



Rana Mustafa

Synthèse enzymatique de colorants phénoliques «naturels»

Biotransformation de phénols en biopolymères
colorées: étude de la structure et des
mécanismes réactionnels impliqués



BL566

062295

③



Rana Mustafa

Synthèse enzymatique de colorants phénoliques «naturels»

Biotransformation de phénols en biopolymères
colorées: étude de la structure et des mécanismes
réactionnels impliqués

Presses Académiques Francophones

Table des matières

Remerciements	ii
Résumé	xvi
Abstract	xviii
Liste des figures	xx
Liste des tableaux	xxxii
Liste des publications et communications	xxxvi
Liste des abréviations	xxxvii
Introduction	2
I- Présentation générale des colorants	7
I-1 Historique et réglementation de l'utilisation des colorants en alimentation	7
I-2 Généralités sur la couleur	10
I-3 Lien entre la structure moléculaire et la couleur	11
I-4 Nature des colorants	12
I-5 Pourquoi utilise-t-on des colorants ?	13
I-6 Importance du marché des colorants	15
II- Processus du brunissement enzymatique	16
II-1 Définition	16
II-2 Différentes familles de composés phénoliques impliqués dans le brunissement enzymatique	20
II-2.1 Les acides phénoliques	20
II-2.1.1 Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés	21
II-2.1.2 Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque	22

II-2.2 Les flavonoïdes.....	22
II-2.2.1 Les flavanols.....	23
II-2.2.2 Les flavonols.....	24
II-2.2.3 Les dihydrochalcones.....	24
II-2.2.4 Les anthocyanes.....	25
II-3 Les polyphénoxydases (PPO).....	26
II-3.1 Définition.....	26
II-3.2 Nomenclature.....	27
II-3.3 Les catéchol oxydases.....	29
II-3.3.1 Distribution.....	29
II-3.3.2 Caractéristiques biologiques et rôles physiologiques.....	30
II-3.3.3 Mécanisme réactionnel.....	34
II-3.3.4 Spécificité du substrat.....	37
II-3.3.5 Inhibiteurs.....	38
II-3.4 Les laccases.....	40
II-3.4.1 Distribution.....	40
II-3.4.2 Caractéristiques biologiques et rôles physiologiques.....	43
II-3.4.3 Le site actif des laccases.....	46
II-3.4.4 Mécanisme réactionnel.....	48
II-3.4.5 Spécificité de substrat.....	50
II-3.4.6 Corrélation entre la structure des substrats et la réactivité des laccases.....	51
II-3.4.7 Inhibiteurs.....	55
II-3.5 Différences entre laccase et catéchol oxydases.....	56
II-3.6 Dosage des activités oxydasiques.....	59
II-3.6.1 Détermination de l'activité enzymatique par polarographie.....	59

II-3.6.2 Détermination de l'activité enzymatique par spectrophotométrie	60
II-3.6.3 Détermination de l'activité enzymatique par CLHP	61
II-4 Les quinones	61
II-4.1 Propriétés physiques	62
II-4.2 Propriétés chimiques	64
II-4.2.1 Réactions d'oxydoréduction couplées et additions nucléophiles	64
II-4.2.2 Dismutation et dismutation inverse	73
II-4.2.3 Additions radicalaires	74
II-5 Influence des conditions expérimentales sur les réactions d'oxydation	76
II-5.1 Nature du solvant de la réaction	76
II-5.1.1 Milieu aqueux	76
II-5.1.2 Milieu organique	77
II-5.1.2.1 Avantages et inconvénients de l'utilisation de solvants organiques	77
II-5.1.2.2 Activité de l'enzyme et choix du solvant organique	79
II-5.1.2.3 Milieux hydro organiques utilisés pour la biocatalyse avec les PPO	82
II-5.2 Influence du pH	87
II-5.2.1 Effet sur l'activité enzymatique	87
II-5.2.2 Effet sur les produits d'oxydation	91
II-5.3 Influence de la température	94
II-5.4 Influence de l'oxygène	97
III- Applications des PPO	99
III-1 Synthèse de colorants	100

III-2 Gélification des polysaccharides	103
III-3 Clarification, élaboration et stabilisation des boissons	106
III-4 Synthèse de biopolymères et de molécules bioactives	107
III-5 Traitement des bouchons de liège	108
III-6 Traitement des eaux usées	109
III-7 Applications diverses	112
Objectifs du travail	115
Plan de l'étude	117
Matériels et méthodes	119
I- Matériels	119
I-1 Biocatalyseurs	119
I-1.1 Laccase- L603P de <i>Trametes</i> sp. (E.C.1.10.3.2).....	119
I-1.2 Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	119
I-1.3 Laccase de <i>Rhus vernicifera</i>	121
I-1.4 Tyrosinase (E.C.1.14.18.1).....	121
I-1.5 Peroxydase (E.C.1.11.1.7)	121
I-2 Produits chimiques	122
II- Purification partielle des laccases	126
II-1 Purification partielle de la laccase de <i>Trametes</i> sp.....	126
II-1.1 Décoloration et élimination des phénols	126
II-1.2 Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium	127
II-1.2.1 Principe	127
II-1.2.2 Mode opératoire.....	128

II-1.3 Fractionnement des protéines par chromatographie d'échange d'ions	128
II-1.3.1 Principe	128
II-1.3.2 Appareillage	129
II-1.3.3 Remplissage de la colonne	131
II-1.3.4 Mode opératoire	132
II-2 Purification partielle de la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	133
II-2.1 Précipitation à l'acétone	133
II-2.2 Fractionnement des protéines par chromatographie d'échange d'ions	134
III- Conduite des transformations enzymatiques	136
III-1 Transformations dans un microréacteur de 15 ml : choix des conditions opératoires	136
III-1.1 Substrats phénoliques	136
III-1.2 Quantité de biocatalyseur mise en jeu	136
III-1.3 Milieux réactionnels	137
III-1.4 Suivi des réactions enzymatiques	138
III-1.5 Mesure de la vitesse initiale de la réaction enzymatique	139
III-2 Transformation enzymatique en réacteur de 1 litre	139
IV- Méthodes analytiques	141
IV-1 Mesure des activités enzymatiques par spectrophotométrie	141
IV-1.1 Activité laccasique	141
IV-1.1.1 Principe	141
IV-1.1.2 Mode opératoire	142
IV-1.1.3 Calcul de l'activité enzymatique	143
II-1.2 Activité tyrosinasiq	143

IV-2 Dosage des protéines	145
IV-2.1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford	145
IV-2.1.1 Principe	145
IV-2.1.2 Mode opératoire	146
IV-2.2 Dosage des protéines par l'acide bicinchoninique	147
IV-2.2.1 Principe	147
IV-2.2.2 Mode opératoire	148
IV-3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	150
IV-3.1 Principe	150
IV-3.2 Composition des réactifs	151
IV-3.3 Mode opératoire	153
IV-4 Analyse des milieux réactionnels par CLHP	156
IV-4.1 Principe	156
IV-4.2 Matériels	157
IV-4.3 Mode opératoire	158
IV-4.4 Traitement des chromatogrammes	160
IV-5 Mesure de la solubilité des substrats phénoliques	164
IV-6 Suivi de la synthèse des colorants par une méthode colorimétrique	165
IV-6.1 Principe	165
IV-6.2 Mode opératoire	169
IV-7 Purification des produits d'oxydation de l'acide férulique et de l'acide sinapique	169
IV-7.1 Récupération des colorants	169
IV-7.2 Protocole de purification des produits d'oxydation par chromatographie à l'échelle semi préparative et préparative	170

IV-7.2.1 Produits d'oxydation de l'acide férulique	171
IV-7.2.2 Produits d'oxydation de l'acide sinapique	173
IV-7.3 Analyse des fractions collectées par chromatographie liquide haute performance	174
IV-8 Caractérisation des produits d'oxydation par spectrométrie de masse (SM)	175
IV-8.1 Principe	175
IV-8.2 Appareillage	177
IV-8.3 Conditions d'analyse en CLHP couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM)	178
IV-8.4 Les paramètres ESI et SM	179
IV-8.5 Analyse structurales en SMn	179
IV-9 Caractérisation des produits d'oxydation en RMN	180
Résultats et discussion	181
I- Oxydation des substrats phénoliques par les polyphénols oxydases en milieu hydro organique : étude de faisabilité	182
I-1 Choix des enzymes	182
I-2 Purification des laccases	187
I-2.1 Introduction	187
I-2.2 Purification de la laccase de <i>Trametes</i> sp.	190
I-2.2.1 Décoloration de l'extrait enzymatique	191
I-2.2.2 Précipitation au sulfate d'ammonium	194
I-2.2.3 Chromatographie d'échange d'ions sur colonne UNOsphère	195
I-2.3 Purification de la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	199

I-2.4 Analyse électrophorétique des laccases purifiées	203
I-3 Choix du milieu réactionnel	208
I-4 Choix de la laccase	213
I-4.1 Réactivité de la laccase de <i>Trametes</i> sp. vis-à-vis de différents composés phénoliques	214
I-4.2 Réactivité de la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i> vis-à- vis de l'acide férulique et de l'acide gallique	219
I-5 Conclusion	223
II- Etude par CLHP de l'oxydation de divers substrats phénoliques par la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i> en milieu hydro organique biphasique	226
II-1 Oxydation de la catéchine	226
II-2 Oxydation de l'acide gallique	234
II-3 Oxydation de l'acide syringique	244
II-4 Oxydation de l'acide caféique	249
II-5 Oxydation de l'acide sinapique	258
II-5.1 Suivi de la réaction par colorimétrie	259
II-5.2 Analyse du milieu réactionnel par CLHP	264
II-5.3 Etude cinétique en CLHP	274
II-5.4 Etude de la stabilité de la couleur de la phase organique du milieu hydro organique biphasique par suivi colorimétrique	276
II-6 Oxydation de l'acide férulique	278
II-7 Conclusion	283
III- Etude de l'influence des conditions opératoires sur l'oxydation de l'acide férulique par les laccases de <i>Trametes</i> sp. et de <i>Myceliophthora thermophila</i>	292
III-1 Influence du milieu	293

III-1.1 Suivi CLHP de l'oxydation de l'acide férulique par les laccases T et M en milieu aqueux et hydro organique biphasique à pH 5,5.....	293
III-1.2 Influence du milieu sur les cinétiques de la réaction d'oxydation par la laccase T et la laccase M à pH 5,5	301
III-1.3 Etude de la stabilité des produits d'oxydation dans la phase acétate d'éthyle.....	304
III-1.4 Conclusion	308
III-2 Influence du pH de la phase aqueuse sur l'oxydation de l'acide férulique par les laccases T et M.....	310
III-2.1 Influence du pH sur la vitesse initiale de la réaction	310
III-2.2 Influence du pH sur les produits d'oxydation	314
III-2.2.1 Influence du pH sur les produits d'oxydation en milieu aqueux	314
III-2.2.2 Influence du pH sur les produits d'oxydation en milieu hydro organique biphasique.....	318
III-2.3 Conclusion	325
III-3 Effet de la concentration en enzyme sur l'oxydation en milieu hydro organique biphasique	326
III-4 Effet de la température sur l'oxydation de l'acide férulique en milieu hydro organique biphasique	329
IV- Purification et caractérisation de quelques-uns des produits provenant de l'oxydation des acides férulique et sinapique en milieu hydro organique par la laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i> ...	332
IV-1 Oxydation des acides férulique et sinapique en réacteur d'un litre.....	336
IV-2 Produits d'oxydation de l'acide férulique	337

IV-2.1 Caractérisation du produit P3	337
IV-2.2 Caractérisations des produits P5 et P10	345
IV-2.2.1 Purification du produit P5	346
IV-2.2.2 Purification du produit P10	350
IV-3 Produits d'oxydation de l'acide sinapique	358
Conclusion- perspectives	366
Références bibliographiques	377
Annexe	426

Synthèse enzymatique de colorants phénoliques «naturels»

Les colorants sont largement utilisés comme additifs dans les produits alimentaires. Pourtant certains de ces colorants sont controversés, notamment les colorants diazoïques qui sont suspectés d'être néfastes pour la santé. Il y a donc une demande croissante pour des colorants d'origine naturelle ayant fait preuve de leur innocuité. Cet ouvrage présente les résultats des études menées par l'auteur dans sa thèse de doctorat en 2005. L'objectif général de cette étude était l'exploitation d'une bioconversion enzymatique "le brunissement enzymatique" pour la synthèse de colorants stables ayant le label "naturel" qui pourraient être utilisés comme additifs de produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques. Cette biotransformation se traduit par la conversion de certains substrats phénoliques en polymères colorés sous l'action des enzymes. Les résultats montrent qu'une oxydase comme la laccase de *Myceliophthora thermophila* pouvait oxyder, en milieu hydro-organique, certains acides cinnamiques (acide férulique) en dimère coloré en jaune orangé. Ces colorants liposolubles, sont dotés de propriétés antioxydantes et antiradicalaires.



Rana Mustafa

Ingénieur en Génie alimentaire et titulaire d'un Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine (Nancy-France) sur les procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Depuis 2005, enseignante-chercheuse au Département de Génie Alimentaire à la Faculté de Génie Chimique et Pétrolier de l'Université Al-Baath (Homs-Syrie).



978-3-8381-7545-4