HAL
open science

Synthèse enzymatique d'esters de fructose et d'acide gras : cinétique, purification et caractérisation des propriétés tensioactives

Samia Soultani

To cite this version:

Samia Soultani. Synthèse enzymatique d'esters de fructose et d'acide gras : cinétique, purification et caractérisation des propriétés tensioactives. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2001. Français. NNT : 2001INPL592N . tel-01749881

HAL Id: tel-01749881

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749881v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

136027 6429

01 INPL 592 N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire Bioprocédés AgroAlimentaires

THÈSE [M] 2001 SOULTANI, S.

Présentée à l'INPL par

Samia SOULTANI

Ingénieur en Industries Agro-Alimentaires

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Synthèse enzymatique d'esters de fructose et d'acide gras :

Cinétique, purification et caractérisation des propriétés tensioactives

---

Soutenue publiquement le 30 novembre 2001 devant la commission d'examen

Présidente	Mme D. Barth	Professeur à l'ENSIC, Nancy
Rapporteurs	Mr D. Combes	Professeur à l'INSA de Toulouse
	Mr J.-M. Laval	Professeur à l'U.T.C de Compiègne
Examinateurs	Mr C. Selve	Professeur à l'U.H.P., Nancy
	Mr J.-M. Engasser	Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy
	Mr M. Ghoul	Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy

La valse de la vie

Elles dansent, les saisons
Elles dansent leur valse sans fin
Et chaque jour nous écrivons
Ce que sera notre destin

Les sourires d'aujourd'hui
Seront les fleurs de demain
Nos trahisons à la vie
Seront notre poids quotidien

Nous bâtissons nous mêmes
L'enfer que l'on craint
Nous forgeons nos chaînes
A coups de haines, à coups de poings

Si l'on doit se battre
Que se soit pour la vie
Pour cette terre et pour les autres
Avec la sagesse de l'esprit

La valse des saisons m'invite
Sur le chemin de mon histoire
Sa fin n'est pas écrite
Il me reste tant à voir

à tous ceux que j'aime…

Les recherches concernant le présent travail ont été menées au Laboratoire des Bioprocédés agro-alimentaires (LABIAL) de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA) de Nancy.

Je remercie Monsieur Pierre GERMAIN, directeur du LABIAL de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Cette thèse a été effectuée sous la direction de Monsieur Jean-Marc ENGASSER, Professeur à l'ENSAIA. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir encadré ce travail et mon admiration pour la précision et la pertinence de vos remarques.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur Mohamed Ghoul, co-directeur de la thèse et Professeur à l'ENSAIA, pour son amitié, sa patience, sa confiance et surtout sa grande passion pour la recherche.

Je remercie également Monsieur Didier COMBES, Professeur à l'INSA de Toulouse, et Monsieur Jean-Marc LAVAL, Professeur à l'U.T.C. de Compiègne, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

J'exprime également mes remerciements à Madame Danièle BARTH, Professeur à l'ENSIC, et à Monsieur Claude SELVE, Professeur à l'U.H.P. de Nancy, d'avoir accepter de participer au jury de thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont à Monsieur Michel GIRARDIN, Monsieur Bernard ROVEL et Madame Bernadette PIFFAUT pour leurs précieux conseils techniques et scientifiques et pour m'avoir adoptée et acceptée au sein de leur équipe en tant qu'ATER.

Un merci particulier va à Catherine pour m'avoir soutenue, pour son amitié et sa sympathie. Je tiens surtout à lui dire que j'espère avoir autant de conscience professionnelle et de motivation qu'elle pour mener à bien ma carrière.

Je n'oublie surtout pas de remercier toute l'équipe du LSGC.

Je remercie enfin toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ma thèse, chercheurs, thésards et personnel de laboratoire pour leur gentillesse et disponibilité.

Les personnes que je n'ai pas citées ont une place particulière dans mon cœur et les mots ne peuvent suffire pour exprimer tout l'amour que je leur porte.

SOMMAIRE GÉNÉRAL

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I: Etude bibliographique.....6

CHAPITRE II: Matériels et méthodes.....83

CHAPITRE III: Etude cinétique de la synthèse des esters de fructose et d'acide gras.....123

CHAPITRE IV: Purification des esters de fructose et d'acide gras.....187

CHAPITRE V: Propriétés des esters de fructose et d'acide gras.....222

CONCLUSION - PERSPECTIVES.....240

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....248

ANNEXES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La catalyse enzymatique en milieu organique est une méthodologie permettant de produire de nouveaux principes actifs à partir de matière première végétale de façon très spécifique et dans des conditions opératoires non dénaturantes. Elle repose sur l'utilisation d'enzymes en milieu pratiquement anhydre ou polyphasique. Dans ces conditions, ces enzymes peuvent catalyser des réactions thermodynamiquement défavorables en milieu aqueux. De plus, la grande sélectivité que présente les biocatalyseurs utilisés permet de placer, sur une position donnée de la molécule "accepteur", un ou plusieurs donneurs d'acyles dont la longueur de chaîne aura été définie en fonction de l'application et des propriétés recherchées. Ainsi, à l'aide de cette technologie, la synthèse de principes actifs "à la carte" peut être effectuée. Par ailleurs, du fait de cette grande sélectivité, le milieu réactionnel ne renferme qu'un ou deux produits, de nature et structure connues. Les procédés de purification postérieurs peuvent donc être considérablement allégés par rapport à ceux nécessaires lors des synthèses par voie chimique.

Parmi les réactions les plus étudiées ces dernières années, la synthèse des esters de monosaccharides et d'acides gras par la lipase de *Candida antarctica* en milieu organique occupe une place de choix. Ces molécules sont des agents tensioactifs non ioniques dont la structure est composée de deux groupements: le sucre, soluble dans l'eau, constitue la tête hydrophile et le donneur d'acyle (acides gras), soluble dans l'huile et les solvants, constitue la queue lipophile.

Ces molécules présentent des applications potentielles dans les secteurs agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. En effet, en variant la nature du sucre et la longueur de la chaîne grasse, il est possible d'obtenir un ensemble de molécules possédant une gamme très large de Balance Hydrophile Lipophile (BHL) et donc de propriétés fonctionnelles intéressantes (tensioactifs moussants, fluidifiants, solubilisants, émulsionnants). Elles présentent également des avantages en matière de pureté, d'activité biologique (effet bactéricide), de biocompatibilité et de biodégradabilité. Ainsi, elles complètent la gamme des tensioactifs non-ioniques actuellement disponibles et obtenus par voie chimique, c'est-à-dire

les alkylpolyglycosides (100.000 T/an) et les esters de saccharose (6000 T/an)

En dépit d'un nombre important de travaux consacrés à la réaction de synthèse enzymatique de ces sucroesters aucune production industrielle n'a encore été réalisée. Ceci est dû au fait que les réactions en milieu non conventionnel sont plus délicates à mettre en œuvre que les procédés chimiques et ne sont pas encore totalement maîtrisées à cause du manque de connaissances sur la cinétique enzymatique et les mécanismes mis en jeu dans des milieux pauvres en eau et des systèmes hétérogènes (substrats partiellement solubles, enzyme immobilisée). En effet, la plupart des travaux menés jusqu'à maintenant dans ce domaine sont focalisés sur l'étude de la faisabilité de ces réactions sans tenir compte des contraintes imposées par une éventuelle industrialisation de ces procédés. En l'occurrence, la simplicité de mise en œuvre, la compatibilité avec l'environnement et l'efficacité de récupération des molécules synthétisées avec des degrés de pureté adaptés aux applications visées.

Pour rendre ces procédés compétitifs, il est donc nécessaire de:

- développer, par l'intermédiaire d'une étude cinétique détaillée, des procédés sûrs et performants adaptés aux contraintes imposées par l'utilisation de solvants organiques;

- disposer de procédés de séparation et de purification permettant de fractionner des molécules parfois très peu solubles et ayant des polarités voisines;

- démontrer, en terme de propriétés, que les molécules obtenues par voie biotechnologique sont au moins aussi performantes que celles obtenues par voie chimique ou bien qu'elles soient complémentaires et plus adaptées à certaines niches d'applications.

L'objectif de ce travail est donc (i) d'étudier l'influence des conditions opératoires et de la nature des substrats sur la cinétique enzymatique de ces procédés de synthèse (ii) de développer un procédé de séparation des molécules obtenues afin d'évaluer leurs performances et (iii) de caractériser les propriétés tensioactives de ces molécules afin de les comparer aux esters de saccharose disponibles sur le marché.

♦ ***Etude cinétique de synthèse des esters de fructose:***

Du point de vue procédé, il est bien établi que la performance de la réaction dépend fortement de la technologie du réacteur et du mode de conduite utilisés. En effet, plusieurs configurations de réacteurs enzymatiques sont envisageables pour la synthèse enzymatique des sucroesters: cuve mélangée, réacteurs à lit fixe ou fluidisé et réacteur à membrane. Plusieurs modes de mise en œuvre doivent également être pris en compte: discontinu, semi-continu, continu. On peut aussi effectuer une récupération en continu de l'un des produits formés afin de déplacer l'équilibre de la réaction ou d'éliminer des substances inhibitrices (par exemple l'eau produite au cours de l'estérification directe ou le méthanol formé au cours de la transestérification d'esters méthyliques d'acide gras).

Pour une configuration donnée, un grand nombre de paramètres est à optimiser:

- la concentration d'enzymes;
- les concentrations initiales et au cours de la réaction des substrats;
- la température;
- l'activité de l'eau du milieu réactionnel;
- les débits d'alimentation et l'hydrodynamique du système;
- dans le cas d'une technologie à enzymes immobilisées, un autre élément de choix concerne le support à utiliser, en terme de nature chimique du matériau et de taille des particules.

Ces différents paramètres sont à étudier afin d'optimiser les deux critères suivants: l'activité du biocatalyseur (en terme de vitesse de réaction, de rendement de conversion et de concentration finale en produit) et la sélectivité de l'enzyme en fonction des conditions opératoires et de la composition du milieu.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés uniquement aux réacteurs parfaitement agités discontinu et semi-continu avec élimination partielle et élimination plus poussée de l'eau formée au cours de la réaction d'estérification. Le choix de l'enzyme (Novozym 435) et de certaines conditions opératoires (température, vitesse d'agitation) a déjà été étudié au sein de notre laboratoire (Coulon *et al.*, 1997) . Par conséquent, dans ce travail on a focalisé nos investigations sur les effets des substrats (concentrations, longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle) et du mode de conduite du réacteur. Le fructose a été retenu comme

substrat modèle pour réaliser ces investigations. A partir de l'analyse des données cinétiques obtenues, on tentera de répondre en priorité aux questions suivantes:

1. Est-ce que la lipase de *Candida antarctica* présente une spécificité vis-à-vis des donneurs d'acyle caractérisés par leurs longueurs de chaîne carbonée (C8 à C18)?
2. Quels sont les facteurs ayant une influence significative sur l'activité enzymatique de la lipase?
3. Quels sont les facteurs ayant une influence significative sur les équilibres thermodynamiques en terme de rendements de conversion des substrats et des concentrations finales en sucroesters?
4. Est-ce qu'on peut contrôler les conditions de synthèse de manière à favoriser la formation de mono- ou diesters de fructose?

♦ ***Mise au point des procédés de séparation et de purification des sucroesters:***

Le marché visé pour la production enzymatique des sucroesters en milieu non conventionnel est constitué par des niches relevant des domaines des cosmétiques, de la pharmacie et de l'alimentaire. Selon l'application envisagée, le degré de pureté souhaité est souvent variable. Il est donc impératif de développer, parallèlement aux réactions de synthèse, des procédés performants de séparation et de purification.

Compte tenu de la nature des molécules à synthétiser, de la composition des milieux (plusieurs phases totalement ou partiellement miscibles) et de l'hétérogénéité du système (solide, liquide), des études de base sur la cinétique et la sélectivité de différentes opérations unitaires de purification sont nécessaires.

Différentes techniques peuvent être envisagées: l'extraction liquide-liquide, la distillation moléculaire, la chromatographie préparative, le CO_2 supercritique et les procédés à membranes. Dans cette étude seule l'extraction liquide-liquide a fait l'objet d'investigations poussées. Au travers des résultats obtenus, on tentera de répondre aux questions suivantes :

1. Est-ce que l'extraction liquide-liquide est un procédé de séparation adapté à la purification des sucroesters?

2. Est-ce qu'il est possible de réduire les volumes des solvants d'extraction afin de limiter les risques de toxicité des molécules purifiées?

3. Est-ce qu'il est possible de purifier de manière sélective des mono- et di-esters de fructose?

♦ ***Etude des propriétés des molécules issues de la biocatalyse enzymatique***

Les sucroesters obtenus ne présentent d'intérêt que s'ils disposent de nouvelles propriétés ou des propriétés tensioactives au moins aussi performantes que celles des molécules déjà existantes. Pour cela, nous avons étudié, au même titre que la concentration ou les taux de conversion, un certain nombre de propriétés de base (tension de surface, tension interfaciale, pouvoir moussant, CMC, hydrophobicité...) et nous avons cherché à savoir:

1. Est-ce que la longueur de chaîne carbonée de la partie hydrophobe du sucroester a une influence sur les propriétés tensioactives?
2. Est-ce que les monoesters sont plus performants seuls ou en mélange avec les diesters?
3. Est-ce que les sucroesters synthétisés et purifiés sont compétitifs en terme de propriétés tensioactives comparés aux esters de saccharose commercialisés?

Dans ce manuscrit nous allons présenter, dans une première partie, une étude bibliographique détaillée sur les réactions de synthèse des sucroesters en milieu organique, dans une deuxième partie, les résultats de l'analyse cinétique, dans une troisième partie les données obtenues au cours de l'extraction liquide-liquide et dans une quatrième et dernière partie l'étude des propriétés tensioactives des sucroesters. Enfin, on terminera par une conclusion-discussion de l'ensemble de nos contributions dans ce domaine.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: Etude bibliographique 6

I. Les sucroesters agents tensioactifs **6**
1- Mécanisme d'action des tensioactifs 8
1.1. Adsorption et orientation aux interfaces 8
1.2. Formation de micelles 9
2- Les esters de sucre et d'acide gras 9
3- Applications des esters de sucre et d'acide gras 11
3.1. Applications alimentaires 11
3.2. Applications non alimentaires 13
II. Synthèse des esters de sucre et d'acide gras **14**
1- Réactions mises en jeu 14
2- Synthèse des esters de sucre et d'acide gras par voie chimique 16
2.1: Estérification directe 16
2.2. Interestérification 17
2.3: Transestérification 18
2.3.1. Transestérification à partir de triglycérides 19
2.3.2. Transestérification à partir d'esters gras 19
2.3.2.1. Réaction avec solvant 19
2.3.2.2. Réaction en micro-émulsion 20
2.3.2.3. Réaction avec des savons d'acides gras 21
2.3.2.4. Réaction en milieu fondu 23
2.3.2.5. Réaction à partir des sucroesters 23
2.4: Conclusion 24
3- Synthèse des esters de sucres et d'acide gras par voie enzymatique 25
3.1: Les enzymes en milieu organique 26
3.1.1. Historique 26
3.1.2. Propriétés des lipases 27
3.1.3. Structure et mécanisme d'action 28
3.1.4. Spécificité des lipases 33
3.1.5. Cas particulier de la lipase de Candida antarctica B 33
3.2: Réaction de synthèse des sucroesters par les lipases 35

3.2.1. Influence des paramètres de la réaction 35
3.2.1.1. Nature et origine de l'enzyme 35
3.2.1.2. Nature des substrats et leurs concentrations 39
- Nature du sucre 39
- Nature du donneur d'acyle 40
- Influence de la concentration des substrats 44

3.2.1.3. Teneur et activité de l'eau 46
3.2.1.4. Solvant de synthèse 50
3.2.1.5. Nature de la réaction 52
3.2.1.6. Influence des conditions opératoires 53
- Influence de la température 53
- Influence de la pression 55

4- Conclusion 57
III. Purification des esters de sucre et d'acide gras 58
1- Elimination de l'enzyme et du solvant de réaction 59
2- Elimination du sucre 59
2.1. Extraction par précipitation 59
2.2. Extraction liquide-liquide 61
2.3. Extraction par osmose inverse 62
2.4. Conclusion et discussion des techniques d'élimination du sucre 63
3- Elimination du donneur d'acyle 64
3.1. Extraction par précipitation - cristallisation 65
3.2. Extraction par dialyse 66
3.3. Extraction par distillation moléculaire 67
3.4. Extraction - purification par chromatographie liquide sur colonne 68
3.5. Extraction au CO_2 supercritique 69
3.6. Extraction liquide-liquide 71
5- Conclusion 75
IV. Propriétés des esters de sucre et d'acide gras 75
1- Balance hydrophile-lipophile: BHL 75
2- Propriétés tensioactives 77
2.1. Pouvoir moussant 787
2.2. Pouvoir émulsifiant 78
2.3. Pouvoir solubilisant et dispersant 79

2.4. Pouvoir antimicrobien 80
2.5. Impact sur l'environnement: toxicité, biodégradabilité et bioaccumulation..... 81

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ FIGURES ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Figure I-1: Représentation d'un tensioactif anionique 6
Figure I-2: Représentation d'un tensioactif cationique 7
Figure I-3: Représentation d'un tensioactif amphotère 7
Figure I-4: Représentation d'un tensioactif non ionique 8
Figure I-5: Orientation des molécules tensioactives aux interfaces 8
Figure I-6: Organisation des tensioactifs dans une émulsion 9
Figure I-7: Structure générale des esters de saccharose 10
Figure I-8: Représentation des réactions mises en jeu lors de la synthèse des sucroesters 15
Figure I-9: Mécanisme d'hydrolyse d'un ester carboxylique par la triade catalytique d'une enzyme à serine 30
Figure I-10: Représentation schématique du volet amphiphile et du phénomène d'activation interfaciale en milieu organique 31
Figure I-11: Structure de la lipase pancréatique humaine et les changements de conformation ouverte (E*S) et fermée (E) induits par l'adsorption à une interface lipide-eau 32
Figure I-12: Activation interfaciale de la lipase de *Rhizomucor miehei* et représentation de la région du site catalytique de la lipase 32
Figure I-13: Représentation de la structure du site actif et de la spécificité de six lipases vis-à-vis des donneurs d'acyle 38
Figure I-14: Effet de l'a_w du catalyseur sur la réaction d'estérification d'acide gras et de glycérophosphatidylcholine 47
Figure I-15: Effet de l'a_w sur l'activité de la lipase de *Candida rugosa*, le rendement de conversion en DHA et le rapport molaire des produits au bout de 72 h de réaction d'estérification du DHA (0.4 mmol) avec de l'acide laurique (2 mmol) dans 4 ml de MTBE à 40 °C 48
Figure I-16: Représentation schématique de la manière dont l'a_w permet d'établir un équilibre de l'eau entre les divers états et phases 50
Figure I-17: Vitesses initiales des lipases lors de la réaction de transestérification entre la tributyrine et l'heptanol dans des solvants organiques de différentes valeurs de log *P* 51
Figure I-18: Effet de la pression sur l'estérification catalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei* du 12-hydroxy stéarate avec l'octanol 56

Figure I-19: Protocole de séparation du sucre résiduel par précipitation 60
Figure I-20: Protocole de séparation du sucre résiduel par extraction liquide-liquide 61
Figure I-21: Protocole de séparation du sucre résiduel par osmose inverse 62
Figure I-22: Protocole de séparation du donneur d'acyle par précipitation 65
Figure I-23: Protocole de séparation du donneur d'acyle par dialyse 66
Figure I-24: Protocole de séparation du donneur d'acyle par distillation moléculaire 68
Figure I-25: Protocole de séparation du donneur d'acyle au CO_2 supercritique 70
Figure I-26: Valeurs de BHL des émulsifiants à base d'esters 76
Figure I-27: Représentation de l'adsorption des sucroesters à la surface de particules de $CaCO_3$.. 79

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ TABLEAUX ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Tableau I-1: Fonctions et applications alimentaires des esters de sucre et d'acide gras 13
Tableau I-2: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters : Estérification directe 17
Tableau I-3: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters : Interestérification 18
Tableau I-4: Résumé des travaux de Galleymore *et al.* portant sur la synthèse par voie chimique des sucroesters : Transestérification à partir de triglycérides 19
Tableau I-5: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters : Transestérification à partir d'esters méthyliques en présence de solvants 20
Tableau I-6: Résumé des travaux de Osipow et Rosenblat sur la synthèse par voie chimique des sucroesters : Transestérification à partir d'esters méthyliques en micro-émulsion 21
Tableau I-7: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters : Transestérification avec des savons d'acides gras 22
Tableau I-8: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters : Transestérification en milieu fondu 23
Tableau I-9: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters : Transestérification avec des sucroesters 24
Tableau I-10: Résumé de quelques travaux sur la synthèse des sucroesters utilisant des lipases ... 36
Tableau I-11: Effet de la nature et des concentrations des substrats sur les rendements de conversion du donneur d'acyle et la distribution des monoesters 39
Tableau I-12: Résumé des principaux sucres et polyols acylés par synthèse enzymatique 41

Tableau I-13: Vitesses initiales de la réaction d'estérification du glucose avec des donneurs d'acyle de différentes longueurs de chaîne carbonée 43
Tableau I-14: Comparaison entre les vitesses initiales et les rendements de conversion obtenus dans les mêmes conditions avec et sans tamis moléculaire 49
Tableau I-15: Résumé des principales techniques d'élimination du sucre résiduel citées dans la littérature 64
Tableau I-16: Résumé des principaux résultats et techniques de séparation cités dans la littérature 73
Tableau I-17: Activité antimicrobienne des palmitates de saccharose (P1570) seuls et en combinaison avec la nisine 81

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les sucroesters agents tensioactifs

Les tensioactifs se distinguent par leur caractère amphiphile, c'est-à-dire qu'ils sont constitués d'une partie polaire (cationique, anionique, amphotère) et d'une autre partie apolaire (chaîne aliphatique ou aromatique). Ce caractère leur permet de se placer à l'interface entre deux phases, de diminuer la tension interfaciale et de rendre les différentes phases plus compatibles.

On distingue quatre classes de tensioactifs selon le caractère ionique de leur groupement hydrophile (Hauthal, 1992):

Les tensioactifs anioniques: les groupements hydrophiles sont chargés négativement. C'est la classe la plus utilisée industriellement et la plus connue du fait de leur faible coût. En effet, 70 % de la consommation des agents de surface correspondent à cette classe de tensioactifs (Karleskind, 1992). Dans ce groupe de tensioactifs, on trouve les savons, les composés sulfatés et les composés sulfonés tels que les alkylbenzène sulfonates (**Figure I-1**).

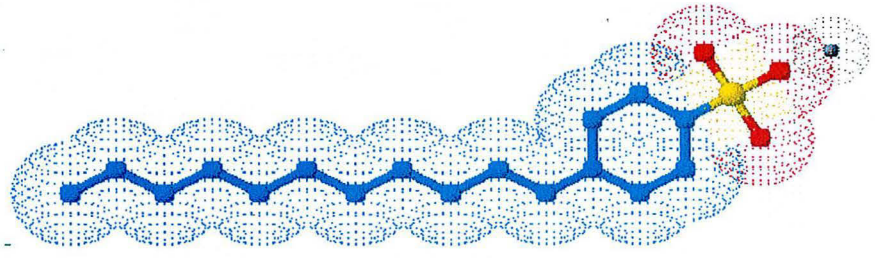


Figure I-1: Représentation d'un tensioactif anionique: le dodécylsulfonate de sodium ($C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3^-$ Na^+).

Les tensioactifs cationiques: qui se dissocient en solution aqueuse pour donner des ions chargés positivement (**Figure I-2**). La plupart des tensioactifs cationiques contiennent un groupement ammonium pouvant être attaché à une ou deux chaînes carbonées hydrophobes.

Ces tensioactifs présentent un intérêt grandissant à cause de leurs biodégradabilité et grande efficacité.

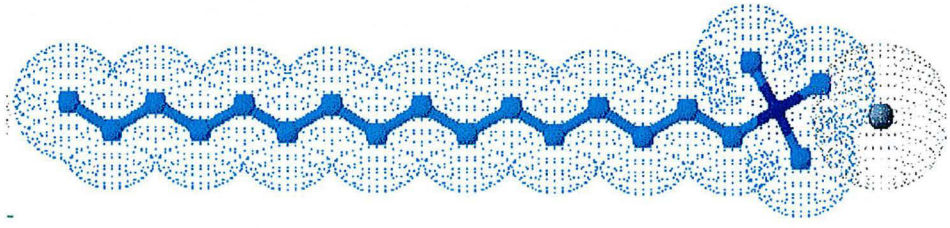


Figure I-2: Représentation d'un tensioactif cationique: sel d'amine grasse à 16 atomes de carbone ($C_{16}H_{33}NH_3^+ Cl^-$).

Les tensioactifs amphotères: contiennent à la fois un groupement anionique et un groupement cationique (**Figure I-3**). Suivant le pH du milieu, ils donnent des tensioactifs anioniques, cationiques ou neutres. Ce groupe est constitué, en particulier, des bétaïnes et des phospholipides.

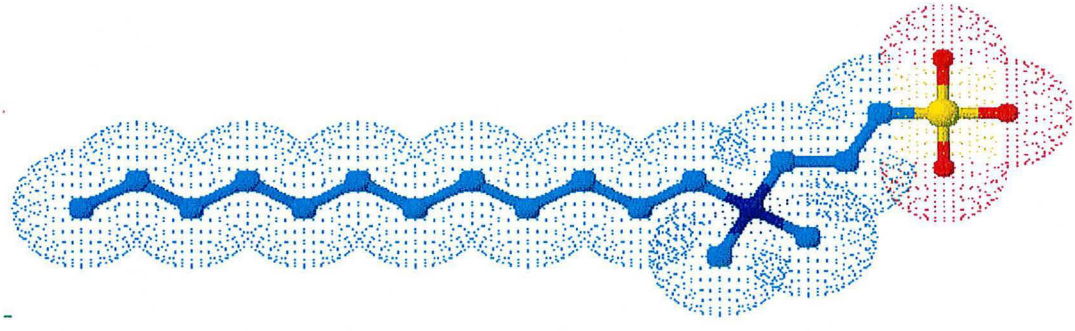


Figure I-3: Représentation d'un tensioactif amphotère: N-dodécyl N,N-diméthyl ammoniopropane sulfonate.

Les tensioactifs non ioniques: ils sont totalement ou partiellement solubles dans l'eau grâce à la présence de groupements fonctionnels ayant une forte affinité pour l'eau. Ils sont classés suivant la nature de la liaison entre les parties hydrophile et lipophile (liaison ester, éther, amine ou amide). Parmi ces tensioactifs, les alkylpolyglycosides (APG) à base de produits naturels et les alcools éthoxylés prennent une part croissante du marché du fait de leur efficacité même aux basses températures. Parmi les tensioactifs les plus importants de cette classe, on distingue les alkylpolyéthylènes polyglycoéthers (éthoxylates) (**Figure I-4**) suivis des alkylphénols éthoxylates.

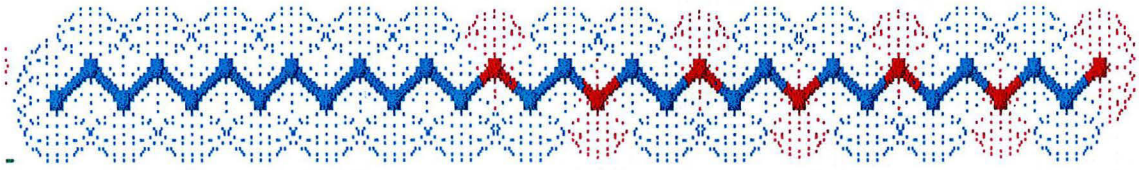


Figure I-4: Représentation d'un tensioactif non ionique le dodécanol hexaéthoxylé: n-$C_{12}H_{25}O(CH_2CH_2O)_6H$.

1- Mécanisme d'action des tensioactifs

1.1. Adsorption et orientation aux interfaces

Le phénomène d'adsorption a lieu au niveau des interfaces liquide-liquide et liquide-gaz. Il provoque une diminution de la tension interfaciale entre les deux phases (Rosen, 1972). La valeur minimale de la tension interfaciale atteinte constitue une caractéristique importante d'un agent tensioactif.

A la surface d'un liquide polaire comme l'eau, ces molécules s'orientent perpendiculairement à la surface si le groupement ionique hydrophile est situé en bout de chaîne. Ce dernier plonge au sein du liquide et oriente la partie hydrophobe à la surface hors du liquide en formant un film monomoléculaire continu comme le montre la **Figure I-5**.

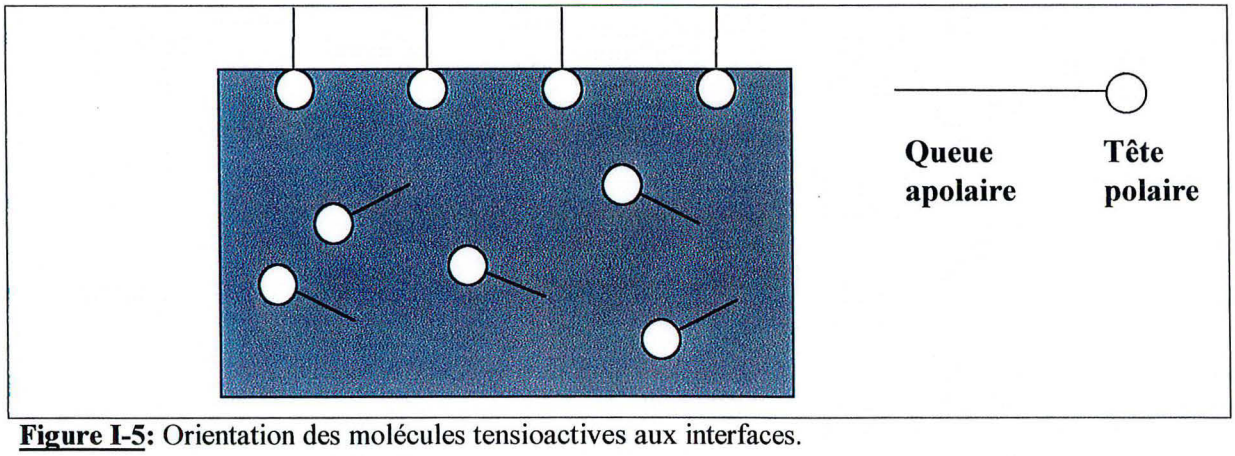


Figure I-5: Orientation des molécules tensioactives aux interfaces.

Cette orientation est un facteur important dans la détermination des changements des propriétés tensioactives (Poré, 1992):

- ***Interface liquide-solide:*** formation de suspensions et utilisation en tant qu'agents mouillants et détergents.

- ***Interface liquide-liquide:*** stabilisation des émulsions et des micro-émulsions.
- ***Interface liquide-gaz:*** formation de bulles et de mousses.

1.2. Formation de micelles

Mises en solution et à faible concentration, les molécules tensioactives se présentent comme des monomères. Cependant, lorsque la quantité de tensioactif en solution augmente, on atteint une concentration critique qui entraîne la formation d'une forme polymérique; il s'agit des micelles (Rosen, 1972). Cette agrégation ou micellisation est responsable de la solubilisation des composés hydrophobes dans un milieu hydrophile.

En milieu organique peu polaire ou apolaire, les tensioactifs forment des agrégats dont le cœur est constitué par les têtes polaires tandis que les chaînes hydrophobes sont en contact avec le solvant: on parlera de micelles inverses (**Figure I-6 a**). Par contre en milieu aqueux, le cœur des agrégats est constitué par la queue apolaire tandis que la tête polaire est en contact avec la phase aqueuse: il s'agit de micelles directes (**Figure I-6 b**).

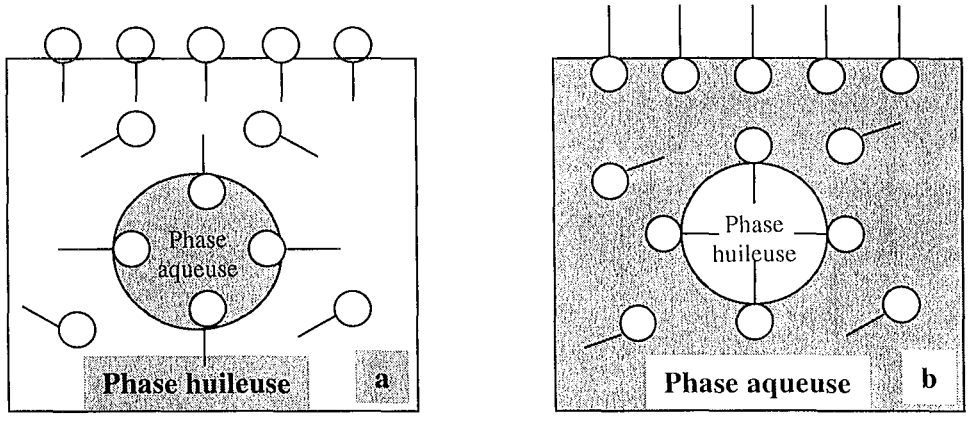


Figure I-6: Organisation des tensioactifs dans une émulsion. Micelle inverse en phase peu polaire ou apolaire (a) et micelle directe en milieu aqueux (b)

2- Les esters de sucre et d'acide gras

Les esters de sucre et d'acide gras présentent un grand intérêt en raison de leurs propriétés physico-chimiques, tensioactives et organoleptiques. Il s'agit de tensioactifs non ioniques issus de sources d'origine naturelle végétale ou animale (Megahed, 2000), donc renouvelables

et respectueux de l'environnement. En effet, ils présentent la meilleure biodégradabilité et le niveau de toxicité le plus faible comparés aux composés sulfatés ou sulfonés et les molécules éthoxylées par exemple (Matsumura *et al.*, 1993; Madsen *et al.*, 1996).

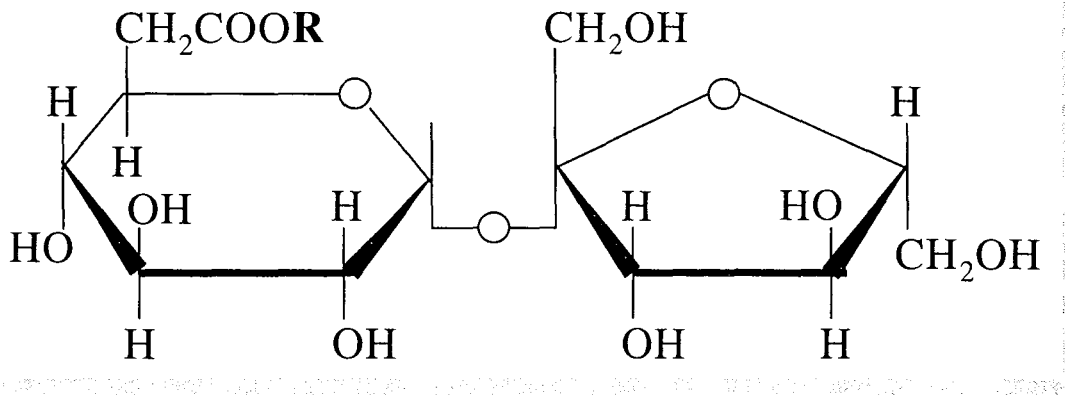
La production mondiale des sucroesters, représentés essentiellement par les esters de saccharose, est évaluée à 6 000 t/an avec une production européenne présentant environ 5 % des besoins mondiaux, le Japon étant leader du domaine (Anonyme, 1998).

Ces tensioactifs, à base de matières premières naturelles, sont très demandés dans divers domaines notamment en industries pharmaceutique et cosmétique. En effet, ces molécules répondent à trois principaux critères: douceur et compatibilité dermique et respect de l'environnement (biodégradable et non toxique).

Les tensioactifs dérivés de sucre sont basés sur deux principaux types de matières premières 100 % végétales:

- Des hydrates de carbone (glucose, saccharose, dextrose...)
- Des alcools gras dérivés d'huiles végétales.

Les sucroesters du commerce sont principalement des esters de saccharose et sont synthétisés par voie chimique. Ils sont obtenus par transestérification d'esters d'acides gras et de saccharose (**Figure I-7**).



R: Groupe alkyl provenant de l'acide gras

Figure I-7: Structure générale des esters de saccharose

Ils sont stables en solution aqueuse à des pH compris entre 7 et 12, biodégradables et peuvent être associés avec d'autres tensioactifs de type anioniques, non ioniques et quaternaires dans diverses formulations.

3- Applications des esters de sucre et d'acide gras

Les sucroesters sont utilisés dans de nombreuses applications aussi bien alimentaires que non alimentaires.

3.1. Applications alimentaires

Les esters de saccharose et d'acide gras sont utilisés comme émulsifiants en industrie alimentaire. Leur utilisation comme additifs alimentaires est autorisée dans de nombreux pays dont les Etats-Unis, certains pays de l'union européenne et le Japon. Les sucroesters commercialisés en tant qu'émulsifiants étant le plus souvent des esters de saccharose à longue chaîne carbonée, comme le palmitate ou le stéarate de saccharose qui sont sans goût ni odeur (Uematsu *et al.*, 2001).

L'union européenne a réévalué l'utilisation des sucroesters dans les produits alimentaires et a récemment autorisé leur consommation avec une DJA (Dose Journalière Admissible) pouvant aller jusqu'à 25 mg/kg de poids corporel (Langley-Danysz, 2000) au lieu d'une DJA de 2.5 mg/kg de poids corporel dans les années 80 (Entressangles, 1987).

Ces tensioactifs présentent une bonne digestibilité, en particulier les monoesters qui sont hydrolysés par le suc pancréatique plus facilement que les esters supérieurs (Nakamura, 1997; Allen et Tao, 1999).

Les sucroesters commercialisés sont disponibles avec une large gamme de valeurs de Balance Hydrophile Lipophile (BHL), qui dépendent du degré d'estérification et de la nature de l'acide gras. Ainsi, les émulsifiants couramment utilisés sont constitués d'un mélange complexe de mono-, di-, et polyesters avec divers types d'acides gras (Sarney *et al.*, 1994).

Deux applications potentielles sont connues dans ce secteur. L'une concerne les sucroesters dont le sucre présente un degré de substitution D.S. ≥ 6. Ces composés sont considérés comme des substituts de matière grasse, ils sont non métabolisables et ont été proposés comme shortening dans les régimes alimentaires basse calorie et les produits allégés (Walker, 1984) et comme agents aptes à réduire le niveau plasmatique du cholestérol (Entressangles, 1987; Jandacek *et al.*, 1990). La deuxième application concerne les produits avec un D.S. ≤ 3. Ces composés peuvent être utilisés comme additifs alimentaires en tant qu'émulsifiants et stabilisants (Walker, 1984).

Sachant que le saccharose lui-même stabilise la conformation de diverses protéines dans les solutions aqueuses, on a porté un intérêt particulier pour les interactions des esters de saccharose avec ce type de molécules (Herrington *et al.*, 1991). Dans le cas des produits alimentaires contenant du gluten, l'association des sucroesters avec les protéines conduit à un réseau gluten plus flexible et ainsi à une meilleure capacité de rétention de gaz. Cette propriété a été exploitée dans la panification et plus particulièrement dans le cas des blés à faible teneur en gluten (Sisterna B.V., 1994).

De même, les sucroesters forment un complexe avec l'amylose retardant ainsi les phénomènes de cristallisation et de rétrogradation de l'amidon et conduisant à une durée de conservation plus longue et une texture plus tendre du pain (Addo *et al.*, 1995). Cette propriété a également été mise à profit dans la fabrication de gels colloïdaux à base de légumineuses. En effet, l'addition de sucroesters avec des valeurs de BHL variant entre 1 et 11 permet d'obtenir des gels moins collants et présentant une meilleure texture (Mwasaru et Muhammad, 2001).

Le **Tableau I-1** résume les principales applications des sucroesters du commerce dans le domaine de l'agro-alimentaire (Nakamura, 1997; Langley-Danysz, 2000).

Tableau I-1: Fonctions et applications alimentaires des esters de sucre et d'acide gras.

Fonction	Application
Emulsification huile/eau	Blanchisseurs pour café, mixes pour crèmes glacées, boissons à base de lait, bonbons
Emulsification eau/huile	Margarines, pâte à étaler à base de matière grasse
Foisonnement	Crème fouettée
Solubilisation	Boissons
Stabilisation des systèmes aérés	Gâteaux, pâté de poisson
Modifications cristallines	Margarines, pâtes à tartiner
Inhibition de rétrogradation de l'amidon	Aliment cuit au four, pâté de poisson
Lubrification	Bonbons, chewing-gum, biscuits
Activité antimicrobienne	Produit conserve: boissons à base de café et de thé

3.2. Applications non alimentaires

Etant non allergènes et en raison de leur compatibilité avec la peau, les sucroesters ont été utilisés dans des applications cosmétiques en tant qu'émulsifiants de crèmes et lotions de type huile/eau ou eau/huile (Nakamura, 1997). En effet, ces molécules sont aisément absorbées par la peau (Colson, 1961), non toxiques (Brooks, 1980) et possèdent des propriétés hydratantes qui ont permis leur utilisation dans des formulations de shampooings, de dentifrices, de lait démaquillants et de mousses à raser (Nobile *et al.*, 1964).

Les sucroesters ont également été utilisés en parfumerie pour hydrosolubiliser des huiles essentielles et arômes synthétiques (Colson, 1961). Cet auteur a montré que le pouvoir solubilisant le plus élevé est obtenu avec le monolaurate de saccharose suivi par ordre décroissant du monomyristate, monooléate, monopalmitate et monostéarate.

L'intérêt d'administrer des esters d'acide gras et de mono- et disaccharides a été démontré dans le traitement des cellules tumorales se traduisant par une augmentation de la capacité de l'hôte à rejeter un grand nombre de cellules tumorales, par un retardement de la croissance de la taille de la tumeur et par l'induction de nécrose tumorale hémorragique. Les sucroesters les plus efficaces étant les esters d'acide gras de maltose, galactose, glucose, mannose, arabinose,

cellobiose et lactose avec des longueurs de chaîne carbonée de l'acide gras comprises entre 12 et 18 atomes de carbone (Nigam et Brailovsky, 1997). Ces mêmes auteurs ont montré qu'un mélange de di- tri- et tétrapalmitates de maltose présentent les meilleurs activités anticarcinogènes ainsi que des effets immunostimulants et antiangiogènes.

Les sucroesters peuvent aussi être introduits dans des préparations pharmaceutiques en tant que vecteurs de transport de principes actifs, de vitamines (Duell *et al.*, 1964) et d'antibiotiques (Handa et Nakamura, 1989).

Les sucroesters possèdent un pouvoir lubrifiant permettant leur utilisation dans des huiles minérales lubrifiantes dont la viscosité peut être contrôlée en jouant sur la nature et la longueur de la chaîne grasse des sucroesters utilisés (Morway et Walter, 1960).

De plus, grâce à leur capacité à réduire la tension de surface des solutions aqueuses et leur pouvoir lavant, les monoesters de saccharose ont été employés dans les produits ménagers pour remplacer les alkylbenzène sulfonates (tensioactifs anioniques couramment utilisés). Néanmoins, leurs faibles pouvoirs moussant et mouillant comparés aux alkylbenzène sulfonates en freine le développement dans ce secteur (Maag, 1984).

II. Synthèse des esters de sucre et d'acide gras

Les esters de sucre et d'acide gras peuvent être synthétisés suivant deux voies : chimique et enzymatique. La voie chimique, tout en permettant d'atteindre des rendements de conversion élevés des substrats, présente plusieurs inconvénients notamment une faible sélectivité de synthèse. Par conséquent, la voie enzymatique a fait l'objet de plusieurs études ces deux dernières décennies afin de pallier les inconvénients rencontrés avec la synthèse par voie chimique.

1- Réactions mises en jeu

Les deux voies de synthèse des esters de sucre et d'acide gras font intervenir trois grands types de réactions: l'estérification directe, l'interestérification ou estérification indirecte et la transestérification à partir de triglycérides ou d'esters méthyliques (**Figure I-8**). Ces réactions

différent selon la nature du donneur d'acyle employé et les produits formés plus ou moins difficiles à éliminer (eau, alcool...).

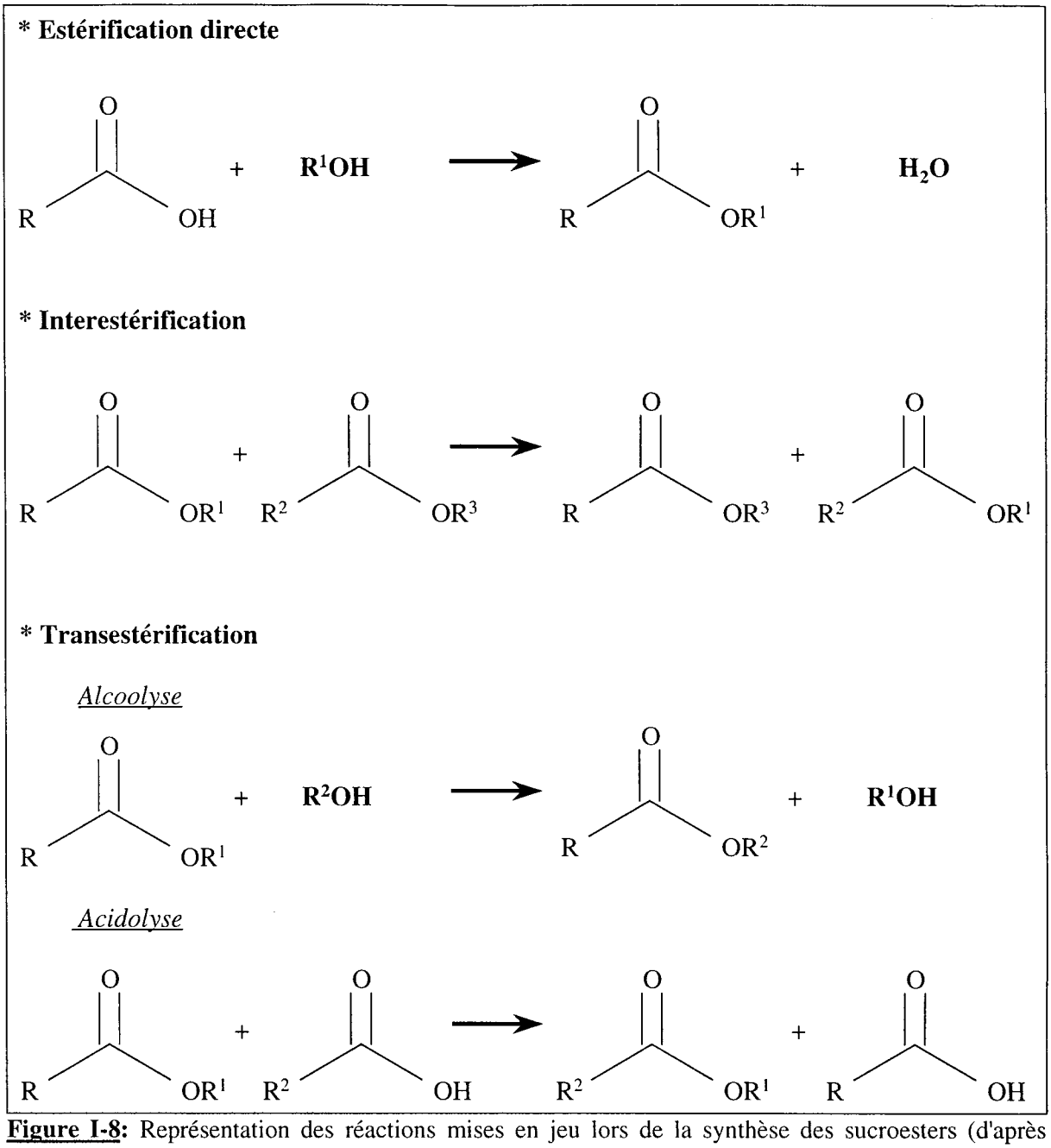


Figure I-8: Représentation des réactions mises en jeu lors de la synthèse des sucroesters (d'après Haraldsson, 1992).

L'estérification directe se fait entre la fonction acide carboxylique d'un acide gras et une fonction alcool d'un sucre et nécessite de travailler avec un large excès de sucre et en présence de faibles quantités d'eau afin d'éviter l'hydrolyse des produits formés (John et Monk, 1978). Les rendements obtenus par cette méthode sont généralement très faibles (Bourhim *et al.*, 1993). Tandis que, la réaction d'interestérification ou d'estérification indirecte correspond à un

échange de groupements acyles entre un ester d'acide gras et un ester de sucre et présente l'avantage de ne générer ni eau ni alcool dans le milieu (Akoh et Swanson, 1987). Enfin, la réaction de transestérification qui se fait avec transfert d'acyle où l'on utilise un ester comme donneur d'acyle et un sucre (alcoolyse) ou un acide gras (acidolyse) comme accepteur (Weiss *et al.*, 1972).

2- Synthèse des esters de sucre et d'acide gras par voie chimique

Les sucroesters commercialisés actuellement sont, pour la plupart, des esters gras de sucre obtenus par transestérification d'esters d'acides gras et de saccharose en présence d'un catalyseur chimique.

Les travaux réalisés sur la synthèse par voie chimique des sucroesters peuvent être classés selon le type de réaction utilisée pour leur obtention.

2.1: Estérification directe

Le **Tableau I-2** résume les principaux travaux cités dans la littérature sur la synthèse par estérification directe des sucroesters par voie chimique. On constate que ce procédé de synthèse est peu étudié et les résultats obtenus ne sont pas très performants pour une éventuelle extrapolation à l'échelle industrielle.

Tableau I-2: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters: Estérification directe.

Références	Réactifs	Conditions et résultats	Inconvénients
Berthelot (1860)	▪ Glucose Tréhalose. ▪ Acide acétique Acide butyrique Acide stéarique Acide benzoïque	▪ 50-60 h ▪ 100-120 °C	▪ Etude peu détaillée. ▪ Peu de produit synthétisé.
John et Monk (1978)	▪ Saccharose ▪ Acide oléique	▪ Carbonate d'ammonium ▪ Sucre/acide = 2 à 3 (mol/mol) ▪ 3 % eau ▪ 40 % d'ester de glucose et 10 % d'ester de saccharose	▪ Hydrolyse des esters formés
Sawada et al. (1988)	▪ Sorbitol ▪ Acide laurique	▪ Sans solvant ▪ $NaBH_4$, 1 h à 80 °C ▪ NaOH, H_3PO_2 ▪ 235 °C, 5h	▪ Non transposable aux disaccharides: décomposition aux fortes températures et faible solubilité.
Bourhim et al. (1993)	▪ Méthylglucose, maltose ▪ Acides gras	▪ Tétrahydrofurane ▪ Triphenylphosphine ▪ Diéthylazodicarboxylate ▪ Température ambiante, 24 h ▪ Rendement conversion: 20 à 50 %	▪ Faibles rendements

2.2. Interestérification

Le **Tableau I-3** reprend les principaux travaux concernant la synthèse par interestérification des sucroesters. Ce type de réaction a été utilisé pour augmenter la réactivité du donneur d'acyle. Pour cela, des chlorures d'acides ou des acylthiones sont mis en jeu.

Tableau I-3: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters: Interestérification.

Références	Réactifs	Conditions et résultats	Inconvénients
Bolanos et al. (1986, 1987, 1988)	▪ Isopropylidène-mannitol, xylose. ▪ Chlorures d'acides gras en C12, C14 et C16.	▪ Pyridine anhydre ▪ Sucre/Donneur acyle = 1/1 (mol/mol) ▪ Température ambiante ▪ 24 à 48 heures. ▪ Rendement = 82 % d'esters de sucre.	▪ Toxicité des chlorures d'acides.
Della Valle et Romeo (1989)	▪ Carboxyméthyl-cellulose, carboxyméthyl-amidon ▪ Chlorures d'acides.	▪ DMSO ▪ Sel de tetrabutyl-ammonium ▪ 30 °C/12 heures.	▪ Toxicité des chlorures d'acides.
Mentech et al. (1991)	▪ Saccharose ▪ Chlorure d'acryloyle ou de méthacryloyle	▪ Milieu aqueux ▪ NaOH 6N ▪ Température ambiante ▪ 1 heure de réaction ▪ 40 à 60 % d'esters de saccharose dont 20 à 40 % de monoesters	▪ Toxicité des chlorures d'acryloyle et de méthacryloyle. ▪ Faibles rendements
Plusquellec et al. (1986, 1992)	▪ Lactose, maltose, glucose ▪ Acylthiones (chlorures d'acides et mécapto-thiazoline)	▪ Pyridine anhydre ▪ Sucre/Donneur acyl = 3 à 4 (mol/mol) ▪ NaH ▪ 25 à 70 °C/ 3 à 6 h ▪ 20 à 80 % de conversion du réactif acylant en sucroeesters avec une majorité de monoesters en 1.	▪ Etape supplémentaire de préparation du donneur d'acyle.
Goueth et al. (1994)	▪ Diactéone glucose ▪ Chlorures d'acides gras.	▪ Toluène anhydre ▪ Triéthanolamine ▪ Température ambiante/ 4 heures	▪ Toxicité des chlorures d'acides ▪ Etape de déprotection
Chortyk et al. (1996)	▪ Saccharose ▪ Chlorures d'acides en C4 à C12	▪ D.M.F., Pyridine ▪ Acide/Sucre = 2.5 (mol/mol) ▪ Acétonitrile ▪ 60 ° C/45 mn	▪ Toxicité des chlorures d'acides ▪ Etape supplémentaire de solubilisation des chlorures d'acides ▪ Solvant supplémentaire

2.3: Transestérification

La réaction de transestérification fait intervenir soit des triglycérides soit des esters méthyliques comme agents acylants.

2.3.1. Transestérification à partir de triglycérides

Ce protocole de synthèse des sucroesters est peu développé et est resté au stade du laboratoire même si l'utilisation de triglycérides présente l'avantage de sa grande disponibilité dans la nature (huiles végétales et animales) et de son faible coût. Le **Tableau I-4** résume les conditions opératoires et les inconvénients de la réaction de synthèse par transestérification selon Galleymore *et al.* (1980, 1981).

Tableau I-4: Résumé des travaux de Galleymore *et al.* (1980, 1981) portant sur la synthèse par voie chimique des sucroesters: Transestérification à partir de triglycérides.

Références	Réactifs	Conditions et résultats	Inconvénients
Galleymore et al. (1980, 1981)	▪ Saccharose ▪ Mélange mono- di- et triglycérides ▪ Suif.	▪ 10 à 20 % de savons potassiques ▪ K_2CO_3 ▪ 125 °C, 5 heures ▪ Pression atm. ▪ Faible rendement en mono- et diesters (25 %)	▪ Réaction peu spécifique ▪ Utilisation de grandes quantités de savon en tant que catalyseur ▪ Difficulté d'élimination des savons ▪ Faibles rendements de conversion ▪ Températures élevées

2.3.2. Transestérification à partir d'esters gras

La réaction de synthèse des sucroesters par transestérification à partir d'esters méthyliques est la plus étudiée car elle donne de meilleurs rendements de conversion comparée aux autres types de réaction. Dans la plupart des travaux cités, on utilise le DMF et le DMSO comme solvants de réaction. Ces derniers permettent de solubiliser aussi bien le sucre que les esters méthyliques d'acides gras. Cependant, d'autres études ont été menées en micro-émulsions, en milieu savons d'acides gras, en milieu fondu et à partir de sucroesters.

2.3.2.1. Réaction avec solvant

Le **Tableau I-5** reprend les principaux travaux concernant la synthèse par transestérification à partir d'esters méthyliques des sucroesters en présence de solvants organiques. On remarque que toutes les études ont été menées sur le saccharose et des esters méthyliques supérieurs.

Tableau I-5: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters: Transestérification à partir d'esters méthyliques en présence de solvants.

Références	Réactifs	Conditions et résultats	Inconvénients
Osipow et al. (1956)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques d'acides gras	▪ DMF, K_2CO_3 anhydre ▪ 90-95 °C ▪ Pression réduite ▪ Mélange de mono-, di-,... octaesters	▪ Solvant toxique ▪ Réaction peu sélective
Bares et Zajic (1968)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques de palme	▪ DMSO/Sucre = 8 (p/p) ▪ Donneur acyle/Sucre = 1 (mol/mol) ▪ K_2CO_3 anhydre ▪ 90 °C, 3 à 6 heures ▪ 22 à 24 torrs ▪ 60 à 70 % d'esters dont 30 à 40 % de monoesters.	▪ Solvant toxique ▪ La présence d'eau provoque la formation de KOH néfaste pour la réaction.
Weiss et al. (1972)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques de palme	▪ DMF, K_2CO_3 anhydre 5 % ▪ Donneur acyle/Sucre = 1 à 12 (mol/mol) ▪ 90 °C à reflux/ 5 à 6 h ▪ 40 % de monoesters pour un rapport équimolaire en substrats	▪ Solvant toxique ▪ Formation de produits très substitués
Lopez et Moreno (1984, 1986)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques en C16 et C18	▪ DMF, K_2CO_3 ▪ Excès de saccharose ▪ 90 à 95 °C/ 10 heures ▪ 80 à 100 mmHg	▪ Solvant toxique ▪ Formation de produits très substitués
Wada et al. (1988)	▪ Saccharose ▪ Stéarate de méthyle	▪ DMSO ▪ Résine échangeuse de cation (catalyse acide) ▪ Sucre/Donneur acyle = 2 (mol/mol) ▪ 90°C/ 6 h, 25 mmHg	▪ Solvant toxique ▪ Moins de 40 % de conversion du sucre
Donnelly et Bulock (1988, 1994)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques d'acides linéaires et branchés (préparés à partir d'acides de Kort)	▪ DMF, K_2CO_3 anhydre ▪ Sans catalyseur: 80 °C/ 2h25, 65 mmHg ▪ Avec catalyseur: 3 heures dans les mêmes conditions	▪ Solvant toxique
Cruces et al. (2001)	▪ Saccharose ▪ Esters vinyliques (C8, C12, C14, C16)	▪ D.M.S.O, Na_2HPO_4 anhydre ▪ 40 °C/ P_{atm} ▪ 85 % de rendement de conversion dont 90 % de monoesters.	▪ Solvant toxique

2.3.2.2. Réaction en micro-émulsion

Afin d'éviter la formation de produits très substitués, des synthèses d'esters de saccharose ont été développées en micro-émulsion. La réalisation de synthèses dans ces conditions permet de travailler en absence de solvant tout en assurant le contact entre les différents réactifs.

Le **Tableau I-6** résume les conditions opératoires et les résultats obtenus par Osipow et Rosenblat (1967) qui ont été les premiers à réaliser ce type de réaction.

Tableau I-6: Résumé des travaux de Osipow et Rosenblat (1967) sur la synthèse par voie chimique des sucroesters: Transestérification à partir d'esters méthyliques en micro-émulsion.

Références	Réactifs	Conditions et résultats	Inconvénients
Osipow et Rosenblat (1967)	▪ Saccharose ▪ Stéarate de méthyle ▪ Stéarate de sodium, oléate de sodium	▪ Propylène glycol en excès pour l'obtention d'une micro-émulsion ▪ K_2CO_3 anhydre ou CH_3ONa ▪ Donneur acyle/Sucre = 1.5 (mol/mol) ▪ 130 à 150 °C/ 8 heures, 130 à 140 mmHg ▪ 165 à 170 °C/ 3 mmHg pour éliminer le propylène glycol ▪ 58 % de stéarate de saccharose en position 1 (85 % monoesters et 15 % diesters)	▪ Températures élevées ▪ Etape supplémentaire pour l'élimination du propylène glycol ▪ Etape supplémentaire pour l'élimination des savons ▪ Faible rendement

Même si ce protocole de synthèse n'utilise pas de solvant organique, il présente plusieurs inconvénients aussi bien lors de l'étape de synthèse que celle de purification des produits (extraction par solvant) limitant considérablement son développement aussi bien à l'échelle de laboratoire qu'à l'échelle industrielle.

2.3.2.3. Réaction avec des savons d'acides gras

La réaction de synthèse peut être réalisée en utilisant un savon d'acide gras comme donneur d'acyle. Dans ce cas, ce dernier joue à la fois le rôle de solubilisant que de catalyseur évitant ainsi l'apport supplémentaire de solvants toxiques et de catalyseurs au milieu tout en améliorant les rendements finaux de conversion. Le **Tableau I-7** résume les principaux travaux utilisant cette méthode de synthèse chimique.

La plupart des synthèses, selon cette méthode, se déroulent en plusieurs étapes augmentant ainsi la durée de la réaction. Ces réactions se font à haute température ce qui provoque la dégradation non seulement du sucre mais également des produits formés.

Tableau I-7: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters: Transestérification avec des savons d'acides gras.

Références	Réactifs	Conditions et résultats	Inconvénients
Feuge et al. (1970)	▪ Sucre fondu ▪ Oléate de sodium (Solubilisant) ▪ Oléate de lithium (catalyseur)	▪ 30 % de savons ▪ 170-180 °C/30 mn, ▪ Pression atm. puis 3 mm Hg pour la réaction ▪ 56 % d'esters (majoritairement mono-et di-esters	▪ Faibles rendements ▪ Température élevée ▪ Caramélisation sucre ▪ Quantités élevées de savons
Rizzi et Taylor (1977)	▪ Saccharose ▪ Oléate de méthyle ▪ Oléate de potassium	▪ Esters méthyliques ajoutés en 2 fois ▪ Savon acide gras/Sucre = 10 (mol/mol) ▪ Savon acide gras/Sucre = 5 (mol/mol) à 150-160 °C / 2 heures le reste à 180 °C / 3.5 heures. ▪ 8 mmHg	▪ Température élevée ▪ Dégradation sucre ▪ Esters de saccharose polysubstitués
Albano et al. (1980)	▪ Méthylglucoside ▪ Laurate de méthyle	▪ 5 % de savons potassiques d'acide gras ▪ 0.5 % de sodium ▪ Ester méthylique/Sucre = 1 (mol/mol) ▪ 95 °/1 h sans sodium ▪ Ajout du catalyseur à 55 °C et réaction à 145-148 °C/2 h	▪ Utilisation de sel ▪ Température élevée ▪ Plusieurs étapes ▪ Produit marron ▪ Faibles rendements
Gibson et al. (1989)	▪ Saccharose < 50 µm ▪ Esters méthyliques d'acides gras en C18 ▪ Savons potassium d'acides gras en C18	▪ Formation de savons *in situ* ▪ K_2CO_3 < 50 µm ▪ Excès d'esters ▪ La moitié des esters méthyliques ajoutée à 135°C/1.5 h, 15 mmHg ▪ Reste des esters méthyliques et K_2CO_3 à 135 °C/4 h, 2 mmHg	▪ Température élevée ▪ Utilisation de savon ▪ Esters polysubstitués
Matsumoto et al. (1989)	▪ Saccharose ▪ Stéarate de méthyle ▪ Stéarate de K	▪ Milieu aqueux ▪ Formation de savons *in situ* (20 à 30 %) ▪ K_2CO_3 ▪ 160 °C/3 h, 5 mmHg	▪ Température élevée ▪ Utilisation de savon ▪ Présence d'eau défavorable à la synthèse
Shieh et al. (1996a)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques d'acides gras	▪ KOH/MeOH ▪ Formation de savons *in situ* à T_{amb} ▪ 130-150 °C/2 h sous vide ▪ 0.5 % (p/p) K_2CO_3 ▪ 12 h de réaction ▪ Neutralisation avec acide acétique	▪ Température élevée ▪ Utilisation de savon ▪ Plusieurs étapes

2.3.2.4. Réaction en milieu fondu

La réaction en milieu fondu a lieu en absence de solvants et de savons d'acides gras. Le **Tableau I-8** résume les principaux travaux réalisés dans ces conditions.

Tableau I-8: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters: Transestérification en milieu fondu.

Références	Réactifs	Conditions et résultats	Inconvénients
Moreno et Nues Fonseca (1985)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques en C18	▪ 8 % K_2CO_3 ▪ 125 °C/12 h, P_{atm} ▪ 20 % de rendement de conversion	▪ Faibles rendements ▪ Température élevée ▪ Utilisation de savons
Akoh et Swanson (1989)	▪ Tréhalose octaacétate, sorbitol hexaacétate, stackyose tétradéca-acétate (Amélioration solubilité) ▪ Oléate de méthyle	▪ 2 % Na (Catalyseur) ▪ Ester méthylique/Sucre = 6 (mol/mol) ▪ 110-115 °C/3 h, 0-5 mmHg, N_2 ▪ 95 à 98 % de rendement de conversion	▪ Température élevée ▪ Etape supplémentaire pour l'obtention de sucres acétates
Hutchinson (1996)	▪ Saccharose tétraétheré (Meilleure solubilité) ▪ Oléate de méthyle	▪ 0.16 % NaH ▪ Esters méthyliques en excès de 50 % ▪ 120-180 °C/4 h, 10 mmHg, N_2	▪ Température élevée ▪ Mélange sucroesters polysubstitués (4 à 8) ▪ Etape supplémentaire pour l'obtention de sucres éthers
Silver et Hasenhuettl (1997)	▪ Saccharose octaacétate ▪ Esters méthyliques de soja	▪ CH_3ONa, zéolithe 5Å ▪ Esters méthyliques en excès ▪ 130 °C/4 h, N_2 (1 l/mn) ▪ Produit obtenu en fine couche (1 mm) sur la paroi du réacteur	▪ Température élevée ▪ Etape supplémentaire pour l'obtention de sucres acétates

La synthèse en milieu fondu se fait à des températures élevées et présente une faible sélectivité. En outre, les rendements obtenus ne deviennent intéressants que lorsqu'on utilise des sucres protégés présentant une meilleure solubilité dans les milieux hydrophobes par rapport au sucre non modifié. La modification chimique du sucre constitue une étape et un coût supplémentaires à la synthèse.

2.3.2.5. Réaction à partir des sucroesters

Cette méthode de synthèse a été proposée par certains auteurs afin de rendre la réaction plus sélective vis-à-vis des esters de sucre à faible degré de substitution. Ce procédé permet

également d'éviter, dans certains cas, l'utilisation de savons qui ont pu être remplacés avec succès par une autre classe de tensioactifs, les alkylpolyglycosides, jouant le rôle d'émulsionnants. Le **Tableau I-9** résume les principaux travaux réalisés avec des sucroesters.

Tableau I-9: Résumé des principaux travaux sur la synthèse par voie chimique des sucroesters: Transestérification avec des sucroesters.

Références	Réactifs	Conditions et résultats	Inconvénients
Wagner et Dean (1990)	▪ Saccharose ▪ Esters de saccharose (D.S. > 2)	▪ DMF ▪ Acides ou bases de Lewis ▪ 90 °C/8 à 30 h à reflux ▪ Mélange riches en monoesters	▪ Utilisation de solvant ▪ Etape supplémentaire d'élimination des acides et bases ▪
Hill et Falkowski (1993)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques C12 à C18 ▪ Alkylpolyglucoside	▪ Esters méthyliques/Sucre = 2-4 (mol/mol) à 135-155 °C, N_2, milieu anhydre pour obtenir 4 % de monoesters ▪ MeOH à 75 °C/30 mn, refroidir à 66 °C, MgO pendant 2 h ▪ 70 % de conversion des esters méthyliques ▪ 14 % monoesters	▪ Température élevée ▪ Réaction en plusieurs étapes ▪ Faible sélectivité vis-à-vis des monoesters ▪
Lemaire-Claverie (1998)	▪ Saccharose ▪ Esters méthyliques de palme ▪ Savons potassiques d'acides gras	▪ Formation de savons *in situ*/6 h ▪ Esters méthyliques/Sucre = 1.6 (mol/mol) ▪ K_2CO_3 ▪ 120 °C/8 h, milieu anhydre, 10 mmHg ▪ 80 % de rendement ▪ Mélange riche en di- et tri- esters de saccharose	▪ Température élevée ▪ Etape supplémentaire pour la formation des savons d'acides gras

Ce procédé de synthèse se fait, de la même manière que pour la majorité des synthèses par voie chimique, à des températures élevées ce qui pourrait causer des dégradations et des polymérisations responsables de la formation de produits colorés à la fin de la réaction. En fait, cette dégradation peut limiter leur utilisation dans les domaines cosmétiques et pharmaceutiques.

2.4: Conclusion

Les études réalisées sur la synthèse par voie chimique des sucroesters montrent qu'une large gamme de substrats peut être utilisée avec de bons rendements de conversion et avec des

temps de réaction relativement courts. Toutefois, cette voie de production présente plusieurs inconvénients qu'il faut pallier afin d'obtenir des produits peu dégradés et possédant des propriétés bien définies.

Les principaux problèmes rencontrés lors de la synthèse des sucroesters par voie chimique sont:

- La réalisation des réactions à des températures élevées donnant des produits colorés ce qui implique la réalisation d'une étape de décoloration.
- L'utilisation de solvants et de substrats parfois toxiques.
- La non-sélectivité de la réaction et l'obtention d'un nombre important d'isomères.
- L'utilisation d'un procédé complexe nécessitant plusieurs étapes au cours de la synthèse (protection-déprotection; formation de savons d'acides gras...).
- L'obtention d'un mélange de molécules avec différents degrés de substitution et présentant des propriétés physico-chimiques et tensioactives variables en fonction de la composition finale.
- L'obtention d'un mélange de molécules engendrant plusieurs étapes de purification.

3- Synthèse des esters de sucres et d'acide gras par voie enzymatique

La synthèse des sucroesters par voie enzymatique utilise des lipases pouvant catalyser des synthèses en milieu organique dit milieu non conventionnel.

La propriété de régio- et stéréospécificité des lipases en a fait une très bonne solution de rechange pour remplacer les catalyseurs chimiques pour la synthèse des sucroesters. Les lipases permettent, en effet, de réaliser une acylation sélective d'un groupement hydroxyle de la molécule de sucre. Par conséquent, la stéréochimie du produit final se trouve complètement contrôlée par la spécificité de l'enzyme (Egloff *et al.*, 1995).

En plus, les lipases sont utilisées dans des conditions très douces de température et de pH. En effet, la synthèse chimique est catalysée par des protons ou des ions hydroxyles en milieu fortement acide ou alcalin tandis que la synthèse enzymatique se fait à un pH proche de la neutralité. Quant à la température, elle est généralement assez faible afin d'éviter la dénaturation de l'enzyme.

3.1: Les enzymes en milieu organique

3.1.1. Historique

Divers procédés utilisant les enzymes solubles ou immobilisées ont été développés principalement en phase aqueuse. Cependant, l'activité catalytique des enzymes dans d'autres solvants a été démontrée pour la première fois au début du siècle (Bourquelot et Bridel, 1911). Ces auteurs ont montré que l'émulsine (β-glucosidase d'amande) conservait son activité catalytique dans des milieux aqueux contenant de l'acétone ou de l'éthanol. Dans ce cas, l'enzyme reste active tant que le milieu contient une forte teneur en eau. Cependant cette activité est plus faible qu'en milieu aqueux. Suite à cette étude, l'utilisation des enzymes comme biocatalyseurs s'est principalement développée dans le domaine de l'agro-alimentaire et à moindre degré en chimie. En effet, ayant une faible stabilité dans ce type de réacteur, les enzymes présentaient peu d'intérêt technologique comparées aux catalyseurs chimiques (Klibanov *et al.*, 1977).

Par la suite et avec le développement des techniques d'immobilisation, l'utilisation des enzymes en tant que biocatalyseurs s'est étendue à d'autres domaines (Hamilton *et al.*, 1974). L'intérêt de l'immobilisation étant d'augmenter leur stabilité et de permettre leur séparation et recyclage à la fin de la réaction.

La synthèse enzymatique en milieu non conventionnel s'est essentiellement développée au cours des 10-15 dernières années afin de remplacer les procédés chimiques utilisés jusque là pour la synthèse de molécules comme les sucroesters (Therisod et Klibanov, 1987; Klibanov, 1989; Halling, 1994; Paiva *et al.*, 2000).

Dans un premier temps, les études se sont tournées vers l'utilisation de milieux biphasiques (Martinek *et al.*, 1986). Ensuite, la synthèse des sucroesters a été réalisée dans des solvants pratiquement anhydres (Klibanov, 1986; Isomo *et al.*, 1995; Lopez-Amaya *et al.*, 1995; Marty *et al.*, 1997). En effet, on a démontré que les lipases pouvaient maintenir, et dans certains cas améliorer, leur degré de spécificité dans des milieux presque anhydres.

D'un point de vue biotechnologique, il existe de nombreux avantages à utiliser les lipases dans les milieux organiques (Klibanov, 1986; Dordick, 1991). En effet, les synthèses enzymatiques en milieu non-conventionnel permettent:

- l'augmentation de la solubilité des substrats non polaires,
- le déplacement de l'équilibre thermodynamique en faveur de la synthèse,
- la suppression des réactions favorables en présence d'eau,
- la possibilité de séparer le solvant de synthèse des produits par simple évaporation à faibles températures évitant ainsi la dénaturation des produits d'intérêt,
- l'augmentation de la thermostabilité de l'enzyme,
- d'éviter les contaminations microbiennes.

Avant d'étudier la réaction de synthèse des sucroesters, nous allons nous intéresser, dans un premier temps, à l'étude des propriétés des lipases, leur structure et leur mécanisme d'action en milieu organique.

3.1.2. Propriétés des lipases

Les lipases (acylglycérol hydrolase, EC 3.1.1.3) font partie du groupe d'enzymes appartenant à la classe des hydrolases qui, d'une part, montrent la capacité de catalyser la réaction d'hydrolyse des liaisons ester et, d'autre part, de catalyser la réaction de synthèse de beaucoup d'esters et monoacylglycérols d'acide gras (Bornscheuer, 1995; Pastor *et al.*, 1995; Gelo-Pujic *et al.*, 1996; Seung-Heon *et al.*, 1996). Les lipases sont synthétisées par différents groupes de micro-organismes, telles que bactéries (Makhozoum *et al.*, 1996; Xiao-Yan-Wu *et al.*, 1996), moisissures (Macris *et al.*, 1996) et levures (Odibo *et al.*, 1995; Destain *et al.*, 1997).

Selon Benzonana et Desnuelle (1965), la principale caractéristique des lipases est leur action catalytique strictement dépendante de la présence d'une interface lipide-eau où la phase lipidique est insoluble. Cette activation interfaciale serait due soit à un changement de conformation tridimensionnelle de l'enzyme soit à une activation du substrat. Cependant, les structures aux rayons X n'ont pas permis de déceler les modifications liées à ce phénomène.

Appartenant à la classe des hydrolases à serine (Blow, 1990), les lipases n'exigent pas de coenzymes pour leur activité. Elles sont disponibles, fortement stables, et montrent une tolérance élevée pour la variation de la structure du substrat tout en maintenant une stéréoseléctivité élevée. Les substrats utilisés lors de ce type de synthèse peuvent ne pas être solubles dans l'eau, puisque les lipases peuvent agir à l'interface lipide-eau.

En conclusion, les lipases ont été utilisées dans les milieux organiques tout en maintenant une bonne activité. Les lipases constituent ainsi un des biocatalyseurs les plus étudiés en synthèse organique.

3.1.3. Structure et mécanisme d'action

Les lipases sont des glycoprotéines dont la masse moléculaire est située entre 20 et 60 KD. Ces enzymes possèdent un site actif constitué d'une triade d'acides aminés hydrophobes à l'origine des interactions entre l'enzyme et les lipides. Les résidus impliqués dans la catalyse étant Ser-His-Asp/Glu (Egloff *et al.*, 1995).

Le mécanisme d'action des lipases a été extrapolé à partir de celui proposé dans le cas de la chymotrypsine (**Figure I-9**). Il s'agit d'une attaque nucléophile mettant en jeu un résidu de serine activé par le réseau de relais de charge (**Figure I-9a**). Après attaque du carbone de la fonction carboxylique du substrat, on a formation d'un intermédiaire tétraédrique (**Figure I-9b**). Des liaisons hydrogène entre l'oxygène chargé négativement (oxyanion) de l'intermédiaire tétraédrique et des groupes N-H peptidique (Histidine) stabilisent la charge négative de l'oxyanion. L'environnement électronique et atomique formé est appelé trou oxyanionique.

Cette catalyse acide-base provoque la rupture de la liaison ester carboxylique et le groupement alcool partant emporte un proton de l'ion imidazolium du résidu histidine. La chaîne acyle de la liaison ester du substrat reste liée de façon covalente à l'enzyme pour former un complexe acyle-enzyme (**Figure I-9c**). L'attaque de ce complexe par une molécule d'eau (**Figure I-9d**) donne un deuxième intermédiaire tétraédrique (**Figure I-9e**) qui se dissocie en libérant le groupement acyle et l'enzyme dans son état initial (**Figure I-9f**).

En outre, lorsqu'il s'agit de réactions enzymatiques à deux substrats, on parlera de mécanisme réactionnel de type bi-bi. Le mécanisme est dit ping-pong lorsque l'un des produits doit être libéré avant que tous les substrats n'aient interagi avec l'enzyme (Wallach, 1997).

Janssen *et al.* (1996) ont également montré que l'estérification d'acides gras avec le subcatol catalysée par la lipase de *Candida rugosa* peut être décrite par un modèle ping-pong avec inhibition compétitive par l'alcool. Ce type d'inhibition a également été observé avec la lipase de *Candida antarctica* qui suit un mécanisme de type bi-bi ping-pong nécessitant la formation d'un complexe acyl-enzyme (Duan *et al.*, 1997; Garcia-Alles et Gotor, 1998).

Pour bien comprendre le mécanisme d'action des lipases, il est nécessaire de connaître leur structure. Malheureusement, la taille relativement importante des lipases ne permet pas la détermination de leur structure tridimensionnelle par RMN. Ce n'est qu'en 1990 que les deux premières structures tridimensionnelles des lipases ont été déterminées par cristallographie aux rayons X (lipase de *Rhizomucor miehei* et lipase pancréatique humaine). Des études plus détaillées ont été réalisées par la suite et ont montré que, quelle que soit leur origine, les lipases présentent de nombreuses caractéristiques structurales communes. Il s'agit du repliement α/β, de la triade catalytique et du volet amphiphile (Egloff *et al.*, 1995).

Le repliement α/β est constitué d'un feuillet β central formé de brins parallèles reliés entre eux par des hélices α. Ce repliement contient le site actif se trouvant au fond d'un tunnel dont les parois sont hydrophobes avec une triade catalytique dont l'ordre d'apparition des résidus dans la séquence primaire est identique: Ser-Asp/Glu-His (Grochulski *et al.*, 1993; Uppenberg *et al.*, 1994). La serine catalytique est toujours située dans un coude serré situé à l'extrémité C-terminale entre un feuillet β (4 ou 5) et l'hélice α suivante. Cette position est énergiquement défavorable pour la serine mais elle permet à sa chaîne latérale de pointer vers l'extérieur de ce coude. L'histidine catalytique se trouve à l'extrémité C-terminale du dernier feuillet constituant le repliement α/β. Quant au résidu carboxylique, il présente quelques variantes de nature et de position selon l'origine de la lipase.

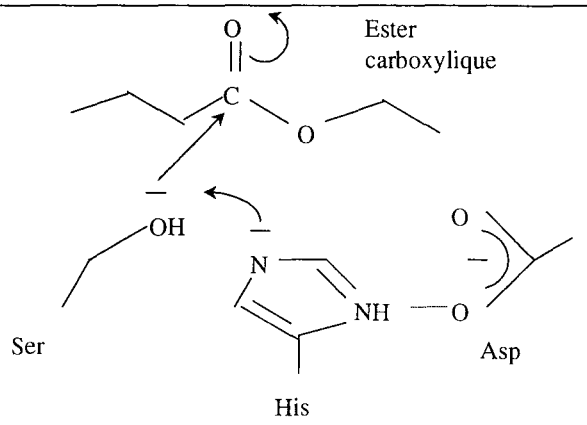


Figure I-9a: Conformation native de l'enzyme et approche du substrat.

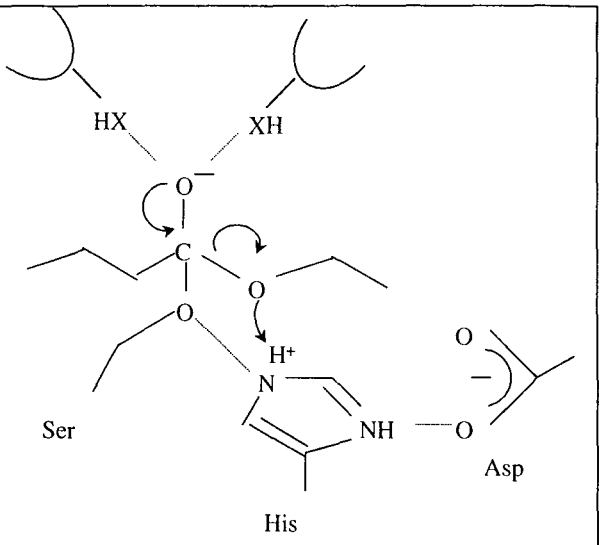


Figure I-9b: Formation du premier intermédiaire tétraédrique et sa stabilisation par le trou de l'oxyanion.

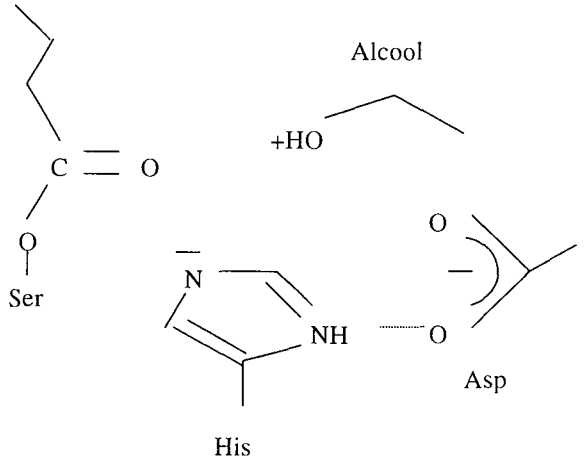


Figure I-9c: Libération de l'alcool et formation du complexe acyl-enzyme.

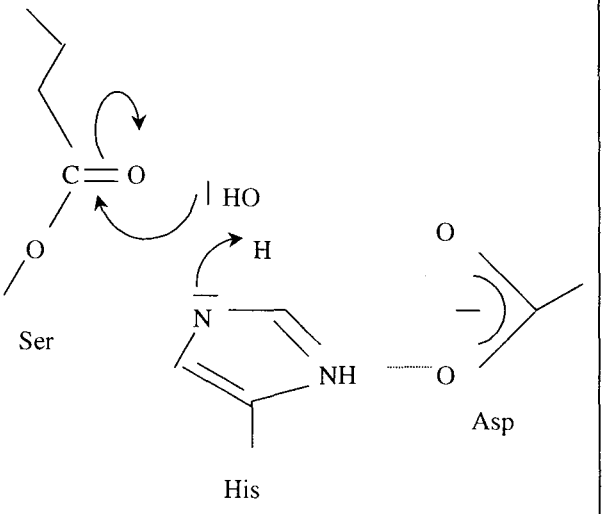


Figure I-9d: Attaque nucléophile par une molécule d'eau.

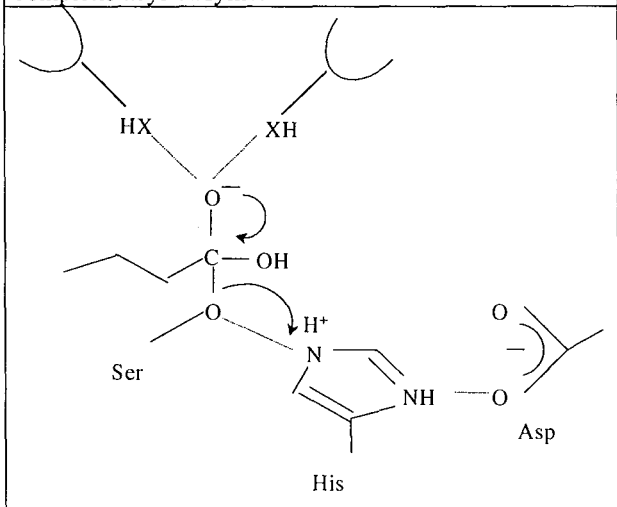


Figure I-9e: Formation du second intermédiaire tétraédrique et sa stabilisation par le trou de l'oxyanion.

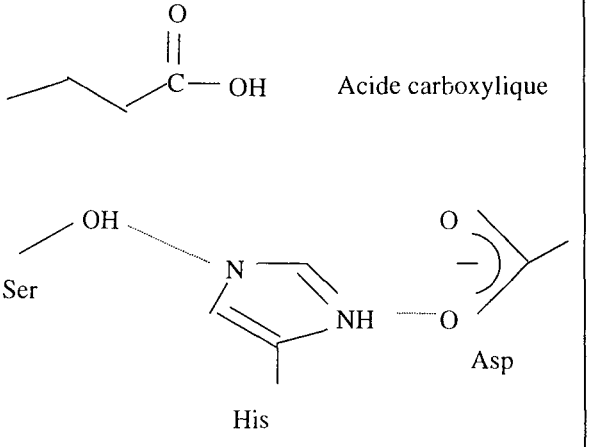


Figure I-9f: Libération de l'acide gras et retour de l'enzyme à sa conformation initiale.

Figure I-9: Mécanisme d'hydrolyse d'un ester carboxylique par la triade catalytique d'une enzyme à serine (d'après Egloff *et al.*, 1995)

En milieu organique, le site actif des lipases n'est généralement pas accessible au solvant. En effet, il est recouvert par une boucle amphiphile appelée volet amphiphile ou "lid" ou "flap". Il s'agit de la forme fermée ou inactive de l'enzyme (**Figure I-10**). Certains auteurs ont mis en évidence l'existence d'une forme ouverte active de l'enzyme. Dans ce cas, la face hydrophobe du volet, orientée auparavant vers l'intérieur du site actif, s'expose alors au solvant, créant une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface lipide-eau (van Tilbeurgh *et al.*, 1993, Benedetti *et al.*, 1996, Gargouri *et al.*, 1997, Maruyama *et al.* 2000).

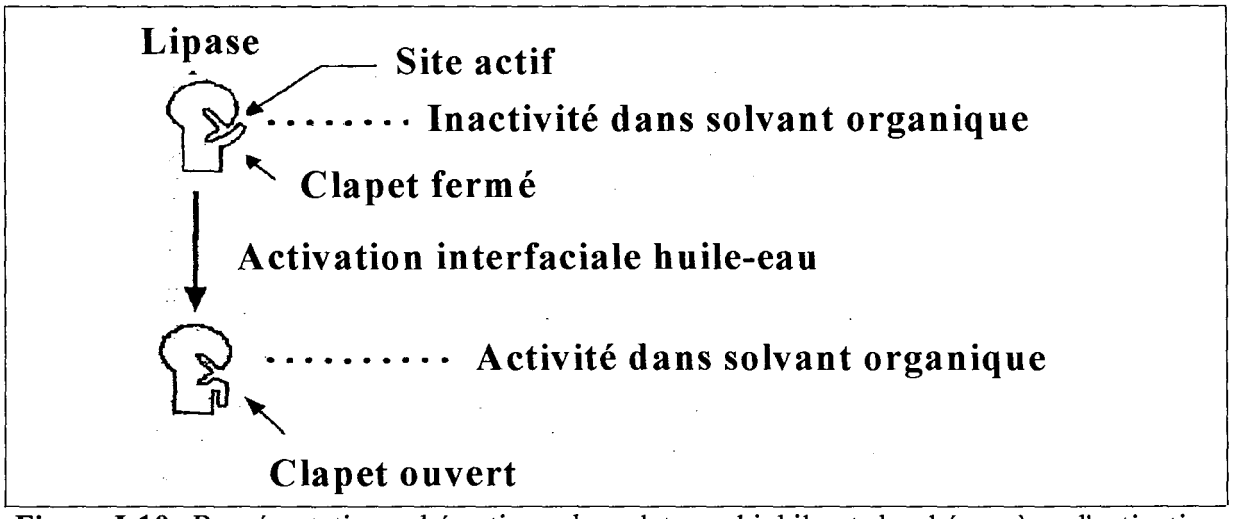


Figure I-10: Représentation schématique du volet amphiphile et du phénomène d'activation interfaciale en milieu organique (d'après Maruyama *et al.*, 2000).

La **Figure I-11** représente la structure de la lipase pancréatique humaine et les changements de conformation induits par l'adsorption à une interface lipide-eau. Dans le cas de cette lipase, le site actif est couvert d'une boucle en surface entre le pont bisulfure reliant les acides aminés cystéine 237 et 261. Cette boucle, à caractère hydrophile, comporte une hélice α courte à un tour avec un résidu de tryptophane (Trp 252) dont la chaîne latérale se situe à l'intérieur du site actif et se reposant directement sur la serine 152 qui se situe quant à elle à la surface du site actif.

Sous sa conformation fermée, rencontrée principalement en milieu aqueux, le volet de la lipase empêche l'accès du substrat au site actif. Cependant, en présence d'un milieu suffisamment hydrophobe la surface non polaire de la boucle peut se déplacer à cause des interactions hydrophobes avec le milieu permettant ainsi de rendre le site actif accessible aux substrats. Lorsque l'enzyme passe dans sa forme ouverte, la surface hydrophobe de l'enzyme exposée au solvant devient beaucoup plus importante. La partie hydrophile du volet va au

contact de la surface de la protéine créant ainsi des liaisons stabilisant la conformation (**Figure I-12**).

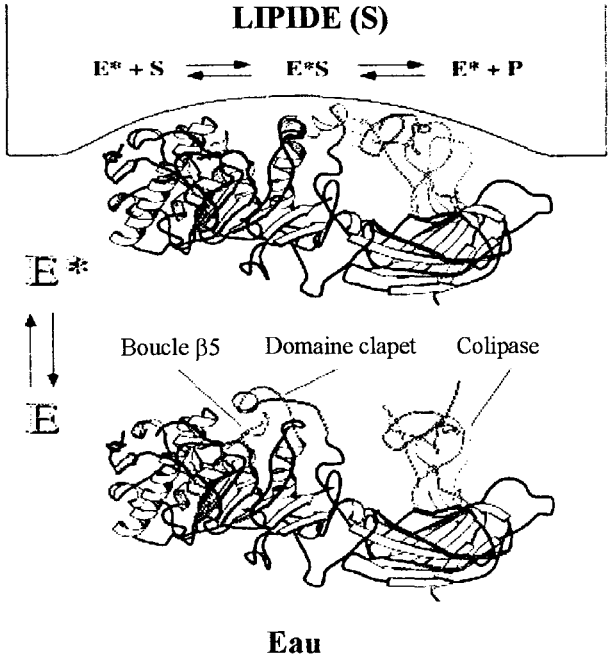


Figure I-11: Structure de la lipase pancréatique humaine et les changements de conformation ouverte (E*S) et fermée (E) induits par l'adsorption à une interface lipide-eau (d'après van Tilbeurgh *et al.*, 1993).

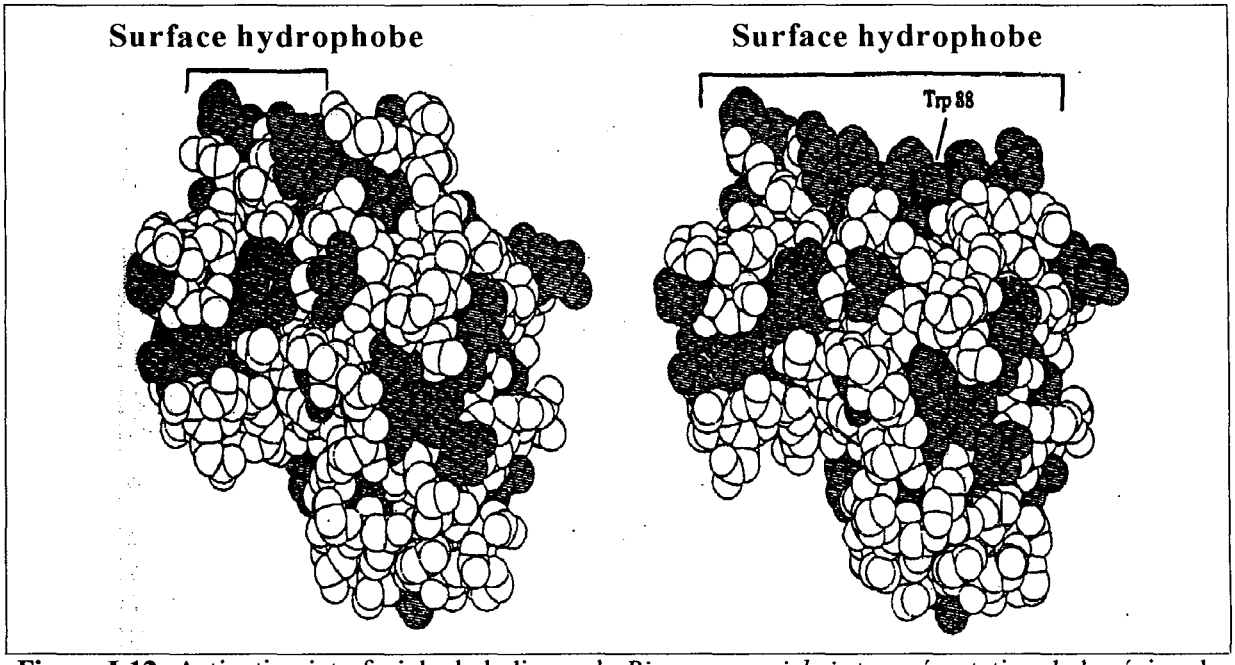


Figure I-12: Activation interfaciale de la lipase de *Rizomucor miehei* et représentation de la région du site catalytique de la lipase. (a) Forme fermée et (b) forme ouverte. Les structures ombrées représentent les atomes hydrophobes (d'après Brzozowski *et al.*, 1991).

3.1.4. Spécificité des lipases

Quoique les lipases catalysent le même type de réaction, leur action vis-à-vis des substrats en terme de chemo-, régio- et énantiosélectivité change considérablement. Les conditions opératoires optimales sont différentes d'une lipase à l'autre, rendant un procédé général approprié à toutes les lipases difficile ou même impossible à être développé.

Les lipases présentent plusieurs spécificités liées à la structure du site actif (Egloff *et al.*, 1995):

- ***La régiosélectivité:*** pouvoir d'hydrolyser préférentiellement les liaisons ester carboxylique en position externe sn-1 et sn-3 (esters primaires) vis-à-vis de la position interne sn-2 (esters secondaires);
- ***La typosélectivité:*** pouvoir de distinguer plusieurs types de donneurs d'acyle;
- ***La stéréosélectivité:*** capacité de discrimination entre deux énantiomères dans le cas d'un substrat racémique et la capacité de discrimination entre deux groupements stéréohétérotopiques mais homomorphiques (énantiotopiques) dans le cas des acylglycérols prochiraux (position sn-1 contre sn-3). L'aptitude des enzymes à distinguer les énantiomères se fait grâce aux différentes interactions diastéréoisomériques intervenant entre les énantiomères et le site actif de l'enzyme.

Pour illustrer ces propos, Villeneuve *et al.* (1996) ont montré que la lipase de *Carica papaya* et la lipase immobilisée de *Candida antarctica* type B sont régiosélectives en sn-3 et typosélectives vis-à-vis des acides gras à moyenne chaîne carbonée (12 carbones). De même, il a également été observé que la lipase de *Rhizopus cohnii* montrait l'affinité la plus forte envers les substrats à longue chaîne carbonée C16-C12 (Km = 0,2 mM) et la plus faible envers les substrats à courte chaîne carbonée C4-C2 (Km = 3,0 mM) (Trzcinska *et al.*, 2000).

3.1.5. Cas particulier de la lipase de Candida antarctica B

La structure cristallographique de la lipase type B de *Candida antarctica* (CAL-B) a été déterminée récemment. Cette structure montre que la CAL-B possède une triade catalytique (S105, H224, D187), semblable à celle des autres lipases, et indique également la présence

d'un site actif accessible aux solvants (Otto *et al.*, 2000). De plus, la CAL-B ne montre aucune activation interfaciale (Uppenberg *et al.*, 1994) et se comporte davantage comme une estérase plutôt qu'une lipase dans les milieux aqueux (Martinelle et Hult, 1995).

La CAL-B est une protéine de 317 acides aminés et 33 kDa. Une courte hélice (boucle α5) a été identifiée comme constituant le volet amphiphile. Cette hélice est située au niveau de l'une des extrémités du tunnel menant au site actif. Le mécanisme catalytique est semblable aux protéases à serine conduisant aux intermédiaires tétraédriques. Le repliement α/β comporte un motif structural central de sept feuillets β parallèles qui sont délimités de part et d'autre par les hélices amphiphiles (Uppenberg *et al.*, 1994).

La poche du site actif se compose de deux tunnels parallèles, l'un accueillant l'acyle et l'autre la partie du substrat à fonction alcool. Le tunnel acyle étant plus spacieux que celui à fonction alcool (Pleiss *et al.*, 1998). Le tryptophane en position 104, juste avant la serine catalytique, restreint le volume du côté de la poche du site actif. Les deux tunnels sont séparés par les chaînes hydrophobes des isoleucines placées en position 189 et 285 (Cambillau *et al.*, 1996).

CAL-B est une lipase qui possède une activité catalytique même dans les solvants polaires tels que le *t*-butanol ou l'acétone (Arcos *et al.*, 1998a et b). Une fois immobilisée, CAL-B présente une thermostabilité élevée et peut être employée dans des réacteurs continus à 60-80 °C sans perte significative d'activité, même après plusieurs utilisations (Turner et Vulfson, 2000). Cette lipase a été largement étudiée et utilisée dans de nombreux travaux qui ont reporté son efficacité particulière dans les synthèses organiques qui s'accompagnent de hautes régio- et énantiosélectivités (Björkling *et al.*, 1989, Adam *et al.*, 1997, Adlercreutz et Mattiasson, 1997).

Les lipases trouvent leur application dans divers secteurs agro-alimentaire, médical et cosmétique. La capacité des lipases à catalyser des réactions réversibles de synthèse a été particulièrement mise à profit dans la production des esters de sucre et d'acide gras (Macrae et Hammond, 1985; Sarney et Vulfson, 1995; Gandhi, 1997).

3.2: Réaction de synthèse des sucroesters par les lipases

La synthèse enzymatique des esters de sucre et d'acide gras consiste à mettre un sucre et un acide gras ou un ester méthylique d'acide gras en présence d'une enzyme (lipase ou protéase). Cette réaction est réalisée en milieu organique à faible teneur en eau afin de favoriser la réaction de synthèse au lieu de l'hydrolyse. En effet, lors de la synthèse des sucroesters par estérification directe, l'eau doit être éliminée non seulement au début de la réaction mais aussi tout au long de la synthèse pour éviter d'inactiver l'enzyme et d'hydrolyser les produits formés.

L'eau ne constitue pas le seul paramètre à contrôler pour améliorer les performances de la réaction. Il s'agit notamment de l'origine de l'enzyme, de la nature des substrats et leurs concentrations, de la nature du solvant et l'hydrophobicité du milieu, des paramètres opératoires (température, pression...).

3.2.1. Influence des paramètres de la réaction

L'utilisation d'enzymes en milieu non conventionnel présente certes plusieurs avantages dont les principaux sont le pouvoir catalytique et la sélectivité. Cependant, ces deux caractéristiques sont largement dépendantes du choix des différents paramètres de la réaction.

3.2.1.1. Nature et origine de l'enzyme

De nombreuses lipases ont été testées pour catalyser la synthèse des sucroesters. Ces enzymes sont pour la plupart d'origine bactérienne et fongique (**Tableau I-10**). Les résultats obtenus dans la littérature ont montré que les lipases immobilisées de *Candida antarctica* et de *Rhizomucor miehei* permettent d'obtenir les meilleures performances de réaction de synthèse des sucroesters.

Tableau I-10: Résumé de quelques travaux sur la synthèse des sucroesters utilisant des lipases.

Origine	Forme	Références
▪ *Candida antarctica*	▪ Libre	Akoh et Mutua (1994); Barfoed et Skagerlind (1994); Claon et Akoh (1994).
	▪ Immobilisée	Björkling *et al.* (1989); Akoh et Mutua (1994); Ducret *et al.* (1995); Coulon (1997); Garcia-Alles et Gotor (1998); Redmann *et al.* (1997); Torres *et al.*, (1999); Hugon (2000).
▪ *Pseudomonas sp*	▪ Immobilisée	Min Sin *et al.* (1998); Torres *et al.* (1999)
▪ *Candida cylindracea*	▪ Libre	Janssen *et al.* (1991); Ikeda et Klibanov (1993); Dordick *et al.* (1993); Min Sin *et al.* (1998);
▪ *Rhizomucor miehei*	▪ Immobilisée	Chulalaksananukul *et al.* (1990); Berger *et al.* (1992); Bloomer *et al.* (1992); Colombié *et al.* (1998); Ghosh et Bhattacharyya (1998).
▪ *Rhizopus arrhizus*	▪ Immobilisée	Goderis *et al.* (1987).
▪ lipase pancréatique de porc	▪ Libre	Chopineau *et al.* (1988); Michel (1992).

Toutes les lipases acceptent des esters allant des courtes (C4) aux longues chaînes d'acides gras, certaines hydrolysent également des esters d'acide gras de chaîne carbonée allant jusqu'à 22 carbones (Pleiss *et al.*, 1998). Cependant, il a été démontré que chaque lipase présente une certaine spécificité vis-à-vis des substrats présents dans le milieu. Cette spécificité a été expliquée par la forme du site actif déterminée par simulation moléculaire et qui est variable d'une enzyme à l'autre (**Figure I-13**).

La spécificité liée à l'origine de l'enzyme a été démontrée par plusieurs auteurs. Ainsi, lorsqu'on synthétise des esters de sorbitol, le meilleur rendement initial a été obtenu avec la lipase pancréatique de porc (Chopineau *et al.*, 1988). Cependant, Akoh et Mutua (1994) ont démontré que lors de la synthèse d'oléate de méthyl-1-glucose dans un mélange benzène/pyridine (2/1, v/v), la lipase de *Candida antarctica* a permis d'atteindre le meilleur rendement de conversion de l'acide gras (76 %) pour un même temps de réaction. De la même manière, Min Sin *et al.* (1998) ont obtenu le meilleur rendement de conversion du fructose (61 %) lorsque la réaction de transestérification est catalysée par la lipase de *Pseudomonas sp.*

Dans les applications industrielles, l'immobilisation des enzymes offre plusieurs avantages comparée à l'utilisation d'enzymes solubles. En effet, une meilleure stabilité de l'activité enzymatique est observée. Ainsi, Redmann *et al.* (1997) ont montré que, dans les mêmes conditions, la réaction de synthèse d'esters de glucose et d'acide gras par estérification directe aboutissait à des rendements de conversion du donneur d'acyle de l'ordre de 55 % dans le cas d'enzymes immobilisées alors que la réaction n'a pas lieu lorsqu'on utilise des enzymes libres. Le même résultat a été obtenu par Akoh et Mutua (1994) et a été expliqué par la grande surface d'échange disponible dans le cas des enzymes immobilisées par rapport aux enzymes libres. De plus, la nature du support d'immobilisation permettrait de retenir l'eau du milieu, augmentant ainsi l'activité de l'enzyme. L'immobilisation des enzymes mène habituellement à une meilleure stabilité thermique (Malcata *et al.*, 1992). Enfin, le support d'immobilisation permettrait à la lipase de retenir la quantité d'eau nécessaire à une conformation active appropriée (Garcia et *al.*, 1996, Halling, 1994).

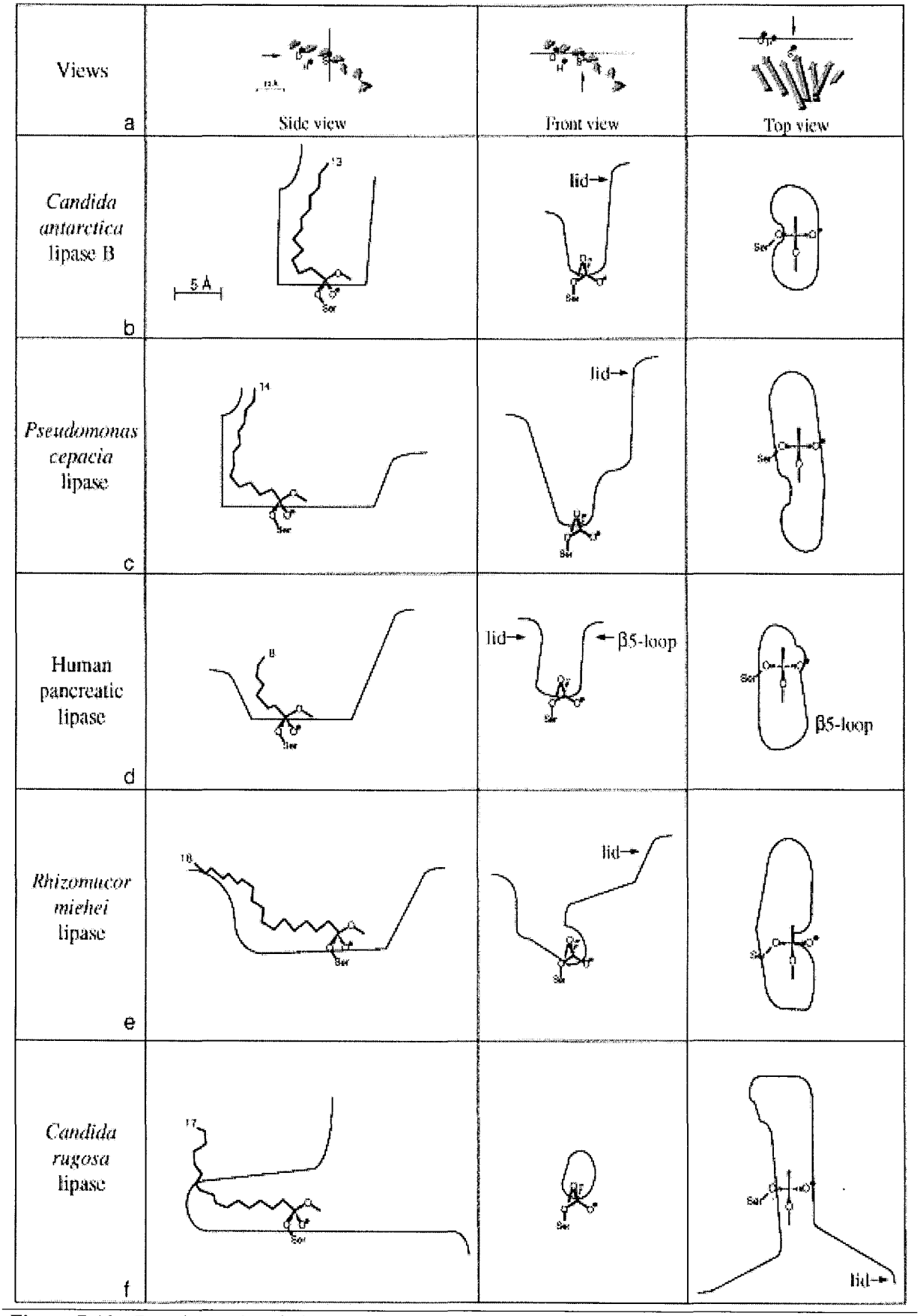


Figure I-13: Représentation de la structure du site actif et de la spécificité de six lipases vis-à-vis des donneurs d'acyle (d'après Pleiss *et al.*, 1998).

3.2.1.2. Nature des substrats et leurs concentrations

L'influence de la nature et de la concentration des substrats sur la synthèse enzymatique des sucroesters a été étudiée et considérée comme un paramètre clé dans les performances et la sélectivité de la réaction.

Le **Tableau I-11** résume les travaux de Ducret *et al.* (1995) qui ont porté sur l'effet de plusieurs donneurs d'acyles et sucres ainsi que leurs rapports molaires sur le rendement de conversion de l'acide gras et le pourcentage de distribution ou sélectivité vis-à-vis des monoesters en présence de lipase immobilisée de *Candida antarctica.*

Tableau I-11: Effet de la nature et des concentrations des substrats sur les rendements de conversion du donneur d'acyle et la distribution des monoesters (d'après Ducret *et al.*, 1995).

Donneur d'acyle	Sucre	Rapport molaire Sucre/Donneur acyle	Temps réaction (h)	Conversion donneur acyle (%)	Monoesters (%)
A. laurique	Sorbitol	3/1	24	98.4	100
A. oléique	Sorbitol	3/1	24	98.8	92.2
A. érucique	Sorbitol	3/1	24	99.3	100
A. oléique	Fructose	1/1	24	93.2	71.3
Oléate méthyle	Fructose	1/1	7	60.1	89.2
A. caprylique	Sorbitol	1/1	7	42.0	100

- Nature du sucre

Bien que la synthèse chimique des sucroesters se fasse en particulier avec des disaccharides, le saccharose notamment, l'obtention des sucroesters par voie enzymatique se fait généralement avec des monosaccharides. En effet, la première synthèse enzymatique des sucroesters en milieu organique et utilisant des disaccharides n'a été réalisée qu'en 1988 par Riva *et al.*. Ces auteurs ont réalisé la synthèse de sucroesters avec trois sucres: maltose, lactose et saccharose, dans du DMF à 45 °C et en présence d'une protéase de *Bacillus subtilis.* Dans ce cas, le meilleur rendement de conversion du sucre a été obtenu avec le lactose (96 %).

Par la suite, les disaccharides les plus étudiés ont été le saccharose (Carrea *et al.*, 1989; Dordick *et al.*, 1993; Rich *et al.*, 1995, Sarney *et al.*, 1996) et à moindre degré le lactose (Sarney *et al.*, 1994; Ku et Hang, 1995) et le tréhalose (Woudenberg van Oosterom *et al.*, 1996, Hugon, 2000). La difficulté qui se pose lors de l'acylation des polysaccharides est leurs faibles solubilités dans les solvants hydrophobes habituellement utilisés en synthèse enzymatique de manière à maintenir une activité optimale de l'enzyme.

Par contre, de nombreuses réactions d'acylation de monosaccharides ou de sucres alcools ont été réalisées ces dernières années (**Tableau I-12**). D'après les résultats obtenus dans la littérature, la nature du substrat osidique joue un rôle important sur les performances de la réaction de synthèse des sucroesters. En effet, elle impose la nature de la réaction lorsque le sucre est modifié et détermine le choix du solvant de synthèse (différence de solubilité).

La nature du sucre peut également avoir un effet sur les propriétés tensioactives du sucroesters. Ainsi, il a été reporté que plus le sucroester est hydrophile plus il peut abaisser les tensions superficielles air/eau (Charlemagne et Legoy, 1995; Akoh, 1992). De même, Ducret *et al.* (1995) ont montré que le monooléate de xylitol présente une concentration micellaire critique (CMC) 2 et 2.5 fois plus faible que le monooléate de fructose et de glucose respectivement. Ces résultats seraient dus à des interactions hydrophobes entre les sucroesters et les molécules d'eau du milieu.

En conclusion, le choix du sucre constitue un paramètre important non seulement dans les performances de la réaction de synthèse enzymatique des sucroesters mais également dans les propriétés finales recherchées.

- Nature du donneur d'acyle

De la même manière que pour le sucre, la nature du donneur d'acyle utilisé pour la synthèse des sucroesters a un impact important aussi bien sur les performances de la réaction (vitesse de réaction, sélectivité vis-à-vis des mono- et diesters, rendement en sucroesters...) que sur les propriétés tensioactives de la molécule synthétisée (Scheckermann *et al.*, 1995).

Tableau I-12: Résumé des principaux sucres et polyols acylés par synthèse enzymatique.

Références	Substrats	Conditions et résultats
Adelhorst et al. (1990)	▪ Ethyl et butylglucose ▪ Acide gras divers	▪ Milieu fondu ▪ Lipase de *Candida antarctica* immobilisée ▪ 70 °C/24 h, 0.01 bar ▪ Rendement = 85 à 90 %
Janssen et al. (1991)	▪ Sorbitol ▪ Acide oléique	▪ 2-pyrrolidone/eau ▪ Tampon phosphate ▪ Lipase de *Chromobacterium viscosum* ▪ Excès d'acide oléique ▪ 40 °C/74 h ▪ Rendement = 80 %
Khaled et al. (1991 a, b)	▪ Fructose ▪ Acide oléique	▪ Méthyl-2 butanol-2 ▪ Lipozyme de *Mucor miehei* immobilisée ▪ Acide gras/Sucre = 10 (mol/mol) ▪ 50 °C/6 h ▪ Recyclage en continu ▪ Rendement = 50 %
Guillardeau et al. (1992)	▪ Fructose ▪ Acide caprylique	▪ Milieu fondu ▪ Lipozyme *Mucor miehei* immobilisée ▪ Acide gras/sucre = 10 (mol/mol) ▪ 60 °C/24 h ▪ Rendement = 25 %
Fabre et al. (1993)	▪ Butylglucose ▪ Acides laurique et stéarique	▪ Hexane ▪ Lipozyme R (Novo) immobilisée ▪ Acide gras/sucre = 2 (mol/mol) ▪ 70 °C/3 jours ▪ Rendement = 80 %
Oguntimein et Schmid (1993)	▪ Fructose, glucose ▪ Acide stéarique	▪ Méthyl-2 butanol-2 ▪ Lipase de *Candida* SP382 et de *Mucor miehei* immobilisée ▪ 40 °C/24 h ▪ Rendement = 10 à 20 %
Fregapane et al. (1994)	▪ Glucose pentaacétate ▪ Esters méthyliques d'acide oléique	▪ Chloroforme, benzène, pyridine ▪ Lipase de *Candida antarctica* ou *cylindraceae* ▪ Ester/sucre = 1 à 1.6 (mol/mol) ▪ 55 °C/ 48 h ▪ Rendement = 6 à 52 %
Ducret et al. (1995)	▪ Sorbitol, glucose ▪ Acide oléique	▪ Méthyl-2 butanol-2, acétonitrile, acétone ▪ Lipozyme et Novozym ▪ Acide gras/sucre = 1 (mol/mol) ▪ 60 °C/24 h, 100-550 mbar reflux ▪ Rendement = 3 à 27 % (100 % monoesters)

Nous avons vu précédemment que les lipases présentent une spécificité liée à la structure du donneur d'acyle. Cette propriété a amené de nombreux auteurs à étudier l'effet de plusieurs types de donneurs d'acyles sur l'activité de l'enzyme et par conséquent sur les performances de la réaction. Parmi les donneurs d'acyle utilisés, on distingue les triglycérides, les acides gras et

leurs esters. Les principaux paramètres étudiés ont été la longueur de chaîne carbonée, le degré de substitution et l'insaturation du donneur d'acyle.

En 1989, Björkling *et al.* ont réalisé la synthèse de 6-O-monoesters de glucose et d'acide gras par transestérification entre l'éthylglucopyranoside et divers acides gras avec la lipase libre de *Candida antarctica*. Cette enzyme a montré une faible spécificité vis-à-vis des donneurs d'acyle étudiés. Ainsi, les rendements de conversion en 6-O-monoesters n'augmente que de 10 % en allant de 8 à 18 atomes de carbones. De la même manière, l'insaturation du donneur d'acyle ne semble pas avoir d'effet sur la spécificité de la CAL-B libre. En effet, on obtient un rendement de conversion de 96 et 92 % dans le cas de l'acide stéarique et l'acide oléique respectivement.

Des résultats similaires ont été obtenus par Fregapane *et al.* avec la lipase de *Rhizomucor miehei* (1991). En effet, on a montré que le taux de conversion de l'isopropylidène xylose en ester de xylose varie faiblement lorsqu'on augmente la longueur de chaîne carbonée de l'ester méthylique d'acide gras et en présence d'insaturation.

Cao *et al.* (1997), quant à eux, ont étudié l'effet de la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle et de l'insaturation dans l'acétone sur le rendement de conversion final en monoesters de glucose et d'acide gras. Les résultats obtenus ont montré que les meilleurs rendements sont obtenus avec les acides gras saturés avec une longueur de chaîne allant de 12 à 18 carbones. En effet, 87 et 92 % de conversion ont été obtenus au bout de 72 h de réaction avec les acides palmitique et stéarique respectivement contre seulement 53 % avec l'acide oléique. De faibles rendements de conversion ont également été obtenus avec les acides gras à courte chaîne. Ces résultats ont été expliqués par une préférence de la lipase CAL-B des substrats hydrophobes et par la faible solubilité dans l'acétone des monoesters à longue chaîne qui précipitent; ce qui permet de diriger la réaction en faveur de leur synthèse.

En 1999, ces mêmes auteurs ont étudié la synthèse catalysée par CAL-B dans le méthyl-2 butanol-2 de palmitate de glucose et ont déterminé l'effet de plusieurs dérivés de l'acide palmitique sur la typosélectivité de la lipase et le rendement de conversion final en sucroesters. Dans ce cas les rendements de conversion les plus élevés ont été atteints avec l'acide palmitique libre (76 %) et l'ester de vinyle correspondant (80 %). Cette différence de performance de la réaction a été expliquée par l'effet des sous-produits générés lors de la

réaction d'estérification (eau, méthanol, acétaldéhyde...) sur l'activité enzymatique de la lipase (Millqvist *et al.*, 1996; Weber et Faber, 1997).

De même, Degn *et al.* (1999) ont montré que la synthèse d'esters de glucose et d'acides gras dans le *tert*-butanol donne des résultats variables en fonction de l'enzyme utilisée et de sa spécificité vis-à-vis des acides gras étudiés. Le **Tableau I-13** montre que la lipase de *Candida antarctica* présente une activité avec de meilleures vitesses initiales que celle de *Mucor miehei* quelle que soit la longueur de chaîne carbonée de l'acide gras.

Tableau I-13: Vitesses initiales de la réaction d'estérification du glucose avec des donneurs d'acyle de différentes longueurs de chaîne carbonée (d'après Degn *et al.*, 1999).

Donneur acyle	**Vitesse initiale* (µmol/mn.g enzyme)**	
	Candida antarctica	***Mucor miehei***
2	1.6 ± 0.4	Pas de réaction
4	3.4 ± 0.4	0.15 ± 0.01
6	3.9 ± 0.1	0.16 ± 0.03
8	3.4 ± 1.0	0.17 ± 0.03
10	3.5 ± 0.2	0.16 ± 0.05
12	3.4 ± 0.3	0.24 ± 0.03
14	3.7 ± 0.4	0.25 ± 0.02
16	3.8 ± 0.3	0.30 ± 0.04
18	4.3 ± 0.4	0.45 ± 0.03
20	4.0 ± 0.4	0.41 ± 0.06

* Moyenne de deux expériences ± erreur standard de la moyenne.

L'étude de l'effet de la longueur de chaîne des esters vinyliques, utilisés comme donneurs d'acyle, sur le rendement de conversion du fructose et la sélectivité vis-à-vis des mono- et di-esters a été réalisée dans la pyridine anhydre par Min Sin *et al.* (1998). Ces auteurs ont obtenu les meilleurs rendements de conversion du fructose avec des longueurs de chaîne carbonées intermédiaires (C12-C14) et une sélectivité totale vis-à-vis des monoesters à partir de 12 carbones. Dans les mêmes conditions opératoires, la réaction n'a pas eu lieu avec l'éthylhexanoate de vinyle.

L'influence du donneur d'acyle sur les performances de la réaction a également été déterminée par Coulon *et al.* (1999). Ceux-ci ont testé trois donneurs d'acyle: l'acide oléique, l'oléate de méthyle et l'huile de colza lors de la synthèse d'esters de fructose sous vide dans du méthyl-2 butanol-2. Les réactions d'estérification directe du fructose par l'acide oléique et de

transestérification dans le cas de l'oléate de méthyle et de l'huile de colza ont permis d'obtenir des rendements de conversion et des concentrations finales similaires. Cependant, les vitesses de réaction obtenues sont environ deux et trois fois plus élevées dans le cas de l'oléate de méthyle comparé à l'acide oléique et à l'huile de colza respectivement. Ces résultats ont été expliqués par l'accumulation des sous-produits formés pouvant inactiver l'enzyme. En effet, le méthanol généré avec l'oléate de méthyle est éliminé plus facilement que l'eau et l'acylglycérol générés respectivement avec l'acide oléique et l'huile de colza dans les conditions opératoires proposées.

Enfin, la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle a également un impact sur les propriétés tensioactives du sucroester. Ce facteur agit directement sur la valeur de la Balance Hydrophile Lipophile (BHL) du sucroester et entraîne ainsi des propriétés tensioactives et des applications variables (Poré, 1992). Il a ainsi été démontré que les esters vinyliques de fructose en C12 et C14 présentent les meilleures activités émulsifiantes (Min Sin *et al.*, 1998).

- Influence de la concentration des substrats

La concentration des substrats de la réaction est un facteur important dans la synthèse enzymatique des sucroesters car la sélectivité vis-à-vis des produits formés et l'activité de l'enzyme en dépendent. Dans la littérature portant sur la synthèse des sucroesters, on raisonne en terme de rapport molaire plutôt que de concentrations des substrats et le plus souvent un excès en substrat acylant est préféré pour améliorer les vitesses initiales de réaction (Adlercreutz et Mattiasson, 1997).

La synthèse de 6-O-octanoylglucose catalysée par la lipase immobilisée de *Candida antarctica* dans l'acétonitrile a été réalisée par Ljunger *et al.* (1994). L'étude de l'influence des concentrations en substrat a montré qu'il existe une concentration optimale en acide octanoïque à environ 8 % (v/v) (rapport molaire acide octanoïque/glucose = 10/1) permettant d'atteindre une conversion totale du glucose en monoesters. Au-delà de 8 % d'acide octanoïque, on obtient de faibles rendements de conversions avec formation de diesters.

Les résultats obtenus par Arcos *et al.* (1998a), lors de la synthèse de 6-O-acylglucose esters catalysée par CAL-B dans l'acétone, ont montré que des concentrations en acide gras < 400 mg/ml favorisent des réactions rapides. Cependant, la tendance s'inverse au-delà de cette

concentration, sans doute, à cause de l'augmentation de la viscosité du milieu et par conséquent la diminution des vitesses de réaction liée à un mauvais transfert de matière au niveau du microenvironnement de l'enzyme.

La concentration des substrats peut être fixée en fonction de l'objectif à atteindre selon que l'on s'intéresse aux concentrations finales, aux monoesters, aux esters supérieurs ou aux rendements de conversion. En effet, il a été démontré qu'une augmentation de la concentration initiale du donneur d'acyle permet une meilleure activation de l'enzyme avec des vitesses de réaction élevées mais ceci se fait la plupart du temps aux dépens de la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis des mono- et di-esters (Chevandier *et al.*, 1997). De plus, les substrats résiduels constituent, dans ce cas, une difficulté lors de l'étape de purification (Coulon *et al.*, 1999).

Généralement, deux profils de l'évolution des rendements de conversion ont été observés dans la littérature en fonction de la nature du biocatalyseur. Le premier a été observé avec la lipase de *Rhizomucor miehei* et montre qu'une augmentation de la concentration du donneur d'acyle permet d'améliorer le rendement de conversion du fructose en caprylate ou oléate de fructose (Guillardeau *et al.*, 1992; Khaled *et al.*, 1992; Scheckermann *et al.*, 1995). Le deuxième profil, rencontré avec la lipase de *Candida antarctica*, correspond à une augmentation du rendement de conversion jusqu'à une certaine concentration en donneur d'acyle (concentration optimale) au-delà de laquelle on assiste à une chute du rendement de conversion (Mukesh *et al.*, 1993; Mutua et Akoh, 1993; Humeau *et al.*, 1998; Soultani *et al.*, 2001). L'inhibition enzymatique a été expliquée par deux phénomènes; soit par une acidification du milieu aqueux présent dans le microenvironnement de l'enzyme (Karra-Chaabouni *et al.*, 1996) soit par la formation d'une barrière hydrophobe empêchant le substrat hydrophile d'accéder au site actif (Coulon, 1997).

La concentration en sucre joue également un rôle dans les performances de la réaction. La tendance générale montre qu'un excès de sucre dans le milieu favorise la formation de monoesters (Ljunger *et al.*,1994; Ducret *et al.*, 1995). Un excès de sucre à une concentration supérieure à sa solubilité dans le solvant de synthèse a souvent été utilisé pour augmenter l'activité enzymatique (Coulon *et al.*, 1997; Arcos *et al.*, 1998a). La présence de sucre solide dans le milieu serait favorable à une bonne activité de l'enzyme (Rich *et al.*, 1995; Coulon, 1997).

3.2.1.3. Teneur et activité de l'eau

La teneur en eau est le paramètre le plus important affectant l'activité enzymatique dans les solvants organiques indépendamment de la nature du solvant lui-même. Elle peut influencer le rendement de conversion des substrats à l'équilibre ainsi que la dispersion et la stabilité des enzymes. Plusieurs études indiquent, en effet, que la structure et l'activité des lipases dépendent fortement de l'eau liée (Gorman et Dordick, 1992; Zaks et Klibanov, 1988a).

De petites quantités d'eau dans le mélange réactionnel sont essentielles pour maintenir l'activité enzymatique tandis qu'une augmentation de la quantité d'eau affectera de manière défavorable l'équilibre. Afin de pouvoir utiliser efficacement le potentiel de l'enzyme pour des réactions de synthèse, le niveau optimum de l'eau doit être maintenu tout au long de la réaction (Halling, 1994; Halling, 1997; Wehtje *et al.*, 1997a et 1997b). Ceci peut exiger différentes teneurs en eau à différentes étapes du procédé/réaction. Ceci a été démontré préalablement en utilisant la lipase de *Pseudomonas* dans une réaction d'estérification (Svensson *et al.*, 1994). Cette enzyme nécessite une activité d'eau élevée pour son activité catalytique. Pour cela, le milieu a été maintenu à une a_w de 0,75 au début de la réaction. Par contre à la fin de la réaction, le rendement a été augmenté en abaissant l'activité de l'eau.

En 1991, Gutman et Shapira avaient déjà étudié l'effet de l'ajout d'eau dans le milieu sur la vitesse de la réaction d'estérification du butanol par l'acide butyrique dans l'hexane avec la lipase de *Rhizomucor miehei*. Ces auteurs ont montré que lorsqu'on augmente la concentration initiale en eau, la phase d'activation de l'enzyme tend à disparaître. Entre 0 et 5 g/l, l'hydratation de l'enzyme favorise son activité alors que pour des valeurs allant jusqu'à 10 g/l on assiste à une chute de la vitesse de réaction à cause de l'agglomération de l'enzyme. Pour des concentrations plus élevées en eau, une reprise des vitesses de réaction a été constatée sans doute à cause de la formation d'un système biphasique.

En réalisant l'estérification par voie enzymatique d'acides gras avec L-α-glycérophosphatidylcholine en milieu fondu, Kim *et al.* (2000) ont déterminé une relation entre l'activité de l'eau du Lipozyme IM de *Mucor miehei* et la quantité de DMF utilisé comme cosolvant organique dans le milieu de synthèse (**Figure I-14**). Ces auteurs ont montré que d'une part, de faibles a_w ne permettent pas à l'enzyme d'avoir une bonne conformation pour la réalisation de la synthèse. D'autre part, un excès d'eau déplace l'équilibre

thermodynamique dans le sens inverse de la synthèse (hydrolyse). Des conditions optimales de fonctionnement de cette enzyme ont été déterminées. Ces conditions consistent à travailler avec 5 à 10 % (v/p) de DMF et de maintenir a_w du biocatalyseur à des valeurs de l'ordre de 0.3 à 0.6.

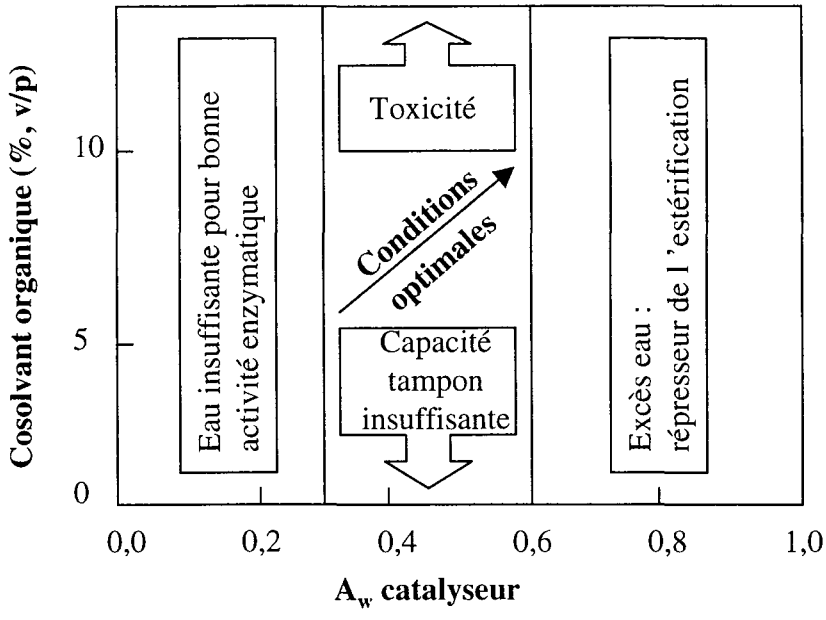


Figure I-14: Effet de l'a_w du catalyseur sur la réaction d'estérification d'acide gras et de glycérophosphatidylcholine (Kim et *al.*, 2000)

Afin de contrôler l'activité de l'eau dans les milieux organiques, plusieurs méthodes ont été proposées. La plupart des études réalisées à ce propos sont basées sur l'utilisation de sels qui permettent d'obtenir une activité de l'eau bien définie (Greenspan,1977; Goderis *et al.*, 1987). La solution de sel saturée peut être employée pour ajuster l'activité de l'eau par l'intermédiaire de la phase vapeur non seulement au début (Valivety et *al.*, 1992) mais également tout au long de la réaction dans laquelle l'eau est produite ou consommée (Dudal et Lortie, 1995). L'utilisation de cette méthode pour contrôler en continu l'activité de l'eau n'est pas pratique parce que le temps d'équilibration est parfois plus long que la vitesse de réaction.

Une autre méthode a été développée et consiste à utiliser des solutions de sel saturées dans un compartiment d'une membrane de silicone et le milieu réactionnel dans l'autre compartiment, l'eau étant transférée à travers la membrane (Kvittingen *et al.*, 1992, Wehtje *et al.*, 1993).

Cette technique de contrôle de l'eau a été appliquée par Virto *et al.* (2000). Ces auteurs ont étudié l'influence de l'activité de l'eau dans le méthyl-*tert*-butyle éther (MTBE) sur l'activité

de la lipase de *Candida antarctica*, le rendement de conversion de dihydroxyacétone (DHA) et le rapport molaire des produits à l'équilibre. La **Figure I-15** montre qu'une augmentation de l'a_w dans un intervalle allant de 0.06 à 0.75 provoque une diminution du rendement de conversion du DHA et une augmentation du rapport molaire monoester/(monoester + Diester). Une valeur optimale de a_w de l'ordre de 0.33 a permis d'atteindre l'activité de la lipase la plus élevée d'environ 125 µmol/mn/mg enzyme.

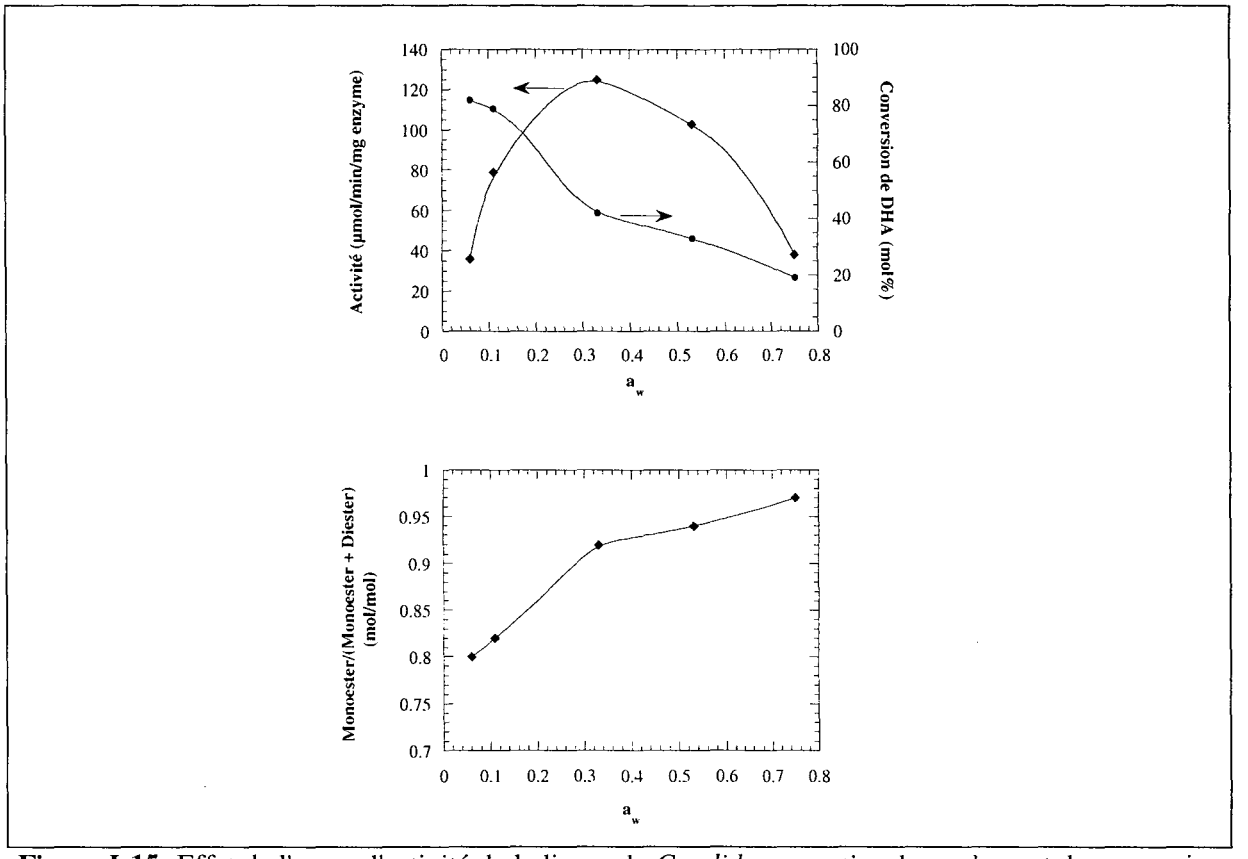


Figure I-15: Effet de l'a_w sur l'activité de la lipase de *Candida antarctica*, le rendement de conversion en DHA et le rapport molaire des produits au bout de 72 h de réaction d'estérification du DHA (0.4 mmol) avec l'acide laurique (2 mmol) dans 4 ml de MTBE à 40 °C (d'après Virto *et al.*, 2000)

D'autres techniques d'élimination de l'eau ont été proposées afin d'améliorer les performances de la réaction. Il s'agit des techniques d'évaporation/pervaporation (Yahya *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2001) et l'ajout de tamis moléculaire.

Les rendements de conversion des substrats ont pu être améliorés par ajout de tamis moléculaire. Certains auteurs ont montré que l'activité et/ou la stabilité des enzymes est affectée par la présence de tamis moléculaire (Ergan *et al.*, 1988; Monot *et al.*, 1991; Bloomer *et al.*, 1992). Wehtje *et al.* (1997a) ont ainsi démontré que la présence de tamis moléculaire permet d'améliorer les rendements à l'équilibre. En effet, le rendement de conversion

augmente de 72 à 95 % avant et après addition de tamis moléculaire respectivement. Cette augmentation a été accompagnée d'une diminution importante de la teneur en eau qui passe de 2,6 à 0,2 mg/ml.

Le **Tableau I-14** montre l'évolution des vitesses initiales obtenues avec la réaction de transestérification de l'acide laurique et du géraniol catalysée par la lipase immobilisée de *Mucor miehei*. On constate que l'enzyme utilisée dans un milieu contenant du tamis moléculaire peut être recyclée jusqu'à 4 fois tout en maintenant une bonne activité par rapport au milieu en absence de tamis moléculaire. De plus, on observe une chute moins importante des vitesses initiales comparées au milieu sans tamis moléculaire.

Tableau I-14: Comparaison entre les vitesses initiales et les rendements de conversion obtenus dans les mêmes conditions avec et sans tamis moléculaire (d'après Lima *et al.*, 1995).

	Sans Tamis moléculaire		**Avec tamis moléculaire**	
Essai	Vitesse initiale ($M/s.10^4$)	Rendement (%)	Vitesse initiale ($M/s.10^4$)	Rendement (%)
1	2.7	92.0	2.7	92.0
2	2.4	84.0	2.6	85.6
3	1.7	74.2	2.3	83.6
4	0.6	60.0	1.8	78.0

L'utilisation de tamis moléculaire a également été mise à profit dans le contrôle de l'eau par circulation d'air. Cette technique proposée par Khan *et al.* (1990) et reprise par Jeong *et al.* (1997) et Colombié *et al.* (1998), consiste à éliminer l'eau produite au cours de la réaction en faisant circuler un courant d'air séché sur tamis moléculaire.

L'élimination de l'eau et de l'alcool produits au cours de la réaction d'estérification et de transestérification respectivement peut également être réalisée en travaillant sous vide. Cette technique est utilisée lorsqu'on veut améliorer l'évaporation d'un constituant tout en maintenant la température constante. Ce procédé a été largement étudié vue sa simplicité (Guillardeau *et al.*, 1992; Barfoed et Skagerlind, 1994; Ducret *et al.*, 1995; Coulon, 1997; Hugon, 2000).

En conclusion, la **Figure I-16** montre que l'a_w dépend de différents facteurs dont il faut tenir compte lors de la prédiction de l'activité du biocatalyseur. En effet, des équilibres se font entre

les différentes phases et l'effet de compétition entre l'eau apportée par les différents composés doit être considérée (Halling, 1994).

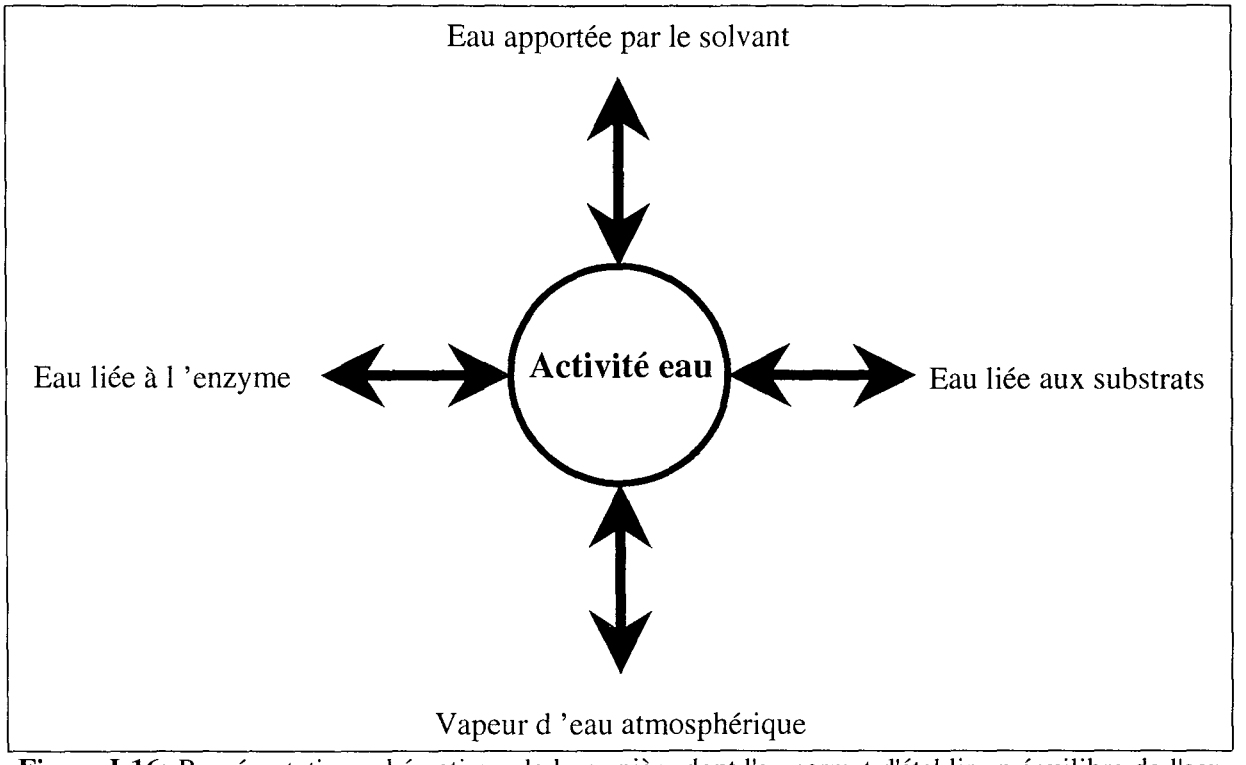


Figure I-16: Représentation schématique de la manière dont l'a_w permet d'établir un équilibre de l'eau entre les divers états et phases (d'après Halling, 1994).

3.2.1.4. Solvant de synthèse

La réalisation des réactions biocatalytiques en milieu biphasique eau-solvant organique ou solvant organique pur ou en mélange a été démontrée par plusieurs auteurs (Laane *et al.*, 1987; Zaks et Russell., 1988b; Carrea *et al.*, 1995; Sarney *et al.*, 1997; Garcia-Alles et Gotor., 1998).

L'utilisation de solvants organiques peut, toutefois, présenter certains inconvénients. En effet, en présence de certains solvants l'enzyme peut être dénaturée ou inhibée provoquant ainsi une diminution des productivités et des rendements finaux de conversion des substrats. Les premiers auteurs à s'être intéressés à l'influence des solvants organiques sur les réactions de biocatalyse sont Brink et Tramper en 1985. Ces auteurs ont étudié l'influence de la polarité des solvants, mesurée grâce au paramètre de solubilité δ, sur l'activité enzymatique.

Cette approche a été critiquée par Laane *et al.* (1985) du fait du manque de précision de la mesure et ont proposé de prendre plutôt le coefficient de partage, log *P*, comme indicateur de

la polarité des solvants. Ces mêmes auteurs ont étudié l'effet de l'hydrophobicité des solvants sur l'activité catalytique de biocatalyseurs de différentes origines (**Figure I-17**). L'hydrophobicité du solvant organique possède donc un effet significatif sur l'activité catalytique des lipases avec des effets plus ou moins importants suivant l'origine de l'enzyme.

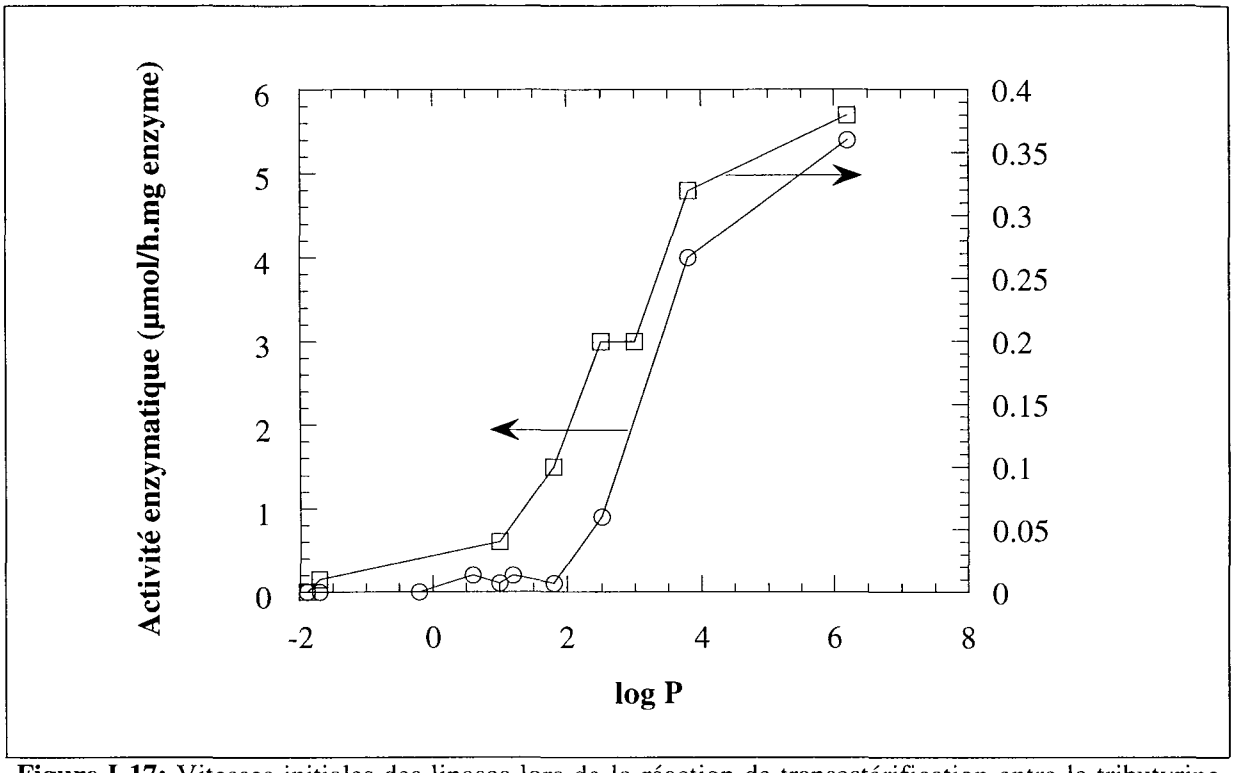


Figure I-17: Vitesses initiales des lipases lors de la réaction de transestérification entre la tributyrine et l'heptanol dans des solvants organiques de différentes valeurs de log *P*. (○) lipase de levure; (□) Lipase de moisissure.

L'étude menée par Bousquet *et al.* (1999) sur la synthèse d'esters de glucosides et d'acides gras insaturés catalysée par la lipase immobilisée de *Candida antarctica* a montré que le solvant le plus adapté pour ce genre de synthèse est le méthyl-2 butanol-2 dont la valeur de log *P* est de 1.30. En effet, ce solvant a permis d'obtenir le rendement de conversion le plus élevé de l'acide gras (62 %) par rapport aux autres solvants utilisés.

Dans la plupart des synthèses réalisées avec la lipase de *Candida antarctica*, on a constaté que le solvant retenu est le méthyl-2 butanol-2 (Faber, 1993, Coulon, 1997, Hugon, 2000). En effet, ce solvant ne constitue pas un substrat potentiel pour cette lipase parce qu'il provoque un encombrement stérique au niveau du site actif (Ducret *et al.*, 1995). Selon Bousquet *et al.* (1999), il s'agit d'un solvant non toxique pouvant être utilisé dans des domaines telles que la pharmacologie et la cosmétologie. En outre, le méthyl-2 butanol-2 est largement utilisé parce

qu'il permet de solubiliser la majorité des substrats utilisés et ne provoque pas la dénaturation de la lipase (Khaled, 1990).

Un dernier facteur à prendre en considération lors du choix d'un solvant organique pour une synthèse en milieu non conventionnel est l'état de solvatation des substrats. En effet, cet état va intervenir aussi bien sur les constantes d'affinité pour le substrat que sur la régiosélectivité de l'enzyme. Dans le premier cas, plus un substrat est solvaté avant d'atteindre le site actif, plus il faudra d'énergie pour le désolvater avant sa fixation et plus la constante d'affinité de l'enzyme va diminuer (Wehtje et Adlercreutz, 1997b). L'effet de solvatation des substrats agit également sur la régiosélectivité des enzymes comme cela a été montré par Mac Manus et Vulfson (1997). On a ainsi montré que le phényl-6-O-trityl-β-D-glucopyranoside s'oriente différemment au niveau du site actif de la lipase de *Pseudomonas cepacia* selon qu'on travail dans un solvant hydrophile (acétone) ou hydrophobe (cyclohexane). Des résultats similaires ont été obtenus par Scheckermann *et al.* (1995) qui ont montré que la lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei* acylait le fructose en position 1 et 6 dans le méthyl-2 butanol-2 et en position 1 uniquement dans un solvant plus hydrophobe comme l'hexane.

3.2.1.5. Nature de la réaction

La plupart des synthèses des sucroesters reportées dans la littérature utilisent l'estérification directe (Seino et Uchibori, 1984; Therisod et Klibanov, 1986; Janssen *et al.*, 1991; Khaled *et al.*, 1992; Schlotterbeck *et al.*, 1993; Oguntimein *et al.*, 1993; Ikeda et Klibanov, 1993; Chevandier *et al.*, 1997; Arcos *et al.*, 1998a et b; Arcos *et al.*, 2001). Cette réaction de synthèse présentant un inconvénient majeur qui est la formation d'eau, certains auteurs ont réalisé des études comparatives des performances de la réaction de synthèse par estérification directe et transestérification.

Ainsi, Akoh et Mutua (1994) ont montré que la transestérification catalysée par la lipase de *Candida antarctica* SP382 dans un mélange benzène/pyridine permet d'atteindre des meilleurs rendements de conversion comparée à l'estérification directe du méthylglucose par l'ester éthylique de l'acide eicosapentaénoïque. Cependant, lorsqu'on utilise le méthyl-1-galactose ou l'octyl-1-glucose comme substrat osidique, les meilleurs résultats sont obtenus par estérification directe.

De même, la comparaison de la synthèse de l'oléate de fructose par estérification directe et transestérification a été reportée par Coulon *et al.* (1995) et a montré que les deux réactions permettent d'atteindre des vitesses initiales voisines mais des rendements de conversion 1.5 fois plus élevés dans le cas de la transestérification. En effet, 65 % de fructose sont convertis avec l'oléate de méthyle contre seulement 46 % avec l'acide oléique. De plus, durant la synthèse par estérification directe, la concentration en monooléate de fructose diminue au bout de 10 heures de réaction sans doute à cause de l'accumulation de l'eau dans le milieu et par conséquent l'hydrolyse des produits formés.

Lors de la synthèse d'esters de tréhalose et d'acide gras catalysée par la lipase de *Candida antarctica* dans le méthyl-2 butanol-2, Hugon (2000) a montré que la réaction d'estérification directe aboutit à une faible prédominance des monoesters avec les acides gras à courte chaîne carbonée (C5-C7). Cette tendance s'inverse lorsqu'on augmente la longueur de chaîne avec lesquels on obtient une prédominance des diesters. Par contre, dans le cas de la transestérification on obtient majoritairement des monoesters avec les esters de plus de 12 carbones. De plus, il a été constaté que les meilleurs rendements de conversion et concentrations finales en produits sont atteints avec les acides en C7 à C9 en estérification directe. Alors que dans le cas de la transestérification, les meilleurs résultats sont obtenus avec les esters en C5 à C8.

3.2.1.6. Influence des conditions opératoires

Quelques travaux ont été consacrés à l'étude de l'influence des conditions opératoires sur la réaction de synthèse des sucroesters. Dans ce paragraphe nous nous intéresserons particulièrement à l'influence de la température et de la pression.

- Influence de la température

La température est un paramètre très important dans la réaction de synthèse des sucroesters car elle intervient à plusieurs niveaux (Kuchner et Arnold, 1997) et plus particulièrement sur:

- l'activation et la dénaturation de l'enzyme;
- la solubilité des différents substrats et produits;
- la viscosité du milieu.

La diffusion des substrats vers l'enzyme affecte l'activité de la lipase et peut être facilitée à température élevée. Cependant, les températures trop élevées doivent être évitées en raison de la dénaturation de la lipase. En effet, la synthèse d'alkylglycosides d'acides gras catalysée par la lipase de *Candida antarctica* SP382 a été étudié à différentes températures par Mutua et Akoh (1993). Ces auteurs ont observé que la température optimale d'activité de cette lipase est de 55 °C dans un mélange benzène/pyridine. Une température plus élevée provoque une chute des rendements de conversion à cause de la dénaturation de l'enzyme, alors qu'à des températures plus faibles, la solubilité des substrats diminue et l'enzyme devient moins active. La même température optimale a été déterminée pour la lipase immobilisée de *Mucor miehei* lors de la synthèse de caprylate et d'oléate de fructose (Guillardeau *et al.*, 1992; Khaled *et al.*, 1992).

Coulon *et al.* (1997) ont observé, lors de la synthèse sous vide d'oléates de fructose par transestérification catalysée par la lipase immobilisée de *Candida antarctica*, que la vitesse initiale et les concentrations en sucroesters augmentent en faisant varier la température de 30 à 90°C. L'augmentation des concentrations finales a été expliquée par un déplacement de l'équilibre dû à l'élimination par évaporation du méthanol formé. Une concentration en oléates de fructose de 50 g/l et une vitesse initiale de 90 g/l.h ont été obtenues à 90 °C.

La température peut également affecter la sélectivité de l'enzyme. En effet, l'influence de la température (22, 45 et 65 °C) a été étudiée sur l'énantiosélectivité de la lipase de *Pseudomonas sp.* lors de la synthèse d'alcools primaires hétérocycliques par transestérification (Faber *et al.*, 1993). On a constaté que plus on augmente la température, plus la sélectivité de la lipase diminue.

Arcos *et al.* (1998a) ont étudié l'effet de la température dans un intervalle allant de 5 à 60 °C sur la synthèse sélective de 1,6-diacyl fructofuranoses dans l'acétone avec Novozym 435. Ces auteurs ont montré que l'augmentation de la température permet d'améliorer les vitesses initiales et les rendements de conversion du fructose. De plus, une meilleure sélectivité vis-à-vis des monoesters est obtenue lorsqu'on augmente la température sans doute à cause de l'augmentation de la solubilité du fructose dans l'acétone. Par contre, afin de diriger la réaction vers la formation de diesters, il a fallu travailler à faible température (5 °C). Ce résultat a été expliqué par une différence de vitesse de réaction entre la réaction de synthèse des monoesters

liée à la solubilité du fructose dans le milieu et la vitesse de la réaction de synthèse des diesters. La formation d'esters supérieurs est évitée dans ces conditions à cause des fortes énergies d'activation associées à l'estérification des groupements hydroxyles secondaires
De la même manière, la synthèse sélective de 6-O-acylglucose esters a été réalisée par Arcos *et al.* (1998b) en faisant varier la température entre 5 et 60 °C. Ces auteurs ont remarqué que lorsqu'on travaille à température ambiante ou légèrement supérieure, on assiste à une précipitation du monoacylglucose ester formé permettant ainsi de diriger la réaction dans le sens de la synthèse préférentielle des monoesters pendant 3-4 jour. A 5 °C, les réactions sont plus sélectives mais plus longues à cause des faibles vitesses initiales à basse température. Au-delà de 40 °C, les concentrations finales en sucroesters augmentent mais aux dépens de la sélectivité. En effet, la solubilité du monoester formé augmente avec la température et sa concentration se trouve ainsi affectée à cause de la formation des diesters.

La lipase immobilisée de *Candida antarctica* est capable de conserver son activité pendant 7 jours à une température allant jusqu'à 82 °C (Woudenberg-van Oosterom *et al.*, 1996). Des études menées sur la synthèse par transestérification d'octadécanol et de stéarate de palmityle a même montré que cette lipase peut rester active jusqu'à 130 °C sans changement significatif de conformation (Turner et Vulfson, 2000). Une activité optimale a été reportée à une température de 60 °C (Coulon, 1997, Yan *et al.*, 1999; Hugon, 2000).

- Influence de la pression

Les rendements obtenus avec les réactions d'estérification enzymatique en milieu organique peuvent être améliorés par élimination en continu des sous produits formés. Lorsque l'eau (ou l'alcool) est le seul composé volatil du milieu, il peut être éliminé par application d'un vide partiel au système (Napier *et al.*, 1996). L'élimination des sous produits formés permet ainsi de déplacer l'équilibre de la réaction vers la synthèse. Plusieurs travaux ont porté sur l'effet de la pression l'activité de l'enzyme et par conséquent sur les performances de la réaction.

La synthèse par estérification directe de caprylate de fructose catalysée par Lipozyme a été étudié à plusieurs pressions par Guillardeau *et al.* (1992). Ces auteurs ont montré qu'à pression atmosphérique, les rendements obtenus sont très faibles à cause de l'accumulation de l'eau formée. Un rendement maximum de 10,5 % est atteint à 160 mm Hg. Au-dessous de cette pression, le rendement chute. En effet, si la réaction est conduite à 60 mm Hg, on obtient

un rendement de seulement 8,4 %. Par conséquent, la pression semble avoir un effet sur l'eau d'hydratation du Lipozyme, qui exige environ 10 % de son poids en eau pour avoir une activité optimale de synthèse (Kao *et al.*, 1997).

Cette valeur optimale de pression n'a pas été obtenue dans le cas de l'estérification du 12-hydroxy stéarate avec l'octanol catalysée par la lipase de *Mucor miehei* (Ghosh et Bhattacharyya, 1998). La **Figure I-18** montre l'effet de la pression sur cette réaction de synthèse. Un rendement maximal est obtenu à 65 °C, 2-5 mm Hg et 10 % (p/p) de lipase au bout de 360 mn de réaction.

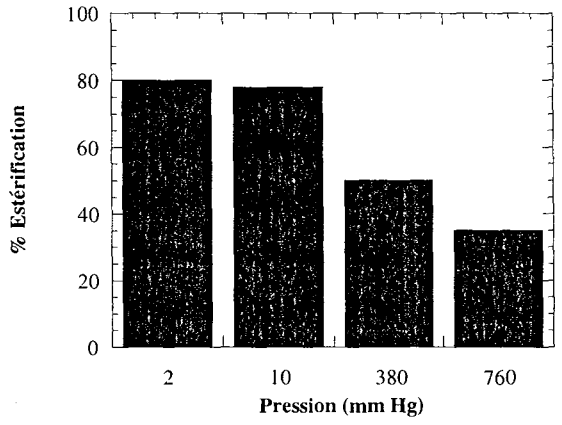


Figure I-18: Effet de la pression sur l'estérification catalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei* du 12-hydroxy stéarate avec l'octanol (d'après Ghosh et Bhattacharyya, 1998).

Ducret *et al.* (1995) ont également utilisé des réacteurs sous vide pour réaliser l'acylation du sorbitol par la lipase de *Candida antarctica*. Ces auteurs ont retenu une pression de 70 mbar qui leur permet de faire évaporer l'eau formée en même temps que le solvant de la réaction. Ce dernier est séché sur tamis moléculaire puis recyclé dans le réacteur. Dans ces conditions, un rendement de conversion du fructose de 90 % a été atteint.

Une diminution de la pression améliore aussi la concentration finale en sucroesters qui passe de 30 g/l sous pression atmosphérique à 50 g/l à 200 mbar lors de la transestérification du fructose et de l'oléate de fructose par la lipase immobilisée de *Candida antarctica* à 60 °C et dans du méthyl-2 butanol-2 (Coulon *et al.*, 1999). Ceci étant dû à une élimination du méthanol formé plutôt qu'à une inhibition de l'enzyme.

La synthèse de pélargonate de tréhalose a également été étudiée à différentes pressions avec la même lipase (Hugon, 2000). Les résultats obtenus montrent que la vitesse initiale n'est pas affectée de manière significative par une augmentation de pression allant de 200 mbar à 1 atm. Cependant, on assiste à une augmentation de la concentration finale en sucroesters, des rendements de conversion du tréhalose et de l'acide pélargonique ainsi qu'une augmentation des diesters aux dépens des monoesters lorsqu'on diminue la pression.

4- Conclusion

L'obtention des esters de sucre et d'acide gras du commerce se fait actuellement par voie chimique. Il s'agit d'une voie de synthèse permettant d'atteindre de bons rendements de conversion des substrats. Toutefois, elle porte essentiellement sur le saccharose comme substrat osidique et mène à un mélange de produits de degrés de substitution élevés sauf dans quelques cas où on arrive à synthétiser de manière "sélective" des sucroesters faiblement substitués (D.S. = 1 à 2). De plus, cette voie de production conduit à des produits colorés à cause des températures élevées auxquelles on opère et des propriétés peu définies limitant leur application dans des domaines aussi stricts que la pharmacologie et la cosmétique.

Par conséquent, la synthèse de ce type de molécules par voie enzymatique semble prometteuse. Plusieurs aspects de cette réaction ont été abordés dans la littérature et montrent principalement que les produits obtenus possèdent des structures mieux définies du fait de la spécificité des enzymes utilisées. Les meilleurs rendements de conversion au début de la réaction ont été obtenus avec des lipases immobilisées de *Mucor miehei* et de *Candida antarctica*. Les températures de synthèse sont généralement assez douces, ne provoquant pas la dégradation des produits formés (environ 60 °C). Les réactions de synthèse enzymatique aboutissent, la plupart du temps, à des rendements de conversion des substrats et des concentrations finales qui ne sont pas encore compétitives avec celles obtenues par voie chimique. Ces résultats sont dus en grande partie à l'absence de stratégie d'optimisation du réacteur enzymatique et des paramètres de la réaction. Le développement de ce procédé nécessite donc une étude plus approfondie des conditions opératoires tout en tenant compte de l'effet variation du volume pour passer à une éventuelle industrialisation de ces procédés.

III. Purification des esters de sucre et d'acide gras

La synthèse des sucroesters n'est jamais totale à cause de la réversibilité de la réaction. En effet, lorsqu'on atteint l'équilibre thermodynamique il subsiste, le plus souvent, dans le milieu réactionnel une certaine quantité de substrats résiduels. Le problème que nous cherchons à résoudre est l'obtention de sucroesters de pureté élevée avec le moins possible de traces de solvants organiques qui peuvent être toxiques et altérer le goût et la couleur de ces produits. Nous cherchons également à développer des méthodes de séparation non dégradantes de ces molécules et faciles à mettre en œuvre.

Selon la destination des sucroesters obtenus, un degré de pureté minimale est requis. En effet, le degré de pureté nécessaire à l'utilisation des sucroesters en cosmétique et en agro-alimentaire est beaucoup plus élevé que dans le cas des détergents. C'est ainsi que l'union européenne applique la directive 95/2 (78/663 anciennement) aux esters de saccharose (E473) utilisés comme émulsifiants en agro-alimentaire. Cette directive n'autorise pas plus de 5 % de sucre libre et 3 % d'acides gras libres dans la composition du sucroester et seulement quelques mg ou ppm de solvants par kg de produit.

La difficulté de la purification des esters de sucre et d'acide gras synthétisés réside dans la diversité des propriétés physico-chimiques de ces molécules. Il existe notamment une grande différence de solubilité des sucroesters dans les différents solvants susceptibles d'être utilisés pour leur extraction. Par conséquent, il est nécessaire de développer des protocoles de purification adaptés à chaque produit synthétisé.

La bibliographie fait état de plusieurs travaux de recherche sur la purification des esters de sucre et d'acide gras et plus particulièrement les esters de saccharose.

Ce chapitre consistera en une brève étude bibliographique sur les différentes méthodes utilisées dans la littérature pour la purification des sucroesters.

1- Elimination de l'enzyme et du solvant de réaction

La synthèse enzymatique des sucroesters utilise le plus souvent des enzymes immobilisées ce qui facilite leur recyclage et leur récupération par filtration (Ducret et *al.* 1995). Les enzymes sont ensuite lavées avec un solvant adapté afin d'éliminer toute trace de substrats ou de produits. Le biocatalyseur ainsi obtenu est stocké à +4 °C pour une éventuelle réutilisation.

Après séparation du biocatalyseur, le milieu de synthèse contient majoritairement le solvant de réaction. Au niveau industriel, la synthèse chimique emploie généralement des solvants relativement toxiques comme la diméthylformamide (DMF) et le diméthylsulfoxide (DMSO) qu'il faut éliminer avant la commercialisation du produit. En effet, la directive 95/2/EC n'autorise pas plus de 2 mg/kg de DMSO et pas plus de 1mg/kg de DMF dans la composition finale des sucroglycérides (E474) par exemple. L'élimination du solvant de réaction est réalisée le plus souvent par distillation à pression atmosphérique ou par évaporation sous vide (Khaled et *al.* 1991b).

2- Elimination du sucre

L'élimination du sucre se fait généralement soit par précipitation soit par extraction liquide-liquide. Toutefois, quelques tentatives de séparation par osmose inverse ont également été réalisées.

2.1. Extraction par précipitation

Il s'agit de la technique la plus utilisée pour l'élimination du sucre résiduel. Plusieurs essais de purification par précipitation sont répertoriés dans la bibliographie. Les travaux les plus intéressants sont présentés et analysés dans ce paragraphe.

La **Figure I-19** présente, à titre d'illustration, un protocole de séparation du sucre proposé par Hagge et *al.* (1966). La technique utilisée par ces auteurs consiste à ajouter un volume de solvant organique (chloroforme, 1-2 dichloroéthane, acétone ou chlorure de méthylène...) au moins égal à celui du milieu réactionnel afin de faire précipiter le saccharose. Cette opération

se fait à des températures variant entre 40 et 60 °C avec agitation. Ce procédé est plus efficace en termes de performances que celui consistant à faire évaporer le solvant de synthèse avant de procéder à l'étape de séparation du sucre résiduel

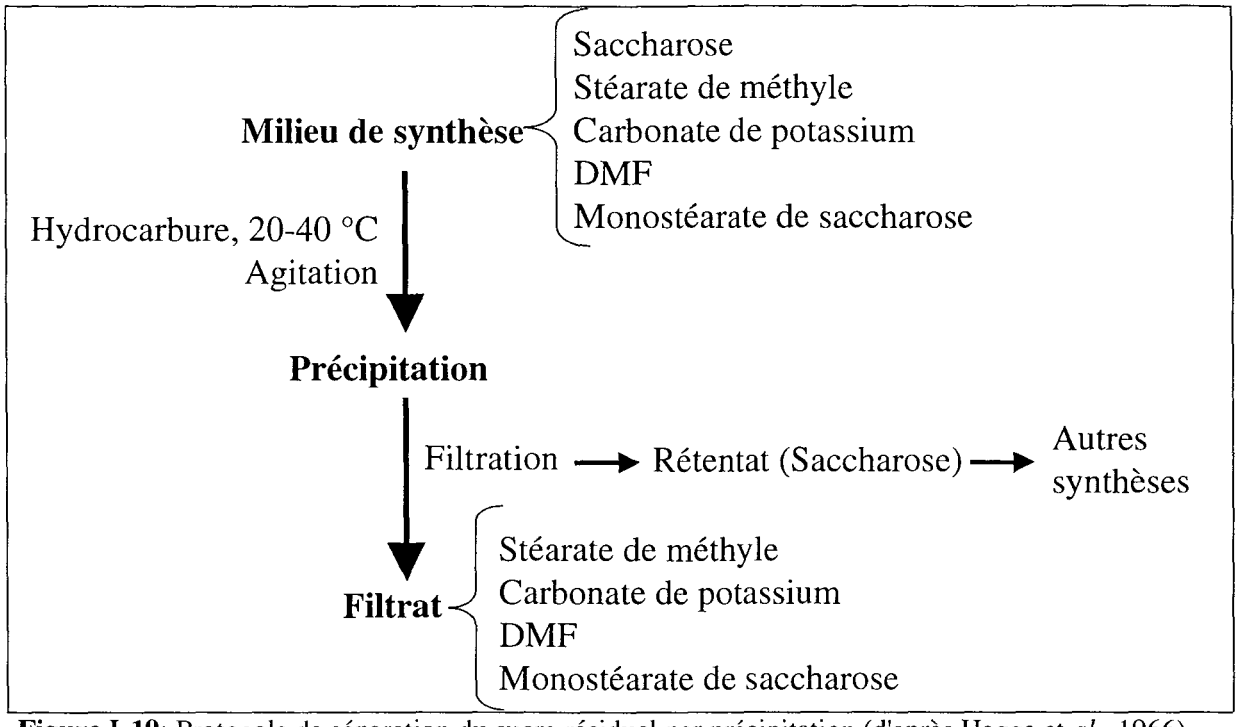


Figure I-19: Protocole de séparation du sucre résiduel par précipitation (d'après Hagge et *al.*, 1966).

Cette technique de séparation a également été utilisée par Koerts et *al.* (1990) qui ont fait précipiter le saccharose par addition d'éthanol dans le milieu.

Cette technique, tout en permettant l'élimination presque totale du sucre résiduel, présente souvent l'inconvénient de provoquer la précipitation simultanée des sucroesters ce qui diminue leur taux de récupération. De plus, on apporte un solvant supplémentaire au système, qu'on devra éliminer par la suite.

Des essais de séparation du sucre par précipitation ont également été réalisés par Coulon (1997). Ce dernier a repris un mélange de fructose/acide gras/sucroesters dans différents solvants organiques afin de faire précipiter le sucre. Dans ce cas, tous les solvants utilisés (hexane, n-butanone, heptane, acétate d'éthyle) n'ont permis qu'une précipitation partielle du fructose.

La séparation du sucre par précipitation semble dépendre de la nature du sucre. En effet, des résultats différents ont été obtenus selon que l'on désire séparer des monosaccharides (fructose) ou des disaccharides (saccharose).

2.2. Extraction liquide-liquide

Les techniques d'extraction liquide-liquide ont également été utilisées pour séparer le sucre résiduel des autres composants du milieu réactionnel. Ainsi, le protocole d'extraction proposé par Nobile et *al.* (1966) consiste à éliminer tout d'abord le solvant de synthèse (DMF). Ensuite, le résidu est solubilisé à 60-90 °C dans un solvant organique auquel on rajoute de l'eau à volume égal. Le saccharose résiduel est récupéré en totalité dans la phase aqueuse (**Figure I-20**).

Les températures retenues dans ce protocole de séparation ont été choisies de manière à faciliter d'une part le transfert du sucre dans la phase aqueuse et d'éviter d'autre part les pertes des sucroesters qui restent dissous dans la phase organique.

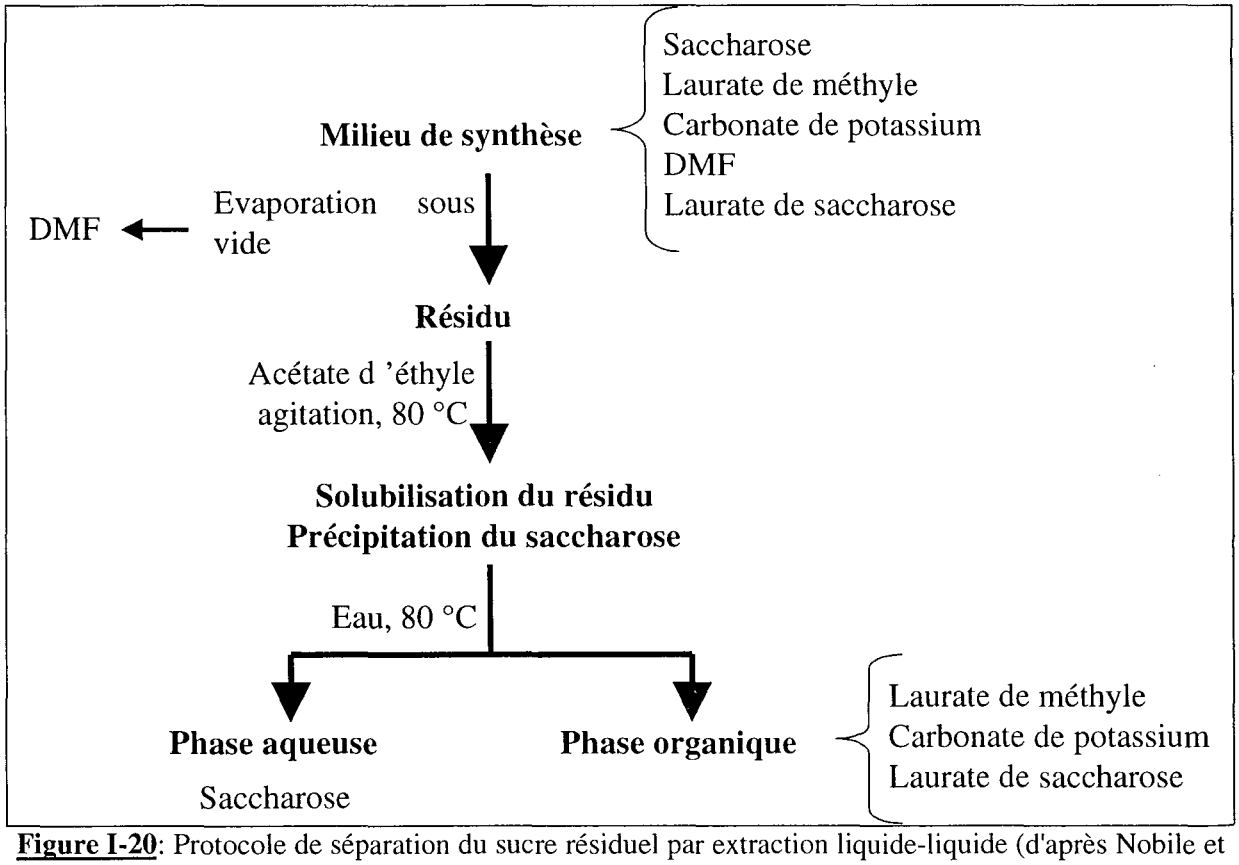


Figure I-20: Protocole de séparation du sucre résiduel par extraction liquide-liquide (d'après Nobile et *al,*. 1966).

Cette méthode présente l'inconvénient d'utiliser de grandes quantités de solvants organiques, ce qui entraîne des surcoûts dus à leur recyclage à l'échelle industrielle.

2.3. Extraction par osmose inverse

Des méthodes de purification sans utilisation de solvants organiques ont été développées et plus particulièrement des techniques de séparation par membrane. Aussi, Matsumoto et *al.* (1991) ont proposé un protocole de séparation du saccharose en milieu aqueux par osmose inverse (**Figure I-21**).

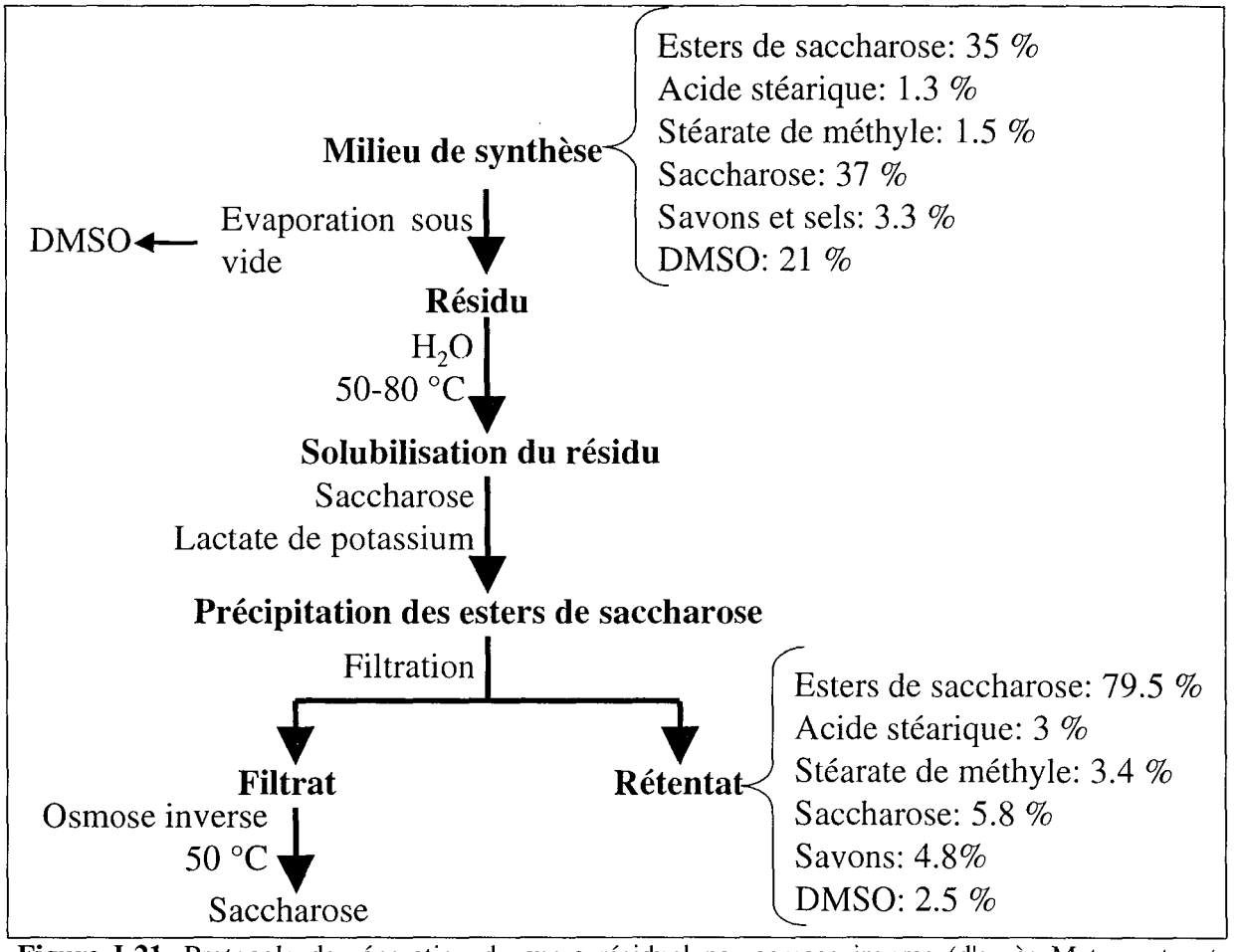


Figure I-21: Protocole de séparation du sucre résiduel par osmose inverse (d'après Matsumoto et *al.*,1991).

Les esters de saccharose solubles dans l'eau, deviennent insolubles par ajout de sels et de saccharose (si nécessaire) et précipitent. Par conséquent, ils peuvent être récupérés par simple filtration. Une étape de séparation par osmose inverse est réalisée si l'on désire récupérer le saccharose pour une éventuelle réutilisation. Les températures retenues pour solubiliser le

résidu dans l'eau permettent d'éviter les problèmes de viscosité sans pour autant provoquer la décomposition des sucroesters.

Cette méthode de purification présente l'avantage de réaliser l'extraction en milieu aqueux et ainsi en absence de solvants organiques toxiques. De plus, avec cette méthode d'extraction on évite les pertes en sucroesters dans la phase aqueuse. Cependant, la pureté finale des sucroesters reste inférieure à 95 %, seuil exigé par les normes en vigueur.

2.4. Conclusion et discussion des techniques d'élimination du sucre

Le **Tableau I-15** reprend les principaux résultats concernant l'élimination du sucre lors de la purification des sucroesters

Cette étude bibliographique nous a permis de distinguer trois principales techniques d'élimination du sucre à partir du milieu de synthèse des sucroesters: la précipitation, l'extraction liquide-liquide et l'osmose inverse.

La technique la plus simple et la moins coûteuse est la précipitation. Cependant, ce procédé, dans les conditions opératoires proposées, ne permet qu'une précipitation partielle du sucre et entraîne une précipitation simultanée des sucroesters. Il faut également noter que les meilleures performances de ce procédé ont été obtenues lorsque la séparation est réalisée sans évaporation préalable du solvantde synthèse.

La technique de séparation par osmose inverse se fait en absence de solvant et présente l'avantage de récupérer le sucre pour une éventuelle réutilisation. Cependant, dans les conditions expérimentales proposées, il reste encore 6 % de sucre dans le milieu contenant les sucroesters. En plus, cette technique nécessite une étape supplémentaire d'élimination des sels ajoutés dans le but de provoquer la précipitation.

Enfin, L'élimination du sucre par extraction liquide-liquide permet une récupération totale du sucre; mais le plus souvent les meilleures performances ne sont atteintes qu'en présence de solvants organiques relativement toxiques.

Cette dernière méthode semble être la plus intéressante, à condition de trouver des solvants non toxiques qui mènent aux mêmes performances.

Tableau I-15: Résumé des principales techniques d'élimination du sucre citées dans la littérature.

Référence	Technique	Conditions	Remarques
		Extraction par précipitation	
Haage *et al.*, 1966	Elimination du saccharose par précipitation	♦ Chloroforme, 1-2 dichloroéthane, acétone ou chlorure de méthylène. ♦ Solvant organique / Milieu réactionnel ≥ 1 (v/v) ♦ 40 < T < 60 °C avec agitation	Procédé plus efficace que lorsqu'on fait évaporer le solvant de synthèse avant séparation
Coulon, 1997	Elimination du fructose par précipitation	♦ Hexane, n-butanone, heptane, acétate d'éthyle ♦ $T_{ambiante}$	Précipitation partielle du fructose
		Extraction liquide-liquide	
Nobile *et al.*, 1966	Elimination du saccharose par extraction liquide-liquide	♦ Evaporation du DMF ♦ Solubilisation du résidu dans l'acétate d'éthyle et l'eau ♦ Solvant organique/eau = 1/1 (v/v) ♦ T = 60 à 90 °C avec agitation	Récupération totale du saccharose dans la phase aqueuse
Coulon, 1997	Elimination du fructose par extraction liquide-liquide	♦ Evaporation du solvant de synthèse (méthyl-2 butanol-2) ♦ Solubilisation du résidu dans l'acétate d'éthyle ♦ Ajout d'eau avec un rapport solvant organique/eau = 1/1 (v/v) ♦ $T_{ambiante}$ sans agitation	Elimination partielle du fructose dans la phase aqueuse
		Extraction par osmose inverse	
Matsumoto *et al.*, 1990	Séparation du saccharose par osmose inverse	♦ Evaporation du DMSO ♦ Solubilisation du résidu dans H_2O à 50-80 °C ♦ Précipitation des sucroesters ♦ Séparation du saccharose à partir du filtrat par osmose inverse à 50 °C	♦ Il reste 6 % de saccharose dans le rétentat ♦ Faible pureté des sucroesters (79 %) ♦ Absence de solvant

3- Elimination du donneur d'acyle

Compte tenu du fait que les propriétés physico-chimiques des espèces présentes dans le milieu sont très proches, la séparation de l'acide gras constitue l'étape limitante pour l'obtention de sucroesters purs avec les meilleurs taux de récupération.

Les publications recueillies dans la littérature relatent une large gamme de méthodes séparatives des esters de saccharose. Celles ci comportent aussi bien des procédés basés sur des opérations unitaires classiques (extraction liquide-liquide, distillation, cristallisation...) que des procédés utilisant des techniques plus récentes (extraction au CO_2 supercritique, chromatographie préparative...). Les travaux les plus pertinents sont décrits et analysés dans ce paragraphe.

3.1. Extraction par précipitation - cristallisation

La précipitation du donneur d'acyle peut être réalisée soit directement dans le milieu de synthèse soit par addition de solvants organiques.

Un protocole de purification par précipitation a été proposé par Wagner et *al.* (1991). La **Figure I-22** résume les différentes étapes d'extraction développées par ces auteurs.

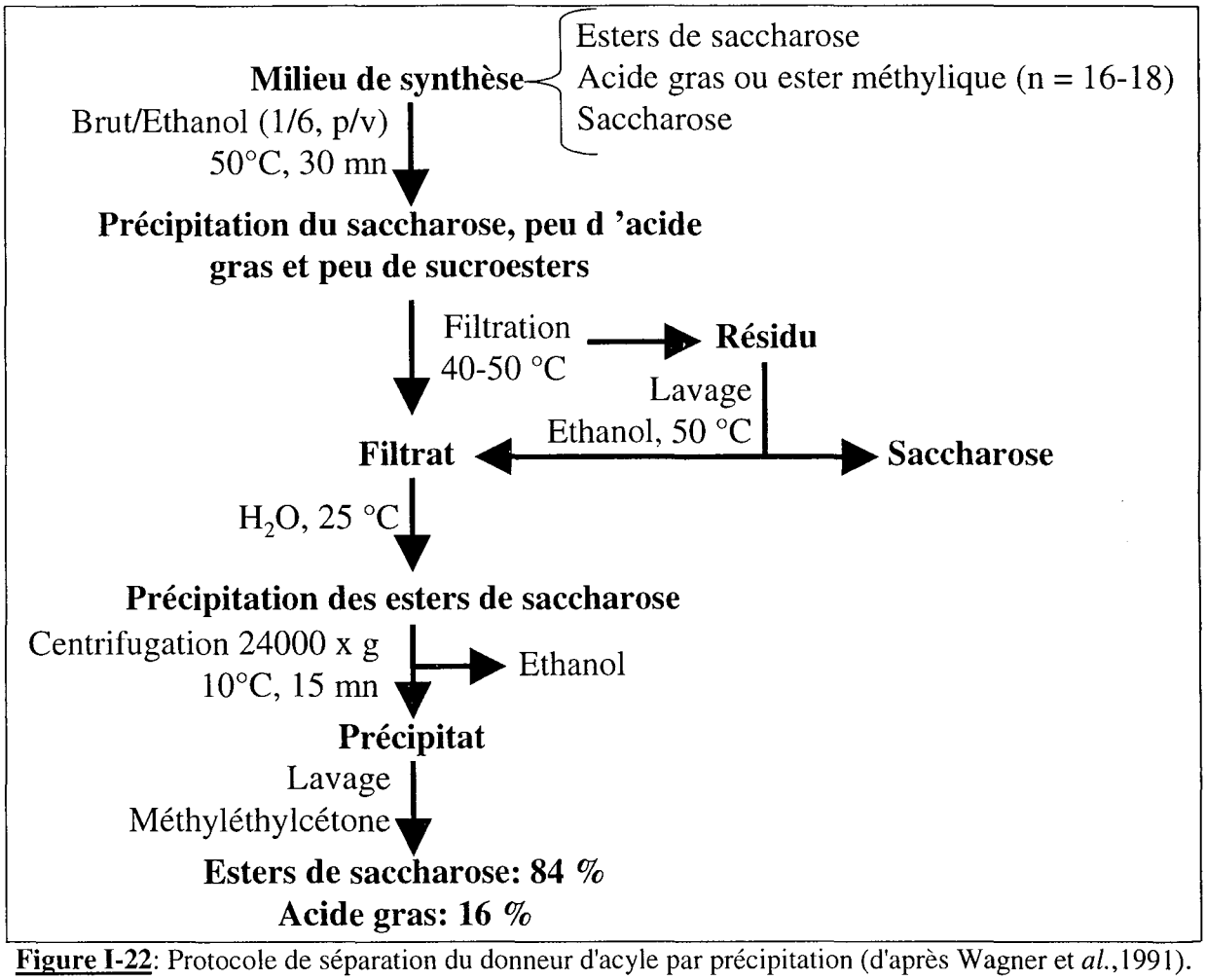


Figure I-22: Protocole de séparation du donneur d'acyle par précipitation (d'après Wagner et *al.*,1991).

Cette méthode d'extraction bien que simple, présente l'inconvénient d'obtenir des molécules de faible pureté (< 90 %).

Schlotterbeck et *al.* (1993) et Scheckermann et *al.* (1995) ont réalisé la cristallisation de l'acide stéarique par simple stockage à –20 °C du milieu de synthèse après élimination de l'enzyme et du fructose. Cette technique est basée sur le caractère apolaire de l'acide gras mais s'accompagne, malheureusement, de la cristallisation simultanée des esters supérieurs. De plus, la cristallisation n'est possible que lorsqu'on travaille avec des acides gras se présentant sous forme solide aux faibles températures. L'élimination de l'acide gras n'étant que partielle, cette étape est suivie d'une précipitation en présence d'un mélange acétone/eau (2/3, v/v).

3.2. Extraction par dialyse

Afin d'éviter les pertes en sucroesters liées à leurs hydrophobicités très proches de celles des donneurs d'acyle à séparer, la dialyse a été proposée par certains auteurs. Cette technique présente l'avantage de séparer différents composés selon leurs tailles moléculaires. Elle peut être utilisée avec profit dans le cas de la purification des sucroesters en solution qui au-delà d'une certaine concentration se présentent sous forme de micelles. Ce procédé a été utilisé par Khaled et *al.* (1991a) pour séparer un mélange d'oléates de fructose et d'acide oléique (**Figure I-23**).

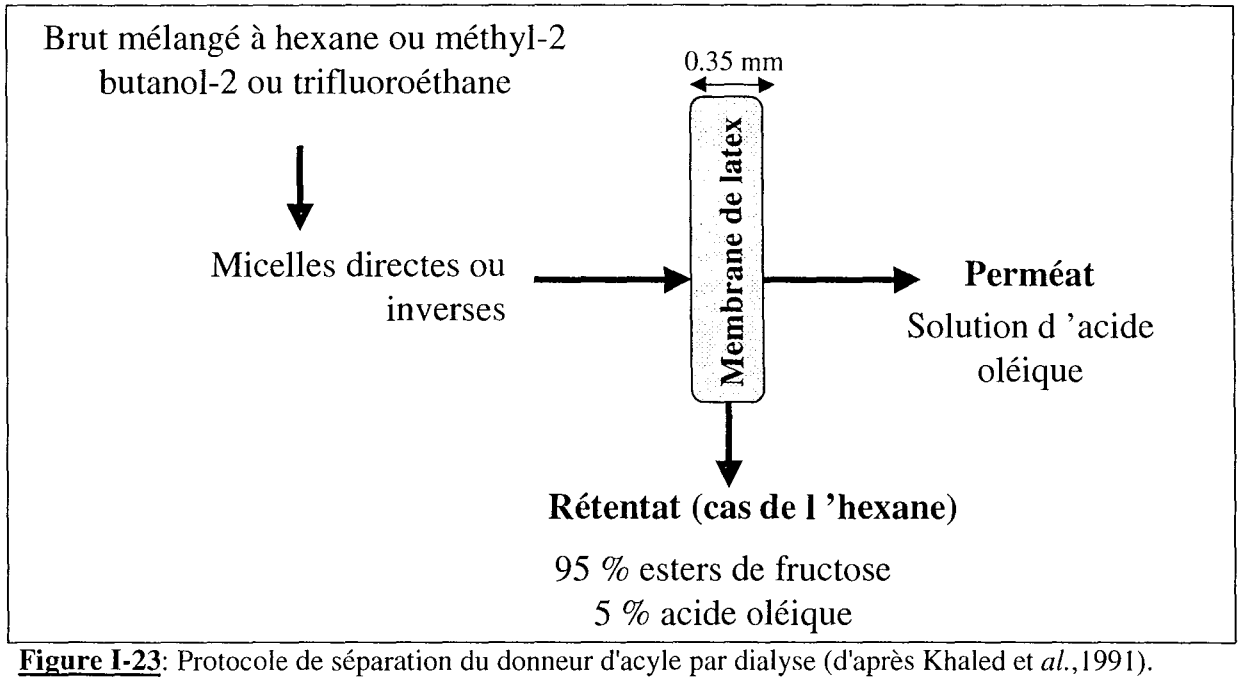


Figure I-23: Protocole de séparation du donneur d'acyle par dialyse (d'après Khaled et *al.*,1991).

L'utilisation de solvants à polarité appropriée (hexane, méthyl-2 butanol-2 ou trichlorofluoroéthane) permet la diffusion des acides gras à travers la membrane en latex alors que les sucroesters sont retenus et récupérés par la suite par simple rinçage de la membrane. Les résultats obtenus par ces auteurs ont montré que la séparation est influencée par la nature du solvant. Ainsi, la meilleure séparation a été obtenue avec l'hexane (95 % d'esters de fructose), solvant le plus polaire, qui permet aux sucroesters de s'agréger sous forme de micelles inverses. L'utilisation du méthyl-2 butanol-2, par contre, entraîne la formation de micelles directes plus petites que les micelles inverses provocant le passage des sucroesters à travers la membrane en même temps que l'acide gras.

Cette méthode est non dégradante vis-à-vis du sucroester mais s'avère très lente et nécessite de très grandes quantités de solvants et une surface membranaire importante.

3.3. Extraction par distillation moléculaire

La distillation est une méthode de séparation basée sur la différence de température d'ébullition des différents liquides qui composent un mélange.

La distillation moléculaire a été mise à profit pour l'extraction de polyesters de fructose (Yamamoto et *al.*, 1986). Ces auteurs ont fait varier plusieurs paramètres pour obtenir les meilleurs taux de récupération et puretés. La **Figure I-24** montre un exemple de séparation de l'acide oléique pour obtenir des polyoléates de fructose à 99 % de pureté et avec un taux de récupération de l'ordre de 98 %. Les sucroesters obtenus dans ce cas sont légèrement colorés à cause des températures élevées appliquées au mélange.

De la même manière, Redmann et *al.* (1995) ont séparé l'acide caprylique des caprylates de fructose par distillation moléculaire. En faisant varier la pression et la température d'extraction, ils ont obtenu, dans les conditions optimales (1 µbar, 60 °C), un distillat constitué de 97.7 % d'acide caprylique et 2.3 % d'esters de fructose. Quant au rétentat, il renferme 91 % de fructose et 9 % d'acide caprylique. L'acide gras résiduel peut être éliminé par plusieurs opérations successives de distillation. Ce protocole, utilisant de faibles températures, a permis d'obtenir des sucroesters moins colorés que dans le cas des polyoléates obtenus avec le protocole proposé par Yamamoto et *al.* (1986).

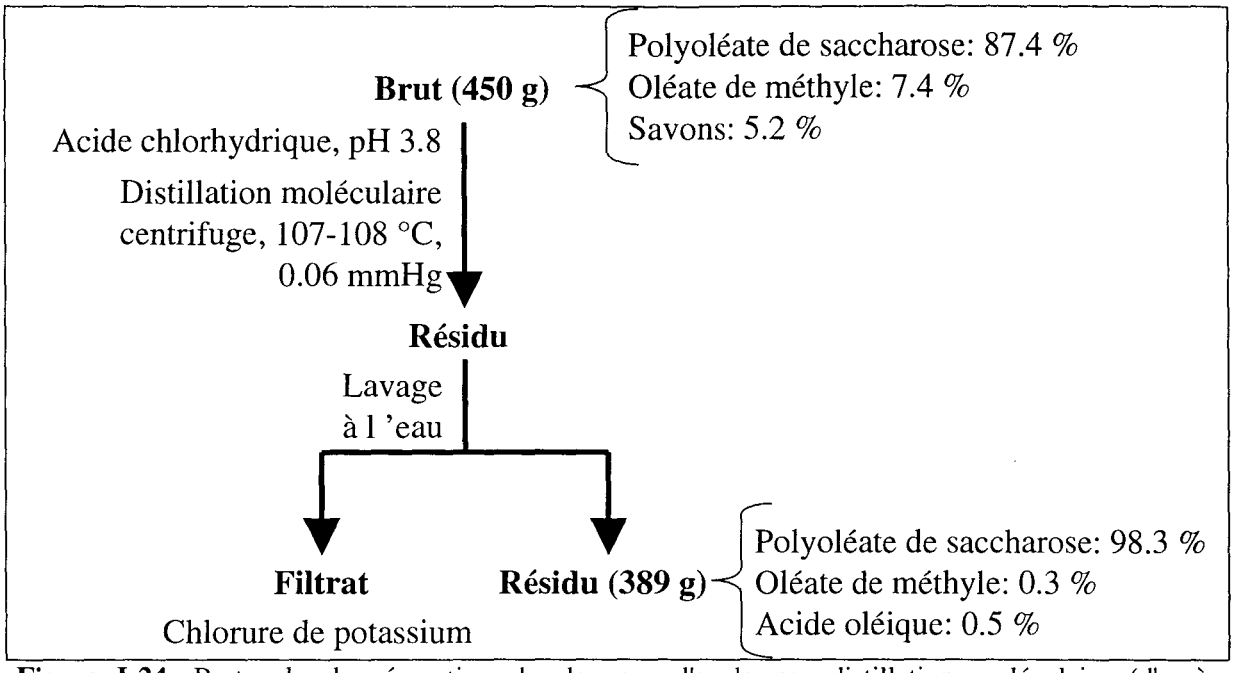


Figure I-24: Protocole de séparation du donneur d'acyle par distillation moléculaire (d'après Yamamoto et *al.*,1986).

3.4. Extraction - purification par chromatographie liquide sur colonne

Les résultats satisfaisants obtenus par chromatographie sur couche mince (CCM) ont permis à certains auteurs de réaliser des essais de purification des sucroesters par chromatographie liquide sur colonne. La séparation est réalisée sous l'effet d'entraînement de la phase mobile et l'effet de rétention de la phase stationnaire.

Cette méthode de séparation a permis à Gupta et *al.* (1983) de purifier des mono- et diesters de saccharose synthétisés à partir de triglycérides (C12-C18). Après lavage du gel de silice avec de l'éther diéthylique anhydre, l'échantillon à purifier est solubilisé dans du toluène à 60 °C et déposé au sommet de la colonne après refroidissement à 30-35 °C. Les glycérides et acides gras résiduels sont élués avec de l'éther diéthylique alors que les sucroesters et les savons résiduels sont retenus par la silice. Les diesters de saccharose sont ensuite recueillis par élution à la n-butanone anhydre alors que les monoesters sont élués avec de la n-butanone saturée en eau. Cette technique a permis d'obtenir aussi bien des fractions de mono- que de diesters de saccharose avec des puretés élevées (90 à 95 %) mais un faible taux de récupérations de l'ordre de 40 %. Les résultats obtenus par cet auteur ont été appliqués par Khaled et *al.* (1990) et Coulon (1997) pour la séparation de monooléates de fructose. Ce dernier a observé que l'utilisation d'un éluant constitué d'un mélange éther diéthyliqe/n-

butanone ne permettaient pas d'obtenir des taux de récupérations intéressants (43 %) alors qu'un mélange éther diéthylique/méthanol, plus polaire, a permis de récupérer plus de 70 % des monooléates de fructose ce qui représente une amélioration de près de 30 %. Ce résultat a été expliqué par une faible affinité des monooléates de fructose pour la n-butanone.

Scheckermann et *al.* (1995) ont utilisé la chromatographie liquide moyenne pression afin de séparer des monoesters de fructose. Dans ce cas, le résidu obtenu après séparation du fructose est déposé au sommet de la colonne. Le passage de chloroforme permet de récupérer les acides gras. Les diesters et les monoesters ont été élués dans l'ordre avec des mélanges chloroforme/méthanol allant de 99/1 à 90/10 (v/v). Les monoesters sont collectés par passage d'un mélange chloroforme/méthanol/eau (60/15/2, v/v/v). Ce même protocole a été utilisé par Ducret et *al.* (1995) pour la purification d'esters de sorbitol.

Les études menées sur la purification par chromatographie sur colonne ont donc montré que cette technique de séparation est adaptée à la purification des sucroesters. Toutefois, l'emploi de grandes quantités de solvants, parfois toxiques, limite son utilisation à grande échelle.

3.5. Extraction au CO_2 supercritique

La purification des sucroesters s'effectue souvent avec des taux de récupération assez faibles lorsqu'on utilise les méthodes de séparation classiques de laboratoire. Pour pallier ce problème, l'extraction au CO_2 supercritique s'est imposée comme une méthode très intéressante. Le CO_2 supercritique est déjà opérationnel dans l'agro-alimentaire (extraction de caféine, extraction d'acides amers du houblon) et dans la phyto-industrie (extraction d'arômes ou de composés des plantes).

Cette technique de séparation a été utilisée pour la purification des esters de saccharose (C2 à C22) en 1983 par Feuge et Zeringue. Dans ce cas, le résidu contenant les sucroesters est solubilisé dans un solvant organique non miscible à l'eau à 20 –50 °C. La solution obtenue est mélangée avec de l'eau dans des proportions permettant la formation d'un système biphasique (environ 1/1, v/v). Ensuite, le système est saturé en CO_2 et l'ester de saccharose est récupéré dans la phase organique après élimination du CO_2.

Par la suite, Koerts et *al.* (1990) ont utilisé cette méthode afin d'extraire les acides gras résiduels et le solvant de réaction d'un milieu contenant, par exemple, du saccharose, de l'acide stéarique, du stéarate de méthyle et du chlorure de potassium (**Figure I-25**). Ce protocole de séparation a permis d'obtenir des taux de récupération des sucroesters d'au moins 98 %. Néanmoins, le taux de récupération baisse lorsqu'on désire extraire des sucroesters ayant des degrés de substitution élevés qui passent, dans ce cas, dans l'extrait en même temps que l'acide gras. Ce résultat pouvant être expliqué par la faible solubilité de ce type de molécules dans le CO_2.

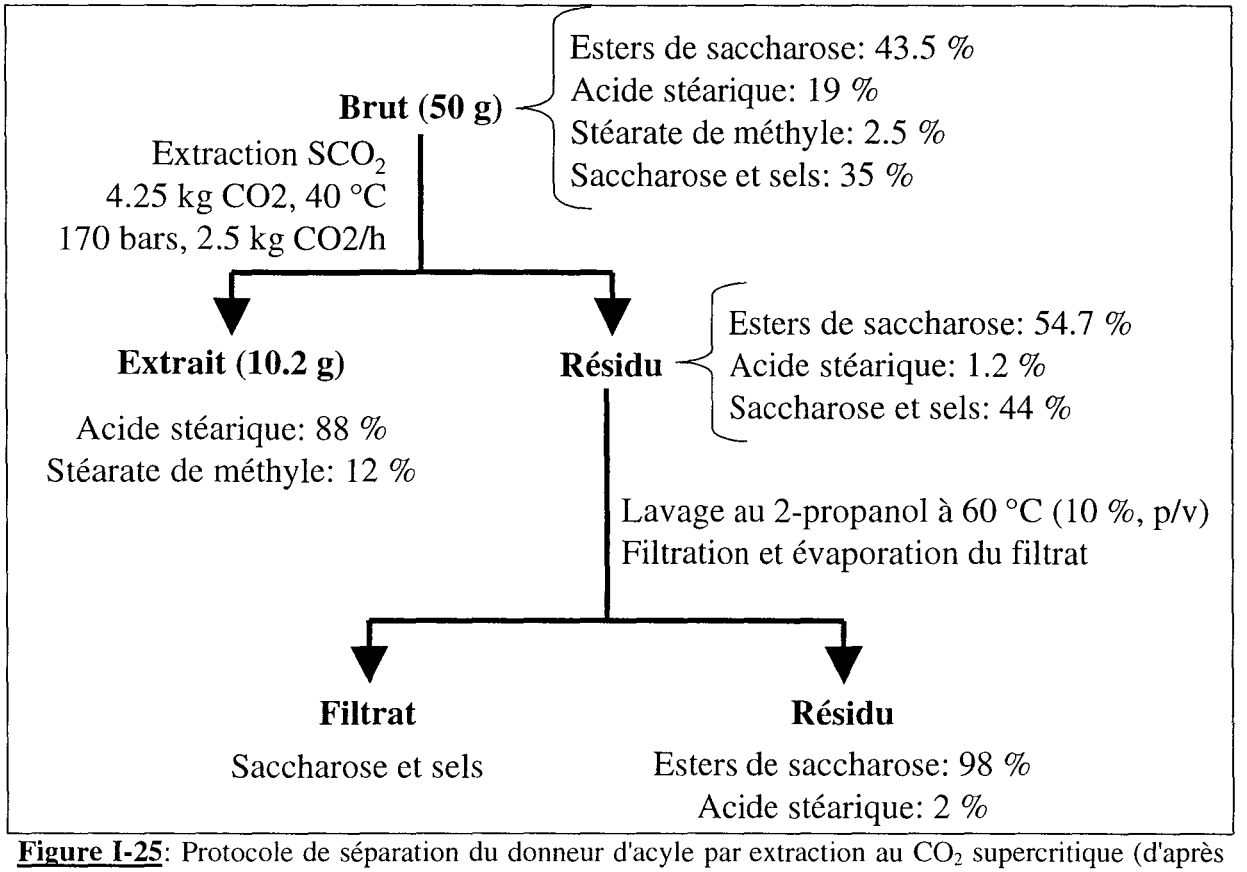


Figure I-25: Protocole de séparation du donneur d'acyle par extraction au CO_2 supercritique (d'après Koerts et *al.*,1990).

Cette technique de séparation au CO_2 supercritique, qui est plus favorable à la diffusivité des espèces chimiques que les solvants organiques, permet de réaliser des extractions plus rapides. Le CO_2 supercritique peut être facilement recyclé, ce qui réduit le coût de cette opération. De plus, cette technique utilise de faibles températures évitant ainsi la dégradation des molécules à séparer. En outre, ce procédé peut fonctionner en continu, ce qui représente un avantage considérable à l'échelle industrielle. Par contre, l'extraction au CO_2 supercritique

nécessite un grand investissement dans une installation industrielle spécifique qui n'est rentable que lorsqu'on désire séparer des solutions fortement concentrées en produit à purifier.

3.6. Extraction liquide-liquide

Cette technique est basée sur la différence de partage des différents composés d'un milieu entre deux liquides non ou partiellement miscibles (Legendre *et al.*, 1976). Cette répartition est définie, le plus souvent par le coefficient de partage qui peut être déterminé expérimentalement. Il s'agit en fait de la constante d'équilibre thermodynamique décrivant le partage d'une espèce chimique entre phases (Skoog *et al.* 1992).

Les acides gras et sucroesters supérieurs, en particulier à longue chaîne carbonée, sont solubles dans des solvants apolaires, tels que les hydrocarbures alors que les monoesters et les sucres sont partiellement à totalement solubles en milieux polaires. Ces propriétés ont été exploitées pour séparer certains sucroesters de l'acide gras. L'efficacité de la séparation dépendant du système utilisé.

Cette méthode de purification a été appliquée par Khaled (1990) pour récupérer les monooléates de fructose à partir d'un mélange monoesters de fructose/acide oléique. Le milieu réactionnel est repris dans un volume de cyclohexane auquel est ajouté un mélange acétonitrile/eau (50/50, v/v). Au bout de 12 heures de séparation, les monooléates de fructose présents dans la phase aqueuse sont récupérés avec une pureté de 95 %.

En 1994, Sarney *et al.* ont purifié des diesters de disaccharide et d'acide gras à l'aide d'une solution aqueuse composée de chlorure de sodium et de carbonate de potassium. Dans ce cas, un taux de récupération de 78 % a été obtenu avec une pureté des diesters de l'ordre de 99 % au bout de 3 extractions successives.

Valente (1998) a proposé deux protocoles d'extraction des monooléates de fructose par extraction liquide-liquide. Il s'agit d'une extraction en mode discontinu et une extraction en mode continu sur colonne à garnissage. Dans le premier cas, un rapport volumique solvants/milieu réactionnel de 3/1 a été utilisé sachant que le mélange de solvants est constitué d'hexane, d'éthanol et d'eau. Les monoesters récupérés dans la phase polaire

éthanol/eau sont purs à plus de 90 % mais avec des rendements d'extraction de seulement 1.6 à 11.4 % en fonction du rapport molaire des solvants. Le protocole de séparation en mode continu, quant à lui, consiste à alimenter une colonne à garnissage avec un mélange milieu réactionnel/hexane (1/20, v/v) à 7 l/h et de rajouter un mélange éthanol/eau (50/50, v/v) à 5.7 l/h pour séparer les monooléates de fructose. Dans ce cas, les monoesters obtenus sont purs à 95 % avec un rendement d'extraction de 30 %.

Des esters de méthyle et d'acides gras ont également été séparés grâce à cette méthode par Rodriguez-Ruiz *et al.* (1998). Le protocole de séparation se fait à 100 °C et consiste à ajouter au résidu de la réaction un mélange MeOH/Chlorure d'acétyle (20/1, v/v) et de l'hexane. Afin de rendre la phase lourde plus hydrophile, de l'eau est ajoutée à raison de deux volumes par volume d'hexane.

Cette méthode a permis à Bloomer *et al.* (1999) de purifier des monoglycérides et des propylène glycol monoesters à environ 100 % de pureté. Le mélange de solvants utilisé est constitué d'éthanol/eau (75/25, v/v) et d'huile enrichie en triglycérides ou d'hexane. Différents rapports volumiques de solvants polaires/apolaires ont été étudiés (1/1, 2/1 et 3/1).

La purification par extraction liquide présente l'avantage de ne pas nécessiter d'installation particulière et d'être relativement facile à mettre en œuvre. Cependant, il convient de trouver un système de solvants pas ou peu miscibles permettant la solubilisation préférentielle de telle ou telle molécule dans l'une ou l'autre des phases. Il faut également noter que cette méthode utilise de grands volumes de solvants qu'il faudra recycler par la suite.

Le **Tableau I-16** reprend les principales techniques utilisées dans la purification des esters de sucre et d'acide gras.

Tableau I-16: Résumé des principaux résultats et techniques de séparation cités dans la littérature.

Référence	Technique	Conditions	Remarques
		Extraction par précipitation	
Wagner *et al.*, 1991	Précipitation	♦ Evaporation du solvant de synthèse. ♦ Solubilisation du résidu dans l'éthanol (1/6, p/v) à 50 °C/30 mn ♦ Précipitation et lavage du précipitat avec méthyléthylcétone	♦ Pureté < 90 % ♦ 16 % acide gras résiduel
Schlotterbeck *et al.*, 1993	Précipitation	♦ Stockage à – 20 °C ♦ Filtration ♦ Acétone/Eau = 2/3 (v/v)	Précipitation simultanée des stéarates de fructose
		Extraction par dialyse	
Khaled *et al.*, 1991	Dialyse	♦ Evaporation du solvant de synthèse ♦ Solubilisation du résidu dans méthyl-2 butanol-2, hexane, trifluoroéthane ♦ Dialyse sur membrane de latex ♦ Rétentat contenant les sucroesters et perméat l'acide oléique	Rétentat constitué de 95 % d'esters de fructose et 5 % d'acide oléique dans le cas de l'hexane
		Extraction par distillation moléculaire	
Yamamoto *et al.*, 1986	Distillation moléculaire centrifuge	♦ 450 g de résidu ♦ Acide chlorhydrique, pH 3.8 ♦ 107-108 °C, 0.06 mm Hg ♦ Lavage à l'eau	♦ Polyoléate de fructose à 99 % de pureté ♦ Rdt = 98 % ♦ Produit coloré
Redmann *et al.*, 1995	Distillation moléculaire	♦ Evaporation du solvant de réaction ♦ 60 °C, 1 µbar	♦ <u>Distillat</u> 97.7 % caprylate 2.3 % esters fructose ♦ <u>Rétentat</u> 9 % caprylate 91 % esters fructose ♦ Produit peu coloré
		Extraction au CO_2 supercritique	
Feuge et Zeringue, 1983	CO_2 supercritique	♦ Solubilisation du résidu dans solvant organique non miscible eau ♦ 20-50 °C ♦ Milieu biphasique après ajout d'eau (solvant/eau = 1/1, v/v) ♦ Saturation du système en CO_2 ♦ Séparation de la phase aqueuse	Esters de saccharose dans la phase organique
Koerts *et al.*, 1990	CO_2 supercritique	♦ 5.5 kg de CO_2 ♦ 90 °C, 350 bars ♦ Précipitation du résidu à l'éthanol (saccharose, KCl, oléates de saccharose)	♦ 99 % d'oléates de saccharose

Séparation par chromatographie sur colonne			
Gupta *et al.*, 1983	Chromatographie sur colonne	♦ Esters de saccharose séparés avec n-Butanone saturée en eau ♦ Glycérides et acides gras séparés avec éther diéthylique ♦ Diesters séparés avec n-butanone anhydre	♦ Rdt en ester de saccharose de 40 % ♦ 90 à 95 % de pureté
Adelhorst *et al.*, 1990	Distillation Chromatographie préparative	♦ 130 °C, 0.004 mbar ♦ Hexane/EtOAc/MeOH	♦ 85 % monoesters ♦ 15 % éthyl-D-glucoside
Ducret *et al.*, 1995	Chromatographie préparative	♦ Acide gras séparé avec chlorforme ♦ Diesters séparés avec chloroforme/MeOH (90/10, v/v) ♦ Monoesters séparés avec chloroforme/MeOH/eau (64/10/1, v/v/v)	Esters de sorbitol
Scheckermann *et al.*, 1995	Distillation Chromatographie préparative	♦ Stockage à – 20 °C ♦ Chloroforme/MeOH/eau, 60/15/2, v/v/v	♦ Palmitate fructose ♦ Précipitation simultanée des sucroesters
Coulon, 1997	Chromatographie préparative	Ether diéthylique/MeOH	Rdt = 70 % en monooléates de fructose
Extraction liquide-liquide			
Khaled *et al.*, 1990	Extraction liquide-liquide	♦ Reprise du milieu dans cyclohexane ♦ Ajouter Acétonitrile/Eau, 50/50, v/v ♦ 12 h décantation	Oléates fructose à 95 % de pureté
Sarney *et al.*, 1994	Extraction liquide-liquide	♦ Solution aqueuse: NaCl + K_2CO_3 ♦ 3 extractions	♦ Diesters de disaccharide à 99 % de pureté et 78 % de rendement
Rodriguez-Ruiz *et al.* (1998)	Extraction liquide-liquide	♦ 1 ml MeOH/Chlorure acétyle (20/1, v/v) + 0.5 ml hexane ♦ 1 ml eau ♦ 100 °C	Esters de méthyle et d'acide gras
Valente, 1998	♦ Extraction liquide-liquide discontinu ♦ Extraction liquide-liquide continue	Acétate éthyle/eau = 50/50, v/v Hexane/Ethanol/Eau = 24.8/48.3/17.0 (mol/mol/mol) Solvant/Milieu réactionnel = 3/1 Résidu/Hexane = 1/20 (v/v) Ethanol/Eau = 50/50 (v/v) $Q_{phase\ org}$ = 7 l/h $Q_{phase\ aq}$ = 5.7 l/h	Pureté > 90 % en monooléates fructose Rendement entre 1.6 et 11.4 % Pureté = 95 % (p/p) Rendement = 30 %
Bloomer *et al.* 1999	Extraction liquide-liquide Cristallisation	♦ Ethanol/Eau = 75/25 (v/v) ♦ Huile enrichie en tri-glycérides ou hexane ♦ Rapport volumique solvants polaires/apolaires = 1/1, 2/1 ou 3/1	♦ 100 % mono-glycérides ♦ 100 % propylène glycol monoesters

5- Conclusion

L'étude bibliographique portant sur la purification des esters de sucre et d'acide gras montre que la séparation des sucroesters est relativement difficile et nécessite la mise en œuvre de plusieurs opérations unitaires. La méthode la plus performante semble être le CO_2 supercritique, mais cette technique est coûteuse. La plupart des travaux ont porté sur la séparation des esters de saccharose. L'utilisation de ces protocoles pour l'extraction des esters de monosaccharides, ayant des propriétés physico-chimiques différentes, n'est pas courante.

Toutefois, en dépit de nombreux inconvénients, l'extraction liquide-liquide paraît la plus facile à mettre en œuvre. Mais, elle nécessite une recherche poussée pour définir le mélange des solvants qui allient performances et sécurité d'utilisation.

IV. PROPRIETES DES ESTERS DE SUCRE ET D'ACIDE GRAS

L'utilisation des sucroesters dépend principalement de leurs propriétés tensioactives. Les différentes applications alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques...de ces molécules peuvent nécessiter des formulations différentes selon la propriété que l'on désire améliorer (Flack et Krog, 1970; Walker, 1984). C'est ainsi que des monoesters de sucre peuvent être préférées à des mélanges dans certaines formulations alors que d'autres pourraient nécessiter la présence d'esters supérieurs ou même d'autres types de tensioactifs type anionique ou cationique par exemple (Brooks, 1980; Shieh *et al.*, 1996b; Kronberg, 1997).

1- Balance hydrophile-lipophile: BHL

Les propriétés des esters de sucre et d'acide gras sont directement liées à leurs structure et composition dans le milieu quand il s'agit de mélanges de tensioactifs. La Balance Hydrophile-Lipophile (BHL) tient compte de ces paramètres.

C'est dans les années 40 que Griffin a introduit ce rapport ou BHL, grandeur sans dimension rendant compte de l'importance relative du ou des groupements polaires et de la partie apolaire, qui traduit les affinités relatives de la molécule pour l'eau et les milieux organiques.

Cette caractéristique des molécules tensioactives, non ioniques en particulier, peut être déterminée expérimentalement selon la formule suivante:

$$\mathbf{BHL = 20 \times (1 - \frac{S}{A})}$$

Où **S** est l'indice de saponification et **A** l'indice d'acidité.

La BHL des tensioactifs non ioniques peut également être calculée de manière approximative à partir de la structure chimique de la molécule (Karleskind, 1992).

$$\mathbf{BHL = \frac{Masse\ moléculaire\ de\ la\ partie\ hydrophile}{Masse\ moléculaire\ totale} \times 20}$$

Les sucroesters, avec les esters de sorbitan éthoxylés, sont les seuls tensioactifs non ioniques présentant une large gamme de BHL permettant leur application dans divers domaines (**Figure I-26**). Cette gamme de BHL provient de la possibilité d'estérifier jusqu'à 8 groupements hydroxyles dans le cas du saccharose par exemple et de travailler avec des acides gras saturés ou non à différentes longueurs de chaîne carbonée (Husband *et al.*, 1998).

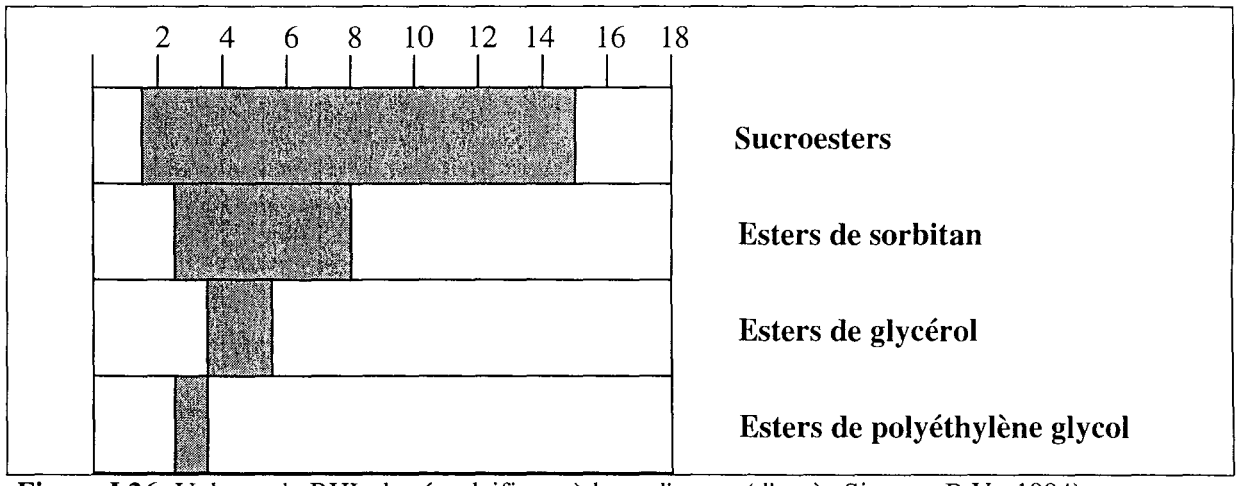


Figure I.26: Valeurs de BHL des émulsifiants à base d'esters (d'après Sisterna B.V., 1994).

2- Propriétés tensioactives

Les propriétés tensioactives sont liées à la chaîne carbonée de la partie hydrophobe. Ainsi, la concentration micellaire critique (CMC) est exprimée en fonction du nombre de carbones n (Marcou, 1989).

$$\log CMC = A - Bn$$

A et B étant des constantes.

Cette formule pourrait laisser penser qu'un agent tensioactif sera d'autant plus actif que sa chaîne grasse sera plus longue. Cependant, ce n'est pas le cas puisque les propriétés tensioactives sont des propriétés des solutions aqueuses des agents de surface et la longueur des chaînes carbonées est limitée par le pouvoir solubilisant des groupements hydrophiles (Marcou, 1989).

Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude des propriétés de surface ou tensioactives des sucroesters: pouvoir moussant, pouvoir émulsifiant, pouvoir solubilisant...

2.1. Pouvoir moussant

L'aptitude d'un tensioactif en solution à former des mousses est définie par le pouvoir moussant. Il prend en compte deux critères: la quantité de mousse formée et sa stabilité au cours du temps (Ismail, 1998).

Les pouvoirs moussants de mono- et dilaurates de saccharose ont été étudiés et comparés à ceux de sucroesters du commerce par Husband *et al.* (1998). Ces auteurs ont reporté que les monolaurates de saccharose présentent un meilleur pouvoir moussant, tant du point de vue quantité que stabilité de la mousse formée, comparés aux dilaurates de saccharose. Cependant, les solutions aqueuses préparées avec des mélanges de mono- et diesters, avec un rapport molaire monoester/diester de 4/1, ont présenté un meilleur pouvoir moussant que lorsqu'on utilise les mono- ou diesters seuls. Ce phénomène a été expliqué par des interactions qui auraient lieu entre les mono- et diesters améliorant ainsi le pouvoir moussant de la solution.

On a également expliqué le faible pouvoir moussant des diesters par leur hydrophobicité élevée. En effet, les particules hydrophobes sont généralement utilisées comme des agents antimousse (Aveyard *et al.*, 1994; Racz *et al.*, 1996).

De la même manière, Drummond et Wells (1998) ont étudié le pouvoir moussant (hauteur de mousse à T_0 et à 30 minutes) de monoesters de lactose et de lactitol en C8, C12 et C16. Ces auteurs ont montré qu'au-delà de la CMC, seuls les monocaprylates de lactose et de lactitol ne présentent pas une bonne stabilité de la mousse au cours du temps. De plus, la hauteur de mousse initiale des esters de lactose et de lactitol ne présente pas de différence significative au-delà de la CMC. Les monoesters de laurate présentent, dans tous les cas, le meilleur pouvoir moussant à T_0 et à 30 minutes.

Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas des alkylglycosides, autres tensioactifs non ioniques. En effet, ces molécules présentent un pouvoir moussant très élevé, en particulier les molécules dont le nombre de carbone du groupement hydrophobe est compris entre 10 et 12 (Matsumura, 1990).

2.2. Pouvoir émulsifiant

Le pouvoir émulsifiant traduit la capacité des agents de surface à disperser et à maintenir en suspension un liquide dans un autre liquide non miscible constituant l'émulsion. La fonction d'un agent émulsifiant est donc de stabiliser cette dispersion obtenue par homogénéisation. L'agitation du système permettant d'apporter l'énergie nécessaire à la création d'une aire interfaciale. La stabilité des émulsions obtenues est possible grâce à la réduction des tensions superficielle et interfaciale par le tensioactif.

Les premiers travaux ont concerné particulièrement les mono- et diesters à courte chaîne carbonée synthétisés par voie chimique (Osipow *et al.*, 1956). Par la suite, Hill *et al.* (1987) ont étudié la stabilité des émulsions préparées avec des esters de lactitol et d'acide gras en C16 et C18 non purifiés. Ces auteurs ont montré que le lactitol palmitate permet d'aboutir à des émulsions Huile de soja/Eau plus stables que le lactitol stéarate. De plus, les émulsions préparées avec un mélange des deux esters de lactitol (50/50, p/p) présentent une stabilité intermédiaire.

Les études des propriétés des sucroesters sont de plus en plus répandues et concernent souvent les esters de saccharose et d'acide gras. Certains auteurs ont étudié la stabilité des émulsions en fonctions des mélanges de polyesters de saccharose (Shieh *et al.*, 1996b), de la longueur de la chaîne carbonée de monoesters de lactose et lactitol (Drummond et Wells, 1998), de la nature du sucre (Ducret *et al.* 1995)...

La Concentration Micellaire Critique (CMC) constitue une indication importante quant à la capacité d'un émulsifiant à stabiliser des émulsions H/E ou E/H. En effet, Charlemagne et Legoy (1995) ont montré que de faibles valeurs de CMC permettent l'émulsification à de faibles concentrations en tensioactif de l'ordre de 0.008 %.

2.3. Pouvoir solubilisant et dispersant

Cette propriété des tensioactifs peut être utilisée afin de solubiliser ou disperser certaines substances protéiques ou lipidiques en solution.

Nakamura *et al.* (1997) ont montré que les monoesters de saccharose sont de bons agents solubilisants et dispersants. En effet, ils présentent une meilleure adsorption aux surfaces des particules de carbonate de calcium par exemple comparés aux polyesters de saccharose (**Figure I-27**). De par la structure de ces derniers, ils joueraient plutôt le rôle d'agents floculants.

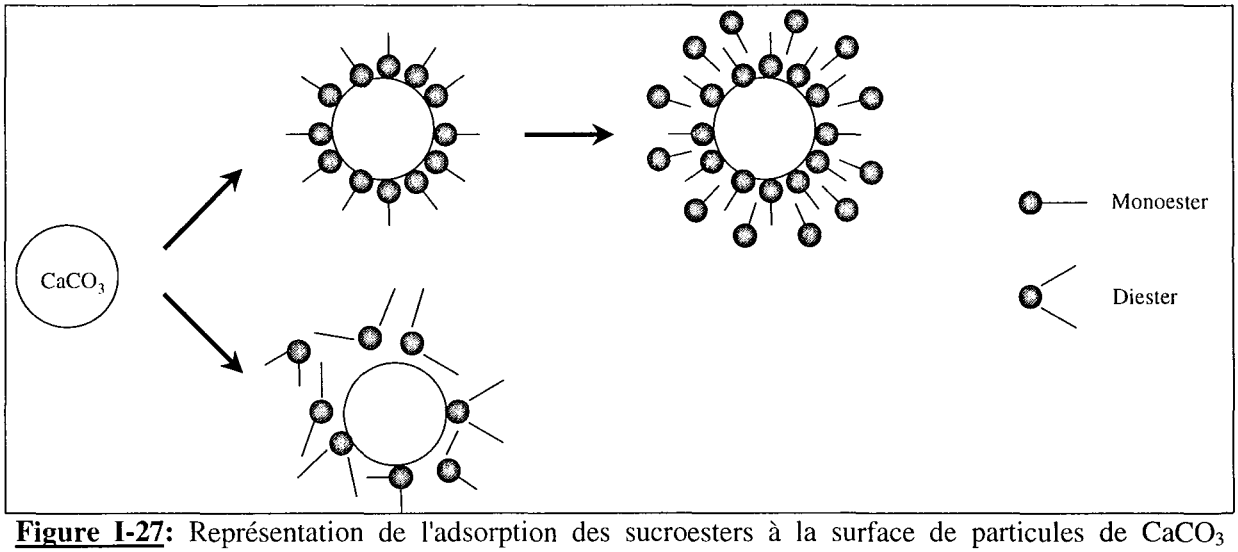


Figure I-27: Représentation de l'adsorption des sucroesters à la surface de particules de $CaCO_3$ (d'après Nakamura *et al.*, 1997).

2.4. Pouvoir antimicrobien

L'intérêt actuellement suscité par les sucroesters est encore renforcé par leur activité antimicrobienne.

En 1986, Marshall et Bullerman ont reporté que les esters de saccharose inhibent la croissance d'*Escherichia coli*. Ils ont également décelé une activité antimycosique de souches d'*Aspergillus, Penicillium, Cladosporium* et *Alternaria*. L'ester de saccharose le moins substitué a été le plus actif vis-à-vis de la réduction de la croissance des moisissures.

Tsuchido *et al.* (1987) ont reporté également que les esters de saccharose et d'acide gras provoquent la lyse cellulaire de *Bacillus subtilis*. En effet, ces auteurs ont remarqué que 50 µg de palmitate de saccharose par ml de culture cellulaire étaient capables de réduire la densité optique DO_{650} de 91 % après 1 heure d'incubation seulement.

De même, Nakamura (1997) a reporté que les sucroesters à base d'acide palmitique et stéarique permettent l'inhibition de la croissance de plusieurs micro-organismes. Ces auteurs ont conclu que les sucroesters peuvent être employés pour éviter la détérioration provoquée par les bactéries thermophiles dans les produits alimentaires.

Les esters de saccharose et d'acide gras ont également été utilisés en combinaison avec la nisine pour inhiber la croissance de bactéries Gram+ (Thomas *et al.* 1998). Le **Tableau I-17** montre l'effet de synergie qu'apportent les sucroesters lorsqu'ils sont utilisés avec la nisine pour l'inhibition de certains micro-organismes pathogènes.

Enfin, les laurates, palmitates et stéarates de saccharose ont récemment été utilisés comme inhibiteurs contre les spores de *Bacillus* sp., *Clostridium sporogenes* PA 3679 et *Alicyclobacillus* sp. (Shearer *et al.*, 2000).

Tableau I-17: Activité antimicrobienne des palmitates de saccharose (P1570) seuls et en combinaison avec la nisine (d'après Thomas *et al.*, 1998).

Organisme	Concentration inhibitrice minimale			
	Incubation	Nisine (IU/ml)	P1570 (%, p/v)	Nisine + P1570
Listeria monocytogenes	24-48 h	100	> 0.1	25 + 0.01
	5 jours	400	> 0.1	25 + 0.01
	7 jours	400	> 0.1	25 + 0.01
	14 jours	800	> 0.1	25 + 0.01
	27 jours	1000	> 0.1	25 + 0.01
Staphylococcus aureus	24-48 h	100	> 0.1	25 + 0.01
	5 jours	400	> 0.1	25 + 0.01
	7 jours	400	> 0.1	50 + 0.01
	14 jours	600	> 0.1	50 + 0.05
	14 jours	600	> 0.1	100 + 0.01
	27 jours	> 1000	> 0.1	100 + 0.01
Bacillus cereus	24-48 h	200	> 0.1	25 + 0.01
	5 jours	600	> 0.1	25 + 0.05
	5 jours	600	> 0.1	50 + 0.03
Clostridium sporogenes	24-48 h	25	0.01	25 + 0.01
	5 jours	25	0.03	25 + 0.01
	7 jours	25	0.03	25 + 0.01
	14 jours	25	0.03	25 + 0.01
	27 jours	25	0.03	25 + 0.01

2.5. Impact sur l'environnement: toxicité, biodégradabilité et bioaccumulation

L'étude de la biodégradabilité constitue la première information à obtenir dans le cas des agents de surface sachant que la nuisance résultant de ces produits est le plus souvent liée à leur tensioactivité et leur capacité à s'adsorber aux interfaces (Cabridenc, 1996).

La biodégradation d'une molécule se traduit par une réduction progressive de sa structure ayant pour but l'obtention de métabolites pour la synthèse de constituants cellulaires. Il s'agit d'une dégradation moléculaire des substances organiques résultant de l'action de micro-organismes. La biodégradabilité, directement liée à la structure de la molécule, est ainsi définie comme étant l'aptitude d'une substance à subir une biodégradation.

La toxicité est étudiée principalement en milieu aquatique (poisson, daphnia, algue) et dans des conditions aérobies. Elle est exprimée en concentration létale LC_{50} dans le cas des poissons ou en concentration effective EC_{50} pour daphnia ou les algues causant 50 % de mortalité, d'inhibition de la croissance ou d'immobilisation. Les molécules tensioactives présentant des valeurs inférieures à 1 mg/l au bout de 96 h pour les poissons et les algues et au bout de 48 h pour daphnia sont considérés comme toxiques. Les tensioactifs respectueux de l'environnement doivent présenter des concentrations supérieures à 10 mg/l (Jönsson *et al.*, 1998).

Tous les composés organiques persistent dans la nature sachant que la biodégradation nécessite un environnement aqueux. La bioaccumulation peut être mesurée directement sur des poissons mais elle peut également être calculée à partir d'un modèle expérimental qui consiste à déterminer le partage P des tensioactifs entre deux phases non miscibles. Le logarithme de la valeur obtenue log P est utilisé pour déterminer leur hydrophobicité. Un agent tensioactif représente une bioaccumulation lorsque son log $P_{oct/w} > 3$ (Jönsson *et al.*, 1998).

Lorsqu'il s'agit de tensioactifs non ioniques, la biodégradation consiste en un raccourcissement des chaînes aliphatiques suivi d'une dégradation de la partie hydrophile de la molécule (Cabridenc, 1996). Par conséquent, certains auteurs ont montré que plus on augmente la longueur de la chaîne carbonée de la partie hydrophobe des sucroesters, moins ils sont biodégradables et métabolisables (Walker, 1984; Shigeoka *et al.*,1984). Cependant, Baker *et al.* (2000) ont montré que ni la variation du groupement hydrophile (glucose, saccharose, raffinose) ni celle du groupement hydrophobe (acide laurique (C12) ou palmitique (C16)) n'avaient d'effet significatif sur la biodégradabilité des sucroesters.

Lorsqu'un produit ne subit pas de biodégradation naturelle, il est considéré comme stable et persiste dans l'environnement. Dans le cas des agents tensioactifs, la durée de biodégradation varie entre 1-2 h pour les esters d'acides gras (acides laurique et palmitique) contre 1-2 jours pour les alkylbenzènes sulfonates linéaires et jusqu'à des mois pour les alkylbenzènes sulfonates ramifiés (Jönsson *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 2000).

CHAPITRE II

MATÉRIELS & MÉTHODES

CHAPITRE II : Matériels et méthodes 83

1- Matériels **83**
1.1. Biocatalyseurs 83
1.2. Réactifs 83
2- Mise en œuvre des synthèses enzymatiques **83**
2.1. Mise en œuvre en discontinu sous pression réduite 84
2.2. Mise en œuvre en discontinu avec tamis moléculaire 85
2.3. Mise en œuvre avec ajout de fructose et en présence de tamis moléculaire 85
3- Plan d'expériences: modélisation de la synthèse des esters de sucre et d'acide gras par la Méthodologie des Surfaces de Réponses **86**
3.1. Objectifs de l'étape de modélisation 86
3.2. Paramètres et domaines expérimentaux 87
3.3. Réponses expérimentales 87
3.4. Matrice expérimentale 88
3.5. Validité des modèles 89
4- Méthodes analytiques **91**
4.1. Analyse des sucres et des sucroesters 91
4.1.1. Analyse par photodensitométrie 91
4.1.1.1. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince 91
4.1.1.2. Analyse quantitative par Photodensitométrie 92
a. Principe 92
b. Etalonnage 93
c. Dosage des sucroesters 93
d. Evaluation des concentrations en substrats résiduels et des rendements de conversion 94
4.1.2. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) 95
a. Principe 95
b. Matériels 95
c. Mode opératoire de la méthode d'analyse avec le DDL 96
d. Etalonnage de la méthode d'analyse avec le DDL 97
e. Mode opératoire de la méthode d'analyse avec le RI 99
f. Etalonnage de la méthode d'analyse avec le RI 100

4.2. Détermination de la solubilité du fructose dans le méthyl-2 butanol-2 102
4.3. Détermination de la quantité d'eau 103
a. Principe 103
b. Matériels 104
c. Mode opératoire 105
4.4. Détermination des vitesses de consommation de l'acide gras 105
4.5. Calcul de l'hydrophobicité 106
4.5.1. Hydrophobicité des molécules 106
4.5.1.1. Prédiction de log P du fructose 107
4.5.1.2. Prédiction de log P des acides gras 107
4.5.1.3. Prédiction de log P des monoesters 107
4.5.1.4. Prédiction de log P des diesters 108
4.5.1.5. Prédiction de log P du méthyl-2 butanol-2 109
4.5.2. Hydrophobicité des mélanges 109
5- Purification des esters de fructose et d'acide gras 109
5.1. Filtration et séparation du biocatalyseur 109
5.2. Purification des monoesters par extraction liquide-liquide 110
5.2.1. Séparation du fructose 110
5.2.2. Séparation de l'acide gras et des diesters 110
5.2.3. Détermination des coefficients de partage 111
5.2.4. Calcul des taux de récupération et de la pureté des monoesters 112
5.3. Prédiction des équilibres thermodynamiques 113
5.3.1. Prédiction des équilibres liquide-liquide 113
5.3.2. Concept des solutions de groupe 113
5.3.3. Structure du modèle UNIFAC 115
5.4. Purification des mélanges de mono- et diesters au CO_2 supercritique (SEPAREX) 116
6- Propriétés physico-chimiques et tensioactives des esters de fructose et d'acide gras 117
6.1. Propriétés physico-chimiques 117
6.1.1. Mesure du pH 117
6.1.2. Calcul de la Balance Hydrophile Lipophile: HLB 117
6.2. Propriétés de surface 118
6.2.1. Tension superficielle 118
6.2.2. Concentration Micellaire Critique: CMC 119

6.2.3. Tension interfaciale 120
6.3. Pouvoir moussant 121
6.4. Stabilité émulsion 122

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ FIGURES ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Figure II-1: Réacteur sous vide à double enveloppe pour la synthèse des sucroesters 84
Figure II-2: Expériences à réaliser dans un plan à deux variables 89
Figure II-3: Première étape de la réaction de coloration des sucres par le réactif d'α-naphtol 92
Figure II-4: Etalonnage de la méthode photodensitométrique pour des solutions de fructose 93
Figure II-5: Chromatogramme d'un milieu de synthèse de myristates de fructose dosés par photodensitométrie 94
Figure II-6: Chromatogramme issu d'une synthèse de caprates de fructose : Dosage DDL 97
Figure II-7: Etalonnage de la courbe de dosage du fructose par DDL 98
Figure II-8: Etalonnage de la courbe de dosage des acides gras par DDL 98
Figure II-9: Chromatogramme issu d'une synthèse de myristates de fructose. Dosage RI 100
Figure II-10: Etalonnage de la courbe de dosage des acides gras par RI 101
Figure II-11: Etalonnage de la courbe de dosage des monoesters de fructose par RI 102
Figure II-12: Réacteur Wheaton® à double enveloppe de 250 ml de volume utile 103
Figure II-13: Schéma représentatif du coulomètre KF 104
Figure II-14: Détermination du coefficient de partage du fructose entre l'eau et le méthyl-2 butanol-2 à 60 °C 112
Figure II-15: Schéma du tensiomètre Krüss K12 118
Figure II-16: Mesure de la tension superficielle entre la solution tensioactive et l'air selon la méthode de la lame de Wilhelmy 119
Figure II-17: Détermination de la Concentration Micellaire Critique par la méthode de la lame de Wilhelmy 120
Figure II-18: Mesure de la tension interfaciale entre la solution aqueuse contenant le tensioactif et l'huile de colza selon la méthode de l'anneau Du Nouy 121
Figure II-19: Détermination du pouvoir moussant selon la méthode Ross Miles 122

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ TABLEAUX ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Tableau II-1: Domaines expérimentaux des facteurs retenus pour l'étude préliminaire 87

Tableau II-2: Appréciation des valeurs de R^2 et Q^2 90

Tableau II-3: Gradient d'élution pour la séparation des esters de sucre et d'acide gras par DDL .. 96

Tableau II-4: Conditions de dosage des acides gras et des monoesters par RI 99

Tableau II-5: Valeurs de constantes fragmentales d'hydrophobicité selon la méthode de Nys et Rekker 106

Tableau II-6: Facteurs de correction utilisés pour le calcul des valeurs de log *P* 107

Tableau II-7: Groupements constituant les acides gras utilisés et leurs log *P* calculés 107

Tableau II-8: Groupements constituant les monoesters de fructose synthétisés et leurs log *P* calculés 108

Tableau II-9: Groupements constituant les diesters de fructose synthétisés et leurs log *P* calculés 108

Tableau II-10: Décomposition structurale de quelques molécules 114

Tableau II-11: Exemples de paramètres d'interaction de groupements fonctionnels UNIFAC 115

Tableau II-12: Exemples de sous-groupes et de leurs paramètres respectifs donnés par UNIFAC 116

Tableau II-13: Conditions de séparation des mélanges mono- et diesters par extraction au CO_2 supercritique 117

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

1- Matériels

1.1. Biocatalyseurs

La lipase de *Candida antarctica* utilisée est Novozym 435 avec une activité de 7000 PLU/g, où 1 unité de propyl laurate (1 PLU) est définie comme 1 µmol d'acide laurique transformée en propyl laurate par minute sous les conditions standards (Novo). Il s'agit d'une lipase immobilisée sur une résine acrylique macroporeuse avec une teneur en eau de 1 à 2 % (p/p) et une teneur protéique enzymatique comprise entre 1 et 10 % (p/p).

1.2. Réactifs

- Fructose (Merck) d'une pureté supérieure à 99 %.
- Acides gras: acide caprylique (C8), acide caprique (C10), acide laurique (C12), acide myristique (C14), acide palmitique (C16) et acide stéarique (C18) de pureté supérieure à 99 % (Fluka).
- Solvants organiques:

  Méthyl-2 butanol-2 de pureté > 99 %.(Merck)

  Hexane et acétonitrile de pureté > 99 % (Merck). Tous les autres réactifs sont d'une qualité analytique et d'une pureté supérieure à 99%.

2- Mise en œuvre des synthèses enzymatiques

Les réactions de synthèse ont lieu dans un réacteur discontinu de 2 L (**Figure II-1**). La pression est maintenue à 200 mbars et la température à 60 ± 0.1 °C tout au long de la réaction.

Le milieu réactionnel est agité à 200 trs/mn. Cette vitesse d'agitation a été choisie comme compromis pour maintenir l'intégrité des particules de lipase d'une part et permettre un bon transfert des substrats vers l'enzyme d'autre part. Il faut noter que toutes les réactions de synthèse ont été réalisées en milieu hétérogène, c'est-à-dire avec une concentration en fructose supérieure à sa solubilité dans le méthyl-2 butanol-2 à 60 °C (13.5 g/l).

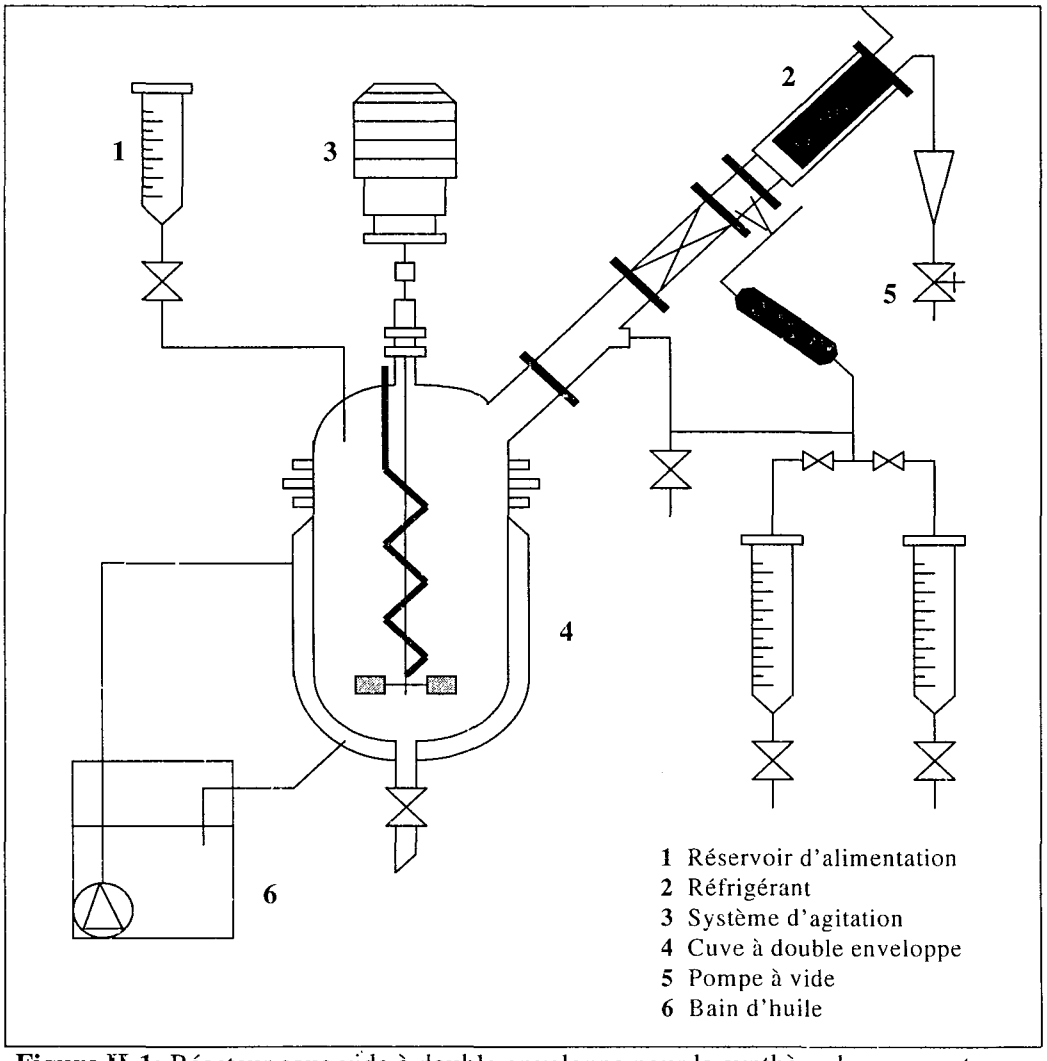


Figure II-1: Réacteur sous vide à double enveloppe pour la synthèse des sucroesters

2.1. Mise en œuvre en discontinu sous pression réduite

Dans les conditions standards, le fructose est préalablement mis sous agitation dans du méthyl-2 butanol-2 et à pression atmosphérique. Au bout de 10 à 12 h, l'acide gras et l'enzyme sont ajoutés au milieu réactionnel et le vide est appliqué. Le protocole opératoire général est comme suit:

- 140 mM de fructose (25 g/l)
- 28 à 700 mM d'acide gras (C8, C10, C12, C14, C16, C18)
- 1 L de méthyl-2 butanol-2
- 10 g/l Novozym 435
- 60 °C, 200 rpm, 200 mbars.

2.2. Mise en œuvre en discontinu avec tamis moléculaire

Le même protocole que celui décrit dans les conditions standards a été suivi lors de ce type de synthèse avec, toutefois, quelques variantes:

- Rapport molaire Fructose/Acide gras : 1/3;
- 140 mM fructose;
- 420 mM d'acide gras: C8, C12 et C14;
- 20 g/l Novozym 435;
- 200 g/l tamis moléculaire (4 Å)
- Temps de réaction: 7 heures.

2.3. Mise en œuvre avec ajout de fructose et en présence de tamis moléculaire

Le même protocole que celui décrit dans les conditions standards a été suivi lors de ce type de synthèse, exception faite des différences suivantes:

- 140 mM fructose avec un 1er ajout de 140 mM au bout de 7 heures et un 2ème ajout au bout de 25 heures;
- Temps de réaction: 7 heures.

3- Plan d'expériences: modélisation de la synthèse des esters de sucre et d'acide gras par la Méthodologie des Surfaces de Réponses

3.1. Objectifs de l'étape de modélisation

En général, lors d'une recherche scientifique on a besoin de répondre aux questions suivantes:

- quels sont les facteurs ayant un effet significatif sur les réponses?
- quels sont les facteurs possédant des interactions significatives (de synergie ou d'antagonisme)?
- quelles sont les conditions opératoires optimales permettant d'obtenir les meilleures réponses?
- comment prédire les réponses dans des conditions opératoires données?

Pour cela, les plans d'expériences peuvent être considérés comme des outils efficaces pour le choix des facteurs influents, l'optimisation des conditions et l'évaluation des effets des facteurs. Cet outil nous permet d'avoir plus d'informations sur un phénomène donné comparé à la méthode habituellement utilisée qui consiste à réaliser les expériences en faisant varier un paramètre à la fois (one-variable-at-a-time: OVAT). En effet, le plan d'expériences prend en considération les interactions entre facteurs en changeant simultanément leurs niveaux. En outre, les plans d'expériences utilisent la Méthodologie des Surfaces de Réponse pour représenter les relations entre les réponses et les niveaux de facteur.

La Méthodologie des Surfaces de Réponses a été largement utilisée dans l'étude de diverses réactions de synthèse dont celle des alkylglycosides (Ismail *et al.*, 1998) ainsi que celle des sucroesters (Shieh et *al.*, 1996a et b; Garcia et *al.*, 1996; Soultani *et al.*, 2001).

Le principe de cette méthodologie consiste à traduire par un ou plusieurs modèles mathématiques les relations de cause à effet entre les variables indépendantes (facteurs) et les variables dépendantes (réponses) (Linder, 1996).

L'un des objectifs de cette étude est l'utilisation des plans d'expériences pour nous permettre de quantifier l'effet de la concentration initiale en acide gras (facteur quantitatif) et la longueur

de chaîne carbonée du donneur d'acyle (facteur qualitatif) sur les réactions de synthèse des esters de sucre et d'acide gras.

3.2. Paramètres et domaines expérimentaux

On entend par paramètres expérimentaux ou facteurs, les variables expérimentales qui peuvent être changées indépendamment les unes des autres et qui peuvent affecter les performances du système étudié.

A partir de l'étude bibliographique, on a retenu les domaines expérimentaux présentés dans le **Tableau II-1**.

Tableau II.1: Domaines expérimentaux des facteurs retenus pour l'étude préliminaire.

Facteur	***Unité***	***Domaine expérimental***
Concentration acide gras	mM	140 – 700
Nombre carbone	–	8 – 18

3.3. Réponses expérimentales

On entend par réponse la valeur mesurée du résultat à partir des expériences. Lors de notre étude, les réponses expérimentales suivantes ont été retenues:

- la concentration finale en sucroesters totaux (g/l);
- la sélectivité de la réaction vis-à-vis des monoesters, définie comme le pourcentage des monoesters par rapport aux sucroesters totaux (%);
- le rendement de conversion de l'acide gras (%);
- Le rendement de conversion du fructose (%);
- La vitesse de consommation de l'acide gras à 30 minutes (mM AG consommé/g enzyme.h).

On s'est également intéressé à l'évolution de l'hydrophobicité initiale du milieu (log *P*) en fonction du nombre de carbone et de la concentration en acide gras.

3.4. Matrice expérimentale

Pour relier les réponses expérimentales aux facteurs indépendants, nous avons utilisé un polynôme de second ordre:

$$\eta = \beta_0 + \sum_{i=1}^{2} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{2} \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

où η est la réponse, X_i (i = 1-2) sont les valeurs non codées des facteurs, β_0 est le coefficient constant, β_i sont les coefficients linéaires, β_{ii} sont les coefficients quadratiques, et β_{12} le coefficient de l'interaction.

Les valeurs codées x_i des différentes variables étant reliées de manière linéaire aux valeurs non codées X_i par l'équation suivante:

$$x_i = 2 * (X_i - \overline{X_i}) / d_i$$

Où

$\overline{X_i}$ est la moyenne des valeurs de Xi aux niveaux +1 et -1

d_i est la différence entre les niveaux +1 et –1 de X_i.

L'utilisation de polynômes pour représenter les réponses expérimentales nous permettra de réaliser les objectifs suivants:

- modéliser la réponse étudiée dans tout le domaine expérimental;
- étudier l'influence de chaque paramètre;
- déterminer les éventuelles interactions entre les différents facteurs.

Nous avons utilisé une matrice qui consiste en un plan factoriel complet avec n_c expériences au centre (**Figure II-2**). Le nombre total d'expériences N à réaliser est:

$$\mathbf{N = K^2 + 2K + 1}$$

K étant le nombre de facteurs.

Ainsi pour deux facteurs, 11 expériences sont réalisées si on prend $n_c = 3$. Les répétitions au centre du domaine permettent d'évaluer l'erreur expérimentale.

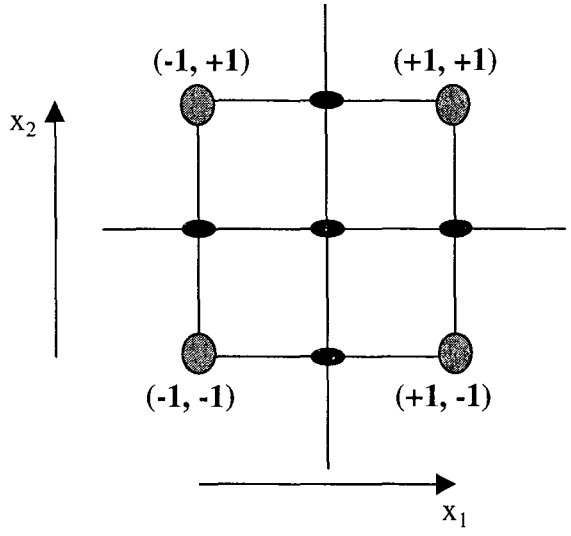


Figure II-2: Expériences à réaliser dans un plan à deux variables

3.5. Validité des modèles

Afin d'évaluer la validité des modèles développés, les valeurs de la variation expliquée par le modèle, R^2, et la capacité de prédiction du modèle, Q^2, constituent d'excellents outils statistiques.

La variation expliquée est la fraction de la variation totale de la réponse expliquée par le modèle. Elle est calculée de la manière suivante:

$$R^2 = (SS - SS_{résid})/SS$$

SS étant la somme des carrées de la variation totale d'une réponse donnée, corrigée pour la moyenne. SS total est divisée en deux parties, une partie résultant du modèle de régression ($SS_{régre}$) et une autre partie due aux résidus ($SS_{résid}$). Ainsi, de faibles résidus permettent d'obtenir un degré élevé de variation expliquée par le modèle.

La variation prédite, Q^2, est la fraction de la variation totale de la réponse qui peut être prédite dans le modèle. Elle est calculée comme suit:

$$Q^2 = (SS - PRESS)/SS$$

PRESS est la somme des carrées du résidu de prédiction. De faibles déviations entre les résidus obtenus et prédits permettent d'obtenir de faibles PRESS et une valeur élevée de la variation prédite.

- Le coefficient de corrélation R^2 : plus il est élevé, plus le modèle est précis et explique la variabilité observée du système.
- Le résidu ou manque d'ajustement (Lack of fit) : il permet de comparer l'erreur expérimentale à celle due au modèle. Le « lack of fit » doit être supérieur à 0.05 pour que le modèle soit valable et permette de prédire et optimiser la réponse.
- La probabilité P (P-value) : c'est la probabilité de l'erreur commise en acceptant l'hypothèse qu'un paramètre a un effet significatif alors qu'il n'en a pas. Si la valeur est inférieure à 0.05, on considère que le paramètre a un effet significatif. Les paramètres n'ayant pas d'effet significatif seront éliminés de l'équation permettant ainsi d'affiner le modèle.

Le **Tableau II-2** montre les valeurs au-delà desquelles on peut considérer qu'un modèle est valide pour décrire un phénomène d'après Lundstedt *et al.* (1998).

Tableau II-2: Appréciation des valeurs de R^2 et Q^2

Domaine	**R^2**	**Q^2**
Chimie	***Acceptable***: ≥ 0.8	***Acceptable***: ≥ 0.5 ***Excellent***: > 0.8
Biologie	***Acceptable***: > 0.7	***Acceptable***: > 0.4

Afin de déterminer les coefficients des modèles et effectuer l'analyse de variance, les données expérimentales ont été traitées par le logiciel MODDE 4.0®.

4- Méthodes analytiques

4.1. Analyse des sucres et des sucroesters

Deux méthodes analytiques ont été utilisées pour le dosage des substrats et des produits : la Chromatographie sur Couche Mince (CCM) associée à une lecture photodensitométrique et la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

4.1.1. Analyse par photodensitométrie

4.1.1.1. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince

L'échantillon à analyser (0.5 µl) est déposé sur une plaque de silice à l'aide d'une microseringue. La plaque est ensuite éluée avec un mélange de solvants constitué de chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (80/15/8/2, v/v/v/v). La migration se déroule en approximativement 2 heures à température ambiante.

Après migration, les composés polaires (fructose) restent pratiquement sur la ligne de dépôt alors que les sucroesters présentent des Rf médians.

La plaque est ensuite séchée à température ambiante puis vaporisée avec le réactif d'α-naphtol (1.59 g d'α-naphtol sont dissous dans 51 ml d'éthanol puis ajoutés à 4 ml d'eau et 6.5 ml d'acide sulfurique 18 M). Les différents composés osidiques présents dans le milieu sont révélés par chauffage à 105 °C pendant 5.5 minutes. Le fructose et les sucroesters présents dans le milieu sont déshydratés en présence d'acide sulfurique concentré pour former l'hydroxy-méthyl-furfural ou le méthyl-furfural. Ce dernier réagit avec l'α-naphtol pour former un dérivé de couleur violacée plus ou moins prononcée en fonction de la concentration (**Figure II-3**).

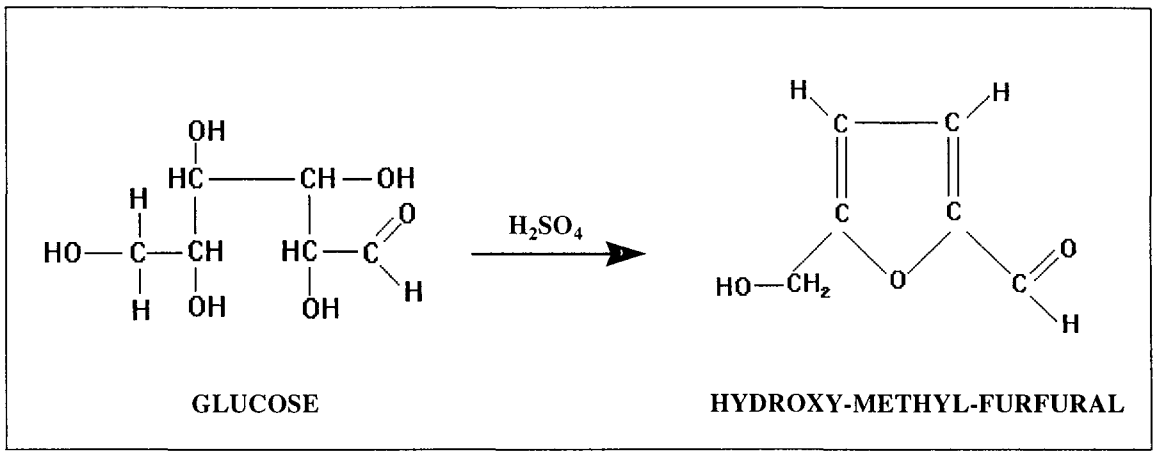


Figure II-3: Première étape de la réaction de coloration des sucres par le réactif d' α-naphtol

4.1.1.2. Analyse quantitative par Photodensitométrie

a. Principe

L'analyse par photodensitométrie suit l'analyse qualitative sur couche mince. Cette méthode consiste à quantifier le produit étudié en mesurant l'intensité de la coloration de la tâche qui le représente. Il s'agit d'une lecture d'absorption qui se fait à une longueur d'onde choisie.

La lampe à fil de tungstène du photodensitomètre (Shimadzu CS 9000, Kyoto; Japon) émet un faisceau lumineux qui balaye la plaque en zigzag, de la ligne de dépôt vers le front de solvant. Il est réfléchi sur la plaque, et l'appareil mesure la différence entre l'intensité du faisceau émis et du faisceau réfléchi.

La quantification se fait en mesurant l'intensité de la coloration des tâches révélées représentant les différents composés à 545 nm. Cette longueur d'onde a été choisie dans un spectre allant de 370 à 700 nm, car elle permet d'obtenir la plus grande différence d'absorption entre le fond de la plaque et la tâche.

Le pic obtenu représente l'absorption en fonction de la position du faisceau sur la plaque. L'aire de pic obtenue permet ainsi la quantification par comparaison à des témoins de concentration connue déposés sur la même plaque.

b. Etalonnage

Une gamme de concentration en fructose allant de 0 à 5 g/l a permis d'étalonner le dosage du fructose dans le milieu afin de permettre de déterminer le taux de conversion du fructose en sucroesters. Dans cet intervalle de concentration la relation liant l'aire des pics et la concentration en fructose est linéaire (**Figure II-4**).

Il faut noter qu'un étalonnage a été réalisé pour chaque plaque de silice afin d'éviter les erreurs liées à la quantité de réactif pulvérisé et au temps de chauffage.

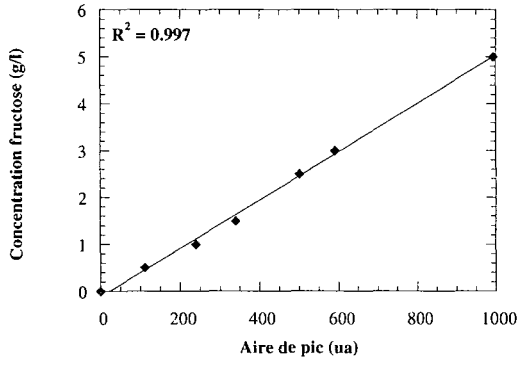


Figure II-4: Etalonnage de la méthode photodensitométrique pour des solutions de fructose.

c. Dosage des sucroesters

L'absence d'esters de fructose et d'acide gras dans le commerce nous a conduit à déterminer la concentration des produits formés à partir de la gamme étalon du fructose. Dans ce dosage nous avons supposé que la présence de groupements acyles n'entraîne pas de modification de l'intensité des tâches obtenues suite à la réaction avec l'α-naphtol. Ainsi, une mole de sucroester devrait réagir de la même manière qu'une mole de fructose non acylé. Il faut noter que cette méthode a déjà été validée au sein de notre laboratoire (Coulon, 1997).

La **Figure II-5** représente un chromatogramme d'un milieu de synthèse contenant du fructose et deux isomères de monoesters de fructose.

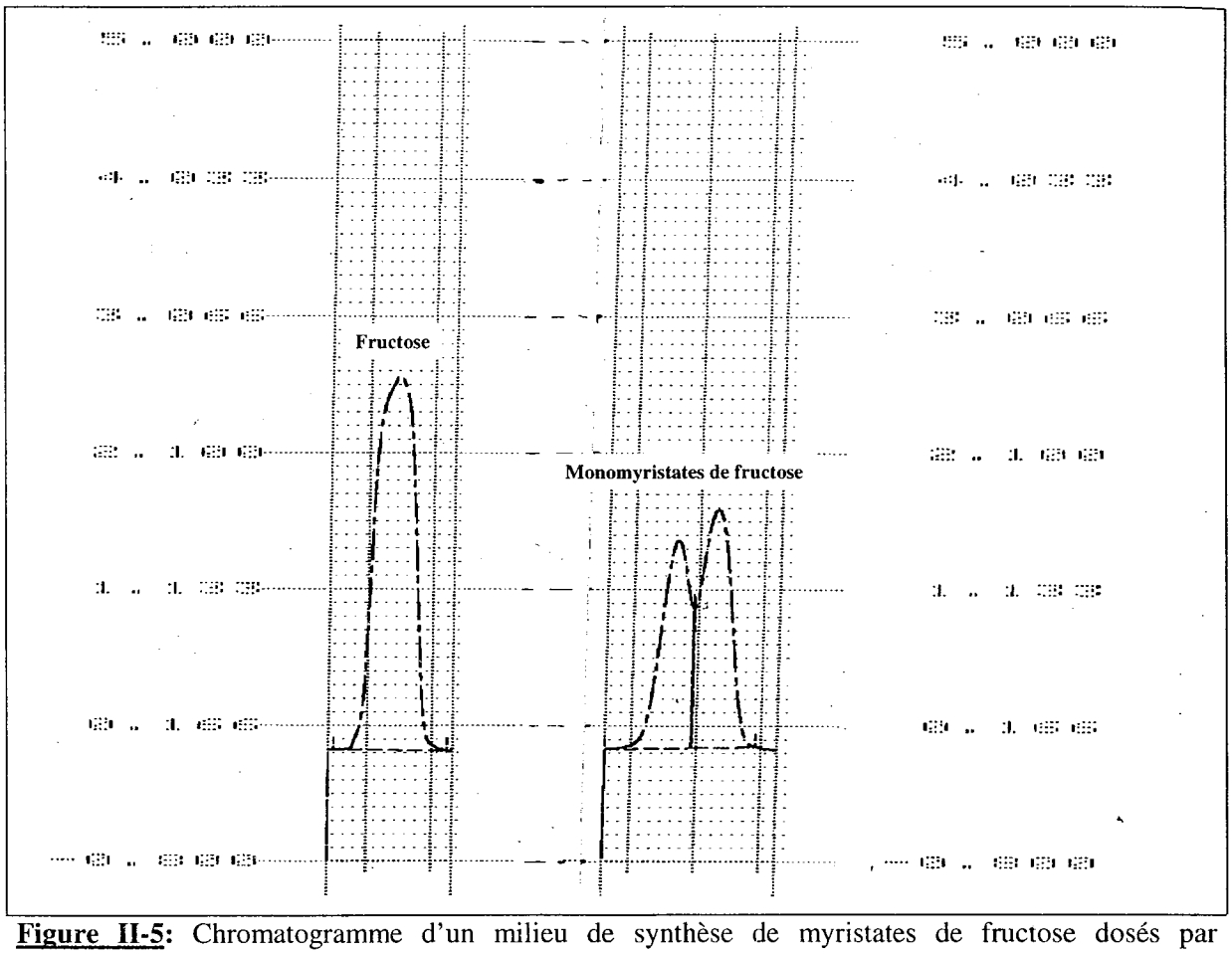


Figure II-5: Chromatogramme d'un milieu de synthèse de myristates de fructose dosés par photodensitométrie.

d. Evaluation des concentrations en substrats résiduels et des rendements de conversion

Les concentrations résiduelles en acide gras et en fructose ont été déterminées théoriquement. En supposant qu'on a formation exclusive de mono- et de di- esters de fructose, on peut en conclure que lorsqu'une mole de monoesters est formée, une mole d'acide gras et une mole de fructose sont consommées. De même, pour une mole de diester produite, 2 moles d'acide gras et une mole de fructose sont consommées. Par conséquent, on peut calculer les nombres de moles des substrats résiduels grâce aux formules suivantes:

$$\mathbf{AG_{Rés} = AG_0 - ME - 2*DE}$$

Et

$$\mathbf{Frc_{Rés} = Frc_0 - ME - DE}$$

Où

$AG_{Rés}$ et $Frc_{Rés}$: concentrations molaires en acide gras et en fructose résiduels respectivement,

AG_0 et Frc_0: concentrations molaires initiales en acide gras et en fructose respectivement,
ME: concentration molaire en monoesters,
DE: concentration molaire en diesters.

Les rendements de conversion de l'acide gras (Rdt AG, %) et du fructose (Rdt Frc, %) ont donc été calculés de la manière suivante:

$$\textbf{Rdt AG (\%)} = (AG_0 - AG_{Rés})/AG_0$$

Et

$$\textbf{Rdt Frc (\%)} = (Frc_0 - Frc_{Rés})/Frc_0$$

4.1.2. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

a. Principe

En chromatographie en phase liquide, comme dans toute méthode chromatographique, les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles, l'une solide poreuse, appelée phase stationnaire (la colonne), l'autre constituée par un solvant et dite phase mobile. Des différences d'affinité des divers constituants du mélange pour chacune des deux phases, il résulte des différences entre les vitesses de migration de ces composés d'où une possibilité de séparation.

La colonne utilisée dans cette étude est apolaire (support de silice sur lequel sont greffées des chaînes aliphatiques à 18 atomes de carbone) alors que l'éluant (mélange méthanol/eau ou acétonitrile/eau) est polaire: on effectue ainsi une chromatographie à polarité de phase inversée.

b. Matériels

Les différentes analyses ont été effectuées grâce au système Merck (LaChrom, Merck) équipé des éléments suivants:

- une colonne Purospher® RP-18e 5 µm (250x4.0 mm, Merck);

- un détecteur indice de réfraction (L-7490, Merck);
- un détecteur à diffusion de lumière DDL 31 (Eurosep);
- un four de colonne (L-7350, Merck);
- un injecteur d'échantillons automatique (L-7200, Merck);
- une pompe (L-7100, Merck);
- un logiciel d'acquisition et de traitement de chromatogramme EZ-Chrom®.

c. Mode opératoire de la méthode d'analyse avec le DDL

L'échantillon à analyser est dilué dans du méthyl-2 butanol-2 afin de se situer dans la gamme de linéarité du détecteur. L'échantillon renfermant des molécules de polarités différentes, il est nécessaire de réaliser un gradient d'élution afin de séparer tous les composants du milieu. Le **Tableau II-3** donne la composition de ce gradient en fonction du temps d'analyse. Le passage du mélange H_2O/MeOH (75/25, v/v) permet d'éluer dans un premier temps le composé le plus polaire (fructose). L'enrichissement progressif de l'éluant en méthanol permet d'entraîner les monoesters, les acides gras et enfin les diesters. L'analyse est effectuée avec un débit d'élution de 1 ml/mn. La température de la colonne étant régulée à 55 °C. La sensibilité et la température du détecteur retenues pour les analyses sont de 450 et 45°C respectivement.

Tableau II-3: Gradient d'élution pour la séparation des esters de sucre et d'acide gras par DDL.

Temps (mn)	H_2O/MeOH (75/25, v/v)	MeOH
0	100	0
5	0	100
20	0	100
25	100	0

La **Figure II-6** représente le chromatogramme d'un échantillon issu d'un milieu réactionnel de synthèse des sucroesters. L'identification des différents pics a été réalisée par injection d'étalons de fructose et d'acides gras.

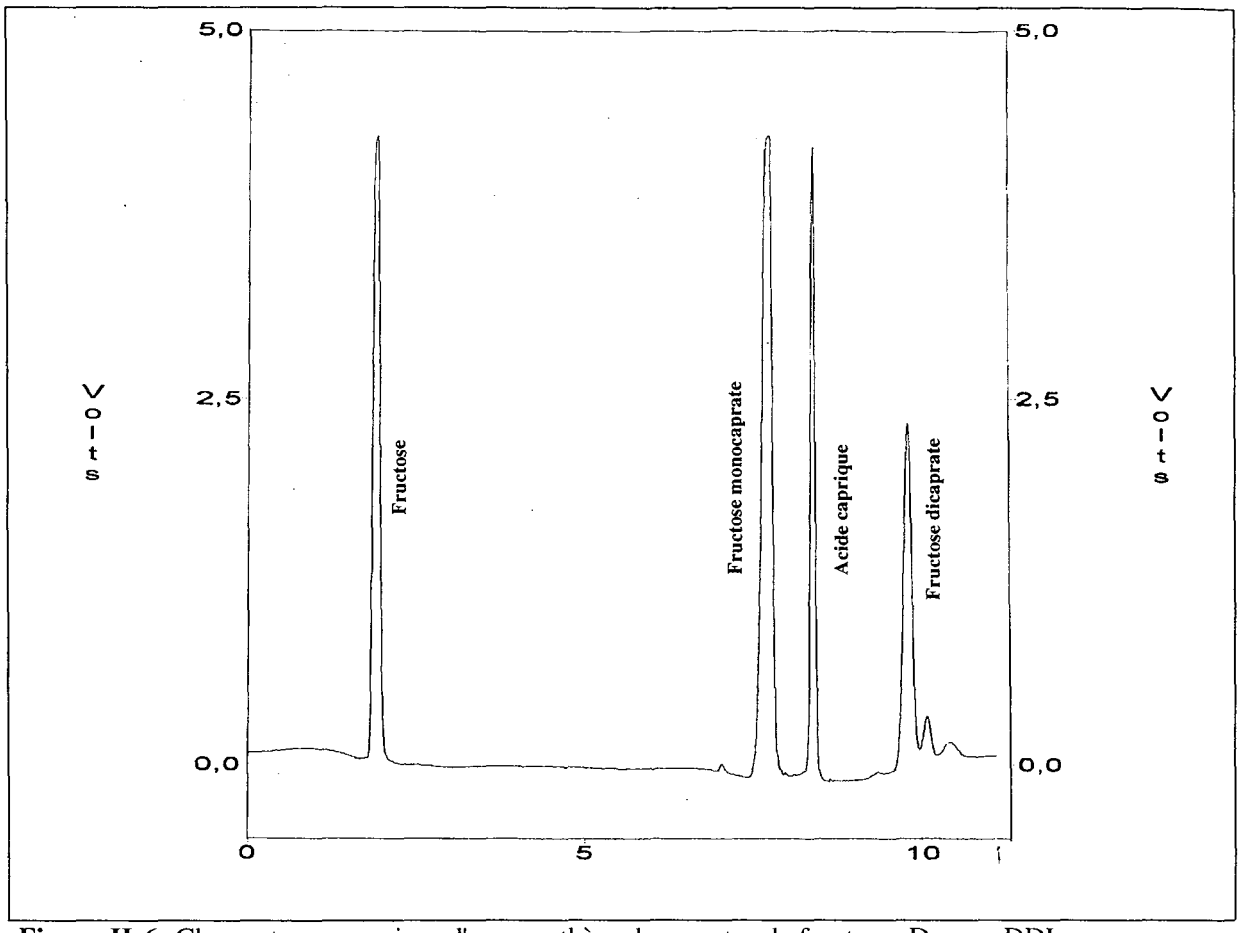


Figure II-6: Chromatogramme issu d'une synthèse de caprates de fructose. Dosage DDL.

d. Etalonnage de la méthode d'analyse avec le DDL

L'étalonnage de cette méthode a été réalisé pour les différents substrats intervenant lors des synthèses à savoir: le fructose et les acides gras à éliminer lors de l'étape de purification (acide caprique, acide myristique et acide stéarique).

- **Dosage du fructose**

Des solutions aqueuses de fructose, de concentrations connues, ont été injectées successivement dans le système analytique. La **Figure II-7** montre que la relation entre l'aire des pics et la concentration en fructose est linéaire dans un intervalle de concentration allant de 0 à 5 g/l.

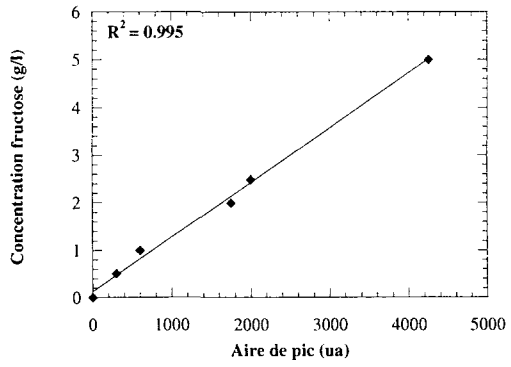


Figure II-7: Etalonnage de la courbe de dosage du fructose par DDL

❑ Dosage des acides gras

Des solutions méthanoliques de chacun des acides gras ont été préparées sur une gamme de concentration allant de 0 à 5 g/l. La réponse étant linéaire dans cet intervalle de concentrations. Il faut noter que dans le cas du dosage des acides gras, la sensibilité de la méthode ne dépasse pas 1 g/l (**Figure II-8**).

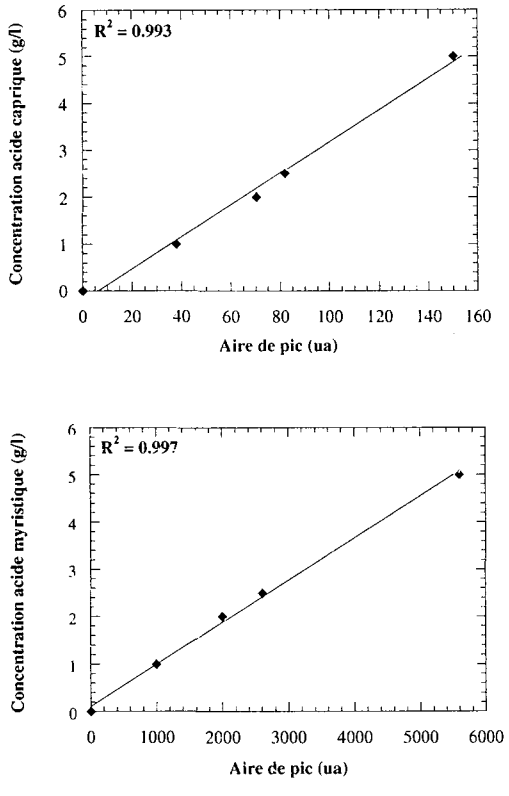


Figure II-8: Etalonnage de la courbe de dosage des acides gras par DDL

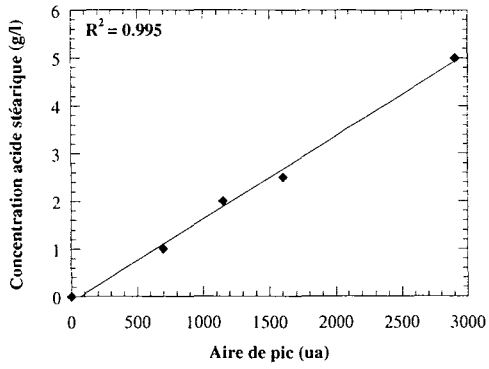


Figure II-8 (suite): Etalonnage de la courbe de dosage des acides gras par DDL

e. Mode opératoire de la méthode d'analyse avec le RI

Avec ce type de détecteur, il n'est pas nécessaire de réaliser un gradient d'élution. Le solvant utilisé dans ce cas est un mélange acétonitrile/eau. Le **Tableau II-4** résume les conditions de dosage des acides gras avec le RI.

Tableau II-4: Conditions de dosage des acides gras et des monoesters par RI.

Paramètres	Conditions opératoires
Acétonitrile/eau	95/5, v/v
Température colonne	55 °C
Débit pompe	0.5 ml/mn
Temps analyse	25 mn

La **Figure II-9** représente le chromatogramme d'un échantillon issu d'un milieu réactionnel de synthèse des sucroesters. L'identification des différents pics a été réalisée par injection d'étalons d'acides gras.

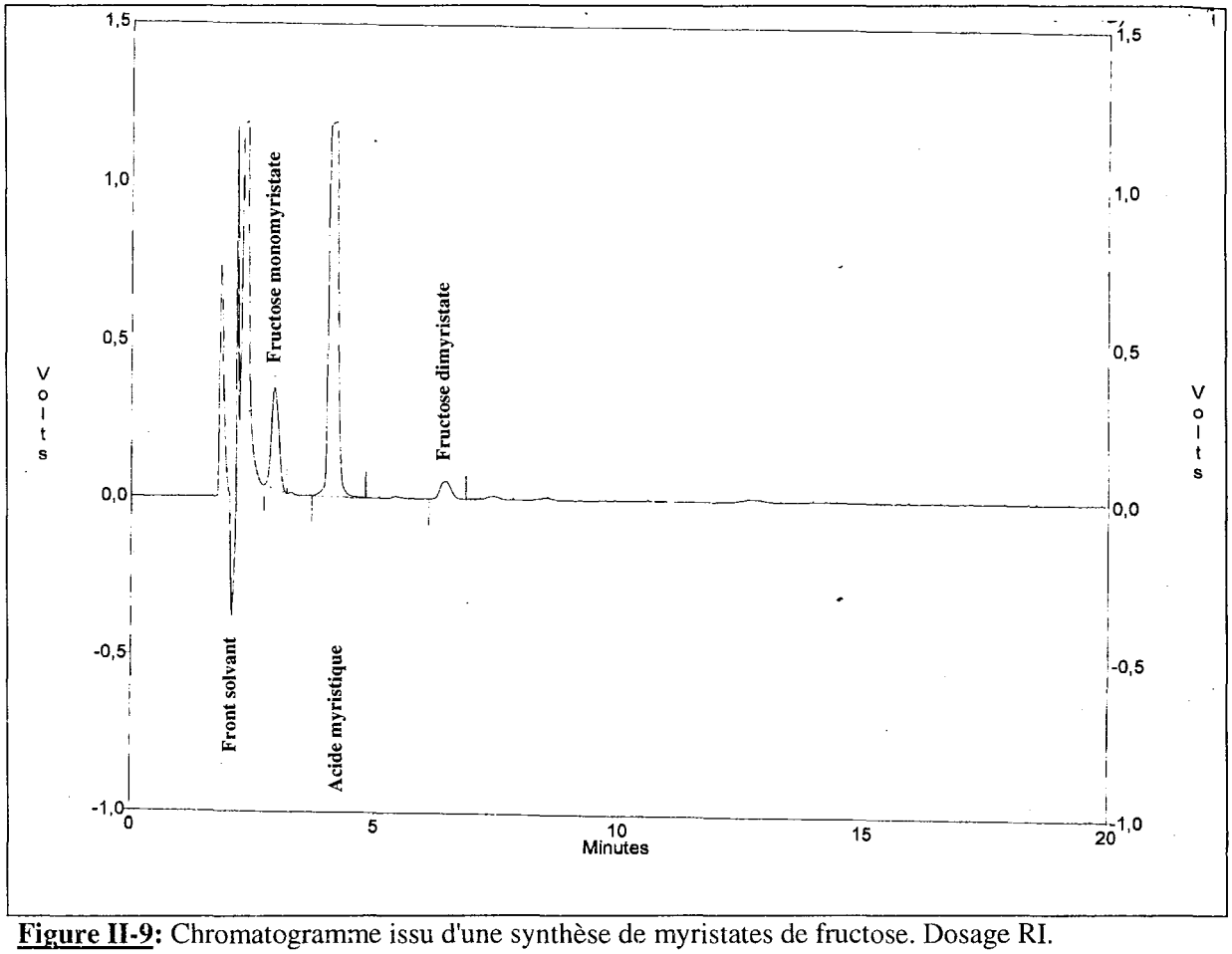
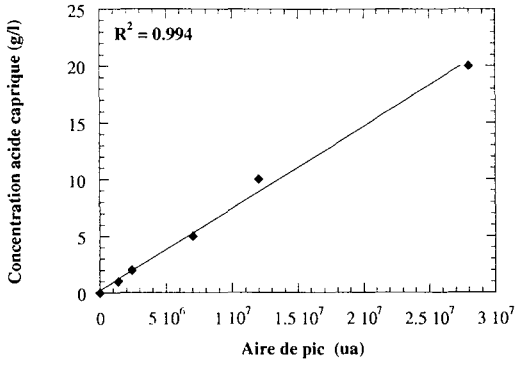


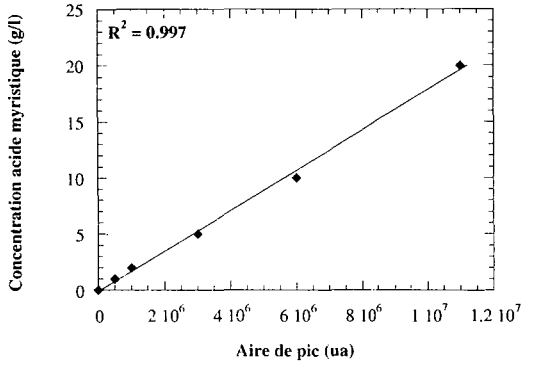
Figure II-9: Chromatogramme issu d'une synthèse de myristates de fructose. Dosage RI.

f. Etalonnage de la méthode d'analyse avec le RI

L'étalonnage de cette méthode a été réalisé pour les trois acides gras à éliminer lors de l'étape de purification (acide caprique, acide myristique et acide stéarique).

Les acides gras ainsi que les monoesters sont solubilisés dans de l'acétonitrile pour obtenir une gamme de concentration allant de 0 à 20 g/l. La réponse étant linéaire dans cet intervalle de concentrations. Dans ce cas, la sensibilité de la méthode est assez élevée nous permettant des descendre à des concentrations de 0.5 g/l (**Figure II-10 et II-11**).





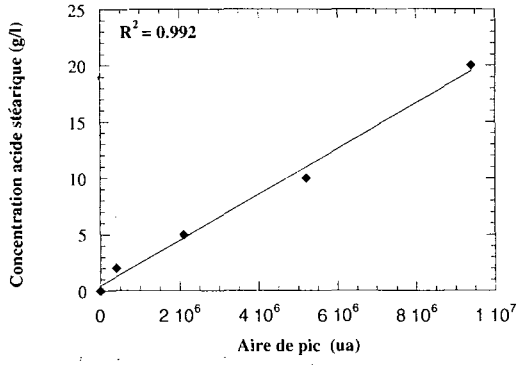


Figure II-10: Etalonnage de la courbe de dosage des acides gras par RI

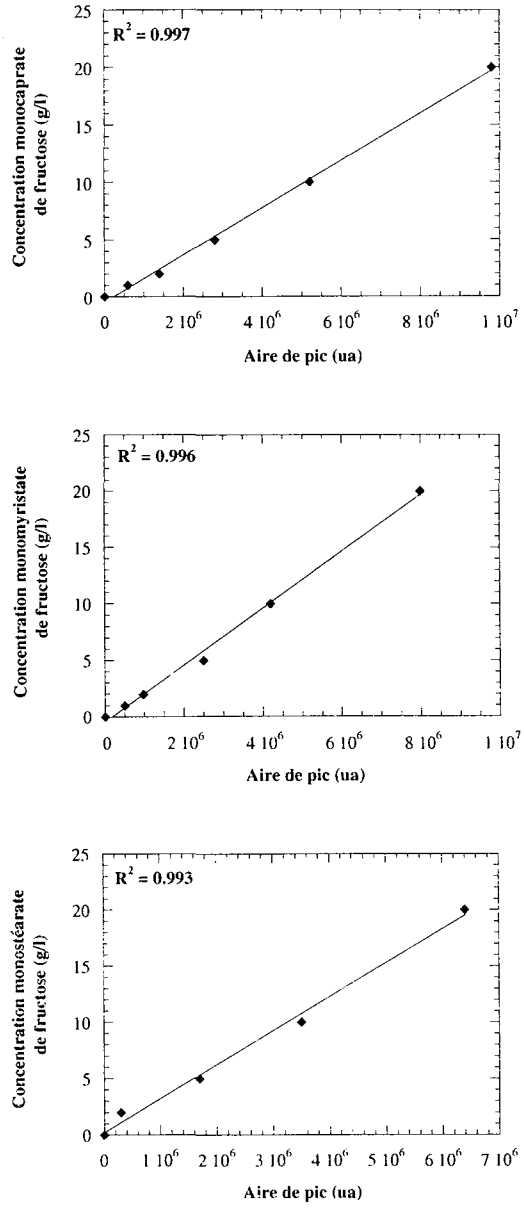


Figure II-11: Etalonnage de la courbe de dosage des monoesters de fructose par RI

4.2. Détermination de la solubilité du fructose dans le méthyl-2 butanol-2

La détermination de la solubilité du fructose a été inspirée de la méthode de Grant et Higuchi (1990). Cette méthode consiste à préparer une solution saturée à 25 g/l de fructose dans un réacteur parfaitement agité et à double enveloppe (**Figure II-12**). La double enveloppe permettant de réguler la température désirée.

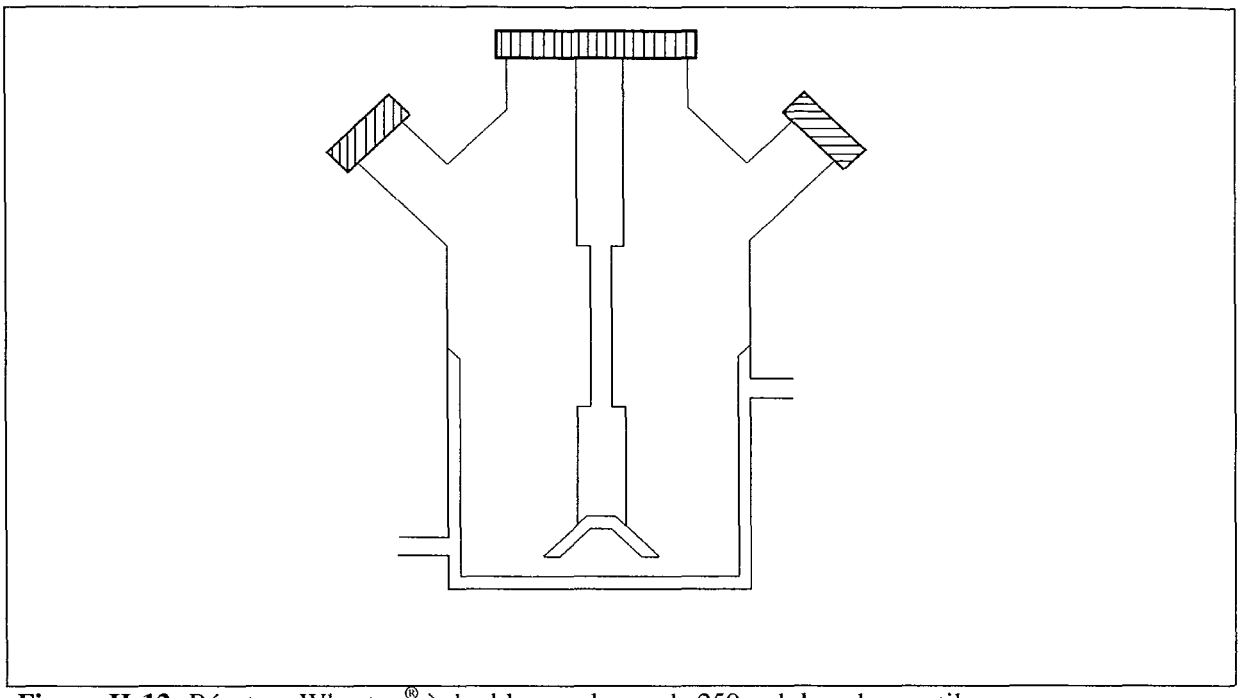


Figure II-12: Réacteur Wheaton® à double enveloppe de 250 ml de volume utile.

Des échantillons sont prélevés à partir des solutions saturées à intervalles réguliers (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 8, 24 et 48 heures) et filtrés. Le fructose soluble est ensuite dosé par CLHP (DDL).

4.3. Détermination de la quantité d'eau

La mesure de la quantité d'eau est effectuée par un titrage coulométrique selon la méthode Karl Fischer.

a. Principe

Le titrage d'une solution qui contient de l'eau comprend plusieurs réactions qui s'expriment par l'équation globale suivante:

$$\mathbf{H_2O + I_2 + [RNH]SO_3CH_3 + 3\ RN \longrightarrow [RNH]SO_4CH_3 + 2\ [RNH]I}$$

Selon cette équation, I_2 réagit quantitativement avec H_2O. Cet enchaînement chimique constitue la base de l'analyse de l'eau.

Lors du titrage Karl Fischer, on génère l'iode directement dans l'électrolyte par voie électrochimique ("burette électronique"). Il y a une relation quantitative rigoureusement précise entre la quantité de courant et la quantité d'iode libérée, et c'est sur ce rapport que se base l'analyse de l'iode.

Le titrage à point final s'effectue par voltamétrie, c'est à dire par application d'un courant alternatif d'intensité constante à une électrode double de platine, ce qui génère entre les deux fils de platine une tension qui, en présence de quantités infimes d'iode libre, accuse une notable diminution, phénomène que l'on peut exploiter pour l'indication du point final du titrage.

b. Matériels

Les analyses sont réalisées grâce à un coulomètre KF 737II (Metrohm) à l'aide du réactif Hydranal-Coulomat AG-H (Riedel-de-Haën).

Les échantillons à doser sont injectés dans la cellule de mesure représentée sur la **Figure II-13**.

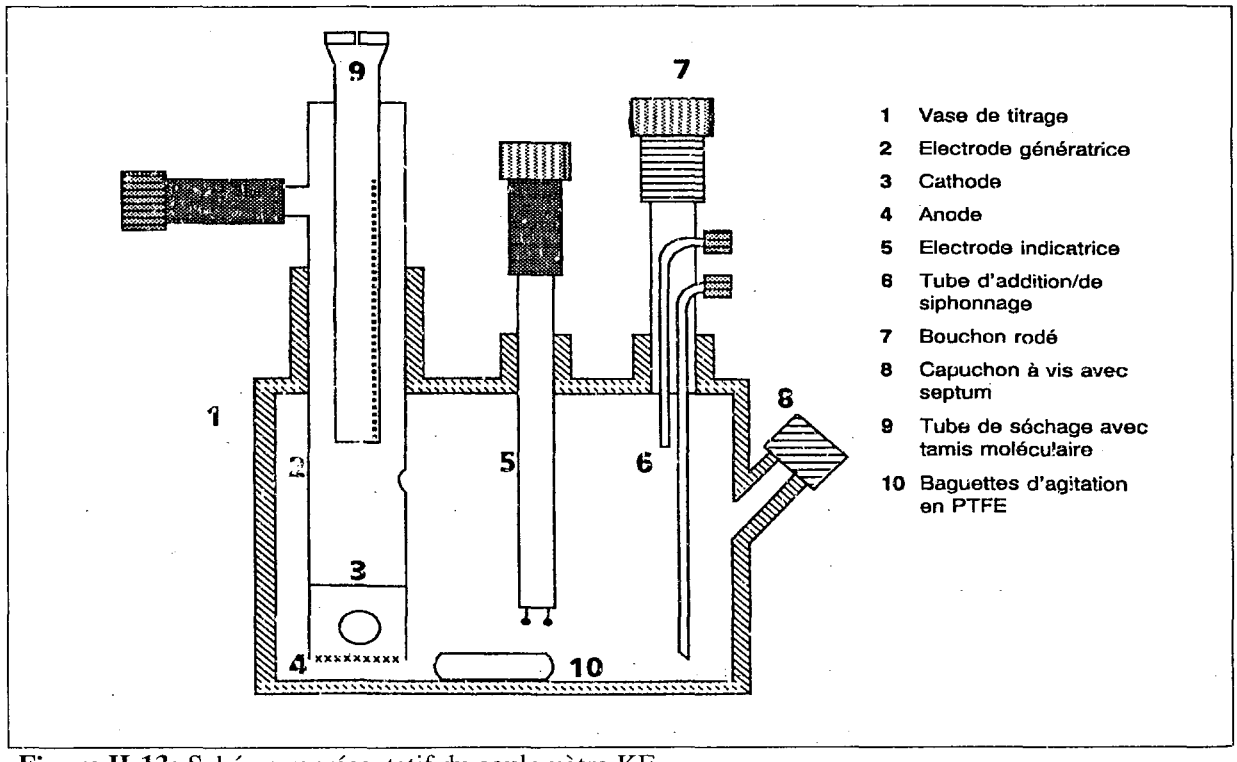


Figure II-13: Schéma représentatif du coulomètre KF.

c. Mode opératoire

Une quantité connue d'échantillon à analyser (50 à 100 mg) est injectée (Capuchon à vis) grâce à une seringue au sein de la cellule de mesure du coulomètre KF. L'appareil effectue la mesure et affiche le résultat final du dosage soit en % soit en ppm (p/p).

4.4. Détermination des vitesses de consommation de l'acide gras

La vitesse de consommation de l'acide gras est évaluée par la tangente à tout moment de la courbe de variation des concentrations de ce substrat. On s'intéressera aux vitesses à 30 minutes et 1 heure en fonction du type de réaction à étudier.

Pour estimer la vitesse de la réaction, nous avons cherché une fonction qui décrit au mieux l'évolution de la consommation de l'acide gras au cours du temps. D'une façon empirique, nous avons supposé que la vitesse pourrait être décrite par la fonction suivante :

$$\mathbf{dy/dt = (P_1.t/P_2 + t + t/P_3) + P_4}$$

où y est la concentration en acide gras (mM), t le temps (mn), P_1, P_2, P_3 et P_4 les paramètres à ajuster.

Pour démarrer le calcul, on initialise les paramètres P_1, P_2, P_3 et P_4, puis on intègre cette fonction pour obtenir $y_{théorique} = f(t)$.
La deuxième étape consiste à estimer les coefficients P_1, P_2, P_3 et P_4 par l'application de la méthode des moindres carrés. Le but de cette démarche est d'ajuster au mieux les paramètres P_1, P_2, P_3 et P_4 de manière à ce qu'ils décrivent le plus finement possible l'évolution de la vitesse de la réaction. Plusieurs itérations sont nécessaires avant d'assurer une convergence convenable. Une fois les paramètres P_1, P_2, P_3 et P_4 définis, on calcule les vitesses de consommation de l'acide gras en introduisant ces paramètres dans la fonction dy/dt proposée dans l'hypothèse.
Dans un but pratique, les vitesses seront exprimées en mM/g enzyme.h. En effet, l'utilisation de cette unité rend les vitesses comparables quel que soit l'acide gras utilisé dans la synthèse.

4.5. Calcul de l'hydrophobicité

4.5.1. Hydrophobicité des molécules

L'hydrophobicité des molécules a été déterminée grâce à leurs log *P*, P étant le coefficient de partition de ladite molécule entre l'eau et l'octanol. Le logiciel Pallas30® a été utilisé pour la prédiction des valeurs de log *P*.

Nys et Rekker (1973) ont déterminé les valeurs de log *P* de différentes molécules en attribuant une constante d'hydrophobicité, appelée valeur fragmentale f, à chaque groupement (**Tableau II-5**).

Tableau II-5 : Valeurs de constantes fragmentales d'hydrophobicité selon la méthode de Nys et Rekker (1973)

	$-CH_3$	$-CH_2$	-CH	-C-	-O-	-OH	-CO	-COOH	-COO-
F	0.702	0.527	0.236	0.14	-1.536	-1.44	-1.69	-1.003	-1.281

L'hydrophobicité d'une molécule donnée est ainsi calculée par la somme des constantes d'hydrophobicité de chaque groupement constituant la molécule et de facteurs de correction (Fc) tenant compte des différentes interactions et répulsions moléculaires entre fragments (**Tableau II-6**). En effet, la proximité des fragments entre eux entraîne:

- des liaisons hydrogène intermoléculaires (+);
- la réduction de la densité électronique d'un accepteur de liaison hydrogène (+);
- un "twisting" stérique d'un groupement polaire hors d'une liaison conjuguée (-).

Le calcul de log *P* s'effectue donc selon l'équation suivante:

$$\log P = \sum f_i + \sum Fc_i$$

Tableau II-6: Facteurs de correction utilisés pour le calcul des valeurs de log *P*

	Groupement hydrophile séparé par un atome de carbone	Groupement hydrophile séparé par 2 atomes de carbone	Groupement hydrophile sur un atome de carbone tétrasubstitué
Fc	0.80	0.46	-0.44

4.5.1.1. Prédiction de log P du fructose

La molécule de fructose est constituée de 2 groupements $-CH_2$, 3 groupements -CH, 5 groupements -OH, 1 groupement -C- et 1 groupement -O-. Sur cette molécule il faut appliquer 5 facteurs correctifs dus à la présence de groupements hydrophiles séparés par 2 atomes de carbone et 1 facteur correctif dû à la présence d'un groupement hydrophile sur un carbone tétrasubstitué. La somme de toutes ces valeurs donne un log *P* de –3.03.

4.5.1.2. Prédiction de log P des acides gras

Les acides gras utilisés comportent un groupement $-CH_3$, de 6 à 16 groupements $-CH_2$ en fonctions de l'acide gras et un groupement -COOH. Aucun facteur de correction n'est à prendre en considération. Les valeurs de log *P* des différents acides gras utilisés dans cette étude sont présentées dans le **Tableau II-7**.

Tableau II-7: Groupements constituant les acides gras utilisés et leurs log *P* calculés

Acide gras	$-CH_3$	$-CH_2$	-COOH	log *P*
Acide caprylique (C8)	1	6	1	2.8
Acide caprique (C10)	1	8	1	3.9
Acide laurique (C12)	1	10	1	4.9
Acide myristique (C14)	1	12	1	5.9
Acide palmitique (C16)	1	14	1	6.8
Acide stéarique (C18)	1	16	1	7.9

4.5.1.3. Prédiction de log P des monoesters

Les monoesters synthétisés comportent un groupement $-CH_3$, de 8 à 18 groupements $-CH_2$ en fonctions de l'acide gras, 3 groupements -CH, 1 groupement -C-, 1 groupement -O-, 4 groupements -OH et un groupement -COO-. 5 facteurs de correction dus à la présence de 5

groupements hydrophiles séparés par 2 atomes de carbone et 1 facteur de correction dû à la présence dans la molécule d'un groupement hydrophile sur un atome de carbone tétrasubstitué ont été appliqués. Les valeurs de log *P* des différents monoesters sont présentées dans le **Tableau II-8**.

Tableau II-8: Groupements constituant les monoesters de fructose synthétisés et leurs log *P* calculés

Acide gras	$-CH_3$	$-CH_2$	-CH	-C-	-O-	-OH	-COO-	log *P*
Monocaprate (C8)	1	6	3	1	1	4	1	0.7
Monocaprylate (C10)	1	8	3	1	1	4	1	1.7
Monolaurate (C12)	1	10	3	1	1	4	1	2.8
Monomyristate (C14)	1	12	3	1	1	4	1	3.8
Monopalmitate (C16)	1	14	3	1	1	4	1	4.8
Monostéarate (C18)	1	16	3	1	1	4	1	5.8

4.5.1.4. Prédiction de log P des diesters

Les diesters synthétisés comportent 2 groupements $-CH_3$, de 14 à 34 groupements $-CH_2$ en fonctions de l'acide gras, 3 groupements -CH, 1 groupement -C-, 1 groupement -O-, 3 groupements -OH et 2 groupements -COO-. On doit appliquer 5 facteurs de correction dus à la présence de 5 groupements hydrophiles séparés par 2 atomes de carbone et 1 facteur de correction dû à la présence dans la molécule d'un groupement hydrophile sur un atome de carbone tétrasubstitué. Les valeurs de log *P* des différents diesters sont présentées dans le **Tableau II-9**.

Tableau II-9: Groupements constituant les diesters de fructose synthétisés et leurs log *P* calculés

Acide gras	$-CH_3$	$-CH_2$	-CH	-C-	-O-	-OH	-COO-	log *P*
Dicaprate (C8)	2	14	2	1	1	3	2	4.5
Dicaprylate (C10)	2	18	2	1	1	3	2	6.5
Dilaurate (C12)	2	22	2	1	1	3	2	8.6
Dimyristate (C14)	2	26	2	1	1	3	2	10.6
Dipalmitate (C16)	2	30	2	1	1	3	2	12.7
Distéarate (C18)	2	34	2	1	1	3	2	14.7

4.5.1.5. Prédiction de log P du méthyl-2 butanol-2

La molécule du méthyl-2 butanol-2 est constituée de 3 groupements -CH3, 1 groupement -CH2, un carbone tétrasubstitué et un groupement hydrophile -OH fixé sur le carbone tétrasubstitué. Par conséquent la valeur de log *P* du méthyl-2 butanol-2 est de 0.89.

4.5.2. Hydrophobicité des mélanges

Pour un mélange constitué de 2 composés, la formule semi-empirique suivante peut être utilisée comme mesure qualitative de la polarité du milieu (Hilhorst *et al.*, 1984)

$$\log P_{mélange} = X_1 \log P_1 + X_2 \log P_2$$

Où X_1 et X_2 sont les fractions molaires des composés 1 et 2 respectivement.

5- Purification des esters de fructose et d'acide gras

En fin de synthèse, le milieu réactionnel contient le biocatalyseur qui doit être séparé du reste des constituants pour éviter la poursuite des réactions de synthèse ou d'hydrolyse. Le milieu de synthèse contient également les substrats résiduels et le solvant en plus des produits formés qu'il faudra purifier.

5.1. Filtration et séparation du biocatalyseur

Le Novozym 435 est séparé du milieu de synthèse par filtration sur verre fritté. L'enzyme immobilisée est lavé avec 20 ml de M2B2 chaud puis stockée à 4 °C pour une éventuelle réutilisation. Le M2B2 ayant servi au lavage de l'enzyme est rajouté au milieu de synthèse afin d'éviter toute perte en produits.

5.2. Purification des monoesters par extraction liquide-liquide

Lors de cette étape, on s'est intéressé uniquement à la purification des monoesters de fructose et d'acide gras pour en étudier les propriétés.

Les monoesters obtenus par synthèse enzymatique ont été purifiés par extraction liquide-liquide afin d'éliminer le maximum de sucre et d'acide gras résiduels ainsi que les diesters. L'élimination du sucre a été réalisée grâce à une extraction à l'eau alors que celle de l'acide gras et des diesters a été réalisée par extraction à l'hexane.

5.2.1. Séparation du fructose

Les essais de séparation du fructose à l'acétate d'éthyle consistent à mettre le milieu de synthèse, en présence d'un mélange acétate d'éthyle/eau (50/50, v/v) à température ambiante dans des ampoules à décanter. Le rapport entre le milieu réactionnel et le mélange de solvants étant de 1/1 (v/v). Le milieu est agité toutes les six heures pendant quelques secondes puis laissé au repos à cette même température. Ces opérations sont répétées pendant 24 heures.

Le protocole retenu par la suite consiste à mélanger 1L de milieu de synthèse, contenant des proportions variables de sucre, acide gras, monoesters et diesters, avec 1 L d'eau à 60 °C dans un réacteur à double enveloppe parfaitement agité (299 trs/mn). La cinétique d'extraction a été suivie dans les deux phases, aqueuse et organique, par prélèvements toutes les 5 minutes pendant 30 minutes d'extraction. Les analyses ont été réalisées par chromatographie CLHP.

A la fin de l'extraction, la phase aqueuse contenant le fructose est séparée de la phase organique contenant encore l'acide gras, les mono- et diesters.

5.2.2. Séparation de l'acide gras et des diesters

L'acide gras résiduel et les diesters sont séparés des monoesters avec un mélange acétonitrile/eau et de l'hexane.

L'étude préliminaire, qui a pour objectif de faire valider le système d'extraction retenu, consiste à réaliser l'extraction de monostéarates de fructose dans des ampoules à décanter à température ambiante et ceci à partir de la phase M2B2 après séparation du fructose. A cette phase sont ajoutés 2 volumes de phase (acétonitrile + 15 % eau) et un volume de phase hexane. L'ampoule est agitée quelques secondes après mise en contact des solvants et laissé reposer à température ambiante pendant 24 heures. Cette opération est répétée toutes les 6 heures tout au long de l'extraction. Au bout de 24 heures, la phase légère (phase hexane), contenant la totalité des diesters et la majorité de l'acide gras, est séparée de la phase lourde (phase acétonitrile/M2B2) qui contient essentiellement les monoesters. Des prélèvements sont effectués toutes les 5 minutes à partir des deux phases et les échantillons analysés par CLHP.

L'extraction en système contrôlé consiste à mélanger 1 volume de phase méthyl-2-butan-2-ol sans fructose avec 2 volumes (acétonitrile + 15 % eau) quel que soit l'acide gras à extraire. Ensuite, de l'hexane est rajouté à différentes proportions en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras. Les volumes ont été déterminés de manière à atteindre un volume total de 2 litres de mélange de solvants. L'extraction est réalisée dans le réacteur de synthèse (**Figure II-1**) muni d'une double enveloppe permettant d'atteindre une température d'extraction de 60 °C et d'un système d'agitation fixée à 300 rpm. Après 30 mn d'extraction, la phase hexane est renouvelée 2 à 3 fois. La cinétique d'extraction de l'acide gras et des diesters est suivie dans les deux phases par prélèvements toutes les 5 minutes. Les concentrations en acide gras et monoesters ont été déterminées par chromatographie CLHP.

5.2.3. Détermination des coefficients de partage

Le coefficient de partage des différentes molécules est déterminé par dosage dans les deux phases constituant le système d'extraction. Au bout de 30 minutes d'extraction, l'agitation est arrêtée et le milieu est laissé reposer à 60 °C jusqu'à séparation complète des phases. Les deux phases sont séparées et leurs volumes mesurés. Un échantillon est prélevé dans chaque phase puis analysé par CLHP. Le coefficient de partage K_t d'une molécule à un temps donné est défini comme étant le rapport de sa concentration dans la phase organique sur sa concentration dans la phase aqueuse.

$$K_t = [\text{Soluté}]_{\text{Phase org.}}/[\text{Soluté}]_{\text{Phase aq.}}$$

A titre d'exemple, le coefficient de partage du fructose entre l'eau et le M2B2 à 60 °C peut être déterminé en traçant la courbe de sa concentration dans la phase organique en fonction de celle dans la phase aqueuse. Dans ce cas, le coefficient de partage est égal à la pente de la droite (**Figure II-14**).

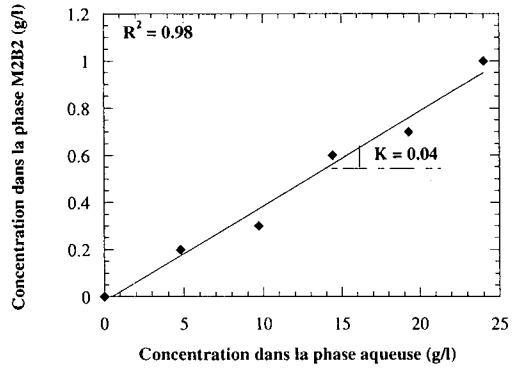


Figure II-14: Détermination du coefficient de partage du fructose entre l'eau et le méthyl-2 butanol-2 à 60 °C.

5.2.4. Calcul des taux de récupération et de la pureté des monoesters

Toutes les concentrations ont été déterminées en tenant compte de la variation des volumes des phases à la fin de l'extraction.

La pureté est déterminée à partir de la composition de la phase acétonitrile à la fin de l'extraction et après séparation des phases. Elle est définie par la fraction molaire des monoesters ($x_{monoester}$) par rapport aux fractions molaires des monoesters et de l'acide gras ($x_{acide\ gras}$) dans la phase acétonitrile.

$$\textbf{Pureté monoester (\%)} = \frac{x_{monoester}}{x_{monoester} + x_{acide\ gas}} * 100$$

Quant au taux de récupération des monoesters, il est défini comme étant le rapport entre la concentration des monoesters dans la phase acétonitrile et celle des monoesters dans la phase M2B2 après extraction du fructose.

$$\textbf{Taux récupération monosters (\%)} = \frac{[\text{Monoesters}]_{\text{Phase acétonitrile}}}{[\text{Monoesters}]_{\text{Phase M2B2}}} * 100$$

5.3. Prédiction des équilibres thermodynamiques

5.3.1. Prédiction des équilibres liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est préconisée quand les produits sont fragiles et la consommation énergétique est importante. Pour réaliser cette extraction, il est nécessaire de disposer de méthodes de prédiction des équilibres entre phases. Parmi les méthodes utilisées, le modèle UNIFAC (Universal Functional-group Activity Coefficient) est souvent utilisé (Magnussen *et al.*, 1981).

Ce modèle repose sur le concept des solutions de groupe (Fredenslund *et al.*, 1975). Il permet d'évaluer les coefficients d'activité en utilisant la méthode de contribution de groupe. Il a l'avantage de pouvoir former un nombre très grand de molécules à partir d'un ensemble relativement petit d'unités structurales. Les unités structurales dans la méthode de calcul s'appellent les sous-groupes.

Les molécules sont construites en combinant des sous-groupes. Quand il est possible de construire une molécule de plus d'un ensemble de sous-groupes, l'ensemble contenant le moindre nombre de différents sous-groupes est l'ensemble à employer pour le calcul.

5.3.2. Concept des solutions de groupe

Il existe à l'état naturel plusieurs milliers de molécules différentes. Néanmoins, le nombre de groupements chimiques qui les compose est beaucoup plus restreint (Achard *et al.*, 1992). Ce concept revient donc à considérer une solution non plus comme un mélange de molécules, mais comme un ensemble de groupes interagissant les uns avec les autres. Bien que cette méthode demeure approximative comparée à des corrélations spécifiques, son application à des milieux biologiques est intéressante pour les raisons suivantes:

- Elle est prédictive et permet en principe de considérer toutes les molécules biologiques existantes à partir de leur décomposition en groupes, ces molécules étant relativement monotones du point de vue structural. Le **Tableau II-10** montre quelques exemples de décomposition structurale de certaines molécules.
- Les domaines de température et de pression des procédés biotechnologiques sont généralement peu importants (-50 < T < 150 °C, 0 < P < 10 bars) et correspondent au domaine de linéarité du modèle UNIFAC
- Le modèle est facilement généralisable à des systèmes multiconstituants et permet de déterminer l'activité de toutes les espèces en solution, ce qui rend accessible le calcul des équilibres de phase.

Tableau II-10: Décomposition structurale de quelques molécules.

Molécules	Nombre de sous-groupes
n-Butane	2 CH_3 2 CH_2
Isobutane	3 CH_3 1 CH
Benzène	6 ACH*
Toluène	5 ACH* 1 $ACCH_3$*
Ethanol	1 CH_3 1 CH_2 1 OH
Acétone	1 CH_3 1 CH_3CO

* AC = Carbone aromatique

Les coefficients d'activité dépendent non seulement des propriétés de chaque sous-groupe mais aussi des interactions entre sous-groupes. Quelques paramètres d'interaction sont donnés comme exemples dans le **Tableau II-11**.

Tableau II-11: Exemples de paramètres d'interaction de groupements fonctionnels UNIFAC.

	1	2	3	4
CH_2	0.00	61.13	76.50	986.50
ACH*	-11.12	0.00	167.00	636.10
$ACCH_2$*	-69.70	146.80	0.00	803.20
OH	156.40	89.60	25.82	0.00

* AC = Carbone aromatique

5.3.3. Structure du modèle UNIFAC

Le modèle UNIFAC a été conçu dans le but de calculer le coefficient d'activité de chaque espèce présente en solution en fonction des paramètres de température, de pression et de composition du milieu. Il est composé de deux parties appelées respectivement partie combinationnelle et partie résiduelle.

Le coefficient d'activité γ_i d'une espèce i s'écrit de la manière suivante:

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^{comb} + \ln \gamma_i^{rés}$$

Où

$$\ln \gamma_i^{comb} = f(x_i, r_i, q_i)$$

$$\ln \gamma_i^{rés} = f(x_i, q_i, a_{nm})$$

La partie combinationnelle permet de prendre en compte la non-idéalité des solutions due aux différences de taille et de forme des molécules où x_i correspond à la fraction molaire liquide de la molécule i. Le volume et la surface occupés par les molécules en solution sont, quant à eux, traduits respectivement par les paramètres r_i et q_i (calculés comme étant la somme des contributions R_k et Q_k de chacun des groupes les constituant). Un nombre d'identification, k, étant associé à chaque sous-groupe. Le **Tableau II-12** montre quelques exemples de sous-groupes et de leurs paramètres respectifs donnés par UNIFAC.

Les interactions plus ou moins importantes entre les molécules en solution provoquent aussi un écart par rapport à l'idéalité. La prise en compte de cette non-idéalité est effectuée dans la partie résiduelle du modèle UNIFAC. a_{nm} représente le paramètre d'interaction entre deux

groupes n et m. Il est calculé à partir de U_{nm} et U_{nn}, énergies d'interactions entre n et m et entre deux groupes n respectivement.

Les paramètres de structure (R_k et Q_k) de chaque groupement fonctionnel ainsi que les paramètres d'interaction énergétique a_{nm} entre deux groupes sont répertoriés dans des tables établies à partir de données expérimentales (Mangnussen *et al.*, 1981).

Tableau II-12: Exemples de sous-groupes et de leurs paramètres respectifs donnés par UNIFAC

Groupement principal	Sous-groupe	k	R_k	Q_k
1: "CH2"	CH3	1	0.9011	0.848
	CH2	2	0.6744	0.540
	CH	3	0.4469	0.228
	C	4	0.2195	0.000
3: "ACH"*	ACH	10	0.5313	0.400
4: "ACCH2"*	ACCH3	12	1.2663	0.968
	ACCH2	13	1.0396	0.660
5: "OH"	OH	15	1.0000	1.200
9: "CH2CO"	CH3CO	19	1.6724	1.488
	CH2CO	20	1.4457	1.180

* AC = Carbone aromatique

Par le calcul des coefficients d'activité de chaque espèce en solution, on peut ainsi prédire si le système de solvants utilisé est mono-, di- ou même triphasique. De plus, le modèle UNIFAC permet d'estimer l'efficacité de séparation d'une molécule particulière au sein d'un mélange de produits pour un système de solvants et un rapport molaire solvants/produits donnés.

5.4. Purification des mélanges de mono- et diesters au CO_2 supercritique (SEPAREX)

Des mélanges de mono- et diesters ont été purifiés par extraction au CO_2 supercritique à partir du milieu de synthèse sans sucre ni solvant. Les conditions opératoires ont été déterminées en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras. Les paramètres d'extraction sont résumés dans le **Tableau II-13**.

Tableau II-13: Conditions de séparation des mélanges mono- et diesters par extraction au CO_2 supercritique.

Sucroesters	Température (°C)	Ethanol (%)	Pression (bars)	CO_2 (Kg/h)
Fructose caprate	70	0	280	8
Fructose palmitate	70	5	150	10
Fructose stéarate	70	5	150	10

La composition des sucroesters purifiés par extraction liquide-liquide et au CO_2 supercritique ainsi que celle des sucroesters du commerce a été déterminée par CLHP.

6- Propriétés physico-chimiques et tensioactives des esters de fructose et d'acide gras

6.1. Propriétés physico-chimiques

6.1.1. Mesure du pH

Les mesures de pH des solutions aqueuses de tensioactifs ont été réalisées à 25 °C à l'aide d'un pH mètre (PHM 210 Standard, Meter Lab. Tac Ussel electronic).

6.1.2. Calcul de la Balance Hydrophile Lipophile: HLB

Selon Griffin (1949), la BHL est la balance entre la taille et la force des groupements hydrophile et lipophile d'un tensioactif. La formule suivante a été utilisée pour évaluer les valeurs de BHL des différents sucroesters et mélanges de sucroesters

$$\mathbf{HLB = 20 \times \frac{Poids\ moléculaire\ du\ goupement\ hydrohile}{Poids\ moléculaire\ total\ du\ tensioactif}}$$

Les valeurs de BHL des mélanges d'émulsifiants sont déterminées selon l'équation:

$$\mathbf{HLB_M = HLB_A x Wt_A\% + HLB_B x Wt_B\%}$$

Où

$\mathbf{HLB_M}$: BHL du mélange

HLB_A et **HLB_B**: les valeurs de BHL des émulsifiants A et B

Wt_A% et **Wt_B%**: la quantité des émulsifiants A et B dans le mélange

6.2. Propriétés de surface

Les mesures des tensions superficielles et interfaciales ont été faites à l'aide d'un tensiomètre Krüss modèle K12 (**Figure II-15**).

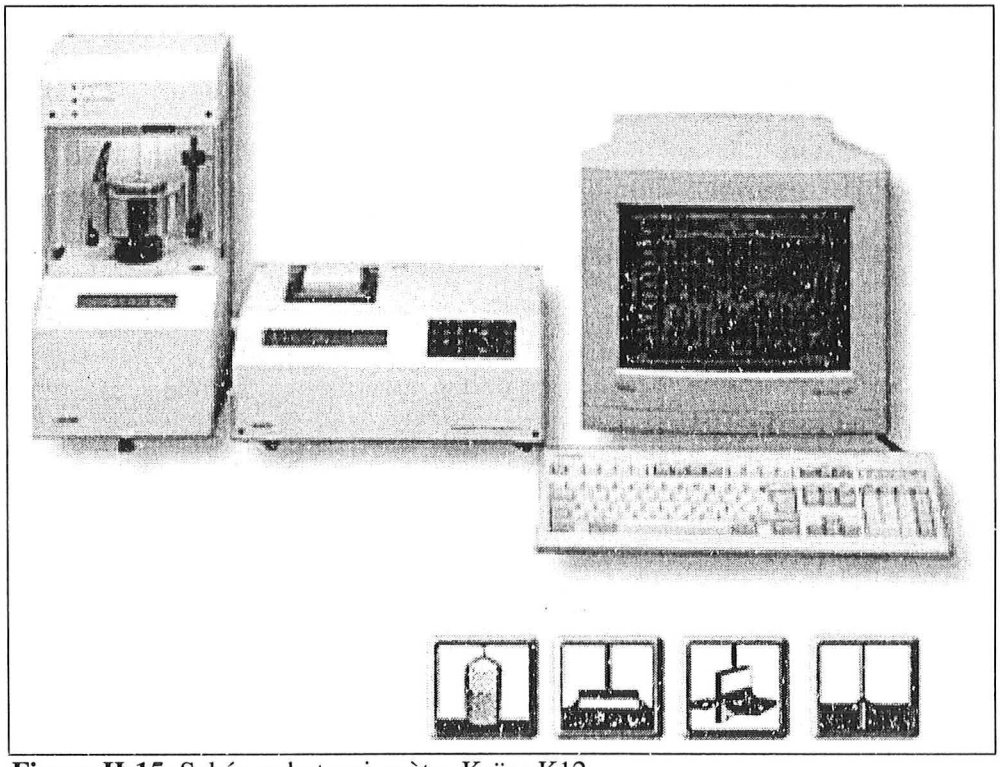


Figure II-15: Schéma du tensiomètre Krüss K12.

6.2.1. Tension superficielle

Les tensioactifs ont pour rôle de réduire la tension de surface d'un liquide. La tension de surface de l'eau est de l'ordre de 72 mN/m; les molécules ayant des propriétés tensioactives peuvent réduire cette valeur dans un intervalle généralement compris entre 30 et 50 mN/m.

Les expériences ont été réalisées selon la méthode de la lame de Wilhelmy (**Figure II-16**). Cette méthode consiste à placer une lame de platine au-dessus de la surface de 50 ml de solution tensioactive contenue dans un cristallisoir posé à son tour sur un plateau. En faisant

remonter celui-ci, la lame est plongée dans la solution et la force nécessaire pour la ramener à sa position initiale correspond à la tension superficielle exprimée en mN/m.

Les sucroesters à étudier ont été solubilisées dans de l'eau distillée à 100 mg/l et à pH compris entre 7 et 8.7. Les mesures ont été réalisées à trois températures différentes : 15, 20 et 25 °C sachant que la température du tensiomètre peut être contrôlée à ± 0.5 °C. Chaque mesure est répétée 3 fois et la valeur moyenne est retenue.

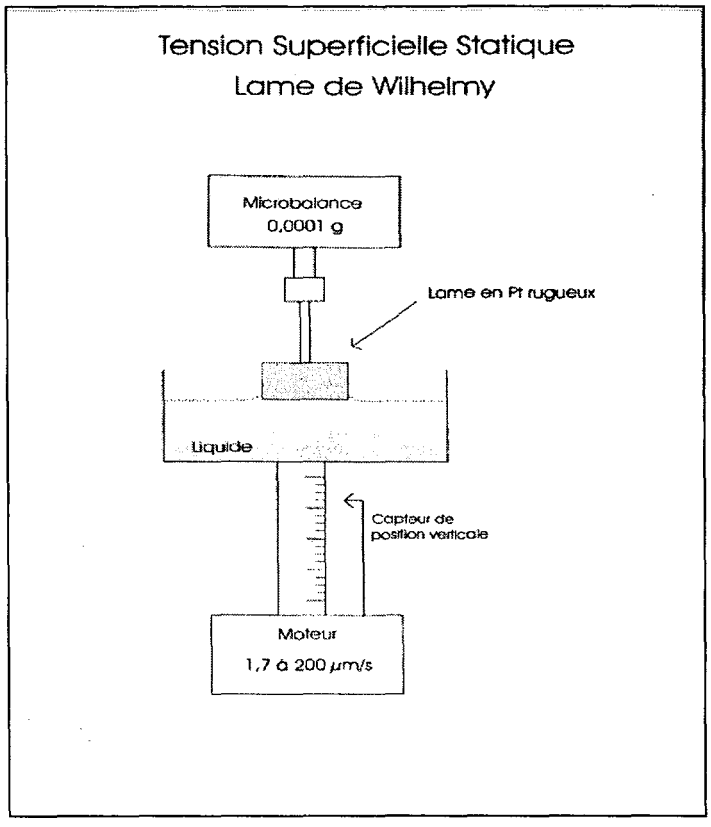


Figure II-16: Mesure de la tension superficielle entre la solution tensioactive et l'air selon la méthode de la lame de Wilhelmy.

6.2.2. Concentration Micellaire Critique: CMC

Les tensioactifs dans l'eau sont capables de former des agrégats ordonnés appelés micelles lorsque leur concentration dépasse la Concentration Micellaire Critique (CMC). Cette concentration est atteinte lorsque la surface du liquide est saturée en tensioactif.

Les mesures de la tension superficielle permettront de tracer l'évolution de la tension superficielle en fonction du logarithme décimal de la concentration du tensioactif. La rupture de pente de la courbe donne la valeur de la CMC (**Figure II-17**).

La CMC a été déterminée automatiquement grâce au processeur du tensiomètre Krüss K12 (Méthode lame Wilhelmy) à 20 °C avec une solution aqueuse contenant le tensioactif à étudier à 100 mg/l.

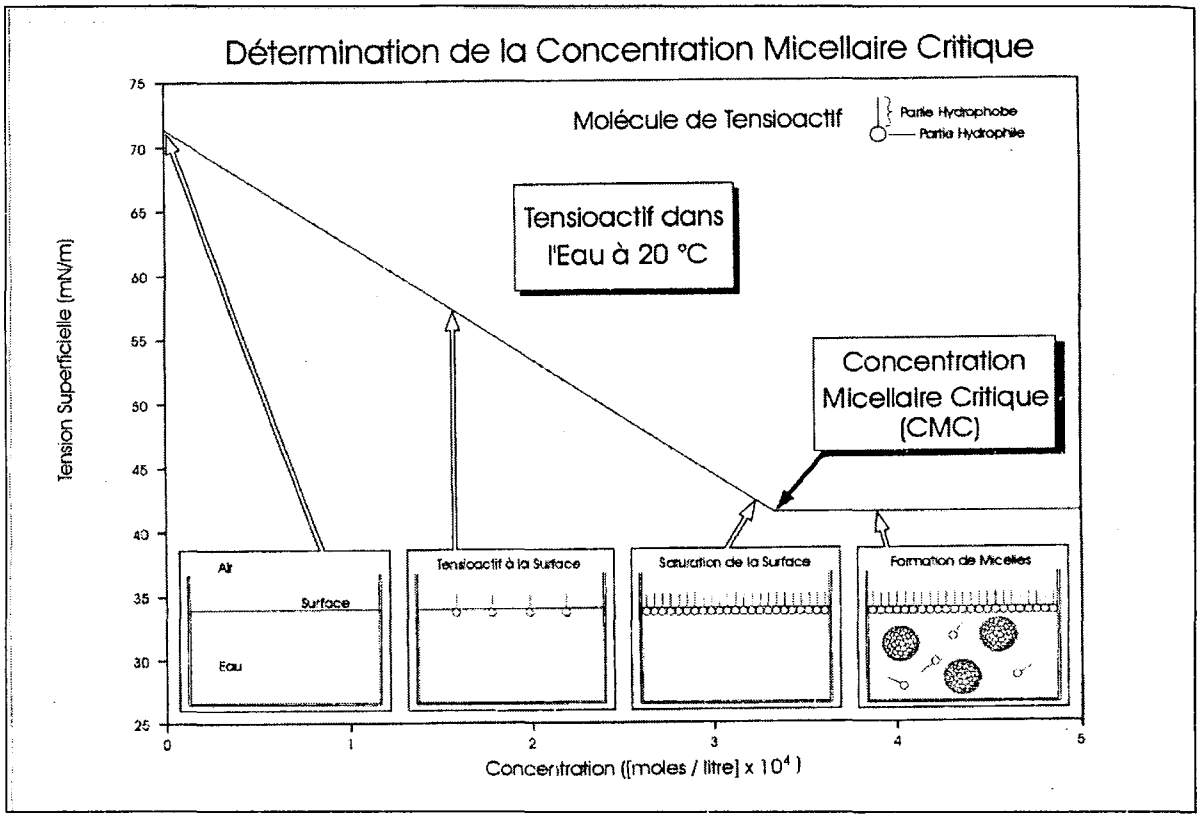


Figure II-17: Détermination de la Concentration Micellaire Critique par la méthode de la lame de Wilhelmy.

6.2.3. Tension interfaciale

Etant des molécules amphiphiles, les sucroesters se placent à l'interface huile-eau provoquant une diminution significative de la tension interfaciale.

La tension interfaciale est déterminée selon la méthode de l'anneau de Lecompte Du Nouy (1919). Un plateau en platine est plongé dans le cristallisoir du tensiomètre à l'interface de deux liquides immiscibles dont l'un contient le tensioactif. La force nécessaire pour retirer l'anneau de l'interface représente la tension interfaciale exprimée en mN/m (**Figure II-18**).

Le système sur lequel ont été effectuées les mesures, est constitué d'eau distillée dans laquelle les tensioactifs à étudier ont été solubilisés à 100 mg/l et d'huile de colza. Les mesures ont été réalisées à 20 °C, chaque mesure étant répétée trois fois et la valeur moyenne retenue.

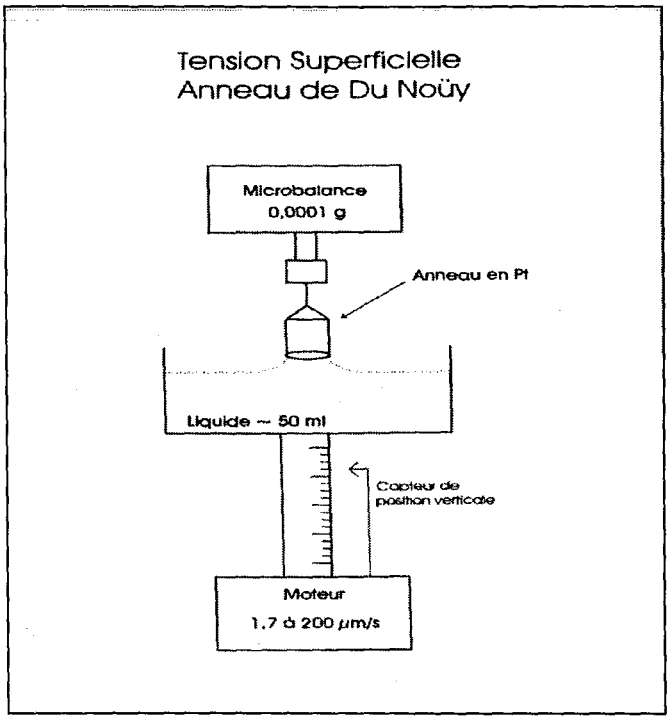


Figure II-18: Mesure de la tension interfaciale entre la solution aqueuse contenant le tensioactif et l'huile de colza selon la méthode de l'anneau de Du Nouy.

6.3. Pouvoir moussant

Le tensioactif à étudier a été solubilisé dans de l'eau distillée à 100 mg/l. Le pouvoir moussant a été déterminé selon la méthode Ross Miles.

L'appareil Ross Miles est constitué d'une pipette et d'un receveur muni d'une double enveloppe permettant la circulation d'eau à 20°C afin d'éviter les fluctuations de température d'une expérience à l'autre.

La méthode de détermination du pouvoir moussant consiste à remplir le receveur de 50 ml de solution tensioactive et de faire couler 200 ml de la même solution contenue dans la pipette (**Figure II-19**). La hauteur de la mousse formée est relevée à T_0, 5, 15 et 45 minutes.

CHAPITRE III : Etude cinétique de la synthèse des esters de fructose et d'acide gras **123**

1- Etude préliminaire de l'influence de la longueur de la chaîne carbonée et de la concentration initiale de l'acide gras **123**

1.1. Plan d'expériences 123

1.2. Analyse statistique des résultats 124

1.3. Conclusion de l'étude préliminaire 128

2- Etude de l'effet des conditions opératoires sur la cinétique de synthèse des sucroesters **128**

2.1. Cinétique de synthèse du caprylate de fructose (C8) à différentes concentrations. 128

2.2. Influence de la concentration initiale en acide gras 138

2.3. Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras 146

2.4. Influence de l'hydrophobicité initiale du milieu 150

2.5. Influence de la teneur en eau du milieu 152

2.5.1. Cinétique de synthèse des caprylates de fructose 154

2.5.2. Cinétique de synthèse des laurates de fructose 155

2.5.3. Cinétique de synthèse des myristates de fructose 156

2.6. Influence de la concentration en fructose 162

2.6.1. Cinétique de synthèse des stéarates de fructose à 50 g/l de fructose initial 162

2.6.2. Influence de la solubilisation du fructose 166

2.6.2.1. Processus de dissolution *167*

2.6.2.2. Cinétique de dissolution du fructose *168*

2.6.2.3. Evaluation de la concentration du fructose soluble au cours de la réaction *171*

2.7. Influence du fructose ajouté en présence de tamis moléculaire 172

3- Conclusion du chapitre III **179**

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ FIGURES ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Figure III-1: Variation des réponses expliquée par les modèles et capacité de prédiction 125

Figure III-2: Effets des facteurs et de leurs significativité 127

Figure III-3a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (140 mM) 132

Figure III-3b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (280 mM) 133

Figure III-3c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (420 mM) 134

Figure III-3d: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (560 mM) 135

Figure III-3e: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (700 mM) 136

Figure III-4a: Influence de la concentration initiale en acide caprylique sur les performances de la réaction 140

Figure III-4b: Influence de la concentration initiale en acide caprique sur les performances de la réaction 141

Figure III-4c: Influence de la concentration initiale en acide laurique sur les performances de la réaction 142

Figure III-4d: Influence de la concentration initiale en acide myristique sur les performances de la réaction 143

Figure III-4e: Influence de la concentration initiale en acide palmitique sur les performances de la réaction 144

Figure III-4f: Influence de la concentration initiale en acide stéarique sur les performances de la réaction 145

Figure III-5a: Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras sur les performances de la réaction à 140 mM de concentration initiale de l'acide gras 147

Figure III-5b: Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras sur les performances de la réaction à 280 mM de concentration initiale de l'acide gras 148

Figure III-5c: Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras sur les performances de la réaction à 420 mM de concentration initiale de l'acide gras 149

Figure III-6: Influence de l'hydrophobicité initiale du milieu sur les vitesses de consommation de l'acide gras à 30 minutes 151

Figure III-7: Influence de l'hydrophobicité initiale du milieu sur la sélectivité de la réaction à 50 heures 153

Figure III-8a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (420 mM) en présence de tamis moléculaire 157

Figure III-8b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide laurique (420 mM) en présence de tamis moléculaire 158

Figure III-8c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide myristique (420 mM) en présence de tamis moléculaire 159

Figure III-9: Evolution des différents critères de performance de la réaction de synthèse des sucroesters avec et sans tamis moléculaire en fonction du nombre de carbone 161

Figure III-10: Cinétique de la réaction de synthèse des stéarates de fructose à 50 g/l de fructose 163

Figure III-11: Comparaison des résultats des réactions de synthèse des stéarates de fructose à 25 et 50 g/l de fructose ajouté initialement 165

Figure III-12: Profil théorique de l'évolution du sucre soluble en fonction du temps lorsque la dissolution du fructose n'est pas cinétiquement limitante 166

Figure III-13: Profil théorique de l'évolution du sucre soluble en fonction du temps lorsque la dissolution du fructose est cinétiquement limitante 167

Figure III-14: Processus de dissolution du fructose et étapes limitantes en présence de lipase 167

Figure III-15: Evolution de la dissolution du fructose dans le méthyl-2 butanol-2 à 60 °C et 200 rpm 169

Figure III-16: Evolution de la vitesse de dissolution du fructose en fonction du temps 170

Figure III-17: Evolution de la vitesse de dissolution du fructose en fonction du fructose soluble 170

Figure III-18: Evolution du fructose soluble au cours du temps lorsqu'on travaille avec une concentration initiale en fructose solide de 25 et 50 g/l 172

Figure III-19a: Evolution des critères de performance de la réaction de synthèse des caprylates de fructose par estérification directe avec ajout du fructose en plusieurs fois 174

Figure III-19b: Evolution des critères de performance de la réaction de synthèse des laurates de fructose par estérification directe avec ajout du fructose en plusieurs fois 175

Figure III-19c: Evolution des critères de performance de la réaction de synthèse des myristates de fructose par estérification directe avec ajout du fructose en plusieurs fois 176

Figure III-20: Evolution des critères de performance de la réaction de synthèse des sucroesters avec et sans ajouts de fructose, en présence et en absence de tamis moléculaire en fonction du nombre de carbone 178

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ TABLEAUX ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Tableau III-1: Réponses obtenues dans différentes conditions opératoires de concentration initiale et de nombre de carbones de l'acide gras 124

Tableau III-2: Résumé de l'effet des différents facteurs sur l'évolution de la synthèse des esters de sucre et d'acide gras 180

CHAPITRE III

ETUDE CINETIQUE DE LA SYNTHESE DES ESTERS DE FRUCTOSE ET D'ACIDE GRAS

L'objectif de la première partie de ce travail est de fournir les données cinétiques nécessaires à la compréhension des effets de différents paramètres qui affectent la réaction de synthèse des sucroesters en milieu organique. Cette étude a été faite en présence de fructose et de différents acides gras. Novozym 435 a été utilisé comme biocatalyseur.

1- Etude préliminaire de l'influence de la longueur de la chaîne carbonée et de la concentration initiale de l'acide gras

Une étude préliminaire a été réalisée afin de quantifier l'effet de la longueur de chaîne carbonée et de la concentration initiale en acide gras sur la concentration finale en sucroesters (SET, g/l), la sélectivité de la réaction (exprimée en pourcentage final en monoesters), les rendements de conversion, au bout de 50 h, de l'acide gras (Rdt AG, %) et du fructose (Rdt Frc, %) et la vitesse de consommation de l'acide gras (Vi, mM acide gras consommé/g enzyme.h). L'évolution de l'hydrophobicité initiale du milieu (exprimée par log P_i) a également été étudiée en fonction de ces deux paramètres. Cette étude a été faite par l'intermédiaire d'un plan d'expériences.

1.1. Plan d'expériences

Les différentes concentrations (140 à 700 mM) et longueurs de chaîne carbonée (8 à 18) des acides gras ont été testées dans les conditions opératoires standards suivantes:

- 1 L méthyl-2 butanol-2;
- 140 mM fructose;
- 10 g/l Novozym®;
- 200 rpm, 200 mbar, 60 °C.

Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau III-1**. Ils montrent que la réaction de synthèse enzymatique des esters de fructose et d'acide gras catalysée par Novozym 435 a lieu quels que soient le nombre de carbone et la concentration initiale en acide gras testés.

Tableau III-1. Réponses obtenues dans différentes conditions opératoires de concentration initiale et de nombre de carbones de l'acide gras.

Ordre exp.	Facteurs		Réponses					
	Carbone	[Acide gras] (mM)	SET (g/l)	Sélectivité %	Rdt AG %	Rdt Frc %	V_i mM/g.h	log P_i
2	8	140	18	87	42	45	1.3	0.91
7	8	700	41	74	21	89	4.5	1.02
5	18	140	49	78	83	72	1.5	0.99
3	18	700	63	62	22	86	3	1.38
11	14	140	33	85	64	58	1.4	0.9
9	14	700	58	49	25	87	4	1.24
10	8	420	33	79	28	73	3.5	0.97
8	18	420	76	64	45	100	5	1.19
1	**14**	**420**	**52**	**58**	**36**	**84**	**2.8**	**1.1**
6	**14**	**420**	**53**	**56**	**37**	**83**	**2.7**	**1.1**
4	**14**	**420**	**51**	**57**	**35**	**81**	**2.8**	**1.1**

1.2. Analyse statistique des résultats

La validité des corrélations ou modèles empiriques reliant les réponses aux deux paramètres étudiés a été vérifiée grâce à l'analyse de la variance (ANOVA). Cette analyse permet d'indiquer si les facteurs étudiés ont un effet significatif sur les réponses.

Cette analyse montre que les effets des paramètres sur les 6 réponses sont significatifs et peuvent être décrits par des modèles polynomiaux. En effet, aucun des deux modèles ne présente de manque d'ajustement (Résidu > 0.05) avec des coefficients de corrélation et des capacités de prédiction satisfaisants (**Figure III-1**). Les valeurs de Q^2 indiquent la capacité des modèles à prédire l'effet des deux paramètres. On observe que ces valeurs sont comprises entre 0.7 et 0.99 excepté le cas des vitesses de consommation de l'acide gras où la valeur de Q^2 est juste légèrement supérieure à 0.5 mais reste acceptable.

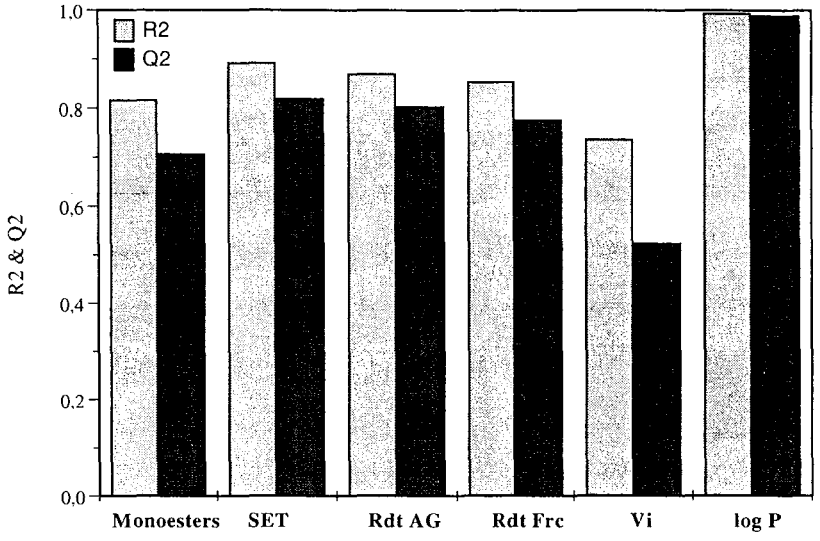


Figure III-1: Variation des réponses expliquée par les modèles et capacité de prédiction.

Les modèles obtenus après élimination des coefficients sans effet significatif (P-value > 0.05) sont les suivants (NC étant le nombre de carbones et Co la concentration en acide gras) :

Sélectivité (%) = $65.30 - 13.54xCo - 6.9x(NC) + 4.6xCo^2 + 7.88x(NC)^2 - 4.6xCox(NC)$

SET (g/l) = $47.23 + 12.02xCo + 15.6x(NC) - 7.74xCo^2 + 3.83x(NC)^2$

Rdt AG (%) = $32.76 - 15.99xCo + 6.1x(NC) + 7xCo^2 - 3.56xCox(NC)$

Rdt Frc (%) = $79.05 + 16.87xCo + 7.5x(NC) - 10.63xCo^2 + 3.9x(NC)^2 - 4.48xCox(NC)$

Vi (mM/g.h)= $3 + 1.05xCo + 0.35x(NC) - 0.73xCo^2 + 0.98x(NC)^2 - 0.45xCox(NC)$

log P_i (Prédite) = $1.08 + 0.13xCo + 0.11x(NC) - 0.012xCo^2 + 0.07xCox(NC)$

Ces modèles indiquent que des interactions (synergie et antagonisme) existent entre les deux facteurs étudiés. La **Figure III-2** représente les effets, tracés dans l'ordre décroissant, des facteurs et de leurs interactions. L'intervalle de confiance de ± 95% est tracé sous forme de courbe de part et d'autre des histogrammes.

Effet simple

La concentration en acide gras possède l'effet le plus significatif sur la majorité des réponses étudiées avec un effet négatif sur la concentration en monoesters et le rendement de conversion de l'acide gras et un effet positif pour les autres réponses. Ce résultat signifie une diminution de la sélectivité vis-à-vis des monoesters et du rendement de conversion de l'acide gras lorsqu'on augmente la concentration en acide gras. Cependant, cet effet s'inverse lorsqu'il s'agit de la concentration finale en sucroesters totaux, du rendement de conversion du fructose, de la vitesse de consommation de l'acide gras et du logP_i du milieu qui augmentent lorsqu'on augmente la concentration initiale en acide gras.

Le nombre de carbones de l'acide gras possède un effet plus faible que celui de la concentration initiale en acide gras sauf sur la concentration finale en sucroesters totaux où l'effet du nombre de carbones est plus important. Le nombre de carbones possède un effet négatif sur la sélectivité vis-à-vis des monoesters (% monoesters) et un effet positif sur toutes les autres réponses. Ces résultats indiquent une diminution du pourcentage des monoesters par rapport aux sucroesters totaux, lorsqu'on augmente la longueur de chaîne carbonée du donneur d'acyle. En revanche, une augmentation du nombre de carbones de l'acide gras induit une augmentation de la concentration finale en sucroesters, des rendements de conversion des substrats, de la vitesse de consommation de l'acide gras et du logP_i du milieu.

Effet dû aux interactions

Une interaction entre deux facteurs possède un effet significatif sur une réponse donnée lorsque les variations de l'un affectent l'effet de l'autre sur la réponse considérée.

L'interaction entre les deux facteurs étudiés est sans effet significatif sur la concentration finale en sucroesters totaux. Cependant, cette interaction est positive dans le cas de l'hydrophobicité du milieu exprimée par logP_i et négative dans le cas des autres réponses.

Par conséquent, à l'exception de la concentration finale en sucroesters, on peut conclure que l'effet de la concentration en acide gras sur les autres réponses est directement lié à sa longueur de chaîne carbonée.

C'est ainsi, par exemple, que l'effet de la concentration initiale en acide gras sur le rendement de conversion de ce substrat est d'autant plus prononcé lorsque la longueur de la chaîne carbonée est élevée (interaction négative). En effet, on constate une baisse de seulement 21 % en passant de 140 à 700 mM d'acide caprylique (C8) alors que cette baisse est d'environ 39 % dans le cas de l'acide myristique (C14) et de plus de 61 % dans le cas de l'acide stéarique (C18).

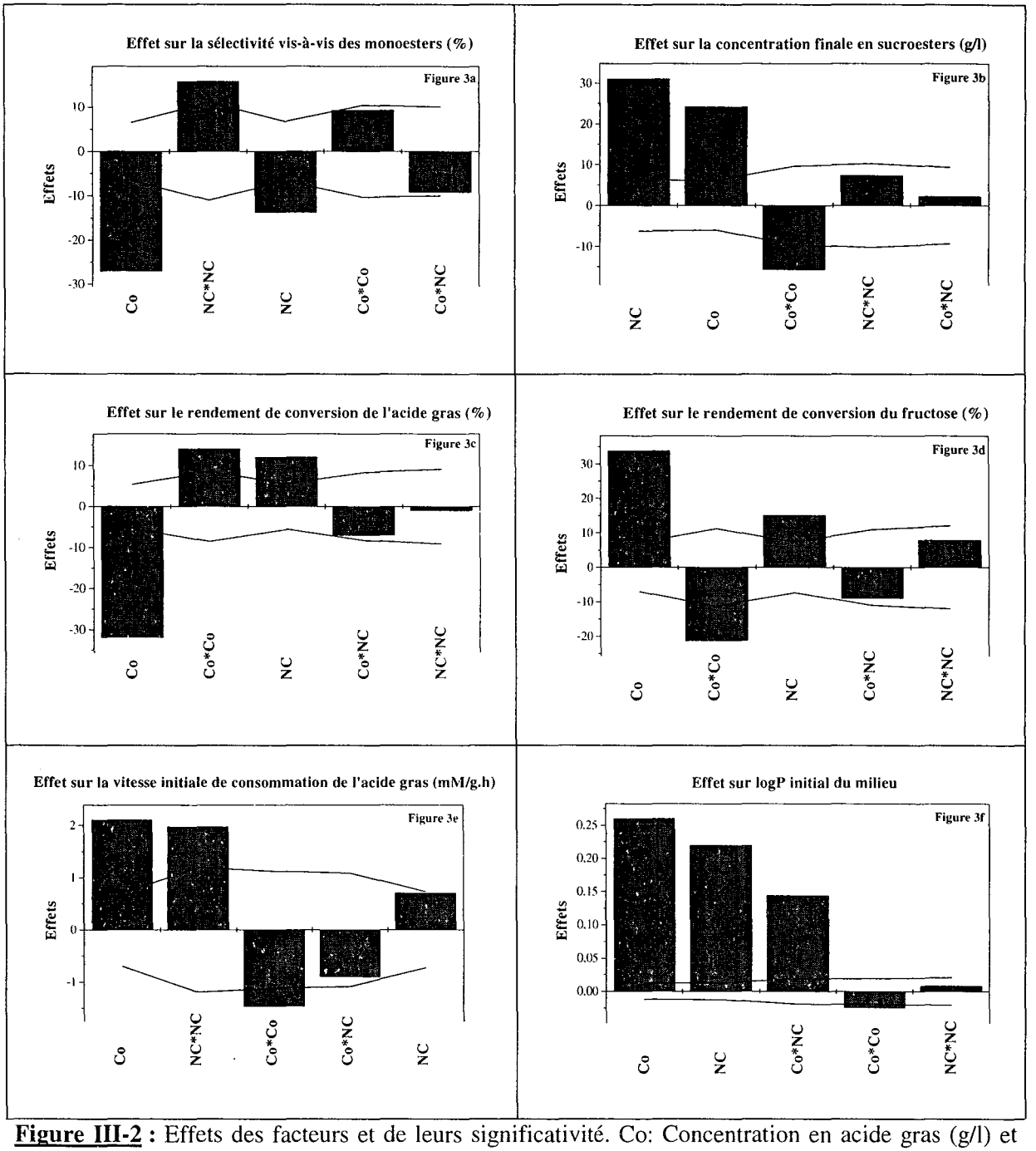


Figure III-2 : Effets des facteurs et de leurs significativité. Co: Concentration en acide gras (g/l) et NC: Nombre de carbone de l'acide gras.

1.3. Conclusion de l'étude préliminaire

Cette étude préliminaire nous a permis de :

- montrer que la concentration initiale et le nombre de carbones de l'acide gras ont des effets significatifs sur les réponses étudiées dans le domaine expérimental exploré;
- montrer qu'il existe un effet dû aux interactions entre les deux facteurs considérés.

2- Etude de l'effet des conditions opératoires sur la cinétique de synthèse des sucroesters

L'étude préliminaire nous a montré que la concentration et la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras peuvent affecter significativement les performances de la réaction de synthèse des esters de fructose; c'est pourquoi, nous nous sommes proposés de réaliser une étude cinétique plus détaillée de ces réactions en présence de six acides gras ayant des longueurs de chaîne carbonée allant de C8 à C18 à des concentrations variant entre 140 et 700 mM.

Cette étude comporte trois étapes:

- ***Etape 1:*** une étude cinétique avec élimination partielle de l'eau par la réduction de la pression (200 mbars). Dans ce cas, on ne présentera, d'une façon détaillée, que la cinétique obtenue avec l'acide caprylique. Les autres cinétiques de synthèse seront reportées en annexe.

- ***Etape 2:*** une étude cinétique détaillée avec élimination poussée de l'eau grâce à l'ajout de tamis moléculaire (4 Å). Cette étude a été faite en présence de 3 acides gras (C8, C12 et C14) à 420 mM.

- ***Etape 3:*** étude de l'effet de la concentration initiale du fructose

2.1. Cinétique de synthèse du caprylate de fructose (C8) à différentes concentrations

Les résultats des réactions de synthèse par estérification directe de sucroesters à partir du fructose et de l'acide caprylique sont reportés sur les **Figures III-3a** à **III-3e**. Les

concentrations en acide gras consommé et en fructose résiduel sont calculées à partir des concentrations mesurées en sucroesters. Ces dernières étant déterminées par dosage CCM.

Etude cinétique à 140 mM

La **Figure III-3a** représente l'évolution des différents constituants du milieu réactionnel et de la vitesse de consommation de l'acide gras au cours du temps à 140 mM d'acide caprylique.

La vitesse de consommation de l'acide gras est rapide au début de la réaction. A 30 minutes, elle est d'environ 1.4 mM C8 consommé/g d'enzyme.h. Ensuite, elle diminue progressivement au cours du temps et elle n'est que de l'ordre de 0.3 mM C8/g enzyme.h après 5 heures de réaction.

Cette réaction présente la particularité de produire majoritairement des monoesters. En effet, seulement 10 % des monoesters formés au début de la réaction sont convertis en diesters en moins d'une heure. Par la suite, le pourcentage des monoesters dans le milieu réactionnel se stabilise à 90 % jusqu'à la fin de la réaction. On observe également que le fructose résiduel reste supérieur à sa solubilité (13.5 g/l) dans le M2B2 à 60 °C jusqu'à la fin de la réaction.

Etude cinétique à 280 mM

De la même manière, la **Figure III-3b** représente l'évolution des différents constituants du milieu réactionnel et de la vitesse de consommation de l'acide gras au cours du temps.

Au cours de cette synthèse, la production de monoesters reste majoritaire avec une sélectivité de l'ordre de 90 %.

La vitesse de consommation de l'acide caprylique est de l'ordre de 3.8 mM C8/g d'enzyme.h. Au bout de 5 heures de réaction, cette vitesse atteint une valeur comparable à celle obtenue avec une concentration initiale de 140 mM d'acide caprylique, c'est-à-dire 0.3 mM C8/g enzyme.h.

En revanche, le fructose résiduel est totalement sous forme soluble à partir de 15 h et il n'en reste que 10 g/l au bout de 50 heures de réaction.

Etude cinétique à 420 mM

La **Figure III-3c** représente l'évolution des différents constituants du milieu réactionnel et de la vitesse de consommation de l'acide gras au cours du temps.

Cette synthèse se caractérise par une diminution du pourcentage de monoesters synthétisés par rapport aux sucroesters totaux comparé à ceux obtenus avec les précédentes concentrations initiales en acide caprylique. En effet, La sélectivité vis-à-vis des monoesters passe de 100 à 80 % au bout d'1 heure pour se stabiliser à cette valeur jusqu'à la fin de la réaction.

Le profil de la vitesse de consommation de l'acide caprylique diffère légèrement de ceux obtenus avec des concentrations initiales en acide gras plus faibles. En effet, dans ce cas, elle est plus élevée au début de la réaction (9 mM C8 consommé/g enzyme.h) mais la chute est plus prononcée puisqu'elle atteint une valeur de l'ordre de 2 mM C8 consommé/g enzyme.h en moins d'1 heure. Enfin, elle se stabilise à 0.5 mM C8/g enzyme.h au bout de 5 heures de synthèse.

Le fructose résiduel atteint la limite de sa solubilité dans le M2B2 à 60 °C au bout de seulement 5 heures de réaction. La concentration en fructose résiduel dans le milieu réactionnel au bout de 50 heures de réaction est de l'ordre de 4 g/l.

Etude cinétique à 560 mM

La **Figure III-3d** montre l'évolution des différents constituants du milieu réactionnel et de la vitesse de consommation de l'acide gras au cours du temps.

Dans ce cas la formation conjointe de mono- et de diesters se fait dés le début de la réaction. Le pourcentage de monoesters continue à diminuer au profit des diesters jusqu'à 10 heures et se stabilise ensuite jusqu'à la fin de la réaction pour atteindre 75 %.

La vitesse de consommation de l'acide gras présente le même profil que lorsqu'on utilise 420 mM d'acide caprylique. En effet, on assiste à une chute assez rapide de la vitesse de

consommation, on passe ainsi de 13.5 à 2 mM C8/g enzyme.h au bout de seulement 1 heure de réaction. Cette vitesse s'annule pratiquement au bout de 5 heures de réaction.

La concentration en fructose résiduel est à la limite de sa solubilité dans le M2B2 à 60 °C au bout de seulement 2 heures de réaction. Par la suite, cette concentration continue à diminuer pour atteindre 4 g/l de fructose résiduel au bout de 30 heures de réaction.

Etude cinétique à 700 mM

Enfin la **Figure III-3e** représente l'évolution des différents constituants du milieu réactionnel et de la vitesse de consommation de l'acide gras.

Cette synthèse a lieu à une vitesse de 4.6 mM C8 consommé/g enzyme.h. On remarque qu'au bout de 2 heures, la vitesse de consommation de l'acide caprylique devient très faible.

A 700 mM d'acide caprylique, la formation de mono- et de diesters se fait conjointement dés le début de la réaction. L'évolution de la sélectivité commence à se stabiliser au bout de 2 heures de réaction à une valeur de 75 %.

Dans ce cas, on se trouve à la limite de la solubilité du fructose dans nos conditions en moins d'1 heure de réaction. Ensuite, la concentration en fructose résiduel diminue lentement pour atteindre 2.5 g/l au bout de 50 heures de réaction.

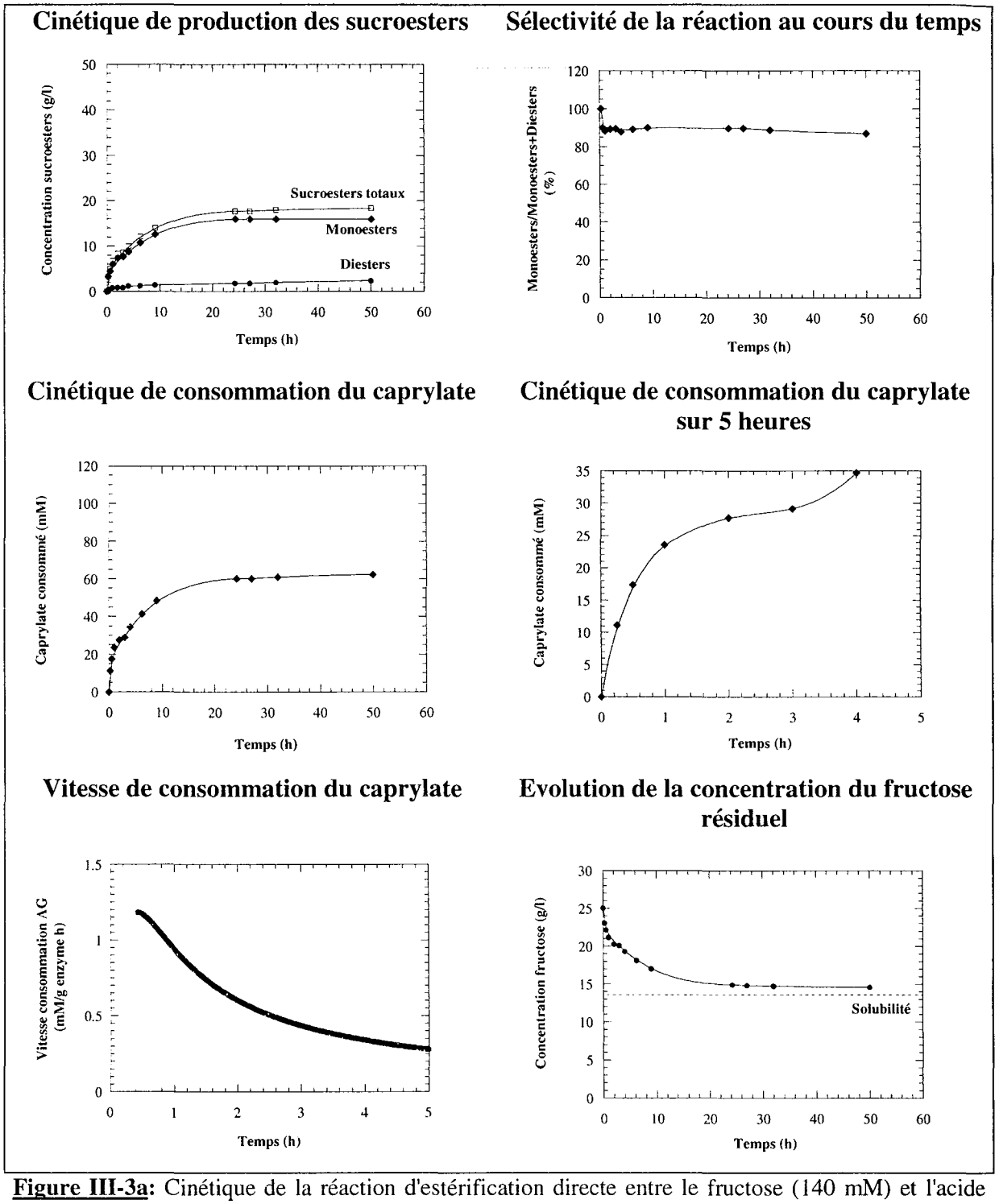


Figure III-3a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (140 mM).

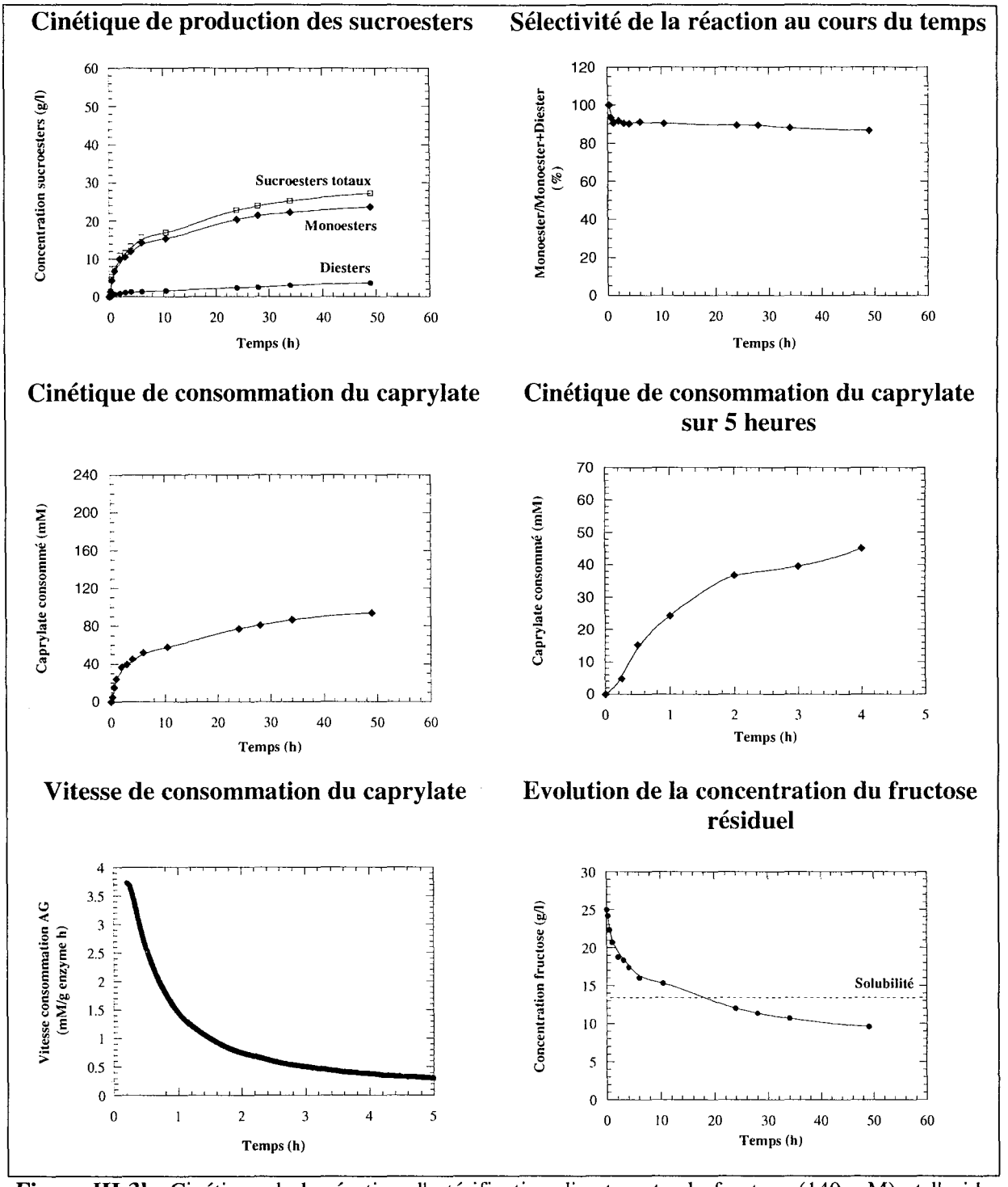


Figure III-3b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (280 mM).

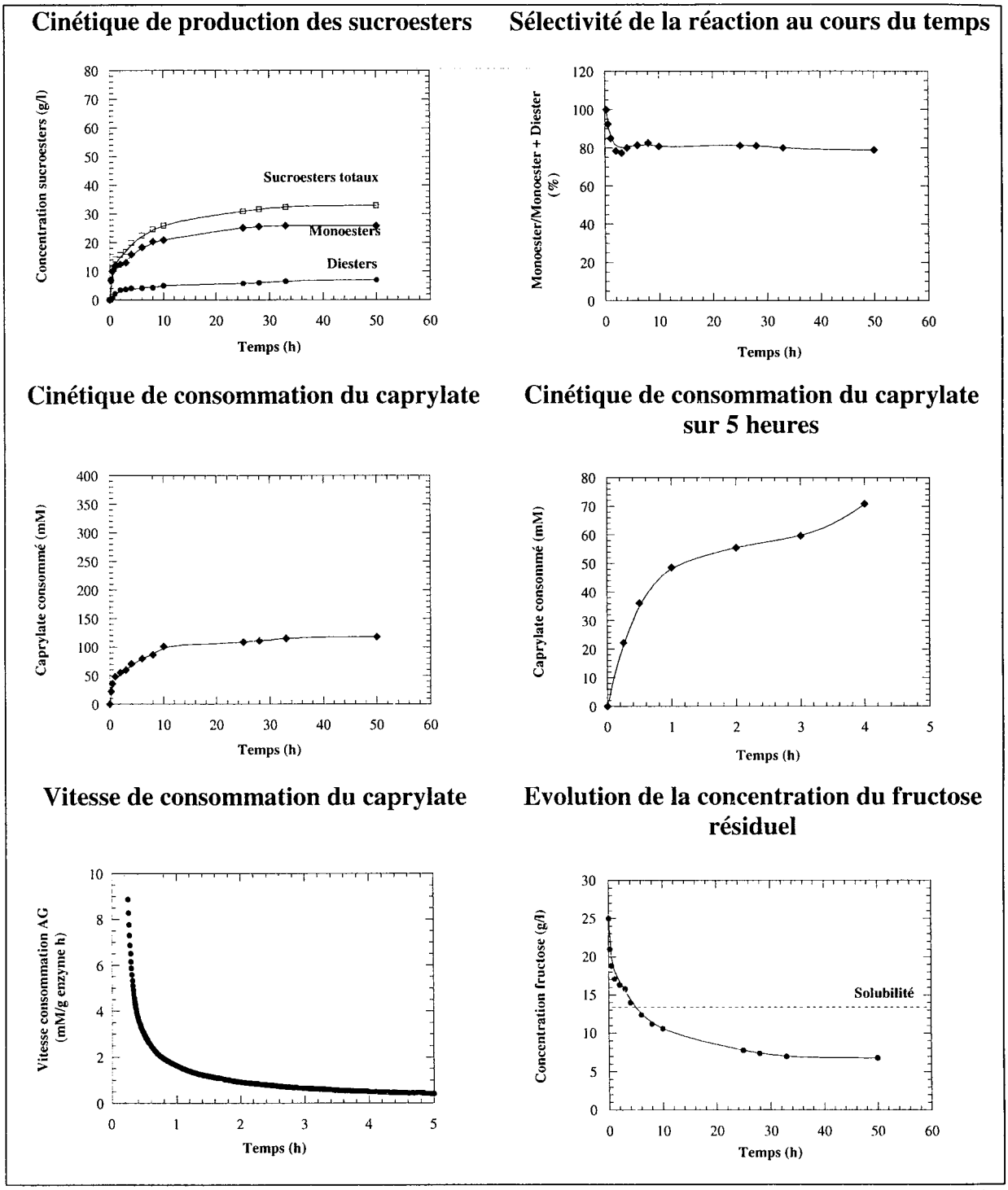


Figure III-3c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (420 mM).

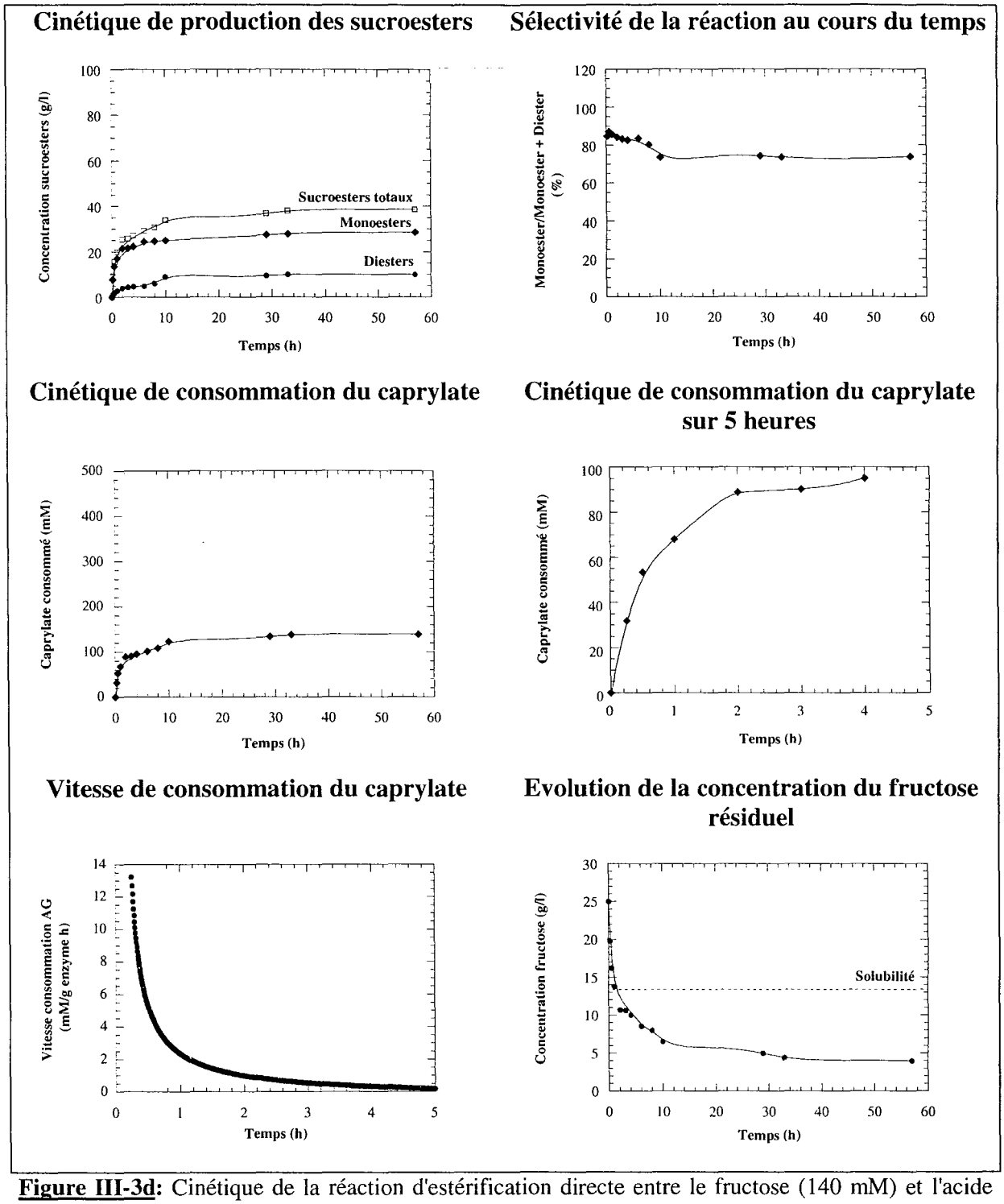


Figure III-3d: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (560 mM).

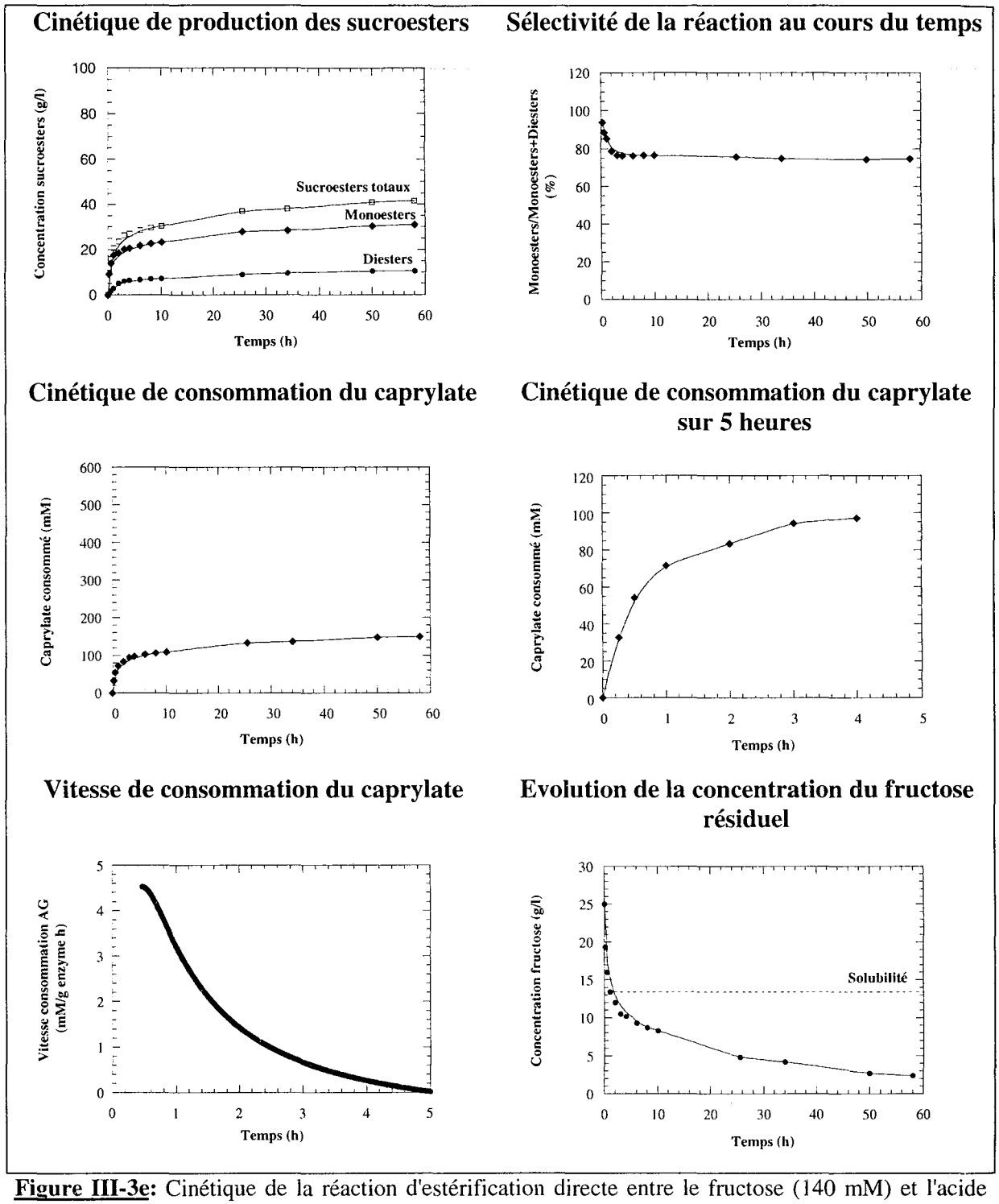


Figure III-3e: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (700 mM).

Toutes les synthèses (C8 à C18) montrent des profils semblables des concentrations en sucroesters et en acide gras consommé ainsi que des vitesses de consommation de l'acide gras. En effet, quelle que soit la concentration initiale en acide gras, la synthèse se fait essentiellement durant les 10 premières heures de la réaction. Elle permet d'obtenir deux produits: les mono- et diesters de fructose sauf lorsqu'on travaille avec un large excès de fructose par rapport à l'acide gras (cas de l'acide stéarique à 28 mM) où l'on synthétise exclusivement des monoesters. La vitesse de consommation de l'acide gras chute de manière considérable dés les premières heures de la synthèse.

Au cours de cette étude cinétique, on a remarqué que dans certains cas les courbes de cinétique montrent un point d'inflexion au bout de 24 h de réaction. Ce phénomène pourrait avoir plusieurs explications:

(i) Soit une meilleure dissolution du fructose. Le sucre est mis à solubiliser dans le méthyl-2 butanol-2 environ 10 heures avant l'ajout de l'acide gras et de l'enzyme. Au début de la réaction, on consomme le fructose déjà solubilisé; le sucre sous forme solide se dissout progressivement dans le milieu pour remplacer la fraction consommée. Ainsi, si la vitesse de réaction est supérieure à celle de dissolution du fructose on peut assister à un ralentissement dû à une diminution du sucre soluble. Or la dissolution peut être affectée dans le sens d'une augmentation par les sucroesters formés, ce qui peut expliquer la légère accélération observée après 24 h. L'évolution de l'hydrophobicité du milieu peut aussi être à l'origine de ce changement.

(ii) Le D-fructose utilisé pour la synthèse des sucroesters est un mélange d'isomères constitué des formes α- et β- fructofuranose et les formes α- et β- fructopyranose; la forme α étant majoritaire. Au cours de la réaction, il y aurait interconversion des formes α et β. Cette dernière, devenant majoritaire, pourrait avoir une vitesse de dissolution plus faible modifiant ainsi le profil des courbes de cinétique.

(iii) On peut supposer qu'au-delà d'une certaine concentration, les sucroesters produits précipitent ce qui s'accompagnerait d'un déplacement de l'équilibre vers la synthèse et ainsi une augmentation de la vitesse de réaction.

(iv) Soit une meilleure élimination de l'eau qui s'opère suite à une modification de la composition du milieu au bout de 24 heures. En effet, les températures d'ébullition et de liquéfaction d'un mélange eau-alcool dépendent de sa composition et un

changement de la concentration des différents composés du milieu peut avoir une influence sur les tensions de vapeur.

2.2. Influence de la concentration initiale en acide gras

Les **Figures III-4a** à **III-4f** représentent l'influence de la concentration initiale de chaque acide gras sur l'évolution de la concentration finale en sucroesters, de la sélectivité de la réaction vis-à-vis des monoesters, des rendements de conversion de l'acide gras et du fructose ainsi que de la vitesse de consommation de l'acide gras.

Influence sur la concentration finale en sucroesters

On observe qu'une augmentation de la concentration initiale en acide gras permet d'augmenter la concentration finale en sucroesters totaux. Ceci peut s'expliquer par la loi d'action de masse. En effet une augmentation de la concentration en substrats permet de déplacer l'équilibre dans le sens de la synthèse. Cependant, on observe une diminution de la concentration en sucroesters dans le cas des acides palmitique et stéarique au-delà de 560 mM d'acide gras. Ceci pourrait s'expliquer par une hydrophobicité élevée du milieu provoquant une inhibition de l'enzyme si l'on n'est pas à l'équilibre ou bien par le niveau de l'eau qui devient très important ce qui provoque l'hydrolyse des produits formés si l'on a atteint l'équilibre. Généralement et à l'exception des acides palmitique et stéarique, la concentration en sucroesters est multipliée par un facteur allant de 1.5 à 2 en passant de 140 à 700 mM.

Influence sur la proportion de monoesters par rapport aux sucroesters totaux

Une augmentation de la concentration initiale en acide gras provoque une diminution de la sélectivité vis-à-vis des monoesters. Les faibles concentrations en acide gras (28 mM) permettent d'obtenir 100 % de monoesters. Au-delà de 28 mM d'acide gras, on commence à synthétiser des diesters. La sélectivité la plus faible a été obtenue à partir d'une concentration en acide gras de 560 mM.

Influence sur le rendement de conversion de l'acide gras

Une augmentation de 140 à 700 mM de la concentration initiale en acide gras provoque une diminution du rendement de conversion de l'acide gras. Cependant, lorsqu'on travaille en excès de fructose par rapport à l'acide gras (cas de l'acide stéarique de 28 à 140 mM), la situation s'inverse et on améliore le rendement de conversion de l'acide gras. Dans nos conditions opératoires, il semble exister une valeur optimale de rendement de conversion de l'acide gras (environ 84 %) à 140 mM d'acide stéarique. Dans ces mêmes conditions, on n'a pas pu atteindre 100 % de rendement de conversion de l'acide gras sans doute à cause d'une accumulation d'eau dans le milieu.

Influence sur le rendement de conversion du fructose

Le rendement de conversion du fructose a le même profil que celui des sucroesters totaux. En effet, une augmentation de la concentration initiale en acide gras permet une augmentation du rendement de conversion du fructose à l'exception des acide palmitique et stéarique à 700 mM où on assiste à une chute de ce rendement. Ce résultat peut s'expliquer par une hydrophobicité excessive empêchant le sucre hydrophile d'accéder au site actif. Des rendements de conversion du fructose de 100 % ont été atteints avec l'acide stéarique à 420 et 560 mM.

Influence sur la vitesse de consommation de l'acide gras

Une augmentation de la concentration initiale en acide gras de 140 à 700 mM, permet une augmentation presque linéaire de la vitesse de consommation de l'acide gras. Cependant, une chute significative (de 6 à 3 mM AG/g enzyme.h) de cette vitesse a été observée en passant de 560 à 700 mM d'acide stéarique. Cette diminution de la vitesse de réaction peut être expliquée par une inhibition par excès de substrat ou une hydrophobicité élevée du milieu diminuant ainsi l'activité enzymatique. Généralement, la vitesse de consommation de l'acide gras fluctue entre 1 et 6 mM d'acide gras consommé/g enzyme.h en fonction de l'acide gras et de sa concentration initiale dans le milieu.

CAPRYLATE DE FRUCTOSE (C8)

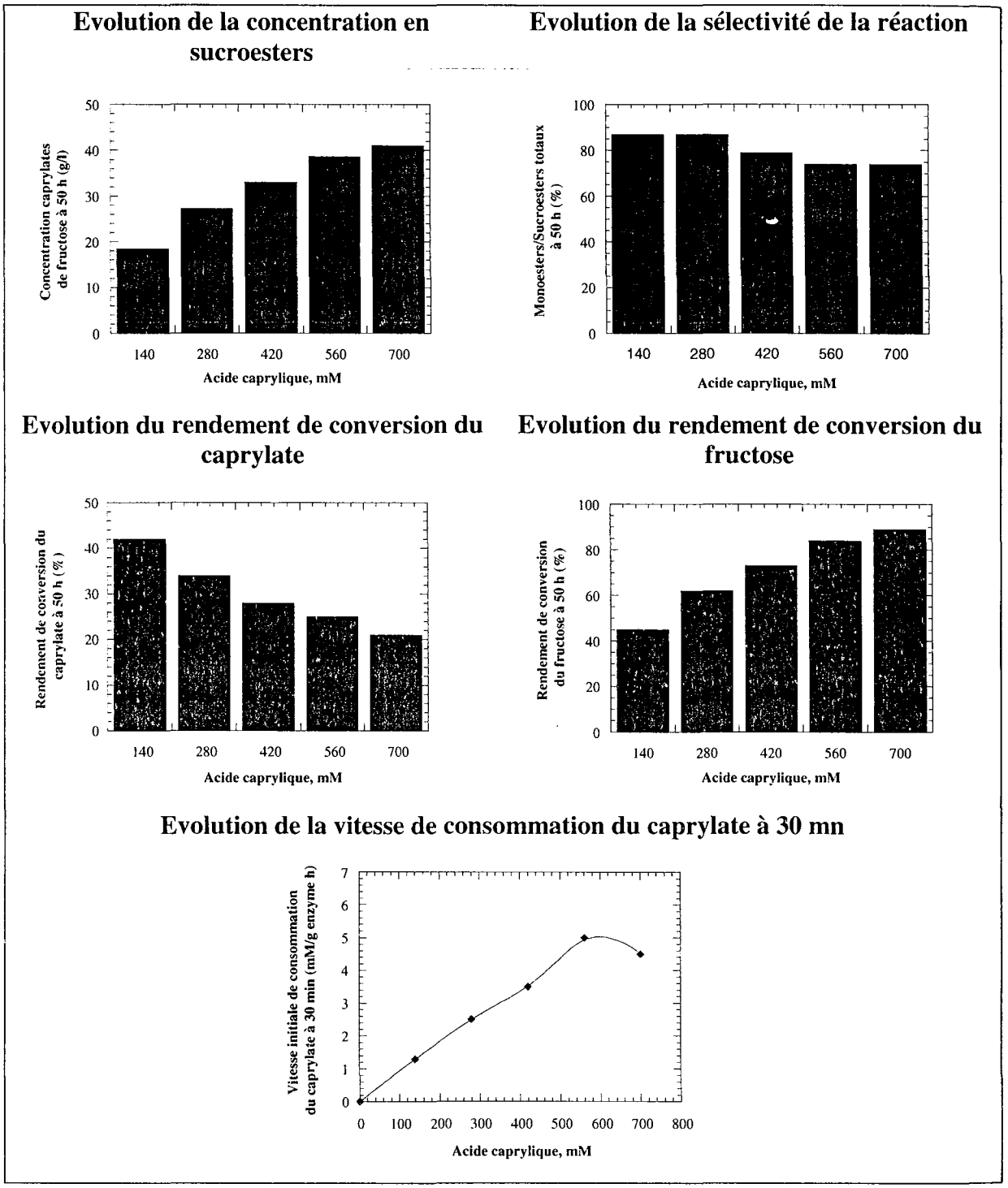


Figure III-4a: Influence de la concentration initiale en acide caprylique sur les performances de la réaction

CAPRATE DE FRUCTOSE (C10)

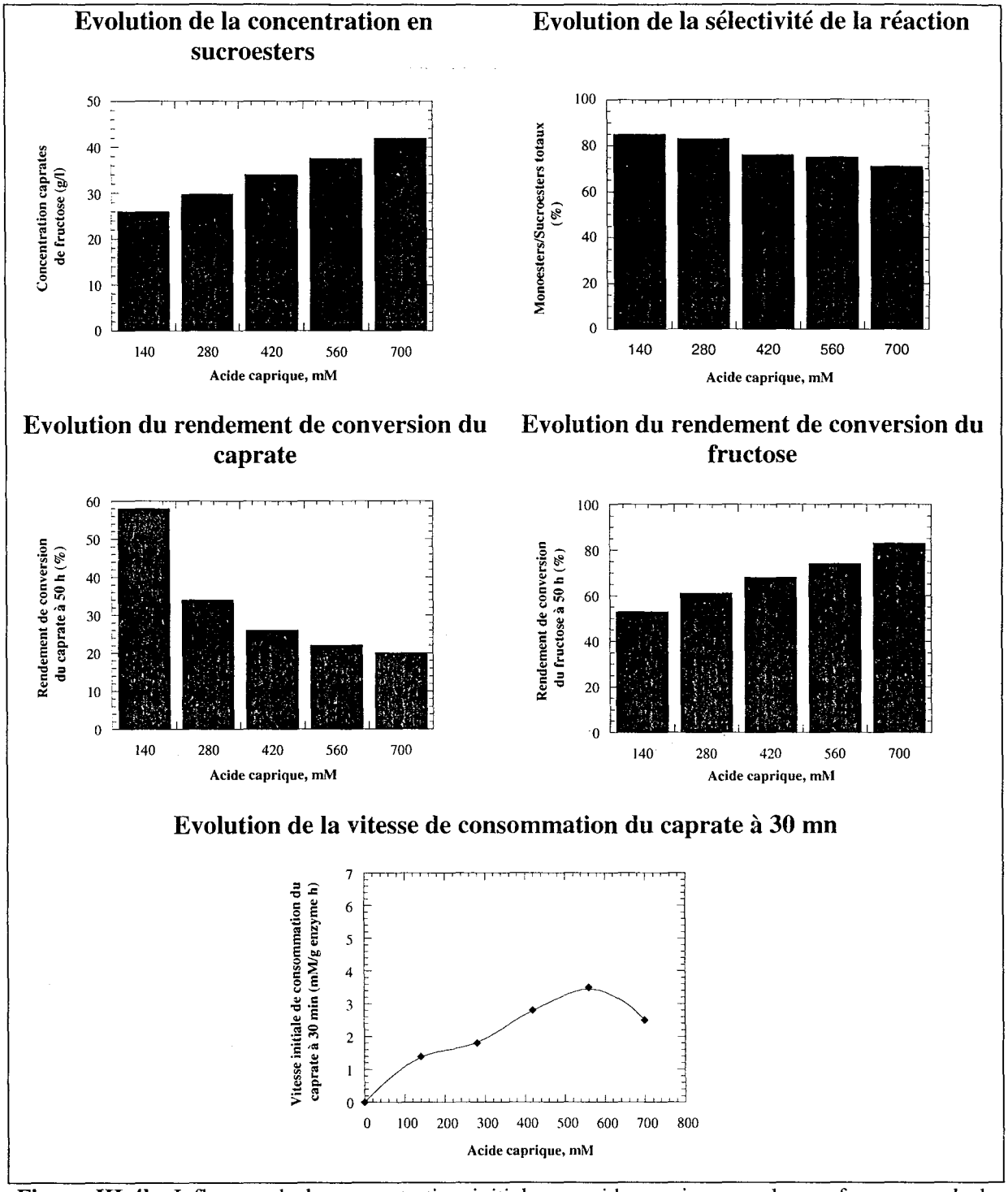


Figure III-4b: Influence de la concentration initiale en acide caprique sur les performances de la réaction

LAURATE DE FRUCTOSE (C12)

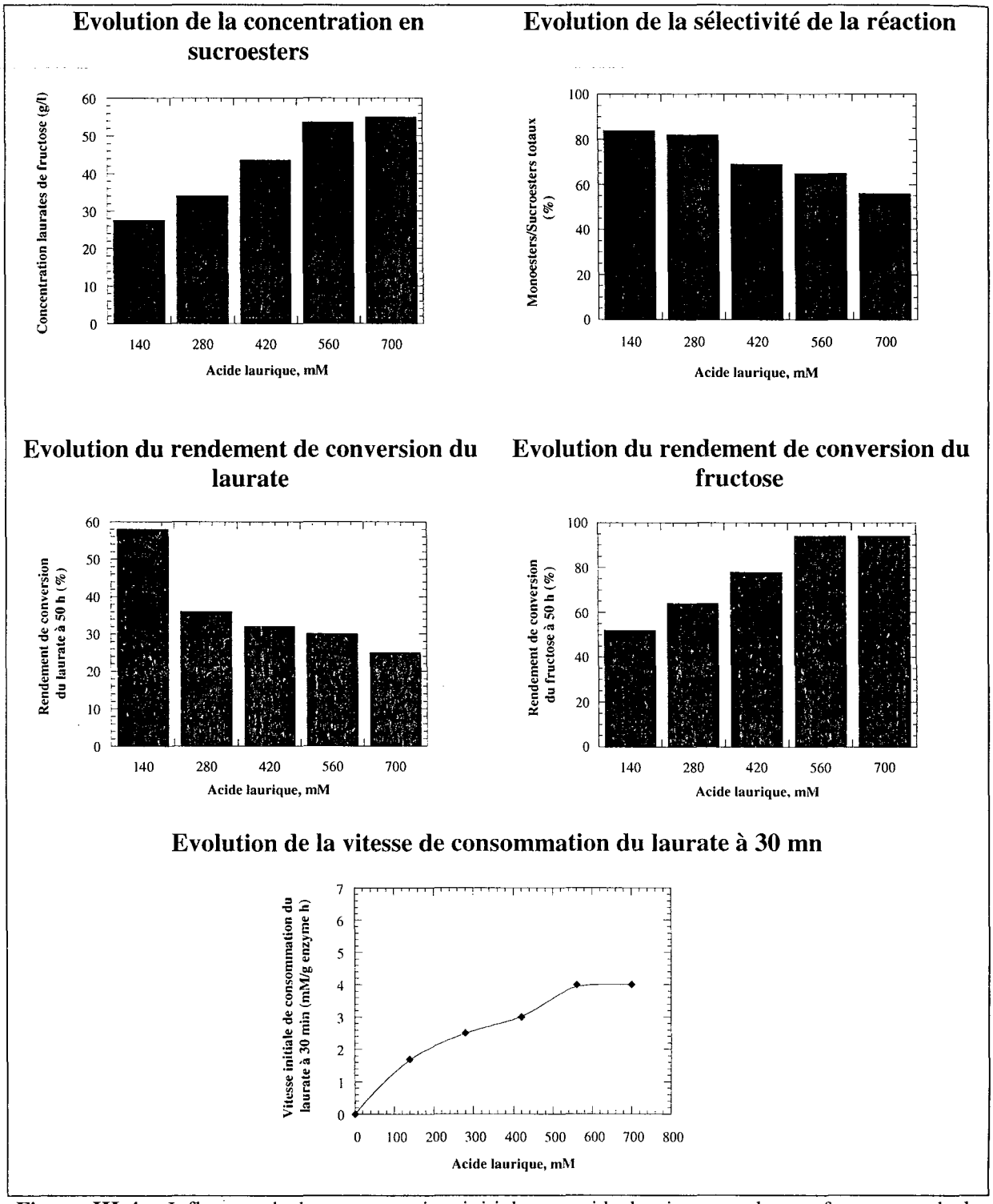


Figure III-4c: Influence de la concentration initiale en acide laurique sur les performances de la réaction

MYRISTATE DE FRUCTOSE (C14)

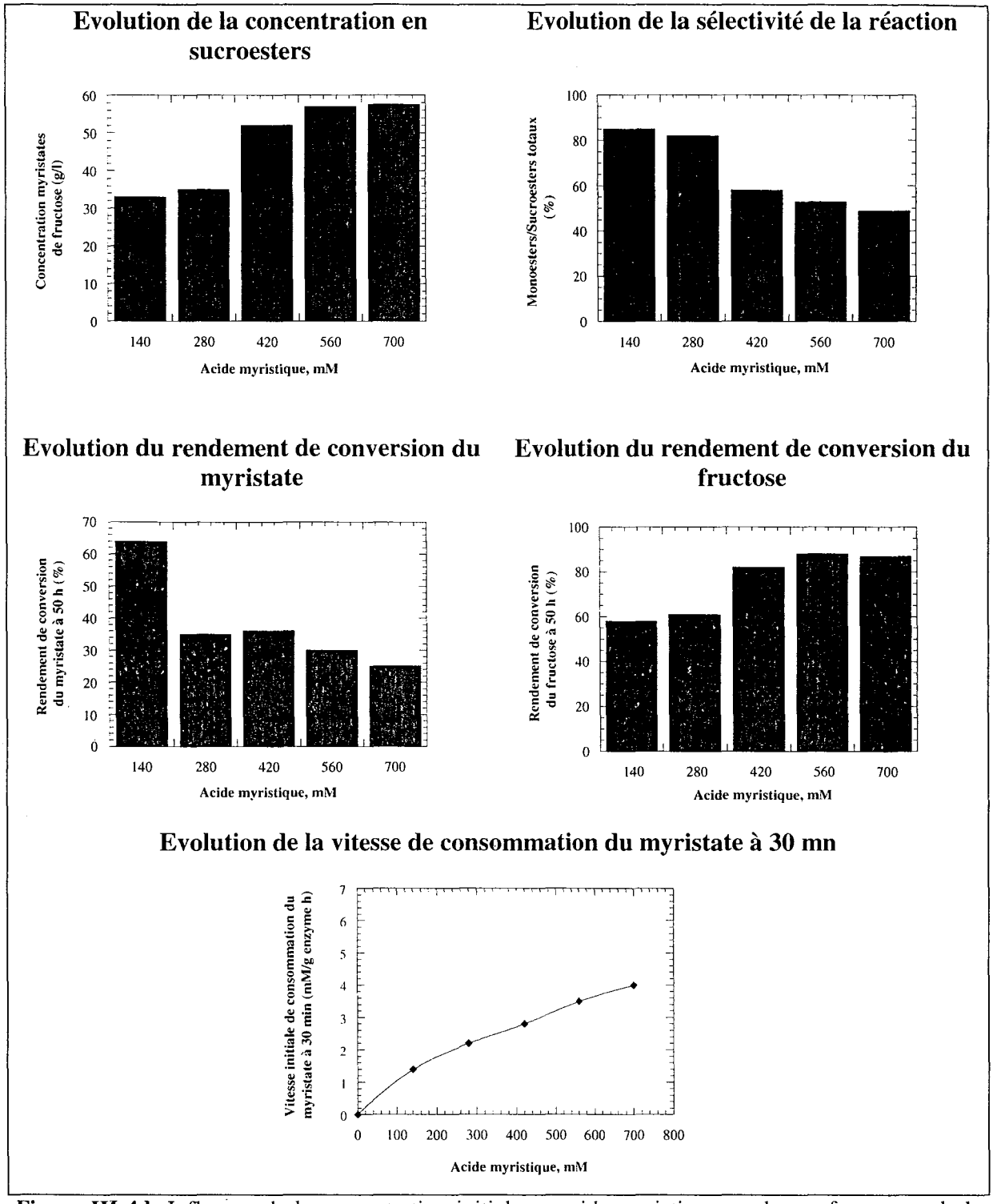


Figure III-4d: Influence de la concentration initiale en acide myristique sur les performances de la réaction

PALMITATE DE FRUCTOSE (C16)

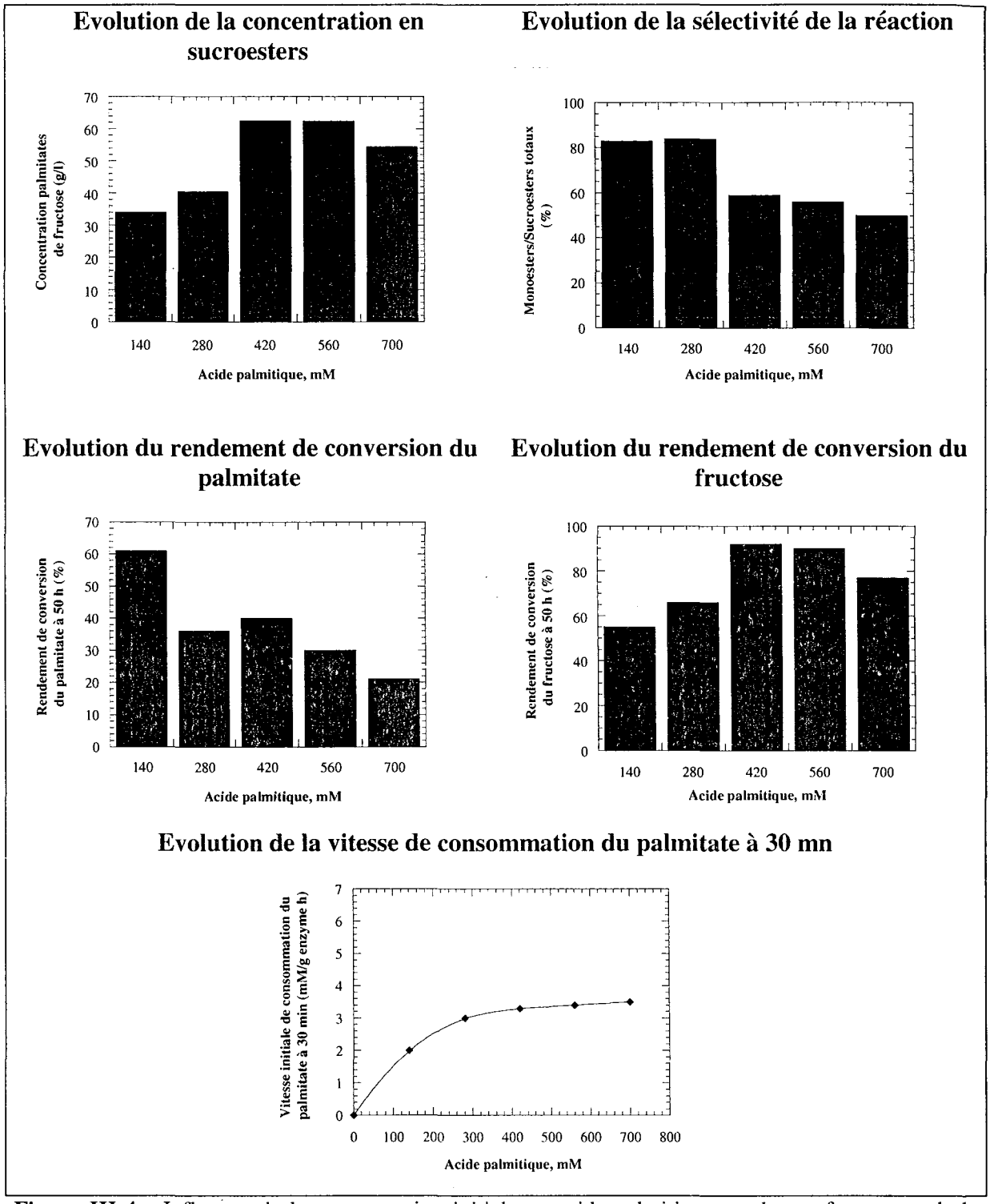


Figure III-4e: Influence de la concentration initiale en acide palmitique sur les performances de la réaction

STEARATE DE FRUCTOSE (C18)

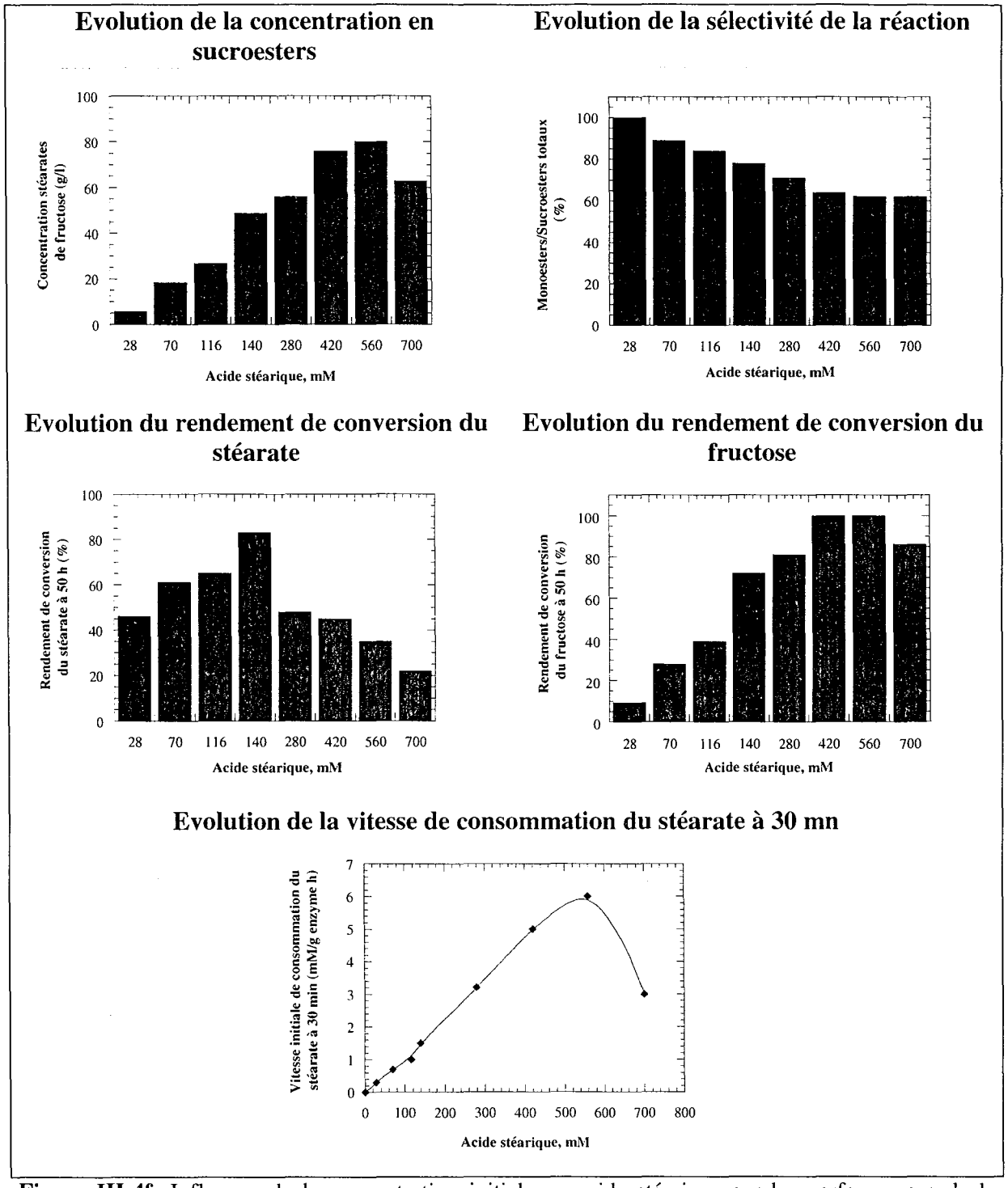


Figure III-4f: Influence de la concentration initiale en acide stéarique sur les performances de la réaction

2.3. Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras

Les **Figures III-5a** à **III-5c** représentent l'influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras à 3 concentrations (140, 280 et 420) sur la réaction de synthèse enzymatique par estérification directe des sucroesters.

Influence sur la concentration finale en sucroesters

On remarque que pour une concentration donnée en acide gras, l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras permet d'augmenter la production des sucroesters qui est environ deux fois plus élevée en passant d'un acide gras en C8 à un acide gras en C18. Ainsi, les meilleures concentrations ont été obtenues avec l'acide stéarique avec lequel on synthétise environ 100, 112 et 148 mM de sucroesters à des concentrations initiales en acide gras de 140, 280 et 420 mM respectivement.

Influence sur la proportion de monoesters par rapport aux sucroesters totaux

La sélectivité de la réaction vis-à-vis des monoesters varie légèrement avec le nombre de carbone. Cette variation est plus importante lorsqu'on travaille avec des concentrations initiales élevées en acide gras. C'est ainsi qu'à 140 mM on ne diminue le pourcentage des monoesters que de 8 % en passant de l'acide caprylique (C8) à l'acide stéarique (C18) (**Figure III-5a**). Cette chute est plus importante (16 %) lorsqu'on travaille à 420 mM d'acide gras (**Figure III-5c**). Une faible prédominance des monoesters est, cependant, observée avec les acides gras à courte chaîne carbonée.

Influence sur les rendements de conversion des substrats

Les rendements de conversion de l'acide gras et du fructose sont comparables sauf dans le cas de l'acide stéarique avec lequel on atteint les meilleurs rendements de conversion des substrats. En effet, dans ce cas on obtient un rendement de conversion de l'acide gras de 82 % lorsqu'on travaille à 140 mM d'acide gras (**Figure III-5a**) et un rendement de conversion du fructose de 100% lorsqu'on travaille à 420 mM d'acide gras (**Figure III-5c**).

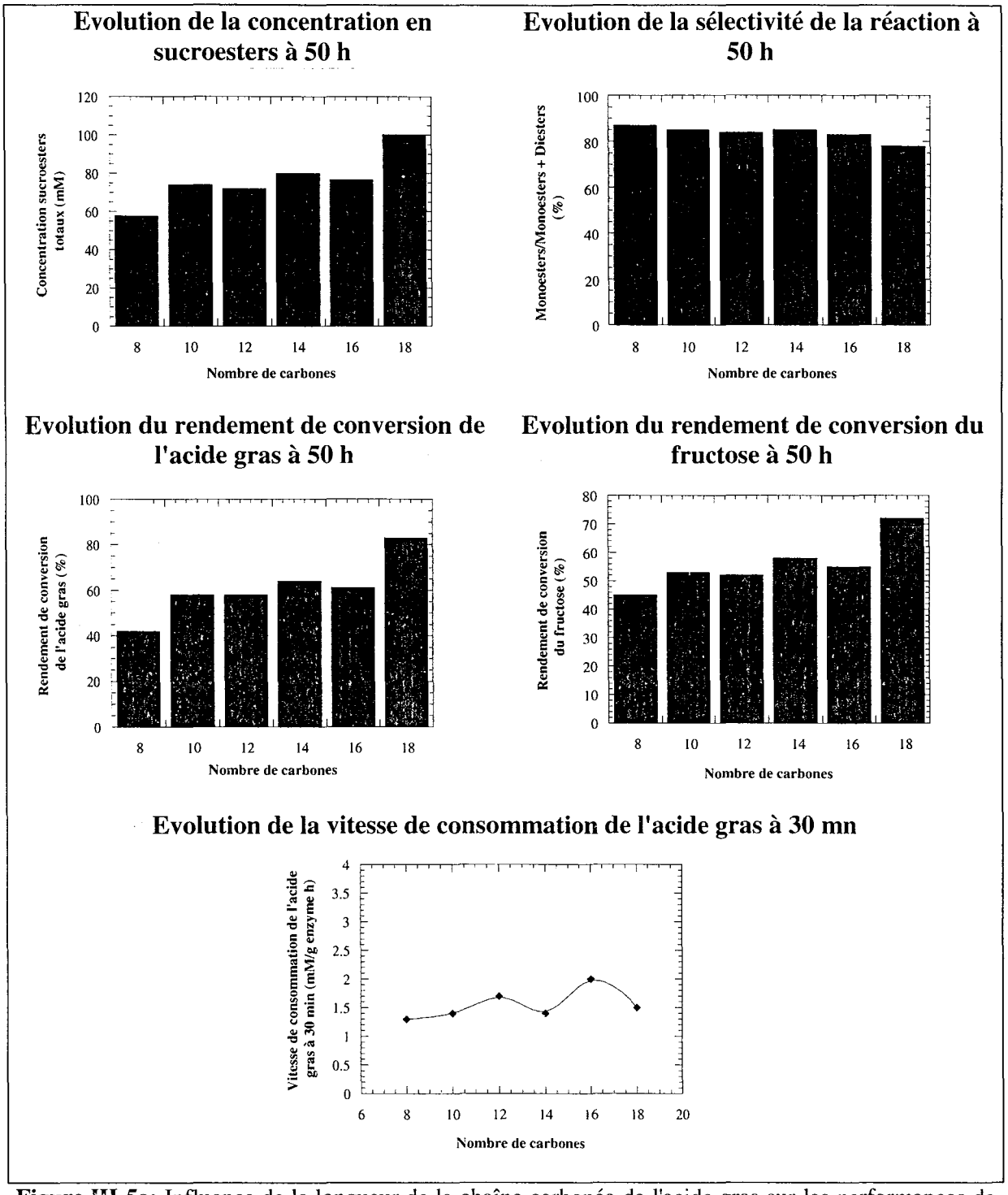


Figure III-5a: Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras sur les performances de la réaction à 140 mM de concentration initiale de l'acide gras.

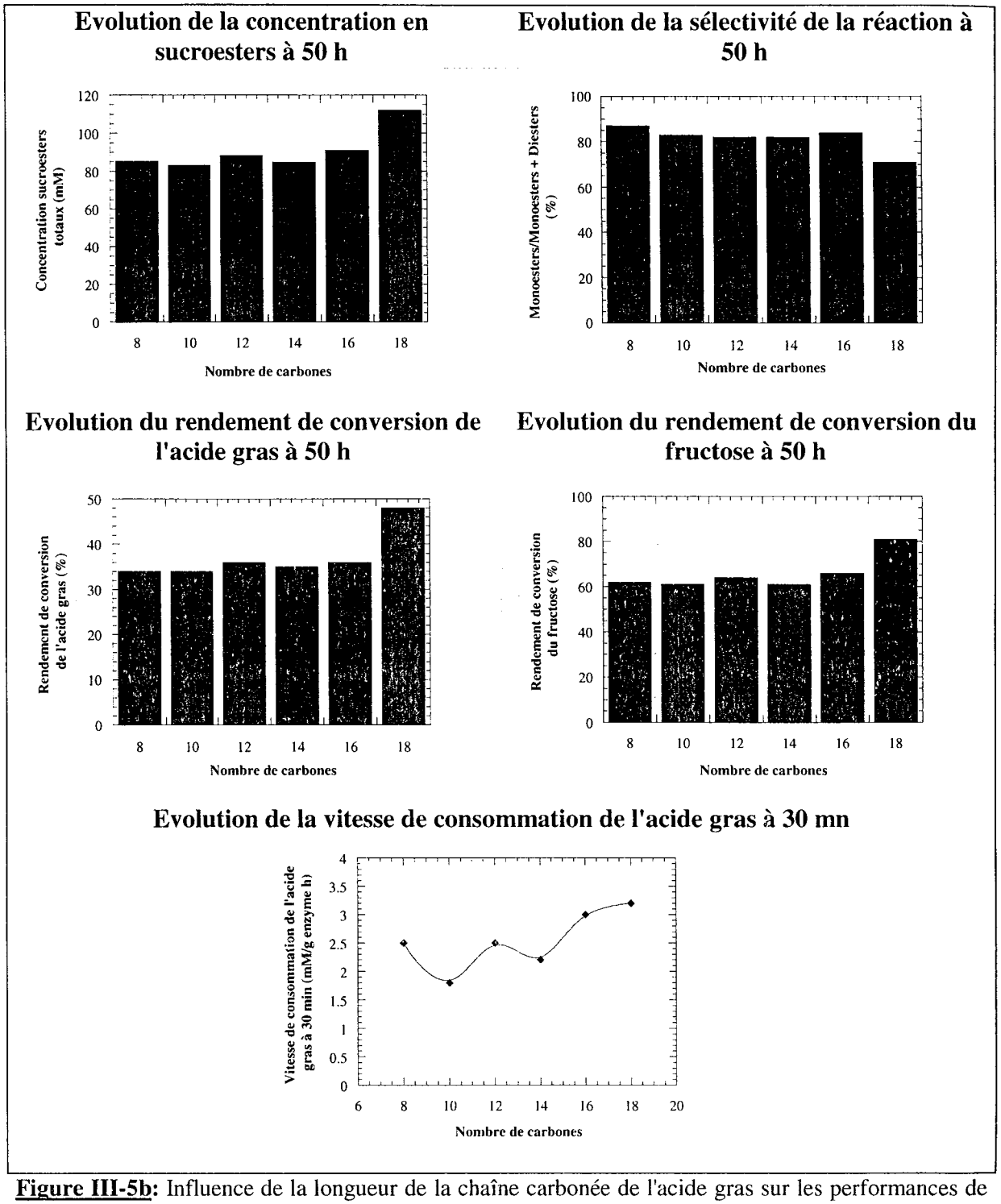
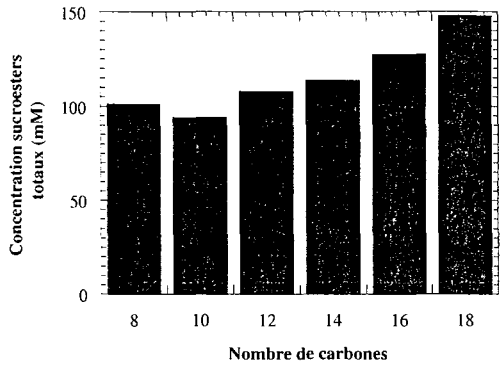
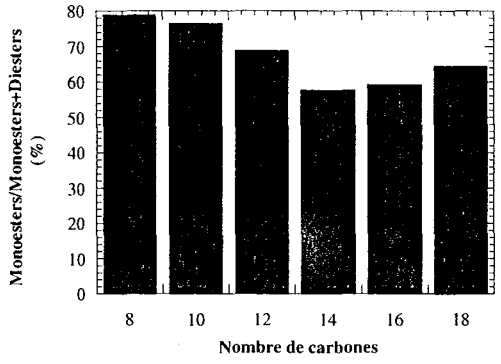


Figure III-5b: Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras sur les performances de la réaction à 280 mM de concentration initiale de l'acide gras.

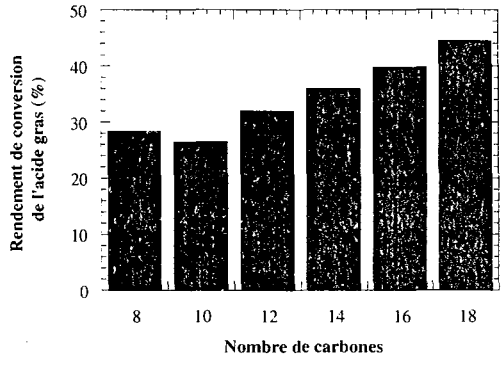
Evolution de la concentration en sucroesters à 50 h



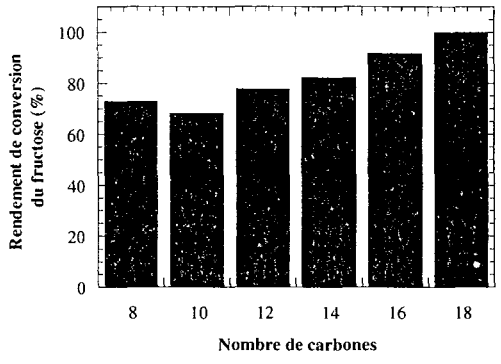
Evolution de la sélectivité de la réaction à 50 h



Evolution du rendement de conversion de l'acide gras à 50 h



Evolution du rendement de conversion du fructose à 50 h



Evolution de la vitesse de consommation de l'acide gras à 30 mn

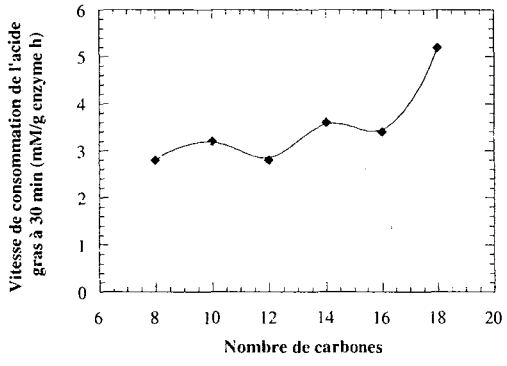


Figure III-5c: Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras sur les performances de la réaction à 420 mM de concentration initiale de l'acide gras.

Influence sur la vitesse de consommation de l'acide gras

Pour tous les acides gras, excepté l'acide stéarique, les vitesses de consommation de l'acide gras ne présentent pas de différence significative lorsqu'on augmente le nombre de carbones de l'acide gras. Dans le cas de l'acide stéarique, on observe une augmentation de la vitesse aux fortes concentrations en acide gras. En effet, à partir de 420 mM, la vitesse de consommation de l'acide stéarique est 1.5 fois plus élevée que celle des autres acides gras (**Figure III-5c**).

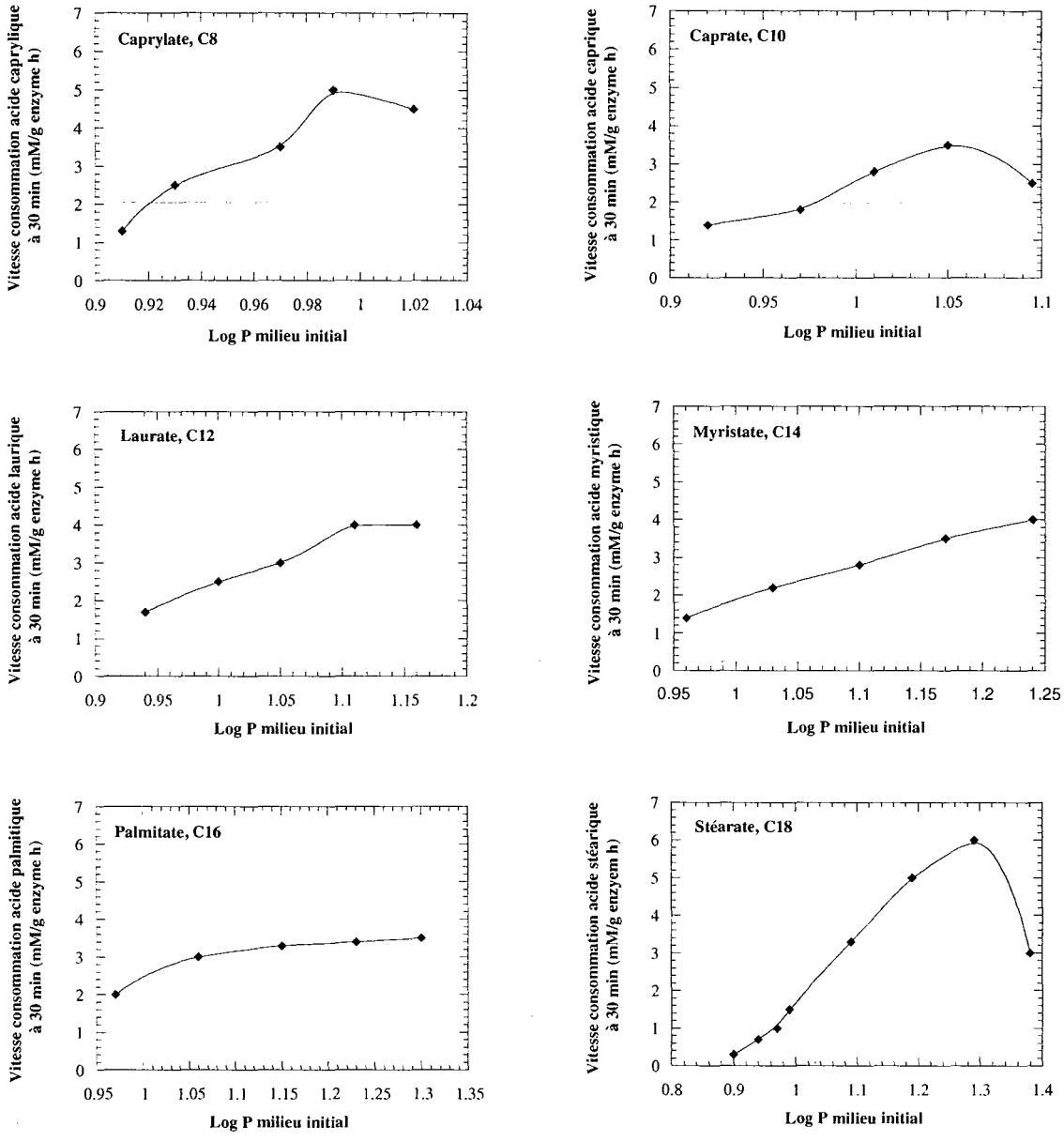
2.4. Influence de l'hydrophobicité initiale du milieu

Les vitesses de réaction obtenues en fonction de la longueur de la chaîne carbonée et de la concentration du donneur d'acyle pourraient s'expliquer soit par une éventuelle spécificité de la lipase soit par l'hydrophobicité apportée par le donneur d'acyle (longueur de chaîne et concentration initiale).

La première hypothèse suppose que la lipase de *Candida antarctica* utilisée présenterait une typosélectivité envers les acides gras à longue chaîne carbonée plus particulièrement l'acide stéarique.

Afin de vérifier la deuxième hypothèse, on a tracé l'évolution de l'activité enzymatique exprimée par la vitesse de consommation de l'acide gras en fonction de log *P* du milieu (**Figure III-6**).

On remarque qu'en faisant varier la composition et par conséquent l'hydrophobicité du milieu, on modifie légèrement les vitesses de consommation de l'acide gras. En effet, plus le milieu est hydrophobe plus l'activité enzymatique est élevée. Cependant, cette tendance s'inverse dans les milieux dont l'hydrophobicité est supérieure à 1.3. Cette valeur est atteinte en travaillant avec l'acide stéarique comme donneur d'acyle à 700 mM. Ces résultats laissent penser qu'il existe une valeur optimale d'hydrophobicité permettant d'atteindre la meilleure activité enzymatique et au-delà de laquelle il y aurait inhibition de l'enzyme. Cependant, sachant que l'hydrophobicité dépend principalement de la concentration et de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras, il est difficile de distinguer si cet effet est dû à l'acide gras ou bien intrinsèquement à l'hydrophobicité du milieu.



Comparaison des vitesses de consommation de l'acide gras Acide caprylique (♦), acide caprique (●), acide laurique (□), acide myristique (▲), acide palmitique (▼), acide stéarique (◎)

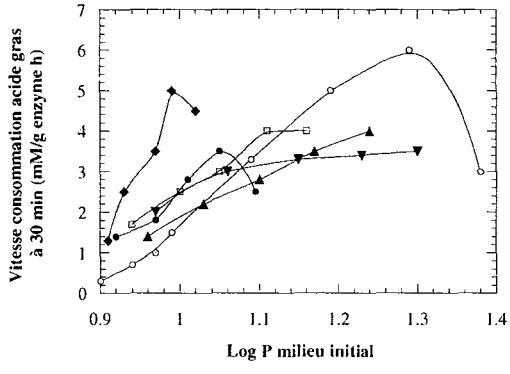


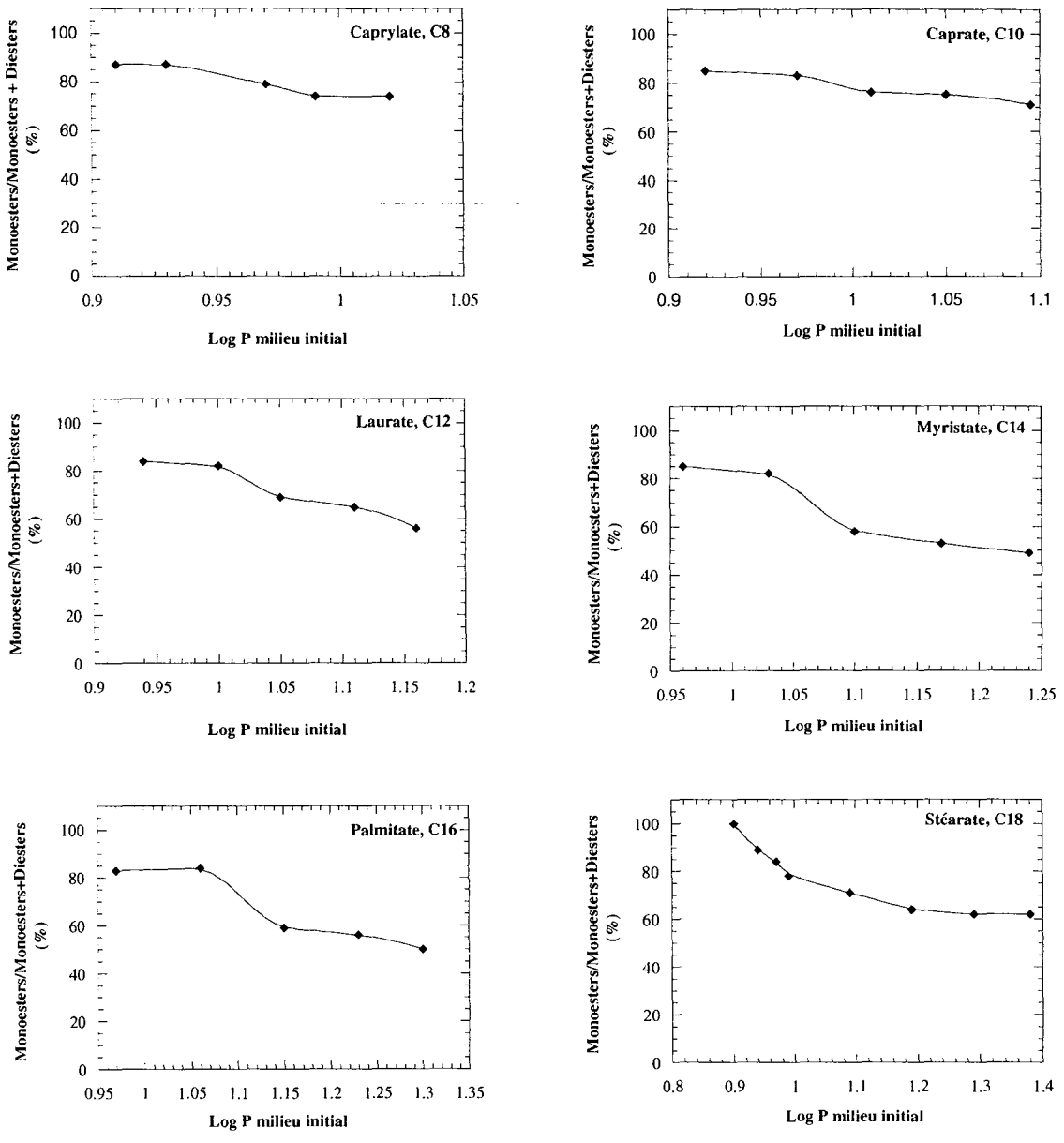
Figure III-6: Influence de l'hydrophobicité initiale du milieu sur la vitesse de consommation de l'acide gras à 30 mn.

La **Figure III-7** montre l'influence de l'hydrophobicité du milieu sur l'évolution de la proportion des monoesters. On remarque que des valeurs élevées de Log *P* initial du milieu provoquent une légère diminution de la sélectivité vis-à-vis des monoesters. De plus, il faut noter que les profils de sélectivité obtenus sont identiques quel que soit l'acide gras étudié. Cet effet peut également être expliqué par l'augmentation de la concentration en acide gras étant donné que la variation de l'hydrophobicité est directement liée à ce facteur.

2.5. Influence de la teneur en eau du milieu

Au cours de l'étude cinétique menée dans les conditions standards, on a observé qu'au meilleur des cas on atteint un rendement de conversion de l'acide gras de 88 % et ceci au bout d'un temps de réaction très long (154 h). Ce résultat a été obtenu avec l'acide stéarique comme donneur d'acyle à une concentration initiale de 28 mM (un excès de fructose de 5 fois). A un rapport équimolaire des substrats, le rendement de conversion obtenu pour l'acide stéarique est légèrement plus faible (83 %). Ainsi, même en travaillant avec un excès important de fructose, on n'améliore pas de manière significative le rendement de conversion de l'acide gras. Ce résultat peut être dû aux équilibres qui seraient affectés par la présence d'eau dans le milieu.

Lorsqu'on réalise la synthèse dans les conditions standards avec élimination d'eau sous vide (P=200 mbar), on atteint des teneurs initiales de l'ordre de 0.12 %. Cette teneur en eau est multipliée par un facteur 2 au bout de seulement 5 minutes de synthèse sans doute à cause de l'accumulation de l'eau dans le milieu. Dans ces conditions, on a remarqué qu'à la fin de la réaction on évapore entre 1 et 10 % du volume total du milieu de synthèse (M2B2 et eau) en fonction de la composition. En effet, les volumes les plus importants, ayant été évaporés, correspondent aux fortes concentrations en acide stéarique. Par conséquent, il faudrait modifier la pression en fonction de la composition du milieu. Cette technique d'élimination de l'eau n'étant pas très pratique, il serait plus intéressant d'utiliser du tamis moléculaire.



Comparaison de la sélectivité de la réaction Acide caprylique (♦), acide caprique (●), acide laurique (□), acide myristique (▲), acide palmitique (▼), acide stéarique (◎).

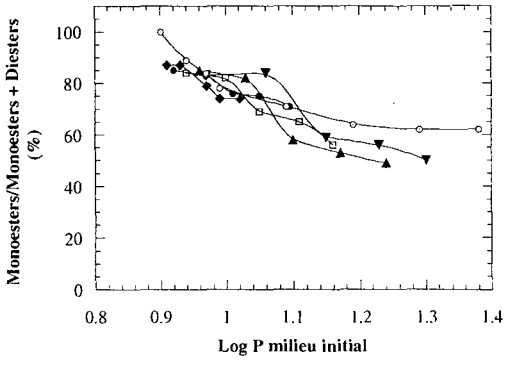


Figure III-7: Influence de l'hydrophobicité initiale du milieu sur la sélectivité de la réaction à 50 h.

L'étude bibliographique a montré que l'eau constitue un paramètre clé dans les synthèses enzymatiques en milieu organique. Plusieurs méthodes ont été proposées dans la littérature pour permettre aussi bien de réduire l'eau apportée par les substrats au début de la réaction que d'éliminer l'eau produite tout au long de la synthèse. L'utilisation de tamis moléculaire a été reportée dans la littérature comme étant une technique très efficace dans le contrôle par adsorption de l'eau dans le milieu de synthèse.

Cette technique va être utilisée dans la suite de ce travail dans le but d'améliorer les rendements de conversion des substrats, plus particulièrement celui de l'acide gras, et d'augmenter les concentrations finales en sucroesters. L'effet de l'élimination de l'eau par ajout de tamis moléculaire sur la proportion des monoesters ainsi que sur l'activité de l'enzyme sera également étudié.

A ce stade, notre objectif sera donc de réaliser la réaction de synthèse à partir de quelques acides gras (acides caprylique, laurique et myristique) en présence de tamis moléculaire.

Pour mettre en place cette série de synthèses, nous avons mis en contact les différents constituants du milieu, excepté l'enzyme, avec 200 g/l de tamis moléculaire (4 Å) pendant 12 heures. Les réactions sont réalisées avec 140 mM de fructose, 420 mM d'acide gras, 20 g/l de Novozym 435, 200 mbars, 200 rpm et 60 °C.

Les **Figures III-8a** à **III-8c** décrivent l'évolution des concentrations finales en sucroesters, des proportions en monoesters, des concentrations en substrats et des vitesses de consommation de l'acide gras au cours du temps.

Globalement, les courbes des cinétiques de synthèse présentent le même profil quel que soit l'acide gras étudié. En effet, lorsqu'on sèche les constituants du milieu, la réaction se fait très rapidement et le fructose est consommé totalement au bout de seulement 4 heures de réaction.

2.5.1. Cinétique de synthèse des caprylates de fructose

La **Figure III-8a** montre les résultats obtenus avec tamis moléculaire lorsqu'on utilise l'acide caprylique comme donneur d'acyle.

La production de sucroesters augmente de manière régulière pour se stabiliser au bout de 4 heures de réaction. A l'équilibre, on atteint une concentration en sucroesters totaux de près de 60 g/l. Dans ce cas, le milieu est constitué d'environ 30 % de monoesters, le reste des sucroesters étant constitué de diesters.

La consommation de l'acide caprylique évolue jusqu'à 4 heures de réaction et passe de 420 à 240 mM.

La vitesse de consommation de l'acide caprylique à 1 h est de 3.5 mM/g enzyme.h. Cette vitesse continue à chuter pour atteindre de faibles valeurs de l'ordre de 0.4 mM/g enzyme.h.

L'arrêt de la réaction est dû à une limitation par le fructose. En effet, la concentration en fructose résiduel atteint rapidement la limite de solubilité du sucre dans le M2B2 à 60 °C (13.5 g/l). Ainsi, au bout d'1 h de réaction, il subsiste 11 g/l de fructose qui sont rapidement consommés aboutissant à une concentration nulle au bout de 4 heures de synthèse seulement. Par conséquent, après 4 heures de synthèse, la légère consommation de l'acide gras peut être attribuée à la formation des diesters à partir des monoesters.

2.5.2. Cinétique de synthèse des laurates de fructose

La **Figure III-8b** montre les résultats obtenus avec l'acide laurique et en présence de tamis moléculaire.

La synthèse des sucroesters augmente pendant les 2 premières heures et se stabilise au bout de 4 heures de réaction. A l'équilibre, on atteint une concentration en sucroesters totaux d'environ 70 g/l. Dans ce cas, le milieu est constitué d'environ 25 % de monoesters et de 75 % de diesters.

L'évolution de la concentration en acide laurique consommé au cours du temps montre une augmentation assez rapide au bout de 2 heures de réaction avant d'atteindre l'équilibre au bout de 4 heures. Dans ce cas, la consommation de l'acide laurique est de 180 mM.

La vitesse de consommation de l'acide laurique à 1 h est de 4.7 mM/g enzyme.h. Ensuite, elle chute à des valeurs de l'ordre de 0.2 mM/g enzyme.h au bout de 4-5 heures.

Au bout d'1 h de réaction, il subsiste encore près de 9 g/l de fructose qui sont rapidement consommés, c'est à dire après 4 heures de synthèse seulement comme dans le cas de l'acide caprylique.

2.5.3. Cinétique de synthèse des myristates de fructose

La **Figure III-8c** montre les résultats obtenus avec tamis moléculaire lorsqu'on utilise l'acide myristique.

La production de sucroesters augmente rapidement jusqu'à 2 heures, ensuite on observe un ralentissement progressif jusqu'à 7 heures de réaction. A l'équilibre, on atteint une concentration en sucroesters totaux d'environ 68 g/l. Dans ce cas, le milieu de synthèse obtenu est constitué d'environ 45 % de monoesters et 55 % de diesters.

La consommation de l'acide myristique augmente jusqu'à 2 heures de réaction. Ensuite, l'évolution de la concentration de l'acide gras consommé est plus lente et se stabilise à environ 200 mM au bout de 7 heures de réaction.

La vitesse de consommation de l'acide myristique à 1 h est d'environ 4.8 mM/g enzyme.h. Cette vitesse chute pour atteindre des valeurs de l'ordre de 0.2 mM/g enzyme.h au bout de 4-5 heures de réaction.

Au bout d'1 h de réaction, il ne reste que 13 g/l de fructose qui sont rapidement consommés par la suite. En effet, la totalité du fructose est consommée au bout de 7 heures de réaction.

CAPRYLATE DE FRUCTOSE (C8)

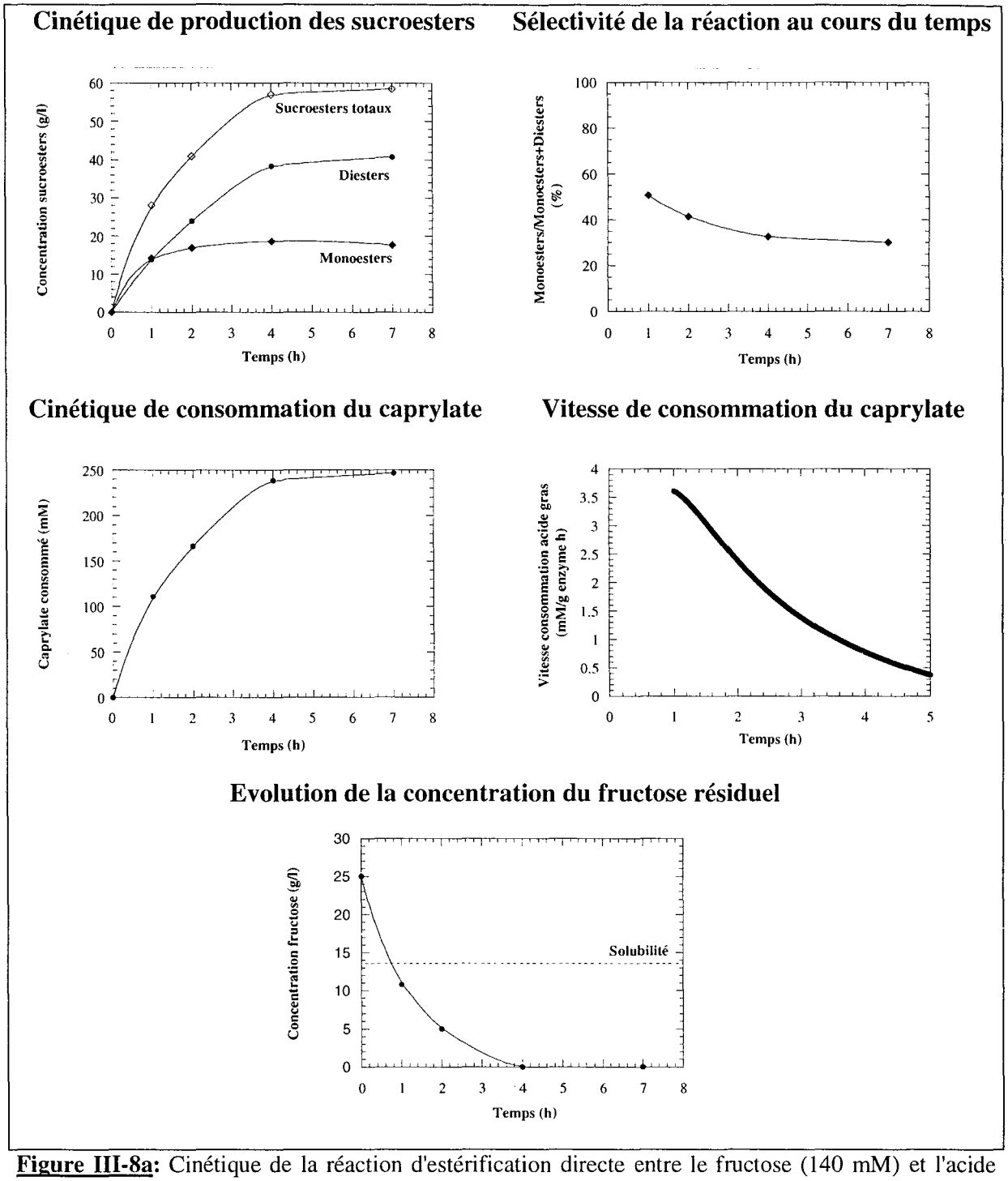


Figure III-8a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprylique (420 mM) en présence de tamis moléculaire.

LAURATE DE FRUCTOSE (C12)

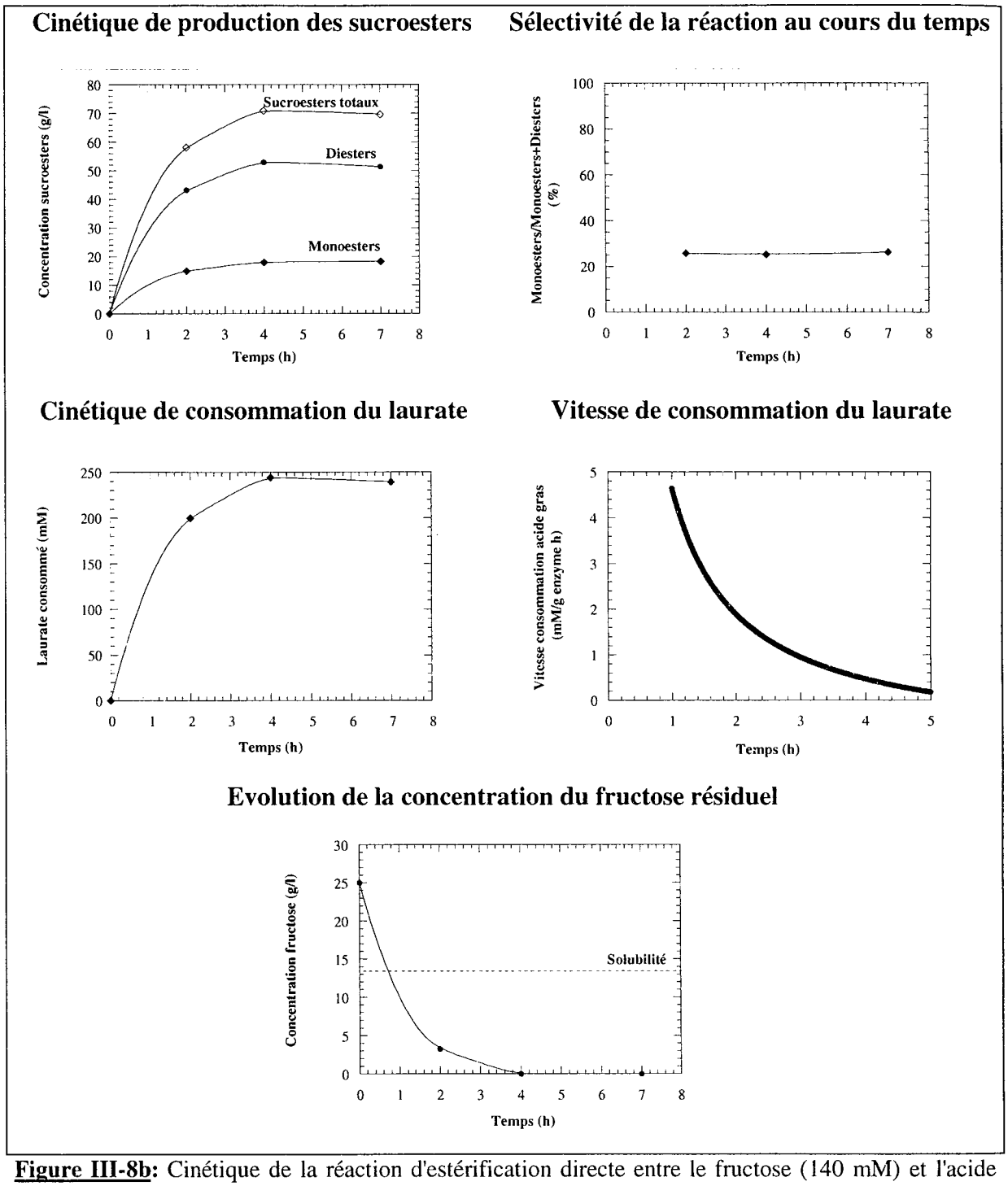


Figure III-8b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide laurique (420 mM) en présence de tamis moléculaire.

MYRISTATE DE FRUCTOSE (C14)

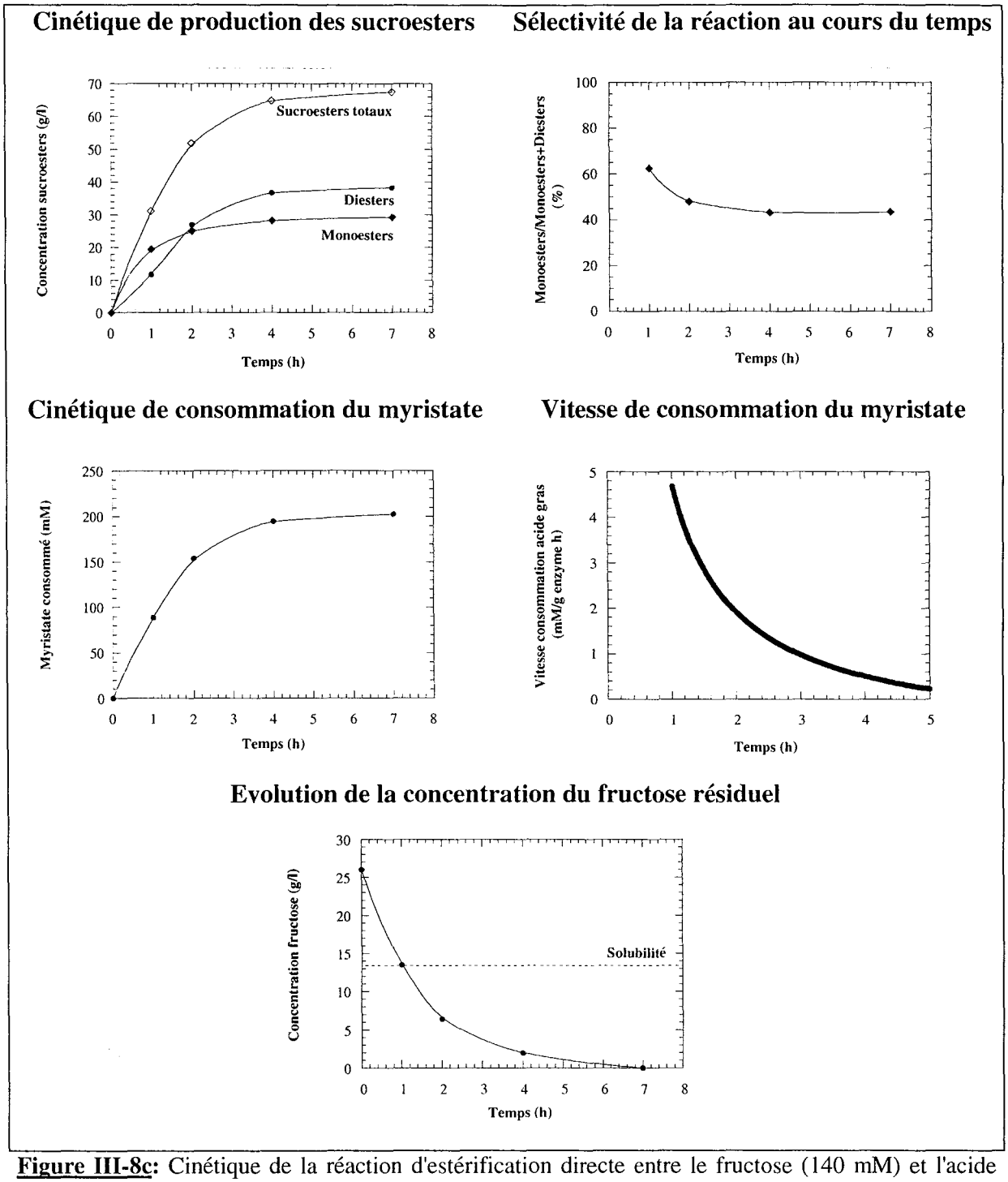


Figure III-8c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide myristique (420 mM) en présence de tamis moléculaire.

La **Figure III-9** compare les résultats obtenus avec et sans tamis moléculaire au bout d'une heure de synthèse pour la vitesse de consommation de l'acide gras et 7 h pour les autres critères.

Influence sur la concentration finale en sucroesters

En présence de tamis moléculaire, on a synthétisé entre 60 et 70 g/l de sucroesters selon l'acide gras utilisé au bout de seulement 7 heures de réaction. Ceci représente un gain de 10 à 20 g/l par rapport aux concentrations finales obtenues au bout de 50 heures de réaction sans tamis moléculaire.

Influence sur la proportion en monoesters

La présence de tamis moléculaire favorise la synthèse des diesters. En effet, au bout de 7 heures on n'a synthétisé que 25 à 45 % de monoesters en fonction de l'acide gras utilisé. Ceci représente une perte de sélectivité comprise entre 50 et 60 % par rapport à la réaction sans tamis moléculaire. L'élimination de l'eau déplace l'équilibre dans le sens de la synthèse qui se fait au profit des diesters.

Influence sur le rendement de conversion de l'acide gras

En présence de tamis moléculaire, on consomme entre 50 et 60 % d'acide gras selon la longueur de la chaîne du donneur d'acyle au bout de 7 heures de réaction. Ce résultat représente une amélioration des rendements de conversion de l'acide gras d'environ trois fois par rapport à la synthèse sans tamis moléculaire.

Influence sur la vitesse de consommation de l'acide gras

En présence de tamis moléculaire, les vitesses de consommation de l'acide gras après 1 heure sont comparables d'un acide gras à l'autre (entre 3.5 et 4.5 mM AG consommé/g enzyme.h). Cependant, une amélioration nette a été observée par rapport aux résultats obtenus sans tamis moléculaire. En effet, la réaction est deux fois plus rapide lorsqu'on utilise du tamis moléculaire.

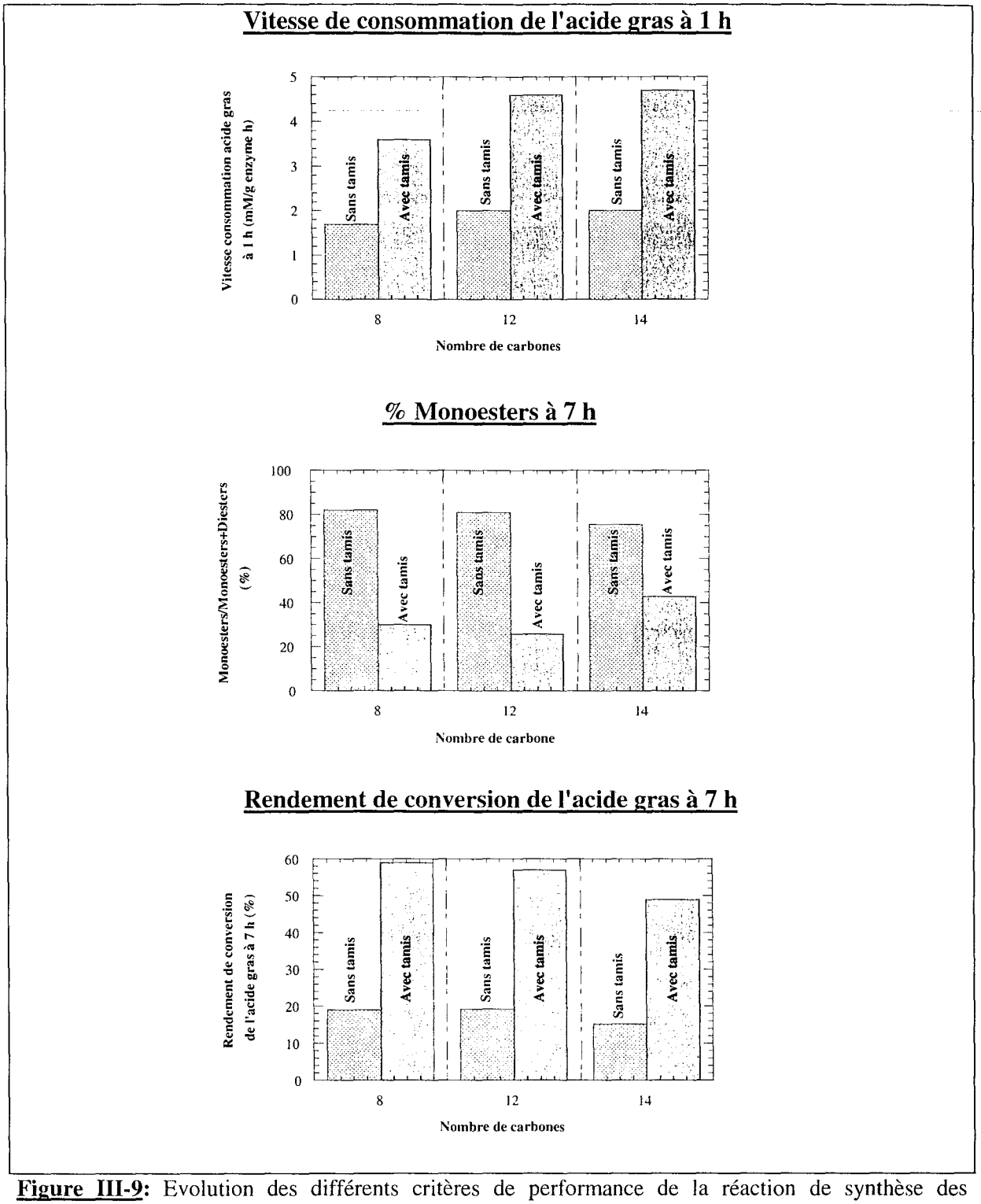


Figure III-9: Evolution des différents critères de performance de la réaction de synthèse des sucroesters avec et sans tamis moléculaire en fonction du nombre de carbone.

En éliminant en partie l'eau produite au cours de la réaction ainsi que l'eau apportée par le M2B2 grâce à l'utilisation de tamis moléculaire, on a amélioré de manière significative les vitesses de réaction ainsi que les rendements de conversion de l'acide gras. La quantité d'eau représente donc un paramètre clé dans la synthèse enzymatique d'esters de sucre et d'acide gras en présence du Novozym 435. Par conséquent, ce paramètre doit être contrôlé non seulement avant le début de la synthèse mais aussi tout au long de la réaction.

Dans ces conditions de synthèse avec tamis moléculaire, on n'a pas pu convertir la totalité de l'acide gras car au bout d'environ 4 heures de réaction on se trouve en limitation de sucre qui atteint des valeurs nulles dans la plupart des cas.

2.6. Influence de la concentration en fructose

Cette étude consiste à déterminer l'intérêt de l'ajout du substrat osidique en plusieurs fois. Pour cela, on se propose de comparer les résultats de deux réactions de synthèse: l'une avec 25 et l'autre avec 50 g/l de fructose ajouté initialement. L'étude est réalisée avec 280 mM d'acide stéarique et la réaction se déroule dans les conditions standards. L'acide stéarique a été choisi comme donneur d'acyle car il a permis d'obtenir les meilleurs résultats lors de l'étude cinétique. Dans le cas de la réaction réalisée avec 25 g/l, on reportera les résultats obtenus auparavant lors de l'étude cinétique de la réaction de synthèse des stéarates de fructose à 280 mM d'acide stéarique.

2.6.1. Cinétique de synthèse des stéarates de fructose à 50 g/l de fructose initial

La **Figure III-10** montre l'évolution des différents constituants du milieu et de la vitesse de consommation du stéarate à une concentration initiale de fructose de 50 g/l.

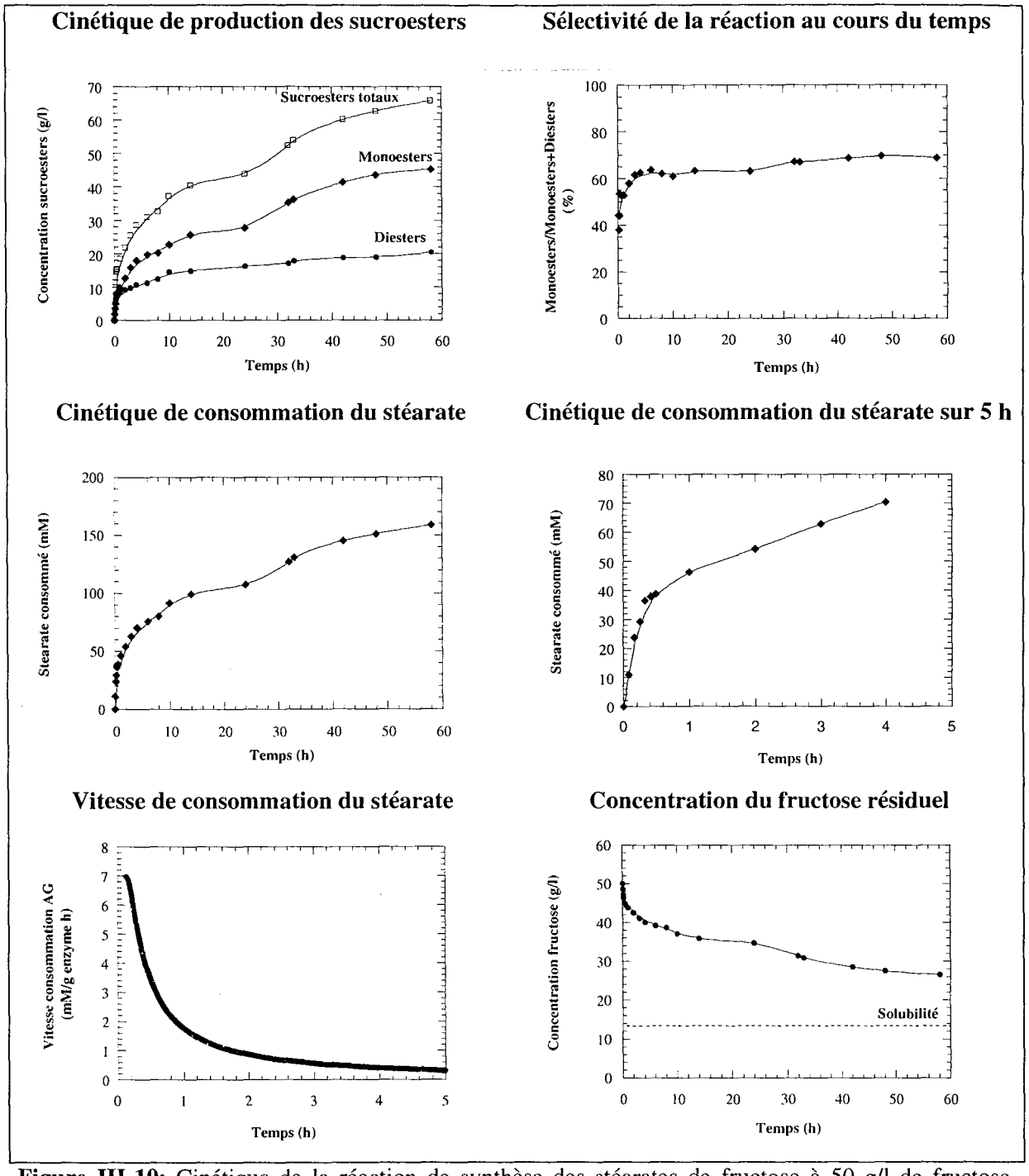


Figure III-10: Cinétique de la réaction de synthèse des stéarates de fructose à 50 g/l de fructose. Conditions expérimentales: 50 g/l fructose, 79.5g/l acide stéarique, 1 L M2B2, 10 g/l Novozym 435, 200 mbars, 200 rpm, 60 °C.

Dans ces conditions, on synthétise 66 g/l de sucroesters dont 70 % sont constitués de monoesters. Pour cela, 160 mM d'acide stéarique ont été convertis avec une vitesse de réaction à 30 mn de 3.5 mM d'acide stéarique consommé/g enzyme.h. La concentration en fructose résiduel est au-dessus de sa solubilité dans le milieu tout au long de la réaction. Par conséquent, il n'y a pas de limitation par le sucre.

La **Figure III-11** compare les résultats obtenus à 50 h avec 25 et 50 g/l de fructose ajouté initialement au milieu de synthèse des stéarates de fructose à 280 mM d'acide stéarique.

Ces résultats montrent que la concentration initiale en fructose a un léger effet sur la vitesse de consommation de l'acide gras qui, à 30 minutes, passe de 3 à 3.5 mM AG consommé/g enzyme.h à des concentrations initiales en fructose de 25 et 50 g/l respectivement. Ce résultat peut être expliqué de trois manières (i) la vitesse de dissolution étant proportionnelle à la concentration en sucre solide, l'augmentation de la concentration en fructose solide augmenterait la surface d'échange et aurait ainsi une influence sur le transfert du fructose soluble vers le site actif de l'enzyme; (ii) étant hygroscope, le fructose présent sous forme solide dans le milieu pourrait fixer les molécules d'eau, diminuant ainsi l'activité de l'eau du milieu réactionnel ce qui s'accompagnerait d'une augmentation de la vitesse de la réaction; (iii) la formation des sucroesters modifie la composition du milieu et aurait, par conséquent, un effet sur la solubilité du fructose et ainsi la vitesse de la réaction.

La sélectivité vis-à-vis des monoesters est légèrement affectée par la variation de la concentration initiale en fructose. En effet, la réaction est moins sélective lorsqu'on travaille avec 50 g/l de fructose. Cette diminution de sélectivité pourrait s'expliquer simplement par la loi d'action de masse ou par la légère augmentation de l'hydrophobicité du milieu (log P = 0.98 à 140 mM de fructose contre 1.06 à 280 mM).

Au bout de 50 heures de réaction, le rendement de conversion de l'acide gras augmente de 22 % lorsqu'on passe de 25 à 50 g/l de fructose ajouté initialement. Quant aux rendements de conversion du fructose, celui obtenu à 25 g/l est environ 2 fois plus élevé que celui à 50 g/l. A cette concentration, la réaction est prolongée et on n'est pas en limitation de fructose d'où l'obtention de concentrations plus élevées en esters de fructose.

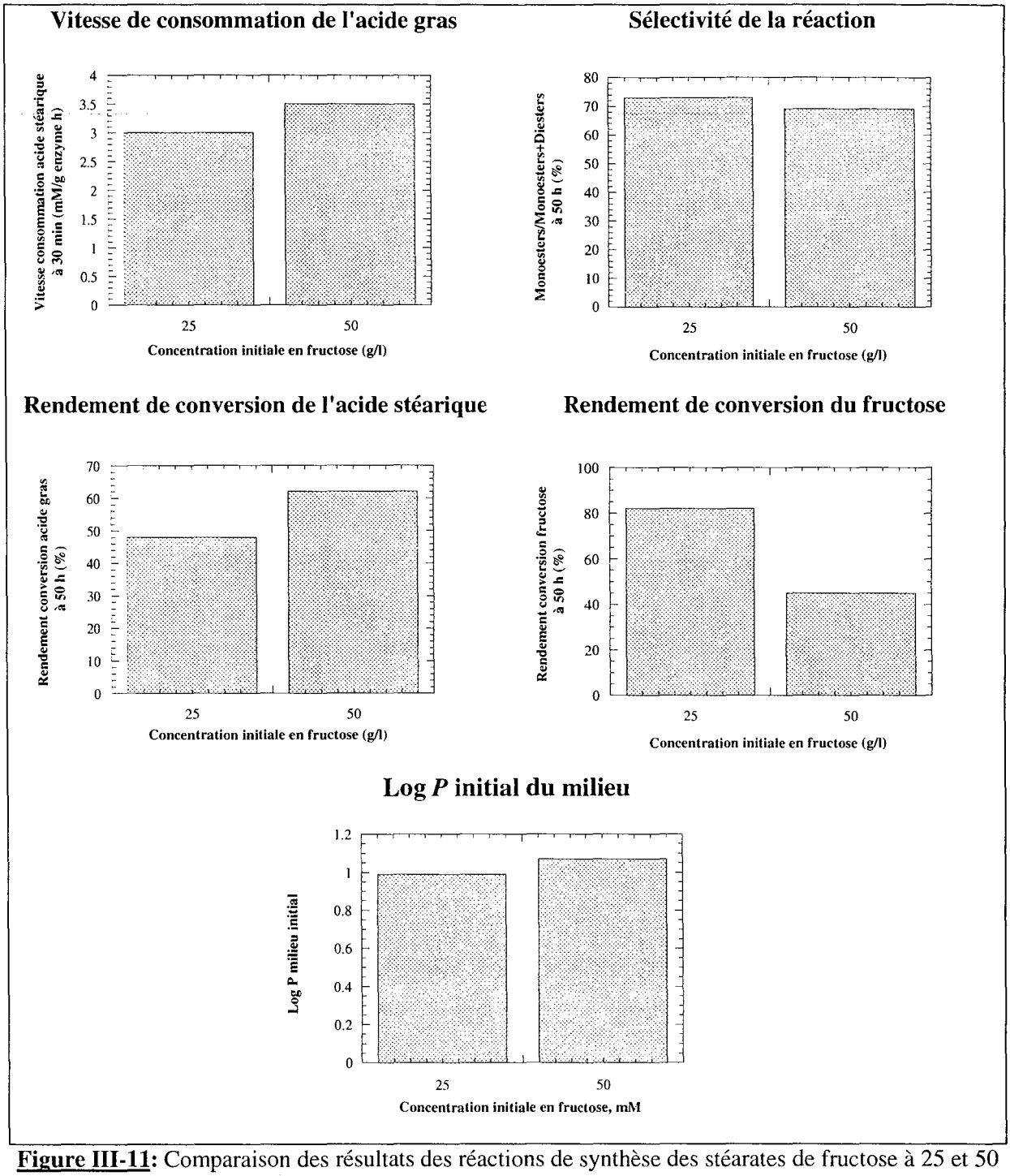


Figure III-11: Comparaison des résultats des réactions de synthèse des stéarates de fructose à 25 et 50 g/l de fructose ajouté initialement. Conditions expérimentales: 280 mM acide stéarique, 1 L M2B2, 10 g/l Novozym, 200 mbars, 200 rpm, 60 °C.

2.6.2. Influence de la solubilisation du fructose

L'étude de la réaction de synthèse à 25 et 50 g/l de fructose ajouté initialement a montré que la vitesse de réaction est légèrement plus élevée lorsqu'on travaille avec une concentration initiale élevée en fructose. Ce résultat a été expliqué, en partie, par un effet du fructose solide sur l'activité enzymatique.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué la concentration du fructose soluble au cours de la réaction. Pour cela, il faut vérifier si cette concentration est constante ou variable en fonction des expériences et également si elle est constante ou variable au cours d'une expérience donnée. Par conséquent, l'objectif est de vérifier si la solubilisation du fructose est cinétiquement limitante et si on peut estimer la concentration du fructose soluble dans le milieu.

Le profil de l'évolution du fructose soluble au cours du temps, auquel on devrait s'attendre lorsque l'étape de dissolution du fructose n'est pas limitante est représenté sur la **Figure III-12**.

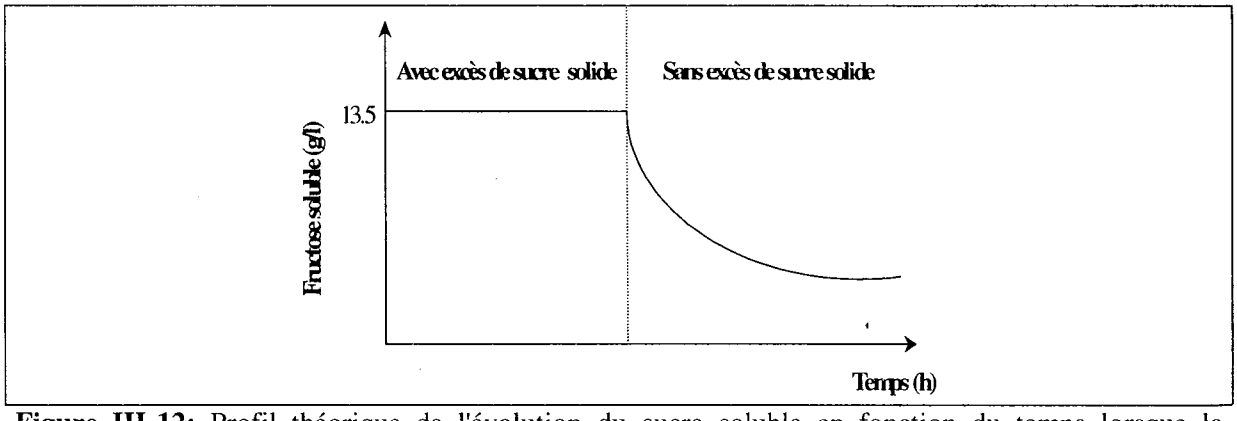


Figure III-12: Profil théorique de l'évolution du sucre soluble en fonction du temps lorsque la dissolution du fructose n'est pas cinétiquement limitante.

Cependant, si la dissolution du fructose est cinétiquement limitante la concentration du fructose soluble devient inférieure à sa solubilité dans le M2B2 à 60 °C même si on a un excès de sucre solide dans le milieu (**Figure III-13**). Dans ce cas, la concentration en fructose soluble dépend de la vitesse de réaction et du fructose solide dans le milieu.

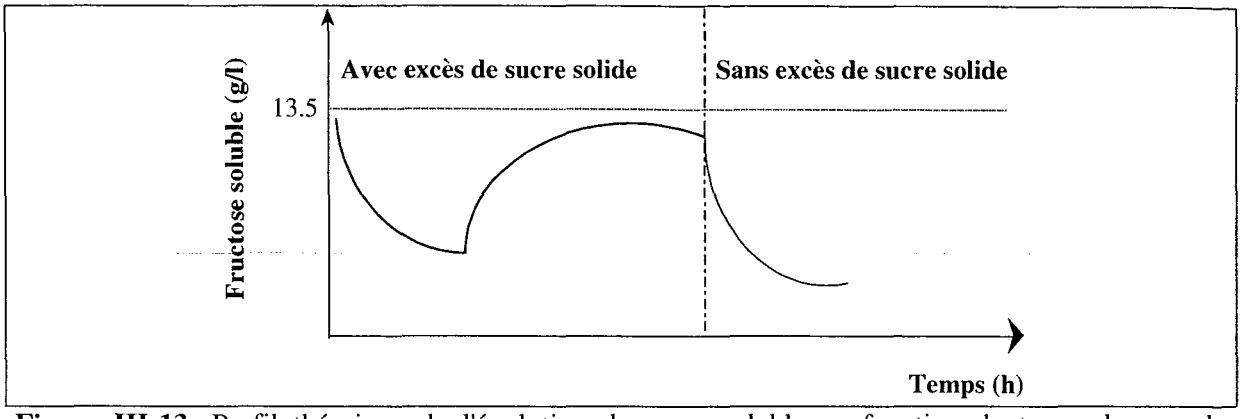


Figure III-13: Profil théorique de l'évolution du sucre soluble en fonction du temps lorsque la dissolution du fructose est cinétiquement limitante.

2.6.2.1. Processus de dissolution

En solution, le fructose ajouté au milieu est composé de sucre solide S_{solide} (g/l) et de sucre soluble S (g/l). Si l'étape de dissolution est non limitante, le sucre soluble est égal à la solubilité S* (g/l) du fructose dans le M2B2 à la température de synthèse. Par contre, la concentration du fructose soluble sera inférieure à cette solubilité si l'étape de dissolution du fructose dans le M2B2 est cinétiquement limitante. La **Figure III-14** représente de manière schématique les étapes limitantes liées à la dissolution du fructose en présence de lipase.

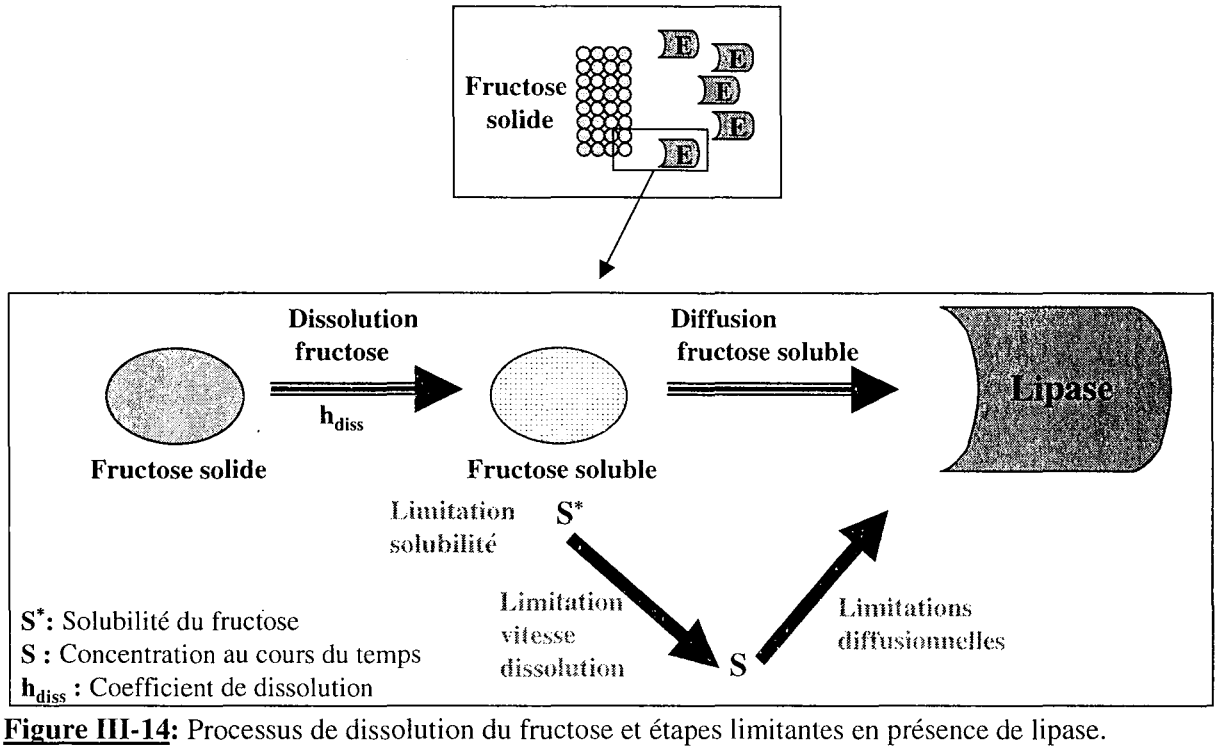


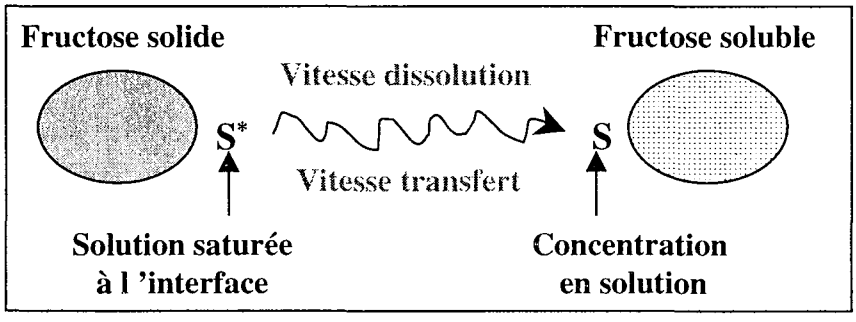
Figure III-14: Processus de dissolution du fructose et étapes limitantes en présence de lipase.

2.6.2.2. Cinétique de dissolution du fructose

Dans un premier temps, on se propose de déterminer la constante de dissolution du fructose dans le M2B2 seul à 60 °C et 200 rpm. Ensuite, cette constante sera utilisée pour l'évaluation de la concentration du fructose soluble au cours de la réaction de synthèse.

- Modèle cinétique de la dissolution

La vitesse de dissolution du fructose est limitée par la vitesse de transfert du sucre vers la solution à partir de la surface des particules solides comme le montre le schéma ci-dessous:



Ainsi, la vitesse de dissolution du fructose en g/h s'écrit:

$$r'' = A.h_{diss}.(S^* - S)$$

Où

h_{diss}: Constante de dissolution du fructose (l/m².h)

A: Surface d'échange du sucre solide (m²)

S^*: Solubilité du fructose dans le M2B2 à 60 °C (g/l)

S: Fructose soluble variable au cours du temps (g/l)

Ne connaissant pas la surface des cristaux de fructose dans le milieu et sachant que cette surface est variable au cours du temps, la vitesse de dissolution du fructose sera exprimée par rapport au sucre solide en g/l.h:

$$\boxed{r''' = S_{solide}.\bar{h}_{diss}.(S^* - S)}$$

Où

$\bar{h}_{diss}$: Coefficient de dissolution du fructose (l/g.h). Il faut noter que ce coefficient dépend de la surface des particules de fructose.

S_{Solide}: Fructose solide variable au cours du temps (g/l).

- Détermination expérimentale de la solubilité du fructose à 60 °C

L'expérience consiste à mettre 25 g/l de fructose dans le M2B2 à 60 °C avec agitation (200 rpm) et de suivre l'évolution de la concentration du fructose au cours du temps.

La **Figure III-15** montre l'évolution de la dissolution du fructose dans le M2B2 à 60 °C. On remarque que la fraction soluble dans le milieu augmente sur les 4 premières heures puis commence à se ralentir au-delà pour atteindre l'équilibre au bout de 20 heures environ. Ceci correspond à une solubilité de 13.5 g/l.

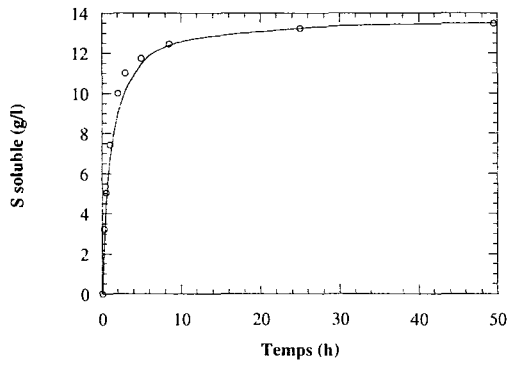


Figure III-15: Evolution de la dissolution du fructose dans le méthyl-2 butanol-2 à 60 °C et 200 rpm.

- Evaluation de la constante de dissolution

Le bilan de matière sur le sucre soluble permet d'écrire:

$$S_{solide} \cdot \bar{h}_{diss} \cdot (S^* - S) = \frac{dS}{dt}$$

$$\boxed{\bar{h}_{diss} \cdot (S^* - S) = \frac{1}{S_{solide}} \frac{dS}{dt}}$$

La **Figure III-16** représente l'évolution de la vitesse de dissolution du fructose (g/l.h) dans le M2B2 en fonction du temps.

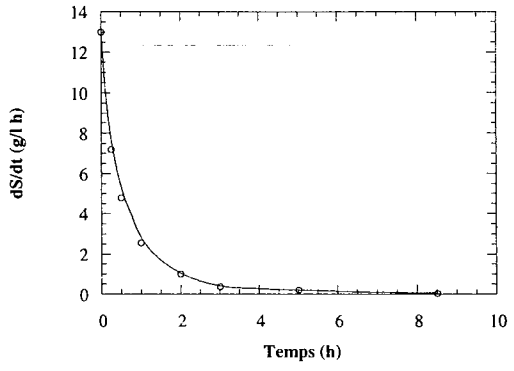


Figure III-16: Evolution de la vitesse de dissolution du fructose en fonction du temps.

Le coefficient de dissolution du fructose peut être déterminé en traçant la courbe (1/Ssolide)dS/dt en fonction du sucre soluble S (**Figure III-17**).

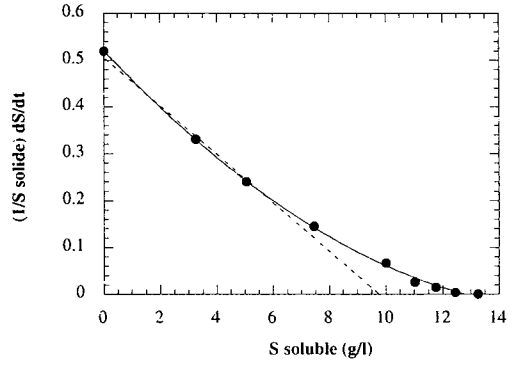


Figure III-17: Evolution de la vitesse de dissolution du fructose en fonction du fructose soluble.

En première approximation, on peut déterminer le coefficient de dissolution à l'aide de la partie linéaire de la courbe (1/Ssolide)dS/dt en fonction du sucre soluble S.

Ainsi, la constante de dissolution du fructose obtenue est de l'ordre de 0.05 l/g.h.

2.6.2.3. Evaluation de la concentration du fructose soluble au cours de la réaction

La variation en fonction du temps de la composition du milieu en fructose soluble dS/dt (g/l.h) peut être déterminée à partir du bilan massique sur le fructose soluble.

Ainsi, en présence de sucre solide le bilan permet d'écrire:

$$S_{solide} \cdot r_{diss} - r_E \cdot E = \frac{dS}{dt}$$

Où

r_{diss} est la vitesse de dissolution du fructose en g/g fructose solide.h.

r_E est la vitesse de réaction en g/g enzyme.h.

S_{solide} est la concentration en fructose solide en g/l.

E est la concentration d'enzyme en g/l.

En remplaçant r_{diss} par son expression, on obtient:

$$S_{solide} \cdot \bar{h}_{diss} \cdot (S^* - S) - r_s''' = \frac{dS}{dt}$$

Où

r_s''' est la vitesse de consommation du fructose en g/l.h.

$$S^* - S = \frac{1}{S_{solide} \cdot \bar{h}_{diss}} \left(\frac{dS}{dt} + r_s'''\right)$$

Si dS/dt << r_s''' et S* est constante, la concentration en sucre soluble peut être calculée selon l'équation suivante:

$$\boxed{S = S^* - \frac{r_s'''}{S_{solide} \cdot \bar{h}_{diss}}}$$

Pour représenter le sucre soluble en fonction du temps, on se propose d'analyser les expériences réalisées avec 25 et 50 g/l de fructose et 280 mM d'acide stéarique en présence de 10 g/l de Novozym sur les 6 premières heures de la synthèse (**Figure III-18**).

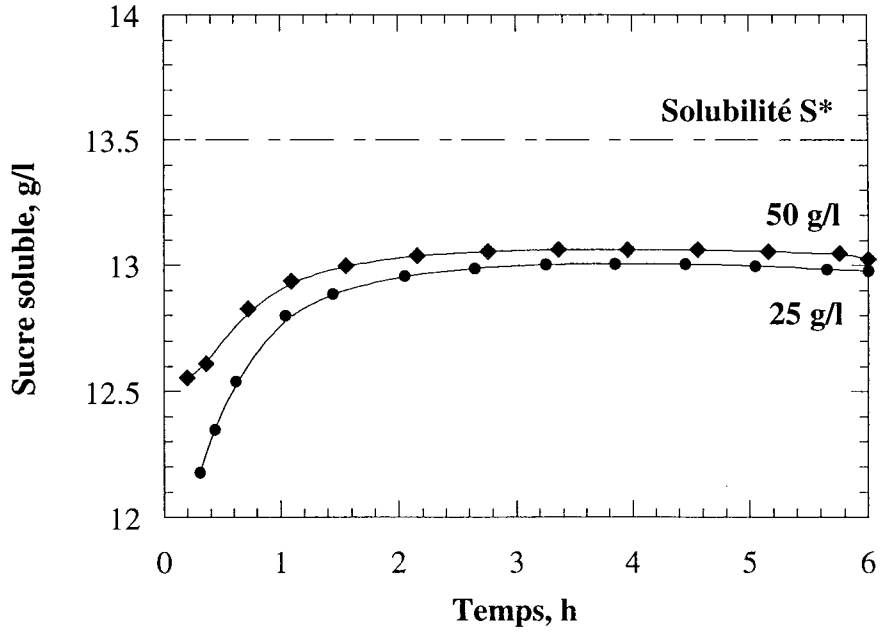


Figure III-18: Evolution du fructose soluble au cours du temps lorsqu'on travaille avec une concentration initiale en fructose solide de 25 et 50 g/l.

La **Figure III-18** montre que l'évolution du fructose soluble varie en fonction du fructose solide dans le milieu. En effet, plus il y a de fructose solide dans le milieu moins est importante la chute de la concentration du fructose soluble, en particulier durant les 30 premières minutes de la réaction. Ce profil permet d'expliquer la différence d'activité enzymatique observée lorsqu'on travaille avec 25 et 50 g/l de fructose. Le profil obtenu montre que la dissolution du fructose est légèrement limitante ($S < S^*$) avec $S_{soluble}$ à 50 g/l > $S_{soluble}$ à 25 g/l.

2.7. Influence du fructose ajouté en présence de tamis moléculaire

Afin d'augmenter les vitesses de réaction et la concentration finale en sucroesters ainsi que d'améliorer les rendements de conversion de l'acide gras, on s'est proposé d'étudier la synthèse des sucroesters par estérification directe avec des ajouts successifs de fructose et en présence

de tamis moléculaire. L'ajout du fructose en plusieurs fois devrait permettre la reprise de la synthèse des sucroesters en évitant d'être en limitation de sucre. Ce protocole a été préféré à l'ajout en une seule étape d'une quantité importante de sucre solide qui peut gêner le transfert et provoquer une abrasion du support de l'enzyme. Pour cela 75 g/l de fructose ont été ajoutés au milieu de synthèse en 3 fois. L'étude a été réalisée sur 3 acides gras et consiste à démarrer la réaction avec 25 g/l (140 mM) de fructose, 420 mM d'acide gras, 20 g/l Novozym, 1 L de M2B2, 200 g/l de tamis moléculaire 4 Å. Par la suite, deux ajouts de fructose sont réalisés: 25 g/l à 7 heures et 25 g/ à 25 heures. L'évolution des critères de performance de la synthèse au cours du temps est représentée sur les **Figures III-19a** à **III-19c**. Les acides gras étudiés étant les acides caprylique, laurique et myristique.

On constate qu'à chaque ajout du fructose au cours de la réaction, l'équilibre est déplacé en faveur de la synthèse des sucroesters. En effet, les ajouts permettent la reprise de la synthèse des esters de sucre et d'acide gras. Au bout de 50 heures de réaction on atteint 120, 130 et 132 g/l de sucroesters dans le cas des acides caprylique, laurique et myristique successivement.

L'ajout du fructose en plusieurs fois favorise la synthèse des monoesters. A l'équilibre, les sucroesters synthétisés sont composés de 60, 52 et 53 % de monoesters dans le cas des acides caprylique, laurique et myristique successivement.

Dans nos conditions opératoires, on consomme plus de 400 mM d'acide gras quel que soit le donneur d'acyle utilisé. Cette consommation correspond à un rendement de conversion de plus de 95 %. La consommation de l'acide gras se fait à des vitesses (à 1 h) de l'ordre de 3.5 à 4.5 mM AG/g enzyme.h en fonction de l'acide gras utilisé.

Enfin, l'ajout du fructose en plusieurs fois permet d'éviter de se trouver en limitation de sucre au cours de la réaction. En effet, la synthèse est relancée après chaque ajout. Cependant, on remarque que l'ajout après 25 heures n'améliore pas les performances autant que le 1er ajout réalisé au bout de 7 heures de réaction. Ce résultat peut s'expliquer par la conversion presque totale de l'acide gras au bout de 30 heures de réaction.

SYNTHESE DES CAPRYLATES DE FRUCTOSE

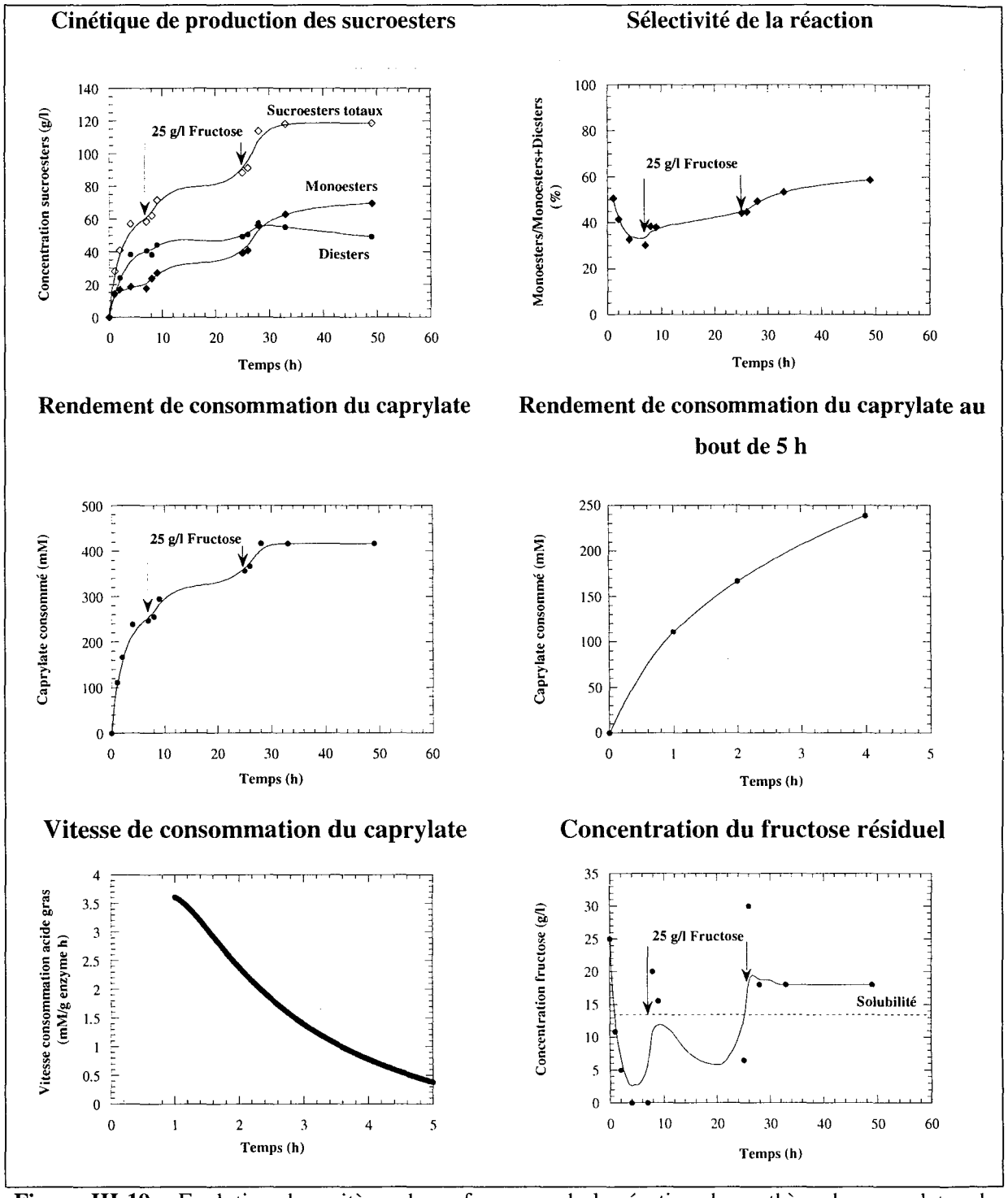


Figure III-19a: Evolution des critères de performance de la réaction de synthèse des caprylates de fructose par estérification directe avec ajout du fructose en plusieurs fois. Conditions expérimentales: 25 g/l Fructose, 420 mM d'acide caprylique, 20 g/l Novozym, 200 g/l tamis moléculaire, 2 ajouts de 25 g/l de fructose à 7 et 25 heures, 200 rpm, 200 mbars, 60 °C.

SYNTHESE DES LAURATES DE FRUCTOSE

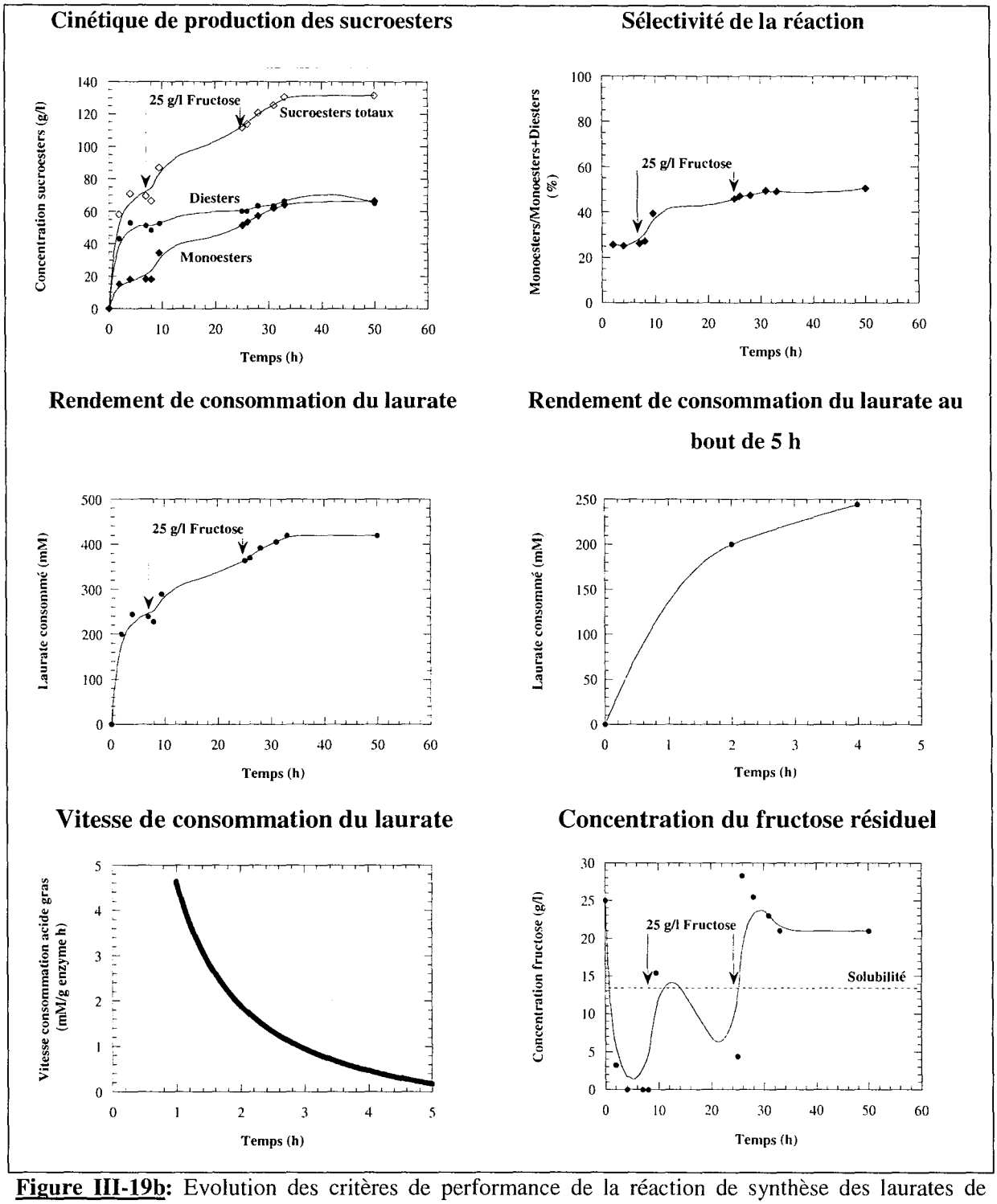


Figure III-19b: Evolution des critères de performance de la réaction de synthèse des laurates de fructose par estérification directe avec ajout du fructose en plusieurs fois. Conditions expérimentales: 25 g/l Fructose, 420 mM d'acide laurique, 20 g/l Novozym, 200 g/l tamis moléculaire, 2 ajouts de 25 g/l de fructose à 7 et 25 heures, 200 rpm, 200 mbars, 60 °C.

SYNTHESE DES MYRISTATES DE FRUCTOSE

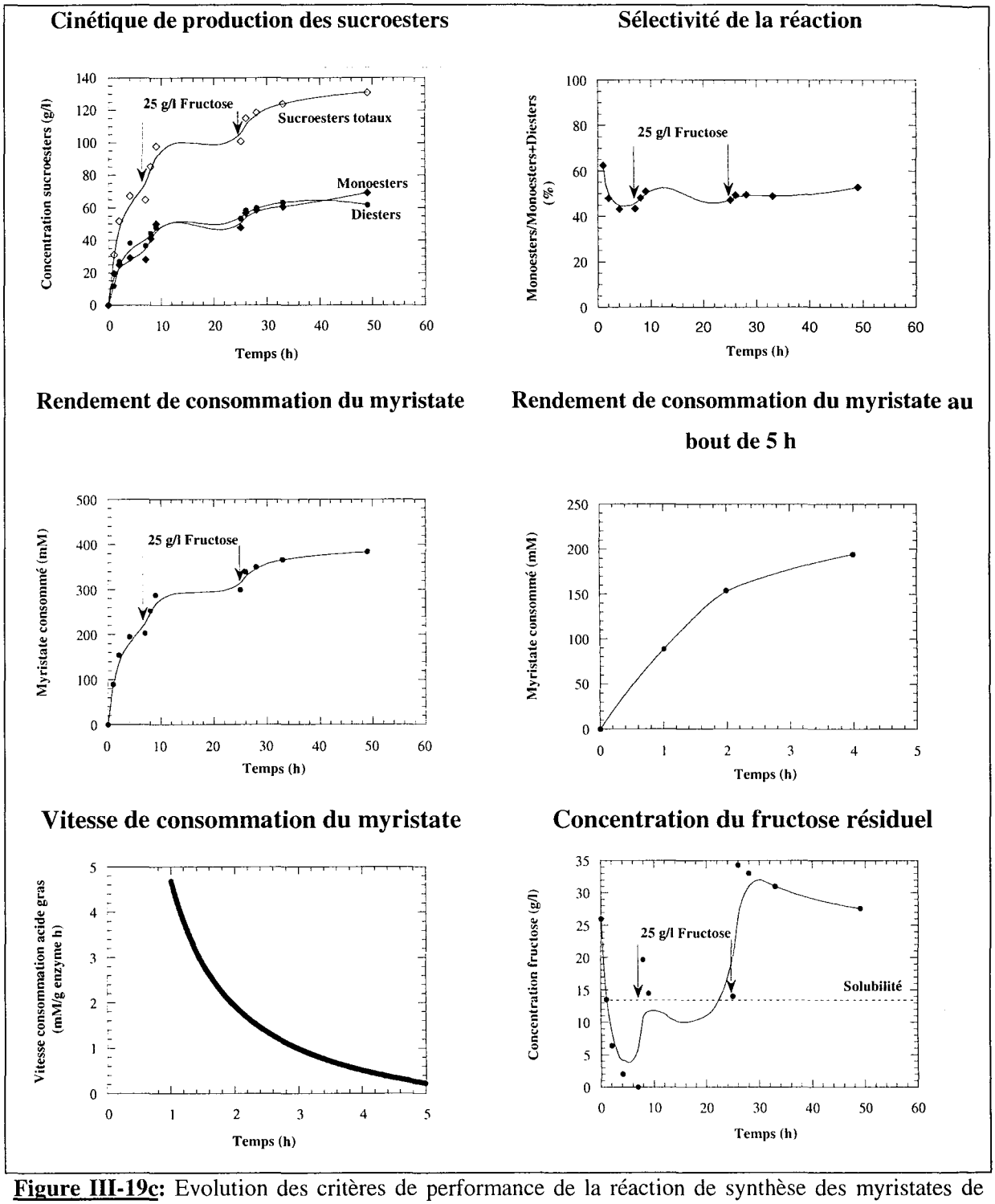


Figure III-19c: Evolution des critères de performance de la réaction de synthèse des myristates de fructose par estérification directe avec ajout du fructose en plusieurs fois. Conditions expérimentales: 25 g/l Fructose, 420 mM d'acide myristique, 20 g/l Novozym, 200 g/l tamis moléculaire, 2 ajouts de 25 g/l de fructose à 7 et 25 heures, 200 rpm, 200 mbars, 60 °C.

La **Figure III-20** permet de comparer les résultats obtenus lors de la synthèse enzymatique des sucroesters dans les conditions standards sans tamis moléculaire (25 g/l fructose et 420 mM d'acide gras, 1 L M2B2, 60 °C et 200 rpm) et lors de la synthèse en présence de tamis moléculaire et avec ajout du fructose en plusieurs fois.

Influence sur la concentration finale en sucroesters

On peut constater qu'au bout de 50 heures de réaction, on a augmenté la concentration en sucroesters d'environ 30 à 120 g/l, de 44 à 130 g/l et de 50 à 132 g/l dans le cas de l'acide caprylique (C8), l'acide laurique (C12) et l'acide myristique (C14) respectivement. Ce résultat représente une augmentation d'environ 60 à 80 % de la production des sucroesters par rapport aux conditions standards en absence de tamis moléculaire et sans ajout de fructose.

Influence sur la proportion en monoesters

L'ajout du fructose en plusieurs fois (à T_0, au bout de 7 et 25 heures) améliorent légèrement la sélectivité de la réaction vis-à-vis des monoesters. Cependant, la réaction est moins sélective que dans le cas de la synthèse dans les conditions standards où l'on obtient 10 à 20 % de monoesters de plus. Ce résultat peut s'expliquer par la présence de tamis moléculaire. En effet, plus le milieu est hydrophobe plus on favorise la formation de molécules hydrophobes.

Influence sur le rendement de conversion de l'acide gras

Une amélioration nette des rendements de conversion de l'acide gras a été observée dans le cas des réactions de synthèse avec des ajouts de fructose et en présence de tamis moléculaire. En effet, les rendements sont environ 2.5 à 3.5 fois plus élevés que lorsqu'on travaille dans les conditions standards.

Influence sur la vitesse de consommation de l'acide gras

Les réactions de synthèse des sucroesters avec l'ajout du fructose en plusieurs fois et en présence de tamis moléculaire présentent des vitesses de consommation de l'acide gras, à 1 heure, 2 fois plus élevées que dans les conditions standards.

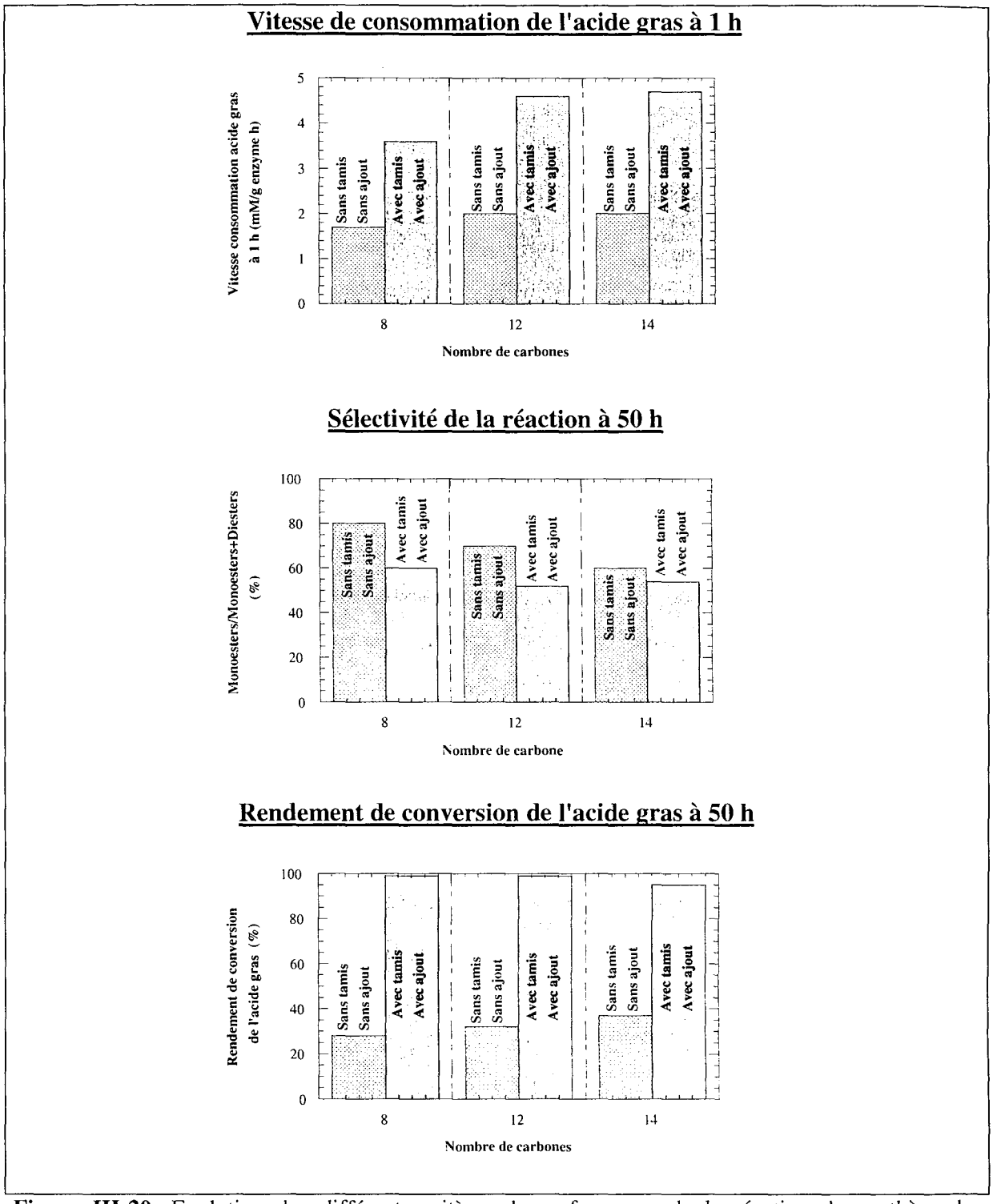


Figure III-20: Evolution des différents critères de performance de la réaction de synthèse des sucroesters avec et sans ajouts de fructose, en présence et en absence de tamis moléculaire en fonction du nombre de carbone.

3- Conclusion du chapitre III

L'étude reportée dans ce chapitre montre que Novozym 435 catalyse la synthèse d'esters de fructose et d'acides gras saturés dans une large gamme de longueur de chaîne carbonée et de concentration. Dans ce cas, deux réactions se déroulent simultanément avec formation d'eau. En effet, la première aboutit à des monoesters qui permettent à leur tour la synthèse de diesters lors de la deuxième réaction. Ces deux réactions sont présentées ci-dessous:

$$\text{Fructose + Acide gras} \underset{}{\overset{K_{Mono}}{\rightleftharpoons}} \text{Monoester + Eau}$$

$$\text{Monoester + Acide gras} \overset{K_{Di}}{\rightleftharpoons} \text{Diester + Eau}$$

Où K_{Mono} et K_{Di} sont les constantes d'équilibre relatives aux réactions de synthèse des monoesters et des diesters respectivement.

On peut ainsi écrire les relations d'équilibre suivantes:

$$K_{Mono} = \frac{[\text{Monoester}].[\text{Eau}]}{[\text{Acide gras}].[\text{Fructose}]}$$

$$K_{Di} = \frac{[\text{Diester}].[\text{Eau}]}{[\text{Monoester}].[\text{Acide gras}]}$$

Les principaux résultats montrent que différents facteurs peuvent avoir une influence sur cette synthèse.

Le **Tableau III-2** présente schématiquement l'analyse cinétique de la réaction de synthèse des sucroesters par estérification directe en résumant l'effet, par ordre décroissant d'importance, des différents facteurs sur l'évolution de la synthèse des esters de sucre et d'acide gras.

Tableau III-2: Résumé de l'effet des différents facteurs sur l'évolution de la synthèse des esters de sucre et d'acide gras.

Paramètre	*Vitesse initiale*	*Conversion acide gras*	*Conversion fructose*	*Pourcentage monoesters*	*Sucroesters totaux*
[Acide gras] ↗	↗	↘	↗	↘	↗
Teneur eau ↘	↗	↗	↗	↘	↗
[Fructose] ↗	↗	↗	↘	↗	→
Nombre carbone ↗	→	→	→	↘	↗
Hydrophobicité ↗	↗	↘	↗	↘	↗

Effet sur la vitesse de consommation de l'acide gras

- ***Effet de la concentration initiale en acide gras***

La vitesse de consommation de l'acide gras varie entre 1 et 6 mM/g enzyme.h lorsque la concentration initiale en acide gras passe de 140 et 700 mM. Il faut cependant noter que lorsqu'on travaille avec l'acide stéarique on a assisté à une chute de la vitesse de consommation de l'acide gras au-delà de 560 mM d'acide gras initial. Ce profil a déjà été obtenu par Erbeldinger *et al.* (1998) et par Virto *et al.* (2000) lors de la synthèse enzymatique catalysée par Novozym 435 d'esters de sucre et d'esters de dihydroxyacétone et d'acides gras respectivement. Le résultat obtenu a été expliqué par une diminution de solubilité des substrats, notamment le sucre, dans le milieu et par l'apparition des limitations diffusionnelles dues à l'augmentation de la viscosité du milieu.

- ***Effet de la teneur en eau***

Lorsqu'on contrôle l'eau du milieu par ajout de tamis moléculaire et sous pression réduite, on améliore l'activité de la lipase et les réactions sont deux fois plus rapides que lorsqu'on travaille sous pression réduite seulement. Des résultats similaires ont été obtenus par Hugon (2000) qui a pu améliorer les vitesses initiales de réaction avec la diminution du niveau d'eau dans le milieu.

♦ ***Effet de la concentration en fructose***

La vitesse de consommation de l'acide gras augmente légèrement lorsqu'on travaille avec deux fois plus de fructose solide. C'est ainsi qu'on est passé de 3 à 3.5 mM d'acide stéarique consommé/g enzyme.h en travaillant avec deux fois plus de fructose initialement. Par conséquent, lorsque la dissolution du fructose constitue une étape limitante, elle entraîne la diminution du fructose soluble dans le milieu ce qui provoque une diminution de la vitesse de réaction. De la même manière, un excès de sucre a été utilisé par Rich *et al.* (1995), Coulon *et al.* (1997) et Arcos *et al.* (1998a) pour améliorer les vitesses de la réaction.

On a également montré que l'augmentation de l'activité peut être due à la différence de la concentration en fructose soluble dans le milieu, en particulier durant les 30 premières minutes de la synthèse. Ce résultat nous a permis de conclure quant à la présence d'une limitation de la réaction due à la dissolution du fructose dans le M2B2 à 60 °C.

♦ ***Effet du nombre de carbones du donneur d'acyle***

Les vitesses de consommation de l'acide gras ne présentent pas de différence significative lorsqu'on augmente la longueur de la chaîne carbonée du donneur d'acyle. En effet, pour une concentration donnée, on ne dépasse pas 1 à 2 mM d'acide gras consommé/g enzyme.h en passant de l'acide caprylique à l'acide stéarique en fonction de la concentration initiale en acide gras. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de la synthèse catalysée par la lipase CAL-B d'esters de glucose et d'acide gras de C4 à C20 (Degn *et al.*, 1999) ainsi que ceux obtenus lors de la synthèse d'esters de tréhalose et d'acides gras de C5 à C18 (Hugon, 2000). Ces résultats sont en contradiction avec la représentation de la structure du site actif et de la spécificité de la lipase de *Candida antarctica* reportées par Pleiss *et al.* (1998). Ces auteurs ont montré une typosélectivité de cette lipase vis-à-vis des donneurs d'acyle en C13. Toutefois, ces auteurs ont précisé que le comportement de la lipase, vis-à-vis des donneurs d'acyle dont la longueur de chaîne dépasse 13 atomes de carbone, ne peut pas être prédit. En effet, dans ce cas le donneur d'acyle peut établir des liaisons avec la surface hydrophobe de la lipase ou se replier au sein même de la poche catalytique modifiant ainsi la spécificité de la lipase.

♦ ***Effet de l'hydrophobicité initiale du milieu***

Dans le même solvant et à volume identique, l'hydrophobicité initiale est apportée essentiellement par la nature et la concentration du donneur d'acyle. Ainsi, en faisant varier la composition initiale du milieu, on modifie légèrement la vitesse de consommation de l'acide gras et plus le milieu est hydrophobe plus l'activité enzymatique est élevée. Cependant, lorsqu'on atteint des hydrophobicités supérieures à 1.3, on assiste à une chute de ces vitesses. Ceci laisse supposer qu'une hydrophobicité initiale de l'ordre de 1.3 est nécessaire pour atteindre une activité enzymatique maximale de la lipase de CAL-B. Cependant, il faut tenir compte des résultats reportés par Humeau (1998) qui, à hydrophobicité initiale égale, a obtenu des résultats différents selon qu'elle travaille avec du palmitate de méthyle seul ou en mélange avec des solvants hydrophobes. Dans ce cas, les meilleurs résultats ont été obtenus lorsqu'on travaille avec l'ester méthylique seul. Otto *et al.* (2000) ont attribué ce phénomène aux propriétés de fixation du site actif et aux interactions entre la lipase et le substrat.

En tout cas, les hypothèses suivantes peuvent être retenues pour expliquer l'effet de l'hydrophobicité du milieu sur l'activité enzymatique. Si le milieu n'est pas assez hydrophobe, la boucle qui recouvre le site actif de la lipase reste en position fermée. Par conséquent, les substrats n'ont pas accès au site catalytique et la réaction n'a pas lieu. Cependant lorsque le milieu est trop hydrophobe (fort excès du donneur d'acyle à longue chaîne carbonée), la boucle est en position ouverte mais les molécules de donneur d'acyle forment une barrière hydrophobe qui empêche le substrat hydrophile d'atteindre le site actif. Cette inhibition par le donneur d'acyle a également été observée dans le cas de la synthèse d'oléates de fructose (Coulon, 1997) et celle d'esters gras de tréhalose (Hugon, 2000).

Effet sur les rendements de conversion des substrats

♦ ***Effet de la concentration initiale en acide gras***

Une augmentation de la concentration initiale de l'acide gras entre 140 et 700 mM provoque une diminution du rendement de conversion de l'acide gras qui passe de 80 à 20 % dans le cas de l'acide stéarique au bout de 50 heures de synthèse. De plus, lorsqu'on travaille avec un excès de fructose par rapport à l'acide gras, on améliore le rendement de conversion de l'acide gras mais la réaction est plus lente.

Une augmentation de la concentration initiale en acide gras permet d'améliorer les rendements de conversion du fructose sauf dans le cas des acides palmitique et stéarique au-delà de 560 mM d'acide gras où l'on assiste à une légère diminution de ces rendements.

Les mêmes résultats ont été obtenus par Mukesh *et al.* (1993) et Mutua et Akoh (1993) lors de la synthèse enzymatique catalysée par la lipase CAL-B de sucroesters. En effet, cette chute de rendement a été expliquée par une inhibition de l'enzyme par le substrat. Cette inhibition pouvant être provoquée soit par une acidification excessive du milieu (Karra-Chaabouni *et al.*, 1996) soit par la formation d'une barrière hydrophobe au niveau du site actif de l'enzyme (Coulon, 1997).

- ***Effet de la teneur en eau***

En présence de tamis moléculaire, on améliore les rendements de conversion de l'acide gras à l'équilibre. Les mêmes résultats ont été reportés par Wehtje *et al.* (1997a) qui ont augmenté le rendement de conversion de 72 à 95 % avant et après contrôle de l'eau par addition de tamis moléculaire. De même, Hugon (2000) a reporté que la conversion des acides gras lors de la synthèse d'esters de tréhalose et d'acide gras augmente d'environ 6 fois lorsque la teneur en eau du milieu passe de 0.1 à 0.01.

De plus, l'ajout du fructose en plusieurs fois avec contrôle de l'eau grâce à la présence de tamis moléculaire a permis d'atteindre une conversion presque totale de l'acide gras quel que soit le donneur d'acyle étudié.

- ***Effet de la concentration initiale en fructose***

Lorsqu'on travaille avec 50 g/l de fructose, on a augmenté le rendement de conversion de l'acide gras par rapport à la réaction réalisée avec 25 g/l de fructose.

- ***Effet du nombre de carbones du donneur d'acyle***

Les rendements de conversion de l'acide gras et du fructose sont comparables quel que soit l'acide gras sauf dans le cas de l'acide stéarique (C18) avec lequel on atteint les meilleurs rendements de conversion des substrats.

Des résultats similaires ont été obtenus par Cao *et al.* (1999) lors de la synthèse enzymatique catalysée par la lipase CAL-B dans l'acétone de monoesters de glucose. En effet, ces auteurs ont obtenu les meilleurs rendements de conversion dans le cas des acides palmitique et stéarique. Ce résultat a été expliqué par une préférence de cette lipase pour les substrats hydrophobes et une précipitation des monoesters à longue chaîne carbonée formés à cause de leur faible solubilité dans l'acétone.

Effet sur la proportion des monoesters

- ***Effet de la concentration initiale en acide gras***

Une augmentation de la concentration initiale en acide gras provoque une diminution de la sélectivité vis-à-vis des monoesters. Des résultats comparables ont été reportés par Ducret *et al.* (1995) et Hugon (2000) qui ont montré que l'équilibre de la réaction de synthèse enzymatique catalysée par Novozym 435 de sucroesters est déplacé vers la synthèse des diesters lorsqu'on travaille avec un excès d'acide gras dans le milieu.

L'obtention exclusive de monoesters nécessite de travailler avec un large excès de fructose par rapport à l'acide gras. En effet, on n'a synthétisé 100 % de monoesters que lorsqu'on a travaillé avec 28 mM d'acide stéarique et 5 fois plus de fructose (140 mM).

- ***Effet de la teneur en eau***

La présence de tamis moléculaire dans le milieu de synthèse permet de diriger la réaction vers la synthèse plutôt que l'hydrolyse des sucroesters. Ainsi, d'après les relations d'équilibre, on peut voir que lorsqu'on contrôle l'eau on évite l'hydrolyse des monoesters qui servent de substrats pour la synthèse des diesters. Par conséquent, l'élimination de l'eau du milieu favoriserait la formation d'esters supérieurs.

De la même manière, lors de la synthèse des 1,3-dilauroyles dihydroxyacétone, Virto *et al.* (2000) ont montré qu'on favorise la formation des diesters lorsqu'on contrôle l'activité de l'eau du milieu. Hugon (2000) a également reporté qu'une élévation de la teneur en eau du milieu a permis de déplacer l'équilibre vers la synthèse des monoesters

- ***Effet du nombre de carbones du donneur d'acyle***

La proportion des monoesters par rapport aux sucroesters totaux diminue légèrement avec l'augmentation du nombre de carbones du donneur d'acyle. Cette variation est d'autant plus importante que la concentration en acide gras est élevée. De plus, une faible prédominance des monoesters est observée avec les acides gras à courte chaîne carbonée. Les mêmes résultats ont été obtenus lors de la synthèse d'esters de tréhalose et d'acide gras (Hugon, 2000).

- ***Effet de l'hydrophobicité initiale du milieu***

Plus le milieu est hydrophobe, moins la réaction est sélective vis-à-vis des monoesters et plus on synthétise de diesters. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Virto *et al.* (2000) qui ont pu favoriser la synthèse des 1-monoacyles dihydroxyacétone dans les milieux polaires et celle des 1,3-diacyles dihydroxyacétone dans les milieux apolaires.

- ***Effet de la concentration initiale en fructose***

Lorsqu'on augmente la concentration initiale en fructose de 25 à 50 g/l, on diminue légèrement la proportion des monoesters synthétisés.

Lors de cette étude, on a observé que la synthèse des sucroesters en présence de tamis moléculaire est favorable à la formation des diesters. Cet effet est compensé par l'ajout progressif de sucre au milieu réactionnel. En effet, au fur et à mesure que l'on ajoute du fructose, la réaction se fait en faveur des monoesters.

<u>Effet sur la concentration finale en sucroesters</u>

- ***Effet de la concentration initiale en acide gras***

Une augmentation de la concentration initiale en acide gras permet d'augmenter la concentration finale en sucroesters totaux. Ce résultat est expliqué par la plupart des auteurs par la loi d'action de masse. Cependant, on a constaté une chute de cette concentration pour

les acides palmitique et stéarique au-delà de 560 mM d'acide gras. Ce résultat pouvant être dû à une inhibition de l'enzyme par l'excès de substrat où une accumulation excessive de l'eau produite dans le milieu provoquant une hydrolyse des sucroesters formés.

- ***Effet de la teneur en eau***

En réduisant la teneur en eau dans le milieu de synthèse grâce à la présence de tamis moléculaire, on favorise la production des sucroesters. En effet, lorsqu'on contrôle l'eau dans le milieu, on obtient 60 à 70 g/l de sucroesters en fonction de l'acide gras utilisé. Ce résultat peut aussi être expliqué par une activation de Novozym 435 dans les milieux hydrophobes.

- ***Effet de la concentration initiale en fructose***

La concentration initiale en fructose n'a pas d'effet significatif sur la concentration finale en sucroesters. Par conséquent, même lorsque la dissolution du fructose est cinétiquement limitante, l'équilibre final n'est pas affecté. Cependant, l'ajout du fructose en plusieurs fois avec contrôle de l'eau dans le milieu a permis d'atteindre des concentrations en sucroesters avoisinant 120 g/l.

- ***Effet du nombre de carbones du donneur d'acyle***

Pour une concentration donnée en acide gras, l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras permet d'augmenter la production des sucroesters. Ainsi, la concentration en sucroesters totaux est passée de 20 à 50 g/l en travaillant à 140 mM d'acide caprylique et d'acide stéarique respectivement. Ce résultat pourrait s'expliquer par une activation de l'enzyme dans les milieux hydrophobes.

CHAPITRE IV

PURIFICATION DES ESTERS DE FRUCTOSE ET D'ACIDE GRAS

CHAPITRE IV : Purification des esters de fructose et d'acide gras..... 187

1- Elimination de l'enzyme..... 188
2- Extraction du fructose 188
2.1. Prédiction des interactions des constituants des milieux d'extraction par UNIFAC 189
2.1.1. Cas du monocaprate de fructose 190
2.1.2. Cas du monomyristate de fructose..... 191
2.1.3. Cas du monostéarate de fructose..... 191
2.2. Etude expérimentale 192
2.2.1. Cas du monocaprate de fructose..... 193
2.2.1.1. Cinétique et calcul du rendement d'extraction du fructose..... 193
2.2.1.2. Bilan massique..... 194
2.2.2. Cas du monomyristate de fructose 194
2.2.2.1. Cinétique et calcul du rendement d'extraction du fructose..... 194
2.2.2.2. Bilan massique..... 195
2.2.3. Cas du monostéarate de fructose 196
2.2.3.1. Cinétique et calcul du rendement d'extraction du fructose..... 196
2.2.3.2. Bilan massique..... 197
2.3. Conclusion - Discussion..... 198
3- Elimination de l'acide gras et des diesters 198
3.1. Prédiction des conditions expérimentales par UNIFAC associé aux plans d'expériences 199
3.1.1. Cas de l'acide caprique..... 202
3.1.2. Cas de l'acide myristique 205
3.1.3. Cas de l'acide stéarique 207
3.1.4. Validation des modèles 210
3.2. Etude expérimentale de l'extraction dans un système contrôlé 211
3.2.1. Extraction de l'acide caprique 211
3.2.1.1. Cinétique..... 211
3.2.1.2. Bilan massique et calcul du taux de récupération du monocaprate de fructose 212

3.2.2. Extraction de l'acide myristique 213
3.2.2.1. Cinétique 213
3.2.2.2. Bilan massique et calcul du taux de récupération du monomyristate de fructose 214
3.2.3. Extraction de l'acide stéarique 215
3.2.3.1. Cinétique 215
3.2.3.2. Bilan massique et calcul du taux de récupération du monostéarate de fructose 216
4- Conclusion du chapitre IV 218

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ FIGURES ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Figure IV-1: Cinétique d'extraction du fructose du milieu de synthèse des monocaprates de fructose à 60 °C et 300 rpm 193
Figure IV-2: Bilan massique sur le fructose et le monocaprate de fructose 194
Figure IV-3: Cinétique d'extraction du fructose du milieu de synthèse du monomyristate de fructose 195
Figure IV-4: Bilan massique sur le fructose et le monomyristate de fructose 196
Figure IV-5: Cinétique d'extraction du fructose du milieu de synthèse du monostéarate de fructose 196
Figure IV-6: Bilan massique sur le fructose et le monostéarate de fructose 197
Figure IV-7: Cinétique de la 1ère extraction de l'acide stéarique sur 24 heures et 30 minutes 201
Figure IV-8: Courbes d'isoréponses pour le taux de récupération et la pureté du monocaprate de fructose en fonction des volumes d'hexane, d'acétonitrile et de M2B2 204
Figure IV-9: Courbes d'isoréponses pour le taux de récupération et la pureté du monomyristate de fructose en fonction des volumes d'hexane, d'acétonitrile et de M2B2 207
Figure IV-10: Courbes d'isoréponses pour le taux de récupération et la pureté du monostéarate de fructose en fonction des volumes d'hexane, d'acétonitrile et de M2B2 209
Figure IV-11: Cinétiques d'extraction de l'acide caprique 212
Figure IV-12: Bilan massique sur l'acide caprique et le monocaprate de fructose 213
Figure IV-13: Cinétiques d'extraction de l'acide myristique 214
Figure IV-14: Bilan massique sur l'acide myristique et le monomyristate de fructose 215
Figure IV-15: Cinétiques d'extraction de l'acide stéarique 215
Figure IV-16: Bilan massique sur l'acide stéarique et le monostéarate de fructose 217
Figure IV-17: Relation entre le nombre de carbone et le rapport volumique phase acétonitrile/phase hexane 218
Figure IV-18: Schéma récapitulatif de la purification des monoesters de fructose 220

Figure IV-19: Chromatogrammes des monoesters de fructose purifiés par extraction liquide-liquide 221

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ TABLEAUX ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Tableau IV-1: Miscibilité M2B2/Eau (50/50, v/v) à 60 °C 190

Tableau IV-2: Partage du fructose et des monocaprates entre M2B2 et eau (50/50, v/v) à 60 °C . 190

Tableau IV-3: Partage du fructose et des monomyristates entre M2B2 et eau (50/50, v/v) à 60 °C 191

Tableau IV-4: Partage du fructose et des monostéarates entre M2B2 et eau (50/50, v/v) à 60 °C 192

Tableau IV-5: Rendement d'extraction et coefficients de partage entre la phase M2B2 et la phase aqueuse 193

Tableau IV-6: Rendement d'extraction et coefficients de partage du fructose entre la phase M2B2 et la phase aqueuse 195

Tableau IV-7: Rendement d'extraction et coefficients de partage du fructose entre la phase M2B2 et la phase aqueuse 197

Tableau IV-8: Domaine de variation des facteurs d'extraction liquide-liquide 200

Tableau IV-9: Analyse de variance des variables : modèles polynomiaux 202

Tableau IV-10: Analyse de variance des variables : modèles polynomiaux 205

Tableau IV-11: Analyse de variance des variables : modèles polynomiaux 208

Tableau IV-12: Validation des modèles développés pour la prédiction du taux de récupération et de la pureté du monomyristate de fructose 210

Tableau IV-13: Conditions d'extraction des monoesters de fructose à 60 °C et 300 rpm en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras 211

Tableau IV-14: Taux de récupération de l'acide caprique dans la phase hexane et coefficients de partage entre la phase ACN et la phase hexane 212

Tableau IV-15: Taux de récupération de l'acide myristique dans la phase hexane et coefficients de partage entre la phase ACN et la phase hexane 214

Tableau IV-16: Taux de récupération de l'acide stéarique dans la phase hexane et coefficients de partage entre la phase ACN et la phase hexane 216

Tableau IV-17: Puretés et taux de récupération des monoesters de fructose obtenus par extraction liquide-liquide dans un réacteur agité à 300 rpm et chauffé à 60 °C 217

CHAPITRE IV

PURIFICATION DES ESTERS DE FRUCTOSE ET D'ACIDE GRAS

Dans la première partie expérimentale de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la synthèse catalysée par Novozym 435 d'esters de fructose et d'acide gras dans le méthyl-2 butanol-2. Ainsi, on a pu atteindre des rendements de conversion élevés en substrats lorsqu'on minimise l'eau dans le milieu et lorsque la réaction est réalisée avec ajout de fructose. Cependant, l'obtention de rendements de conversion élevés n'est pas toujours possible ou nécessite des temps de réaction très longs, ce qui réduit la productivité. De même, ces rendements sont variables selon la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras et selon la composition initiale du milieu. Par conséquent, pour obtenir des produits purs, il est nécessaire de procéder à une ou plusieurs étapes de séparation. Cette purification est surtout nécessaire pour caractériser les propriétés tensioactives de ces molécules et montrer leur intérêt par rapport aux tensioactifs utilisés actuellement.

Selon les applications visées (cosmétiques, alimentaires, pharmaceutiques...), le degré de pureté des sucroesters peut être très variable. C'est ainsi que dans le cas des applications alimentaires des esters de saccharose et d'acide gras (E473) en tant qu'émulsifiants et stabilisants, la législation européenne (95/2/EC) exige une pureté des esters de saccharose supérieure à 80 % avec moins de 3 % d'acide gras libre (exprimés en acide oléique) et pas plus de 5 % de sucre. En revanche, dans le cas de préparation de détergents, on peut tolérer des puretés plus faibles. Ces exigences imposent le développement, parallèlement à la synthèse, de procédés de séparation et de purification de ces molécules. Cette étape a une grande importance du point de vue coût de réalisation. D'où, l'intérêt de chercher des procédés n'apportant pas un surcoût trop important à l'étape de synthèse. De plus, cette étape doit tenir compte du recyclage des solvants d'extraction et doit être douce pour éviter la dégradation des produits à extraire.

Dans notre cas, les milieux réactionnels obtenus à la fin de la réaction de synthèse présentent une composition complexe avec des produits possédants des hydrophobicités proches rendant

leur séparation assez délicate. Par conséquent, il est nécessaire de développer un protocole de séparation adapté à chaque produit présent dans le milieu de synthèse.

1- Elimination de l'enzyme

L'emploi d'enzyme immobilisée a facilité la récupération du Novozym 435 pour d'éventuelles réutilisations dans d'autres synthèses. En effet, ce biocatalyseur se présente sous forme de granules ayant une distribution normale de taille variant entre 0.3 et 0.9 mm de diamètre et pouvant être séparé du milieu de synthèse par simple filtration sur verre fritté (Ducret et *al.*, 1995). Le biocatalyseur est ensuite lavé avec du méthyl-2 butanol-2 chaud pour éliminer les traces de substrats et de produits et stocké à 4 °C.

2- Extraction du fructose

Comme il a été mentionné précédemment plusieurs procédés d'élimination du sucre à partir du milieu réactionnel ont été proposés dans la littérature. Toutefois, la plupart des procédés proposés s'accompagne d'importantes pertes en sucroesters.

Parmi l'ensemble de ces méthodes, l'extraction liquide-liquide nous paraît la plus facile à mettre en œuvre; mais il reste à trouver le mélange de solvants qui permet d'atteindre des taux de récupération et des degrés de pureté élevés. L'objectif de cette partie est de trouver le mélange de solvants permettant de remplir ces exigences.

Pour réaliser cet objectif, on s'est proposé tout d'abord de réaliser, à petite échelle, des extractions liquide-liquide du fructose en s'inspirant du protocole proposé par Nobile *et al.* (1966). Dans ce cas, le solvant de synthèse a été évaporé à 60 °C et le résidu solubilisé dans de l'acétate d'éthyle. A ce mélange, on a rajouté de l'eau (50/50, v/v) et procédé à l'extraction à température ambiante dans une ampoule à décanter. Ce protocole nous a permis d'obtenir des milieux à moins de 2 % de fructose. Cependant, lors de cette étape d'extraction on s'est trouvé confrontés à divers problèmes:

- la difficulté à solubiliser le résidu dans l'acétate d'éthyle;
- la formation d'une émulsion stable;

- la formation d'une phase intermédiaire contenant les monoesters ayant précipité;
- plusieurs opérations sont nécessaires: (i) évaporation du solvant de synthèse, (ii) étape de solubilisation du résidu nécessitant parfois un chauffage du milieu, (iii) évaporation de l'acétate d'éthyle avant de passer à l'étape d'extraction de l'acide gras.

Compte tenu de ces difficultés, il s'avère donc nécessaire de chercher un autre système plus adapté et de travailler à des températures plus élevées pour éviter la précipitation des constituants d'intérêt du milieu.

Le système retenu consiste à réaliser cette étape de purification en milieu aqueux sans élimination du solvant de synthèse qui servira comme phase organique (50/50, v/v). L'extraction a été faite à 60 °C, température à laquelle on a réalisé la synthèse. Le réacteur d'extraction est sous agitation (300 rpm) afin d'augmenter le coefficient de transfert du sucre vers la phase aqueuse.

L'eau et le M2B2 étant partiellement solubles l'un dans l'autre, cette solubilité risque d'évoluer en présence des autres espèces et d'affecter les performances de la séparation. Pour étudier le comportement et les performances de ce système seul ou en présence d'autres molécules, nous avons utilisé le logiciel prédictif UNIFAC. La simulation tient compte de la température qui affecte non seulement la solubilité des composés mais aussi l'équilibre des phases.

2.1. Prédiction des interactions des constituants des milieux d'extraction par UNIFAC

La miscibilité mutuelle M2B2/Eau a été prédite à 60 °C tout d'abord en absence de tout autre composé (**Tableau IV-1**) et ensuite en conditions réelles (concentration réelle en monoesters et en fructose) pour trois sucroesters de différentes longueurs de chaîne carbonée: C10, C14 et C18.

Tableau IV-1: Miscibilité M2B2/Eau (50/50, v/v) à 60 °C

	Nombre de moles	Phase M2B2		Phase aqueuse	
		ml	%	ml	%
M2B2	4.623	477.8	**95.6**	22.2	**4.4**
Eau	27.78	61.3	**12.3**	438.7	**87.7**

A 60 °C et dans des proportions équivalentes, l'eau et le méthyl-2 butanol-2 présentent une miscibilité mutuelle partielle donnant ainsi un système biphasique. En effet, 12.3 % d'eau passent dans la phase M2B2 et 4.4 % de M2B2 passent dans la phase aqueuse.

2.1.1. Cas du monocaprate de fructose

Le **Tableau IV-2** montre que:

- la miscibilité des deux solvants n'est pas affectée de manière significative en présence de fructose et de monocaprate. En effet, on observe une augmentation de seulement 0.4 % d'eau dans la phase M2B2 et de 0.2 % de M2B2 dans la phase aqueuse par rapport aux solvants seuls.
- Plus de 96 % de fructose passent dans la phase aqueuse
- De l'ordre de 1 % de monocaprates seulement passent dans la phase aqueuse.

Tableau IV-2: Partage du fructose et des monocaprates entre M2B2 et eau (50/50, v/v) à 60°C.

	Composition initiale	Composition phase M2B2	Composition phase aqueuse
Fructose	**6.3 g**	0.25 g	**6.05 g**
Monocaprate	**7.7 g**	**7.6 g**	0.1 g
M2B2	500 ml	476.8 ml *(95.4 %)*	23.2 *(4.6 %)*
Eau	500 ml	63.6 ml *(12.7 %)*	436.4 ml *(87.3 %)*

Ce protocole de purification devrait nous permettre d'obtenir des rendements d'extraction du fructose assez élevés avec de faibles pertes en monocaprates dans la phase aqueuse.

2.1.2. Cas du monomyristate de fructose

De la même manière que pour l'acide caprique, le **Tableau IV.3** montre que:

- la miscibilité des deux solvants n'est pas affectée de manière significative en présence de fructose et de monomyristate. En effet, on observe une augmentation de seulement 0.6 % d'eau dans la phase M2B2 et de 0.2 % de M2B2 dans la phase aqueuse par rapport aux solvants seuls.
- 96 % de fructose passent dans la phase aqueuse
- Les monomyristates restent à 100 % dans la phase M2B2.

D'après les résultats de simulation, les monomyristates ne devraient pas passer dans la phase aqueuse avec des rendements d'extraction du fructose assez élevés.

Tableau IV-3: Partage du fructose et des monomyristates entre M2B2 et eau (50/50, v/v) à 60°C.

	Composition initiale	**Composition phase M2B2**	**Composition phase aqueuse**
Fructose	**6.84 g**	0.27 g	**6.57 g**
Monomyristate	**14.8 g**	**14.8 g**	0
M2B2	500 ml	476.9 ml *(95.4 %)*	23.1 *(4.6 %)*
Eau	500 ml	64.5 ml *(12.9 %)*	435.6 ml *(87.1 %)*

2.1.3. Cas du monostéarate de fructose

Le **Tableau IV-4** montre que:

- la miscibilité des deux solvants n'est pas affectée de manière significative en présence de fructose et de monostéarate. En effet, on observe une augmentation de seulement 0.6 % d'eau dans la phase M2B2 et de 0.1 % de M2B2 dans la phase aqueuse par rapport aux solvants seuls.
- 96 % de fructose passent dans la phase aqueuse

- On n'a pas de perte en monostéarates dans la phase aqueuse.

D'après les résultats de simulation, les monostéarates ne devraient pas passer dans la phase aqueuse avec des rendements d'extraction du fructose assez élevés.

Tableau IV-4: Partage du fructose et des monostéarates entre M2B2 et eau (50/50, v/v) à 60°C

	Composition initiale	**Composition phase M2B2**	**Composition phase aqueuse**
Fructose	**3.42 g**	0.12 g	**3.3 g**
Monostéarate	**22.7 g**	**22.7 g**	0
M2B2	500 ml	477.7 ml *(95.5 %)*	22.3 *(4.5 %)*
Eau	500 ml	64.6 ml *(12.9 %)*	435.6 ml *(87.1 %)*

Conclusion

D'après les résultats obtenus grâce au modèle de prédiction UNIFAC, on remarque que:

- la longueur de chaîne de donneur d'acyle n'a pas d'effet sur les performances du système d'extraction;
- on n'a pas ou très peu de pertes en monoesters dans la phase aqueuse;
- on obtient des rendements d'extraction du fructose élevés.

Il apparaît, d'après ces résultats de simulation, que le système eau-M2B2 est adapté pour l'extraction du fructose résiduel en présence de monoesters de fructose quel qu'en soit la longueur de chaîne carbonée.

2.2. Etude expérimentale

Une seule étape d'extraction a été réalisée sur les différents milieux de synthèse. On s'est intéressé au taux de récupération du fructose dans la phase aqueuse ainsi qu'aux coefficients

de partage du fructose dans les deux phases. Les bilans massiques ont également été déterminés sur le fructose et les monoesters de fructose.

2.2.1. Cas du monocaprate de fructose

2.2.1.1. Cinétique et calcul du rendement d'extraction du fructose

La **Figure IV-1** montre que la quasi-totalité du fructose résiduel passe dans la phase aqueuse au bout de 10 minutes. Au-delà, on assiste à un ralentissement de l'extraction. Le temps d'extraction a été fixé à 30 minutes pour les différents milieux étudiées dans ce travail.

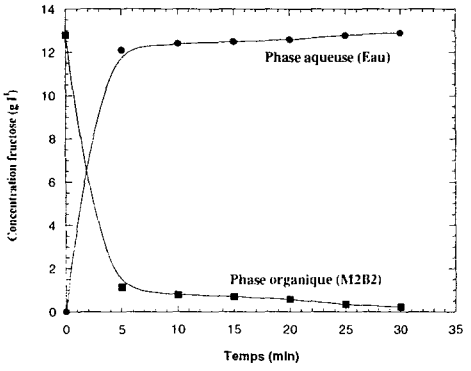


Figure IV-1: Cinétique d'extraction du fructose du milieu de synthèse des monocaprates de fructose à 60 °C et 300 rpm.

Dans le **Tableau IV-5** figurent les coefficients de partage du fructose à 10 minutes ainsi qu'à l'équilibre et le rendement d'extraction du fructose dans la phase aqueuse. On observe que les résultats obtenus expérimentalement sont conformes à la simulation.

Tableau IV-5: Rendement d'extraction et coefficients de partage du fructose entre la phase M2B2 et la phase aqueuse.

Rendement d'extraction (%)	$K_{10\,mn}$	K_{Eq}
97	0.054	0.03

2.2.1.2. Bilan massique

Sur la **Figure IV-2** on présente les bilans massiques effectués aussi bien sur le fructose que sur le monocaprate de fructose. Ces bilans confirment que le système d'extraction utilisé a permis d'extraire la presque totalité du fructose dans la phase aqueuse (97 %) sans perdre pour autant des monoesters dans cette même phase. En effet, 100 % de monocaprates de fructose sont retenus dans la phase M2B2.

Phase lourde Eau			Extraction liquide-liquide Fructose caprate (C10)	Phase légère M2B2		
Mono-ester (g)	Fructose (g)	Volume (ml)		Volume (ml)	Fructose (g)	Mono-ester (g)
0	0	1000	Eau — M2B2	1000	12.8	15.6
				1046	0.39	17.9
0	12.5	954				

Figure IV-2: Bilan massique sur le fructose et le monocaprate de fructose. Conditions expérimentales: M2B2/Eau : 50/50 (v/v), T = 60 °C, 300 rpm.

2.2.2. *Cas du monomyristate de fructose*

2.2.2.1. Cinétique et calcul du rendement d'extraction du fructose

De la même manière que pour le monocaprate de fructose on a réalisé une étude cinétique de l'extraction du fructose à partir du milieu réactionnel contenant les monomyristates de fructose, vers la phase aqueuse. La **Figure IV-3** montre également qu'au bout de 10 minutes, la majorité du fructose passe dans la phase aqueuse. Ensuite, on assiste à une légère évolution jusqu'à 30 minutes d'extraction.

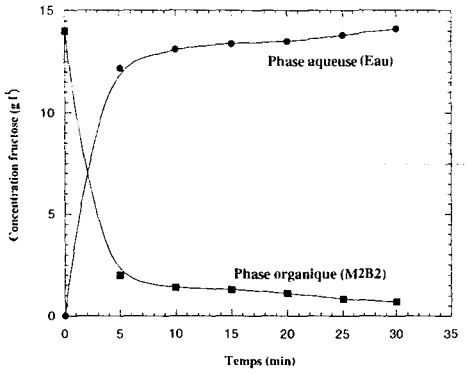


Figure IV-3: Cinétique d'extraction du fructose du milieu de synthèse du monomyristate de fructose.

Les coefficients de partage du fructose à 10 minutes et à l'équilibre ainsi que le rendement d'extraction du fructose dans la phase aqueuse ont été calculés et sont représentés dans le **Tableau IV-6**.

Tableau IV-6: Rendement d'extraction et coefficients de partage du fructose entre la phase M2B2 et la phase aqueuse.

Rendement d'extraction (%)	$K_{10\ mn}$	K_{Eq}
95	0.1	0.05

2.2.2.2. Bilan massique

Les bilans massiques effectués aussi bien sur le fructose que sur le monomyristate de fructose sont représentés sur la **Figure IV-4**. On constate que le système d'extraction utilisé a permis d'extraire 95 % du fructose, présent initialement dans le milieu réactionnel, dans la phase aqueuse sans perte du monoester. En effet, la totalité du monomyristate de fructose est retenue dans la phase M2B2.

Phase lourde Eau			Extraction liquide-liquide Fructose myristate (C14)	Phase légère M2B2		
Mono-ester (g)	Fructose (g)	Volume (ml)		Volume (ml)	Fructose (g)	Mono-ester (g)
0	0	2000	Eau — M2B2	2000	28	60
				2040	1.43	61
0	27.6	1960				

Figure IV-4: Bilan massique sur le fructose et le monomyristate de fructose. Conditions expérimentales: M2B2/Eau : 50/50 (v/v), T = 60 °C, 300 rpm.

2.2.3. Cas du monostéarate de fructose

2.2.3.1. Cinétique et calcul du rendement d'extraction du fructose

Une étude cinétique de l'extraction du fructose à partir du milieu réactionnel, contenant les monostéarates de fructose, vers la phase aqueuse a été réalisée. La **Figure IV-5** montre le même profil que celui obtenu avec les deux autres sucroesters. Ainsi, au bout de 10 minutes, la majorité du fructose passe dans la phase aqueuse. Ensuite, on assiste à un ralentissement de l'extraction jusqu'à 30 minutes.

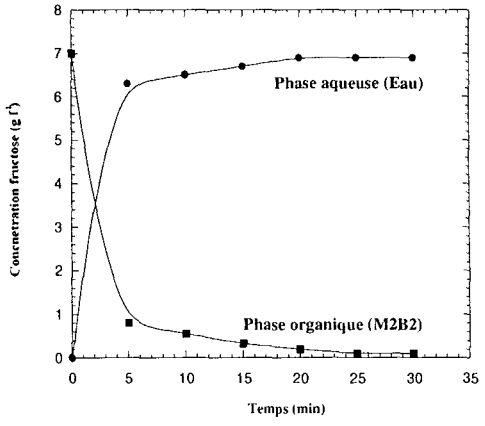


Figure IV-5: Cinétique d'extraction du fructose du milieu de synthèse du monostéarate de fructose.

Les coefficients de partage du fructose à 10 minutes et à l'équilibre ainsi que le rendement d'extraction du fructose dans la phase aqueuse ont été calculés (**Tableau IV-7**).

Tableau IV-7: Rendement d'extraction et coefficients de partage du fructose entre la phase M2B2 et la phase aqueuse.

Rendement d'extraction (%)	$K_{10\ mn}$	K_{Eq}
97	0.075	0.033

2.2.3.2. Bilan massique

Les bilans massiques ont été réalisés aussi bien sur le fructose que sur le monostéarate de fructose et sont représentés sur la **Figure IV-6**. On constate que le système d'extraction utilisé a permis d'extraire 97 % du fructose, présent initialement dans le milieu réactionnel, dans la phase aqueuse sans perte du monoester. En effet, la totalité du monostéarate de fructose est retenue dans la phase M2B2.

Phase lourde Eau			Extraction liquide-liquide Fructose stéarate (C18)	Phase légère M2B2		
Mono-ester (g)	Fructose (g)	Volume (ml)		Volume (ml)	Fructose (g)	Mono-ester (g)
0	0	1000	Eau — M2B2	1000	7	45.3
				1025.5	0.24	46.5
0	6.8	974.5				

Figure IV-6: Bilan massique sur le fructose et le monostéarate de fructose. Conditions expérimentales: M2B2/Eau : 50/50 (v/v), T = 60 °C, 300 rpm.

2.3. Conclusion - Discussion

- Il existe une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et les résultats prédits par le modèle UNIFAC.
- La grande majorité du fructose, composé le plus polaire (log P = -3.03), diffuse dans la phase aqueuse (log P = -1.31). En effet, plus de 95 % du fructose sont séparés des autres constituants quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée du sucroester au bout de 30 minutes d'extraction.
- La totalité des mono- esters (log P > 1.7) reste dans la phase M2B2 (log P = 0.89) quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée du sucroester.

Les résultats reportés dans la littérature lors de la purification des sucroesters par extraction liquide-liquide ont montré, d'une part, que lorsqu'on désire séparer des monosaccharides, on obtient le plus souvent de faibles rendements d'extraction avec des pertes des sucroesters soit dans la phase aqueuse soit par précipitation. En outre, ces extractions mettent en jeu un tierce solvant qu'il faudra éliminer à la fin de l'extraction.

Le système d'extraction que nous avons proposé dans ce travail permet de réaliser la séparation du sucre directement sur le milieu de synthèse et sans apport de solvant supplémentaire si ce n'est la phase aqueuse constituée d'eau. Les rendements élevés d'extraction obtenus ainsi que le faible coût de l'opération permettent de retenir ce système d'extraction pour une éventuelle extrapolation à l'échelle industrielle.

3- Elimination de l'acide gras et des diesters

Après élimination du fructose résiduel, l'obtention des monoesters purs nécessite la séparation des acides gras et des diesters. Ces composés ayant des hydrophobicités proches, leur séparation s'est avérée très délicate. Par conséquent, le système d'extraction à définir devra permettre une extraction sélective des monoesters avec le moins de pertes possibles dans la phase contenant l'acide gras et les esters supérieurs.

Dans le but de réduire le nombre des manipulations nous avons utilisé, comme pour la séparation du fructose, le logiciel UNIFAC pour prédire les conditions opératoires permettant la récupération des monoesters sachant que le nombre d'extractions va en dépendre.

Une fois les conditions opératoires (mélange et proportions des phases) ont été définies, nous avons réalisé l'extraction des trois monoesters retenus dans ce travail.

3.1. Prédiction des conditions expérimentales par UNIFAC associé aux plans d'expériences

En extraction liquide-liquide, le partage d'une espèce entre deux composants non miscibles dépend de son hydrophobicité et des propriétés des phases liquides. L'effet de la phase organique étant plus important que celui de la phase aqueuse lorsqu'on désire extraire des espèces hydrophobes.

L'hydrophobicité de l'espèce à extraire dépend de sa structure et de son interaction avec les molécules de solvants constituant le système d'extraction. De ce fait, le choix d'un système adéquat constitue l'étape la plus importante dans les procédés d'extraction liquide-liquide.

Dans cette étude, le système d'extraction à utiliser doit être constitué de solvants permettant de solubiliser les monoesters de manière sélective. De plus, les solvants utilisés doivent posséder des températures d'ébullition permettant leur élimination par évaporation et surtout être compatibles avec l'utilisation finale des monoesters purifiés.

En se basant, sur les travaux de Chabredier *et al.* (1987) qui ont étudié la purification du ricinoléate de méthyle, nous avons retenu un système constitué d'acétonitrile, d'eau et d'hexane.

Ce système a également été utilisé par Khaled *et al.* (1990) pour la purification des monooléates de fructose.

Afin de vérifier la faisabilité de la purification des monoesters grâce à ce système, nous avons réalisé des extractions à partir d'une préparation à base d'acide stéarique. La purification est réalisée à température ambiante et dans des ampoules à décanter.

Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure IV-7**. Ils montrent que la majorité de l'acide stéarique passe dans la phase hexane au bout de 10 minutes d'extraction avec un coefficient de partage $K_{C18,10mn}$ de 3.66. A 30 minutes ce coefficient est égal à 4.85. A 24 h, il est de l'ordre de 10.

Dans les conditions mentionnées sur la **Figure IV-7**, on a constaté que la totalité des diesters est éliminée dans la phase hexane dés la première extraction. Cependant, l'élimination de l'acide gras n'est pas totale. Ce n'est qu'au bout de 3 extractions de 24 heures, que l'on obtient des monoesters de stéarate à 97 % de pureté mais avec un faible taux de récupération de l'ordre de 56 %. De plus, l'extraction à température ambiante provoque une précipitation des composés à extraire et la formation d'une phase intermédiaire solide à l'origine des pertes en monoesters et des faibles taux de récupération.

Les résultats obtenus sont intéressants mais il est nécessaire de définir, avec un minimum d'extractions, les proportions de chaque solvant sachant que le mélange acétonitrile, M2B2, hexane et eau n'aboutit à un système biphasique que si ces solvants sont apportés dans des proportions bien définies. Par conséquent, celles-ci ont été recherchées grâce au logiciel de prédiction UNIFAC. Les domaines expérimentaux obtenus par simulation et retenus pour la réalisation des plans d'expériences sont donnés dans le **Tableau IV-8**.

Tableau IV-8: Domaine de variation des facteurs d'extraction liquide-liquide

Valeurs codées	**-1**	**0**	**+1**
Hexane (ml)	196	294	392
Acétonitrile (ml)	78	144	209
M2B2 (ml)	86.5	119	151.4

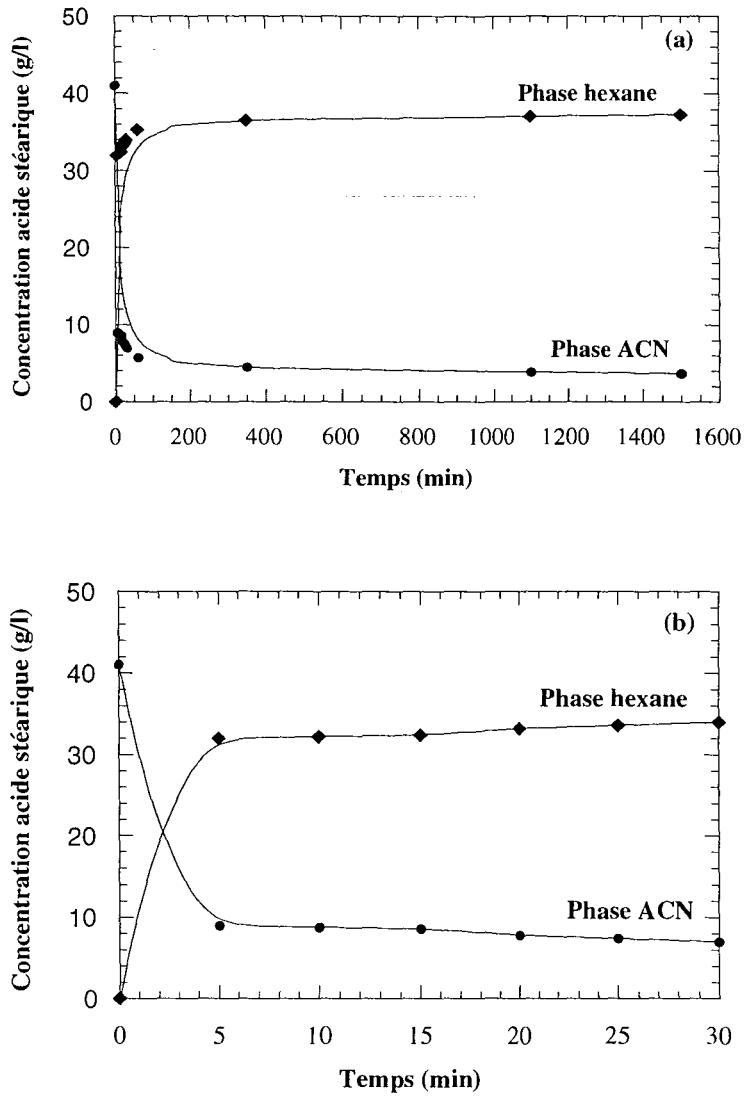


Figure IV-7: Cinétique de la 1ère extraction de l'acide stéarique sur 24 heures (a) et 30 minutes (b). Conditions expérimentales: Phase ACN/Phase hexane = 2/1, Phase M2B2/Phase ACN = 1/2, $T_{ambiante}$.

Le plan d'expérience utilisé est de type plan composite centré en étoile. Le point au centre a été répété 3 fois. Ce plan aboutit à 17 expériences.

La prédiction du taux de récupération dans la phase acétonitrile et de la pureté des monoesters de chaque expérience prédite par les plans d'expériences a été déterminée par UNIFAC. Cette simulation a été réalisée à une température égale à 60 °C. Celle ci ayant été retenue d'une part pour éviter les pertes par précipitation des monoesters et d'autre part pour éviter un surcoût dû au refroidissement du milieu de synthèse qui est déjà à 60 °C à la fin de l'opération d'extraction du fructose.

Lors de la prédiction du partage de l'acide gras et des monoesters entre phases, la composition initiale du milieu M2B2 a été maintenue constante quel que soit l'acide gras à extraire afin d'éliminer l'effet dû à la charge du milieu sur les réponses. C'est ainsi qu'on a considéré que le M2B2 utilisé est constitué de 70g/l d'acide gras et 33 g/l de monoesters.

3.1.1. Cas de l'acide caprique

Les résultats obtenus après prédiction des réponses montrent que quels que soient les volumes de solvants utilisés, on obtient de très bons taux de récupération des monoesters variant entre 90 et 100 %. Cependant, la meilleure pureté, de l'ordre de 75 %, a été obtenue lorsqu'on travaille avec un excès de la phase hexane de l'ordre de 4 fois celui de la phase acétonitrile et avec un rapport volumique phase acétonitrile/Phase M2B2 égal à 1/1.

La validité des modèles empiriques obtenus est vérifiée grâce à l'analyse de variance (**Tableau IV-9**). L'analyse statistique des résultats obtenus a montré que les différentes réponses peuvent être prédites par des modèles polynomiaux avec des coefficients de corrélation satisfaisants et des valeurs des résidus (lack of fit) supérieures à 0,05 se traduisant par une absence de manque d'ajustement.

Tableau IV-9: Analyse de variance des variables: modèles polynomiaux.

Source de variation	**Degré de liberté**	**Carré moyen (Variance)**	
		Taux récupération (R)	***Pureté (P)***
Modèle	13	4.3	112.64
Erreur totale	5	0.249	20.8
Résidu (Lack of fit)	3	0.414	34.7
Erreur pure	2	$2.5\ 10^{-3}$	0.01
R2		0.98	0.94
$R^2_{ajusté}$		0.94	0.82

Les coefficients du modèle ont été calculés par l'analyse de régression sur les réponses prédites par UNIFAC. Après élimination des coefficients des interactions sans effet significatif (*P-value* > 0.05), les modèles obtenus pour les différentes réponses sont exprimés comme suit:

Rendement (%) = 99.22 + 1.7 (Hexane) + 2.8 (Acétonitrile) – 2.4 (M2B2) + 1.9 $(\text{Hexane})^2$ – 2.3 $(\text{Acétonitrile})^2$ – 0.88 $(\text{M2B2})^2$ + 2.9 (Hexane x Acétonitrile) – 4.6 (Hexane x M2B2) + 4.24 (Acétonitrile x M2B2)

Pureté (%) = 33.6 + 3.3 (Hexane) – 6.06 (Acétonitrile) – 14.97 (M2B2) + 3.44 $(\text{Hexane})^2$ + 2.6 $(\text{Acétonitrile})^2$ + 11.96 $(\text{M2B2})^2$ – 17.2 (Hexane x Acétonitrile)

Les modèles obtenus montrent que les volumes d'hexane et de M2B2 présentent des effets similaires sur les deux réponses alors que l'acétonitrile présente des effets opposés sur le taux de récupération et la pureté du monocaprate de fructose. Afin de mieux visualiser l'effet des différents facteurs sur les réponses, les résultats obtenus sont utilisés pour tracer une série de surfaces de réponses. Cette représentation consiste à tracer une variable en fonction de l'autre en gardant la troisième constante.

La **Figure IV-8** montre les courbes d'isoréponses décrivant l'effet des volumes de solvants sur le taux de récupération et la pureté du monocaprate de fructose.

On constate que pour de faibles volumes de M2B2 (86,5 ml), une augmentation du volume d'acétonitrile provoque une diminution du taux de récupération du monocaprate de fructose. Une zone optimale donnant le meilleur taux de récupération est obtenue lorsqu'on travaille avec plus de 400 ml d'hexane et de faibles volumes d'acétonitrile (100 à 150 ml). Lorsqu'on travaille avec un volume de M2B2 plus élevé (118,75 et 151 ml), la zone optimale est atteinte avec des volumes plus faibles d'hexane (< 300 ml) et le volume d'acétonitrile est sans effet sur le taux de récupération lorsqu'on travaille à des volumes élevés d'hexane. C'est ainsi qu'avec un volume d'hexane de 500 ml et un volume de M2B2 de 151 ml, la variation du volume d'acétonitrile entre 100 et 300 ml ne présente pas d'effet significatif sur le taux de récupération du monocaprate de fructose.

La **Figure IV-8** montre également que l'augmentation des volumes d'hexane et d'acétonitrile permet d'augmenter la pureté du monocaprate de fructose quel que soit le volume de M2B2 utilisé. L'augmentation du volume d'hexane est cependant sans effet sur la pureté lorsqu'on travaille avec plus de 200 ml d'acétonitrile. En effet, en travaillant à 225 ml d'acétonitrile et 86,5 ml de M2B2, la variation du volume d'hexane entre 100 et 500 ml n'a pas d'effet sur la pureté du monocaprate de fructose qui est de l'ordre de 100 %. L'augmentation du volume de

M2B2 provoque une diminution de la pureté du monocaprate de fructose. En effet, lorsqu'on travaille avec 118,75 et 151 ml de M2B2 il faut plus d'acétonitrile pour obtenir les mêmes puretés que celles obtenues avec 86,5 ml de M2B2. Avec des volumes élevés de M2B2, on remarque qu'entre 100 et 225 ml d'acétonitrile, une augmentation du volume d'hexane est en faveur de la pureté finale du produit alors qu'une augmentation du volume d'acétonitrile provoque une diminution de la pureté. Au-delà de 225 ml d'acétonitrile, l'augmentation du volume d'hexane est sans effet sur la pureté et une augmentation du volume d'acétonitrile permet d'obtenir des molécules plus pures.

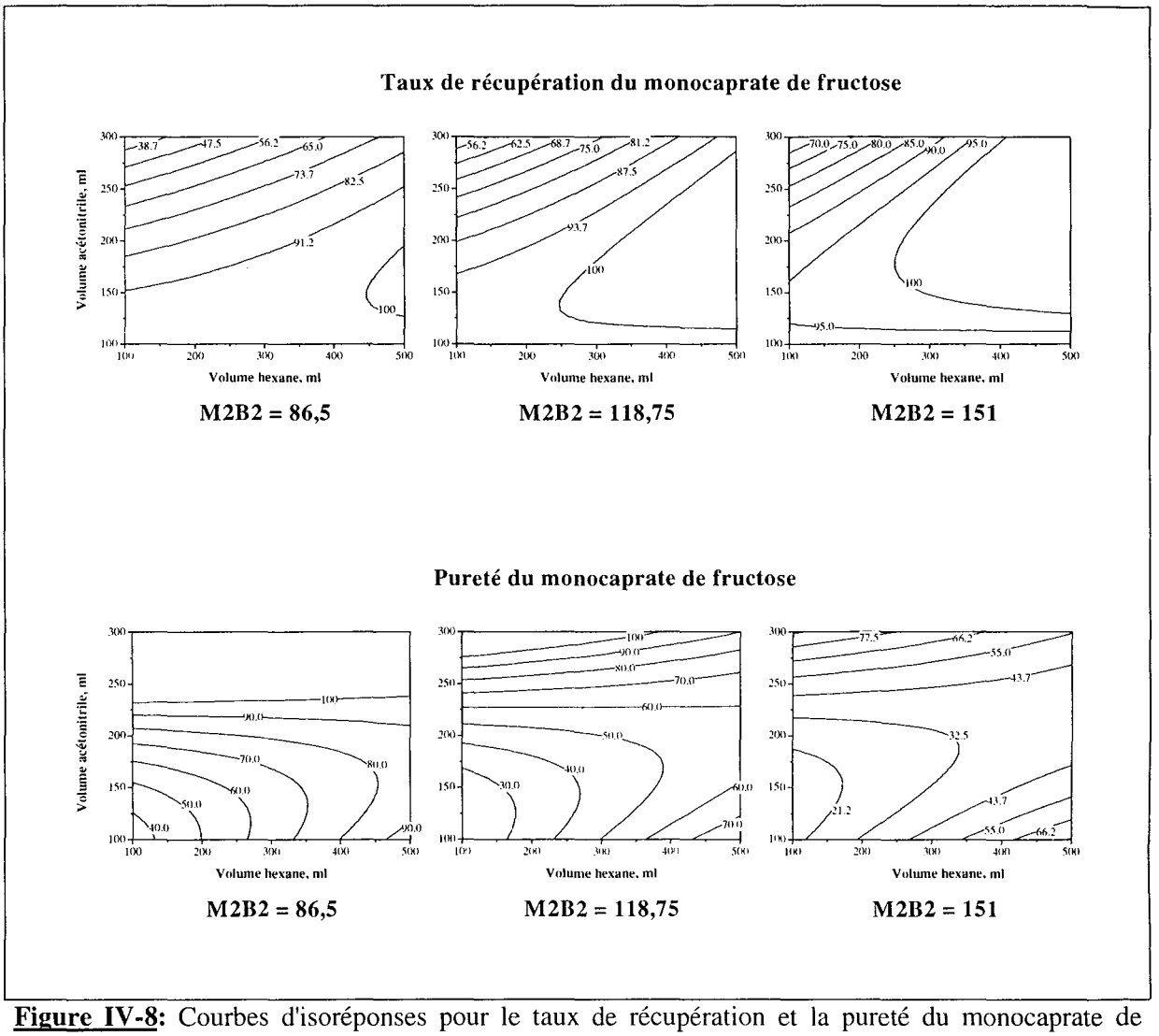


Figure IV-8: Courbes d'isoréponses pour le taux de récupération et la pureté du monocaprate de fructose en fonction des volumes d'hexane, d'acétonitrile et de M2B2.

L'étude de la pureté et du taux de récupération du monocaprate de fructose en fonction des solvants utilisés montre que les volumes de solvant n'ont pas des effets similaires sur les deux réponses considérées et qu'un compromis doit être trouvé en fonction des objectifs recherchés.

3.1.2. Cas de l'acide myristique

Les réponses prédites dans les différentes conditions opératoires ont montré que quels que soient les volumes de solvants utilisés, on obtient de très bons taux de récupération des monoesters variant entre 90 et 100 %. La meilleure pureté du monomyristate de fructose ne dépasse pas 74 % et est obtenue lorsqu'on travaille avec un excès de 4 fois d'hexane par rapport aux volumes d'acétonitrile et de M2B2.

La validité des modèles empiriques obtenus est vérifiée grâce à l'analyse de variance (**Tableau IV-10**). L'analyse statistique des résultats obtenus a montré que les différentes réponses peuvent être prédites par des modèles polynomiaux avec des coefficients de corrélation satisfaisants et des valeurs des résidus (lack of fit) supérieures à 0,05 se traduisant par une absence de manque d'ajustement dans un intervalle de confiance de 95 %.

Tableau IV-10: Analyse de variance des variables: modèles polynomiaux.

Source de variation	**Degré de liberté**	**Carré moyen (Variance)**	
		Taux récupération (R)	***Pureté (P)***
Modèle	16	253.78	183.45
Erreur totale	9	47.01	7.25
Résidu (Lack of fit)	7	60.63	9.25
Erreur pure	2	0.25	0.25
R2		0.90	0.98
$R^2_{ajusté}$		0.82	0.96

Les coefficients du modèle ont été calculés par l'analyse de régression sur les réponses expérimentales. Après élimination des coefficients des interactions sans effet significatif (*P-value* > 0.05), les modèles obtenus pour les différentes réponses sont exprimés comme suit:

Rendement (%) = 88.86 + 7.12 (Hexane) - 1.08 (Acétonitrile) – 19.09 (M2B2) – 2.28 (Hexane)^2 – 3.9 (Acétonitrile)^2 + 5.23 (M2B2)^2 + 9.09 (Hexane x M2B2)

Pureté (%) = 49.88 + 9.89 (Hexane) – 1.32 (Acétonitrile) – 10.36 (M2B2) – 1.21 (Hexane)^2 + 1.92 (Acétonitrile)^2 – 2.29 (Hexane x Acétonitrile) – 3.11 (Acétonitrile x M2B2)

Les modèles obtenus montrent que les volumes des différents solvants présentent des effets similaires sur les deux réponses. Comme précédemment, les résultats obtenus sont utilisés pour tracer les courbes d'isoréponses.

La **Figure IV-9** montre ces courbes et décrit l'effet des volumes de solvants sur le taux de récupération et la pureté du monomyristate de fructose. On observe l'existence d'une zone optimale dans laquelle on atteint un taux de récupération d'environ 100 % et qui est variable en fonction du volume de M2B2. En effet, cette zone est beaucoup plus large lorsqu'on travaille avec 86,5 ml de M2B2. Dans ce cas, lorsque le volume d'acétonitrile varie entre 50 et 250 ml et celui de l'hexane entre 100 et 200 ml, la variation des volumes n'a pas d'effet sur le taux de récupération qui se maintient à des valeurs de l'ordre de 100 %. Ce profil change lorsqu'on travaille avec des volumes d'acétonitrile < 150 ml et > 250 ml où une augmentation du volume d'hexane dans un intervalle compris entre 200 et 500 ml provoque une diminution du taux de récupération. Le Même résultat est également obtenu lorsqu'on travaille avec un volume d'hexane < 200 ml et un volume d'acétonitrile > 250 ml. D'autre part, lorsqu'on augmente le volume de M2B2, l'obtention d'un taux de récupération du monomyristate de fructose satisfaisant nécessite l'utilisation de volumes d'hexane plus élevés. Ainsi, si on veut obtenir un taux de récupération de 100 % avec un volume d'acétonitrile de 150 ml, il faut moins de 100 ml lorsqu'on travaille avec 86,5 ml de M2B2; le volume d'hexane passe à des valeurs supérieures à 400 ml lorsqu'on augmente le volume de M2B2.

L'évolution de la pureté du monomyristate de fructose en fonction des volumes des solvants d'extraction est représentée sur la **Figure IV-9**. On constate qu'une augmentation des volumes d'hexane et d'acétonitrile permet d'augmenter la pureté des monoesters. Par contre, une augmentation du volume de M2B2 provoque une diminution de la pureté finale de la molécule. En effet, pour obtenir par exemple une pureté de l'ordre de 55 % avec un volume initiale d'acétonitrile de 150 ml, il faut environ 300, 350 et 400 ml lorsqu'on utilise des volumes de M2B2 de 86,5, 118,75 et 151 ml respectivement.

De la même manière que pour le monocaprate de fructose, on remarque qu'il faut trouver un compromis entre un bon taux de récupération et des puretés acceptables du monomyristate de fructose. Les Meilleurs résultats étant obtenus lorsqu'on travaille avec de faibles volumes de M2B2.

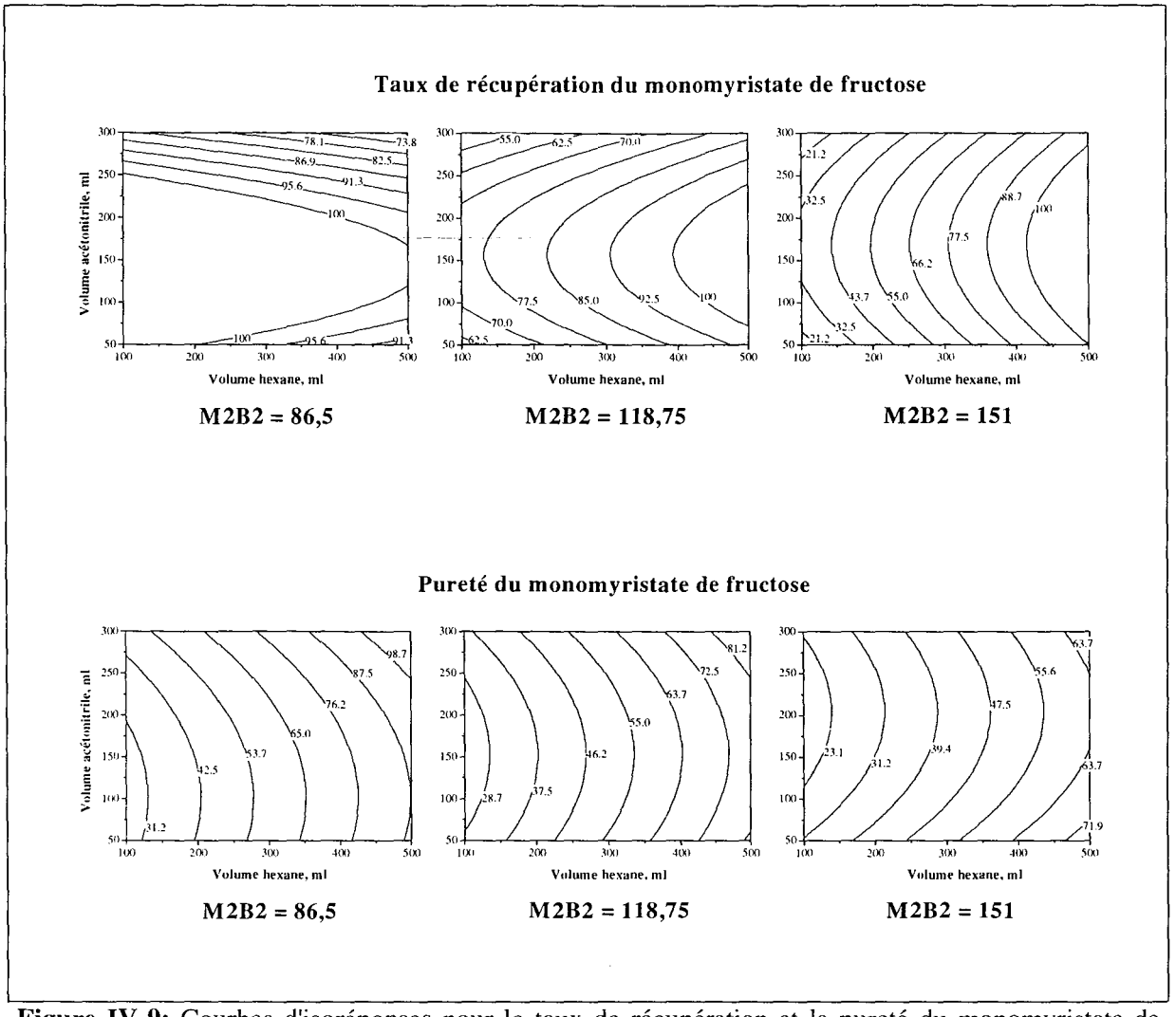


Figure IV-9: Courbes d'isoréponses pour le taux de récupération et la pureté du monomyristate de fructose en fonction des volumes d'hexane, d'acétonitrile et de M2B2.

3.1.3. Cas de l'acide stéarique

Les résultats issus de l'étape de prédiction des réponses montrent que quels que soient les volumes de solvants utilisés, on obtient de très bons taux de récupération des monoesters variant entre 80 et 100 %. La meilleure pureté du monostéarate de fructose ne dépasse pas 76 % et est obtenue lorsqu'on travaille avec un excès d'hexane de 4 fois par rapport au volume de M2B2.

La validité des modèles empiriques obtenus est vérifiée grâce à l'analyse de variance (**Tableau IV-11**). Les différentes réponses peuvent être prédites par des modèles polynomiaux avec des coefficients de corrélation satisfaisants et des valeurs des résidus (lack

of fit) supérieures à 0,05 se traduisant par une absence de manque d'ajustement dans un intervalle de confiance de 95 %.

Tableau IV-11: Analyse de variance des variables: modèles polynomiaux.

Source de variation	Degré de liberté	Carré moyen (Variance)	
		Taux récupération (R)	*Pureté (P)*
Modèle	16	396.32	178.94
Erreur totale	7	20.04	28.91
Résidu (Lack of fit)	5	27.66	40.38
Erreur pure	2	1	0.25
R2		0.98	0.93
$R^2_{ajusté}$		0.95	0.84

Les coefficients du modèle ont été calculés par l'analyse de régression sur les réponses expérimentales. Après élimination des coefficients des interactions sans effet significatif (*P-value* > 0.05), les modèles obtenus pour les différentes réponses sont exprimés comme suit:

Rendement (%) = 89.07 + 14.93 (Hexane) + 0.28 (Acétonitrile) – 23.68 (M2B2) – 8.5 $(\text{Hexane})^2$ + 1.2 $(\text{Acétonitrile})^2$ - 2.16 $(\text{M2B2})^2$ + 18.58 (Hexane x M2B2) – 2.95 (Acétonitrile x M2B2)

Pureté (%) = 43.14 + 8.32 (Hexane) – 2.74 (Acétonitrile) – 11.17 (M2B2) + 1.02 $(\text{Hexane})^2$ + 1.4 $(\text{Acétonitrile})^2$ + 6.6 $(\text{M2B2})^2$ – 1.69 (Hexane x Acétonitrile) – 2.75 (Hexane x M2B2) – 4.27 (Acétonitrile x M2B2)

Les modèles obtenus montrent que les volumes d'hexane et de M2B2 présentent des effets similaires sur les deux réponses alors que le volume d'acétonitrile présente un effet négatif sur la pureté et un léger effet positif sur le taux de récupération.

Les courbes d'isoréponses sont données dans la **Figure IV-10**. Elles montrent l'effet des volumes de solvants sur le taux de récupération et la pureté du monostéarate de fructose. On constate que dans nos conditions opératoires, les meilleurs résultats (pureté et taux de récupération) sont obtenus avec de faibles volumes de M2B2. En effet, pour obtenir un taux de récupération du monostéarate de fructose de 100 % et lorsqu'on utilise un volume d'acétonitrile de 350 ml, il faut environ 160 ml d'hexane lorsqu'on travaille avec 86.5 ml de

M2B2 alors que lorsqu'on augmente le volume de ce dernier, il faut des volumes beaucoup plus importants d'hexane pour atteindre les mêmes taux de récupération. De la même manière, une pureté de l'ordre de 90 % est obtenue lorsqu'on travaille avec des volumes d'acétonitrile, d'hexane et de M2B2 de 350, 160 et 86.5 ml respectivement. Pour atteindre la même pureté lorsqu'on augmente le volume de M2B2 il faut beaucoup plus d'acétonitrile pour un même volume d'hexane.

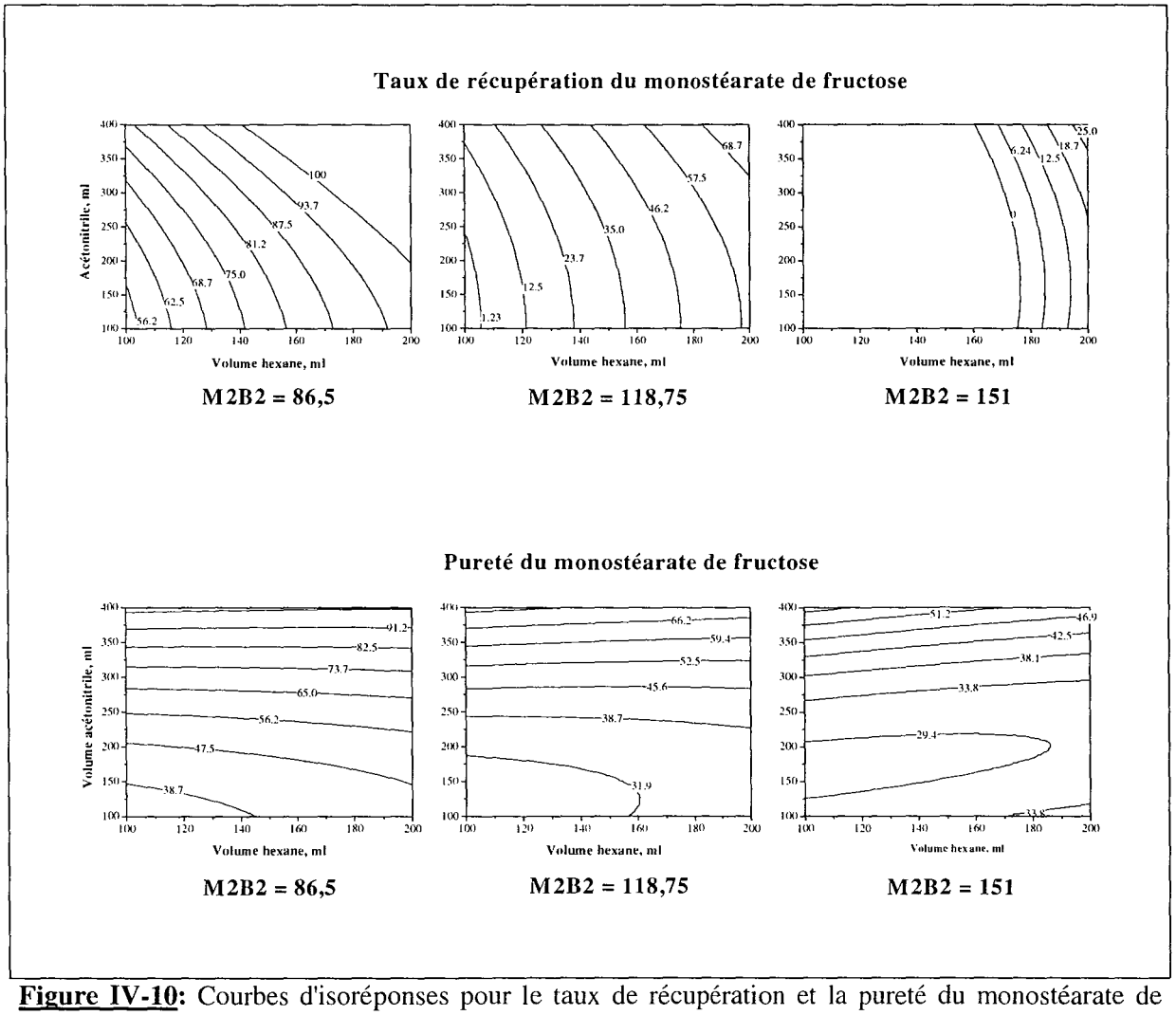


Figure IV-10: Courbes d'isoréponses pour le taux de récupération et la pureté du monostéarate de fructose en fonction des volumes d'hexane, d'acétonitrile et de M2B2.

On constate également que lorsque le volume d'acétonitrile dépasse 250 ml, le volume d'hexane est sans effet significatif sur la pureté du monostéarate de fructose quel que soit le volume de M2B2. De plus, à un volume de M2B2 de 151 ml on remarque que pour des volumes d'acétonitrile < 250 ml, on assiste à une diminution de la pureté lorsqu'on augmente le volume d'acétonitrile. Cependant, à des volumes d'acétonitrile > 250 ml ce profil change et

une augmentation du volume d'acétonitrile devient en faveur de la pureté du monostéarate de fructose.

Ainsi, si on veut obtenir un taux de récupération de 100 % avec une pureté finale acceptable, on peut travailler avec 350 ml d'acétonitrile, 86,5 ml de M2B2 et environ 160 ml d'hexane. Dans ce cas on atteint une pureté de l'ordre de 90 %. Celle ci pouvant être améliorée lors d'une extraction supplémentaire.

3.1.4. Validation des modèles

Une extraction sur l'acide myristique a été réalisée dans les conditions déterminées précédemment afin de valider les modèles développés.

Le **Tableau IV-12** permet de comparer les valeurs expérimentales et les valeurs prédites déterminées grâce à la Méthodologie des Surfaces de Réponses. On remarque qu'il existe une bonne corrélation entre la prédiction avec les modèles quadratiques développés et les résultats expérimentaux.

Tableau IV-12: Validation des modèles développés pour la prédiction du taux de récupération et de la pureté du monomyristate de fructose.

Résultats	Taux de récupération (%)	Pureté (%)
Expérience	39	27
Prédiction	35,5	25,6

Conclusion

L'approche plans d'expériences avec prédiction des résultats grâce au modèle UNIFAC nous a permis de déterminer les conditions expérimentales idéales pour l'obtention de molécules de monoesters avec des taux de récupération élevées et des puretés satisfaisantes sans réaliser les extractions expérimentalement. Cette approche permet donc d'étudier l'extraction à moindre coût et d'avoir une idée globale sur l'effet des différents facteurs ayant une influence sur les réponses étudiées.

Ces résultats montrent aussi qu'il est nécessaire de chercher un compromis pour atteindre les meilleurs taux de récupération et degrés de puretés des monoesters de fructose. Ces compromis sont résumés dans le **Tableau IV-13**. Il faut noter que pour obtenir des produits purs des extractions successives sont nécessaires.

Tableau IV-13: Conditions d'extraction des monoesters de fructose à 60 °C et 300 rpm en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras.

Rapport volumique	***Caprylate***	***Myristate***	***Stéarate***
M2B2/(ACN + 15 % eau)	1/2	1/2	1/2
(ACN + 15 % eau)/Hexane	1/4	1/1	2/1

3.2. Etude expérimentale de l'extraction dans un système contrôlé

La purification des monoesters de fructose a été réalisée dans les conditions retenues lors de l'étape d'optimisation. Le milieu de synthèse (M2B2) après extraction du fructose est placé dans un réacteur parfaitement agité (300 rpm) à double enveloppe chauffée à 60 °C. On a retenu un temps d'extraction de 30 minutes avec 2 à 3 extractions selon l'acide gras à extraire et la composition initiale du milieu.

3.2.1. Extraction de l'acide caprique

3.2.1.1. Cinétique

L'évolution en fonction du temps des quantités de monoesters de fructose et d'acide gras dans la phase acétonitrile est donnée dans la **Figure IV-11**. Elle montre que la quasi-totalité de l'acide gras passe dans la phase hexane au bout de 15 minutes d'extraction. Au-delà, l'évolution du passage de l'acide caprique et du monocaprate de fructose entre phases se ralentit et on atteint l'équilibre.

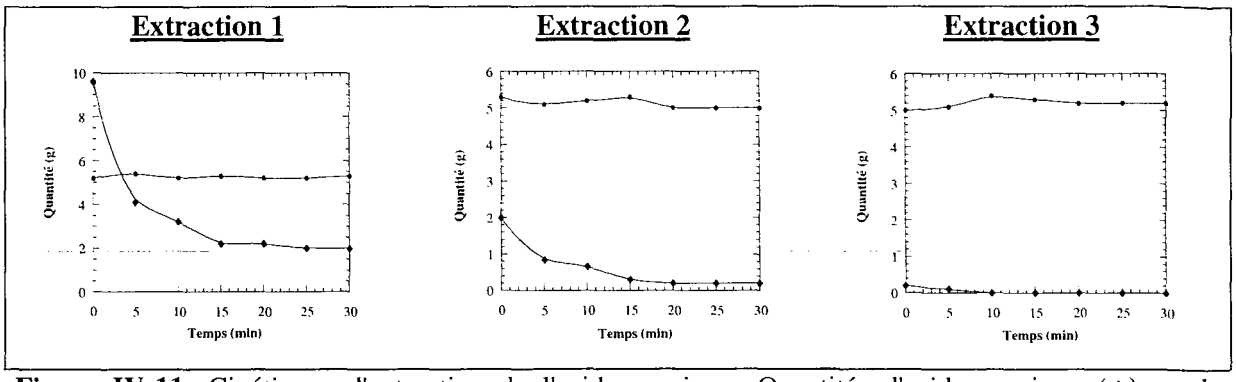


Figure IV-11: Cinétiques d'extraction de l'acide caprique: Quantités d'acide caprique (◆) et de monocaprate de fructose (•) dans la phase acétonitrile à 60 °C et 300 rpm.

Le **Tableau IV-14** montre qu'à l'équilibre le taux de récupération de l'acide caprique dans l'hexane augmente avec le nombre d'extractions. Au bout de trois extractions, la totalité de l'acide gras est éliminée dans la phase légère.

Tableau IV-14: Taux de récupération de l'acide caprique dans la phase hexane et coefficients de partage entre la phase ACN et la phase hexane.

Nombre Ext.	$K_{C10,15mn}$	$K_{C10,30mn}$	Taux récupération (%)
Extraction 1	3.36	3.8	79
Extraction 2	5.66	9	90
Extraction 3	-	-	100

3.2.1.2. Bilan massique et calcul du taux de récupération du monocaprate de fructose

Suite à l'étude cinétique, on a réalisé un bilan massique sur l'acide caprique et le monocaprate de fructose (**Figure IV-12**). On constate que la totalité de l'acide caprique (9.6 g) passe dans la phase hexane sans perte en monoesters (5.2 g). Les proportions de solvants retenues ont permis d'augmenter la sélectivité de la phase acétonitrile vis-à-vis des monoesters et par conséquent éviter leur passage dans la phase hexane. Dans ce cas, on atteint une pureté en monocaprate de fructose de plus de 99 % avec un taux de récupération dans la phase acétonitrile de l'ordre de 99%.

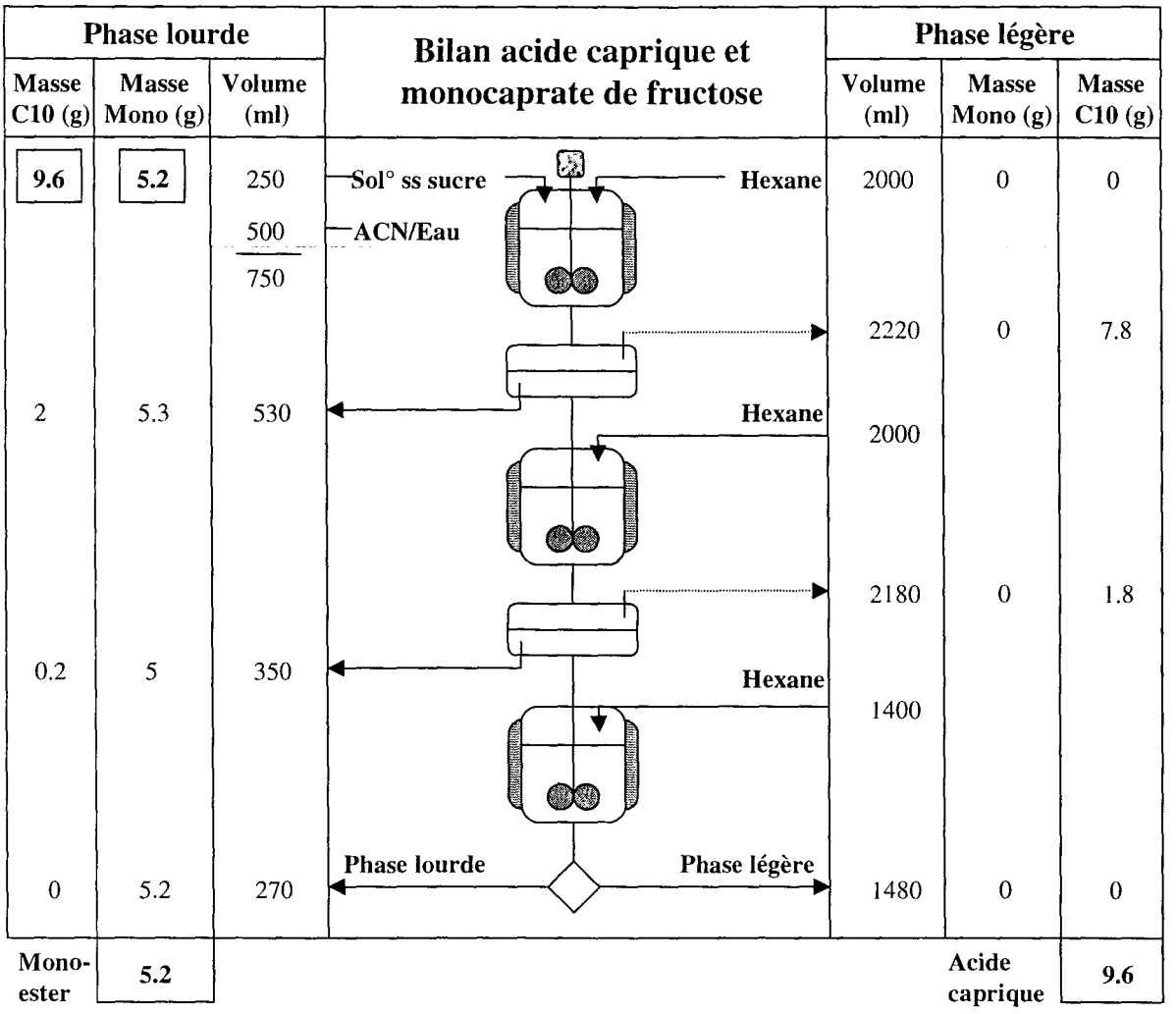


Figure IV-12 : Bilan massique sur l'acide caprique et le monocaprate de fructose.

3.2.2. Extraction de l'acide myristique

3.2.2.1. Cinétique

De la même manière que dans le cas de l'acide caprique, la majorité de l'acide myristique passe dans la phase hexane au bout de 15 minutes d'extraction (**Figure IV-13**). Par contre, l'extraction totale de l'acide myristique n'a nécessité que 2 extractions à l'hexane. Il faut noter que dans ce cas on assiste à une légère perte des monomyristates de fructose. En effet, près de 7 % des monoesters passent dans la phase hexane au bout de la 2ème extraction.

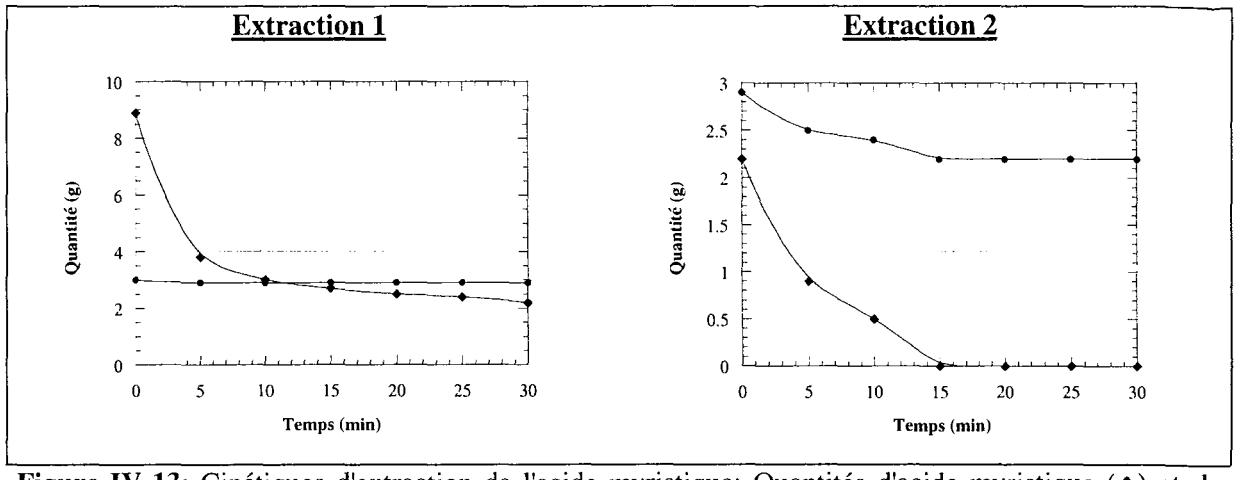


Figure IV-13: Cinétiques d'extraction de l'acide myristique: Quantités d'acide myristique (◆) et de monomyristate de fructose (•) dans la phase acétonitrile à 60 °C et 300 rpm.

Le **Tableau IV-15** montre qu'on atteint 100 % de taux de récupération au de 2 extractions de 30 minutes. On constate également que le coefficient de partage de l'acide myristique ne se trouve pas amélioré de manière significative entre 15 et 30 minutes d'extraction. Par conséquent, le temps des extractions peut être réduit à 15 minutes seulement.

Tableau IV-15: Taux de récupération de l'acide myristique dans la phase hexane et coefficients de partage entre la phase ACN et la phase hexane.

Nombre Ext.	$K_{C14,15mn}$	$K_{C14,30mn}$	Taux récupération (%)
Extraction 1	2.3	3.4	75
Extraction 2	-	-	100

3.2.2.2. Bilan massique et calcul du taux de récupération du monomyristate de fructose

La **Figure IV-14** montre que la totalité de l'acide myristique passe dans la phase hexane. Cependant, on n'est pas arriver à boucler le bilan dans le cas du monomyristate de fructose. Ceci pourrait être dû aux erreurs liées aux limites de détection de la méthode de dosage (CLHP). En effet, vu les faibles concentrations initiales et finales en monoesters, les dosages sont peu précis. La pureté du monomyristate de fructose obtenu est de l'ordre de 99 % avec un taux de récupération dans la phase acétonitrile de 93 %.

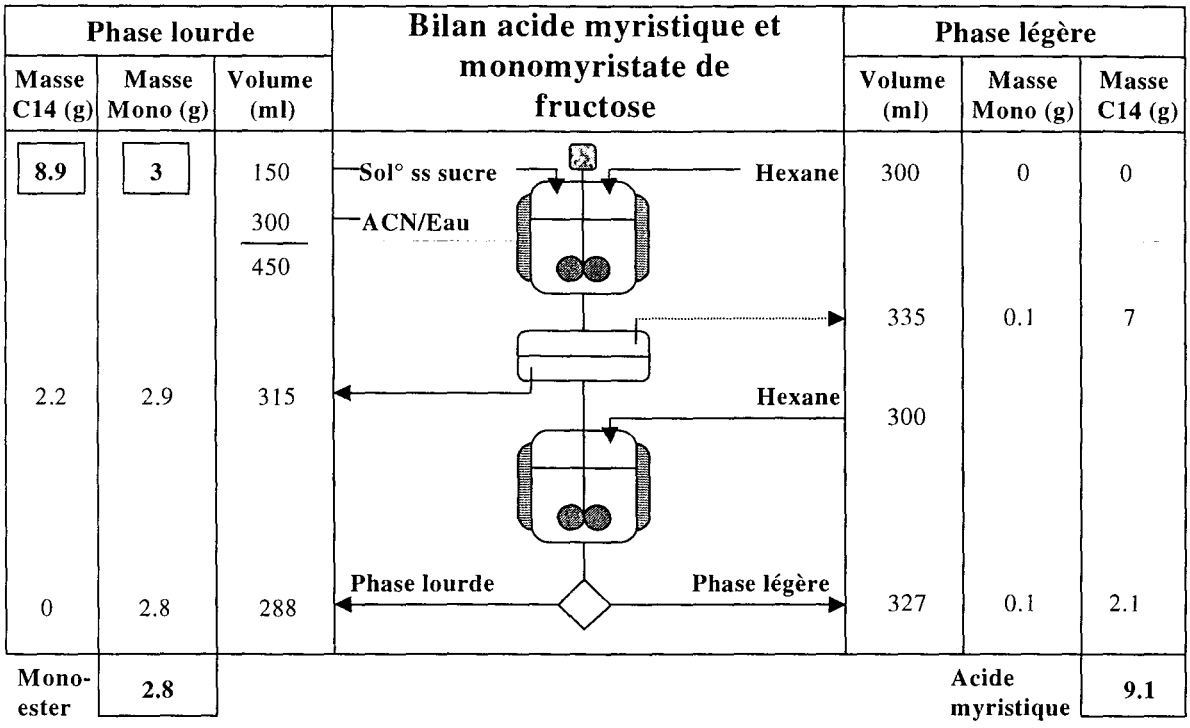


Figure IV-14: Bilan massique sur l'acide myristique et le monomyristate de fructose.

3.2.3. Extraction de l'acide stéarique

3.2.3.1. Cinétique

L'étude cinétique d'extraction de l'acide stéarique montre que la majorité de l'acide gras passe dans la phase hexane au bout de 10 à 15 minutes et 2 extractions ont été suffisantes pour séparer la totalité de l'acide stéarique. Au bout de ces deux extractions on remarque qu'on n'a pas eu de perte significative en monostéarates de fructose (**Figure IV-15**).

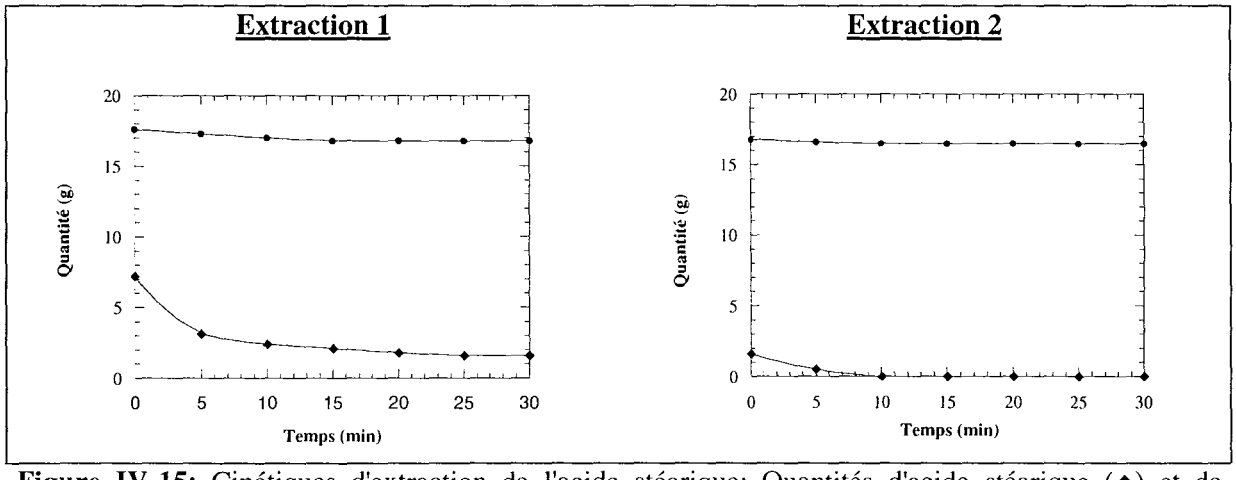


Figure IV-15: Cinétiques d'extraction de l'acide stéarique: Quantités d'acide stéarique (◆) et de monostéarate de fructose (•) dans la phase acétonitrile à 60 °C et 300 rpm.

Le **Tableau IV-16** montre que les coefficients de partage de l'acide stéarique sont comparables à ceux obtenus avec l'acide myristique. Un taux de récupération de 100 % a été atteint au bout de 2 extractions. Le temps d'extraction peut également être réduit à 15 minutes.

Tableau IV-16: Taux de récupération de l'acide stéarique dans la phase hexane et coefficients de partage entre la phase ACN et la phase hexane.

Nombre Ext.	$K_{C18,15mn}$	$K_{C18,30mn}$	Taux récupération (%)
Extraction 1	2.4	3.4	78
Extraction 2	-	-	100

3.2.3.2. Bilan massique et calcul du taux de récupération du monostéarate de fructose

L'étude cinétique nous a permis de réaliser un bilan massique sur l'acide stéarique et le monostéarate de fructose (**Figure IV-16**). On constate que la totalité de l'acide stéarique (7.2 g) passe dans la phase hexane avec une légère perte en monoesters (1 g). Les proportions de solvants retenues ont donc permis d'augmenter la sélectivité de la phase acétonitrile vis à vis des monoesters et par conséquent éviter leur passage dans la phase hexane. Dans ce cas, on atteint une pureté en monostéarate de fructose de plus de 99 % avec un taux de récupération dans la phase acétonitrile de l'ordre de 94%.

Récapitulatif des résultats:

Les puretés et taux de récupération des monoesters obtenus dans nos conditions opératoires sont résumés dans le **Tableau IV-17**. On constate que les meilleurs résultats sont obtenus avec l'acide caprique. Toutefois, les puretés des monoesters obtenus sont toutes de l'ordre de 99 %.

Les résultats obtenus lors de cette étude semblent indiquer l'existence d'une relation entre la longueur de chaîne carbonée de l'acide gras et les rapports volumiques Phase Acétonitrile/Phase Hexane. La **Figure IV-17** montre qu'il existe effectivement une relation linéaire entre le rapport volumique et le nombre de carbone de l'acide gras. Ce résultat nous permet ainsi de prédire les conditions d'extraction d'autres molécules intermédiaires tel que l'acide laurique et l'acide palmitique.

Phase lourde			Bilan acide stéarique et monostéarate de fructose	Phase légère		
Masse C18 (g)	Masse Mono (g)	Volume (ml)		Volume (ml)	Masse Mono (g)	Masse C18 (g)
7.2	17.6	400	Sol° ss sucre / Hexane	400	0	0
		800	ACN/Eau			
		1200				
				400	0.6	6
1.6	16.8	1200	Hexane	600		
0	16.5	1025	Phase lourde / Phase légère	775	1.2	1.5
Mono-ester	16.5				Acide stéarique	7.5

Figure IV-16: Bilan massique sur l'acide stéarique et le monostéarate de fructose.

Tableau IV-17: Puretés et taux de récupération des monoesters de fructose obtenus par extraction liquide-liquide dans un réacteur agité à 300 rpm et chauffé à 60 °C.

Ph. ACN / Ph. hexane	Monocaprate		Monomyristate		Monostéarate	
	Pureté %	*Taux récupération %*	*Pureté %*	*Taux récupération %*	*Pureté %*	*Taux récupération %*
2/1	-	-	-	-	> 99	93.7
1/1	-	-	> 99	93.3	-	-
1/4	> 99	> 99	-	-	-	-

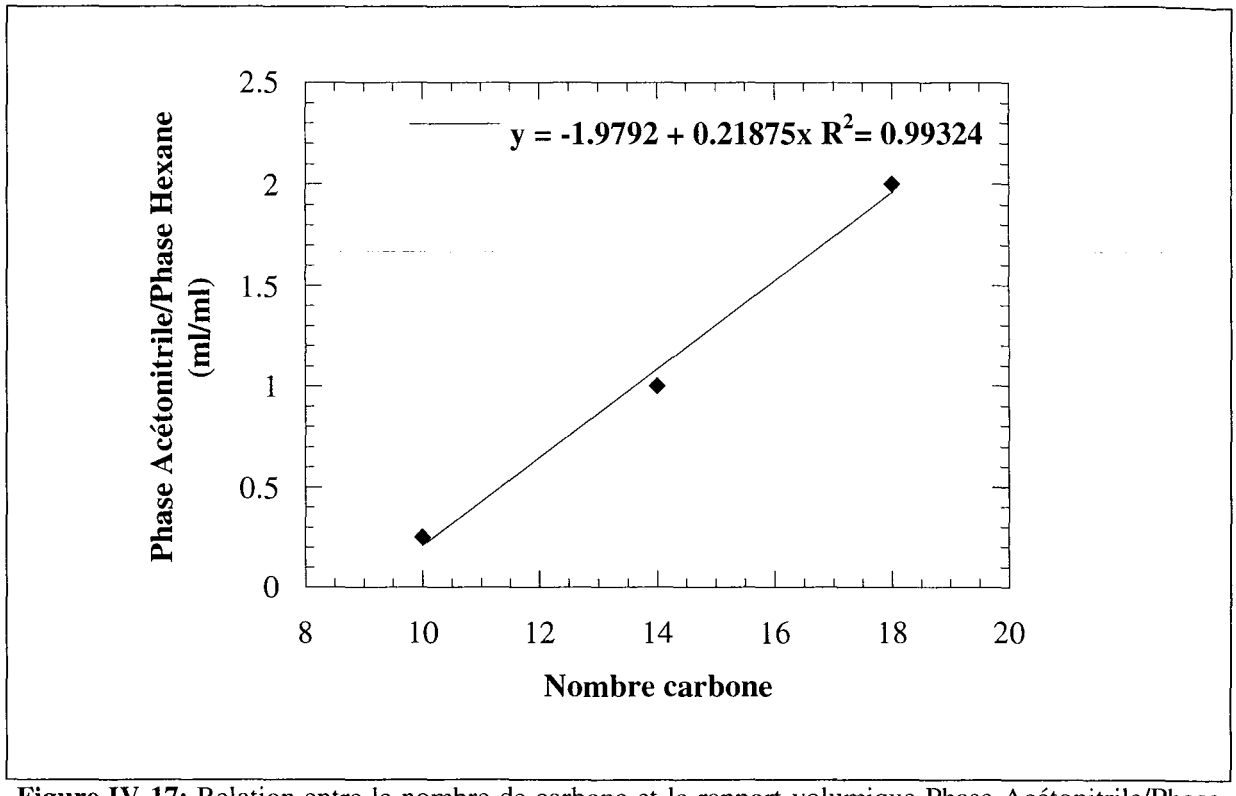


Figure IV-17: Relation entre le nombre de carbone et le rapport volumique Phase Acétonitrile/Phase Hexane.

4- Conclusion du chapitre IV

- L'extraction en système contrôlé nous a permis d'améliorer les puretés et taux de récupération des monoesters par rapport à l'extraction dans des ampoules à décanter et à température ambiante. Le meilleur résultat étant obtenu pour le monocaprate de fructose (> 99 %). Environ 94 % de monostéarate de fructose sont récupérés dans la phase acétonitrile. Tandis que dans le cas du monomyristate de fructose on récupère près de 93 %. Tous les monoesters obtenus sont de pureté supérieure à 99 %.
- On a pu démontrer que la longueur de la chaîne hydrophobe du sucroester joue un rôle dans la détermination des volumes des solvants d'extraction. Par conséquent, il faut adapter le rapport volumique des solvants en fonction de l'acide gras à extraire.
- La relation linéaire entre la longueur de chaîne carbonée de l'acide à extraire et le rapport volumique des solvants permet de prédire les rapports des solvants à utiliser pour la purification d'autres sucroesters.

Par conséquent, le système étudié peut être considéré comme adapté à l'extraction des monoesters de fructose. En effet, ce protocole présente divers avantages par rapport à celui

proposé par Nobile *et al.*1966; Khaled *et al.*, 1990; Coulon, 1997. Dans nos conditions de séparation, on évite l'étape d'élimination du solvant de réaction ainsi que celle l'étape de solubilisation du résidu obtenu dans un tierce solvant. Dans les travaux reportés dans la littérature, ces deux étapes ont été réalisées quelle que soit la technique de séparation utilisée (précipitation, extraction liquide-liquide et osmose inverse).

La première étape a consisté à éliminer le fructose par une simple extraction à l'eau directement à partir du milieu de synthèse.

La deuxième étape a consisté à éliminer l'acide gras et les diesters sans transvasement du réacteur et à 60 °C. Le système proposé a permis d'éliminer les diesters dés la première extraction. Dans ces conditions opératoires, on a pu éviter la précipitation simultanée des monoesters qui a lieu lorsqu'on utilise la technique de séparation du donneur d'acyle par précipitation ou cristallisation (Schlotterbeck *et al.*, 1993). De plus, on a pu obtenir de meilleurs résultats de purification par rapport à ceux obtenus par la technique de chromatographie préparative qui a permis d'atteindre, au meilleur des cas, une pureté de 95 % des sucroesters (Gupta *et al.*, 1983) et un rendement de 70 % (Coulon, 1997).

Dans nos conditions de purification, les puretés (> 99 %) et taux de récupération (> 93 %) obtenus sont plutôt proches de ceux atteints par Yamamoto *et al.* (1986) et Redmann *et al.* (1995) qui ont utilisé la technique de distillation moléculaire et par Feuge et Zeringue (1983) et Koerts *et al.* (1990) qui ont réalisé la purification au CO_2 supercritique, techniques efficaces mais peuvent être plus coûteuses comparées à l'extraction liquide-liquide proposée dans cette étude.

Les protocoles de séparation proposés sont donc faciles à mettre en œuvre et réalisables directement dans le réacteur de synthèse et sans changement de température qui est maintenue à 60 °C.

Par conséquent, un procédé intégré synthèse-purification peut être envisagé pour la purification des monoesters de fructose.

Enfin, la particularité de ce travail par rapport à ceux reportés dans la littérature est l'utilisation des outils de simulation (UNIFAC) et des plans d'expériences. En effet, cette

démarche nous a permis d'étudier le système d'extraction en réalisant le minimum d'expériences possibles.

Le protocole final de différentes étapes de séparation est schématisé sur la **Figure IV-18**.

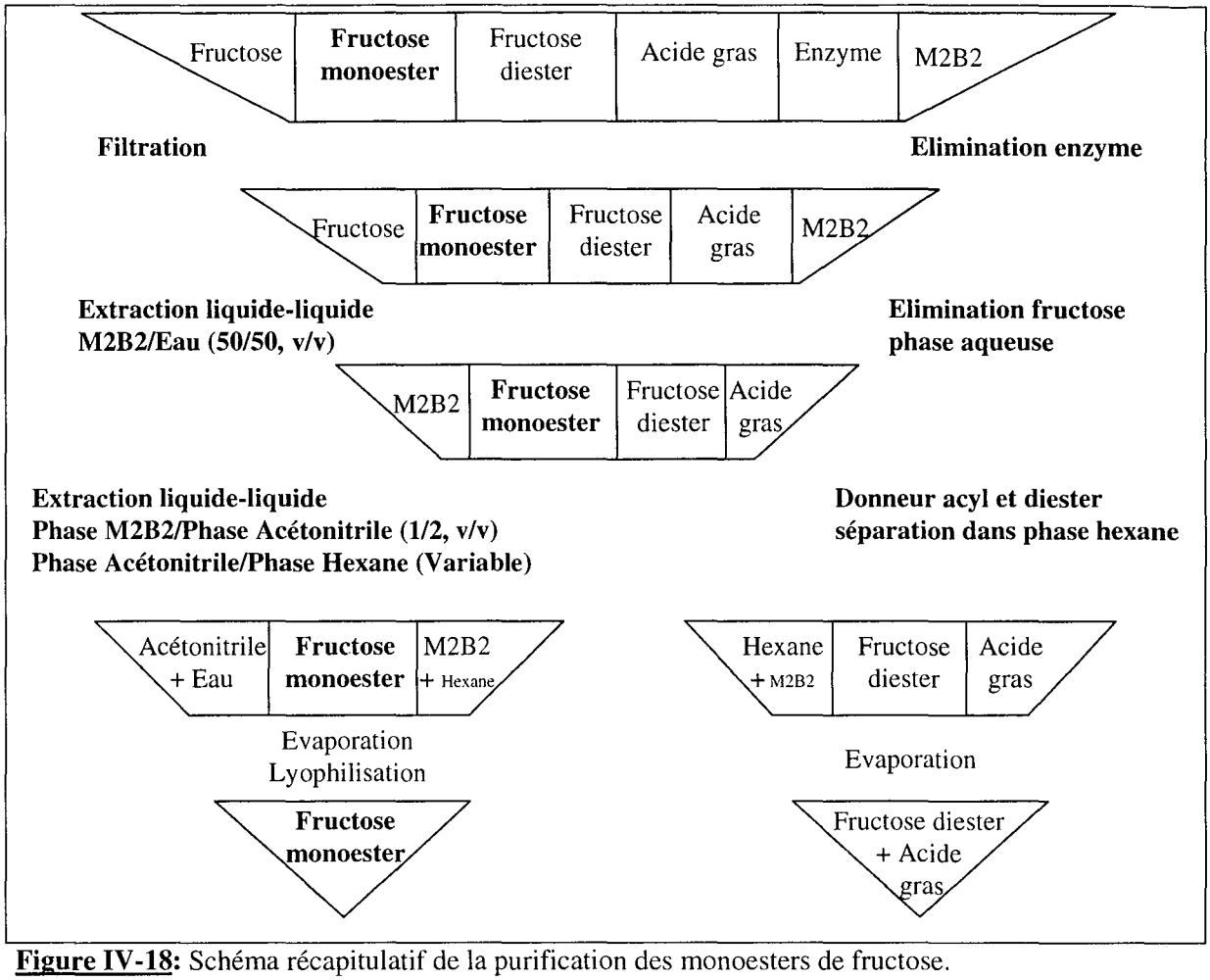


Figure IV-18: Schéma récapitulatif de la purification des monoesters de fructose.

Les chromatogrammes des monoesters de fructose purs dosés par HPLC/DDL et obtenus selon le protocole proposé de purification par extraction liquide-liquide sont représentés sur la **Figure IV-19**.

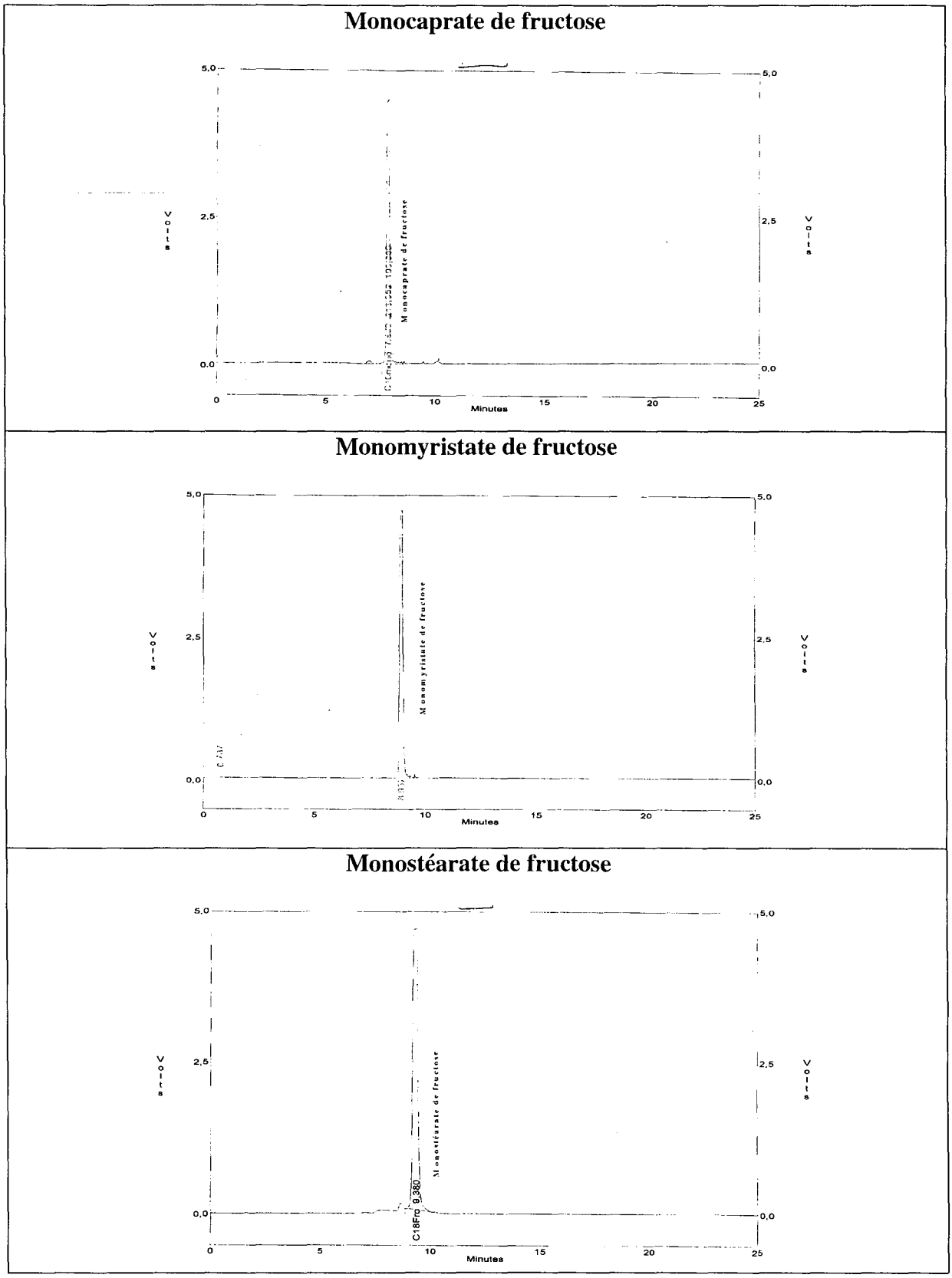


Figure IV-19: Chromatogrammes des monoesters de fructose purifiés par extraction liquide-liquide.

CHAPITRE V

PROPRIÉTÉS DES ESTERS DE FRUCTOSE ET D'ACIDE GRAS

CHAPITRE V : Propriétés des esters de fructose et d'acide gras.....222

1- pH et composition des sucroesters étudiés.....222
2- Propriétés tensioactives des sucroesters.....224
2.1. Tension interfaciale $\gamma_{H/E}$.....224
2.2. Tension de surface et Concentration Micellaire Critique (CMC).....226
2.2.1. Cas des monoesters de fructose.....227
2.2.2. Cas des mélanges de mono- et di-esters de fructose.....229
2.2.3. Cas des esters de saccharose du commerce.....231
2.3. Pouvoir moussant.....233
2.4. Stabilité émulsion.....235
2.4.1. Calcul de la Balance Hydrophile Lipophile : BHL.....235
2.4.2. Stabilité des émulsions huile de colza/eau.....236
3- Conclusion du Chapitre V.....238

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ FIGURES ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Figure V-1: Réduction de la tension interfaciale à 20 °C entre l'eau et l'huile de colza en fonction du temps par la méthode Du Nouy.....225
Figure V-2: Détermination du pouvoir moussant à 0.1 g/l d'esters de fructose et d'esters de saccharose du commerce.....234
Figure V-3: Stabilisation des émulsions Huile de colza/Eau à 0.5 % (p/v) avec des esters de fructose et des esters de saccharose du commerce.....237

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋ TABLEAUX ❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Tableau V-1: pH et composition des différents sucroesters.....223
Tableau V-2: CMC et tension de surface de solutions aqueuses de monoesters de fructose.....228
Tableau V-3: CMC et tension de surface de solutions aqueuses de mélanges de mono- et di-esters de fructose.....230
Tableau V-4: CMC et tension de surface des esters de saccharose du commerce.....232
Tableau V-5: Valeurs calculées de BHL des esters de fructose et de saccharose.....235
Tableau V-6: Résumé des intervalles de BHL et des applications possibles des tensioactifs.....236

CHAPITRE V

PROPRIETES DES ESTERS DE FRUCTOSE ET D'ACIDE GRAS

La connaissance des propriétés tensioactives des sucroesters permet d'identifier les applications potentielles de ces molécules. Ces applications peuvent nécessiter des formulations variant en fonction de la propriété que l'on désire promouvoir. En effet, les propriétés tensioactives des sucroesters peuvent varier considérablement, pour un sucre donné, selon la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras utilisé et selon que les sucroesters sont utilisés sous forme de mélange ou à l'état pur.

L'objectif de ce chapitre est de déterminer quelques propriétés de base des sucroesters obtenus par synthèse enzymatique aussi bien lorsqu'ils sont utilisés à l'état pur que lorsqu'ils sont sous forme de mélange. Ces propriétés seront comparées à celles des sucroesters de saccharose obtenus par synthèse chimique.

Les sucroesters étudiés sont :

- Trois monoesters de fructose en C10, C14 et C18 purifiés par extraction liquide-liquide.
- Trois mélanges de mono- et di- esters de fructose en C10, C16 et C18 purifiés par extraction au CO_2 supercritique.

Les propriétés de ces molécules sous forme de monoesters purs et de mélanges de mono- et di- esters ont été comparées à quelques molécules commercialisées d'esters de saccharose.

1- pH et composition des sucroesters étudiés

Le pH et la composition des mélanges de sucroesters affectent leurs propriétés tensioactives. En effet, le pH peut avoir une influence sur la stabilité et la diffusion moléculaire des agents tensioactifs au niveau de l'interface. Par conséquent, il faut tenir compte de ces deux paramètres lors de la comparaison des propriétés des différents sucroesters. Le pH et la composition (en %) des différents sucroesters sont résumés dans le **Tableau V-1**.

Tableau V-1: pH et composition des différents sucroesters.

Sucroester	pH	Sucre (%)	Acide gras (%)	Monoester (%)	Di- et poly-esters (%)
Fructose monocaprate (FrcC10Mono)	7.4	0	1	99	0
Fructose monomyristate (FrcC14Mono)	7.1	0	2	98	0
Fructose Monostéarate (FrcC18Mono)	6.9	0	5	95	0
Fructose mono- et di- caprate (FrcC10MonoDi)	8.4	5.5	4.5	52	38
Fructose mono- et di- palmitate (FrcC16MonoDi)	8.5	< 5	< 2.5	46	48
Fructose mono- et di- stéarate (FrcC18MonoDi)	8.3	< 5	< 2.5	47	49
Saccharose palmitate (P1670, Ryoto)	8.7	-	< 3	70	30
Sucrose stearate (S1670, Ryoto)	8.5	-	< 3	70	30
SP30, Sisterna	8	-	< 3	30	70
SP70, Sisterna	8.1	-	< 3	70	30

Ce tableau indique que:

- Le pH des différentes solutions tensioactives est situé entre 7 et 8.5.
- Quel que soit le sucroester, l'acide gras et le sucre résiduels ne dépassent pas 5 % avec une pureté plus élevée des monoesters de fructose et des sucroesters du commerce. La présence d'acide gras résiduel doit être la plus faible possible car il s'agit d'un contaminant tensioactif pouvant induire des erreurs lors de la comparaison des propriétés tensioactives de ce type de molécules.
- Les mélanges de mono- et di- esters sont composés d'autant de mono- que de di- esters à l'exception du caprate où l'on a un léger excès de monoesters.
- Les sucroesters du commerce étudiés présentent un excès de monoesters à l'exception du SP 30 (Sisterna) qui contient plus de diesters.

2- Propriétés tensioactives des sucroesters

Les propriétés tensioactives ayant fait l'objet de cette étude sont :

- La tension interfaciale huile colza/eau;
- Tension superficielle air/eau;
- Concentration Micellaire Critique (CMC);
- Pouvoir moussant;
- Stabilité des émulsions H/E.

2.1. Tension interfaciale $\gamma_{H/E}$

La capacité des monoesters de fructose à réduire la tension interfaciale a été déterminée dans un système biphasique eau-huile de colza et comparée à celle des mélanges mono- et di-esters de fructose et des esters de saccharose et d'acide gras du commerce. Ce système biphasique a été choisi pour s'approcher le plus des systèmes réels utilisés dans les applications alimentaires.

La **Figure V-1** montre l'évolution à 20 °C de la tension interfaciale $\gamma_{H/E}$ des différentes solutions testées en fonction du temps.

Ces résultats révèlent qu'en présence de préparations à base de monoesters purs, le stéarate de fructose permet d'obtenir la tension interfaciale ($\gamma_{H/E}$) la plus stable au cours du temps. En revanche, la tension interfaciale la plus faible a été obtenue avec le monoester de myristate, c'est-à-dire avec une longueur de chaîne carbonée intermédiaire. En effet, avec ce sucroester, la tension interfaciale a été de l'ordre de 3 mN/m contre 8 et 13 mN/m pour le monocaprate et le monostéarate de fructose respectivement.

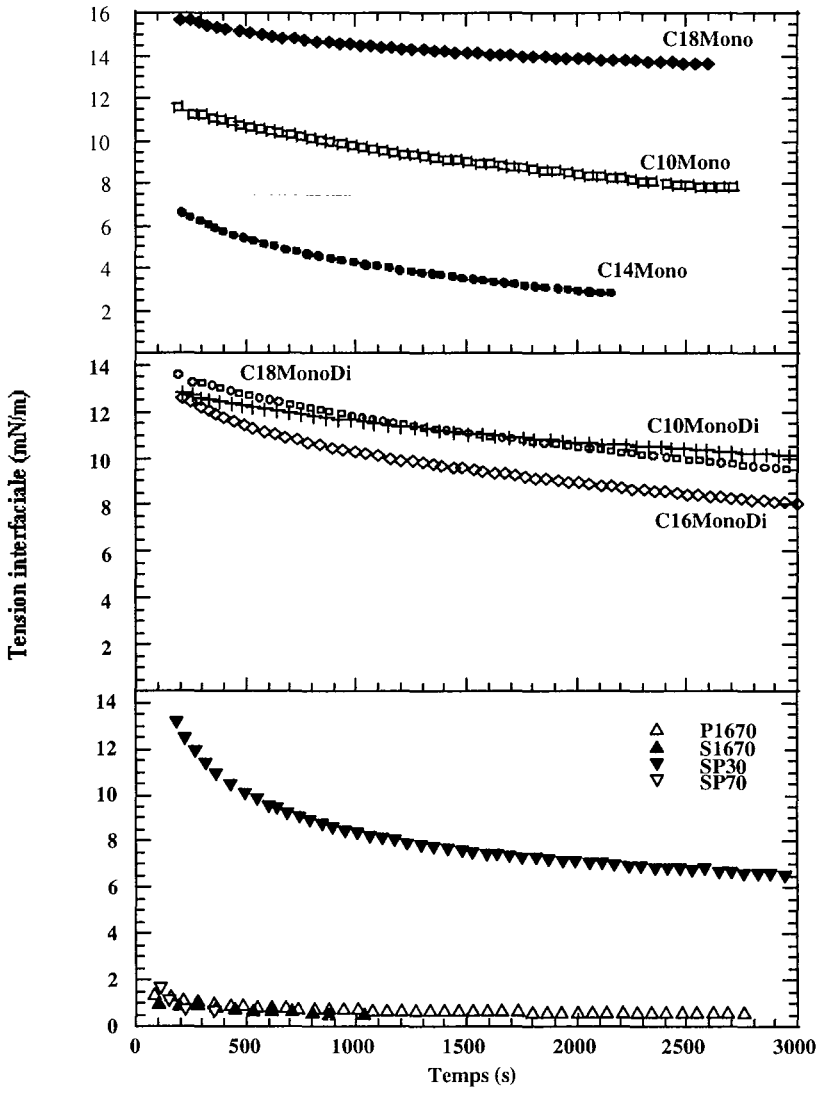


Figure V-1: Réduction de la tension interfaciale à 20 °C entre l'eau et l'huile de colza en fonction du temps par la méthode Du Nouy (Krüss K12).

Dans le cas des mélanges de mono- et diesters de fructose, on remarque que quel que soit le mélange étudié, les tensions interfaciales ne sont pas stables au cours du temps. Ces profils indiquent que le mélange de sucroester diffuse lentement à l'interface avec un temps d'adsorption plus ou moins long. De plus, les tensions interfaciales obtenues ne présentent pas de différence significative. C'est ainsi, en passant d'une longueur de chaîne allant de 10 à 18 atomes de carbones, $\gamma_{H/E}$ passe de 8 et 10 mN/m. Ces résultats montrent un comportement intermédiaire des mélanges d'esters de fructose entre le monocaprate et le monostéarate de fructose.

Les esters de saccharose du commerce, quant à eux, présentent de meilleures stabilités des tensions interfaciales au cours du temps à l'exception du SP30. Ces sucroesters permettent d'atteindre des faibles $\gamma_{H/E}$ comparées à celles obtenues avec les esters de fructose. En effet, à l'exception du Sisterna SP30 qui donne une tension interfaciale de 6.5 mN/m, tous les autres esters de saccharose ont abaissé la tension interfaciale jusqu'à une valeur négligeable de l'ordre de 0.6 mN/m.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats montre que la faible stabilité de la tension interfaciale au cours du temps est plus marquée dans le cas des mélanges de sucroesters de fructose et des esters de saccharose du commerce contenant majoritairement des diesters. La présence d'esters supérieurs semble affecter la stabilité des solutions tensioactives obtenues avec ce type de molécules. Ce phénomène a également été observé par Ferrari *et al.* (1997) et a été expliqué par une adsorption des diesters à l'interface suivie de leur diffusion dans la phase huile.

De même ces résultats ont montré que les plus faibles valeurs de tension interfaciale sont obtenues lorsqu'on travaille avec des esters de fructose à longueur de chaîne carbonée intermédiaire (C14-C16) qu'il s'agisse de monoesters ou de mélanges de mono- et diesters. Des résultats similaires ont été décrits par Drummond et Wells (1998) au cours d'une étude menée en présence des monoesters de lactitol et de lactose en C16.

Enfin, la différence constatée entre les tensions interfaciales des solutions contenant les esters de saccharose et celles contenant les esters de fructose peut être attribuée au groupement hydrophile. En effet, vu la différence de structure entre le fructose et le saccharose, les esters d'acide gras correspondants peuvent avoir un comportement différent dans le système étudié. Les différences des propriétés tensioactives liées au groupement hydrophile ont déjà été reportées par Garofalakis *et al.* (2000).

2.2. Tension de surface et Concentration Micellaire Critique (CMC)

Les tensioactifs dans l'eau sont capables de former des agrégats ordonnés appelés micelles lorsque leur concentration dépasse la concentration micellaire critique. Cette concentration est atteinte lorsque la surface du liquide est saturée en tensioactif. Les valeurs de CMC sont

déterminées à partir du point d'inflexion de la courbe de la tension de surface en fonction du log de la concentration du tensioactif.

Il faut noter que certains auteurs ont préféré utiliser le terme Concentration d'Agrégation Critique (CAC). En effet, Garofalakis *et al.* (2000) ont considéré que lorsque les solutions tensioactives restent limpides, la CAC correspond à la CMC alors que lorsque ces solutions sont troubles à la concentration à laquelle on atteint un plateau de la tension de surface, on utilise le terme CAC car dans ce cas le processus d'agrégation est réversible.

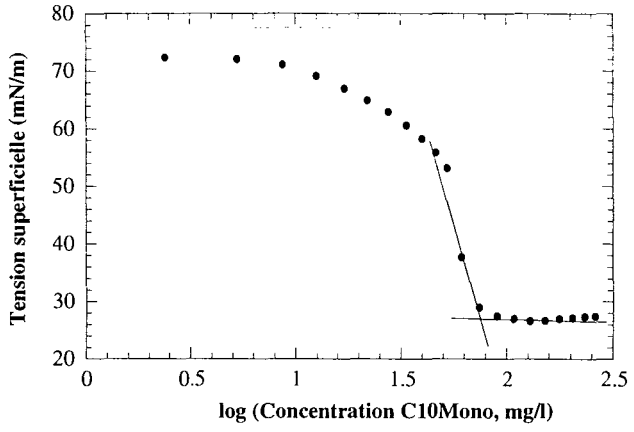
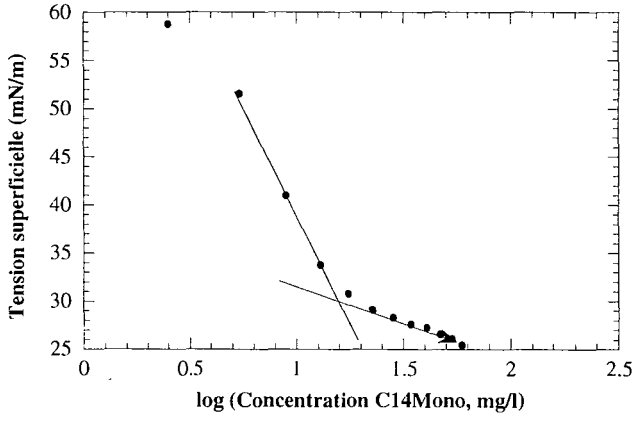
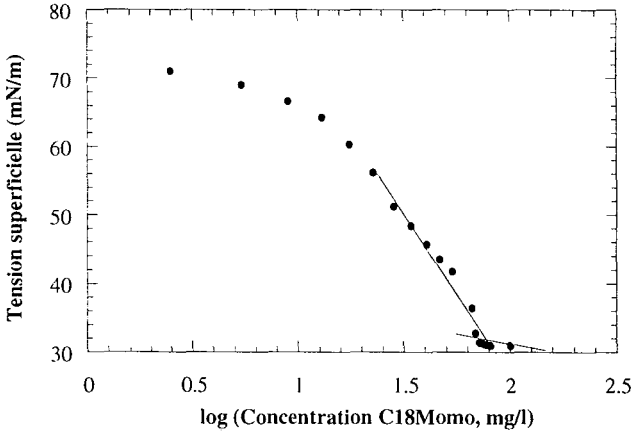
2.2.1. Cas des monoesters de fructose

Le **Tableau V-2** montre l'évolution de la CMC et de la tension superficielle de solutions aqueuses à 0.1 % (p/v) de monoesters de fructose.

On observe que les tensions superficielles des monocaprate (C10) et monomyristate (C14) de fructose ne sont pas affectées par la variation de température entre 15 et 25 °C alors que celle du monostéarate de fructose diminue légèrement lorsqu'on augmente la température. Cette légère variation peut être attribuée à la variation de la solubilité et de la diffusion en fonction de la température.

Les tensions superficielles obtenues avec les sucroesters à courte (C10) et moyenne (C14) longueur de chaîne carbonée sont plus faibles (environ 26 mN/m) que celles obtenues avec les monoesters à longue chaîne carbonée (environ 40 mN/m). Ce comportement semble être indépendant de la nature du groupement hydrophile du sucroester. En effet, Ducret *et al.* (1996) ont déjà obtenu une meilleure réduction de la tension superficielle avec le monocaprylate de sorbitol (C8) comparé au monoerucate de sorbitol (C21). Des observations comparables ont été rapportées par Akoh (1992), Charlemagne et Legoy (1995) ainsi que Ho *et al.* (2000) qui ont montré que plus le tensioactif est hydrophobe moins il réduit la tension de surface.

Tableau V-2: CMC et tensions de surface de solutions aqueuses de monoesters de fructose.

Fructose Esters	Tension superficielle (mN/m)			CMC 20°C (mg/l)	Courbe Concentration Micellaire Critique à 20 °C
	15 °C	20 °C	25 °C		
Fructose mono-caprate C10	26.7	25.5	25.3	73.5	
Fructose mono-myristate C14	26	25.7	25.4	15.3	
Fructose mono-stéarate C18	41	39	35.3	70.8	

La détermination graphique de la CMC des 3 monoesters de fructose à 20 °C montre que la valeur de CMC la plus faible a été obtenue avec le C14. En revanche les 2 autres molécules à base de C10 et C18 donnent des valeurs plus élevées. Des résultats similaires ont été décrits par Novo Nordisk (1999) avec des monoesters de glucose et par Garofalakis *et al.* (2000) avec

des monoesters de xylose. Dans les deux cas les esters de myristate ont donné les plus faibles valeurs de CMC de l'ordre de 0.015 mM.

2.2.2. Cas des mélanges de mono- et di-esters de fructose

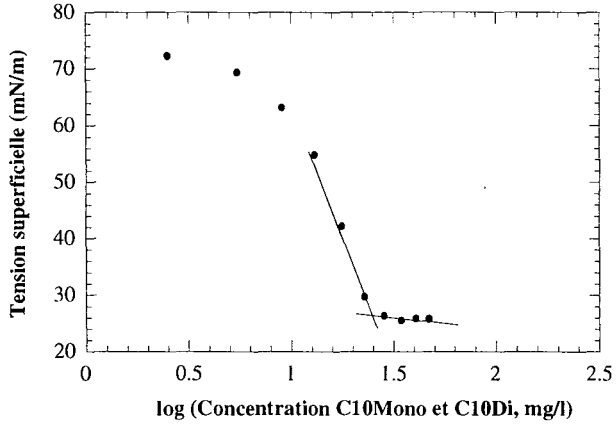
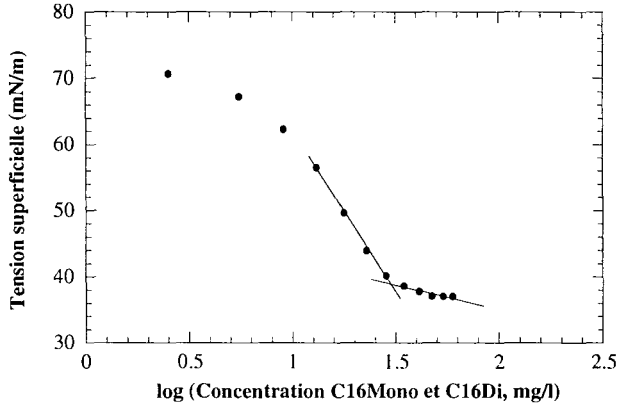
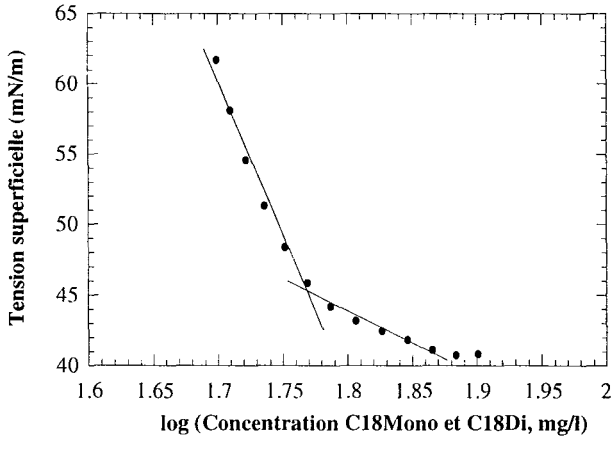
Le **Tableau V-3** montre l'évolution de la CMC et de la tension superficielle de solutions aqueuses à 0.1 % (p/v) contenant des mélanges de mono- et di-esters de fructose.

On constate que la tension superficielle du mélange mono- et di-esters de caprate (C10) n'est pas affectée par l'augmentation de la température alors que celles des mélanges de mono- et di-esters de palmitate (C16) et mono- et di-esters de stéarate (C18) diminuent avec l'augmentation de la température. Les tensions superficielles varient entre 24 et 45 mN/m en passant des courtes aux longues chaînes carbonées de la partie hydrophobe du sucroester. De la même manière que pour les monoesters de fructose purs, ce résultat peut être expliqué par la faible solubilité dans l'eau des sucroesters à longue chaîne carbonée ainsi que celle des diesters par rapport aux monoesters.

De plus, on constate que les tensions de surface obtenues avec les mélanges de sucroesters sont légèrement plus élevées que celles obtenues avec les monoesters purs lorsqu'on travaille avec les sucroesters à longue chaîne carbonée. Ce résultat corrobore les constatations de Husband *et al.* (1998) qui ont obtenu une meilleure réduction de la tension de surface avec le monolaurate de saccharose comparé au diester correspondant. De même, Akoh (1992) a démontré que les polyesters de sucre hautement lipophiles ne permettaient pas de réduire de manière appréciable les tensions de surface par comparaison aux émulsifiants hydrophiles.

La détermination de la CMC des mélanges de mono- et diesters de fructose à 20 °C montre que contrairement aux résultats obtenus avec les monoesters, la CMC augmente avec la longueur de chaîne carbonée du mélange de sucroester. Ces valeurs passent de 25 à 57 mg/l quand la longueur de la chaîne carbonée augmente de C10 à C18. Ces résultats semblent indiquer que l'agrégation des monomères se fait à de faibles concentrations lorsqu'on est en présence de diesters.

Tableau V-3: CMC et tensions de surface de solutions aqueuses de mélanges de mono- et di-esters de fructose.

Fructose Esters	Tension superficielle (mN/m)			CMC 20°C (mg/l)	Courbe Concentration Micellaire Critique à 20°C
	15 °C	20 °C	25 °C		
Fructose mono- et dicaprate C10	24.6	24.5	24.3	25	
Fructose mono- et di-palmitate C16	35	34	29	31	
Fructose mono- et di-stéarate C18	46	42.5	37	57	

En effet, les monocaprate (CMC = 73.5 mg/l) et monostéarate (70.8 mg/l) de fructose donnent des valeurs de CMC plus élevées que lorsqu'ils sont utilisés en mélange avec des diesters (25 et 57 mg/l respectivement). Ce résultat peut être attribué à d'éventuelles interactions

moléculaires entre mono- et diesters ce qui modifierait la forme des micelles et la manière dont elles s'agrègent par comparaison à celles obtenues avec les monoesters purs comme cela a été observé par Husband *et al.* (1998).

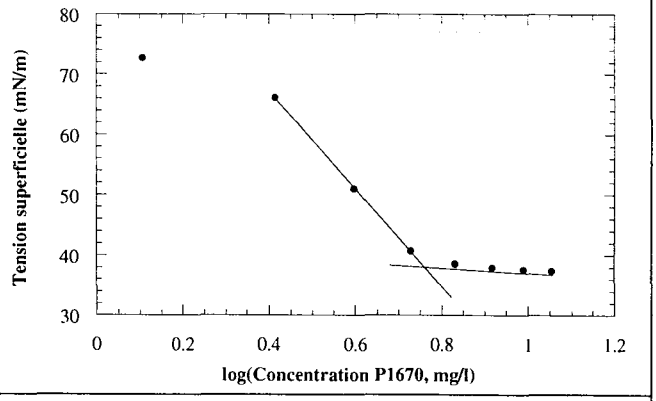
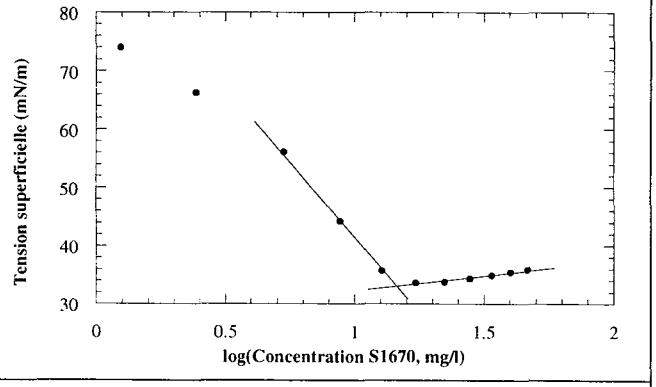
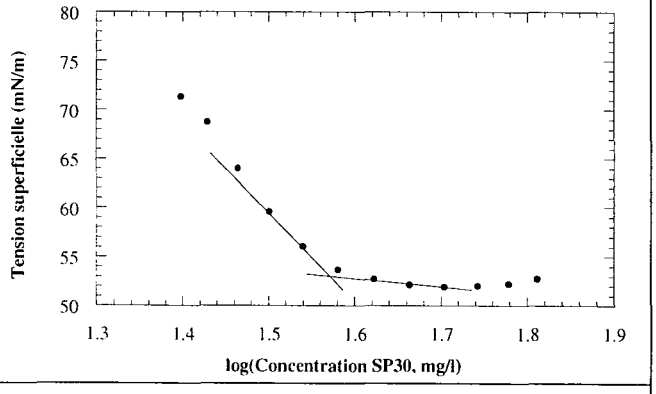
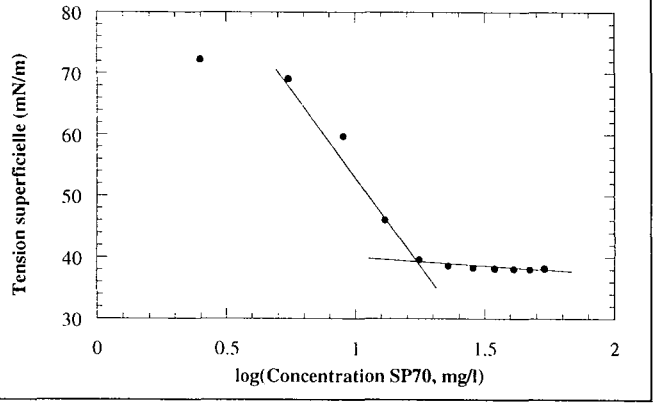
2.2.3. Cas des esters de saccharose du commerce

Le **Tableau V-4** montre l'évolution de la CMC et de la tension superficielle de solutions aqueuses à 0.1 % (p/v) d'esters de saccharose du commerce. On remarque que les tensions superficielles des esters de saccharose du commerce varient entre 34 et 50 mN/m selon la composition en mono- et diesters. De plus, les tensions superficielles des esters de saccharose du commerce ne varient pas de manière significative lorsqu'on augmente la température sauf dans le cas du mélange Sisterna SP30 qui contient majoritairement des esters supérieurs.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de différence significative entre la tension superficielle obtenue avec Ryoto P1670, constitué de palmitates de saccharose, et Ryoto S1670, constitué de stéarates de saccharose. Cependant, dans le cas des mélanges de palmitate et stéarate de saccharose (Sisterna SP30 et SP70), une diminution de la proportion des monoesters par rapport aux diesters aboutit à une augmentation de la tension superficielle. Dans le cas des esters de saccharose, les valeurs les plus faibles de CMC (5.6 mg/l) et de tension de surface (36 mN/m) sont obtenues avec le palmitate de saccharose riche en monoesters (P1670). Dans le cas des esters de fructose, le monomyristate (C14) est le seul sucroester présentant une valeur de CMC voisine de celles obtenues avec les esters de saccharose du commerce. Quant à la tension de surface, tous les monoesters de fructose ainsi que les mélanges de mono- et di-esters de fructose étudiés aboutissent à des valeurs comparables à celles obtenues avec les esters de saccharose du commerce.

En conclusion, les tensions de surface obtenues avec les esters de fructose synthétisés par voie enzymatique sont comparables à celles obtenues avec les esters de saccharose du commerce synthétisés par voie chimique. Il faut noter que l'effet de la température est plus marqué lorsqu'on est en présence de diesters et cet effet est d'autant plus prononcé lorsqu'on travaille avec des sucroesters à longue chaîne hydrophobe.

Tableau V-4: CMC et tensions de surface des esters de saccharose du commerce.

Sucro-esters	Tension superficielle (mN/m)			CMC 20°C (mg/l)	Courbe Concentration Micellaire Critique à 20 °C
	15 °C	20 °C	25 °C		
Sucrose palmitate P1670	37	36	35	5.6	
Sucrose stéarate S1670	38	36	35	14	
SP30	52.5	47.6	44.5	36.1	
SP70	38.2	37.2	34.6	15.9	

2.3. Pouvoir moussant

Le pouvoir moussant est lié à deux paramètres:

- La quantité de mousse formée
- La stabilité de la mousse au cours du temps.

L'étude du pouvoir moussant réalisée au sein de notre laboratoire sur les oléates de fructose à des concentrations comprises entre 0.01 et 1 g/l a montré qu'au-delà de 0.75 g/l la concentration en tensioactif n'a pas d'effet sur le pouvoir moussant (Coulon, 1997). Les esters de saccharose à longue chaîne, utilisés dans notre cas, présentant une limite de solubilité dans l'eau à 20 °C à 0.1 g/l, on a choisi de travailler à cette concentration.

Par conséquent, les mesures ont été réalisées sur des solutions aqueuses à 0.1 g/l de tensioactif. Les pouvoirs moussants des monoesters de fructose purs et en mélange avec les diesters ont été déterminés et comparés à ceux obtenus avec deux esters de saccharose du commerce (P1670 et SP70).

La **Figure V-2** représente la hauteur de mousse formée avec les différents sucroesters à 0 et 45 minutes. Il apparaît que quel que soit le sucroester, la hauteur de mousse diminue au cours du temps et varie aussi bien en fonction de la longueur de chaîne de l'acide gras que de la composition du milieu. En effet, la hauteur de mousse diminue lorsqu'on augmente le nombre de carbone de la partie hydrophobe du sucroester. De plus, la meilleure stabilité de mousse est obtenue avec Ryoto SP70, un mélange de palmitate et de stéarate de saccharose à 70 % de monoesters. Ces résultats peuvent être attribués soit à la nature du groupement hydrophile du sucroester (fructose ou saccharose) soit à la proportion monoester/diester dans la solution.

Ces résultats montrent aussi que les monoesters de fructose purs présentent des hauteurs de mousse plus importantes avec une meilleure stabilité au cours du temps comparés aux mélanges mono- et di-esters de fructose. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Husband *et al.* (1998) qui ont démontré que les monolaurates de saccharose présentent de meilleures propriétés moussantes que les dilaurates de saccharose. Aveyard *et al.* (1994) et Racz *et al.* (1996) ont, de leur côté, démontré l'effet négatif des particules hydrophobes qui

sont généralement utilisées comme des déstabilisants de mousse. Par conséquent, le faible pouvoir moussant des solutions aqueuses contenant des diesters peut être expliquée par leur nature hydrophobe comparés aux monoesters.

On peut également observer que les esters de fructose à courte (C10) et moyenne (C14) chaîne carbonée présentent de meilleures propriétés moussantes comparés aux esters de fructose à longue chaîne carbonée (C18). Ce comportement serait dû à une différence de solubilité dans les solutions aqueuses à 0.1 g/l et à 20 °C ainsi qu'à l'hydrophobicité de ces molécules.

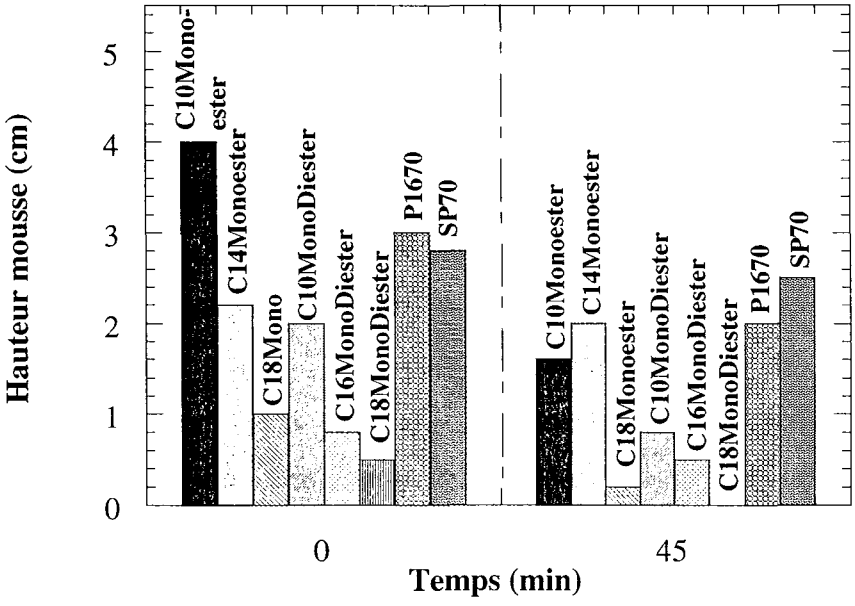


Figure V-2: Détermination du pouvoir moussant à 0.1 g/l d'esters de fructose et d'esters de saccharose du commerce.

Les stabilités de mousse les plus importantes, au bout de 45 minutes, ont été obtenues avec le monomyristate de fructose et le mélange de mono- et dipalmitate de fructose alors que les sucroesters à plus courte chaîne carbonée présentent des hauteurs de mousse initiales très importantes mais très instables au cours du temps.

Par comparaison aux esters de saccharose du commerce, les esters de fructose à courte et moyenne chaîne carbonée présentent des pouvoirs moussants proches et mêmes parfois plus élevés mais avec des mousses de faible stabilité au cours du temps dans le cas des caprates de

fructose. Cependant, les esters de fructose à longue chaîne carbonée ne présentent pas des pouvoirs moussants intéressants.

2.4. Stabilité émulsion

L'étude de la stabilité nécessite la connaissance du type d'émulsion à préparer en fonction du tensioactif utilisé. Cette information peut être obtenue à partir des valeurs de BHL (Balance Hydrophile Lipophile) des différentes préparations.

2.4.1. Calcul de la Balance Hydrophile Lipophile: BHL

La BHL est une caractéristique des tensioactifs qui est étroitement liée à la structure des molécules et, par conséquent, au pouvoir émulsionnant d'un agent tensioactif. La détermination de ce paramètre permet de prédire l'action d'un tensioactif donné en solution.

Le **Tableau V-5** montre les valeurs calculées de BHL des différents sucroesters étudiés.

Tableau V-5: Valeurs calculées de BHL des esters de fructose et de saccharose.

Fructose monoesters			**Fructose mono- et di-esters**			**Esters de saccharose du commerce**			
C10	***C14***	***C18***	***C10***	***C16***	***C18***	***P1670***	***S1670***	***SP30***	***SP70***
10.8	9.2	8.1	8.4	6.6	6.3	14.6*	13.6*	6**	15**

* Valeurs calculées. Les fournisseurs donnent des valeurs de HLB égales à 16 pour les deux sucroesters P1670 et S1670. La différence serait due à la méthode de calcul utilisée.
** Données par le fournisseur. La composition en stéarate et en palmitate n'étant pas connue, les valeurs de HLB n'ont pas pu être calculées.

Les esters de fructose étudiés présentent des valeurs de BHL comprises entre 6 et 11. D'après Marcou (1989) ce sont des émulsifiants de type huile dans eau et des agents mouillants comme le montre le **Tableau V-6**. Par conséquent, on étudiera uniquement l'effet des sucroesters sur la stabilité des émulsions H/E.

Tableau V-6: Résumé des intervalles de BHL et des applications possibles des tensioactifs (d'après Marcou, 1989).

Intervalle BHL	Application possible
3 à 6	Emulsifiant E/H
7 à 9	Agent mouillant
8 à 13	Emulsifiant H/E
13 à 15	Agent détergent
15 à 18	Agent solubilisant

2.4.2. Stabilité des émulsions huile de colza/eau

Les émulsions huile de colza/eau préparées en absence de tensioactif sont très instables et présentent une séparation de phase totale après quelques minutes seulement. On s'est donc proposé de déterminer la capacité des esters de fructose et des esters de saccharose du commerce à stabiliser ce type d'émulsion à 0.5 % (p/v) de tensioactif et à 20 °C. Le pourcentage de séparation de phase a été suivi en fonction du temps.

La **Figure V-3** montre que seul le monocaprate de fructose est capable de stabiliser ce type d'émulsion avec moins de 6 % de séparation de la phase huile au bout de 2 heures. La séparation de phase se maintient à cette valeur au bout de 24 heures. Le mélange mono- et di-esters de caprate présente, par contre, une séparation de la phase huile de l'ordre de 40 % au bout de 24 heures. Des résultats similaires ont été obtenus par Herrington *et al.* qui ont montré que les mélanges contenant des pourcentages élevés en monoesters de saccharose formaient des émulsions H/E plus stables. La mauvaise stabilité des émulsions a été attribuée à la faible solubilité, dans l'eau, des mélanges d'esters de saccharose contenant des diesters et des esters supérieurs. Par conséquent, la composition des mélanges de sucroesters semble jouer un rôle important dans la stabilisation des émulsions des mélanges contenant des mono- et diesters.

Dans le cas des esters de fructose à plus longue chaîne carbonée, une séparation totale des phases est obtenue au bout de quelques minutes seulement confirmant ainsi les résultats obtenus par Ducret *et al.* (1996). En effet, ces auteurs ont montré que le monolaurate de sorbitol (C12) permet d'obtenir des émulsions H/E plus stables que celles obtenues avec le monoerucate de sorbitol (C21). Les résultats obtenus peuvent être expliqués par une meilleure solubilité dans l'eau des esters de fructose à courte chaîne carbonée et une micellisation (micelles inverses et phase lamellaire) dans le cas des sucroesters à longue chaîne carbonée

lorsqu'ils sont préparés dans une solution aqueuse. Par conséquent, ces derniers pourraient ne pas être disponibles pour s'adsorber à l'interface huile/eau.

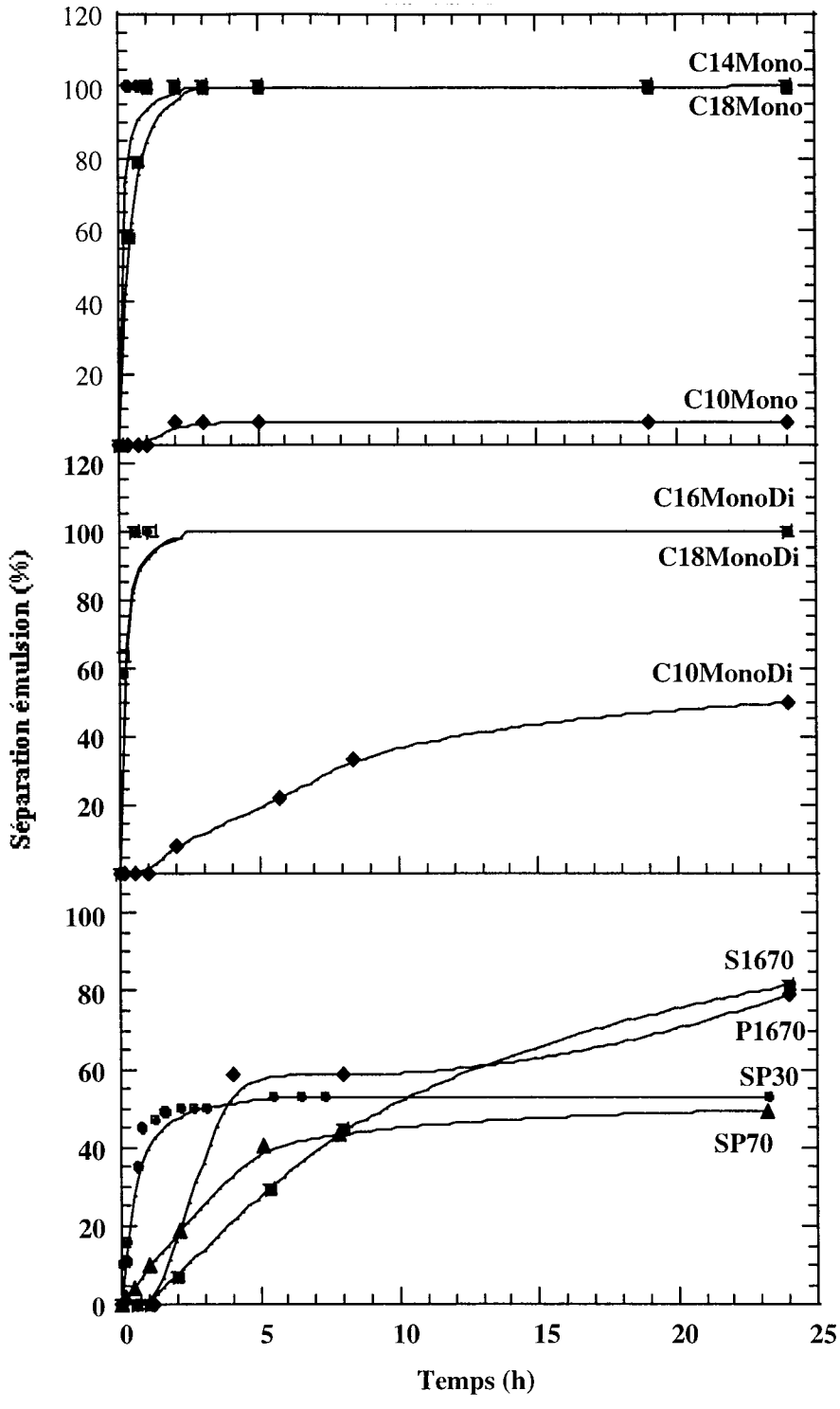


Figure V-3: Stabilisation des émulsions Huile de colza/Eau à 0.5 % (p/v) avec des esters de fructose et des esters de saccharose du commerce.

Dans le cas des esters de saccharose du commerce, la meilleure stabilité de l'émulsion est obtenue avec le mélange palmitate et stéarate de saccharose SP70 à 70 % de monoesters. Cependant, lorsqu'on travaille avec S1670, contenant également la même proportion de monoesters, l'émulsion obtenue est moins stable montrant un effet plus important de la longueur de chaîne et un éventuel effet de synergie lorsqu'on travaille avec des mélanges de sucroesters.

La comparaison des esters de fructose et de saccharose du commerce, montre que les monocaprates de fructose purs et en mélange avec les diesters correspondants sont les meilleurs stabilisants des émulsions huile de colza/eau à 0.5 % (p/v) et 20 °C. Les tensioactifs constitués de groupements hydrophobes plus importants stabiliseraient plutôt des émulsions type E/H.

3- Conclusion du Chapitre V

Cette partie du travail montre que les esters de fructose synthétisés par voie enzymatique présentent de bonnes activités de surface.

L'évolution des tensions interfaciales en fonction du temps des esters de fructose est comparable à celle de l'ester de saccharose Sisterna SP30. Les plus faibles valeurs étant atteintes avec les esters de saccharose SP70, P1670 et S1670. Ce comportement peut être attribué à la composition variable des différents mélanges ainsi qu'à la solubilité des esters de sucre dans les deux phases aboutissant à une migration plus ou moins importante des différents composés vers la phase huile en fonction du temps.

Les tensions de surface les plus faibles sont obtenues avec les esters de fructose, en particulier les monocaprates de fructose. En considérant cette propriété, les esters formés à partir de monosaccharides aboutissent à des performances comparables par rapport aux esters de saccharose du commerce contenant 70 % de monoesters. De plus, ce travail montre que les valeurs de CMC des mélanges de mono- et di-esters sont comparables à celles obtenues avec l'ester de saccharose Sisterna SP30. La plus faible valeur de CMC est atteinte avec l'ester de saccharose Ryoto P1670. En considérant cette propriété, les monomyristates de fructose possèdent la valeur de CMC la plus proche de celle des esters de saccharose du commerce.

Le pouvoir moussant des esters de fructose à courte chaîne carbonée est comparable à celui obtenu avec l'ester de saccharose Ryoto P1670 au bout de 45 minutes. Cependant, le monocaprate de fructose est le meilleur agent moussant à 0 minute.

Enfin, la perte de la stabilité de l'émulsion H/E semble être due principalement à la longueur de la chaîne carbonée. De plus, la capacité des esters de fructose à courte chaîne carbonée (C10) à stabiliser les émulsions H/E dépasse largement celle des esters de saccharose du commerce. Par conséquent, les valeurs de HLB peuvent être utilisées comme indicateurs du comportement d'un agent émulsifiant mais la capacité d'un émulsifiant à stabiliser une émulsion donnée ne peut être déterminée que de manière expérimentale. Ainsi, il se révèle qu'il est relativement difficile de prédire la stabilité des émulsions lorsqu'on travaille avec des mélanges de sucroesters sachant que la stabilité d'une émulsion dépend de plusieurs paramètres (pourcentage de chaque composé, pourcentage des phases huile et eau, température, pH...).

L'ensemble de ces conclusions peut être remis en cause au cours de l'utilisation de ces molécules dans des formulations plus complexes. En effet, d'autres mécanismes d'interaction avec des protéines et polysaccharides par exemple peuvent soit stabiliser le système qui était instable soit le déstabiliser totalement. Les résultats obtenus dans ce chapitre ne donnent que des indications sur les potentialités de ces molécules et leur utilisation nécessite de tenir compte de l'effet matrice d'incorporation.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

CONCLUSION-PERSPECTIVES

L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans le cadre plus général de la maîtrise des procédés de synthèse des principes actifs par voie enzymatique en milieu organique. Ces procédés sont prometteurs soit pour remplacer les procédés chimiques relativement polluants et moins sélectifs, soit pour synthétiser de nouvelles molécules avec de nouvelles propriétés fonctionnelles grâce à la sélectivité des biocatalyseurs utilisés.

Notre travail a été focalisé plus particulièrement sur les réactions de synthèse des esters de fructose en présence de différents acides gras de longueur de chaîne carbonée variant entre C8 et C18. Le catalyseur utilisé est le Novozym 435 (*Candida antarctica* immobilisée). Le méthyl-2 butanol-2 (M2B2) a été utilisé comme solvant. Les réactions ont été menées dans un réacteur parfaitement agité en mode discontinu ou alimenté par intermittence avec du fructose.

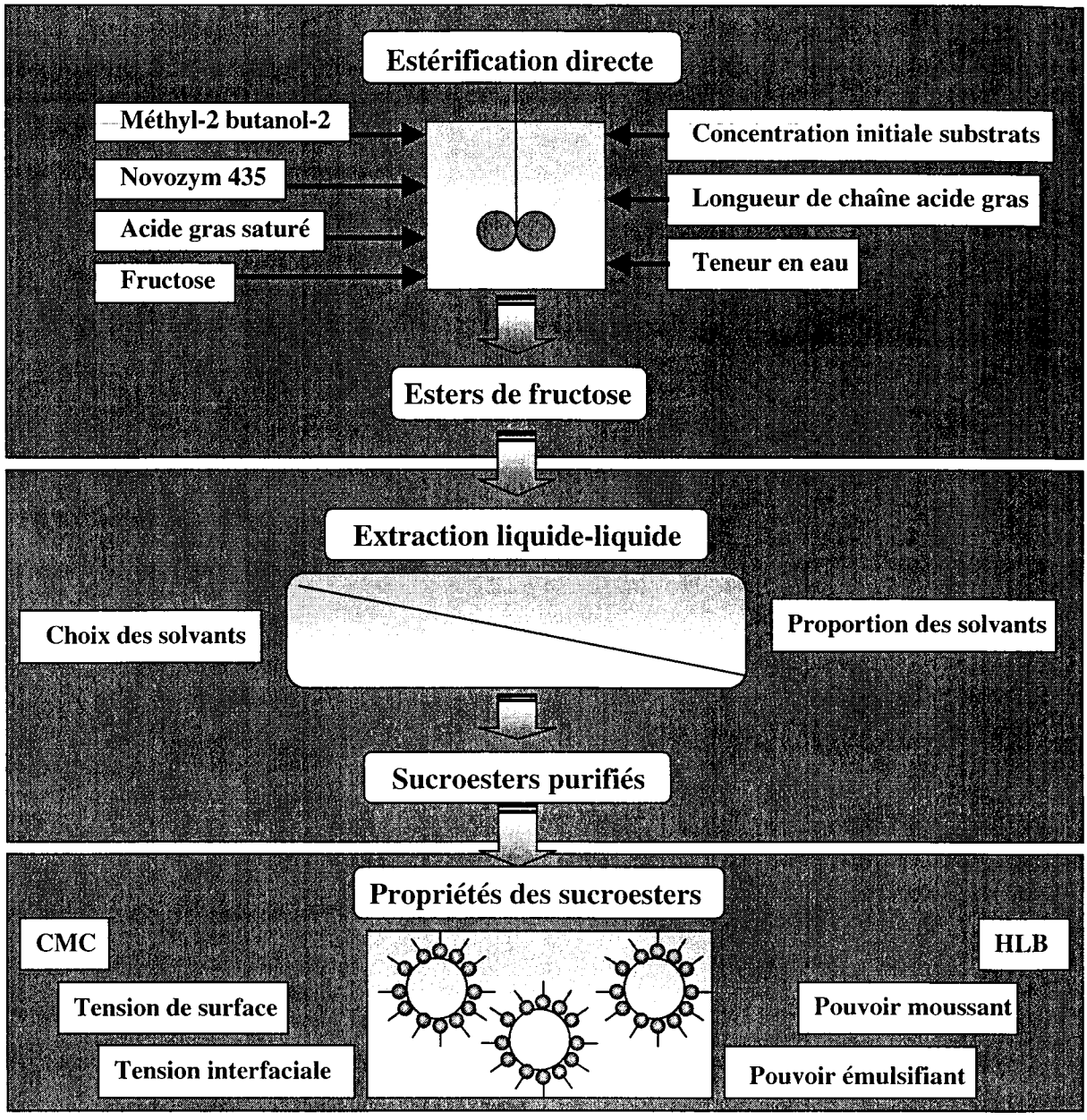
Trois objectifs principaux ont été fixés:

- Fournir les données cinétiques de base de ces réactions de synthèse afin de quantifier l'influence des concentrations des substrats, de la longueur de la chaîne carbonée et du mode de conduite de la réaction sur la spécificité et la sélectivité de l'enzyme ainsi que sur les équilibres thermodynamiques de la réaction (taux de conversion, concentration finale..).

- Définir un procédé de séparation simple permettant d'éliminer les substrats résiduels des produits formés tout en minimisant la quantité de solvants mise en jeu. Dans cette étude on s'intéresse uniquement aux monoesters de fructose.

- Caractériser les principales propriétés tensioactives des sucroesters obtenus et les comparer à celles des esters de saccharose dans le but de donner des indications sur les niches potentielles d'applications de ces molécules.

La démarche générale adoptée dans ce travail est représentée dans la figure suivante:



Résultats de l'étude Cinétique de synthèse des sucroesters

Cette partie de l'étude nous a permis de formuler les conclusions suivantes par rapport aux questions évoquées dans notre introduction.

- Les résultats obtenus ont montré que la lipase CAL-B ne présente pas une spécificité prononcée vis-à-vis d'une large gamme d'acides gras saturés (C8-C18). En effet, les vitesses de réaction, à 30 min par exemple, sont comparables quel que soit le nombre de

carbones de l'acide gras étudié. Ainsi, la différence de consommation d'acide gras en g/g enzyme.h n'est que de l'ordre de 1 à 2 mM lorsqu'on passe de l'acide caprylique à l'acide stéarique et ceci quelle que soit la concentration initiale en acide gras.

- En absence d'élimination de l'eau, la vitesse de consommation de l'acide gras varie entre 1 et 6 mM/g enzyme.h lorsque les concentrations initiales en acide gras augmentent de 140 à 700 mM. La réduction du niveau d'eau du milieu par ajout de tamis moléculaire améliore l'activité de la lipase CAL-B. Les réactions sont deux fois plus rapides et l'effet de la longueur de la chaîne carbonée persiste. Ces résultats indiquent donc clairement que la concentration initiale en acide gras affecte l'activité de cette enzyme.

- Les rendements de conversion du fructose et des acides gras dans les conditions d'accumulation de l'eau et à concentrations équivalentes entre les deux substrats sont faibles. Cependant, en présence d'un excès d'acide gras la conversion du fructose peut être totale. Ainsi, elle passe de 40 à 90 % lorsque la concentration d'acide caprylique augmente de 140 à 700 mM. En revanche, un accroissement de la concentration initiale du sucre n'entraîne qu'une légère modification au niveau de la conversion de l'acide gras. En présence de tamis moléculaire, les conversions des deux substrats avoisinent les 100 % quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée. Ces résultats montrent que la nature de l'acide gras joue un rôle mais il est mineur par comparaison à l'effet de l'eau.

- En absence de contrôle de l'eau, la concentration finale en sucroesters augmente avec l'augmentation de l'acide gras et elle est indépendante de l'apport initial en fructose. A faible niveau d'eau (tamis moléculaire), ces concentrations sont très élevées de l'ordre de 120 à 140 g/l. Ces résultats confirment le rôle de l'hydrophobicité et du niveau d'eau du milieu.

- La proportion en monoesters est aussi contrôlée par le niveau de l'eau et de la longueur de la chaîne carbonée (hydrophobicité). En présence d'un excès de fructose et/ou avec un acide gras à faible longueur de chaîne carbonée, on obtient essentiellement des monoesters. Pour une concentration donnée, l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée favorise la formation des diesters. Cette tendance est accentuée à fortes

concentrations. L'élimination de l'eau du milieu désavantage la formation des monoesters même en présence des acides gras à courte chaîne.

Il ressort de cette étude que les performances de la synthèse enzymatique des sucroesters peuvent être améliorées considérablement par l'intermédiaire d'un choix judicieux de l'environnement de la réaction de synthèse. Ainsi, si l'objectif est d'atteindre des conversions et des concentrations élevées, il est nécessaire de maintenir la teneur en eau du milieu à un niveau très faible. Par contre, si l'objectif est de favoriser la synthèse des monoesters, l'eau et l'hydrophobicité du milieu doivent être contrôlées à d'autres niveaux qui restent à déterminer. Les ajouts successifs de fructose sont également bénéfiques à cette réaction. Cette procédure a été préférée à un seul ajout au début de la réaction pour éviter des problèmes liés à des limitations de transfert de matière et l'abrasion de l'enzyme.

Purification des monoesters de fructose

A la fin de la synthèse, le milieu réactionnel contient divers composés qu'il faut séparer afin de purifier les monoesters de fructose. La première étape a consisté à séparer l'enzyme par une simple filtration sur verre fritté. Le fructose résiduel a ensuite été séparé des autres composés par extraction liquide-liquide à l'eau, à 60 °C et sous agitation. En effet, dans ce cas le solvant de synthèse constitue la phase organique du système d'extraction. Lorsque l'eau et le milieu filtré ont été utilisés à volume égal, on a pu éliminer la presque totalité du fructose dans la phase aqueuse sans perte de sucroesters et acides gras qui restent dans la phase M2B2. Enfin, les monoesters ont été séparés du reste des composés (acide gras et diesters) à partir du milieu de synthèse sans fructose par extraction liquide-liquide. Dans ce cas, le système d'extraction qui a été retenu est constitué d'hexane et d'un mélange acétonitrile/eau avec des proportions variables en fonction de la longueur de chaîne du sucroester à séparer.

En guise de conclusion à cette étude, nous pouvons retenir les constations suivantes:

- Le système d'extraction utilisé a permis d'atteindre des puretés finales des monoesters de fructose de l'ordre de 99 % avec moins de 7 % de pertes dans la phase hexane en fonction du monoester à extraire. Par conséquent, le protocole de purification proposé peut être considéré comme adapté à l'extraction des monoesters de fructose.

- Dans les conditions d'extraction retenues, la totalité du fructose a été éliminée avec de l'eau évitant ainsi l'apport d'un solvant supplémentaire au système.

Par la suite, le système proposé pour la purification des monoesters a permis d'éliminer dans la phase légère les diesters dés la première extraction et la totalité de l'acide gras au bout de 2 à trois étapes d'extraction. Le nombre limité d'extractions permet ainsi de minimiser les volumes de solvants organiques utilisés tout en obtenant des résultats appréciables tant du point de vue puretés (> 99 %) que taux de récupération (> 93 %). De plus, à la fin de l'extraction, les solvants peuvent être recyclés.

En outre, les protocoles de séparation proposés sont faciles à mettre en œuvre et réalisables directement dans le réacteur de synthèse.

- Le système d'extraction proposé a permis de séparer de manière sélective les monoesters. Cependant, la totalité des diesters reste mélangée aux acides gras résiduels.

Propriétés des monoesters de fructose

La dernière étape de ce travail a consisté à étudier quelques propriétés tensioactives des monoesters purifiées et nous a permis de tirer les conclusions suivantes:

- Les propriétés tensioactives dépendent de la longueur et de l'hydrophobicité du sucroester mais aussi de la composition du milieu. En particulier, la stabilité de l'émulsion H/E et le pouvoir moussant semblent être principalement liés à la longueur de la chaîne carbonée sans doute à cause de la variation de la solubilité des tensioactifs en fonction de leur longueur de chaîne hydrophobe.

- Les propriétés tensioactives varient selon qu'on travaille avec des monoesters purs ou en mélange avec des diesters. En effet, certaines propriétés comme la CMC semblent être améliorées avec la présence de diesters alors que d'autres propriétés telles que la stabilité de l'émulsion H/E et les tensions superficielles semblent être défavorisées en présence de ces molécules hydrophobes.

- L'évolution des tensions interfaciales en fonction du temps des esters de fructose est comparable à celle de l'ester de saccharose Sisterna SP30. Les plus faibles valeurs étant atteintes avec les esters de saccharose du commerce SP70, P1670 et S1670.

Cette partie de l'étude nous a permis de montrer que les esters formés à partir de monosaccharides abaissent la tension de surface de la même manière que les esters de saccharose du commerce contenant 70 % de monoesters. De plus, les valeurs de CMC des mélanges de mono- et di-esters sont comparables à celles obtenues avec l'ester de saccharose Sisterna SP30. La plus faible valeur de CMC est atteinte avec l'ester de saccharose Ryoto P1670. En considérant cette propriété, les monomyristates de fructose possèdent la valeur de CMC la plus proche de celle des esters de saccharose du commerce.

Le pouvoir moussant des esters de fructose à courte chaîne carbonée est comparable à celui obtenu avec l'ester de saccharose Ryoto P1670 au bout de 45 minutes. Cependant, le monocaprate de fructose est le meilleur agent moussant à 0 minute.

De plus, la capacité des esters de fructose à courte chaîne carbonée (C10) à stabiliser les émulsions H/E dépasse largement celle des esters de saccharose du commerce.

❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋❋

Pour compléter et affiner les conclusions obtenues dans ce travail, un certain nombre de perspectives peuvent être formulées.

Du point de vue cinétique

Lors de cette étude on a observé que les performances de la réaction sont affectées par le niveau de l'eau, l'hydrophobicité du milieu et les concentrations en substrats. Il serait donc intéressant de mener des investigations supplémentaires selon ces directions:

♦ ***Effet de l'eau***:

Deux directions peuvent être envisagées. Tout d'abord du point de vue procédé, l'ajout de tamis moléculaire dans le réacteur n'est valable qu'à l'échelle du laboratoire. Il serait donc intéressant de mettre au point une technique extrapolable à l'échelle industrielle, tels que la

pervaporation, le bullage avec un gaz sec, l'utilisation d'une boucle externe de tamis moléculaire... Il est vraisemblable qu'il faut évaporer sous vide l'eau et une partie du solvant avant de procéder à la phase de déshydratation.

Du point de vue scientifique, il serait intéressant de déterminer le niveau d'eau optimum pour l'activité de la lipase de *Candida antarctica*. Cependant, cette étape n'est possible que si un système de déshydratation permettant de fixer différents points consignes du niveau d'eau ait été mis au point.

- ***Hydrophobicité***:

Nos résultats ainsi que certaines données de la littérature mettent en évidence que l'hydrophobicité du milieu affecte la sélectivité de la lipase de *Candida antarctica*. Il serait donc intéressant de réaliser des essais à hydrophobicité constante quelles que soient les concentrations des substrats et la longueur de la chaîne carbonée. Ceci peut être obtenu par la substitution d'une fraction de méthyl-2 butanol-2 par un cosolvant qui n'affecte ni l'activité de l'enzyme ni la solubilité des substrats.

- ***Conduite du réacteur***:

Les concentrations initiales des substrats affectent l'hydrophobicité du milieu et par conséquent, les performances de la réaction, particulièrement la sélectivité entre mono- et di-esters. Il serait donc pertinent de tester différents modes de conduite de réacteur particulièrement alimentation en continu ou par intermittence en acide gras et en fructose.

L'ensemble de ces essais devrait être réalisé une fois le système, permettant de contrôler le niveau de l'eau constant tout au long de la réaction, a été mis au point.

Du point de vue purification

Il faut chercher un système d'extraction liquide-liquide qui permet de séparer le monoester et le diester des substrats résiduels et de vérifier la faisabilité de ce procédé en continu. D'autres techniques peuvent être considérées tels que la cristallisation, le CO_2 supercritique ou la distillation moléculaire.

Du point de vue propriétés des sucroesters

Les résultats obtenus ne constituent que des indications sur les performances des sucroesters synthétisés. Il serait intéressant de les étudier en présence de la matrice d'applications car les autres composés (polysaccharides, protéines...) de la formulation peuvent être à l'origine de différentes interactions qui peuvent changer totalement le comportement de ces tensioactifs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achard, C., Gros, J.B. et Dussap C.G. Prédiction de l'activité de l'eau, des températures d'ébullition et de congélation de solutions aqueuses de sucres par un modèle UNIFAC. *Cahier scientifique – I.A.A.* 1992.

Adam, W., Groer, P. et Saha-Möller, C.R. Enzymatic preparation of optically α-methylene β-lactones by lipase-catalyzed kinetic resolution through asymmetric transesterification. *Tetrahedron: asymmetry*. 1997. **8**(6), 833-836.

Addo, K., Slepak, M. et Akoh, C.C. Effects of sucrose fatty acid ester and blends on alveograph characteristics of wheat flour doughs. *J. Cereal Sc.* 1995, **22**, 123-127.

Adelhorst, K., Björkling, F. et Godfredsen, O.K. Enzyme catalyzes preparation of 6-O-acylglucopyranosides. *Synthesis*, 1990, **2**, 112-115.

Adlercreutz, P. et Mattiasson, B. Lipase catalyzed esterification of lactic acid. *Biotechnol. Lett.*, 1997, **19**(4), 315-317.

Akoh, C.C. Emulsification properties of polyesters and sucrose ester blends I: Carbohydrate fatty acid polyesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1992, **69**, 9-13.

Akoh, C.C. et Mutua, L.N. Synthesis of alkylglycoside fatty acid esters: Effect of reaction parameters and the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acid. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, **16**(2), 115-119.

Akoh, C.C. et Swanson, B.G. One stage synthesis of raffinose fatty acid polyesters. *J. Food Sci.* 1987, **52**(6), 1570-1576.

Akoh, C.C. et Swanson, B.G. Preparation of trehalose and sorbitol fatty acid polyesters by interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1989, **66**(11), 1581-1587.

Albano, G.E., Lorica, R.G., Pama, M. et De Leon, L. Solventless synthetic methods for methyl glucoside and sorbitol esters of coconut fatty acids. *Phil. J. Coco. Stud.* 1980.**1**, 51-62.

Allen, D.K. et Tao, B.Y. Carbohydrate-alkyl ester derivatives as biosurfactants. *J. Surfact. Deterg.* 1999, **2**, 383-390.

Anonyme. Tensioactifs naturels: sucroesters et APG en forte croissance. *Parf. Cosm. Act.* 1998. **139**, 44-48.

Arcos, J.A., Bernabé, M. et Otero, C. Quantitative enzymatic production of 1,6-diacyl fructofuranoses. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998a, **22**, 27-35.

Arcos, J.A., Bernabé, M. et Otero, C. Quantitative enzymatic production of 6-O-acylglucose esters. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998b, **57**(5), 505-509.

Arcos, J.A., Hill, C.G. et Otero, C. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. *Biotechnol. Bioeng.* 2001, **73**(2), 104-110.

Aveyard, R., Binks, B.P., Fletcher, P.D.I. et Rutherford, C.E. Contact angles in relation to the effects of solids on film and foam stability. *J. Dispersion Sci. Technol.* 1994 **15**, 251-271.

Baker, I.J.A., Matthews, B., Suares, H., Krodkiewska, I., Neil Furlong, D., Grieser, F. et Drummond, C.J. Sugar fatty acid ester surfactants: Structure and ultimate aerobic biodegradability. *J Surf. Det.* 2000, **3**(1), 1-10.

Bares, M. et Zajic, J. Esters of fatty acids with saccharose. IX. Influence of water in the course of the reaction between palmitic acid methylester and saccharose. *Sci. Pap. Inst. Chem. Technol.* 1968. **21**, 55-63.

Barfoed, M. et Skagerlind, J. Enzymatic synthesis of sugar alcohol esters. 1994. *WO 94/12651.*

Benedetti, F., Berti, F., Linda, P., Miertus, S. et Sabot, A. Modeling of solvent effects in the activation of the lipase from *Rhizomucor miehei. Biorog. Med. Chem. Lett.* 1996. **6**(7), 839-844.

Benzonana, G. et Desnuelle, P. Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur les triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochim. Biophys. Acta.* 1965. **105**, 121-136.

Berger, M., Laumen, K. et Schneider, M.P. Lipase-catalyzed esterification of hydrophilic diols in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, 1992, **14**(7), 553-558.

Berthelot, M. Sur les combinaisons des sucres avec les acides ou les saccharides. *Ann. Chim. Phys.* 1860. **3**(60), 93-104.

Björkling, F., Godtfredsen, S.E. et Kirk, O. A highly selective enzyme-catalyzed esterification of simple glucosides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1989, **14**, 934-935.

Bloomer, S., Adlercreutz, P. et Mattiasson, B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, **14**, 546-552.

Bloomer, S.D., Benson, R.D., Kolstad, J.J. et Tsobanakis, P., Method for preparation of purified monoglycerides and products. 1999. *United State Patent, n° 5 859 270.*

Blow, D. More of the catalytic triad. *Nature.* 1990. **343**, 694-695.

Bolanos, J.F. et Iglesias Guerra, F. Synthesis of special surfactants. *VIII., Tens. Deter.* 1986. **23**(3), 145-149.

Bolanos, J.F. et Iglesias Guerra, F. Synthesis of special surfactants. *XII., Tens. Surf. Deter.* 1987. **24**(3), 164-166.

Bolanos, J.F. et Bueno Iborra, N. Tensioactivos. *XVI., Grasas y Aceites.* 1988. **39**(2), 92-95.

Bornscheuer, U.T., Lipase catalyzed synthesis of mono-acylglycerols. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1995, **17**(7), 578-586.

Bourhim, A., Czernecki, S. et Krausz, P. Selective monoesterification of unprotected mono and disaccharides. *J. Carb. Chem.* 1993, **12**(7), 853-863.

Bourquelot, E. et Bridel, M. Action de l'émulsine sur la gentiopicrine en milieu alcoolique. *J. Pharm. Chim.* 1911, **4**, 385-390.

Bousquet, M.P., Willemot, R.M., Monsan, P. et Boures, E. Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermo-cosmetic applications. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **63**(6), 730-736.

Brink, L.E.S. et Tramper, J. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 1985, **27**, 1258-1269.

Brooks, G. Advantages of sucrose esters in formulating cosmetic creams and lotions. *Cosm. Toil.* 1980, **95**, 73-76.

Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turtunburg, J.P., Bjorkling, F., Huge,-Jensen, B., Paktar, S.A. et Thim, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature.* 1991. **351**, 491-494.

Cabridenc, R. La biodégradabilité des agents de surface. *L'Act. Chim.* 1996, **2**(3), 49-53.

Cambillau, C., Longhi, S., Nicolas, A. et Martinez, C. Acyl glycerol hydrolases, inhibitors, interface and catalysis. *Curr. Opin. Structur. Biol.* 1996. **6**, 449-455.

Cao, L., Fischer, A., Bornscheuer, U.T. et Schmid, R.D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters. *Biocatal. Biotrans.*, 1997, **14**, 269-283.

Cao, L., Bornscheuer, U.T. et Schmid, R.D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1999, **6**, 279-285.

Carrea, G., Riva, S., Secundo, F. et Danieli, B. Enzymatic synthesis of various 1'-O-sucrose and 1-O-fructose esters. *J. Chem. Perkin Trans.*, 1989, **1**, 1057-1061.

Carrea, G., Ottolina, G. et Riva, S. Rôle of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *TIBTECH*, 1995, **13**, 63-70

Chabredier, I., Cote, G. et Bauer, D. Application des méthodes d'extraction liquide-liquide à la purification du ricinoléate de méthyle provenant de l'huile de ricin. *Récents progrès en génie des procédés.* 1987. **1**(2), 164-170.

Charlemagne, D. et Legoy, M.D. Enzymatic synthesis of polyglycerol fatty acid esters in a solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1995, **72**, 61-65

Chevandier, F., Dubreucq, E. et Galzy, P. Lipase catalysed synthesis of propanediol monoesters in biphasic aqueous medium. *Biotechnol. Lett.*, 1997, **19**(9), 913-917.

Chopineau, J., Therisod, M. et Klibanov, A.M. Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in a nonaqueous medium. *Biotechnol. Bioeng.*, 1988, **31**, 208-214.

Chortyk, O. Chemically synthesized sugar esters for the control of soft-bodied arthropods. 1996. *WO 96/01832.*

Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Delorme, P. et Willemot, R.M. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS Lett.*, 1990, **276**, 181-184.

Claon, P.A. et Akoh, C.C. Enzymatic synthesis of geranyl acetate in n-hexane with *Candida antarctica* lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994, **71**(6), 575-578.

Colombié, S., Tweddell, R.J., Condoret, J.S. et Marty, A. Water activity control: a way to improve the efficiendy of continuous lipase esterification. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **60**(3), 362-368.

Colson, R. Autres applications des sucroesters et des sucroglycérides en cosmétique et en parfumerie. *Parf. Cosm. Sav.* 1961, **4**(10), 405-408.

Coulon, D., Girardin, M., Rovel, B. et Ghoul, M. Comparison of direct esterification and transesterification of fructose by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol. Lett.* 1995, **16**(2), 183-186.

Coulon, D. Etude d'un procédé de synthèse enzymatique d'esters de sucre et d'acides gras. *Thèse de l'INPL,* Nancy, 1997.

Coulon, D., Girardin, M. et Ghoul, M. Enzymic synthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors. *Process Biochem.*, 1999, **34**, 913-918.

Cruces, M.A., Plou, F.J., Ferrer, M., Bernabé, M. et Ballesteros, A. Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2001, **78**(5), 541-546.

Degn, P., Pedersen, L.H., Duus, J. et Zimmermann, W. Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in *tert*-butanol. *Biotechnol. Lett.* 1999, **21**, 275-280.

Della Valle, F. et Romeo, A. New polysaccharide esters. 1989. *WO 8910940.*

Destain J., Roblain D., Thonart P., Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica. Biotechnol. Lett.*, 1997, **19**(2), 105-107.

Donnelly, M.J. et Bulock, J.D. Sucrose esters as model compounds for synthetic glycolipid surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988. **65**(2), 284-287.

Donnelly, M.J. et Bulock, J.D. The synthesis of sucrose esters from telomer monocarboxylic acids. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1994. **61**, 187-195.

Dordick. J.S. Principles and selected applications of nonaqueous enzymology. In Applied Biocatalysis. Manch, H.W., Clarck, D.S. Eds Marcel Dekker. N.Y. 1991.pp 1-51.

Dordick, J.S., Hacking, A.J. et Khan, R.A. Sucrose 6,4'-dicarboxylic esters. 1993, *United States Patent, n° 5 270 460.*

Drummond, C.J. et Wells, D. Nonionic lactose and lactitol based surfactants: comparison of some physicochemical properties, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 1998, **141**, 131-142.

Duan, G., Ching, C.B., Lim, E. et Aug, C.H. Kinetic study of enantioselective esterification of ketoprofen with n-propanol catalyzed by lipase in organic medium. *Biotechnol. Lett.* 1997.**19**(11), 1051-1055.

Ducret, A., Giroux, A., Trani, M. et Lortie, R. Enzymatic preparation of biosurfactants from sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, **48**, 214-221.

Ducret, A., Lortie, R. et Trani, R. Preparation of sugar and sugar alcohol esters using *Candida antarctica* lipase, esterase or protease in an organic system with continuous water removal under reflux. 1996. *CA 2 149 935.*

Dudal, Y. et Lortie, R. Influence of water activity on the synthesis of tiolein catalyzed by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, **45**, 129-134.

Duell, H.E. Enhancing the absorption of orally administered medicament with disaccharide fatty acid esters.1964, *United State Patent, n° 3 160 565.*

Egloff, M.F., Ransac, S., Marguet, F., Rogalska, E., Van Tilbeurgh, H., Buono, G., Cambillau, C. et Verger, R. Enzymes lipolytiques et lipolyse. *OCL.* 1995. **2**(1), 52-67.

Entressangles, B. Les polyesters de saccharose ou sucroesters: Aspects chimiques et alimentaires. *L'alimentation et la vie.* 1987, **72**, 46-51.

Erbeldinger, M., Ni, X. et Halling, P.J. Enzytmatic synthesis with mainly undissolved substrates at very high concentrations. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1998, **23**, 141-148.

Ergan, F. Trani, M. et Andre, G. Solvent free triglyceride synthesis using lipozyme® IM-20. *Biotechnol. Biolett.*, 1988, **10**, 629-634.

Faber, K. Selectivity-enhancement of hydrolase reactions. *Biocatal.*, 1993, **8**, 91-132.

Fabre, J., Monsan, P. et Perie, J. Regiospecific enzymic acylation of butyl-α-D-glucopyranoside. *Carbohydrate Res.*, 1993, **243**(2), 407-411.

Feuge, R.O., Zeringue, H.J. et Weiss, T.J. Preparation of sucrose esters by transesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1970. **47**, 56-60.

Feuge, R.O. et Zeringue, H.J. Method of purifying fatty acid ester products. 1983, *United State Patent, n° 4 377 686.*

Flack E.A. et Krog, N. The functions and applications of some emulsifying agents commonly used in Europe. *Food Trade Rev.* Août 1970, 27-33.

Fredenslund, A., Russel, L.J. et Prausnitz, J.M. Group contribution estimation of activity coefficients in non ideal liquid mixtures. *AIChE Journal.* 1975, **21**(6), 1086-1099.

Fregapane, G., Sarney, D.B et Vulfson, E.N. Enzymatic solvent-free synthesis of sugar acetal fatty acid esters. *Enzyme. Microb. Technol.*, 1991, **13**, 796-800.

Fregapane, G., Sarney, D.B., Greenberg, S.G., Knight, D.J. et Vulfson, E.N. Enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their comparison with conventional products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, **71**(1), 87-91.

Galleymore, H.R., James, K. et Jones, H.F. Process for the production of a surfactant containing sucrose esters. 1980. *EP 0031191.*

Galleymore, H.R., James, K. et Jones, H.F. Process for the production of a surfactant containing sucrose esters. 1981. *United State Patent, n° 4 298 730.*

Gandhi, N.N. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997. **74**(6), 621-634.

Garcia, T., Martinez, M. et Aracil, J. Enzymatic synthesis of myristyl myristate. Estimation of parameters and optimization of process. *Biocatal. Biotrans.*, 1996, **14**, 67-85.

Garcia-Alles, L.F. et Gotor, V. Lipase-catalyzed transesterification in organic media: solvent effect on equilibrium and individual rate constants. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **59**(6), 684-694.

Gargouri, Y., Ransac, S. et Verger, R. Covalent inhibtion of digestive lipases: an in vitro study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and lipid metabolism.* 1997. **1344**(1), 6-37.

Garofalakis, G., Murray, B.S. et Sarney, D.B. Surface activity and critical aggregation concentration of pure sugar esters with different sugar headgroups. *J. Colloid Interface Sci.* 2000, **229**, 391-398.

Gelo-Pujic M., Guibe-Jampel E., Loupy A., Galema S.A., Mathe D., Lipase catalyzed esterification of some alpha-D-glucopyranosides in dry media under focused microwave irradiation. *J. Chem. Soc.*, 1996, **23**, 2777-2780.

Ghosh, M. et Bhattacharyya, D.K. Lipase-catalyzed synthesis of hydroxy stearates and their properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998, **75**(8), 1057-1059.

Gibson, M., Haukins, L., Peffly, M., Kenneally, C. Production of polyol polyesters having reduced color content. 1989. *EP 0349221.*

Goderis, H.L., Ampe, G., Feyten, M.P., Fouwé, B.L. Guffens, W.M., van Cauwenbergh, S.M. et Tobback, P.P. Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol. Bioeng.*, 1987, **30**, 258-266.

Gorman, L.S. et Dordick, J.S. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 1992. **39**, 392-397.

Goueth, P.Y., Gogalis, P. et Gode, P. Synthesis of monoesters as surfactants and drugs from D-glucose. *J. Carbohydrate Chem.* 1994. **13**(2), 249-272.

Grant, D.J.W. et Higuchi, T. Solubilty behavior of organic compounds. 1990. Wiley, New York.

Greenspan, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. Res. Nut. Bur. Stand. Phys. Chem.*, 1977, **81A**, 89-96.

Griffin, W.C. Classification of surface active agents by HLB. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1949, **1**, 311-326.

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrisson, D., Rubin, B. et Cygler, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa+* lipase. *J. Biol. Chem.* 1993. **268**(17), 12843-12847.

Guillardeau, L., Montet, D., Khaled, N., Pina, M. et Graille, J. Fructose caprylate biosynthesis in a solvent free medium. *Tenside Surf. Det.*, 1992, **29**(5), 342-344.

Gupta, R.K., James, K. et Smith, F.J. Analysis of fructose mono- and diesters prepared from triglycerides containing C_{12}-C_{18} fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1983, **60**(11), 1908-1913.

Gutman, A.L. et Shapira, M. Effect of water on enzymatic activity and stereoselectivity in organic solvents. Transesterification of a substituted malonate diester. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1991, 1467-1468.

Hagge, W., Hendricks, U.W. et Quaedvlieg, M. Process for the separation of unreacted sugars from reaction mixtures obtained in the production of sugar fatty acid esters from sugars and fatty alkyl esters. 1966, *United State Patent, n° 3 251 829.*

Halling, P.J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in non conventionnal media: theory, tests and recommendatios for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, **16**, 178-206.

Halling, P.J. Predicting the behaviour of lipases in low-water media. *Biochem. Soc. Tans.*, 1997, **25**, 170-174.

Hamilton, B.K., Montgomery, J.P. et Wang, D.I. In Enzyme Engineering. Pye, E.K. et Wingard, L.B. 1974. Eds Plenum, N.Y. **2**, 153-163.

Handa, Y. et Nakamura, S. Pharmaceutical composition for the treatment of skin wounds. 1989, *EP 343 671 A2.*

Hauthal, H.G. Trends in surfactants. *Chemicaoggi*, 1992, **10**, 9-13.

Herrington, T.M., Midmore, B.R. et Sahi, S.S. Sucrose esters as emulsion stabilizers. In *Microemulsions and emulsions in food.* ACS Symposium Series 448, Ed. M. El-Nokaly et D. Cornell. *Am. Chem. Soc.*, Washington, DC. 1991. 82-102.

Hilhorst, R., Spruijt, R., Laane, C. et Veeger, C. Rules for the regulation of enzyme activity in reversed micelles as illustrated by the conversion of apolar steroids by 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 1984. **144**(3), 459-466.

Hill, C.G., Hedinsdottir, JR.R. et Amundson, C.H. Surface active properties and cleaning efficacy of materials derived from lactitol. *J. Food Process.Preserv.*, 1987, **11**, 111-134.

Hill, K. et Falkowski, J. Preparation of partial esters of fatty acids with polyols. 1993. *DE 4212155.*

Hill, K. et Rhode, O. Sugar-based surfactants for consumer products and technical applications. *Fett/Lipid.* 1999, **101**, 25-33.

Ho, C.C. et Chow, M.C. The effect of the refining process on the interfacial properties of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000, **77**(2), 191-199.

Hugon, D. Production biotechnologique d'une nouvelle gamme de tensioactifs: des esters de tréhalose et d'acides gras. *Thèse de l'INPL,* Nancy, 2000.

Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B. et Miclo, A. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *J. Biotechnol.*, 1998, **63**, 1-8.

Husband, F.A., Sarney, D.B., Barnard, M.J. et Wilde, P.J. Comparison of foaming and interfacial properties of pure sucrose monolaurates, dilaurate and commercial preparations, *Food Hydrocoll.* 1998, **12**, 237-244.

Hutchinson, R.B. Sucrose polyester useful as fat substitute and preparing process. 1996. *United State Patent, n° 5 504 202.*

Ikeda, I. et Klibanov, A.M. Lipase-catalyzed acylation of sugars solubilized in hydrophobic solvents by complexation. *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, **42**, 788-791.

Ismail, A. Etude et optimisation des réactions de synthèse enzymatique d'alkylglycosides. 1998, Thèse de l'INPL, Nancy.

Ismail, A., Soultani, S. et Ghoul, M. Optimization of the enzymatic synthesis of butylglucoside using Reponse Surface Methodology. *Biotechnol. Prog.* 1998, **14**, 874-878

Isomo Y., Nabetani H., Nakaijma M., Interesterification of triglyceride and fatty acid in a microeoaqueous reaction system using lipase-surfactant complex. *Bioscien. Biotechnol. Biochem.*, 1995, **59**(9), 1632-1635.

Jandacek, R.J., Ramirez, M.M. et Crouse, J.R. Effects of partial replacement of dietary fat by olestra on dietary cholesterol absorption in man. *Metabolism*, 1990, **39**(8), 848-852.

Janssen, A.E.M., Klabbers, C., Franssen, M.C.R. et van't Riet, K. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in 2-pyrrolidone. *Enzyme Microb. Technol.*, 1991, **13**, 565-572.

Janssen, A.E.M., Vaidaya, A.M. et Halling, P.J. Substrate specificity and kinetics of *Candida rugosa* lipase in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 1996. **18**, 340-346.

Jeong, J.C. et Lee, S.B. Enzymatic esterification reaction in organic media with continuous water stripping: effect of water content on reactor performance and enzyme agglomeration. *Biotechnol. Tech.*, 1997, **11**(12), 853-858.

John, W.H.T. et Monk, R.W. Preparation of sucrose esters. 1978. *GB 1530475*.

Jönsson, B., Lindman, B., Holmberg, K. et Kronberg, B. Surfactants and polymers in aqueous solution. John Wiley & Sons, New York, 1998, 24-25.

Kao, F.J., Ekhorutomwen, S.A. et Sawan, S.P. Residual stability of lipase from *Candida rugosa* in hexane, supercritical CO_2 and supercritical SF_6. *Biotechnol. Tech.* 1997, **11**(12), 849-852.

Karleskind, A. Principales utilisations industrielles des corps gras. Technique et Documentation Lavoisier, Manuel des corps gras, 1992, **2**, 1433-1566.

Karra-Chaabouni, M., Pulvin, S., Touraud, D. et Thomas, D. Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. *Biotechnol. Lett.*, 1996, **18**(9), 1083-1088.

Khaled, N. Synthèse enzymatique d'une nouvelle classe de molécules amphiphiles originales: les sucroesters. Thèse de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1990.

Khaled, N., Montet, D., Pina, M. et Graille, J. Purification de l'oléate de fructose par dialyse sur membrane de latex. *Rev. Fr. Corps Gras.*, 1991a, **38**(5-6), 167-170.

Khaled, N., Montet, D., Pina, M. et Graille, J. Fructose oleate synthesis in a fixed catalyst bed reactor. *Biotechnol. Lett.*, 1991b, **13**(3), 167-170.

Khaled, N., Montet, D., Farines, M., Pina, M. et Graille, J. Synthèse des monoesters de sucre par biocatalyse. *Oléagineux*, 1992, **47**(4), 181-190.

Khan; S.A., Halling, P.J. et Bell, G. Measurement and control of water activity with an aluminium oxide sensor in organic two-phase reaction mixtures for enzymic catalysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, **12**, 453-458.

Kim, J. et Kim, B.G. Lipase catalyzed synthesis of lysophosphatidylcholine using organic cosolvent for *in situ* water activity control. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2000, **77**(7), 791-797.

Klibanov, A.M., Samokhin, G.P., Martinek, K. et Berezin, I.V. A new approch to preparative enzymatic synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 1977. **XIX**, 1351-1361.

Klibanov, A.M. Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech.* 1986.**16**, 354-359.

Klibanov, A.M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biotechnol.* 1989. **14**, 141-144.

Koerts, K., Bakker, A. et Vianen, G.M. Process for purifying products containing esters of a non reducing sugar and one or more fatty acids. 1990, *EP 0 404 226 A1*.

Kronberg, B., Surfactant mixtures. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1997, **2**, 456-463.

Ku, M.A. et Hang, Y.D. Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssochlamys pulva*. *Biotechnol. Lett.* 1995, **17**(10), 1081-1084.

Kuchner, O. et Arnold, F.H. Directed evolution of enzyme catalysts. *TIBTECH*, 1997, **15**, 523-530.

Kvittingen, L., Sjursnes, B. et Anthonsen, T. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalyzed synthesis in organic media: a practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron*, 1992, **48**(13), 2793-2802.

Laane, C., Boeren, S. et Vos, K. On optimizing organic solvents in multiphase liquid-liquid phase biocatalysis. *Trends Biotechnol.*, 1985, **3**, 251-252.

Laane, C., Boeren, S., Vos, K. et Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 1987, **30**, 81-87.

Langley-Danysz, P. Emulsifiants: des stabilisants multifonctionnels. *RIA*. Janvier 2000, **598**, 34-36.

Legendre, L., Avril, J.L., Labidalle, S., Martin, C., Mignot, A. et Reynet, A. Travaux pratiques de chimie organique. Ed. Lavoisier, Paris, 1976, p 23.

Lemaire-Claverie, V. Mise au point d'un nouveau procédé de synthèse des esters de saccharose de degré de substitution contrôlé. 1998. Thèse de l'INP de Toulouse. ENSCT.

Lopez-Amaya C., Stubbs D., Marangoni A.G., A new assay for lipase activity in organic solvents. Lipase-catalyzed synthesis of octyl-linolenate in a hexane microaqueous reaction system. *Enzyme Microbiol. Techno.*, 1995, **17**(2), 131-135.

Lima, F.M., Pyle, D.L. et Asenjo, J.A. Factors affecting the esterification of lauric acid using an immobilized biocatalyst : Enzyme characterization and studies in a well-mixed reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, **46**, 69-79.

Linder, M. Optimisation d'un procédé de valorisation de co-produit d'abattage par hydrolyse enzymatique. Propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des hydrolysats. 1996, Thèse de l'INPL, Nancy.

Ljunger, G., Adlercreutz, P. et Mattiasson, B. Lipase catalyzed acylation of glucose. *Biotechnol. Lett.*, 1994, **16**(11), 1167-1172.

Lopez, M.L. et Moreno, P.L.G. Sintesis de los monoesteres de sacarosa de los acidos grasos del aceite de tiburon. *Centro Azucar.* 1984. **11**(1), 43-50.

Lopez, M.L. et Moreno, P.L.G. Sintesis de los monoesteres de sacarosa de los acidos grasos del aceite de tiburon. *Centro Azucar.* 1986. **13**(1), 5-11.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pettersen, J., et Bergman, R. Experimental design and optimization. *Chemo. Intel. Lab. Sys.* 1998, **42**, 3-40.

Maag, H. Fatty acid derivatives: Important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1984, **61**(2), 259-267.

Mac Manus, D.A. et Vulfson, E.N. Reversal of regioselectivity in the enzymatic acylation of secondary hydroxyl groups mediated by organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, **20**, 225-228.

Macrae, A.R. et Hammond, R.C. Present and future applications of lipases. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* 1985. **3**, 193-217.

Macris J.B., Kourentzi E., Hatzinikolaou D.G., Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, 1996, **31**(8), 807-812.

Madsen, T., Petersen, G., Seierø, C. et Tørsløv, J. Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and nonionic alcohol ethoxylate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**(7), 929-933.

Magnussen, T., Rasmussen P. et Fredenslund A., UNIFAC parameter table for prediction of liquid/liquid equilibria. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* 1981, **20**(2), 331-339.

Makhozoum, A., Owusu-Apenten, R.K. et Knapp, J.S. Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. *Intern. Dairy J.* 1996, **6**(5), 459-472.

Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. et Amundson, C.H. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, **14**(6), 426-446.

Marcou, L. Chimie des agents de surface. In Phénomènes d'interface. Agents de surface: Principes et modes d'action. Ed. Technip. Paris. 1989.

Marshall, D.L. et Bullerman, L.B. Antimicrobial activity of sucrose fatty acid esters emulsifiers. *J. Food Sci.* 1986, **51**(2), 468-470.

Martinek, K., Levaskov, A.V., Klyachko, N., Khmelnitski, Y. et Berezin, I.V. Micellar enzymology. *Eur. J. Biochem.* 1986. **155**, 453-468.

Martinelle, M. et Hult, K. Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. **1251**, 191-197.

Marty, A., Dossat, V. et Condoret, J.S. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: influence of the production of hydrophilic compounds. *Biotechnol. Bioeng.* 1997, **56**(2), 232-237.

Maruyama, T., Nakajima, M., Ichikama, S., Nabetani, H., Furusaki, S. et Seki, M. Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglycerides and fatty acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000. **77**(11), 1121-1126.

Matsumoto, S., Hatakawa, Y. et Nakajima, A. Process for purifying sucrose fatty acid esters. 1989. *EP 0349849.*

Matsumoto, S., Hatakawa, Y. et Nakajima, A. Process for recovering unreacted sucrose from reaction mixture in synthesis of sucrose fatty acid esters. 1991, *United State Patent, n° 4 995 911.*

Matsumura, S., Imai, K. Yoshikawa, S., Kawada, K. et Uchibori, T. Surface activities, biodegradability, antimicrobial properties of n-alkylglucosides, mannosides and galactosides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1990, **67**, 996-1001.

Matsumura, S., Kinta, Y., Sakiyama, K. et Toshima, K. Enzymatic synthesis of alkylxylobioside and xyloside from xylan and alcohol. *Biotechnol. Lett.*, 1993, **18**(11), 1335-1340.

Megahed, M.G. Sucrose polyesters from poultry fat as non-ionic emulsifiers. *Grasas y Aceites.* 2000, **51**(6), 457-460.

Mentech, J. Betremieux, I. et Leger, B. Procédé de préparation de monomères de saccharides comportant au moins un groupement carboxyvinylique polymérisable. 1991. *EP 0467762.*

Michel, P.L.O. Procédé de préparation par voie enzymatique de monoesters en position 6 du glucopyranoside de méthyle. 1992. *FR 2 686 132-Al.*

Millqvist, A., Adlercreutz, P. et Mattiasson, B. Glyceride synthesis in a solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 1489-1496.

Min Sin, Y., Woong Cho, K. et Ho Lee, T. Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas sp.* Lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnol. Lett.*, 1998, **20**(1), 91-94.

Monot, F., Borzeix, F., Bardin, M. et Vandecasteele, J.P. Enzymatic esterification in organic media: Role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1991, **35**, 759-765.

Moreno, P.L.G. et Nues, Fonseca, L.R. Sintesis de los esteres de sacarosa a partire de los esteres metilicos de los acidos grasos del aceite de cera de cana en ausencia del solvente. *Centro Azucar.* 1985. **12**(1), 19-24.

Morwa y, A.J. et Walter, E.W. Lubricants containing fatty acid esters of saccharides. 1960. *United State Patent, n° 2 944 024.*

Mukesh, D., Jadhav, S., Sheth, D., Banerji, A.A., Newadkar, R. et Behinakatti, H.S. Lipase-catalysed esterification reaction in a tubular reactor. *Biotechnol. Tech.*, 1993, **7**(8), 569-572.

Mutua, L.N. et Akoh, C.C. Synthesis of alkylglycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida sp.* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1993, **70**(1), 43-46.

Mwasaru, M.A. et Muhammad, K. Effect of surfactant HLB on some gel properties of pigeonpea and cowpea starches. *Starch.* 2001, **53**, 155-161.

Nakamura, S. Using sucrose esters as food emulsifiers. *INFORM.* 1997, **8**(8), 1997.

Napier, P.E., Lacerda, H.M., Rosell, C.M., Valivety, R.H., Vaidya, A.M. et Halling, P.J. Enhanced organic-phase enzymatic esterification with continuous water removal in a controlled air-bleed evacuated-headspace reactor. *Biotechnol. Prog.* 1996, **12**, 47-50.

Nigam, V.N. et Brailovsky, O.T. Pharmaceutical compositions for treatment of tumor cells. 1997. *CA 1120399.*

Nobile, L., Rovesti, P. et Svampa, M.B. Study of the activity on the skin of sugar esters, sucroglycerides and derivatives when used as detergents and emulsifiers in cosmetics. *Am. Perf. Cosm.* 1964, **79**, 19-28.

Nobile, L. Process for the preparation of purified sucrose esters and products obtained thereby. 1966, *United State Patent, n° 3 249 600.*

Novo Nordisk A/S Technical report. Reference samples of synthetic glucose-esters. Biotechnology project PL970363. 1999.

Nys, G.G. et Rekker, R.F. Statistical analysis of a series of partition coefficients with special reference to the predictability of folding of drug molecules. The introduction of hydrophobic fragmental constants (f values). *Chimie Thérapeutique.* 1973, **5**, 521-535.

Odibo F.J.C., Okereke U.O., Oyeka C.A., Influence of culture conditions on the production of lipase of *Hendersonula toruloidea. Biores. Technol.* 1995, **54**(1), 81-83.

Oguntimein, G.B. et Schmid, R.D. Lipase catalyzed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, 1993, **30**(6), 175-180.

Osipow, L.I. et Rosenblat, W. Micro-emulsion process for the preparation of sucrose esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1967. **44**(5), 307-309.

Osipow, L.I., Snell, F.D., York, W.C. et Finchler, A. Methods of preparation of fatty acid esters of sucrose. *Ind. Eng. Chem.* 1956, **48**(9), 1456-1462.

Otto, R.T., Scheib, H., Bronscheuer, U.T., Pleiss, J., Syldatk, C. et Schmid, R.D. Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of aryl-aliphatic glycolipids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2000. **8**, 201-211.

Paiva, A.L., Balcão, V.M. et Malcata, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enz. Microb. Technol.* 2000. **27**, 187-204.

Pastor E., Otero C., Ballesteros A., Synthesis of mono- and dioleylglycerols using an immobilized lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1995, **50**(3), 251-263.

Pleiss, J., Fischer, M. et Schmid, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Bchem. Phys. Lipids.*, 1998, **93**, 67-80.

Plusquellec, D., Baczlso, K. et Chauvin, C. Nouveaux composés monoesters de saccharose tels que les 2-O-acylsaccharoses et les 6-O-acylsaccharoses, ainsi que leurs procédés de synthèse. 1992. *FR 2670493.*

Poré, J. Balance hydrophile/lipophile HLB-RHLB. In Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples. Editions Techniques des Industries des Corps Gras. Neuilly, 1992, 37-53.

Racz, G., Koczo, K. et Wasan, D.T. Mechanisms of antifoam deactivation; *J. Colloid. Interf. Sci.*, 1996, **181**, 124-135.

Redmann, I., Montet, D., Bonnot, F., Pina, M. et Graille, J. Fructose mono- and polycaprylate purification by molecular distillation. *Biotechnol. Tech.*, 1995, **9**(2), 123-126.

Redmann, I., Pina, M., Guyot, B., Blaise, P., Farines, M. et Graille, J. Chemoenzymatic synthesis of glucose fatty esters. *Carbohydrate Res.*, 1997, **300**, 103-108.

Rich, J.O., Bruce, A.B. et Dordick, J.S. Controlling enzyme-catalyzed regioselectivity in sugar ester synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, **45**, 426-434.

Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A.P.G. et Klibanov, A.M. Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 584-589.

Rizzi, G.P. et Taylor, H.M. A solvent-free synthesis of sucrose polyesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1977. **55**(9), 398-401.

Rodriguez-Ruiz, J., Belarbi, E.H., Sanchez, J.L.G. et Alonso, D.L. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnol. Tech.*, 1998, **12**(9), 689-691.

Rosen, M.J. The relationship of structure to properties in surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1972, **49**, 293-297.

Sarney, D.B., Kapeller, H., Fregapane, G. et Vulfson, E.N. Chemo enzymatic synthesis of disaccharide fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, **71**(7), 711-714.

Sarney, D.B. et Vulfson, E.N. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Tibtech.* 1995. **13**, 164-172.

Sarney, D.B., Barnard, M.J., MacManus, D.A. et Vulfson, E.N. Application of lipases to the regioselective synthesis of sucrose fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 1481-1487.

Sarney, D.B., Barnar, M.J., Virto, M. et Vulfson, E.N. Enzymatic synthesis of sorbitan esters using a low-boiling point azeotrope as a reaction solvent. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, **54**(4), 351-356.

Sawada, H. Preparation of sorbitan esters with low color. 1988. *DE 3729335.*

Seung-Heon Y., Miyawaki O., Kwan-Hwa P., Nakamura K., Transesterification between triolein and ethylbehenate by immobilized lipase in supercritical carbon dioxide. *J. Ferment. Bioeng.*, 1996, **82**(4), 334-340.

Scheckermann, C., Schlotterbeck, A., Schmidt, M., Wray, V. et Lang, S. Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures. *Enzyme Microb. Technol.*, 1995, **17**, 157-162.

Schlotterbeck, A., Lang, S., Wray, V. et Wagner, F. Lipase-catalyzed monoacylation of fructose. *Biotechnol. Lett.*, 1993, **15**(1), 61-64.

Seino, H. et Uchibori, T. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid (I) Esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1984, **61**(11), 1761-1765.

Shearer, A.E.H., Dunne, C.P., Sikes, A., Hoover, D.G. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives and mild heat. *J. Food Prot.* 2000. **63**(11), 1503-1510.

Shieh, C.J., Akoh, C.C. et Koehler, P.E. Formulation and optimization of sucrose polyester physical properties by mixture Response Surface Methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996a, **73**(4), 455-460.

Shieh, C.J., Koehler, P.E. et Akoh, C.C. Optimization of sucrose polyester synthesis using Response Surface Methodology. *J. Food Sci.* 1996b, **61**, 97-100.

Shigeoka, T., Izawa, O., Kitasawa, K. et Yamauchi, F. Studies on the metabolic fate of sucrose esters in rats. *Food Chem. Toxicol.* 1984, **22**(6), 409-414.

Silver, R.S. et Hasenhuettl, G.L. Method for preparing polyol fatty acid polyesters by transesterification. 1997. *United State Patent, n° 5 596 085.*

Sisterna B.V. Sucrose esters of fatty acids - A unique class of emulsifiers for the food industry. *Food Tech Europe.* 1994, Janvier/Mars.

Skoog, D.A., West, D.W. et Holler, F.J. Fundamentals of analytical chemistry, 6th Ed. Saunders College Publishing, 1992, 779-783.

Soultani, S., Engasser, J.M. et Ghoul, M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2001, **11**(4-6), 725-731.

Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P. et Mattiasson, B. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium position in enzymatic esterifications. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, **44**, 549-556.

Therisod, M. et Klibanov, A.M. Facile enzymatic preparation of monoacyllated sugars in pyridine. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, **108**(18), 5638-5640.

Therisod, M. et Klibanov, A.M. Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugar catalyzed by lipases in organic solvent. *Am. Chem. Soc.* 1987. **109**, 3977-3981.

Thomas, L.V., Davies, E.A., Delves-Broughton, J. et Wimpenny, J.W.T. Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of gram-positive bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 1998, **85**, 1013-1022.

Torres, C., Bernabé, M. et Otero, C. Part II. Two procedures for selective synthesis of malic acid monoesters. *Enzyme Microb. Technol.*, 1999, **25**, 753-761.

Tsuchido, T., Ahn, Y.H. et Takano, M. Lysis of *Bacillus subtilis* cells by glycerol and sucrose esters of fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, **53**(3), 505-508.

Turner, N.A. et Vulfson, E.N. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme Microb. Technol.* 2000, **27**, 108-113.

Uematsu, Y., Hirata, K., Suzuki, K., Iida, K., Kan, T. et Saito, K. Determination of sucrose esters of fatty acids in food additive premixes by gas chromatography and confirmation of identity by gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2001, **84**(2), 498-506.

Uppenberg, J., Hausen, M.T., Paktar, S. et Jones, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinements of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica. Structure.* 1994. **2**, 293-308.

Valente, H. Purification des monooléates de fructose et détermination des constantes d'équilibre de la réaction de synthèse. Rapport DEA, INPL, Nancy, 1998.

Valivety, R.H., Halling, P.J. et Macrae, A.R. Reaction rate with suspended lipase catalysts shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim. Biophys. Act.*, 1992, **1118**, 218-222.

Van Tilbeurgh, H., Egloff, M.P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. et Cambillau, C. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature.* 1993. **362**, 814-820.

Villeneuve, P., Pina, M. and Graille, J. Mise en évidence des sélectivités des lipases en inetrestérification à l'aide d'un triglycéride chiral modèle. *OCL.* 1996. **3**, 459-464.

Virto, C., Svensson, I. et Adlercreutz, P. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of dihydroxyacetone fatty acid esters. *Biocatal. Biotrans.* 2000, **18**, 13-29.

Wada, K. Onuma, K. et Ushikubo, T. Process for preparing sucrose fatty acid esters. 1988. *EP 0275939.*

Wagner, F.W. et Dean, M. Sugar ester synthesis. 1990. *United State Patent, n° 4 927 920.*

Wagner, F.W., Dean, M.A., De La Motte, R.S. et Stryker, V.H. Separation and purification of sugar esters. 1991, *United State Patent, n° 4 983 731.*

Walker, C.E. Food applications of sucrose esters. *Cereal Foods World.* 1984, **29**(5), 286-289.

Wallach, J. Les enzymes. *Sciences.* 1997. **128**. 10-20.

Weber, H.K. et Faber, K. Stabilization of lipases against deactivation by acetaldehyde formed in acyl transfer reactions. *Methods in Enzymology.* 1997, **286**, 509-518.

Wehtje, E., Svensson, I., Adlercreutz, P., et Mattiasson, B. Continuous control of water activity during biocatalysis in organic media. *Biotechnol. Lett.*, 1993, **7**, 873-878.

Wehtje, E., Kaur, J., Adlercreutz, P., Chand, S. et Mattiasson, B. Water activity control in enzymatic esterification processes. *Enzyme Microb. Technol.*, 1997a, **21**, 502-510.

Wehtje, E. et Adlercreutz, P. Lipases have similar water activity profiles in different reactions. *Biotechnol. Lett.*, 1997b, **11**(6), 537-540.

Weiss, T.J., Brown, M., Zeringue, J.R. et Feugz, R.O. Influence of solvent on degree of acylation in the formation of sucrose esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1972, **49**(9), 524-526.

Woudenberg-van Oosterom, M., van Rantwijk, F. et Sheldon, R.A. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalysed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, **49**, 328-333.

Xiao-Yan-Wu, Yu-Yen-Linko, Variations among four commercial lipases from *Chromobaterium viscosum* in ester synthesis. *Process Biochem.* 1996, **31**(8), 765-772.

Yahya, A.R.M., Anderson, W.A. et Moo-Young, M. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, **23**, 438-450.

Yamamoto, T. et Kinami, K. Production of fatty acid polyester. 1986, *GB 2 161 806 A.*

Yan, Y., Bornscheuer, U.T., Cao, L. et Schmid, R.D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatt acid esters. Removal of byproducts by azeotropic distillation. *Enzyme Microb. Technol.* 1999, **25**, 725-728.

Yan, Y., Bornscheuer, U.T., Stadler, G., Lutz-Wahl, S., Reuss, M. et Schmid, R.D. Production of sugar fatty acid esters by enzymatic esterification in a stirred-tank membrane reactor: Optimization of parameters by Response Surface Methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2001, **78**(2), 147-152.

Zaks, A. et Klibanov, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem*, 1988a, **263**, 8017-8021.

Zaks, A. et Russel, A.J. Enzymes in organic solvents: Properties and applications. *J. Biotechnol.*, 1988b, **8**, 259-270.

ANNEXES

En complément aux études cinétiques rapportées dans le manuscrit principal, ces annexes décrivent les cinétiques obtenues avec d'autres acides gras: acide caprique (C10), acide laurique (C12), acide myristique (C14), acide palmitique (C16) et acide stéarique (C18). Les effets analysés sont les mêmes que ceux décrits avec l'acide caprylique.

ANNEXE 1: Caprates de fructose (C10)

Les résultats des réactions de synthèse par estérification directe de sucroesters à partir du fructose et de l'acide caprique sont reportés sur les **Figures Anx1a** à **Anx1e**.

- Les synthèses de caprates de fructose présentent des vitesses variables en fonction de la concentration initiale en acide gras. La vitesse de consommation de l'acide caprique passe de 1.4 à 7.4 de C10 consommé/g enzyme.h en allant de 140 à 420 mM d'acide gras avec une légère diminution à partir de 560 mM. On remarque qu'au-delà de 5 heures de réaction, la vitesse atteint des valeurs négligeables.

- La proportion de monoesters diminue avec l'augmentation de la concentration initiale en acide caprique. A l'équilibre, cette réaction aboutit à des proportions de monoesters comprises entre 70 et 85 % en passant de 700 à 140 mM d'acide caprique. Le reste des produits formés étant constitué de diesters qui sont synthétisés conjointement avec les monoesters dés les premières minutes de la réaction lorsqu'on travaille avec de fortes concentrations initiales en acide caprique.

- A l'équilibre, la concentration en fructose résiduel est inférieure à sa solubilité dans le M2B2 à 60 °C quel que soit la concentration en acide caprique. La chute en fructose résiduel étant moins prononcée pour les faibles concentrations, plus particulièrement à 140 mM d'acide caprique.

- Les réactions de synthèse de 140 à 420 mM d'acide caprique présentent une particularité par rapport aux synthèses avec l'acide caprylique. En effet, on assiste à un état pseudo-stationnaire se traduisant par un ralentissement de la réaction et une reprise à partir de 24 heures de synthèse.

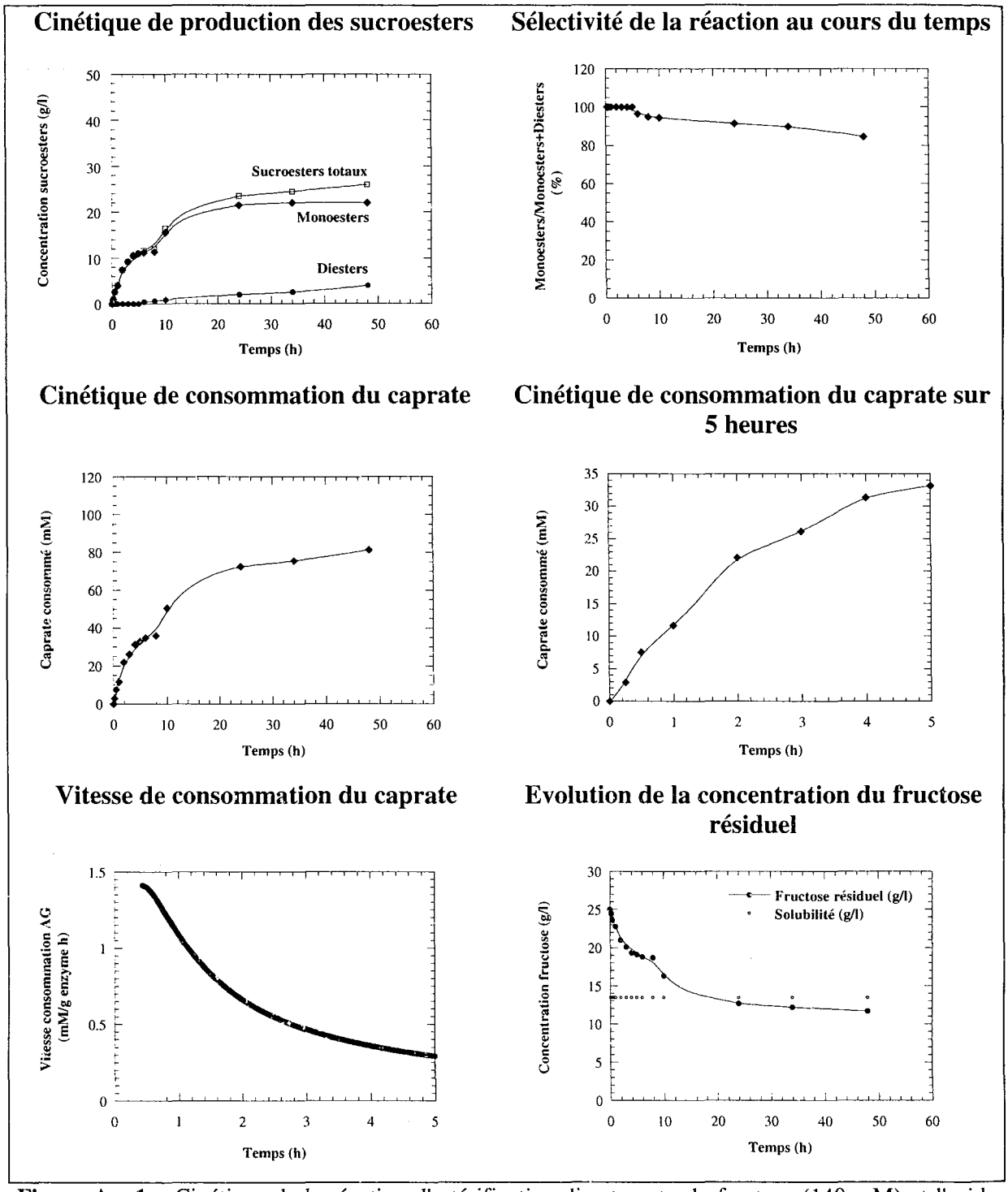


Figure Anx1a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprique (140 mM).

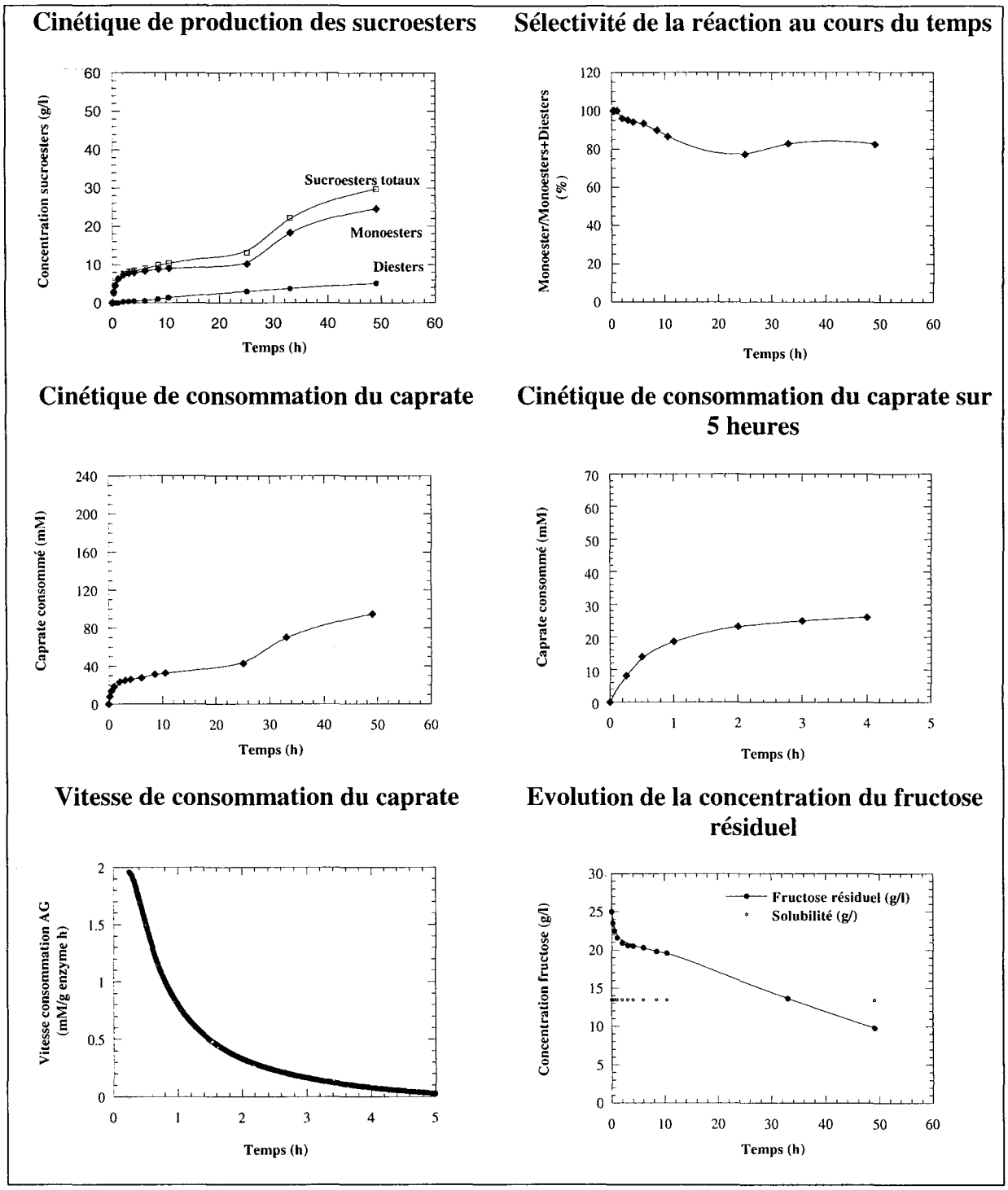


Figure Anx1b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprique (280 mM).

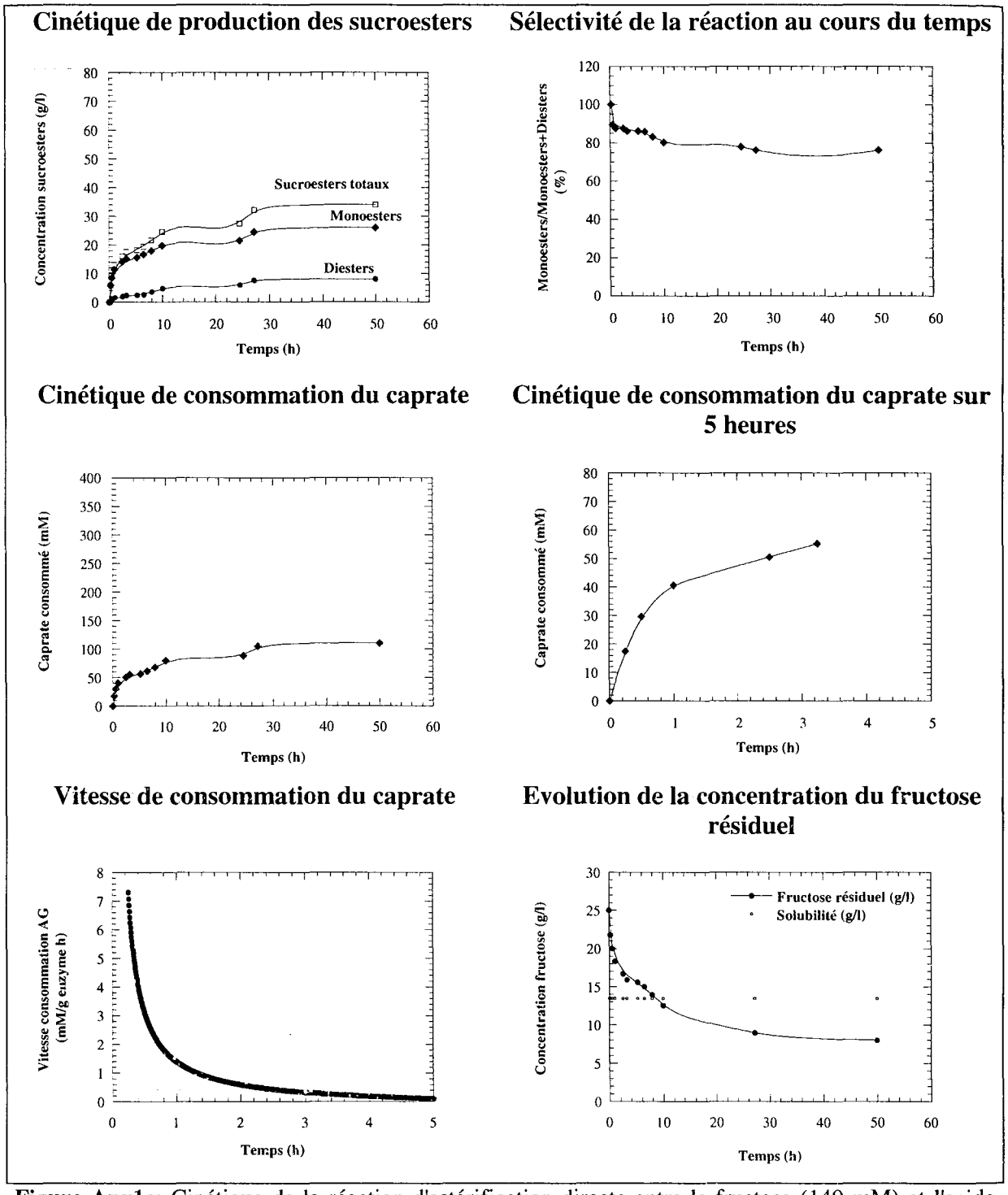


Figure Anx1c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprique (420 mM).

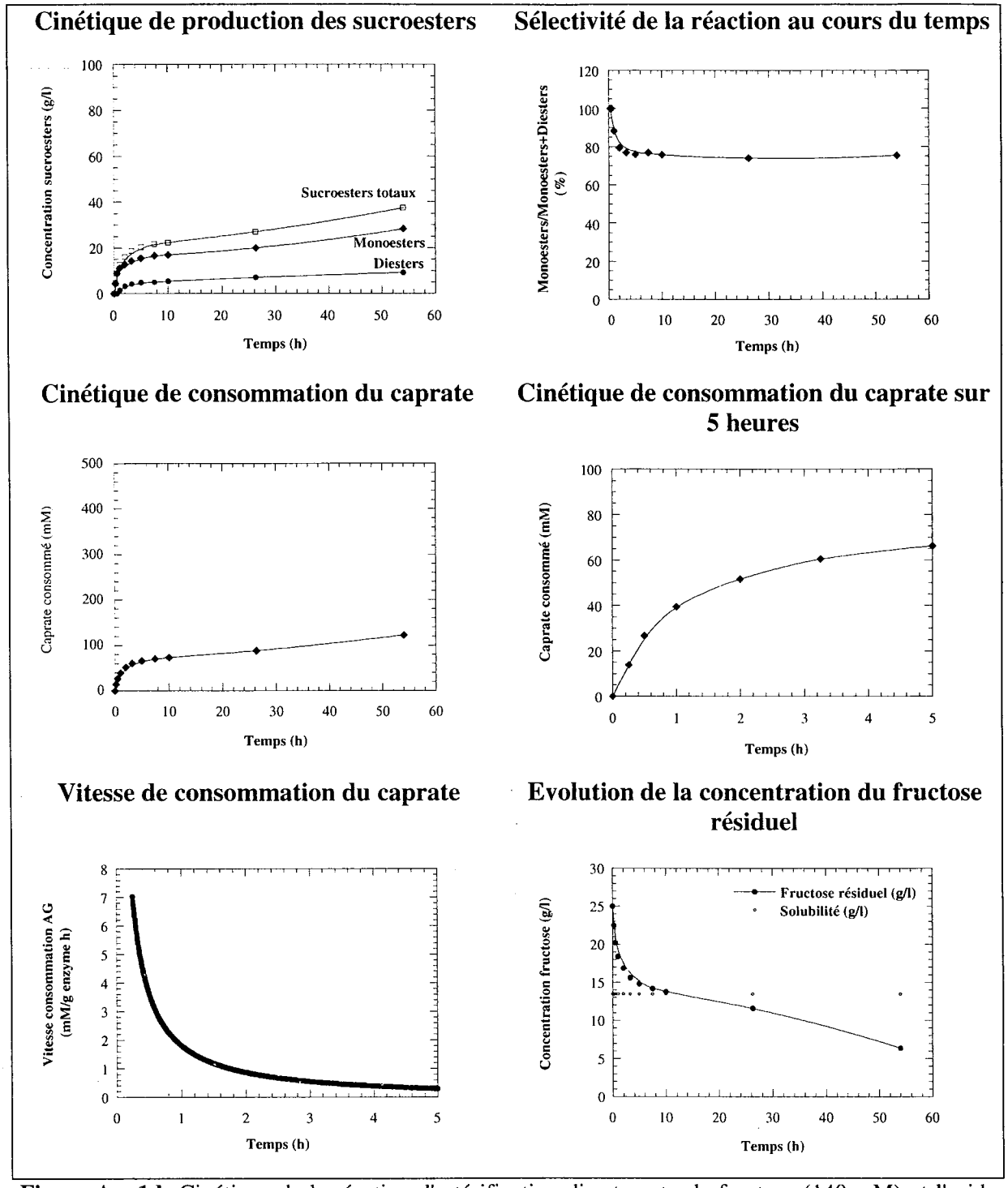


Figure Anx1d: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprique (560 mM).

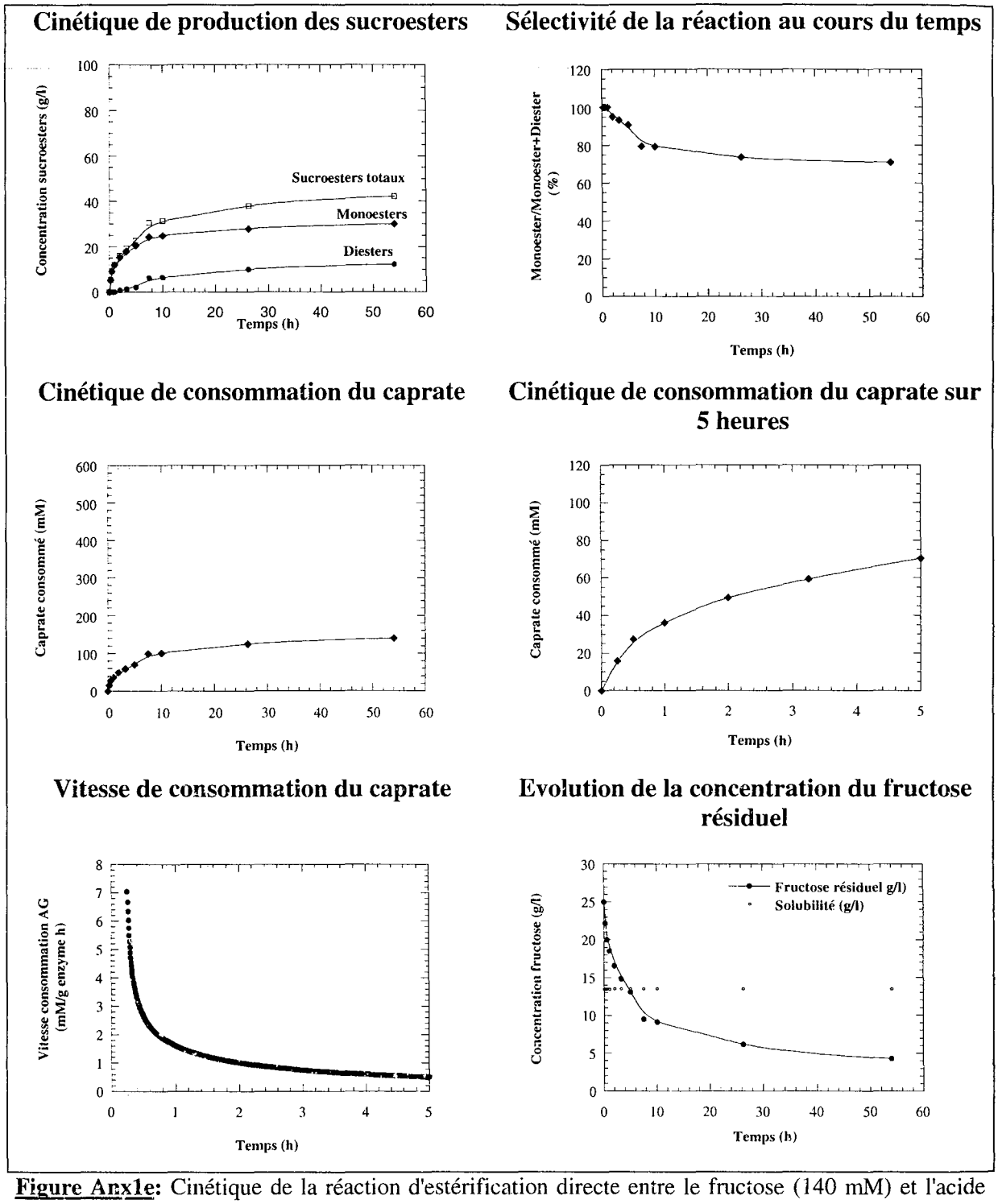


Figure Anx1e: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide caprique (700 mM).

ANNEXE 2: Laurates de fructose (C12)

Les résultats des réactions de synthèse par estérification directe de sucroesters à partir du fructose et de l'acide laurique sont reportés sur les **Figures Anx2a** à **Anx2e**.

- Les synthèses de laurates de fructose présentent des vitesses variables en fonction de la concentration initiale en acide gras. La vitesse de consommation de l'acide laurique passe de 2 à 16 mM de C12 consommé/g enzyme.h en augmentant la concentration initiale en acide gras de 140 à 420 mM. A 560 mM d'acide laurique, on constate une chute de la vitesse qui atteint 4.3 mM d'acide gras consommé/g enzyme.h. Au-delà, la vitesse augmente pour atteindre une valeur de 13.5 mM/g enzyme.h. Au bout de 3 heures, la vitesse commence à se stabiliser pour atteindre des valeurs négligeables ou même s'annuler, dans la plupart des cas, au bout de 5 heures de réaction.

- La proportion de monoesters diminue avec l'augmentation de la concentration initiale en acide laurique. A l'équilibre, cette réaction aboutit à des proportions de monoesters comprises entre 60 et 85 % en passant de 700 à 140 mM d'acide laurique. Le reste des produits formés étant constitué de diesters qui sont synthétisés aux dépens des monoesters et de plus en plus rapidement au fur et à mesure que la concentration initiale en acide laurique augmente.

- A l'équilibre, la concentration en fructose résiduel est inférieure à sa solubilité dans le M2B2 à 60 °C quelle que soit la concentration en acide laurique. Cependant, la réaction de synthèse à 140 mM d'acide laurique présente une particularité. En effet, on n'est à la limite de la solubilité du fructose (13.5 g/l) qu'au bout de 40 heures de réaction.

- On assiste à un état pseudo-stationnaire se traduisant par un ralentissement de la réaction et une reprise à partir de 24 heures de synthèse seulement lorsqu'on travaille avec une concentration initiale en acide laurique de 700 mM.

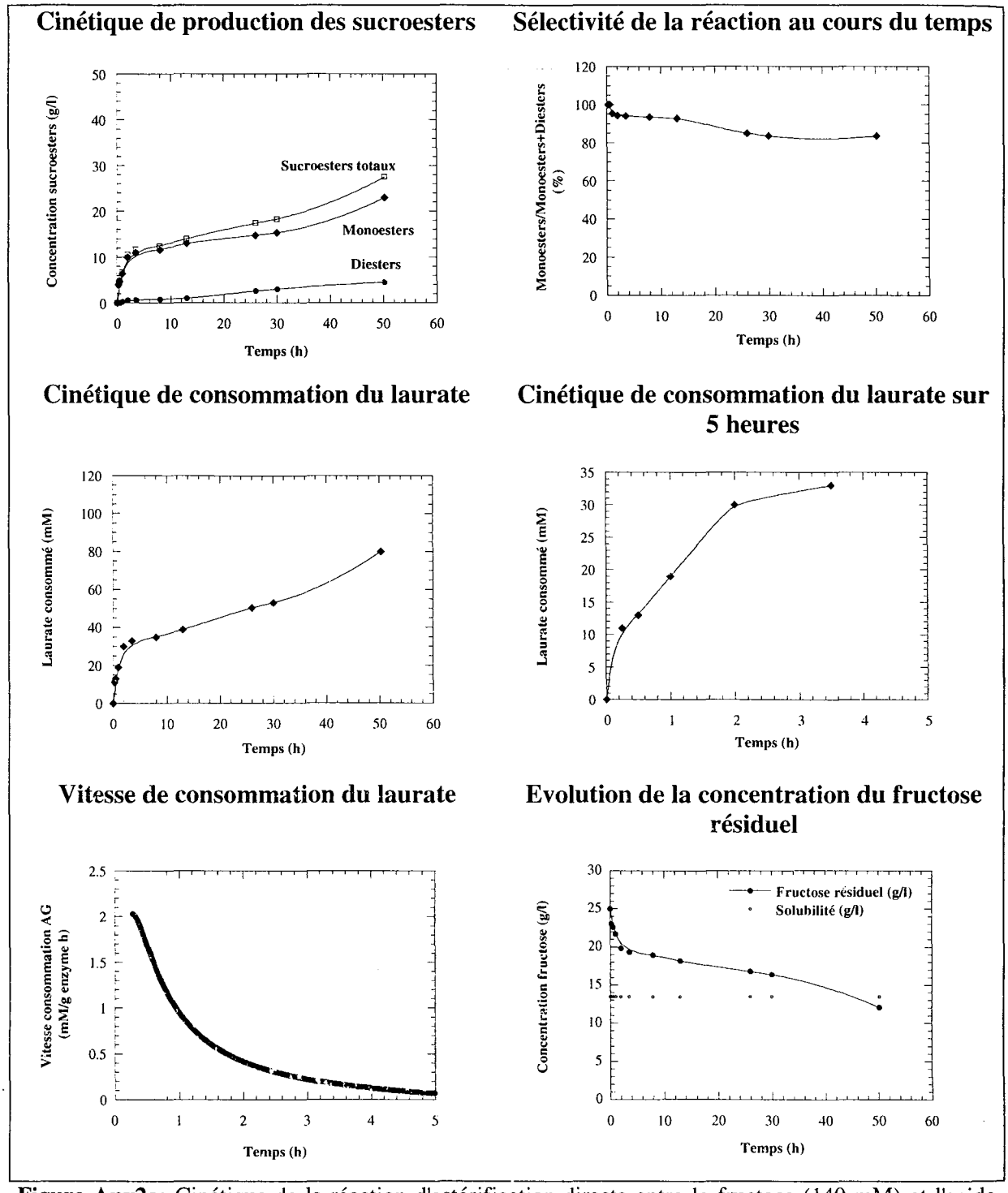


Figure Anx2a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide laurique (140 mM).

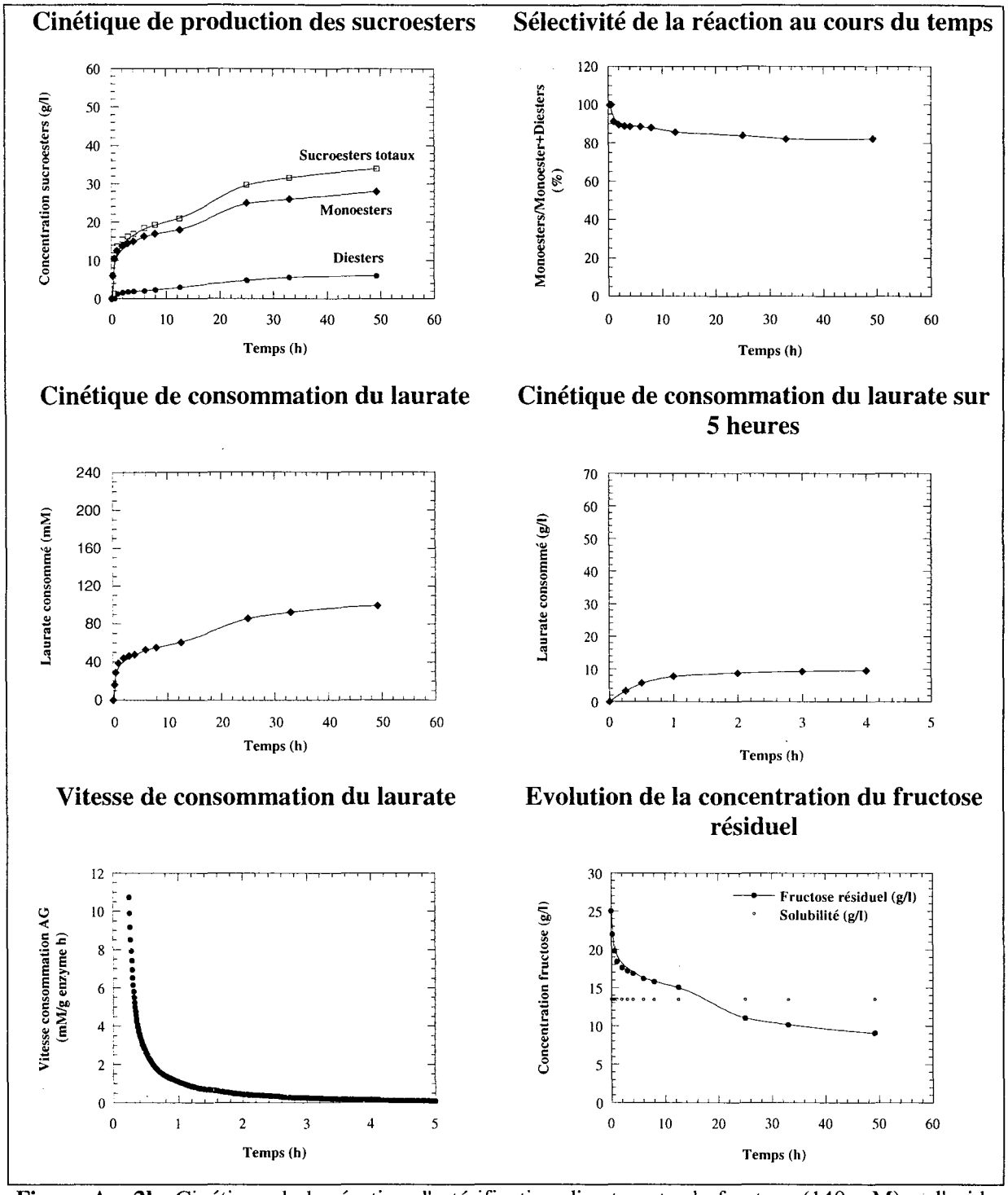


Figure Anx2b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide laurique (280 mM).

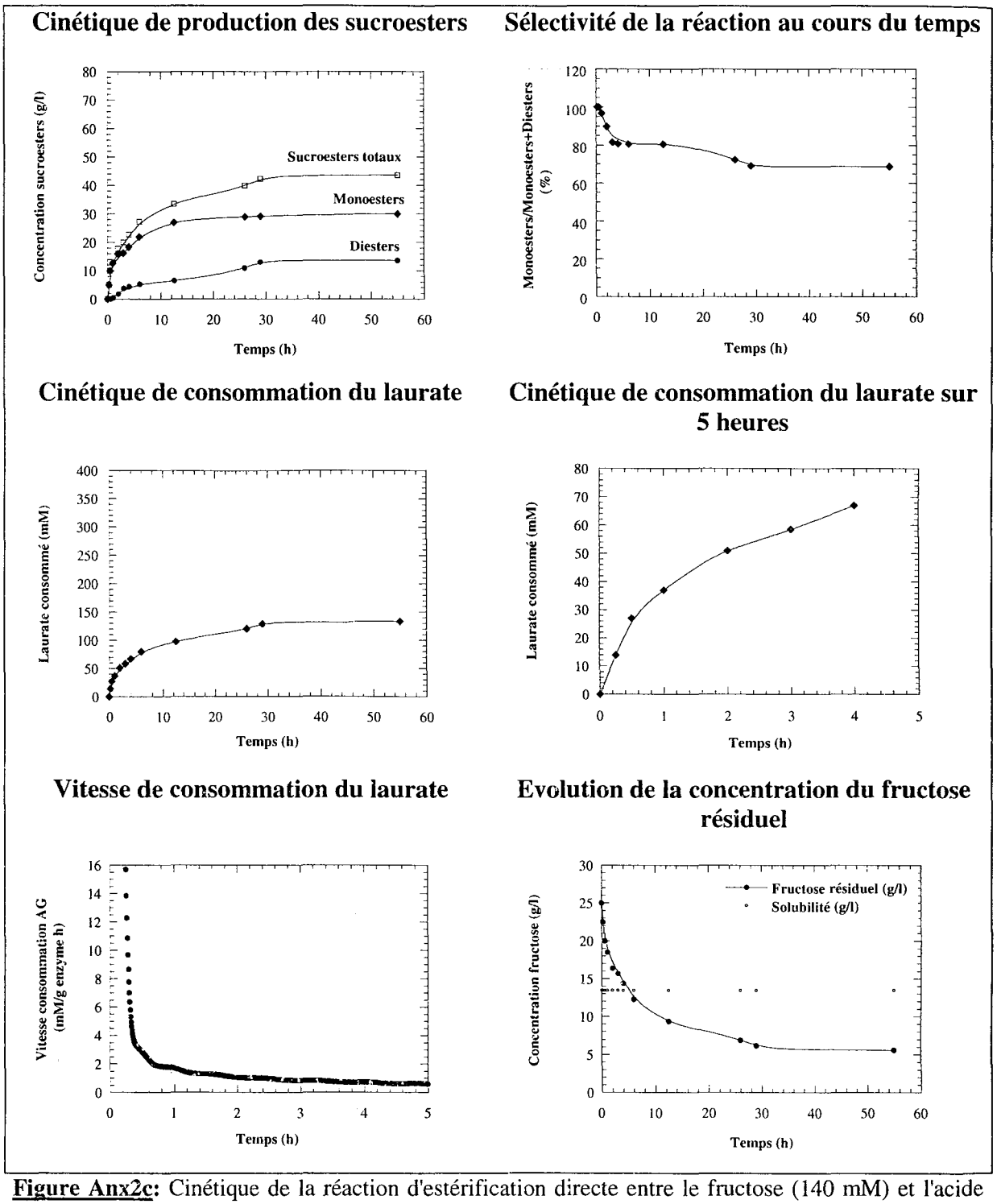


Figure Anx2c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide laurique (420 mM).

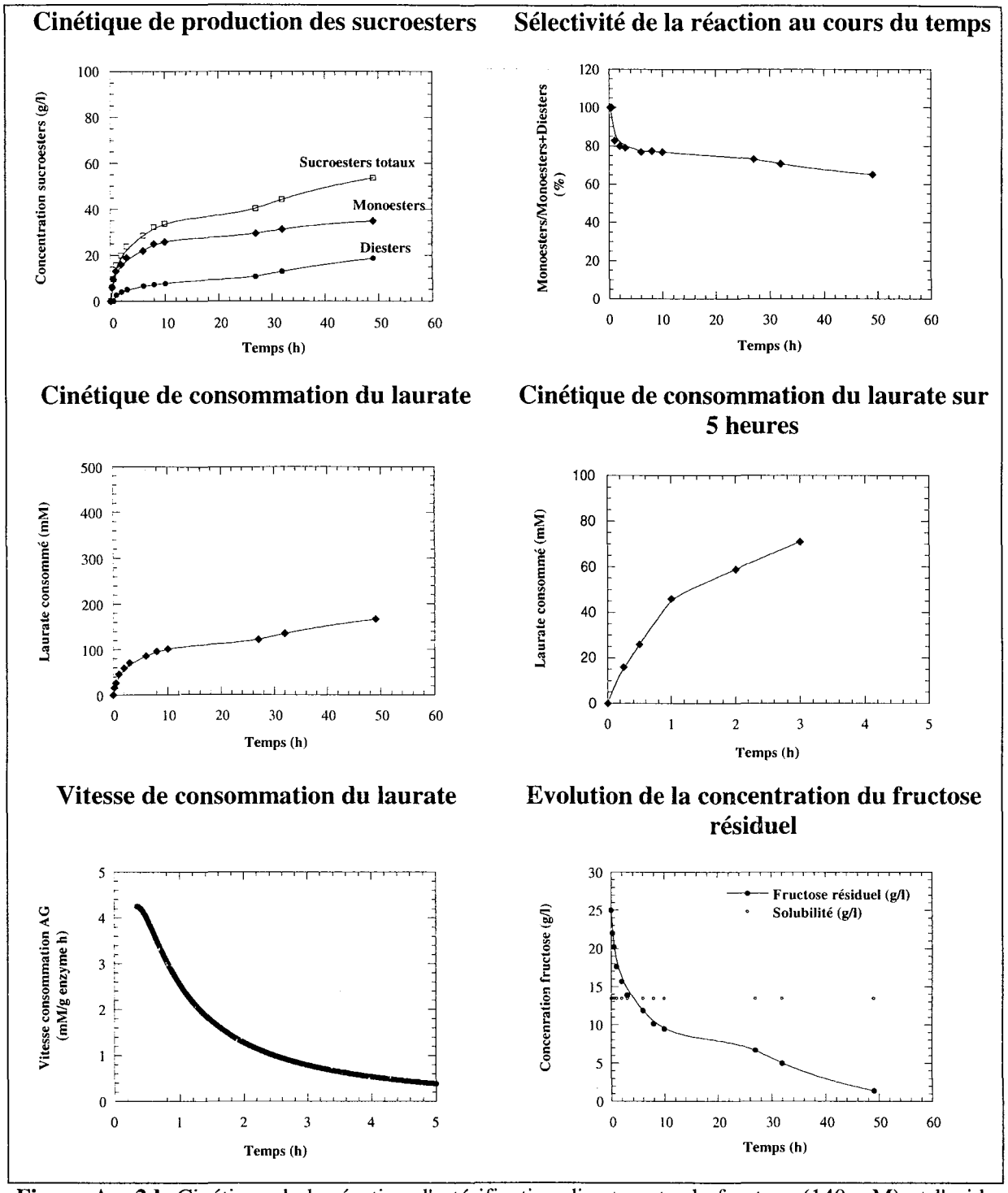


Figure Anx2d: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide laurique (560 mM).

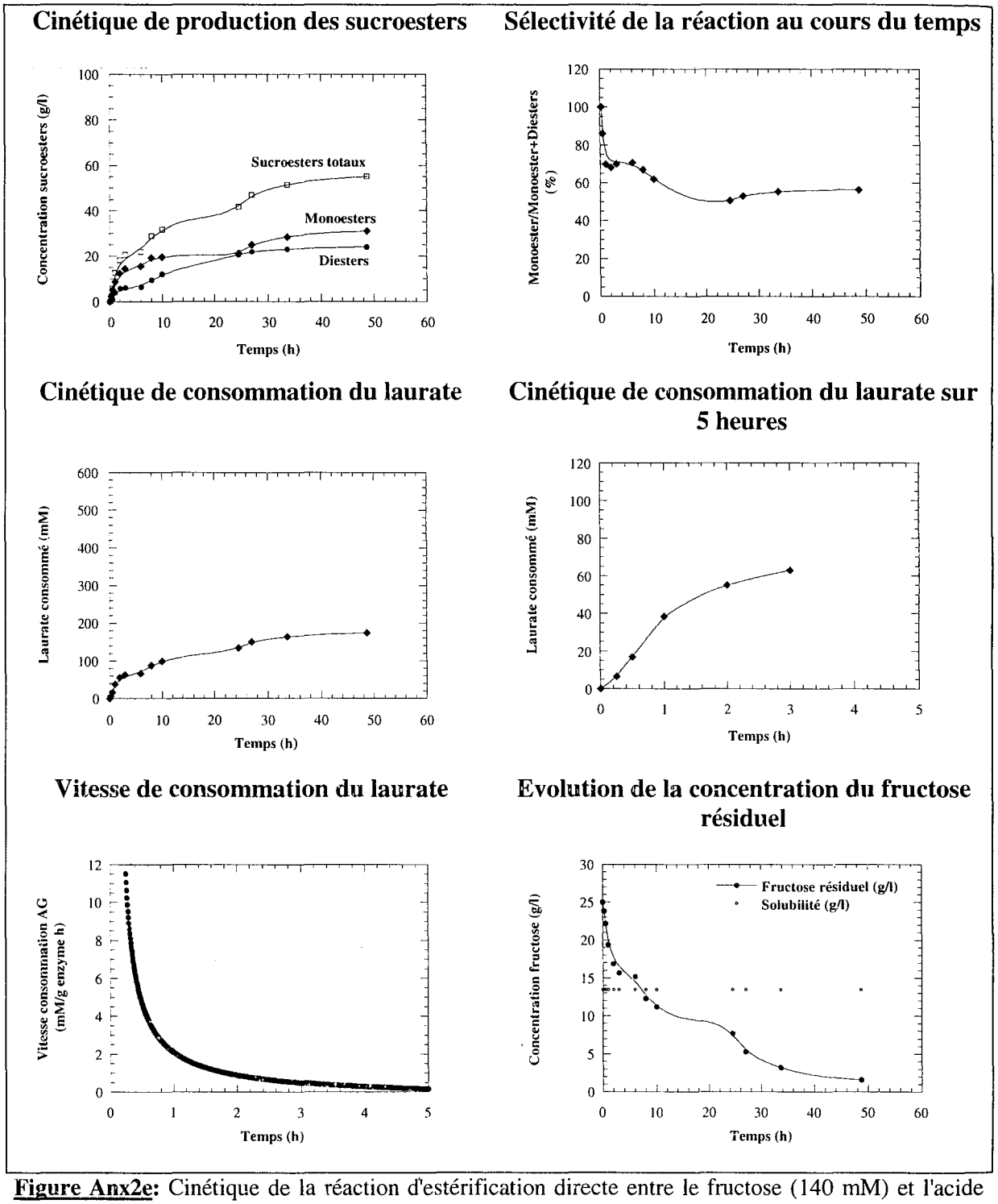


Figure Anx2e: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide laurique (700 mM).

ANNEXE 3: Myristates de fructose (C14)

Les résultats des réactions de synthèse par estérification directe de sucroesters à partir du fructose et de l'acide myristique sont reportés sur les **Figures Anx3a** à **Anx3e**.

- Les synthèses de myristates de fructose présentent des vitesses variables en fonction de la concentration initiale en acide gras. La vitesse de consommation de l'acide myristique ne présente pas de différence significative dans une gamme de concentration initiale de l'acide myristique allant de 140 à 560 mM. En effet, dans cette gamme de concentration, la vitesse de consommation de l'acide myristique est comprise entre 4.2 et 5.6 mM/g enzyme.h. Au bout de 5 heures de réaction, la vitesse est de l'ordre de 0.2 mM/g enzyme.h. Le profil change légèrement lorsqu'on travaille avec une concentration initiale en acide myristique de 700mM. Dans ce cas, la réaction démarre avec une vitesse 2 fois plus importante, de l'ordre de 8.5 mM/g enzyme.h et se stabilise à environ 1 mM/g enzyme.h.

- La proportion de monoesters diminue avec l'augmentation de la concentration initiale en acide myristique. A l'équilibre, cette réaction aboutit à des proportions de monoesters comprises entre 50 et 85 % en passant de 700 à 140 mM d'acide myristique. Le reste des produits formés étant constitué de diesters qui sont synthétisés aux dépens des monoesters et de plus en plus rapidement au fur et à mesure que la concentration initiale en acide myristique augmente. Il faut noter qu'à 700 mM d'acide myristique, la formation conjointe de mono- et de diesters se fait dés les premières minutes de la réaction.

- A l'équilibre, la concentration en fructose résiduel est inférieure à sa solubilité dans le M2B2 à 60 °C quelle que soit la concentration en acide myristique. On est au dessous de la solubilité du fructose (13.5 g/l) de plus en plus vite au fur et à mesure que la concentration initiale en acide myristique augmente. En effet, on n'est à la limite de la solubilité qu'au bout de 30 h de réaction pour une concentration de 140 mM alors que lorsqu'on travaille avec 5 fois plus d'acide myristique, ce temps est divisé par un facteur 7.5.

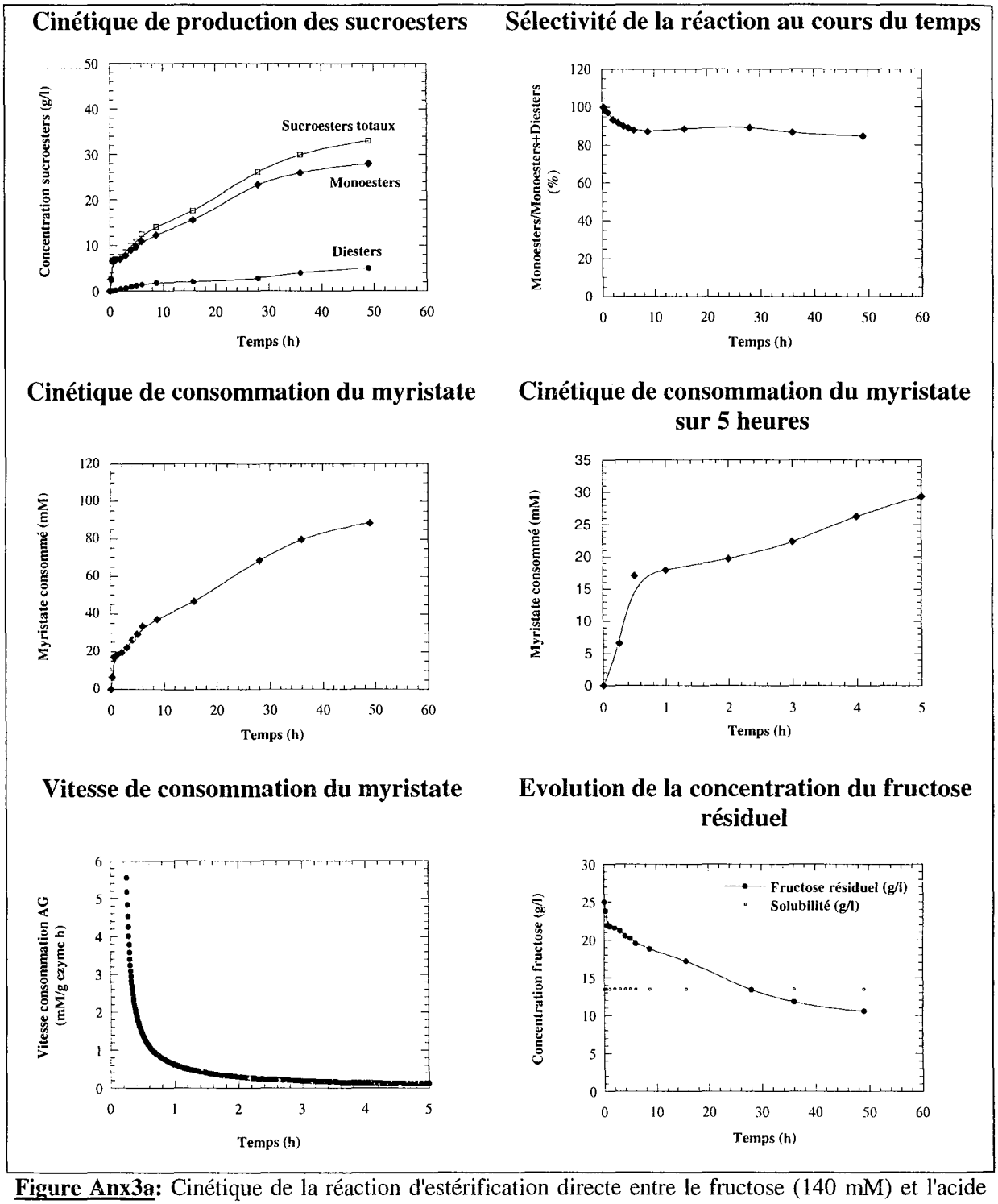


Figure Anx3a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide myristique (140 mM).

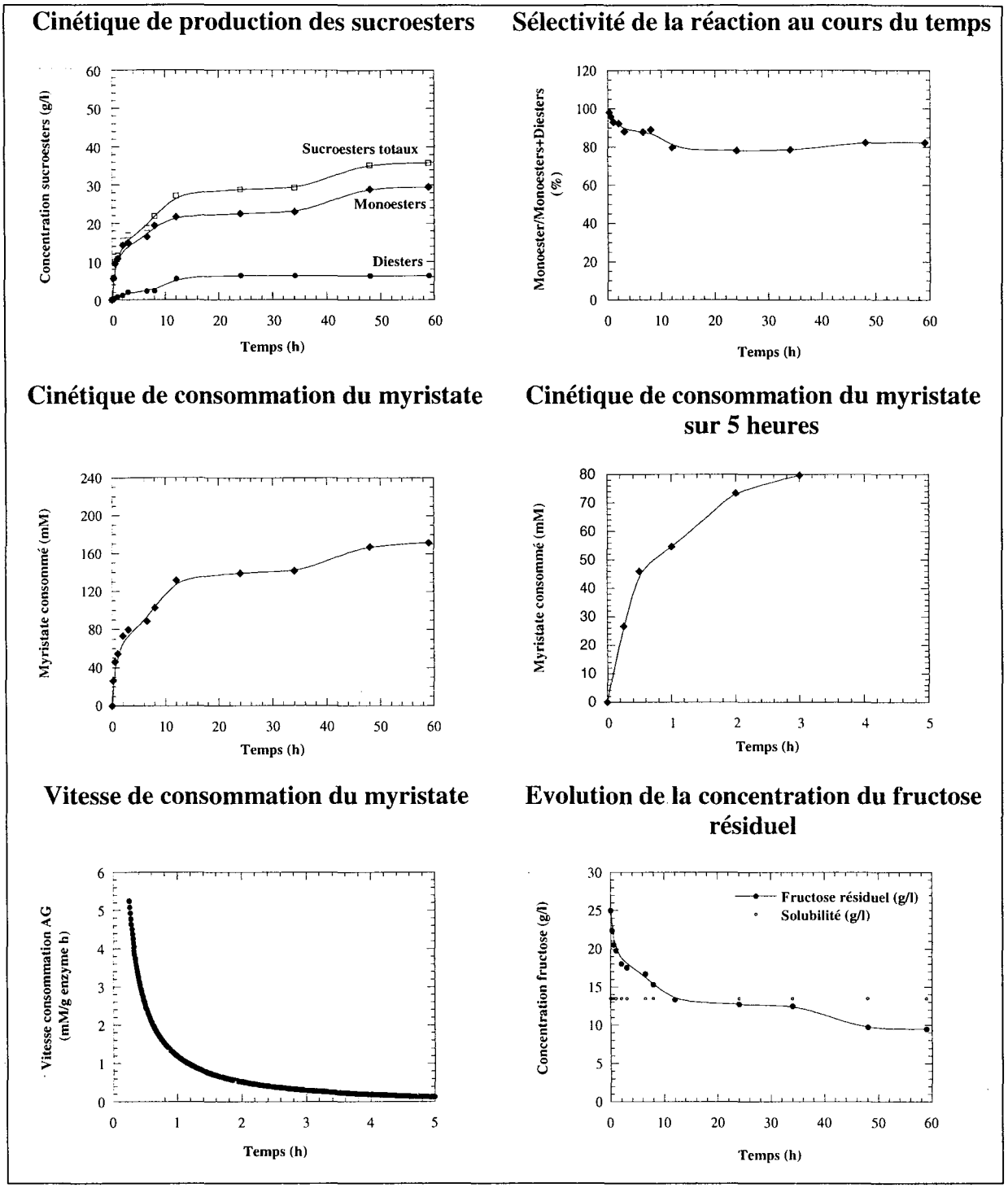


Figure Anx3b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide myristique (280 mM).

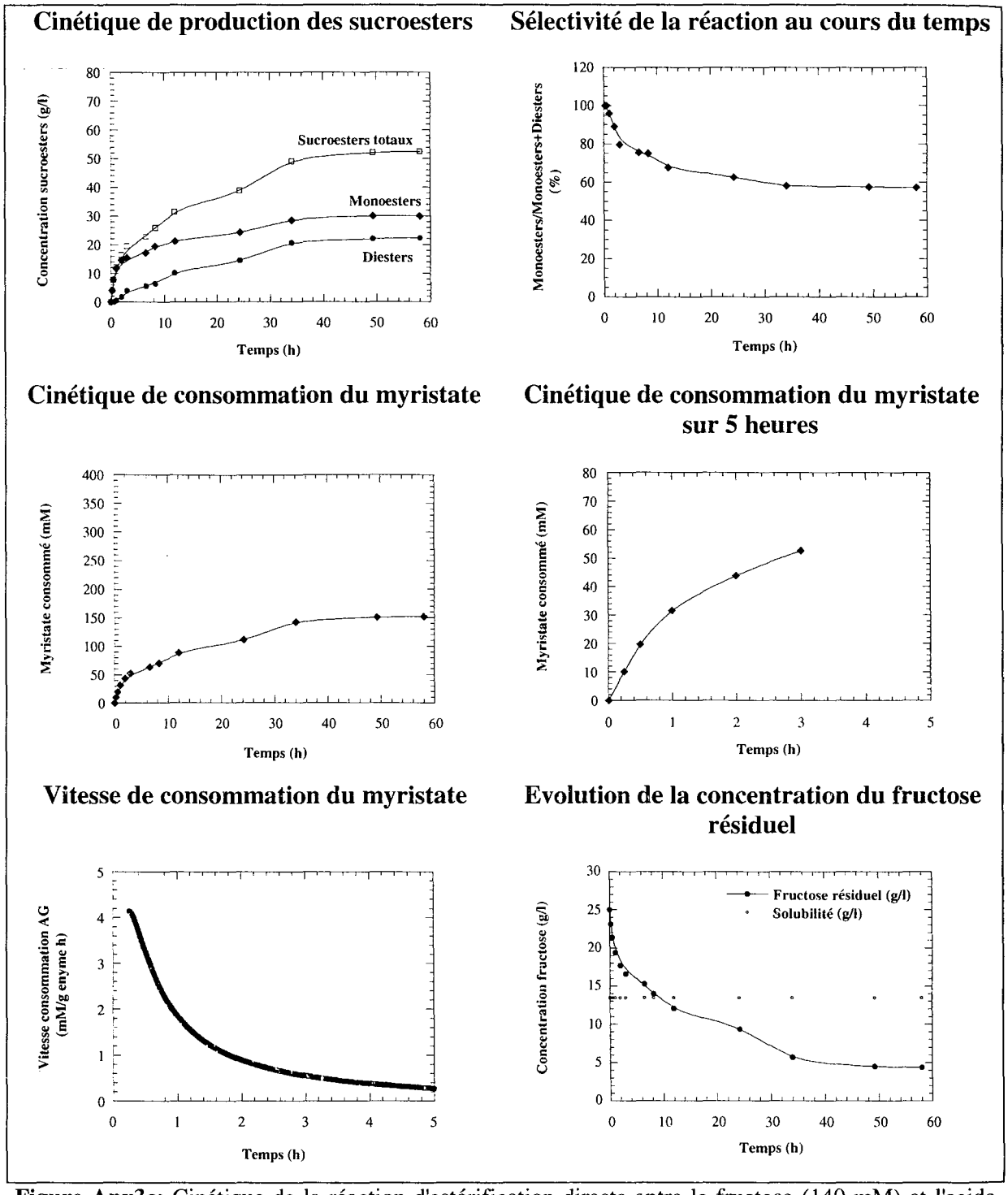


Figure Anx3c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide myristique (420 mM).

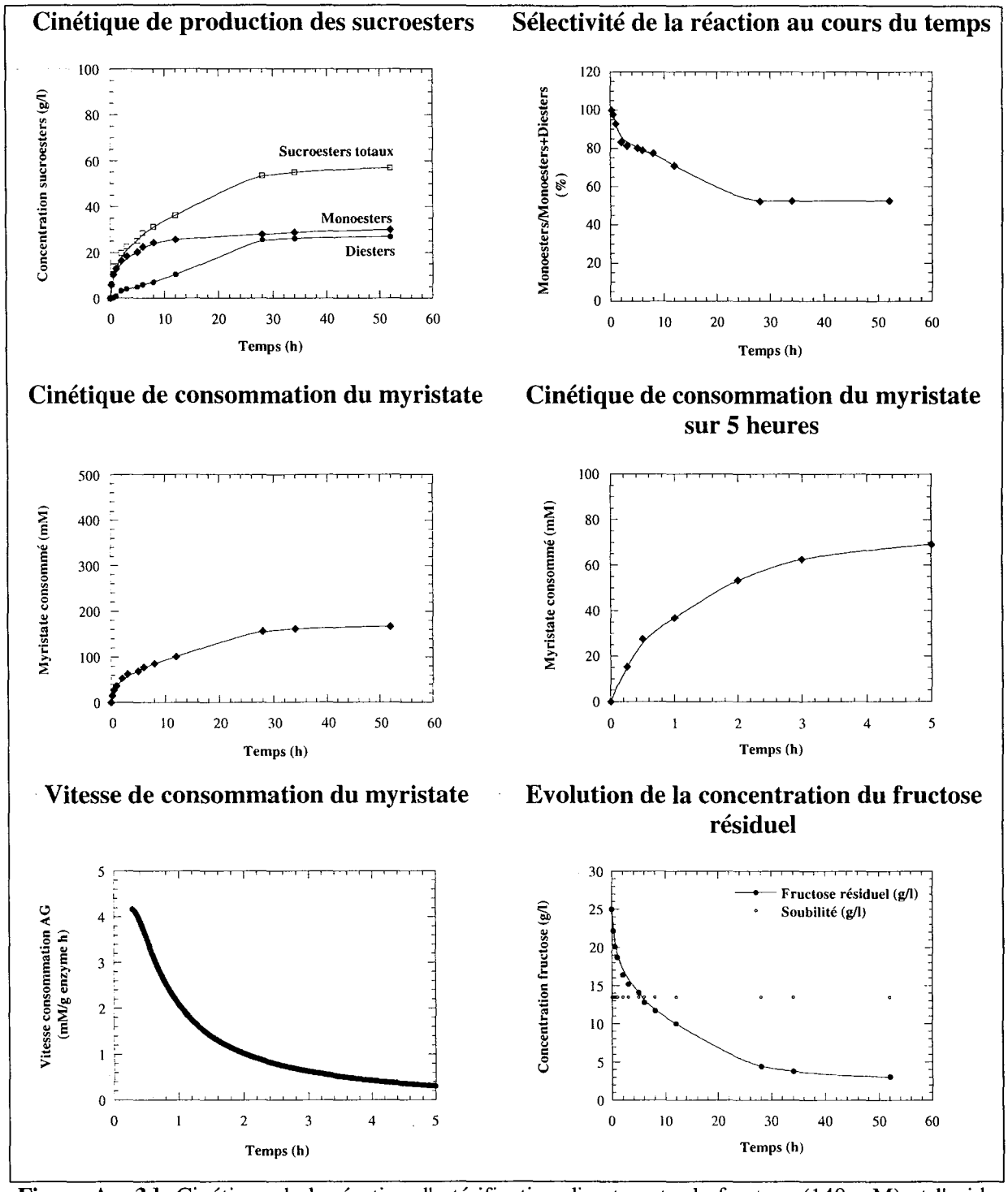


Figure Anx3d: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide myristique (560 mM).

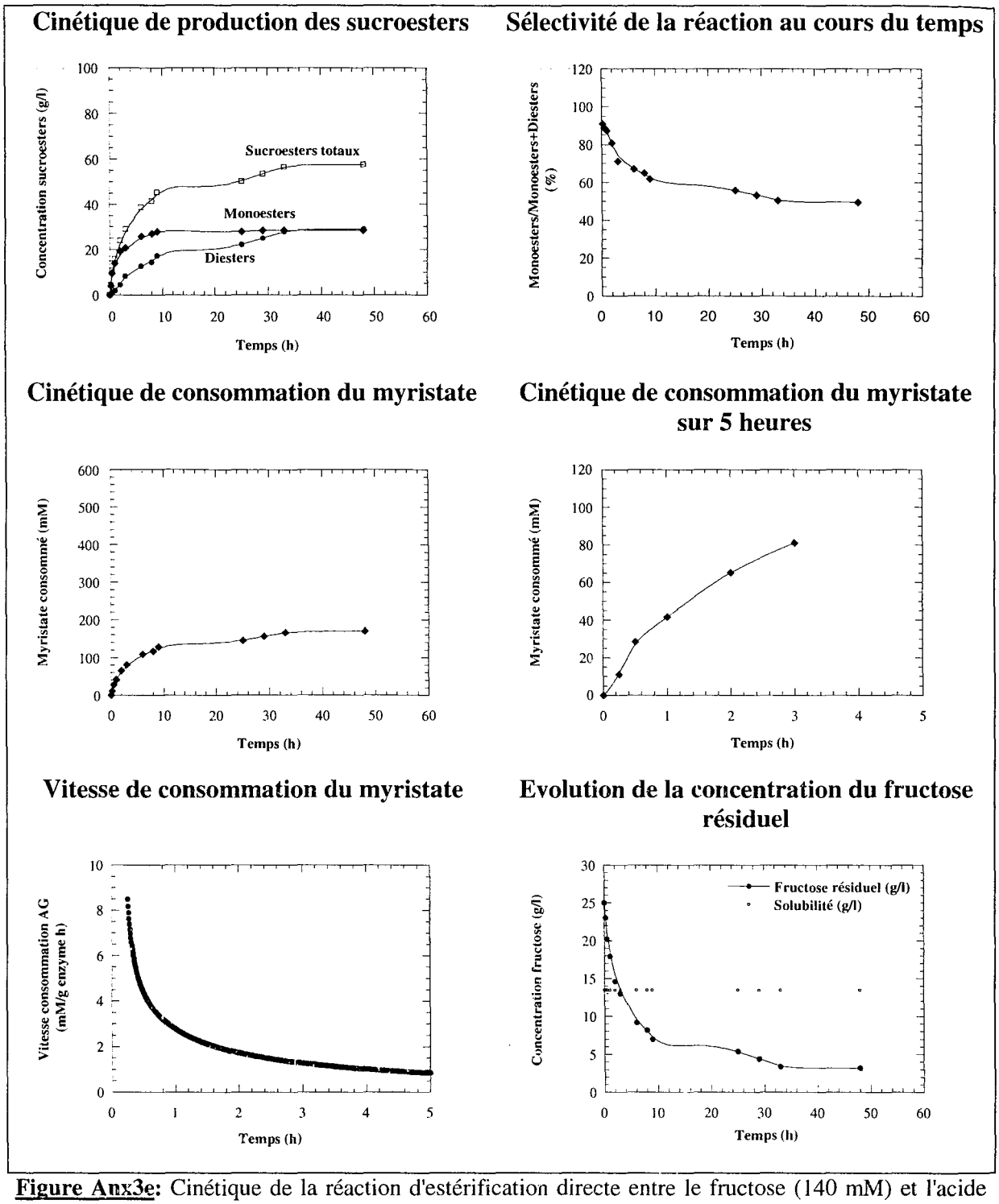


Figure Anx3e: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide myristique (700 mM).

ANNEXE 4: Palmitates de fructose (C16)

Les résultats des réactions de synthèse par estérification directe de sucroesters à partir du fructose et de l'acide palmitique sont reportés sur les **Figures Anx4a** à **Anx4e**.

- Les synthèses de palmitates de fructose présentent des vitesses variables en fonction de la concentration initiale en acide gras. La vitesse de consommation de l'acide palmitique ne présente pas de différence significative et est de 2.7 à 3.8 mM/g enzyme.h pour les concentrations initiales en acide palmitique de 140, 420 et 560 mM. La vitesse est beaucoup plus importante (9.5 mM/g enzyme.h) pour une concentration initiale d'acide palmitique de 280 mM pour rechuter à 700 mM d'acide palmitique à 6.8 mM/g enzym.h. Pour une concentration initiale donnée, au fur et à mesure de la réaction, la vitesse chute et se stabilise au bout de 5 heures de réaction à des valeurs négligeables comprises entre 0.1 et 0.6 mM d'acide palmitique consommé/g enzyme.h.
- La proportion de monoesters diminue avec l'augmentation de la concentration initiale en acide palmitique. A l'équilibre, cette réaction aboutit à des proportions de monoesters comprises entre 50 et 85 % en passant de 700 à 140 mM d'acide palmitique. Le reste des produits formés étant constitué de diesters qui sont synthétisés aux dépens des monoesters et dés les premières minutes à partir d'une concentration en acide palmitique de 420 mM. Il faut noter que dans le cas de l'acide palmitique, on remarque qu'en passant de 140 à 280 mM, la proportion finale en monoesters ne varie pas.
- A l'équilibre, la concentration en fructose résiduel est inférieure à sa solubilité dans le M2B2 à 60 °C quelle que soit la concentration en acide palmitique. On est au dessous de la solubilité du fructose en moins de 10 heures de réaction, sauf dans le cas d'une concentration initiale en acide palmitique de 140 mM où la concentration en fructose résiduel évolue plus lentement. A l'équilibre, la concentration finale en fructose résiduel baisse lorsqu'on augmente la concentration initiale en acide palmitique jusqu'à 560 mM. Alors qu'à 700 mM, la concentration en fructose résiduel est plus élevée (6 g/l) qu'à 560 mM (2.5 mM) s'accompagnant d'une concentration finale en sucroesters moins importante.
- Ces synthèses se caractérisent également par un état pseudo-stationnaire qui se manifeste par un ralentissement puis une reprise de la synthèse au bout de 24 heures de réaction.

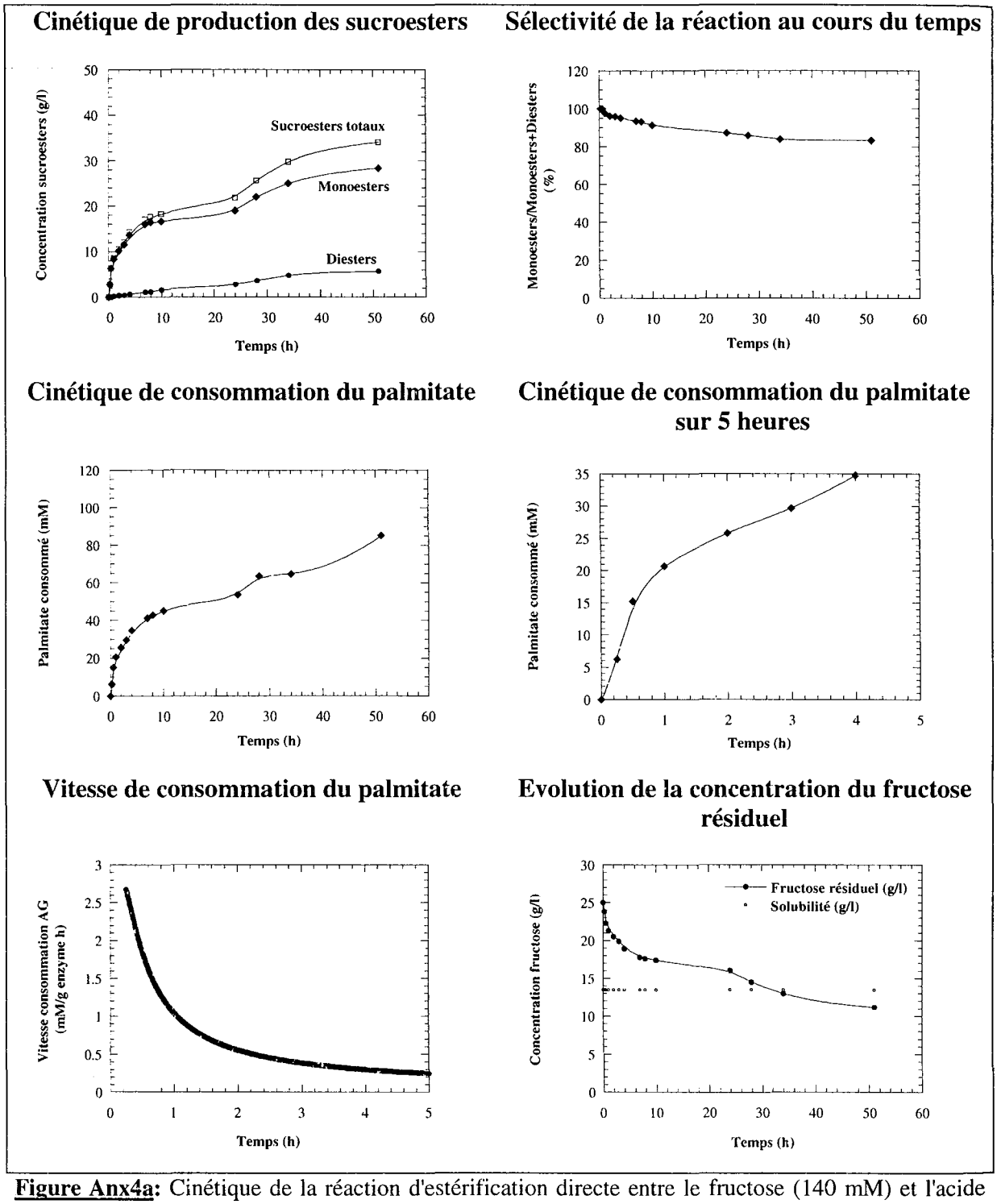


Figure Anx4a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide palmitique (140 mM).

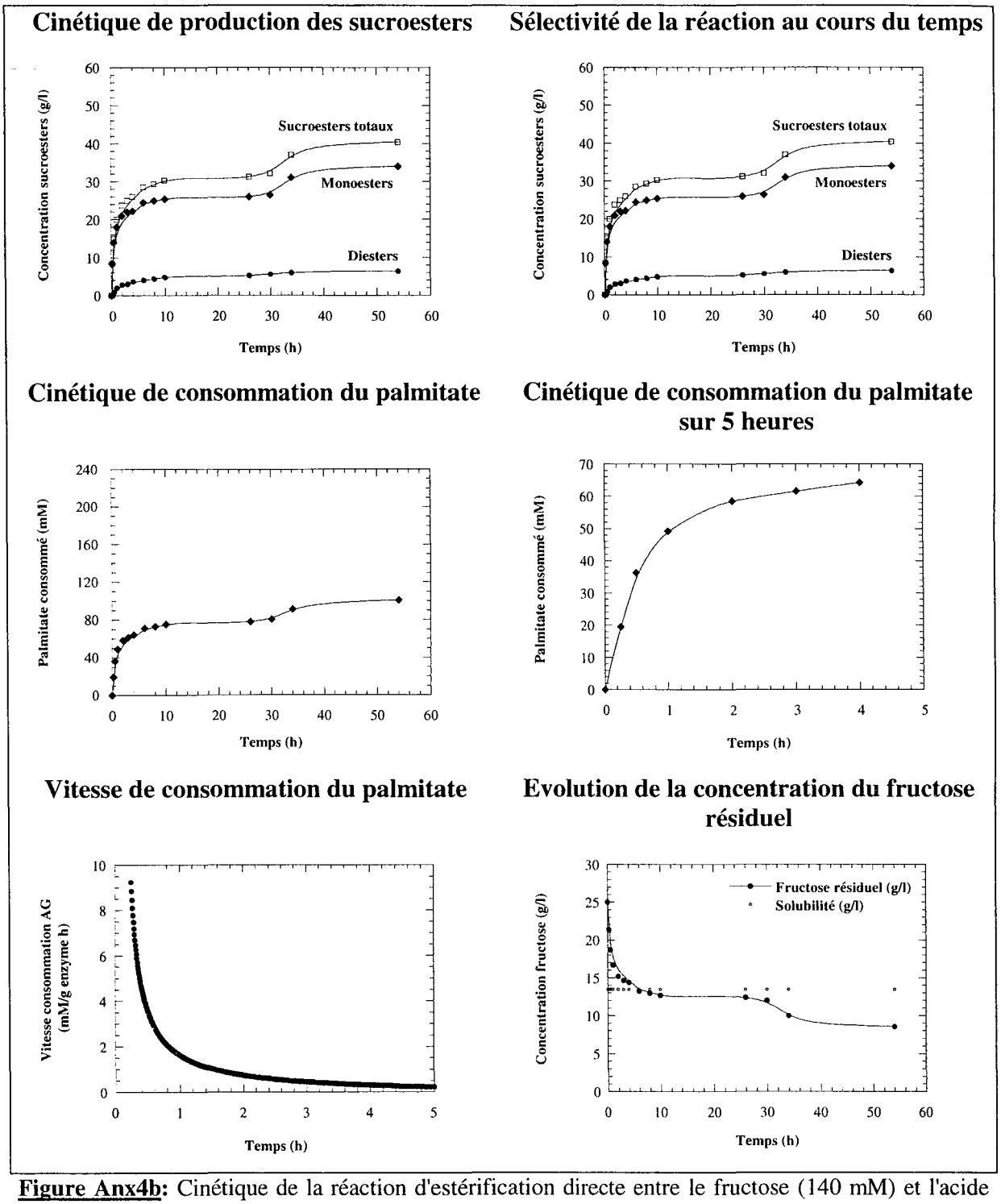


Figure Anx4b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide palmitique (280 mM).

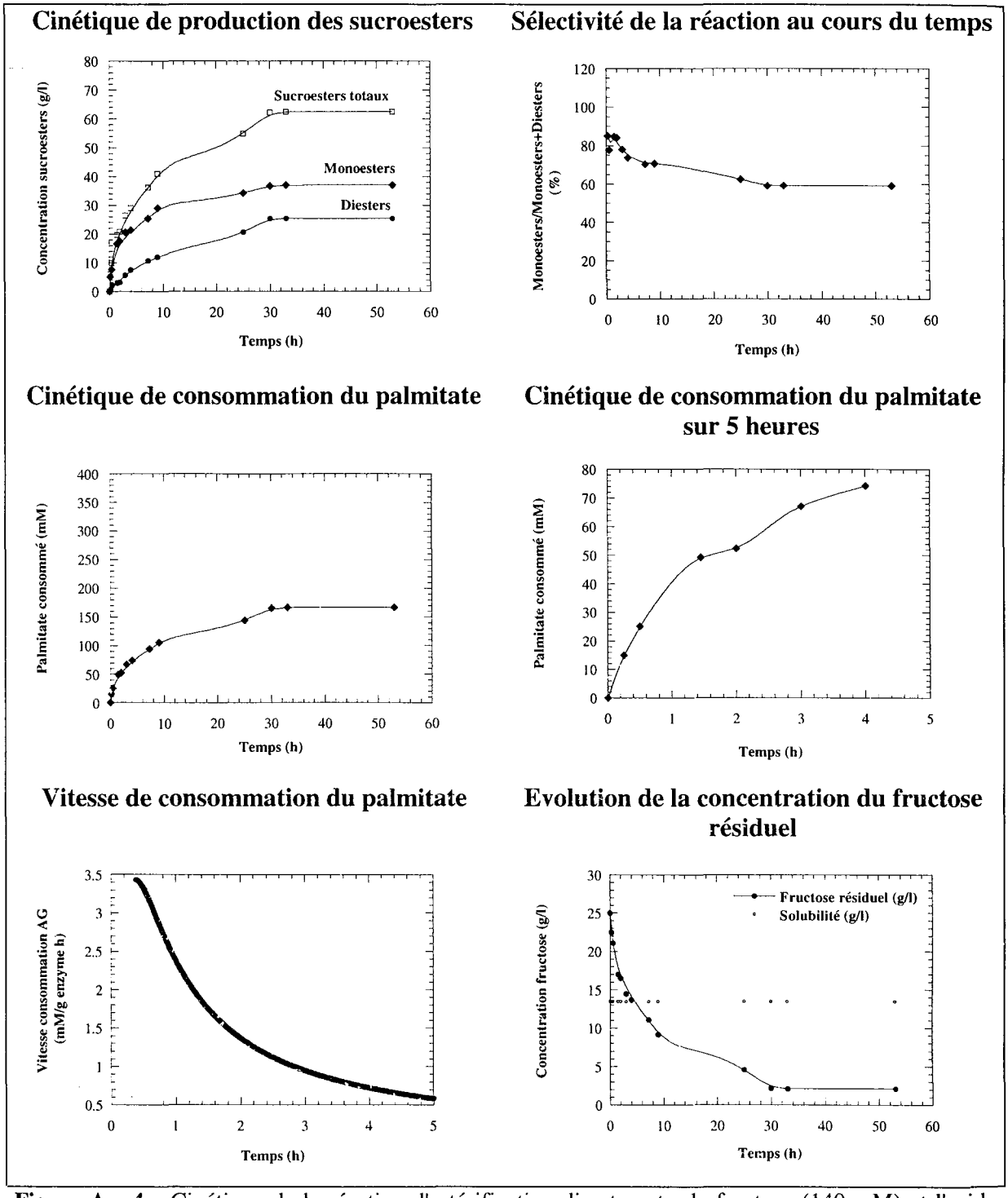


Figure Anx4c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide palmitique (420 mM).

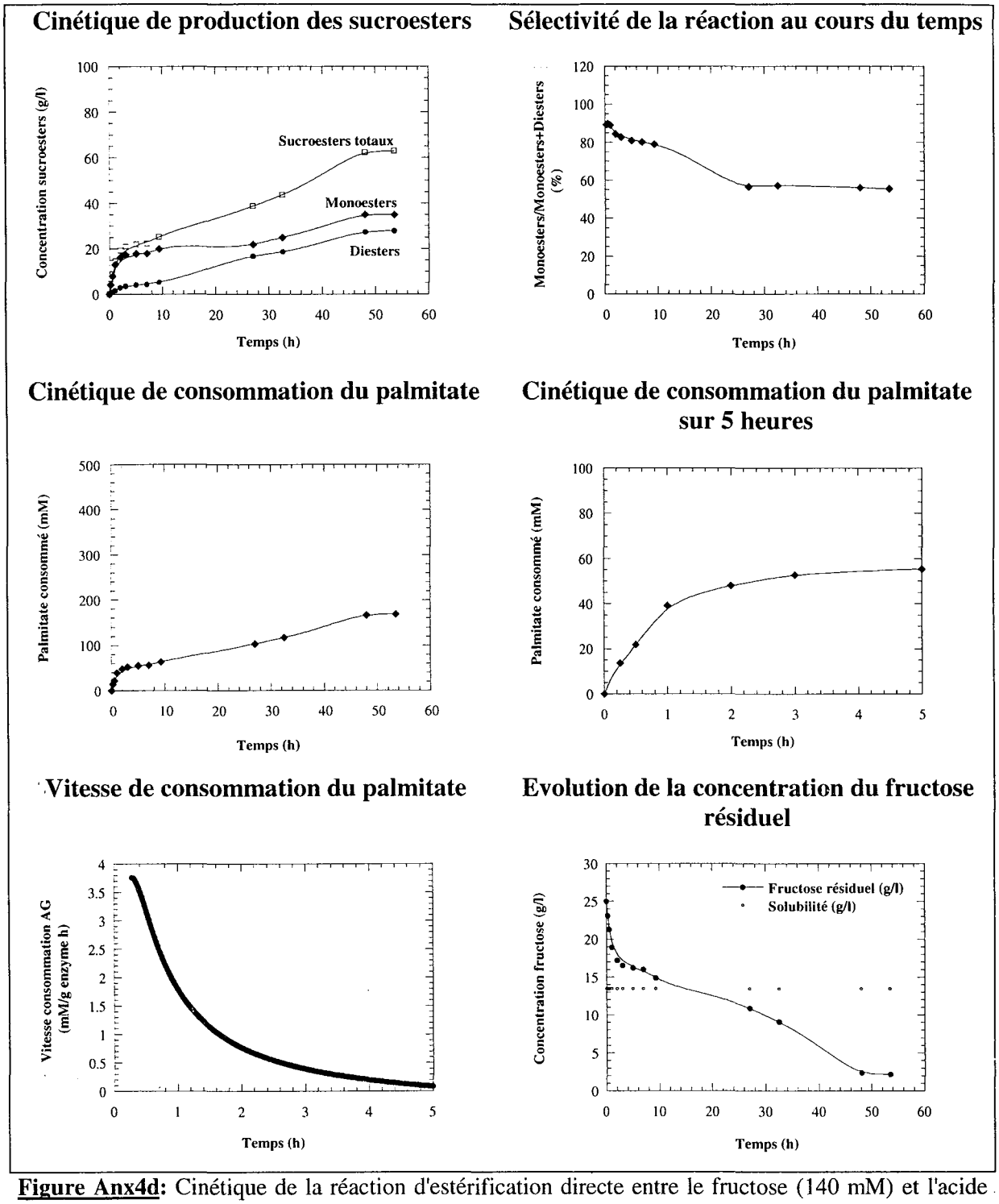


Figure Anx4d: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide palmitique (560 mM).

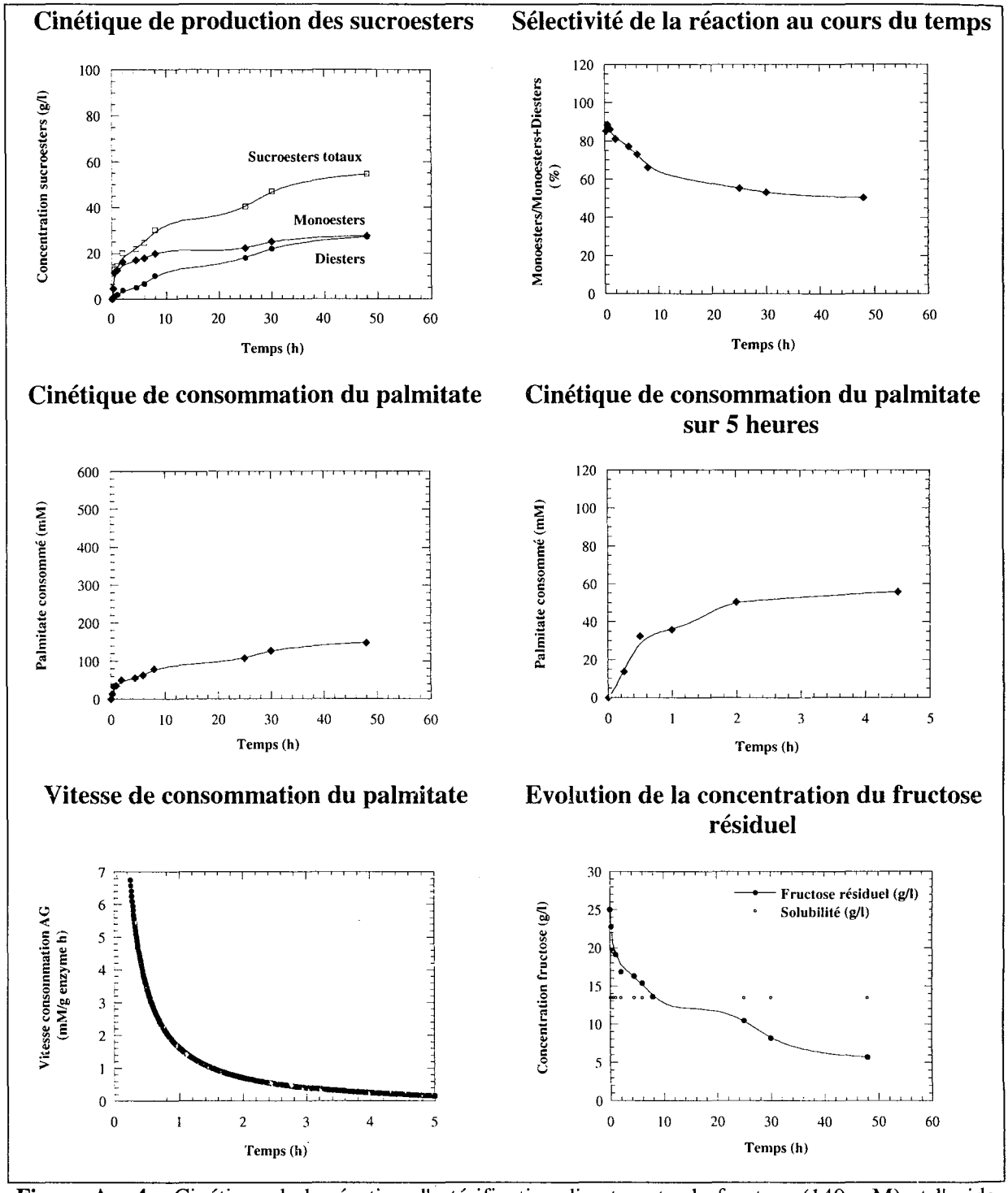


Figure Anx4e: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide palmitique (700 mM).

ANNEXE 5: Stéarates de fructose (C18)

Les résultats des réactions de synthèse par estérification directe de sucroesters à partir du fructose et de l'acide stéarique sont reportés sur les **Figures Anx5a** à **Anx5e**. Dans le cas de l'acide stéarique, on a étudié l'effet de la concentration initiale en acide gras dans une gamme plus large afin de réaliser la synthèse en partant d'un excès de sucre par rapport à l'acide gras.

- A l'exception d'une concentration initiale de 28 mM d'acide stéarique, toutes les synthèses obtenues avec les autres concentrations montrent des profils semblables des concentrations en sucroesters et en acide stéarique consommé ainsi que des vitesses de consommation de l'acide gras. En effet, pour ces concentrations initiales en acide stéarique, la synthèse se fait essentiellement durant les 30 premières heures de la réaction et permet d'obtenir deux produits: les mono- et diesters de fructose. La vitesse de consommation de l'acide stéarique chute de manière considérable dés les premières heures de la synthèse.

- La réaction de synthèse avec 28 mM d'acide stéarique débute avec une très faible vitesse de l'ordre de 0.48 mM C18 consommé/g enzyme.h. On remarque qu'au bout de 2 heures, la vitesse commence à se stabiliser pour atteindre des valeurs négligeables de l'ordre de 0.04 mM C18/g enzyme.h au bout de 5 heures de réaction. Pour des concentrations initiales comprises entre 70 et 280 mM, les vitesses de consommation de l'acide stéarique ne présentent pas de différence significative avec une moyenne de 2.7 mM/g enzyme.h. A 560 mM, la vitesse de réaction est la plus élevée de l'ordre de 8 mM/g enzyme.h. Au-delà, on assiste à une chute des vitesses jusqu'à 3.8 mM/g enzyme.h pour une concentration initiale en acide stéarique de 700 mM. Toutes ces vitesses atteignent des valeurs négligeables au bout de 5 heures de réaction.

- La réaction réalisée avec 28 mM d'acide stéarique conduit exclusivement à des monoesters jusqu'à plus de 50 heures de réaction. Au-delà de ces concentrations initiales, on synthétise conjointement des mono- et des diesters. Dans ce cas, les proportions les proportions en monoesters diminuent avec l'augmentation de la concentration initiale en acide stéarique. A l'équilibre, les réactions de synthèse aboutissent à des proportions de monoesters comprises entre 60 et 90 % en passant de 700 à 70 mM d'acide stéarique. Le reste des produits formés étant constitué de diesters qui sont synthétisés dés les premières

minutes de la réaction lorsqu'on travaille avec des concentrations initiales en acide stéarique supérieures à 280 mM.

- Du point de vue fructose résiduel, on est au dessus de la solubilité du fructose dans le M2B2 à 60 °C tant qu'on travaille en excès de fructose par rapport à l'acide stéarique (28, 70 et 116 mM d'acide gras). Au-delà de 140 mM d'acide stéarique, on se trouve plus ou moins rapidement au dessous de cette solubilité. La concentration en fructose résiduel continue à chuter jusqu'à s'annuler pour des concentrations initiales en acide stéarique supérieures à 420 mM.

- La majorité de ces synthèses se caractérisent par un état pseudo-stationnaire qui se manifeste par un ralentissement puis une reprise de la synthèse au bout de 24 heures de réaction.

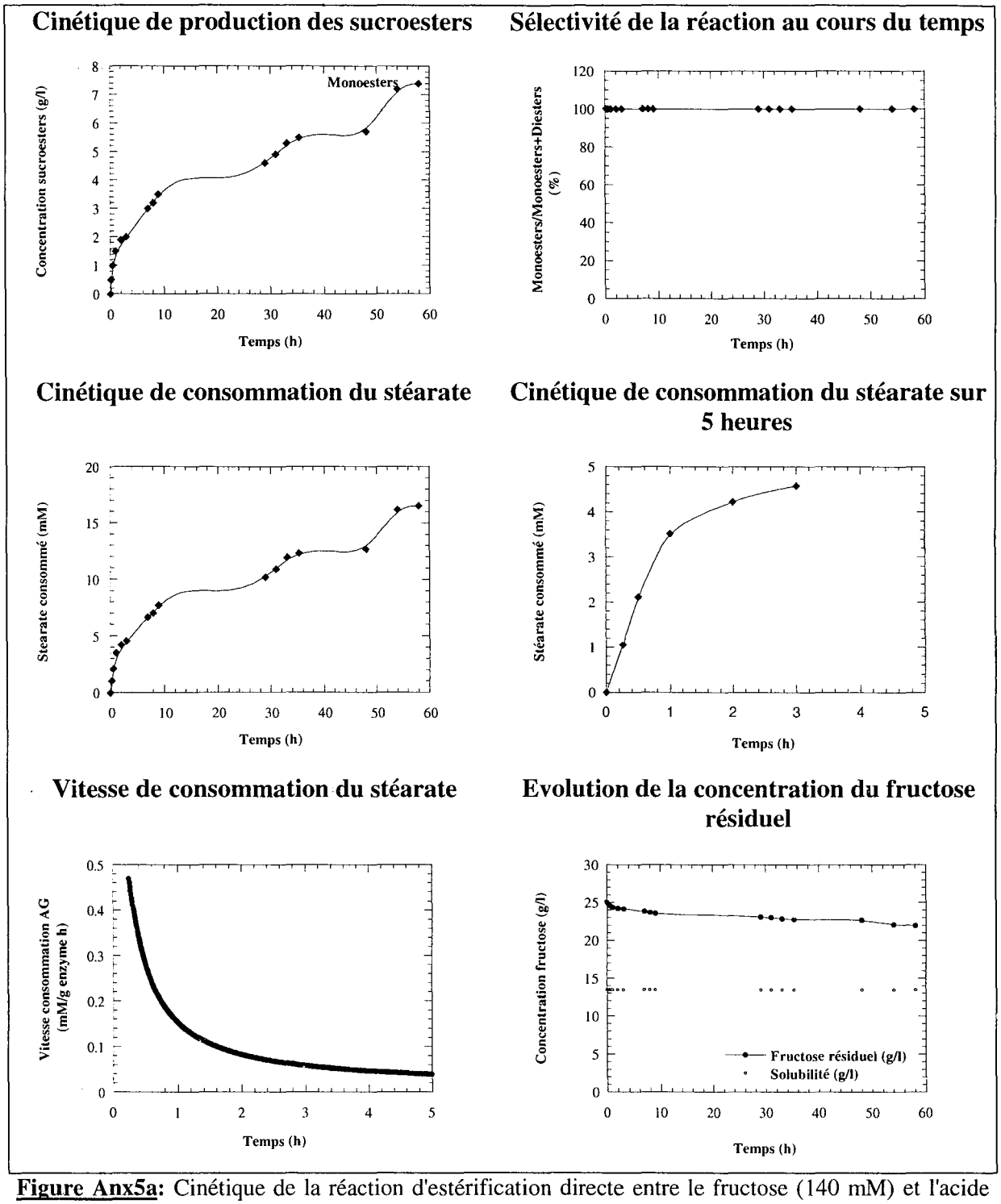


Figure Anx5a: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide stéarique (28 mM).

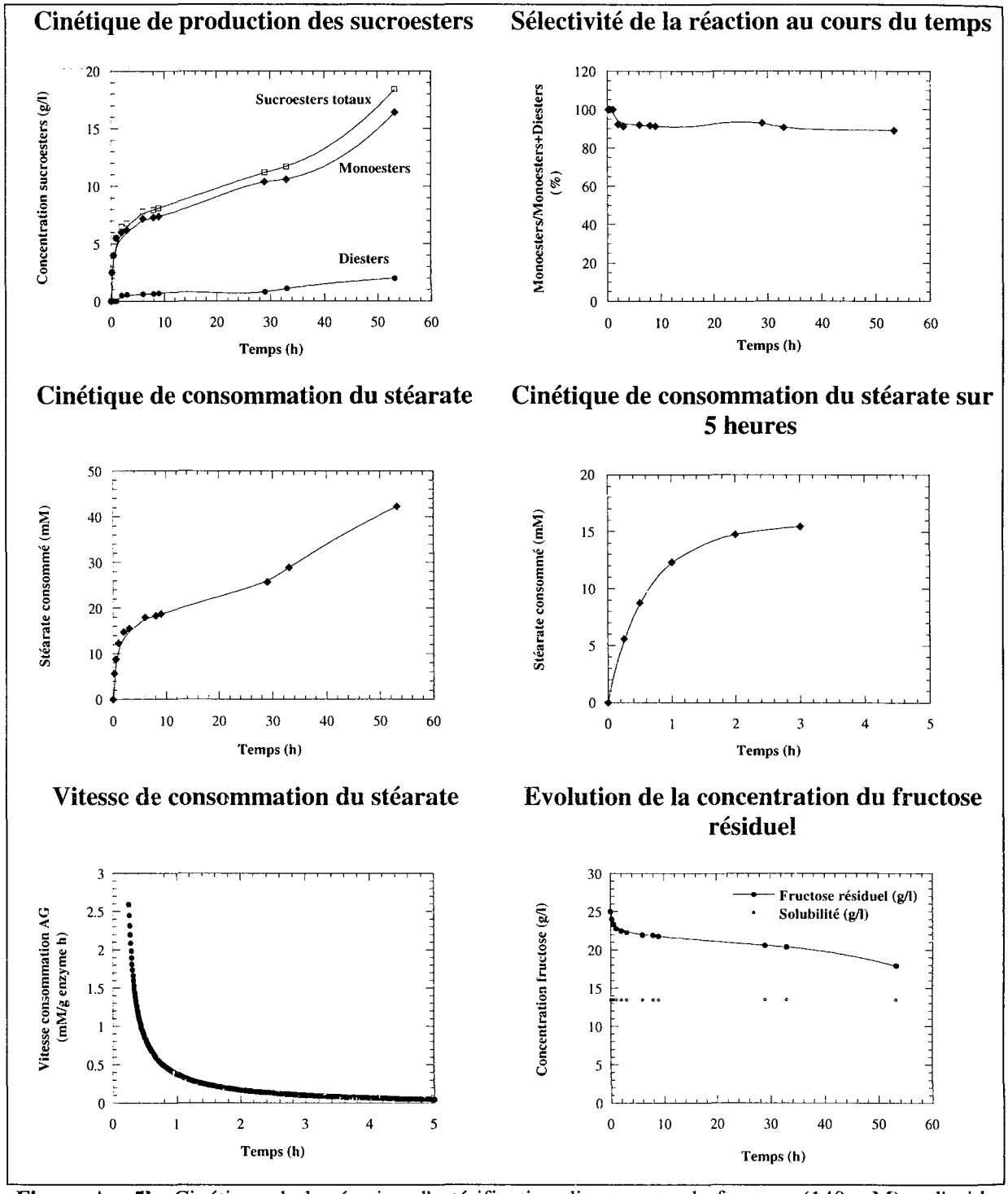


Figure Anx5b: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide stéarique (70 mM).

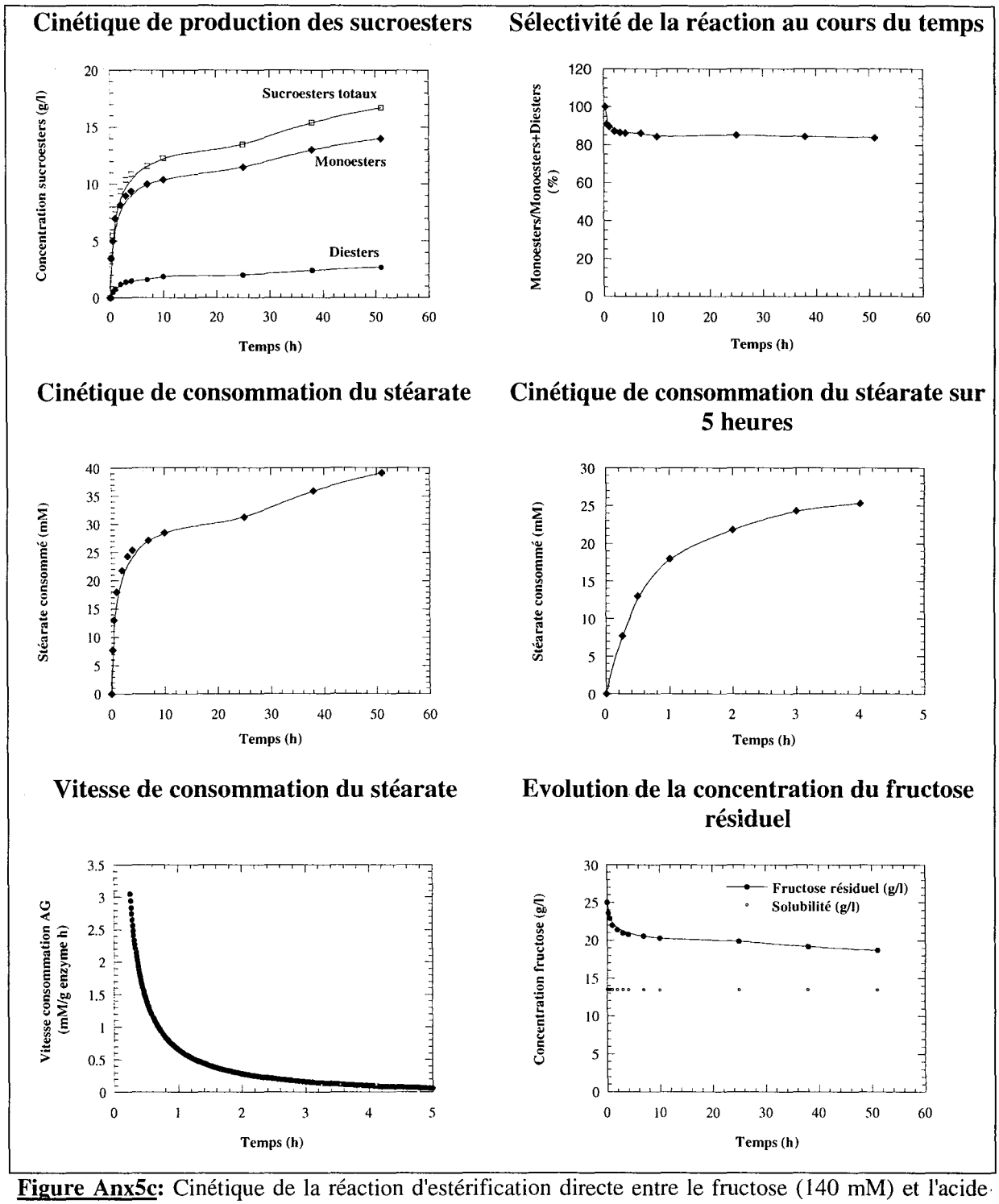


Figure Anx5c: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide stéarique (116 mM).

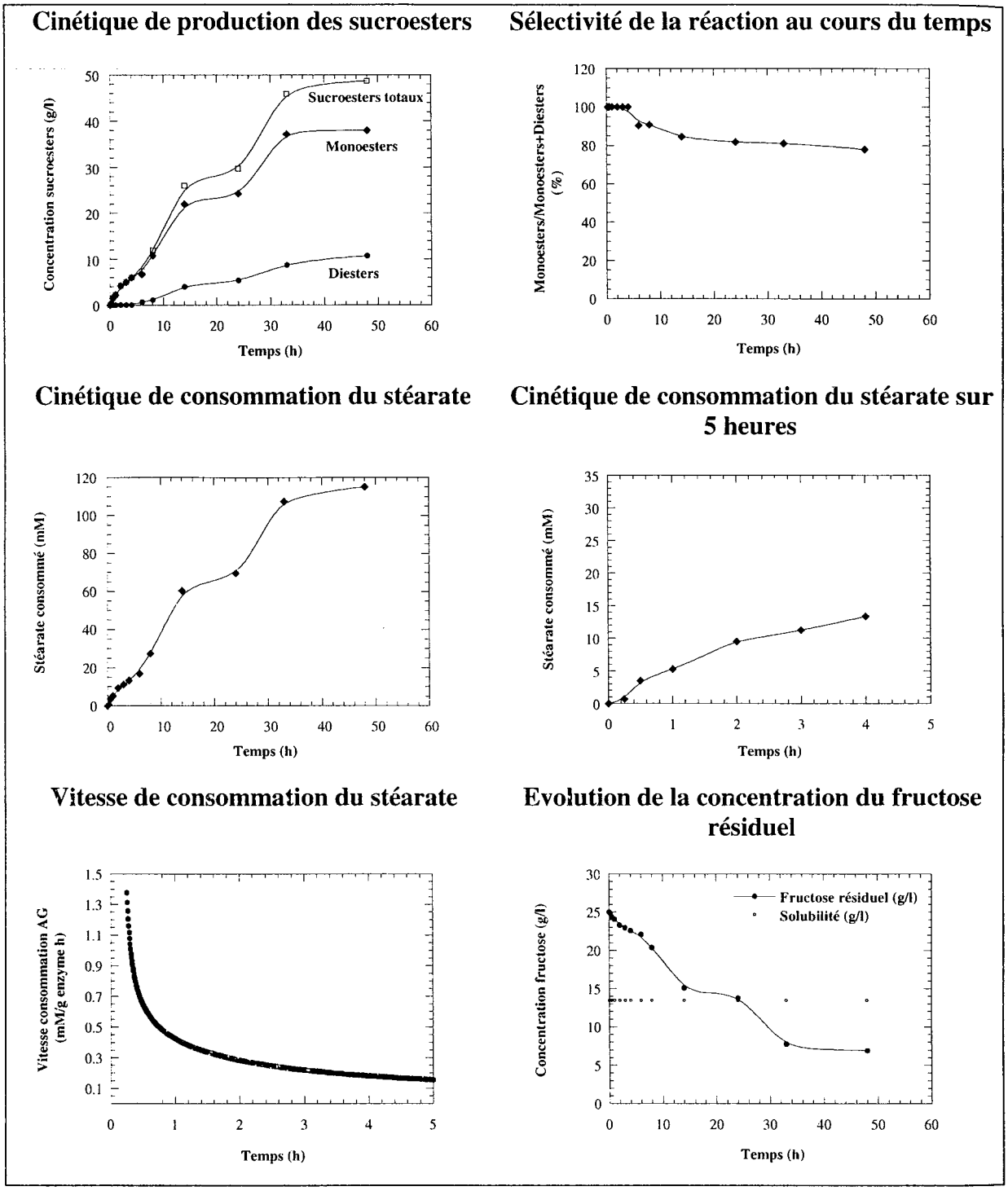


Figure Anx5d: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide stéarique (140 mM).

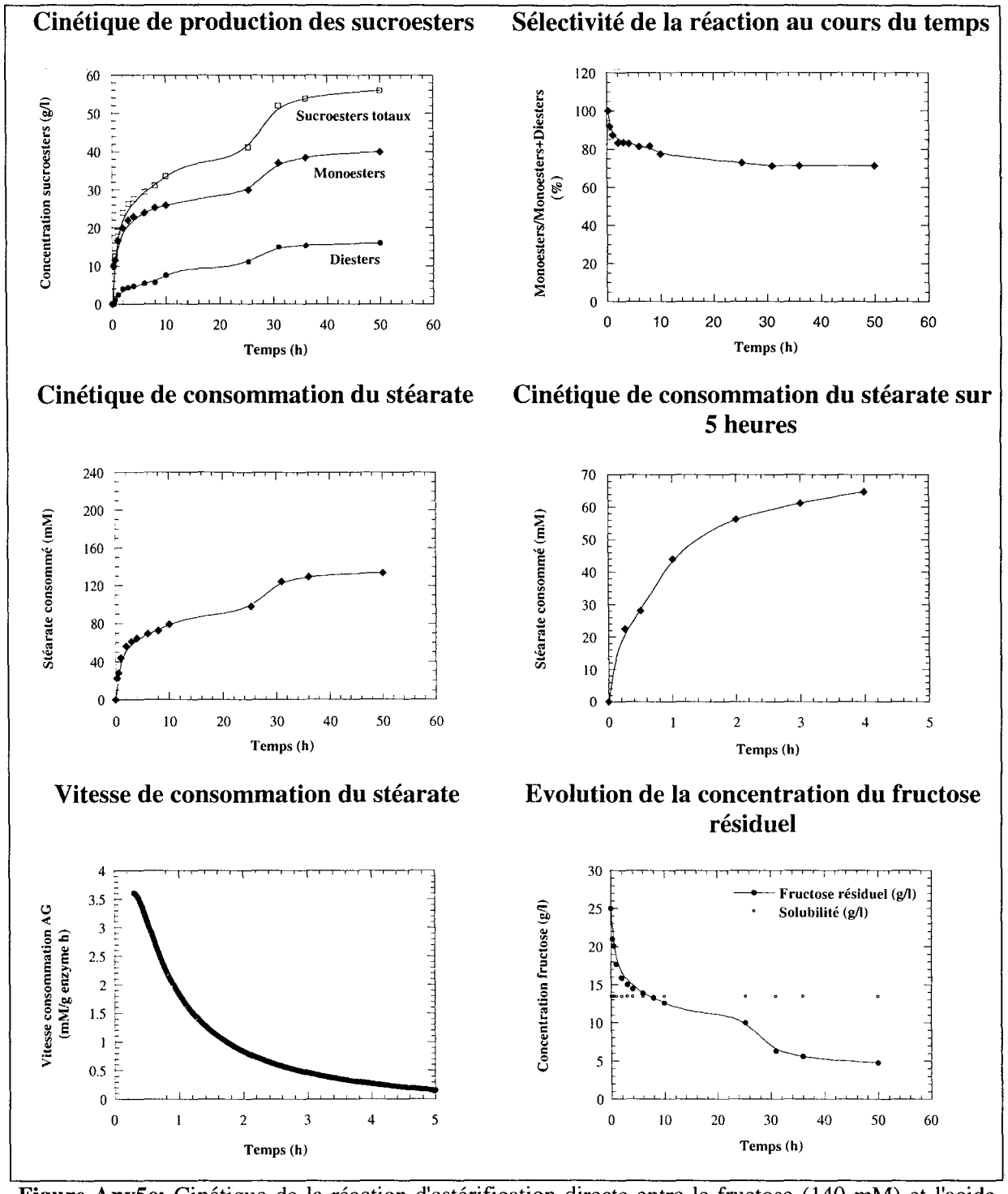


Figure Anx5e: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide stéarique (280 mM).

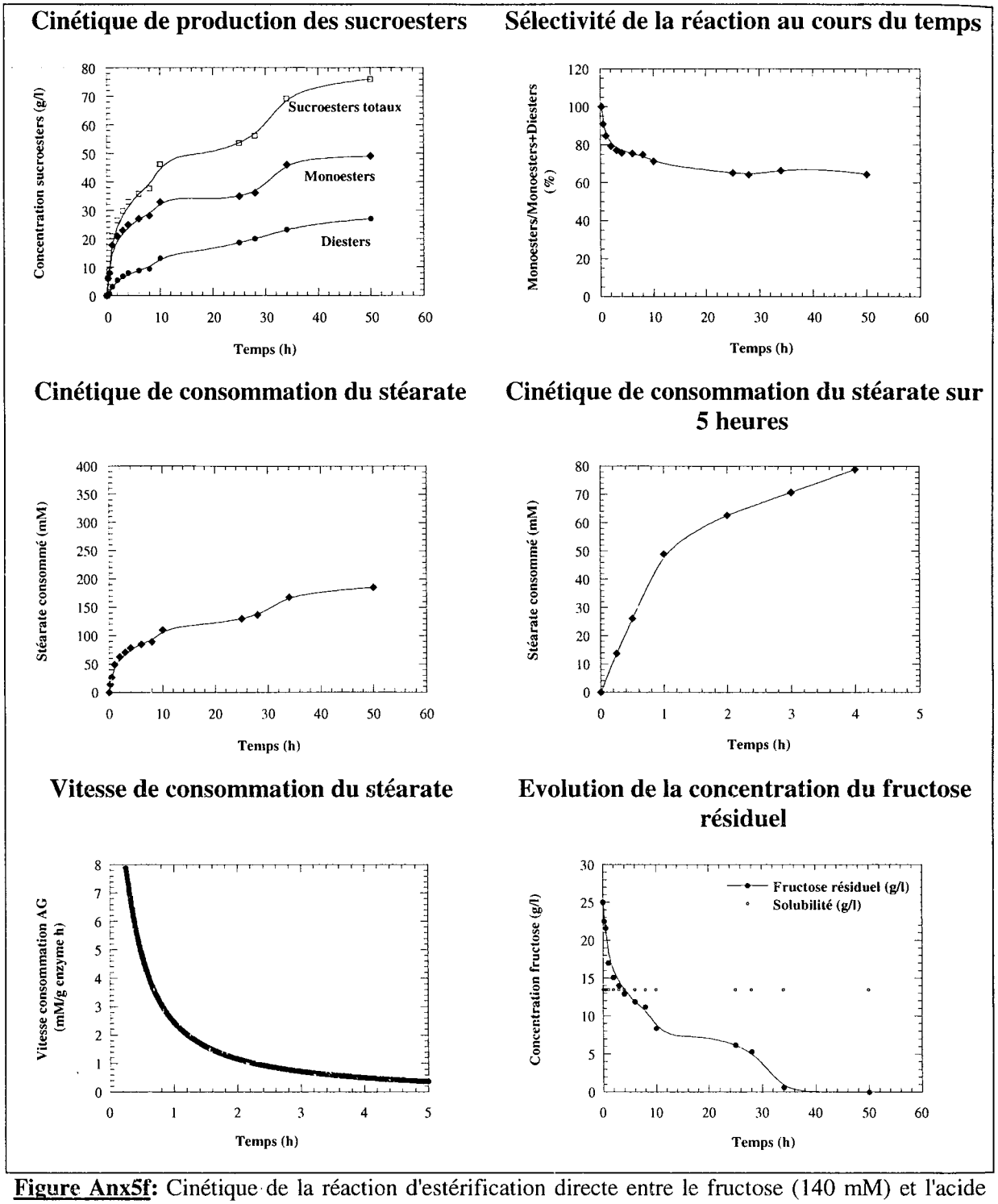


Figure Anx5f: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide stéarique (420 mM).

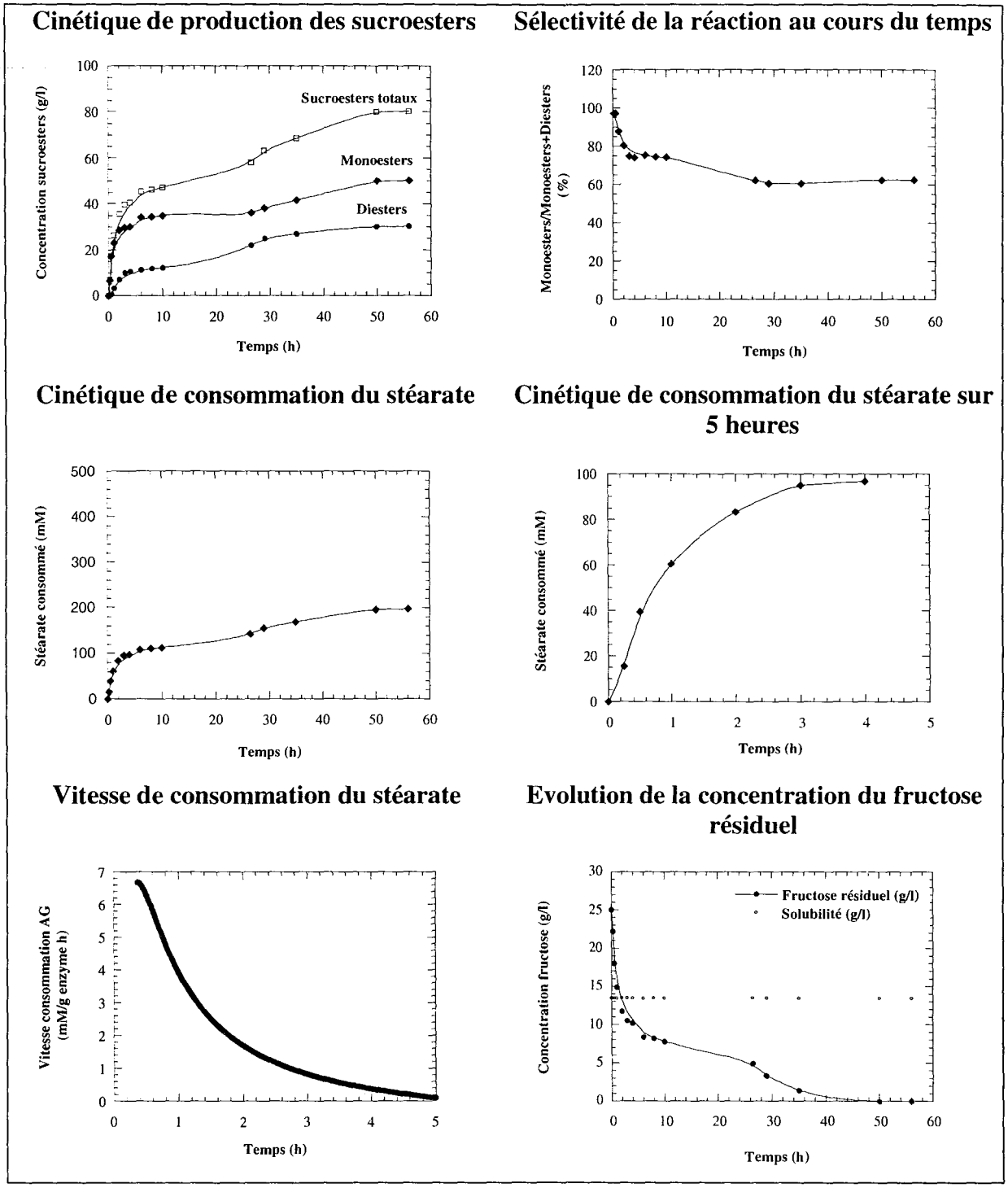


Figure Anx5g: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide stéarique (560 mM).

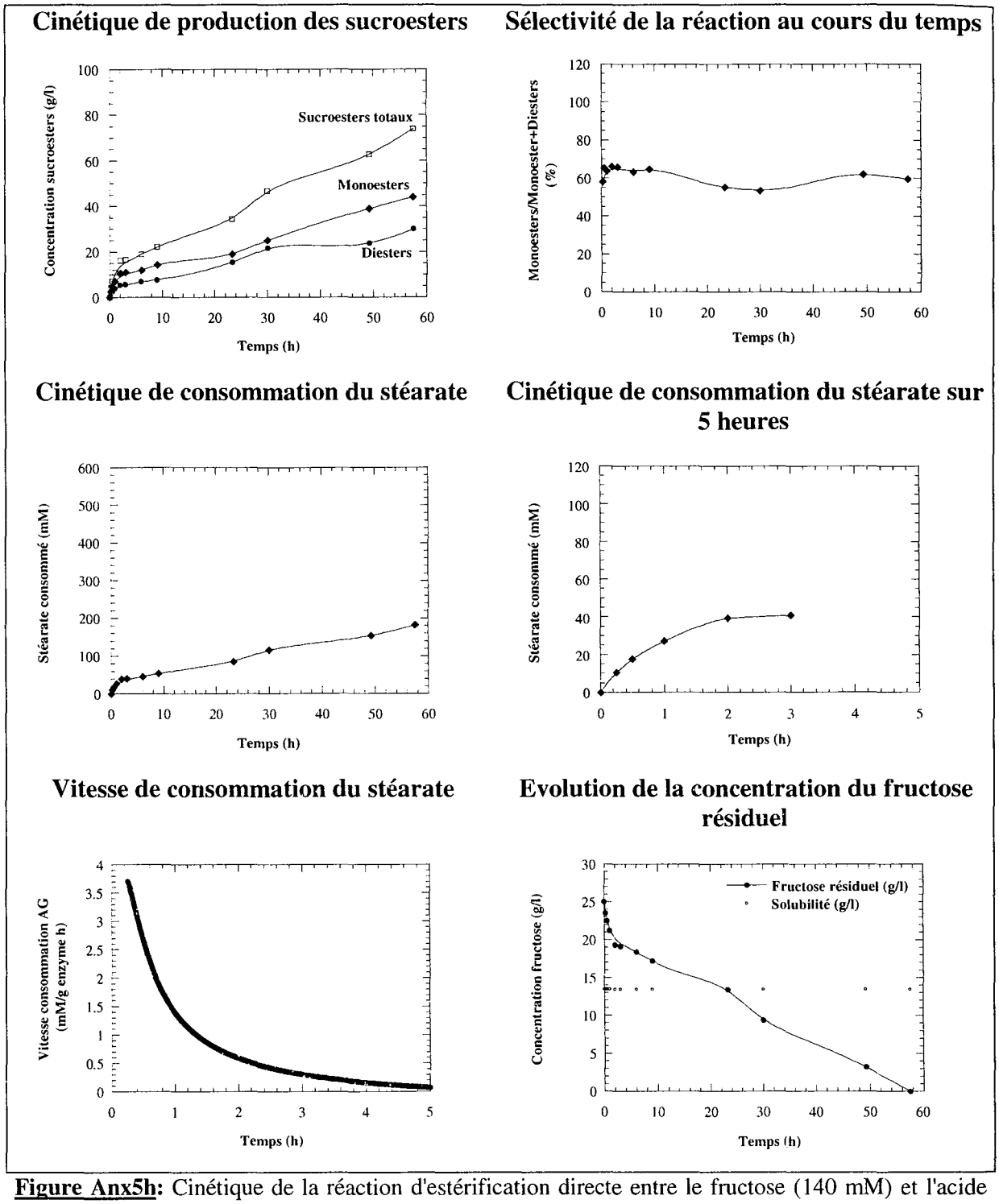


Figure Anx5h: Cinétique de la réaction d'estérification directe entre le fructose (140 mM) et l'acide stéarique (700 mM).

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

oOo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur COMBES Didier, Professeur, INSA, Toulouse
Monsieur LAVAL Jean Marc, Professeur, UTC, Compiègne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle SOULTANI Samia

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

«Synthèse enzymatique d'esters de fructose et d'acide gras : cinétique, purification et caractérisation des propriétés tensioactives»

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **«PROCEDES BIOTECHNOLOGIQUES & ALIMENTAIRES»**

Fait à Vandoeuvre le, 19 novembre 2001

Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Résumé : Ce travail a pour objectif d'étudier la cinétique, la purification et les propriétés tensioactives de sucroesters obtenus par synthèse enzymatique. Le fructose et différents acides gras de C8 à C18 ont été utilisés comme substrats. Ces synthèses ont été réalisées dans le méthyl-2 butanol-2 à 60°C et en présence de la lipase de *Candida antarctica* immobilisée comme biocatalyseur. Du point de vue cinétique, les résultats obtenus montrent que l'activité de cette enzyme est influencée par les concentrations des substrats, l'hydrophobicité et le niveau de l'eau dans le milieu réactionnel. Par un contrôle judicieux de l'environnement de la synthèse, il a été possible de convertir la quasi totalité des substrats (>90 %) avec des concentrations avoisinant les 140 g/l. Il a été démontré que la sélectivité monoesters/diesters est affectée par le macro-environnement du système. La purification des monoesters des substrats résiduels a été réalisée avec succès par extraction liquide-liquide. La pureté des produits obtenus est de l'ordre de 99 % avec des pertes < 7%. Ces extractions ont été réalisées sur des sucroesters en C10, C14 et C18. La caractérisation des propriétés des sucroesters à l'état pur ou sous forme de mélanges avec les diesters a montré que ces molécules sont aussi performantes que les esters de saccharose du commerce. En effet, ils ont permis de stabiliser les émulsions H/E et d'abaisser les tensions interfaciales huile de colza/eau. De même, ils ont un pouvoir moussant élevé.

Abstract: This work aims to study kinetics, purification and surfactive properties of sugar esters obtained by enzymatic synthesis. Fructose and various fatty acids (C8 to C18) were used as substrates. These syntheses were carried out in methyl-2 butanol-2, at 60 °C and in the presence of an immobilized *Candida antarctica* lipase as biocatalyst. From the kinetic point of view, the results obtained show that the activity of this enzyme is influenced by substrate concentrations, hydrophobicity and the level of water in the medium. By a judicious control of the synthesis environment, it was possible to convert the quasi totality of the substrates (>90 %) with concentrations bordering the 140 g/l. The monoesters/diesters selectivity was affected by the macro-environment of the system. The purification of the monoesters from the residual substrates was carried out successfully by a liquid-liquid extraction. The purity of the obtained products is about 99 % with losses less than 7%. These extractions were carried out on three sugaresters (C10, C14 and C18). The characterization of the properties of the sugaresters in a pure state or in mixture with diesters showed that these molecules are as efficient as sucrose esters . They allow to stabilize H/E emulsions and to lower rapeseed oil/water interfacial tensions. In the same way, they have a high foaming capacity.

Mots clés : Sucroester, fructose, acide gras saturé, lipase, Novozym 435, milieu organique, extraction liquide-liquide, propriétés tensioactives.