



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Collégium SCIENCES & TECHNOLOGIES
Pôle scientifique Chimie Physique Moléculaires
Ecole Doctorale Lorraine de Chimie et Physique Moléculaires

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine
en Chimie
par

Jonathan JACOBY

Lipase *Mucor miehei* immobilisée dans des matériaux poreux silicatés : Bioréacteurs pour la synthèse d'esters méthyliques à partir d'huiles végétales

Soutenue le 5 décembre 2013

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Aristotelis Xenakis	Directeur de Recherche NHRF Institut de Recherche Biologique et Biotechnologie – Athènes
	M. Christophe Innocent	Chargé de recherche CNRS Institut Européen des Membranes - Montpellier
Examineurs :	M. Vincent Coupard	Ingénieur I.F.P. Energies Nouvelles – Lyon
	M. Cédric Carteret	Professeur Université de Lorraine - Nancy
	Mme Andreea Pasc	Maitre de conférences Université de Lorraine - Nancy
Directeur de thèse :	M. Jean-Luc Blin	Professeur Université de Lorraine - Nancy

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe-projet NANO, au Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Unité Mixte de Recherche n°7565 du CNRS et de la faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Lorraine.

Premièrement, je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse Jean-Luc Blin, professeur à l'université de Lorraine, ainsi que Marie-José Stébé, Directrice de Recherche CNRS, pour m'avoir permis de continuer mes études en thèse et accueilli dans leur laboratoire. Tout au long de ces trois années, ils m'ont apporté leur soutien et leurs conseils afin de mener à bien mon sujet de recherche. Pour cela, ainsi que pour leur disponibilité, je leur exprime ma gratitude.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Aristotelis Xenakis, Directeur de Recherche NHRF à l'Institut de Recherche Biologique et Biotechnologie d'Athènes et Monsieur Christophe Innocent, Chargé de Recherche CNRS à l'Institut Européen des Membranes de Montpellier pour avoir accepté de juger ce travail en tant de rapporteurs.

Mes remerciements vont également à Monsieur Vincent Coupard, Ingénieur à l'Institut Français du Pétrole (I.F.P. Energies Nouvelles) à Lyon, Madame Andreea Pasc, Maître de conférences à l'Université de Lorraine et Monsieur Cédric Carteret, Professeur à l'Université de Lorraine pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Durant ce travail, différentes techniques d'analyses ont été utilisées. Je tiens donc à remercier les personnes qui m'ont permis d'avoir accès à ces appareils et pour leurs conseils avisés. Tout d'abord, je remercie Mélanie Emo, Ingénieur d'Etudes et responsable de l'appareil de diffraction des rayons X aux petits angles, pour l'analyse des nombreux matériaux. Ensuite, j'adresse mes remerciements à François Dupire, responsable du service commun de spectrométrie de masse et chromatographie, pour m'avoir formé à l'utilisation de la GC-MS. Enfin, je souhaite remercier Cédric Carteret pour son aide lors des analyses par spectroscopie infrarouge ainsi que pour l'utilisation d'un plan d'expériences.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Mme Pascale Tsan et Mme Brigitte Lherbier pour leur confiance lorsqu'elles ont accepté de me confier une partie de leur enseignement de Physique dans le département Génie Biologie et Santé et Génie Biologique Agro-Alimentaire de l'IUT de Nancy Brabois.

J'adresse mes remerciements à l'école doctorale SESAMES.

Je remercie bien sûr les autres membres actuels et anciens de l'équipe NANO, tout particulièrement Lionel, Andreea, Nadia, Mélanie pour les nombreux fous rires, sans oublier Anna, Karine, Sanghoon, Philippe, Denise, Dominique, Kevin ainsi que les stagiaires passés par le laboratoire Marie, Guillaume, Andreas, Clothilde, Renan, Amélie, Jessica et Alexiane.

Pour terminer, je tiens à remercier toute ma famille, mes amis pour leur soutien durant ces trois années. Qu'ils trouvent en ces mots l'expression de ma gratitude. Enfin, je souhaiterai dédier ce manuscrit à ma grand-mère et mon grand-père.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
 CHAPITRE I – GENERALITÉS	
A. SYNTHÈSE DU BIODIESEL	5
1. DEFINITION ET PROPRIÉTÉS DU BIODIESEL.....	5
2. SYNTHÈSE DU BIODIESEL PAR VOIE CHIMIQUE.....	7
3. SYNTHÈSE DU BIODIESEL PAR VOIE ENZYMATIQUE	11
a. Choix de l'enzyme	12
b. Propriétés de la lipase <i>Mucor miehei</i>	14
c. Paramètres influençant la réaction de transestérification.....	17
i. La nature de l'alcool	17
ii. Le rapport molaire alcool/huile	18
iii. Composition de l'huile.....	18
iv. La température et le temps de réaction.....	19
B. IMMOBILISATION D'ENZYME.....	19
1. CONDITIONS NECESSAIRES A L'IMMOBILISATION	20
2. LES DIFFÉRENTES MÉTHODES D'IMMOBILISATION D'ENZYME	21
a. Adsorption physique (physisorption).....	22
b. Adsorption chimique (chimisorption)	23
c. Encapsulation	24
d. Cross-linking (réticulation)	24
3. MATÉRIAUX UTILISÉS COMME SUPPORT D'ENZYME	25
a. Les polymères synthétiques organiques.....	25
b. Les polymères naturels	25
c. Les supports inorganiques.....	25
d. Microémulsions inverses.....	26
e. Matériaux mésoporeux	26
i. Effet de la taille des pores sur l'immobilisation	27
ii. Effet de la structure et de la morphologie sur l'immobilisation	27
iii. Effet des propriétés de surface sur l'immobilisation	28
4. LES DIFFÉRENTS MATÉRIAUX UTILISÉS COMME SUPPORT POUR L'IMMOBILISATION DE LA LIPASE <i>MUCOR MIEHEI</i> DANS LE CADRE DE LA SYNTHÈSE DU BIODIESEL.....	29
C. MATRICES POREUSES.....	30

1.	LES MATERIAUX MESOPOREUX.....	30
a.	<i>Procédé sol-gel</i>	31
b.	<i>Mécanisme d'auto-assemblage coopératif CTM</i>	33
c.	<i>Mécanisme transcriptif LCT</i>	33
d.	<i>Interactions tensioactif-précurseur</i>	34
e.	<i>Matériaux SBA-15</i>	35
f.	<i>Matériaux mésoporeux préparés à partir de tensioactifs fluorés</i>	36
2.	LES MATERIAUX A POROSITE HIERARCHISEE	38
D.	OBJECTIF DE LA THESE	41

CHAPITRE II – PARTIE EXPERIMENTALES

A.	PRODUITS UTILISES	53
1.	TENSIOACTIFS	53
2.	HUILE PERFLUOREE	53
3.	REACTION DE TRANSESTERIFICATION	54
B.	PREPARATION DES MATERIAUX POREUX SILICATES	55
1.	SOURCE DE SILICE	55
2.	MODE OPERATOIRE	56
a.	<i>Matériaux mésoporeux organisés</i>	56
i.	<i>Matériau SBA-15</i>	56
ii.	<i>Matériau MMF</i>	57
iii.	<i>Matériau silicaté à porosité hiérarchisée préparé à partir d'une émulsion</i>	58
iv.	<i>Matériau silicaté à porosité hiérarchisée préparé à partir de doubles émulsions et SLN</i>	58
b.	<i>Immobilisation de l'enzyme sur les matériaux par physisorption</i>	59
c.	<i>Immobilisation de l'enzyme sur les matériaux par chimisorption</i>	59
C.	TECHNIQUES EXPERIMENTALES	59
1.	DIFFUSION-DIFFRACTION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES (SAXS)	59
2.	ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE	62
3.	SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER.....	64
a.	<i>Détermination de la quantité d'enzyme sur les matériaux poreux</i>	65
b.	<i>Isotherme d'adsorption</i>	65
4.	RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) DU SOLIDE.....	67
5.	POROSIMETRIE A MERCURE	67
6.	CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	68
7.	PURIFICATION DES PRODUITS DES REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION	69
8.	CALCUL DU RENDEMENT DES REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION	70
9.	PLAN D'EXPERIENCE	72

CHAPITRE III – PHYSISORPTION DE LA LIPASE MM-L SUR UN SUPPORT SILICATÉ MESOPOREUX

A. SUPPORTS MESOPOREUX SILICATES	79
1. MATERIAU SBA-15.....	79
2. MATERIAU MMF	81
3. STABILITE DES MATERIAUX SBA-15 ET MMF DANS LES CONDITIONS D'IMMOBILISATION DE L'ENZYME	82
a. <i>Matériau SBA-15</i>	82
b. <i>Matériau MMF</i>	83
B. PREPARATION DU BIOREACTEUR MESOPOREUX PAR PHYSISORPTION..	85
1. MATERIAU SBA-15.....	86
2. MATERIAU MMF	90
3. DISCUSSION DES RESULTATS D'ADSORPTION DE LA LIPASE.....	93
C. TESTS CATALYTIQUES PRELIMINAIRES	95
1. METHANOLYSE DE L'HUILE DE COLZA	96
2. INFLUENCE DU CO-SOLVANT SUR LE RENDEMENT DE LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION.....	97
3. REUTILISATION DU BIOREACTEUR.....	100
D. PLAN D'EXPERIENCES.....	101
1. OPTIMISATION DES CONDITIONS REACTIONNELLES	102
2. ETUDE CINETIQUE DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES	107
3. REUTILISATION DU BIOREACTEUR.....	109
4. CARACTERISATION DU BIOREACTEUR APRES UTILISATION	109
5. ETUDE DE L'AJOUT PROGRESSIF DE METHANOL.....	111
a. <i>Cinétique</i>	111
b. <i>Caractérisation du bioréacteur</i>	112
E. RESUME	112

CHAPITRE IV - PREPARATION D'UN BIOREACTEUR PAR CHIMISORPTION DE LA LIPASE MM-L SUR UN SUPPORT SILICATE MESOPOREUX

A. FONCTIONNALISATION DU MATERIAU SBA-15	119
B. ADSORPTION CHIMIQUE DE L'ENZYME SUR LE SUPPORT SBA-15	
FONCTIONNALISE	126

1.	CARACTERISATION DU BIOREACTEUR OBTENU PAR IMMOBILISATION CHIMIQUE	127
2.	DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ENZYME CHIMISORBEE SUR LE SUPPORT NCO _{2M} -SBA-15 131	
C.	REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION CATALYSEES PAR LA LIPASE MM-L CHIMISORBEE.....	133
D.	CARACTERISATION DU BIOREACTEUR APRES REUTILISATION	135
E.	RESUME	138
 CHAPITRE V – BIOREACTEURS MESO-MACROPOREUX		
A.	BIOREACTEURS MESO-MACROPOREUX OBTENUS PAR LA PHYSISORPTION DE LA LIPASE MM-L	145
1.	PREPARATION DU MATERIAU.....	145
2.	CARACTERISATION DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX	146
3.	EFFET DE LA CALCINATION	148
4.	IMMOBILISATION DE LA LIPASE <i>MUCOR MIEHEI</i> SUR LE MATERIAU CALCINE	151
a.	<i>Caractérisation du bioréacteur et mise en évidence de l'adsorption</i>	<i>151</i>
b.	<i>Dosage de l'enzyme</i>	<i>154</i>
5.	REACTION DE TRANSESTERIFICATION DE L'HUILE DE COLZA	155
a.	<i>Cinétique.....</i>	<i>155</i>
b.	<i>Recyclage du bioréacteur</i>	<i>158</i>
B.	BIOREACTEURS SILICATES PREPARES A PARTIR DE DOUBLES EMULSIONS ET DE SLN	161
1.	SYSTEMES COLLOÏDAUX UTILISES COMME TEMPLATE	162
a.	<i>Emulsion inverse.....</i>	<i>162</i>
b.	<i>Double émulsion.....</i>	<i>163</i>
c.	<i>Nanoparticules solides lipidiques (SLN)</i>	<i>164</i>
2.	MATERIAUX	165
a.	<i>Minéralisation du système « double émulsion »</i>	<i>165</i>
b.	<i>Minéralisation du système à base de SLN</i>	<i>168</i>
3.	REACTION DE TRANSESTERIFICATION	171
C.	RESUME	176
CONCLUSIONS GENERALES		181
PERSPECTIVES		183

Liste des figures

CHAPITRE I - GENERALITES

FIGURE I-1 - PRODUCTION DE BIODIESEL DES PRINCIPAUX ETATS MEMBRES EUROPEENS	6
FIGURE I-2 - SCHEMA GENERAL D'UNE REACTION DE TRANSESTERIFICATION	7
FIGURE I-3 - REACTION DE TRANSESTERIFICATION DES TRIGLYCERIDES	7
FIGURE I-4 - REACTIONS SUCCESSIVES DE LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION.....	8
FIGURE I-5 - MECANISME DE LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION CATALYSEE PAR UNE BASE	9
FIGURE I-6 - PARAMETRES INFLUENÇANT LA CATALYSE ENZYMATIQUE	13
FIGURE I-7 - REPRESENTATION DU SITE ACTIF DE L'ENZYME	14
FIGURE I-8 - STRUCTURE DE LA LIPASE <i>MUCOR MIEHEI</i> DANS SA FORME FERMEE (A,C) ET OUVERTE (B,D).....	15
FIGURE I-9 - MECANISME CATALYTIQUE DE LA LIPASE.....	16
FIGURE I-10 - REACTION DE SAPONIFICATION DES TRIGLYCERIDES	18
FIGURE I-11 - SCHEMA METHODOLOGIQUE D'IMMOBILISATION D'ENZYME	21
FIGURE I-12 - METHODES D'IMMOBILISATION.....	22
FIGURE I-13 - REPRESENTATION DES MATERIAUX DE LA FAMILLE DES M41S	31
FIGURE I-14 - MECANISME DE FORMATION CTM	33
FIGURE I-15 - MECANISME TRANSCRIPTIF LCT	34
FIGURE I-16 - MECANISME DE FORMATION DU MATERIAU SBA-15	35
FIGURE I-17 - MECANISME DE GONFLEMENT DE LA PHASE HYBRIDE	37
FIGURE I-18 - SCHEMA ILLUSTRANT LA PREPARATION DES SLN PAR LA METHODE D'INJECTION DE SOLVANT ET LA PREPARATION DE MATERIAUX MESO-MACROPOREUX A PARTIR DE DISPERSIONS DE SLN	40

CHAPITRE II –PARTIE EXPERIMENTALE

FIGURE II-1- STRUCTURE MOLECULAIRE DE LA PERFLUORODECALINE	54
FIGURE II-2 - SCHEMA D'UNE REACTION DE TRANSESTERIFICATION DE TRIGLYCERIDES	54
FIGURE II-3 - VARIATION DU TEMPS DE GELIFICATION ET DE LA STABILITE DE LA SILICE EN SOLUTION EN FONCTION DU PH.....	55
FIGURE II-4 - VARIATION DE LA TEMPERATURE DE POINT DE TROUBLE EN FONCTION DU TAUX DE $R^F_7EO_8$ DANS LE MELANGE $R^F_7EO_8/R^F_8EO_9$	57
FIGURE II-5 - SCHEMA ILLUSTRANT LA LOI DE BRAGG	60
FIGURE II-6 - MONTAGE SAXS	61
FIGURE II-7 – SCHEMA ET DIFFRACTOGRAMME D'UN MATERIAU PRESENTANT UNE STRUCTURE HEXAGONALE (SBA-15)	61
FIGURE II-8 - ISOTHERMES TYPIQUES TYPE II ET IV.....	63
FIGURE II-9 - SPECTRE INFRAROUGE D'UN MATERIAU SBA-15 CONTENANT LA MM-L	65
FIGURE II-10 - DROITES D'ETALONNAGE RELATIVES AUX MATERIAUX SBA-15, MMF ET MATERIAU MESO-MACROPOREUX.....	66

FIGURE II-11 - EVOLUTION DE L'ADSORPTION D'ENZYME EN FONCTION DU TEMPS D'IMMOBILISATION.....	66
FIGURE II-12 - PHOTOGRAPHIE DE L'APPAREIL GC-MS SHIMADZU QP2010 SE.....	68
FIGURE II-13 - CYCLE DE CHAUFFE (A) ET CHROMATOGRAMME TYPIQUE OBTENU PAR GC-MS (B).....	69
FIGURE II-14 - DROITE D'ETALONNAGE DES ESTERS METHYLIQUES	71

CHAPITRE III – PHYSISORPTION DE LA LIPASE MM-L SUR UN SUPPORT SILICATE

MESOPOREUX

FIGURE III-1 - DIFFRACTOGRAMME SAXS DU MATERIAU SBA-15	79
FIGURE III-2 - ISOTHERME D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU SBA-15	80
FIGURE III-3 - IMAGE MEB DU MATERIAU SBA-15.....	80
FIGURE III-4 - DIFFRACTOGRAMME SAXS DU MATERIAU MMF	81
FIGURE III-5 - ISOTHERME D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU MMF	81
FIGURE III-6 – DIFFRACTOGRAMMES SAXS DU MATERIAU SBA-15 APRES IMMERSION DANS LA SOLUTION A DIFFERENTS PH.....	82
FIGURE III-7 - ISOTHERME D'ADSORPTION ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES APRES IMMERSION DU MATERIAU SBA-15 DANS LA SOLUTION A DIFFERENTS PH	83
FIGURE III-8 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DU MATERIAU MMF APRES IMMERSION DANS LA SOLUTION A DIFFERENTS PH.....	83
FIGURE III-9 - ISOTHERME D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES APRES IMMERSION DU MATERIAU MMF DANS LA SOLUTION TAMPON	84
FIGURE III-10 - SPECTRES IR MONTRANT LES BANDES CARACTERISTIQUES DE L'ENZYME LORS DE SON ADSORPTION SUR LE MATERIAU SBA-15 A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE LIPASE DANS UNE SOLUTION A PH 6	87
FIGURE III-11 - ISOTHERME D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU SBA-15 APRES IMMOBILISATION A PH3 (A), 6 (B) ET 10 (C).....	87
FIGURE III-12 - VARIATION DE LA SURFACE SPECIFIQUE, DU VOLUME POREUX ET DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU SBA-15 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN LIPASE POUR LES PH D'IMMOBILISATION 3 (A), 6 (B) ET 10 (C).....	88
FIGURE III-13 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DU MATERIAU SBA-15 APRES IMMOBILISATION DE LA MM-L A 5 MG/ML ET 20 MG/ML.....	89
FIGURE III-14 - ISOTHERME D'ADSORPTION DE LA LIPASE SUR LE MATERIAU SBA-15 A DIFFERENTS PH D'IMMOBILISATION	90
FIGURE III-15 - VARIATION DE LA SURFACE SPECIFIQUE, DU VOLUME POREUX ET DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU MMF EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN LIPASE POUR UNE IMMOBILISATION REALISEE A PH 3 (A), 6 (B) ET 10 (C).....	91
FIGURE III-16 - DIFFRACTOGRAMME SAXS DU MATERIAU MMF APRES L'IMMOBILISATION DE LA LIPASE DANS UNE SOLUTION AYANT UNE CONCENTRATION DE 5 MG/ML ET DE 20 MG/ML.....	92

FIGURE III-17 - ISOTHERME D'ADSORPTION DE LA LIPASE SUR LE MATERIAU MMF A DIFFERENTS PH D'IMMOBILISATION	92
FIGURE III-18 - ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS POINTS ISOELECTRIQUES DE LA SILICE ET DE LA LIPASE	94
FIGURE III-19 - EVOLUTION DE LA QUANTITE D'ENZYME ADSORBEE EN FONCTION DU TEMPS D'IMMERSION DANS LA SOLUTION A PH 6.....	95
FIGURE III-20 - SUIVI DU RENDEMENT DE LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION DANS LES CONDITIONS SUIVANTES : IMMOBILISATION A PH6 ; RAPPORT MOLAIRE MeOH/HUILE : 1; AGITATION : 100 RPM ; TEMPERATURE DE REACTION : 44°C; MASSE DE CATALYSEUR : 10 MG	97
FIGURE III-21 - EVOLUTION DU RENDEMENT EN ESTERS METHYLIQUES EN FONCTION DU POURCENTAGE D'EAU. LE TEMPS A ETE FIXE A 24 (A) ET A 72 HEURES (B)	97
FIGURE III-22 - EVOLUTION CINETIQUE DE LA FORMATION D'ESTERS METHYLIQUES SANS AJOUT (A) ET AVEC AJOUT DE 5% D'EAU (B).....	98
FIGURE III-23 - COMPARAISON DES RENDEMENTS EN ESTERS METHYLIQUES OBTENUS AVEC UN BIOREACTEUR DONT L'IMMOBILISATION A ETE FAITE DANS UNE SOLUTION A PH 3, 6 ET 10.....	99
FIGURE III-24 - REUTILISATION DU CATALYSEUR DANS LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION	100
FIGURE III-25 - EFFETS PRINCIPAUX	104
FIGURE III-26 - DIAGRAMME DES INTERACTIONS	105
FIGURE III-27 - VARIATION DU POURCENTAGE D'EAU DANS LE MILIEU REACTIONNEL.....	107
FIGURE III-28 - EVOLUTION CINETIQUE DES ESTERS METHYLIQUES DANS LES CONDITIONS EXPERIMENTALES DEFINIES PAR LE PLAN D'EXPERIENCES	107
FIGURE III-29 - COMPARAISON DES TURNOVER NUMBERS (CONDITIONS NON-OPTIMISEES ; CONDITIONS OPTIMISEES A L'AIDE DU PLAN D'EXPERIENCES).....	108
FIGURE III-30 - REUTILISATION DU BIOREACTEUR DANS LES CONDITIONS OPTIMALES	109
FIGURE III-31 - DIFFRACTOGRAMMES, ISOTHERMES D'ADSORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES AVANT ET APRES 3 REUTILISATIONS	110
FIGURE III-32 - SPECTRES IR DU BIOREACTEUR AVANT UTILISATION ET APRES 3 UTILISATIONS	110
FIGURE III-33 - CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION APRES 3 INJECTIONS DE METHANOL.....	111
FIGURE III-34 - DIFFRACTOGRAMMES, ISOTHERMES D'ADSORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTIONS DE LA TAILLE DES PORES DU BIOREACTEUR AVANT ET APRES REACTION.....	112

CHAPITRE IV – PREPARATION D'UN BIOREACTEUR PAR CHIMISORPTION DE LA LIPASE

MM-L SUR UN SUPPORT SILICATE MESOPOREUX

FIGURE IV-1 - REPRESENTATION DU 3-(TRIETHOXSILYL)PROPYL ISOCYANATE.....	120
FIGURE IV-2 - SCHEMA DE PRINCIPE ILLUSTRANT L'ETAPE DE FONCTIONNALISATION DU SUPPORT SBA-15	121
FIGURE IV-3 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DU MATERIAU SBA-15 APRES FONCTIONNALISATION A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN ISOCYANATE	122
FIGURE IV-4 - ISOTHERMES D'ADSORPTION ET DISTRIBUTIONS DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU SBA-15 APRES FONCTIONNALISATION A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN ISOCYANATE.....	122

FIGURE IV-5 - EVOLUTION DE LA SURFACE SPECIFIQUE, VOLUME POREUX ET TAILLE DES PORES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN TPI	123
FIGURE IV-6 - SPECTRES DU MATERIAU SBA-15 A DIFFERENTS TAUX DE FONCTIONNALISATION	124
FIGURE IV-7 - SPECTRE RMN 13C DU MATERIAU FONCTIONNALISE NCO2M-SBA-15	125
FIGURE IV-8 - NOMENCLATURE DES UNITES Q ET T	126
FIGURE IV-9 - SPECTRE RMN 29Si DU MATERIAU FONCTIONNALISE NCO2M-SBA-15	126
FIGURE IV-10 - SCHEMA DE PRINCIPE ILLUSTRANT L'ADSORPTION CHIMIQUE DE L'ENZYME SUR LE MATERIAU FONCTIONNALISE.....	127
FIGURE IV-11 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DU MATERIAU SBA-15 INITIAL, DU MATERIAU FONCTIONNALISE NCO2M-SBA-15 ET DU MATERIAU FONCTIONNALISE CONTENANT L'ENZYME MM-L-UREE10-SBA-15 ...	128
FIGURE IV-12 - ISOTHERMES D'ADSORPTION ET DISTRIBUTIONS DE LA TAILLE DES PORES DES MATERIAUX SBA-15, NCO2M-SBA-15, MM-L-UREE5-SBA-15 ET MM-L-UREE10-SBA-15	128
FIGURE IV-13 - SPECTRES RMN 13C DU MATERIAU FONCTIONNALISE NCO2M-SBA-15, DU MATERIAU MM-L-UREE10-SBA-15 ET DU MATERIAU CONTENANT LA LIPASE PHYSISORBEE	129
FIGURE IV-14 - SPECTRES IR DES MATERIAUX SBA-15 INITIAL, NCO2M-SBA-15, MM-L-UREE5-SBA-15 ET MM-L-UREE10-SBA-15.....	130
FIGURE IV-15 – DROITE D'ETALONNAGE DETERMINEE PAR UV AVEC DIFFERENTES SOLUTIONS TAMPON (pH 6) A CONCENTRATIONS VARIABLES DE MM-L DANS LA SOLUTION TAMPON A pH 6	132
FIGURE IV-16 - VARIATION DE LA QUANTITE D'ENZYME ADSORBEE SUR LE MATERIAU NCO2M-SBA-15 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN LIPASE DANS LA SOLUTION A pH 6.....	133
FIGURE IV-17 – CINETIQUES DE LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION AVEC UN CATALYSEUR CHIMISORBE. LES CONDITIONS DE LA REACTION SONT : R= 1:1 ; 25°C ; 100 TRS/MIN ; 2,5% (●) ET 5% D'EAU (○) (A : LIPASE CHIMISORBEE; B : LIPASE PHYSISORBEE).....	134
FIGURE IV-18 - EVOLUTION DU RENDEMENT EN FONCTION DU NOMBRE D'UTILISATIONS DU BIOREACTEUR QUI CONTIENT LA LIPASE MM-L CHIMISORBEE	136
FIGURE IV-19 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DES SUPPORTS MM-L-UREE10-SBA-15 AVANT REACTION, APRES 5 ET 6 UTILISATIONS.....	136
FIGURE IV-20 - ISOTHERMES D'ADSORPTION ET DISTRIBUTIONS DE LA TAILLE DES PORES POUR LE MATERIAU AVANT REACTION, APRES 5 ET 6 UTILISATIONS.....	137
FIGURE IV-21 - SPECTRES IR DU SUPPORT AVANT SON UTILISATION ET APRES 5 ET 6 UTILISATIONS	138

CHAPITRE V – BIOREACTEUR MESO-MACROPOREUX

FIGURE V-1 - MECANISME DE FORMATION DES MATERIAUX MESO-MACROPOREUX	145
FIGURE V-2 - DIFFRACTOGRAMME SAXS DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX	146
FIGURE V-3 - ISOTHERME D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX	146
FIGURE V-4 - DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX OBTENU PAR POROSIMETRIE A MERCURE.....	147
FIGURE V-5 - MICROGRAPHIE MEB DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX	147

FIGURE V-6 – DIFFRACTOGRAMME SAXS, ISOTHERME D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES SUR UN MATERIAU MESO-MACRO NON CALCINE APRES UNE IMMOBILISATION A pH 6 DANS UNE SOLUTION DE LIPASE D'UNE CONCENTRATION DE 5 MG/ML.....	148
FIGURE V-7 - COMPARATIF DES DIFFRACTOGRAMMES SAXS DES MATERIAUX MESO-MACROPOREUX NON-CALCINES ET CALCINES	149
FIGURE V-8 – COMPARATIF DES ISOTHERMES D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTIONS DE LA TAILLE DE PORES D'UN MATERIAU MESO-MACROPOREUX NON CALCINE ET CALCINE.....	150
FIGURE V-9 - DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX CALCINE OBTENU PAR POROSIMETRIE A MERCURE.....	150
FIGURE V-10 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX APRES IMMOBILISATION A DIFFERENTES CONCENTRATIONS ENZYMATIQUES	151
FIGURE V-11 - ISOTHERMES D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTIONS DE LA TAILLE DES PORES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN LIPASE DE LA SOLUTION TAMPON A pH6.....	152
FIGURE V-12 - EVOLUTION DE LA SURFACE SPECIFIQUE, DU VOLUME POREUX ET DES DIAMETRES DES PORES DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN LIPASE DANS LA SOLUTION TAMPON.....	152
FIGURE V-13 - SPECTRES IR DE LA LIPASE MM-L PHYSISORBEE SUR LE MATERIAU MESO-MACROPOREUX EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE	154
FIGURE V-14 - ISOTHERME D'ADSORPTION DE LA LIPASE MM-L IMMOBILISEE A pH 6 SUR LE MATERIAU MESO-MACROPOREUX.....	154
FIGURE V-15 - RENDEMENT EN ESTERS METHYLIQUES EN FONCTION DU TEMPS.....	156
FIGURE V-16 - "TURNOVER NUMBER" DES DEUX TYPES DE BIOREACTEURS.....	157
FIGURE V-17 - REUTILISATION DU BIOREACTEUR (MATRICE MESO-MACROPOREUSE)	158
FIGURE V-18 - ISOTHERMES D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTIONS DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU BRUT, IMMOBILISE ET APRES REACTION	159
FIGURE V-19 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DES MATERIAUX MESO-MACROPOREUX BRUT, CONTENANT LA LIPASE (10 MG/ML) ET AUX DIFFERENTES ETAPES DE REUTILISATION	159
FIGURE V-20 - SPECTRES IR DU BIOREACTEUR AU COURS DU RECYCLAGE.....	160
FIGURE V-21 - SCHEMA D'ILLUSTRATION DE LA FORMATION ET DE LA TRANSFORMATION DE LA DOUBLE EMULSION EN SLN	162
FIGURE V-22 - IMAGE REALISEE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE ET ANALYSE PAR DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE DE L'EMULSION INVERSE CONTENANT LA LIPASE	163
FIGURE V-23 - IMAGES REALISEES PAR MICROSCOPIE OPTIQUE DE LA PREPARATION A BASE DE DOUBLES EMULSIONS.....	163
FIGURE V-24 - ANALYSES DLS (A) ET MASTERSIZER (B) DE LA PREPARATION A BASE DE DOUBLES EMULSIONS.....	164
FIGURE V-25 - ANALYSE PAR DLS D'UNE PREPARATION A BASE DE SLN	164
FIGURE V-26 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DES MATERIAUX MDE	165
FIGURE V-27 - ISOTHERMES D'ADSORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTIONS DE LA TAILLE DES PORES POUR LES MATERIAUX MDE A DIFFERENTS RAPPORTS MOLAIRES TA/TMOS	166

FIGURE V-28 - DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES OBTENUE PAR POROSIMETRIE A MERCURE AVEC LE MATERIAU MDE PREPARE AVEC $R = 0,018$	167
FIGURE V-29 - IMAGES MEB (A, B, C) ET MET (D, E) DU MATERIAU MDE SYNTHETISE AVEC $R = 0,018$	168
FIGURE V-30 - DIFFRACTOGRAMME DU MATERIAU MSLN	169
FIGURE V-31 - ISOTHERME D'ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU MSLN	169
FIGURE V-32 - DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU MATERIAU MSLN REALISEE PAR POROSIMETRIE A MERCURE.....	170
FIGURE V-33 - MICROGRAPHIES MET DU MATERIAU MSLN	170
FIGURE V-34 - DIFFRACTOGRAMMES DES MATERIAUX MmL-MDE ET MmL-MSLN	171
FIGURE V-35 - RENDEMENT EN ESTERS METHYLIQUES EN FONCTION DU TEMPS DES 3 BIOREACTEURS	172
FIGURE V-36 - "TURNOVER NUMBER" DES TROIS TYPES DE BIOREACTEURS (MmL-SBA-15, MmL-MSLN ET MmL- MDE).....	173
FIGURE V-37 - RECYCLAGE DES BIOREACTEURS MmL-MSLN ET MmL-MDE	174
FIGURE V-38 - DIFFRACTOGRAMMES SAXS DES BIOREACTEURS MmL-MSLN ET MmL-MDE APRES UTILISATION	174
FIGURE V-39 - ISOTHERMES D'ADSORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU BIOREACTEUR MmL-MSLN APRES 1, 2 ET 6 REACTIONS	175
FIGURE V-40 - ISOTHERMES D'ADSORPTION D'AZOTE ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES DU BIOREACTEUR MmL-MDE APRES 1, 2 ET 6 REACTIONS.....	175

Liste des abréviations

SMO : Systèmes Moléculaires Organisés

Produits :

Mm-L : *Mucor Miehei* Lipase

TMOS : tétraméthoxysilane $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$

PFD : perfluorodécaline $\text{C}_{10}\text{F}_{18}$

Γ : quantité d'enzyme adsorbée par milligramme de matériau

Γ_{max} : quantité maximale d'enzyme adsorbée par milligramme de matériau

K_L : constante

$[\text{C}_{\text{eq}}]$: concentration résiduelle en lipase

d : distance de répétition

a_0 : paramètre de maille de la phase hexagonale

Caractéristiques des matériaux :

S_{BET} : surface spécifique

d_p : diamètre des pores

V_p : volume poreux

e : épaisseur des parois de silice

Matériaux :

MCM : Mobil Crystalline Materials

SBA : Santa Barbara Amorphous

MMF: Matériau Mésoporeux "Fluoré"

MDE: Matériau préparé à partir de doubles émulsions

MSLN : Matériau préparé à partir de SLN

Techniques utilisées:

SAXS: Small Angles X-ray Scattering

DLS: Dynamic Light Scattering (Diffusion dynamique de la lumière)

BET: méthode de Brunauer, Emmet et Teller de détermination de la surface spécifique

BJH : méthode de Barret, Joyner et Halenda de détermination de la distribution de la taille des pores

FTIR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy

GC-MS: Gas Chromatography Mass Spectrometry

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique à transmission

Introduction générale

Durant les dix dernières années, le biodiesel a suscité un certain engouement grâce à sa capacité à diminuer la production et l'utilisation des combustibles fossiles. Le biodiesel, qui présente l'avantage d'être une énergie renouvelable, biodégradable et non-toxique, est un mélange d'esters d'acides obtenus par la réaction de transestérification d'une huile végétale ou animale.

Actuellement, la méthanolyse des triglycérides présents dans les huiles est réalisée en présence de catalyseur homogène basique et acide. La catalyse basique donne de très bons résultats puisque les taux de conversion atteignent leurs maxima en très peu de temps. Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients comme une consommation importante d'énergie (température de réaction élevée), une séparation difficile des esters méthyliques et du glycérol, une réaction de saponification possible entre l'eau présente dans l'huile et les acides gras ainsi que la récupération du catalyseur.

Plus récemment, pour palier à ces inconvénients, la catalyse enzymatique hétérogène a été investie. Elle permet de travailler dans des conditions douces de réaction et devrait améliorer la séparation des produits de la réaction. Néanmoins, ce procédé n'est pas encore mis en place au niveau industriel à cause des contraintes inhérentes à l'utilisation d'enzyme telles que l'inhibition de l'enzyme par le méthanol et le coût élevé des enzymes.

Le travail engagé dans cette thèse a consisté à étudier l'immobilisation de la lipase *Mucor miehei* sur des matériaux poreux silicatés dans le but de mettre au point des bioréacteurs qui seront le siège pour transestérifier des huiles végétales par catalyse enzymatique. Ces systèmes devraient permettre une bonne dispersion de l'enzyme due à la grande surface spécifique de ce type de support ainsi qu'une récupération simplifiée du bioréacteur à des fins de recyclage.

Ce travail a consisté principalement à développer des bioréacteurs servant de catalyseur à la méthanolyse de l'huile de colza et à déterminer leur performance catalytique de même que leur recyclage. Pour cela, plusieurs supports silicatés ont été préparés à partir de systèmes moléculaires organisés à base de tensioactif. La lipase Mm-L a été immobilisée par physisorption, chimisorption ou encapsulation directe et les performances catalytiques des différents bioréacteurs ont été évaluées.

Le premier chapitre est consacré à une introduction sur le biodiesel et aux différentes façons de le produire. Sont également exposés les différents types d'immobilisation ainsi que les matériaux servant de support. Enfin, une synthèse bibliographique des résultats obtenus avec la réaction de transestérification par catalyse enzymatique est présentée. La partie expérimentale décrit les produits, les techniques utilisées ainsi que les différentes méthodes et protocoles mis en œuvre pour la synthèse des matériaux.

Le chapitre 3 rapporte l'étude de l'adsorption physique de la lipase sur deux types de matériaux mésoporeux silicatés. L'utilisation de ces bioréacteurs comme catalyseur dans la conversion de l'huile de colza en esters méthyliques est aussi exposée dans cette partie. Dans le chapitre 4, la lipase *Mm-L* a été chimisorbée par liaison covalente au support mésoporeux. L'activité catalytique de ce bioréacteur a été testée et comparée au système physisorbé. Dans le chapitre 5, deux matrices silicatées présentant une porosité hiérarchisée ont servi de supports et la lipase a été soit physisorbée, soit encapsulée directement pendant la synthèse du matériau.

CHAPITRE I - GENERALITES

A.	SYNTHESE DU BIODIESEL.....	5
1.	DEFINITION ET PROPRIETES DU BIODIESEL.....	5
2.	SYNTHESE DU BIODIESEL PAR VOIE CHIMIQUE.....	7
3.	SYNTHESE DU BIODIESEL PAR VOIE ENZYMATIQUE	11
a.	<i>Choix de l'enzyme</i>	12
b.	<i>Propriétés de la lipase Mucor miehei</i>	14
c.	<i>Paramètres influençant la réaction de transestérification</i>	17
i.	La nature de l'alcool	17
ii.	Le rapport molaire alcool/huile	18
iii.	Composition de l'huile.....	18
iv.	La température et le temps de réaction.....	19
B.	IMMOBILISATION D'ENZYME	19
1.	CONDITIONS NECESSAIRES A L'IMMOBILISATION	20
2.	LES DIFFERENTES METHODES D'IMMOBILISATION D'ENZYME	21
a.	<i>Adsorption physique (physisorption)</i>	22
b.	<i>Adsorption chimique (chimisorption)</i>	23
c.	<i>Encapsulation</i>	24
d.	<i>Cross-linking (réticulation)</i>	24
3.	MATERIAUX UTILISES COMME SUPPORT D'ENZYME	25
a.	<i>Les polymères synthétiques organiques</i>	25
b.	<i>Les polymères naturels</i>	25
c.	<i>Les supports inorganiques</i>	25
d.	<i>Microémulsions inverses</i>	26
e.	<i>Matériaux mésoporeux</i>	26
i.	Effet de la taille des pores sur l'immobilisation	27
ii.	Effet de la structure et de la morphologie sur l'immobilisation	27
iii.	Effet des propriétés de surface sur l'immobilisation	28
4.	LES DIFFERENTS MATERIAUX UTILISES COMME SUPPORT POUR L'IMMOBILISATION DE LA LIPASE MUCOR MIEHEI DANS LE CADRE DE LA SYNTHESE DU BIODIESEL.....	29
C.	MATRICES POREUSES	30
1.	LES MATERIAUX MESOPOREUX.....	30
a.	<i>Procédé sol-gel</i>	31
b.	<i>Mécanisme d'auto-assemblage coopératif CTM</i>	33
c.	<i>Mécanisme transcriptif LCT</i>	33
d.	<i>Interactions tensioactif-précurseur</i>	34
e.	<i>Matériaux SBA-15</i>	35
f.	<i>Matériaux mésoporeux préparés à partir de tensioactifs fluorés</i>	36
2.	LES MATERIAUX A POROSITE HIERARCHISEE	38
D.	OBJECTIF DE LA THESE	41

Chapitre I : Généralités

Ce chapitre aborde les notions de bases nécessaires à la compréhension du travail développé dans le cadre de la thèse. Dans un premier temps, nous décrirons le biodiesel ainsi que ses propriétés. Ensuite, les différentes méthodes de préparation du biodiesel seront présentées, en s'attachant plus particulièrement à la catalyse enzymatique. Puis, le mécanisme associé à ce type de catalyse sera expliqué. Deuxièmement, nous montrerons comment l'enzyme peut s'adsorber sur les supports relativement à la synthèse du biodiesel. Dans une troisième partie, les différentes méthodes de préparation de matériau à porosité hiérarchisée seront examinées (émulsions diluées ou les nanoparticules lipidiques solides (SLN)).

A. Synthèse du biodiesel

1. Définition et propriétés du biodiesel

Le biodiesel est un carburant alternatif au diesel classique, dérivé du pétrole. Il est préparé à partir d'huile végétale ou animale transformée par une réaction chimique appelée transestérification. Il est composé d'esters alkyles. Cette réaction consiste à faire réagir l'huile avec un alcool, souvent le méthanol ou l'éthanol, afin d'obtenir des esters méthyliques ou éthyliques en fonction de l'alcool utilisé. Au cours de cette réaction, un sous-produit est créé, le glycérol. Généralement, la plupart des huiles utilisées donnent par hydrolyse des acides gras ayant entre 16 et 18 carbones, tels que l'acide palmitique (hexadécanoïque), linoléique (octadécadiénoïque), oléique (octadécénoïque) et stéarique (octadécanoïque). Ces constituants sont fonction de l'huile de départ. Des acides gras insaturés (C_{12} - C_{16}) sont par exemple présents dans l'huile de noix de coco.

Les avantages du biodiesel, en comparaison avec le diesel classique, sont nombreux et les principaux concernent la réduction des émissions d'échappement, la biodégradabilité, l'absence de soufre, le bilan énergétique positif, la compatibilité avec les moteurs diesel ainsi qu'avec les infrastructures distribuant le diesel. Un carburant classique est caractérisé par différents paramètres tels que son indice de cétane, sa viscosité cinématique ou encore la stabilité oxydative. Ces propriétés dépendent de la composition du mélange, et donc de l'huile utilisée lors de la réaction¹. D'après les travaux de Gerhard Knothe, l'indice de cétane, nombre sans dimension illustrant le temps de retard à l'allumage dans la chambre de combustion d'un moteur, varie selon les acides gras présents. Plus ce nombre est grand, plus le temps de retard à l'allumage lors de la combustion est court. C'est un paramètre important relatif à la combustion du carburant. Le nombre de cétane augmente en fonction de la longueur des chaînes alkyles, ainsi que du degré de saturation de ces chaînes. Le nombre de cétane d'un ester méthylique issu d'un acide palmitique est de 86 alors que celui d'un ester méthylique issu d'un acide oléique est d'environ 55. Cette différence s'explique par l'insaturation présente dans la chaîne de l'oléate de méthyle, insaturation que n'a pas le palmitate de méthyle. De manière générale, une huile de colza a un nombre de cétane compris entre 51 et 55, alors que pour une huile de soja, il est de 48-52. Pour le diesel classique, ce nombre varie entre 49 et 52. Gerhard Knothe montre aussi que le nombre de cétane joue un rôle sur l'émission des oxydes d'azote. En effet, en augmentant ce paramètre, il y a une diminution des émissions d'oxydes d'azote. La longueur des chaînes et le niveau de saturation influence les émissions, et ces dernières sont réduites lorsque la majorité des esters méthyliques est saturée. Un paramètre important à

prendre en compte est la viscosité. Pour les carburants, on parle de viscosité cinématique. Sa valeur à 40°C pour le diesel classique est comprise entre 3 et 5 mm²/s. Concernant le biodiesel, sa valeur est toujours dépendante de la composition du système. Ce paramètre augmente avec l'augmentation de la longueur des chaînes des esters méthyliques ainsi qu'avec le niveau de saturation. Le biodiesel préparé à partir d'huile de colza a une viscosité cinématique de 4,5 mm²/s.

La stabilité oxydative définit le temps durant lequel un carburant est utilisable. En effet, en présence d'air, le carburant réagit avec l'oxygène et se dégrade. Le diesel est stable durant des mois grâce à différents additifs tels que les antioxydants ajoutés lors de la production du carburant. En ce qui concerne le biodiesel préparé à partir d'huile végétale, la raison de l'oxydation est la présence de double liaison dans les chaînes d'esters. Les esters méthyliques ayant une saturation complète des chaînes (palmitate de méthyle, stéarate de méthyle...) ont une stabilité oxydative supérieure à 24 heures, alors que celle des chaînes insaturées n'est que de quelques heures, donc il est nécessaire d'ajouter un additif pour remédier à cette oxydation. Les propriétés du biodiesel sont assez proches de celle du diesel conventionnel. L'avantage du biodiesel réside également dans l'absence de composés toxiques comme les oxydes d'azote (NO_x). C'est pourquoi sa production ne cesse d'augmenter comme le montre la Figure I-1.

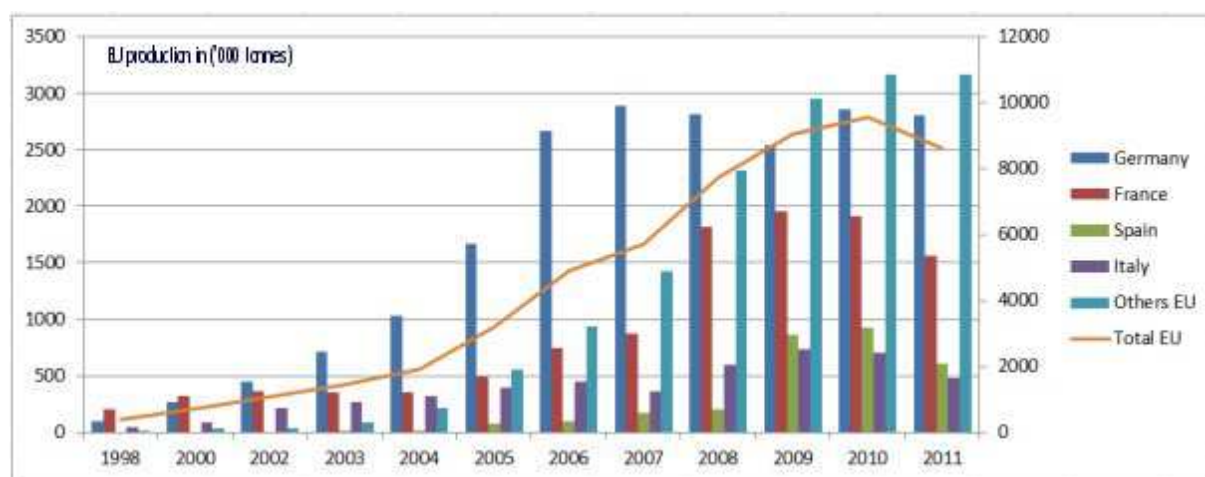


Figure I-1 - Production de biodiesel des principaux états membres européens

Le biodiesel est préparé industriellement par voie chimique. Cette réaction appelée transestérification a lieu entre un ester et un alcool pour donner un second ester. Pour accélérer la réaction de transestérification, on utilise deux types de catalyseurs. Ces catalyseurs sont soit acides, soit basiques. La Figure I-2 représente le schéma général d'une réaction de transestérification.



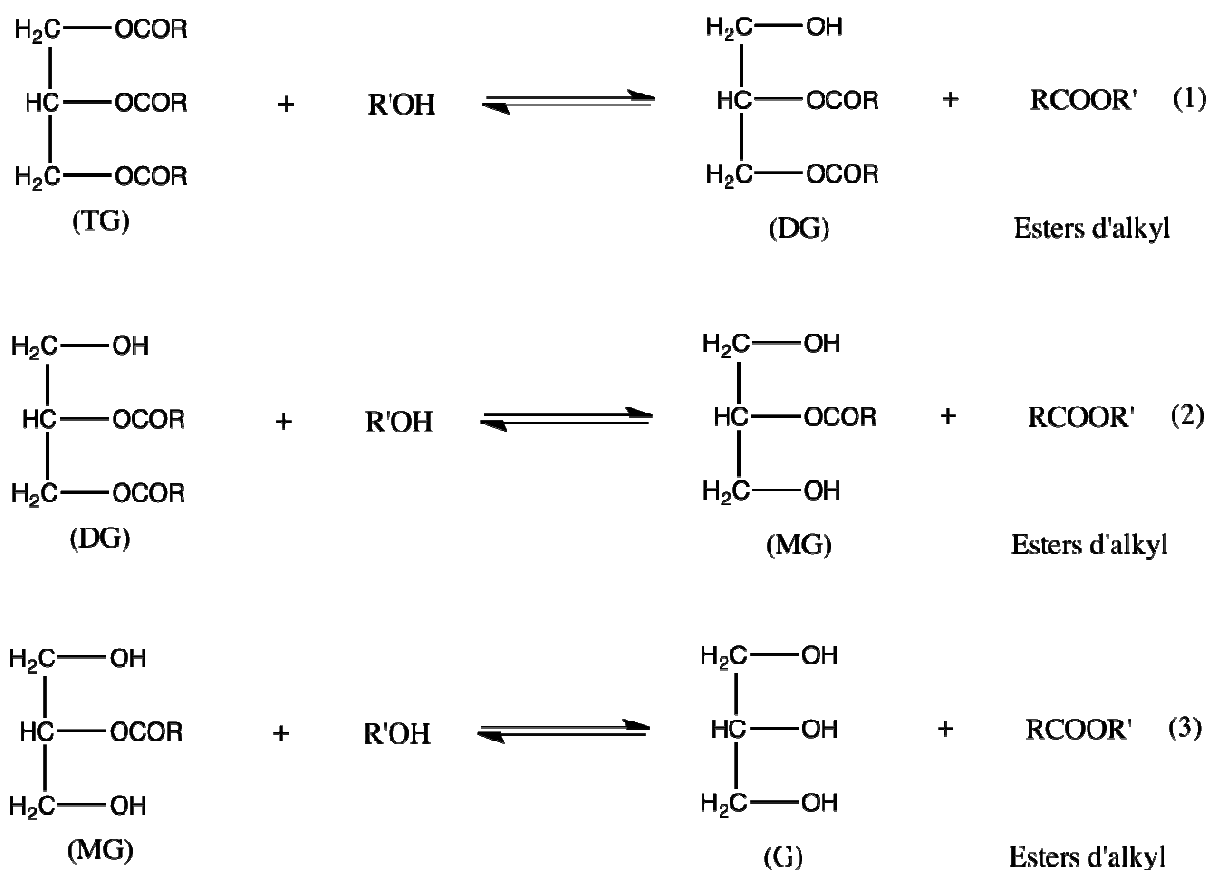


Figure I-4 - Réactions successives de la réaction de transestérification

La réaction de transestérification est équilibrée chimiquement. Les fonctions esters primaires sont transestérifiées en premier (étapes 1 et 2). Ces deux étapes sont rapides, alors que la troisième étape est plus lente².

En catalyse basique, le mécanisme est présenté en Figure I-5.

Dans un premier temps, une attaque nucléophile du carbonyle du triglycéride par l'anion alcoolate forme un carbanion intermédiaire, il s'agit de la phase d'addition. Ensuite, lors de la phase d'élimination, la présence du doublet de l'oxygène entraîne le départ du nucléofuge. Lorsque la fonction alcoolate du glycérol apparaît, l'alcoolate est régénéré. Le passage d'un monoglycéride à un ester semble être une réaction déterminante car la stabilité des monoglycérides est supérieure à celle des diglycérides.

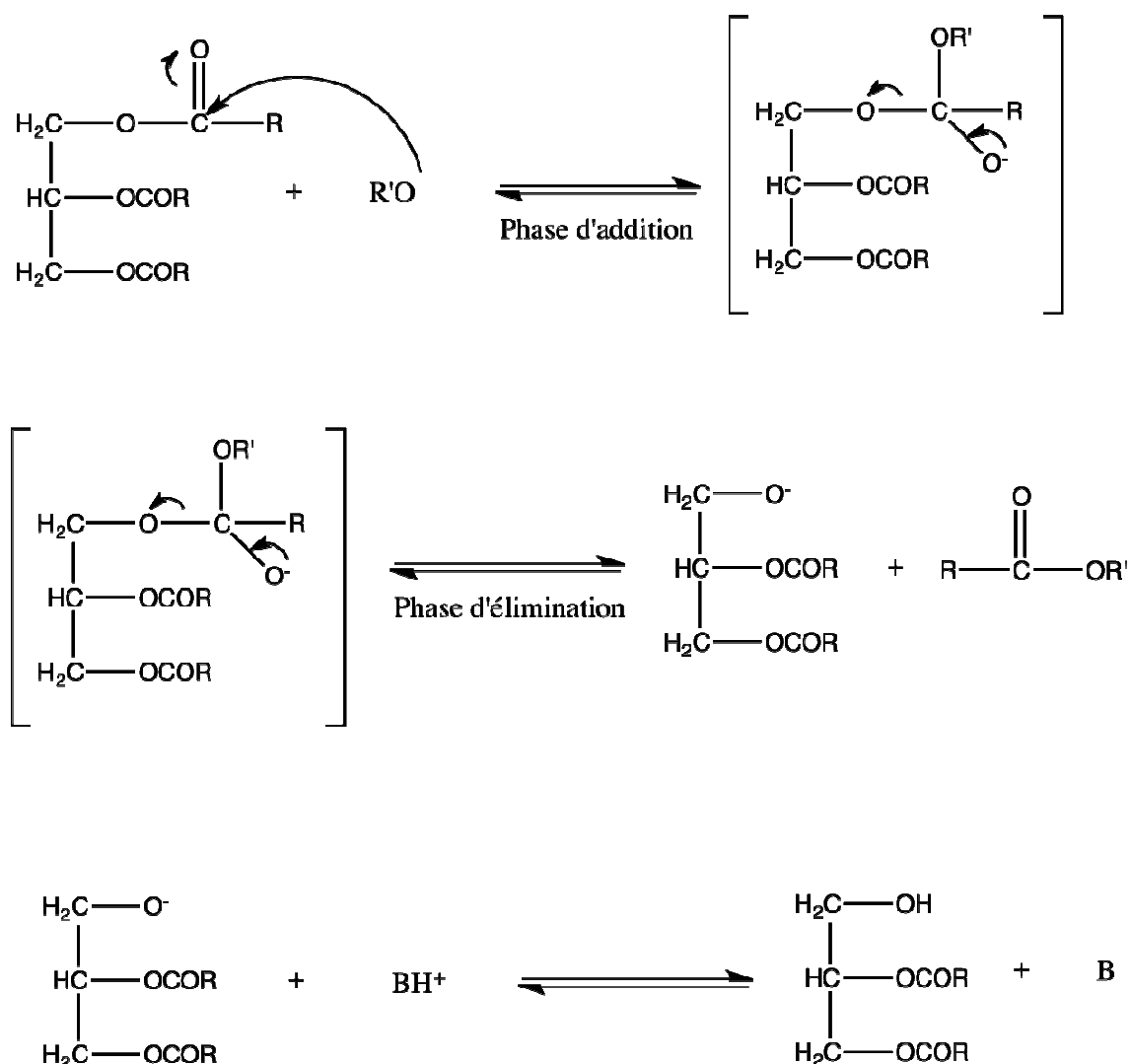


Figure I-5 - Mécanisme de la réaction de transestérification catalysée par une base

Les catalyseurs les plus utilisés sont les alcoolates de métaux alcalins (CH₃ONa par exemple), les hydroxydes de métaux alcalins (KOH, NaOH) et les carbonates de sodium (Na₂CO₃) ou potassium (K₂CO₃). Cependant, les catalyseurs type CH₃ONa sont les plus actifs et donne un rendement supérieur à 98% en peu de temps (moins d'heure). Le point négatif de ces catalyseurs est qu'ils doivent être utilisés en absence d'eau dans le milieu réactionnel. Tout comme les alcoolates, les hydroxydes de métaux alcalins doivent catalyser la réaction de transestérification en absence d'eau. L'avantage de ce type de catalyseur est lié à son coût, moins élevé, toutefois le catalyseur est moins actif. Leur inconvénient est que, lors de cette réaction, de l'eau est formée. Cette présence d'eau entraîne l'hydrolyse et la saponification des esters produits ; ce qui a pour conséquence de réduire le taux de conversion de la réaction de transestérification, mais aussi de rendre difficile la séparation du glycérol².

Les catalyseurs comme le carbonate de potassium évitent la réaction de saponification et donnent des rendements en esters supérieurs à 95%. La formation du bicarbonate au lieu de celle de l'eau explique cela et empêche l'hydrolyse des esters.

Le recours à la catalyse basique, en plus de la vitesse de la réaction plus élevée que celle catalysée par un acide, est relatif au problème de corrosion. En effet, les bases sont moins corrosives que les acides. Au niveau industriel, cet aspect est important³.

Les catalyseurs (acide ou basique) sont utilisés en catalyse homogène, c'est à dire que le catalyseur ne forme qu'une seule phase avec le milieu réactionnel. Ainsi, un grand nombre d'étapes sont nécessaires pour séparer et purifier le biodiesel du glycérol. En limitant ce processus purification/séparation, la catalyse hétérogène rend donc moins coûteuse la production de biodiesel. Encinar *et al.* ont montré qu'en catalyse hétérogène, on pouvait obtenir des rendements aussi élevés qu'en catalyse homogène. La matrice constituée d'oxyde de calcium dans laquelle est incorporée du nitrate de potassium présente alors plusieurs avantages, comme son prix peu élevé, sa forte basicité, sa faible solubilité et sa facilité de manipulation ainsi que son pouvoir catalytique⁴.

Les avantages de la catalyse hétérogène par rapport à la catalyse homogène se situent essentiellement dans le nombre d'étapes nécessaire pour obtenir un produit pur. Pour la catalyse hétérogène, une simple filtration est suffisante pour séparer le catalyseur du milieu réactionnel. Par contre, pour les deux types de catalyse, les réactions de transestérification nécessitent une température assez élevée (supérieure à 50°C) et un rapport molaire alcool/huile important (au delà de 6). En général, les inconvénients de la catalyse homogène sont corrigés par la catalyse hétérogène. Une nouvelle voie de catalyse a été étudiée, il s'agit de la catalyse enzymatique. Le Tableau I-1 résume les comparaisons entre les trois méthodes catalytiques (acide, base et enzymatique)⁵.

Tableau I-1 - Comparaison des différentes catalyses

	Catalyse homogène basique	Catalyse homogène acide	Catalyse enzymatique
Température de réaction	40-60°C	60-100°C	30-40°C
Présence d'acides gras libres dans la matière première	Saponification des acides gras	Pas d'influence	Pas d'influence
Présence d'eau dans l'huile	Ralentissement de la réaction	Réaction entravée	Peut montrer une activité accrue
Rendement	> 90%	> 90%	Dépend du type d'enzyme
Récupération du glycérol	Difficile	Plus ou moins facile en fonction de la quantité d'alcool ajoutée	Facile
Purification du biodiesel	Etapes de lavage répétées	Facile	Pas nécessaire
Coût de la catalyse	Faible	Faible	Elevée
Vitesse de réaction	Rapide par rapport à la catalyse acide	Lente par rapport à la catalyse basique	Plus lente que la catalyse acide et basique

3. Synthèse du biodiesel par voie enzymatique

Les enzymes sont des biocatalyseurs naturels utilisées dans un grand nombre de domaines tels que la chimie organique, la pharmacie, les biovecteurs, les piles à combustibles⁶. Pour la synthèse du biodiesel, les lipases sont des enzymes intéressantes. Les lipases (triacylglycérol ester hydrolases, EC 3.1.1.3) sont des enzymes hydrosolubles capables de décomposer les triglycérides en acides gras et glycérol. En 1990, la structure du site catalytique a été mise en évidence par des études cristallographiques. Brady *et al.* ont montré que la structure tridimensionnelle permet de comprendre l'activité des lipases⁷. Une boucle peptique couvre le site actif, en jouant le rôle de couvercle (lid). Selon la nature du substrat et de l'environnement, cette boucle peut s'ouvrir et permettre l'accès au site actif. Ce changement de conformation est la base du fonctionnement des lipases. En fonction du milieu environnant la lipase peut avoir deux activités. En milieu aqueux, la lipase catalyse l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol alors qu'en milieu non aqueux, il y a transestérification⁸.

a. Choix de l'enzyme

La catalyse enzymatique dépend de plusieurs paramètres (Figure I-6). Tout d'abord, le choix de l'enzyme est primordial car chaque enzyme possède sa propre fonctionnalité. Plusieurs lipases peuvent jouer le rôle de catalyseur pour l'estérification ou la transestérification d'une huile végétale, comme la lipase *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Penicillium cyclopium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus oryzae* la lipase pancréatique porcine ou encore la lipase *Mucor miehei*. Plusieurs études ont montré la faisabilité de la réaction avec ces différentes lipases. Dans le cas de la synthèse de biodiesel, les lipases les plus couramment utilisées sont la lipase *Mucor miehei*, *Candida rugosa* ou *Candida antarctica*. Concernant le substrat, il doit exister une corrélation avec l'enzyme. D'autre part, le rapport molaire alcool/huile est important, car il peut avoir deux effets sur la préparation du biodiesel. Des quantités trop grandes peuvent inhiber l'enzyme au point de la rendre inactive. Mais un rapport molaire trop faible ne sera pas suffisant pour transestérifier l'ensemble du substrat présent. Pour ce qui concerne la température, elle doit correspondre à la gamme de température optimale de fonctionnement de l'enzyme. D'autres paramètres entre en compte lors de la synthèse d'esters, spécifiques à chaque enzyme, comme l'ajout d'eau. Certaines lipases ont une préférence pour une catalyse sans ajout d'eau. Par contre, Nelson *et al.* ont mis en évidence qu'un faible ajout d'eau permet d'augmenter le rendement de la réaction de transestérification⁹. C'est le cas de la lipase *Pseudomonas cepacia* qui avec ajout d'eau permet d'améliorer la conversion (60-84%). Un autre paramètre important est le pH d'immobilisation de l'enzyme dans des matrices.

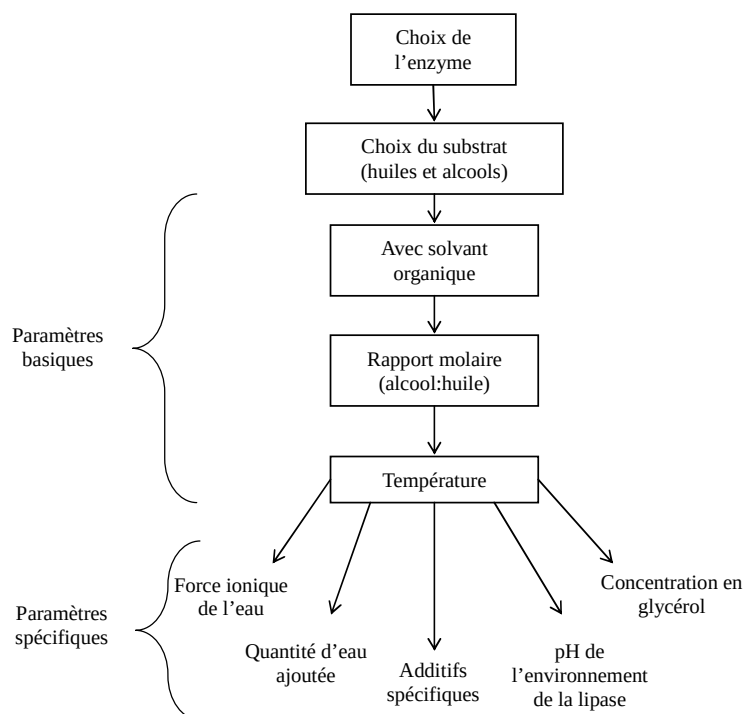


Figure I-6 - Paramètres influençant la catalyse enzymatique¹⁰

Shah *et al.* ont comparé la transestérification de l'huile de *Jatropha* par trois lipases, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum* et la lipase pancréatique porcine¹¹. D'après leurs résultats, seule la catalyse effectuée par la lipase *Chromobacterium viscosum* donne un taux de conversion de l'ordre de 60%. La réaction réalisée avec les deux autres lipases conduit à un rendement quasi nul. Il est également possible d'utiliser un mélange de deux enzymes pour synthétiser du biodiesel. D'après les travaux de Jang *et al.*, le pouvoir catalytique est accru lorsque les lipases *Candida rugosa* et *Rhizopus oryzae* sont mélangées¹². D'autres équipes de recherche ont immobilisé la lipase sur une résine. C'est le cas de Tan *et al.*, qui ont répertorié les résultats plusieurs études dans leur revue¹³, dont une où la lipase *Candida antarctica* est immobilisée sur une résine acrylique et dont son utilisation donne un taux de conversion supérieur à 90%^{14,15}. Cette lipase a également fait l'objet d'une étude sur la catalyse enzymatique de la réaction de transestérification assistée par ultrason¹⁶. Il résulte de ces travaux que le fait de soumettre le milieu réactionnel aux ultrasons favorise le rendement. L'effet de la nature de l'alcool sur la réaction de transestérification des triglycérides a été résumé par Fukuda *et al.*²⁶. Par exemple, en utilisant l'huile de colza comme substrat et la lipase *Candida rugosa* sous forme de poudre, un taux de conversion de 97% est obtenu. L'alcool utilisé dans cette réaction n'est pas commun, il s'agit du 2-éthyl-1-hexanol. Une réaction réalisée avec la lipase *Mucor miehei* immobilisée sur une résine poreuse dans un système sans solvant donne une conversion supérieure à 85% des esters de départ¹⁷. L'éthanol

est un alcool qui peut être utilisé pour la transestérification des triglycérides et les résultats donnent un rendement en esters éthyliques supérieur à 80% dans le cas d'une catalyse réalisée par les lipases *Mucor miehei*¹⁸, *Candida antarctica*¹⁹ et *Pseudomonas cepacia*²⁰. Par contre, cette dernière lipase n'est pas efficace en fonctionnant avec du méthanol car la réaction de transestérification de l'huile de palme a donné une conversion de seulement 15%²¹. Concernant la méthanolyse, Shimada *et al.* montrent que la lipase *Candida antarctica* est la plus efficace parmi les lipases testées²². Il a également mis en évidence l'inactivation de la lipase quand la quantité de méthanol ajouté au système est trop grande c'est-à-dire à partir du rapport molaire méthanol/huile égal à 3.

b. Propriétés de la lipase *Mucor miehei*

Dans ce travail, nous avons utilisé la lipase *Mucor Miehei* (Mm-L). Elle est extraite d'un champignon (*Aspergillus oryzae*). Sa masse molaire est de 31 600 Da et son point isoélectrique de 3,8. De structure globulaire (4-5 nm), la lipase Mm-L a été décrite pour la première fois par Brady *et al.*⁷ (Figure I-8). Cela a permis de montrer que le site actif est composé d'une triade catalytique constituée de sérine, histidine et d'acide aspartique protégée par une boucle peptidique (Figure I-7).

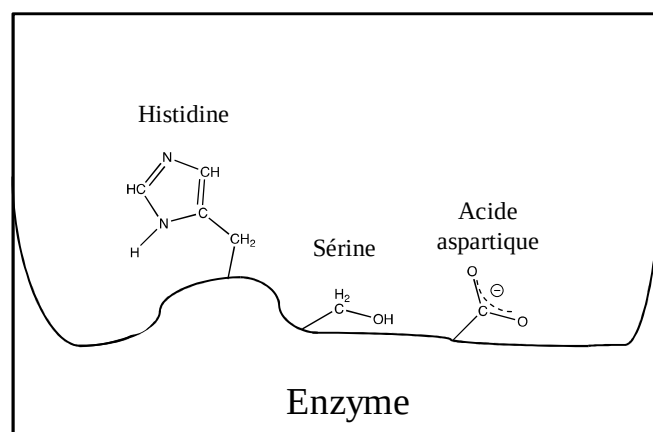


Figure I-7 - Représentation du site actif de l'enzyme

D'un point de vue général, l'enzyme est décrite comme une chaîne polypeptidique de 269 éléments aminoacides. Elle est repliée sous forme de feuillets (appelé feuillet β) reliés par des boucles et des segments hélicoïdaux (hélice α). Toutes ces boucles sont situées à droite, ce qui entraîne un arrangement du feuillet central asymétrique. Trois ponts disulfures stabilisent la molécule. Un segment de protéine sous forme d'hélice protège le site actif. C'est le

déplacement de cette hélice constituée de 15 acides aminés qui entraîne l'activation de l'enzyme. Après l'ouverture du site actif, une surface de 800 Å² est alors disponible.

La catalyse par la lipase a lieu à 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^{23,24}. A l'interface eau-lipide, il y a un phénomène de désolvatation de cet acide aminé (Arg86) qui joue un rôle clé dans le processus d'activation²⁵.

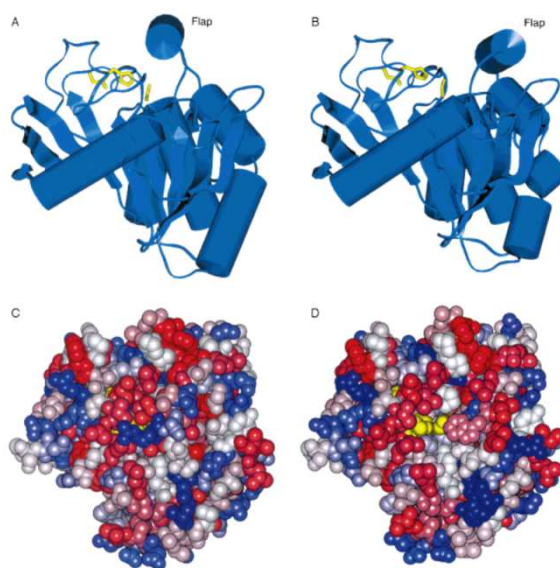


Figure I-8 - Structure de la lipase *Mucor miehei* dans sa forme fermée (A,C) et ouverte (B,D)

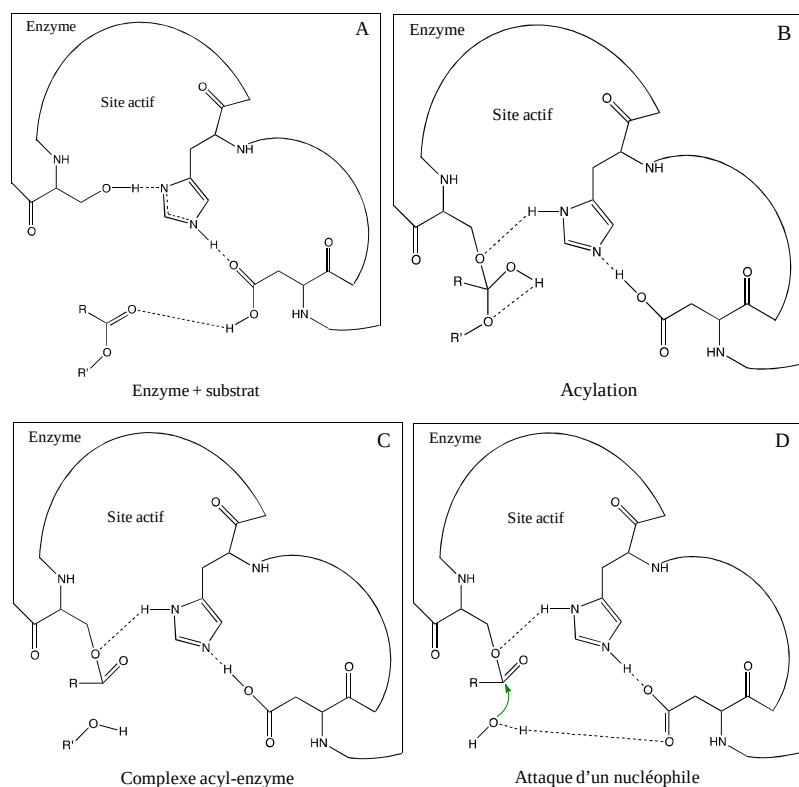


Figure I-9 - Mécanisme catalytique de la lipase

Pour la réaction de transestérification, la catalyse s'effectue en 4 étapes (Figure I-9). Elle est basée sur le principe clé/serrure. Lorsque l'huile (substrat) arrive sur le site actif, l'oxygène de la sérine attaque le site C=O du substrat, qui est activé par la liaison hydrogène établie entre le substrat et l'acide aspartique (étape A). Ensuite, une liaison covalente est créée entre un atome de carbone du substrat et l'oxygène de la sérine. Il y a alors une réorganisation des charges. L'histidine capte un proton de la sérine tandis qu'un autre proton est cédé à l'acide aspartique afin de rester neutre (étape B). C'est l'étape d'acylation. Un groupement alcool est libéré à cause de la force motrice puisque la création d'une double liaison (C=O) est plus favorable que deux liaisons simples (O-C-O) (étape C). Le processus continue avec l'attaque du nucléophile, en effet, la liaison C=O interagit avec l'oxygène du méthanol, activé et coordonné par celui de l'acide aspartique. Enfin, la création de la liaison entre l'oxygène du méthanol et le groupement carboxyle entraîne la libération de l'ester (étape D).

La réaction de transestérification catalysée par la lipase *Mucor miehei* (Mm-L) a été étudiée par plusieurs groupes. Nelson *et al.* ont examiné la catalyse de plusieurs huiles par la lipase Mm-L dans l'hexane dans des conditions de réaction différentes. La conclusion de cette étude est que, quel que soit le type de substrat et l'alcool utilisé (méthanol, éthanol, butanol,

isobutanol et propanol), le rendement de la réaction de transestérification est supérieur à 90%⁹. Toutefois, en immobilisant la lipase sur une résine macroporeuse, le rendement de la réaction de transestérification diminue de 98% à 68%. D'autres lipases ont été investies, mais les résultats montrent que la lipase *Mucor miehei*, utilisée dans des conditions moins drastiques, est la plus efficace. Fukuda *et al.* ont étudié la transestérification d'huiles provenant de différentes origines en choisissant également comme catalyseur les lipases *Mucor miehei*, *Candida antarctica* et *Pseudomonas cepacia*²⁶. De manière générale, toutes ses lipases sont appropriées pour transestérifier les huiles utilisées telles que l'huile de tournesol, huile de poisson, l'huile usagée ou encore l'huile de soja. Le choix du solvant organique pour effectuer la réaction de transestérification catalysée par la *Mm-L* a fait l'objet d'une étude réalisée par Antczak *et al.*¹⁰. Le solvant organique donnant un rendement en esters le plus élevé est l'hexane (94%), alors qu'une réaction dans l'acétone ne produit que 20% d'esters. Ils ont aussi mis en évidence l'importance du choix de l'alcool. Les réactions réalisées dans l'hexane avec comme catalyseur la lipase *Mucor miehei* produisent de meilleurs taux de conversion avec l'éthanol (98%) comparé au méthanol (73%). D'autres alcools comme l'isobutanol permettent d'atteindre un rendement de 98,5%.

c. Paramètres influençant la réaction de transestérification

Pour maîtriser une réaction de transestérification, il est nécessaire d'optimiser les différents paramètres qui jouent un rôle relativement à son rendement. Ces paramètres sont la nature du catalyseur, de l'alcool et de l'huile, le rapport molaire alcool/triglycérides, la température, la pureté de l'huile, la vitesse d'agitation et le temps de réaction.

i. La nature de l'alcool

La réaction de transestérification est une réaction équilibrée. Le fait d'ajouter l'alcool en excès permet de forcer la réaction dans le sens de la production des alkyls esters. Les alcools utilisés sont des mono-alcools aliphatiques primaires ou secondaires et les plus couramment rencontrés sont le méthanol, l'éthanol, le propanol et le butanol. Cependant, l'éthanol et plus particulièrement le méthanol dû à son coût faible (et à la courte longueur de sa chaîne) et à leur polarité élevée sont les deux alcools que l'on retrouve le plus souvent dans le processus de transestérification d'une huile végétale.

Des études ont montré que l'homogénéité du mélange huile/alcool dépend de la longueur de la chaîne carbonée de l'alcool²⁷. En effet, plus la chaîne de l'alcool est longue, plus l'émulsion formée par l'huile et l'alcool est stable. Dasari *et al.* ont travaillé sur l'influence de plusieurs

alcools (méthanol, éthanol et isopropanol) en chauffant à 150°C et sans utilisé catalyseur²⁸ et montrent que l'isopropanol a une activité plus faible que celle du méthanol et de l'éthanol, ces derniers ayant un comportement similaire. Cela s'explique par l'encombrement stérique de l'isopropanol qui entraîne une répulsion des groupements entre eux.

On doit noter que la provenance de l'alcool donne des caractéristiques différentes au biodiesel. En effet, l'éthanol issu de la fermentation du sucre (canne à sucre ou betterave) rend le biodiesel moins nocif que celui obtenu à partir de méthanol.

ii. Le rapport molaire alcool/huile

Ce rapport est l'un des paramètres les plus importants de la réaction de transestérification puisqu'il dicte la vitesse de réaction²⁹. La stœchiométrie de la réaction est de 3, c'est à dire que 3 moles d'alcool doivent être utilisées pour transestérifier une mole de triglycérides. Cette condition permet d'obtenir une mole de glycérol et 3 moles d'esters d'acides gras. En fonction du type de catalyseur, la quantité d'alcool nécessaire est variable. En effet, lors d'une catalyse basique, le rapport molaire doit être au moins de 6. Un rapport supérieur rend la purification du biodiesel difficile. Lors d'une catalyse acide, l'alcool doit être en fort excès pour obtenir un rendement proche de 100%. Zheng *et al.* en 2006 ont transestérifié une huile de friture avec H₂SO₄. Ils ont montré qu'un rapport molaire huile/méthanol de 245 est nécessaire²⁸.

iii. Composition de l'huile

La composition de l'huile utilisée dans le cadre d'une réaction de transestérification peut avoir une influence sur le rendement. D'autre part, la présence d'eau et d'acides gras libres est également à prendre en compte. Si l'huile contient une quantité non négligeable d'eau ou d'acides gras libres, une réaction "parasite" a lieu, la saponification des triglycérides (Figure I-10).

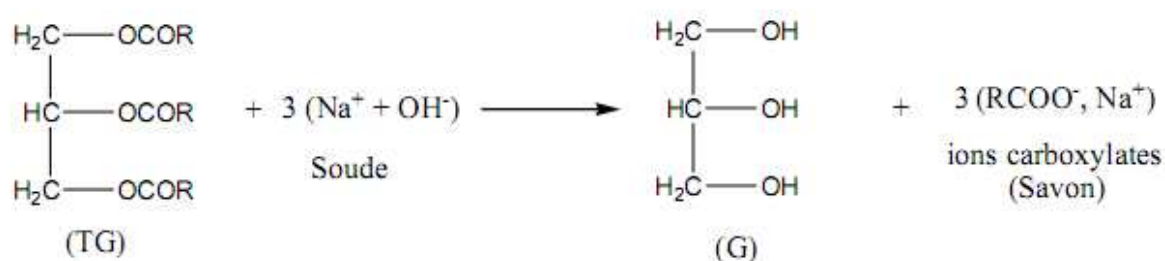


Figure I-10 - Réaction de saponification des triglycérides

En présence d'eau, il y a hydrolyse des triglycérides. Cela entraîne la formation de glycérol et d'acides gras libres. Cette présence d'eau conduit donc à une baisse du rendement de la

réaction due à la formation de savons issus des acides libres formés. Cependant, Ma *et al.* ont montré que la présence d'eau est plus nocif au rendement que celle des acides libres³⁰.

Le fait de stocker certaines huiles peut également entraîner l'hydrolyse des triglycérides et l'huile devient alors acide³¹. A cause de cette acidité, le rendement de la réaction de transestérification catalysé par une base de ce type d'huile est limité à cause de la formation de savons. Dans ce cas, un catalyseur acide est recommandé pour les huiles acides³². Pour résoudre ce problème d'acidité de l'huile, plusieurs études ont été développées. Par exemple, il est possible d'envisager deux réactions, la première étant l'estérification des acides gras libres par un catalyseur acide, tandis que la deuxième est la transestérification des triglycérides par une base³⁰.

iv. La température et le temps de réaction

Ces deux paramètres sont inter-dépendants car la vitesse de réaction est gouvernée par la température du milieu réactionnel. Dans le cas d'une catalyse basique, la réaction de transestérification peut avoir lieu à température d'ébullition de l'alcool et à pression atmosphérique à la condition que l'huile soit très pure. Une huile quelconque peut être transestérifiée mais la température doit être augmentée (240°C) et la pression doit atteindre 9000 kPa. Dans ces conditions, l'estérification des acides gras libres et la transestérification des triglycérides ont lieu simultanément³³. Freedman *et al.* montrent qu'en catalyse basique, 80% de triglycérides sont convertis en une minute quand la température est augmentée². En catalyse acide, la vitesse de réaction est beaucoup moins importante. L'augmentation de la température permet de contourner ce problème de vitesse de réaction. Une étude réalisée par Poré *et al.* a pour conclusion qu'une réaction effectuée à 120°C a pour conséquence une hausse du rendement³⁴.

B. Immobilisation d'enzyme

La catalyse enzymatique, en plein essor grâce à la biocompatibilité et la biodégradabilité, offre un environnement réactionnel optimal d'un point de vue écologique. Toutefois, le prix élevé des enzymes reste un frein au développement de ce type de catalyse. Un moyen de réduire ce coût est de les immobiliser sur des supports afin de pouvoir réutiliser le biocatalyseur.

L'immobilisation des enzymes dans des supports est une méthode qui a pour but d'augmenter le recyclage du biocatalyseur. Cette technique consiste à confiner l'enzyme dans un espace ou dans un réseau en vue de restreindre sa mobilité. Il existe trois catégories d'immobilisation

d'enzyme : l'adsorption sur un support, l'encapsulation dans le support et la réticulation³⁵. Pour immobiliser l'enzyme, on doit considérer son efficacité, le maintien de l'activité de l'enzyme et le taux d'enzyme dans le support. Concernant le choix du support, il doit présenter des propriétés physiques appropriées à la méthode d'immobilisation utilisée telle que la taille et la densité des particules et leur densité, l'hydrophobicité ainsi que la résistance mécanique. Des conditions optimales pour avoir une immobilisation satisfaisante doivent être recherchées.

1. Conditions nécessaires à l'immobilisation

Les propriétés de l'enzyme et du support peuvent être différentes. Il n'existe pas de méthode universelle pour obtenir les conditions optimales à l'immobilisation. L'enzyme, le support et les conditions de la réaction doivent être pris en considération pour obtenir un bioréacteur le plus efficace possible. Hudson *et al.* ont développé une méthodologie d'immobilisation et présenté un schéma illustrant un protocole d'immobilisation sur des matériaux mésoporeux³⁶ (Figure I-11). Mais le questionnement reste le même pour tous les autres supports. La première étape dans la conception d'un biocatalyseur est la sélection de l'enzyme. Chaque enzyme a une fonction spécifique (hydrolase, oxydo-réductase, lyases etc.) et trouve son application pour une réaction définie. Ensuite, il faut connaître les caractéristiques de cette enzyme comme sa taille, sa forme et sa structure. D'autres propriétés sont propres à chaque enzyme, tels que le point isoélectrique ou la nature des acides aminés présents en surface. L'étape suivante est le choix du support d'immobilisation. Il sera sélectionné en fonction de ses caractéristiques texturales, structurales et morphologiques. Dans le cas des matériaux mésoporeux que nous avons utilisés, la taille des pores, le volume poreux sont à considérer ainsi que la nature chimique du matériau (point isoélectrique). Une fois un accord trouvé entre les caractéristiques de l'enzyme et celles du support et la compatibilité vérifiée, l'activité de l'enzyme immobilisée doit être testée. Si le résultat est satisfaisant, le biocatalyseur est réalisé avec succès.

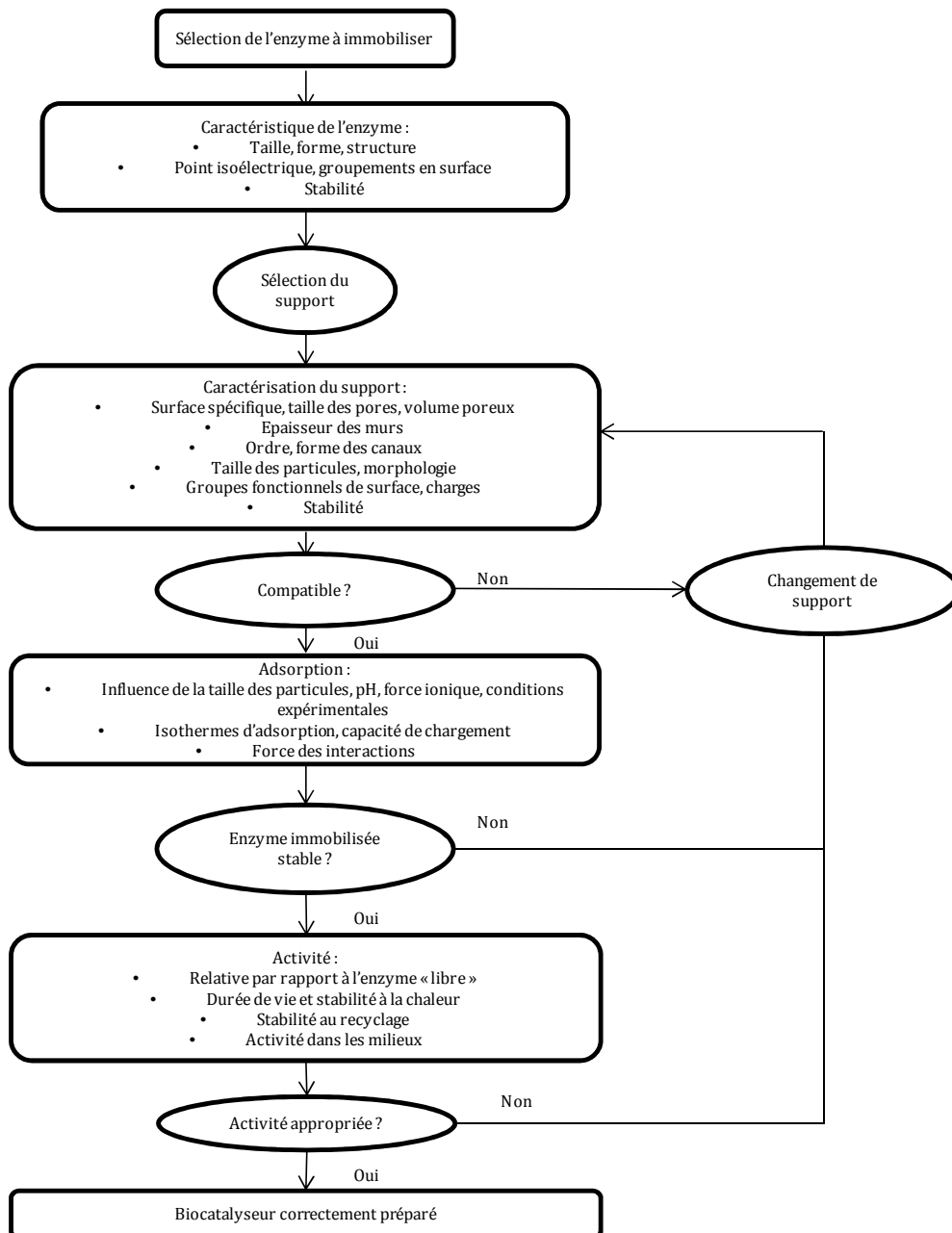


Figure I-11 - Schéma méthodologique d'immobilisation d'enzyme

2. Les différentes méthodes d'immobilisation d'enzyme

Il existe plusieurs types d'immobilisation : l'adsorption, l'encapsulation et la réticulation. Dans l'immobilisation par adsorption, il est possible de lier l'enzyme au support par liaisons physiques ou par liaisons covalentes. Des supports solides sont utilisés pour accueillir l'enzyme comme les silices préparées par voie sol-gel, les verres poreux, les gels polymères naturels ou synthétiques et plus récemment les matériaux mésoporeux silicatés organisés. Cependant, une technique permet de ne pas utiliser de support, c'est la technique dite du "cross-linking" (réticulation). Les enzymes se condensent individuellement entre elles et

forment une grosse particule sous forme d'agrégats grâce à des agents liants, entraînant un couplage des groupes situés aux extrémités de l'enzyme (amines nucléophiles, acides carboxyliques etc.). Ces groupes peuvent aussi être liés au support par des interactions de type physiques (forces électrostatiques, van der Waals, liaisons hydrogène...) ou chimiques (greffage covalent). Pour que ces immobilisations soient efficaces, il est nécessaire que les supports possèdent des groupes de surface comme des hydroxydes (-OH), des groupes carboxyliques (-COOH) ou amines (-NH₂). La Figure I-12 schématise les différentes méthodes d'immobilisation d'une enzyme sur un support.

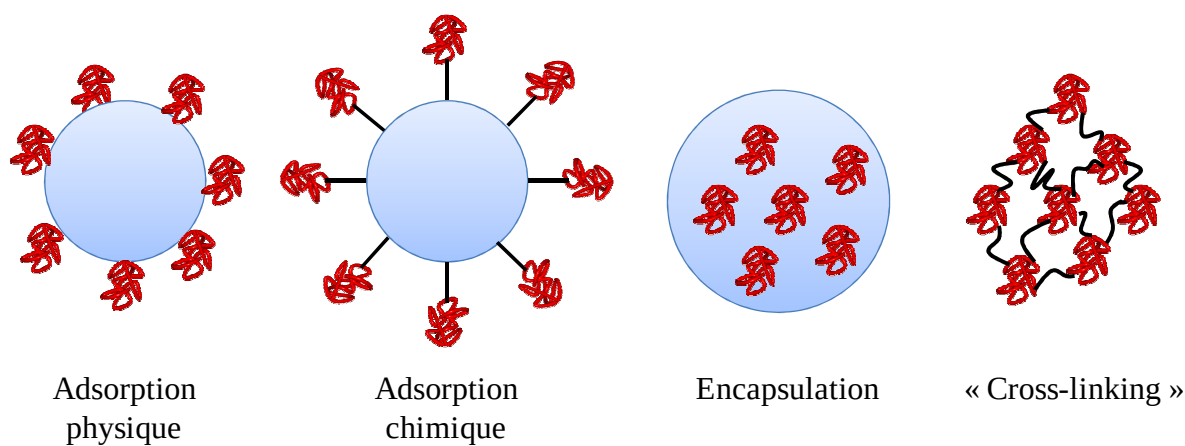


Figure I-12 - Méthodes d'immobilisation

a. Adsorption physique (physisorption)

La méthode consiste à fixer l'enzyme sur le support par liaisons physiques. C'est la technique la plus simple à mettre en œuvre car une simple immersion du support dans la solution enzymatique permet d'obtenir une adsorption via des liaisons hydrogènes ou des interactions faibles comme les forces de van der Waals. Ces interactions sont réversibles et dépendent fortement du point isoélectrique de l'enzyme. Cette méthode, peu coûteuse, dénature peu, voire pas l'enzyme. Toutefois, le fait d'adsorber l'enzyme rend quelques sites actifs inaccessibles, car elle forme soit une multicouche à la surface du support, ou pénètre profondément dans les pores. L'idéal serait d'obtenir une monocouche de molécules d'enzymes adsorbées à la surface du support. Un autre point négatif de cette méthode concerne la désorption de l'enzyme due aux faibles forces d'interaction avec le support. Un changement de température, de concentration ou de force ionique du milieu peut également entraîner la désorption. Serra *et al.* ont réussi à limiter le phénomène de désorption en ajustant le diamètre des pores du support à celui de l'enzyme³⁷. De plus, d'après les travaux de

Takahashi *et al.*, cet ajustement permet d'obtenir une activité enzymatique plus importante que lors d'une immobilisation où le diamètre de l'enzyme ne correspond pas à celui des pores du support⁴⁸. Des traitements post-immobilisation peuvent être également réalisés pour réduire l'ouverture des pores et rendre la surface plus hydrophobe. Toutefois, il a été reporté qu'une modification excessive de l'hydrophobicité de la surface du matériau de type MCM-41 entraîne une adsorption limitée³⁸. Blanco *et al.* ont fonctionnalisé un matériau mésoporeux silicaté par des groupements octyle³⁹ et de cette façon, la lipase *Candida antarctica* est adsorbée sur le support par des interactions hydrophobes. Lors de la procédure d'immobilisation, le matériau a été aspergé d'éthanol. Cet ajout d'éthanol augmente l'hydrophobicité de la surface du support et permet d'une part, d'immobiliser davantage d'enzyme (500 mg/g contre 200 mg/g en absence d'éthanol) et d'autre part, l'activité catalytique est quadruplé.

b. Adsorption chimique (chimisorption)

Une manière de remédier au problème de désorption de l'enzyme est de la lier au support de façon covalente.

Pour que la chimisorption soit efficace, une modification de la surface du support est souvent nécessaire. Pour cela, il existe une grande variété de fonctions permettant le greffage. Par exemple, l'étude de Yiu *et al.* porte sur la fonctionnalisation du matériau SBA-15 (matériau préparé à partir du copolymère triblocs P123) dans le but de lier l'enzyme au support⁴⁰. De cette façon, l'immobilisation est plus efficace et conduit à une possible réutilisation conséquente du catalyseur comme l'ont montré Salis *et al.*⁴¹ La modification de la surface du support a été faite selon deux méthodes : une fonctionnalisation post-synthèse et une fonctionnalisation in-situ par des groupements thiol est prometteur. Cette dernière voie semble être intéressante. Pour ce type d'adsorption, si l'enzyme est immobile au sein du support, une baisse de son activité peut avoir lieu. L'inconvénient majeur de cette méthode concerne la fonctionnalisation du support rendant les conditions de travail plus contraignantes. La modification de la surface du support conduit à une augmentation du coût du biocatalyseur. Les propriétés de l'enzyme peuvent être modifiées lorsqu'elle est adsorbée chimiquement. En effet, la conformation de l'enzyme peut changer en entraînant une baisse de son activité.

c. Encapsulation

Cette technique consiste à inclure l'enzyme dans un réseau de natures diverses (organique, inorganique). La différence entre l'adsorption physique et l'encapsulation n'est pas très claire selon Sheldon *et al.*, car les interactions sont les mêmes à la seule différence qu'en encapsulant l'enzyme, elle ne peut plus se désorber³⁵. Dans le cas d'une adsorption physique, le support est synthétisé avant l'étape d'immobilisation, il est comme "préfabriqué". L'encapsulation d'une enzyme requiert la synthèse du matériau en présence de l'enzyme. Les inconvénients de cette technique sont intrinsèques à la synthèse du support. Des températures élevées peuvent être nécessaires et rendre ainsi l'enzyme inactive. L'utilisation de solvant peut aussi être une raison de la dénaturation de l'enzyme. Galarneau *et al.* ont synthétisé un matériau mésoporeux spongieux dans lequel une enzyme très fragile a été introduite durant la synthèse en ajoutant du lactose pour protéger l'enzyme lors de la formation du réseau⁴². Cette encapsulation dans des matériaux spongieux silicatés conduit à des activités enzymatiques nettement supérieures à celles obtenues pour une méthode d'encapsulation par voie sol-gel. Macario *et al.* ont encapsulé la lipase *Rhizomucor miehei* lors de la synthèse de nanopshères de silice⁴³.

d. Cross-linking (réticulation)

La réticulation consiste à lier les enzymes entre elles par leurs groupes terminaux et par des agents liants. Des agrégats et des cristaux sont ainsi formés et sont appelés respectivement "cross-linking enzyme aggregates" (CLEA) et "cross-linking enzyme crystals" (CLEC). Cette technique offre plusieurs avantages puisque la concentration d'enzyme dans le catalyseur est élevée, l'enzyme est bien protégée et enfin le coût de production dû à l'absence de support devrait être faible.

Il n'existe pas de méthode d'immobilisation idéale. Le choix de la technique dépend de l'enzyme utilisée, du support et de l'objectif de l'immobilisation. Le couplage de plusieurs méthodes d'immobilisation peut donner lieu à de meilleurs résultats. Par exemple, Kim *et al.* ont ajouté des enzymes réticulées dans une matrice mésoporeuse silicatée⁴⁴. Cela a permis de maintenir l'activité du catalyseur jusqu'à 6 jours à 100% alors que pour une enzyme uniquement adsorbée, son activité est quasi nulle au bout de 6 jours.

3. Matériaux utilisés comme support d'enzyme

Les propriétés de l'enzyme immobilisée sur un support sont gouvernées par les propriétés de l'enzyme mais également par celles du support. Parmi les supports couramment utilisés, on retrouve des polymères synthétiques organiques, des biopolymères et des supports inorganiques type silice poreuse.

a. Les polymères synthétiques organiques

Diverses résines acryliques sont utilisées comme support pour immobiliser des enzymes par physisorption. Par exemple, la lipase *Candida antarctica* adsorbée sur une résine acrylique macroporeuse est commercialisée sous le nom de Novozym 435. Cependant, le problème du relargage de l'enzyme dans le milieu réactionnel reste toujours présent. Cette désorption peut être évitée en liant de manière covalente l'enzyme à la résine. Pour cela, la surface du polymère doit être fonctionnalisée et le copolymère Eupergit® C est l'un d'entre eux, souvent utilisé. L'avantage de ce polymère est qu'il possède en surface une forte densité de groupements oxydes d'éthylène offrant de nombreux points d'accroche à l'enzyme. Grâce aux liaisons covalentes, Kallenberg *et al.* ont réalisé plus de 800 cycles en conservant 60% de l'activité initiale de l'enzyme⁴⁵.

b. Les polymères naturels

Les biopolymères peuvent également servir de support pour l'immobilisation d'enzyme. La cellulose et autres polysaccharides dans lesquels l'enzyme est adsorbée chimiquement sont utilisés dans des réactions en flux continue. Par exemple, pour produire des acides L-aminés par le procédé Tanabe, une cellulose modifiée sur laquelle est fixée une enzyme est employée depuis plus de 40 ans⁴⁶.

c. Les supports inorganiques

Plusieurs familles de matériaux peuvent être choisies comme support, tel que les silices, les zéolithes et les matériaux mésoporeux silicatés. Les silices mésoporeuses les plus rencontrés pour l'adsorption d'enzyme sont les matériaux SBA-15 et les MCM-41. Ces matériaux offrent des caractéristiques intéressantes. Ils possèdent des pores d'un diamètre uniforme, une très grande surface spécifique et un volume poreux important. Ils sont également inertes et stables à température élevée. De plus, leur surface peut être fonctionnalisée facilement.

Cependant, la physisorption est la technique d'immobilisation la plus répandue, car très simple, pour ce type de support. Mais la faible stabilité opérationnelle (au cours de la réaction)

conduit à la chimisorption de l'enzyme. Cela est possible en modifiant la surface du matériau par des groupements fonctionnels comme les hydrocarbures aliphatiques, les groupements thiols, vinyliques etc. Les groupements amine sont souvent utilisés pour coupler l'enzyme à la surface.

d. Microémulsions inverses

Les matériaux présentés jusqu'à présent peuvent être qualifiés de « supports conventionnels ». Des études montrent qu'il est également possible d'immobiliser des lipases dans des microémulsions inverses E/H. Les travaux de Xenakis *et al.* ont montré que l'activité catalytique de la lipase *Mucor miehei* est maintenue lorsque cette dernière est encapsulée dans une microémulsion inverse dont le milieu continu est l'hexane, le propanol jouant le rôle de tensioactif. En terme de stabilité, l'activité de la lipase *Mucor miehei* encapsulée dans une telle microémulsion est conservée à hauteur de 80% après 20 jours d'incubation⁴⁷. Les microémulsions peuvent également être préparées à partir de tensioactifs plus conventionnels et cette même équipe grecque a utilisé le dioctyl sulfosuccinate de sodium (AOT) ou de la lécithine en présence de biopolymères naturels comme l'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC) pour formuler des microémulsions inverses⁴⁸. Ces systèmes sont formulés dans la plupart des solvants apolaires, à l'exception de l'acétone et sont utilisables dans des conditions douces dans des réactions de synthèse en milieu organique non polaire ou relativement peu polaire. Les résultats montrent que l'activité catalytique est maintenue pendant 6 expériences consécutives. On note également que l'activité de la lipase encapsulée dans une microémulsion préparée à partir de lécithine est supérieure à celle préparée à partir d'AOT. De plus, les performances de l'enzyme sont améliorées en fonction de la teneur en eau dans le cœur de la microémulsion inverse⁴⁹. D'autre part, le rapport eau/AOT peut influencer l'activité de la lipase. Il a été montré qu'avec les lipases *P. simplicissimum*, et des lipases *R.delemar* et *R. arrhizus*, l'activité maximale est obtenue pour des rapports 6 et 9.

e. Matériaux mésoporeux

Les propriétés des matériaux mésoporeux influencent l'immobilisation de l'enzyme. Un bon accord entre les propriétés du support et celles de l'enzyme conduisent à un taux d'adsorption optimal. Zhou et Hartmann ont développé dans leur publication les différents facteurs jouant un rôle dans l'immobilisation d'enzyme sur des matériaux mésoporeux⁵⁰.

i. Effet de la taille des pores sur l'immobilisation

Les premières études d'adsorption d'enzyme ont été réalisées sur des matériaux mésoporeux MCM-41 ayant des diamètres de pores de 4 nm. La quantité d'enzyme adsorbée était très faible (moins de 1 mg/g de MCM-41). La synthèse de matériaux ayant de plus grand pores a généré plus d'intérêt pour l'étude de l'immobilisation d'enzyme. Dans ces travaux, Takahashi *et al.* ont montré la dépendance de la taille des pores sur l'adsorption d'enzyme⁵¹. Pour cela, les auteurs ont synthétisé des matériaux FSM-16 (de 2,7 à 8,9 nm), des matériaux MCM-41 (de 5,0 à 6,6 nm) et des matériaux SBA-15 (de 5,0 à 9,2 nm) dans lesquels une physisorption de peroxydase (*Horseradish peroxidase*) a été réalisée. Il en résulte que les taux d'adsorption les plus élevés ont été observés sur les matériaux ayant des pores d'une taille supérieure à 5 nm. Pour les matériaux bénéficiant d'un diamètre poreux inférieur, l'enzyme s'adsorbe sur la surface externe du support. Cela est également lié à la taille de l'enzyme. L'accord entre la taille de l'enzyme et celle des pores du support est important car il a été remarqué qu'une augmentation de l'activité enzymatique est détectée lorsque la taille des pores du matériau correspond à celle du support. De manière générale, les matériaux mésoporeux organisés présentant des pores d'un diamètre inférieur à 5 nm possèdent une capacité limitée d'adsorption d'une enzyme de masse moléculaire de 40 000 Da et plus. Des supports possédant des pores du même ordre de grandeur que l'enzyme présentent un faible taux de relargage.

ii. Effet de la structure et de la morphologie sur l'immobilisation

Les matériaux mésoporeux organisés sont caractérisés en plus de leur porosité, par une organisation des pores. Les matériaux MCM-41 et SBA-15 ont une structure des pores unidimensionnelle due à leur organisation hexagonale. Dans ce type de structure, la diffusion de l'enzyme dans les pores peut être limitée si les pores sont bouchés. Ce n'est pas le cas des matériaux SBA-15 et MCM-48 qui ont une structure tridimensionnelle où les pores sont interconnectés. La diffusion de l'enzyme peut ainsi avoir lieu plus facilement. Balkus *et al.* ont démontré l'influence de la structure des matériaux SBA-15⁵², MCM-48 et MCM-41⁵³ sur l'adsorption de cytochrome c. L'adsorption maximale a été observée lors de l'utilisation du matériau MCM-48 comme support. Cela est dû à sa structure des pores interconnectés et à sa surface spécifique, supérieure à celle des autres matériaux. La morphologie du support est un paramètre jouant un rôle clé dans l'immobilisation. Une étude comparative a été réalisée par Fan *et al.*⁵⁴. Ils ont adsorbé du lysozyme sur le matériau SBA-15 sous différentes formes, tubulaire et conventionnelle. Les résultats montrent une adsorption plus importante du

lysozyme sur le matériau SBA-15 sous forme tubulaire en comparaison avec le matériau SBA-15 conventionnel. Yang *et al.* ont modifié morphologiquement des matériaux mésoporeux et ont immobilisé du lysozyme dedans. La capacité d'adsorption des matériaux dépend fortement de la morphologie⁵⁵. D'après Yang *et al.*, les matériaux mésoporeux comportant des sphères creuses sont des supports pouvant adsorber une plus grande quantité de molécules biologiques.

iii. Effet des propriétés de surface sur l'immobilisation

Les matériaux mésoporeux peuvent être préparés à partir de différents molécules servant d'emprunts. Selon la nature et la composition chimique de ces tensioactifs, les propriétés de surface des matériaux sont modifiées. L'équipe de Takahashi ont comparé dans leurs travaux l'effet de la nature des tensioactifs utilisés pour la synthèse de matériaux sur l'immobilisation⁵¹. Ils ont conclu que les matériaux préparés à partir de tensioactifs cationiques (MCM-41 et FSM-16) adsorbent plus que le matériau SBA-15 préparé à partir de tensioactifs non-ioniques (P123). Cela est expliqué par les charges portées par la surface du matériau. En effet, la surface du matériau MCM-41 est plus chargée négativement que le matériau SBA-15. Le point isoélectrique de l'enzyme est une valeur importante dans l'étude de son immobilisation. Par conséquent, le pH de la solution dans laquelle a lieu l'immobilisation a une forte influence sur l'adsorption de biomolécules sur les supports par l'intermédiaire des forces électrostatiques.

Un autre moyen de modifier les propriétés de surface des supports est de remplacer dans le réseau quelques éléments de silice par des éléments inorganiques comme l'aluminium ou le titane entre autres. Vinu *et al.* ont réalisé cette étude en incorporant de l'aluminium dans des matériaux SBA-15 et MCM-41 dans lesquels le lysozyme est adsorbé⁵⁶. Les résultats montrent que le taux d'adsorption de lysozyme est plus important dans les supports modifiés que dans les supports « purs ». Les sites d'aluminium chargés négativement et les charges positives des acides aminés de surface du lysozyme entraînent une interaction forte, ce qui explique cette adsorption élevée. Il est également possible d'introduire, à la place des éléments inorganiques, des groupements organiques dans lesquels on retrouve des amines, acides carboxyliques, des thiols, phényles etc. Les matériaux modifiés par ces composés organiques sont utilisés comme support pour une adsorption chimique de l'enzyme. Yiu *et al.* ont fonctionnalisé le matériau SBA-15 avec différents composés tels que les thiols, les amines, les acides carboxyliques et les phényles. Une adsorption de trypsine a été effectuée sur ces matériaux⁶. Le support fonctionnalisé avec les phényles a un taux d'adsorption plus faible que

les autres matériaux. Cela prouve que la force d'interaction entre l'enzyme et le support modifié dépend du groupement ajouté. Par contre, la plus grande stabilité a été observée avec la modification par le groupement thiol par l'intermédiaire d'une fonctionnalisation in situ. Les liaisons -S-S- de la surface de la trypsine et les groupements thiol du support sont responsables de cette stabilité grâce à leur interaction. On retrouve également une activité importante de la trypsine (84% de l'activité initiale). La fonctionnalisation par une amine montre des effets négatifs sur l'enzyme et son activité.

4. Les différents matériaux utilisés comme support pour l'immobilisation de la lipase *Mucor miehei* dans le cadre de la synthèse du biodiesel

La réaction de transestérification d'une huile végétale catalysée par une enzyme est un procédé connu. La lipase *Mucor miehei* est parfaitement adaptée à cette application. L'un des avantages principaux de la catalyse enzymatique est la réutilisation du bioréacteur, formé d'une lipase et d'un support. Différentes études ont été réalisées sur la synthèse du biodiesel catalysée par la lipase *Mucor miehei*, adsorbée sur plusieurs supports. Par exemple, Rodrigues *et al.* ont fait réagir plusieurs huiles avec différents alcools, le tout catalysée par la lipase *Mucor miehei* immobilisée sur une résine échangeuse d'ions⁵⁷. Après 6 heures de réaction à 30°C, avec un rapport molaire alcool/huile égal à 7,5, 4% d'eau et 15% d'enzyme, les résultats montrent un meilleur taux de conversion pour la réaction réalisée avec l'huile de son de riz et butanol (environ 55%). Dans les mêmes conditions, les réactions avec les autres huiles donnent des rendements de 40% pour l'huile de soja et de 30% pour l'huile de tournesol. Par contre, l'effet de l'alcool sur la réaction est la même quelle que soit l'huile choisie, c'est-à-dire les meilleurs rendements sont obtenues avec le butanol et le propanol. Les réactions avec le méthanol et l'éthanol ont un taux de conversion nettement inférieur aux autres alcools. Les auteurs ont aussi montré l'influence du solvant de lavage sur l'activité du catalyseur. En effet, la lipase *Mucor miehei* immobilisée sur sa résine échangeuse d'ions conserve 75% de son activité après 7 utilisations avec un lavage à l'hexane, contrairement à un catalyseur non-lavé qui voit son activité chuter à 25%. Calabro *et al.* ont étudié la cinétique de la réaction de transestérification de l'huile de palme⁵⁸. Dans ces travaux, la lipase *Mucor miehei* est toujours immobilisée sur une résine échangeuse d'ions. Le but de cette étude est d'optimiser les conditions de réaction, mais aussi de déterminer et modéliser les aspects cinétiques de cette réaction afin de prévoir l'utilisation de ce type de catalyseur. L'optimisation de la réaction de transestérification étant un aspect important, Rodrigues *et al.*

ont également effectué cette mise au point sur une huile de soja à l'aide d'un plan d'expérience⁵⁹. Le biocatalyseur utilisé est un mélange de deux lipases, la lipase *Mucor miehei* et la lipase *Thermomyces lanugosus*. Les résultats de cette étude montrent que la combinaison des deux lipases donne un taux de conversion supérieur à celui des deux lipases utilisés séparément. Les auteurs expliquent cela par une hypothétique différence de spécificité des lipases pour les acides gras de l'huile de soja. Macario *et al.* ont encapsulé la lipase dans une nanosphère hybride composé d'une matrice silicaté poreuse et d'un liposome⁶⁰. Ce type de matériau présente l'avantage d'être réutilisable plus de 7 fois et d'être stable. Les auteurs ont calculé la productivité (mg de produit/(mg d'enzyme.heure)) de ce biocatalyseur. Ils montrent qu'après cinq cycles, la lipase *Mucor miehei* immobilisée est plus productive que la lipase libre. Rodrigues *et al.* ont répertorié les différents supports sur lesquels la lipase *Mucor miehei* est immobilisée et utilisés dans le domaine de la biocatalyse industrielle comme par exemple, des membranes en nylon⁶¹. Une technique permettant d'éviter d'avoir des supports est l'immobilisation sur des particules issues de la biomasse. Il est aussi possible d'encapsuler cette lipase dans une émulsion, servant de matrice. Cette émulsion peut être composée d'organogels ou de gels. Des supports en cellulose peuvent recevoir l'enzyme. Rodrigues *et al.* évoquent également la possibilité d'immobiliser la lipase sur des fibres de cellulose acétate-TiO₂.

A coté de ces matériaux, les silices poreuses organisées sont de très bons candidats pour l'immobilisation d'enzyme étant données leur grande surface spécifique, ainsi que leur porosité définie.

C. Matrices poreuses

Deux types de matrices peuvent être utilisés comme matrice pour l'immobilisation de la lipase *Mucor miehei*, les matériaux mésoporeux organisés et les matériaux à porosité hiérarchisée.

1. Les matériaux mésoporeux

Les matériaux mésoporeux ont été découverts en 1992 par des chercheurs de la société Mobil Oil Company⁶². Les canaux poreux constituant ces matériaux sont organisés selon une structuration hexagonale, cubique ou lamellaire. La surface spécifique est élevée, de l'ordre de 1000 m²/g dans le cas de matériaux silicatés, la distribution de la taille des pores homogène est comprise entre 2 et 50 nm selon les conditions de synthèse et le volume poreux est également important. Préparés à partir de systèmes moléculaires organisés, leur synthèse

basée sur le procédé sol-gel peut être réalisée selon deux voies, le mécanisme transcriptif LCT (pour *Liquid Crystal Templating*) et le mécanisme d'auto-assemblage coopératif CTM (pour *Cooperative Templating Mechanism*). Ce dernier a lieu lorsque la source inorganique est placée dans une solution micellaire. La taille des pores est gouvernée par la taille des micelles qui peuvent être gonflées par des composés *ad'hoc*. Trois structures silicatées appelées MCM (Mobil Crystalline Materials) ont été préparées à partir de micelles de CTABr en changeant les quantités d'espèces inorganiques. Les canaux des matériaux MCM-41 sont arrangés selon une symétrie hexagonale, les MCM-48 selon une organisation cubique Ia3d et les MCM-50 selon un arrangement lamellaire. Ces matériaux font partie de la famille des M41S (Figure I-13).

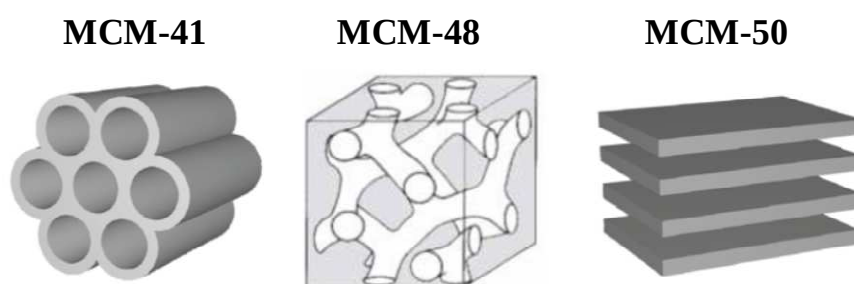


Figure I-13 - Représentation des matériaux de la famille des M41S

De nombreuses études ont été développées suite à ces premiers travaux. Par exemple, Huo *et al.* ont préparé en milieu basique et acide des matériaux mésoporeux à partir de tensioactifs ioniques⁶³. Les tensioactifs non ioniques servant d'agent structurant ont également été utilisés pour synthétiser des matériaux mésoporeux. Pinnavaia a réalisé une étude complète pour la synthèse de tels matériaux préparés à partir de tensioactifs polyoxyéthylés^{64,65}.

a. Procédé sol-gel

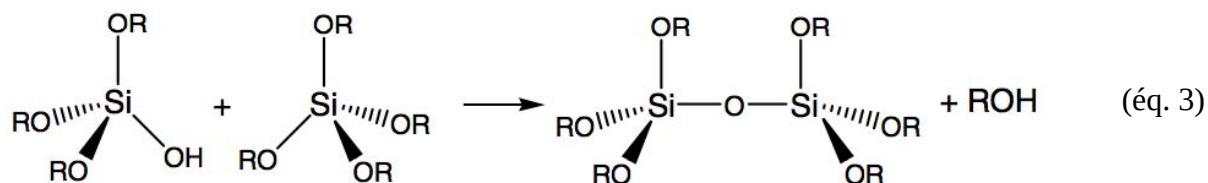
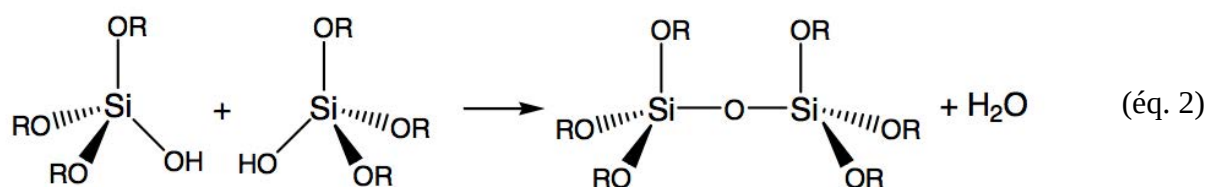
Le procédé sol-gel a été découvert par Ebelmen en 1846⁶⁶ et utilisé pour l'élaboration de matériaux mésoporeux préparés à partir de systèmes moléculaires organisés. Brinker *et al.* ont décrit en 1990 dans une revue détaillée cette méthode qui permet de préparer des matériaux vitreux sans atteindre des températures élevées⁶⁷. Ce procédé permet de synthétiser des matériaux mésoporeux à partir de systèmes moléculaires organisés. Un précurseur inorganique est (co-)polymérisé ou (co-)condensé dans une solution à une température variant entre 20 et 150°C.

Les précurseurs sont de type alkoxysilane Si(OR)_4 où R est un groupement organique $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ et les plus souvent utilisés sont le TEOS ($\text{Si(OC}_2\text{H}_5)_4$) et le TMOS ($\text{Si(OCH}_3)_4$). La première

étape du procédé sol-gel est l'hydrolyse des groupements alkoxy (éq. 1) en groupements silanol (Si-OH) et produit l'alcool correspondant (R-OH).



La condensation constitue la deuxième étape entraînant la gélification du système. La création de ponts siloxanes Si-O-Si conduit à la formation du réseau. Ce mécanisme se produit simultanément par condensation de deux groupements silanols en libérant une molécule d'eau (éq. 2) et par condensation entre un groupement silanol et un groupement alkoxy non-hydrolysé en libérant une molécule d'alcool (éq. 3).



Cette étape de condensation intervient généralement avant la fin de l'étape d'hydrolyse. Le réseau ainsi formé est un enchaînement de tétraèdres (SiO_4^{4-}) au centre duquel se trouve l'atome de silicium. Ces réactions de polymérisation entraînent la formation de clusters de silice qui s'agrégent entre eux. Ces amas, de petite taille, constituent une suspension colloïdale appelée **sol**. Un gel est alors formé lorsque ces particules se lient entre elles pour donner un réseau tridimensionnel interconnecté rendant le milieu visqueux. La taille des particules ainsi que leur agrégation dépendent de la compétition entre les réactions d'hydrolyse et de condensation, cette dernière déterminant la morphologie du matériau final. Ces propriétés structurales dépendent des vitesses des réactions, qui elles mêmes sont fonction du pH et de la salinité de la solution. Un vieillissement du composé peut ensuite être effectué au cours duquel la polycondensation des particules colloïdales continue. Des réactions de solubilisation et reprecipitation ont alors lieu et conduisent à une augmentation de l'épaisseur des parois du matériau, lequel devient plus stable mais au dépend de sa porosité. Un traitement

hydrothermal est ensuite généralement effectué permettant une condensation plus complète des silanols résiduels en augmentant la solidité du matériau.

b. Mécanisme d'auto-assemblage coopératif CTM

Ce mécanisme est fondé sur l'auto-assemblage des micelles et des précurseurs inorganiques conduisant à une organisation du système (Figure I-14). Le précurseur de silice polymérise autour de micelles de tensioactifs dans l'eau.

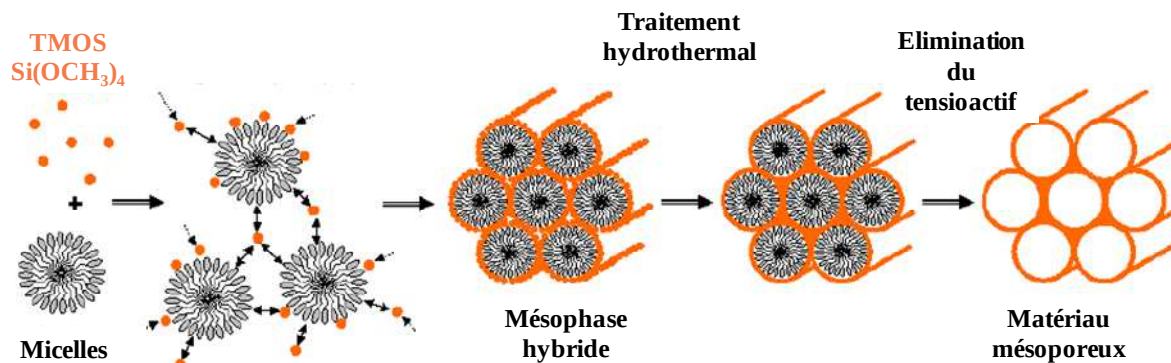


Figure I-14 - Mécanisme de formation CTM

L'étape initiale est la polymérisation intramicellaire. Les têtes polaires des tensioactifs interagissent avec le précurseur par liaisons hydrogènes ou électrostatiques en fonction de la nature du tensioactif. Durant cette étape, les têtes polaires des micelles sont recouvertes par le précurseur. Ensuite, il y a une condensation intermicellaire. Au cours de cette étape, les micelles recouvertes de silice s'associent entre elles pour former une mésophase hybride. La condensation de la matrice inorganique est achevée grâce à un traitement hydrothermal. L'étape finale est l'élimination du tensioactif, soit par calcination, soit par extraction à l'éthanol si le tensioactif est non ionique.

c. Mécanisme transcriptif LCT

Les cristaux liquides peuvent être utilisés comme empreinte pour la préparation de matériaux mésoporeux. Pour la première fois, Attard *et al.* en 1995⁶⁸ ont de cette façon synthétisé des silices mésostructurées à partir de tensioactifs hydrogénés non ioniques.

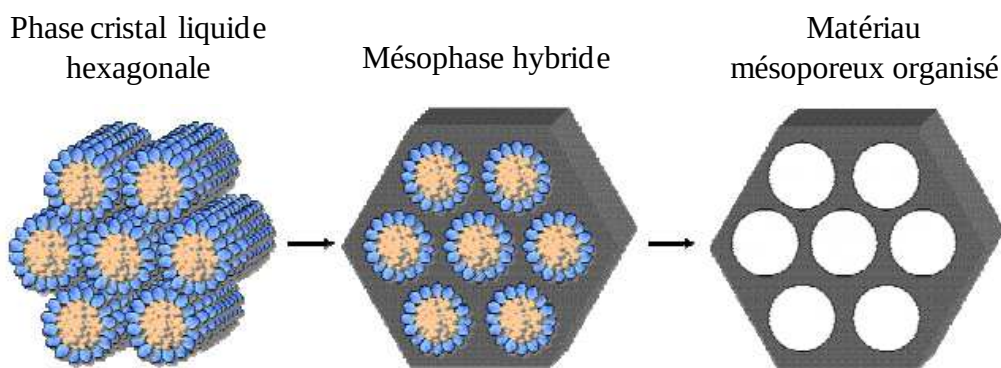


Figure I-15 - Mécanisme transcriptif LCT

En présence d'une phase cristal liquide hexagonale, le précurseur inorganique polymérise autour des cylindres de tensioactif, ce qui conduit à la formation d'une mésophase hybride. Les étapes suivantes sont identiques à celles du mécanisme CTM. L'avantage du mécanisme LCT est sa modularité en termes de structures grâce à l'utilisation de différents types de cristaux liquides. De plus, pour l'élaboration d'oxydes non silicatés, ce mécanisme est mieux adapté car leurs précurseurs correspondants sont souvent très réactifs.

d. Interactions tensioactif-précurseur

Les interactions à l'interface organique/inorganique gouvernent la formation de la phase hybride. Les interactions présentes dans la mésophase hybride sont dépendantes de la nature du tensioactif. Pour les tensioactifs ioniques, les interactions électrostatiques peuvent être de type direct (S^+I^- ou S^-I^+). Cependant, si le tensioactif et le précurseur portent la même charge, des espèces supplémentaires, telles que des contre ions (X) peuvent être solubilisées dans le milieu aqueux⁶⁹. Ces interactions sont alors de type indirecte S^+XI^- ou S^-XI^+ . Dans le cas des tensioactifs non ioniques, ce sont les liaisons hydrogènes qui génèrent la mésophase hybride, les interactions sont de type S^0I^0 . L'utilisation d'un tensioactif non ionique présente l'avantage de s'éliminer facilement car les interactions entre les têtes polaires du tensioactif et le matériau sont faibles. Le Tableau I-2 présente des exemples de matériaux formés à partir de différents types d'interactions.

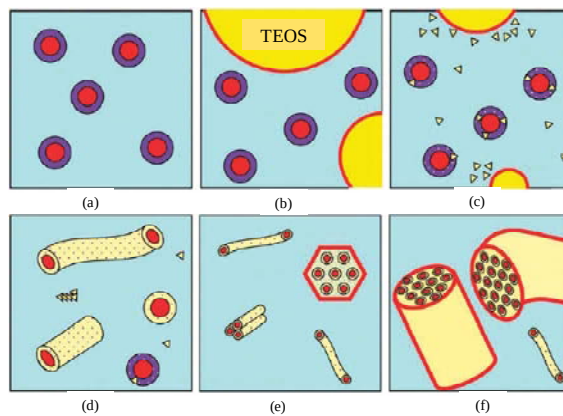
Tableau I-2 - Différentes voies de synthèses de matériaux mésoporeux

Type de tensioactifs	Interaction	Conditions		Exemples
		pH	TA utilisé	
Ioniques	Electrostatique directe	Basique	CTMABr	MCM-41 (hex) MCM-48 (cub) MCM-50 (lam)
	Electrostatique indirecte	Neutre basique	Sulfates Phosphates	Oxydes de Mg, Al Fe, Pb (lam), de Sn et Ti (hex)
Non ioniques	Liaisons hydrogènes	Acide	CTMABr	SBA-1 (cub), SBA-2 (hex), SBA-3 (Hex)
		Basique	Phosphates	Oxyde de Zn (lam) Alumine (lam)
Non ioniques	Liaisons hydrogènes	Neutre	Amine primaire	HMS
		Acide	$C_m(EO)_nOH$	MSU, CMI
Non ioniques	Liaisons hydrogènes	Très acide	$C_m(EO)_nOH$	SBA-11 (cub) SBA-12 (hex)
			Pluronic	SBA-15 (hex), SBA-16 (cub)
			Esters de sucres	Analogues des SBA-11 (cub)

e. Matériaux SBA-15

Les matériaux SBA-15 sont préparés à partir du copolymère à blocs Pluronic P123 de formule $HO(CH_2CH_2O)_{20}(CH_2CH(CH_3)O)_{70}(CH_2CH_2O)_{20}H$ $[(EO)_{20}(PO)_{70}(EO)_{20}]$, de masse molaire 5800 g/mol et selon le mécanisme d'auto-assemblage CTM⁷⁰⁻⁷¹. Les sources de silices utilisées sont le TEOS (tetraethyl orthosilicate) ou le TMOS (tetramethyl orthosilicate).

La formation du matériau SBA-15 a été étudié *in situ* par SANS et SAXS⁷². La cinétique de formation du matériau a été examinée dans des solutions acides de nature différentes (HNO_3 , HBr , HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4)⁷³. La présence d'anions tels que $H_3PO_4^-$ ou SO_4^{2-} conduit à un matériau mieux organisé qu'un matériau préparé en présence d'anions Br^- ⁷¹.

Figure I-16 - Mécanisme de formation du matériau SBA-15⁷⁴

En termes de cinétique, l'analyse des expériences SANS in situ effectuées par Zholobenko *et al.*⁷² permet de comprendre la formation de la mésophase hybride pendant les 90 premières minutes de la synthèse du matériau SBA-15. Le mécanisme de formation proposé par Manet *et al.*⁷⁴ (Figure I-16) est composé de 6 étapes. Premièrement, le tensioactif P123 en solution aqueuse forme des micelles sphériques (a). Ensuite, la source de silice est ajoutée (b). Les résultats montrent que durant les 5 premières minutes, les micelles restent sphériques, l'hydrolyse du précurseur de la silice commence (c). Ensuite, entre 5 et 20 minutes, une transition où les micelles sphériques deviennent cylindriques est observée (d). Durant cette transformation, la mésophase hybride est obtenue par interaction des groupements EO avec les espèces silicatées produits durant l'hydrolyse du précurseur de silice. La cinquième étape débute après 20-25 minutes lorsque les micelles hybrides commencent à se compacter pour former un début de phase hexagonale 2D qui précipite (e). Cette phase hexagonale 2D grossit et devient majoritaire (f) par augmentation des forces de van der Waals entre les cœurs hydrophobes des micelles. La condensation de la silice continue et permet de former les murs séparant les micelles⁷⁵. Lors de la synthèse d'un matériau SBA-15, la condensation de la silice continue durant l'étape de vieillissement de la silice à 40°C et dure approximativement 20 heures. Le traitement hydrothermal à haute température (100°C) et la calcination (550°C) permettent de compléter l'étape de condensation en densifiant la structure du matériau. Cela a pour conséquence de diminuer le paramètre de maille et d'augmenter la taille des pores ainsi que la stabilité hydrothermale du matériau.

f. Matériaux mésoporeux préparés à partir de tensioactifs fluorés

Les tensioactifs fluorés ont des propriétés différentes de leurs analogues hydrogénés, telle qu'une meilleure stabilité thermique. Ces propriétés sont dues à l'atome de fluor qui est l'élément chimique le plus électronégatif. Les chaînes fluorées sont plus volumineuses et plus rigides que les chaînes hydrogénées car les groupements CF_2 et CF_3 sont plus volumineux que les groupements CH_2 et CH_3 (respectivement 38 et 92 Å³, 27 et 54 Å³). La différence d'énergie de liaisons C-F (485 kJ/mol) et C-H (425 kJ/mol) confère aux fluorocarbures une meilleure stabilité chimique et thermique.

Le premier matériau mésoporeux organisé a été synthétisé en 2004 au laboratoire à partir d'une solution micellaire de $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{C}_2\text{H}_4(\text{OC}_2\text{H}_4)_9\text{OH}$ ⁷⁶. En comparaison avec les matériaux préparés avec l'analogue hydrogéné ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{EO})_{10}$) et en tenant compte de la différence d'hydrophobie (1 CF_2 = 1,7 CH_2), un plus haut degré de structuration a été observé pour le matériau synthétisé avec le tensioactif fluoré. La perfluorodécane ($\text{C}_{10}\text{F}_{18}$) a été utilisé pour

moduler la taille des pores dans ce système⁷⁷. La solubilisation de la perfluorodécaline est très limitée dans ces micelles (environ 1%) mais permet d'obtenir des pores de taille plus conséquente (4 à 6 nm). Cet effet a été expliqué par le gonflement de la phase hybride en relation avec la solubilisation du fluorocarbure dans la phase hexagonale cristal liquide (Figure I-17).

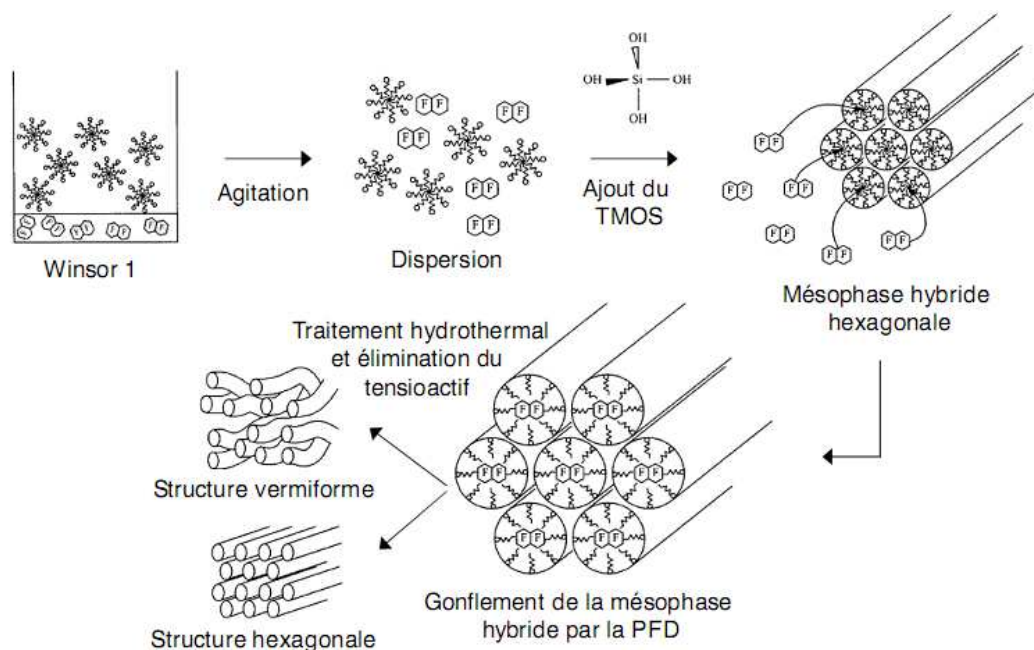


Figure I-17 - Mécanisme de gonflement de la phase hybride⁷⁴

Il est également possible d'utiliser des systèmes mixtes fluorés et hydrogénés pour améliorer la résistance hydrothermal du matériau. Des matériaux ont été obtenus à partir de micelles de tensioactifs hydrogénés en ajoutant un tensioactif fluoré ionique à une solution de P123. Le groupe de Xiao a obtenu ainsi après un traitement hydrothermal à 220°C un matériau plus stable du point de vue hydrothermal que les matériaux SBA-15 classiques⁷⁸. Rankin *et al.* ont également utilisé des tensioactifs fluorés ioniques pour synthétiser des matériaux mésoporeux ayant des pores de faibles diamètres⁷⁹. Cette diminution de la taille des pores est due à l'utilisation de tensioactifs à chaînes plus courtes comparée aux tensioactifs hydrogénés, puisque l'hydrophobicité des groupements CF est plus grande que l'hydrophobicité d'un groupement CH. Ces micelles fluorées sont donc plus petites que celle formées avec un tensioactif hydrogéné. Le groupe de Xiao a préparé des matériaux mésoporeux à très basse température (entre -20 et 0°C) avec un tensioactif fluoré. Les pores sont de 1,3 nm et la structure est hexagonale⁸⁰.

2. Les matériaux à porosité hiérarchisée

Les matériaux à porosité hiérarchisée sont des matériaux présentant deux tailles de pores distinctes. Cela permet, entre autres, d'améliorer le processus de diffusion des réactifs et des produits⁸¹. Les matériaux à porosité hiérarchisée offrent grâce à leur texture des applications potentiellement intéressantes. Plusieurs méthodes sont possibles pour obtenir ce type de support. Par exemple, Yun *et al.* ont ajouté des billes de polystyrène à une solution micellaire de P123⁸². Ces billes servent donc d'empreinte pour créer des macropores. L'élimination des billes de polystyrène a été effectuée par calcination à 550°C pendant 5 heures. D'autres chercheurs ont utilisé des billes de nature différente. Stein *et al.* ont incorporé des billes de latex au système⁸³, ou encore le groupe de Zhang a utilisé des billes de silice⁸⁴. En 2003, Tiddy *et al.* ont synthétisé un matériau poreux silicaté dont le diamètre des pores s'étend sur trois ordres de grandeur à partir de billes de latex synthétiques⁸⁵. Sun *et al.* ont synthétisé un monolithe silicaté à porosité hiérarchisée dont les macropores d'une taille moyenne de 1 µm sont obtenus à partir de microsphères de polymère (TMSPM, 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate) et ils sont structurés selon une symétrie cubique face centrée. Les mésopores sont synthétisés à partir de micelles P123 et leur diamètre varie entre 3,6 et 4,7 nm⁸⁶. Les matériaux macroporeux peuvent également être obtenus à partir d'une émulsion. En effet, Carn *et al.* ont utilisé une émulsion concentrée dont le milieu continu contient des micelles et pour obtenir un monolithe inorganique présentant des mésopores et des macropores⁸⁷. Dans ces matériaux, les macropores sont interconnectés et il n'y a pas de structure. La taille des mésopores varie entre 1,2 et 4,0 nm.

Les matériaux méso-macroporeux peuvent également être obtenus à partir de nanoparticules solides lipidiques. Ces nanoparticules (SLN, "solid lipid nanoparticles") sont des dispersions solides de particules constituées d'un ou plusieurs lipides stabilisées par une couche de tensioactifs. Ces systèmes sont généralement biocompatibles, biodégradables et biorésorbables, ce qui leur confère des potentialités d'applications dans le domaine biomédical, notamment comme transporteur de principes actifs. En effet, l'intérêt majeur de ces systèmes est leur capacité d'encapsulation associée à une libération retardée de principes actifs hydrophobes ou hydrophiles. Ce type de vecteurs peut remplacer dans certains cas ceux communément utilisés à ce jour comme les émulsions, les liposomes ou les polymères. Les SLN peuvent être produites selon différentes méthodes telles que l'homogénéisation à haute pression (méthode industrielle), l'émulsification ou encore par évaporation du solvant^{88,89,90}. Les premiers brevets sur leur production ont été déposés en 1993 et 1996^{91,92}.

Tout comme les émulsions, les SLN ont été utilisées pour la préparation de matériaux hiérarchisés, méso-macroporeux, mais conduisent à des macropores de taille inférieure au micron^{93,94}. La préparation des matériaux silicatés à partir de SLN est semblable à celle obtenue à partir des émulsions. En effet, le milieu continu aqueux des SLN contient des micelles et permettent d'obtenir la mésoporosité. Lorsque la source de silice est ajoutée, il y a interaction avec le tensioactif situé à l'interface des SLN et avec les micelles présentes dans la solution aqueuse. Ces interactions conduisent à la formation d'une phase hybride. Un traitement hydrothermal complète la polymérisation. Une étape d'extraction à l'éthanol permet d'éliminer le tensioactif et le lipide solide et donne le matériau poreux. Dans ce mécanisme, les mésopores sont formés par le mécanisme coopératif (CTM) à partir des micelles présentes dans la solution de SLN. Les macropores, eux, sont formés par les particules lipidiques solides dispersées dans la phase aqueuse. De ce fait, la taille des macropores est gouvernée par celle des particules lipidiques solides.

En faisant varier la nature du tensioactif, on peut contrôler la morphologie des grains de silice et leur méso-structuration. La taille des SLN est comprise entre 200 et 400 nm. Avec le tensioactif Tween 20, des mésopores de 3 nm ont été obtenus alors qu'avec le Tween 40, la taille est de 5 nm et avec le Pluronic® P123, elle est de 9 nm⁹³. La présence de macropores de faible taille conjugue les avantages d'un grand volume poreux et d'une surface spécifique importante avec une haute diffusivité et un bon transfert de masse inhérent aux macropores classiques.

La méthode par injection de solvant pour la préparation des SLN possède l'avantage d'être simple, performante et ne nécessite aucun équipement sophistiqué. Le principe consiste à préparer deux solutions, une solution micellaire et une solution contenant la graisse et le solvant. Cette dernière est chauffée à une température supérieure à la température d'ébullition du solvant. Ensuite, la solution de graisse est injectée dans la solution micellaire maintenue à une température supérieure à celle de l'ébullition. Les nanoparticules lipidiques solides sont obtenues après l'évaporation complète du solvant et le retour à température ambiante (Figure I-18). Une fois les nanoparticules obtenues, l'étape de minéralisation est effectuée.

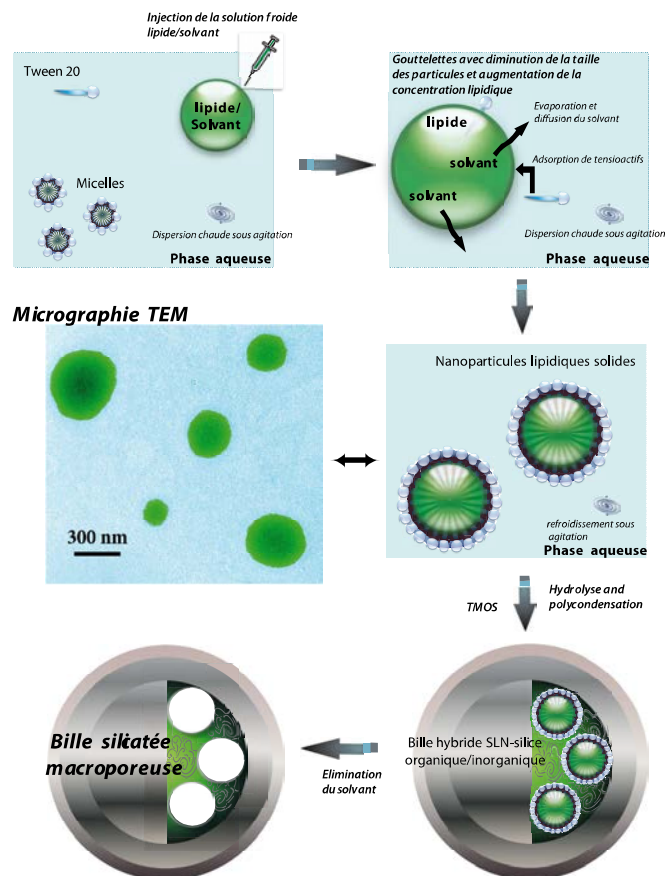


Figure I-18 - Schéma illustrant la préparation des SLN par la méthode d'injection de solvant et la préparation de matériaux méso-macroporeux à partir de dispersions de SLN⁹³

D. Objectif de la thèse

Ce travail s'inscrit dans la thématique du laboratoire qui concerne la synthèse de matériaux silicatés mésoporeux et à porosité hiérarchisée. Ces matériaux sont de bons candidats pour l'adsorption de molécules biologiques comme les enzymes. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré l'efficacité catalytique de la lipase *Mucor miehei* (*MmL*) immobilisée par physisorption dans des matériaux mésoporeux préparés à partir de tensioactifs fluorés non-ionique sur une réaction d'estérification⁹⁵. Cette étude a permis d'envisager d'utiliser de tels supports pour synthétiser des esters méthyliques à partir d'huiles végétales par l'intermédiaire d'une réaction de transestérification catalysée par la lipase *MmL*. L'objectif principal de ce travail est la mise au point de bioréacteurs pour la méthanolyse de l'huile de colza. Les performances catalytiques du bioréacteur seront évaluées *via* des réactions de transestérification successives en adsorbant la lipase *Mucor miehei* sur différentes matrices silicatées ayant des caractéristiques texturales spécifiques. Les matériaux silicatés mésoporeux et les matériaux à porosité hiérarchisée seront ainsi considérés. En termes d'adsorption, trois types d'immobilisation de la lipase sur le support seront étudiés : physisorption, chimisorption et encapsulation lors de la synthèse du matériau. L'étude de la physisorption sera essentiellement effectuée en utilisant une matrice de type SBA-15 et un matériau méso-macroporeux comme support. Pour ce qui concerne la chimisorption, le matériau SBA-15 sera fonctionnalisé afin de lier de manière covalente à l'enzyme. L'efficacité de la réaction de transestérification étant gouvernée par plusieurs paramètres comme le rapport molaire méthanol/huile, la température de réaction, l'ajout d'un co-solvant, l'optimisation des conditions de la réaction sera effectuée à l'aide d'un plan d'expérience. Cette stratégie devrait permettre de déterminer les facteurs les plus influents et de mieux maîtriser les interactions entre les différents paramètres.

Références bibliographiques

- ¹ G. Knothe, Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition *Energy Environ. Sci.*, **2009**, 2, 759-766
- ² B. Freedman, E. H. Pryde, T. L. Mounts, Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1984**, 61, 1638-1643
- ³ U. Schuchardt, R. Sercheli, R. M. Vargas, Transesterification of vegetable oils: a review, *J. Braz. Chem. Soc.*, **1998**, 9, 199-210
- ⁴ J.M. Encinar, J.F. González, A. Pardal, G. Martínez, Rape oil transesterification over heterogeneous catalysts, *Fuel Process. Technol.*, **2010**, 91, 1530-1536.
- ⁵ A. Abbaszaadeh, B. Ghobadian, M. Omidkhah, G. Najafi, Current biodiesel production : a comparative review, *Energy Convers. Manage.*, **2012**, 63, 138-148
- ⁶ J. Wang, P. Pamidi, D. S. Park, Screen-Printable Sol-Gel Enzyme-Containing Carbon Inks, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2705-2708.
- ⁷ L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim, U. Menge, A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase, *Nature*, **1990**, 343, 767-770
- ⁸ R. D. Schmid, R. Verger, Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1998**, 37, 1608-1633.
- ⁹ L. Nelson, A. Foglia, N. Marmer, Lipase-catalyzed production of biodiesel, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, 73, 1191-1195
- ¹⁰ M. S. Antczak, A. Kubiak, T. Antczak, S. Bielecki, Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process, *Renewable Energy*, **2009**, 34, 1185-1194
- ¹¹ S. Shah, S. Sharma, M. N. Gupta, Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil, *Energy Fuels*, **2004**, 18, 154-159
- ¹² M. G. Jang, D. K. Kim, S. C. Park, J. S. Lee, S. W. Kim, Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic processes, *Renewable Energy*, **2012**, 42, 99-104
- ¹³ T. Tana, J. Lua, K. Niea, L. Deng, F. Wanga, Biodiesel production with immobilized lipase: A review, *Biotechnol. Adv.*, **2010**, 28, 628-634

- ¹⁴ W. Du, Y. Xu, D. Liu, J. Zeng, Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 30, 125–129
- ¹⁵ D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Locatelli, Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent, *Bioresour. Technol.*, **2007**, 98, 648–653
- ¹⁶ N. Gharat, V. K. Rathod, Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate, *Ultrason. Sonochem.*, **2013**, 20, 900–905
- ¹⁷ B.K. De, D.K. Bhattacharyya, C. Bandhu, Enzymatic Synthesis of Fatty Alcohol Esters by Alcoholysis, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1999**, 76, 451-453
- ¹⁸ B. Selmi, D. Thomas, Immobilized Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil in a Solvent-Free Medium, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998, 75, 691-695
- ¹⁹ H. Breivik, G. G. Haraldsson, B. Kristinsson Preparation of Highly Purified Concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1997**, 74, 1425-1429
- ²⁰ W.H. Wu, T.A. Foglia, W.N. Marmer, J.G. Phillips, Optimizing Production of Ethyl Esters of Grease Using 95% Ethanol by Response Surface Methodology, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1999**, 76, 517-521
- ²¹ R. Abigor, P. Uadia, T. Foglia, M. Hass, K. Jones, E. Okpefa, J. Obibuzor, M. Bafor, Lipase catalyzed production of biodiesel fuel some Nigerian lauric oils, *Biochem. Soc. Trans.*, **2000**, 28, 979-981
- ²² Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, Hi. Fukuda, Y. Tominaga, Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1999**, 76, 789-793
- ²³ R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010** 66, 15–32.
- ²⁴ M. Holmquist, M. Nodn, K. Hult, The Role of Arginines in Stabilizing the Active Open-Lid Conformation of *Rhizomucor miehei* Lipase, *Lipids*, **1993**, 28, 721-726
- ²⁵ P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser, R. Miller, Lipases at interfaces: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2009**, 147, 237-250
- ²⁶ H. Fukuda, A. Kondo, H. Noda, Biodiesel fuel production by transesterification of oils, *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 92, 405-416
- ²⁷ G. Kildiran, S. Yücel, S. Ö.Türkay, *In situ* alcoholysis of soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, 73, 225-228

-
- ²⁸ M.A. Dasari, M.J. Goff, G.J. Suppes, Noncatalytic alcoholysis kinetics of soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2003**, 80, 189–192
- ²⁹ S. Zheng, M. Kates, M.A. Dubé, D.D. McLean, Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil, *Biomass Bioenerg.*, **2006**, 30, 267-272.
- ³⁰ F. Ma, L.D. Clements, M.A. Hanna, The Effects of Catalyst, Free Fatty Acids, and Water on Transesterification of Beef Tallow *Trans. ASAE*, **1998**, 41, 1261-1264
- ³¹ S. Zullaikah, C.C. Lai, S.R. Vali, Y.H. Ju, A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil, *Bioresource Technology*, **2005**, 96, 1889-1896
- ³² B. Hamad, R.O. Lopes de Souza, G. Sapaly, M.G. Carneiro Rocha, P.G. Pries de Oliveira, W.A. Gonzalez, E. Andrade Sales, N. Essayem, *Catal. Commun.*, **2008**, 10, 92-97
- ³³ Y.H. Hwi, *5th éd.*, New York : Wiley Interscience, **1996**, 5.
- ³⁴ J. Poré, J. Verstaete, *Oléagineux*, *7eme année*, **1952**, 11, 641-644
- ³⁵ A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis : why, what and how, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6223-6235
- ³⁶ S. Hudson, E. Magner, J. Cooney, B.K. Hodnett, Methodology for the immobilization of enzymes onto mesoporous materials, *J. Phys. Chem B*, **2005**, 109, 19496-19506
- ³⁷ E. Serra, A. Mayoral, Y. Sakamoto, R. M. Blanco, I. Diaz, Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2008**, 114, 201–213
- ³⁸ A. Galarneau, M. Mureseanu, S. Atger, G. Renard, F. Fajula, Immobilization of lipase on silicas. Relevance of textural and interfacial properties on activity and selectivity, *New J. Chem.*, **2006**, 30, 562–571
- ³⁹ R. Blanco, P. Terresos, N. Munoz, E. Serra, Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2007**, 47, 13-20
- ⁴⁰ H. Yiu, P. Wright, N. Botting, Enzyme immobilization using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, 15, 81-92
- ⁴¹ A. Salis, M. F. Casula, M. S. Bhattacharyya, M. Pinna, V. Solinas, M. Monduzzi, Physical and Chemical Lipase Adsorption on SBA-15: Effect of Different Interactions on Enzyme Loading and Catalytic Performance, *Chem. Cat. Chem.* **2010**, 2, 322 – 329
- ⁴² A. Galarneau, G. Renard, M. Mureseanu, A. Tournette, C. Biolley, M. Choi, R. Ryoo, F. Di Renzo, F. Fajula, Synthesis of sponge mesoporous silicas from

lecithin/docdecylamine mixed-micelles in ethanol/water media: a route towards efficient biocatalysts, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2007**, 104, 103-114

⁴³ A. Macario, F. Verri, U. Diaz, A. Corma, G. Giordano, Pure silica nanoparticles for liposome/lipase system encapsulation: Application in biodiesel production, *Catal. Today*, **2013**, 204, 148–155

⁴⁴ M. Kim, J. Kim, J. Lee, H. Jia, H. Na, J. Youn, J. Kwak, A. Dohnalkova, J. Grate, P. Wang, T. Hyeon, H. Park, H. Chang, Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica : a simple and effective method for enzyme stabilization, *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, 96, 210-218

⁴⁵ A.I. Kallenberg, F. van Rantwijk, A. Sheldon, Immobilization of Penicillin G Acylase: The Key to Optimum Performance, *Adv. Synth. Catal*, **2005**, 347, 905-926

⁴⁶ T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase, *Enzymologia.*, **1966**, 31, 214-24

⁴⁷ M. Zoumpanioti, M. Karali, A. Xenakis, H. Stamatis, Lipase biocatalytic processes in surfactant free microemulsion-like ternary systems and related organogels, *Enzyme Microb. Tech.*, **2006**, 39, 531–539

⁴⁸ C. Delimitsou, M. Zoumpanioti, A. Xenakis, H. Stamatis, Activity and Stability Studies Of *Mucor miehei* Lipase Immobilized in Novel Microemulsion-based Organogels, *Biocatal. Biotransfor*, **2002**, 20, 319–327

⁴⁹ H. Stamatis, A. Xenakis, M. Provelegiou, F.N. Kolisis, Esterification Reactions Catalyzed by Lipases in Microemulsions: The Role of Enzyme Localization in Relation to Its Selectivity, *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 42, 103-110

⁵⁰ Z. Zhou, M. Hartmann, Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 3894-3912

⁵¹ H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on the Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica, *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 3301-3305

⁵² L. Washmon-Kriel, V.L. Jimenez, K.J. Balkus Jr., Cytochrome c immobilization into mesoporous molecular sieves, *J. Mol. Catal. B: Enzym*, **2000**, 10, 453–469

⁵³ J. Felipe Diaz, Kenneth J. Balkus Jr, Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve, *J. Mol. Catal. B: Enzym*, **1996**, 2, 115-126

-
- ⁵⁴ J. Fan, J. Lei, L. Wang, C. Yu, B. Tu, D. Zhao, Rapid and high-capacity immobilization of enzymes based on mesoporous silicas with controlled morphologies, *Chem. Commun.*, **2003**, 17, 2140–2141
- ⁵⁵ J. Liu, C. Li, Q. Yang, J. Yang, C. Li, Morphological and Structural Evolution of Mesoporous Silicas in a Mild Buffer Solution and Lysozyme Adsorption, *Langmuir*, **2007**, 23, 7255–7262
- ⁵⁶ A. Vinu, V. Murugesan, M. Hartmann, Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 7323–7330
- ⁵⁷ R. C. Rodrigues, G. Volpato, K. Wada, M. A. Z. Ayub, Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2008**, 85, 925–930
- ⁵⁸ V. Calabro, E. Ricca, M. G. De Paola, S. Curcio, G. Iorio, Kinetics of enzymatic trans-esterification of glycerides for biodiesel production, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2010**, 33, 701–710
- ⁵⁹ R.C. Rodrigues, M. Ayub, Effects of the combined use of thermomyces lanuginosus and Rhizomucor miehei lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil, *Process Biochem.*, **2011**, 46, 682–688
- ⁶⁰ A. Macario, F. Verri, U. Diaz, A. Corma, G. Giordano, Pure silica nanoparticles for liposome/lipase system encapsulation: Application in biodiesel production, *Catal. Today*, **2013**, 204, 148–155
- ⁶¹ R. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Lipase from Rhizomucor miehei as an industrial biocatalyst in chemical process, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 64, 1–22
- ⁶² C.T. Kresge, M.E. Lenowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, *Nature*, **1992**, 359, 710–712
- ⁶³ Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Petroff, F. Schüth, G.D. Stucky, Generalized synthesis of periodic surfactant/inorganic composite materials, *Nature*, **1994**, 368, 317–321
- ⁶⁴ P. T. Tanev, M. Chibwe, T.J. Pinnavaia, Titanium-containing mesoporous molecular sieves for catalytic oxidation of aromatic compounds, *Nature*, **1994**, 368, 321–323
- ⁶⁵ S. A. Bagshaw, E. Prouzet, T. J. Pinnavaia, Templating of Mesoporous Molecular Sieves by Nonionic Polyethylene Oxide Surfactants, *Science*, 1995, 269, 1242–1244
- ⁶⁶ J. J. Ebelmen, *Ann. Chem. Phys.* **1846**, 57
-

⁶⁷ C.J. Brinker, G.W. Scherer, The physics and chemistry of sol-gel processing, San Diego, **1990**

⁶⁸ G. S. Attard, J. C. Glyde, C. G. Goltner, Liquid-crystalline phases as templates for the synthesis of mesoporous silica, *Nature*, **1995**, 378, 366

⁶⁹ Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, D. G. Demuth, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B. F. Chmelka, F. Schuth, G.D. Stucky, Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphasic Arrays, *Chem. Mater.*, **1994**, 6, 1176-1191

⁷⁰ D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 6024–6036

⁷¹ D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores, *Science*, **1998**, 279, 548-552

⁷² V. L. Zholobenko, A. Y. Khodakov, M. Impérator-Clerc, Initial stages of SBA-15 synthesis : An overview, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2008**, 142, 67-74

⁷³ S. Manet, A. Lecchi, M. Imperor-Clerc, V. Zholobenko, D. Durand, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, I. Grillo, F. Meneau, C. Rochas, Structure of Micelles of a Nonionic Block Copolymer Determined by SANS and SAXS, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, 11318–11329.

⁷⁴ S. Manet, J. Schmitt, M. Imperor-Clerc, V. Zholobenko, D. Durand, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, C. Gervais, N. Baccile, F. Babonneau, I. Grillo, F. Meneau, C. Rochas, Kinetics of the Formation of 2D-Hexagonal Silica Nanostructured Materials by Nonionic Block Copolymer Templating in Solution, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, 11330–11344

⁷⁵ A. Y. Khodakov, V. L. Zholobenko, M. Imperor-Clerc, D. Durand, Characterization of the Initial Stages of SBA-15 Synthesis by in Situ Time-Resolved Small-Angle X-ray Scattering, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 22780–22790.

⁷⁶ J.L. Blin, P. Lesieur, M.J. Stébé, Nonionic fluorinated surfactant : Investigation of phase diagram and preparation of ordered mesoporous materials, *Langmuir*, **2004**, 20, 491-198

-
- ⁷⁷ J. L. Blin and M. J. Stébé, Perfluorodecalin Incorporation in Fluorinated Surfactant-Water System: Tailoring of Mesoporous Materials Pore Size, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 11399-11405
- ⁷⁸ Y. Han, D. Li, L. Zhao, J. Song, X. Yang, N. Li, Y. Di, C. Li, S. Wu, X. Xu, X. Meng, K. Lin, F.S. Xiao, High-Temperature Generalized Synthesis of Stable Ordered Mesoporous Silica-Based Materials by Using Fluorocarbon-Hydrocarbon Surfactant Mixtures, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 3633-3637
- ⁷⁹ S. E. Rankin, B. Tan, H.J. Lehmler, K. P. Hindman, B. L. Knutson, Well-ordered mesoporous silica prepared by cationic fluorinated surfactant templating, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2004**, 73, 197-202
- ⁸⁰ Y. Di, X. Meng, L. Wang, S. Li, F.S. Xiao, Ultralow Temperature Synthesis of Ordered Hexagonal Smaller Supermicroporous Silica Using Semifluorinated Surfactants as Template, *Langmuir*, **2006**, 22, 3068-3072
- ⁸¹ J. Yu, J. C. Yu, M. K.-P. Leung, W.i Ho, B. Cheng, X. Zhao, J. Zhao, Effects of acidic and basic hydrolysis catalysts on the photocatalytic activity and microstructures of bimodal mesoporous titania, *J. Catal*, **2003**, 217, 69-78
- ⁸² J.S. Yun, S.K. Ihm, Synthesis of mesoporous SBA-15 having macropores by dual-templating method, *J. Phys. Chem. Solids*, **2008**, 69, 1133-1135
- ⁸³ B. T. Holland, C. F. Blanford, A. Stein, Synthesis of Macroporous Minerals with Highly Ordered Three-Dimensional Arrays of Spheroidal Voids, *Science*, **1998**, 281, 538-540
- ⁸⁴ H. Zhang , A. I. Cooper, Emulsion-Templated Hierarchically Porous Silica Beads Using Silica Nanoparticles as Building Blocks, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2005**, 44, 8707-8714
- ⁸⁵ T. Sen, G. J. T. Tiddy, J. L. Casci, M. W. Anderson, One-Pot Synthesis of Hierarchically Ordered Porous-Silica Materials with Three Orders of Length Scale, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4649-4653
- ⁸⁶ Z.Sun, Y. Deng, J. Wei, D. Gu, B. Tu, D. Zhao, Hierarchically Ordered Macro-Mesoporous Silica Monolith: Tuning Macropore Entrance Size for Size-Selective Adsorption of Proteins, *Chem. Mater.*, **2011**, 23, 2176-2184
- ⁸⁷ F. Carn, A. Collin, M.F. Achard, H. Deleuze, E. Sellier, M. Birot, R. Backov, Inorganic monoliths hierarchically textured via concentrated direct emulsion and micellar templates, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 1370-1376

⁸⁸ R.H. Muller, W. Mehnert, J.S.Lucks, C.Schwarz, A. zur Muhlen, H. Weyhers, C. Freitas, D. Ruhl, Solid lipid nanoparticles (SLN) — an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1995**, 41, 62–69

⁸⁹ R.H. Muller, K. Mader, S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery — a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2000**, 50, 161–177

⁹⁰ W. Mehnert, K. Mader, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv.Rev.*, 2001, 47, 165–196

⁹¹ M.R. Gasco, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, *US Patent No.5250236*, **1993**

⁹² R.H. Muller, J.S. Lucks, Arzneistofftrager aus festenLipid-teilchen, Feste Lipidnanospharen (SLN), *European Patent No.EP0605497*, **1996**

⁹³ A. Pasc, J.L. Blin, M.J. Stébé, J. Ghanbaja, Solid lipid nanoparticles (SLN) templating of macroporous silica beads, *RSC Adv.*, **2011**, 1, 1204-1206

⁹⁴ R. Ravetti-Duran, J.L. Blin, M.J. Stébé, C. Castel, A. Pasc, Tuning the morphology and the structure of hierarchical meso–macroporous silica by dual templating with micelles and solid lipid nanoparticles, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 21540

⁹⁵ F. Michaux, M. Zoumpanioti, M. Papamentzelopoulou, M.J. Stébé, J.L. Blin, A. Xenakis, Immobilization and activity of *Rhizomucor miehei* lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants, *Process Biochem.* **2010**, 45, 39-46

CHAPITRE II – PARTIE EXPERIMENTALE

A.	PRODUITS UTILISES.....	53
1.	TENSIOACTIFS	53
2.	HUILE PERFLUOREE	53
3.	REACTION DE TRANSESTERIFICATION	54
B.	PREPARATION DES MATERIAUX POREUX SILICATES	55
1.	SOURCE DE SILICE	55
2.	MODE OPERATOIRE	56
a.	<i>Matériaux mésoporeux organisés.....</i>	<i>56</i>
i.	Matériau SBA-15	56
ii.	Matériau MMF.....	57
iii.	Matériau silicaté à porosité hiérarchisée préparé à partir d'une émulsion.....	58
iv.	Matériau silicaté à porosité hiérarchisée préparé à partir de doubles émulsions et SLN	58
b.	<i>Immobilisation de l'enzyme sur les matériaux par physisorption.....</i>	<i>59</i>
c.	<i>Immobilisation de l'enzyme sur les matériaux par chimisorption</i>	<i>59</i>
C.	TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	59
1.	DIFFUSION-DIFFRACTION DES RAYONS X AUX PETITS ANGLES (SAXS)	59
2.	ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE	62
3.	SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER.....	64
a.	<i>Détermination de la quantité d'enzyme sur les matériaux poreux.....</i>	<i>65</i>
b.	<i>Isotherme d'adsorption.....</i>	<i>65</i>
4.	RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) DU SOLIDE.....	67
5.	POROSIMETRIE A MERCURE	67
6.	CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	68
7.	PURIFICATION DES PRODUITS DES REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION	69
8.	CALCUL DU RENDEMENT DES REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION.....	70
9.	PLAN D'EXPERIENCE	72

Chapitre II : Partie expérimentale

Ce chapitre est consacré à la description des produits chimiques utilisés, des techniques de caractérisation des matériaux ainsi que des protocoles employés pour la préparation des matériaux poreux. Les méthodes de quantification du taux d'enzyme adsorbé sur les matériaux sont ensuite décrites. Puis, après avoir rappelé la définition d'une réaction de transestérification, les réactifs et produits de la réaction sont donnés. Le calcul du rendement de ce type de réaction est également détaillé. Enfin, le plan d'expérience utilisé pour optimiser les conditions de la réaction de transestérification sera finalement exposé à la fin de ce chapitre.

A. Produits utilisés

1. Tensioactifs

Ce travail est axé sur l'utilisation de matériaux silicatés, préparés à partir de systèmes à base de tensioactifs non ioniques. Les tensioactifs sont des composés qui comportent une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Deux types d'amphiphiles non ioniques ont été utilisés, des tensioactifs fluorés et un copolymère à blocs. Les tensioactifs fluorés notés $R^F_7EO_8$ et $R^F_8EO_9$ ont une partie hydrophile constituée de plusieurs motifs oxyéthyléniques (OC_2H_4) et la partie hydrophobe est formée d'une chaîne alkyle linéaire fluorée et de deux motifs CH_2 , jouant le rôle d'espaceur entre la tête polaire et la chaîne fluorocarbonée. Ces composés sont commerciaux et le nombre de motifs oxyéthyléniques de la chaîne hydrophile ainsi que le nombre de carbones des chaînes hydrophobes ne sont pas exactement définis. En particulier, le nombre de motifs hydrophiles présente une distribution gaussienne centrée sur les valeurs présentées dans le Tableau II-1. Concernant la partie hydrophobe du tensioactif fluoré, elle est constituée de chaînes de longueurs différentes et la valeur moyenne est donnée dans le Tableau II-1.

Le tensioactif Pluronic P123 est un copolymère composé de deux blocs hydrophiles constitués de motifs oxyéthyléniques entourant un bloc hydrophobe constitué de motifs oxypropyléniques. Les tensioactifs ont été utilisés sans purification particulière.

Tableau II-1 - Tensioactifs utilisés : formules, caractéristiques physico-chimiques et fournisseurs

Noms	Formules	Densité	M (g.mol ⁻¹)	Fournisseur
$R^F_7EO_8$	$C_7F_{15} C_2H_4(OC_2H_4)_8OH$	1,35	744	DuPont
$R^F_8EO_9$	$C_8F_{17} C_2H_4(OC_2H_4)_9OH$	1,39	870	DuPont
Pluronic P123	$HO(C_2H_4O)_{20}(CH_2CH(CH_3)O)_{70}(C_2H_4O)_{20}H$	1,04	5800	Sigma- Aldrich

2. Huile perfluorée

Les fluorocarbures sont l'équivalent des hydrocarbures où les atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes de fluor. Leur caractère hydrophobe et lipophobe est marqué. Toutefois, ils peuvent être solubilisés dans l'eau à l'aide de tensioactif qui comporte une chaîne hydrophobe fluorée en formant des microémulsions¹ ou des émulsions concentrées². Dans notre cas, nous avons utilisé la perfluorodécane comme fluorocarbure (notée PFD). Cette huile est formée de deux cycles (Figure II-1). Sa formule moléculaire est $C_{10}F_{18}$, sa

masse molaire est de 462 g/mol et sa densité est de 1,95 à 20°C. Ce produit, acheté chez Sigma-Aldrich, est un mélange d'isomères cis et trans de composition 45/55.

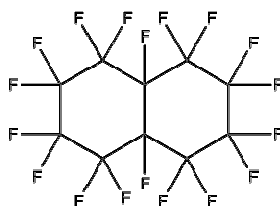


Figure II-1- Structure moléculaire de la perfluorodécaline

La perfluorodécaline peut être solubilisée dans les micelles de tensioactifs fluorés. Ces micelles gonflées de PFD sont utilisées pour préparer les matériaux mésoporeux. En effet, la solubilisation de PFD dans les micelles de tensioactifs fluorés permet d'accroître leur taille et par conséquent la taille des mésopores des matériaux^{3,4}.

3. Réaction de transestérification

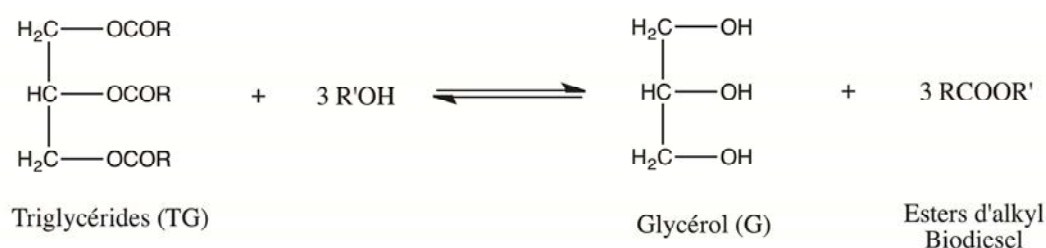


Figure II-2 - Schéma d'une réaction de transestérification de triglycérides

Les réactions de transestérification (Figure II-2) investies dans ce travail ont été effectuées en partant d'une huile de colza commerciale. Sa masse molaire, donnée par Hajar *et al*⁵, est de 881 g/mol. De manière générale, des triglycérides, diglycérides et monoglycérides sont présents dans l'huile de colza. L'huile étant commerciale et les possibilités de combinaisons étant très variées (par exemple, un triglycéride peut être constitué de deux chaînes d'acides oléiques et d'une chaîne d'acide palmitique), il est difficile de donner la composition exacte en triglycérides. Les acides gras issus de l'hydrolyse de l'huile de colza sont constitués de 17% d'acide palmitique (C₁₅H₃₁COOH), 30% d'acide linoléique (C_{18:2}), 45% d'acide oléique (C_{18:1}) et 8% d'acide stéarique (C₁₇H₃₅COOH).

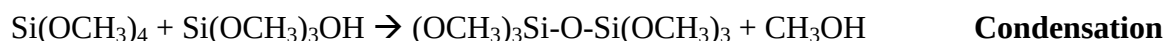
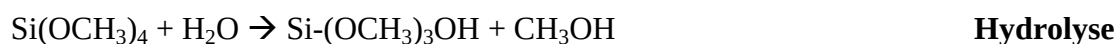
Les réactions de transestérification sont réalisées en ajoutant du méthanol dans le milieu réactionnel. Le méthanol, d'une pureté de 99,9% a été acheté chez Sigma-Aldrich.

B. Préparation des matériaux poreux silicatés

Dans ce travail, deux types de supports ont été préparés pour immobiliser l'enzyme. Chaque support a des caractéristiques particulières. Ainsi, deux types de matériaux mésoporeux organisés et de matériaux à porosité hiérarchisée ont été préparés. Tous ces matériaux sont silicatés.

1. Source de silice

Nous avons utilisé comme source de silice le tétraméthoxysilane (noté TMOS) qui a pour formule $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ et une masse molaire de 152,2 g/mol. La formation du réseau de silice est générée par les réactions suivantes :



Les conditions de synthèse influencent la vitesse de ces réactions et la durée de formation du gel peut atteindre plusieurs jours. Cependant, il existe un moyen de contrôler la cinétique en faisant varier le pH de la solution aqueuse⁶. La Figure II-3 représente le temps de gélification et la stabilité de la silice en fonction du pH de la solution. Ce temps est proportionnel à l'inverse du taux de condensation.

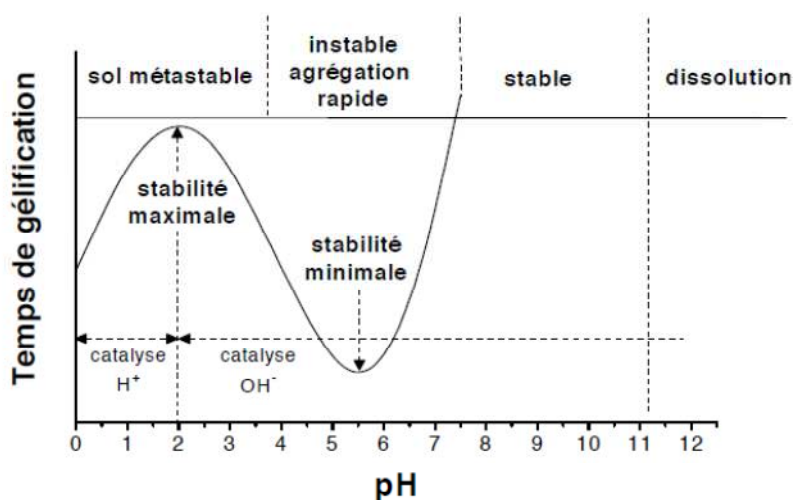


Figure II-3 - Variation du temps de gélification et de la stabilité de la silice en solution en fonction du pH

Des études ont montré que la structuration des matériaux préparés à partir de copolymères à blocs est favorisée lorsque la polymérisation est effectuée à pH 0, ce qui est en accord avec la Figure II-3⁷. Pour une valeur de pH proche de 2, la vitesse de condensation est minimale. Cette valeur de pH correspond au point isoélectrique de la silice. A ce pH, les espèces ne portent pas de charge et une polymérisation progressive est obtenue, les temps de gélification sont alors longs. Une hydrolyse complète du précurseur inorganique de silice peut être envisagée. Dans une gamme de pH comprise entre 2 et 7, la vitesse de gélification est proportionnelle à la concentration en ions OH⁻. En dessous de pH 2, cette vitesse est proportionnelle à la concentration en H⁺. Proche de pH 6, il existe un minimum qui correspond à une gélification rapide, laquelle conduit à la formation de gels de silice hydratée amorphe [SiO₂xH₂O].

2. Mode opératoire

a. Matériaux mésoporeux organisés

Les matériaux mésoporeux préparés ont été synthétisés exclusivement, selon le mécanisme coopératif d'auto-assemblage. Ainsi, les synthèses sont réalisées à partir d'une solution micellaire de tensioactif en présence d'une source de silice (TMOS). Après addition du tensioactif dans l'eau à pH 0 (le pH est ajusté avec une solution d'acide chlorhydrique à 1M), la solution micellaire est agitée à 300 tours par minute et la source de silice est ajoutée goutte à goutte. La quantité de TMOS est calculée en fonction du rapport molaire tensioactif/TMOS choisi.

i. Matériau SBA-15

Ce matériau a été synthétisé selon le protocole décrit dans la publication de Li *et al.*⁸. La solution micellaire à pH 0, préparée à partir du Pluronic P123, est composée de 2,5% en masse de ce tensioactif. Le rapport molaire $\frac{\text{tensioactif}}{\text{TMOS}}$ est fixé à 0,017. La solution est ensuite placée dans une gaine en téflon d'un autoclave et un traitement hydrothermal est effectué à une température de 40°C pendant 24 heures, puis à 100°C pendant 2 jours. Après cette étape, le gel est lavé à l'éthanol pendant 48 heures à l'aide d'un Soxhlet. Une partie du tensioactif est éliminé du matériau par extraction à l'éthanol. L'éthanol utilisé lors cette étape possède un degré de pureté de 99%. Pour compléter l'élimination du tensioactif, le matériau est calciné sous air à 550°C pendant 3 heures.

ii. Matériau MMF

Le matériau mésoporeux fluoré, noté MMF, a été mis au point au laboratoire. Cette synthèse est réalisée à partir d'une solution micellaire (pH 0) composée de 25% en masse d'un mélange de tensioactifs dissous dans l'eau constitué de $R^F_7EO_8$ et $R^F_8EO_9$. Initialement, un seul tensioactif était utilisé, $R^F_7EO_8$ ⁹. Suite à un changement de lot, les propriétés physico-chimiques du nouveau lot sont différentes, en particulier sa température de point de trouble est déplacée vers les très basses températures (-49°C). Pour remédier à ce problème, la solution a été d'ajouter un tensioactif, plus hydrophile, $R^F_8EO_9$, pour retrouver la valeur de point de trouble favorable à la préparation des matériaux organisés. La variation de la température de point de trouble a été déterminée en fonction de la quantité de $R^F_7EO_8$ dans le mélange $R^F_7EO_8$ - $R^F_8EO_9$ (Figure II-4). Le point de trouble d'un composé est atteint lorsque ce dernier commence à se cristalliser.

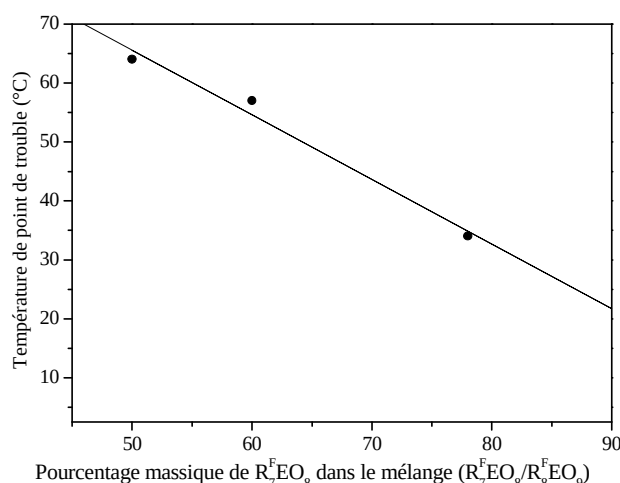


Figure II-4 - Variation de la température de point de trouble en fonction du taux de $R^F_7EO_8$ dans le mélange $R^F_7EO_8/R^F_8EO_9$

Nous avons choisi comme amphiphile un mélange constitué de 50% de $R^F_8EO_9$ et 50% de $R^F_7EO_8$. Une fois la solution micellaire préparée, la perfluorodécane (7% en masse du mélange de tensioactifs) est incorporée et l'on obtient des micelles gonflées. La solution est portée à 40°C. Ensuite, la source de silice (TMOS) est ajoutée en respectant un rapport molaire $\frac{\text{tensioactif}}{\text{TMOS}}$ égal à 0,5. Le mélange est agité pendant 1 heure, puis placé dans un autoclave pour effectuer le traitement hydrothermal à 100°C pendant 24 heures. L'élimination des tensioactifs est réalisée à l'aide d'un Soxhlet par extraction à l'éthanol durant 48 heures.

iii. Matériau silicaté à porosité hiérarchisée préparé à partir d'une émulsion

Des matériaux méso-macroporeux ont été synthétisés en utilisant le protocole établi auparavant au laboratoire¹⁰. Dû au changement de lot du tensioactif $R^F_7EO_8$, dans ce travail, la solution micellaire (pH 0) est composée de 25% en masse d'un mélange de tensioactifs qui est constitué de 30% de $R^F_8EO_9$ et de 70% de $R^F_7EO_8$. A cette solution, on ajoute 20% de perfluorodécane. Ensuite, la source de silice est incorporée au mélange à 40°C en respectant le rapport molaire $\frac{\text{tensioactif}}{\text{TMOS}}$ égal à 0,5. L'ensemble est agité pendant 30 minutes, puis récupéré et placé dans un autoclave à 100°C pendant 24 heures. L'élimination du tensioactif se fait à l'aide d'un Soxhlet durant 48 heures.

iv. Matériau silicaté à porosité hiérarchisée préparé à partir de doubles émulsions et SLN

Un matériau méso-macroporeux a été synthétisé à partir d'une double émulsion et de nanoparticules solides lipidiques (SLN). Pour cela, nous avons préparé une émulsion inverse à partir de 1 g de limonène dans lequel 237 mg de lécithine d'œuf et 107 mg de NHP sont dissous. Ensuite, 600 mg de solution de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS) à pH 6 dans laquelle la lipase est introduite est ajouté et agité sous vortex. Enfin, 50 mg d'isopropanol sont introduit au mélange. La double émulsion est composée d'une solution micellaire de P123 à 3,45% dans laquelle est ajoutée l'émulsion inverse. La quantité introduite est de 14% de la masse totale de la double émulsion. L'ensemble est alors agité sous vortex.

La préparation du matériau méso-macroporeux à partir de SLN est identique à celle des doubles émulsions. Une étape supplémentaire d'évaporation du solvant est nécessaire afin d'obtenir les SLN. Cela est effectué sur l'évaporateur rotatif. Le mélange est soumis à une pression de 40 mbar et à 40°C pendant 30 minutes. Cette étape permet d'éliminer près de 80% du solvant. Ensuite, une quantité d'eau est rajoutée pour maintenir la concentration micellaire en P123 à 3,45%. La minéralisation de ces deux préparations est réalisée grâce à l'ajout de TMOS. Le traitement hydrothermal est effectué à 50°C pendant 24 heures. Le tensioactif est éliminé par un lavage abondant à l'eau sous Büchner. Cette technique d'extraction est utilisée pour ne pas dénaturer l'enzyme présente dans le matériau, comme cela pourrait être le cas avec une extraction à l'éthanol à l'aide d'un Soxhlet.

b. Immobilisation de l'enzyme sur les matériaux par physisorption

Pour réaliser la physisorption de la lipase sur les matériaux, une solution tampon de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS) est préparée à différents pH (3, 6 ou 10). Ensuite, la lipase est introduite dans cette solution à différentes concentrations (de 0 à 50 mg/mL). Pour finir, 25 mg de matériau sont ajoutés à la solution. L'ensemble est placé sur une table vibrante et agité vigoureusement. Comme chaque matériau a des caractéristiques différentes, le temps d'immobilisation varie selon le matériau sélectionné. Pour le support SBA-15, 3h30 sont nécessaires pour atteindre une adsorption maximale. Par contre, pour les matériaux MMF et à porosité hiérarchisée, 2h30 suffisent. L'étape finale consiste à récupérer par filtration Büchner le matériau qui est lavé avec la solution tampon.

c. Immobilisation de l'enzyme sur les matériaux par chimisorption

Une méthode permettant de lier de manière covalente la lipase au matériau a été investie. Pour cela, la surface du matériau a été modifiée.

- Fonctionnalisation du matériau

Le matériau est fonctionnalisé par du 3-(triéthoxysilyl)propyl isocyanate de masse molaire 247,4 g/mol. Une masse de 100 mg de matériau est mélangée à une solution de toluène de 1,5 mL ayant une concentration en isocyanate de 2M. La réaction est réalisée par voie microonde à 50W pendant 8 minutes. L'ensemble est ensuite lavé au toluène et le matériau est récupéré par filtration.

- Immobilisation de l'enzyme

La lipase a été ajoutée à la solution tampon à pH 6. Après homogénéisation, le matériau fonctionnalisé est également incorporé à la solution enzymatique. La réaction entre l'enzyme et le matériau fonctionnalisé dure 24 heures et est réalisée à 40°C. Après réaction, le catalyseur est lavé avec la solution tampon (pH 6) et récupéré par filtration Büchner, puis séché à température ambiante. Les poudres récupérées après l'étape de lavage sont séchées à température ambiante, puis broyées pour être caractérisées.

C. Techniques expérimentales

1. Diffusion-diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS)

La technique de diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS - Small Angle X-ray Scattering) est une méthode expérimentale adaptée pour déterminer les propriétés structurales des matériaux à l'échelle de plusieurs dizaines de nanomètres.

Le faisceau de rayons X diffracté sur les différents plans de la structure conduit à l'observation de pics de Bragg caractéristiques de la géométrie du système.

Les différents plans sont espacés d'une distance appelée distance de répétition et est reliée à la loi de Bragg (Figure II-5):

$$2 d_{hkl} \sin \theta = n \cdot \lambda$$

avec d_{hkl} la distance de répétition ; θ le demi-angle de diffraction ; n l'ordre de réflexion et λ la longueur d'onde des rayons X

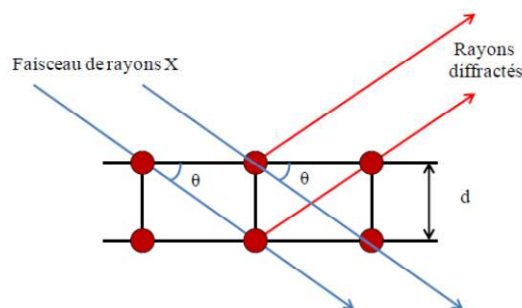


Figure II-5 - Schéma illustrant la loi de Bragg

La structure du système étudié est déterminée à partir des rapports entre les distances de répétition. D'après la loi de Bragg, plus la distance de répétition est grande, plus l'angle entre le faisceau diffracté et le faisceau direct est petit. Les matériaux étudiés présentent des distances de répétition de l'ordre de plusieurs nanomètres et ces angles de diffraction sont donc petits.

L'appareil SAXS utilisé au laboratoire est un montage Anton Paar SAXSess mc². Il est constitué par :

- un générateur de rayons X (tube PANalytical, $\lambda_{Cu K\alpha} = 0,1542$ nm ; paramètres de fonctionnement : 40 kV, 50 mA)
- un miroir pour rendre le faisceau incident monochromatique et le focaliser
- un bloc de collimation
- une chambre de mesure sous vide équipée d'un contrôleur de température à effet Peltier où est introduite la cellule contenant l'échantillon retenu entre deux feuilles de Kapton®,
- une caméra CCD (charged-couple device) (La distance échantillon – détecteur est de 309 mm)

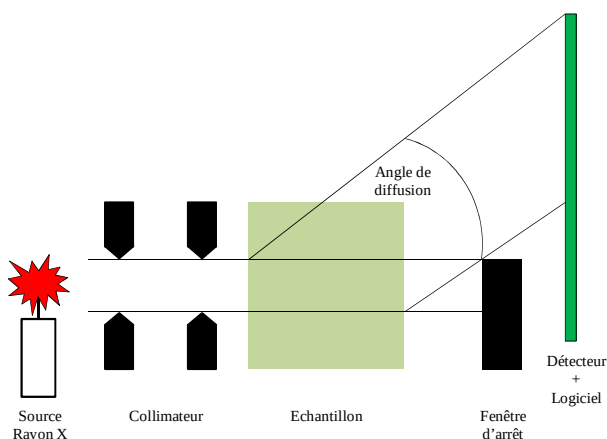


Figure II-6 - Montage SAXS

Ce montage a été utilisé pour caractériser la structure des matériaux mésoporeux (Figure II-6). Lorsque les matériaux obtenus présentent une organisation hexagonale, les rapports entre les pics de diffraction sont les suivants : $1 ; \sqrt{3} ; 2 ; \sqrt{7}$. Le diffractogramme correspondant à cette structure est présenté en Figure II-7. Le paramètre de maille, appelé a_0 , est calculé à partir de la distance de répétition donnée par le premier pic et correspond à la somme du diamètre d'un pore et de l'épaisseur de la paroi de silice :

$$a_0 = \frac{2d_{100}}{\sqrt{3}}$$

L'épaisseur de la paroi du matériau est un paramètre important car il donne une information sur la solidité du matériau. Cette épaisseur est calculée en soustrayant la taille des pores obtenue par adsorption-désorption d'azote et le paramètre de maille a_0 .

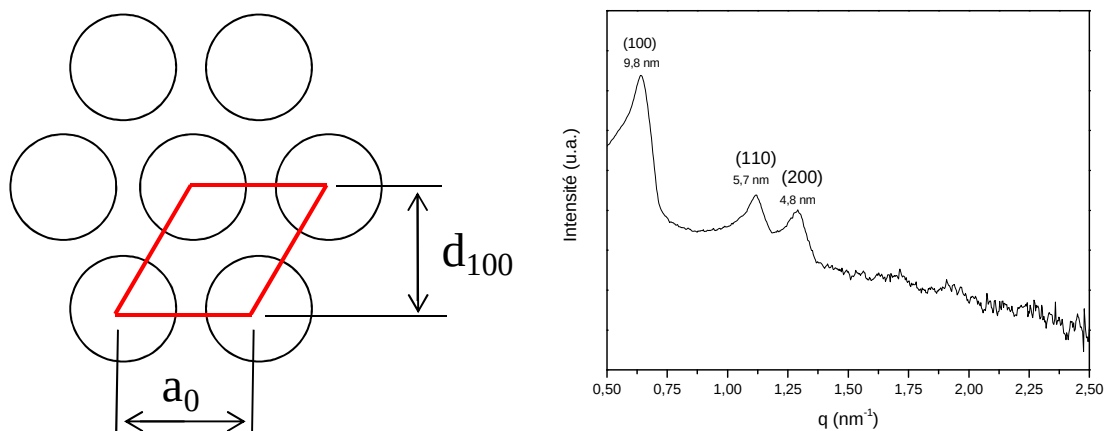


Figure II-7 – Schéma et diffractogramme d'un matériau présentant une structure hexagonale (SBA-15)

2. Adsorption-désorption d'azote

L'adsorption est un phénomène de surface où des molécules de gaz ou de liquide (adsorbat) se fixent sur la surface d'un solide (adsorbant). Le phénomène inverse s'appelle la désorption et a lieu lorsque les molécules adsorbées sur la surface s'en détachent. Cela peut être accentué sous l'action d'une augmentation de température et d'une baisse de la pression. Selon les interactions entre l'adsorbat et l'adsorbant, il existe deux types d'adsorption, la physisorption (ou adsorption physique) et chimisorption (ou adsorption chimique).

La technique d'adsorption-désorption d'azote donne des informations qui sont caractéristiques de la texture du matériau et permet de classer le matériau analysé (matériau micro-, méso- ou macroporeux). Les matériaux poreux sont caractérisés par deux paramètres, la surface spécifique et la distribution en taille des pores. Il est important de connaître toutes les caractéristiques du matériau car son efficacité dépend entre autre de ses propriétés de surface et du diamètre des pores. Nous avons utilisé cette technique avec l'azote à sa température de liquéfaction (77K). Avant d'analyser le matériau, un dégazage est nécessaire pour éliminer toute trace d'eau restant dans le matériau. Ce dégazage est effectué sur les matériaux bruts en les portant à 320°C durant une nuit. Pour les matériaux contenant la lipase immobilisée en surface et les matériaux fonctionnalisés le dégazage s'effectue à température ambiante afin de ne pas altérer l'échantillon (désorption de l'enzyme et perte de la fonction greffée).

La quantité de gaz adsorbé à la surface du matériau dépend, à la fois, de l'étendue de l'interface, de la pression du gaz et de la température. L'équilibre qui s'établit entre les états gazeux et adsorbé de la substance adsorbable est analogue à l'équilibre qui existe entre un liquide et sa vapeur. A une température donnée, la quantité d'espèces adsorbées en fonction de la pression relative d'équilibre (p/p_0) du gaz dans la gamme de pression compris entre 0 et la pression de vapeur saturante forme l'isotherme d'adsorption. Les isothermes sont classées selon six types distincts. Dans ce travail, deux types d'isotherme ont été rencontrés, l'isotherme de type II et de type IV.

- Isotherme de type II

Ces isothermes sont obtenues pour des matériaux non-poreux ou macroporeux (Figure II-8). La montée continue de la quantité adsorbée est le signe d'une hétérogénéité d'un point de vue énergétique entre la surface et les molécules adsorbées. Cette isotherme indique également qu'il n'y a pas formation d'une monocouche d'azote.

- Isotherme de type IV

L'isotherme de type IV correspondant à des matériaux mésoporeux (Figure II-8). Dans ce type d'isotherme, une condensation capillaire se produit. La désorption de l'azote condensé par capillarité dans les mésopores n'étant pas réversible, une hystérésis de la désorption par rapport à l'adsorption est observée.

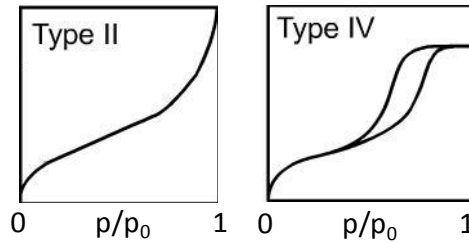


Figure II-8 - Isothermes typiques type II et IV

L'exploitation des données issues de ces isothermes permet d'accéder aux valeurs de surface spécifique, de volume poreux et de diamètre des pores.

- Détermination de la surface spécifique et du diamètre des pores

La surface spécifique est calculée à partir du volume de gaz nécessaire à la formation d'une monocouche pour des pressions relatives faibles et de la surface occupée par une molécule d'adsorbat :

$$S_{\text{BET}} = \frac{V_m}{V_{\text{mol}}} N_A \sigma$$

avec σ : aire occupée par une molécule d'adsorbat ($\sigma = 0,162 \text{ nm}^2$ pour N_2 à 77K)

V_{mol} : volume molaire du gaz (22,4 L/mol)

N_A : nombre d'Avogadro

L'équation BET (Brunauer, Emmett, Teller) permet d'obtenir le volume nécessaire pour former une monocouche¹¹.

$$\frac{p}{V(p_0 - p)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(C - 1) p}{V_m C p_0}$$

avec V : volume adsorbé à la pression p

V_m : volume nécessaire pour former une monocouche

p_0 : pression de vapeur saturante de l'adsorbat

C : constante BET

La distribution de la taille des pores est obtenue par la méthode BJH (Barett, Jayne, Halenda)¹². Le phénomène de condensation capillaire apparaissant dans les mésopores est la base de cette théorie qui est liée à la loi de Kelvin associant la pression p (pression à laquelle a lieu la condensation) au rayon de courbure du ménisque du liquide formé.

$$\ln \frac{p}{p_0} = - \frac{\gamma V_m}{(r_p - t)RT}$$

avec γ la tension superficielle à la température T ; r_p le rayon du pore ; t l'épaisseur d'une couche adsorbée

Cette méthode est appliquée à la branche d'adsorption de l'isotherme et est basée sur le calcul itératif. Elle permet de calculer la quantité de gaz adsorbé dans un intervalle de pression défini. Le rayon poreux étant lié à la pression relative, il est possible de connaître le volume cumulé sur l'ensemble des intervalles en fonction du rayon poreux, qui par dérivation donne la distribution de la taille des pores. Cependant, cette méthode sous-estime la taille des pores d'environ 20%¹³. L'appareil utilisé est un Micromeritics Tristar 3000.

3. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) est une technique d'analyse permettant d'identifier les groupements chimiques. Le principe de l'analyse est basé sur la vibration des liaisons inter-atomiques sous l'action d'un rayonnement infrarouge. Chaque groupement vibre à sa propre longueur d'onde et chacune de ces vibrations donne lieu à une absorption. Les longueurs d'onde d'absorption dépendent de la liaison et du milieu environnant. Nous avons examiné les matériaux silicatés poreux bruts, les matériaux poreux contenant de l'enzyme physisorbée et les matériaux mésoporeux fonctionnalisés pour observer les groupements silanols (SiOH) et autres groupements attestant d'une adsorption de l'enzyme ou d'une modification de la surface des matériaux. Cette technique a également été utilisée pour déterminer le taux d'adsorption de l'enzyme et pour mettre en évidence la fonctionnalisation du support.

Les spectres infrarouge ont été collectés sur un équipement Harrick DRA-2CI et la cellule est de type Harrick HVC-DRP. Avant l'analyse, les matériaux ont été dispersés dans une matrice de KBr utilisée comme référence (5% en masse). Les spectres sont enregistrés en mode réflexion diffuse avec une résolution spectrale fixée à 8 cm^{-1} et le nombre de scans est de 50.

Les spectres sont présentés en mode pseudo-absorbance $[-\log(R)]$ où R est la réflectance exprimée par le rapport entre l'échantillon (R_e) et celle de la référence (KBr) (R_r) ($R = R_e/R_r$).

a. Détermination de la quantité d'enzyme sur les matériaux poreux

La quantité d'enzyme adsorbée sur le matériau est déterminée en mesurant les aires des pics des vibrations correspondant à l'enzyme qui se situent entre 1460 et 1530 cm^{-1} (respectivement amide III et amide II). La bande à 1643 cm^{-1} correspond à la vibration de l'amide I, mais elle n'est pas prise en compte pour la détermination du taux d'adsorption, car elle est sensible à l'eau et intègre une légère contribution de la silice. Les valeurs des aires des bandes de l'enzyme se situant entre 1770 et 2100 cm^{-1} sont normalisées par rapport à l'aire des bandes correspondant au réseau de silice servant d'étalon interne. La Figure II-9 représente un spectre infrarouge typique obtenu pour un matériau SBA-15 contenant la *Mm-L*.

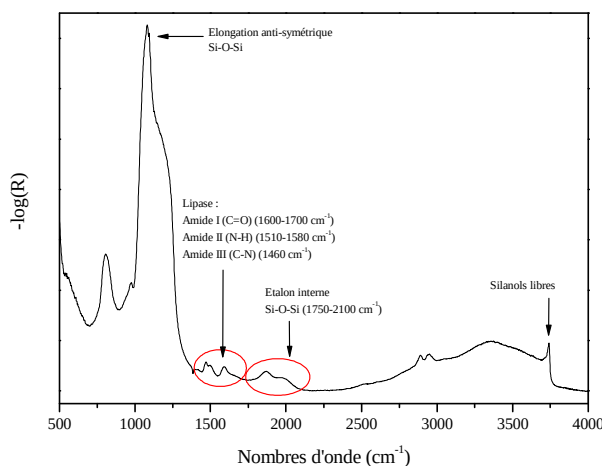


Figure II-9 - Spectre infrarouge d'un matériau SBA-15 contenant la *Mm-L*

b. Isotherme d'adsorption

Pour établir les isothermes d'adsorption, une courbe d'étalonnage est nécessaire afin de connaître la quantité d'enzyme adsorbée à l'équilibre. Pour cela, des quantités connues d'enzyme ont été dispersées mécaniquement dans le matériau et les échantillons ont été analysés par IR. Les courbes d'étalonnage ont été établies pour chaque type de matériau utilisé (SBA, MMF, matériaux méso-macroporeux) (Figure II-10).

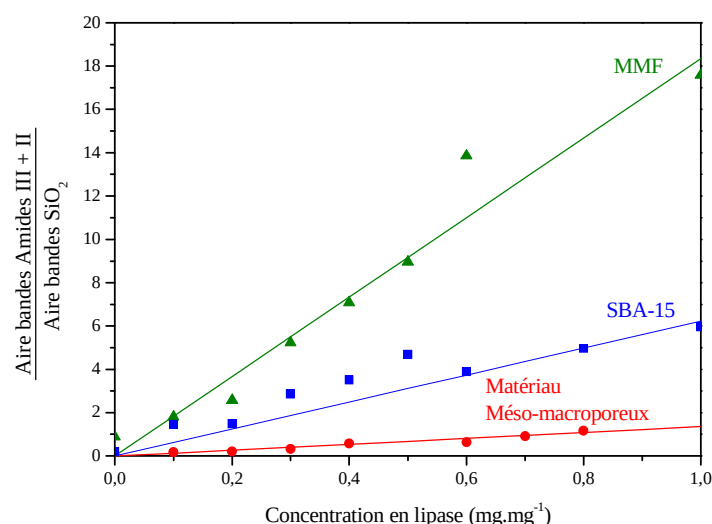


Figure II-10 - Droites d'étalonnage relatives aux matériaux SBA-15, MMF et matériau mésoporeux

Pour chaque échantillon dont on veut connaître la quantité adsorbée, on détermine à partir du spectre IR la valeur du rapport entre les aires des bandes de vibration amide III et amide II relatives à l'enzyme et celle de la silice qui est reportées sur la droite d'étalonnage et ce qui permet de déterminer la concentration d'enzyme en milligramme par milligramme de matériau.

L'isotherme d'adsorption représente la quantité d'enzyme adsorbée à l'équilibre par le matériau en fonction de la concentration d'enzyme non adsorbée (restant en solution). La Figure II-11 illustre le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre pour les matériaux SBA-15 (Figure II-11A) et MMF (Figure II-11B).

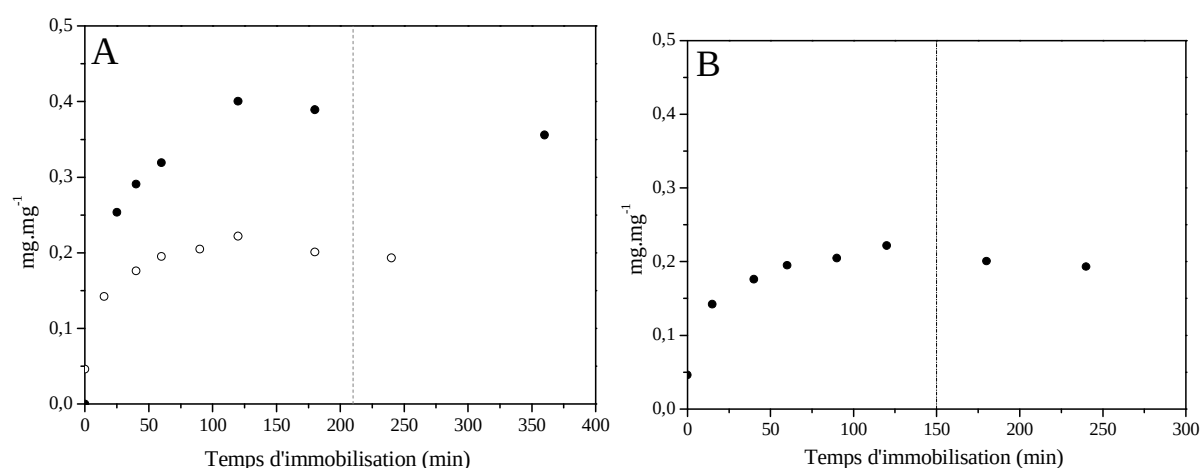


Figure II-11 - Evolution de l'adsorption d'enzyme en fonction du temps d'immobilisation (A: SBA-15; B: MMF ; ● : concentration initiale en lipase de 5 mg/mL et ○ : concentration initiale en lipase de 2 mg/mL)

On peut constater que la concentration initiale en lipase n'influence pas le temps d'immobilisation.

4. Résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du solide est une technique complémentaire de la diffraction des rayons X car elle donne des informations sur l'environnement chimique des atomes alors que la diffraction des rayons X renseigne sur l'organisation des atomes à longue distance. Le comportement des spins nucléaires des atomes considérés placés dans un champ magnétique est à la base de cette technique. Des interactions se créent entre l'atome considéré et son environnement électrique et peuvent décrire la structure du matériau. De ce fait, la dépendance des niveaux d'énergie magnétique entre le noyau et l'environnement est décrite par le déplacement chimique. La mesure de ce déplacement permet de caractériser l'environnement chimique immédiat du noyau examiné. Le spectromètre utilisé est un spectromètre DSX300 de marque Brüker. Dans ce travail, deux noyaux ont été considérés, le silicium (^{29}Si) et le carbone (^{13}C). Les échantillons forment un angle de $54,74^\circ$ avec la direction du champ magnétique dont l'intensité est de 7,04 T. Les échantillons sont placés dans des rotors en zirconium de 4 mm.

5. Porosimétrie à mercure

Cette technique a été utilisée dans le but de déterminer la taille des macropores présents dans les matériaux à porosité hiérarchisée. Pouvant mesurer des diamètres de pores allant jusqu'à quelques dizaines de micromètres, elle est complémentaire à l'adsorption-désorption d'azote qui elle permet de connaître la taille des pores dans le domaine mésométrique. La porosimétrie à mercure est basée sur les propriétés non mouillantes du mercure. Lorsque le mercure entre en contact avec un solide, il ne s'adsorbe pas immédiatement sur les parois, car il possède une tension superficielle élevée. Cela entraîne une résistance qui empêche la pénétration du mercure dans les pores. Cette résistance peut être dépassée si une pression extérieure est appliquée.

Il existe une relation entre cette pression et la taille des pores qui est donnée par l'équation de Washburn :

$$p \cdot r = -2\gamma \cos \theta$$

avec r la taille des pores, γ la tension de surface du mercure, θ l'angle de contact, p la pression absolue appliquée.

L'application de cette relation est soumise à l'hypothèse que les pores soient cylindriques. Connaissant la quantité de mercure ayant pénétré dans le solide et la pression d'équilibre, il est possible de déterminer la taille des macropores.

6. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est une technique permettant de séparer des molécules d'un mélange complexe. Cette technique s'applique aux composés facilement vaporisables par chauffage, mais sans que ces derniers se décomposent. L'appareil utilisé, présenté en Figure II-12, est un équipement de chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse.



Figure II-12 - Photographie de l'appareil GC-MS Shimadzu QP2010 SE

L'appareil est constitué d'un bloc « séparation » et d'un bloc « détection ». Le bloc « séparation » est constitué d'une colonne (DB5-MS UI) situé dans un four, d'un injecteur et d'un détecteur. Le bloc « détection » est un spectromètre de masse. L'échantillon injecté est ionisé et passe dans le détecteur par l'intermédiaire d'un quadripôle séparant les ions. Ce quadripôle est composé de quatre « pôles » où circule une tension positive dans les deux pôles qui s'opposent et une tension négative dans les deux autres pôles ainsi que d'une radiofréquence. L'utilisation d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse permet d'identifier les différentes espèces présentes dans l'échantillon grâce au spectre de masse et à une librairie sans injecter d'échantillon référence pour identifier les constituants.

Les produits issus de la réaction de transestérification sont composés de plusieurs esters méthyliques qui ont chacun un point de fusion différent. Pour obtenir l'ensemble des esters

méthyliques sur un même chromatogramme, un cycle de chauffe a été optimisé (Figure II-13A).

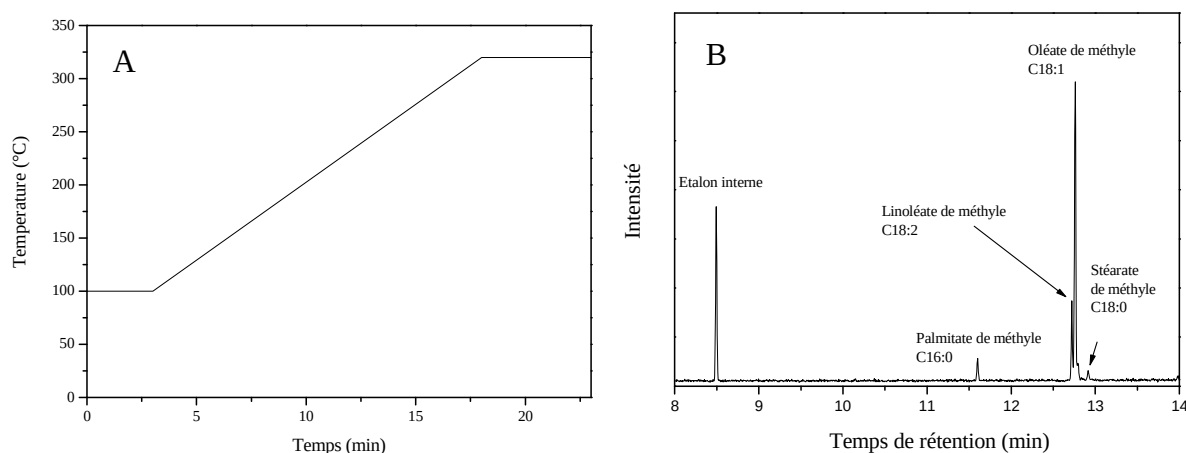


Figure II-13 - Cycle de chauffe (A) et chromatogramme typique obtenu par GC-MS (B)

Lors de l'analyse, l'échantillon est ionisé et tous les ions sont détectés et suivis en même temps. Le total de ces ions donne un chromatogramme appelé « TIC » pour Total Ion Chromatogram. Il est alors possible d'extraire de façon judicieuse de ce chromatogramme complet, quelques ions et de retracer un chromatogramme correspondant à chacun de ces ions qui sont choisis de manière à ce qu'ils soient représentatifs de chaque espèce. Cela permet d'affiner le chromatogramme et de le rendre plus sélectif et plus sensible.

Les échantillons sont purifiés de façon à récupérer uniquement les esters méthyliques, car les produits de la réaction de transestérification sont composés d'esters et d'acides gras. La Figure II-13B montre un chromatogramme typique obtenu par GC-MS. Le laurate de méthyle a été choisi comme étalon interne et a été ajouté aux produits de réaction pour la quantification des produits. Son temps de rétention est le plus court.

7. Purification des produits des réactions de transestérification

Pour purifier les produits des réactions de transestérification, la séparation des acides gras et des esters est nécessaire et des cartouches SPE (*Solid Phase Extraction*) ont été utilisées. Cette technique d'extraction est simple d'emploi, rapide et efficace. Le principe consiste à adsorber les composés à séparer sur une phase stationnaire contenue dans la cartouche, puis ils sont récupérés lors de l'élution de ces composés. La phase stationnaire est composée de silice dont la surface spécifique est de 500 m²/g. Sur cette silice sont greffées des chaînes

octadécyles (composées de 18 atomes de carbone) qui favorisent l'adsorption des composés. Le protocole mis au point pour séparer les esters des acides gras est le suivant :

- conditionnement : l'activation de la phase et son conditionnement sont effectués en introduisant 1 mL d'acétonitrile. Ensuite, l'acétonitrile est évacué en gardant la phase stationnaire mouillée.
- dépôt de l'échantillon : 100 μ L de produits de la réaction sont placés dans la cartouche ainsi que 100 μ L d'une solution contenant 0,4% d'étalon interne (laurate de méthyle).
- élution des composés : la récupération des esters méthyliques se fait en injectant 9 mL d'acétonitrile dans la cartouche puisque les esters sont miscibles dans ce solvant, contrairement aux acides gras.
- pour compléter la purification, 1 mL d'acétonitrile est ajouté aux 9 mL déjà présents.

L'étalon interne et l'échantillon sont déposés dans les cartouches SPE en même temps afin que la purification n'influence pas le rendement de la réaction. En effet, l'étalon interne étant un ester, si les esters méthyliques ne sont pas totalement récupérés, il en sera de même pour l'étalon interne.

8. Calcul du rendement des réactions de transestérification

L'efficacité du biocatalyseur vis à vis d'une réaction de transestérification est évaluée en calculant le rendement de la réaction. Par définition, le rendement est le rapport entre la quantité de produit obtenue et la quantité maximale théorique que l'on peut obtenir. La détermination des quantités des produits de réaction s'effectue par chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, 100 μ L de produits de réaction sont dilués dans l'acétonitrile ou l'hexane contenant du laurate de méthyle à 0,004% jouant le rôle d'étalon interne. L'étalon interne permet de quantifier les esters méthyliques en rapportant les aires de ces esters (A_{EM}) à l'aire de l'étalon interne (A_{EI}) $\frac{A_{EM}}{A_{EI}}$. Auparavant, une droite d'étalonnage est établie à partir d'une solution contenant uniquement les esters méthyliques issus de l'huile de colza. Ces esters ont été obtenus en transestérifiant par voie chimique l'huile en suivant le protocole donné dans la publication de Freedman *et al.*¹⁴. Dans cette expérience, 13 g de méthanol sont ajoutés à 60 g d'huile de colza et l'ensemble est porté à 60°C. Ensuite, 0,39 g de méthoxyde de potassium est incorporé au mélange (0,5% de la masse d'huile). Le tout est placé sous un réfrigérant qui comporte une garde contenant du CaCl_2 à sa sortie pour capter l'eau afin qu'elle ne s'incorpore pas au mélange. La réaction dure 24 heures. La solution est ensuite filtrée. Pour séparer le glycérol formé, on ajoute de l'éther de pétrole ainsi que du sulfate de sodium afin

de piéger l'eau présente dans le milieu réactionnel. Une nouvelle étape de filtration est nécessaire. Enfin, l'utilisation de l'évaporateur rotatif permet d'extraire l'éther de pétrole, mais également l'excès de méthanol.

Pour établir la droite d'étalonnage, nous avons considéré plusieurs cas. Pour un rendement de 100% de la réaction de transestérification par voie chimique, la solution d'acétonitrile (10 mL) contient 100 μL d'esters méthyliques purs ; pour un rendement de 75%, la solution contient 75 μL etc. Ainsi en injectant 1 μL de ces différentes solutions dans la GC-MS, il est possible de connaître les quantités des esters méthyliques produits en mesurant les aires des différents pics et en rapportant ces aires à l'aire de l'étalon interne. La droite d'étalonnage a ainsi pu être construite (Figure II-14).

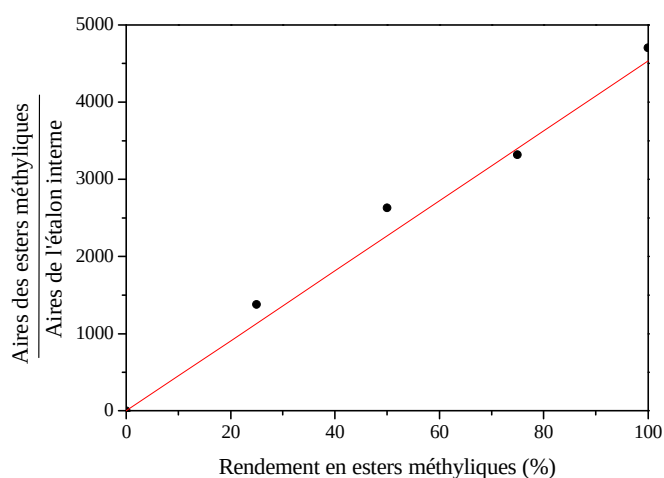


Figure II-14 - Droite d'étalonnage des esters méthyliques

Dans le cas de la méthanolyse de l'huile de colza, le rapport molaire stœchiométrique entre le méthanol et l'huile est de 3. Si le rapport molaire est inférieur à 3, c'est le méthanol qui joue le rôle de réactif limitant, alors que si le rapport molaire est supérieur à 3, le réactif limitant est l'huile. On doit noter que le rapport molaire entre le méthanol et l'huile est important pour la réaction de transestérification. Selon que le méthanol ou l'huile est l'espèce limitante, le calcul du rendement est différent.

- Cas 1 : le méthanol est le réactif limitant

Pour des rapports molaires méthanol/huile inférieurs à 3, le rendement est le rapport entre le nombre de moles d'esters méthyliques produits (n_{EM}) et le nombre de moles de méthanol (n_{MeOH}) présents dans la réaction.

Il s'exprime donc par la relation suivante:

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{n_{\text{EM}}}{n_{\text{MeOH}}} \cdot 100$$

En analysant par GC-MS l'échantillon issu d'une réaction de transestérification, nous pouvons en déduire le volume d'esters méthyliques (V_{EM}) présents à partir de la droite d'étalonnage:

$$n_{\text{EM}} = \frac{V_{\text{EM}} \cdot \rho_{\text{EM}}}{M_{\text{EM}}}$$

avec ρ_{EM} la masse volumique moyenne et M_{EM} la masse molaire moyenne des esters méthyliques

Cette donnée permet de déduire le nombre de moles d'esters méthyliques et le rendement peut être calculé à partir du nombre de moles de méthanol qui est introduit.

- Cas 2 : l'huile est le réactif limitant

Dans les cas où le rapport méthanol/huile est supérieur à 3, une transestérification totale d'un échantillon d'huile de colza est alors effectuée par voie chimique. Le rapport des aires $\frac{A_{\text{EM}}}{A_{\text{EI}}}$ est déterminé et sert de référence (Γ_{ref}). Par ailleurs, ce même rapport $\Gamma_{\text{éch}}$ est déterminé avec l'échantillon issu d'une réaction dont on veut connaître le rendement. Ce rendement est alors calculé en rapportant à la référence.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\Gamma_{\text{éch}}}{\Gamma_{\text{ref}}} \cdot 100$$

- Cas 3 : Réaction en condition stœchiométrique

Pour un rapport méthanol/huile égal à 3, les deux méthodes (cas 1 ou 2) peuvent être appliquées.

9. Plan d'expérience

L'optimisation des conditions de la réaction de transestérification a été réalisée à l'aide d'un plan d'expérience. Les plans d'expériences sont utilisés pour optimiser les conditions d'un système en limitant le nombre d'expériences. Dans notre cas, le système étudié est la réaction de transestérification qui a pour valeur de sortie le rendement de cette réaction. Plusieurs paramètres peuvent influencer le rendement, tel que le rapport molaire méthanol/huile ou la

température. La variation successive et systématique de tous les paramètres conduirait à réaliser des centaines d'expériences. Ces paramètres sont souvent dépendants les uns des autres. Nous avons choisi comme type de plan d'expérience un plan factoriel composite à deux niveaux. Le plan factoriel composite est composé d'un nombre limité de niveaux pour chaque facteur. Dans notre étude, le plan étudié est un plan 2^4 . Cela signifie que quatre facteurs ont été investigués ayant chacun deux niveaux. De plus, il y a également des points situés au centre du domaine d'étude. Ce type de plan permet de modéliser mathématiquement le système étudié. Cette méthode est un outil statistique et mathématique qui s'adapte à un modèle afin de définir les interactions existantes entre les différents facteurs. Les plans d'expériences utilisent un vocabulaire spécifique. Le terme « facteur » correspond au paramètre utilisé et le terme « niveau » fait référence aux différentes valeurs prises par les facteurs.

Plusieurs paramètres ont été pris en considération, comme le rapport molaire méthanol/huile, la température, le temps de réaction, l'agitation ou encore l'ajout d'eau (ou autre co-solvant) dans la réaction. Le volume d'huile de colza utilisé a été maintenu constant à 600 μL . L'agitation a été fixée à 100 tours par minute et la masse de catalyseur a été prise à 10 mg.

Références bibliographiques

- ¹ G. Mathis, P. Leempoel, J.C. Ravey, C. Selve, J.J. Delpuech, A novel class of nonionic microemulsions: fluorocarbons in aqueous solutions of fluorinated poly(oxyethylene) surfactants, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6162-6171
- ² J.C. Ravey, M.J. Stébé, Properties of fluorinated non-ionic surfactant-based systems and comparison with non-fluorinated systems, *J. Colloids Surfaces A*, **1994**, 84, 11-31
- ³ J.L. Blin, M.J. Stébé, Perfluorodecalin Incorporation in fluorinated surfactant-water system: Tailoring of mesoporous materials pore size, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 11399-11405
- ⁴ J.L. Blin, M.J. Stébé, Effect of fluorocarbon addition on the structure and pore size diameter of mesoporous materials prepared with a fluorinated surfactant, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2005**, 87, 67-76
- ⁵ M. Hajar, F. Vahabzadeh, S. Shokrollahzadeh, Empirical modeling of the enzymatic methanolysis of canola oil, *Transactions C : Chemistry and chemical engineering*, **2010**, 17, 97-105
- ⁶ R.K. Iler, *The Colloid Chemistry of Silica and Silicates*, **1979**
- ⁷ M.J. Yuan, J.W. Tang, C.Z. Yu, Y.H. Chen, B. Tu, D.Y. Zhao, The upper temperature limit in cooperative assembly of ordered mesoporous, *Chem. Lett.*, **2003**, 32, 660-661
- ⁸ J. Li, Q. Hu, H. Tian, C. Ma, L. Li, J. Cheng, Z. Hao, S. Qiao, Expanding mesoporosity of triblock-copolymer-templated silica under weak synthesis acidity, *J. Colloid Interface Sci.*, **2009** 339, 160–167
- ⁹ N. Du, M.J. Stébé, R. Bleta, J.L. Blin, Preparation and characterization of porous silica templated by a nonionic fluorinated systems, *Colloids Surf., A*, **2010**, 357, 116-127
- ¹⁰ J.L. Blin, R. Bleta, J. Ghanbaja, M.J. Stébé, Fluorinated emulsions: Templates for the direct preparation of macroporous – mesoporous silica with a highly ordered array of large mesopores, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2006**, 94, 74–80
- ¹¹ S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1938**, 60, 309-319

¹² E.P. Barret, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 37-41

¹³ A. Galarneau, D. Desplantier, R. Dutartre, F. Di Resto, Micelle-templated silicates as a test bed for methods of mesopore size evaluation, *Micropor. Mesopor. Mater.*, **1999**, 27, 297-308

¹⁴ B. Freedman, E.H. Pryde, T.L. Mounts, Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 61, 1638-1643

CHAPITRE III – PHYSISORPTION DE LA LIPASE MM-L SUR UN SUPPORT SILICATE MESOPOREUX

A.	SUPPORTS MESOPOREUX SILICATES.....	79
1.	MATERIAU SBA-15.....	79
2.	MATERIAU MMF	81
3.	STABILITE DES MATERIAUX SBA-15 ET MMF DANS LES CONDITIONS D’IMMOBILISATION DE L’ENZYME	82
a.	<i>Matériau SBA-15</i>	82
b.	<i>Matériau MMF</i>	83
B.	PREPARATION DU BIOREACTEUR MESOPOREUX PAR PHYSISORPTION.....	85
1.	MATERIAU SBA-15.....	86
2.	MATERIAU MMF	90
3.	DISCUSSION DES RESULTATS D’ADSORPTION DE LA LIPASE.....	93
C.	TESTS CATALYTIQUES PRELIMINAIRES.....	95
1.	METHANOLYSE DE L’HUILE DE COLZA	96
2.	INFLUENCE DU CO-SOLVANT SUR LE RENDEMENT DE LA REACTION DE TRANSESTERIFICATION.....	97
3.	REUTILISATION DU BIOREACTEUR	100
D.	PLAN D’EXPERIENCES	101
1.	OPTIMISATION DES CONDITIONS REACTIONNELLES	102
2.	ETUDE CINETIQUE DANS LES CONDITIONS OPTIMISEES	107
3.	REUTILISATION DU BIOREACTEUR.....	109
4.	CARACTERISATION DU BIOREACTEUR APRES UTILISATION	109
5.	ETUDE DE L’AJOUT PROGRESSIF DE METHANOL.....	111
a.	<i>Cinétique</i>	111
b.	<i>Caractérisation du bioréacteur</i>	112
E.	RESUME.....	112

Chapitre III : Physisorption de l'enzyme sur un support silicaté mésoporeux

Ce chapitre est consacré à l'élaboration d'un biocatalyseur en physisorbant la lipase *Mucor miehei* (*Mm-L*) sur des matériaux mésoporeux silicatés synthétisés à l'aide de deux types de tensioactif. L'effet du pH de la solution et des caractéristiques des deux supports sur l'adsorption de la lipase *Mm-L* ont été tout d'abord examinés. Puis, la méthanolyse de l'huile de colza est réalisée à l'aide du bioréacteur. Enfin, les conditions de la réaction de transestérification seront optimisées grâce à l'utilisation d'un plan d'expériences.

Cette étude a débuté par la synthèse de deux matériaux mésoporeux présentant la même structure, mais ayant une taille de pores différente. Cela a permis d'étudier l'influence des caractéristiques structurales sur l'adsorption physique de l'enzyme. Ensuite, nous avons examiné l'influence du pH de la solution enzymatique sur la quantité d'enzyme adsorbée. Puis, les bioréacteurs ont été utilisés pour effectuer la réaction de transestérification de l'huile de colza.

A. Supports mésoporeux silicatés

Ces matériaux ont été synthétisés selon le mécanisme coopératif d'autoassemblage (CTM) décrit dans le chapitre 1. Le protocole de synthèse des deux supports mésoporeux désignés SBA-15 et MMF est détaillé dans le chapitre 2.

1. Matériau SBA-15

Le matériau SBA-15 a été synthétisé à partir d'une solution micellaire de P123. Après les étapes d'élimination du tensioactif par extraction à l'éthanol et de séchage, le matériau est caractérisé. Une analyse par diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) permet de déterminer la structure du matériau. La Figure III-1 représente le diffractogramme SAXS du matériau mésoporeux SBA-15.

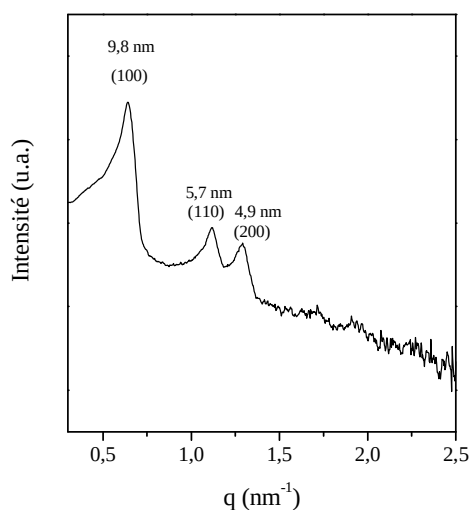


Figure III-1 - Diffractogramme SAXS du matériau SBA-15

D'après ce diffractogramme, on peut observer trois pics situés à 9,8 nm, 5,7 et 4,9 nm caractéristiques d'un arrangement hexagonal des pores car le rapport entre le premier pic et les deux autres pics est de $\sqrt{3}$ et 2. La distance de répétition des pores est calculée à partir du premier pic. Pour ce matériau, la distance entre les plans (100) est de 9,8 nm. Une analyse par

adsorption-désorption d'azote a également été effectuée sur le matériau SBA-15 pour déterminer sa surface spécifique, la taille des pores et son volume poreux (Figure III-2).

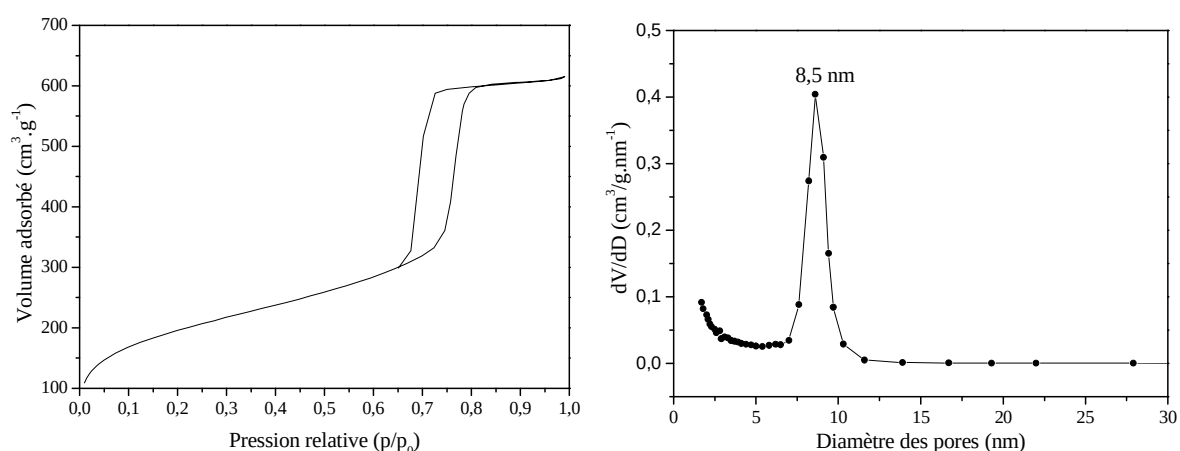


Figure III-2 - Isotherme d'adsorption-désorption d'azote et distribution de la taille des pores du matériau SBA-15

L'isotherme d'adsorption-désorption d'azote est une isotherme de type IV, caractéristique d'un matériau mésoporeux. De plus, la distribution de la taille des pores est uniforme et centrée sur 8,5 nm. L'image réalisée par microscopie électronique à balayage confirme la structure et la mésoporosité du matériau (Figure III-3). Le Tableau III-1 récapitule les caractéristiques du matériau SBA-15.

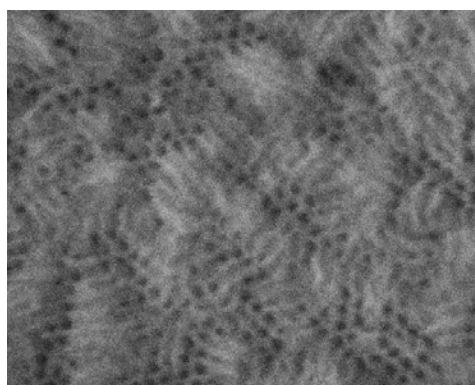


Figure III-3 - Image MEB du matériau SBA-15

Tableau III-1 - Caractéristiques du matériau SBA-15

Support	Paramètre de maille a_0 (nm)	Diamètre des pores (nm)	Surface spécifique S_{BET} (m²/g)	Volume poreux V_p (cm³/g)	Epaisseur du mur e (nm)
SBA-15	11,3	8,5	700	0,72	2,8

2. Matériau MMF

Ce matériau a été préparé à partir d'un mélange de tensioactifs fluorés. Le protocole est détaillé dans le chapitre 2. Le diffractogramme SAXS présenté en Figure III-4 montre trois pics situés à 5,8 nm, 3,4 et 2,9 nm, caractéristiques d'un arrangement hexagonal des pores. La distance entre les plans (100) est de 5,8 nm.

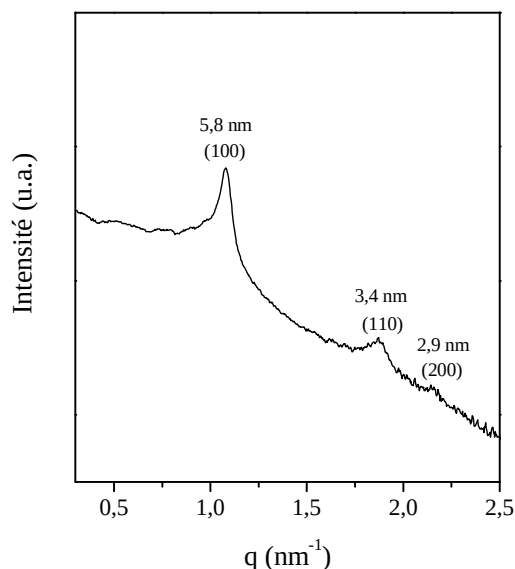


Figure III-4 - Diffractogramme SAXS du matériau MMF

Le résultat de l'analyse par adsorption-désorption d'azote permet de confirmer la mésoporosité du matériau car l'isotherme d'adsorption est de type IV. La distribution de la taille des pores est étroite et centrée sur 5,7 nm montrant l'homogénéité des pores. Le Tableau III-2 récapitule les caractéristiques du matériau MMF.

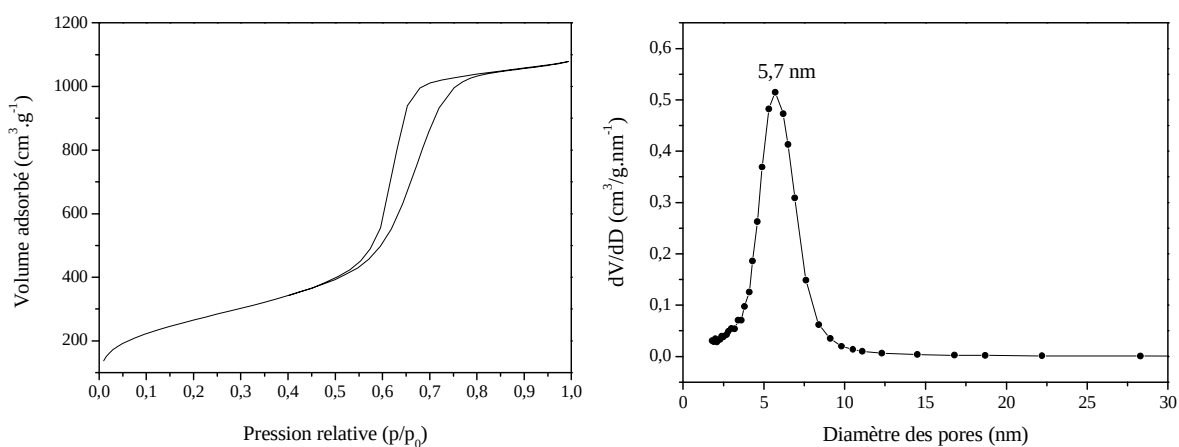


Figure III-5 - Isotherme d'adsorption-désorption d'azote et distribution de la taille des pores du matériau MMF

Tableau III-2 - Caractéristiques du matériau MMF

Support	Paramètre de maille a_0 (nm)	Diamètre des pores (nm)	Surface spécifique S_{BET} (m ² /g)	Volume poreux V_p (cm ³ /g)	Epaisseur du mur e (nm)
MMF	6,7	5,7	1000	1,5	1,0

3. Stabilité des matériaux SBA-15 et MMF dans les conditions d'immobilisation de l'enzyme

Lors de l'adsorption de l'enzyme, ces deux matériaux sont plongés dans une solution de TRIS à pH 3, 6 et 10. Il est donc intéressant de connaître l'influence du pH de la solution sur les propriétés des matériaux. Pour cela, le protocole est identique à celui de l'immobilisation de l'enzyme, à la différence que la solution tampon ne contient pas la lipase.

a. Matériau SBA-15

Des analyses par diffraction des rayons X et adsorption-désorption d'azote ont été réalisées pour examiner la stabilité du matériau lors de l'immobilisation. La Figure III-6 montre que la structure du matériau n'est pas affectée par les conditions d'immobilisation quel que soit le pH de la solution. En effet, sur les 3 diffractogrammes, les pics de diffraction apparaissent clairement et sont de même intensité. De plus, les rapports entre les premières réflexions et les réflexions secondaires sont toujours égaux à $\sqrt{3}$ et 2.

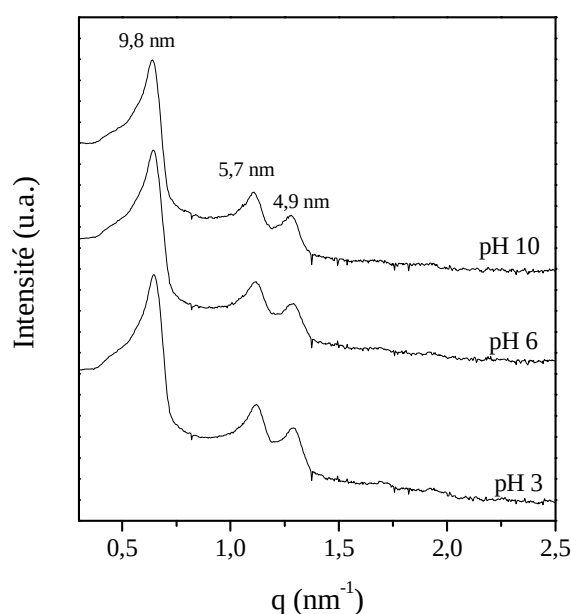


Figure III-6 – Diffractogrammes SAXS du matériau SBA-15 après immersion dans la solution à différents pH

Concernant la texture du matériau, d'après la Figure III-7, la forme de l'isotherme d'adsorption prouve que la mésoporosité du matériau est conservée. Le diamètre des pores n'a également pas été affecté par l'immersion dans les solutions à différents pH. Cependant, la surface spécifique et le volume poreux sont modifiés par ce traitement. En effet, à pH 10, la surface spécifique chute de 700 m²/g à 380 m²/g et le volume poreux passe de 0,72 cm³/g à 0,65 cm³/g.

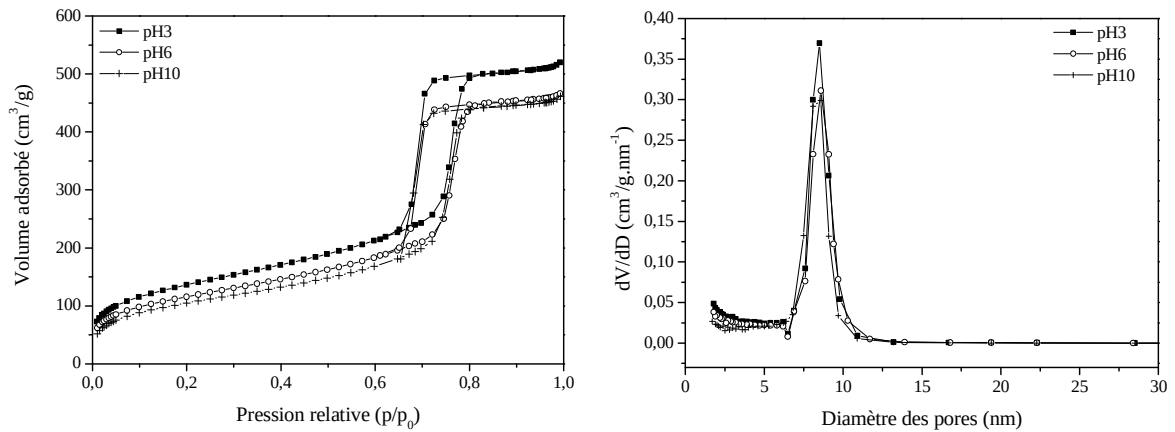


Figure III-7 - Isotherme d'adsorption et distribution de la taille des pores après immersion du matériau SBA-15 dans la solution à différents pH

b. Matériau MMF

Une étude similaire a été réalisée sur le matériau MMF. La Figure III-8 représente les diffractogrammes SAXS du matériau après traitement dans les solutions à différents pH. On peut constater qu'à pH 3 et 6, les pics du deuxième ordre sont moins intenses que ceux du matériau initial et ont totalement disparu après immersion dans la solution tampon à pH 10. La structure des mésopores est donc dégradée.

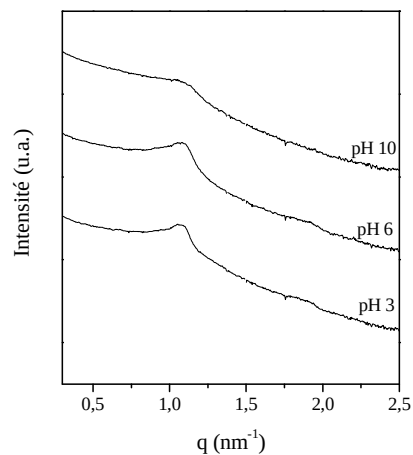


Figure III-8 - Diffractogrammes SAXS du matériau MMF après immersion dans la solution à différents pH

L'analyse par adsorption-désorption d'azote (Figure III-9) montre que le matériau conserve une mésoporosité malgré le traitement, car l'isotherme reste de type IV. Cependant, le volume adsorbé diminue pour les traitements effectués à pH 3 et 6, cela est plus particulièrement marqué pour le matériau ayant été plongé dans la solution à pH 10. Quel que soit le pH de la solution, la taille des pores diminue légèrement, passant de 5,7 nm à 5,2 nm (5,1 nm à pH 10). Les valeurs de dV/dD sont plus faibles que celles du matériau MMF initial, en particulier pour le matériau qui a été plongé dans la solution à pH 10. Cela prouve une perte de mésoporosité. De plus, la surface spécifique et le volume poreux baissent pour les trois pH. Le Tableau III-3 est un récapitulatif des caractéristiques des matériaux SBA-15 et MMF après immersion dans les solutions à différents pH.

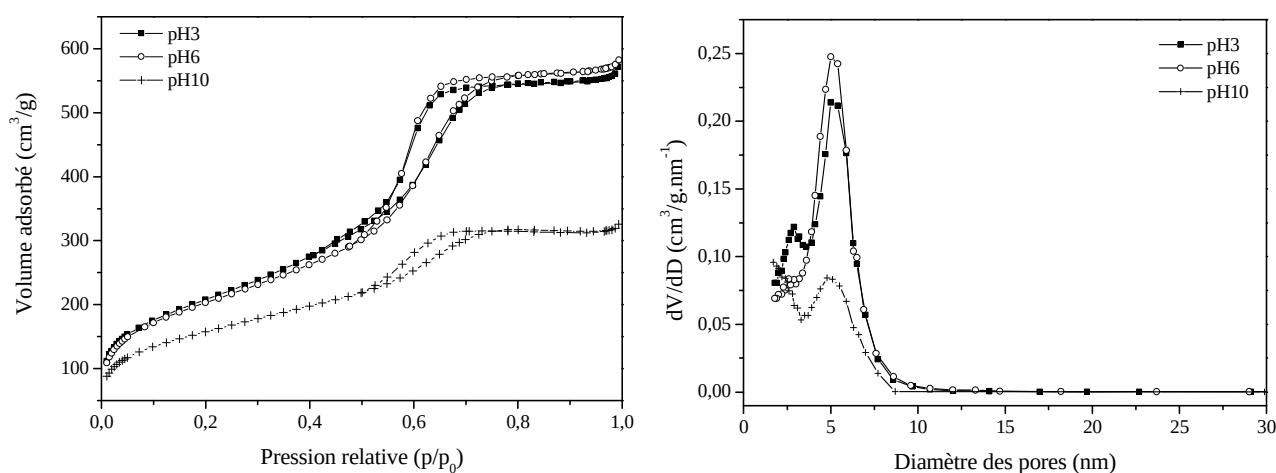
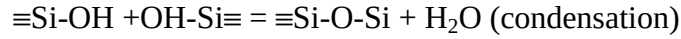
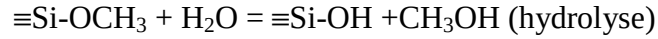


Figure III-9 - Isotherme d'adsorption-désorption d'azote et distribution de la taille des pores après immersion du matériau MMF dans la solution tampon

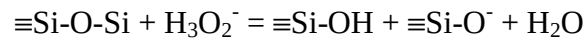
Tableau III-3 - Récapitulatif des caractéristiques des matériaux SBA-15 et MMF après immersion dans les solutions à différents pH

Support	pH	a_0 (nm)	Diamètre des pores (nm)	Surface spécifique S_{BET} (m²/g)	Volume poreux V_p (cm³/g)
MMF	3	6,7	5,2	751	0,76
	6	6,7	5,2	732	0,79
	10	-	5,1	564	0,4
SBA-15	3	11,3	8,5	490	0,72
	6	11,3	8,5	417	0,65
	10	11,3	8,5	380	0,65

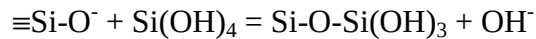
La stabilité de ces deux matériaux est en relation avec leur état de surface. L'hydrolyse et la condensation de la source de silice (TMOS) conduisent à la formation d'espèces composées d'éléments Si-O-Si selon les réactions suivantes :



Au cours de ces réactions, les groupements silanols sont formés à la surface. L'eau adsorbée sur ces groupements est à l'origine de l'hydrolyse des liaisons Si-O-Si. Il a été rapporté dans la littérature qu'il y a un réarrangement de la silice entre pH 5 et 10 car la vitesse de dissolution augmente fortement¹. Le passage de pH 3 à pH 8 a pour conséquence de tripler l'ordre de grandeur de la vitesse de dissolution. Pour les pH élevés, les ions OH⁻ (ou H₃O₂⁻) se trouvant en concentration élevée entraînent une attaque nucléophile des atomes de silice liés aux siloxanes de surface, comme le montre l'équation suivante :



Ces silanols subissant l'attaque des anions H₃O₂⁻ conduisent à la formation de silanodiol [=Si-(OH)₂] et d'anions polysilicatés [≡Si-O⁻]. Ensuite, il y a formation de silanotriol [-Si(OH)₃] et d'acide orthosilicique [Si(OH)₄] due à la présence de H₃O₂⁻ qui attaque respectivement [=Si-(OH)₂] et [-Si(OH)₃]. La recondensation des espèces orthosiliciques et polysilicatées a lieu, comme le montre la réaction suivante :



Par conséquent, la silice subit des phénomènes de dissolution et recondensation.

La caractérisation des matériaux ayant été plongés dans les solutions tampon montre que le matériau SBA-15 présente une meilleure stabilité comparée au matériau MMF. La structure des mésopores est préservée, alors que pour le matériau MMF, on observe un début d'effondrement de la structure des pores. L'épaisseur des parois du matériau SBA-15 étant plus importante explique cette différence de comportement. En effet, le matériau SBA-15 a une épaisseur de mur de 2,8 nm alors que le matériau MMF possède des murs de seulement 1 nm. Le matériau SBA-15 présente également un plus haut degré de condensation de la silice que le matériau MMF. Un autre groupe a étudié la dissolution de la silice pour des matériaux de type MCM-41, SBA-15 et un matériau HMS, en solution aqueuse dans le cadre du traitement des eaux². Ces chercheurs ont montré que la basicité de la solution dans laquelle sont plongés les matériaux mésoporeux influence leur dégradation. C'est pourquoi les auteurs

proposent une utilisation des matériaux dans des conditions acides pour ralentir leur dissolution. Cependant, ils ont montré que le matériau SBA-15 n'est pas affecté si les conditions sont neutres (pH 7). Guthrie *et al.* se sont également intéressés à la stabilité du matériau MCM-41 dans une solution aqueuse³. Leur résultat met en évidence une métastabilité du matériau dans une eau déminéralisée par rapport à son analogue amorphe. Ils expliquent cela par le fait que le matériau MCM-41 se déstructure en présence d'eau. Une précipitation de cette silice désorganisée sur les particules de MCM-41 est observée, produisant une couche protectrice à la surface du matériau MCM-41.

B. Préparation du bioréacteur mésoporeux par physisorption

Les isothermes d'adsorption de l'enzyme ont été réalisés dans le but de déterminer la quantité de lipase adsorbée sur le matériau. Le protocole d'adsorption d'enzyme, le calcul de la quantité d'enzyme adsorbée et la l'établissement des isothermes d'adsorption sont décrits dans le chapitre 2. Les matériaux SBA-15 et MMF ont été utilisés comme support d'immobilisation.

1. Matériau SBA-15

En faisant varier la quantité initiale de lipase dans la solution, l'adsorption de cette dernière sur le support peut être mise en évidence par infrarouge. La Figure III-10 présente des spectres IR montrant l'adsorption de l'enzyme sur le matériau pour une immobilisation à pH 6 et l'on observe entre autres les vibrations caractéristiques de la lipase. On peut observer une augmentation des bandes amide II ($1510-1580\text{ cm}^{-1}$) et III (1460 cm^{-1}) lorsque la concentration en lipase augmente. Cette augmentation met en évidence l'adsorption croissante de l'enzyme sur le matériau. La bande amide A (3333 cm^{-1}) est également caractéristique de la lipase. La diminution de l'intensité de la bande des silanols libres (3740 cm^{-1}) prouve à nouveau la présence d'enzyme sur le matériau.

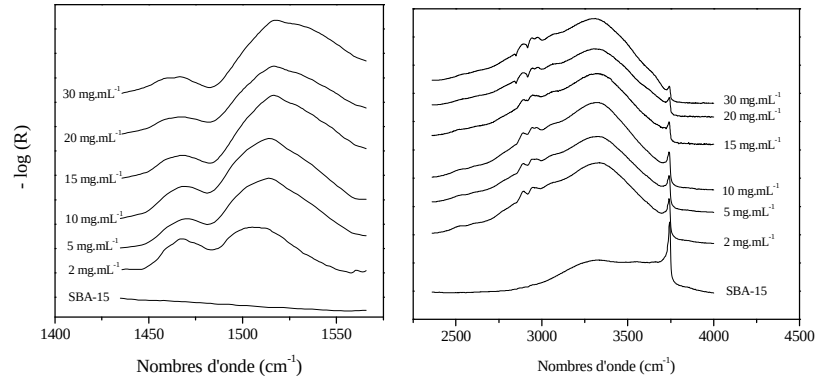


Figure III-10 - Spectres IR montrant les bandes caractéristiques de l'enzyme lors de son adsorption sur le matériau SBA-15 à différentes concentrations de lipase dans une solution à pH 6

Une analyse par adsorption-désorption d'azote des matériaux après immobilisation permet aussi de caractériser l'adsorption. Ce type d'analyse a été effectué sur les supports après immobilisation de l'enzyme à pH 3, 6 et 10. Ces analyses sont présentées sur la Figure III-11.

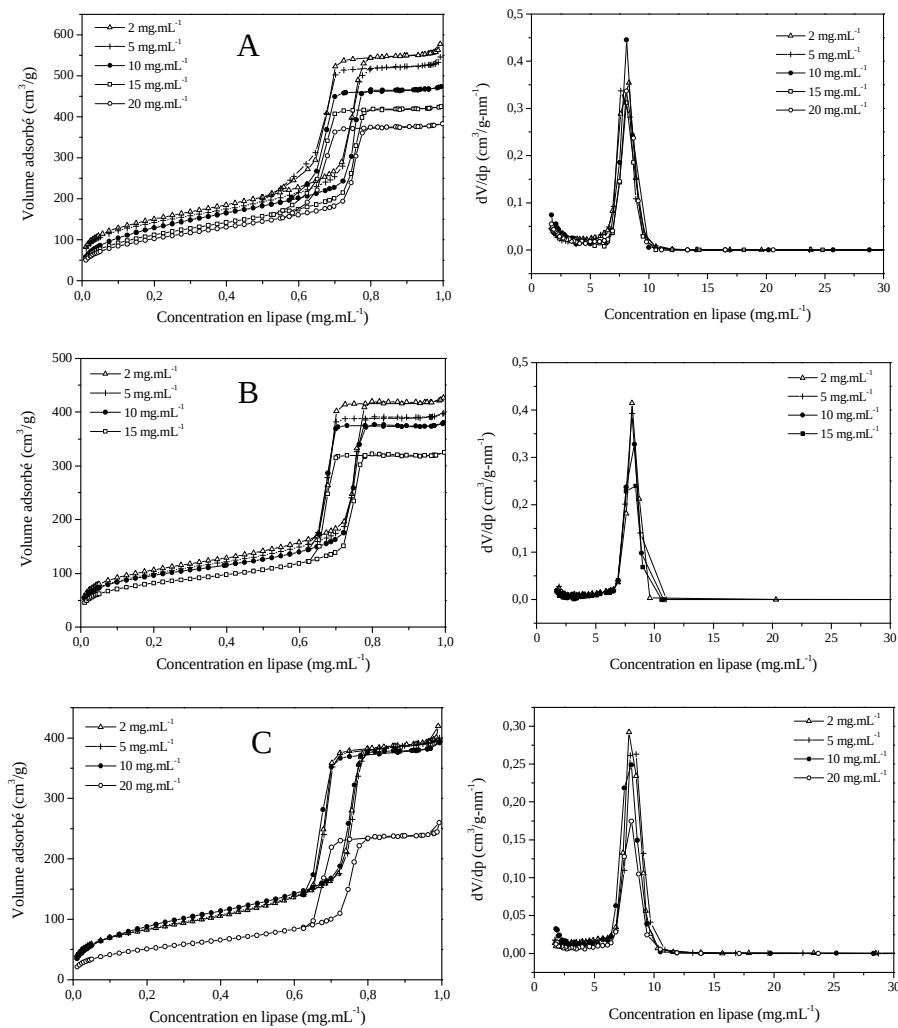


Figure III-11 - Isotherme d'adsorption-désorption d'azote et distribution de la taille des pores du matériau SBA-15 après immobilisation à pH3 (A), 6 (B) et 10 (C)

Les isothermes d'adsorption d'azote du matériau SBA-15 après immobilisation dans différentes conditions sont toujours de type IV, montrant la mésoporosité du support. D'après la Figure III-12, on peut voir que le volume adsorbé diminue lorsque la concentration en enzyme augmente, et ce, quel que soit le pH de la solution d'immobilisation. Ce résultat met en évidence une hausse du taux d'adsorption de l'enzyme. La valeur dV/dD issue de la distribution de la taille des pores est plus faible que la valeur dV/dD du matériau initial. Cela constitue une nouvelle fois la preuve de l'adsorption de l'enzyme. La surface spécifique et le volume poreux diminuent avec l'augmentation de la concentration en lipase de la solution. La diminution du volume poreux aux trois pH indique que l'enzyme est bien adsorbée à l'intérieur des pores. Par contre, la taille des pores reste constante.

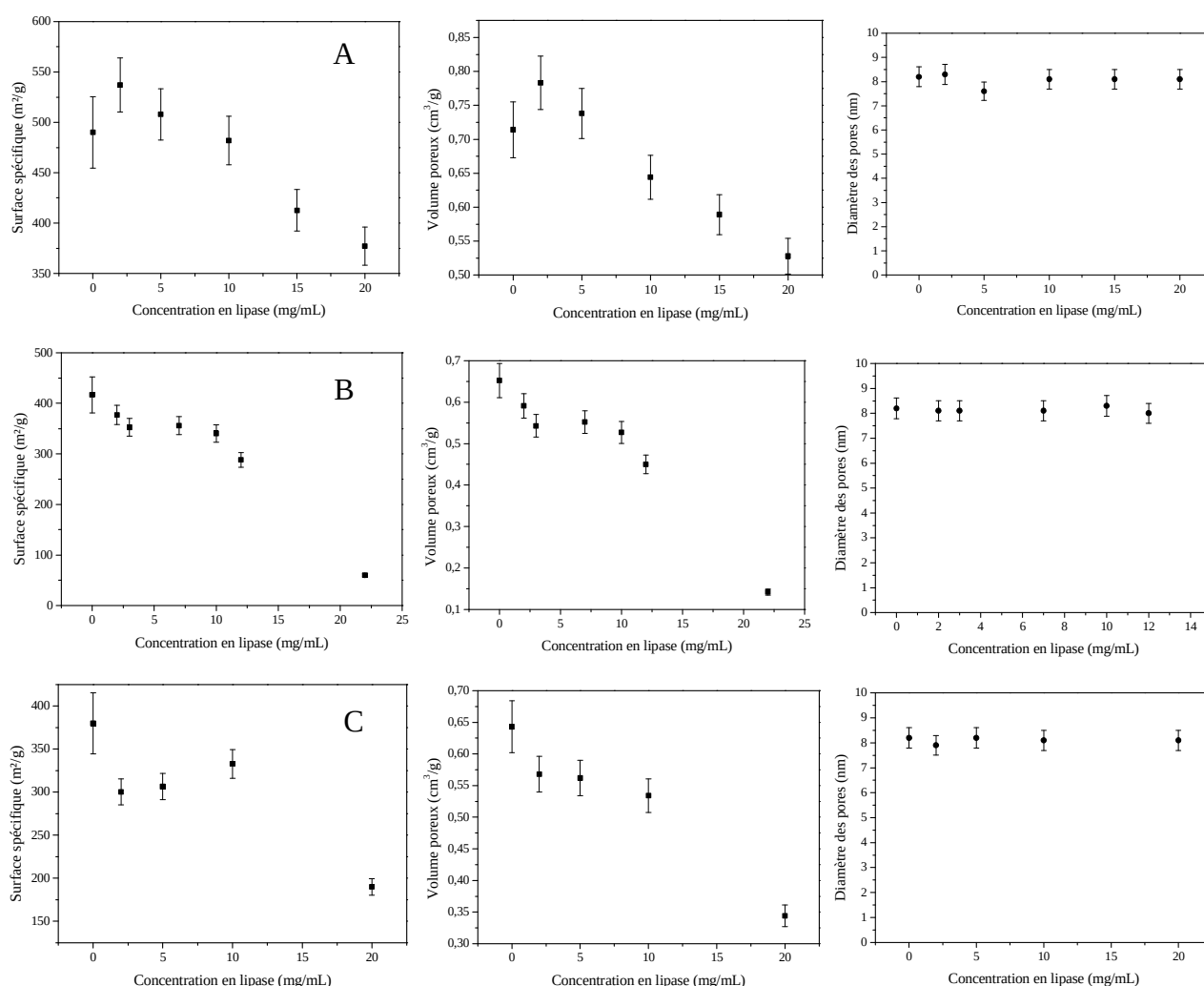


Figure III-12 - Variation de la surface spécifique, du volume poreux et de la taille des pores du matériau SBA-15 en fonction de la concentration initiale en lipase pour les pH d'immobilisation 3 (A), 6 (B) et 10 (C)

Les caractéristiques texturales du matériau SBA-15 pouvant être modifiées par l'adsorption d'enzyme, une analyse par diffraction des rayons X aux petits angles est effectuée pour vérifier la structure du réseau mésoporeux après l'étape d'immobilisation (Figure III-13).

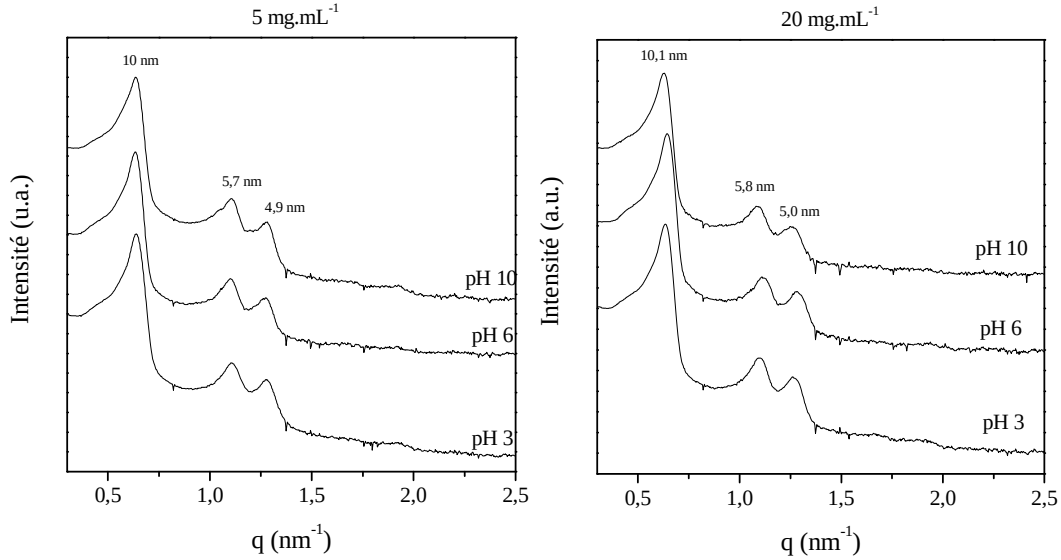


Figure III-13 - Diffractogrammes SAXS du matériau SBA-15 après immobilisation de la *Mm-L* à 5 mg/mL et 20 mg/mL

Nous pouvons voir que l'immobilisation n'affecte pas l'arrangement hexagonal des pores, car les trois réflexions sont bien visibles quelle que soit la concentration initiale en lipase (5mg/mL ou 20 mg/mL).

Pour décrire l'adsorption de l'enzyme sur le matériau SBA-15, nous avons choisi de prendre un modèle qui décrit de manière simple cette adsorption, l'isotherme de Langmuir. Cette isotherme d'adsorption met en relation l'adsorbat et le substrat sur lequel l'adsorbat vient se fixer. Les isothermes d'adsorption présentées sur la Figure III-14 permettent de quantifier la lipase adsorbée sur le matériau. Les points expérimentaux sont en accord avec le modèle de l'isotherme de Langmuir qui a pour équation :

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\max} [C]_{\text{eq}}}{[C]_{\text{eq}} + K_L}$$

où Γ est la quantité d'enzyme adsorbée, $\Gamma_{\max}$ la quantité maximale d'enzyme adsorbée, $[C]_{\text{eq}}$ la concentration résiduelle en enzyme et K_L la constante de Langmuir.

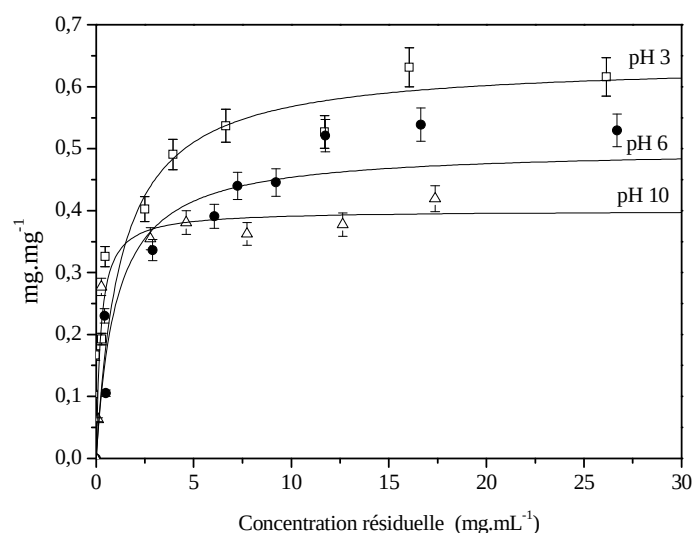


Figure III-14 - Isotherme d'adsorption de la lipase sur le matériau SBA-15 à différents pH d'immobilisation

Les différents paramètres de l'équation de Langmuir sont regroupés dans le Tableau III-4.

Tableau III-4 - Valeurs des paramètres de l'équation de Langmuir pour le matériau SBA-15 à différents pH

Support		pH 3	pH 6	pH 10
SBA-15	K_L (mg.mL ⁻¹)	1,27	1,02	0,23
	$\Gamma_{\max}$ (mg.mg ⁻¹)	0,64	0,5	0,4

Les résultats expérimentaux montrent qu'à pH 3, l'adsorption est plus élevée que pour les autres pH. En effet, il est possible d'immobiliser 0,64 mg de lipase pour 1 mg de silice dans le cas d'une immobilisation dans une solution à pH 3. Par contre, à pH 10, ce taux chute à 0,4 mg par mg de silice. La valeur de K_L caractérise l'affinité entre la lipase et le matériau. Une valeur élevée de ce paramètre signifie la présence d'interactions faibles entre l'enzyme et le support.

2. Matériau MMF

Le matériau MMF présente des caractéristiques texturales différentes de celles du matériau SBA-15 comme un diamètre de pores plus petit, ainsi qu'une surface spécifique et un volume poreux plus élevés. Les conditions d'adsorption de la lipase sur ce support sont identiques à celles du matériau SBA-15. Une analyse par adsorption-désorption d'azote est réalisée sur les

supports après immobilisation de la lipase pour connaître l'évolution des caractéristiques du matériau (Figure III-15).

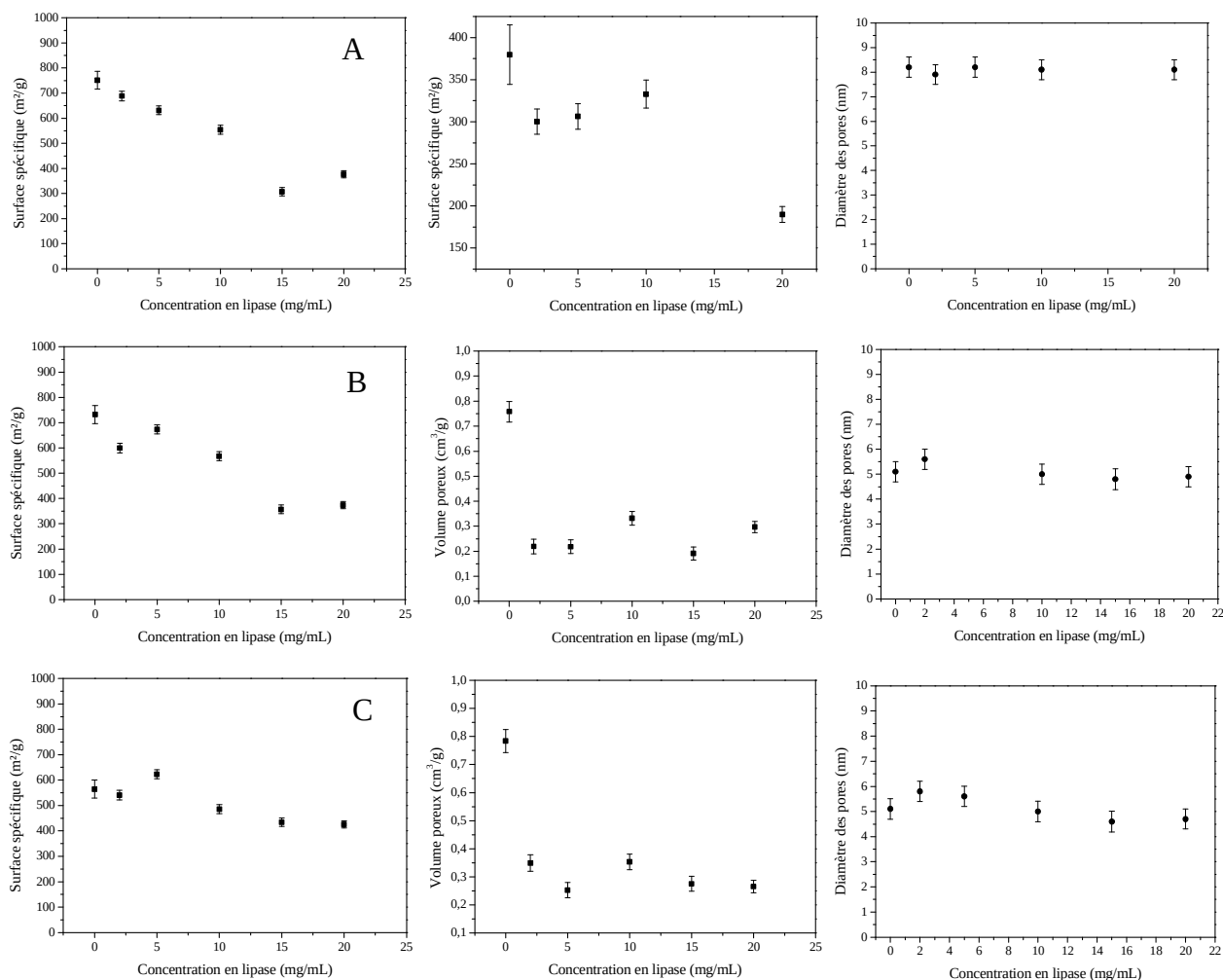


Figure III-15 - Variation de la surface spécifique, du volume poreux et de la taille des pores du matériau MMF en fonction de la concentration initiale en lipase pour une immobilisation réalisée à pH 3 (A), 6 (B) et 10 (C)

La diminution de la surface spécifique et du volume poreux confirment l'augmentation du taux d'enzyme adsorbée lorsque la concentration initiale en lipase de la solution tampon croît, et ce, pour les pH d'immobilisation de 3 et 6. Concernant les caractéristiques du matériau après immobilisation à pH 10, on peut voir que la surface spécifique et le volume poreux ne suivent pas les mêmes évolutions qu'aux pH 3 et 6. En effet, la surface spécifique diminue faiblement, et indique une adsorption de l'enzyme dans ces conditions. L'évolution du volume poreux semble confirmer cette faible adsorption. Ce résultat est validé par les analyses IR décrites ci-après dans ce chapitre. Le diamètre de pores reste inchangé pour les

trois pH. Des analyses SAXS ont également été effectuées pour suivre l'évolution de l'arrangement des mésopores (Figure III-16).

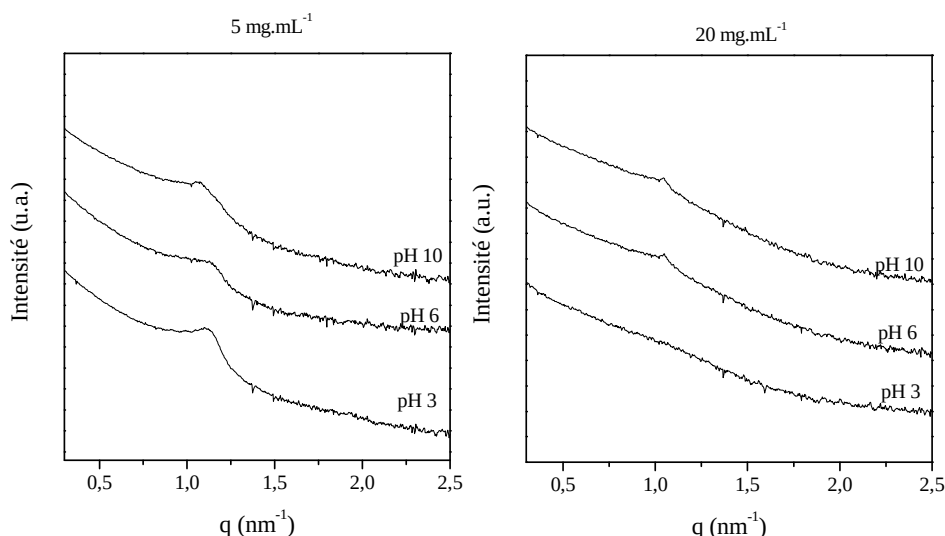


Figure III-16 - Diffractogramme SAXS du matériau MMF après l'immobilisation de la lipase dans une solution ayant une concentration de 5 mg/mL et de 20 mg/mL

D'après la Figure III-16, la structure du matériau est dégradée après l'immobilisation. Les pics de diffraction sont globalement moins intenses, en particulier lorsque l'immobilisation est faite avec une concentration initiale de 20 mg.mL⁻¹. Cela peut être relié au phénomène d'érosion de la silice, présenté auparavant.

De la même manière que pour la matrice SBA-15, nous avons établi l'isotherme d'adsorption pour le matériau MMF. L'ajustement entre les points expérimentaux et le modèle théorique est faite également avec l'équation de Langmuir. La Figure III-17 présente les isothermes d'adsorption aux différents pH d'immobilisation (3, 6 et 10).

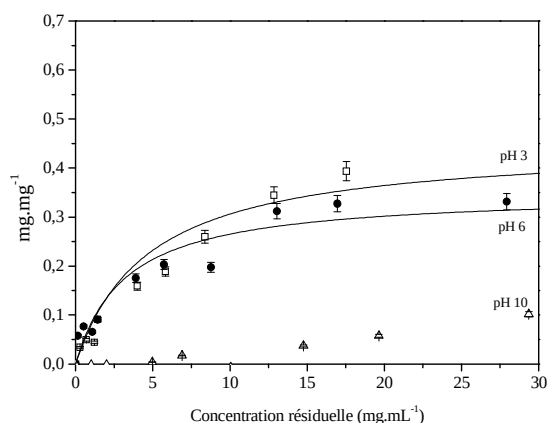


Figure III-17 - Isotherme d'adsorption de la lipase sur le matériau MMF à différents pH d'immobilisation

Le Tableau III-5 est un récapitulatif des valeurs des paramètres de l'équation de Langmuir.

Tableau III-5 - Valeurs des paramètres de l'équation de Langmuir pour le matériau MMF à différents pH

Support		pH3	pH6	pH10
MMF	K_L (mg.mL ⁻¹)	4,7	3,2	-
	$\Gamma_{\max}$ (mg.mg ⁻¹)	0,45	0,35	-

Les résultats d'adsorption sur le matériau MMF suivent la même tendance que pour le matériau SBA-15. L'adsorption maximale a été réalisée à pH 3. En effet, les valeurs de $\Gamma_{\max}$ atteignent 0,45 mg/mg pour une immobilisation réalisée à pH 3, alors qu'elle n'est que de 0,35 pour une immobilisation à pH 6. Par contre, l'immobilisation à pH 10 n'a pas permis de déterminer les valeurs de l'équation de Langmuir, les taux d'adsorption étant trop faibles. Concernant les valeurs du paramètre K_L , elles suivent la même évolution que pour le paramètre $\Gamma_{\max}$, c'est-à-dire que la valeur la plus élevée est obtenue pour une immobilisation à pH 3 (4,7 mg/mL contre 3,2 pour l'immobilisation à pH 6). Cela traduit une adsorption plus efficace à pH 3.

3. Discussion des résultats d'adsorption de la lipase

Les résultats expérimentaux ont montré une variation de la quantité d'enzyme adsorbée en fonction du pH d'immobilisation. Cette variation met en évidence l'affinité de l'enzyme pour le support dans certaines conditions. En effet, à pH 10, le taux d'immobilisation est le plus faible, alors qu'au pH 3, l'adsorption est maximale, quel que soit le matériau utilisé. Cela peut être expliqué en considérant le point isoélectrique de la silice et de la lipase *Mucor miehei*. D'après les travaux de Sahai⁴, le point de charge nulle d'une silice mésoporeuse est d'environ 3,0. En dessous de cette valeur de pH, la surface de la silice est chargée positivement et négativement au dessus. Le point isoélectrique de la lipase est de 4,1. Cette différence entre le point de charge nulle de la silice et le point isoélectrique de la lipase crée une zone où il y a coexistence de charges positives et de charges négatives (Figure III-18). Par exemple, à pH 3, la surface de la silice est chargée négativement ce qui entraîne une interaction entre les groupements de surface de la silice et les charges positives de surface de l'enzyme. L'augmentation du pH de la solution au dessus de 4,1 conduit à un changement progressif de l'état de charge de la surface de l'enzyme (cette dernière devient négative). Par conséquent, des forces répulsives entre le matériau et la lipase limitent l'adsorption. Plus le pH de la

solution tampon est élevé, plus la répulsion est grande. C'est pourquoi à pH 3, l'adsorption est la plus élevée alors qu'à pH 10, elle est la plus faible. Salis *et al.* ont également tenu compte des différentes valeurs des points isoélectriques de la lipase et de leur matériau mésoporeux pour expliquer la physisorption⁵. Une étude menée par Dizge *et al.* a mis en évidence l'influence du pH de la solution enzymatique lors de l'immobilisation⁶. Les auteurs ont investigué l'effet du pH de la solution tampon sur l'adsorption de la lipase *Thermomyces lanuginosus* sur deux polymères microporeux. Il en résulte qu'à pH 6, l'immobilisation est maximale.

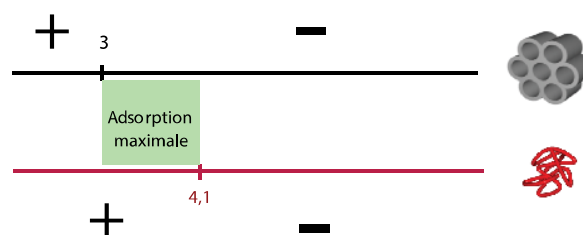


Figure III-18 - Illustration schématique des différents points isoélectriques de la silice et de la lipase

Les isothermes d'adsorption de l'enzyme sur le support permettent aussi de déterminer quel matériau a le plus d'affinité pour l'enzyme. En comparant la Figure III-14 (isotherme du matériau SBA-15) et la Figure III-17 (isotherme du matériau MMF), une différence du taux d'adsorption est observable. Dans les trois conditions d'immobilisation, on peut observer qu'une plus grande quantité d'enzyme se fixe sur le matériau SBA-15. La taille des pores (SBA-15 : 8,5 nm ; MMF : 5,7 nm) doit être considérée. Concernant les capacités d'adsorption proprement dite, le matériau SBA-15 peut accueillir au maximum 0,64 mg de lipase par milligramme de matériau. Le support MMF lui sature lorsque le taux d'adsorption atteint 0,45 mg/mg. Les valeurs de K_L donnent également des informations sur l'interaction entre le matériau et la lipase. Ces valeurs sont plus élevées pour le support MMF que pour le matériau SBA-15, cela traduit une affinité plus grande pour la matrice MMF. Ce résultat peut être relié à la concentration des silanols présents à la surface du support. En effet, l'élimination du tensioactif par lavage du support SBA-15 est suivie d'une calcination à 550°C alors que l'élimination du tensioactif pour le matériau MMF ne s'effectue que par extraction à l'éthanol. Le processus de calcination permet d'augmenter le degré de condensation de la silice et réduit le nombre de silanols à la surface du matériau. Nous pouvons conclure que le support SBA-15 est plus résistant que la matrice MMF à l'adsorption

de la lipase. En effet, après l'immobilisation de l'enzyme, le matériau MMF perd l'organisation de ces mésopores contrairement au SBA-15. Cela est dû d'une part à l'épaisseur des murs séparant les pores et au degré de condensation de la silice.

Avant de tester le bioréacteur pour la réaction de transestérification, nous avons étudié le relargage de l'enzyme. Après avoir immobilisé la lipase par physisorption sur le matériau SBA-15, nous avons plongé le matériau dans la solution à pH 6. Un prélèvement a été réalisé à différents temps et le matériau a été analysé par spectroscopie IR pour déterminer le taux d'adsorption. Ainsi, nous avons pu tracer l'évolution de la quantité d'enzyme adsorbée au cours du temps d'immersion dans la solution (Figure III-19).

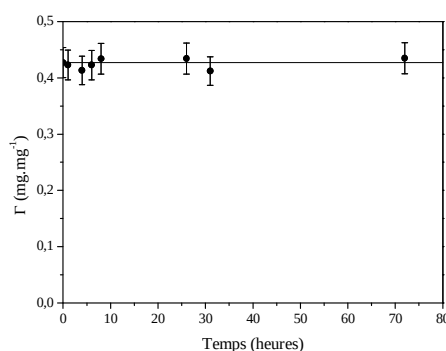


Figure III-19 - Evolution de la quantité d'enzyme adsorbée en fonction du temps d'immersion dans la solution à pH 6

Les résultats montrent une conservation de la quantité de lipase adsorbée sur le matériau SBA-15. Il n'y a pas de phénomène de relargage malgré la faible interaction entre la lipase et le matériau.

C. Tests catalytiques préliminaires

De par leurs propriétés physico-chimiques et leur capacité d'adsorption, les matériaux mésoporeux contenant l'enzyme sont de bons candidats pour la méthanolyse de l'huile de colza. Leur efficacité catalytique est mesurée par rapport au rendement de la réaction de transestérification. L'immobilisation de l'enzyme est une étape importante qui peut avoir un effet sur la réaction et sur les supports. Le matériau MMF ayant perdu sa structure après immobilisation, il n'a donc pas été considéré pour les tests de synthèse du biodiesel. Les expériences ont été réalisées en utilisant, comme bioréacteur, le matériau SBA-15 uniquement. Pour l'ensemble des expériences, le taux d'adsorption de l'enzyme est constant et l'immobilisation est faite à partir de solutions à pH 3, 6 et 10 ayant une concentration initiale

en lipase de 10 mg/mL. Cette valeur de concentration a été choisie de façon à avoir un taux d'immobilisation de la lipase *Mm-L* maximal.

Pour montrer l'efficacité de la catalyse enzymatique, l'ensemble des réactions présentées dans la suite de ce travail ont été précédées de « blancs », c'est à dire de réactions réalisées dans les mêmes conditions mais sans lipase adsorbée, dans le but de mettre en évidence le pouvoir catalytique de la lipase. Le rendement de ces réactions dites « blanches » est inférieur à 1%.

1. Méthanolyse de l'huile de colza

Le rendement de la réaction de transestérification est sensible à plusieurs paramètres comme le rapport molaire méthanol/huile, la température, etc. Pour établir les conditions de départ, nous avons utilisé l'étude reportée par Ahn *et al.*⁷. Les conditions étaient les suivantes :

- rapport molaire MeOH/huile = 3
- volume d'huile : 600 μ L
- agitation = 100 rpm
- température de réaction = 44°C
- masse de catalyseur : 10 mg

L'immobilisation de l'enzyme a été réalisée dans une solution à pH6. Le rendement de ces réactions est calculé à partir du méthanol. Cependant, dans ces conditions, le rendement de ces réactions est très faible. Pour tenter d'augmenter ce rendement, nous avons tout d'abord diminué le rapport molaire MeOH/huile (rapport = 1) puisque, d'après la littérature, la quantité d'alcool ajoutée dans le milieu réactionnel joue un rôle important sur le rendement. La Figure III-20 illustre l'évolution au cours du temps des esters méthyliques issus de la réaction de transestérification dans ces conditions. Nous avons constaté que la réaction atteint un rendement de 10% au bout 24 heures. Donc, avec un rapport molaire MeOH/huile de 1, trois fois plus faible que le rapport stœchiométrique, nous obtenons des rendements peu satisfaisants et la toxicité du méthanol vis-à-vis de la lipase est mise en cause. En effet, une quantité trop importante de méthanol entraîne une dénaturation et une désactivation de la lipase. En prenant un rapport molaire égal à 1, ces problèmes sont réduits. Des conditions plus adaptées doivent donc être trouvées.

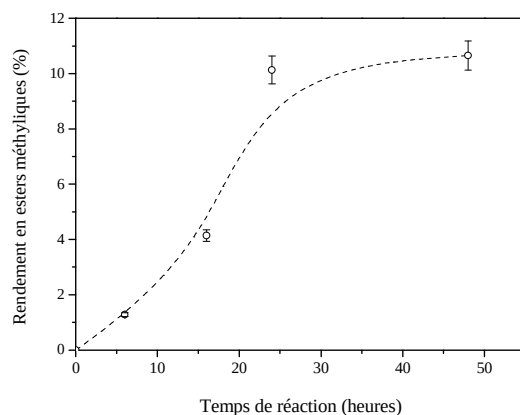


Figure III-20 - Suivi du rendement de la réaction de transestérification dans les conditions suivantes : immobilisation à pH6 ; rapport molaire MeOH/huile : 1 ; agitation : 100 rpm ; température de réaction : 44°C ; masse de catalyseur : 10 mg

2. Influence du co-solvant sur le rendement de la réaction de transestérification

D'après des études réalisées dans la littérature, un co-solvant, tel que le tert-butanol ou l'eau peut améliorer l'activité catalytique⁸. Une revue sur l'effet d'un ajout d'eau dans la réaction de transestérification catalysée par une lipase a été écrite par Atadashi *et al.* et a montré l'intérêt d'un tel ajout^{9,10}. Nous avons donc étudié l'influence de l'ajout d'eau dans le milieu réactionnel pour des temps des réactions de 24 et 72 heures (Figure III-21).

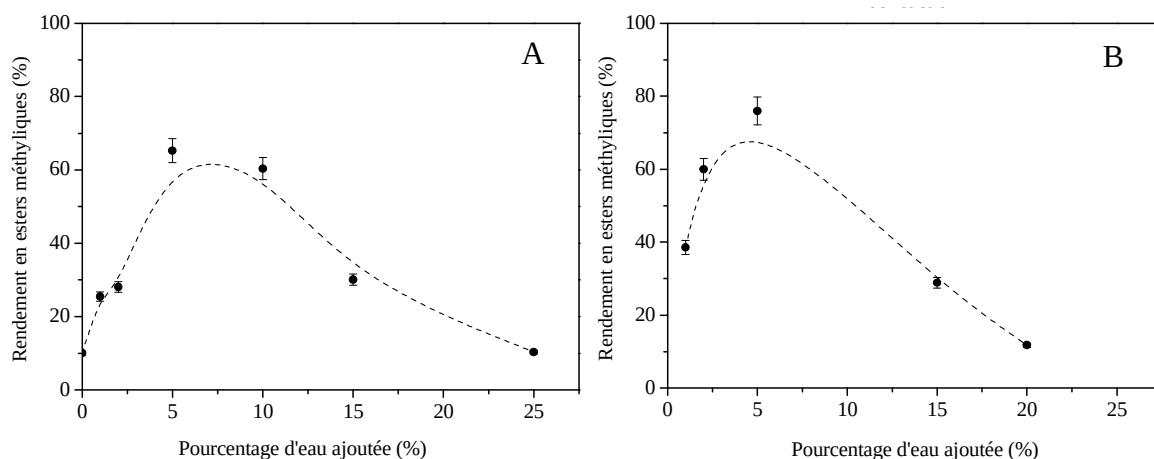


Figure III-21 - Evolution du rendement en esters méthyliques en fonction du pourcentage d'eau. Le temps a été fixé à 24 (A) et à 72 heures (B)

On peut voir sur ces deux figures, quel que soit le temps de réaction, qu'un apport d'eau allant jusqu'à 5% permet d'augmenter le rendement en esters méthyliques de la réaction, au-delà de cette quantité d'eau, le rendement chute. L'ajout d'eau optimal dans ces conditions de réaction est donc de 5% et permet d'augmenter significativement le rendement puisqu'il passe de 10 à 70-80%. Par contre, un ajout trop important d'eau conduit à la chute du rendement due à l'hydrolyse des triglycérides par la lipase^{11,12}. L'ajout d'eau a pour effet d'augmenter le taux d'interface huile/enzyme par l'intermédiaire de la formation d'une émulsion et facilite ainsi la catalyse enzymatique. Nous avons ensuite suivi au cours du temps le rendement en esters méthyliques de la réaction de transestérification (Figure III-22).

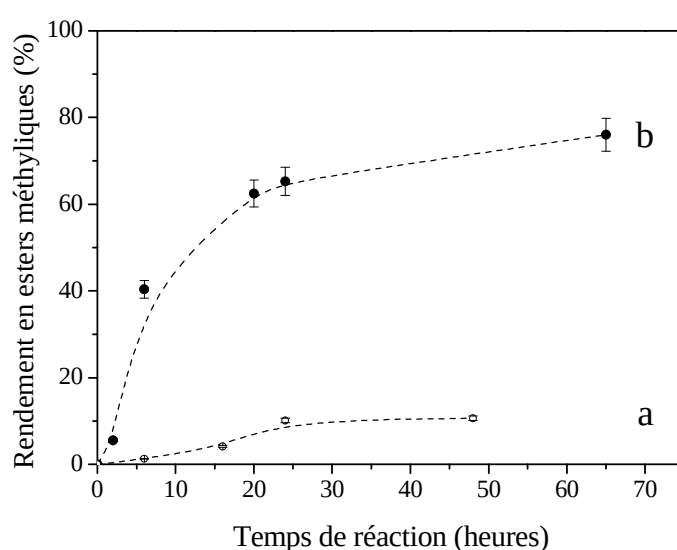


Figure III-22 - Evolution cinétique de la formation d'esters méthyliques sans ajout (a) et avec ajout de 5% d'eau (b)

L'ajout de 5% d'eau dans le système a pour effet de faire passer le rendement de 10% à 76%. Cette valeur de rendement est atteinte au bout de 50 heures de réaction. De tels rendements sont reportés dans la littérature. Par exemple, Macario *et al.* ont obtenu un rendement de 77% pour une réaction de transestérification de la trioléine en présence de méthanol catalysée par la lipase *Rhizomucor miehei* physisorbée sur un matériau mésoporeux organisés et sans solvant type hexane¹³.

Le Tableau III-6 est un récapitulatif des vitesses initiales déterminées dans le cas des réactions effectuées avec et sans eau. On peut voir que l'ajout de 5% d'eau dans le milieu réactionnel a permis de multiplier par 20 la vitesse de formation des esters, passant de 1,6 μmol d'esters par heure à 31,9. Par ailleurs, la vitesse de consommation du méthanol a été également calculée et l'on constate qu'elle correspond à la vitesse initiale de formation des esters.

Tableau III-6 - Récapitulatif des vitesses initiales

Bioréacteur	Réaction	Consommation de MeOH		Formation des esters méthyliques		
Support	Température (°C)	Ajout d'eau (%)	Vitesse initiale (μmol/h)	Vitesse initiale (μmol/h/mg _{Mm-L})	Vitesse initiale (μmol/h)	Vitesse initiale (μmol/h/mg _{Mm-L})
SBA-15	44	0	1,6	0,38	1,6	0,38
		5	33,1	7,8	31,9	7,59

La réaction de transestérification a été réalisée avec un bioréacteur dont l'immobilisation a été faite dans une solution à pH6. Nous avons effectué d'autres réactions de méthanolyse de l'huile de colza en immobilisant l'enzyme à pH 3 et 10. Les conditions sont identiques à celles faites avec le bioréacteur dont l'immobilisation a été réalisée à pH6, c'est-à-dire avec un ajout de 5% d'eau dans le milieu réactionnel. Les résultats de ces réactions effectuées durant 24 heures ont montré qu'après immobilisation à pH 3 et 10, la lipase perd son activité catalytique (Figure III-23).

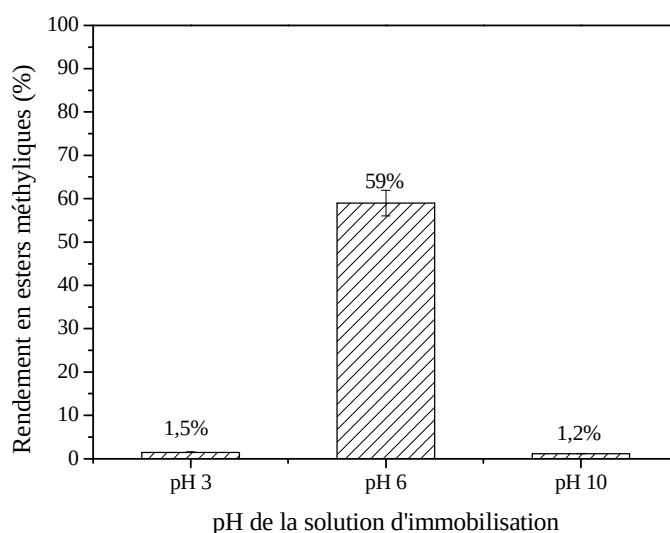


Figure III-23 - Comparaison des rendements en esters méthyliques obtenus avec un bioréacteur dont l'immobilisation a été faite dans une solution à pH 3, 6 et 10

Des rendements de 1,5 et 1,2% ont été obtenus pour les réactions la lipase adsorbée respectivement à pH 3 et 10 alors, qu'une immobilisation à pH 6 permet d'atteindre un rendement de l'ordre de 60%. Ces résultats montrent également que le taux d'immobilisation de l'enzyme sur le matériau n'est pas un critère fondamental. En effet, une quantité plus importante d'enzyme est adsorbée lors d'une immobilisation à pH 3 comparée à une immobilisation à pH 6. Néanmoins, le rendement est quasi nul pour une réaction catalysée avec un bioréacteur immobilisé à pH 3 alors qu'il est de 60% avec un bioréacteur dont la

lipase est adsorbée à pH 6. L'acidité de la solution d'immobilisation doit avoir un effet dénaturant pour l'enzyme.

3. Réutilisation du bioréacteur

Un des intérêts principaux de l'utilisation d'une lipase adsorbée sur une matrice est la réutilisation du bioréacteur (lipase-matrice) pour effectuer de nouvelles réactions de transestérification. En conservant les mêmes conditions de réaction et un temps de réaction de 24 heures, nous avons effectué plusieurs réactions successives avec le même bioréacteur. Le rendement de ces réactions de transestérification successives a été calculé en prenant comme référence le rendement de la première réaction. Ainsi, le rendement déterminé peut être qualifié de relatif.

Après chaque réaction, le milieu réactionnel est centrifugé pendant 15 min à 5000 tours par minutes afin de séparer les esters méthyliques et l'huile en excès du glycérol et du catalyseur. Ensuite, la partie surnageante (esters + huile) est récupérée et le bioréacteur est lavé sous Büchner à l'hexane pour éliminer le glycérol et les résidus d'huile et d'esters restant sur le matériau. Après un séchage à l'air, le catalyseur est réutilisé pour effectuer une nouvelle réaction de transestérification. Ce protocole est répété pour chaque cycle.

La Figure III-24 représente le rendement relatif obtenu après chaque utilisation du catalyseur.

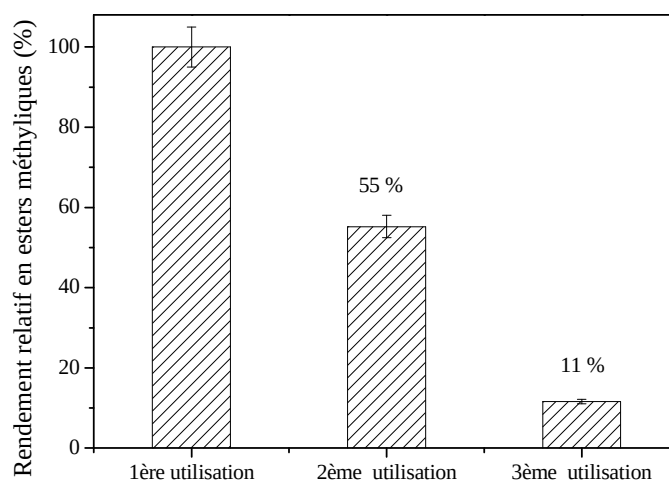


Figure III-24 - Réutilisation du catalyseur dans la réaction de transestérification

Nous pouvons constater qu'après une seconde utilisation, le rendement chute de moitié et après une troisième utilisation, le rendement relatif est de 11%. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Macario¹⁴. Cette diminution du rendement au cours des réactions

successives peut être due à une désorption de l'enzyme ou à un changement de conformation de l'enzyme, qui peut provenir d'une redistribution des charges des acides aminés.

Nous avons montré que le biocatalyseur formé de la lipase *Mucor miehei* adsorbée par physisorption sur une matrice silicatée mésoporeuse pouvait être utilisé pour des réactions de transestérification. La suite de ce chapitre sera consacrée à l'optimisation des conditions de cette réaction à l'aide d'un plan d'expériences.

D. Plan d'expériences

Comme il a été décrit précédemment, le rendement de la réaction de transestérification est gouverné par plusieurs paramètres. L'effet d'un paramètre étant souvent dépendant d'un autre paramètre, il est possible de mettre en évidence leur interaction éventuelle en effectuant l'optimisation des conditions de la réaction à l'aide d'un plan d'expériences. Cet outil permet d'étudier l'influence des différents paramètres expérimentaux sur le système et ainsi obtenir les effets et les interactions de ces paramètres avec une incertitude minimale¹⁴.

Le terme "facteur" correspond au paramètre utilisé et le terme "niveau" fait référence aux différentes valeurs prises par ce facteur. Les plans d'expériences sont couramment utilisés dans plusieurs domaines comme l'agronomie¹⁵ ou la formulation, cosmétiques^{16,17}. En revanche, l'optimisation des conditions de la réaction de transestérification catalysée par une lipase à l'aide d'un plan d'expériences a été examinée bien que peu développée. Par exemple, Yucel a optimisé par un plan d'expériences, appelé plan composite centré, les conditions de la production de biodiesel à partir d'huile d'olive¹⁸. La conclusion de ce travail est que le rapport molaire méthanol/huile et le temps de réaction sont des facteurs prédominants sur le rendement de la réaction. Rodrigues *et al.* ont également utilisé ce type de plan d'expériences pour étudier les effets de la combinaison de deux lipases (*Thermomyces lanuginocius* TLL et *Rhizomucor miehei* RmL) sur la transestérification et sur l'hydrolyse de l'huile de soja¹⁹. Les résultats montrent que la combinaison des deux lipases, avec une quantité plus importante de TLL donnent de meilleurs rendements dans les deux réactions que l'utilisation d'une seule lipase. Jang *et al.* ont optimisé les conditions de réaction à l'aide d'une analyse en surface de réponse et par la méthode des moindres carrés²⁰. Les auteurs ont conclu que le pourcentage d'enzyme dans la solution tampon et la quantité de méthanol sont les trois facteurs importants.

1. Optimisation des conditions réactionnelles

L'élaboration des plans d'expériences ainsi que la représentation et la modélisation des résultats ont été effectuées à l'aide du logiciel *Minitab*. Le système étudié est la réaction de transestérification et la réponse est le rendement de cette réaction. Le premier plan choisi est un plan factoriel composite qui permet de modéliser le système en considérant 5 niveaux pour chaque facteur. Ce plan permet de représenter les résultats obtenus sous forme de surfaces de réponse ou de graphiques de contours en prenant en compte les interactions entre les facteurs étudiés. Les paramètres étudiés sont le rapport molaire méthanol/huile, la température, le temps de réaction, la masse de catalyseur et le pourcentage massique d'eau ajoutée. Le volume d'huile utilisé pour ces expériences a été fixé à 1,5 mL et l'agitation à 100 tours par minute.

Tableau III-7 – Paramètres du plan d'expériences n°1

Paramètres	Niveaux				
	-2	-1	0	+1	+2
Rapport molaire	1	3	5	7	9
Température (°C)	25	33	41	49	57
Temps (h)	5	15	25	35	45
Masse de catalyseur (mg)	5	20	35	50	65
Ajout d'eau (%)	0	5	10	15	20

Avec ce plan, le nombre d'essais est de 26 expériences, auxquelles s'ajoutent six points au centre (niveau 0 0 0). Cette première série d'expériences a permis de balayer de manière globale l'influence de chaque paramètre afin d'identifier les paramètres jouant un rôle majeur dans la réaction. Le résultat de chaque essai est le rendement calculé en tenant compte du rapport molaire.

Les données obtenues mettent en évidence que le paramètre principal est le rapport molaire méthanol/huile. En effet, un rapport supérieur à 3 conduit à des rendements quasi nuls. Cela est dû à la dénaturation de la lipase par le méthanol. Une quantité d'eau trop importante conduit également à un rendement faible. Ces résultats nous ont amenés à effectuer une nouvelle série d'expériences sous forme d'un deuxième plan d'expériences de type factoriel complet à 4 facteurs (Tableau III-8) en réduisant le rapport molaire méthanol/huile et le pourcentage d'eau ajoutée. Dans ce nouveau plan, nous avons fixé le temps de réaction à 72

heures. Le Tableau III-9 résume les conditions expérimentales du plan d'expériences n°2 ainsi que ses résultats.

Tableau III-8 - Paramètres du plan d'expériences n°2

Paramètres	Niveaux		
	-1	0	+1
Rapport molaire	1	2	3
Température (°C)	24	34	44
Masse de catalyseur (mg)	10	15	20
Ajout d'eau (%)	2	5	8

Tableau III-9 - Conditions expérimentales pour la deuxième série d'expériences et résultats

N° expérience	Rapport molaire méthanol/huile	Température (°C)	Ajout d'eau (%)	Masse de catalyseur (mg)	Rendement (%)
1	1	24	2	10	75,1
2	3	24	2	20	0,4
3	1	44	2	20	71,4
4	3	44	2	10	0,5
5	1	24	8	20	47,3
6	3	24	8	10	11,1
7	1	44	8	10	45,3
8	3	44	8	20	0,7
9	1	24	2	20	80,3
10	3	24	2	10	0,3
11	1	44	2	10	65,2
12	3	44	2	20	0,27
13	1	24	8	10	42,6
14	3	24	8	20	11,6
15	1	44	8	20	70,3
16	3	44	8	10	0,9
17	2	34	5	15	12,8
18	2	34	5	15	12,5
19	2	34	5	15	13,7
20	2	34	5	15	14,9

Les points au centre (expériences N°17 à 20) permettent d'estimer l'erreur expérimentale et de tester le modèle linéaire associé au plan factoriel complet. Les rendements obtenus pour ces points montrent une bonne répétabilité. Le traitement des résultats de ce plan fournit des informations sur l'influence de chacun des paramètres. La Figure III-25 représente les effets principaux de chaque paramètre étudié.

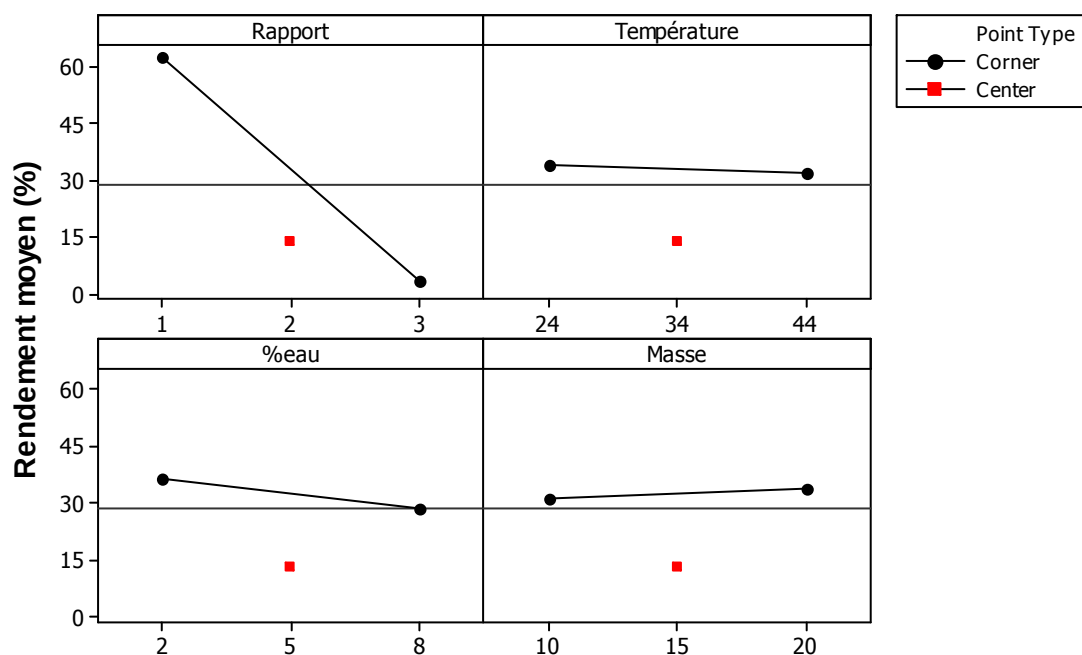


Figure III-25 - Effets principaux

Il est à noter que les valeurs prises par chaque point correspondent à la moyenne des rendements obtenus à ce niveau, indépendamment des niveaux pris pour les autres paramètres. On peut observer sur ce graphique que le paramètre le plus influant de la réaction de transestérification est le rapport molaire méthanol/huile. En effet, on voit qu'une augmentation de ce rapport entraîne une forte chute du rendement. Comme l'effet de ce facteur est négatif (augmentation du rendement lorsque le rapport molaire augmente), il est préférable d'effectuer la réaction en utilisant un rapport molaire de 1. Ensuite, le pourcentage d'eau ajoutée au milieu réactionnel est un facteur à considérer mais ayant un effet moins important que le rapport molaire. La température et la masse ont une influence négligeable sur le rendement, car l'évolution du rendement en passant de la borne inférieure à la borne supérieure est minimale.

Le plan d'expériences donne des informations sur les interactions entre les différents facteurs (Figure III-26).

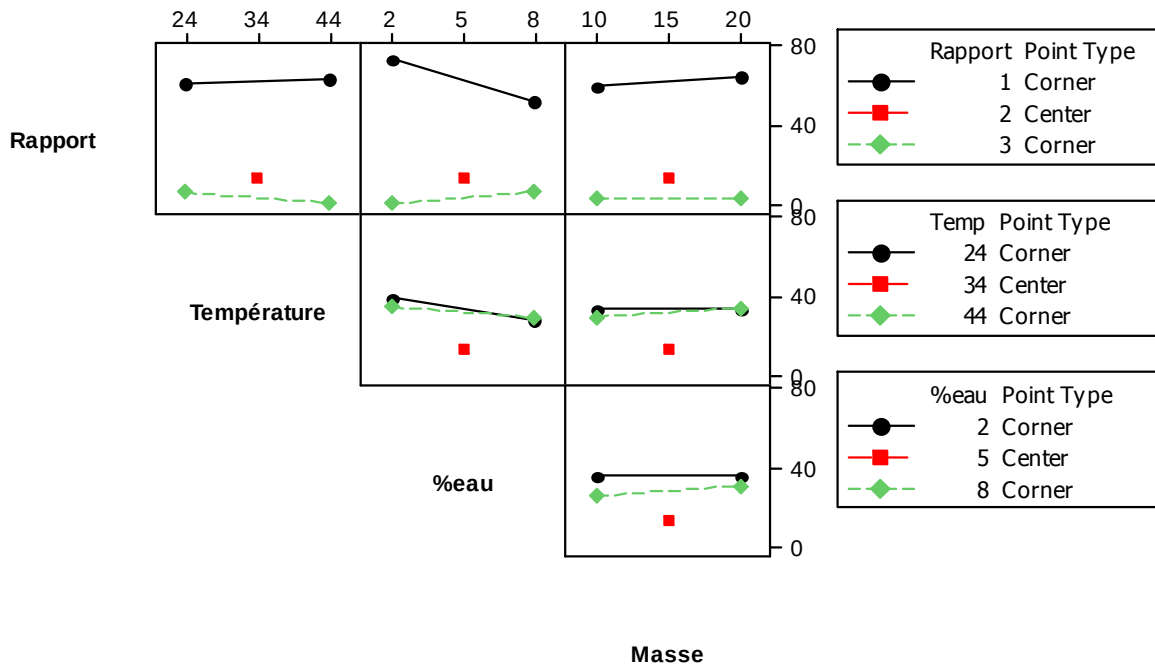


Figure III-26 - Diagramme des interactions

Le degré d'influence d'un couple de paramètres est dicté par la différence de pente des deux droites (i.e. l'effet d'un facteur dépend du niveau de l'autre facteur, c'est la notion d'interaction). On constate qu'une interaction forte existe entre le rapport molaire et le pourcentage d'eau ajoutée (Figure III-26). Ce graphique montre que, pour un rapport molaire de 1, la hausse du pourcentage d'eau ajoutée fait baisser le rendement. Au contraire, pour un rapport de 3, l'augmentation du taux d'eau conduit à un rendement supérieur. L'interaction avec d'autres paramètres ne permet pas un gain significatif sur le rendement.

Le Tableau III-10 regroupe l'analyse statistique du plan. La colonne « effet » permet de connaître l'influence sur le rendement. Plus la valeur absolue du terme est grande, plus ce paramètre est influent. Dans notre cas, le coefficient correspond à la valeur de l'effet divisé par 2 puisque on considère seulement deux valeurs. L'erreur sur ce coefficient, la variable *t* de Student sont également données ainsi que la probabilité *P* correspondant au risque limite qui permet de définir si un paramètre est significatif ou pas. Il est à noter que la première ligne du tableau est une constante laquelle donne le rendement moyen de l'ensemble des essais du plan d'expériences.

Tableau III-10 - Statistiques de l'analyse du plan d'expériences

Terme	Effet	Coefficient	Erreur sur le coefficient	t	P
Constante		32,68	0,279	117,12	0,000
Rapport molaire méthanol/huile	-58,97	-29,49	0,279	-105,67	0,000
Température	-1,74	-0,87	0,279	-3,13	0,052
% eau	-7,97	-3,99	0,279	-14,28	0,001
Masse	2,44	1,22	0,279	4,38	0,022
Rapport molaire x Température	-3,48	-1,74	0,279	-6,23	0,008
Rapport molaire x % eau	13,65	6,83	0,279	24,47	0,000
Rapport molaire x Masse	-2,36	-1,18	0,279	-4,23	0,024
Température x %eau	2,9	1,45	0,279	5,2	0,014
Température x Masse	2,21	1,11	0,279	3,96	0,029
%eau x Masse	2,81	1,4	0,279	5,03	0,015
Rapport molaire x Température x %eau	-8,23	-4,11	0,279	-14,74	0,001
Rapport molaire x Température x Masse	-2,34	-1,17	0,279	-4,19	0,025
Rapport molaire x %eau x Masse	-2,54	-1,27	0,279	-4,55	0,020
Température x %eau x Masse	5,11	2,56	0,279	9,17	0,003
Rapport molaire x Température x %eau x Masse	-5,15	-2,58	0,279	-9,24	0,003

En considérant un risque de 5%, les données du Tableau III-10 indiquent que tous les paramètres sont significatifs. En effet, tous les paramètres ont un coefficient P inférieur à 0,05, cela veut dire que le risque maximum de se tromper est de 5%. De plus, les paramètres peuvent être classés par ordre d'influence (en valeur absolue, plus l'effet du paramètre est important, plus ce dernier sera influent).

De manière générale, d'après les graphiques de la Figure III-26, les points au centre ne sont pas sur les droites, ce qui signifie que le modèle linéaire n'est pas adapté. Nous avons donc regardé l'influence du pourcentage d'eau ajoutée en maintenant les conditions les plus favorables, c'est-à-dire, rapport molaire de 1, température de réaction de 24°C, 20 mg de catalyseur, agitation de 100 tours par minute et temps de réaction de 72 heures. En affinant la quantité d'eau incorporée à la réaction, on a pu ainsi obtenir un rendement proche de 100% (Figure III-27).

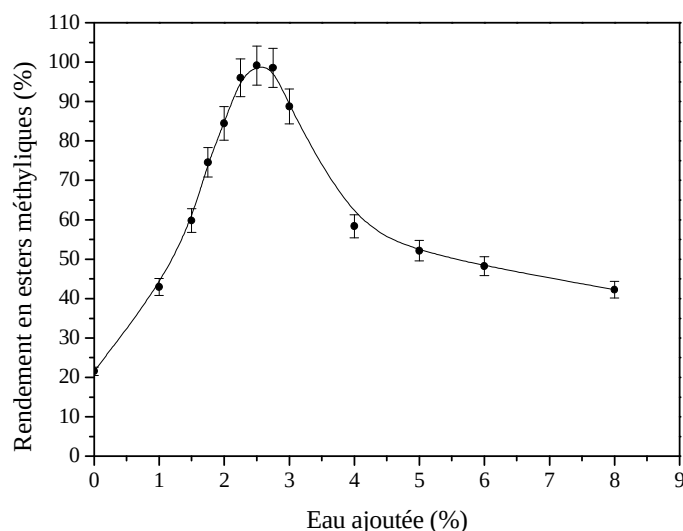


Figure III-27 - Variation du pourcentage d'eau dans le milieu réactionnel

Le rendement optimal est obtenu avec un ajout de 2,5% d'eau dans la réaction. Entre 0 et 2,5%, le rendement de la réaction augmente alors qu'une fois passée cette valeur de pourcentage d'eau, ce rendement diminue. Cette chute du rendement s'explique par l'hydrolyse des triglycérides^{12,13}. Pour résumer, le rendement de la réaction de transestérification catalysée par la lipase *Mm-L* physisorbée sur le matériau SBA-15 est maximal avec un rapport molaire méthanol/huile de **1**, un ajout d'eau de **2,5%**, une température de réaction de **24°C**, une agitation de **100 tours/min** et une masse de catalyseur de **20 mg**.

2. Etude cinétique dans les conditions optimisées

La variation du pourcentage d'eau a été réalisée en fixant le temps de réaction à 72 heures, une étude cinétique de la réaction dans les conditions optimales a été entreprise (Figure III-28).

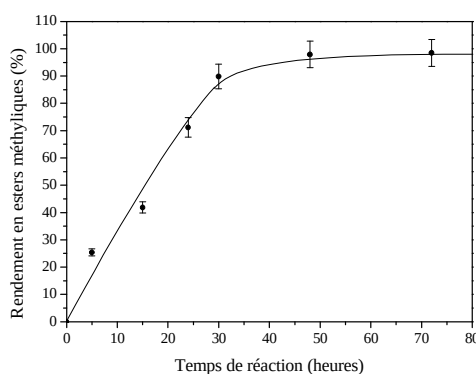


Figure III-28 - Evolution cinétique des esters méthyliques dans les conditions expérimentales définies par le plan d'expériences

D'après la Figure III-28, environ 40 heures suffisent pour obtenir un rendement proche de 100%. La vitesse initiale de formation des esters est 18,5 $\mu\text{mol/h}$. Si l'on rapporte cette vitesse à la quantité d'enzyme utilisée lors de la réaction, on obtient 4,4 $\mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$. Dans les conditions non-optimisées de la réaction (cf. partie B.2), la vitesse initiale est supérieure à cette dernière (7,59 $\mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$), cependant, le rendement atteint n'est que de 77%.

Tableau III-11 - Vitesses initiales pour la réaction de transestérification optimisée

Bioréacteur	Réaction		Consommation de MeOH		Formation des esters méthyliques	
Support	Température (°C)	Ajout d'eau (%)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$)
SBA-15	24	2,5	19,2	4,57	18,5	4,4

Pour comparer les performances catalytiques dans ces deux conditions, les « turnover numbers », (capacité d'une mole de catalyseur à transformer le substrat (huile de colza)), ont été calculés et sont exprimés en mole de substrat converti par mole de lipase adsorbée sur le support.

Les résultats sont présentés sur la Figure III-29. Pour rappel, les deux conditions optimisées sont : rapport molaire : 1, température : 25°C, 2,5 % d'eau ajouté, agitation : 100 tours/min, masse de catalyseur : 10 mg et les conditions non-optimisées sont : rapport molaire : 1, température : 44°C, 5 % d'eau ajouté, agitation : 100 tours/min, masse de catalyseur : 10 mg.

Le turnover number de la réaction optimisée est supérieur à celui de la réaction non optimisée (4800 contre 3700) puisque le nombre de mole de substrat converti est supérieur dans le cas de la réaction optimisée avec une même quantité de lipase physisorbée.

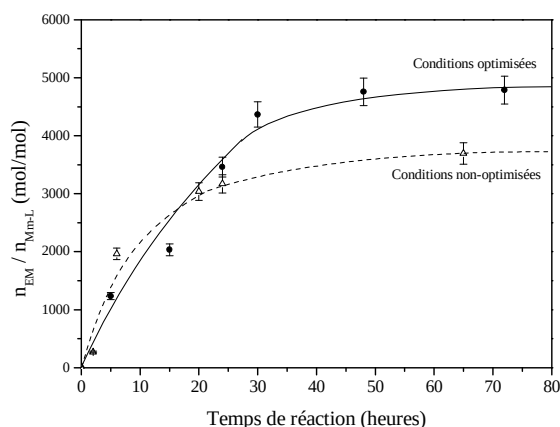


Figure III-29 - Comparaison des turnover numbers (conditions non-optimisées ; conditions optimisées à l'aide du plan d'expériences)

3. Réutilisation du bioréacteur

Le recyclage du bioréacteur a été testé en utilisant les conditions optimales. Après une première utilisation, le bioréacteur est récupéré par filtration et lavé à l'eau afin d'éliminer le glycérol présent, puis enfin séché. Pour chacune des réactions de transestérification, le temps de réaction a été fixé à 24 heures. Le rendement des réactions a été calculé relativement à la première réaction. La Figure III-30 présente les rendements relatifs en fonction du nombre de réutilisation du bioréacteur.

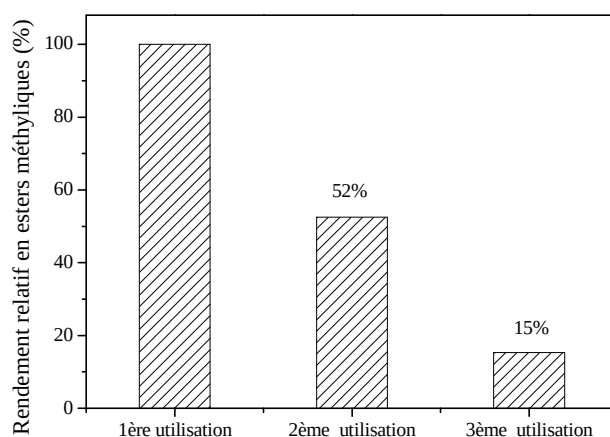


Figure III-30 - Réutilisation du bioréacteur dans les conditions optimales

On constate que le recyclage du bioréacteur est limité à 2 utilisations consécutives et le rendement chute de 100% à 52%. A la troisième réutilisation, le rendement est limité à 15%. Les conditions de la réaction sont optimisées, toutefois, les problèmes liés au type d'immobilisation persistent et la désorption de la lipase au cours du recyclage est inévitable. D'autre part concernant la réaction de transestérification, le glycérol produit peut limiter la diffusion du substrat²¹ et les triglycérides en présence d'oxygène sont susceptibles de former des produits oxydants^{22,23}.

4. Caractérisation du bioréacteur après utilisation

La caractérisation du catalyseur après son recyclage a permis d'apporter une explication probable à sa réutilisation limitée. La Figure III-31 présente les analyses effectuées par SAXS et adsorption-désorption d'azote sur le bioréacteur avant utilisation et après trois utilisations. On constate que la série de réactions n'affecte pas sa structure. On distingue les raies de diffractions caractéristiques d'un arrangement hexagonal et la distance entre les plans (100) reste égale à 9,9 nm. Au niveau textural, le volume d'azote adsorbé par le bioréacteur après

réutilisation est plus important que celui avant utilisation. De même pour le diamètre des pores, on observe une légère augmentation de la taille qui passe de 7,4 nm à 7,5 nm après utilisation. Le volume poreux et la surface spécifique sont également supérieurs après le recyclage du bioréacteur. Ces valeurs sont regroupées dans le Tableau III-12.

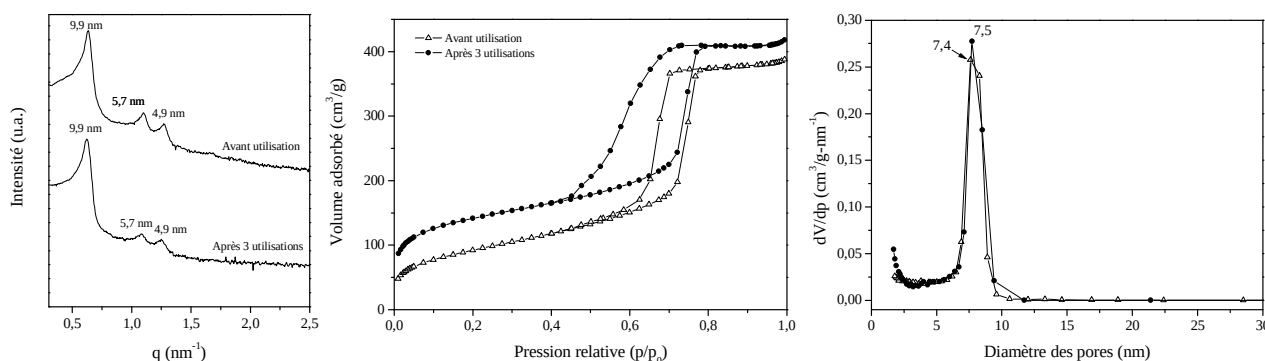


Figure III-31 - Diffractogrammes, isothermes d'adsorption d'azote et distribution de la taille des pores avant et après 3 réutilisations

Tableau III-12 - Caractéristiques du bioréacteur avant et après 3 utilisations

Bioréacteur	Paramètre de maille a_0 (nm)	Surface spécifique (m^2/g)	Volume poreux V_p (cm^3/g)	Diamètres des pores (nm)
Avant utilisation	11,3	334	0,45	7,4
Après 3 utilisations	11,3	490	0,55	7,5

Ces modifications des caractéristiques texturales du matériau après recyclage est reliable à une désorption de l'enzyme au cours de son utilisation. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé le catalyseur par spectroscopie IR (Figure III-32).

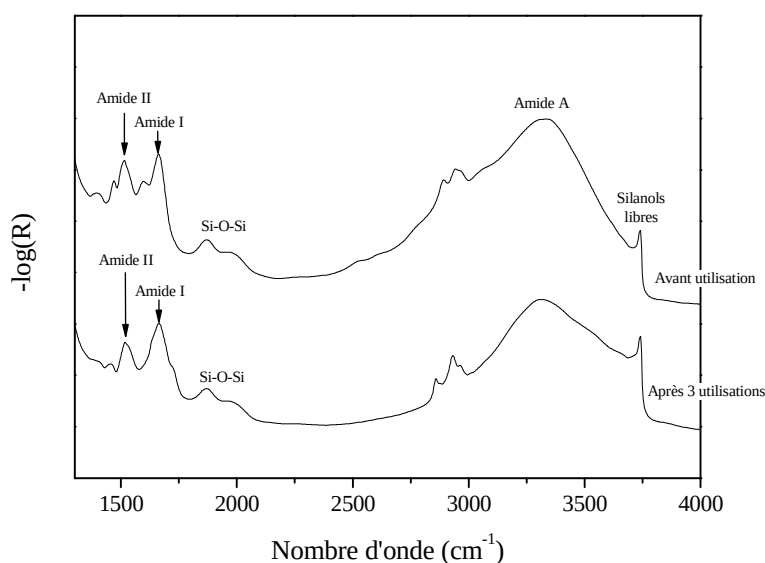


Figure III-32 - Spectres IR du bioréacteur avant utilisation et après 3 utilisations

La comparaison des spectres du bioréacteur avant et après utilisation a permis de quantifier la désorption de la lipase observée par sorption d'azote. Nous pouvons voir que les bandes attribuées à la lipase (Amide I, II, III et A) sont toujours présentes après les réactions de transestérification, indiquant qu'une quantité de lipase est encore adsorbée sur le support. La mesure des aires des bandes caractéristiques (Amide II et III) indique qu'après l'immobilisation de la lipase sur le matériau SBA-15, 0,43 mg de lipase *Mm-L* par milligramme de support sont physisorbées. Après 3 utilisations, le taux d'adsorption chute à 0,20 mg/mg. De plus, la vibration attribuée à l'amide A est moins intense après la réutilisation, contrairement au signal caractéristique des silanols libres qui augmente. Il y a donc bien un phénomène de désorption de l'enzyme au cours du recyclage du bioréacteur.

5. Etude de l'ajout progressif de méthanol

Le méthanol a un effet inhibiteur sur l'activité de la lipase. En effet, l'ajout d'une quantité de méthanol stœchiométrique n'a pas permis d'obtenir un taux de conversion de 100%. Par contre, il a été démontré par plusieurs groupes de chercheurs que l'ajout progressif de méthanol permet d'améliorer le rendement^{24,25,26,27}.

a. Cinétique

Nous avons réalisé une réaction de transestérification dans les conditions optimales, mais en ajoutant trois fois un équivalent de méthanol correspondant à un rapport molaire méthanol/huile de 1. Une quantité d'eau (2,5% cf. plan d'expériences) a également été introduite en même temps que le méthanol. La Figure III-33 présente le taux de conversion en fonction du temps.

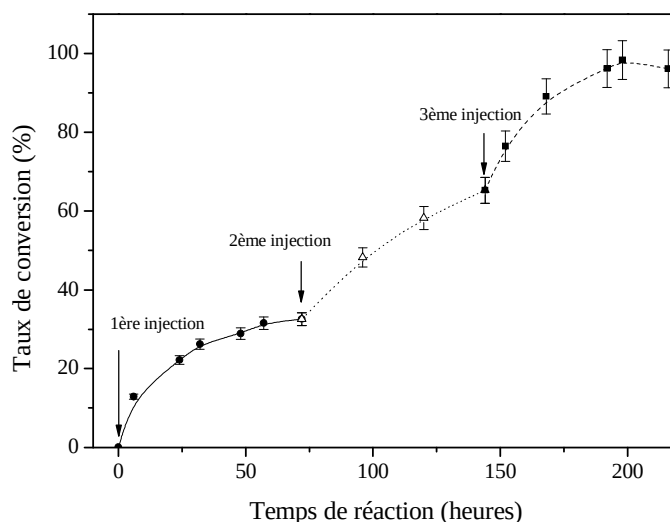


Figure III-33 - Cinétique de la réaction de transestérification après 3 injections de méthanol

Les résultats indiquent qu'il est possible de convertir l'ensemble des triglycérides présents dans l'huile en esters méthyliques en injectant trois fois l'équivalent d'un rapport molaire égal à 1, ainsi que 2,5% d'eau. Cependant, pour obtenir un tel taux de conversion, près de 200 heures de réaction sont nécessaires car le méthanol ajouté doit être consommé avant une nouvelle injection afin de ne pas dénaturer la lipase.

b. Caractérisation du bioréacteur

Le bioréacteur après utilisation a été caractérisé par diffraction des rayons X aux petits angles et par sorption d'azote (Figure III-34). L'arrangement hexagonal des mésopores est maintenu puisque les trois raies de diffraction caractéristiques sont présentes malgré les 200 heures de réaction. La distance entre les plans (100) n'est pas modifiée. Concernant l'analyse texturale du bioréacteur après réaction, on observe une augmentation du volume d'azote adsorbé. La surface spécifique et le volume poreux du matériau avant et après utilisation passent respectivement de 334 m²/g à 557 m²/g et de 0,45 à 0,66 cm³/g. Le diamètre poreux augmente également légèrement (de 7,4 nm à 7,6 nm).

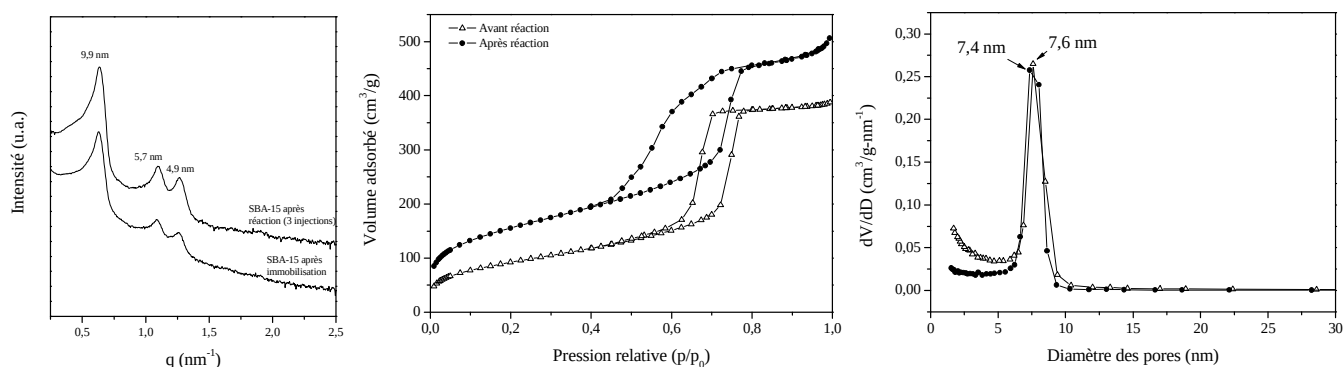


Figure III-34 - Diffractogrammes, isothermes d'adsorption d'azote et distributions de la taille des pores du bioréacteur avant et après réaction

E. Résumé

Nous avons montré que la lipase *Mucor miehei* physisorbée sur le matériau SBA-15 peut catalyser une réaction de transestérification sans utiliser de solvant tel que l'hexane. Concernant les conditions d'adsorption physique de l'enzyme, elles dépendent à la fois du pH de la solution enzymatique et des caractéristiques du support. De plus, elles ont une influence sur l'activité catalytique de la lipase. Les meilleures performances catalytiques ont été obtenues avec une lipase immobilisée dans une solution enzymatique à pH 6. Les conditions de la réaction de transestérification des triglycérides ont été optimisées à l'aide d'un plan

d'expériences type factoriel composite qui a permis d'identifier les paramètres importants ainsi que ceux qui interagissent le plus. Le recyclage du bioréacteur a été testé et nous avons montré qu'il est limité à deux utilisations. La désorption de l'enzyme au cours de la réaction semble être la raison principale de cette limite, 52% de la lipase ont été désorbés après trois utilisations. Dans les conditions de réaction (déterminées avec le plan d'expériences) seuls 33% des triglycérides sont convertis (rapport molaire méthanol/huile égal à 1). Toutefois, en injectant du méthanol à intervalles de temps réguliers, près de 100% de l'huile a été convertie en esters méthyliques en 200 heures. Enfin, on a constaté que le support SBA-15 garde son intégrité après son utilisation.

Références bibliographiques

- ¹ J.C. Brinker, Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects on Structure. *J. Non-Cryst. Solids*, **1988**, 100, 31-50
- ² A.L. Pham, D.L. Sedlak, F.M. Doyle, Dissolution of mesoporous silica supports in aqueous solutions: Implications for mesoporous silica-based water treatment processes, *Appl. Catal., B*, **2012**, 126, 258–264
- ³ C.P. Guthrie, E.J. Reardon, Metastability of MCM-41 and Al-MCM-41, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112, 3386-3390
- ⁴ N. Sahai, Is Silica Really an Anomalous Oxide? Surface Acidity and Aqueous Hydrolysis Revisited, *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, 445-452
- ⁵ A. Salis, M.F. Casula, M.S. Bhattacharyya, M. Pinna, V. Solinas, M. Monduzzi, Physical and Chemical Lipase Adsorption on SBA-15: Effect of Different Interactions on Enzyme Loading and Catalytic Performance, *Chem. Cat. Chem.*, **2010**, 2, 322 – 329
- ⁶ N. Dizge, B. Keskinler, A. Tanriseven, Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer, *Biochem. Eng. J.*, **2009**, 44, 220–225
- ⁷ K.W. Ahn, S.H. Ye, W.H. Chun, H. Rah, S.G. Kim, Yield and component distribution of biodiesel by methanolysis of soybean oil with lipase-immobilized mesoporous silica, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2011**, 142, 37–44
- ⁸ M. K. Lam, K. T. Lee, Catalytic transesterification of high viscosity crude microalgae lipid to biodiesel: Effect of co-solvent, *Fuel Process. Technol.*, **2013**, 110, 242-248
- ⁹ I.M. Atadashi, M.K. Aroua, A.R. Abdul Aziz, N.M.N. Sulaiman, The effects of water on biodiesel production and refining technologies: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2012**, 16, 3456–3470
- ¹⁰ J. Lu, Y. Chen, F. Wang, T. Tan, Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, 56, 122–125
- ¹¹ L. Giraldo, J.C. Moreno-Piraján, Lipase supported on mesoporous materials as a catalyst in the synthesis of biodiesel from *Persea americana* mill oil. *J Mol Catal B: Enzymat*, **2012**, 77, 32–38.

- ¹² P. Yin, L. Chen, Z. Wang, R. Qu, X. Liu, S. Ren, Production of biodiesel by esterification of oleic acid with ethanol over organophosphonic acid-functionalized silica, *Bioresour. Technol.*, **2012**, 110, 258–263.
- ¹³ A. Macario, M. Moliner, A. Corma, G. Giordano, Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in porous organic-inorganic system. *Microporous and Mesoporous Materials*, **2009**, 118, 334–340
- ¹⁴ J. Goupy, *Introduction aux plans d'expériences*, Dunod: Paris, **2001**
- ¹⁵ R. Fisher, *Statistical methods for research workers*, Oliver and Boyd, **1925**
- ¹⁶ C. Pierlot, J. Poprawski, M. Catté, J.L. Salager, J.M. Aubry, *Polym. Int.*, **2003**, 52, 614-618
- ¹⁷ F. Nielloud, J.P. Mestres, R. Fortuné, S. Draussin, G. Marti-Mestres, *Polym. Int.*, **2003**, 52, 610-613
- ¹⁸ Y. Yucel, Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology, *Fuel processing technology*, **2012**, 99, 97-102
- ¹⁹ R. C Rodrigues, M. A. Z. Ayub, Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil, *Process biochemistry*, **2011**, 46, 682-688
- ²⁰ M. G. Jang, D. K. Kim, S. C. Park, J. S. Lee, S. W. Kim, Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic process, *Renewable energy*, **2012**, 42, 99-104
- ²¹ V. Dossat, D. Combes, A. Marty, Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: Influence of the glycerol production, *Enzyme Microb. Technol.*, **1999**, 25, 194-200.
- ²² Y. Ohta, T. Yamane, S. Shimizu, Inhibition and inactivation of lipase by fat peroxide in the course of batch and continuous glycerolyses of fat by lipase, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, 53, 1885-1890.
- ²³ D. Pirozzi, Improvement of lipase stability in the presence of commercial triglycerides, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2003**, 105, 608-613
- ²⁴ M. Kaieda, T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto, H. Fukuda, Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent, *J. Biosci Bioeng.*, **1999**, 88, 627-631

²⁵ N. Dizge, B. Keskinler, A. Tanriseven, Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer, *Biochem. Eng. J.*, **2009**, 44, 220-225

²⁶ W. Du, Y. Xu, D. Liu, J. Zeng, Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 30, 125-129

²⁷ Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tominaga, Conversion of vegetable oil biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1999**, 76, 789-793

CHAPITRE IV – PRÉPARATION D'UN BIOREACTEUR PAR CHIMISORPTION DE LA LIPASE MM-L SUR UN SUPPORT SILICATÉ MÉSOPOREUX

A.	FONCTIONNALISATION DU MATERIAU SBA-15.....	119
B.	ADSORPTION CHIMIQUE DE L'ENZYME SUR LE SUPPORT SBA-15 FONCTIONNALISE	126
	1. CARACTERISATION DU BIOREACTEUR OBTENU PAR IMMOBILISATION CHIMIQUE...	
		127
	2. DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ENZYME CHIMISORBEE SUR LE SUPPORT NCO _{2M} -SBA-15	131
C.	REACTIONS DE TRANSESTERIFICATION CATALYSEES PAR LA LIPASE MM-L CHIMISORBEE	133
D.	CARACTERISATION DU BIOREACTEUR APRES REUTILISATION	135
E.	RESUME.....	138

Chapitre IV : Préparation d'un bioréacteur par chimisorption de la lipase *Mm-L* sur un support silicaté mésoporeux

Puisque le recyclage du bioréacteur élaboré en physisorbant la lipase *Mm-L* est limité à deux utilisations, il est intéressant d'examiner l'efficacité d'un bioréacteur dans lequel l'enzyme serait liée de façon covalente avec le support silicaté mésoporeux. Dans ce cas, le matériau doit être au préalable fonctionnalisé avant de chimisorber la lipase. Dans ce chapitre, nous décrirons les différentes étapes qui permettent de chimisorber la lipase *Mm-L*. Ensuite, nous testerons les performances catalytiques de ce bioréacteur ainsi que son recyclage.

L'étude précédente a montré les faibles capacités de recyclage du bioréacteur lorsque la lipase *Mm-L* est physisorbée sur le matériau. En effet, après trois réactions successives avec le même catalyseur, l'activité de ce dernier chute très fortement en devenant inutilisable. Le changement de conformation de l'enzyme et la désorption de l'enzyme au cours des réactions de transestérification sont les raisons probables de cet échec. Pour remédier au problème de relargage, nous proposons de lier l'enzyme au support de manière covalente.

La littérature concernant la fonctionnalisation de supports est abondante. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour modifier la surface. Par exemple, Bai *et al.* ont fonctionnalisé la surface de nanosphères de silice avec trois molécules présentant des groupements aldéhyde (γ -chloropropyltriethoxysilane (CPTES), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) et vinyltriethoxysilane (VTES))¹. Cette fonctionnalisation post-synthèse s'est effectuée en trois ou quatre étapes en fonction de la molécule sélectionnée. Du fait de l'excellente réactivité entre les groupements aldéhyde et les groupements aminés de l'enzyme, une lipase pancréatique a pu être immobilisée de manière covalente à la surface des billes de silice. Ces trois bioréacteurs conservent leur activité catalytique et un recyclage du bioréacteur est possible une quinzaine de fois. La fonctionnalisation du support est obtenue en plusieurs étapes, ce qui rend la méthode peu facile à mettre en œuvre. D'une autre façon, le groupe de Liu a modifié une silice mésoporeuse en greffant des polymères soit hydrophobes, soit hydrophiles², mais cette modification a entraîné un changement d'environnement qui influence l'activité catalytique du lysozyme adsorbée sur le support. De plus, la fonctionnalisation a lieu sous atmosphère d'argon, ce qui est contraignant et l'adsorption de l'enzyme dure plus de 95 heures. Toutefois, la variation de l'hydrophobicité du support est un point intéressant. Ce paramètre est un facteur important lors d'une immobilisation d'enzyme. En effet, la lipase est sensible à la balance hydrophobe/hydrophile du support en relation avec son activation interfaciale.

Les matériaux de type SBA-15 ont été également fonctionnalisés de diverses façons. Par exemple, des chercheurs ont modifié la surface de la matrice par des liquides ioniques^{3,4}. Pour réussir ce type de fonctionnalisation, Yang *et al.* ont dû réaliser pas moins de cinq étapes puisque le matériau SBA-15 subit plusieurs traitements dans différentes solutions organiques³. Il faut aussi ajouter une étape supplémentaire pour adsorber chimiquement l'enzyme concernée, la lipase pancréatique porcine. Malgré tous ces traitements, le bioréacteur ainsi élaboré conserve plus de 80% de l'activité initiale de la lipase. Dans tous ces travaux, la fonctionnalisation a lieu après la synthèse du matériau. Humphrey H.P. Yiu et son équipe ont

fonctionnalisé la surface du matériau SBA-15 au cours de la synthèse du matériau⁵. Afin de comparer si la fonctionnalisation *in situ* donne de meilleurs résultats qu'en post-synthèse, ce groupe de chercheurs a exploré les deux méthodes. Des groupements thiol, chlorure, amine et acide carboxylique ont été ainsi liés par des liaisons siloxypropane à la surface du matériau. Ensuite, l'adsorption de la trypsine s'est effectuée par simple immersion dans une solution tampon (TRIS) à pH 6. Les résultats montrent que les molécules organiques introduites sont plus réactives vis-à-vis de l'enzyme lors d'une co-condensation comparée à une modification de la surface post-synthèse.

Dans ce travail, la modification de la surface du matériau SBA-15 a été réalisée après synthèse par un groupement isocyanate. A notre connaissance, une telle fonctionnalisation d'une silice mésoporeuse n'a jamais été réalisée dans le cadre d'une immobilisation d'enzyme. L'avantage de ce synthon chimique est relatif à sa bonne réactivité dans des conditions dites douces avec les amines primaires, lesquelles sont présentes dans la lipase *Mm-L*. De plus, en incorporant cette fonction dans la matrice silicatée, l'hydrophobicité de la surface diminue. Cette modification de la silice a été réalisée par voie micro-onde et ne dure que quelques minutes, les méthodes reportées dans la littérature durent plusieurs heures, voire plusieurs dizaines d'heures.

A. Fonctionnalisation du matériau SBA-15

Cette étude a été réalisée en utilisant comme support le matériau SBA-15. Le protocole de modification de la surface du matériau est décrit dans le chapitre 2. Dans notre travail, la fonctionnalisation est réalisée sur une matrice mésoporeuse silicatée synthétisée auparavant et est basée sur la réaction de condensation entre les groupements siliciques du 3-(triéthoxysilyl)propyl isocyanate, noté *TPI* (Figure IV-1) et les groupements silanols libres du matériau SBA-15.

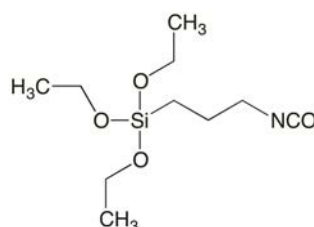


Figure IV-1 - Représentation du 3-(triéthoxysilyl)propyl isocyanate

Nous avons étudié le degré de fonctionnalisation de la surface du matériau en faisant varier la concentration en isocyanate dans le toluène. Nous avons choisi les concentrations en TPI

suivantes : 0,0125M, 0,125M, 1M et 2M. La Figure IV-2 illustre schématiquement la modification de la surface des pores du matériau SBA-15.

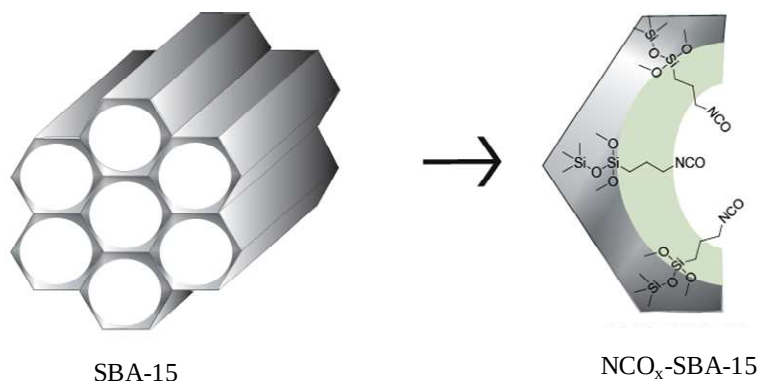


Figure IV-2 - Schéma de principe illustrant l'étape de fonctionnalisation du support SBA-15

Après les étapes de fonctionnalisation, de lavage et de séchage, les matériaux sont caractérisés par SAXS, adsorption-désorption d'azote et spectroscopie IR. Dans la suite de ce chapitre, les supports fonctionnalisés seront nommés NCO_x-SBA-15 avec x la concentration molaire de l'isocyanate dans le toluène qui est la solution dans laquelle le matériau a été ajouté. La Figure IV-3 représente les diffractogrammes SAXS des matériaux modifiés. D'après cette figure, on peut noter la présence des pics de diffraction q_1 , q_2 et q_3 , représentant respectivement la première, deuxième et troisième réflexion, caractéristiques d'un arrangement hexagonal 2D et ce, quelle que soit la concentration en TPI. La première réflexion q_1 est représentative de la distance de Bragg du plan (100). Cette valeur diminue progressivement lorsque la concentration en TPI augmente. Le paramètre de maille de la structure des matériaux fonctionnalisés diminue légèrement passant de 11,9 nm pour le support NCO_{0,0125M}-SBA-15 à 11,3 nm pour le NCO_{2M}-SBA-15. En comparant ces paramètres de maille à celui du SBA-15 non-fonctionnalisé (12,1 nm), on peut attribuer cette diminution à la présence de groupements isocyanate de propyle à l'intérieur des pores.

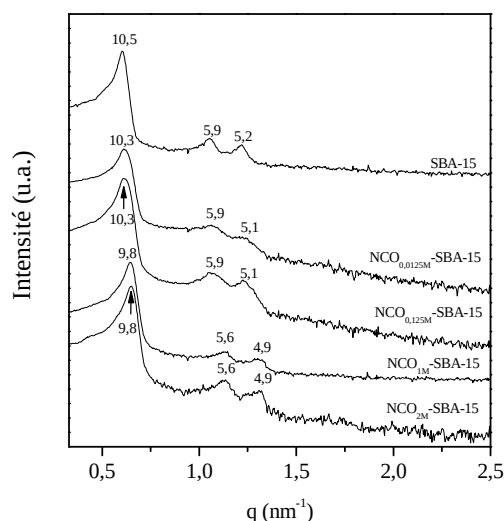


Figure IV-3 - Diffractogrammes SAXS du matériau SBA-15 après fonctionnalisation à différentes concentrations en isocyanate

L'évolution texturale des matériaux est caractérisée par les isothermes d'adsorption d'azote et les distributions de la taille des pores (Figure IV-4).

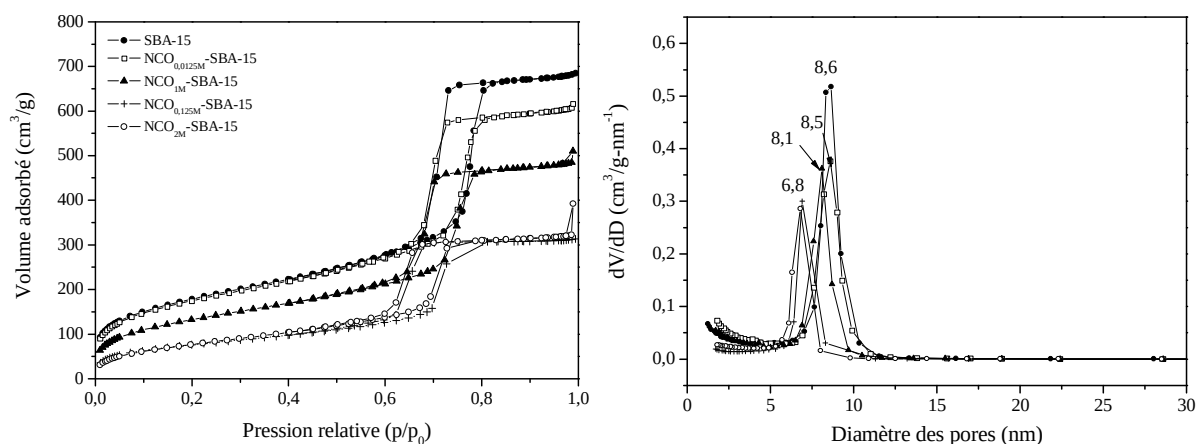


Figure IV-4 - Isothermes d'adsorption et distributions de la taille des pores du matériau SBA-15 après fonctionnalisation à différentes concentrations en isocyanate

Les résultats montrent que l'ensemble des supports présentent une mésoporosité (isotherme de type IV). Le volume d'azote adsorbé diminue en fonction de la concentration en isocyanate, signifiant une hausse du degré de fonctionnalisation. De plus, en augmentant la concentration en TPI dans le toluène, le diamètre des pores et le volume poreux diminuent (Figure IV-5). En effet, le diamètre de 8,6 nm pour le matériau $\text{NCO}_{0,0125\text{M}}\text{-SBA-15}$, tandis qu'il est de 6,5 nm pour le matériau $\text{NCO}_{1\text{M}}\text{-SBA-15}$ et les volumes poreux sont respectivement de 0,83 à $0,44 \text{ cm}^3/\text{g}$. Par contre, on constate un effet de saturation à partir d'une concentration molaire en isocyanate de 1M puisque le diamètre des pores et le volume poreux restent constants. La

diminution de la surface spécifique, du diamètre et du volume poreux est donc attribuée à la présence des groupements organiques qui tapissent la surface interne des pores. Le Tableau IV-1 est un récapitulatif des caractéristiques des matériaux fonctionnalisés à différentes concentrations molaires en isocyanate.

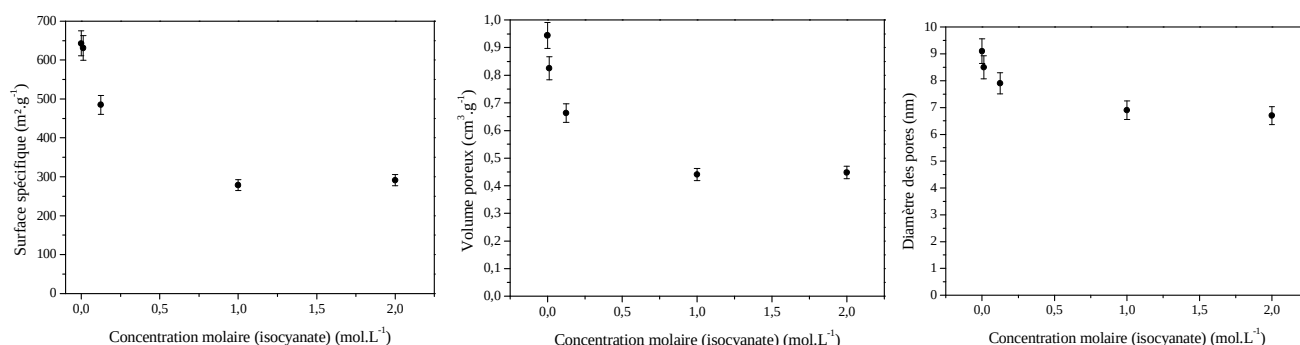


Figure IV-5 - Evolution de la surface spécifique, volume poreux et taille des pores en fonction de la concentration en TPI

Tableau IV-1 - Récapitulatif des caractéristiques des différents supports fonctionnalisés

Support	a_0 (nm)	Diamètre des pores (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_p (cm ³ /g)	Epaisseur du mur (nm)
SBA-15	12,1	8,6	695	0,83	3,5
NCO _{0,0125M} -SBA-15	11,9	8,6	632	0,83	3,3
NCO _{0,125M} -SBA-15	11,9	8,1	485	0,66	3,8
NCO _{1M} -SBA-15	11,3	6,5	278	0,44	4,8
NCO _{2M} -SBA-15	11,3	6,8	291	0,45	4,5

En combinant les résultats obtenus en adsorption-désorption d'azote et en diffraction des rayons X aux petits angles, il est possible de calculer l'épaisseur des murs entre les pores et les valeurs sont reportées dans le Tableau IV-1. En augmentant la concentration en TPI, on peut constater que l'épaisseur des murs augmente en passant de 3,5 nm à 4,5 nm. Cette augmentation de la taille des murs permet de confirmer la présence des groupements organiques qui tapissent les parois. La dimension du groupement $-(CH_2)_3-N=C=O$ est évaluée à 0,6 nm pour une conformation étirée. Cette dimension correspond à la moitié de l'épaisseur supplémentaire du mur. Il est donc probable qu'une monocouche d'isocyanate de propyl existe à l'intérieur des pores.

Une analyse FTIR permet de mettre en évidence le greffage de l'isocyanate de propyl sur la silice mésoporeuse. La Figure IV-6 présente les spectres FTIR du matériau SBA-15 brut, des matériaux fonctionnalisés avec une concentration en TPI de 1M et 2M.

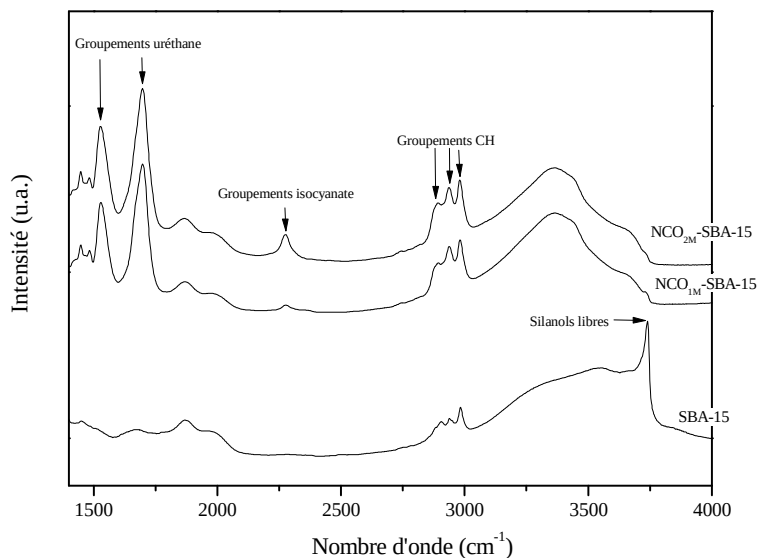


Figure IV-6 - Spectres du matériau SBA-15 à différents taux de fonctionnalisation

Les vibrations détectées à 2891, 2937 et 2983 cm^{-1} sont observées sur le matériau SBA-15 non-fonctionnalisé et correspondent aux groupements CH du tensioactif, qui n'a pas été totalement éliminé. La bande à 3740 cm^{-1} très intense caractérise les silanols libres (Si-OH) de la surface du matériau. Après fonctionnalisation, cette bande diminue fortement. Cela est dû au couplage entre les groupements siliciques du TPI et les silanols libres présents en surface. On peut aussi remarquer l'apparition d'une vibration située à 2280 cm^{-1} qui prouve la présence d'isocyanate sur le matériau. Les bandes à 1697 et 1529 cm^{-1} sont caractéristiques de la formation du groupement uréthane. En comparant le spectre du matériau NCO_{1M}-SBA-15 et NCO_{2M}-SBA-15, ces bandes s'intensifient avec l'augmentation de la concentration en TPI.

La modification de la surface des pores peut également être mise en évidence par spectroscopie RMN du solide.

Pour les spectres RMN du silicium (^{29}Si SP-MAS NMR), ces spectres ont été enregistrés avec une vitesse de rotation de 15 kHz et un angle d'impulsion de 30°. La fréquence de résonance de ce noyau à cette valeur de champ magnétique est de 59,59 MHz. La référence utilisée est le tétraméthylsilane (TMS). Les spectres RMN du carbone (^{13}C CP-MAS NMR) ont été établis avec une vitesse de rotation de 8 kHz et une fréquence de résonance de 75,43 MHz. Le temps

de contact pour la polarisation croisée est de 3 ms avec un temps entre les impulsions de 4 s et un nombre d'accumulations de 7000. Tous les spectres ont été effectués avec une largeur spectrale de 26 kHz. L'adamantane est utilisée comme référence (29,47 ppm).

La Figure IV-7 représente le spectre RMN du carbone ^{13}C obtenu pour le matériau après fonctionnalisation dans une solution de toluène à 2 M d'isocyanate. Nous observons un pic de résonance à 59 ppm qui peut être attribué à la présence du groupement $-\text{CH}_2\text{-NCO}$ de la molécule de TPI. Un pic de résonance à 159 ppm est identifié au groupement uréthane $-\text{NH}-\text{COO}$ qui peut provenir de réactions secondaires entre l'isocyanate et l'éthanol, formées durant la fonctionnalisation. On trouve également dans ce spectre trois pics à 9, 13 et 18 ppm qui peuvent être attribués aux carbones $-\text{CH}_2\text{-Si}$ et CH_3- des groupements isocyanate et carbamates. Enfin, le pic situé à 24 ppm est caractéristiques des méthylènes $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$.

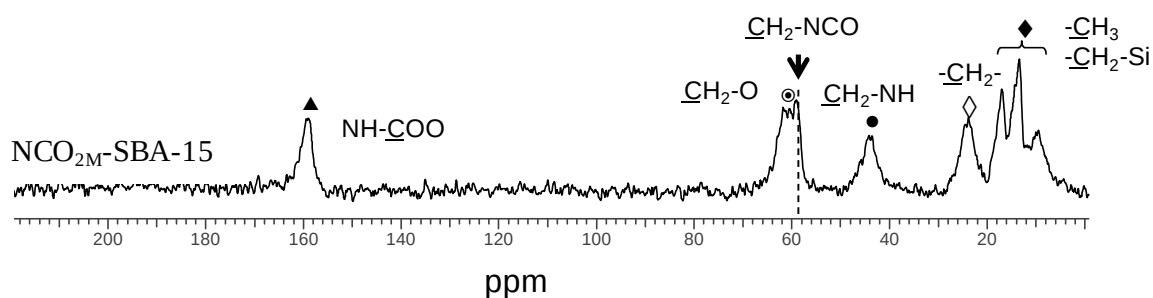


Figure IV-7 - Spectre RMN ^{13}C du matériau fonctionnalisé NCO_{2M}-SBA-15
(Référence : adamantane ; Fréquence de résonance : 75,43 MHz)

Le spectre RMN du silicium ^{29}Si (Figure IV-9) permet d'obtenir des informations complémentaires sur l'environnement silicique et sur la fonctionnalisation de la surface du matériau SBA-15. Ce spectre présente trois pics à -51, -58 et -109 ppm qui sont respectivement caractéristiques de $\text{T}^2[(\text{SiO})_2\text{Si}(\text{OH})\text{C}]$, $\text{T}^3[(\text{SiO})_3\text{SiC}]$ et $\text{Q}^4[\text{Si}(\text{OSi})_4]$. Les résonances Q^n sont observées pour les siloxanes [$\text{Q}^n = \text{Si}(\text{OSi})_n(\text{OH})_{4-n}$] et T^m pour les organosiloxanes [$\text{T}^m = \text{RSi}(\text{OSi})_m(\text{OH})_{3-m}$]⁶. Les pics T^m (m étant le nombre d'oxygène pontants liés à l'atome central) représentent un groupement siloxane trifonctionnel sur lequel se greffe un groupement organique (Figure IV-9Figure IV-8).

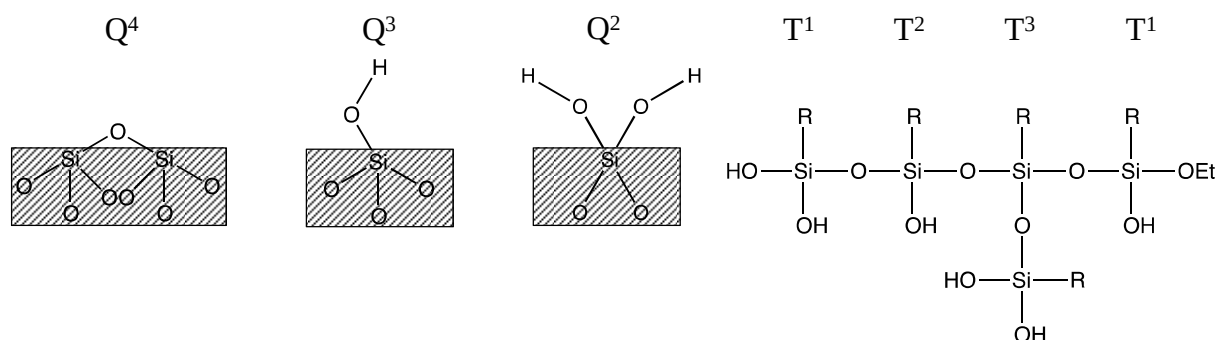


Figure IV-8 - Nomenclature des unités Q et T

Les pics T^2 et T^3 confirment la liaison covalente entre les atomes Si présents du matériau et la molécule fonctionnalisante. Leur intensité augmente lorsque la surface du matériau est de plus en plus modifiée. En déconvoluant les spectres et en intégrant l'aire des pics Q^n et T^m , on peut estimer le taux de fonctionnalisation de la surface du matériau par le calcul $T^m/(T^m + Q^n)^7$. D'après ce calcul, les groupements organiques greffés sur les supports sont de l'ordre de **10,4%** pour le matériau NCO_{2M} -SBA-15. On peut noter aussi l'absence des pics à 91 ppm ($Q^2[Si(OSi)_2(OH)_2]$) et 101 ppm ($Q^3[Si(OSi)_3(OH)]$) indiquant un haut degré de condensation du réseau silicique⁸.

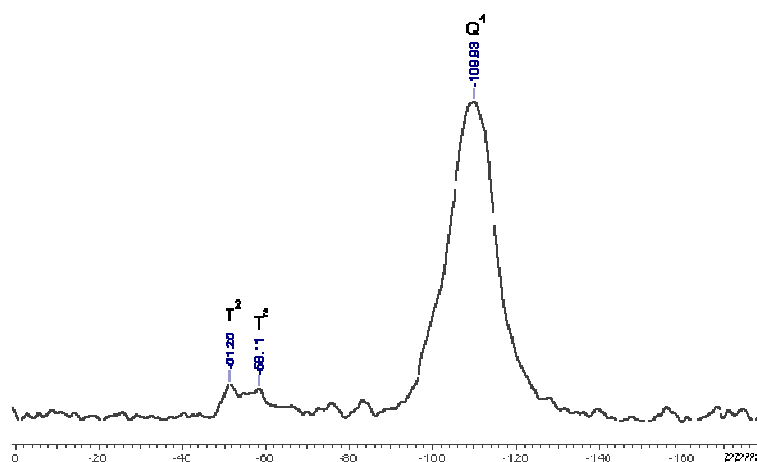


Figure IV-9 - Spectre RMN ^{29}Si du matériau fonctionnalisé NCO_{2M} -SBA-15
(Référence : TMS ; Fréquence de résonance : 59,59 MHz)

B. Adsorption chimique de l'enzyme sur le support SBA-15 fonctionnalisé

Le matériau SBA-15 étant fonctionnalisé, l'adsorption chimique de l'enzyme sur ce support peut être envisagée. Lors de cette étape d'immobilisation, nous avons choisi de fonctionnaliser le matériau avec une solution de toluène ayant une concentration en

isocyanate de 2M afin d'atteindre la saturation au niveau de la fonctionnalisation et de tapisser au maximum la surface du matériau. La Figure IV-10 est un schéma de principe illustrant l'étape de l'adsorption chimique de la lipase Mm-L qui a été réalisée selon le protocole décrit dans le chapitre 2. Les échantillons contenant la lipase liée de manière covalente seront nommés Mm-L-urée_y-SBA-15 avec y la concentration initiale en lipase dans la solution tampon utilisée pour l'immobilisation.

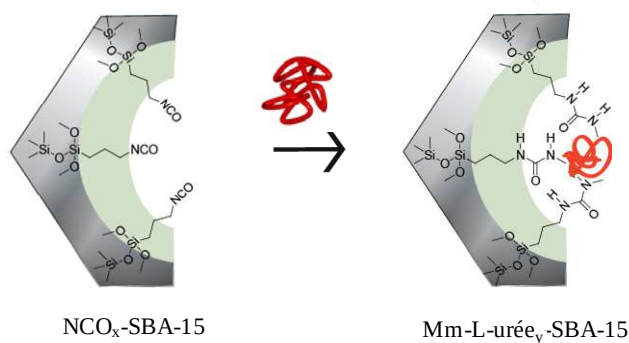


Figure IV-10 - Schéma de principe illustrant l'adsorption chimique de l'enzyme sur le matériau fonctionnalisé

Dans un premier temps, nous avons choisi une concentration initiale en lipase de 10 mg/mL afin de pouvoir comparer la capacité d'adsorption et les performances catalytiques des deux types de bioréacteurs (l'un où l'enzyme est physisorbée et l'autre où elle est chimisorbée).

1. Caractérisation du bioréacteur obtenu par immobilisation chimique

La réaction entre l'isocyanate et l'enzyme ayant lieu en milieu aqueux, la liaison covalente peut se faire par l'intermédiaire de plusieurs liaisons urée qui se forment par addition nucléophile des amines primaires présentes sur les chaînes latérales de l'enzyme sur la surface modifiée du support. La caractérisation du matériau avec l'enzyme chimisorbée a été réalisée pour déterminer les propriétés structurales et texturales du bioréacteur. La Figure IV-11 représente les diffractogrammes SAXS du support SBA-15 initial, fonctionnalisé NCO_{2M}-SBA-15 et contenant l'enzyme Mm-L-urée₁₀-SBA-15. Cette figure montre que l'arrangement hexagonal du matériau contenant l'enzyme est préservé après chimisorption de l'enzyme. Cependant, malgré l'adsorption de l'enzyme, la distance entre les plans (100) reste constante (9,8 nm) par rapport au matériau fonctionnalisé.

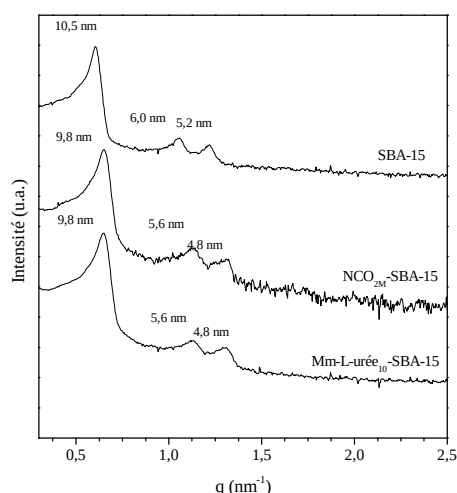


Figure IV-11 - Diffractogrammes SAXS du matériau SBA-15 initial, du matériau fonctionnalisé $\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15 et du matériau fonctionnalisé contenant l'enzyme Mm-L-urée₁₀-SBA-15

L'analyse par adsorption-désorption d'azote a été effectuée et la Figure IV-12 montre les isothermes d'adsorption et les distributions de la taille des pores du support SBA-15 initial, fonctionnalisé $\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15 et contenant l'enzyme (Mm-L-urée₅-SBA-15 et Mm-L-urée₁₀-SBA-15).

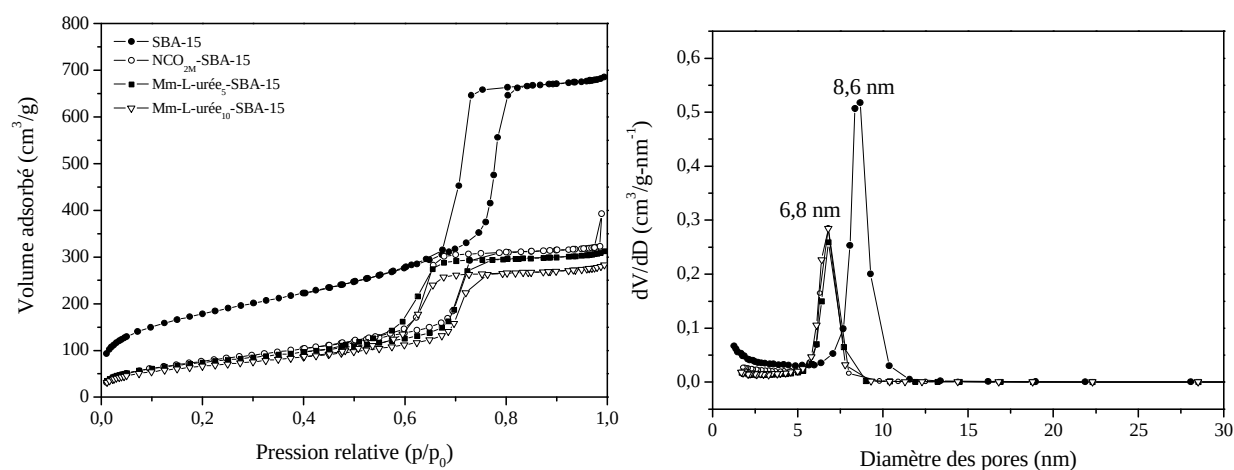


Figure IV-12 - Isothermes d'adsorption et distributions de la taille des pores des matériaux SBA-15, $\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15, Mm-L-urée₅-SBA-15 et Mm-L-urée₁₀-SBA-15

Les résultats de l'analyse par adsorption-désorption d'azote montrent que la mésoporosité est conservée après la chimisorption de l'enzyme car les isothermes sont de type IV. De plus, la distribution de la taille des pores du matériau fonctionnalisé $\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15 ainsi que des matériaux contenant l'enzyme Mm-L-urée₅-SBA-15 et Mm-L-urée₁₀-SBA-15 ne varie pas,

elle est centrée sur 6,8 nm. Le Tableau IV-2 regroupe les caractéristiques des supports Mm-L-urée₅-SBA-15 et Mm-L-urée₁₀-SBA-15.

Tableau IV-2 – Comparaison des caractéristiques d'adsorption-désorption d'azote des matériaux fonctionnalisés et contenant

Support	Diamètre des pores (nm)	S _{BET} (m ² /g)	V _p (cm ³ /g)
Mm-L-urée ₁₀ -SBA-15	6,8	262	0,39
Mm-L-urée ₅ -SBA-15	6,8	273	0,43
NCO _{2M} -SBA-15	6,8	291	0,45
SBA-15	8,6	695	0,83

Lorsque la concentration initiale en lipase dans la solution tampon utilisée pour l'immobilisation augmente, le volume poreux et la surface spécifique diminuent légèrement, indiquant une augmentation du taux d'adsorption de la *Mm-L*.

Une analyse par spectroscopie RMN ¹³C a permis également de confirmer la présence de la lipase sur les supports. Les spectres RMN ¹³C du matériau fonctionnalisé NCO_{2M}-SBA-15, du matériau Mm-L-urée₁₀-SBA-15 et du matériau contenant la lipase physisorbée sont présentés en Figure IV-13.

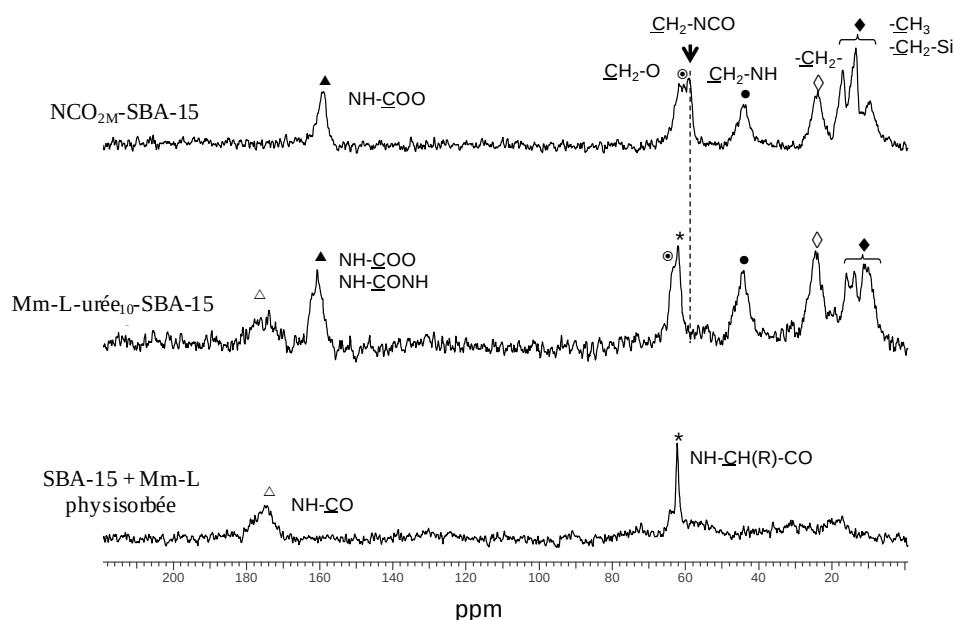


Figure IV-13 - Spectres RMN ¹³C du matériau fonctionnalisé NCO_{2M}-SBA-15, du matériau Mm-L-urée₁₀-SBA-15 et du matériau contenant la lipase physisorbée
(Référence : adamantane ; Fréquence de résonance : 75,43 MHz)

Sur le spectre du support Mm-L-urée₁₀-SBA-15, on peut noter la disparition de la fonction isocyanate située à 59 ppm ($\text{CH}_2\text{-NCO}$), indiquant que cette dernière a réagi avec les groupements NH_2 de l'enzyme. En comparant le spectre d'un matériau SBA-15 contenant une lipase physisorbée avec celui du support Mm-L-urée₁₀-SBA-15, on peut constater l'existence d'un même pic situé à 174 ppm, caractéristique de l'enzyme. La présence de ce pic ainsi que de celui situé à 62 ppm sont respectivement attribués au groupement CONH et NHCH(R)CO également caractéristiques de l'enzyme. La spectroscopie RMN a donc permis de mettre en évidence l'adsorption chimique de la lipase sur le matériau SBA-15 fonctionnalisé. La spectroscopie infrarouge peut également confirmer la présence d'enzyme sur ce support. La Figure IV-14 représente l'ensemble des spectres IR enregistrés pour les matériaux SBA-15, $\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15, Mm-L-urée₅-SBA-15 et Mm-L-urée₁₀-SBA-15.

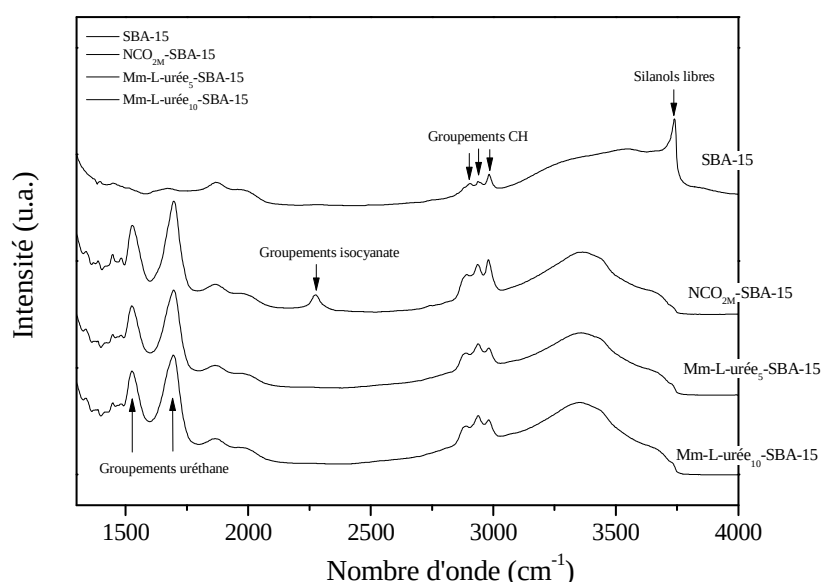


Figure IV-14 - Spectres IR des matériaux SBA-15 initial, $\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15, Mm-L-urée₅-SBA-15 et Mm-L-urée₁₀-SBA-15

Sur le spectre IR des bioréacteurs Mm-L-urée₅-SBA-15 et Mm-L-urée₁₀-SBA-15, on peut voir que la bande présente à 2280 cm^{-1} sur le spectre $\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15, caractéristique de l'isocyanate, a disparu. Cela suggère que cette fonction isocyanate a réagi avec la lipase. Cependant, il n'y a pas de différence entre le spectre des matériaux Mm-L-urée₅-SBA-15 et celui de Mm-L-urée₁₀-SBA-15, la bande à 2280 cm^{-1} qui caractérise l'isocyanate est absente sur les deux spectres. Cela pourrait indiquer que la saturation est atteinte et qu'il n'y a plus de possibilité d'adsorber d'enzyme supplémentaire sur le support. La liaison urée formée entre la fonction isocyanate (-NCO) et les amines de l'enzyme ($\text{H}_2\text{N-Enz}$) par addition nucléophile,

aurait dû avoir une bande caractéristique aux alentours des 1690 cm^{-1} . Cette bande doit être masquée par la fonction uréthane, qui, elle, est indésirable. Malheureusement, la mesure de l'aire de la bande située à 1535 cm^{-1} ne donne pas d'information sur la quantité d'enzyme adsorbée car cette bande reste constante au cours des différentes étapes de la préparation du bioréacteur ($\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15, Mm-L-urée₅-SBA-15 et Mm-L-urée₁₀-SBA-15).

2. Détermination de la quantité d'enzyme chimisorbée sur le support

$\text{NCO}_{2\text{M}}$ -SBA-15

Il est important de connaître la quantité de lipase liée de manière covalente au support afin de relier la quantité d'enzyme adsorbée aux performances catalytiques du bioréacteur. Les bandes caractéristiques de l'enzyme observées sur les spectres IR étant situées dans une zone où apparaissent également celles liées à la modification du support, il n'est pas possible de quantifier la quantité de lipase adsorbée par IR. La quantification a donc été effectuée par la méthode dite « des restes » en utilisant la spectroscopie Ultra-Violet (UV). La réaction de chimisorption s'effectuant en milieu aqueux, l'ensemble est filtré sous Büchner et le filtrat (solution enzymatique de départ) est récupéré. Ensuite, le matériau est lavé avec une quantité connue de solution tampon qui est également récupérée. Ce filtrat et l'eau de lavage sont analysés par spectroscopie UV afin de déterminer la concentration en lipase contenue dans les solutions. Le spectre UV présente une bande caractéristique de l'enzyme située aux alentours de 280 nm. Cette bande est attribuée aux cycles aromatiques présents dans les acides aminés de la protéine. Une autre bande est détectée par UV vers 200 nm et est attribuée aux liaisons peptidiques. Nous avons utilisé la bande à 280 nm^9 pour déterminer le taux d'adsorption. Pour connaître la concentration en lipase, il est nécessaire d'établir au préalable une droite d'étalonnage reliant l'absorbance à la concentration enzymatique. Cette droite a été déterminée en préparant différentes solutions tampon ayant des concentrations en lipase allant de 0 à 30 mg.mL^{-1} . L'analyse ces solutions enzymatiques par UV a permis de connaître l'adsorption correspond à chacune de ces solutions. L'adsorption du filtrat et de l'eau de lavage a été mesurée pour chaque échantillon et la concentration en lipase a pu être déterminée.

La droite d'étalonnage est présentée sur la Figure IV-15 et a pour équation :

$$\text{Abs} = 1,073 \cdot [\text{C}_{\text{Mm-L}}]$$

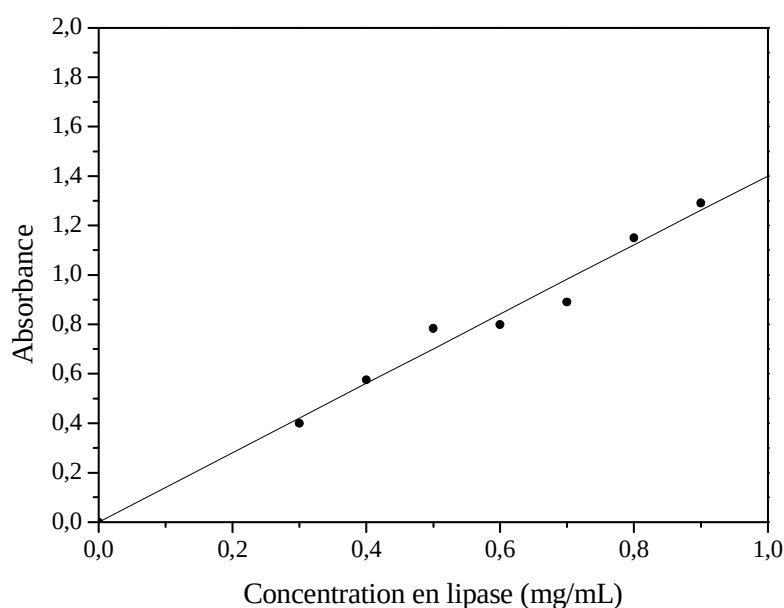


Figure IV-15 – Droite d'étalonnage déterminée par UV avec différentes solutions tampon (pH 6) à concentrations variables de *Mm-L* dans la solution tampon à pH 6

Connaissant les volumes du filtrat et l'eau de lavage ainsi que la concentration en lipase dans chacune de ces solutions, le taux d'adsorption est calculé d'après l'équation suivante :

$$\frac{m_{\text{lipase}}}{m_{\text{matériau}}} = \frac{m_{\text{lipase}}^{\text{initiale}} - C_{\text{lipase}}^{\text{filtrat}} \cdot V_{\text{filtrat}} - C_{\text{lipase}}^{\text{eau de lavage}} \cdot V_{\text{eau de lavage}}}{m_{\text{matériau}}}$$

où m_{lipase} est la masse de lipase adsorbée, $m_{\text{matériau}}$ la masse de matériau utilisé, $m_{\text{lipase}}^{\text{initiale}}$ la masse initiale de lipase présente dans la solution tampon, $C_{\text{lipase}}^{\text{filtrat}}$ la concentration en lipase du filtrat, V_{filtrat} le volume du filtrat, $C_{\text{lipase}}^{\text{eau de lavage}}$ la concentration en lipase des eaux de lavage et $V_{\text{eau de lavage}}$ le volume de l'eau de lavage.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la quantité maximale de lipase incorporable dans ce support SBA-15 fonctionnalisé. Pour cela, des solutions tampon à différentes concentrations en lipase (2, 5 et 10 mg/mL) ont été préparées en supposant que cette gamme permettra d'obtenir une saturation en termes d'immobilisation.

La Figure IV-16 présente l'évolution du taux de chimisorption de la lipase *Mm-L* en fonction de la concentration initiale en lipase dans la solution tampon.

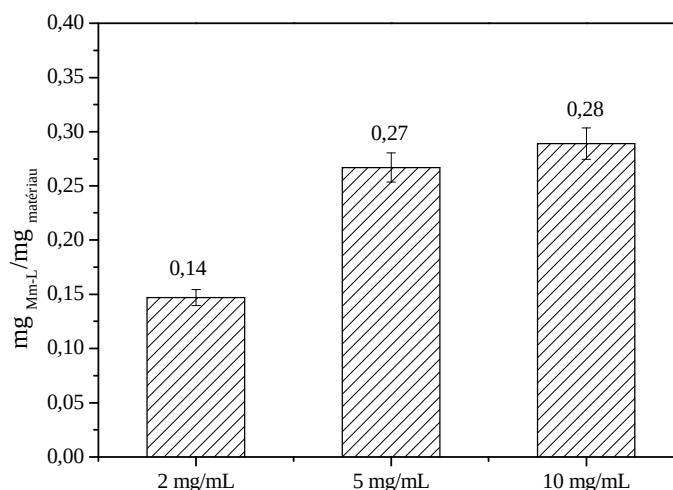


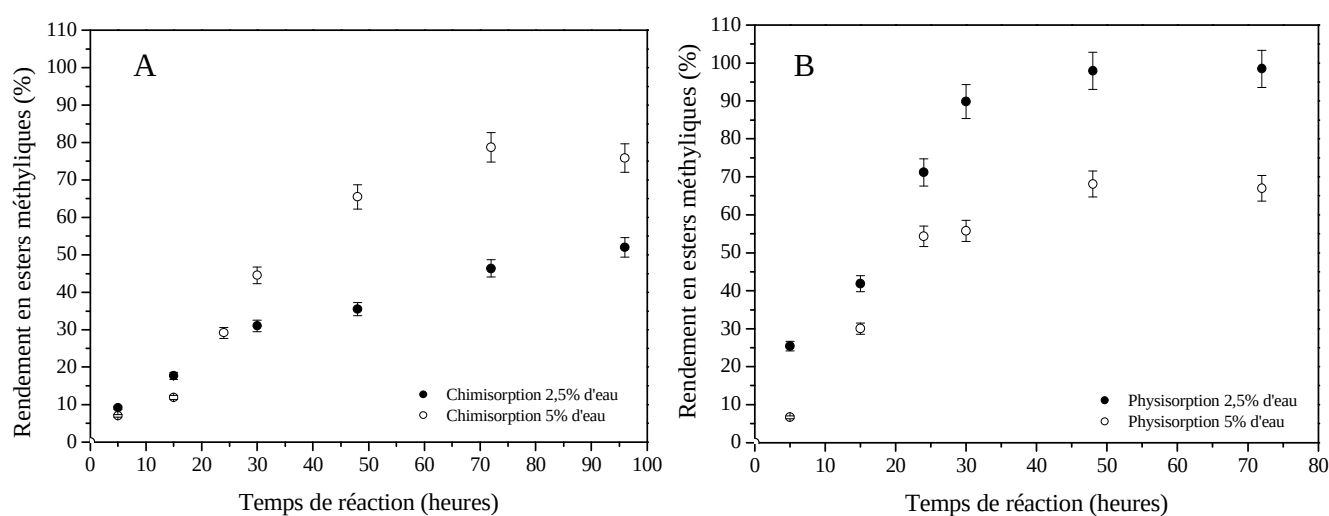
Figure IV-16 - Variation de la quantité d'enzyme adsorbée sur le matériau NCO_{2M}-SBA-15 en fonction de la concentration initiale en lipase dans la solution à pH 6

La quantité d'enzyme adsorbée sur le matériau NCO_{2M}-SBA-15 augmente progressivement en fonction de la concentration en *Mm-L* dans la solution tampon et l'adsorption maximale est de 0,28 mg *Mm-L*/mg NCO_{2M}-SBA-15. La faible différence d'adsorption entre une immobilisation réalisée à partir d'une solution ayant une concentration à 5 mg/mL et celle réalisée avec une solution à 10 mg/mL suggère que la capacité d'adsorption de la matrice fonctionnalisée pourrait être atteinte. Ce résultat peut être corrélé avec les résultats obtenus par analyse d'adsorption-désorption d'azote puisque l'on note une légère variation du volume poreux et de la surface spécifique des bioréacteurs *Mm-L*-urée₅-SBA-15 et *Mm-L*-urée₁₀-SBA-15. Pour la suite de ce travail, nous avons choisi de réaliser les immobilisations à partir d'une solution ayant une concentration de 10 mg/mL.

C. Réactions de transestérification catalysées par la lipase *Mm-L* chimisorbée

Nous avons testé l'activité catalytique du support *Mm-L*-urée₁₀-SBA-15 en effectuant la réaction de méthanolyse de l'huile de colza sans solvant et en prenant les conditions déterminées dans le cas de la réaction de transestérification pour une lipase physisorbée. Ainsi, le volume d'huile est de 600 μ L, la masse de catalyseur de 10 mg, le rapport molaire MeOH/huile est de 1, la quantité d'eau est de 2,5% (par rapport à la masse d'huile), la température de 24°C, et enfin l'agitation de 100 tours par minute. La purification des produits de la réaction et l'analyse par GC-MS sont faites selon le protocole décrit dans le chapitre 2.

Les performances catalytiques de ce bioréacteur contenant la lipase chimisorbée ont été testées. Pour cela, nous avons suivi le rendement des esters méthyliques de la réaction de transestérification effectuée dans les conditions données ci-dessus, mais en faisant varier la quantité d'eau ajoutée (2,5 et 5%) (Figure IV-17A). Pour rappel, le rendement de la réaction est toujours calculé à partir du méthanol. Les rendements obtenus sont de 50% et 80% en présence, respectivement, de 2,5% et de 5% d'eau. On note que le rendement est plus faible que dans le cas du bioréacteur élaboré à partir de la lipase *Mm-L* physisorbée (rendement qui peut atteindre 100%). Ainsi la liaison covalente qui lie l'enzyme au support joue un rôle sur l'activité catalytique.



Lorsque 2,5% d'eau sont ajoutés (Figure IV-17B), nous constatons que la réaction catalysée par une lipase physisorbée atteint un rendement proche de 100% après 40 heures de réaction. Par contre, le rendement de la réaction catalysée par une lipase chimisorbée sur le matériau est seulement de 50% au bout de 72 heures. En revanche avec 5% d'eau ajoutés, la cinétique est quasi-identique pour les deux types de catalyseurs, au bout de 75 heures, près de 80% du méthanol a réagi. On peut noter que les deux types de bioréacteurs présentent la même cinétique, malgré une quantité d'enzyme différente. En effet, le matériau SBA-15 dont l'enzyme est physisorbée contient 0,43 mg_{Mm-L}/mg_{SBA-15}, alors qu'avec l'enzyme liée de manière covalente, le taux est de 0,28 mg_{Mm-L}/mg_{SBA-15}. Le fait d'avoir un rendement quasi-identique et une quantité d'enzyme différente signifie que le « *turnover number* » n'est pas le

même pour les deux supports. Le « *turnover number* » correspond au rapport du nombre de moles de substrat (huile de colza) converti sur le nombre de moles de catalyseur utilisé. Il représente la capacité à catalyser un substrat en fonction de la quantité de catalyseur. Il ne faut pas le confondre avec le « *turnover frequency* » qui est le *turnover number* par unité de temps.

Tableau IV-3 - "Turnover number" des différents catalyseurs testés

Biocatalyseur	Γ^* (g _{Mm-L} /g _{support})	Eau (%)	Turnover number (mol/mol _{Mm-L})
<i>Mm-L</i> chimisorbée	0,28	2,5	4830
<i>Mm-L</i> chimisorbée	0,28	5	7085
<i>Mm-L</i> physisorbée	0,43	5	3880

* Γ représente le taux d'adsorption d'enzyme sur le support.

Tableau IV-4 - Valeurs des vitesses initiales calculées pour les différentes conditions de réactions

Bioréacteur		Réaction		Consommation de MeOH		Formation des esters méthyliques	
Type d'adsorption	Quantité de lipase (mg _{Mm-L} /mg)	Température (°C)	Ajout d'eau (%)	Vitesse initiale (μmol/h)	Vitesse initiale (μmol/h/mg _{Mm-L})	Vitesse initiale (μmol/h)	Vitesse initiale (μmol/h/mg _{Mm-L})
Physisorption	0,43	24	2,5	19,2	4,57	18,5	4,4
			5	13,9	3,31	13,4	3,19
Chimisorption	0,28	24	2,5	8,5	3,03	8,2	2,93
			5	7,7	2,75	7,4	2,64

Nous avons calculé les vitesses initiales de formation des esters méthyliques. Avec 2,5 et 5% d'eau, les vitesses initiales sont quasi-identiques puisque l'on obtient respectivement 8,5 et 7,7 μmol/h. Par ailleurs, les vitesses de consommation du méthanol sont très proches de celles de la formation des esters méthyliques. Ces résultats montrent que le fait de lier de manière covalente la lipase au support ne dénature pas l'enzyme et plus particulièrement son site actif¹⁰. Malgré la fixation de la lipase *Mm-L* sur la silice, cette enzyme reste active. Le comportement du bioréacteur vis-à-vis de son recyclage a ensuite été examiné. Nous avons effectué plusieurs réactions de transestérification successives pendant 24 heures. Deux séries ont été effectuées en ajoutant 2,5 et 5% d'eau. Après chaque réaction, le matériau contenant la lipase a été lavé abondamment à l'eau distillée et séché à température ambiante. Les résultats reportés sur la Figure IV-18 présentent le rendement relatif des différentes réactions, en considérant un rendement de 100% pour la réaction initiale. On peut constater que l'enzyme

conserve une activité catalytique appréciable pendant 4 cycles avec les deux types de bioréacteur. Dans le cas d'un ajout de 5% d'eau, cette activité est totalement maintenue jusqu'au 4^{ème} cycle d'utilisation, avant de diminuer progressivement à 43% à la 6^{ème} réutilisation. Par contre, dans les conditions où 2,5% d'eau sont ajoutés dans le milieu réactionnel, le fonctionnement maximum du bioréacteur n'est possible que pendant 2 cycles.

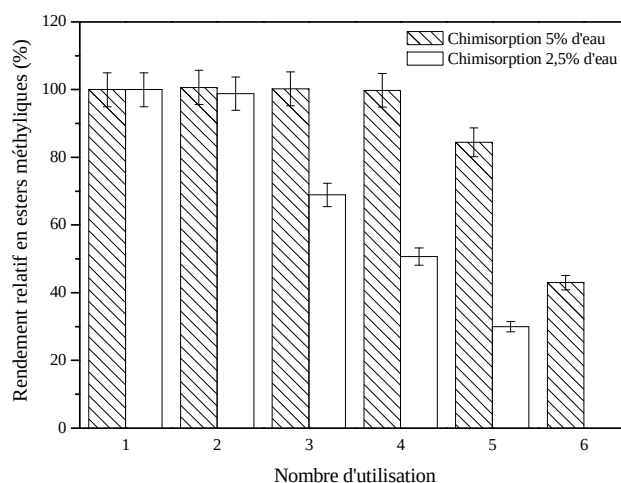


Figure IV-18 - Evolution du rendement en fonction du nombre d'utilisations du bioréacteur qui contient la lipase *Mm-L* chimisorbée

D. Caractérisation du bioréacteur après réutilisation

Pour comprendre la perte d'activité catalytique de la lipase *Mucor miehei* après plusieurs utilisations, nous avons effectué plusieurs caractérisations physico-chimiques du bioréacteur. Nous avons sélectionné le matériau Mm-L-urée₁₀-SBA-15 qui permet d'obtenir le meilleur rendement avec un ajout de 5% d'eau. Une analyse par diffraction des rayons X aux petits angles a été effectuée pour connaître l'évolution de la structure mésoporeuse (Figure IV-19).

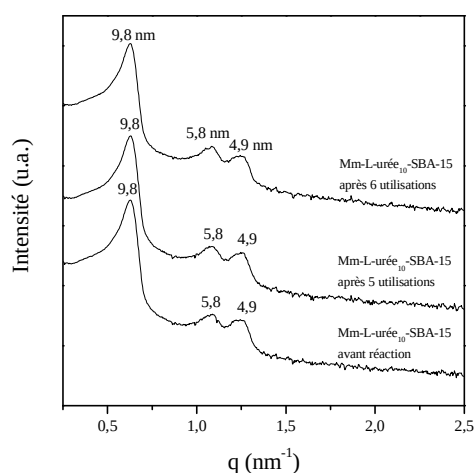


Figure IV-19 - Diffractogrammes SAXS des supports Mm-L-urée₁₀-SBA-15 avant réaction, après 5 et 6 utilisations

La présence de trois pics de diffraction sur les diffractogrammes montre que l'arrangement hexagonal des pores est conservé après les 6 utilisations du bioréacteur. De plus, la distance entre les plans (100) reste constante et est de 9,8 nm. Une analyse par adsorption-désorption d'azote a été effectuée après la 5^{ème} et la 6^{ème} utilisation. Les isothermes confirment que la mésoporosité est toujours présente puisque les isothermes sont de type IV (Figure IV-20).

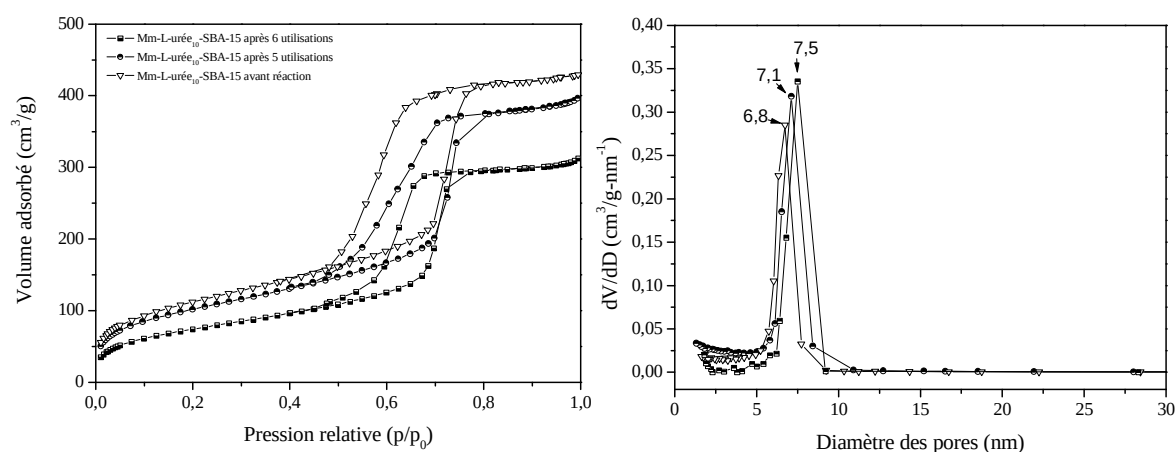


Figure IV-20 - Isothermes d'adsorption et distributions de la taille des pores pour le matériau avant réaction, après 5 et 6 utilisations

Concernant la taille des pores, on observe une légère augmentation au fur et à mesure des réutilisations. Elle passe de 6,8 nm pour le matériau initial à 7,5 nm après 6 utilisations. Une faible désorption de l'enzyme ou de la monocouche d'isocyanate peut être à l'origine de cet accroissement du diamètre des pores. L'augmentation des valeurs de surface spécifique et de volume poreux est en accord avec cette hypothèse. Les valeurs sont regroupées dans le Tableau IV-5.

Tableau IV-5 – Caractéristiques du bioréacteur au cours de son recyclage

Support	Diamètres de pores (nm)	Surface spécifique (m²/g)	Volume poreux (cm³/g)
Mm-L-urée ₁₀ -SBA-15 avant réaction	6,8	272	0,39
Mm-L-urée ₁₀ -SBA-15 après 5 réactions	7,1	371	0,55
Mm-L-urée ₁₀ -SBA-15 après 6 réactions	7,6	413	0,60

La présence de l'enzyme sur le support après plusieurs utilisations a été observée par spectroscopie IR et les spectres sont tracés sur la Figure IV-21.

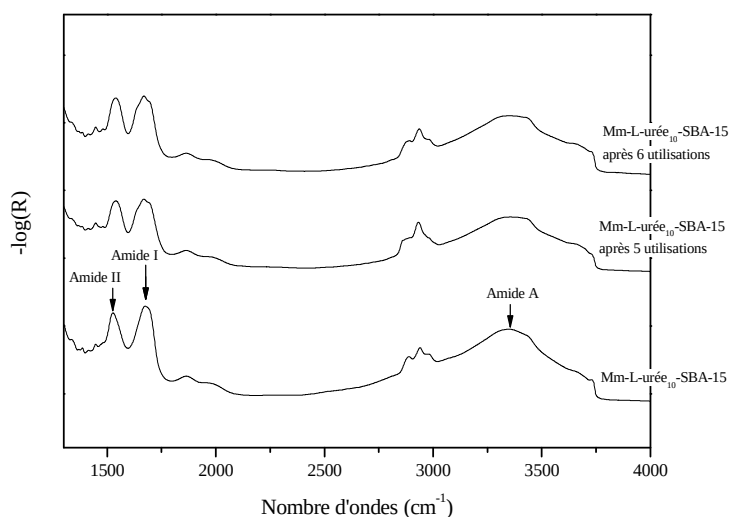


Figure IV-21 - Spectres IR du support avant son utilisation et après 5 et 6 utilisations

En comparant les spectres des supports avant utilisation et après 5 et 6 utilisations, on peut toujours constater la présence des bandes caractéristiques de l'enzyme (Amide I, II et A). Cependant, les fonctions uréthane et urée ont également des bandes caractéristiques situées dans cette gamme de nombre d'onde. La quantification du taux d'immobilisation n'est pas donc possible à déterminer par spectroscopie IR. En revanche, on observe un décalage des bandes Amide II et I vers les plus forts nombres d'ondes sur le spectre du support après 5 utilisations. Il est possible que des modifications structurales de la lipase s'opèrent au cours du temps. Toutefois, il n'y a pas de forte perte d'activité, puisque le rendement relatif de la réaction de transestérification passe de 100% lors de la 1^{ère} utilisation à 84% pour la 5^{ème} utilisation. A la 6^{ème} utilisation, l'activité catalytique chute à 43%.

E. Résumé

Dans ce chapitre, nous avons montré que la lipase *Mucor miehei* pouvait être liée de manière covalente à un support, préalablement fonctionnalisé, en conservant une activité catalytique. La modification de la surface des pores n'altère pas les caractéristiques structurales du matériau, mais le diamètre des pores diminue. En termes de capacité d'adsorption, un support fonctionnalisé contient au maximum 0,28 mg_{Mm-L}/mg_{SBA-15}. Dans le cas de la physisorption, ce taux atteint la valeur de 0,43 mg_{Mm-L}/mg_{SBA-15}. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la fonctionnalisation du matériau entraîne une diminution de la taille des pores et la capacité d'immobilisation est ainsi réduite. Les valeurs de surface spécifique et volume poreux confirment cette hypothèse. On peut aussi noter que la molécule fonctionnalisante à trois terminaisons ($-CH_3$) qui sont susceptibles de se lier au support (SiOH) et une seule

fonction isocyanate qui peut créer une liaison covalente avec la lipase. Dans le cas de la physisorption, chaque silanol libre (-OH) peut créer une liaison avec l'enzyme tandis qu'en chimisorption, le fait d'ajouter une molécule conduit à diviser par trois les possibilités de fixation.

La comparaison des performances catalytiques d'une enzyme physisorbée et chimisorbée permet de connaître l'influence du type d'interactions entre le support et l'enzyme. Dans les conditions de réaction optimales établies dans le cas de la physisorption (2,5% d'eau), nous avons constaté que le rendement de la réaction de transestérification catalysée par une lipase chimisorbée était divisé par deux. Par contre, une quantité d'eau égale à 5% permet d'améliorer le rendement (environ 80%). Il est donc nécessaire de déterminer pour chaque biocatalyseur les conditions optimales de la réaction envisagée. En termes de vitesses initiales, la quantité d'eau présente n'a pas d'influence. En comparant ces vitesses à celles calculées pour un bioréacteur dont la lipase est physisorbée, nous avons observé que les vitesses initiales correspondant au catalyseur chimisorbé sont divisées par plus de la moitié. Cependant, les taux d'adsorption des deux types de bioréacteurs étant différents, l'écart entre les valeurs des vitesses est réduit, puisqu'il faut tenir compte de la quantité de lipase présente dans le milieu réactionnel.

Concernant le recyclage du catalyseur, nous avons constaté qu'un bioréacteur dont la lipase est physisorbée ne permet que deux réutilisations puisque ses performances catalytiques deviennent nulles par la suite. Cela peut être lié à la désorption de l'enzyme au cours des réactions, les liaisons entre l'enzyme et le support étant faibles. Lier chimiquement l'enzyme est une manière de résoudre ce problème. Les résultats du recyclage d'une lipase chimisorbée montrent que l'activité catalytique est maintenue pendant six utilisations. Cela suggère que l'enzyme reste fixé sur le support. Cependant, après 5 réutilisations, le rendement diminue progressivement. Cette perte d'activité est liée à l'enzyme mais pas à son relargage. Teixeira *et al.* reporte que la perte d'activité de l'enzyme pourrait être due à la présence d'un excès d'eau au fur et à mesure de la réutilisation du bioréacteur et à la présence de glycérol¹¹. Le glycérol dans le milieu réactionnel forme une couche autour de la lipase, empêchant ainsi la diffusion du substrat¹². Une étude de Virto *et al.* a montré que ce phénomène n'a pas seulement lieu lors de l'utilisation d'une lipase immobilisée, mais également avec une lipase « libre »¹³. Une autre cause de la perte d'activité de l'enzyme peut être liée à la présence de produits oxydant les lipides, comme les peroxydes. En effet, la combinaison d'acides gras insaturés et d'oxygène entraîne la formation de produits d'oxydation. Ce phénomène peut avoir lieu dans notre cas, car l'huile de colza utilisée pour la réaction de transestérification

contient des acides gras insaturés comme l'acide oléique et l'acide linoléique. A ce propos, Ohta *et al.* ont également observé une désactivation de la lipase en présence de peroxydes lipidiques¹⁴. D'après Pirozzi *et al.*, le processus d'oxydation des triglycérides se fait en deux étapes¹⁵. Tout d'abord, des produits type peroxydes sont formés, et ensuite une seconde oxydation conduit à la formation d'aldéhydes qui interagissent avec les groupements SH, les amino-acides et l'histidine de l'enzyme. Ces attaques causent la désactivation de la lipase, cette seconde oxydation étant particulièrement sévère.

Références bibliographiques

- ¹ Y. X. Bai, Y. F. Li, Y. Yang, L. X. Yi, Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized nanoscale SiO₂ spheres, *Process Biochem.*, **2006**, 41, 770–777
- ² J. Liu, S. Bai, Q. Jin, H. Zhong, C. Li, Q. Yang, Improved Catalytic Performance of Lipase Accommodated in the Mesoporous Silicas with Polymer-Modified microenvironment, *Langmuir*, **2012**, 28, 9788-9796
- ³ J. Yang, Y. Hu, L. Jiang, B. Zou, R. Jia, H. Huang, Enhancing the catalytic properties of porcine pancreatic lipase by immobilization on SBA-15 modified by functionalized ionic liquid, *Biochem. Eng. J.*, **2013**, 70, 46–54
- ⁴ B. Zou, Y. Hu, D. Yu, L. Jiang, W. Liu, P. Song, Functionalized ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15: A novel, designable and efficient carrier for porcine pancreas lipase, *Colloids Surf., B*, **2011**, 88, 93–99
- ⁵ H.P.Y. Humphrey, P. A. Wright, N. P. Botting, Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, 15, 81–92
- ⁶ D. Margolese, J. A. Melero, S. C. Christiansen, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, Direct syntheses of ordered SBA-15 mesoporous silica containing sulfonic acid groups, *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 2448-2459
- ⁷ J. L. Blin, C. Gérardin, L. Rodehüser, C. Selve, M. J. Stébé, Influence of Alkyl Peptidoamines on the Structure of Functionalized Mesoporous Silica, *Chem. Mater.*, **2004**, 16, 5071-5080
- ⁸ M. Luhmer, J.B. d'Espinose, H. Hommel, A.P. Legrand High-resolution ²⁹Si solid-state NMR study of silicon functionality distribution on the surface of silicas, *Magnetic Resonance Imaging*, **1996**, 14, 911–913
- ⁹ J. Wang, G. Meng, K. Tao, M. Feng, X. Zhao, Z. Li, H. Xu, D. Xia, J. R. Lu, Immobilization of Lipases on Alkyl Silane Modified Magnetic Nanoparticles: Effect of Alkyl Chain Length on Enzyme Activity, *PLoS ONE*, **2012**, 7, e43478. doi:10.1371/journal.pone.0043478
- ¹⁰ S. Jääskeläinen, C. S. Verma, R. E. Hubbard, P. Lestko, L. S.D Caves, Conformational change in the activation of lipase: An analysis in terms of low-frequency normal modes, *Protein Sci.*, **1998**, 7, 1359-1367

-
- ¹¹ A. R. S. Teixeira, J. L. C. Santos, J. G. Crespo, Lipase-Catalyzed Consecutive Batch Reaction for Production of Steryl Esters from Vegetable Oil Deodorizer Distillates, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2012**, 51, 5443-5455
- ¹² V. Dossat, D. Combes, A. Marty, Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: Influence of the glycerol production, *Enzyme Microb. Technol.*, **1999**, 25, 194-200.
- ¹³ M. Virto, I. Agud, S. Montero, A. Blanco, R. Solozabal, J. Lascaray, M.J. Llama, J.L. Serra, L.C. Landeta, M. de Renobales, Kinetic properties of soluble and immobilized *Candida rugosa* lipase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1995**, 50, 127-136
- ¹⁴ Y. Ohta, T. Yamane, S. Shimizu, Inhibition and inactivation of lipase by fat peroxide in the course of batch and continuous glycerolyses of fat by lipase, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, 53, 1885-1890.
- ¹⁵ D. Pirozzi, Improvement of lipase stability in the presence of commercial triglycerides, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2003**, 105, 608-613

CHAPITRE V – BIOREACTEURS MESO-MACROPOREUX

A.	BIOREACTEURS MESO-MACROPOREUX OBTENUS PAR LA PHYSISORPTION DE LA LIPASE MM-L	145
1.	PREPARATION DU MATERIAU.....	145
2.	CARACTERISATION DU MATERIAU MESO-MACROPOREUX	146
3.	EFFET DE LA CALCINATION	148
4.	IMMOBILISATION DE LA LIPASE <i>MUCOR MIEHEI</i> SUR LE MATERIAU CALCINE	151
a.	<i>Caractérisation du bioréacteur et mise en évidence de l'adsorption</i>	<i>151</i>
b.	<i>Dosage de l'enzyme</i>	<i>154</i>
5.	REACTION DE TRANSESTERIFICATION DE L'HUILE DE COLZA	155
a.	<i>Cinétique.....</i>	<i>155</i>
b.	<i>Recyclage du bioréacteur</i>	<i>158</i>
B.	BIOREACTEURS SILICATES PREPARES A PARTIR DE DOUBLES EMULSIONS ET DE SLN	161
1.	SYSTEMES COLLOÏDAUX UTILISES COMME TEMPLATE	162
a.	<i>Emulsion inverse.....</i>	<i>162</i>
b.	<i>Double émulsion</i>	<i>163</i>
c.	<i>Nanoparticules solides lipidiques (SLN)</i>	<i>164</i>
2.	MATERIAUX	165
a.	<i>Minéralisation du système « double émulsion »</i>	<i>165</i>
b.	<i>Minéralisation du système à base de SLN</i>	<i>168</i>
3.	REACTION DE TRANSESTERIFICATION	171
C.	RESUME	176

Chapitre V : Bioréacteurs

méso-macroporeux

Ce chapitre est consacré à la préparation de bioréacteurs méso-macroporeux et à leur utilisation dans la réaction de transestérification de l'huile de colza. Ces matériaux sont obtenus par immobilisation de la lipase *Mucor miehei* dans une matrice silicatée selon deux méthodes. La première repose sur la physisorption post-synthèse de la *Mm-L* dans la matrice silicatée obtenue à partir d'une émulsion huile/eau et la seconde met en jeu l'encapsulation directe de l'enzyme lors de la synthèse du matériau silicaté par l'intermédiaire d'une double émulsion eau/huile/eau. Pour les matériaux méso-macroporeux préparés à partir d'une double émulsion, il est possible de réduire la taille des macropores de quelques microns à quelques centaines de nanomètres par l'intermédiaire des nanoparticules lipidiques solides (SLN) obtenues par évaporation du limonène, un des constituant huileux de la double émulsion. Cette voie est originale et permet d'ajuster la taille des macropores, tout en assurant une encapsulation directe de l'enzyme au sein du matériau. Les résultats obtenus à partir des voies explorées seront comparés et les performances catalytiques de ces matériaux vis-à-vis de la réaction de transestérification de l'huile de colza seront présentées. Enfin, nous aborderons l'aspect recyclage/réutilisation des biocatalyseurs.

A. Bioréacteurs méso-macroporeux obtenus par la physisorption de la lipase *Mm-L*

Nous étudierons dans un premier temps l'immobilisation de la lipase *Mm-L* sur un support silicaté méso-macroporeux préparé à partir d'une émulsion. La présence de macropores doit permettre une meilleure diffusion des réactifs et des produits, ce qui devrait accélérer la réaction de transestérification. La préparation de ces matériaux est décrite dans le chapitre 2. Avant l'étape d'adsorption de l'enzyme, une caractérisation du matériau est nécessaire.

1. Préparation du matériau

La synthèse originale de ce matériau a été effectuée au laboratoire par Rudina Bleta à partir de tensioactifs fluorés $R^F_7(EO)_7$ qui forment dans l'eau des émulsions¹. Dans ce travail, le matériau a été synthétisé à partir d'un mélange de tensioactifs : 30% de $R^F_8EO_9$ et 70% de $R^F_7EO_8$. L'émulsion est une dispersion de gouttelettes d'huile dans un milieu aqueux. Dans le cas des émulsions considérées, le milieu continu est constitué de micelles gonflées d'huile dispersées dans l'eau. Cette double empreinte permet l'obtention de pores à deux échelles différentes. En effet, les gouttelettes d'huile de l'émulsion sont à l'origine des pores dont la taille est de quelques micromètres et les micelles de tensioactif permettent de former le réseau de mésopores. Ce réseau de mésopores organisés constitue les murs des macropores. La Figure V-1 illustre le mécanisme de formation.

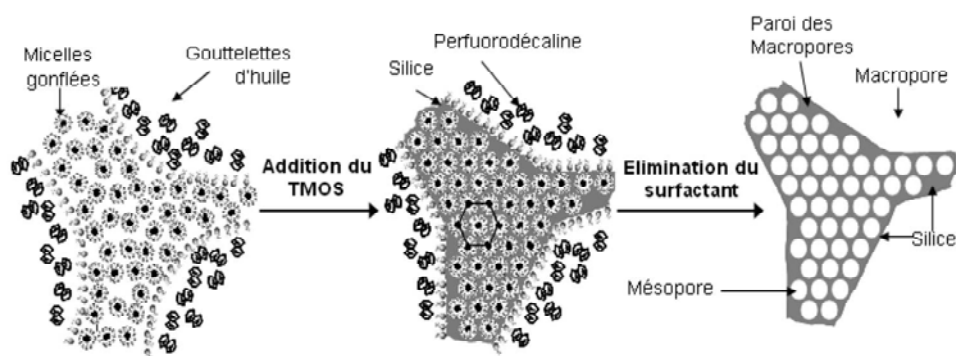


Figure V-1 - Mécanisme de formation des matériaux méso-macroporeux²

En comparaison avec l'utilisation de billes de latex comme empreinte, les gouttelettes d'huile des émulsions présentent l'avantage d'avoir une certaine résistance à la pression subie lors de l'hydrolyse et de la condensation de la source de silice qui peut influencer la structure du

matériau. En effet, avec les émulsions, la charpente est alors plus régulière et moins fracturée que celle obtenue dans le cas des billes de latex².

2. Caractérisation du matériau méso-macroporeux

Le support silicaté a été caractérisé par diffraction des rayons X, adsorption-désorption d'azote, porosimétrie à mercure et par microscopie électronique à balayage.

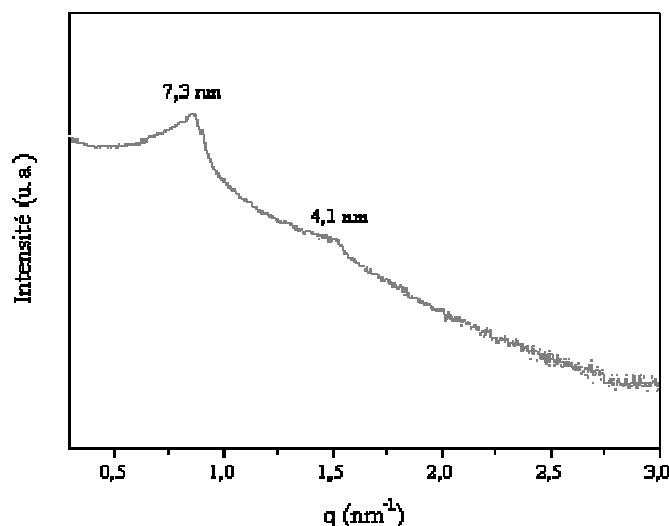


Figure V-2 - Diffractogramme SAXS du matériau méso-macroporeux

Sur le spectre de diffraction (Figure V-2), on observe deux pics correspondant à des distances entre les plans (100) et (110) respectivement de 7,3 nm et 4,1 nm caractéristiques d'un arrangement hexagonal des pores car le rapport entre les pics est de $\sqrt{3}$. La première réflexion permet de calculer le paramètre de maille a_0 . On trouve que a_0 est égal à 8,4 nm. Les analyses de sorption d'azote ont permis la caractérisation de la porosité du matériau (Figure V-3).

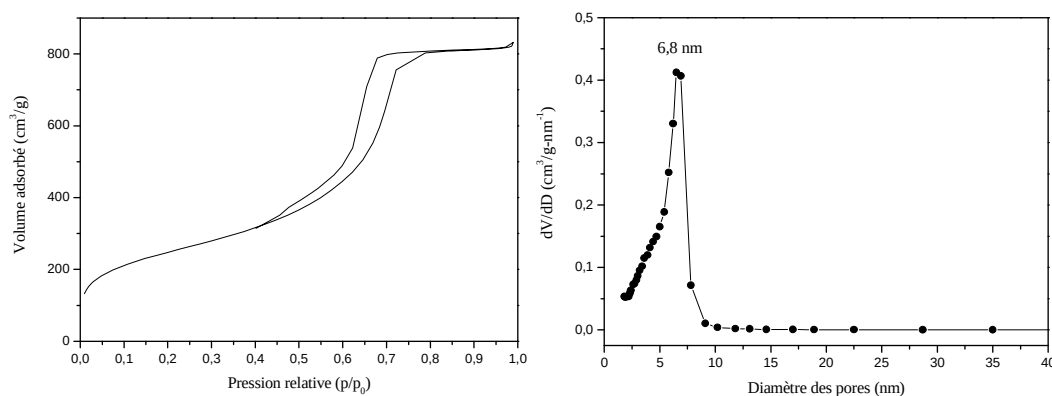


Figure V-3 - Isotherme d'adsorption-désorption d'azote et distribution de la taille des pores du matériau méso-macroporeux

L'isotherme est de type IV, spécifique à un matériau présentant une mésoporosité. Dans ce matériau, bien qu'il y ait des macropores, un réseau de mésopores dont la taille est de 6,8 nm est présent et constitue la paroi des macropores. Afin de déterminer la taille des macropores, le matériau a été analysé par porosimétrie à mercure (Figure V-4).

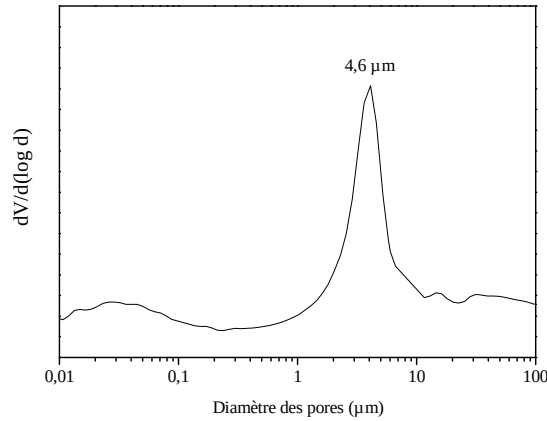


Figure V-4 - Distribution de la taille des pores du matériau méso-macroporeux obtenu par porosimétrie à mercure

La Figure V-4 représente la distribution de la taille des pores du matériau méso-macroporeux. La présence de macropores est confirmée par le pic situé à $4,6 \mu\text{m}$. La largeur de ce pic fournit une information sur l'homogénéité de la taille des macropores. Le pic fin est caractéristique d'une distribution assez fine de la taille des pores (entre 2 et $8 \mu\text{m}$).

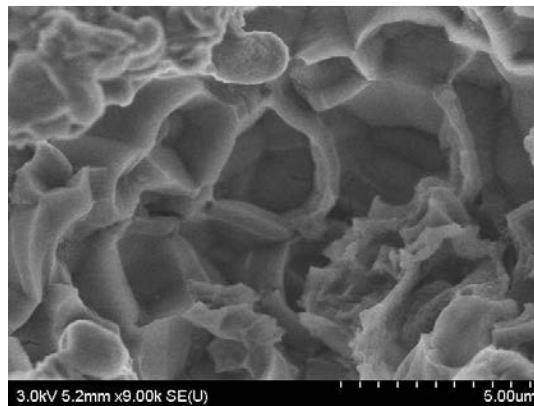


Figure V-5 - Micrographie MEB du matériau méso-macroporeux

La Figure V-5 est une image réalisée par microscopie électronique à balayage montrant des pores d'environ $5 \mu\text{m}$ en accord avec la porosimétrie à mercure.

Le matériau ainsi caractérisé a été utilisé comme support pour l'immobilisation de la lipase *Mucor miehei*. La caractérisation du matériau après immobilisation de l'enzyme montre une dégradation de la structure du réseau de mésopores (Figure V-6).

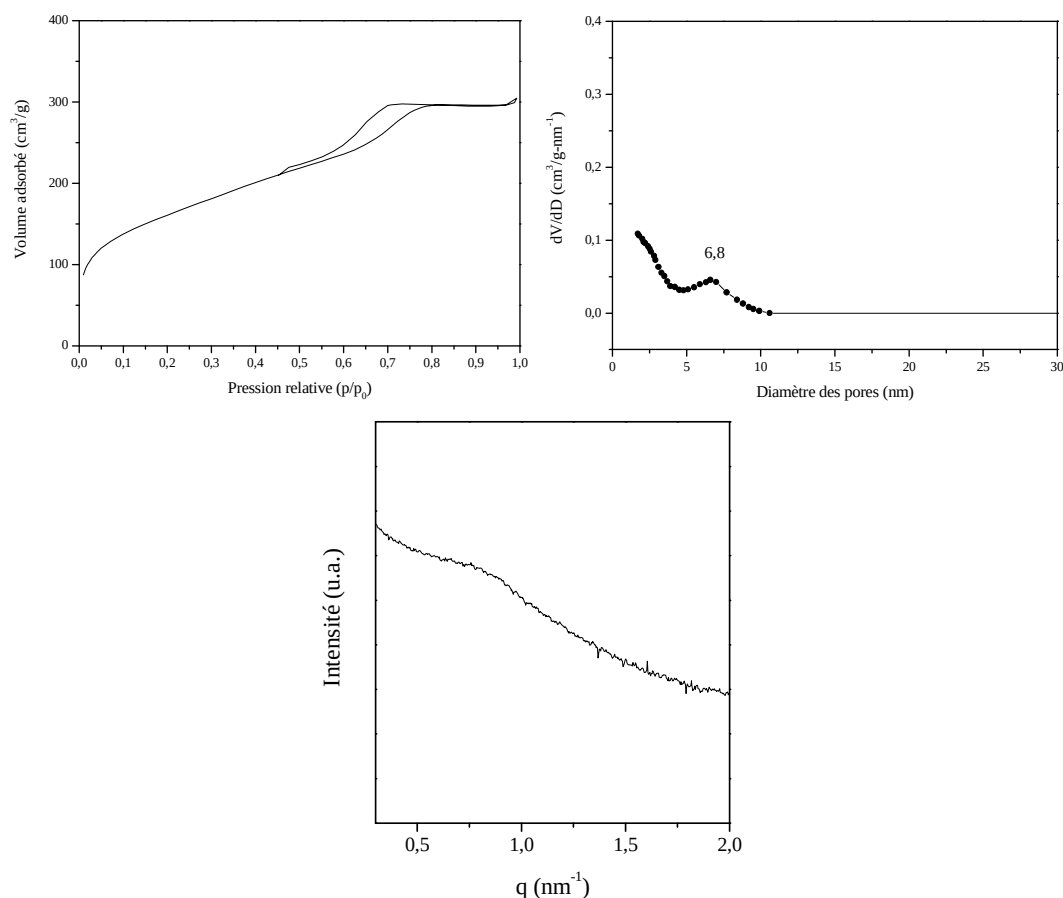


Figure V-6 – Diffractogramme SAXS, isotherme d'adsorption-désorption d'azote et distribution de la taille des pores sur un matériau méso-macro non calciné après une immobilisation à pH 6 dans une solution de lipase d'une concentration de 5 mg/mL

L'analyse montre que le matériau présente encore une mésoporosité (isotherme de type IV). Cependant, le volume adsorbé a chuté à 300 cm³/g et la valeur de dV/dD a également diminué fortement. Cette dégradation pourrait être due à l'hydrolyse de la silice lors de l'immobilisation de la lipase *Mm-L* qui entraînerait une dissolution de la silice et donc une déstructuration des mésopores. Ce phénomène s'est aussi produit lors de l'immobilisation de l'enzyme sur le matériau type MMF. Pour conserver l'arrangement des mésopores, nous avons calciné le matériau.

3. Effet de la calcination

Le matériau a été calciné à 550°C pendant 3 heures sous air en passant par plusieurs paliers, l'un à 100°C et l'autre à 350°C. La température est augmentée lentement (2°C/min) pour ne pas dégrader la structure du matériau³. Bagshaw *et al.* ont montré que la vitesse de chauffe lors de la calcination était un paramètre qui influençait la structure des mésopores⁴. La calcination consolide la structure car aux températures supérieures à 200°C, des réactions de condensation thermique ont lieu et entraînent la formation de siloxanes à partir des silanols. Cela a pour conséquence une diminution du taux de silanols libres et donc, une diminution potentielle de la capacité d'adsorption. La Figure V-7 présente les diffractogrammes des matériaux méso-macroporeux non calcinés et calcinés.

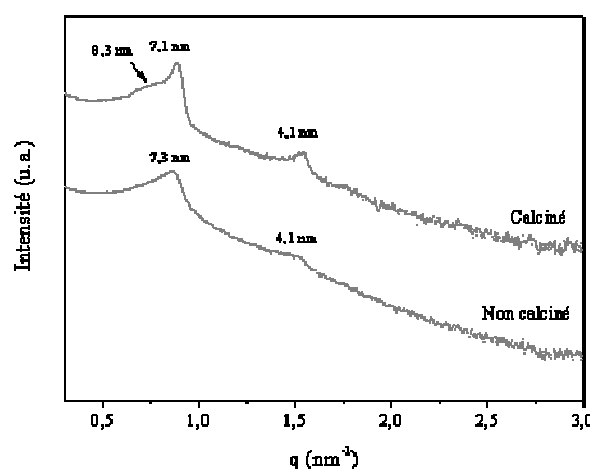


Figure V-7 - Comparatif des diffractogrammes SAXS des matériaux méso-macroporeux non-calcinés et calcinés

On observe sur la Figure V-7 un décalage des pics vers les plus grandes valeurs de q dans le cas du matériau calciné. En effet, après calcination, la distance entre les plans (100) passe de 7,3 à 7,1 nm car une contraction du réseau a lieu suite à la déshydroxylation des silanols⁵. On observe également une bosse située à 8,3 nm qui correspond à une structure vermiforme des canaux. Nous avons donc obtenu un matériau qui présente des domaines organisés et d'autres qui ne le sont pas.

L'analyse par adsorption-désorption d'azote après l'étape de calcination est présentée sur la Figure V-8 en comparaison avec le matériau non calciné. On constate que la mésoporosité du matériau est maintenue puisque l'isotherme est de type IV. On observe également une faible augmentation du diamètre des pores, qui passe de 6,9 nm à 7,1 nm. Le volume poreux est aussi affecté par la calcination tandis que la surface spécifique reste constante.

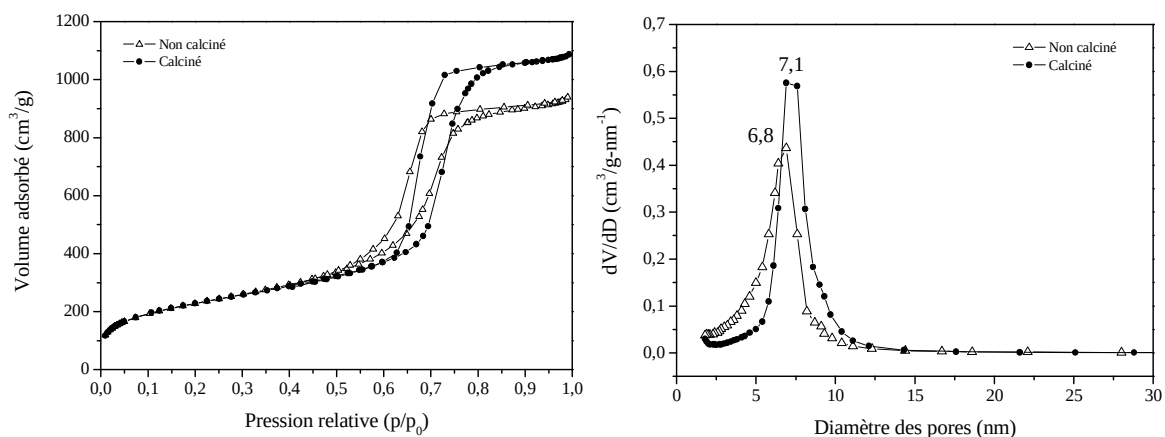


Figure V-8 – Comparatif des isothermes d'adsorption-désorption d'azote et distributions de la taille de pores d'un matériau méso-macroporeux non calciné et calciné

Le diamètre des macropores a également été déterminé après l'étape de calcination (Figure V-9) et malgré une distribution plus large, la taille est toujours centrée sur 4,8 μm . On peut également voir les mésopores qui correspondent à ceux présents dans les murs des macropores.

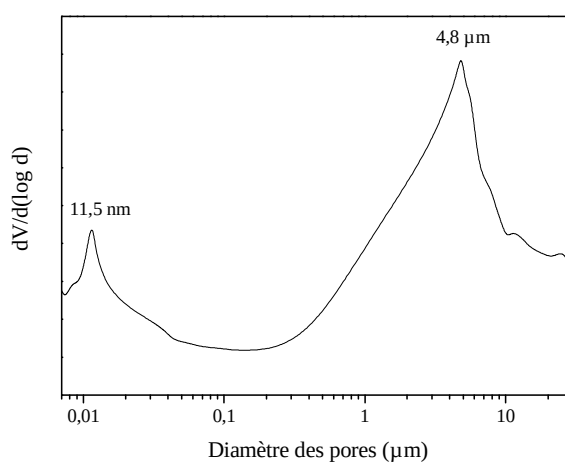


Figure V-9 - Distribution de la taille des pores du matériau méso-macroporeux calciné obtenu par porosimétrie à mercure

Le Tableau V-1 regroupe les valeurs déterminées par SAXS et par adsorption-désorption d'azote pour les matériaux méso-macroporeux calciné et non calciné.

Tableau V-1 – Valeurs caractéristiques des matériaux méso-macroporeux avant et après calcination

Matériau méso-macroporeux	a_0 (nm)	d_{100} (nm)	d_p (nm)	S_{BET} (m^2/g)	v_p (cm^3/g)	e (nm)
Non calciné	8,4	7,3	6,8	823	1,33	1,6
Calciné	8,2	7,1	7,1	823	1,57	1,1

4. Immobilisation de la lipase *Mucor miehei* sur le matériau calciné

De la même manière que pour les supports SBA-15 et MMF, nous avons étudié la capacité d'adsorption de la lipase *Mm-L* dans les matériaux méso-macroporeux. Le protocole est détaillé dans le chapitre 2. Le matériau est immergé dans une solution enzymatique et la quantification de l'adsorption de la lipase a été déterminée en suivant la même méthode que celle utilisée pour les matériaux mésoporeux (cf. chapitre 3). Nous avons montré que les rendements de la réaction de transestérification catalysée par la lipase *Mm-L* physisorbée sur un support mésoporeux à pH 3 et 10 sont négligeables (chapitre 3). Pour ces raisons, l'immobilisation de la lipase *Mm-L* sur le matériau méso-macroporeux a uniquement été faite à pH 6.

a. Caractérisation du bioréacteur et mise en évidence de l'adsorption

Nous avons fait varier la quantité de lipase dans la solution tampon à pH 6 en choisissant des concentrations de 2 à 20 mg/mL. Après l'immobilisation, les bioréacteurs ont été caractérisés par SAXS. Les résultats de ces analyses sont présentés sur la Figure V-10. Pour les faibles concentrations (jusqu'à 5 mg/mL), les raies (100) et (110) sont bien visibles. Lorsque l'immobilisation a lieu dans des solutions enzymatiques où la concentration est plus élevée, on observe des réflexions moins prononcées, signifiant que le contraste (nombre d'électrons/unité de volume) est modifié par la présence de la lipase dans le matériau.

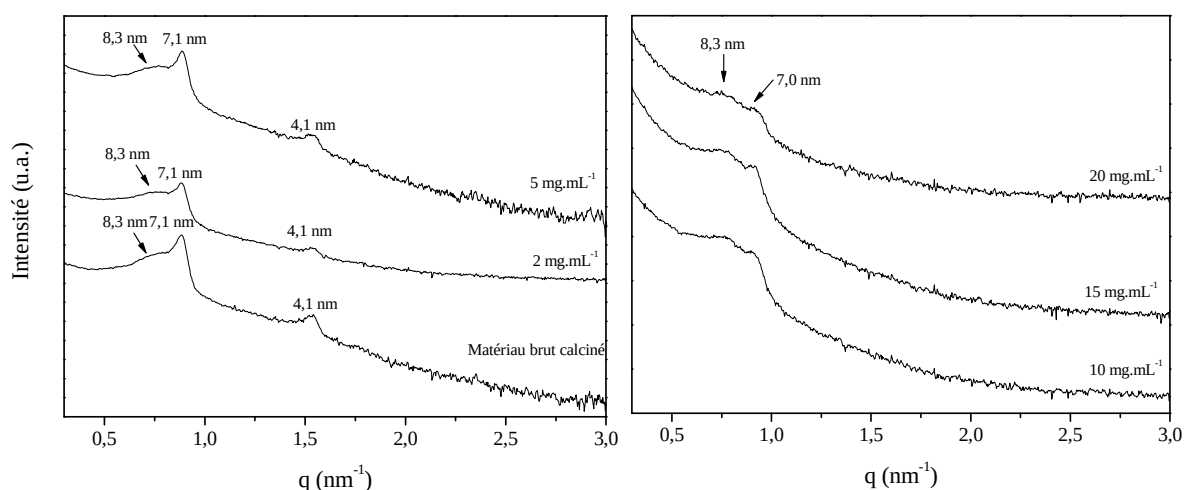


Figure V-10 - Diffractogrammes SAXS du matériau méso-macroporeux après immobilisation à différentes concentrations enzymatiques

La présence de l'enzyme sur le matériau méso-macroporeux a été confirmée par les analyses d'adsorption-désorption d'azote qui ont également permis d'examiner des propriétés du matériau en fonction du taux d'immobilisation (Figure V-11).

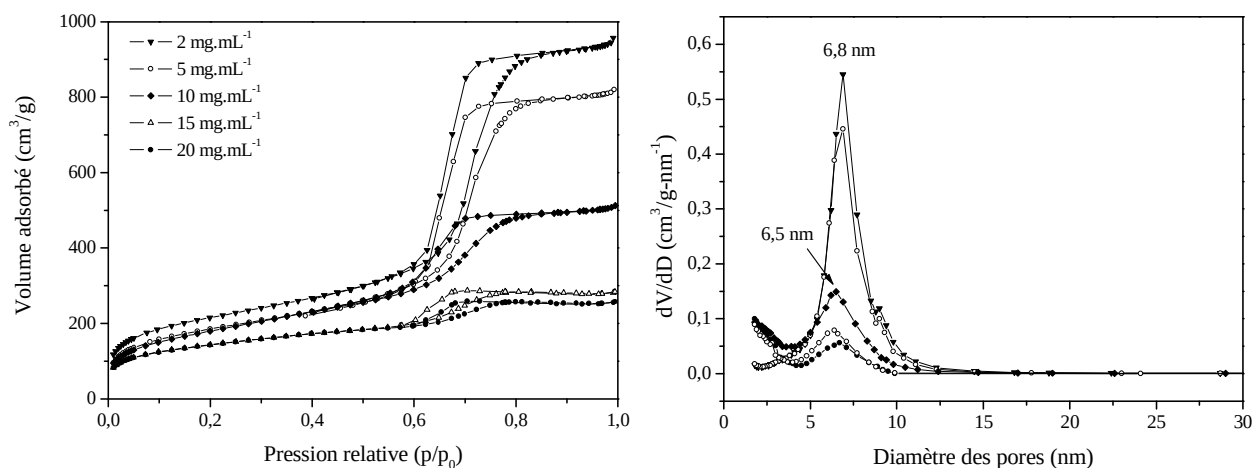


Figure V-11 - Isothermes d'adsorption-désorption d'azote et distributions de la taille des pores en fonction de la concentration initiale en lipase de la solution tampon à pH6

Bien que les isothermes soient toujours de type IV, l'adsorption croissante d'enzyme conduit à une diminution du volume d'azote d'adsorbé. Ainsi, l'augmentation de la concentration initiale en lipase a pour conséquence un saut de condensation capillaire de moins en moins marqué. Concernant la distribution de la taille des pores, l'immobilisation n'engendre pas de changement du diamètre poreux, mais une diminution graduelle de la valeur dV/dD qui est caractéristique d'un remplissage progressif des pores.

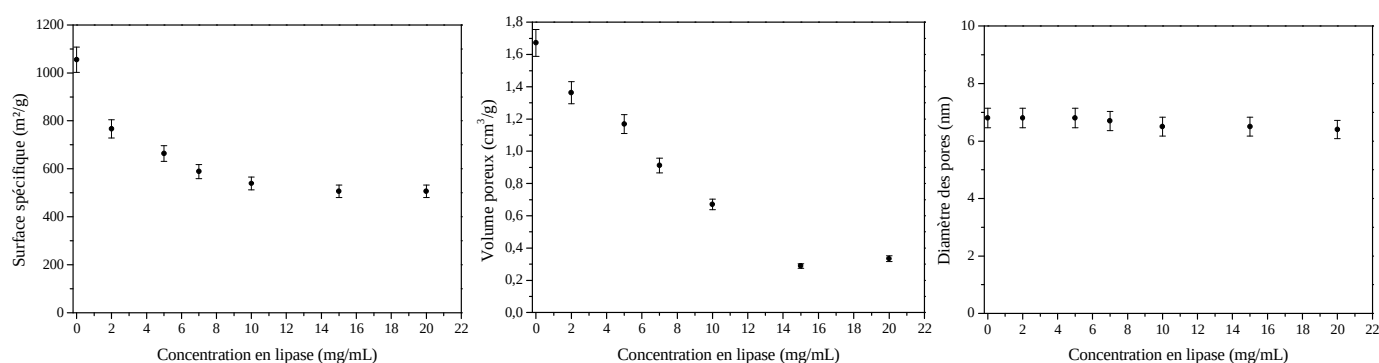


Figure V-12 - Evolution de la surface spécifique, du volume poreux et des diamètres des pores du matériau méso-macroporeux en fonction de la concentration initiale en lipase dans la solution tampon

La Figure V-12 présente l'évolution des caractéristiques texturales de la matrice méso-macroporeuse en fonction de la concentration initiale de l'enzyme dans la solution tampon.

L'immobilisation de la lipase sur ce support conduit à la diminution de la surface spécifique, qui passe de 1055 m²/g à 500 m²/g lorsque la concentration en lipase varie de 0 à 20 mg/mL. Le volume poreux est également fortement affecté diminuant de 1,7 à 0,3 cm³/g, contrairement au diamètre des pores qui, lui, reste pratiquement inchangé (6,8 à 6,4 nm). Cependant, le volume poreux et la surface spécifique atteignent une valeur minimale à partir d'une concentration de 15 mg/mL. Cela pourrait indiquer une saturation de la capacité d'adsorption de l'enzyme par les mésopores. Le calcul de l'épaisseur de la paroi par soustraction du diamètre poreux au paramètre de maille a_0 montre que les murs ont tendance à se renforcer. L'épaisseur des murs passent de 1,4 à 1,7 nm.

Le Tableau V-2 est un récapitulatif des valeurs déterminées par les deux techniques d'analyses, SAXS et adsorption-désorption d'azote, pour les matériaux méso-macroporeux après immobilisation de l'enzyme à différentes concentrations.

Tableau V-2 - Valeurs caractéristiques du matériau après immobilisation

Support	a_0 (nm)	S_{BET} (m ² /g)	v_p (cm ³ /g)	d_p (nm)	e (nm)
2 mg.mL ⁻¹	8,2	766	1,36	6,8	1,4
5 mg.mL ⁻¹	8,2	664	1,17	6,8	1,4
10 mg.mL ⁻¹	8,1	539	0,67	6,5	1,6
15 mg.mL ⁻¹	8,1	506	0,29	6,5	1,6
20 mg.mL ⁻¹	8,1	506	0,33	6,4	1,7

L'adsorption de l'enzyme sur le support méso-macroporeux calciné a été également mis en évidence par spectroscopie infrarouge. La Figure V-13 représente un ensemble de spectres IR indiquant les bandes caractéristiques de la lipase en fonction de la concentration initiale en lipase dans la solution tampon à pH 6. On peut voir une augmentation de la bande Amide II (situé aux alentours de 1528 cm⁻¹) et de la bande Amide III (environ 1460 cm⁻¹). Il en est de même pour la bande Amide A (3333 cm⁻¹) qui est amplifiée au fur et à mesure que la quantité de lipase présente dans le matériau augmente. La diminution de l'intensité de la bande correspondant aux groupements silanols libres Si-OH située à 3745 cm⁻¹ qui constitue une preuve supplémentaire de la lipase *Mm-L* dans le matériau.

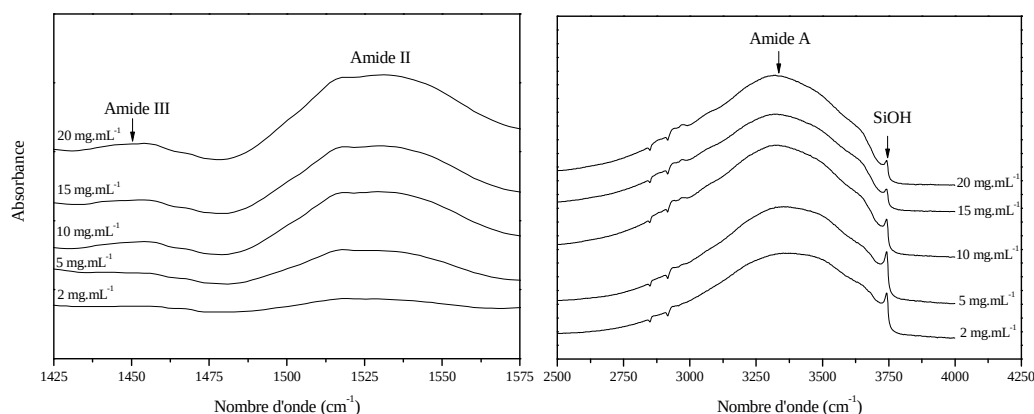


Figure V-13 - Spectres IR de la lipase *Mm-L* physisorbée sur le matériau méso-macroporeux en fonction de la concentration initiale de la solution enzymatique

b. Dosage de l'enzyme

La quantité de lipase dans le matériau a été déterminée en faisant varier les concentrations en lipase de la solution tampon (pH 6). La méthode utilisée est identique à celle décrite dans le chapitre 2.

L'isotherme d'adsorption de la lipase sur le matériau méso-macroporeux calciné est présentée sur la Figure V-14. L'exploitation de l'isotherme a été faite avec le modèle de Langmuir tout comme pour les matériaux SBA-15 et MMF (chapitre 3). Il a pour équation :

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\max} [C]_{\text{eq}}}{[C]_{\text{eq}} + K_L}$$

En ajustant le modèle théorique aux points expérimentaux obtenus à partir des solutions de lipase immobilisées à pH 6, le matériau a une capacité d'adsorption maximale de 1,1 mg_{Mm-L}/mg_{Matrice} et une constante K_L de 2,57 mg/mL.

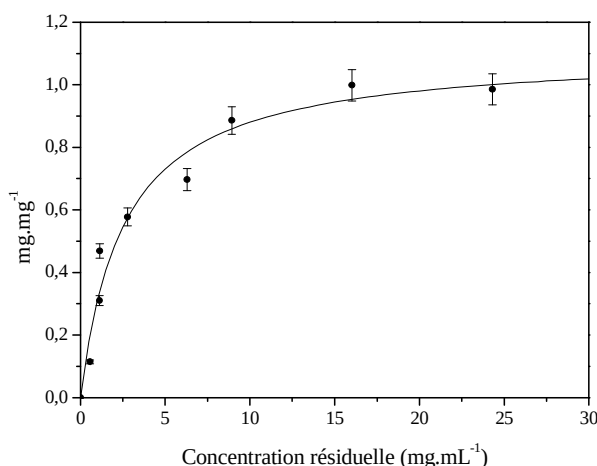


Figure V-14 - Isotherme d'adsorption de la lipase *Mm-L* immobilisée à pH 6 sur le matériau méso-macroporeux

La capacité d'adsorption maximale de 1,11 mg de la lipase par milligramme de matériau est plus élevée que celle déterminée par ce même modèle pour les matériaux mésoporeux SBA-15 et MMF (respectivement 0,5 et 0,35 mg_{Mm-L}/mg_{matrice}). Cette différence peut être due à la présence des macropores dans la matrice. L'enzyme peut donc facilement pénétrer et s'adsorber à la surface de ces macropores. Les deux matériaux précédemment étudiés étant constitués uniquement de mésopores, l'accessibilité de la lipase dans les pores est limitée. Le volume poreux du matériau méso-macroporeux déterminé par analyse d'adsorption-désorption d'azote est caractéristique du volume des mésopores (1,57 cm³/g). En supposant que la lipase adopte une forme sphérique de diamètre de 4 nm, il est possible de calculer l'adsorption théorique maximale dans les mésopores. Une molécule de lipase *Mm-L* a un volume de 33,5 nm³. Ainsi, l'adsorption maximale théorique est égale à 2,47 g_{Mm-L}/g_{matériau}. Cette capacité d'adsorption est surestimée car le volume poreux des mésopores est considéré global. Or ce volume correspond à un ensemble de canaux de longueurs différentes ayant en moyenne 6,7 nm de diamètre.

5. Réaction de transestérification de l'huile de colza

a. Cinétique

Nous avons utilisé l'ensemble « matrice silicatée-lipase » pour réaliser la méthanolyse de l'huile de colza. L'immobilisation de l'enzyme sur la matrice méso-macroporeuse a été réalisée à partir d'une solution de lipase ayant une concentration de 10 mg/mL à pH 6. Les conditions d'adsorption de la lipase sont les mêmes que celles utilisées dans le cas du matériau mésoporeux SBA-15 afin de comparer les performances catalytiques de l'enzyme. Ainsi, le taux d'adsorption dans ce cas est de 0,57 mg_{Mm-L}/mg_{silice}, celui du matériau SBA-15 étant de 0,43 mg/mg. Nous avons choisi d'utiliser les conditions optimales définies par le plan d'expérience dans le cas des matériaux mésoporeux à des fins de comparaison.

Ces conditions sont les suivantes :

- Volume d'huile : 600 µl,
- Rapport molaire méthanol/huile : 1,
- Ajout d'eau dans le milieu réactionnel : 13 µL c'est-à-dire 2,5% en masse (par rapport à la masse d'huile)
- Température de réaction : 25°C
- Agitation : 100 tours par minute
- Masse de catalyseur : 10 mg

La Figure V-15 montre la production d'esters méthyliques en fonction du temps. Le rendement est calculé en considérant le méthanol comme étant le réactif limitant (cf . chapitre 2).

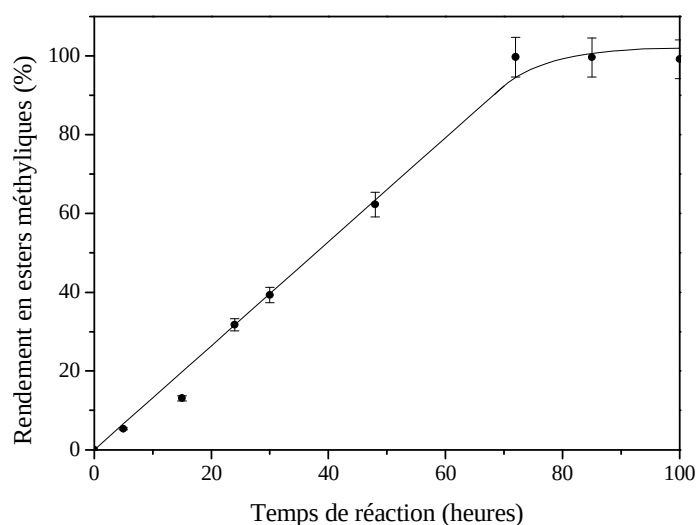


Figure V-15 - Rendement en esters méthyliques en fonction du temps

La cinétique de production des esters méthyliques est linéaire en fonction du temps. Le comportement est différent de celui obtenu avec le bioréacteur à base du matériau SBA-15, que ce soit dans le cas de la physisorption ou de la chimisorption. Après 72 heures de réaction, près de 100% du méthanol a été consommé après 72 heures de réaction. Avec le support méso-macroporeux, le rendement R évolue en $1,3 \times t$ avec t le temps de réaction (en heures) et la vitesse initiale de formation des esters méthyliques est de $8,3 \mu\text{mol/h}$. Cette valeur est nettement inférieure à celle calculée pour le bioréacteur à base du matériau SBA-15 ($13,4 \mu\text{mol/h}$). De plus, si les vitesses sont rapportées à la quantité d'enzyme, cette différence est accentuée puisque la capacité d'adsorption de la matrice méso-macroporeuse est plus importante que pour la matrice SBA-15 et on trouve pour le support méso-macroporeux $1,45 \mu\text{mol/h/mg}$ contre $4,4 \mu\text{mol/h/mg}$ pour le support SBA-15.

Tableau V-3 – Comparaisons des vitesses initiales du bioréacteur méso-macroporeux

Bioréacteur	Consommation de MeOH		Formation des esters méthyliques	
	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$)
Matériau méso-macroporeux	8,6	1,51	8,3	1,45
SBA-15	19,2	4,57	18,5	4,4

Les performances catalytiques d'un bioréacteur dépendent non seulement du rendement de la réaction, mais également de son « turnover number ». Pour rappel, ce nombre est le rapport entre le nombre de moles de substrat transformé et le nombre de moles de catalyseur présent. La Figure V-16 présente l'évolution du turnover number d'une réaction catalysée par le bioréacteur dont la matrice est méso-macroporeuse. A titre de comparaison, l'évolution du turnover number de la réaction de transestérification avec le matériau SBA-15 servant de support est aussi présentée sur cette figure.

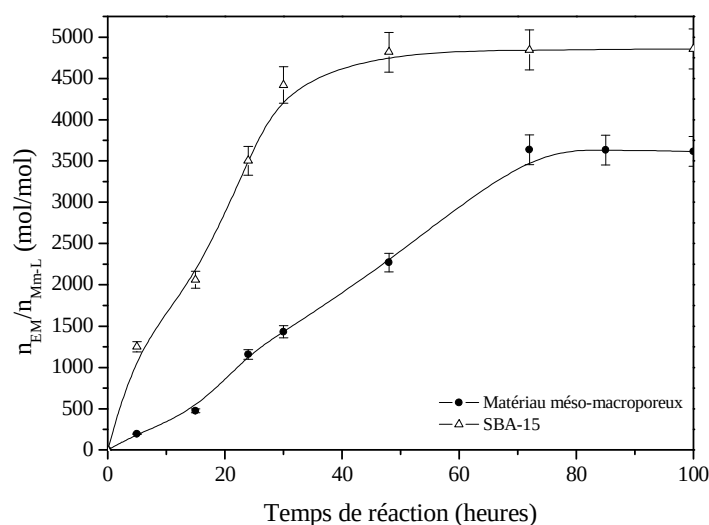


Figure V-16 - "Turnover number" des deux types de bioréacteurs

Sur la Figure V-16, on constate que le « turnover number » de la réaction catalysée par le support SBA-15 est supérieur à celui de la réaction effectuée avec le bioréacteur méso-macroporeux. Dans ce cas, une mole d'enzyme présente dans le support SBA-15 est capable de transestérifier près de 4900 moles de substrat alors qu'une mole de lipase adsorbée sur le matériau méso-macroporeux n'en transforme que 3600. Les macropores devant faciliter la diffusion du substrat, nous aurions pu nous attendre à une vitesse initiale supérieure à celle obtenue avec le bioréacteur SBA-15. On peut donc penser que l'enzyme adsorbée à la surface des macropores (4,8 μm) n'est pas confinée et que sa conformation est modifiée⁶. La lipase alors plus exposée au milieu réactionnel entraîne une baisse de son activité catalytique. Selon Takahashi *et al.*, un bon ajustement entre la taille de l'enzyme et le diamètre des pores doit être trouvé pour conserver l'activité de l'enzyme et la stabiliser. Il faut noter également que la présence de macropores dans la matrice implique que la probabilité de rencontre entre la lipase adsorbée dans ces pores et le substrat est plus faible que dans le support qui est exclusivement mésoporeux.

b. Recyclage du bioréacteur

La recyclabilité du biocatalyseur est un atout important pour des questions économiques. Nous avons étudié cet aspect en effectuant consécutivement plusieurs réactions de transestérification. Pour l'évaluation de l'efficacité, la production d'esters méthyliques de la première réaction de transestérification sert de référence. Après chaque réaction de transestérification, le catalyseur est récupéré par centrifugation, puis lavé à l'eau afin d'éliminer le glycérol. Après séchage, il est réutilisé. Le recyclage du bioréacteur est arrêté lorsque l'activité catalytique du catalyseur est inférieure à 10%.

Le graphe de la Figure V-17 montre l'évolution du rendement relatif en esters méthyliques en fonction du nombre d'utilisations du bioréacteur méso-macroporeux.

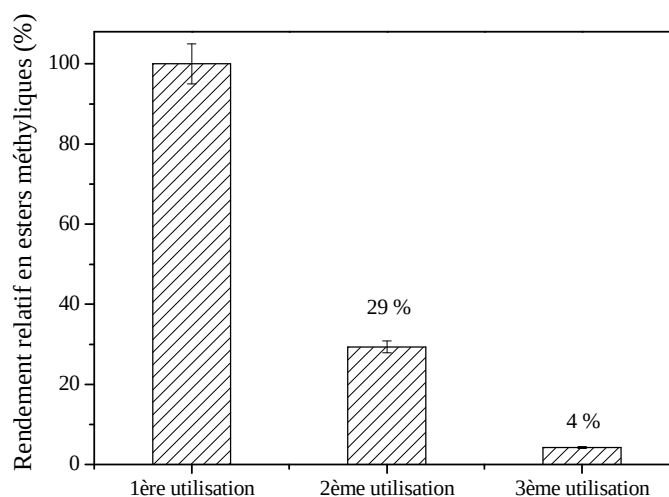


Figure V-17 - Réutilisation du bioréacteur (matrice méso-macroporeuse)

On peut voir que, dès la deuxième réutilisation du bioréacteur, le rendement chute fortement, puisque seuls 30 % d'esters méthyliques sont formés. Lors d'une troisième utilisation, la production d'esters méthyliques est très faible (4%).

L'activité catalytique du bioréacteur est donc réduite à deux utilisations. La même baisse d'activité a été constatée avec le support SBA-15 dont l'enzyme est physisorbée.

Pour essayer d'expliquer ce phénomène, nous avons caractérisé le bioréacteur après chaque utilisation. Les isothermes d'adsorption-désorption d'azote ainsi que la distribution de la taille des pores des supports utilisés au cours du recyclage du bioréacteur méso-macroporeux sont données sur la Figure V-18.

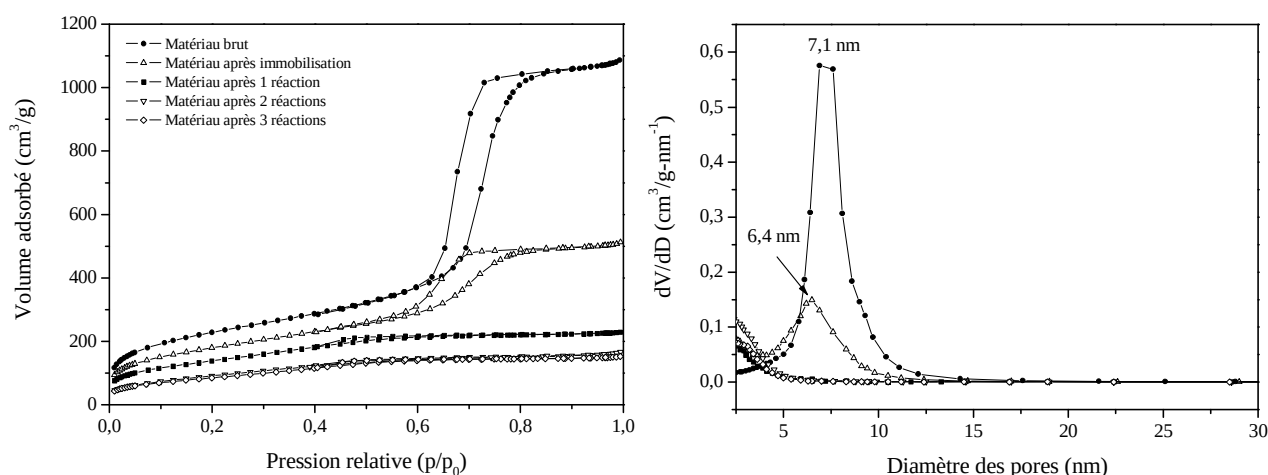


Figure V-18 - Isothermes d'adsorption-désorption d'azote et distributions de la taille des pores du matériau brut, immobilisé et après réaction

Le matériau brut et celui qui contient l'enzyme présentent une isotherme de type IV caractéristique de la présence de mésopores. Concernant les distributions de la taille des pores, on peut constater que le diamètre poreux diminue entre son état initial et après immobilisation en passant de 7,1 à 6,4 nm, caractérisant la présence de l'enzyme. En comparaison avec le matériau où la lipase est immobilisée, l'isotherme du matériau après réactions de transestérification possède un saut de condensation capillaire très faible, suggérant l'effondrement de la matrice silicatée, et ce, dès la première réaction. L'analyse de diffraction des rayons X aux petits angles confirme cette désorganisation (Figure V-19).

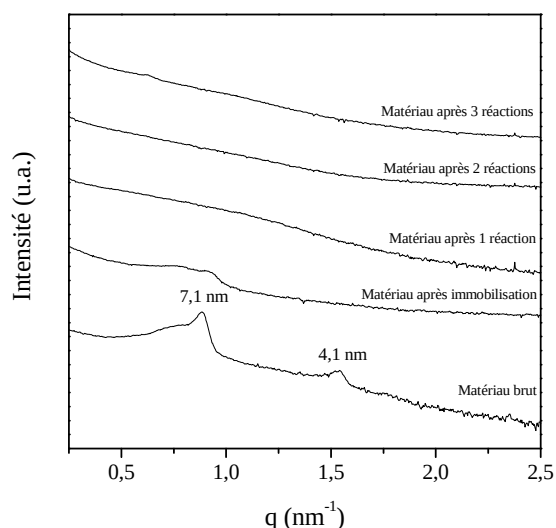


Figure V-19 - Diffractogrammes SAXS des matériaux méso-macroporeux brut, contenant la lipase (10 mg/mL) et aux différentes étapes de réutilisation

En effet, l'intensité des raies de diffraction chute au fur et à mesure du recyclage pour disparaître après la troisième utilisation. Ainsi les différents traitements subis par le matériau, et en particulier le lavage du bioréacteur à l'eau après réaction doit être examiné avec attention. Nous savons que l'eau ne dénature pas l'enzyme et nous avons montré qu'elle ne détruirait pas le bioréacteur SBA-15 (cf. chapitre 3). L'eau permet de solubiliser le glycérol produit pendant la réaction de transestérification et ainsi de l'éliminer. Cependant, dans le cas du support méso-macroporeux, il se peut que la condensation soit moins bonne qu'en contact avec l'eau, le matériau s'hydrolyse entraînant une dégradation marquée du support. Le Tableau V-4 regroupe les données issues des analyses SAXS et adsorption-désorption d'azote du matériau lors des différentes réutilisations.

Tableau V-4 – Données des analyses d'adsorption-désorption d'azote pour les supports au cours de ses différentes étapes

Support	S_{BET} (m ² /g)	v_p (cm ³ /g)	d_p (nm)
Matériau brut	823	1,57	7,1
Matériau immobilisé	539	0,67	6,5
Matériau après 1 réaction	505	0,26	-
Matériau après 2 réactions	315	0,17	-
Matériau après 3 réactions	343	0,18	-

Afin de quantifier l'enzyme restante dans le matériau après réaction, nous avons analysé ses bioréacteurs par spectroscopie infrarouge (Figure V-20).

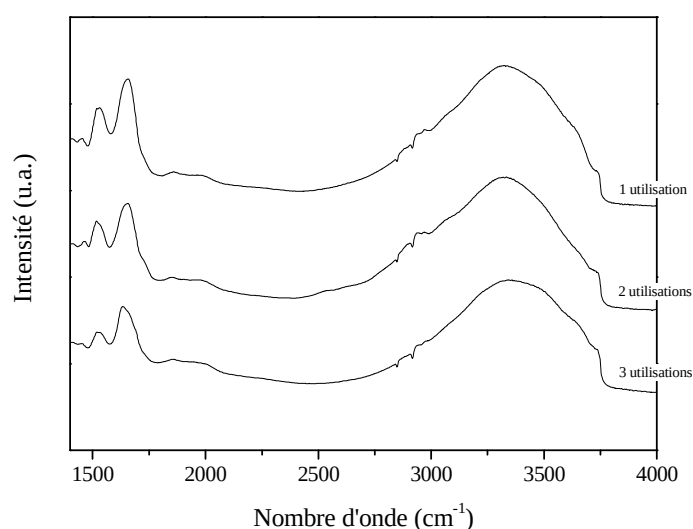


Figure V-20 - Spectres IR du bioréacteur au cours du recyclage

On peut constater que l'intensité des bandes caractéristiques de la lipase (Amide III et Amide II) diminue après chaque utilisation. Ainsi, la quantité d'enzyme adsorbée passe de 0,57 à 0,35 mg/mg après la première utilisation, puis à 0,24 mg/mg après la deuxième et enfin à 0,19 mg/mg après la troisième. Il y a bien un phénomène de désorption. Sur les spectres, nous avons observé également une baisse de l'intensité des bandes Si-O-Si situées entre 1750 et 2100 cm^{-1} , qui peut être corrélée avec la déstructuration de la matrice silicatée. Cette dégradation entraîne sans doute le relargage de la lipase.

En résumé, l'utilisation d'un bioréacteur de type méso-macroporeux qui présente une organisation hexagonale des mésopores a été investie pour immobiliser la lipase *Mm-L*. Une étape de calcination de la matrice a été nécessaire pour maintenir la structuration des mésopores après l'encapsulation de l'enzyme. Le taux d'adsorption maximal est de 1,1 $\text{mg}_{\text{Mm-L}}/\text{mg}_{\text{matrice}}$, lequel est bien supérieur à un matériau mésoporeux (i.e. SBA-15). La cinétique de réaction de transestérification est beaucoup plus lente que celle obtenue dans les mêmes conditions avec le support SBA-15, elle est linéaire et atteint son maximum (rendement proche de 100%) au bout de 72 heures de réaction alors que le rendement de la réaction catalysée par le bioréacteur formé avec le matériau SBA-15 atteint 100% après 30 heures. La vitesse initiale du bioréacteur méso-macroporeux est 3 fois plus faible ($1,45 \mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$) que celle du bioréacteur SBA-15. La capacité de réutilisation du bioréacteur, tout comme dans le cas du support SBA-15 est limitée à 2 utilisations. La dégradation du support peut être la principale cause de la perte d'activité du bioréacteur. Pour réduire, voire éviter cette dégradation, un solvant ne provoquant pas l'hydrolyse de la silice et ne désactivant pas l'enzyme pourrait être utilisé. En effet, il a été montré par Dossat *et al.* qu'avec un mélange eau/alcool tertiaire, le glycérol a pu être éliminé et l'activité catalytique ainsi maintenue⁷.

B. Bioréacteurs silicatés préparés à partir de doubles émulsions et de SLN

Une autre voie d'encapsulation de l'enzyme consiste à l'immobiliser lors de la synthèse du matériau méso-macroporeux. Pour ce faire, l'enzyme a d'abord été incorporée dans une émulsion inverse (Eau/Huile), puis à partir de cette émulsion, une double émulsion (E/H/E) sert de « template » pour la synthèse du matériau silicaté.

La phase organique est constituée de composés « verts », biosourcés et respectueux de l'environnement (i.e. N-hexadecylpalmitate (NHP) et le limonène constituent la phase

huileuse, la lécithine d'œuf est le tensioactif et l'isopropanol joue le rôle de co-tensioactif) (cf. Figure V-21).

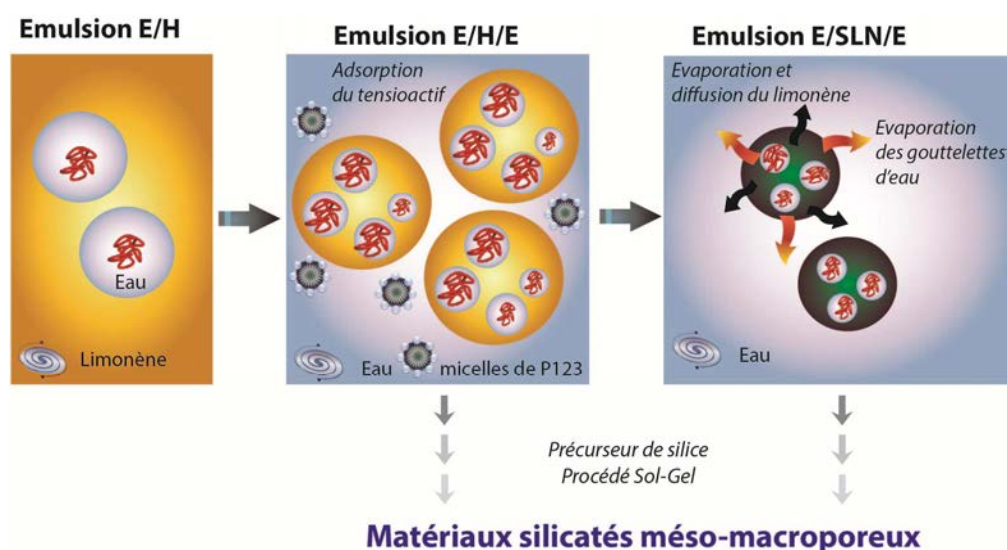


Figure V-21 - Schéma d'illustration de la formation et de la transformation de la double émulsion en SLN

Par évaporation du limonène, la phase huile conduit à des nanoparticules solides lipidiques à base de NHP. Ces deux types de systèmes (émulsion E/H/E et E/SLN/E) dans lesquels l'enzyme est solubilisée dans une phase aqueuse, tout en étant protégée par un environnement sous forme de gouttelettes dispersées dans l'eau, ont été minéralisés *via* un procédé sol-gel. Enfin, les performances catalytiques des matériaux ainsi préparés ont été testées en procédant à une réaction de transestérification de l'huile de colza.

1. Systèmes colloïdaux utilisés comme template

Dans un premier temps, nous avons mis au point les conditions expérimentales pour préparer les matériaux en l'absence d'enzyme.

a. Emulsion inverse

L'émulsion inverse est composée d'une phase huile contenant un mélange limonène/ NHP et d'une phase aqueuse contenant une solution tampon TRIS (pH 6). L'émulsion, obtenue par simple agitation sous vortex, est stabilisée par un mélange lécithine d'œuf/isopropanol. La composition massique de l'émulsion est de 50% de limonène, 30% de solution aqueuse contenant l'enzyme, 11,9% de lécithine d'œuf, 5,25% de NHP et 2,85% d'isopropanol.

Les mesures par diffusion dynamique de la lumière (DLS) montrent la présence de plusieurs tailles de particules dont les dimensions caractéristiques sont 25 nm, 210 nm et 2 μm . Les gouttelettes de 2 μm ont pu également être visualisées par microscopie optique et sont attribuées aux gouttelettes d'eau (Figure V-22).

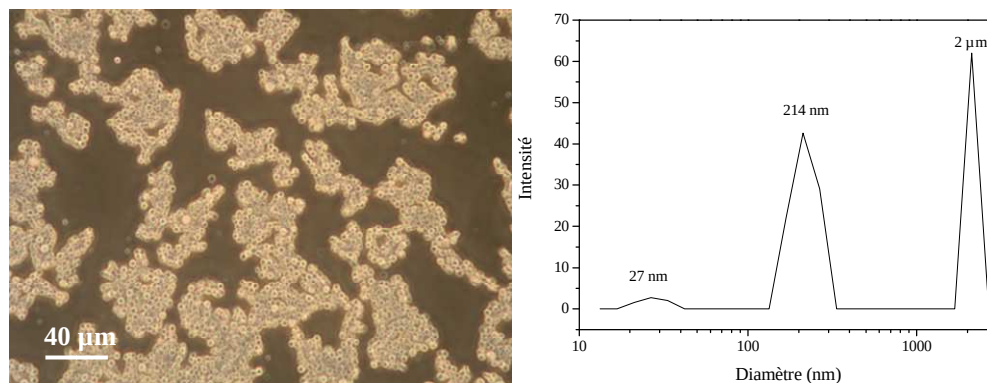


Figure V-22 - Image réalisée par microscopie optique et analyse par diffusion dynamique de la lumière de l'émulsion inverse contenant la lipase

b. Double émulsion

L'émulsion inverse a été ensuite ajoutée dans une solution micellaire de P123 (3,45 wt%) pour donner à une double émulsion E/H/E. Ce système dont le milieu continu contient à la fois des micelles et des gouttelettes E/H, a été choisi pour préparer des matériaux à porosité hiérarchisée en mettant à profit le mécanisme coopératif et transcriptif.

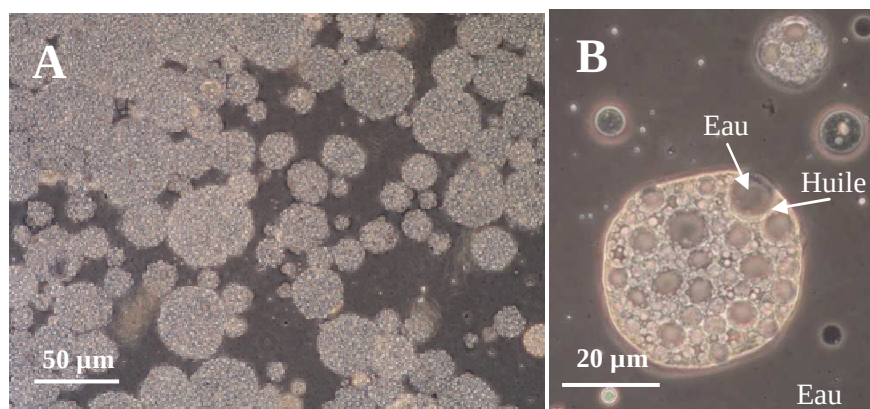


Figure V-23 - Images réalisées par microscopie optique de la préparation à base de doubles émulsions

L'analyse par DLS a permis d'observer des objets identiques à ceux observés dans l'émulsion inverse de départ, alors que l'analyse par granulométrie (Mastersizer) a permis de déterminer la taille des gouttelettes constituant la double émulsion, qui sont de l'ordre de 50 μm . La taille et la morphologie des gouttelettes, respectivement d'eau et de l'huile, a été examinée par

microscopie optique (Figure V-23A). Sur l'image B de la Figure V-23, on observe une gouttelette de la phase dispersée huileuse qui est constituée de fines gouttelettes d'eau.

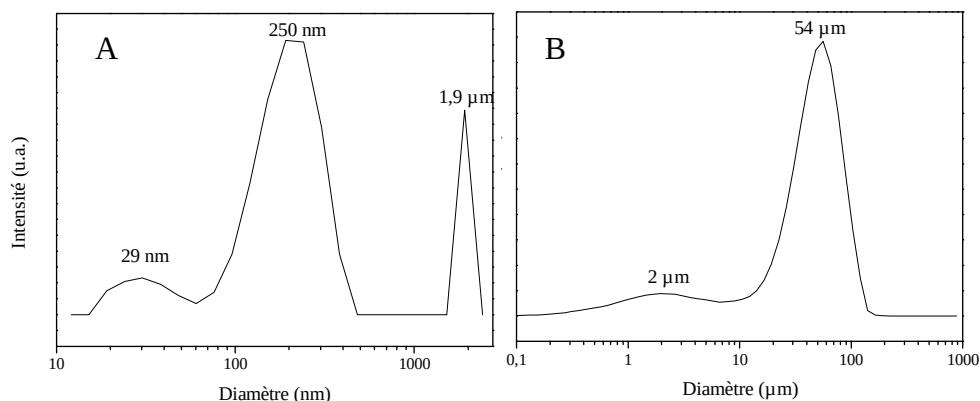


Figure V-24 - Analyses DLS (A) et Mastersizer (B) de la préparation à base de doubles émulsions

c. Nanoparticules solides lipidiques (SLN)

La phase huileuse des doubles émulsions que nous avons préparées est constituée d'une phase d'un mélange d'un ester gras, solide ($T_f = 54^\circ\text{C}$) et de limonène, liquide à température ambiante. Il est ainsi possible par simple évaporation du limonène, d'obtenir des nanoparticules solides lipidiques, tout en conservant les gouttelettes d'eau qui sont confinées au sein des SLN. Cette méthode, a déjà été décrite dans la littérature et a permis l'encapsulation d'une catalase dans des SLN préparées à partir de phosphatidylcholine de soja⁸. Dans notre cas, en évaporant 80 wt% du solvant, on obtient une dispersion dont les particules peuvent être divisées en 3 tailles (20, 130 et 500 nm), mais la population la plus importante est centrée sur 130 nm (Figure V-25).

Enfin, le volume d'eau a été ajustée afin d'obtenir une concentration de 3,45 wt% de P123 qui correspond à la concentration optimale pour préparer des matériaux méso-macroporeux organisés selon une symétrie hexagonale.

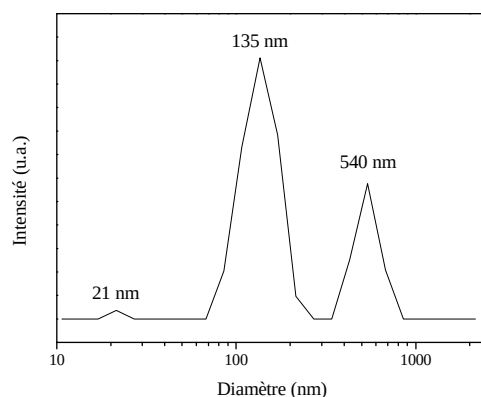


Figure V-25 - Analyse par DLS d'une préparation à base de SLN

2. Matériaux

a. Minéralisation du système « double émulsion »

La minéralisation des doubles émulsions a été réalisée par un procédé sol-gel en utilisant le TMOS comme source de silice. Le but est d'obtenir un matériau à porosité hiérarchisée avec un réseau de mésopores organisés. Le rapport molaire Tensioactif(TA)/TMOS, facteur qui influence la structuration des matériaux, a été varié entre 0,008 et 0,040.

Les matériaux obtenus après minéralisation des doubles émulsions (notés **MDE**) sont caractérisés afin de connaître leurs propriétés structurales et texturales. La Figure V-26 présente les diffractogrammes SAXS des matériaux MDE en fonction de la quantité de silice ajoutée.

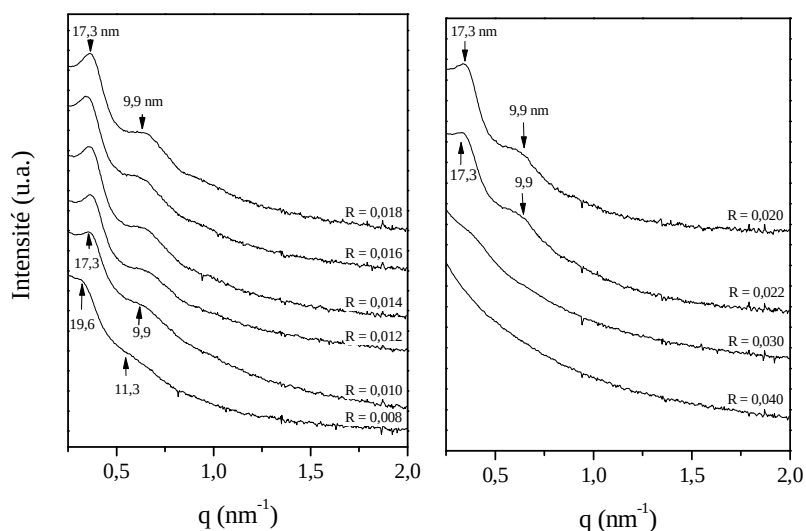


Figure V-26 - Diffractogrammes SAXS des matériaux MDE

Pour le rapport molaire TA/TMOS de 0,008, l'organisation des canaux est vermiculaire. En effet, sur le diffractogramme correspondant, on peut observer deux pics larges de faible intensité. En augmentant le rapport TA/TMOS, les raies de diffraction s'affinent et s'intensifient, alors que le rapport entre le premier et le deuxième pic reste inchangé ($\sqrt{3}$). L'arrangement hexagonal des canaux est donc de plus en plus marqué. Les matériaux préparés avec un rapport molaire TA/TMOS compris entre 0,014 et 0,020 semblent également avoir cette structuration car leurs diffractogrammes sont quasi identiques. Pour des rapports supérieurs à 0,020, les raies s'élargissent, montrant ainsi une diminution du degré de structuration. La variation de la quantité de précurseur de silice influence également la distance entre les plans (100). Pour $R = 0,008$, cette distance est de 19,6 nm alors, que pour un matériau préparé avec un $R = 0,018$, elle vaut 17,3 nm. Ainsi, le paramètre de maille de ce

matériau ($R = 0,018$) est égal à 19,9 nm, lequel est supérieur à celui d'un matériau mésoporeux type SBA-15 ($a_0 = 11,3$ nm).

L'ajout d'une quantité trop importante de TMOS conduit à la formation d'une phase silicique amorphe. Le réseau hexagonal est donc dilué dans une matrice de silice non structurée (voir matériau avec un rapport $R=0,020$) et disparaît complètement lorsque le rapport atteint 0,040. Pour la suite de ce travail, nous avons donc choisi de synthétiser les matériaux MDE avec un rapport molaire TA/TMOS égal à **0,018**, une concentration en P123 de 3,45% et le traitement hydrothermal est effectué à 50°C pendant 24 heures.

La Figure V-27 présente les résultats des analyses par sorption d'azote pour les matériaux MDE synthétisés avec un rapport molaire TA/TMOS égal à 0,008, 0,018 et 0,030.

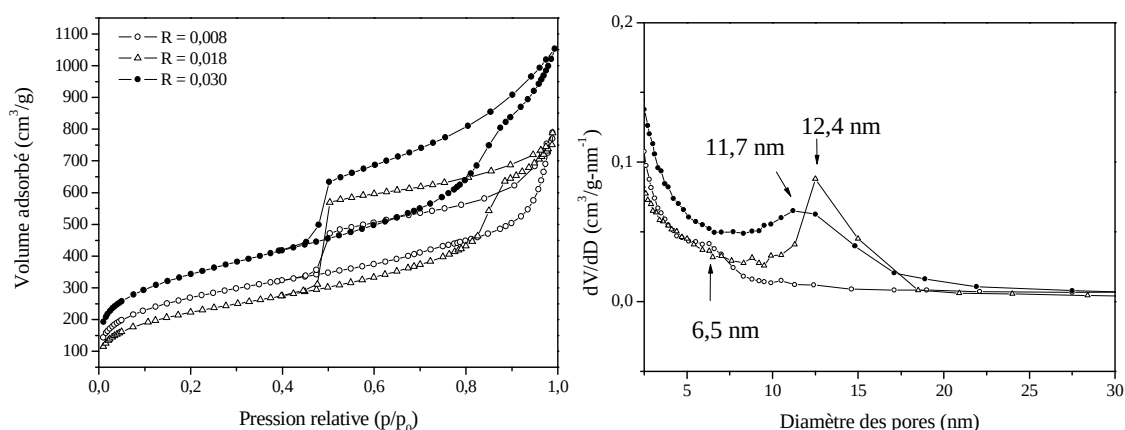


Figure V-27 - Isothermes d'adsorption d'azote et distributions de la taille des pores pour les matériaux MDE à différents rapports molaires TA/TMOS

L'absence de paliers aux pressions relatives proche de 1 peut correspondre à la présence de macropores ou à une porosité interparticulaire. L'augmentation du rapport molaire TA/TMOS de 0,008 à 0,018 a permis d'agrandir la taille des pores de 11,7 à 12,4 nm. Toutefois, pour un matériau synthétisé avec $R = 0,030$, le diamètre des pores ainsi que l'intensité de la valeur dV/dD diminuent car l'excès de TMOS conduit à la dilution de la mésostructure dans la matrice silicatée qui est amorphe. Les volumes poreux augmentent de 0,7 à 1,2 cm³/g avec les rapports TA/TMOS de 0,008 à 0,030. Cette variation peut être liée à la diminution du degré de structuration observée par SAXS. Les caractéristiques de ces trois matériaux sont regroupées dans le Tableau V-5.

Tableau V-5 – Données déterminées par adsorption-désorption d’azote pour les matériaux MDE

Matériaux	Structure	d_p (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_p (cm ³ /g)
Matériau préparé avec $R = 0,008$	Vermiforme	6,5	960	0,7
Matériau préparé avec $R = 0,018$	Hexagonale	12,4	799	0,91
Matériau préparé avec $R = 0,030$	-	11,7	1210	1,21

Le matériau MDE préparé avec $R = 0,018$ a été analysé par porosimétrie à mercure afin de déterminer le diamètre des macropores présents dans la matrice.

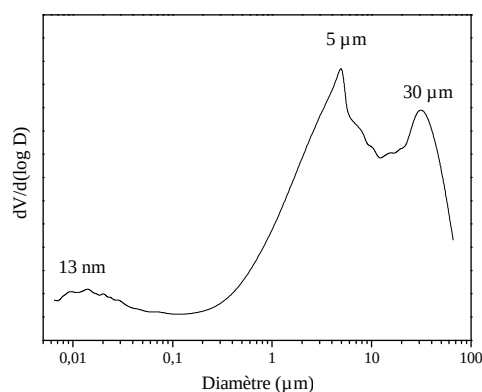


Figure V-28 - Distribution de la taille des pores obtenue par porosimétrie à mercure avec le matériau MDE préparé avec $R = 0,018$

Cette analyse a confirmé la présence de macropores dans le matériau. En effet, deux pics distincts sont attribués aux macropores (5 et 30 μm). Le pic large centré sur 5 μm pourrait correspondre à l'empreinte de la des gouttelettes d'eau dans l'huile alors que celui à 30 μm pourrait être associé à la porosité interparticulaire. Toute même, on note que la taille des macropores est supérieure à celle des gouttelettes de la double émulsion (30 μm), probablement due aux phénomènes de coalescence qui ont pu se produire lors de la synthèse du matériau. La large distribution du pic correspondant aux macropores (200 nm à 10 μm) montre que le matériau est hétérogène en taille de pores. Les mesures par intrusion de mercure mettent également en évidence la présence de mésopores dont la taille, de 13 nm, correspond parfaitement à la taille des mésopores obtenues par des mesures de sorption d'azote (12,4 nm).

L'observation du matériau MDE ($R = 0,018$) par microscopie électronique à balayage et à transmission a permis de visualiser la morphologie du matériau ainsi que sa porosité (Figure V-29 A, B et C). On observe notamment des pores de taille allant de 100 nm à 1 μm , qui

pourraient correspondre à l'empreinte des gouttelettes d'eau dans l'huile. De plus, les clichés MET confirment l'organisation hexagonale des mésopores (Figure V-29D, E), dont la taille est en parfait accord avec les valeurs obtenues par les mesures de sorption d'azote.

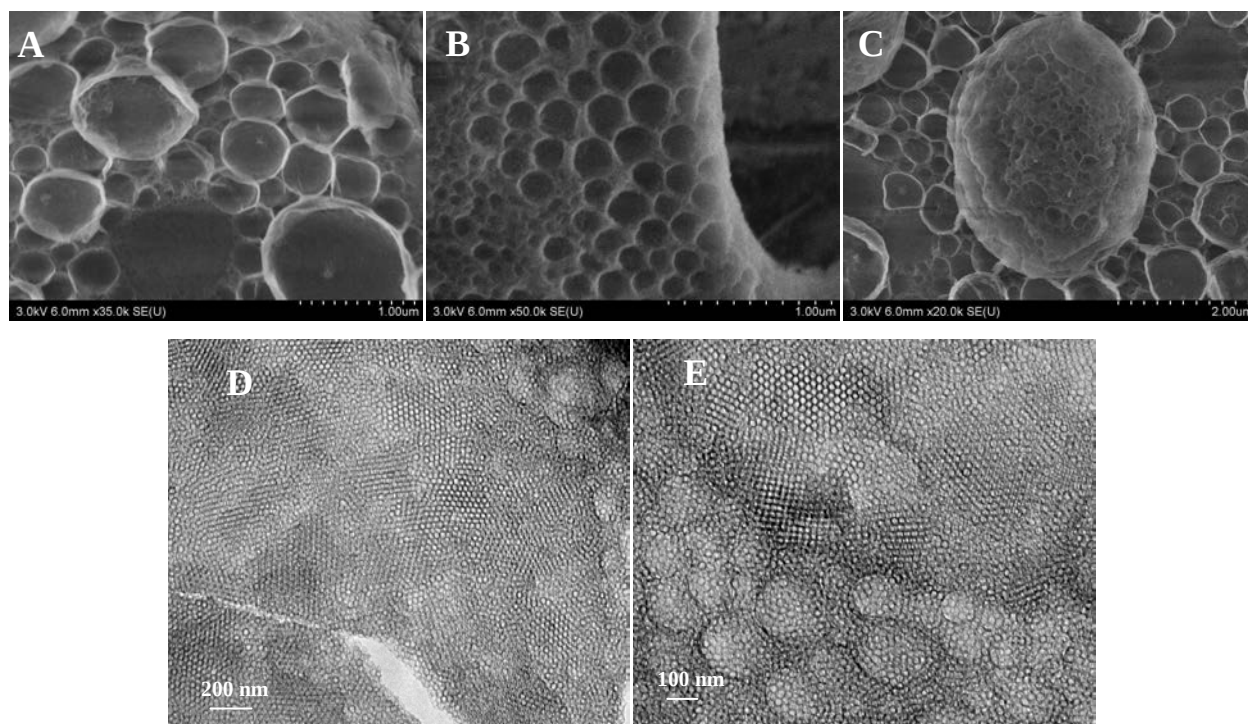


Figure V-29 - Images MEB (A, B, C) et MET (D, E) du matériau MDE synthétisé avec $R = 0,018$

b. Minéralisation du système à base de SLN

Pour préparer les matériaux silicatés à partir de SLN (notés **MSLN**), nous avons pris les conditions expérimentales établies lors de la minéralisation des matériaux à partir des doubles émulsions, c'est-à-dire, un rapport molaire TA/TMOS de 0,018 et un traitement hydrothermal de 50°C pendant 24 heures. Le tensioactif a été éliminé par un lavage abondant à l'eau (cf. chapitre 2). Le matériau a été analysé par SAXS, sorption d'azote, porosimétrie à mercure et microscopie électronique à transmission. Le diffractogramme SAXS du matériau MSLN est présenté en Figure V-30.

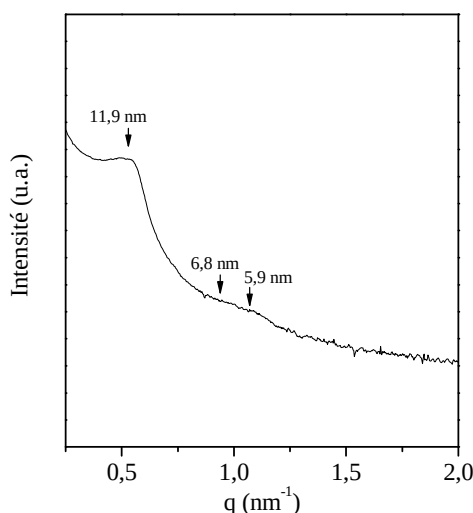


Figure V-30 - Diffractogramme du matériau MSLN

Le matériau est de type HMS (Hybrid Mesoporous Structure), c'est-à-dire, qu'il est composé de zones organisées de type hexagonal et non organisées, de type vermiforme. En comparant avec le matériau MDE, on constate que la distance entre les plans (100) est plus faible (11,9 nm) contre 17,3 nm pour le matériau MDE. L'isotherme d'adsorption d'azote présentée en Figure V-31 montre que, pour des pressions relatives p/p_0 proches de 1, on observe une forte hausse du volume d'azote adsorbé, ce qui caractérise soit la présence de macropores dans la matrice, soit une porosité interparticulaire. La distribution de la taille des pores met en évidence des mésopores d'un diamètre de 8,4 nm. Cette taille de pore est proche de celle d'un matériau mésoporeux type SBA-15 (8,7 nm).

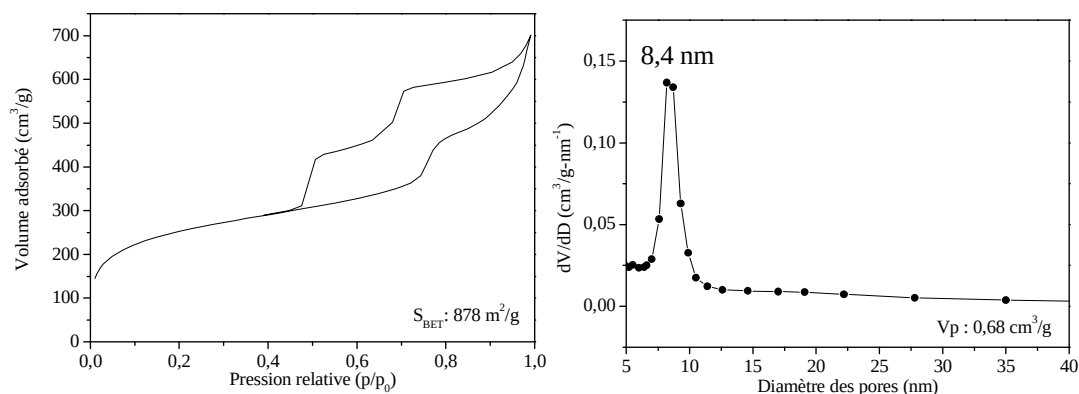


Figure V-31 - Isotherme d'adsorption-désorption d'azote et distribution de la taille des pores du matériau MSLN

La présence de macropores a été confirmée par des mesures de porosimétrie à mercure (Figure V-32).

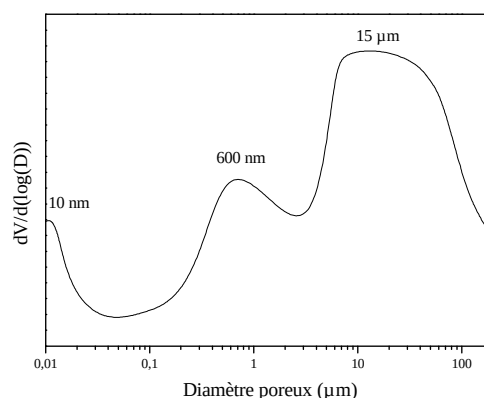


Figure V-32 - Distribution de la taille des pores du matériau MSLN réalisée par porosimétrie à mercure

On observe 3 distributions larges des pores centrée sur 10 nm, 600 nm et 15 μm . Les pores de taille nanométrique peuvent être attribués aux empreintes des SLN, alors que les pores de tailles micrométriques doivent correspondre à une porosimétrie interparticulaire.

La microscopie électronique à transmission a permis de visualiser la morphologie et la structuration des matériaux MSLN. Sur la Figure V-33A, on peut observer l'organisation hexagonale des mésopores. La taille des mésopores correspond au diamètre déterminé par sorption d'azote. Sur l'image B, on distingue des pores d'environ 130 nm qui peuvent correspondre aux particules de SLN utilisées comme empreinte. L'image C montre des pores de 600 nm qui peuvent également être attribués à des SLN. Le Tableau V-6 regroupe les caractéristiques du matériau MSLN.

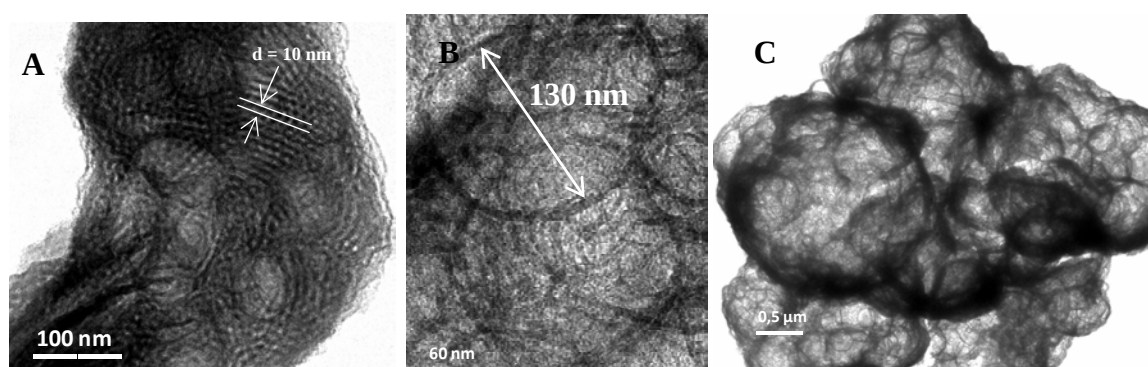


Figure V-33 - Micrographies MET du matériau MSLN

Tableau V-6 - Caractéristiques du matériau MSLN

Support	a_0 (nm)	S_{BET} (m^2/g)	v_p (cm^3/g)	d_p (nm)
Matériau MSLN	13,7	878	0,68	8,4

3. Réaction de transestérification

Des bioréacteurs méso-macroporeux ont été synthétisés à partir de doubles émulsions et de SLN pour cela, la lipase *Mm-L* a été solubilisée dans la solution tampon TRIS à pH 6 laquelle constitue la phase aqueuse de l'émulsion inverse. La solution enzymatique a une concentration de 50 mg/mL choisie de façon arbitrairement. Le bioréacteur préparé à partir de la double émulsion a été appelé MmL-MDE et celui préparé à partir de SLN, MmL-MSLN.

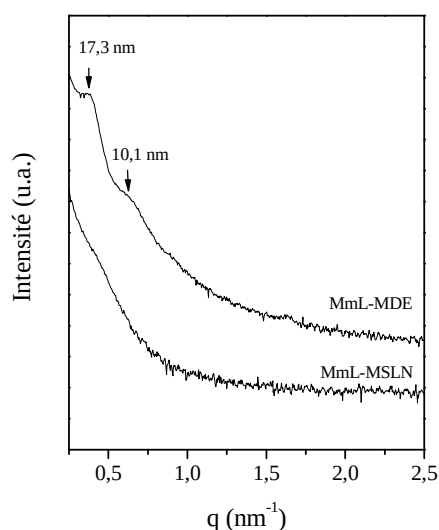


Figure V-34 - Diffractogrammes des matériaux MmL-MDE et MmL-MSLN

En comparant les diffractogrammes SAXS des matériaux contenant ou non l'enzyme (Figure V-34, Figure V-26 et Figure V-30), on observe que l'ajout de l'enzyme ne modifie pas sensiblement la structuration des matériaux mais le degré de structuration est plus faible car les raies de diffraction sont moins intenses sur le diffractogramme d'un matériau ne contenant pas d'enzyme par rapport à un diffractogramme d'un matériau contenant l'enzyme.

La quantité théorique maximale de lipase encapsulée dans la matrice a été estimée à **0,054 mg** de lipase/mg de support silicaté, ce qui est 8 fois inférieure au taux d'encapsulation de la lipase par physisorption dans le SBA-15. Cette quantité est étroitement liée à la quantité d'enzyme introduite dans l'émulsion inverse initiale et peut donc être facilement ajustable.

Enfin, le bioréacteur MmL-MSLN a été testé en réalisant la méthanolyse de l'huile de colza. La réaction a été réalisée dans un solvant organique, l'hexane, connu pour conduire à des rendements élevés en esters méthyliques⁹. Typiquement, le milieu réactionnel, hétérogène, est constitué de 10 mL d'hexane, 100 μ L d'huile de colza (1 éq.), 13 μ L de méthanol (3 éq.) et 100 mg de catalyseur supporté. Le système est maintenu sous agitation à 300 tours/minute et à

une température de 25°C. Des prélèvements de 100 μL sont effectués à intervalles de temps réguliers pour suivre l'avancement de la réaction.

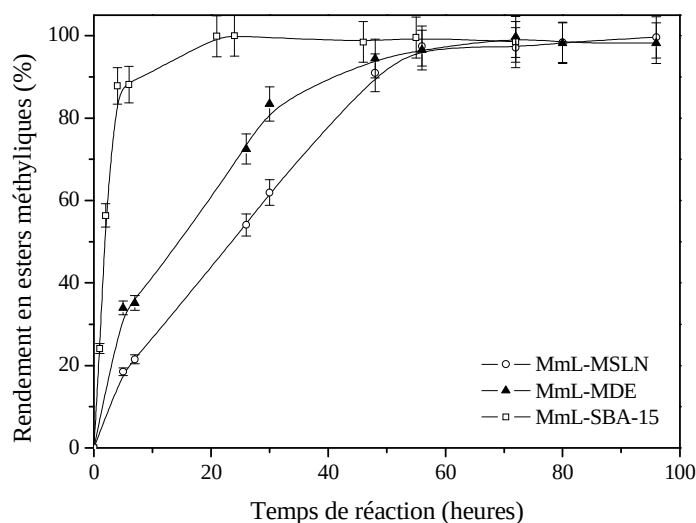


Figure V-35 - Rendement en esters méthyliques en fonction du temps des 3 bioréacteurs

Pour chacun des bioréacteurs méso-macroporeux MmL-MDE et MmL-MSLN, la conversion totale du méthanol est atteinte au bout de 48 heures (Figure V-35). On observe une légère augmentation de la vitesse initiale de la réaction catalysée par MmL-MDE par rapport à MmL-MSLN. Toutefois, la vitesse initiale reste inférieure à celle de la réaction catalysée par l'enzyme physisorbée sur un support mésoporeux type SBA-15. En effet, ce matériau dont la synthèse a été décrite dans le chapitre 2, a aussi été testé en utilisant les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour les bioréacteurs méso-macroporeux (MmL-MDE et MmL-MSLN). Le résultat montre que les performances catalytiques du matériau MmL-SBA-15 restent supérieures à celles des matériaux où l'enzyme a été immobilisée pendant la synthèse du matériau (Tableau V-7).

Tableau V-7 - Récapitulatif des vitesses initiales des trois bioréacteurs (MmL-SBA-15, MmL-MSLN et MmL-MDE)

Bioréacteur		Réaction	Consommation de MeOH		Formation des esters méthyliques	
Support	Quantité d'enzyme (mg)	Température (°C)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol/h/mg}_{\text{Mm-L}}$)
MmL-SBA-15	42	25	74,5	1,78	69,3	1,65
MmL-MSLN	5,4	25	6,4	1,19	5,9	1,09
MmL-MDE	5,4	25	9,4	1,74	8,7	1,61

Les propriétés catalytiques des matériaux préparés à partir de doubles émulsions, de SLN et du matériau mésoporeux SBA-15 dépendent, d'une part de la quantité d'enzyme présente dans les supports et d'autre part, du type d'immobilisation. L'enzyme est physisorbée au matériau SBA-15 alors qu'elle est encapsulée lors de la synthèse des matériaux MDE et MSLN. La présence de macropores dans le matériau peut avoir un effet négatif sur le rendement et l'activité de l'enzyme. Dans le cas de l'encapsulation de l'enzyme, dès la première étape de synthèse du matériau, les différents traitements peuvent également dénaturés l'enzyme et donc être à l'origine de la différence d'activité catalytique. Cependant, le taux d'immobilisation pour le matériau SBA-15 est de $0,42 \text{ mg}_{\text{Mm-L}}/\text{mg}_{\text{Matériau}}$, soit presque 8 fois supérieur au taux d'immobilisation pour les supports préparés à partir de SLN ou de doubles émulsions ($0,054 \text{ mg/mg}$). Ainsi, en considérant les rendements atteints par ces bioréacteurs et les taux de lipase immobilisée, les bioréacteurs MmL-MSLN et MmL-MDE sont plus efficaces car leur « turnover number » est largement supérieur à celui du bioréacteur correspondant au matériau SBA-15. La Figure V-36 présente l'évolution du turnover number en fonction du temps.

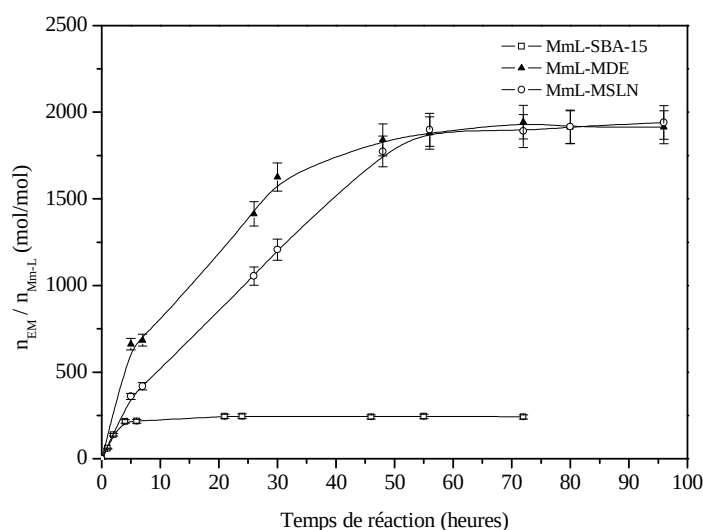


Figure V-36 - "Turnover number" des trois types de bioréacteurs (MmL-SBA-15, MmL-MSLN et MmL-MDE)

Enfin, en termes de réutilisation du support catalytique, on note qu'à partir de la 3^{ème} utilisation, le rendement de la réaction est inférieur à 10% avec les matériaux préparés à partir de doubles émulsions et de SLN (Figure V-37). La déstructuration du matériau peut être la cause de ce mauvais résultat (Figure V-38).

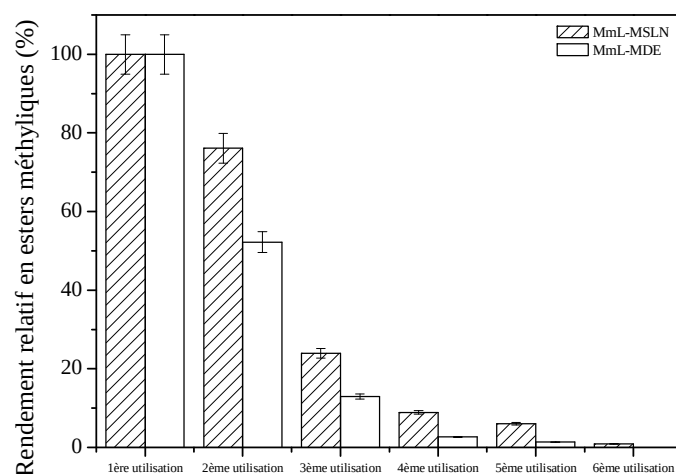


Figure V-37 - Recyclage des bioréacteurs MmL-MSLN et MmL-MDE

En effet, en présence d'hexane, la silice mésoporeuse peut se gonfler par l'hexane et donner un gel.

La Figure V-38 présente les diffractogrammes des deux bioréacteurs avant et après utilisation. On constate une dégradation progressive pour le matériau MDE et plus direct pour le matériau MSLN.

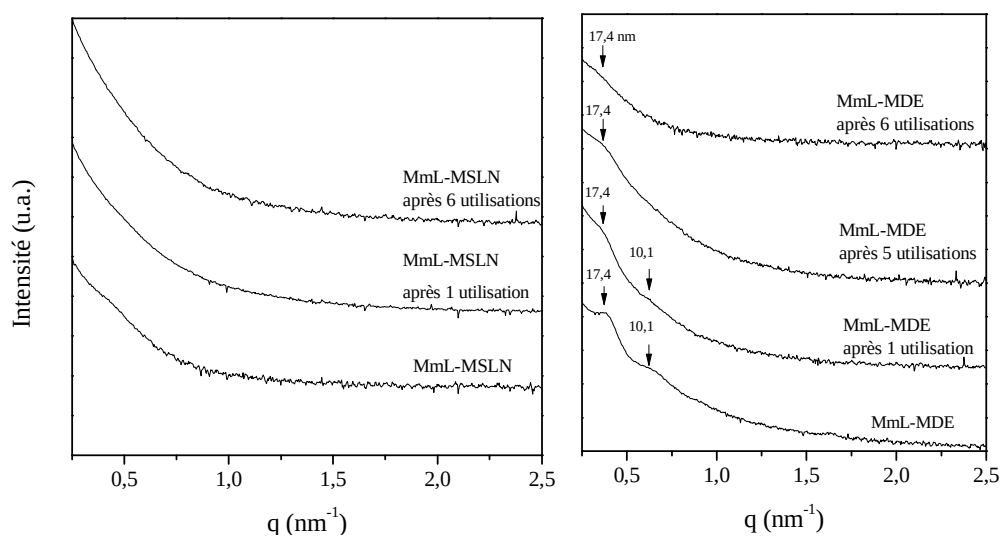


Figure V-38 - Diffractogrammes SAXS des bioréacteurs MmL-MSLN et MmL-MDE après utilisation

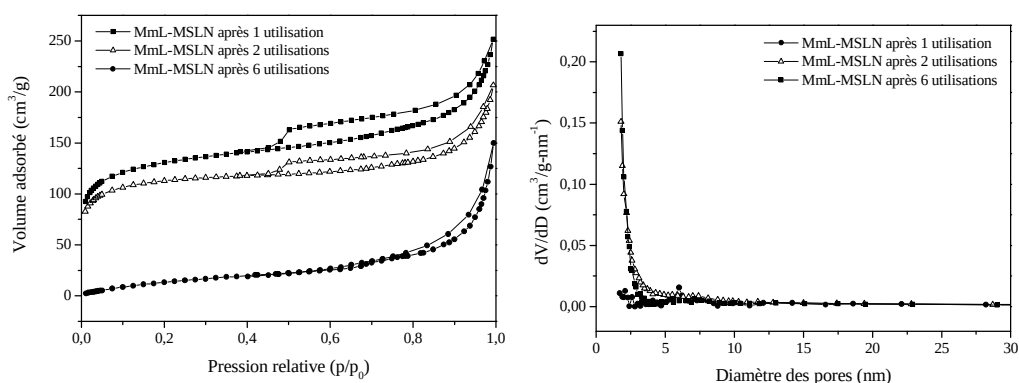


Figure V-39 - Isothermes d'adsorption d'azote et distribution de la taille des pores du bioréacteur MmL-MSLN après 1, 2 et 6 réactions

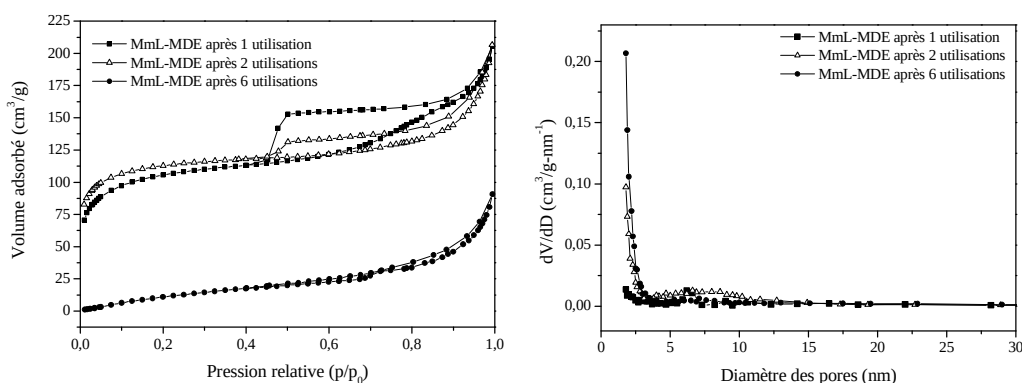


Figure V-40 - Isothermes d'adsorption d'azote et distribution de la taille des pores du bioréacteur MmL-MDE après 1, 2 et 6 réactions

Les analyses par adsorption-désorption d'azote montrent également la dégradation des matrices (Figure V-39 et Figure V-40). La surface spécifique passe de 800 m²/g à 70 m²/g pour les deux matrices alors que les volumes poreux sont divisés par 10. Les isothermes d'adsorption sont alors caractéristiques d'un matériau macroporeux. Les distributions de la taille des pores mettent également en évidence l'effondrement des matrices après utilisation car les valeurs de dV/dD sont faibles et ne permettent pas de montrer l'existence de mésopores.

En résumé de cette deuxième partie de chapitre, nous avons optimisé la synthèse de matériaux méso-macroporeux à partir, soit d'une double émulsion, soit de nanoparticules lipidiques solides. Nous avons réussi à obtenir un réseau mésoporeux organisé pour les deux types de matériaux méso-macroporeux. Cela a été réalisé dans le but d'encapsuler la biomolécule pendant la synthèse du matériau ainsi de développer une méthode d'immobilisation directe. Nous avons étudié la faisabilité de la réaction de transestérification catalysée par ce type de

bioréacteur. Les résultats ont montré que l'activité catalytique de la lipase est conservée malgré les différentes étapes inhérentes à la synthèse du matériau (préparation des doubles émulsions et SLN, traitement hydrothermal, extraction du tensioactif). La méthanolyse de l'huile de colza est complète après 48 heures en utilisant un solvant (hexane). En comparaison avec une réaction effectuée dans les mêmes conditions (c'est-à-dire avec hexane) en utilisant le matériau SBA-15, ce temps est plus long. En effet, 100% du rendement avec le matériau type SBA-15 est atteint après seulement une vingtaine d'heures de réaction. La liaison entre l'enzyme et le support peut également jouer un rôle. La réutilisation de ces bioréacteurs a été examinée et le même catalyseur peut être réutilisés 6 fois avant que ses performances catalytiques ne soit quasi-nulles.

Une optimisation des conditions de synthèse devrait permettre de maintenir l'organisation du matériau après utilisation et peut être optimisé le recyclage du bioréacteur.

C. Résumé

Ce cinquième chapitre a été consacrée à la préparation de matériaux silicatés méso-macroporeux pour immobiliser la lipase *Mm-L*. La présence de macropores a permis d'augmenter la capacité d'adsorption de l'enzyme (1,1 mg/mg) par rapport à un matériau exclusivement mésoporeux (0,5 mg/mg). Les performances catalytiques de ce type de bioréacteur ont été investiguées. Malheureusement, l'activité de la lipase est plus faible que dans le cas d'un matériau type SBA-15, le rendement maximal en esters méthyliques étant atteint après 72 heures de réaction contre 30 heures pour le bioréacteur mésoporeux. Pour ce qui concerne le recyclage, ce système n'a pas permis d'améliorer l'efficacité, seules 2 utilisations sont envisageables. La désorption de l'enzyme est mise en cause.

En complément, nous avons exploré la méthode d'encapsulation directe de l'enzyme dans la matrice. Pour cela, des matériaux silicatés ont été préparés à partir de doubles émulsions ou de SLN dans lesquelles la lipase a été introduite. Les conditions de synthèse ont été recherchées afin d'organiser le réseau mésoporeux constituant les murs des macropores. Les bioréacteurs ainsi synthétisés ont été testés en convertissant l'huile de colza en esters méthyliques en présence d'un solvant organique, l'hexane. En 48 heures, la réaction est totale. Enfin, un rendement notable est encore obtenu après 5 utilisations de ces bioréacteurs *MmL-MDE* et *MmL-MSLN*.

Références bibliographiques

¹ J.L. Blin, R. Bleta, J. Ghanbaja, M.J. Stébé, Fluorinated emulsions: Templates for the direct preparation of macroporous–mesoporous silica with a highly ordered array of large mesopores, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2006**, 94, 74–80

² A. Imhof, D. J. Pine, Ordered macroporous materials by emulsion templating, *J.Nature*, **1997**, 389, 948-951

³ F. Kleitz, W. Schmidt, F. Schuth, Evolution of mesoporous materials during the calcinations process: structural and chemical behavior, *Microporous Mesoporous Mater.* **2001**, 44, 95-109

⁴ S.A. Bagshaw, I. J. Bruce, Rapid calcinations of high quality mesostructured MCM-41, MSU-X, and SBA-15 silicate materials: A step towards continuous processing?, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2008**, 109, 199-209

⁵ F. Bérubé, S. Kaliaguine, Calcination and thermal degradation mechanism of triblock copolymer template in SBA-15 materials, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2008**, 115, 469-479

⁶ H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on the Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica, *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 3301-3305.

⁷ V. Dossat, D. Combes, A. Marty, Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: Influence of the glycerol production, *Enzyme Microb. Technol.*, **1999**, 25, 194-200.

⁸ C. Qi, Y. Chen, J. H. Huang, Q. Z. Jina, X. G. Wang, Preparation and characterization of catalase-loaded solid lipid nanoparticles based on soybean phosphatidylcholine, *J. Sci. Food. Agric.*, **2012**, 92, 787–793

⁹ L.A. Nelson, T. A. Foglia, W. N. Marner, Lipase-catalyzed production of biodiesel, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, 73, 1191-1195

Conclusions générales

L'objectif principal de ce travail était de proposer des bioréacteurs enzymatiques pour produire des esters méthyliques par transestérification de l'huile de colza en présence de méthanol. La première partie de l'étude a consisté à immobiliser par physisorption la lipase *Mucor miehei* sur des types de silices mésoporeuses organisées ayant des spécificités texturales différentes, le matériau SBA-15 et un matériau préparé à partir de tensioactifs non ioniques fluorés (MMF). Nous avons démontré que ces caractéristiques jouent un rôle important vis-à-vis de l'adsorption de l'enzyme. En effet, le matériau MMF dont les pores ont un diamètre inférieur à celui du matériau SBA-15 (respectivement 5,7 nm et 9 nm) adsorbe une quantité assez faible de lipase. Le phénomène d'adsorption, mis en évidence par spectroscopie infrarouge, est aussi gouverné par le pH de la solution enzymatique dans laquelle est plongé le matériau, en relation avec les points isoélectriques du matériau et de la lipase Mm-L. Après immobilisation de l'enzyme, le bioréacteur SBA-15 a donc catalysé la réaction de méthanolyse de l'huile de colza sans solvant, seul le matériau SBA-15 a été considéré, la structure du matériau MMF s'étant partiellement effondrée. Après une première phase exploratoire conduisant à des rendements de l'ordre de 80%, l'ajout d'eau ayant amélioré les performances catalytiques, les conditions de la réaction ont été optimisées à l'aide d'un plan d'expérience pour aboutir à un rendement de 100%. Cependant, les conditions optimales de la réaction ont été obtenues en prenant un rapport molaire entre le méthanol et l'huile égal à 1 (soit 3 fois inférieur à la stœchiométrie de la réaction) car le méthanol a un effet inhibiteur sur l'enzyme. Pour obtenir une conversion complète, nous avons ajouté la quantité de méthanol correspondante en trois fois, tout en maintenant les conditions optimales de la réaction. La capacité de recyclage du bioréacteur a également été investiguée. Seules deux réutilisations ont permis d'obtenir un rendement supérieur ou égal à 50%. Le relargage de l'enzyme est la raison essentielle de cette perte d'activité après trois réutilisations, 52% d'enzyme ont été désorbées.

Le second volet du travail de thèse a été consacré à tester un bioréacteur dont l'enzyme a été chimisorbée sur le matériau silicaté. Ainsi, la fonctionnalisation du matériau SBA-15 a été entreprise en greffant la molécule 3-(triethoxysilyl)propyl isocyanate à sa surface et la lipase a été ensuite liée de manière covalente par formation d'une liaison urée entre le support et la

lipase. Le taux d'adsorption de la lipase, déterminé par spectroscopie UV, est dans ce cas, plus faible que pour une lipase physisorbée. La diminution de la taille des pores due à la fonctionnalisation du matériau réduit la capacité d'adsorption, mais après immobilisation, le matériau est toujours organisé. Toutefois, ce bioréacteur est moins efficace que celui dont la lipase est physisorbée. Cependant, ce bioréacteur a pu être utilisé dans 6 réactions de transestérification successives et dans la dernière réaction, sa capacité catalytique est encore de 40%. La chimisorption de l'enzyme par liaison covalente permet de mieux recycler le bioréacteur, ce qui n'empêche que l'activité enzymatique diminue pour d'autres raisons, telle que l'oxydation de l'enzyme ou encore l'inhibition de l'enzyme due au glycérol.

Dans le dernier chapitre sont décrits les résultats avec des bioréacteurs dont le support est méso-macroporeux. Tout d'abord, des émulsions fluorées ont été considérées et des matériaux constitués de pores d'environ 5 μm dont les murs sont formés par un réseau mésoporeux hexagonal ont été préparés. Ces matériaux ont été utilisés comme support pour physisorber la lipase. La présence de macropores a permis d'accroître considérablement le taux d'immobilisation (1,1 $\text{mg}_{\text{Mm-L}}/\text{mg}_{\text{matériau}}$). Par contre, avec ce système, le rendement de la réaction de transestérification peut être maximal à condition d'attendre 72 heures de réaction. En termes de recyclage du catalyseur, il est limité à 2 utilisations. Nous avons montré que le taux de désorption de l'enzyme est important.

Une troisième méthode d'immobilisation de la lipase a été investie. Il s'agit de l'encapsulation directe de l'enzyme pendant la synthèse du matériau méso-macroporeux, lequel a été préparé à partir d'une double émulsion (E/H/E) et la lipase a été introduite dans la phase aqueuse de l'émulsion inverse. Lorsque le limonène qui constitue avec le NHP la phase huile est évaporé, la taille des gouttelettes huileuses est réduite et engendre l'obtention de SLN. La minéralisation de ces systèmes a permis d'obtenir des matériaux dont le réseau mésoporeux est organisé selon une symétrie hexagonale. L'encapsulation directe conduit à un taux d'immobilisation de la lipase de 0,054 $\text{mg}_{\text{Mm-L}}/\text{mg}_{\text{matériau}}$, soit près de 10 fois inférieur aux bioréacteurs SBA-15. L'activité catalytique des bioréacteurs a été évaluée *via* la réaction de transestérification effectuée cette fois dans un solvant organique (l'hexane). Malgré la faible quantité de lipase encapsulée dans la matrice méso-macroporeuse, 100% de l'huile a été convertie en esters méthyliques en 48 heures. A titre de comparaison, une réaction dans des conditions identiques a été réalisée avec le bioréacteur de type SBA-15. Le même taux de conversion de 100% est atteint, mais en un temps plus court, seulement 20 heures. Cependant, les bioréacteurs MmL-MSLN et MmL-MDE sont plus efficaces au regard des turnover

numbers. Ces mêmes bioréacteurs peuvent être réutilisés mais leur activité catalytique ne cesse de décroître au fur et à mesure des cycles successifs, pour atteindre une activité quasi-nulle après 6 utilisations.

En résumé, ce travail a permis de proposer plusieurs types de bioréacteurs capables de catalyser une réaction de transestérification. Nous avons montré que chaque type de bioréacteur possède des avantages et des inconvénients. Le bioréacteur méso-macroporeux sur lequel la lipase est physisorbée paraît être le catalyseur le moins efficace du point de vue de la cinétique de la réaction et de son recyclage. Selon les mêmes critères, le bioréacteur exclusivement mésoporeux dans lequel la lipase a été chimisorbée semble être le plus prometteur.

Perspectives

Avant d'envisager l'utilisation des systèmes élaborés dans ce travail pour la production de biodiesel, il est nécessaire d'améliorer la capacité de réutilisation des bioréacteurs. Nous avons mis en évidence que la désorption de l'enzyme entraînait la baisse de l'activité catalytique, mais on doit également s'intéresser aux autres phénomènes qui limitent la durée de vie du bioréacteur, en particulier la formation de produits oxydants. Pour réduire cette pollution, une molécule anti-oxydante pourrait être ajoutée au mélange réactionnel.

Dans notre travail, les réactions de transestérification ont été réalisées pour l'essentiel sans solvant, mais en ajoutant de l'eau afin d'améliorer les performances catalytiques du bioréacteur. Toutefois, l'inconvénient lié à la présence du méthanol vis-à-vis de l'enzyme pourrait être remplacé par un solvant tel que le *tert*-butanol qui possède un effet moins inhibiteur.

Les supports méso-macroporeux ont des potentialités et doivent être améliorés grâce à la présence des macropores. La fonctionnalisation de ce type de matrice pourrait s'avérer plus efficace pour accueillir l'enzyme en comparaison avec les supports exclusivement mésoporeux, étant donné que l'espace disponible est plus important. La chimisorption de l'enzyme présente l'avantage d'améliorer le recyclage du catalyseur. Ces supports méso-macroporeux pourraient également être utilisés dans le cadre de réactions de transestérification en flux continu, la présence de macropores faciliteraient la diffusion du substrat.

Les bioréacteurs MmL-MDE et MmL-MSLN élaborés respectivement à partir de doubles émulsions et de SLN doivent être optimisés pour éviter la dégradation de la charpente silicatée au terme de structuration. De plus, l'augmentation du taux d'encapsulation de l'enzyme permettrait d'accélérer la cinétique.

En référence à des nouveaux concepts décrits dans la littérature, on a imaginé rendre magnétique les matériaux préparés à partir des doubles émulsions. Ainsi, des particules de magnétite préparées selon le protocole de Gingasu *et al.*¹ seraient incorporées dans l'émulsion inverse. L'utilisation d'un tel matériau, comme support d'immobilisation de l'enzyme, permettrait de récupérer plus facilement le bioréacteur après réaction. Cette idée a été explorée et des résultats intéressants ont été obtenus. Une double émulsion préparée avec une solution de magnétite, dont la concentration a été ajustée, a été mise en contact avec la source

de silice TMOS. Les conditions de synthèse sont identiques à celles utilisées pour préparer les matériaux MDE et MSLN, (rapport molaire TA/TMOS : 0,018). La seule modification est relative au traitement hydrothermal qui a été optimisé et en choisissant une température de 120°C pendant 24 heures, le spectre SAXS présente 3 raies qui sont révélatrices d'un arrangement hexagonal imparfait (Figure 1). Des macropores de quelques micromètres ont également été mis en évidence au MET. L'exploitation de ce système pourrait être poursuivie en examinant en premier les propriétés magnétiques du matériau pour valider son utilisation.

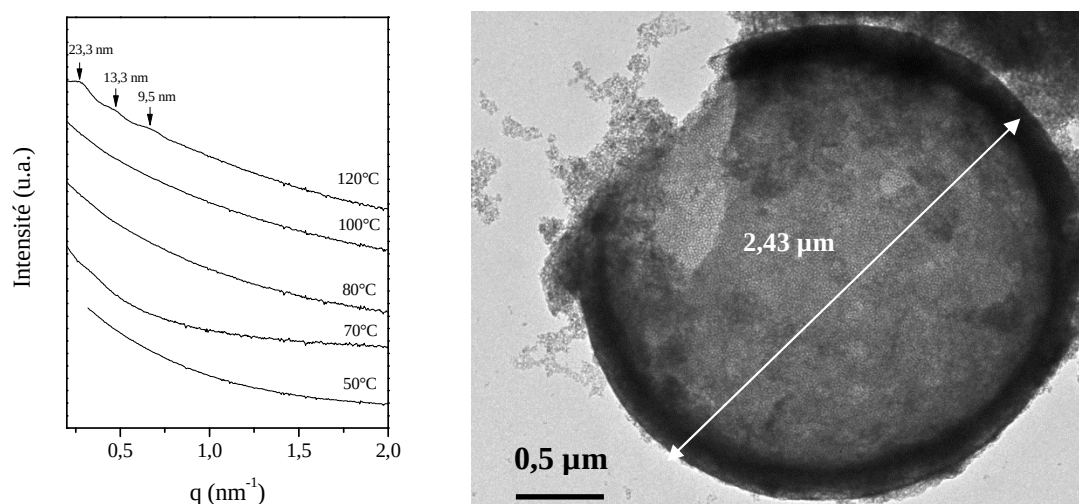


Figure 1 - Diffractogrammes SAXS des matériaux MDE magnétique en fonction de la température du traitement hydrothermal et image MET du matériau synthétisé à 120°C

¹ D. Gingasu, I. Mindru, L.A. Patron J. M. Calderon-Moreno, L. Diamandescu, F. Tuna, T. Ppescu Investigation of magnetite formation in the presence of hydrazine dihydrochloride, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **2011**, 6, 1065-1072

Liste des publications

- J. Jacoby, A. Pasc, C. Carteret, F. Dupire, M.J. Stébé, V. Coupard, J.L. Blin, Ordered mesoporous materials containing *Mucor Miehei* Lipase as biocatalyst for transesterification reaction, *Process Biochem*, **2013**, 48, 831–837
- N. Canilho, J. Jacoby, A. Pasc, C. Carteret, F. Dupire, M.J. Stébé, J.L. Blin, Isocyanate-mediated covalent immobilization of *Mucor miehei* lipase onto SBA-15 for transesterification reaction, *Colloids Surf. B*, **2013**, 112, 139–145

Résumé :

Ce travail a consisté à préparer des catalyseurs en immobilisant la lipase *Mucor miehei* dans des matériaux silicatés poreux pour la production de biodiesel à partir d'huiles végétales. Pour développer cette étude, plusieurs systèmes à base de tensioactifs ont été utilisés afin de synthétiser des matériaux silicatés à porosité contrôlée en empruntant des protocoles décrits dans la littérature ou mis au point au laboratoire. Le point commun de ces matériaux, qu'ils soient mésoporeux ou méso-macroporeux est l'organisation hexagonale de leurs mésopores. Les matériaux méso-macroporeux ont été préparés à partir d'émulsions huile dans eau (H/E) et à partir de doubles émulsions (E/H/E) ou encore de nanoparticules solides lipidiques (SLN). Ces différentes matrices ont servi de support pour l'immobilisation de la lipase. Ainsi, plusieurs méthodes ont été investiguées. Premièrement, la lipase a été fixée au support par physisorption en immergeant le matériau dans une solution enzymatique. Deuxièmement, la lipase a été liée de façon covalente à la matrice par des liaisons urée. Pour cela, le matériau a dû être fonctionnalisé après sa synthèse. Enfin, l'encapsulation de l'enzyme a été effectuée uniquement avec les supports préparés à partir de doubles émulsions et de SLN. L'ensemble de ces bioréacteurs a été testé en effectuant une réaction de transestérification de l'huile de colza en présence de méthanol. Les conditions de cette méthanolyse ont été optimisées à l'aide d'un plan d'expériences.

Mots clés : biodiesel, matériaux mésoporeux, matériaux méso-macroporeux, lipase, immobilisation, plan d'expériences, catalyse

Abstract :

This work was to prepare catalysts by immobilizing *Mucor miehei* lipase into silicate porous materials for the biodiesel production from vegetable oils. To develop this study, several systems based on surfactants were used to synthesize silicate materials with controlled porosity by taking protocols described in the literature or developed in the laboratory. The common point of these materials, whether mesoporous or meso-macroporous, is a hexagonal organization of their mesopores. Meso-macroporous materials were prepared from oil-in-water emulsions (O/W) and from double emulsions (W/O/W) or from solid lipid nanoparticles (SLN). These different materials served as a matrix for immobilization of the lipase. Several methods of immobilization were investigated. Firstly, the lipase was fixed into support by physisorption by immersing material in an enzymatic solution. Secondly, the lipase was linked covalently to matrix with urea bonds. In our case, the material had to be functionalized after this synthesis. Finally, the encapsulation method of the enzyme was carried out only with materials prepared from double emulsions and SLN. All bioreactors were tested by performing a transesterification reaction with methanol. The conditions of this methanolysis were optimized with an experimental design.

Keywords: biodiesel, mesoporous materials, meso-macroporous materials, lipase, immobilization, experimental design, catalysis