

# Synthèse de mono-esters de sucre par biocatalyse

## Synthesis of sugar mono-esters by biocatalysis

N. KHALED<sup>(1)</sup>, D. MONTET<sup>(1)</sup>, M. FARINES<sup>(2)</sup>, M. PINA<sup>(1)</sup>, J. GRAILLE<sup>(3)</sup>

**Résumé.** — On a réalisé la synthèse de différents mono-esters de sucre en milieu organique. Les paramètres influençant la synthèse de l'oléate de fructose par le Lipozyme ont été étudiés plus particulièrement. L'étude spectroscopique du produit obtenu montre que celui-ci s'avère être le 1-oléoyl- $\alpha$ -D-fructofuranose.

**Mots-clés.** — Synthèse, enzymatique, lipase, sucro-estér, tensio-actifs

**Summary.** — Different sugar mono-esters were synthesized in an organic medium. Particular attention was paid to the parameters affecting fructose oleate synthesis by Lipozyme. Spectroscopic examination of the product obtained revealed that it was 1-oleoyl- $\alpha$ -D-fructofuranose exclusively.

**Key words.** — Synthesis, enzymatic, lipase, sucro-ester, surfactant

### INTRODUCTION

Les sucro-esters ou esters de sucre sont généralement des molécules de synthèse. Les sucres sont, en effet, rarement rencontrés sous cette forme dans la nature. Les pouvoirs émulsifiant, moussant, détergent et solubilisant de ces molécules suscitent un grand intérêt.

La balance hydrophile/lipophile (BHL) [1], et donc le pouvoir tensio-actif des sucro-esters, diminue lorsque le nombre de chaînes grasses fixées augmente. Elle est, par exemple, égale à 14 pour le monopalmitate de saccharose et à 7 pour le distéarate de saccharose [2,3]. Actuellement, les esters de saccharose sont les seuls à être commercialisés. Par la structure de leur groupement polaire, ce sont des tensio-actifs non ioniques qui ont l'avantage d'être stables à tous les pH. La dose journalière ingérable admissible d'esters commerciaux est de 2,5 mg/kg de poids corporel [4].

Des esters supérieurs de saccharose ont été également synthétisés mais ils présentent peu d'intérêt en tant qu'agents émulsifiants du fait de leur BHL peu élevée [5]. Par contre, leur faible digestibilité et leur aptitude à réduire le taux de cholestérol plasmatique laisse entrevoir une utilisation dans l'élaboration des corps gras acaloriques, par exemple [6].

Malgré les propriétés intéressantes des sucro-esters, l'utilisation industrielle de ces derniers reste limitée du fait de leur synthèse difficile par voie chimique. En effet, la non miscibilité des deux synthons entre eux dans les solvants organiques rend difficilement envisageable la synthèse en milieu homogène sans avoir recours à des solvants comme le diméthylformamide ou la pyridine. La température a également un effet néfaste sur la molécule de sucro-ester puisqu'on observe rapidement une caramélisation du produit.

### INTRODUCTION

Sucro-esters, or esters of sugar, are usually synthetic molecules which are rarely encountered in this form in nature. The emulsifying, foaming, detergent and solubilizing properties of these molecules make them most interesting.

The hydrophile/lipophile balance (HLB) [1], hence the surfactant properties of sucro-esters, decreases when the number of fixed fatty chains increases. For example, HLB is equal to 14 for sucrose mono-palmitate and 7 for sucrose distearate [2,3]. Sucrose esters are currently the only ones to be marketed. Their structure and polar grouping make them non-ionic surfactants, which offer the advantage of stability at all pH values. The daily acceptable intake of commercial esters is 2.5 mg/kg of body weight [4].

Higher esters of sucrose have also been synthesized, but they are of little interest as emulsifying agents, as their HLB is low [5]. However, their low digestibility and their ability to reduce plasmatic cholesterol suggests they will be useful in the production of calory-free fats, for example [6].

Despite the attractive properties of sucro-esters, their industrial uses remain limited, as they are difficult to synthesize chemically. Indeed, the non-miscibility of the two synthons with each other in organic solvents means that synthesis is hardly possible in a homogeneous medium without using solvents such as dimethylformamide or pyridine. Temperature also has a harmful effect on the sucro-ester molecule, with rapid caramelization of the product.

(1) IRHO-CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier (France)

(2) Université de Perpignan, avenue de Villeneuve, 66860 Perpignan (France)

(3) IRHO-CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier (France) - A qui toute correspondance doit être adressée.

(1) IRHO-CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier, (France)

(2) University of Perpignan, avenue de Villeneuve, 66860 Perpignan, (France)

(3) IRHO-CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier, (France) - To whom all correspondence should be sent

Même si certains auteurs ont réussi à synthétiser des esters de sucres par voie chimique, le produit synthétisé est toujours un mélange d'esters. Par transestérification sur des esters méthyliques de sucres, la réaction s'oriente préférentiellement vers les 6-6' diesters de saccharose. La seule façon d'obtenir des monoesters est celle qui consiste à protéger puis déprotéger les fonctions hydroxyles [7].

On constate en fin de compte qu'aucune méthode chimique n'a donné entière satisfaction à ce jour. C'est pour cela, que les recherches se sont orientées vers la biosynthèse. Les auteurs se sont naturellement tournés vers les lipases qui catalysent la réaction de synthèse d'esters de sucres [8-10]. Seino *et al.* [11] synthétisent des esters gras de polyols (glucose, sorbitol, saccharose) avec des rendements élevés en milieu tampon, mais ces auteurs obtiennent toujours un mélange d'esters. Therizod et Klivanov [12] sont les seuls à obtenir des oses monoacylés mais ils utilisent la pyridine comme solvant. La littérature signale également l'utilisation des protéases de *Bacillus subtilis* [13], *Arthrobacter sp* [14] et *Actinobacter* [15]. L'idéal serait d'opérer dans un solvant non toxique, et si possible alimentaire, qui soit susceptible de solubiliser partiellement les sucres. Les alcools tertiaires semblent répondre à ces critères : ce sont les seuls alcools qui ne réagissent pas avec les acides gras en présence d'une lipase [8-9]. En ce qui concerne le choix de la lipase, au regard des résultats obtenus par Therizod et Klivanov [12], il semble *a priori* qu'une lipase 1-3 spécifique soit préférable.

## MATERIELS ET METHODES

Après une étude préalable sur trois lipases commerciales, le Lipozyme™, lipase 1-3 spécifique de *Mucor miehei* fixée sur une résine macroporeuse échangeuse d'anions (Novo), a été retenu.

Tous les produits chimiques (réactifs et solvants) sont de pureté analytique (> 99 %) sauf l'acide oléique technique (74,3 %). Le tampon phosphate 0,2 M pH = 7 est le seul milieu aqueux utilisé.

Sauf indication contraire, les réactions d'estérification enzymatique s'effectuent généralement à 55 °C durant 24 heures, dans des flacons en verre d'une capacité totale de 25 ml, bouchés hermétiquement et agités mécaniquement à l'aide d'un vibro-agitateur dans une étuve thermostatée. Elles opposent un acide gras à un sucre ou un polyol et sont catalysées par une lipase, en présence de solvant. La nature et les quantités de sucre ou de polyol, de solvant et de biocatalyseur seront précisées au cours de l'expérimentation.

### □ Synthèse d'oléate de fructose en réacteur fermé

La réaction est réalisée dans un réacteur hermétique en verre d'une capacité totale de 1 litre. La vitesse d'agitation (200 tr/min) est assurée par un agitateur à pales en inox. La température de la réaction est maintenue à 55 °C à l'aide d'un bain-marie thermostaté. L'acide oléique (312,5 g) est opposé au fructose (20 g) dans un rapport molaire 10/1 en présence de 750 ml de 2-méthyl butan-2-ol (M2B2). La réaction est catalysée par 12,5 g de Lipozyme.

### □ Quantification des sucro-esters

Les produits de la réaction et les substrats n'ayant pas réagi sont mis en évidence par CCM en utilisant des plaques de silice Merck 60 G de 0,25 mm d'épaisseur. Les dépôts sont réalisés à l'aide d'un déposateur automatique Linomat III de Camag. La différence de polarité des constituants de la réaction nécessite l'utilisation de 2 systèmes de migration distincts :

*Although certain authors have succeeded in synthesizing sugar esters chemically, the synthesized product is always a mixture of esters. By transesterification between sugar and methyl esters, the reaction is directed preferentially towards the 6-6' diesters of sucrose. The only way to obtain monoesters is to protect and deprotect the hydroxyl functions [7].*

*In fact, no chemical method has so far given total satisfaction, hence research has been steered towards biosynthesis. The authors turned naturally to lipases, which catalyze the sugar ester synthesis reaction [8-10] Seino et al. [11] synthesized the fatty esters of polyols (glucose, sorbitol, sucrose) with high yields in a buffer medium, but always obtained a mixture of esters. Therizod and Klivanov [12] are the only ones to have obtained monoacyloses, but they used pyridine as a solvent. The literature also indicates the use of proteases of *Bacillus subtilis* [13], *Arthrobacter sp.* [14] and *Actinobacter* [15]. The best thing would be to operate in a non-toxic and suitable food solvent, capable of partially solubilizing the sugars. Tertiary alcohols seem to satisfy these criteria ; they are the only alcohols that do not react with fatty acids in the presence of a lipase [8-9]. As regards the choice of lipase, the results obtained by Therizod and Klivanov [12] seem to indicate in theory that a 1-3 specific lipase is preferable.*

## MATERIALS AND METHODS

*After a prior study on three commercially available lipases, Lipozyme™, 1-3 specific lipase of *Mucor miehei* fixed to a macroporous anion exchange resin (Novo), was chosen. All the chemical products (reagents and solvents) were of analytical purity (> 99 %) except for the technical oleic acid (74.3 %). A 0.2 M phosphate buffer with a pH of 7 was the only aqueous medium used.*

*Unless otherwise indicated, enzymatic esterification reactions were usually carried out at 55 °C for 24 hours, in glass flasks with a total capacity of 25 ml, hermetically sealed and stirred on a mechanical shaker in a thermostatically controlled oven. The reactions were between a fatty acid and a sugar or a polyol, with a lipase catalyst, in the presence of a solvent. The type and quantities of sugar or polyol, solvent and biocatalyst will be specified during the experiment.*

### □ Fructose oleate batch synthesis

*The reaction was carried out in a hermetically sealed glass reactor with a total capacity of 1 litre. The mixture was stirred by a stainless steel paddle stirring-rod at 200 rpm. The reaction temperature was maintained at 55 °C in a thermostatically controlled water bath. Oleic acid (312.5 g) was set against fructose (20 g) in a molar ratio of 10:1, with 750 ml of 2-methyl 2-butanol (2M2B). The reaction was catalyzed using 12.5 g of Lipozyme.*

### □ Quantification of sucro-esters

*The reaction products and the substrates that had not reacted were detected by planar chromatography using 0.25 mm thick layer, Merck 60G silica gel plates. A Camag Linomat III automatic applicator was used for this purpose. The difference in polarity of the reaction constituents means that 2 distinct migration systems have to be used.*

- avec le mélange hexane/éther éthylique/acide acétique (75/25/1, v/v/v), les acides gras ont un Rf d'environ 0,5 alors que les sucro-esters et les sucres restent au dépôt ;
- avec le mélange chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (80/10/8/2, v/v/v/v), les sucro-esters ont un Rf de 0,5. les sucres restent alors au dépôt et les acides gras migrent avec un Rf de 0,9.

Les plaques sont séchées à l'air chaud puis révélées par vaporisation d'un mélange d'acétate de cuivre saturé dans l'eau et d'acide orthophosphorique à 85 % (50/50, v/v) à 180 °C pendant 5 minutes [16]. Les bandes révélées sont quantifiées par photo-densitométrie à l'aide d'un scanner DESAGA à 500 nm. L'estimation de la quantité de sucro-esters synthétisée est réalisée par comparaison à une gamme étalon de sucro-ester. L'obtention de l'oléate de fructose à l'état pur, par chromatographie d'adsorption sur colonne, nous a permis de mettre au point un dosage des sucro-esters par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur support Nucléosil CN 5µm (diamètre : 4,6 mm, longueur : 25 cm).

Les échantillons sont injectés en solution dans du chloroforme stabilisé par l'amylène à une concentration inférieure à 1 %. Le solvant vecteur (1 ml/min) est un gradient isopropanol/isooctane. La concentration en isopropanol passe de 0,5 à 50 % en 15 minutes. La réponse non linéaire du détecteur Laser est traitée à l'aide d'un programme Basic (Shimadzu). Dans ces conditions, les temps de rétention (min) sont respectivement :

Oléate de méthyle : 3,59, Acide oléique : 6,96 et Oléate de fructose : 9,79.

#### □ Dosage et mesure de l'activité de l'eau

Le dosage de l'eau s'effectue selon la méthode de Karl Fisher grâce à un appareil automatique Baird and Tatlock AF3 en utilisant le méthanol comme solvant et une solution de Karl Fisher Merck (Réf. 9248). L'activité de l'eau ( $a_w$ ) est mesurée à 25 °C à l'aide du Thermoconstanter RTD-33, TH2 de Novasina.

#### □ Identification de l'oléate de fructose

- Détermination de la composition par CLHP d'exclusion sur gel

La recherche des diesters et éventuellement d'esters supérieurs, a été réalisée par chromatographie d'exclusion sur deux colonnes couplées remplies de PL gel 5 µ (Touzart et Matignon) (longueur 300 mm, diamètre 7,5 mm et diamètre de pores 100 Å). Le débit du tétrahydrofurane (THF) est de 1,5 ml/min. Les échantillons d'oléate de fructose sont injectés en solution à 2 % (m/v) dans du THF (10 µl). La détection est assurée par un réfractomètre différentiel Waters

- Détermination de la structure de l'oléate de fructose

La RMN  $^1\text{H}$  en une et deux dimensions a été effectuée à l'aide d'un appareil Bruker A360 dans le deutériochloroforme avec une fréquence de 360 MHz. La spectrométrie de masse en introduction directe (FAB +) du sucro-ester pur a été réalisée avec un spectromètre Jed DX 300 sous une énergie de 70 eV. Pour l'identification du sucro-ester silylé, la mise au point des conditions de CPG a été réalisée sur un chromatographe Carlo Erba GC 6000. Les dérivés triméthylsilyléthers ont été préparés selon la méthode décrite par Sweeley *et al.*, [17]. Le réactif est constitué de 1,8 ml d'hexaméthylidisilazane et de 1,2 ml de triméthylchlorosilane auxquels on ajoute 2 ml de pyridine anhydre. 100 µl de ce réactif sont ajoutés à environ 5 mg d'oléate de fructose pur. Cette solution est portée à 60 °C pendant 1/2 heure. Le solvant est

- with a hexane/ethyl ether/acetic acid mixture (75/25/1, v/v/v), fatty acids have an Rf of approximately 0.5, whereas sucro-esters and sugars remain in the deposit,
- with a chloroform/methanol/acetic acid/water mixture (80/10/8/2, v/v/v/v), sucro-esters have an Rf of 0.5 ; the sugars remain in the deposit and the fatty acids migrate with an Rf of 0.9.

The plates were dried in warm air and revealed by spraying them with a mixture of saturated copper acetate in water and 85 % orthophosphoric acid (50/50, v/v) at 180 °C for 5 minutes [16]. The bands revealed were quantified by photodensitometry using a DESAGA scanner at 500 nm. The quantity of sucro-esters synthesized was evaluated by comparison with a sucro-ester reference range. Obtaining pure fructose oleate by absorption chromatography on a column enabled us to work out a method to quantify sucro-esters by high performance liquid chromatography (HPLC) on a 5 µm Nucleosil CN support (4.6 mm ID, 25 cm length).

The samples were injected in chloroform stabilized by amylene at a concentration of under 1 %. The carrier solvent (1 ml/min) was an isopropanol/isooctane gradient. The isopropanol concentration increased from 0.5 to 50 % in 15 minutes. The non-linear response of the Laser light-scattering detector was converted into a linear function using a Basic program (Shimadzu). Under these conditions, the respective retention times (min) were

Methyl oleate : 3.59, Oleic acid : 6.96 and Fructose oleate : 9.79

#### □ Water content determination and measurement of activity

Water quantitation was carried out according to the Karl Fisher method, using an automatic Baird and Tatlock AF3 device, with methanol as the solvent and a Merck Karl Fisher solution (Ref. 9248). Water activity ( $a_w$ ) was measured at 25 °C with a Novasina RTD-33, TH2 Thermoconstanter.

#### □ Identification of fructose oleate

- Composition determination by exclusion HPLC on gel

The detection of diesters, and any higher esters, was carried out using exclusion chromatography on two linked columns filled with 5 µ PL gel (Touzart and Matignon) (300 mm length, 7.5 mm ID, pore size 100 Å). The tetrahydrofuran flow (THF) was 1.5 ml/min. The fructose oleate samples were injected as 2 % (m/v) THF solution (10 µl). A Waters differential refractometer was used for detection.

- Determination of fructose oleate structure

The NMR  $^1\text{H}$  in one and two dimensions was carried out using a Bruker A360 apparatus in deuterochloroform with a frequency of 360 MHz. A Jed DX 300, powered at 70 eV was used for mass spectrometry with direct introduction (FAB +) of the pure sucro-ester. A Carlo Erba GC6000 chromatograph was used to work out gas chromatography conditions for silylated sucro-ester. Trimethylsilyléthers were prepared using the method described by Sweeley *et al.* [17].

The reagent was composed of 1.8 ml of hexamethyldisilazane and 1.2 ml of trimethylchlorosilane, to which 2 ml of anhydrous pyridine were added. 100 µl of this reagent were added to around 5 mg of pure fructose oleate. This solution was heated to 60 °C for half-an-hour. The solvent was evaporated off and the residue taken up in 1 ml of

évaaporé et le résidu est repris par 1 ml d'hexane afin d'obtenir une solution à 0,5 % (m/v). 1 µl de la solution précédente est injectée dans le chromatographe équipé d'une colonne capillaire DB 17. J & W de 15 m de longueur, de diamètre interne 0.32 mm et d'épaisseur de film 0.15 µm.

Les conditions de température sont les suivantes :

- injecteur diviseur : 300 °C ; détecteur à ionisation de flamme : 350 °C , four : 260 °C.

Le rapport de division est de 1/50 ; le débit de gaz vecteur (hélium) est de 2 ml/min dans la colonne.

Le couplage CPG/SM a été effectué au laboratoire de spectrométrie de masse du CNRS de Lyon. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Perkin Elmer Sigma 3B :

- colonne DB1 : longueur 50 m, épaisseur de film : 0,2 µm, diamètre interne : 0,25 mm ;
- injecteur diviseur : fuite 1/50. injection de 1 µl, température 400 °C ;
- four : gradient de température 200 à 300 °C à 5 °C/min.

Le spectromètre de masse est un Perkin Elmer VG 7070. La mesure a été faite par impact électronique avec une température de source de 200 °C et un courant d'émission de 200 µA, sous une énergie de 70 eV.

hexane to obtain a 0.5 % solution (m/v). 1 µl of the said solution was injected into the chromatograph equipped with a 15 m long J & W DB 17 capillary column with an internal diameter of 0.32 mm and 0.15 µm film thickness.

Temperature conditions were as follows :

- splitting injector : 300 °C ; flame ionization detector : 350 °C ; oven : 260 °C.

the splitting ratio was 1:50 ; carrier flow (helium) was 2 ml/min inside the column.

GC/MS coupling was carried out at the CNRS mass spectrometry laboratory in Lyons. The gas chromatograph used was a Perkin Elmer Sigma 3B :

- DB1 column. length 50 m, film thickness : 0.2 µm, internal diameter : 0.25 mm ;
- splitting injector: splitting ratio 1:50, injection of 1 µl, temperature : 400 °C ;
- oven. temperature gradient 200 to 300 °C at 5 °C/min

The mass spectrometer was a Perkin Elmer VG 7070. Measurement was by electronic impact with a source temperature of 200 °C and an emission current of 200 µA, powered at 70 eV.

TABLEAU I. — Influence du solvant de réaction sur le rendement de synthèse d'oléate de sorbitol

Solvants	Rendement (%)
Trichlorotrifluoroéthane	0
Hexane	0
Chloroforme	0
Ether éthylique	0
Méthyl tertobutyl éther	0
Isopropanol	traces
Tertobutanol	5
3 Méthyl pentan-3-ol	5
2 Méthyl butan-2-ol	7
Tampon phosphate pH 7; 0, 2 M	0
Eau	0

TABLE I — Effect of the reaction solvent on sorbitol oleate synthesis yield

Solvents	Yield (%)
Trichlorotrifluoroethane	0
Hexane	0
Chloroform	0
Ethyl ether	0
Methyl tertobutyl ether	0
Isopropanol	traces
Tertobutanol	5
3 Methyl-3-ol pentan	5
2 Methyl-2-ol butan	7
Phosphate buffer pH 7; 0, 2 M	0
Water	0

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

### □ Etude du solvant de réaction

Le monolaurate de sorbitane (Span 20, Aldrich) étant le seul modèle analytique dont nous disposions, nous avons étudié la réaction d'estérification en opposant le sorbitol (5 mM) à l'acide oléique (3,5 mM) dans 15 ml de solvant à 60 °C, en présence de 100 mg de Lipozyme. Parmi les solvants, les alcools primaires ont été écartés car ils sont susceptibles d'être eux-mêmes estérifiés. Nous avons supposé *a priori* que le laurate de sorbitane aurait un Rf voisin de celui de l'oléate de sorbitol.

L'analyse des produits de la réaction par CCM conduit aux résultats consignés dans le tableau I. Le Lipozyme catalyse la réaction d'estérification de l'acide oléique par le sorbitol en présence de solvants à polarités intermédiaires tels que l'isopropanol, le tertobutanol, le 3 méthyl pentan-3-ol et le 2 méthyl butan-2-ol. En revanche, l'estérification n'a pas lieu en milieu aqueux, tamponné ou non, ce qui n'est pas étonnant d'un point de vue thermodynamique, puisque la tendance à l'hydrolyse est alors favorisée.

## RESULTS AND DISCUSSION

### □ Study of reaction solvent

As sorbitan monolaurate (Span 20, Aldrich) was the only analytical model we had available, we studied the esterification reaction by setting sorbitol (5 mM) against oleic acid (3.5 mM) in 15 ml of solvent at 60 °C. in the presence of 100 mg of Lipozyme. Among the possible solvents, primary alcohols were ruled out, because they were likely to be esterified themselves. We assumed *a priori* that sorbitan laurate would have an Rf similar to that of sorbitol oleate.

An analysis of the reaction products by TLC gives the results in table I. The Lipozyme catalyzes the esterification of the oleic acid by the sorbitol in the presence of solvents with inter-mediate polarities such as isopropanol, tertobutanol, 3 methyl 3 pentanol and 2 methyl 2 butanol. On the other hand, esterification does not take place in an aqueous medium, whether buffered or not, which is not surprising from a thermodynamic point of view, since the tendency towards hydrolysis is favoured.



Il faut signaler cependant que ce résultat semble contredire les travaux de Seino *et al.* [11] qui synthétisent l'oléate de fructose en milieu tamponné, à l'aide d'une lipase du genre *Mucor*. L'absence de synthèse dans les solvants de très faibles polarités et non miscibles à l'eau tels que le trichlorotrifluoroéthane, l'hexane et le chloroforme, est sûrement attribuable à l'insolubilité du sorbitol dans ces solvants. L'inactivation du Lipozyme est en effet fortement improbable puisque les enzymes sont opérationnelles lorsque le sorbitol est remplacé par le n-butanol [18]. Bien que l'isopropanol soit le seul alcool (autre l'éthanol) autorisé par la législation alimentaire, nous retiendrons le M2B2 comme solvant de réaction dans la suite de cette étude, car c'est dans ce cas que la synthèse enzymatique donne le meilleur résultat.

TABLEAU II. — Influence de la nature de différents sucres et polyols sur le rendement de la réaction.

Polyols	Rendement (%)
Glucose	0
Fructose	15
Sorbose	10
Saccharose	0
Mannitol	5
Sorbitol	12

#### □ Comportement de différents sucres et polyols

Les différents polyols sont opposés dans un rapport molaire 1/1 en présence de 15 ml de M2B2 et de 100 mg de Lipozyme. L'analyse de la réaction par CCM nous a permis de constater que le fructose et le sorbose sont estérifiés par l'acide oléique (Tabl. II). L'apparition d'une seule tache en CCM de Rf 0,5 laisse présager la synthèse d'un ou plusieurs esters ayant un degré de substitution identique. En effet, le mélange de migration est suffisamment polaire pour séparer les monoesters, les diesters et les polyesters de sucres [19]. En revanche, un tel mélange de migration ne permet pas de séparer les isomères de position.

Le glucose, par contre, n'est pas estérifié par l'acide oléique. Pourtant, il possède une fonction hydroxyle primaire sur le carbone 6, susceptible d'être estérifiée [12]. La non-estérification du glucose pourrait, peut être, provenir d'une diminution de la disponibilité de l'hydroxyle primaire rendu ainsi difficilement accessible à la lipase. En effet, la conformation spatiale du glucose met en évidence la proximité de la fonction hydroxyle primaire avec l'oxygène du pont éther pyranique. De ce fait, une interaction hydrogène pourrait rendre l'hydroxyle non disponible.

Suivant cette logique, la non-estérification du saccharose est surprenante. En effet, ce disaccharide comporte en plus de la fonction hydroxyle primaire du glucose les deux fonctions hydroxyles primaires du fructose. La très faible solubilité du saccharose dans le M2B2 (environ 0,05 % à 60 °C) est probablement à l'origine de son inertie. Enfin, les polyols testés conduisent aussi à la synthèse d'un sucro-ester de Rf voisin de 0,5. En fin de compte, le meilleur rendement a été obtenu avec le fructose. C'est pourquoi, l'oléate de fructose a été choisi comme "modèle" dans la suite de notre étude.

#### □ Influence du volume de solvant sur le rendement de la réaction

L'acide oléique (250 mg) et le fructose (160 mg) sont opposés dans un rapport molaire 1/1 en présence de 100 mg de Lipozyme. Les volumes de 2M2B varient entre 0 et 20 ml.

However, it should be pointed out that this result seems to contradict the work by Seino *et al.* [11], who synthesized fructose oleate in a buffered medium, using a *Mucor* type lipase. The lack of synthesis in solvents with very low polarities and non-miscible in water, such as trichlorotrifluoroethane, hexane and chloroform, can surely be attributed to the insolubility of sorbitol in these solvents. In fact, Lipozyme inactivation is highly improbable, since the enzymes are operational when sorbitol is replaced by n-butanol [18]. Although isopropanol is the only alcohol (other than ethanol) permitted by the food authorities, we chose 2M2B as the reaction solvent for the remainder of this study, since it was in this case that enzymatic synthesis gave the best result.

TABLE II. — Effect of the different types of sugars and polyols on reaction yield

Polyols	Yield (%)
Glucose	0
Fructose	15
Sorbose	10
Sucrose	0
Mannitol	5
Sorbitol	12

#### □ behaviour of different sugars and polyols

The different polyols were set against each other in a molar ratio of 1:1, in the presence of 15 ml of 2M2B and 100 mg of Lipozyme. An analysis of the reaction by TLC showed that fructose and sorbose were esterified by oleic acid (Table II). The appearance of a single stain in TLC with an Rf of 0.5 suggested the synthesis of a single type of ester since the migration mixture is sufficiently polar to separate sugar mono-esters, diesters and polyesters [19]. On the other hand, such a migration mixture cannot be used to separate position isomers.

Glucose, however, is not esterified by oleic acid but it has a primary hydroxyl function on carbon 6, which is likely to be esterified [12]. Non-esterification of glucose may stem from reduced availability of the primary hydroxyl, to which access is more difficult for the lipase. Indeed, the spatial structure of glucose reveals the proximity of the primary hydroxyl function to the oxygen of the pyranic ether bridge. Hence, hydrogen interaction could make the hydroxyl unavailable.

In line with this logic, the non-esterification of sucrose is surprising. Indeed, in addition to the primary hydroxyl function of glucose, this disaccharide has the two primary hydroxyl functions of fructose. The very low solubility of sucrose in 2M2B (around 0.05 % at 60 °C) is probably at the root of its inertia. Finally, the polyols tested also led to synthesis of a sucro-ester with an Rf of around 0.5. All in all, the best yield was obtained with fructose, which is why fructose oleate was chosen as the "model" for the remainder of our study.

#### □ Effect of the volume of solvent on reaction yield

Oleic acid (250 mg) and fructose (160 mg) were set against each other at a molar ratio of 1.1 in the presence of 100 mg of Lipozyme. 2M2B volumes varied between 0 and 20 ml. In the absence of solvent, esterification did not take

En l'absence de solvant, la réaction d'estérification n'a pas lieu (Fig. 1), ce qui n'est pas surprenant du fait de la non-miscibilité de l'acide oléique et du fructose. Le passage de 0 à 2 ml de 2M2B augmente progressivement le rendement de synthèse de 8,5 à 9,6 %. Cette variation provient probablement de la solubilisation progressive du fructose à 55 °C dans le 2M2B.

Ce résultat semble confirmer que la non-estérification du glucose et du saccharose observée dans l'expérience précédente est bien due à leur faible solubilité dans le 2M2B. La réaction atteint son rendement maximal pour un volume de solvant compris entre 4 et 6 ml. Au-delà de 6 ml de 2M2B, le rendement de synthèse diminue progressivement. Ce phénomène peut trouver une explication dans le fait que la dilution des substrats dans le milieu diminue leur contact avec l'enzyme.

Par la suite, la synthèse d'oléate de fructose sera réalisée en présence de 6 ml de solvant, soit une concentration en acide oléique de 4,2 % et en fructose de 2,7 %.

#### □ Influence de la quantité d'enzyme sur le rendement

L'acide oléique (250 mg) est opposé au fructose (160 mg) dans un rapport molaire 1/1, en présence de 6 ml de 2M2B. La réaction est catalysée par une quantité de Lipozyme qui varie de 25 à 500 mg. La figure 2 montre que le rendement est maximal (9,6 %) en présence de 100 mg de Lipozyme (0,25 % p/p). L'augmentation du rapport massique jusqu'à 1,21 est sans effet sur le rendement de la réaction.

place (Fig 1), which is not surprising since oleic acid and fructose are not miscible. Raising the 2M2B from 0 to 2 ml gradually increased synthesis yield from 8.5 to 9.6 %. This variation probably stemmed from gradual solubilization of fructose at 55 °C in the 2M2B.

This result seems to confirm that the non-esterification of glucose and sucrose observed in the previous experiment was indeed due to their low solubility in 2M2B. The reaction reached its maximum yield for a volume of solvent ranging from 4 to 6 ml. Over 6 ml of 2M2B, the synthesis yield fell gradually. This phenomenon can be explained by the fact that substrate dilution in the medium reduces their contact with the enzyme.

Subsequent fructose oleate synthesis will be carried out with 6 ml of solvent, i.e. an oleic acid concentration of 4.2 % and a fructose concentration of 2.7 %

#### □ Effect of the quantity of enzyme on yield

Oleic acid (250 mg) was set against fructose (160 mg) in a molar ratio of 1.1, with 6 ml of 2M2B. The reaction was catalyzed by a quantity of Lipozyme varying from 25 to 500 mg. Figure 2 shows that yield was maximum (9.6 %) with 100 mg of Lipozyme (0.25 % w/w). Increasing the mass ratio to 1.21 had no effect on reaction yield.

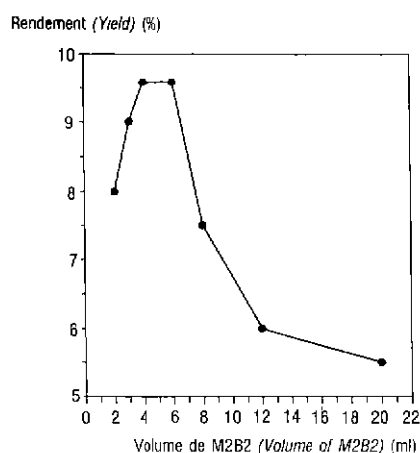


FIG. 1. — Influence du volume de solvant sur la synthèse d'oléate de fructose — (Effect of the volume of solvent on fructose oleate synthesis)

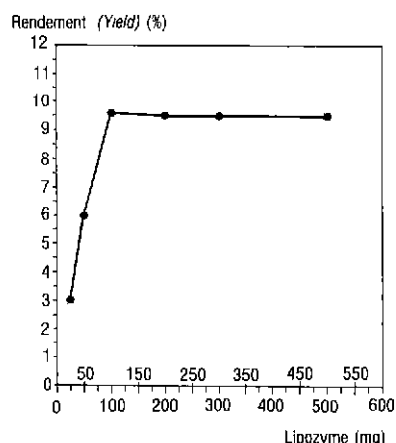


FIG. 2. — Evolution du rendement en fonction de la quantité d'enzyme mise en oeuvre — (Changes in yield depending on the amount of the enzyme used)

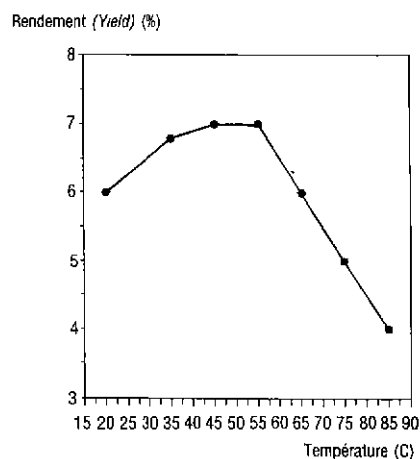


FIG. 3. — Influence de la température sur le rendement de la réaction — (Effect of the temperature on reaction yield)

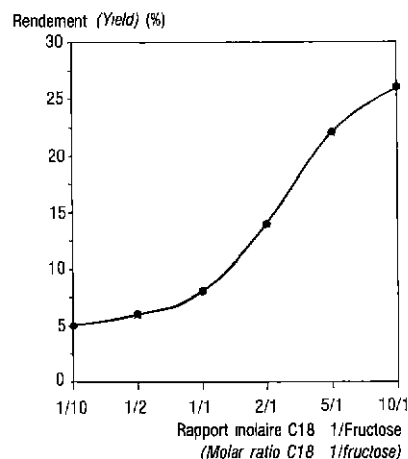


FIG. 4. — Influence du rapport molaire C18:1/fructose sur le rendement lorsque la quantité d'acide gras varie — (Effect of the C18 1/fructose molar ratio on yield when the amount of fatty acid varies)

### ❑ Détermination de la température optimale de réaction

Le rendement de synthèse (Fig. 3) passe par un maximum se situant entre 45 et 55 °C. Cet optimum se situe donc au-dessous de la température recommandée par NOVO pour l'hydrolyse des triglycérides (60 °C). De plus, il est intéressant de noter que l'activité catalytique du Lipozyme est préservée jusqu'à 85 °C. Il est probable que la résine sur laquelle est adsorbée la lipase protège l'enzyme et de ce fait, lui confère une meilleure thermostabilité.

### ❑ Influence du rapport molaire sur le rendement de la réaction

La réaction de synthèse a été étudiée pour des rapports molaires acide gras/fructose variant de 1/10 à 10/1. La quantité de fructose est fixée à 0,89 mM. La figure 4 montre qu'un excès d'acides gras est favorable à la réaction puisque le rendement optimum de 17 % est obtenu pour un rapport molaire 10/1. Par contre, l'addition de fructose n'a que peu d'effet sur le rendement. Seino *et al.* [11] montrent également que lorsqu'on fait réagir l'acide oléique sur le saccharose, le rendement évolue favorablement quand la quantité d'acide gras est augmenté de façon importante. De la même façon, Therizod et Klibanov [12] obtiennent un rendement optimal (60 %) lorsque le rapport molaire acide butyrique/ fructose est de 3/1.

### ❑ Influence de l'activité de l'eau sur le déroulement de la réaction

Le mélange réactionnel de base a la composition suivante : 250 mg d'acide oléique (0 % d'eau), 160 mg de fructose (0,2 % d'eau), 15 ml de 2M2B (0,03 % d'eau) et 100 mg de Lipozyme (10 % d'eau).

Le mélange réactionnel de base contient donc 14,82 mg d'eau soit 1,1 %. Une série de réactions de synthèse est effectuée en ajoutant dans le mélange réactionnel de base de 0 à 1 g d'eau. On détermine après 24 heures le rendement de la réaction et l'activité de l'eau du mélange à 25 °C.

L'activité catalytique de synthèse du Lipozyme est maximale lorsque la teneur en eau du milieu correspond au taux d'hydratation du mélange de base ( $a_w = 0,12$ ) (Fig. 5). Cependant, dans la zone où l'activité catalytique du Lipozyme chute fortement, de 7 à 0,64 %, l'activité de l'eau varie peu (0,12 à 0,16) alors que la quantité d'eau ajoutée passe de 0 (1,2 %) à 300 mg (2,5 %). Aux faibles activités, l'eau est fortement adsorbée sur les sites polaires des constituants (résine et solvant compris) par des liaisons hydrogènes. Elle n'est donc pas disponible pour s'opposer à la réaction. La synthèse de l'oléate de fructose doit donc s'effectuer en milieu très faiblement hydraté, sans adjonction d'eau.

### ❑ Cinétiques de la synthèse de l'oléate de fructose et de la production d'eau en réacteur fermé

Le rendement augmente de façon pratiquement linéaire jusqu'à 4 h (18 %) (Fig. 6). La production se ralentit ensuite et atteint un plateau à 30 % après 24 heures. La figure 7 montre qu'une forte quantité d'eau est libérée lors des deux premières heures de la réaction. La production d'eau reste ensuite pratiquement constante. Cette forte proportion d'eau libérée dès les premières heures de la réaction pourrait être à l'origine de l'infléchissement du rendement de synthèse après 4 heures de réaction.

### ❑ Identification de l'oléate de fructose

L'étude par spectrométrie de masse (SM) et de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton de l'oléate de fructose nous a permis d'identifier sans ambiguïté la structure de ce composé.

### ❑ Determination of the optimum reaction temperature

Synthesis yield (Fig.3) increased to a maximum somewhere between 45 and 55 °C. This optimum is therefore below the temperature recommended by NOVO for triglyceride hydrolysis (60 °C). In addition, it is interesting to note that Lipozyme's catalytic activity is maintained up to 85°C. It is probable that the resin on which the lipase is adsorbed protects the enzyme and thereby gives it better thermostability.

### ❑ Effect of the molar ratio on reaction yield

The synthesis reaction was studied for fatty acid:fructose ratios varying from 1:10 to 10:1. The amount of fructose was fixed at 0.89 mM. Figure 4 shows that excess fatty acid favoured the reaction, since an optimum yield of 17 % was obtained with a molar ratio of 10:1. However, adding fructose had little effect on yield. Seino *et al.* [11] also showed that when oleic acid is reacted with sucrose, yield rises when the amount of fatty acid is substantially increased. Likewise, Therizod and Klibanov [12] obtained an optimum yield (60 %) with a butyric acid:fructose molar ratio of 3:1.

### ❑ Effect of water activity on the reaction process

The composition of the basic reaction mixture was as follows: 250 mg of oleic acid (0 % water), 160 mg of fructose (0.2 % water), 15 ml of 2M2B (0.03 % water) and 100 mg of Lipozyme (10 % water). The basic reaction mixture therefore contained 14.82 mg of water, i.e. 1.1 %. A series of synthesis reactions was carried out by adding from 0 to 1 g of water to the basic reaction mixture. The water activity of the mixture was determined at 25 °C after 24 hours. The Lipozyme's synthesis catalysis activity was maximum when the medium's water content corresponded to the hydration rate of the basic mixture ( $a_w = 0.12$ ) (Fig. 5).

However, in the zone where the Lipozyme's catalysis activity dropped sharply, from 7 to 0.64 %, there was little variation in water activity (0.12 to 0.16), whereas the amount of water added increased from 0 (1.2 %) to 300 mg (2.5 %). At low activity rates, water was largely adsorbed onto the polar sites of the constituents (resin and solvent included) by hydrogen bonds. Water is therefore not available to inhibit the reaction. Fructose oleate synthesis should therefore be carried out in a medium with very limited hydration state and no added water.

### ❑ Fructose oleate synthesis and water production kinetics in batch

Yield increase was virtually linear up to 4 hrs (18 %) (Fig. 6). Production then slowed down and reached a plateau of 30 % after 24 hours. Figure 7 shows that a large amount of water was released during the first two hours of the reaction. Water production then remained virtually constant. The high proportion of water released in the first hours of the reaction could be the cause of the drop in synthesis yield after 4 hours of reaction.

### ❑ Fructose oleate identification

We were able to identify the structure of the compound beyond any doubt by using mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Given the way it is synthesized, the pure compound isolated is a fructose mono or

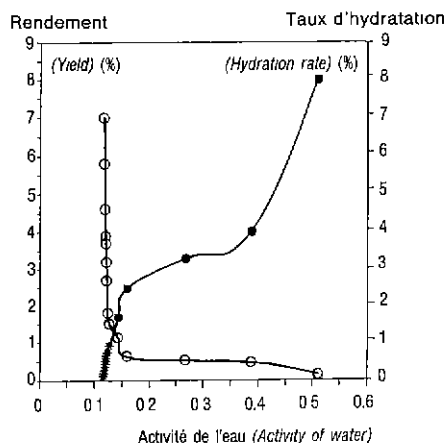


FIG. 5. — Rendement de la réaction en fonction de l'activité de l'eau — (Reaction yield depending on water activity)

Le composé pur isolé, du fait de son mode de synthèse, est un mono ou un polyoléate de fructose ; il faut également déterminer le ou les sites d'estérification.

En SM, l'ion moléculaire n'a pu être observé, qu'il s'agisse du composé libre étudié par FAB ou du dérivé silylé étudié par impact électronique ou ionisation chimique. Le fructose étant pentaalcoolique, l'observation de l'ion tétrasilylé de masse 437 ( $C_{17}H_{14}O_5Si_4$ , 4 %) prouve que la molécule initiale est un mono-ester ; de plus, il apparaît que c'est un groupe alcool primaire  $-CH_2-O-X$  qui a été perdu. Ces conclusions sont corroborées par l'observation de l'ion 629 ( $C_{32}H_{65}O_6Si_3$ , 9 %) attribuable à un oléate de fructose ayant perdu un fragment  $CH_2-O-TMS$ . La présence des deux groupes précédents précise également que le fructose est sous forme fructofuranoïque. Le pic 217 ( $C_9H_{21}O_2Si_2$ , 100 %) provient du clivage des liaisons C3-C4 et O-C5, la fonction hydroxyle en 6 étant silylée (Fig. 8). Toutes ces données de SM sont en faveur d'un monoester de fructofuranose, la fonction alcool primaire en 6 étant estérifiée par l'acide oléique.

De façon à confirmer la structure du composé synthétisé, nous avons étudié ce produit par RMN du proton à une et deux dimensions :

- entre 3,5 et 4,5 ppm, le massif complexe des protons appartenant au noyau fructose a été étudié par RMN à deux dimensions. Le signal à 4,10 ppm (2H) n'est couplé avec aucun autre proton, il est donc attribuable aux protons en 1. Le signal à 3,73 ppm (2H) est couplé avec le signal à 3,96 ppm (1H), lui-même couplé avec les signaux à 4,25 ppm (2H) ce qui nous a permis d'attribuer les signaux respectivement aux protons en 6, 5 et 4-3 comme indiqué sur la figure 9 ;
- de 2,4 à 0,87 ppm, on note les massifs caractéristiques des groupes méthyléniques de la chaîne oléyle [20], attributions confirmées par RMN 2D ;
- le signal situé à 3,6 ppm est affecté si l'on change de solvant ( $CDCl_3$  ou  $DMSD_6$ ) : il doit être attribué aux atomes d'hydrogène des fonctions alcools du fructose ;
- vers 5,3 ppm, on note un multiplet dû aux protons éthyléniques du reste oléyle.

Les principaux clivages observés en SM ainsi que l'analyse du spectre de RMN nous ont permis d'identifier le sucro-ester synthétisé comme étant le 1-oléyl- $\alpha$ -D-fructofuranose.

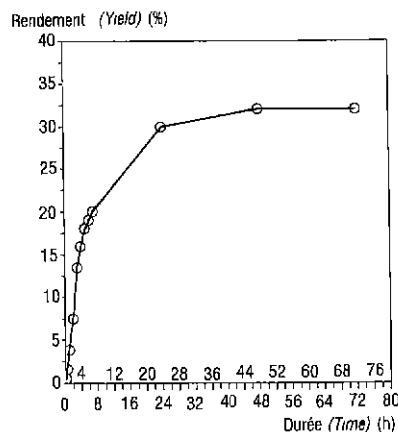


FIG. 6. — Cinétique de la réaction en reacteur fermé pour le rapport molaire C8:1/fructose = 10/1 — (Reaction kinetics in a closed reactor for a C8 1/fructose molar ratio of 10 1)

polyoléate; the esterification site(s) also need(s) to be determined.

It was not possible to observe the molecular ion using mass spectrometry, either for the free compound studied by FAB or for the silylated derivative studied by electronic impact or chemical ionization. As fructose is a penta-alcohol, observation of the tetrasilylated ion with a mass of 437 ( $C_{17}H_{14}O_5Si_4$ , 4 %) proved that the initial molecule was a monoester, in addition, it seems that the alcohol group lost was a primary group  $-CH_2-O-X$ . These conclusions were corroborated through observation of ion 629 ( $C_{32}H_{65}O_6Si_3$ , 9 %), attributable to a fructose oleate that has lost a fragment  $CH_2-O-TMS$ . The existence of the above two groups also indicated that the fructose was in fructofuranose form. The 217 peak ( $C_9H_{21}O_2Si_2$ , 100 %) came from the splitting of bonds C3-C4 and O-C5, the hydroxyl function in 6 being silylated (Fig 8). All these MS data suggest a fructofuranose monoester, with the primary alcohol in 1 esterified by the oleic acid.

In order to confirm the structure of the synthesized compound, we studied this component using 1- and 2-dimensional NMR of the proton :

- between 3.5 and 4.5 ppm, the complex mass of protons belonging to the fructose nucleus was studied using 2-dimensional NMR. The signal at 4.10 ppm (2H) was not coupled to any other proton ; it is therefore attributable to the protons in 1. The signal at 3.73 ppm (2H) was coupled to the signal at 3.96 (1H), which was itself coupled to the 4.25 ppm (2H) signals, which meant that we could attribute the signals to the protons in 6, 5 and 4-3 respectively, as indicated in figure 9,
- from 2.4 to 0.87 ppm, the masses characteristic of methylenic groups of the oleyl chain were noted [20], attributions confirmed by 2D NMR,
- the signal located at 3.6 ppm is affected if the solvent is changed ( $CDCl_3$ , or  $DMSD_6$ ) : it has to be attributed to the hydrogen atoms of the fructose's alcohol functions;
- towards 5.3 ppm, a multiplet was noted, brought about by the ethylenic protons of the oleyl remains.

The main splits observed in MS, and the NMR spectrum analysis enabled us to identify the synthesized sucro-ester as being 1-oleyl- $\alpha$ -D-fructofuranose.



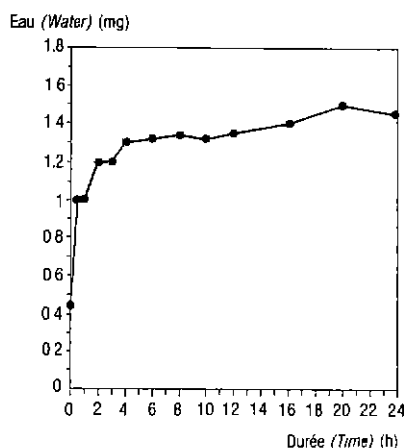


FIG. 7. — Cinétique de la production d'eau lors de la synthèse d'oléate de fructose en réacteur fermé — (Water production kinetics during fructose oleate synthesis in a closed reactor)

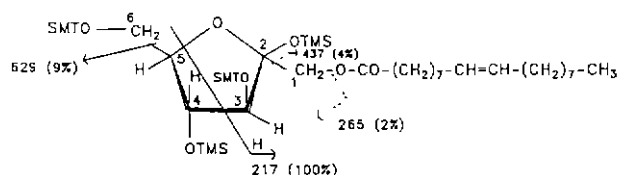


FIG. 8 — Principaux clivages de l'oléate de fructose analysé par CPG/SM — (Main fructose oleate splits analyzed by GC/MS)

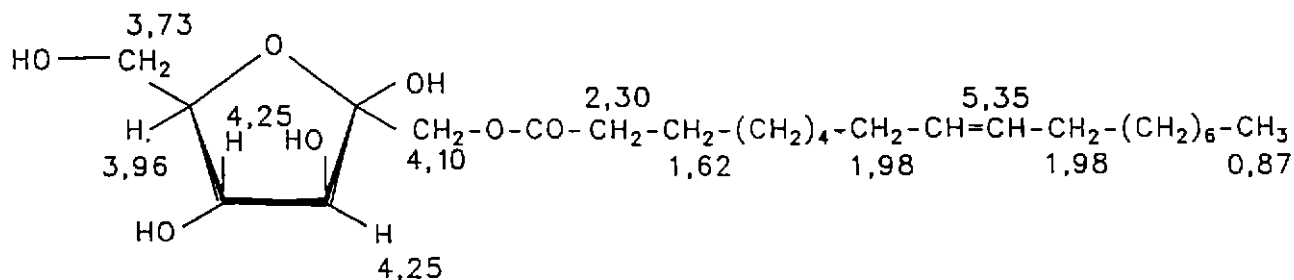


FIG. 9. — Principales attributions des signaux caractéristiques du spectre RMN de l'oléate de fructose — (Main attributions of signals characteristic of the fructose oleate NMR spectrum)

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRIFFIN W C (1949). — J. Soc. Cosmet Chem., **1**, 311-326
- [2] ENTRESSANGLES B (1987). — L'Aliment et la Vie, **72**, 46-51.
- [3] GUPTA R.K., JAMES K et SMITH F J (1983). — J. Am. Oil Chem Soc., **60**, 862-869.
- [4] LAURIDSEN J B. (1976). — J. Am. Oil Chem Soc., **53**, 400-407.
- [5] RIZZI G P et TAYLOR H M. (1978). — J. Am. Oil Chem Soc., **55**, 398-401.
- [6] HAUMANN F. (1986). — J. Am. Oil Chem Soc., **63**, 278-288.
- [7] GOMEZ HERRERA C., FERNANDEZ-BOLAÑOS VAZQUEZ J.M., BUENO IBORA N. et RIEGO MARTIN M (1987). — Grasas y Aceites, **38**, 116-119
- [8] OKUMARA S., IWAI M et TSUJISAKA Y. (1979). — Biochim Biophys Acta, **575**.
- [9] GATFIELD I.L (1984). — Anals Acad. Sci., New-York, **434**, 569-572
- [10] ZAKS A. et KLIBANOV A M (1985). — Proc. Natl Acad Sci., USA, **82**, 3192-3196
- [11] SEINO H., UCHIBORI T., NISHITANI T. et INAMASU S (1984). — J. Am. Oil Chem Soc., **61**, 1761-1765
- [12] THERIZOD M. et KLIBANOV A M (1986). — J. Am. Chem Soc., **108**, 5638-5640.
- [13] RIVA S., CHOPINEAU J., KIEBOOM A P G. et KLIBANOV A.M (1988). — J. Am. Chem Soc., **110**, 584-589
- [14] GOBBERT U., SCHMEICHEL A., LAND S. et WAGNER F. (1988). — J. Am. Oil Chem Soc., **65**, 1519-1525.
- [15] GRAILLE J (1984). — Biofutur, octobre.
- [16] BA V (1982). — These de Doctorat 3e cycle, Université de Montpellier II
- [17] SWEELEY C C., RONALD J., BENTLEY M., MAKI T A W W., WELLS R. (1985). — J. Am. Chem Soc., **107**, 2497-2507
- [18] LAANE C., BOEREN S., VOS K. et VEEGER C. (1987). — Biotechnol and Bioeng., **30**, 81-87
- [19] OSIPOW L L., SNELL F D., YORK W C. et FINCHLER A. (1956). — Ind. Eng. Chem., **48**, 1459-1462
- [20] R J. HAMILTON and J B. ROSSELL. — Analysis of oils and fats. Elsevier Applied Science Publishers, (1986), p.407

## RESUMEN

### Síntesis de monoésteres de azúcar por biocatálisis

N. KHALED, D. MONTET, M. FARINES, M. PINA, J. GRAILLE. *Oléagineux*, 1992, 47, N°4, p. 181-190

Se realizó la síntesis de diversos monoésteres de azúcar en un medio orgánico. Se insistió en el estudio de los parámetros que influyen en la síntesis del oleato de fructosa por la lipozima. El estudio espectroscópico del producto logrado muestra que éste resulta ser el 1-oleoil- $\alpha$ -D-fructofuranosa.

**Palabras clave.** — Síntesis, enzimático, lipasa, azúcar-ésteres, tensioactivos.

