



## Synthèse enzymatique d'esters de fructose (Enzymatic synthesis of fructose esters)

Gilles Olive, Gabriella Torezan, Christophe Blecker

### ► To cite this version:

Gilles Olive, Gabriella Torezan, Christophe Blecker. Synthèse enzymatique d'esters de fructose (Enzymatic synthesis of fructose esters). *Comptes Rendus. Chimie*, 2012, 15 (11-12), pp.1037-1047. 10.1016/j.crci.2012.09.002 . hal-00730955

**HAL Id: hal-00730955**

**<https://hal.science/hal-00730955>**

Submitted on 12 Sep 2012

**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.

# Synthèse enzymatique d'esters de fructose

## Enzymatic synthesis of fructose esters

Gilles Olive<sup>a,b\*</sup>, Gabriela A. Pompeu Torezan<sup>a</sup>, Christophe Blecker<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux, Belgium, Tel: 00 32 81.62.25.64, Fax: 00 32 81.60.17.67.

<sup>b</sup> Ecole Industrielle et Commerciale de la Ville de Namur (EICVN), Rue Pépin 2B, B-5000 Namur, Belgium, Tel: 00 32 81.25.74.00, Fax: 00 32 81.25.74.09. Email: gilles.olive@eicvn.be

### Résumé:

Dans la littérature, il est possible de trouver un grand nombre d'articles sur la synthèse enzymatique d'ester du fructose. Un certain nombre de paramètres ont été revus afin d'optimiser les conditions opératoires, ceci dans une démarche plus industrielle. Les conditions expérimentales présentées ici sont maintenant supérieures à celles de la littérature et les rendements en esters le montrent: nous obtenons 78 % de laurate de fructose. Des méthodes analytiques ont été mises au point et il a été développé des méthodes rapides (basées sur différentes conditions CCM en fonction des informations désirées), des méthodes précises (basées sur l'HPLC) et plusieurs méthodes de purification.

### Abstract:

The enzymatic synthesis of esters is well documented in the literature. A number of parameters have been revised to optimize the operating conditions, in view of a more industrial approach. The experimental conditions presented here are now superior to those of literature and the yields of esters show 78% of fructose laurate. Analytical methods have been perfected and rapid methods (based on different TLC conditions depending on the desired information), accurate methods (based on HPLC) and several purification methods were developed.

### Mots clés:

ester, lipase, *Candida antarctica* Novozym 435, tensioactif, teneur en eau, fructose.

### Keywords:

ester, lipase, *Candida antarctica* Novozym 435, surfactant, water content, fructose.

## 1. INTRODUCTION

Les esters entre un sucre et un acide gras sont des tensioactifs<sup>a</sup> non-ioniques. Ils sont complètement biodégradables, non toxiques, non irritants pour la peau, sans odeur et sans goût, ce qui permet leur utilisation dans l'industrie alimentaire ou cosmétique par exemple [2-5]. Depuis les années 1950, les sucroesters sont réalisés principalement par voie chimique [6; 7]. Mais cette méthode de synthèse présente plusieurs inconvénients. En premier lieu, la réaction a lieu à haute température dans des solvants toxiques difficiles à enlever [8], ce qui entraîne une non sélectivité dans l'estérification des

groupements hydroxyles du sucre [2; 9] et en plus par un phénomène de caramélisation les produits sont ainsi colorés [10] et contiennent des sous-produits nocifs [11]. Depuis 1986, la synthèse des esters de sucre peut être réalisée par voie enzymatique notamment par des lipases [7; 12]. L'avantage est que ce type de réaction peut être conduit dans des conditions douces et des solvants moins nocifs que par la voie chimique [13] et conduisent généralement à des monoesters [6]. Dans le cas de réaction enzymatique, le surfactant peut bénéficier du label "naturel". Quant à la synthèse des esters de fructose, elle a débuté dans l'année 1995 [14].

Dans cet article, nous présentons nos résultats sur la réaction enzymatique entre le fructose et l'acide laurique principalement mais aussi l'influence de divers paramètres comme le temps de réaction, le solvant, la longueur de chaîne de l'acide gras, le ratio molaire entre le sucre et l'acide gras, et la quantité d'eau initiale dans le milieu. Dans la mesure du possible, nous modéliserons les courbes obtenues afin d'apporter des données cinétiques importantes industriellement. Nous donnons des conditions analytiques permettant un suivi rapide de la réaction.

Le comportement des agents tensio-actifs dépend de la longueur de la chaîne grasse: une courte chaîne (en dessous C12) donne un tensioactif hydrophile tandis que les tensioactifs à longue chaîne (au dessus de C12) sont lipophiles. Le choix de l'acide laurique comme composé test a été dicté par le fait qu'il a une longueur de chaîne intermédiaire mais surtout parce que le laurate de fructose est reconnu pour certaines propriétés d'intérêt, dont notamment un fort effet d'inhibition de croissance sur *Streptococcus mutans* responsable de la carie dentaire [2]. Les esters de fructose possèdent aussi activité émulsifiante plus élevée sur les hydrocarbures aromatiques et les huiles que sur les hydrocarbures aliphatiques [15; 16]. Grâce à son fort pouvoir de réduction des tensions de surface, le laurate de fructose peut être adopté en substitution des émulsifiants synthétiques [15]. Quant au laurate de fructose, son HLB indique qu'il est neutre et stabilise aussi bien les émulsions eau dans huile que huile dans eau [4]. Tout ceci permet l'utilisation de ces esters de fructoses dans l'industrie alimentaire dans la production d'arome ou bien la maturation de fromage, qui ne sont que quelques exemples parmi tant d'autres [17].

---

<sup>a</sup> En accord avec Sekeroglu, un tensioactifs ou surfactant est une molécule amphiphile qui tend à diminuer les tensions interfaciales aux interfaces [1].

Les lecteurs trouveront les résultats sur l'estérification de l'inuline, qui est un polymère de résidus fructose liés en  $\beta$ -(1->2), en annexe dans le Supporting Information.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le biocatalyseur utilisé est la lipase B immobilisée de *Candida antarctica* Novozym 435 de Novo Industri. Les plaques de chromatographie sur couche mince sont des plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub> de Merck. Le gel de silice est du silica gel 60 Å SI<sub>0</sub> 1720 de chez Rocc (70-210 mesh). Les tamis moléculaires (4 Å, 8-12 mesh, Aldrich) sont activés pendant 2 h à 350 °C et laissés une semaine dans un dessiccateur.

L' $\alpha$ -naphtol est préparé de la façon suivante: 21 ml de solution mère (15 % - p/v dans l'éthanol) sont prélevés et dilué dans 13 ml d'acide sulfurique concentré, 81 ml d'éthanol 96 % et 8 ml d'eau.

Le révélateur au permanganate de potassium basique est constitué de 10 g de carbonate de potassium, 1,5 g de permanganate de potassium dans 150 ml d'eau et 1,25 ml d'une solution aqueuse de soude à 10 %.

Le calcul des moyennes et des erreurs (avec niveau de confiance de 95 % de Student-Fisher) a été déterminé par le module One variable statistic Version 1.05 [18] qui fait partie du programme Gabriel Data Analysis [19]. L'analyse des courbes de points a été réalisée par le module Two variables statistic Version 1.31 [20] qui fait partie du même logiciel.

## 2.1. Solubilité

Les essais ont été effectués dans l'hexane ( $\log P = 3,5$ ), le 2-méthyl-2-butanol ( $\log P = 0,89$ ), la pyridine ( $\log P = 0,71$ ), l'acétate d'éthyle ( $\log P = 0,68$ ), le *tertio*-butanol ( $\log P = 0,35$ ), l'acétone ( $\log P = -0,23$ ), l'acétonitrile ( $\log P = -0,33$ ) et l'eau. 0,5 g de sucre sont ajoutés à 20 ml de solvant. Le mélange est maintenu à 60 °C sous agitation (100 rpm) pendant 5 heures, centrifugée à 14 000 rpm pendant 10 minutes. Un prélèvement de 2  $\mu$ l du surnageant (environ 10 ml) est développé par CCM (butanol/éthanol/eau 5/3/2 v/v/v - révélation à l' $\alpha$ -naphtol).

La détermination quantitative de la solubilité a été réalisée de la façon suivante: dans 20 ml de solvant, 0,6 g de fructose sont ajoutés, puis le mélange est chauffé à 60 °C sous agitation pendant 2 heures. Après 1 heure à 60 °C sans agitation, 10 ml de surnageant sont prélevés avec précision et transférés dans un ballon de 100 ml préalablement taré, puis le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif.

## 2.2. Méthodes analytiques

### 2.2.1. Méthodes analytiques rapides de suivi de la réaction enzymatique - CCM

Une première élution de 2,7 cm est effectuée par le mélange de solvant chloroforme/méthanol/eau (85/13,5/1,5, v/v/v). La plaque est séchée, puis un deuxième développement par du chloroforme/méthanol/acide acétique (98,5/1,5/1, v/v/v) est conduit jusqu'à 5,2 cm. La plaque est de nouveau séchée puis remise à éluer par le mélange de *n*-hexane/éther diéthylique/acide acétique (70/30/1, v/v/v) jusqu'à 9 cm. La révélation s'effectue sur la plaque séchée par une pulvérisation d'une solution de fluorescéine (0,2 % dans le méthanol) et une observation sous lampe UV suivi d'une pulvérisation d'une solution  $\alpha$ -naphtol puis carbonisation à 105 °C pendant 5 min. Dans ces conditions les  $R_f$  sont de 0,00, 0,12, 0,18 et 0,41 respectivement pour le fructose, le monolaurate de

fructofuranosyle, les polyaurates de fructofuranosyle et l'acide laurique et de 0,10 pour le monolaurate de glucopyranosyle.

L'autre méthode consiste en une élution par un mélange de solvant dichlorométhane/éthanol (19/1, v/v) suivie d'une révélation à froid par une solution de permanganate de potassium basique. Les  $R_f$  sont de 0,00, 0,10, 0,37 et 0,58 respectivement pour le fructose, le monolaurate de fructofuranosyle, les polyaurates de fructofuranosyle et l'acide laurique.

#### 2.2.2. Dosage des acides gras

A 1 ml (qui sera pesé) de prélèvement de la réaction, on ajoute 10 ml d'éthanol absolu et 2 gouttes de phénolphthaléine (0,1 % éthanol 96 %). Les acides gras libres sont alors titrés par de la potasse 0,02 M. Chaque échantillon est dosé deux fois.

#### 2.2.3. HPLC

Les analyses HPLC ont été effectuées sur un appareil Agilent Technologies 1200 series équipé avec un détecteur ELSD Alltech 330 (température: 84,5 °C, débit du gaz: 2,22 slpm). Une colonne Agilent Zorbax SB-C18 (150 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m) a été utilisée lors de l'analyse. Le programme du gradient de solvant a été le suivant (débit 0,5 ml min<sup>-1</sup>): à 0 min 45/55 (% v acétonitrile/% v eau), à 15 min 100/0, à 25 min 100/0, à 30 min 45/55, puis maintenu pendant 10 min.

#### 2.2.4. Teneur en eau

La teneur en eau des milieux réactionnels a été caractérisée par titrage de 1 g de ce milieu par un titrateur Mettler Toledo DL31 Karl Fisher [21].

#### 2.2.5. Tension de surface

Les tensions de surface ont été déterminées à l'aide d'un appareil Lauda TVT 1 équipé du logiciel Lauda Drop-Volume-Tensiometer TVT-1 Version 2.0 avec les réglages suivant: Température: 20 °C, Mode: DYNamic, Volume de la seringue: 2,5 ml, Rayon: 1,055 mm, Densité: 0,998 g.ml<sup>-1</sup>, Nombre de répétitions: 2, Nombre de gouttes: 8, Réduction: ON, T1: 0,07 s.μl<sup>-1</sup>, T2: 0,8 s.μl<sup>-1</sup>. La température était contrôlée par un appareil RM 6 de Lauda à plus ou moins 0,5 °C. Les déterminations des tensions de surface ont été effectuées par le module TVT Analyze Version 1.03 [22] qui fait partie du programme Gabriel Data Analysis [19].

#### 2.2.6. ACD/DSC

Les thermogrammes ont été obtenus sur un 2920 MDSC V 2.6A de TA Instruments dont les réglages étaient un balayage de la température de -40 °C à +200 °C avec une vitesse de 5 °C par minute.

### 2.3. Réaction d'estérification enzymatique

A 20 ml de solvant (2-méthyl-2-butanol), le fructose (0,5044 g ; 2,8 mmoles) et l'acide gras (2,8 mmoles (0,5609 g dans le cas de l'acide laurique)) sont chauffés à 60 °C dans un erlenmeyer fermé par

un bouchon à vis recouvert d'une feuille d'aluminium changée toutes les 24 heures. Au bout de 1 heure, le tamis moléculaire (2 g) et la lipase Novozym 435 (100 mg) sont ajoutés en une fois. Le mélange réactionnel est agité grâce à un agitateur orbitalaire (100 rpm) thermostaté par un bain-marie à 60 °C pendant 48 heures. Au bout de ce temps, le mélange réactionnel est filtré pour éliminer le tamis moléculaire et l'enzyme. 40 ml d'eau distillée sont versés dans le filtrat. Ce dernier est extrait par 2 x 10 ml de dichlorométhane et la phase organique est éliminée dans un évaporateur rotatif. Le produit restant est alors redissous dans 10 ml de chloroforme ou dichlorométhane en vue de sa purification qui est décrite au paragraphe suivant.

Un blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans enzyme.

#### **2.4. Purification des esters**

30 g de gel de silice G60, préalablement conditionnée dans 70 ml de chloroforme, sont déposés, pour atteindre une hauteur de 20 cm, dans une colonne en verre de 2,0 cm de diamètre. 60 ml de chloroforme sont élués avant le dépôt de l'échantillon. Le produit (dissous dans 2 ml de chloroforme) est déposé en tête de colonne. La colonne est lavée par 130 ml de chloroforme (récupération de l'acide gras), puis par 120 ml du mélange chloroforme/méthanol (90/10, v/v) (obtention des polyesters). Le monoester est enfin élué par 120 ml du mélange chloroforme/méthanol/eau (64/10/1, v/v/v). La pureté des esters, contrôlée par HPLC, est supérieure à 99 %.

Une autre méthode consiste à introduire dans une colonne de 6 cm de diamètre, 150 g de silice dans 250 ml d'un mélange dichlorométhane/éthanol 19/1 v/v. 450 ml du même mélange sont élués afin de récupérer l'acide laurique. 100 ml de solvant 18/2 v/v sont ensuite utilisés comme tampon (sinon la colonne sèche prématurément) et 700 ml de mélange 17/3 v/v servent à éluer les polylaurates et ensuite le monolaurate de fructose. La pureté est alors déterminée par CCM et aucun spot autre que celui du produit n'est visible.

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Recherche du solvant adéquat

Avant de se lancer dans la synthèse, il nous a semblé important de déterminer le meilleur solvant notamment au niveau de la solubilisation des substrats. Le problème associé à cette étude est que le solvant doit à la fois solubiliser le sucre (polaire), l'acide gras (apolaire) ainsi que l'enzyme sans la dénaturer. Des essais de solubilité ont été effectués dans l'hexane, le 2-méthyl-2-butanol ou alcool *tertio*-amylique, la pyridine, l'acétate d'éthyle, le *tertio*-butanol, l'acétone, l'acétonitrile et l'eau. Les solvants fortement polaires (ayant un  $\log P < -0,5$ ), tel que le DMSO par exemple, n'ont pas été testés car ceux-ci sont connus pour conduire au phénomène de "water-stripping", c'est-à-dire un déplacement de l'eau liée à l'enzyme vers le solvant [23; 24], sachant que les lipases y sont fortement sensibles contrairement aux protéases [25]. Il a été trouvé clairement que le fructose est soluble dans l'eau et la pyridine, qu'il est insoluble dans l'hexane (ce qui est en accord avec les résultats de Spiliotis [9]) et qu'il est partiellement soluble selon l'ordre suivant : 2-méthyl-2-butanol > *t*-butanol > acétonitrile > acétone > acétate d'éthyle (voir figure S 1 dans le supporting information).

Le tableau S 1 donne un relevé de la littérature de la solubilité du fructose en fonction du solvant et de la température ainsi que nos valeurs expérimentales, vu la disparité des valeurs bibliographiques. Il a été trouvé une solubilité de 10,0 g.l<sup>-1</sup> à 60 °C dans le 2-méthyl-2-butanol ce qui est proche de la valeur donnée par Chamouleau (11,0 g.l<sup>-1</sup>) [6] alors que dans le *tertio*-butanol il a été trouvée une valeur de 15,9 g.l<sup>-1</sup> à 60 °C ce qui est en accord avec la valeur de Yoo (15,6 g.l<sup>-1</sup>) [26].

Pour la suite le 2-méthyl-2-butanol a été utilisé de préférence, qui présente de plus l'avantage d'être autorisé pour le secteur alimentaire [8] ; des traces ne seraient par conséquent pas un obstacle.

### 3.2. Mise au point d'analyse pour le suivi de la réaction d'estérification enzymatique

Il est important de développer des méthodes analytiques rapides pour suivre la réaction enzymatique.

#### 3.2.1. Méthode rapide basée sur la CCM

Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réalisées afin de permettre un suivi qualitatif rapide de la synthèse des esters de sucre. La mise au point de cette analyse a permis de trouver une méthode qui révèle sur la même plaque chromatographique les substrats (sucre et acide gras) et les produits (mono et diesters) de la réaction. Tous les essais ont été réalisés sur plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub>.

Le premier système chromatographique utilisé est une adaptation de la littérature [2; 3]. L'éluent était un mélange de solvants (chloroforme/méthanol/acide acétique/eau - 80/15/8/2, v/v/v/v) et la révélation ayant été réalisée par pulvérisation d'acide sulfurique à 50 % puis chauffage à 105 °C. Par ce système, on aperçoit seulement les spots du fructose et des esters de fructose (données non montrées).

Un deuxième système a donc été testé, basé sur le mélange de solvants éther pétrole/éther éthylique/acide formique - 6/4/0,15, v/v/v suivi d'une révélation par UV après pulvérisation de fluorescéine. Dans ce cas, seul les spots d'acide gras sont révélés (données non montrées).

Le troisième système a été mis au point par Sultani *et al.* [3] (chloroforme/méthanol/acide acétique/eau - 80/15/8/2, v/v/v/v ; révélation par pulvérisation d' $\alpha$ -naphthol 50 % puis carbonisation à 105 °C) et ne permet de détecter que les spots du fructose et de ses esters (données non montrées).

L'objectif fixé a été finalement atteint en modifiant le principe d'une triple élution et une double révélation mis au point par Castillo *et al.* [27]. Cela consiste en une première élution de 2,7 cm par du chloroforme/méthanol/eau (85/13,5/1,5, v/v/v) suivie d'un séchage de la plaque. Un deuxième développement de 5,2 cm est réalisé par un mélange de chloroforme/méthanol/acide acétique (98,5/1,5/1, v/v/v). La plaque est à nouveau séchée puis éluee une dernière fois par un mélange de *n*-hexane/éther diéthylique/acide acétique (70/30/1, v/v/v) sur une hauteur de 9 cm. Une fois la plaque séchée, la double révélation consiste en une pulvérisation d'une solution de fluorescéine et une observation sous lampe UV suivie d'une pulvérisation d'une solution  $\alpha$ -naphthol suivie d'une carbonisation à 105 °C. Grâce à ce système, on peut observer les spots des réactifs de départ (sucre et acide gras) ainsi que les produits de la réaction (mono et polyesters). Les  $R_f$  ont été calculés à partir de la figure 1 et sont de 0,00, 0,12, 0,18 et 0,41 respectivement pour le fructose, le monolaurate de fructofuranosyle, les polylaurates<sup>b</sup> de fructofuranosyle et l'acide laurique. Dans les mêmes conditions le monolaurate de glucopyranosyle a un  $R_f$  de 0,10 (données non montrées).

Ce système de triple élution et une double révélation est pratique pour avoir rapidement les informations sur tous les composés présents en même temps, mais se révèle trop lent dans le cas d'un suivi d'une réaction. Pour cela une autre méthode plus rapide a été développée. L'objectif a été atteint par un mélange dichlorométhane/éthanol (19/1 v/v) et une révélation par du permanganate de potassium basique (voir figure a). L'avantage de ce solvant est qu'il sera utilisé directement plus tard lors de la purification par colonne.

---

<sup>b</sup> Les spots CCM identifiés par une flèche à la figure a seront nommés par la suite "polylaurates". Il est en fait impossible d'identifier s'il s'agit de différents conformères du dilaurate ou bien de tri, tétra esters sans analyses complémentaires poussées.

### 3.2.2. Méthode pour la détermination de la conversion d'acide gras

Les acides gras libres ont été dosés par de la soude ou par de la potasse. Cette méthode permet d'évaluer le rendement de la réaction. L'équation (1) donne le pourcentage de conversion.

$$\% \text{ conversion molaire} = [(C_0 - C)/C_0] \times 100 \quad (1)$$

$C_0$  = concentration molaire initiale de l'acide gras,

$C$  = concentration molaire de l'acide gras à un temps donné

Cette méthode a été utilisée par la suite pour calculer le taux de conversion lors de l'optimisation de la réaction.

### 3.2.3. Méthode pour la quantification et l'identification des produits synthétisés - HPLC

Le système chromatographique était constitué d'une colonne C18 couplée à un détecteur ELSD (détecteur évaporatif à diffraction de lumière) qui est un détecteur permettant de faire du quantitatif. Différents essais de phases mobiles ont été testés afin d'obtenir une séparation des différents réactifs et produits de la réaction d'estérification enzymatique. Le premier essai effectué a consisté à essayer ce qui a été trouvé dans la littérature et en particulier la publication de Scheckermann [14] qui utilise comme éluant l'acétonitrile/méthanol/eau (35/60/5, v/v/v) à 40 °C (figure S 2 (a)). N'obtenant pas de bonne résolution, le mélange acétonitrile/eau (65/35, v/v) à 35 °C a été testé et donne là aussi une résolution trop faible (figure S 2 (b)). Enfin une excellente séparation (figure S 2 (c)) a été obtenue par un gradient acétonitrile/eau décomposé comme suit: à 0 min 45/55 (% v acétonitrile/% v eau), à 15 min 100/0, à 25 min 100/0, à 30 min 45/55, maintenu pendant 10 min. Dans ces conditions le fructose a un temps de rétention de 2,4 minutes, le monolaurate de fructofuranosyle de 10,1 et 10,8 minutes, l'acide laurique 16,8 minutes et les polylaurates de fructofuranosyle de 24,5 minutes. Dans les mêmes

conditions, le monopalmitate de fructosyle a un temps de rétention de 14,0 minutes et le dipalmitate de fructose un temps de 19,3 minutes (données non montrées).

### 3.3. Réaction d'estérification enzymatique

La première étape a été une adaptation des conditions opératoires de Chamouveau *et al.* [6], ces derniers réalisant la synthèse du palmitate de fructofuranosyle dans 200 ml de 2-méthyl-2-butanol catalysée par la lipase de *Candida antarctica*.

Schématiquement les conditions expérimentales que nous avons utilisées sont les suivantes: à un mélange équimolaire (2,8 mmol) de fructose et d'acide laurique dans 20 ml de solvant sont ajoutés 100 mg d'enzyme Novozym 435 et 2 g de tamis moléculaire activé 4 Å. Le mélange est agité (100 rpm) pendant 48 h à 60 °C. Par la suite nous nous sommes rendus compte de l'importance de l'eau dans le processus enzymatique et nous proposons les modifications suivantes: l'erlenmeyer doit être à vis et le col est en plus protégée par une feuille d'aluminium changée toute les 24 heures. Grâce à ces modifications, dans le cas de l'alcool *tertio* amylique (ou 2-méthyl-2-butanol) la conversion d'acide gras est d'environ 78 %. Un blanc était réalisé dans les mêmes conditions sans enzyme.

La purification des produits obtenus sera décrite plus loin (point 3.4).

Nous présentons ici l'optimisation de certains paramètres, tels que le temps de réaction, la longueur de chaîne, *etc.* afin d'avoir les meilleures conditions pour cette réaction.

#### 3.3.1. Influence du temps de réaction

Le premier paramètre que nous avons étudié est le temps de réaction. Pour cela, nous avons mesuré le taux de conversion de l'acide laurique à différents intervalles de temps (figure 2). Le graphe obtenu montre que l'on tend vers un plateau maximum vers 80 %. L'augmentation de la conversion n'est que de 8 % (passant de 70 à 78 %) entre la 24<sup>ème</sup> et la 72<sup>ème</sup> heures ; il nous semble donc qu'un temps de réaction de 48 heures est un bon compromis (taux de conversion 76 %).

La courbe peut être ajustée par une corrélation hyperbolique (équation (2) avec un écart-type S de 1,51 [19; 20]).

$$\text{Conversion (\%)} = (3,31078 + 21,01813 \text{ Temps (h)}) / (1 + 0,25507 \text{ Temps (h)}) \quad (2)$$

La comparaison avec les valeurs trouvées dans la littérature se trouvent au point suivant. Dans tous les cas, nos valeurs sont supérieures à celles de Soultani et Sadeber mais légèrement inférieure à celle de Sin, qui est une transestérification sans production d'eau comme sous-produit.

### 3.3.2. Influence du solvant

Bien que dans la littérature de nombreux solvants de réaction sont cités (l'acétone [2; 8], le 2-méthyl-2-butanol [2; 3; 7; 10; 13; 14], le *tertio* butanol [2; 9], l'éthyl méthyl cétone [2], le *n*-hexane [9] et la pyridine [16]), peu de données concernent la conversion de l'acide laurique. A notre connaissance seuls Soultani *et al.* annoncent une conversion de 57,5 % dans le 2-méthyl-2-butanol sans donner de temps de réaction [3], Sabeder *et al.* donnent dans le même solvant un taux de conversion de 55 % après 72 heures [2], Sin *et al.* donnent un taux de consommation du fructose par transestérification dans la pyridine de 86 % après trois jours [16] (ou 90 % en 7 jours [15]) et Arcos *et al.* indiquent un taux de conversion de 55 ou 100 % en 72 heures dans l'acétone [8].

Dans nos conditions expérimentales, à 48 heures, nous obtenons un taux de conversion de l'acide laurique de 76 % dans le 2-méthyl-2-butanol, de 74 % dans le *tertio* butanol et seulement de 12 % dans le *n*-hexane. Sabeder obtient des taux de conversion proche dans le 2-méthyl-2-butanol et le *tertio* butanol pour la synthèse du palmitate de fructose [2]. Comme le 2-méthyl-2-butanol est non toxique et utilisable comme solvant alimentaire capable de solubiliser partiellement les sucres et dont les produits de la réaction ne cristallisent pas immédiatement [2], c'est ce solvant qui fut choisi pour la suite de ce travail.

Dans cette partie, l'analyse de la composition des produits obtenus a montré que dans le 2-méthyl-2-butanol 24,7 % de monolaurate de fructose et 11,0 % de polylaurates ont été trouvés. Une composition similaire a été trouvée dans le *tertio* butanol (respectivement 24,3 % et 9,8 % pour le mono et les polylaurates), alors que dans le *n*-hexane seuls 2,6 % de polylaurates ont été détectés.

### 3.3.3. Influence de la longueur de chaîne de l'acide

L'influence de la longueur de chaîne de l'acide gras n'a qu'un impact limité sur le taux de conversion. Celui-ci étant respectivement de 76, 73,6 et 73,3 % pour l'acide laurique (C12), l'acide palmitique (C16) et l'acide caprique (C10). Nos résultats sont en accord avec ceux de Scheckermann lequel observe une faible variation du taux de conversion, même s'il note que le taux de conversion est inversement proportionnel avec la longueur de chaîne [14]. Par contre Soultani obtient de meilleurs taux de conversion des acides gras avec des acides gras à longue chaîne [3]. Ces résultats confirment que la lipase de *C. antarctica* est plus spécifique avec les acides gras à longue chaîne. Une explication pourrait être que les courtes et moyennes chaînes d'acide gras (C8-C14) sont relativement plus polaires, ce qui entraînerait un bas taux d'élimination de l'eau pendant la synthèse [3].

### 3.3.4. Influence du ration fructose/acide laurique

Par contre, le ratio molaire fructose:acide laurique a une plus grande influence sur la conversion. En effet plus la quantité d'acide est élevée moins la conversion est importante allant de 76 % pour un ratio 1:1 à seulement 33,6 % pour un ratio 1:5 en passant par 59,0 % pour un ratio 1:2. Nos résultats sont en accord avec ceux de Soutani [3]. Se basant sur le taux de conversion du sucre, Arcos [8] dans l'acétone, a trouvé que le taux de conversion est plus élevé dans les cas d'un ratio 1:3 et 1:5 (100 %) que pour un ratio de 1:1 (55 %). Ces résultats sont également en accord avec ceux de Sekeroglu [4]. Dans notre situation, la lipase de *C. antarctica* est probablement inhibée par le donneur d'acyle ou bien par une limitation de la concentration en fructose dans le milieu, ce qui concorderait avec les travaux de Soutani *et al.* [3].

### 3.3.5. Influence de la teneur initiale en eau [28]

Le dernier paramètre qui a été étudié est la quantité initiale d'eau dans le milieu réactionnel. Le pourcentage d'eau a été déterminé par la méthode de Karl Fisher.

Six expériences ont été réalisées: la première en présence de tamis moléculaire, la deuxième en l'absence de tamis moléculaire et enfin en ajoutant 50, 100, 150 et 200 µl d'eau au début de la réaction, ce qui donne respectivement 0,02 %, 0,21 %, 0,42 %, 0,61 %, 0,80 % et 0,96 % d'eau dans le milieu après 48 h de réaction (tableau I). La teneur en eau influence grandement le taux de conversion, celui-ci passe de 72 % pour 0,02 % d'eau à 4,5 % à 0,96 % d'eau (figure 3 et tableau I). En l'absence de tamis moléculaire mais sans ajout d'eau (ce qui correspond à 0,21 %), le rendement est alors de 21 %. Chamouveau observe le même phénomène pour la synthèse du palmitate de fructose [6] et Yoo aussi pour l'oléate de xylitol [26]. Il est possible de modéliser la courbe obtenue. Celle-ci suit en effet une loi

en puissance à 3 paramètres d'Herschel-Bulkley (équation (3) et figure 3), déterminée par le module Two variables statistic Version 1.31 [20] qui fait parti du programme Gabriel Data Analysis [19].

En 1993, Akoh [29] publie les résultats de l'incorporation d'acide oléique au cours de la transestérification de glucoside de méthyle par l'oléate de méthyle dans le benzène/pyridine catalysée par la lipase de *Candida sp.* (SP382) lorsque de l'eau est ajoutée. Plus récemment, les mêmes informations ont été publiées par Chamouleau *et al.* lors de l'estérification du fructose par l'acide palmitique en 2-méthyl-2-butanol catalysée par la Novozym 435, l'incorporation de l'eau dans le milieu réactionnel étant réalisée par utilisation d'atmosphères de solutions salines saturées [6]. D'autre part, en 2007, Yoo contrôlait la teneur en eau par l'addition de différentes quantités de tamis moléculaires lors de l'estérification du xylitol par l'acide oléique [26].

La modélisation de courbes de points expérimentaux est importante pour les procès industriels. Pour cela, il a semblé important de modéliser aussi les travaux de Chamouleau et d'Akoh. La modélisation a fait appel au module Two variables statistic Version 1.31 [20] du programme Gabriel Data Analysis [19]. Comme la réaction de Chamouleau est la même que la nôtre (estérification), l'équation de la conversion en fonction de la teneur initiale en eau peut être décrite par la même équation de loi en puissance à 3 paramètres (équation (4) et figure 3).

Comme la réaction d'Akoh est différente, puisqu'il s'agit d'une transestérification le meilleur modèle correspond à une loi exponentielle donnée à l'équation (5) et à la figure 3.

$$\text{Conversion}(\%) = 3,68625 + 0,80315 \times \text{TeneurInitialeEnEau}^{-1,61746} ; r = -0,9992 \quad (3)$$

$$\text{Conversion}(\%) = 0,48347 + 0,82710 \times \text{TeneurInitialeEnEau}^{-1,31602} ; r = -0,9844 \quad (4)$$

$$\text{Conversion}(\%) = 73,48444 \times 0,16330^{\text{TeneurInitialeEnEau}} ; r = -0,99326 \quad (5)$$

En comparant les coefficients de l'équation de notre étude à ceux déterminés à partir des résultats de l'étude de Chamouleau, il est possible de conclure que le premier coefficient est en relation avec les conditions expérimentales si l'eau n'est pas présente et que le troisième coefficient (l'exposant) correspond au « pouvoir d'action » de l'eau (pour faire décroître le taux de conversion). Dans ce cas, le premier coefficient indique que nos conditions sont meilleures que celles des travaux de Chamouleau, mais le troisième terme montre **clairement** que la diminution du taux de conversion est plus forte dans nos conditions que dans les conditions de Chamouleau, ceci étant dû au fait que nous introduisons l'eau directement dans le milieu réactionnel contrairement à Chamouleau qui agit avec des conditions plus douce par diffusion en utilisant une atmosphère de solutions saturées en sels.

Par ailleurs, l'étude quantitative par HPLC montre que la concentration en produits formés est différente (figure S 3 et figure 1) en fonction de la teneur en eau. La synthèse de polyesters diminue de 30,7% à 1,4%, respectivement avec des tamis moléculaires jusqu'à l'addition de 50 µl d'eau (0,14 à 0,27 % de teneur en eau initiale). Un résultat similaire dans l'acétone avec de l'acide oléique a été trouvé par Arcos *et al.* [8]. Selon Chamouleau, la perte de la sélectivité de l'enzyme est due à la réduction de la couche d'hydratation des protéines ; le manque d'eau proche de l'enzyme augmentant l'hydrophobie de l'environnement et donc une diminution de la solubilité du fructose. Dans ces conditions, le monoester devient un meilleur substrat que le fructose [6]. Contrairement à nous, Chamouleau rapporte les cinétiques pour deux points seulement, avec et sans tamis moléculaires, alors que rapportons ici une étude complète de l'addition de plusieurs quantités d'eau (voir tableau I et figure S 3).

Il est impossible de conclure si le phénomène de diminution de la synthèse des polyesters est le même avec une quantité d'eau ajoutée supérieure à 50 µl. En terme de cinétique, la synthèse des polyesters est le carré de la vitesse de la synthèse du monoester. Or le taux de conversion diminue avec l'ajout d'eau, la détection des polyesters par HPLC n'étant plus assurée (figure S 3).

Dans les mêmes conditions, quelque soit la quantité d'eau dans la milieu, la lipase de *Candida antarctica* ne produit que des monoesters avec le glucose comme sucre au lieu de fructose (données non montrées).

### 3.4. Purification des esters

Le mélange réactionnel est d'abord filtré pour récupérer l'enzyme et le tamis moléculaire. Le filtrat est alors dilué par de l'eau puis extrait par du dichlorométhane. La phase organique est évaporée sous vide et les produits de la synthèse sont repris soit par du chloroforme (méthode 1), soit par du dichlorométane (méthode 2).

La première séparation (méthode 1) a été réalisée par colonne chromatographique préparative, dont le système de solvant est basé sur le chloroforme, d'abord pur, puis un mélange chloroforme/méthanol (90/10, v/v) et pour finir par un mélange chloroforme/méthanol/eau (64/10/1, v/v/v). Les esters obtenus ont alors été utilisés comme témoins pour l'analyse HPLC et ont servi à l'établissement de droite d'étalonnage mais aussi à la caractérisation physico-chimique. La pureté des esters a été contrôlée par HPLC (voir 3.2.3) et est supérieure dans tous les cas à 99 % (figure S 4). Dans la littérature, plusieurs hypothèses sont données pour expliquer les deux pics visibles à la figure S 4 (a) dans le cas du monolaurate de fructose: pour Arcos [8], Chamouveau [6] et Soultani [3], il pourrait s'agir soit des anomères  $\alpha$  et  $\beta$ , soit d'une acylation en 1 et en 6, tandis que pour Scheckermann [14] et Coulon [30], il s'agirait plutôt des formes furanose et pyranose du fructose.

Le deuxième version (méthode 2) est basée sur le gradient d'un mélange dichlorométhane et éthanol, passant d'une fraction 19/1 v/v à une fraction 17/3 v/v. Dans ce cas la pureté des produits fut contrôlée par CCM.

### 3.5. Résultats sur les propriétés interfaciales

#### 3.5.1. Propriétés de surface

Cette étape est la plus importante pour la caractérisation des propriétés intrinsèques des molécules synthétisées. En effet, celles-ci gouvernent les propriétés technofonctionnelles (propriétés moussantes, émulsionnantes - voir 3.5.3). De plus, ce type de mesures met en œuvre de faibles quantités.

Nous avons en premier déterminé la tension de surface du mono et du polylaurate de fructose à 60 g.l<sup>-1</sup>. A la lecture du tableau II, nous constatons alors que le monolaurate de fructose est plus actif que le polylaurate.

Dans la littérature, différentes valeurs de CMC ont été trouvées pour le laurate de fructose. Il y a parfois un facteur dix entre elles:  $2,8.10^{-4}$  M pour Scheckermann *et al.* [14] à  $2,76.10^{-5}$  M pour Sin [15] en passant par  $7,20.10^{-5}$  M pour Sekeroglu [4]. Il nous a semblé opportun alors de déterminer cette valeur. Pour le monolaurate de fructose, il a été obtenu une valeur de  $8.10^{-5}$  M (soit 29 mg.l<sup>-1</sup>) et un  $\gamma = 32,18$  mN.m<sup>-1</sup> (figure 4 (a)).

La figure 4 (b) montre qu'il n'est pas possible de déterminer la CMC du polylaurate de fructose. Après d'autres essais, nous nous sommes rendus compte d'une solubilité limitée (*vide infra*).

Lors de l'étude à 60 g.l<sup>-1</sup>, il avait été constaté qu'il est difficile de dissoudre complètement le polylaurate de fructose. Afin de voir son influence, une étude sur une solution de polylaurate pur à 1 % a été entreprise aussi bien sur des solutions brutes et sur des solutions filtrées et les résultats sont présentés au tableau II. Une variation de presque 20 % est constatée entre la solution non filtrée et la

solution filtrée et aussi que la nouvelle tension de surface est nettement supérieure à la valeur trouvée dans l'étude à 60 g.l<sup>-1</sup> (voir tableau II).

La figure 4 (c) montre qu'il n'est toujours pas possible, malgré la dilution et la filtration, de déterminer la CMC du polylaurate de fructose.

Un des buts de cette étude est aussi l'utilisation des bruts réactionnels à des fins industrielles. Pour cela le mélange réactionnel, débarrassé du fructose et de l'acide laurique n'ayant pas réagi, a été l'objet de travaux, dont les résultats sont présentés au tableau II et à la figure 4 (d). Le mélange "naturel" a une CMC de 27 mg.l<sup>-1</sup> avec  $\gamma_{\text{CMC}} = 28,55 \text{ mN.m}^{-1}$ . En comparant ces résultats avec ceux du monolaurate de fructose, il est constaté que les valeurs obtenues sont proches: comme le polylaurate est peu soluble, les résultats sont dus au monolaurate qui est soluble totalement.

Comme, il peut être intéressant industriellement d'obtenir de nouvelle caractéristique, la détermination de la CMC d'un mélange "artificiel reconstitué" (qui consiste à prendre du monolaurate et du polylaurate de fructose pur et à les mélanger) 50/50 a donné 41 mg.l<sup>-1</sup> avec un  $\gamma_{\text{CMC}} = 28,64 \text{ mN.m}^{-1}$  (figure 4 (e)).

### 3.5.2. DSC

Pour avoir une meilleure connaissance des molécules mais aussi pour pouvoir éventuellement poser les bases d'une purification par une méthode douce comme la (re)cristallisation, de la DSC (ou ACD) a été utilisée dont les thermogrammes sont présentés à la figure 5.

Le thermogramme obtenu pour le monolaurate présente deux pics exothermiques. Le premier entre 55 et 80 °C correspond vraisemblablement à une transition à l'état de cristaux liquides. Le second peu avant 150 °C correspond à la fusion totale et l'obtention d'un liquide anisotrope.

Le polylaurate ne semble pas présenter d'organisation en cristaux liquides.

Dans les deux cas, les conditions de préparation (quantité d'eau ajoutée avant lyophilisation) ont peu d'impact sur l'allure des thermogrammes mais occasionnent un léger "shift" des valeurs de température.

### 3.5.3. Propriétés technofonctionnelles

Elles correspondent aux propriétés moussantes et émulsionnantes. Seuls des tests orientatifs ont été réalisés et ont pu mettre en évidence que le laurate de fructose est peu moussant.

Grâce au "Group Number" de Davies [31], nous avons calculé la Balance Hydrophile-Lipophile (HLB). Le HLB calculé pour le laurate de fructose est de 8,8 soit émulsionnant huile dans eau, agent mouillant, légèrement soluble dans l'eau (ni hydrophile, ni lipophile) et peu moussant.

## 4. CONCLUSION

Grâce à la littérature nous savions que la synthèse enzymatique à partir du fructose était possible. Nous avons néanmoins repris un certain nombre de paramètres afin d'optimiser les conditions opératoires, ceci dans une démarche plus industrielle. Nos conditions expérimentales sont maintenant supérieures à celles de la littérature et nos rendements en esters le montrent: nous obtenons 78 % de laurate de fructose où le meilleur de la littérature (Soultani) annonce 57 %. De plus nous avons passé en revue

différents paramètres tels que le temps de réaction, l'influence de la longueur de chaîne de l'acide gras, le solvant, *etc.* et la réaction est bien maîtrisée maintenant.

De nombreuses difficultés d'ordre analytique ont été résolues et nous avons développé des méthodes rapides (basées sur différentes conditions CCM en fonction des informations désirées), des méthodes précises (basées sur l'HPLC) et plusieurs méthodes de purification.

### **Remerciements:**

Ce travail a reçu le soutien financier de la Direction Générale de L'Agriculture de la région Wallonne (n° D31 / 1143). Ce travail est dédié à Monsieur Benoit Dispa, Bourgmestre de Gembloux.

### **Bibliographie**

- [1] G. Sekeroglu, S. Fadiloglu, E. Ibanoglu, Turkish J. Eng. and Env. Sci. 28 (2004) 241-247.
- [2] S. Sabeder, M. Habulin, Z. Knez, J. Food Eng. 77 (2006) 880-886.
- [3] S. Sultani, J.-M. Engasser, M. Ghoul, J. Mol. Catal. B - Enzymatic 11 (2001) 725-731.
- [4] G. Sekeroglu, S. Fadiloglu, E. Ibanoglu, J. Sci. Food Agric. 82 (2002) 1516-1522.
- [5] S. Piccicuto, C. Blecker, J.-C. Brohée, A. Mbampara, G. Lognay, C. Deroanne, M. Paquot, M. Marlier, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (2001) 209-219.
- [6] F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, J. Mol. Catal. B - Enzymatic 11 (2001) 949-954.
- [7] D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, Process Biochem. 34 (1999) 913-918.
- [8] J. A. Arcos, M. Bernabé, C. Otero, Enzyme Microbial Technol. 22 (1998) 27-35.
- [9] N. Spiliotis, E. Voutsas, K. Magoulas, D. Tassios, Sep. Purif. Technol. 19 (2000) 229-236.
- [10] D. Coulon, M. Girardin, J.-M. Engasser, M. Ghoul, Ind. Crop. Prod. 6 (1997) 375-381.
- [11] R. Gulati, P. Arya, B. Malhotra, A. K. Prasad, R. K. Saxena, J. Kumar, A. C. Watterson, V. S. Parmar, Arkivoc iii (2003) 159-170.

- [12] W. A. M. Alloue, M. Aguedo, J. Destain, H. Ghalfi, C. Blecker, J.-P. Wathelet, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 (2008) 57-68.
- [13] D. Coulon, A. Ismail, M. Girardin, B. Rovel, M. Ghoul, *J. Biotechn.* 51 (1996) 115-121.
- [14] C. Scheckermann, A. Schlotterbeck, M. Schmidt, V. Wray, S. Lang, *Enzyme Microbial Technol.* 17 (1995) 157-162.
- [15] Y.-M. Sin, S.-H. Chung, J.-Y. Park, T. H. Lee, *Biotechnol. Lett.* 18 (1996) 689-694.
- [16] Y. M. Sin, K. W. Cho, T. H. Lee, *Biotechnol. Lett.* 20 (1998) 91-94.
- [17] N. S. Neta, A. M. Peres, J. A. Teixeira, L. i. R. Rodrigues, *New Biotechnology* 28 (2011) 349-355.
- [18] G. Olive, *One variable statistic Module*, 2010, V 1.05.
- [19] G. Olive, *Gabriel Data Analysis*, 2011, V 1.16 Build 4.7c.
- [20] G. Olive, *Two variables statistic Module*, 2011, V 1.31.
- [21] S. N. Ronkart, M. Paquot, C. Fougnyes, C. Deroanne, J.-C. Van Herck, C. Blecker, *Talanta* 70 (2006) 1006-1010.
- [22] G. Olive, *TVT Analyze Module*, 2009, V 1.05.
- [23] C. Blecker, *Bull. Rech. Agron. Gembloux* 28 (1993) 51-85.
- [24] F. J. Plou, M. A. Cruces, M. F. Ferrer, G., E. B. Pastor, M., M. C. Christensen, F., J. L. Parra, A. Ballesteros, *J. Biotechn.* 96 (2002) 55-66.
- [25] N. R. Pedersen, J. B. Kristensen, B. G., R. B.J., D. R., K. L. Larsen, L. H. Pedersen, *Tetrahedron: Asymmetry* 16 (2005) 615-622.
- [26] I. S. Yoo, S. J. Park, H. H. Yoon, *J. Ind. Eng. Chem.* 13 (2007) 1-6.
- [27] E. Castillo, F. Pezzotti, A. Navarro, A. López-Munguía, *J. Biotechn.* 102 (2003) 251-259.
- [28] G. Olive, G. A. Pompeu Torezan, C. Blecker, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 81 (2012) 82-89.
- [29] L. N. Mutua, C. C. Akoh, *Journal of the American Oil Chemists Society* 70 (1993) 43-46.
- [30] D. Coulon, M. Girardin, B. Rovel, M. Ghoul, *Biotechnol. Lett.* 17 (1995) 183-186.

- [31] Z. E. Proverbio, S. M. Bardavid, E. L. Arancibia, P. C. Schulz, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects 214 (2003) 167-171.

## Captions

**Tableau I** Taux de conversion et ratio polyester sur monester en fonction de la teneur en eau.

**Tableau II** Tension de surface des surfactants synthétisés.

**Tableau III** Tension de surface des surfactants synthétisés, à 60 g.l<sup>-1</sup>.

**Tableau IV** Tension de surface des surfactants synthétisés sur solution non filtrée et filtrée.

**Figure 1** Chromatogramme sur couche mince de la réaction d'estérification du fructose par l'acide laurique (a) avec tamis moléculaire (0,05 % d'eau), (b) sans tamis moléculaire (0,23 % d'eau ) et (c) avec addition d'eau (1,30 % d'eau). Sur chaque plaque de gauche à droite nous avons les dépôts suivants: fructose, monolaurate de fructose authentique, polylaurate de fructose, brut réactionnel, blanc réactionnel.

**Figure 2** Cinétique de la réaction enzymatique entre le fructose et l'acide laurique (X: temps (h), Y:conversion molaire de l'acide laurique (%)).

**Figure 3** Taux de conversion en fonction de la teneur initiale en eau (notre étude et celle de Chamouleau [6]) ou de la quantité d'eau ajoutée (étude de Akoh [29]).

**Figure 4** (a) détermination de la CMC du monolaurate de fructose, (b) détermination de la CMC du polylaurate de fructose, (c) détermination de la CMC du polylaurate de fructose à partir d'une solution filtrée et diluée, (d) détermination de la CMC sur un mélange réactionnel et (e) détermination de la CMC sur un mélange de monolaurate et polylaurate de fructose 50/50.

**Figure 5** DSC (a) monolaurate de fructofuranosyle. (b) polylaurate de fructofuranosyle.

**Figure a** Chromatogramme sur couche mince de la réaction d'estérification du fructose par acide laurique en grosse quantité (Eluant: dichlorométhane/éthanol, 19/1 v/v).

**Tableau I** Taux de conversion et ratio polyester sur monoester en fonction de la teneur en eau.

|                     | Avec tamis             | Sans tamis               | Avec de l'eau ajoutée    |                          |                        |                        |
|---------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
|                     | moléculaire            | moléculaire              | 50 µl                    | 100 µl                   | 150 µl                 | 200 µl                 |
| Teneur en eau       | 0,14±0,01 <sup>*</sup> | 0,150±0,005 <sup>*</sup> | 0,27±0,02 <sup>*</sup>   | 0,434±0,006 <sup>*</sup> | 0,65±0,04 <sup>*</sup> | 0,87±0,02 <sup>*</sup> |
| (%)                 | 0,02±0,01 <sup>†</sup> | 0,207±0,006 <sup>†</sup> | 0,424±0,009 <sup>†</sup> | 0,608±0,004 <sup>†</sup> | 0,80±0,02 <sup>†</sup> | 0,96±0,02 <sup>†</sup> |
| Taux de conversion  | 72±6                   | 21±3                     | 10,1±0,8                 | 7,2±0,8                  | 5,3±0,7                | 4,5±0,9                |
| (%) <sup>‡</sup>    |                        |                          |                          |                          |                        |                        |
| Polyester/monoester | 30,2/69,8              | 2,6/97,4                 | 1,4/98,6                 | nd/-                     | nd/-                   | nd/-                   |
| (%/%) <sup>¶</sup>  |                        |                          |                          |                          |                        |                        |

<sup>\*</sup> Teneur initiale en eau déterminée par la méthode de Karl Fisher. Les résultats sont la moyenne de deux réactions différentes et de six données au total.

<sup>†</sup> Teneur en eau après 48 h de réaction déterminée par la méthode de Karl Fisher. Les résultats sont la moyenne de deux réactions différentes et de six données au total.

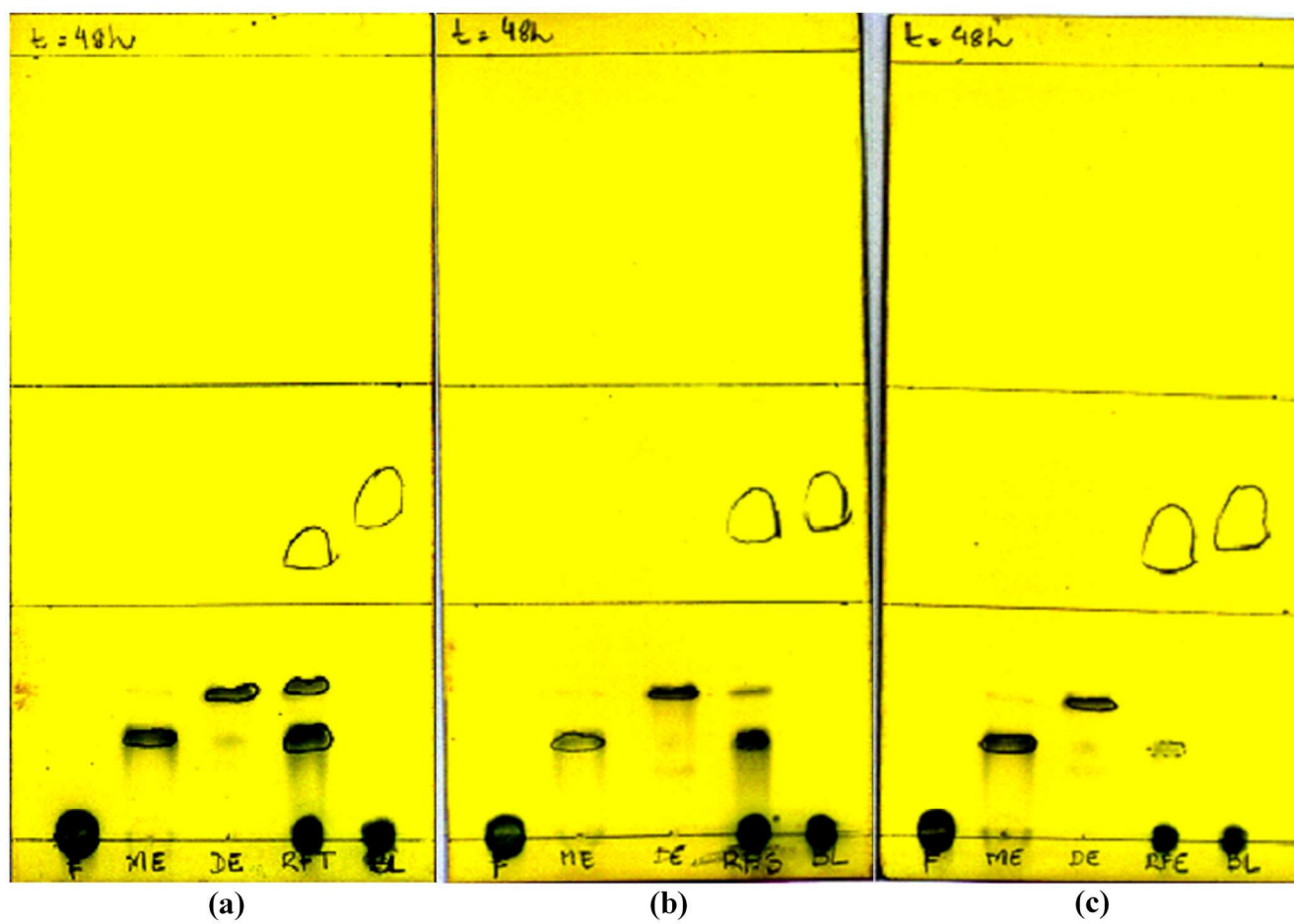
<sup>‡</sup> Basée sur la conversion de l'acide laurique après 48 h. . Les résultats sont la moyenne de deux réactions différentes et de quatre données au total.

<sup>¶</sup> Déterminée par HPLC - Deux répétitions - Voir figure S 3. (nd: non détectable)

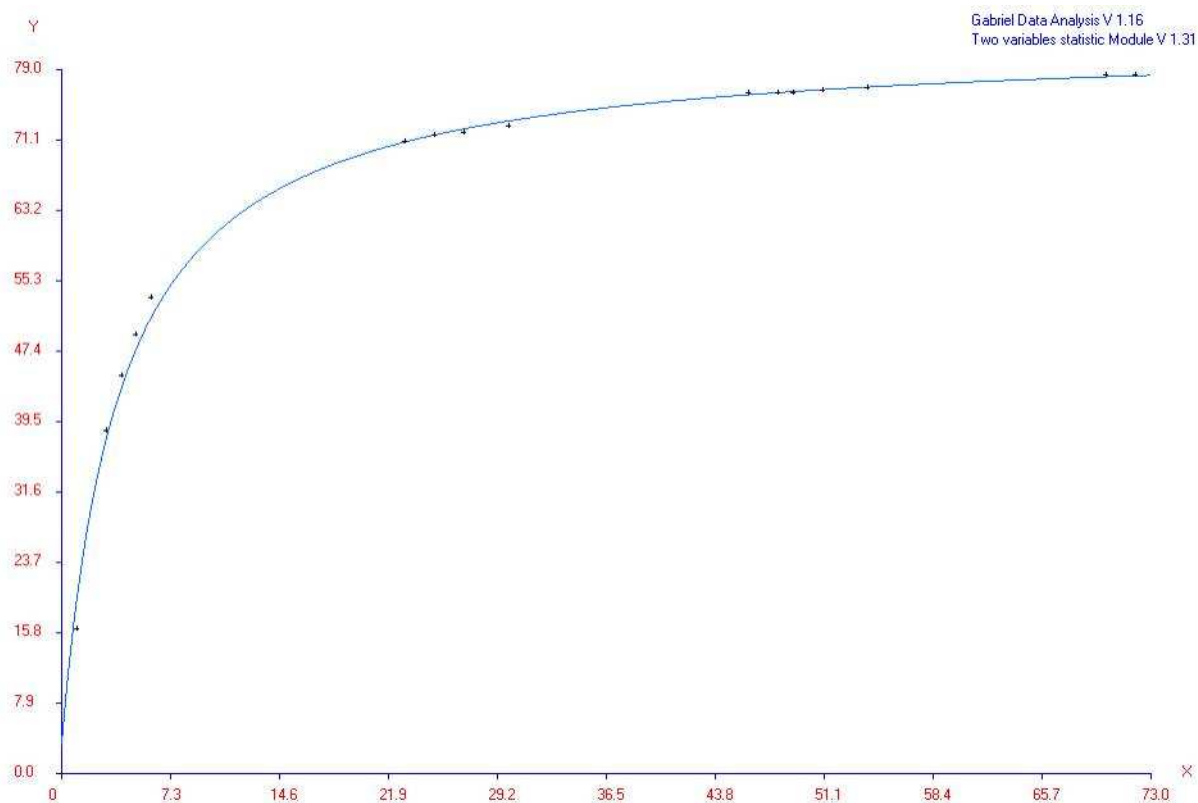
**Tableau II** Tension de surface des surfactants synthétisés.

|                                       | Tension de surface<br>de solution à<br>60 g.l <sup>-1</sup><br>(mN.m <sup>-1</sup> ) | Tension de surface<br>de solution <u>Non</u><br>filtrée 1 %<br>(mN.m <sup>-1</sup> ) | Tension de surface<br>de solution filtrée 1<br>%<br>(mN.m <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| monolaurate de fructose               | 26,3 ± 0,3                                                                           |                                                                                      |                                                                           |
| polylaurate de fructose               | 32,5 ± 0,2                                                                           | 40,8                                                                                 | 46,7                                                                      |
| monolaurate + polylaurate de fructose |                                                                                      | 28,4                                                                                 | 27,7                                                                      |

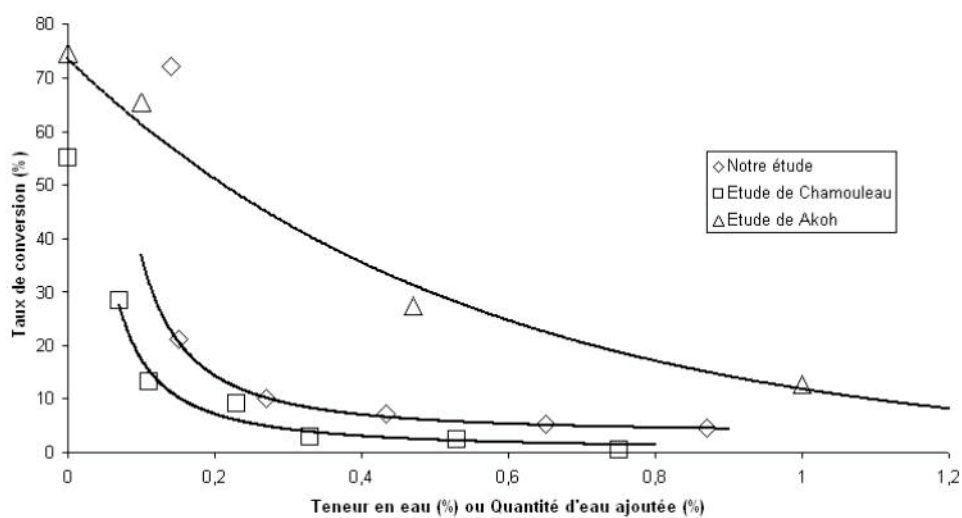
Figure 1



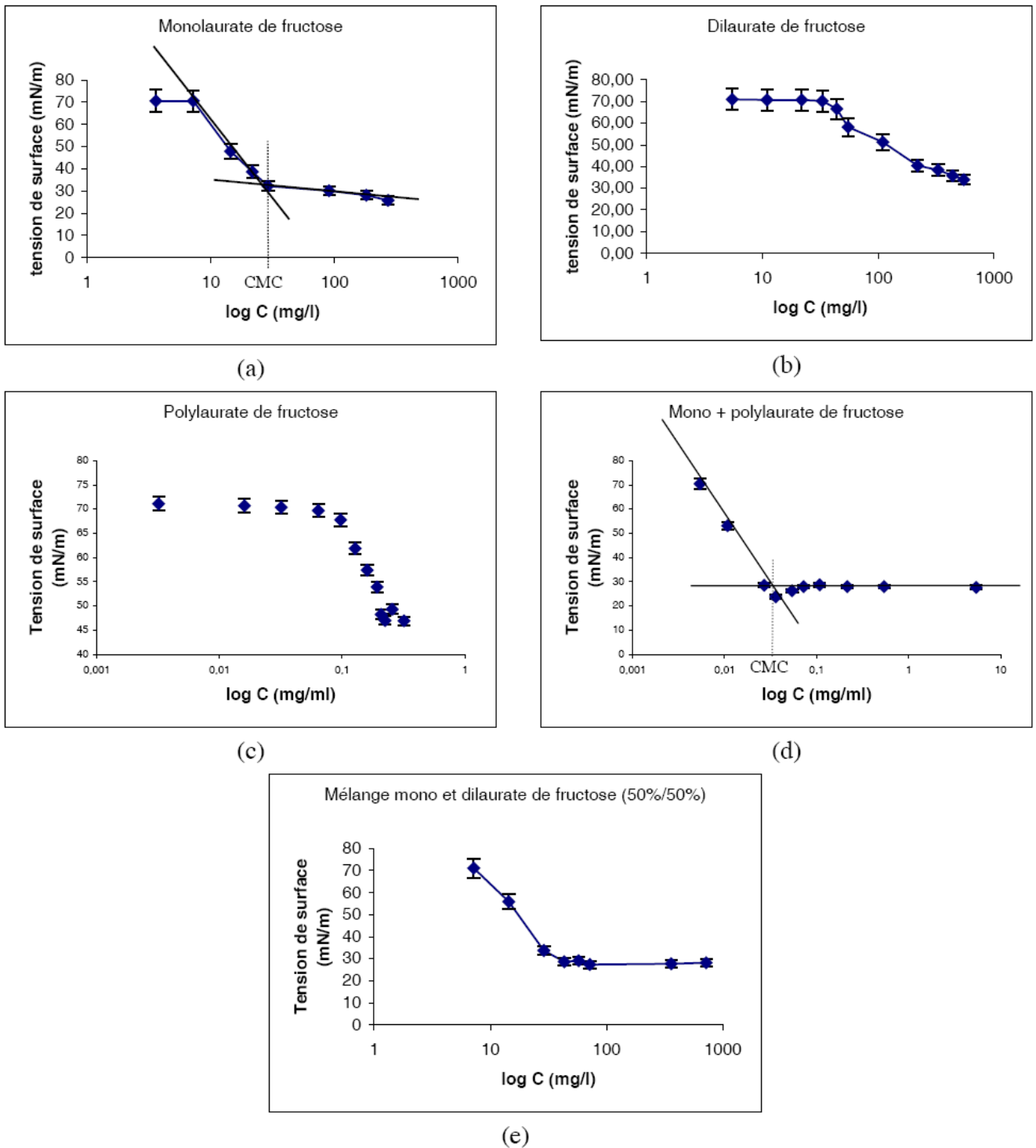
**Figure 2**



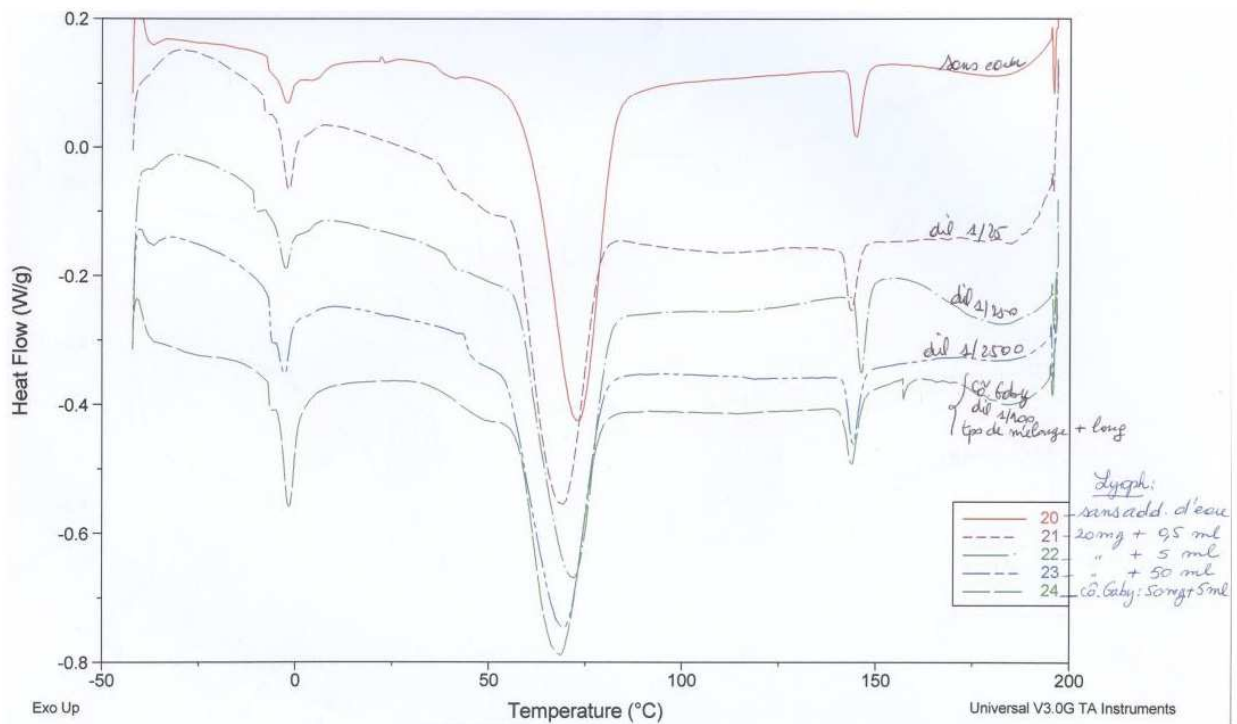
**Figure 3**



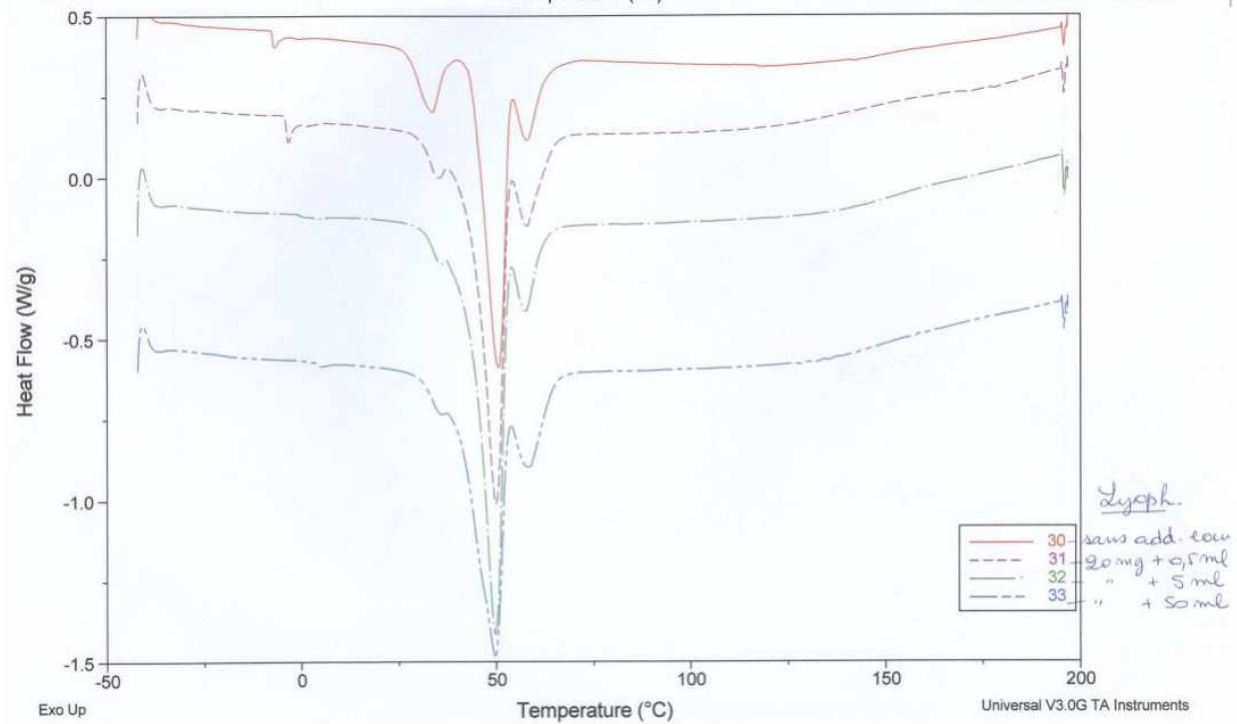
**Figure 4**



**Figure 5**



(a)



(b)

**Figure a**

