

Effet des solvants organiques sur la synthèse enzymatique de glycérides partiels en milieu biphasique

G. RENARD (1), J. GRIMAUD (1), A. EL ZANT (2), M. PINA (2) et J. GRAILLE (2)

Résumé. — Il est possible d'obtenir des α monoglycérides (α MG) ou des diglycérides 1-3 (DG 1-3) purs dans un milieu biphasique (glycérol hydraté/solvant organique) en faisant réagir directement des acides gras (AGL) en présence d'une poudre lipasique commerciale de *Rhizopus arrhizus* fonctionnant en synthèse. L'orientation de la réaction vers la formation d' α monoglycérides ou de diglycérides 1-3 est étudiée en fonction de la nature du solvant organique mis en jeu. La nature des produits synthétisés est en relation étroite avec leurs solubilités dans la phase organique.

INTRODUCTION

On sait depuis longtemps que les enzymes sont actives dans des solvants apolaires [1] et que certaines ont été utilisées pour transformer des composés insolubles dans l'eau [2] ou pour la synthèse peptidique [3] en développant des procédés favorisant le déplacement de l'équilibre vers la synthèse.

Dans le domaine des corps gras, Werdelmann et Schmid [4] ont résumé les principaux travaux biotechnologiques en insistant sur le défi et l'opportunité de telles recherches. Okumara et coll. ont également très rapidement vu l'intérêt de l'utilisation des lipases dans le sens de la synthèse [5, 6, 7].

Dans un précédent article [8], nous avons montré qu'il est possible d'obtenir par voie enzymatique des monoglycérides purs, à partir d'acides gras libres et de glycérol en milieu biphasique; nous avons utilisé des lipases d'origine microbienne. En effet, on trouve facilement ces enzymes sur le marché et elles ne nécessitent pas de cofacteur pour fonctionner. De plus, les résultats que nous avons enregistrés nous ont amené à penser que le solvant organique utilisé devait jouer un rôle important dans l'orientation des produits de synthèse obtenus.

Nous décrivons dans ce travail la synthèse de glycérides purs en fonction de la nature du solvant choisi.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La lipase de *Rhizopus arrhizus* utilisée est une lipase 1-3 spécifique qui nous a été gracieusement fournie par la société Gist-Brocades (France). Le glycérol bidistillé (Merck) est de qualité analytique. Les acides gras et les autres composés utilisés sont de qualité technique (Merck)

Conditions opératoires générales des synthèses.

Les réactions sont conduites sous agitation mécanique (400 oscillations/min) dans une enceinte thermostatée. Dans un flacon de 25 ml hermétiquement fermé, on introduit 5 g d'un mélange glycérol/eau contenant 50 mg de lipase (*R. arrhizus*) et 10 ml d'une solution à 2 % d'AGL (200 mg) dans le solvant organique choisi non miscible à la phase glycérolique.

Après pesée du glycérol, la quantité convenable d'eau est ajoutée à la pipette de précision pour obtenir la proportion pondérale voulue. Ensuite, l'enzyme est ajoutée sous forme de poudre puis dispersée dans la phase glycérolique jusqu'à homogénéité. On laisse au repos dix minutes. La solution d'AGL est alors ajoutée. L'agitation provoque le contact des deux phases non miscibles. La réaction est stoppée par l'arrêt de l'agitation. Les phases se séparent et l'enzyme reste dans la phase glycérolique.

La phase organique, contenant les glycérides synthétisés et les acides gras restants, peut être récupérée quantitativement, lavée à l'eau distillée puis séchée sur sulfate de sodium anhydre. Le solvant est éliminé sous pression réduite et le mélange lipidique repris par 10 ml du même solvant organique et conservé à 4 °C sous atmosphère d'azote.

Quantification des produits de la réaction [9].

L'évaluation des glycérides synthétisés s'effectue par chromatographie sur couche mince (CCM) (déposeur automatique: Linomat III de Camag, évaluation photodensimétrique: scanner de Camag, intégrateur: Enica 10 Delsi).

Les plaques commerciales de silice 60 G de 0,25 mm d'épaisseur (Merck) sont lavées à fond perdu à l'éther éthylique distillé pour éliminer toute trace de matière organique.

En CCM quantitative, la nécessité d'obtenir des Rf compris entre 0,3 et 0,7 oblige à effectuer la séparation des mélanges de glycérides selon les deux systèmes de développement suivants:

— hexane/ether éthylique/acide acétique: 75/25/1 (v/v/v) pour doser les triglycérides, les diglycérides et les acides gras libres.

— hexane/ether éthylique/acide acétique: 10/90/1 (v/v/v) pour doser les monoglycérides.

Le dépôt en bande effectué automatiquement à l'aide du déposeur à commande électronique permet d'obtenir une répétitivité remarquable des bandes qui demeurent suffisamment étroites et rectilignes, conditions favorables pour l'estimation quantitative.

Après évaporation du solvant, les chromatoplaques sont révélées par dispersion, durant 20 secondes d'une solution constituée d'un mélange fraîchement préparé en parties égales d'une solution aqueuse saturée d'acétate de cuivre à 15 °C et d'acide phosphorique à 80 % [10]. La pression appliquée sur le disperseur dont on dispose est de 0,25 bar.

(1) ENSCM, 8, rue de l'École Normale, 34053 Montpellier

(2) Division Chimie des Corps Gras, IRHO-CIRAD, B.P. 5035 34032 Montpellier

La révélation des plaques est obtenue par chauffage à 150 °C pendant 5 minutes très précisément. Le respect scrupuleux du protocole opératoire de carbonisation contribue aussi, largement, à la répétabilité des densités optiques. Dans ces conditions, les substances apparaissent sous forme de bandes noires. Les bandes sont ensuite évaluées par photodensitométrie en réflexion à 500 nm, longueur d'onde optimale. Les mesures sont ainsi très reproductibles.

Au préalable, une droite d'étalonnage a été établie à l'aide d'une gamme de témoins purs de 0 à 25 µg de chaque catégorie lipidique. Dans les conditions précitées, tous les constituants ont une même et seule droite de réponse. La linéarité de l'équation est vérifiée jusqu'à 15 µg en équivalent carbone.

Evaluation de l'isomérisation $\alpha\beta$ des monoglycérides synthétisés.

Le monoglycéride obtenu par voie enzymatique est déposé sur une plaque de silice préalablement imprégnée d'une solution d'acide borique à 5 %, puis réactivée. Le système de migration est constitué du mélange chloroforme/acétone/acide acétique/méthanol (75,5/25/0,5/2 : v/v : v/v) dans lesquels les R_f respectifs des α et β Mg sont de 0,45 et 0,63.

Synthèse enzymatique préparative de diglycérides 1-3 en discontinu dans le n-heptane.

Dans un réacteur de 250 ml, on met en contact 100 ml d'une solution d'acides gras à 2 % dans le n-heptane, 50 g d'un mélange glycérol/eau (95/5 p/p) et 500 mg de lipase (*R. arrhizus*). Le milieu est agité et maintenu à 38 °C pendant 4 heures. Les acides gras restant à la fin de la réaction sont enlevés du milieu par un lavage basique (solution hydroalcoolique (50/50) de bicarbonate de soude à 1 %) à froid. Après séchage sur sulfate de sodium anhydre et évaporation du solvant, on recueille les diglycérides 1-3. Les acides gras sont régénérés dans la phase hydroalcoolique par acidification avec HCl 6 N, puis extraits à l'heptane.

Le rendement est de 25 % ; la pureté du dioléate 1-3, du dipalmitate 1-3 et du dilaurate 1-3 est de 80 %, l'impureté

étant l' α monoglycéride correspondant. Une recristallisation dans l'hexane permet d'obtenir les produits purs à 100 %.

Solubilité des composés de référence.

La solubilité des produits de référence (α palmitine et dipalmitine 1-3) a été déterminée à 20, 30 et 40 °C.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans un précédent article [8], nous avons pu montrer que le solvant organique utilisé, exerce un rôle important dans l'orientation de la réaction d'estérification du glycérol.

Nous avons étudié principalement la nature des composés formés par l'action de la lipase de *Rhizopus arrhizus* par rapport à un système biphasique comprenant, d'une part du glycérol et de l'eau, et d'autre part un acide gras libre en solution dans un solvant donné non hydrosoluble. Cependant, afin de tester si la réaction pouvait également être efficace en milieu monophasique, quelques bons solvants hydrosolubles des acides gras (acétone, 1-4' dioxane, tétrahydrofurane) ont été testés, mais les rendements de synthèse ont été très médiocres.

Les résultats enregistrés sont présentés dans le tableau I dans lequel la pureté des produits est exprimée, selon le cas, par la proportion pondérale en α MG ou en DG 1-3 par rapport à la totalité des glycérides obtenus et le taux de synthèse est calculé par rapport aux AGL, moléculairement mineurs dans tous les cas. Il faut noter que les monoglycérides synthétisés sont exclusivement sous la forme d'isomères α ce qui vérifie bien la spécificité 1-3 du biocatalyseur.

Il faut toutefois souligner que nous n'avons regroupé dans le tableau I, pour chacun des solvants étudiés que le rendement maximal obtenu, soit en monoglycéride, soit en diglycéride correspondant à la proportion d'eau optimale dans la phase glycérolée. En effet, pour une température donnée, la solubilité de l'eau dans les solvants organiques n'étant pas la même, nous avons dû déterminer pour chaque solvant étudié et pour chaque produit recherché (α MG ou DG 1-3), la proportion optimale d'eau que doit contenir, au départ, la phase glycérolée pour que le meilleur rendement soit atteint.

D'après les résultats obtenus (Tabl. I), nous pouvons considérer trois types de solvant :

TABLEAU I. — Influence du solvant sur la réaction à 38 °C

Solvants	α MG			DG 1-3		
	Glycérol/eau p/p	Taux de synthèse (%)	Pureté* (%)	Glycérol/eau p/p	Taux de synthèse (%)	Pureté* (%)
Chloroforme	80/20	23,6	82	95/5	2	35
Dichlorométhane	75/25	16	100	85/15	2,9	13
Acétate éthyle	85/15	8,3	100	90/10	0,1	—
Chlorobenzène	80/20	9	100	65/35	9	49
Tétrachlorométhane	98/2	2,8	100	90/10	26,2	74
n Heptane	95/5	2,8	7	95/5	27,5	85
Acétone	90/10	3,4	100	90/10	0,1	—
1-4 Dioxane	90/10	2,8	100	90/10	0,1	—
Tétrahydrofurane	90/10	2,7	100	90/10	0,1	—
n Hexane	90/10	2	10	95/5	22	70
Toluène	90/10	10	40	85/15	27,5	84
Ether diéthylique	90/10	20	80	90/10	5,2	20

- Ceux qui favorisent uniquement la synthèse d' α monoglycérides
 - acétate d'éthyle, acétone, dioxane, tétrahydrofurane.
- Ceux qui favorisent presque exclusivement la synthèse de diglycérides 1-3
 - n heptane et n hexane ;
- Ceux dont l'orientation de la réaction est dépendante de la teneur initiale en eau de la phase glycérolée
 - chloroforme, dichlorométhane, chlorobenzène, tétrachlorure de carbone et toluène.

On remarque cependant que la teneur initiale en eau de la phase glycérolée n'est pas seule responsable de l'orientation de la synthèse (formation d' α MG ou de DG 1-3). Comme nous l'avons déjà suggéré dans notre précédent article [8], il est possible que la solubilité des produits formés dans le solvant choisi soit l'une des principales causes de la sélectivité observée.

Nous avons alors étudié la solubilité de l' α -monopalmitine, de la dipalmitine 1-3 et de l'acide palmitique à 20, 30 et 40 °C, dans chaque solvant utilisé précédemment. Les résultats ont été regroupés dans le tableau II. Les solvants étudiés solubilisent tous, à des degrés divers, l'acide palmitique. Par contre, la solubilité de l' α monopalmitine et de la dipalmitine 1-3 est très variable suivant le solvant. On remarque immédiatement que les solvants dans lesquels les monoglycérides sont très peu solubles (n heptane et n hexane) sont ceux qui précédemment avaient été classés comme favorisant la synthèse des diglycérides. De même, les solvants dans lesquels les monoglycérides sont solubles (acétate d'éthyle, acétone, dioxane et tétrahydrofurane) sont ceux qui avaient été classés comme favorisant la synthèse des monoglycérides, même si celle-ci est très faible.

L'orientation de la réaction en fonction de la nature des solvants devra certainement faire l'objet d'une étude plus approfondie puisque nous n'avons pas tenu compte de la teneur en eau des solvants organiques dans l'étude des solubilités.

Il faut souligner que dans le cas du toluène et du tétrachlorure de carbone, la solubilité de l' α monoglycéride est médiocre. Cependant, à la température de réaction retenue (40 °C), l' α MG commence à se solubiliser ; le composé formé de façon majoritaire est alors le diglycéride (Tabl. I).

Inversement, dans le cas du chloroforme ou du dichlorométhane, dans lesquels l' α monopalmitate est soluble, on constate que la synthèse d' α MG est largement favorisée

Ces résultats peuvent s'expliquer sur la base du mécanisme d'action des lipases. En effet, on sait que les lipases agissent à l'interface phase aqueuse/phase organique. Le premier composé formé est un α monoglycéride puisque la lipase de *Rhizopus arrhizus* est 1-3 régiosélective. Si ce produit n'est pas ou peu soluble dans le solvant organique utilisé, il sera piégé à l'interface du système biphasique et, au niveau du complexe enzyme/substrat, subira, de ce fait, une seconde acylation. Comme la lipase est 1-3 régiosélective, le produit formé sera un diglycéride 1-3. Par conséquent, dans les solvants où le monoglycéride n'est pas soluble, on observe la formation sélective de diglycéride 1-3. Inversement, dans les solvants où les monoglycérides sont très solubles, on observe une préférence pour la synthèse d' α monoglycérides.

D'autre part, nous avons étudié l'influence de la quantité d'AGL opposée au glycérol dans le cas d'un solvant orientant la réaction vers la synthèse d' α MG et dans celui orientant la réaction dans le sens de la synthèse de DG 1-3. Pour cela, nous avons effectué 2 séries de réaction dans lesquelles la quantité d'AGL dans la phase organique (10 ml) croît de 50 mg (concentration de 0,5 %) à 1 000 mg (concentration de 10 %). La quantité et la composition de la phase glycérolique est constante. Les résultats sont consignés dans le tableau III. Dans les 2 cas, la quantité de produit synthétisé augmente avec la concentration en AGL ; le rendement de la réaction diminue, ce qui est logique puisque celui-ci est exprimé par rapport aux AGL.

Toutefois, la quantité d'AGL mise en réaction a une répercussion très marquée sur la sélectivité de la réaction et donc sur la pureté des produits synthétisés. Dans le cas du solvant favorisant la synthèse de DG 1-3 (n heptane), l' α MG, formé dans le premier temps de la réaction étant peu soluble dans la phase organique, aura tendance à rester à l'interface phase organique/phase glycérolée. Une augmentation de la concentration en AGL devrait avoir tendance à faciliter le départ de l'interface de ce composé par un effet de co-dissolution, limitant la possibilité d'une deuxième estérification et, en conséquence, diminuant la sélectivité de la réaction, ce qui est effectivement observé ; la pureté des

TABLEAU II. — Solubilité des composés de référence en g/l. Les valeurs pour l'acide palmitique sont celles indiquées dans (12)

Solvants	Acide palmitique		α monopalmitine		Dipalmitine 1-3		
	20 °C	20 °C	30 °C	40 °C	20 °C	30 °C	40 °C
Chloroforme	96	196			100		
Dichlorométhane	100	100			204		
Acétate éthyle	200	300			non	non	300
Chlorobenzène	100	306			306		
Tétrachlorométhane	100	non	non	490	306		
n Heptane	300	non	non	non	non	non	non
Acétone	196	306			non	98	
1-4 Dioxane	98	196			non	300	
Tétrahydrofurane	98	102			102		
n Hexane	300	non	non	non	non	non	non
Toluène	100	non	non	294	306		
Ether diéthylique	102	300			408		

DG 1-3 synthétisés diminue progressivement de 95 % à 82 % quand la concentration en AGL dans la phase organique croît de 0,5 % à 10 %.

En revanche, dans le cas du chloroforme, solvant organique favorisant la synthèse d' α MG, les produits solubles issus de la première estérification ne s'attardent pas à l'interface phase organique/phase glycérolée et en conséquence l'augmentation de la concentration en AGL ne peut aller, pour la même raison que précédemment, que dans le sens d'une amélioration de la sélectivité. Dans ce cas effectivement, la pureté progresse de 73 % à 95 % à mesure que la concentration en AGL dans la phase organique augmente de 0,5 % à 10 %.

Il faut noter que dans les 2 cas, ce n'est qu'aux plus fortes concentrations en AGL que l'effet positif ou négatif sur la sélectivité de la synthèse est vraiment significative.

CONCLUSION

Il ressort de l'étude entreprise qu'il est possible d'obtenir des glycérides partiels purs, notamment des α monoglycérides et des diglycérides 1-3 en utilisant des solvants courants de l'industrie chimique en présence d'une lipase. Pour l'ob-

TABLEAU III. — Sélectivité de la réaction en fonction de la quantité d'AGL

Chloroforme				n Heptane		
AGL (mg)	α MG (mg)	Rendement (%)	Sélectivité (%)	DG 1-3 (mg)	Rendement (%)	Sélectivité (%)
50	10	20	71	17	35	95
100	19	19	72	32	32	95
200	38	17,5	73	56	28	90
500	77,5	15,5	93	85	17	85
1 000	135	13,5	95	120	12	82

tention de monoglycérides, le meilleur solvant est le dichlorométhane [8] et pour l'obtention des diglycérides 1-3, les meilleurs solvants sont les hydrocarbures et notamment l'hexane et l'heptane.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHEN C S, ISH C J (1989) — *Angew. Chem Int Ed Engl*, **28**, 695
 [2] MACRAE A R. (1983) — *J Am Oil Chem Soc.*, **60**, 291.
 [3] KULLMAN K. (1987) — *Enzymatic peptid synthesis*, CRC Press, Boca Raton, Fl
 [4] WERDELMAN B W., SCHMID R D (1984) — *Fette Seifen Anstrichmittel*, **84**, 436
 [5] OKUMARA S., IWAI M., TSUJISAKA Y (1981). — *Agricultural Biology Chemistry*, **45**, 185
 [6] OKUMARA S., IWAI M., TSUJISAKA Y (1979) — *Biochimica Biophysica Acta*, **575**, 156
 [7] OKUMARA S., IWAI M., TSUJISAKA Y (1977) — *Biochimica Biophysica Acta*, **489**, 415
 [8] EL ZANT A., PINA M., GRAILLE J., GRIMAUD J., RENARD G (1988) — *Oléagineux*, **43**, (8-9), 305-358
 [9] NAUDET M., PASERO J., BIASINI S (1965) — *Rev. Fr Corps Gras*, **12**, 528
 [10] GOSSELIN L., DE GREAVE J (1975) — *J Chromatography*, **110**, 117
 [11] FUKUI S., TANAKA A (1985) — *Endeavour*, **9**, 10
 [12] BEILSTEIN HANDBUCH DER ORGANISCHEN CHEMIE (1960). — Springer Verlag 4^e Ed., Tome II, 943

SUMMARY

Effect of organic solvents on the enzymatic synthesis of partial glycerides in diphasic medium.

G. RENARD, J. GRIMAUD, A. EL ZANT, M. PINA and J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 7, p. 337-340.

It is possible to obtain α monoglycerides (α MG) or pure 1-3 diglycerides (1-3 DG) in a diphasic medium (hydrated glycerol/organic solvent) by performing the direct reaction of fatty acids (FFA) in the presence of a commercial lipase powder of *Rhizopus arrhizus* functioning in synthesis. Orientation of the reaction towards the production of α monoglycerides or 1-3 diglycerides is studied in accordance with the type of organic solvent used. The type of products synthesized is closely linked to their solubility in the organic phase.

RESUMEN

Efecto de solventes orgánicos en la síntesis enzimática de glicéridos parciales en medio bifásico.

G. RENARD, J. GRIMAUD, A. EL ZANT, M. PINA y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 7, p. 337-340.

Es posible obtener α monoglicéridos (α MG) o diglicéridos 1-3 (DG 1-3) puros en un medio bifásico (glicerol hidratado/solvente orgánico) haciendo reaccionar directamente ácidos grasos (AGL) en presencia de un polvo de lipasa comercial de *Rhizopus arrhizus* que funciona en forma sintética. La orientación de la reacción hacia la formación de α monoglicéridos o diglicéridos 1-3 se estudia según la índole del solvente orgánico que interviene. La índole de los productos sintetizados se relaciona estrechamente con sus solubilidades en la fase orgánica.