

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 588 272**

⑫ N° d'enregistrement national :

**85 14827**

⑬ Int Cl' : C 12 P 7/62.

⑭

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑮ Date de dépôt : 7 octobre 1985.

⑯ Priorité :

⑰ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 15 du 10 avril 1987.

⑱ Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑴ Demandeur(s) : *Société anonyme dite : ETABLISSE-  
MENTS GATTEFOSSE. — FR.*

⑵ Inventeur(s) : Jean Graille.

⑶ Titulaire(s) :

⑷ Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

⑸ Procédé de synthèse d'esters d'acides organiques et d'alcools en phase hétérogène par catalyse enzymatique.

⑹ L'invention concerne le domaine de la synthèse d'esters  
spécifiques de polyols et d'acides organiques.

Selon un mode préféré de réalisation, elle consiste à mettre  
en contact sous agitation une phase aqueuse comportant un  
triol comme le glycérol et une lipase et une phase organique  
comportant un acide gras et un solvant organique non miscible  
à l'eau.

Dans le cas où le monoester formé est soluble dans le  
solvant (solvant chloré) la réaction aboutit à un rendement  
élevé en monoesters. Dans le cas où le monoester est insolu-  
ble dans le solvant (solvant aliphatique) la réaction aboutit  
avec un rendement élevé à un diester.

FR 2 588 272 - A1

D

Procédé de synthèse d'esters d'acides organiques et d'alcools en phase hétérogène par catalyse enzymatique.

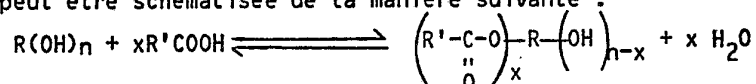
L'invention concerne un procédé de synthèse d'esters d'acides organiques et d'alcools ou de thiols consistant à faire réagir au moins un acide organique de C<sub>2</sub> à C<sub>40</sub> avec au moins un alcool ou un thiol en présence d'une lipase.

Etat de la technique

Les réactions chimiques catalysées par des composés biochimiques (enzymes), du fait de leur haute spécificité et de leur rendement élevé, prennent une importance de plus en plus considérable en chimie organique.

Dans le domaine de la chimie des corps gras, cette tendance se précise également chaque jour un peu plus. Ainsi, on trouvera dans le mensuel BIOFUTUR (n° spécial Biotechnologies et Industries agro-alimentaires octobre 1984 n° 28 p.77 à 79) un aperçu de l'état de la technique concernant ce domaine fait par l'inventeur de la présente demande de brevet.

Dans le cas de la réaction d'un acide avec un alcool ou un thiol catalysée par une enzyme, la réaction réversible peut être schématisée de la manière suivante :



Sur le plan industriel, on a surtout utilisé les enzymes pour catalyser la réaction d'hydrolyse. En effet, les enzymes catalysant les hydrolyses ne nécessitent en général pas de co-facteurs, biomolécules coûteuses et difficilement recyclables quantitativement.

Si la réaction d'hydrolyse a un intérêt certain, la réaction inverse de synthèse d'esters revêt également un intérêt indiscutable, surtout lorsqu'il s'agit d'esters difficilement accessibles par voie chimique, par exemple lorsqu'un seul isomère optique ou de position est souhaité.

Par ailleurs, cette réaction d'estérification est d'une grande importance car la synthèse d'esters d'acides gras dans un état de pureté élevée est d'un grand intérêt pour les industries pharmaceutique et cosmétique. Ces esters ont notamment des

applications dans le domaine des émulsions. Ce sont des molécules amphiphiles dont la Balance Hydrophile/Lipophile (HLB) est dépendante de la copule estérifiant l'acide gras. Une grande plage de l'échelle HLB peut ainsi être couverte.

5                   Ainsi, OKUMURA et al. ont tenté la synthèse de glycérides en milieu aqueux. Ils ont notamment obtenu dans les conditions les plus favorables 65 % d'un mélange de mono- et diglycérides après 18 h de réaction à 30°C en faisant réagir le glycérol sur des acides gras en présence d'une lipase. Ces  
10 travaux sont mentionnés dans les publications suivantes :  
Agricultural and Biological Chemistry (1981), 45, 185  
Biochimica Biophysica Acta (1979), 575, 156 Ibid (1977), 489,  
415.

                  Il s'agit donc d'une réaction non spécifique  
15 et qui, de ce fait, est peu intéressante sur le plan industriel.  
Objet de l'invention

                  A la différence des procédés déjà connus et qui  
ont été mentionnés dans l'état de la technique ci-dessus, la  
présente invention permet d'obtenir une réaction d'une grande  
20 spécificité.

                  En particulier, dans le cas des polyols (comme  
les triols), elle permet d'aboutir à des monoesters ou des diesters  
avec un rendement élevé parfois proche ou égal à 100 % selon le  
solvant utilisé.

#### 25 Description générale de l'invention

                  Selon l'invention le procédé est caractérisé  
en ce qu'il consiste à mettre en contact sous agitation une phase  
organique contenant l'acide organique et un solvant non ou peu  
miscible avec l'eau et une phase aqueuse comportant l'alcool ou le  
30 thiol et la lipase.

                  La réaction s'effectue donc à l'interface et,  
dans l'aspect le plus général, peut être appliquée avec succès  
à de nombreux alcools, thiols et acides.

                  On peut citer parmi ceux-ci les monoalcools  
35 linéaires de formule  $C_n H_{2n+1} OH$  où n est compris entre 2 et 30,  
les monoalcools ramifiés, les monoalcools insaturés, les diols

comme l'éthylèneglycol ou le diéthylèneglycol, les triols comme le glycérol ou le triméthylolpropane ou éthane, les tétrols comme le pentaérythritol, les hexitols comme le sorbitol, les sucres comme le saccharose, le lactose, les phénols comme les phénols végétaux tels que les tocophérols. Les thiols correspondant aux alcools précités conviennent également.

Bien entendu, on peut également utiliser sans aucune restriction les mélanges de deux ou plusieurs de ces alcools ou de ces thiols, la seule condition d'utilisation étant que les composés précités soient solubles dans l'eau. En effet, afin que la lipase puisse acquérir la conformation qui la rend active, il est nécessaire qu'elle soit en milieu aqueux.

Parmi les acides organiques, on peut citer les acides linéaires ou ramifiés, saturés ou insaturés et par exemple les acides gras saturés ou insaturés. En ce qui concerne l'acide, il faut que celui-ci ne soit pas soluble dans l'eau vu que la réaction selon l'invention est hétérogène et doit s'effectuer à l'interface. Cette réaction est donc plus aisée avec des acides ayant un nombre de carbone supérieur ou égal à 3.

Il est également possible d'utiliser des acides solubles dans l'eau tels que l'acide tartrique ou l'acide lactique à condition toutefois que l'alcool y soit insoluble ou tout au moins que le monoester le soit.

Cette liste n'est évidemment pas exhaustive et le chimiste de l'art pourra aisément comprendre que l'invention est destinée à protéger tous les acides organiques et tous les alcools qui sont connus pour réagir entre eux et conduire ainsi à des esters tout en préservant la condition que la réaction est effectuée en phase hétérogène.

Toutes les lipases bien connues peuvent être utilisées dans le cadre de l'invention. Ainsi, on peut citer à titre indicatif : la lipase pancréatique, *Rhizopus arrhizus*, *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*. La lipase peut se présenter sous forme soluble ou insoluble.

Les conditions de la réaction en ce qui concerne la durée, le pH, la température ne sont pas critiques mis à part le fait que ces conditions ne doivent pas rendre la lipase inactive. On conçoit donc que cela dépendra dans une certaine mesure du type de lipase utilisée. En général, il est souhaitable d'effectuer la

réaction en absence d'un milieu tampon à un pH compris entre 6 et 8. Cependant, dans certains cas, l'usage d'un milieu tampon est obligatoire. De même, la température devra généralement être comprise entre 10°C et 60°C.

5 De préférence, le rapport en poids alcool/eau sera compris entre 30/70 et 99/1 et le rapport acide/alcool en moles entre 1/99 et 98/2.

10 L'invention vient d'être décrite dans son mode de réalisation le plus général afin que l'homme de métier soit à même d'évaluer la portée de celle-ci.

Il est maintenant nécessaire de décrire les variantes préférées de l'invention étant bien entendu que celle-ci ne se limite en aucune façon à ces variantes.

15 En premier lieu, il a été dit précédemment qu'un des intérêts de l'invention se situait dans la possibilité d'obtenir une régiosélectivité très forte.

20 Ainsi, le procédé de l'invention trouve une application particulièrement intéressante dans le cas où les alcools ou les thiols sont des polyols ou des polythiols. Pour la clarté et la simplification de l'exposé qui suit, on ne parlera plus que des alcools et sans mentionner les thiols, mais il est bien entendu que cet exposé pourra également s'appliquer aux thiols.

25 Parmi les polyols, les triols sont préférés du fait que les lipases sont destinées à hydrolyser les esters de triol et plus particulièrement de glycérol.

Par contre, il est préférable d'utiliser des monoacides et avantageusement ceux de  $C_{12}$  à  $C_{30}$ .

30 On pourra améliorer le rendement et la vitesse de la réaction en associant à l'enzyme des sels minéraux effecteurs de celle-ci comme par exemple le disodium tétraborate décahydraté ou le chlorure de strontium ( $SrCl_2$ ). Ces effecteurs de l'enzyme sont présents à environ 1 % par rapport à l'eau de la phase aqueuse.

35 Un procédé préféré selon l'invention consiste en ce que la phase organique contient au moins un acide organique de  $C_{12}$  à  $C_{30}$ , la phase aqueuse comporte un polyol et la lipase et en ce que le solvant de la phase organique est tel qu'il permet la dissolution du monoester formé à l'interface. Cette forme de réalisation permet d'aboutir avec un rendement extrêmement élevé

si ce n'est quantitatif en monoester. Sans que l'invention soit limitée d'une quelconque manière par une explication scientifique, l'inventeur pense que la sélectivité est due à la différence de solubilité des mono- et diesters dans les solvants organiques mis en jeu. La réaction ayant lieu à l'interface eau/solvant et le premier produit de la synthèse étant les monoesters, si ces derniers sont très solubles dans le solvant organique, ils se dissolvent immédiatement et quittent donc rapidement l'interface vers la masse du solvant. Dans le cas contraire, les monoesters sont bloqués à l'interface et sont alors le siège d'une nouvelle estérification donnant des diesters alors suffisamment solubles pour quitter l'interface vers la masse du solvant.

Parmi les solvants qui dissolvent les monoesters de triols, comme le glycérol, on peut citer les solvants halogénés comme les solvants chlorés tels que le chloroforme, le dichlorométhane ou fluorés comme les fréons.

Un autre procédé préféré de l'invention consiste en ce que la phase organique contient au moins un acide organique de  $C_{12}$  à  $C_{30}$ , la phase aqueuse comporte un polyol et la lipase et en ce que le solvant de la phase organique est tel qu'il ne permet pas la dissolution du monoester formé à l'interface.

Parmi ces solvants, on peut citer avantageusement les solvants alicycliques ou aliphatiques comme le pentane, l'hexane, le cyclohexane substitués ou non.

Du fait que la préparation enzymatique conserve son activité intégrale après 20 cycles, on peut travailler en réacteur continu. Si on ne compense pas la quantité consommée d'acides gras, on peut arriver aisément à 95 % de rendement après 4 passages. A l'aide d'un réacteur en régime continu total avec recyclage et alimentation de compensation en acides gras, on peut considérer que les rendements sont quantitatifs par rapport à l'alimentation de compensation à condition de mettre en jeu un volant suffisant d'acides gras au départ correspondant à la quantité à recycler.

L'invention est maintenant illustrée par les exemples ci-après.

Les conditions opératoires communes aux exemples

qui vont suivre sont les suivantes :

- phase organique : 200 mg d'acides gras dissous dans 10 ml de solvant organique ;

5 - phase aqueuse : 50 mg de poudre commerciale d'enzyme dissous dans 5 g d'une phase alcool ou thiol/eau dont le rapport en poids sera indiqué pour chaque exemple ;

10 - le calcul du rendement et l'analyse des produits obtenus sont effectués par rapport à l'acide organique (ou aux acides organiques) mis en jeu par chromatographie sur couche mince et densité optique complétée par la chromatographie en phase gazeuse.

I. Exemples effectués à l'aide d'un solvant chloré

Exemple 1

- phase organique : chloroforme

Acides gras de colza

- phase aqueuse : Glycérol/Eau 80/20 à pH 7

Lipase 1-3 spécifique de Rhizopus Arrhizus

- Température : 35°C

- Durée : 8 h.

Résultats : Rendement de synthèse : 17 %

20 Pureté du produit : Monoglycérides alpha 80 %  
Diglycérides 1-3 15 %  
Diglycérides 1-2 2 %  
Triglycérides 3 %

Exemple 2

25 - Phase organique : Dichlorométhane

Acide oléique

- Phase aqueuse : Glycérol/Eau 75/25 à pH 7

Lipase 1-3 spécifique de Rhizopus Arrhizus

- Température : 30°C

30 - Durée : 8 h.

Résultats : Rendement de synthèse : 22 %

35 Pureté du produit : Monoglycérides alpha 93 %  
Diglycérides 1-3 5 %  
Diglycérides 1-2 1 %  
Triglycérides 1 %

Exemple 3

- phase organique : Dichlorométhane

Acide oléique

- Phase aqueuse : Glycérol/eau 75/25 à pH 6  
Lipase 1-3 spécifique de Rhizopus Arrhizus  
Disodium Tétraborate décahydraté 1 % par rapport  
à l'eau
- 5 - Température : 30°C  
- Durée : 6 h.
- Résultats : Rendement de synthèse 12 %  
Pureté du produit : Monoglycéride alpha 100 %.

Exemple 4

- 10 Mêmes conditions que dans l'exemple 3 mais le borate de sodium a été  
remplacé par le chlorure de strontium ( $\text{SrCl}_2$ ) 1 % par rapport à l'eau.
- Résultats : - Rendement de synthèse 17 %  
- Pureté du produit : Monoglycéride alpha 100 %.

Exemple 5

- 15 - Phase organique : Chloroforme  
Acide oléique
- Phase aqueuse : Lactose/eau 10/90 pH 7  
Lipase MY non spécifique de Candida cylindracea
- Température : 40°C
- 20 - Durée : 24 h.
- Résultats : Rendement de synthèse : 2 %  
Pureté du produit : Monooléate 100 %.

Exemple 6

- Phase organique : Chloroforme  
Acide oléique
- 25 - Phase aqueuse : n-butanol/eau 80/20 pH 7  
Lipase MY non spécifique de Candida cylindracea
- Température : 30°C
- Durée : 4 h.
- 30 Résultats : Rendement de synthèse : 60 %  
Pureté du produit : oléate de n-butyle 100 %.

Exemple 7

- Phase organique : Dichlorométhane  
Acide oléique



- Phase aqueuse : Ethylèneglycol/eau 60/40 pH 7  
Lipase 1-3 spécifique de Rhizopus arrhizus
- Température : 28°C
- Durée : 16 h.

5 Résultats : Taux de synthèse : 3,4 %  
Pureté du produit : monoester 100 %.

II. Exemples effectués à l'aide d'un solvant hydrocarboné.

Exemple 8

- Phase organique : Heptane  
10 Acides gras de suif
- Phase aqueuse : Glycérol/eau 95/5 à pH 7  
Lipase 1-3 spécifique de Rhizopus Arrhizus
- Température : 30°C
- Durée : 4 h.

15 Résultats : Rendement de synthèse : 45 %  
Pureté du produit : Diglycérides 1-3 : 95 %  
Diglycérides 1-2 : 1 %  
Monoglycérides alpha : 2 %  
Triglycérides : 2 %

20 Exemple 9

- Phase organique : Cyclohexane  
Acide palmitique
- Phase aqueuse : Glycérol/eau 80/20 à pH 7  
Lipase 1-3 spécifique de Rhizopus Arrhizus.
- 25 - Température : 30°C
- Durée : 16 h.

Résultats : Rendement de synthèse 38 %  
Pureté du produit : Diglycérides 1-3 : 90 %  
Monoglycérides alpha : 6 %  
30 Diglycérides 1-2 : 1 %  
Triglycérides : 3 %

Exemple 10

- 5 - Phase organique : Heptane  
Acide stéarique
- Phase aqueuse : Glycérol/eau 95/5 à pH 7  
Alphamonopalmitate obtenu suivant les conditions  
de l'exemple 3  
Lipase 1-3 spécifique de *Rhizopus arrhizus*
- Température : 38°C
- Durée : 4 h.
- 10 Résultats : Taux de synthèse : 50 %  
Pureté des produits :  
1-3 palmityl stéaryl glycérol : 50 %  
1-3 distéaryl glycérol : 40 %  
1-3 dipalmityl glycérol : 10 %

15 Exemple 11

- Phase organique : Heptane  
Acide oléique
- Phase aqueuse : Ethylèneglycol/eau 80/20 à pH 7  
Lipase MY non spécifique de *Candida cylindracea*
- 20 - Température : 28°C
- Durée : 20 h.
- Résultats : Taux de synthèse : 55 %  
Pureté des produits : Monoester 19 %  
Diester 36 %

25 Exemple 12

- Phase organique : Heptane  
Acide oléique
- Phase aqueuse : Dodécane-thiol 1/eau 85/15 à pH 7  
Lipase 1-3 spécifique de *Rhizopus arrhizus*
- 30 - Température : 28°C
- Durée : 16 h.
- Résultats : Taux de synthèse : 72,6 %  
Pureté du produit : Oléate de dodécane-thiol 1 : 100 %

Exemple 13

Mêmes conditions que l'exemple 12 en remplaçant le dodécane-thiol 1 par l'alcool laurique.

Résultats : Taux de synthèse 21 %

5 Puresse du produit : Oléate de lauryle : 100 %.

RENDICATIONS

1. Procédé de synthèse d'esters d'acides organiques et d'alcools ou de thiols consistant à faire réagir au moins un acide organique de  $C_2$  à  $C_{40}$  avec au moins un alcool ou un thiol,  
5 en présence d'une lipase, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact sous agitation une phase organique contenant l'acide organique et un solvant non ou peu miscible avec l'eau et une phase aqueuse comportant l'alcool ou le thiol et la lipase.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé  
10 en ce que l'alcool est un polyol.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le polyol est le glycérol.
4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'acide organique est un acide de  $C_{12}$  à  $C_{30}$ .
- 15 5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la phase aqueuse comporte des sels minéraux effecteurs de l'enzyme.
6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le rapport alcool/eau en poids est compris entre 30/70 et  
20 99/1.
7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la phase organique contient au moins un acide organique de  $C_{12}$  à  $C_{30}$ , la phase aqueuse comporte un polyol et la lipase et le solvant de la phase organique est tel qu'il permet la dissolution  
25 tion du monoester formé à l'interface.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le solvant est choisi parmi les solvants halogénés tels que les solvants chlorés ou fluorés.
9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en  
30 ce que la phase organique contient au moins un acide organique de  $C_{12}$  à  $C_{30}$ , la phase aqueuse comporte un polyol et la lipase, et le solvant de la phase organique est tel qu'il ne permet pas la dissolution du monoester formé à l'interface.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé  
35 en ce que le solvant est choisi parmi les solvants aliphatiques ou alicycliques substitués ou non.