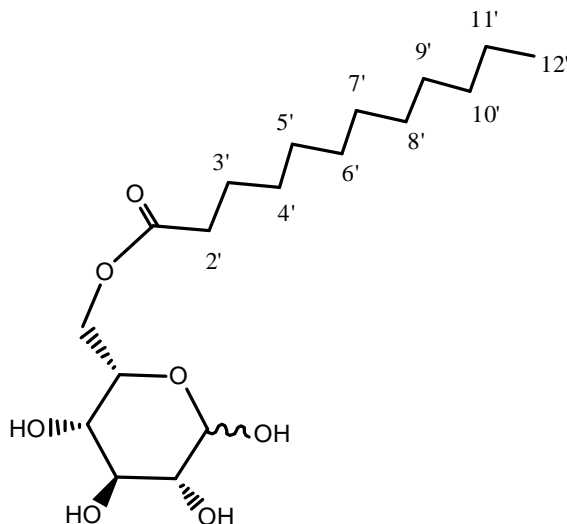
RMN ¹H (DMSO-d₆, 250 MHz), δ (ppm): 0.81 (m, 6H, H_{12'}), 1.24 (m, 32H, H_{11'}, H_{10'}, H_{9'}, H_{8'}, H_{7'}, H_{6'}, H_{5'}, H_{4'}), 1.5 (m, 4H, H_{3'}), 2.1 (s, 4H, H_{2'}), 3.13-4.0 (m, 10H, 2H_{5 α} , 2H_{5 β} , H_{2 α} , H_{2 β} , H_{4 α} , H_{4 β} , H_{3 α} , H_{3 β}), 5.3 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz, H_{1 α}), 6.01 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H_{1 β}).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 62.9 MHz), δ (ppm): 13.8 (C_{12'}), 22.0 (C_{11'}), 24.3 (C_{10'}), 28.3 (C_{9'}), 30.3, 30.4, 30.5, 30.6 (C_{8'}, C_{7'}, C_{6'}, C_{5'}, C_{4'}, C_{3'}), 32.9 (C_{2'}), 62.9 (C_{5 α}), 66.8 (C_{5 β}), 69.1 (C_{1' α}), 70.7 (C_{1' β}), 71.0 (C_{4 α}), 71.4 (C_{4 β}), 73.5 (C_{2 α}), 74.8 (C_{2 β}), 75.0 (C_{3 α}), 77.7 (C_{3 β}), 95.0 (C_{1 α}), 100 (C_{1 β}), 170 (2CH₃C=O).

IR (KBr) : O-H 3340cm⁻¹, C-H 2960-2850 cm⁻¹, C=O 1735cm⁻¹, C-O 1149 cm⁻¹, -CH₂ 1468 cm⁻¹, 1058 (C-O-H).

GC/MS : m/z = 458 [M-HOTS], 368 [M-2HOTS].

➤ **6-O-Dodecanoyl- α,β -D-(α)-Glucopyranoside**



Formule brute : $C_{18}H_{34}O_7$

Masse molaire : 362 g/mol

Rf : 0.27 ($CH_2Cl_2/MeOH$: 90/10)

Rdt : 43%.

F° = 130°C.

% α = 84,37%.

% β = 15,68%.

Solide blanc.

RMN 1H (DMSO- d_6 , 250 MHz), δ (ppm): 0.85 (t, 6H, H-12'), 1.25 (m, 32H, H-4'-11), 1.50 (m, 4H, H-3'), 2.27 (t, 4H, H-2'), 2.95-3.20 (m, 6H, H-2 α , H-2 β , H-3 α , H-3 β , H-4 α , H-4 β), 3.76 (m, 2H, H-5 α , H-5 β), (dd, 2H, J=5.95, 6.03, H-6), 4.24 (d, 2H, J=10.8, H-6, H-1 β), 4.56 (m, 2H, OH-4 α , OH-4 β), 4.72-5.20 (m, 5H, OH-2 α , OH-2 β , OH-3 α , OH-3 β , H-1 α), 6.35 (d, 1H, J=2.98, OH-1 α), 6.65 (d, 1H, OH-1 β).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 62.9 MHz), δ (ppm): 13.87 (C-12, CH_3), 22.01 (C-11', CH_2), 24.38 (C-3', CH_2), 28.35 (C-4', CH_2), 28.63 (C-5', C-6', CH_2), 28.83 (C-7', CH_2), 28.92 (C-8', C-9',

CH₂), 31.21 (C-10', CH₂), 33.38 (C-2', CH₂), 172.83 (C-1', C=O); 63.78 (C-6, CH₂), 69.03 (C-4, CH), 70.45 (C-5, CH), 72.09 (C-2, CH), 72,76 (C-3, CH), 92.19 (C-1, CH).

IR (KBr) : O-H 3340cm⁻¹, C=O (ester) 1735cm⁻¹, C-O 1149 cm⁻¹, -CH₂ 1468 cm⁻¹, 1058 (C-O-H)

GC/MS (du produit silylée) : m/z [M-TMS-TMSOH-H]⁻ = 486

3 Mesure de la conversion (C%)

La conversion est évaluée par titrage colorimétrique par la mesure de la quantité d'acide gras non réagit dans le milieu réactionnel selon le mode opératoire suivant : 0.1g de mélange réactionnel est dilué dans 20 ml d'une solution de phénophtaléine dans l'éthanol à 0.1%. Une solution de NaOH 0.1M est ensuite ajoutée goutte à goutte jusqu'à obtention d'une coloration rose.

La conversion est donnée par l'expression suivante:

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



Scholars Research Library

Der Pharma Chemica, 2015, 7(1):261-269
(<http://derpharmachemica.com/archive.html>)



ISSN 0975-413X
CODEN (USA): PCHHAX

Optimization of lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose ester using statistical experimental designs

Nadia Bouzaouit and Chahra Bidjou-Haiour

LOMOP. Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Badji-Mokhtar University, El-Hadjar, Annaba, Algeria

ABSTRACT

The present work is devoted to study the effect of various factors affecting the enzymatic synthesis of fatty acid xylose ester using the methodology of experimental designs. To optimize the different parameters that have a direct influence on the production of lauric xylose ester, experiments were conducted using first a design of Plackett-Burman to initially screen five of which the three factors were found to have significant effect on xylose ester production. Response surface methodology under Box-Behnken design was then employed to analyze the effects of important parameters on the preparation of fatty acid xylose ester. Experimental ester conversions were found to be in good agreement with predictions. The search for optimal conditions, verified by analysis of contour plots, helped to locate the optimal value of the conversion, $C = 85\%$. This corresponds to the following values of the factors : temperature 60°C , time 72 hours, and 30 mg of molecular sieves.

Keywords: xylose, lipase, Plackett-Burman design, Box-Behnken design, Response surface methodology

INTRODUCTION

Naturally occurring sugar esters [1] are of particular interest in the field of biocompatible surfactants. Because of their properties of amphiphilic nature, nontoxic, bio-degradability, among others, they are often used in the pharmaceutical, cosmetic and food industry [2,3]. Sugar esters can be synthesized using either chemical or biological catalysts. As a result of regioselectivity and mild reaction condition of enzymatic process [4], there is growing interest in the application of lipases as biocatalyst for carbohydrate fatty acid esters production [5, 6]. Numerous reports have shown that lipases are good biocatalyst in non aqueous media [7, 8]. In our previous study, the enzymatic synthesis of 1-*O*-dodecanoyl-D-xylopyranose by esterification of D-xylose with lauric acid using immobilized lipases was carried out in organic solvents [9]. In the present study, the esterification of D-xylose was carried out using immobilized *Candida cylindracea* lipase as a catalyst and optimized with response surface methodology. The study is aimed at a better understanding of the relationships between the important reaction parameters (sugar/fatty acid ratio, amount of enzyme, amount of molecular sieves, temperature and reaction time) and sugar conversion.

The study of enzymatic sugar ester synthesis is so complicated because it depends on several factors [10] and important aspects of this reaction remain to be clarified. The use of experimental design has become more common in several sciences such as bioprocess, environmental chemistry etc...[11]. A well defined statistical experimental design is considered to be necessary for optimization of such process, since it would be possible to get more information through conducting fewer measurements during the process.

The Plackett-Burman design (PBD) has been frequently used for screening process variables that make the greatest impact on a process [12]. It is a set of small and efficient experimental design, which is very powerful, widely

applicable and especially well suited for biotechnology research and development [13]. Recent reports on the use of PBD include its application toward improving lipase catalyzed esterification [14].

To carry out this study, a first screening design of Plackett-Burmann was used to identify which factors have significant effects on xylose ester production. Such factors are then studied by Box-Benkhen design [15]. The results were analyzed by response surface methodology (RSM). RSM has been reported to be an effective tool for optimizing a process [16]. It is defined as the statistical tool that uses quantitative data from appropriate experimental design to determine and simultaneously solve multivariate equations. The graphical representation of these equations are called as response surfaces, could be used to describe the individual and cumulative effect of the test variables on the response and to determine the mutual interaction between the test variables and their subsequent effect on the response [17]. Recently, optimization of lipase-catalyzed production of various esters by RSM has been investigated like synthesis of emulsifier in food industry such as lauroyl lactic acid [18] and synthesis of antioxidant such as octyl hydroxyphenyl propionate [19]. Although the enzymatic synthesis of highly biodegradable surfactants from renewable resources (sugar and fatty acids) has been widely investigated [20,21], statistical design of experiments and RSM have been only applied in a few studies [22,23].

The aim of this investigation is to optimize the synthesis of xylose laurate production by immobilized *Candida cylindracea* lipase (CCL Im) as well as to study the application of RSM to assess the relative importance of process variables.

MATERIALS AND METHODS

Candida cylindracea lipase (Type II) was purchased from Sigma Co. (USA). D-xylose from Sigma-Aldrich and lauric acid from Merck were tested as starting materials. Ethanol (EtOH), tetrahydrofuran (THF) were from Merck. Molecular sieves 3Å (4-8 mesh) was used as a water removal adsorbent (Aldrich, USA). All other chemicals used in this work were of analytical grade and used without further purification.

General procedure for xylose ester synthesis

D-xylose (200 mg, 1,33 mmol) was first dissolved in THF for one night. After that, lauric acid (from 1,33 to 1,99 mmol) was added, the mixture equilibrated for 15 min and the biocatalyst (CCL Im) finally incorporated. Aliquots were removed at intervals, filtered and analyzed qualitatively by thin layer chromatography and quantitatively by volumetric titration.

Analysis

The sugar content was quantified by calculating the residual fatty acid amount in the reaction mixture. Samples were analyzed by volumetric method : 0.1 g of sample of reaction mixture was diluted in 20 mL of 0.1 wt % phenolphthalein solution in absolute ethanol and then titrated with standardized sodium hydroxide solution of 0.1 M in water. Samples were withdrawn at definite time intervals and the extent of esterification monitored by a back titration procedure which estimated the decrease in total acid content of the reaction mixture.

Lipase immobilization

Celite (60 mg) was added to 10 mL of 0,1 M phosphate buffer (pH = 8) containing the *Candida cylindracea* lipase (100 U/mL). The reaction was then stirred with a magnetic bar at 4 °C and 100 rpm for 30 mn. 20 mL of cold acetone were then added. After 2 h, the suspension was filtered. The immobilized enzyme was washed with acetone, dried in a vacuum desiccator and then stored at -18 °C.

Experimental designs and data analysis

Before applying the response surface methodology (RSM) to determine the conditions which will give the best conversion for xylose laurate synthesis, two experimental designs were conceived and applied : a preliminary experiment based on Plackett-Burman Design (PBD) followed by a Box-Behnken Design (BBD). The first design's objective was to highlight the most influential parameters, which were studied in more depth with the second experimental design.

The Plackett-Burman statistical experimental design is a reliable method to short-list the most significant parameters from a wide range or understand the extent of esterification possible under a given set of conditions in a very small number of experiments. PBD considers the statistical interactions between variables to obtain maximum interferences for a minimum number of tests, thus reducing process variability, time of development and overall costs. The parameters selected for the experiment were xylose/acid lauric ratio (LA), immobilized *Candida cylindracea* lipase concentration (CCL Im), amount of molecular sieves (MS), temperature (T°) and reaction time (t). All trials were performed in triplicate and the sugar conversion (C) was used as the response. In the present study

the five independent variables were organized according to the PBD matrix. For each variable, high (+1) and low (-1) levels were tested (Table 1).

Table 1. Process variables and levels in Plackett-Burman design

Parameter	Symbol	Unit	Levels	
			Low(-)	High(+)
Xylose/Lauric acid ratio	LA		0,5	1
<i>Candida cylindracea</i> lipase	CCL Im	mg	10	30
Molecular sieves	MS	mg	10	30
Temperature	T°	°C	40	60
Time	t	h	24	72

As per the design, various combinations of the five parameters used, along with the results obtained, are summarized in Table 2.

Table 2. Plackett-Burman design matrix with coded and actual values for 5 independent variables

Run. N°	Coded values					Actual values					C (%)
	LA	CCL Im (mg)	MS (mg)	T (°C)	t (h)	LA	CCL Im (mg)	MS (mg)	T (°C)	t (h)	
1	-1	1	1	1	-1	0,5	30	30	60	24	35
2	-1	-1	-1	-1	-1	0,5	10	10	40	24	20
3	1	1	-1	1	-1	1,0	30	10	60	24	40
4	-1	1	-1	-1	-1	0,5	30	10	40	24	20
5	-1	-1	1	1	1	0,5	10	30	60	72	50
6	1	-1	1	-1	-1	1,0	10	30	40	24	10
7	1	1	1	-1	1	1,0	30	30	40	72	20
8	1	-1	1	1	-1	1,0	10	30	60	24	45
9	1	-1	-1	-1	1	1,0	10	10	40	72	30
10	-1	1	1	-1	1	0,5	30	30	40	72	32
11	1	1	-1	1	1	1,0	30	10	60	72	70
12	-1	-1	-1	1	1	0,5	10	10	60	72	60

To obtain a proper model for the optimization of xylose ester synthesis, the Box-Behnken design, for three variables was then applied. This design was preferred because relatively a few experimental combinations of the variables are adequate to estimate the response function. A3 -factor, 3-level design used is suitable for exploring quadratic response surfaces and constructing second order polynomial model.

Statistical analysis

The experimental data were analyzed by the statistical software package Minitab 14. The goodness of fit of the model was evaluated by the coefficient of determination (R^2) and the analysis of variances.

RESULTS AND DISCUSSION

Plackett-Burman Design

A preliminary screening was carried out based on PBD with 5 variables (xylose/acid lauric ratio, immobilized *Candida cylindracea* lipase concentration, amount of molecular sieves, temperature and reaction time) and 2 levels (Table 2).

According to their p -value (> 0.05), the less significant factors were discriminated, whilst the parameters that significantly influenced the sugar conversion were selected later for the BBD.

From the statistical analysis, it was found that ester production was affected by the amount of molecular sieves, the temperature and the reaction time [24] as evident from their p -values as shown in Table 3 (a p -value less than 0.05 is considered significant).

Moreover the model coefficients allow to assess the influence of factors on the response (Table 3). It was found that coefficients with high values are the most important factors.

The final response equation obtained with the coded factors values is as follows:

$$C (\%) = 36 + 14T^\circ + 7,667t - 4MS + 0,167CCL\ Im - 0,167LA \quad (1)$$

Table 3. Estimated effects and coefficients for conversion

Term	Effect	Coefficient	p-value
Constant	-	36,000	0,000
LA	-0,333	-0,167	0,934
CCL Im	0,333	0,167	0,934
MS	-8,00	-4,0	0,085
T°	28,000	14,000	0,000
t	15,333	7,667	0,008
R ² = 92,28%		R ² adj = 91.5%.	

Model fitting and analysis of variance (ANOVA)

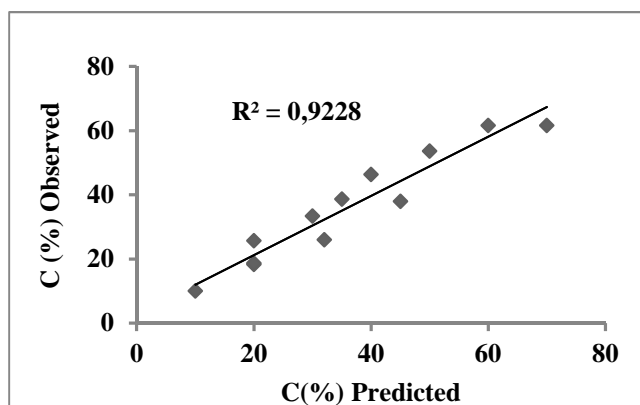
It is always necessary to examine the fitted model to ensure that it provides an adequate approximation of the true system. The ANOVA results of the developed model is calculated using the statistical software Minitab 14 and are shown in Table 4. The significance of the model has been analyzed by the F-test (Table 4). The F-value and the p-value of the model are 14,34 and 0,003 respectively, showing a statistical relation between the response and the selected factors and therefore the significance of the model at 95% probability level. The fit of the model has been tested by the analysis of the regression equation and the R². The R² of 0.9228 is concordant and confirms that 92,28 % of variation in the ester formation can be explained by the fitted model.

Table 4. Analysis of variance for the experimental PBD.

Source	DF*	SS**	MS***	F-value	p-value
Model	5	3250	650	14,34	0,003
Residual Error	6	272	45,33		
Total	11	3522			

* Degrees of freedom ** Sum of square *** Mean of square

Figure 1, representing the plot of experimental values compared to predicted values, shows a good concordance between them.

**Figure 1. Plot of experimental versus predicted values of conversion**

Therefore, ANOVA can be validated since Figure 1 prove that the model accurately represents the influence of the chosen factors on the sugar conversion. This means that there is a good correlation between the theoretical and measured responses. This correlation is confirmed by the value of adjusted R squared (R²adj= 91.5%).

Main effect plots

The main effect is calculated as the difference between the average of measurements made at the high level setting (+1) and the average of measurements observed at low level setting (-1) of each factor (figure 2).

Diagram of main effects informs us about the simultaneous influence of all factors on conversion. According to this diagram (Figure 2) we found that the temperature, time and amount of the molecular sieves, are the most influential factors on the progress of the enzymatic esterification of D-xylose. Increasing the temperature and reaction time increases the conversion. Increasing the amount of molecular sieves causes a decrease of the response. For factors, xylose/lauric acid ratio and lipase concentration, no significant effect on the conversion is observed.

The Plackett-Burman design was proved to be a powerful tool to determine the effects of various parameters on xylose conversion. However the optimal conditions of each factor that significantly affect xylose ester production could not be obtained. Further work needed to be done to find out this information.

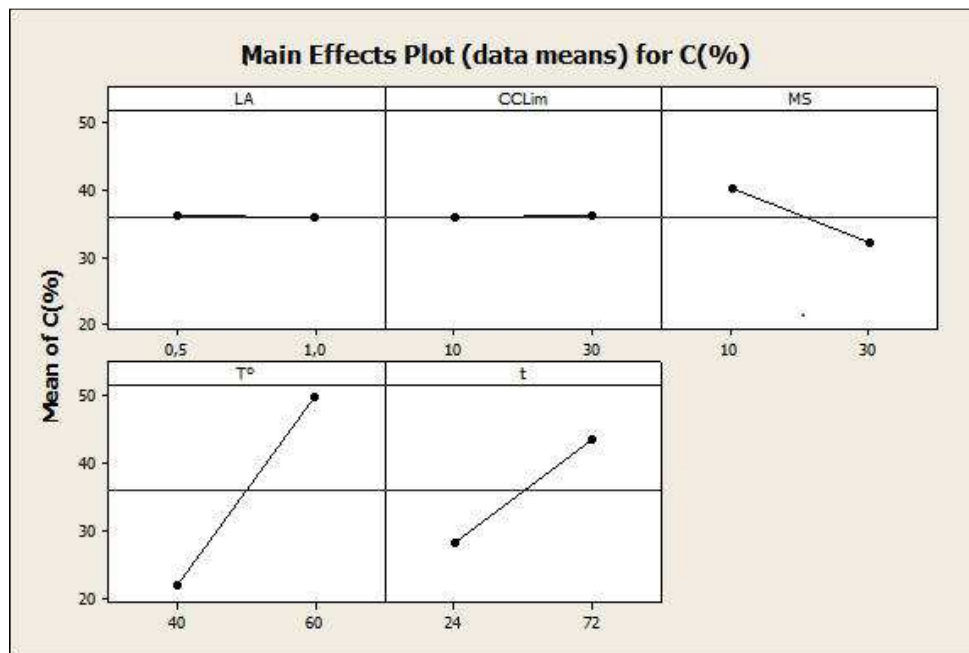


Figure 2. Main effects plot for the conversion C (%)

Optimization

The enzymatic production of xylose laurate was thus optimized by RSM under Box-Benhken design [25,27] and the influence of parameters as well as their interactions on the response was studied. The experimental conditions for BBD were selected according to PBD results for each variable based on prior studies. Experiments were carried out according to the design points with independent variable such as temperature (T°), reaction time (t) and molecular sieves concentration (MS). Three levels, such as low, medium and high, denoted as -1, 0, +1, were employed to fit a full quadratic response surface model and later approximated to obtain the optimal response (Table 5).

Table 5. Process variables and levels in Box-Benhken design

Parameters	Levels		
	Low (-1)	Medium (0)	High (+1)
T°	40	50	60
t	24	48	72
MS	10	20	30

Table 6. Box-Benhken three variables experimental design

Run N°	Coded values			Actual values			C (%)	
				T°	t	MS	Experimental values	Predicted values
1	1	0	-1	60	48	10	10	08,37
2	-1	0	1	40	48	30	22	23,62
3	0	1	1	50	72	30	48	54,87
4	0	0	0	50	48	20	25	31,66
5	-1	1	0	40	72	20	41	32,50
6	0	1	-1	50	72	10	29	31,37
7	0	0	0	50	48	20	35	31,66
8	1	0	1	60	48	30	80	73,87
9	-1	-1	0	40	24	20	25	25,75
10	0	0	0	50	48	20	35	31,66
11	0	-1	1	50	24	30	55	52,62
12	1	1	0	60	72	20	61	60,25
13	-1	0	-1	40	48	10	12	18,12
14	1	-1	0	60	24	20	30	38,50
15	0	-1	-1	50	24	10	12	05,12

The design variables selected in this study with actual and coded levels along with response variables with 3 replicates are shown in Table 6.

The aim of the study is to find the best reaction conditions to obtain the highest conversion [28]. All of the 15 designed experiments were performed and the results were multi-regression analyzed. Coefficients were evaluated by regression analysis and tested for their significance (Table 7). Finally, the best-fitting model was determined by regression.

Table 7. Estimated regression coefficients and R-squared values of the models

Term	Coefficient	p-value
Constant	31,667	0,002
T°	10,125	0,024
t	7,125	0,074
MS	17,750	0,002
T° ²	1,292	0,792
T ²	6,292	0,234
MS ²	-1,958	0,691
T.t	3,750	0,439
T°.MS	15,000	0,020
T.MS	-6,000	0,237
R ² = 92,65%	R ² adj = 79,41	

The resulting fitted second-order polynomial equation with the coded factors values is given below :

$$C(\%) = 31,667 + 10,125T^\circ + 7,125t + 17,750MS + 1,292T^{\circ 2} + 6,292t^2 - 1,958MS^2 + 3,750T^\circ.t + 15T^\circ.MS - 6t.MS$$

(2) Model fitting and analysis of variance (ANOVA)

For estimation of significance of the model, the analysis of variance (ANOVA) was applied. Results are given in Table 8.

Table 8. Analysis of variance for the conversion

Source	DF*	SS**	MS***	F-value	p-value
Regression	9	5018,92	557,66	7,00	0,023
Linear	3	3746,75	1248,92	15,67	0,006
Square	3	171,92	57,31	0,72	0,582
Interaction	3	1100,25	366,75	4,60	0,067
Residual error	5	398,42	79,68	-	-
Lack-of-fit	3	331,75	110,58	3,32	0,240
Pure error	2	66,67	33,33	-	-
Total	14	5417,33	-	-	-

* Degrees of freedom ** Sum of square *** Mean of square

The irrelevant coefficients including quadratic coefficients (T², MS², t²) and the cross-product coefficients (T.t, t.MS) were eliminated according to their p-value (Table 8) in order to refine the model ($\alpha = 0.05$). Thus, the non significant terms were eliminated (Table 10).

Therefore, the simplified polynomial expression for equation (3) in terms of coded factors values was expressed as follows :

$$C(\%) = 34,667 + 10,125T^\circ + 7,125t + 17,750MS + 15T^\circ.MS \quad (3)$$

Table 9: Estimated regression coefficients and R-squared values of the models (after elimination of no-significant terms)

Terme	Coefficient	T	p-values
Constant	34,667	15,295	0,000
T°	10,125	3,262	0,009
t	7,125	2,296	0,045
MS	17,750	5,719	0,000
T°.MS	15,000	3,418	0,007
R ² = 85,78%	R ² (adj)=80,09%		

Table 10: ANOVA after elimination of no-significant terms

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	F-values	p-values	
Model	4	4646,75	1161,69	15,08	0,000
Linear	3	3746,75	1248,92	16,21	0,000
Interaction	1	900,00	900,00	11,68	0,007
Residual error	10	770,58	77,06	-	-
Lack- of - fit	8	703,92	87,99	2,64	0,304
Pure error	2	66,67	33,33	-	-
Total	14	5417,33	-	-	-

The goodness of fit of the regression equation was evaluated by the determination coefficient (R^2). The value of determination R^2 (0.8578) indicates that the response model can explain 85.78% of the total variations. The value of adjusted determination coefficient R^2_{Adj} (80.09%) was also high enough to indicate the significance of the model. The corresponding analysis of variance (ANOVA) is given in Table 10. In addition, the calculated F-value (15.08) obtained in Table 10 is greater than the previously obtained F-value (7.00) before removing non-significant terms (Table 8). In this case, the ANOVA of the regression model demonstrates that the model is highly significant and is capable of representing the system under the given experimental domain. Thus the improved model is statistically better. It should be noted that polynomial models are reasonable approximations of the true functional relationship over relatively small regions of the entire space of the independent variables.

Furthermore, the analysis of variance indicated that the variance due to the lack-of-fit is not significant. The lack-of-fit value increases from 0.240 (Table 8) to 0.304 (Table 10), which means a better fitting model.

The clustering of the points around the diagonal line in Figure 3 indicates a satisfactory correlation between the experimental and predicted values, thereby confirming the soundness of the model.

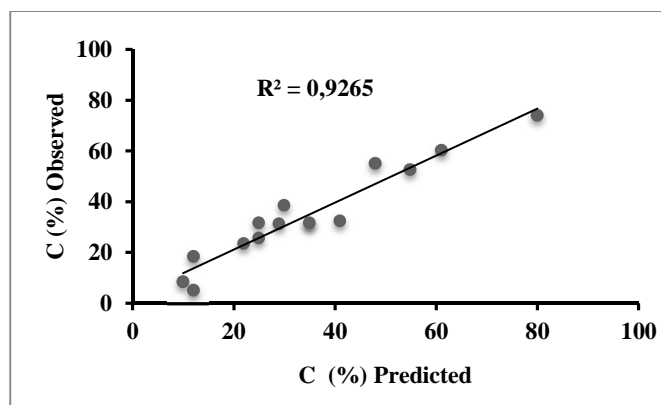


Figure 3. Plot of experimental versus predicted values of conversion C (%)

The predicted values were in good agreement with the experimental values showing that the cubic model could be used to predict and optimize the esterification percentage by determining the optimal operating conditions (temperature, molecular sieves and reaction time). The optimization process was carried out based on the contour plots.

Contour plots

The final step consists in finding the values of factors that give the optimal response [29]. From the validated mathematical model, using the software, we performed graphically 2D contours. The boundary curves are generated using MINITAB software 14 by the combination of three factors induced. To visualize the combined effects of the three factors on xylose ester synthesis, contour plots were generated for the fitted model that displays the effects of the three variables. Figure 4 shows the response surface plots as function of temperature (T°), reaction time (t) and molecular sieves concentration (MS).

According to the interpretation of the contour diagrams, the highest values of the conversion ($C > 80\%$) are obtained when the three factors are fixed at high levels. Consideration of the set of graphs allowed the selection of the optimal point : $T^\circ = 60^\circ\text{C}$, $t = 72\text{ h}$, $MS = 30\text{ mg}$ and the conversion value at this point is equal to $C = 85.041\%$.

Model verification

The validity of the predicted model was verified by performing the lipase-assisted synthesis of xylosyl laurate under the predicted optimum conditions, corresponding to a temperature, molecular sieves quantity and time of 60 °C, 30 mg, 72 h respectively. Therefore, the model represented by the equation (3) accurately predicts the optimal conversion of the lipase-catalyzed synthesis of 1-*O*-dodecanoyl-D-xylopyranose. Hence, this statistical model showed that the chosen parameters and their adjustments have a significant influence on the substrate conversion.

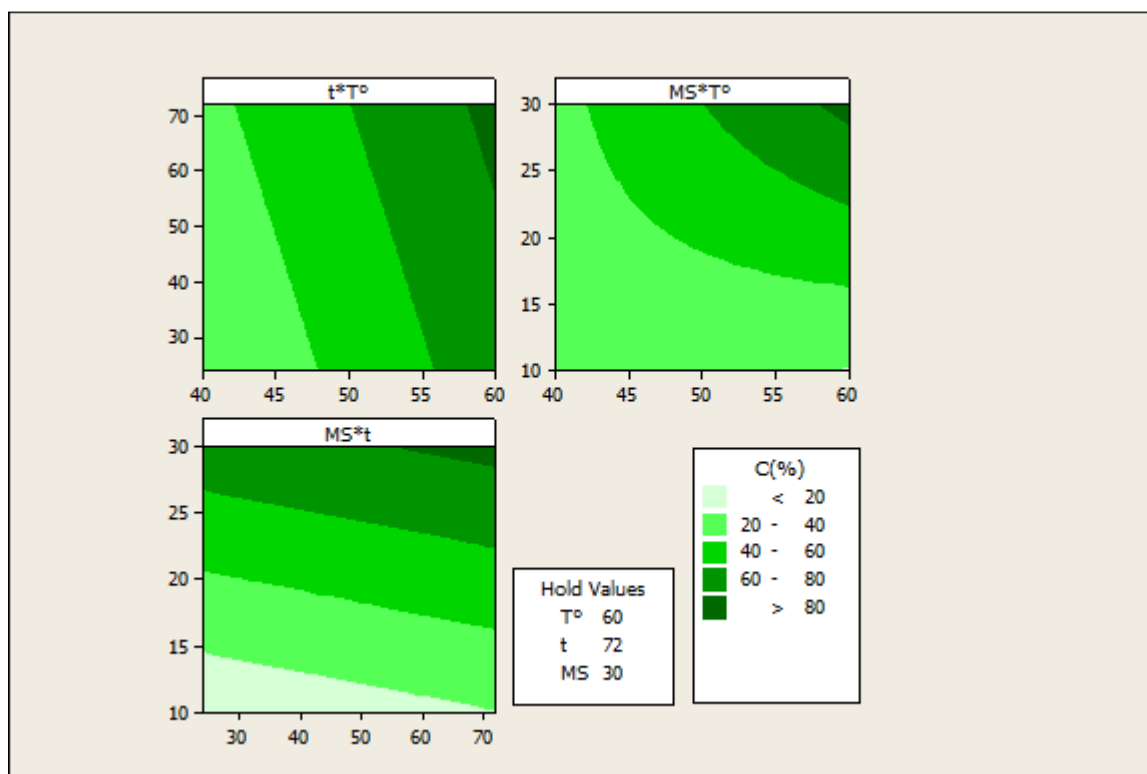


Figure 4. Contour plots of C (%) versus (T°, t, MS) constant at high levels

CONCLUSION

Statistical experimental designs combined with RSM for optimization of enzymatic synthesis of 1-*O*-dodecanoyl-D-xylopyranose were developed. First, Plackett-Burman design was implemented to screen the variables that significantly influence the conversion. This preliminary design displayed a model with a *p*-value of 0.003 and a coefficient of determination R^2 of 0.9228, thus indicating that the model is highly significant and the relationship between the conversion and the factors is adequately represented. It made it possible to highlight, among the five tested parameters, the three most significant ones : the temperature, the reaction time and molecular sieves concentration.

In the second step, the optimum values were determined by Box-Benhken design under response surface methodology. The determination coefficient R^2 was 0.8578, which ensure an adequate credibility of the model. The statistical analysis showed that the optimum reaction conditions led to the maximum conversion (85%). Comparison of predicted and experimental values revealed good matching between them, implying that empirical models derived from RSM can be applied to adequately describe the relationship between the factors and response in xylose laurate synthesis. This model can then be used to predict the conversion under any given conditions within the experimental range.

Acknowledgements

We are grateful to the Algerian Ministry of Scientific Research for providing financial assistance to carry out this project and to the UBMA University for the facilities provided to conduct this research work in LOMOP Laboratory.

REFERENCES

- [1] T. Ivankovic, J. Hrenovic, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.*, **2010**, 61, 95.
- [2] H. Maag, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1984**, 61, 259.
- [3] S. Nakamura, *Oleochemicals*, **1997**, 8, 866.
- [4] P. Villeneuve, *Biotechnol. Adv.*, **2007**, 25, 515.
- [5] A.M. Gumel, M.S.M. Annuara, T. Heidelberg, Y. Chisti, *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 2079.
- [6] S.W. Chang, J.F. Shaw, *New Biotechnology*, **2009**, 26, 109.
- [7] M. Therisod, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 5638.
- [8] A. M. Klibanov, *Nature*, **2001**, 409, 241.
- [9] C. Bidjou-haiour, N.Klai, *Asian J. Chem.*, **2013**, 25 (8), 4347.
- [10] D. Coulon, M. Ghoul, *Agro. Food Industry Hi-Tech.*, **1998**, 9, 22.
- [11] M. Kilic, E. Bayraktar, S. Ates, Ü. Mehmetgolu, *Process Biochem.*, **2002**, 37, 759.
- [12] R. L. Plackett, and J. P. Burman, *Biometrika*, **1946**, 33, 305.
- [13] N. B. Ghanem, H. H. Yusef, H. K. Mahrouse, *Bioresour. Biotechnol.*, **2000**, 73, 113.
- [14] L. Rao, S. Divakar, *Process Biochem.*, **2001**, 36, 1125.
- [15] G.E.P. Box, D.W. Behnken, *Technometrics*, **1960**, 2, 455.
- [16] T.U. Nwabueze, *International Journal of Food Science & Technology*, **2010**, 45, 1768.
- [17] R.H. Meyer, D.C. Montgomery, *Response Surface Methodology: Design and Analysis of Experiments*, (John Wiley and sons, New York, **2002**), 445.
- [18] K. R. Kiran, B. Manohar, S. Divakar, *Enzyme Micro. Tech.*, **2001**, 29 (2-3), 122.
- [19] Y.K. Twu, I. L. Shih, Y. H. Yen, C.J. Shieh, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53(4), 1012.
- [20] S. Sabeder, M. Habulin, Z. Knez, *J. Food Eng.*, **2006**, 77, 880.
- [21] T. Polat, and R. J. Linhardt, *J. Surf. Det.*, **2001**, 4 (4), 415.
- [22] C.J. Shieh, P.E. Koehler, C.C. Akoh, *J. Food Sci.*, **1996**, 6 (1), 97.
- [23] N. S. Neta, A.M. Peres, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, *New Biotechnology*, **2011**, 28, 349.
- [24] Y. Yan, U.T. Bornscheuer, G. Stadler, S. Lutz-Wahl, R. T. Otto, M. Reuss, R. D. Schmidt, *Europ. J. Lipid Sci. Technol.*, **2001**, 103 (9), 583-587.
- [25] G. E. P. Box, *Biomertika Trust*, **1952**, 39 (1), 49.
- [26] G. E. P. Box, K.B. Wilson, *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **1951**, 13 (1), 1.
- [27] R.F. Teofilo, M.M.C. Ferreira, *Quim. Nova*, **2006**, 29, 338.
- [28] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pertensen, R. Bergman, *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, **1998**, 42, 3.
- [29] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, L. A. Escaleira, *Talanta*, **2008**, 76, 965.

Response Surface Methodological Study of Glucose Laurate Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipase from *Candida cylindracea*

Nadia Bouzaouit and Chahra Bidjou-Haiour

LOMOP. Organic Synthesis and Modeling group. Faculty of Sciences.
Badji-Mokhtar University. BP 12 El-Hadjar. 23000 Annaba. Algeria.

(Corresponding author: Chahra Bidjou-Haiour)

(Received 11 April, 2016, Accepted 12 May, 2016)

(Published by Research Trend, Website: www.researchtrend.net)

ABSTRACT: The purpose of the present work is to study the reaction conditions affecting the lipase-catalyzed synthesis of fatty acid glucose ester with immobilized *Candida cylindracea* lipase, using response surface methodology. According to the Box-Behnken design principles, response surface methodology with three factors such as temperature, solvent polarity and reaction time at three levels was adopted. The factors influencing the parameters were determined by means of regression analysis. The optimum values for the highest conversion yield of C=76% was obtained at a temperature of 80°C in ethyl methyl ketone as a solvent and at a reaction time of 72h. It was shown that the obtained model can predict conversion of the starting material and the obtained results were in good agreement to measured data.

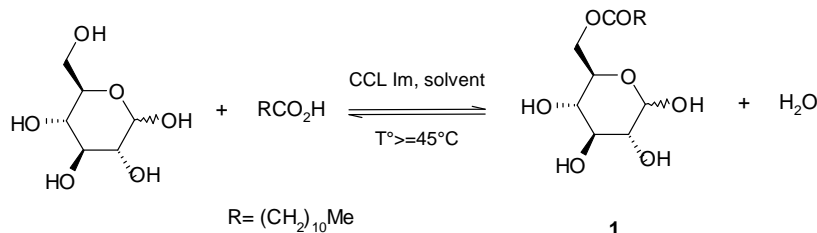
Keywords: Lipase from *Candida cylindracea*, sugar, optimization, response surface methodology.

INTRODUCTION

Fatty acid sugar esters are nonionic surfactants with high emulsifying, stabilizing, detergency and other useful effects (Favrelle *et al.*, 2010; Van Kempen *et al.*, 2013). These sugar-based compounds are widely used as emulsifiers in food, detergents, cosmetics and pharmaceutical industries (Piccicuto *et al.*, 2001). In recent years, lipase-catalyzed synthesis of sugar fatty acid esters has emerged as an interesting synthetic route (Uswatun *et al.*, 2012; Sarney *et al.* 1995), due to the general properties and advantages of the biotechnological over the chemical synthesis (Villeneuve, 2007; Loughlin, 2000). The use of enzymes is a green alternative to organic synthesis and has been widely investigated (Boland *et al.*, 1991; Faber 1995; Persson *et al.* 2002). Bio-inspired processes or enzymatic reactions have a low environmental impact, reduce the amount of waste material and can minimize costs, thus serving the requirements to integrate environmental sustainability with economic growth and welfare. The main advantage of the enzymatic synthesis is that its high regioselectivity mainly leads to the production of monoesters (Khaled *et al.*, 1992). An important way to

improve the performance of enzymes in non-natural environments (Klibanov, 1989) is to immobilize them by adsorption on a solid support. This offers advantages over free enzymes, because of the possibility of rapid termination reactions and enhancement of the catalytic activity of the lipase. In addition, a higher thermostability of the enzyme would be required for long-term process in many applications.

In this paper, optimization of lipase-catalyzed esterification of D-Glucose is reported. The obtained 1-O-Dodecanoyl-D-Glucopyranose **1** is a nonionic surfactant with good emulsifying properties (Klai *et al.*, 2015; Serradj *et al.* 2008). Conversions obtained for this synthesis with the free lipase are not high enough. So, find a more convenient method to synthesize is considerable. We obtained **1** from D-glucose by treatment with lauric acid and immobilized *Candida cylindracea* lipase (CCL Im) synthesized at the laboratory but the conversion just reach to 57 % (Scheme-I). The goal of the present work is to optimize the conversion of the starting glucose to obtain **1** via a Box-Behnken design (BBD) and response surface methodology (RSM).



Scheme-I.

Response surface methodological studies were conducted in order to optimize and understand the relationship between the important reaction parameters. In our previous work, a screening design was used to identify which factors had significant effects on ester production (Bouzaouit and Bidjou-Haiour, 2015). Subsequently, a Box-Benken design (Box *et al.*, 1960; Box *et al.*, 1951) is employed to optimize factors, which have significant influence on sugar ester production. The results are analyzed by response surface methodology. RSM has been reported to be an effective tool for optimizing a process. It involves statistical design of experiments in which all factors are varied together over a set of experimental runs (Myers *et al.*, 2009, Montgomery *et al.*, 2002). The main objective of RSM is to settle the optimum operational conditions of the system or to determine a region that satisfies the operating specifications (Bas *et al.*, 2007). It has been employed for optimization of lipase-catalyzed synthesis of various enzymatic reactions (Guvenc *et al.*, 2007, Martins *et al.*, 2011). This method is particularly suitable for the lipase-assisted synthesis of sugar esters (Zhang *et al.*, 2015, Galonde *et al.*, 2013).

MATERIALS AND METHODS

Candida cylindracea lipase (Type II) was purchased from Sigma Co. (USA). D-glucose from Sigma-Aldrich and lauric acid from Merck were tested as starting materials. All solvents (Merck) were of analytical grade and were distilled once before use. Molecular sieves 3Å (4-8 mesh) was used as a water removal adsorbent (Aldrich, USA). All other chemicals used in this work were of analytical grade and used without further purification.

A. Lipase immobilization

Celite (60 mg) was added to 10 mL of 0, 1 M phosphate buffer (pH = 8) containing the *Candida cylindracea* lipase (100 U/mL). The reaction was then stirred with a magnetic bar at 4 °C and 100 rpm for 30 mn. 20 mL of cold acetone were then added. After 2 h, the suspension was filtered. The immobilized enzyme (CCL Im) was washed with acetone, dried in a vacuum desiccator and then stored at -18°C.

B. Synthesis of glucose ester by esterification

D-glucose (180 mg, 1mmol) was first dissolved in the solvent for one night. After that, lauric acid (200 mg, 1mmol) was added, the mixture equilibrated for 15 min,

the biocatalyst (CCL Im) and molecular sieves finally incorporated. Aliquots were removed at intervals, filtered and analyzed qualitatively by thin layer chromatography and quantitatively by volumetric titration.

C. Analysis

Samples were withdrawn at definite time intervals and the extent of esterification monitored by a titration procedure which estimated the decrease in total acid content of the reaction mixture (Leitgeb *et al.*, 1990).

D. Experimental design and statistics

The parameters selected for the experiment were reaction temperature (X_1), reaction time (X_2) and solvent polarity (X_3). The sugar conversion (Y) was used as the response. Before applying the response surface methodology (RSM) to determine the conditions which will give the best conversion for the synthesis of the compound 1, Box-Behnken experimental design was conceived and applied. In the present study a 3-factor, 3-level (high, medium and low) design involving 15 experiments from three important variables (X_1 , X_2 , X_3) is suitable for exploring quadratic response surfaces and constructing second order polynomial equation:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_1X_2 + a_5X_1X_3 + a_6X_2X_3 + a_7X_1^2 + a_8X_2^2 + a_9X_3^2$$

where Y = sugar conversion in %, X_1 = reaction temperature, in °C, X_2 = time, in hours, X_3 =solvent polarity, a_0 = constant, a_1 , a_2 , a_3 = linear coefficients, a_4 , a_5 , a_6 = quadratic coefficients, and a_7 , a_8 , a_9 = cross product coefficients.

This design was considered to analyze the linear, cross-product and quadratic effects to arrive at a predictive equation for the conversion of the starting sugar. The variables and their respective levels are presented in Table 1.

Minitab 14 software was used to analyze coefficients and their statistical significance and to arrive at the final predictive equation.

RESULTS AND DISCUSSION

Response data for all 15 experimental runs of Box-Behnken experimental design were performed. All trials were performed in triplicate. The actual variables employed and their corresponding coded levels are given in Table 2.

Table 1: Actual and coded values employed for the analysis.

Coded level	Low (-1)	Medium (0)	High (+1)
Solvent (X_1 , logP)	THF	<i>t</i> -BuOH	EMK
Temperature (X_2 , °C)	40	60	80
Time (X_3 , h)	24	48	72

Table 2 : Results of Box-Behnken experimental design. Comparison of predicted and experimental conversion in glucose ester synthesis.

Coded values			Actual values			Response	
			X ₁	X ₂	X ₃	Ester conversion, Experimental (%)	Ester conversion, Predicted (%)
1	0	-1	EMK	60	24	10,75	12,37
-1	0	1	THF	60	72	50,00	48,37
0	1	1	<i>t</i> -BuOH	80	72	57,74	58,73
0	0	0	<i>t</i> -BuOH	60	48	10,00	09,12
-1	1	0	THF	80	48	37,14	37,77
0	1	-1	<i>t</i> -BuOH	80	24	01,40	01,47
0	0	0	<i>t</i> -BuOH	60	48	08,69	09,12
1	0	1	EMK	60	72	45,16	45,87
-1	-1	0	THF	40	48	23,47	25,17
0	0	0	<i>t</i> -BuOH	60	48	08,69	09,12
0	-1	1	<i>t</i> -BuOH	40	72	19,13	19,05
1	1	0	EMK	80	48	43,66	41,95
-1	0	-1	THF	60	24	12,22	11,50
1	-1	0	EMK	40	48	20,00	19,36
0	-1	-1	<i>t</i> -BuOH	40	24	06,95	05,95

A statistical analysis of data in the table above has allowed us to estimate the coefficients of the mathematical model. From these results, a regression procedure from Minitab 14 was employed to fit the second order polynomial equation. The significance of the coefficients of the full model equation (1) was tested using regression analysis. The linear term corresponding to X₁ and the cross-product term corresponding to X₁ with X₃ were found to be

insignificant and were eliminated according to their *p*-value in order to refine the model ($\alpha = 0.05$). The final response equation obtained is as follows:

$$C(\%) = 9,126 + 8,798X_2 + 17,588X_3 + 15,084X_1^2 + 6,856X_2^2 + 5,321X_3^2 + 2,497X_1 \cdot X_2 + 11,040X_2 \cdot X_3 \quad (1)$$

The corresponding analysis of variance (ANOVA) is given in Table 3.

Table 3: Statistical significance of the response equation.

Regression statistics					
Term	Coefficient	<i>t</i> -statistic	<i>p</i> -value		
Constant	9,1267	8,907	0,000		
X ₁	-0,4075	-0,649	0,540		
X ₂	8,7988	14,023	0,000		
X ₃	17,5888	28,032	0,000		
X ₁ •X ₁	15,0842	16,332	0,000		
X ₂ •X ₂	6,8567	7,424	0,000		
X ₃ •X ₃	5,3217	5,762	0,001		
X ₁ •X ₂	2,4975	2,815	0,031		
X ₂ •X ₃	11,0400	12,442	0,000		
R square	0,9960				
Adjusted R square	0,9900				
Standard error					
Analysis of variance (ANOVA)					
Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	<i>p</i> -value
Regression	8	4621,33	577,67	183,41	0,000
Linear	3	3095,59	1031,86	327,62	0,000
Square	3	1013,27	337,76	107,24	0,000
Interaction	2	512,48	256,24	81,36	0,000
Residual error	6	18,90	3,15	-	-
Lack-of-fit	4	17,75	4,44	7,76	0,117
Pure error	2	1,14	0,57	-	-
Total	14	4640,23	-	-	-

The F value is a measure of the variation of the data about the mean. Generally, the calculated F value should be several times greater than the tabulated F value if the model is a good prediction of the experimental results and the estimated factor effects are real. In this case, the ANOVA of the regression model demonstrates that the model is highly significant, as is evident from the calculated F value (183,41) and a very low probability value p (0,0000) which indicates that the second-order polynomial is highly significant and therefore the significance of the model at 95% probability level. The R^2 of 0.996 is concordant and confirms that 99.6% of variation of the sugar conversion can be explained by the fitted model. The

model can be considered as a good model for the prediction of the conversion with the factors used and within the ranges tested.

Fig. 1, showing the plot of experimental values compared to predicted values, demonstrates a good concordance between these values. In addition, Fig. 2 representing the normal probability of residuals, shows a good correlation between the experimental data distribution and the linear regression model. Consequently analysis of variance can be validate from Fig. 1 and 2 prove that the model represents well and accurately the influence of the selected factors on glucose conversion.

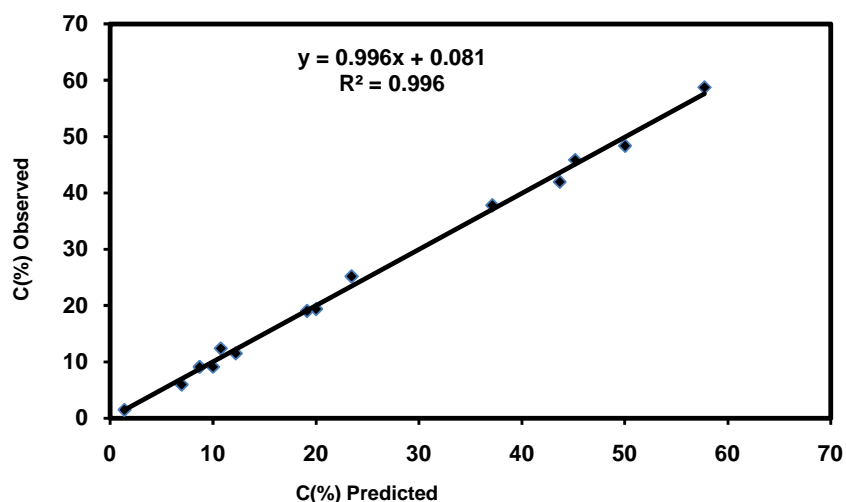


Fig. 1. Plot of experimental values versus predicted values of glucosyl laurate synthesis.

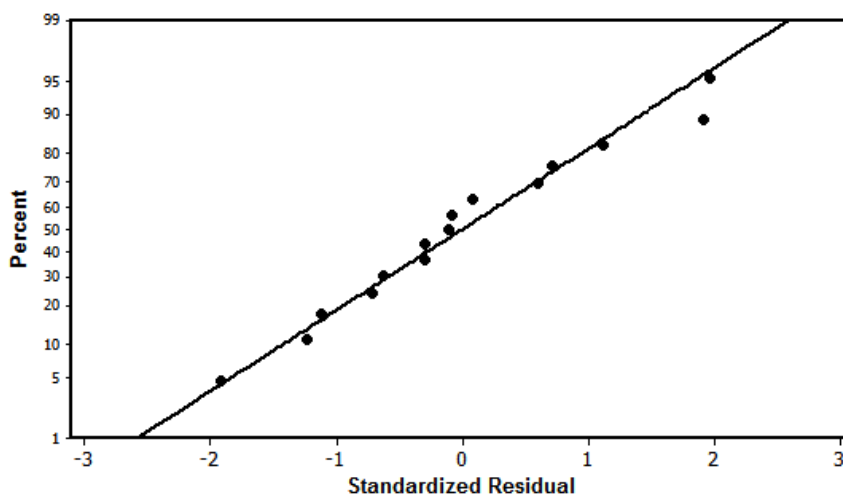


Fig. 2. Normal probability plot of the residuals.

These results show a satisfactory representation of the relationship between the experimental and predicted values. Those calculated from the model equation, indicate a good fit, as observed in Fig 1. The high value

of R^2 ($R^2 = 0,99$) indicate a good correlation between the measured and theoretical values predicted by the model.

The mutual effect of the solvent polarity (X_1), the temperature (X_2) and reaction time (X_3) on the conversion was studied by the contour plots generated from the predicted model using MINITAB software 14 by the combination of the three considered factors. The response surface plots are shown in Fig. 1, 2 and 3,

which illustrate the relationship between response and the experimental data. According to the interpretation of the contour diagrams, the highest values of the conversion (>70%) are obtained when the three factors are fixed at high levels.

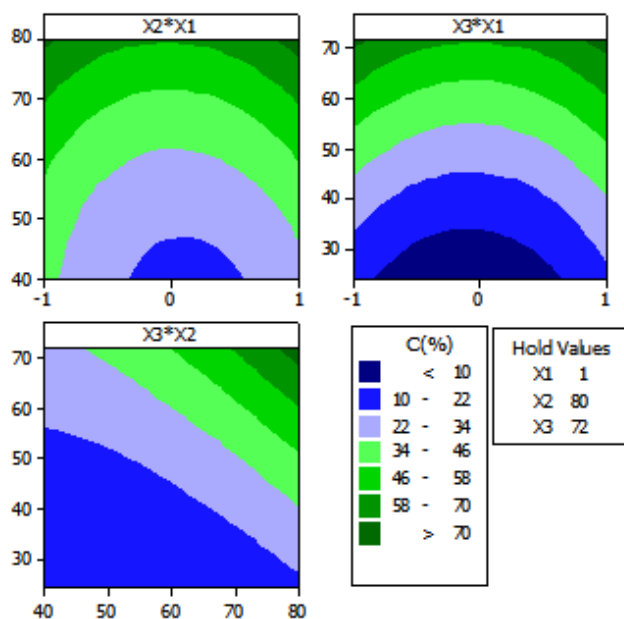


Fig. 3. Contour plots showing the crossed effect of parameters on the predicted conversion (%) of the glucose laurate synthesis (X_1 , X_2 , X_3 are constant at high levels).

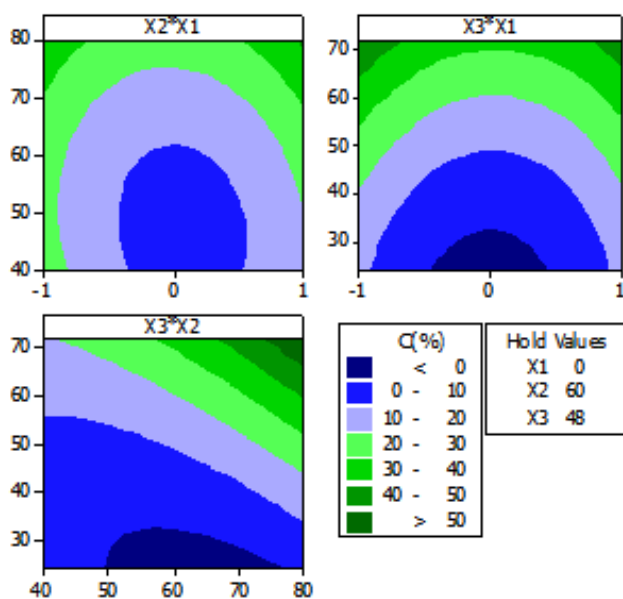


Fig. 4. Contour plots showing the crossed effect of parameters on the predicted conversion (%) of the glucose laurate synthesis (X_1 , X_2 , X_3 are constant at medium levels).

Consideration of the set of graphs allowed the selection of the optimal point : $X_1 = 80^\circ\text{C}$, $X_2 = 72\text{ h}$, $X_3 = \text{EMC}$; X_1 , X_2 and X_3 are the coded levels of hydrophobic solvents, temperature, and reaction time respectively. The conversion value at this point is $C = 76\%$. As can be seen from the various curves, maximum conversion is obtained when the three factors are maintained at their highest levels. The increase of the conversion with temperature can be explained by an improvement of the enzymatic activity due to a better diffusion process and by a higher sugar solubility in EMK at this temperature (Yan *et al.*, 2001). Similar positive effect of the temperature was also observed for the immobilized *Candida antarctica* lipase B (Yoshida *et al.*, 2006). It has been shown that the lipase from *Candida cylindracea*

has a surface with a very high hydrophobicity (Sugimura *et al.*, 2000) and hydrophobic interactions are likely to have an important role in the adsorption process. Lipases exist in two structural forms, one closed, where a lid consisting of a polypeptide chain isolates the active site of the reaction medium, and the open form, where the lid moves and the active center is exposed (Derewenda *et al.*, 1992). This equilibrium is shifted to the open form in the presence of hydrophobic surfaces like porous celite support (Accurel EP-100), wherein the lipase is absorbed on the hydrophobic material. This permits us to hypothesize that lipase immobilized following this kind of mechanism might be quite specific towards sugars.

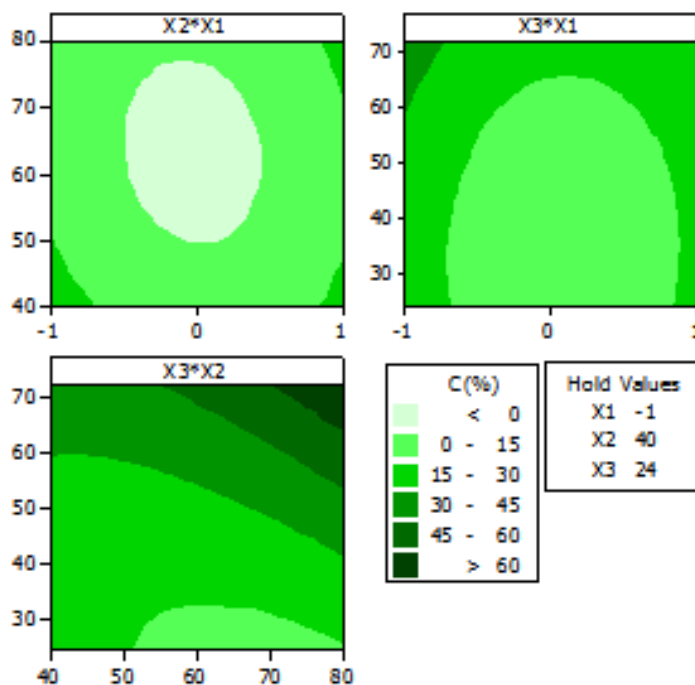


Fig. 5. Contour plots showing the crossed effect of parameters on the predicted conversion (%) of the glucose laurate synthesis (X_1 , X_2 , X_3 are constant at low levels).

Verification of the predicted values was conducted by using optimal conditions in experiments. The practical corresponding response was 75,35%. This result corroborated the validity and the effectiveness of this model.

CONCLUSION

The modeling and optimization of immobilized *Candida cylindracea* lipase catalyzed synthesis of glucose ester was successfully performed using a response surface methodology based on a Box-Behnken

design. Predictability of the results for the above-mentioned reaction was found to be very good. Under the optimal conditions, the conversion was 76% in EMK at 80°C and 72h. The determination coefficient (R^2) was 0.923, which ensure an adequate credibility of the model. The effectiveness of the bio-catalytic esterification of D-Glucose with immobilized CCL was found to depend strongly on the reaction temperature and the solubility of the substrate.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Algerian Ministry of Scientific Research for providing financial assistance to carry out this project and to the UBMA University for the facilities provided to conduct this research work in LOMOP Laboratory.

REFERENCES

- Bas, D. & Boyacı I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. **78**: 836–845.
- Boland, W., Frössl, C. & Lorenz, M. (1991). Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis*. **12**: 1049-1072.
- Bouzaouit, N. & Bidjou-Haiour, C. (2015). Optimization of lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose ester using statistical experimental designs. *Der Pharma Chemica*. **7**(1): 261-269
- Box, G.E.P. & Benhken, D.W. (1960). Some new three level designs for the study of **quantitative** variables. *Technometrics*. **2**(4): 455-475.
- Box, G.E.P. & Wilson, K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. **13**(1): 1-45.
- Dejaegher, B. & Vander Heyden, Y. (2011). Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **56** : 141– 158.
- Derewenda, U., Brzozowski, A.M., Lawson, D.M. & Derewenda, Z.S. (1992). Catalysis at the interface : the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*, **31**: 532-144.
- Faber, K., (1995). Biotransformations in Organic Chemistry, second edition. Springer, New York.
- Favrelle, A., Boyère C., Laurent, P., Broze, P., Blecker, C., Paquot, M., Jérôme, C. & Debuigne, A.(2011). Enzymatic synthesis and surface active properties of novel hemifluorinated mannose esters. *Carbohydrate Research*. **346**: 1161-1164.
- Galonde, N., Brostaux, Y, Richard., G., Nott, K., Jérôme, C. & Fauconnier, M.L. (2013). Use of response surface methodology for the optimization of the lipase-catalyzed synthesis of mannosyl myristate in pure ionic liquid. *Process Biochemistry*, **48**: 1914-1920.
- Guvenc, A., Kapucu, N., Kapucu, H., Aydogan, O. & Mehmetoglu, U. (2007). Enzymatic esterification of isoamylalcohol obtained from fuel oil: optimization by response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 778-785.
- Khaled, N., Montet, D., Farines, M., Pina, M. & Graille, J. (1992). Synthèse de mono-esters de sucre par biocatalyse. *Oleagineux*. **47**: 181-190.
- Klai, N., Bidjou-Haiour, C. & Bouquillon, S. (2015). D-Xylose-based surfactants: Synthesis, characterization and molecular modeling studies. *Comptes Rendus Chimie*. **18**: 599-606.
- Klibanov, A.M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends in Biotechnology*. **14**: 141–144.
- Leitgeb, M. & Knez, Z. (1990). The influence of water on the synthesis of n-butyl oleate by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **67**, 775-778.
- Loughlin, W.A. (2000). Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*. **74**, 49-62.
- Martins, A.B., Graebin, N.G., Lorenzoni, A.S.G., Fernandez-Lafuente, R., Ayub M.A.Z. & Rodrigues, R.C. (2011). Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. *Process Biochemistry*, **46**: 2311–2316.
- Montgomery, D.C. (2002). Response Surface Methodology: Design and Analysis of Experiments. New York : Wiley, p. 445-474.
- Myers, R.H., Montgomery DC & Anderson-Cook, C.M. (2009). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. New York : John Wiley & Sons. p. 219–265.
- Persson, M., Mladenoska, I., Wehtje, E. & Adlercreutz, P. (2002). Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. **31**: 833–841
- Piccicuto, S., Blecker, C., Brohée, J.C., Mbampara, A., Lognay, G., Deroanne, C., Paquot, M. & Marlier, M. (2001). Les esters de sucres : voies de synthèse et potentialités d'utilisation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **5**: 209–220.
- Sarney, D.B. & Vulfson, N.E. (1995). Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends in Biotechnology*. **13**: 164–172.
- Serradj, T. & Bidjou-Haiour, C. (2008). Synthèse d'esters de D-glucose. Détermination de leurs propriétés fonctionnelles liées a leur caractère tensioactif. *Algerian Journal of Advanced Materials*. **5**: 297-300.

- Sugimura, Y., Fukunaga, K., Matsuno, T., Nakao, K., Goto, M & Nakashio, F. (2000). A study on the surface hydrophobicity of lipases. *Biochemical Engineering Journal*. **5**: 123-128.
- Uswatun, H.Z., Abdul Rahman, M.B., Abdulmalek, E., Siti, S.E., Basri, M., Rahman, R.N.Z.R.A., & Salleh, A.B. (2012). Biocatalytic production of lactose ester catalyzed by mica-based immobilized lipase. *Food Chemistry*. **131**: 199-205.
- Van Kempen, S.E.H.J., Boeriu, C.G., Schols, H.A., de Waard, P., Van der Linden, E.& Sagis L.M.C. (2013). Novel surface-active oligofructose fatty acid mono-esters by enzymatic esterification. *Food Chemistry* **138**: 1884 -1891.
- Villeneuve, P. (2007). Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*. **25**: 515-536.
- Yan, Y., Bornscheuer, U.T., Stadler, G., Lutz-Wahl, S., Reuss, M. & Schmid, R.D. (2001). Production of sugar fatty acid esters by enzymatic esterification in a stirred-tank membrane reactor: optimization of parameters by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **78**, 47-53.
- Yoshida, Y., Kimura, Y., Kadota, M., Tsuno, T. & Adachi, S. (2006). Continuous synthesis of alkyl ferulate by immobilized *Candida antarctica* lipase at high temperature. *Biotechnology Letters*. **28**: 1471-1474.
- Zhang, X., Nie, K., Zheng, Y., Wang, F., Deng, L. & Tan, T. (2015). Enzymatic production and functional characterization of D-sorbitol monoesters with various fatty acid. *Catalysis Communications*. **72**: 138-141.