

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

BADJI MOKHTAR-ANNABA

UNIVERSITY

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
ANNABA



جامعة باجي مختار

-عناية-

Faculté des Sciences

Année : 2024/2025

Département de Chimie

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

*Synthèse, optimisation et caractérisation de bio-tensioactifs
à base de sucres*

Filière
Chimie

Spécialité
Chimie organique

Par

Mlle LOULOU Fatma

Directrice de thèse : *M^{me} Bidjou-Haiour Chahra* Professeur U.B.M. Annaba

Devant le jury

Présidente : *M^{me} Attoui-Yahia Ouassila* Professeur U. B.M. Annaba

Examineurs : *M^{me} Ali-Rachedi Fahima* Professeur U. Souk Ahras

M^{me} Bouguessa Sabrina Maître de conférences A. U. Tebessa

M^{me} Fedaoui Dalila Maître de conférences A. U.B.M. Annaba

DÉDICACE

Je dédie cette thèse à :

Mes parents :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, sa tendresse, pour toute son assistance, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils.

Mon père, qui n'a jamais cessé de m'encourager et de me soutenir pendant mon parcours.

A mes frères et sœurs et leurs époux

Et à tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

Ce travail est effectué au laboratoire de synthèse Organique, Modélisation et Optimisation des Procédés chimiques (LOMOP), de l'Université d'Annaba, sous la direction de madame la Professeure **BIDJOU-HAIOUR Chahra**. J'aimerais lui exprimer ici toute ma gratitude en tant que Directrice du laboratoire et la remercier pour m'avoir dirigé tout au long de cette thèse. Je vous remercie pour la grande confiance, le soutiens et la disponibilité ainsi que pour votre temps et votre patience.

Je remercie chaleureusement les membres de jury qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour leur participation à l'évaluation de mon travail.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont à Madame la Professeure **ATTOUI-YAHIA Ouassila**, de Université d'Annaba, pour avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Je tiens à remercier également Madame la Professeure **ALI-RACHEDI Fahima** de l'Université de Souk-Ahras, qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examinatrice. Je lui adresse mes plus vifs remerciements.

J'exprime toute ma gratitude et mon profond respect à Madame le docteur **BOUGUESSA Sabrina**, Maitre de conférences de l'Université de Tebessa, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens à exprimer également mes remerciements les plus sincères à Madame le docteur **FEDDAOUI Dalila**, Maitre de conférences de l'Université d'Annaba, d'être parmi les examinatrices de ma thèse.

Mes remerciements sont aussi destinés à **Mme Chafai**, **Mlle Rahmani Karima** de laboratoire ELCHIFA. Je remercie chaleureusement **Mlle Nadjjet LEMOUARI**, ingénieure au CRAPC pour son aide et sa bienveillance.

« *La reconnaissance est la mémoire du cœur* » *J. Massieu*

Résumé

Le propos de ce manuscrit est de décrire la synthèse des bio-tensioactifs à base de sucres et d'acides gras ainsi que l'étude de leurs propriétés tensioactives et de leurs activités antibactériennes. Ces esters de sucres sont des tensioactifs amphiphiles, non ioniques intéressants en raison de leur grande biodégradabilité, biocompatibilité et leur faible toxicité. Leur origine verte répond également aux attentes des consommateurs pour des produits ayant un impact réduit sur l'environnement.

Nous avons choisi le xylose en raison de son abondance dans la nature après le glucose pour la synthèse enzymatique d'une série homologue d'esters 1-*O*-acyl xylose avec différentes longueurs de chaînes du donneur d'acyle (C14, C16, C20, C22). L'estérification est réalisée en une seule étape avec la lipase de *Candida antarctica* B. La meilleure conversion est obtenue avec l'acide béhénique (65,7%) qui montre l'influence de la longueur de chaîne sur le rendement de la réaction. La réutilisation de la CAL B dans la synthèse de ces composés a été évaluée en quatre cycles. Par la suite, nous avons étudié l'influence d'enzymes modifiées obtenues préalablement au laboratoire sur la réaction d'estérification d'une série d'esters du xylose (C14, C16, C22). Les résultats montrent que la CAL B donne la meilleure conversion.

Les propriétés tensioactives de ces produits indiquent une réduction importante de la tension de surface de l'eau et un excellent pouvoir émulsifiant qui dépasse 80% pour tous les produits testés. Le pouvoir moussant est aussi mesuré, les résultats ne sont pas importants en raison de la longueur de chaîne.

Les anomères de stéarate et de laurate du D-xylose ont été séparés pour étudier leurs propriétés tensioactives et leur activité antibactérienne. Ces produits ont donné une bonne activité antibactérienne contre certaines souches de Gram+ et Gram-. Afin de compléter notre travail, la réactivité de ces anomères a été étudiée par la modélisation moléculaire.

Une étude sur l'effet de la tête polaire sur les propriétés tensioactives d'esters de sucre est également envisagée avec le D-xylose et le L-rhamnose.

Mots clés : Bio-tensioactifs, estérification, 1-*O*-acyl xylose, propriétés tensioactives, modélisation moléculaire, activité antibactérienne, Gram, Gram-, L-rhamnose.

Abstract

The purpose of this manuscript is to describe the synthesis of sugar and fatty acid bio-surfactants, as well as the study of their surfactant properties and their antibacterial activities. These sugar esters are amphiphilic, non-ionic surfactants of interest due to their high biodegradability, biocompatibility and low toxicity. Their green origin also meets consumers' expectations for products with a reduced impact on the environment.

In the first part we chose xylose because of its abundance in nature, (It is the 2nd most abundant sugar after glucose) for enzymatic synthesis of a series of 1-O-acyl xylose esters with different lengths of acyl donor chains (C14, C16, C20, C22). The esterification is carried out in a single step with the lipase of *Candida antarctica* B. The best conversion is obtained by behenic acid (65.7%) which shows obviously the influence of chain length on the reaction yield. The reuse of CAL B in the synthesis of these compounds was evaluated in four cycles. Subsequently, we studied the influence of modified enzymes obtained previously in the laboratory on the esterification reaction of a series of xylose esters (C14, C16, C22). The results show that CAL B gives the best conversion.

The surface-active properties of these products indicate a significant reduction in water surface tension and good emulsifying power, which exceeds 80% for all tested products. The foaming power is also measured; the results are not important because of the length of the chain.

Xylose stearate and laurate anomers were separated to study their surfactant properties and antibacterial activity. It was founded that these products have a good antibacterial activity against some strains of Gram+ and Gram-. To complete our work, the reactivity of these anomers was studied by molecular modelling.

A study of the effect of polar head on surface activities of sugar esters was investigated with D-xylose and L-rhamnose

Keywords: bio-surfactant, enzymatic esterification, 1-O-acyl xylose, surfactant properties, molecular modelling, antibacterial activity, Gram+, Gram-, L-rhamnose.

الغرض من هذه المخطوطة هو وصف تصنيع المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية انطلاقاً من سكر و أحماض دهنية، ودراسة خصائصها الخافضة للتوتر السطحي بالإضافة إلى أنشطتها المضادة للبكتيريا. إسترات السكر هذه هي مواد خافضة للتوتر السطحي غير أيونية ذات أهمية نظراً لقابليتها العالية للتحلل الحيوي وتوافقها الحيوي وكذا انخفاض السمية. كما أن أصلها الأخضر يلبي توقعات المستهلكين بشأن المنتجات ذات تأثير منخفض على البيئة.

في الجزء الأول اخترنا الزيروز بسبب وفرة في الطبيعة، (وهو ثاني سكر الأكثر وفرة بعد الجلوكوز) للتصنيع الإنزيمي لسلسلة متشابهة من إسترات O-1-اسيل الزيروز بأطوال مختلفة من سلاسل المانحين للأسيل (C14 ، C16 ، C20 ، C22). يتم إجراء الاسترة في خطوة واحدة بوجود ليباز من *Candida antarctica* B. يتم الحصول على أفضل تحويل عن طريق حمض البيهينيك (65.7%) مما يدل بوضوح على تأثير طول السلسلة على مردود التفاعل. تم تقييم إعادة استخدام CAL B في تصنيع هذه المركبات في أربع دورات. بعد ذلك، درسنا تأثير الإنزيمات المعدلة مسبقاً في المخبر على تفاعل الاسترة لسلسلة من إسترات الزيروز (C14 ، C16 ، C22). تظهر النتائج أن ليباز CAL B يعطي أفضل تحويل.

تشير الخصائص النشطة لسطح هذه المنتجات إلى انخفاض كبير في التوتر السطحي للمياه وقوة الاستحلاب الجيدة، والتي تتجاوز 80% لجميع المنتجات المختبرة. تم أيضاً قياس قوة الرغوة، والنتائج ليست مهمة بسبب طول السلسلة. تم فصل أنومرات زيروز ستايرات وزيروز لورات لدراسة خصائصها الخافضة للتوتر السطحي والنشاط المضاد للبكتيريا. تتمتع هذه المنتجات بنشاط جيد مضاد للبكتيريا ضد بعض سلالات Gram + و-Gram. لإكمال عملنا، تمت دراسة تفاعلية هذه الأنوميرات عن طريق النمذجة الجزيئية.

اجريت دراسة على تأثير الجزء المحب للماء على الخصائص التوتر السطحي لاسترات السكر للزيروز والرامنوز.

الكلمات المفتاحية :

خافض للتوتر الحيوي، استرة إنزيمية، O-1-اسيل الزيروز ، خصائص المواد خافضة للتوتر السطحي، النمذجة الجزيئية، النشاط المضاد للبكتيريا، سلالات Gram + و-Gram. ال-رامنوز.

Sommaire

Dédicace	I
Remerciement	II
Résumé	III
Abstract	IV
ملخص	V
Liste des schémas	XI
Liste des figures	XIII
Liste des tableaux	XVII
Liste d'abréviations	XIX
Introduction générale	1

Partie I

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur les lipases.

Introduction	5
I. Structure des lipases	6
a. Le site actif des enzymes	7
b. L'activation interrassiale de lipase	9
II. Les différentes formes de lipases	10
III. La cinétique enzymatique.	12
1. Théorie du complexe stéréospécifique	12
2. Equation de Michaelis –Menten	13
3. Signification physique de K_M et K_{cat}	14
4. Le modèle cinétique Bi Bi ordonné (Réaction à deux substrats)	15
5. Le modèle cinétique interfacial	15
IV. Classification des lipases	18
1. Classification des lipases en fonction de la boucle « lid »	18
2. Classification de lipases selon leurs trous d'oxyanion	19
V. La régiosélectivité et la stéréosélectivité des lipases.	21
1. La régiosélectivité des lipases.	21
2. La stéréosélectivité des lipases.	21
3. La typo sélectivité ou acylosélectivité.	22
VI. Les réactions catalysées par la lipase.	22
VII. Mécanisme catalytique de la synthèse des esters par la lipase.	23
1. Mécanisme de la réaction d'estérification par la CAL B.	23
2. Mécanisme de la réaction de la transestérification par la CAL B.	24

Chapitre II : Aperçu sur les esters de sucres et d'acides gras.

Introduction	
I. Synthèse des esters de sucre et d'acide gras.	26

1. Synthèse par voie chimique.	26
a. Transestérification par un catalyseur alcalin.	26
b. Estérification en présence de n-BuLi.	29
c. Estérification par la réaction de Mitsunobu.	29
d. Estérification en utilisant des esters actifs.	31
2. Synthèse par voie enzymatique.	32
a. Effet de la nature de lipase.	36
b. Effet de la température.	40
c. Effet du solvant organique	41
d. Effet d l'activité de l'eau.	43
e. Effet de la longueur de chaîne d'agent acylant.	45
f. Effet du rapport molaire entre les substrats	47
II. Propriétés physico-chimiques des esters de sucres et d'acides gras	48
1. Mode d'action des tensioactifs	49
a. L'adsorption.	49
b. La formation de micelle	51
2. Les Modèles de solutions micellaires	51
a. Modèle de séparation de phase.	51
b. Le modèle d'action de masse.	52
2. La balance hydrophile-lipophile (HLB)	52
3. La tension de surface γ .	54
a. Mesure de la tension superficielle avec des tensiomètres de force.	56
i. La méthode de l'anneau Du Noüy.	56
ii. Méthode de la plaque Wilhelmy.	58
b. La méthode de la goutte pendante ou montante	59
c. Mesure de la tension de surface au moyen du poids des gouttes.	61
4. La concentration micellaire critique (CMC).	61
5. La concentration surfacique (l'excès de surface).	64
6. Aire de la molécule à l'interface (A).	64
7. Le paramètre d'empilement P	65
III. Propriétés bioactives des esters de sucre	66
1. Activité antitumorale	66
2. Activité antibactérienne.	67
3. L'activité antifongique.	69
IV. Applications des esters de sucres.	69
1. Application des esters de sucres et d'acide gras dans l'industrie alimentaire	69
2. Utilisation des esters de sucres comme détergents.	71
3. Utilisation des esters du sucre en cosmétique.	71
4. Applications pharmaceutiques.	71

Partie II

Chapitre I : Synthèse enzymatique de biotensioactifs à base du D-xylose

Introduction	74
I. Etude préliminaire	74
1. Synthèse du 1-O-hexadécanoyl-D-xylopyranose	74
2. Résultats et discussion	75
II. Optimisation de l'estérification du xylose par des acides gras, obtention de nouveaux tensioactifs	77

1. Résultats et discussion	78
a. Effet du rapport molaire entre les réactifs	78
b. Effet de longueur de chaîne	89
c. Effet des enzymes modifiées sur la réaction d'estérification du xylose par des acides gras	82
2. Réutilisation de la CAL B dans la réaction d'estérification du xylose par différents agents acylants.	85
3. Propriétés tensioactives des esters du xylose et d'acide gras	87
a. La balance hydrophobe-hydrophile HLB	87
b. Les propriétés tensioactives	89
4. Le pouvoir émulsifiant et moussant des esters du xylose	93
a. Le pouvoir émulsifiant et sa stabilité	93
b. Le pouvoir moussant et la stabilité de la mousse	94
Conclusion	96

Chapitre II. Séparation et évaluation des anomères du laurate et du stéarate du D-xylose.

Introduction	97
I. Séparation des anomères	97
a. Mécanisme d'acétylation	97
b. Mécanisme de désacétylation	98
II. Etude spectroscopique	98
a. Caractérisation des produits acétylés $\underline{1}\alpha'$, $\underline{1}\beta'$, $\underline{4}\alpha'$, $\underline{4}\beta'$	98
b. Caractérisation des anomères purs $\underline{1}\alpha$, $\underline{1}\beta$, $\underline{4}\alpha$, $\underline{4}\beta$	99
III. Propriétés tensioactives des anomères α et β des esters du sucre	101
IV. Le pouvoir émulsifiant des anomères séparés	101
1. Le pouvoir émulsifiant	102
2. Stabilité du pouvoir émulsifiant	102
V. Modélisation moléculaire des anomères	104
1. Résultats et discussion	104
a. Optimisation moléculaire des esters du xylose	104
b. Orbitales moléculaires frontières HOMO-LUMO et analyse de descripteurs de la réactivité globale	105
c. Potentiel électrostatique moléculaire par les bases : 6-31 G (d, p) et 6-31 G (d)	110
VI. Activité antibactérienne	111
1. Détermination de la zone d'inhibition	111
2. La concentration minimale inhibitrice	113
Conclusion	113

Chapitre III. Synthèse de 1-O-hexadécanoyl-L-rhamnopyranose. Effet de la tête polaire.

Introduction	115
I Synthèse de 1-O-hexadécanoyl- L-rhamnopyranose	115
II. Résultats et discussion	116
1. Effet de solvant sur la réaction d'estérification	116
a. Test de solubilité	116
b. Réactions en milieu solvant organique seul	117
2. Effet du Co-solvant	118
a. Solvant / DMSO: 1 ml / 0.1 ml	118

b. Solvant / DMSO: 1 ml / 50 µl	118
3. Influence de la quantité de l'enzyme	120
4. Influence du rapport molaire entre les substrats	121
III. Etude comparative des propriétés physico-chimiques	122
1. Propriétés tensioactives	122
2. Le pouvoir émulsifiant	124
Conclusion.	125

Chapitre IV. Partie expérimentale

I. Protocole général d'estérification du D-xylose	126
II. Détermination du taux de conversion	126
III. Appareillages et conditions générales	127
1. Analyse par Résonance magnétique nucléaire RMN	127
2. Analyse par infrarouge	127
III. Mesure de la tension de surface	127
IV. Mesure du pouvoir émulsifiant	127
V. Mesure du pouvoir moussant	131
VI. Activité antibactérienne	131
1. Préparation de l'inoculum	131
2. Détermination des diamètres de la zone d'inhibition (mm)	131
3. Mesure de la concentration minimale inhibitrice CMI.	132
VII. Modélisation moléculaire	132
VIII. Caractérisation des composés de synthèse	132
IX. Protocole général d'acétylation	141
X. Protocole général de désacétylation	141
1. Caractérisation produits acétylés	141
2. Caractérisation des anomères purs	149
XI. Estérification enzymatique du L-rhamnose	157
XII. Caractérisation du 1- <i>O</i> -hexadécanoyl-L-rhamnopyranose	157
Conclusion générale	160
Références bibliographiques	164
Annexe	176

Liste des schémas

PARTIE I

Chapitre I

Schéma 1. Repliement α/β de lipase, les flèches représentent les feuillettes β et les rectangles les hélices α	7
Schéma 2. A. lipase catalyse l'hydrolyse de triglycéride. B. lipase catalyse la transestérification en utilisant un acyle-accepteur	21
Schéma 3. Acylation Régiosélective de resveratrol catalysée par la lipase de CSL sous microonde	21
Schéma 4. Les réactions chimiques catalysées par les lipases	23
Schéma 5. Mécanisme catalytique de la réaction d'estérification par la lipase	24
Schéma 6. Mécanisme de la transestérification enzymatique par la lipase de <i>Candida antarctica</i> B type de	25

Chapitre II

Schéma 7. Transestérification de sucrose par un catalyseur alcalin	27
Schéma 8. Transestérification de raffinose sous l'irradiation ultrasonique par un catalyseur alcalin	27
Schéma 9. Synthèse de 2-O-lauryl saccharose	28
Schéma 10. Synthèse d'ester d'amidon d'acide gras.	28
Schéma 11. Transestérification de saccharose sans solvant.	29
Schéma 12. Estérification à l'aide du n-BuLi.	29
Schéma 13. Synthèse de palmitate de mélézitose	30
Schéma 14. Dérivés de raffinose obtenus de la réaction avec l'acide palmitique.	30
Schéma 15. Estérification du saccharose dans les conditions de Mitsunobu.	31
Schéma 16. Acylation de α -D-glucose et méthyle α -D-glucopyranoside	31
Schéma 17. Estérification de méthyl α -D-glucopyranoside.	32
Schéma 18. Influence de la nature du solvant	41
Schéma 19. (1) Estérification du méthylglucoside avec des acides gras, catalysée par Novozym 435 ; (2) transestérification du glucose avec des esters vinyliques d'acides gras, catalysés par Lipozyme TLIM	46
Schéma 20. Diagramme de l'angle de contact et la mesure de pouvoir mouillant	50

PARTIE II

Chapitre I

Schéma 21. Estérification enzymatique du D-Xylose par l'acide palmitique	74
Schéma 22. Estérification enzymatique du D-Xylose par des acides gras.	77

Chapitre II

Schéma 23 : Mécanisme d'acétylation de composés 1 et 4	97
Schéma 24 : Mécanisme de désacétylation des anomères (1α' , 1β' , 4α' , 4β')	98

Chapitre III

Schéma 25. Estérification enzymatique de l'L-(+)-rhamnose.	115
---	-----

Liste des figures

Partie I

Figure 1. Marché mondial des surfactants à base de sucre et leurs applications	1
Figure 2. Marché des surfactants à base de sucres entre 2020 et 2030	2
Figure 3. Les douze principes de la chimie verte	2

Chapitre I

Figure 4. Schémas du volet amphiphile d'une lipase	10
Figure 5. Surface moléculaire de deux états de conformation de la lipase <i>Candidae rugosa</i> de la même direction sous le site actif.	10
Figure 6 La variation de l'énergie de Gibbs	12
Figure 7. Schéma réactionnel selon le modèle ping pong Bi-Bi	15
Figure 8. Modèle cinétique interfacial d'après Verger et Hans 1973	16
Figure 9. Catalyse interfaciale selon le modèle « scooting hopping »	17
Figure 10. Illustration schématique de deux modes extrêmes de la catalyse interfaciale sur vésicules	18
Figure 11. Les trois types de lipase en fonction de volet « lid domain ».	19
Figure 12. Les trois types de tous oxyanion	20
Figure 13. Le type GX dans la lipase candida antarctica B	20

Chapitre II

Figure 14. Les différentes classes de tensioactifs.	26
Figure 15. Effet du type de lipase sur le rendement dans la réaction d'estérification de fructose	37
Figure 16. Effet de l'enzyme sur la réaction d'estérification de glucose	38
Figure 17. Conversions obtenues par différentes lipases pour catalyser la synthèse du laurate de glucose en 2M2B.	38
Figure 18. Formes de cinq types de site de liaisons de lipases comme identifiés par Pleiss & Fischer	39
Figure 19. La distribution spatiale de l'occupation de l'eau à la surface CALB calculée pour le CALB / MTBE (méthyl tert-butyl ether), systèmes aux activités de l'eau de (a) 0,18 ; (b) 0,26 ; (c) 0,33 ; (d) 0,47 et (e) 0,54 en moyenne sur la dernière 10 ns de chaque simulation.	44
Figure 20 : Variation de conversion avec la longueur de la chaîne des acides gras	47
Figure 21. Influence de différents rapports molaires sur le rendement de la synthèse de l'oléate de glucose. (Réaction catalysée par la CAL B)	48
Figure 22 Le phénomène d'adsorption et de la formation de micelle.	49
Figure 23. Classification des tensioactifs en fonction de leurs HLB.	54
Figure 24. Schéma des forces d'attraction entre les molécules dans un liquide.	55
Figure 25. Schéma de (a)l'anneau du Noüy (b) la plaque de Wilhelmy.	56
Figure 26. Procédure expérimentale de la méthode.	57
Figure 27. Changement schématique de la force mesurée pendant le processus d'une expérience de tensiomètre.	57
Figure 28. Illustration d'une plaque de Wilhelmy.	59
Figure 29. (a) goutte pendante (b) goutte montante.	60
Figure 30. (a)Courbure de la surface de la goutte (b) coordonnées d'un point M de la goutte	60
Figure 31. Montage du tensiomètre de la goutte pendante	60
Figure 32. Méthode stalagmométrie	61

Figure 33. Tension superficielle d'une solution de tensioactif à concentration croissante, formation de micelles.	62
Figure 34. Détermination de la CMC avec un tensiomètre	63
Figure 35. la tension de surface en fonction de la concentration de tensioactif dans la phase aqueuse. (a) Pour un tensioactif pur. (b) Pour un tensioactif contenant des impuretés	64
Figure 36. Représentation schématique d'un tensioactif et de l'espace qu'il occuperait dans un agrégat.	65
Figure 37. Effet du monocrate de saccharose sur la morphologie de <i>Bacillus cereus</i> (A, B), <i>Staphylococcus aureus</i> (C, D) et <i>Escherichia coli</i> (E, F). (A, C, E) non traité ; (B, D, F) traités avec monocrate de saccharose à une valeur de CMI pendant 6 h	69
Figure 38. Liaison hydrophobique entre la protéine et l'ester de saccharose.	70

PARTIE II

Chapitre I

Figure 39. Réaction cinétique la production de hexadécanoyl-1- <i>O</i> -D-xylopyranose	75
Figure 40. Effet du rapport entre les réactifs dans la réaction d'estérification du xylose par l'acide béhénique.	80
Figure 41. Effet de longueur de chaîne sur la conversion du xylose	81
Figure 42. Effet des enzymes modifiées sur la réaction d'estérification du xylose	85
Figure 43. Réutilisation de la lipase CAL B dans la réaction d'estérification du xylose par acide gras : a) acide hexanoïque ; b) acide dodécanoïque ; c) acide tétradécanoïque ; d) hexadécanoïque ; e) acide octadécanoïque ; f) acide eicosanoïque ; g) acide docosanoïque	86
Figure 44. Application de tensioactif en fonction de l'échelle de la HLB	88
Figure 45. Mesure de la tension de surface d'ester du xylose dans l'eau : x-14 : 1- <i>O</i> -tetradécanoyl-D-xylopyranose, xy-16 : 1- <i>O</i> -hexadécanoyl-D-xylopyranose, xy-20 : 1- <i>O</i> -eicosanoyl-D-xylopyranose, xy-22 : 1- <i>O</i> -docosanoyl-D-xylopyranose	
Figure 46. Forme des micelles en fonction de paramètre d'empilement.	90
Figure 47. Le pouvoir émulsifiant des esters du xylose	94
Figure 48. Stabilité d'émulsifiant	94
Figure 49. Le pouvoir moussant des esters du xylose	95
Figure 50. stabilité de la mousse	95

Chapitre II

Figure 51. Le pouvoir émulsifiant de solution d'esters du xylose (25 wt %) à 25 °C	102
Figure 52 : Stabilité d'émulsification de solutions aqueuses d'esters de xylose à 25 °C (0,25 % p/v).	104
Figure 53. (a) Structures géométriques des anomères 1α,1β optimisées avec la fonctionnelle B3LYP/6-31G (d). (b) Structures géométriques des anomères 4α,4β optimisées avec la fonctionnelle B3LYP/6-31G (d,p)	105
Figure 54. Diagramme énergétique de deux anomères de laurate de D- xylose obtenus avec l'ensemble des fonctions de base (3-21G et 6-31G(d))	108
Figure 55. Diagramme énergétique de deux anomères de stéarate de D- xylose obtenus avec l'ensemble des fonctions de base (3-21G et 6-31G (d, p))	109
Figure 56. a) Potentiel électrostatique moléculaire des anomères 4α,4β obtenu avec la méthode B3LYP/6-31G (d, p). b) Potentiel électrostatique moléculaire des anomères 1α,1β obtenu avec la méthode B3LYP/6-31G (d)	111

Chapitre III

Figure 57. Effet de solvants et Co-solvants sur la réaction d'estérification du rhamnose	119
Figure 58. Influence de la quantité de l'enzyme sur la conversion.	121
Figure 59. Influence du rapport molaire entre les substrats sur la conversion	122
Figure 60. Tension de surface de 1-O-hexadécanoyl-L-rhamnopyranose dans l'eau	123
Figure 61. Stabilité du pouvoir émulsifiant de palmitate de rhamnose et de palmitate de xylose	125

Chapitre IV

Figure 62. Le pouvoir émulsifiant des esters du xylose	128
Figure 63. Stabilité de l'émulsifiant des esters du xylose	128
Figure 64. Stabilité d'émulsifiant de produits anomères de 1-O- dodécanoyl -D- Xylopynose (0,25% p/v)	129
Figure 65. Stabilité d'émulsifiant de produits anomères de 1-O- Octadécanoyl -D- Xylopynose (0,25% p/v)	130
Figure 66. Stabilité de la mousse des esters du xylose	131
Figure 67. Détermination de la zone d'inhibition par la technique de Kirby-Bauer	132
Figure 68. Spectre ATR-FTIR de composé <u>2</u>	133
Figure 69. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de composé <u>2</u>	134
Figure 70. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé <u>2</u>	134
Figure 71. Spectre ATR-FTIR de composé <u>3</u>	135
Figure 72. Spectre RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de composé <u>3</u>	136
Figure 73. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé de <u>3</u>	136
Figure 74. Spectre ATR-FTIR de composé <u>5</u>	137
Figure 75. Spectre RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de composé <u>5</u>	138
Figure 76. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé <u>5</u>	138
Figure 77. Spectre ATR-FTIR de composé <u>6</u>	139
Figure 78. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de composé <u>6</u>	140
Figure 79. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé <u>6</u>	140
Figure 80. Spectre ATR-FTIR de composé <u>1-β'</u>	142
Figure 81. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de composé <u>1β'</u>	142
Figure 82. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé <u>1β'</u>	143
Figure 83. Spectre ATR-FTIR de composé <u>1-α'</u>	144
Figure 84. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de composé <u>1α'</u>	144
Figure 85. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé <u>1α'</u>	145
Figure 86. Spectre ATR-FTIR de composé <u>4β'</u>	146
Figure 87. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de composé <u>4β'</u>	146
Figure 88. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé <u>4β'</u>	147
Figure 89. Spectre ATR-FTIR de composé <u>4α'</u>	148
Figure 90. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de composé <u>4α'</u>	148
Figure 91. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé <u>4α'</u>	149
Figure 92. Spectre ATR-FTIR de composé <u>1β</u>	150
Figure 93. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de composé <u>1β</u>	150
Figure 94. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, DMSO _{6d}) de composé <u>1β</u>	151
Figure 95. Spectre ATR-FTIR de composé <u>1α</u>	152
Figure 96. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de composé <u>1α</u>	152
Figure 97. Spectre RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) de composé <u>1α</u>	153
Figure 98. Spectre ATR-FTIR de composé <u>4β</u>	154
Figure 99. Spectre RMN ¹ H (400 MHz, DMSO _{6d}) de composé <u>4β</u>	154

Figure 100. Spectre RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) de composé 4β	155
Figure 101. Spectre ATR-FTIR de composé 4α	156
Figure 102. Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de composé 4α	156
Figure 103. Spectre RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de composé 4α	157

Liste des tableaux

PARTIE I

Chapitre I

Tableau 1. Les résidus aminoacides polaire qui forment le site actif des enzymes	8
---	---

Chapitre II

Tableau 2. Synthèse enzymatique des esters de sucre par des lipases dans des solvants organiques variés	34
Tableau 3. Activité enzymatique et la solubilité du glucose et l'hydrophobicité du solvant	42
Tableau 4. Effet du rapport molaire entre les substrats sur le rendement de la réaction	48
Tableau 5. Numéro de groupe HLB.	53
Tableau 6. Types d'agrégation en fonction de paramètre d'empilement	66
Tableau 7. Applicabilité des esters de saccharose dans diverses formulations pharmaceutiques d'administration de médicaments	72

PARTIE II

Chapitre I

Tableau 8. Réutilisation de la CAL B	76
Tableau 9. Effet du rapport molaire entre le xylose et l'agent acylant	79
Tableau 10. Influences des lipases modifiées : cas acide myristique	83
Tableau 11. Influences des lipases modifiées : cas acide palmitique	83
Tableau 12. Influences des lipases modifiées : cas acide béhénique	84
Tableau 13. HLB et propriétés des tensioactifs synthétisés	88
Tableau 14. Paramètres physico-chimiques de tensioactifs synthétisés.	91

Chapitre II

Tableau 15. Propriétés tensioactives des anomères d'ester du xylose et d'éther du D-xylose.	101
Tableau 16. Moyenne de longueur de bande de liaison de esters du xylose optimisés.	105
Tableau 17. Paramètres moléculaires des anomères des esters du xylose obtenus avec les fonctionnelles B3LYP/6-31G (d, p) et B3LYP/6-31G (d)	106
Tableau 18. Evaluation de l'activité antibactérienne des anomères 1α et 1β .	112
Tableau 19. Evaluation de l'activité antibactérienne des anomères 4α et 4β .	112

Chapitre III

Tableau 20. Solubilité du D-rhamnose dans les solvants organiques.	116
Tableau 21. Influence du solvant organique sur la conversion.	117
Tableau 22. Influence du co-solvant sur la conversion (1ml / 0.1 ml).	118
Tableau 23. Influence du Co-solvant sur la conversion (1 ml / 50 μl).	119

Tableau 24. Influence de la quantité de l'enzyme sur la conversion.	120
Tableau 25. Influence du rapport entre les substrats sur la conversion. Variation de l'acide palmitique.	121
Tableau 26. Influence du rapport entre les substrats sur la conversion. Variation du sucre	120
Tableau 27. Propriétés tensioactives des esters de sucres	126

Liste des abréviations et des symboles

	Trifluorométhanesulfonate de 1-butyl-3-méthylimidazolium
[Bmim][TfO]	
[Hmim][TfO]	Trifluorométhanesulfonate de 1-hexyl-3-méthylimidazolium,
2M2B	2-méthylbutan-2-ol
Å	Angström
Ac₂O	Anhydride acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcONa	Acétate de sodium
ANL	lipase de <i>Aspergillus niger</i>
AOL	lipase d' <i>Aspergillus oryzae</i>
a_w	Activité de l'eau
B3LYP	Becke 3-Parameter Lee-Yang-Parr.
Bn	benzène
CAL B	Lipase de <i>Candida antarctica</i> B
CCL	lipase de <i>Candida rugosa</i>
CCL C65	lipase de <i>Candida rugosa</i> enrobée dans le span 65
CCL Ic	lipase de <i>Candida rugosa</i> immobilisée dans le célite
CH₃CN	Acétonitrile
CMC	Concentration Micellaire Critique
DHA	Dihydroxyacétone
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Et₂O	Éther diéthylique
EMC	Ethyle méthyle cétone
éq	Equivalent
h	heure
IR-ATR	Infrarouge-Réflexion totale atténuée

KSt	Stéarate de potassium
M R. miehei	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
MEPS	La surface du potentiel électrostatique moléculaire
min	minute
MTBE	méthyl-tert-butyle éther
n-Bu Li	n-butyllithium
n-BuOH	n-butanol
PEL	lipase de <i>Penicillium expansum</i>
PH₃P	Triphénylphosphine
PPL	lipase pancréatique de porc
PPL C65	Lipase Pancréatique de porc enrobée dans le span 65
PPL Ic	Lipase Pancréatique de porc immobilisé dans le célite
Py	Pyridine
RCL	lipase de <i>Rhizopus chinensis</i>
Rdt	rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
span 65	tristéarate de sorbitan
TA	Température ambiante
TM	Tamis moléculaire
t-BuOH	tert-butanol
THF	Tétrahydrofurane
TLL	lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
ZnSt	Stéarate de zinc

La synthèse de biotensioactifs à base de substrats d'origine végétale par catalyse enzymatique est une voie très recherchée pour des raisons économiques et écologiques. Contrairement aux biotensioactifs, les tensioactifs conventionnels pourraient faire face à des défis en termes de disponibilité limitée de combustibles fossiles, de conditions de traitement difficiles et de faible biodégradabilité en milieu aquatique. Ces tensioactifs biosourcés sont biodégradables¹ et ne présentent ni toxicité, ni caractère irritant^{2,3}. Leur bivalence structurelle amphiphile constitue la principale caractéristique qui définit leurs propriétés. Ces atouts ont abouti à l'orientation du marché mondial vers leur consommation. Dans ce contexte les esters de sucres et d'acides gras (Sugar Fatty Acid Esters, SFAEs) constituent une classe importante de biotensioactifs non-ioniques qui sont majoritairement utilisés comme des produits de soins personnels et ménagers⁴ (**Figure 1**). Leur production est en hausse depuis les années 2020 comme luster sur la figure 2. L'utilisation croissante de ces produits qui sont des composés bénins par rapport à ceux dérivés principalement de précurseurs du pétrole devrait augmenter la demande dans les années à venir^{5,6}.

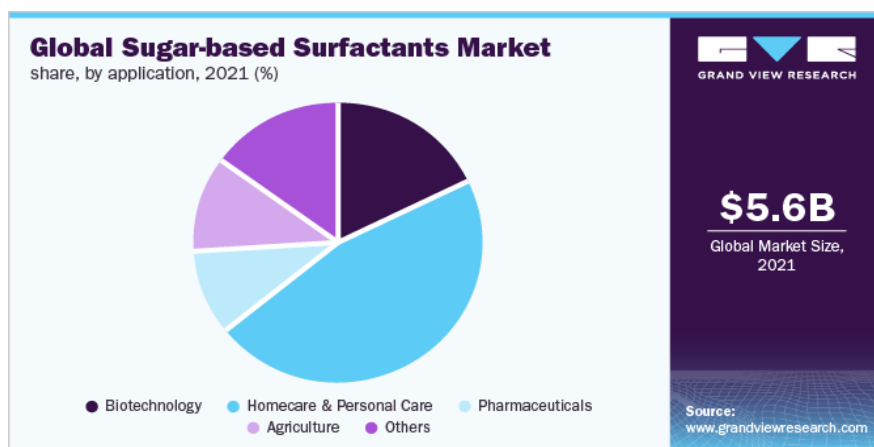


Figure 1. Marché mondial des surfactants à base de sucre et leurs applications.

¹ Allen, D.K.; Tao, B.Y. Synthesis and Characterization of Maltose Fatty Acid Monoesters as Biosurfactants. *J. Surfactants Deterg.* **2002**, *5*, 245–255.

² Sangiorgio, S.; Pargoletti, E.; Rabuffetti, M.; Robescu, M.S.; Semproli, R.; Ubiali, D.; Cappelletti, G.; Speranza, G. Emulsifying properties of sugar-based surfactants prepared by chemoenzymatic synthesis. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2022**, *48*, 100630.

³ Zhao, K.-H.; Cai, Y.Z.; Lin, X.S.; Xiong, J.; Halling, P.J.; Yang, Z. Enzymatic synthesis of glucose-based fatty acid esters in bisolvent systems containing ionic liquids or deep eutectic solvents. *Molecules* **2016**, *21*, 1294.

⁴ Hanno, I.; Centini, M.; Anselmi, C.; Bibiani, C. Green cosmetic surfactant from rice: Characterization and application. *Cosmetics* **2015**, *2*, 322–341.

⁵ Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2000**, *53*, 495–508.

⁶ <https://www.grandviewresearch.com/>

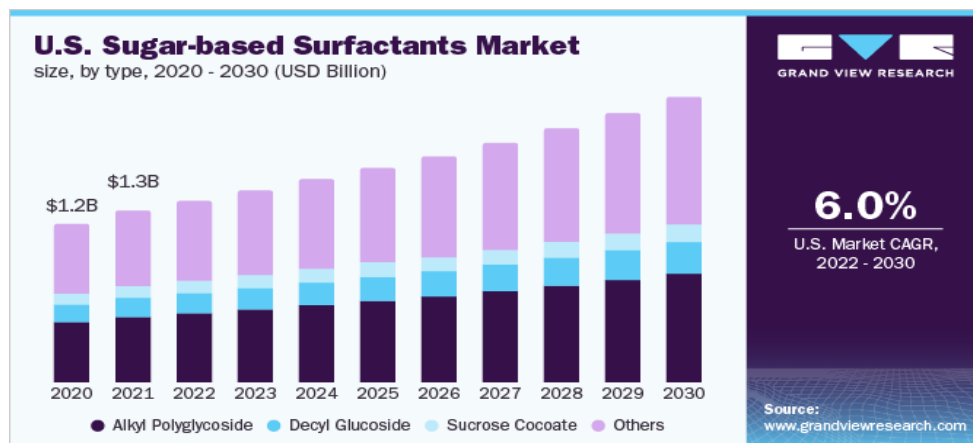


Figure 2. *Marché des tensioactifs à base de sucres entre 2020 et 2030⁶.*

Les esters de sucres sont des biomolécules qui peuvent être également obtenues par la voie chimique⁷. Cependant, vu les contraintes observées lors de cette synthèse (températures élevées, produits secondaires, dégradation, séparation difficile...) et pour des raisons écologiques nous avons opté pour la synthèse enzymatique.

La réaction biocatalysée est réalisée en une seule étape avec une haute sélectivité et une limitation de la génération de produits indésirables ce qui réduit des coûts de purification relativement importants. Il s'agit donc d'un procédé respectueux des principes de la chimie verte qui ont été développés par Paul Anastas et John Warner en 1998⁸ (**Figure 3**). A savoir :

- La catalyse.
- Ressources renouvelables.
- Produits biodégradables.
- Réduction des déchets.

⁷ Fregapane, G.; Sarney, D. B. Greenberg, S. G.; Knight, D. J.; Vulfson, E. N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, 71, 87

⁸ Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, pp 30, **1998**.



Figure 3. Les douze principes de la chimie verte

Les biocatalyseurs utilisés dans ce travail sont des lipases qui permettent de greffer un acide gras sur un sucre en formant ainsi la liaison ester. Les esters de sucres ainsi synthétisés ont des potentialités variées ce qui leur procurent un grand intérêt comme agents émulsifiants dans les industries alimentaires, des détergents, des additifs dans les produits pharmaceutiques ou cosmétiques⁹ etc.

Le sucre utilisé est le xylose ou sucre du bois, un monosaccharide de type aldopentose très abondant dans les parois cellulaires des plantes lignocellulosiques et le principal composant des xylanes (polymère de xylose)¹⁰.

Ce travail de recherche a porté sur la synthèse d'esters à base de D-xylose et d'acides gras de longueurs de chaînes différentes par la voie enzymatique. La réaction d'estérification catalysée par les enzymes fait partie des processus chimiques et biochimiques d'importance industrielle. L'estérification pour la production des SFAEs catalysée par les lipases a acquis une attention grandissante pour ses diverses applications, en raison de l'importance des produits dérivés. Ces composés à potentialités tensioactives ont suscité l'intérêt des chercheurs au cours de ces dernières années en raison d'une utilisation accrue des esters organiques en biotechnologie et dans l'industrie chimique.

Notre objectif général est donc l'étude d'un procédé de synthèse de nouveaux bio-tensioactifs non ioniques par estérification enzymatique. Le présent manuscrit se divise en deux parties

⁹Zhao, L.; Zhang, H.; Hao, T.; Li, S. In vitro antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters against five food-related bacteria. *Food Chemistry*. **2015**, 187, 370–377.

¹⁰Ebringerova, A.; Heinze, T. Xylan and xylan derivatives biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, 21, 542-556.

qui traitent séparément de la bibliographie concernant le sujet abordé puis des différents résultats obtenus.

La première partie concerne une étude bibliographique qui comporte deux chapitres. Le premier chapitre présente un aperçu bibliographique sur les lipases, leurs propriétés ainsi que leurs utilisations. Le deuxième chapitre est consacré à des généralités sur les esters de sucres, leur synthèse par la voie chimique et enzymatique, leurs propriétés physico-chimiques et bioactives ainsi que leurs applications.

Dans la seconde partie qui constitue notre contribution, les résultats sont regroupés dans trois chapitres distincts :

Le premier chapitre comporte une étude préliminaire sur la synthèse de hexadénoyl-1-*O*-D-xylopyranose. L'optimisation des facteurs influençant l'estérification du D-xylose par des acides gras comportant différentes longueurs de chaîne en présence de la lipase de *Candida antarctica* B est mise en œuvre. Les propriétés tensioactives des produits synthétisés sont par la suite évaluées.

Le deuxième chapitre est consacré à la séparation des anomères de 1-*O*-dodécanoyl-D-xylopyranose et ceux de 1-*O*-octadécanoyl-D-xylopyranose dans le but d'étudier l'effet de la configuration sur les propriétés tensioactives et leur activité antibactérienne. La réactivité de ces anomères a été décrite en utilisant la modélisation moléculaire.

Dans le troisième chapitre, une étude sur l'effet de la tête polaire sur les propriétés tensioactives du palmitate du D-xylose et du palmitate de L-rhamnose est réalisée.

La partie expérimentale et les caractéristiques des produits de synthèse sont décrites dans le dernier chapitre. Toutes les références sont mentionnées en bas de page de ce manuscrit qui sera terminé par une conclusion générale et la présentation des perspectives envisagées.

Introduction

Les triacylglycérols acyl hydrolases ou lipases (EC.3.1.1.3) sont des enzymes appartenant à la famille des hydrolases qui peuvent catalyser l'hydrolyse ou la synthèse de nombreux substrats¹¹. Ce sont des enzymes d'une importance physiologique considérable qui catalysent l'hydrolyse de triacylglycérides de longues chaînes avec la formation de diacylglycerides, de monoacylglycerides, du glycérol et des acide gras libres¹². La réaction est réversible et s'effectue à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique, cette activation interfaciale est due à la présence d'une boucle hydrophobique au niveau du site actif dans la plupart des lipases¹³.

Les lipases sont également capables de catalyser de nombreuses réactions utiles dans les milieux organiques comme la réaction de transestérification en consommant moins d'énergie par rapport au processus de la catalyse chimique même en présence d'acides gras libres^{14,12,15,16}. La lipase de *Rhizopus oryzae* est un exemple de lipase sélective à la position 1,3 qui a été utilisée dans la réaction d'acylation directe¹⁷. Les lipases catalysent aussi la réaction d'interestérification, la lipase de *Mucor miehei* immobilisée sur résine microporeuse échangeuses d'anions a été utilisée dans la réaction d'interestérification régiosélective 1,3¹⁸.

Leurs propriétés catalytiques varient d'une espèce à une autre selon la source d'obtention. Elles peuvent être extraites de microorganismes, des cellules animales ou végétales et également de champignons.

Nous pouvons citer quelques propriétés de la littérature. Certaines lipases ont une tolérance à un pH alcalin avec une activité optimum à pH 8 c'est le cas des lipases extracellulaires de *Antrodia cinnamomea* qui reste stable entre 25 et 60°C et montre une activité maximale à

¹¹Mats, M.; Karl H. Kinetics of triglyceride lipase. In: Wooley P. & Petersen S.B., eds. Lipases. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994, 159-180

¹²Aha, B.; Berger, J.; Jakob, M.B.; Haase, B.; Hermann, J.; Machmuller, G.; Muller, S.; Waldinger, C.; Schneider, M.P., Bioconversion of plant materials: lipids proteins and carbohydrates, in: B. Zwanenburg, M. Micolajczyk, P. Kiebasinski (Eds.), Enzymes in Action, Green Solutions for Chemical Problems, Kluwer Academic Publishers. 2000, pp. 323–345.

¹³Schmid, R.D.; Verger, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 1608–1633

¹⁴Canet, A.; Bonet-Ragel, K.; Benaiges, M.D., & Valero, F. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. *Biomass and Bioenergy.* 2016, 85, 94–99.

¹⁵Robles-Medina, A.; Gonzalez-Moreno, P.A.; Esteban-Cerd, L.; Molina-Grima, E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production, *Biotechnol. Adv.* 2009, 27, 398-408.

¹⁶Parawira, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.* 2009, 29, 82-93.

¹⁷Gandolfi, R.; Converti, A.; Pirozzi, D.; Molinari, F. Efficient and selective microbial esterification with dry mycelium of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Biotechnology.* 2001, 92, 21–26.

¹⁸Muderhwa, J.M.; Pina Michel, Montet Didier, Feuillard P., Graille Jean. Interestérification enzymatique régiosélective 1-3 en milieu fondu et en réacteur continu : valorisation de l'huile de palme. *Oléagineux.* 1989, 44, 35-43.

45°C¹⁹. La lipase de *Penicillium aurantiogriseum* est actif dans le milieu de pH entre 6 et 9 et à une température allant de 37 à 70 °C mais avec une activité maximum à 60 °C à pH 8²⁰. La lipase de *Talaromyces thermophilus* fonctionne efficacement dans un milieu alcalin de pH 8.9 à 10.5 avec une activité optimum à pH 9.5 à 60 °C²¹. Les lipases d'origine fongique ont un pH optimum neutre ou légèrement acide : 6.5 pour la lipase de *Geotrichum candidum*²², 5.6 pour celle de *Rhizopus delemar*²³, 7 pour la lipase de *Yarrowia lipolytica*²⁴. Certaines lipases restent actives et stables dans une certaine gamme de pH. La lipase de *Pseudomonas cepacia* conserve ainsi 100 % de son activité après incubation durant 24 h à 30 °C pour un intervalle de pH variant de 3 à 11²⁵ alors que la lipase de *Fusarium heterosporum* est stable dans une gamme de pH variant de 4 à 10²⁶. Ces biocatalyseurs sont atypiques vu leur spécificité de substrats et leurs mécanismes catalytiques. Toutes ces propriétés augmentent leurs potentialités et leurs applications dans divers secteurs industriels pour la confection de produits alimentaires, de détergents, de produits pharmaceutiques et cosmétiques.

I. Structure des lipases

Les lipases sont considérées comme des α/β -hydrolases. La structure et la fonction de cette classe d'enzyme ont été identifiées grâce aux résultats de l'étude de la structure cristallographique des lipases de : *Rhizomucor miehei*²⁷, *Candida rugosa* (CRL), *Geotrichum candidum* (GCL), *Bacillus subtilis* (BSL) et *Pancréatique humaine* (HPL).

La résolution des structures cristallographiques de ces lipases a permis de bien mettre en évidence la structure tridimensionnelle.

¹⁹Shu ,C.H.;Xu ,C.J.&Lin G.C.Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem.* **2006**, 41, 734-738.

²⁰Lima ,V.M.G.; Krieger,N.; Mitchell ,D.A. & Fontana JD. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Eng.***2004**,18, 65-71.

²¹Zhang, X.; Li ,X.; Xia,L. Expression of a thermo-alkaline lipase gene from *Talaromyces thermophilus* in recombinant *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal.* **2015**,103, 263–269.

²² Veeraragavan,K.; Colpitts ,T.; Gibbs ,B.F. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochim. Biophys. Acta.***1990**, 1044, 26-33.

²³Iwai M; Tsujisaka, Y. The purification and the properties of three kinds of lipase from *Rhizopus delemar*. *Agric. Biol. Chem.* **1974**, 38, 1241-1247.

²⁴ Destain, J.;Roblain, D.; Thonart ,P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* **1997**, 19, 105-107.

²⁵Sugihara, A. et al. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.* **1992**, 112, 598-603.

²⁶Shimada, Y et al. Purification and characterisation of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, 75, 349-352.

²⁷ Brady L. et al. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature.***1990**, 343, 767-770.

Malgré la variabilité de la séquence primaire des lipases, elles ont toutes la même architecture tridimensionnelle formée par 8 brins β connectés par 6 brins α , c'est le repliement α/β (**Schéma 1**) autour duquel se greffent des structures peptidiques qui sont responsables de la spécificité aux substrats et des propriétés catalytiques.

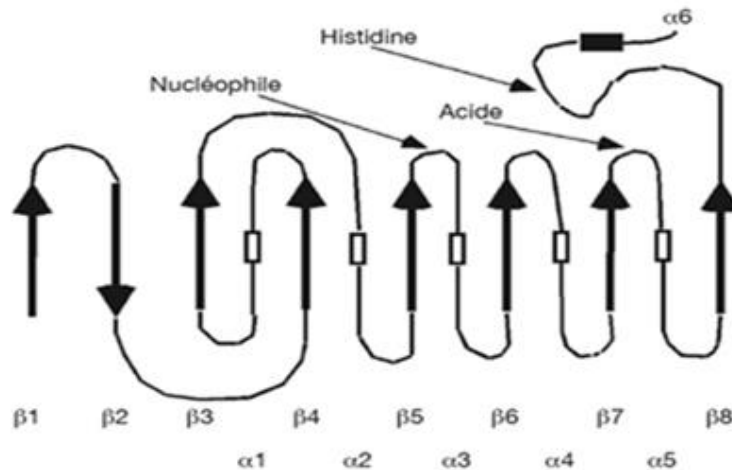


Schéma 1. Repliement α/β de lipase, les flèches représentent les feuillettes β et les rectangles les hélice α (Egloff et al 1995)²⁸.

a. Le site actif des enzymes

Plusieurs études structurales ont montré qu'effectivement les protéines enzymatiques ont en leur sein un site actif sous forme d'une cavité délimitée par des aminoacides hydrophobes ou des résidus polaires non ionisables et des résidus aminoacides ionisables (**Tableau 1**).

Les aminoacides hydrophobes font du site actif un espace hydrophobe où les interactions électrostatiques sont fortes. Les résidus polaires forment le centre catalytique car à leur niveau s'effectuent les interactions ou les réactions entre enzyme et substrat qui constituent l'essence même du mécanisme catalytique.

²⁸ Egloff M.P., Cohen, P.T., Reinemer, P., and Barford, D. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J. Mol. Biol.* **1995**,254,942–959.

Tableau 1 : les résidus aminoacides polaires qui forment le site actif des enzymes

Résidu aminoacide	Groupe actif	Charge à pH7	Fonction
Sérine	-CH ₂ OH	0	Liaison covalente d'acyle
Tyrosine	-OH	0	Liaison d'hydrogène avec des ligands
Cystéine	-S ⁻¹	0	Liaison covalente d'acyle
Aspartate	-COO ⁻¹	-1	Liaison de cation ; transfert de proton
Glutamate	-COO ⁻¹	-1	Liaison de cation ; transfert de proton
Lysine	-NH ₃ ⁺	+1	Liaison d'anions
Arginine	Guanidinium	+1	Liaison d'anions
Histidine	Histidine	0	Transfert de protons

A pH neutre, l'aspartate et le glutamate sont chargés négativement ; la lysine et l'arginine le sont positivement. Ces anions et cations peuvent alors participer à de fortes interactions avec de groupes de charges opposés du substrat. De plus l'aspartate et le glutamate peuvent intervenir au transfert des protons. L'histidine en raison de son pka comprise entre 6 et 7 joue le rôle d'accepteur ou de donneur de protons.

Pour les lipases ce site actif est composé de résidus d'acides aminés, d'une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique (Aspartate ou glutamate) qui forment la triade catalytique dont l'ordre d'apparition dans la structure primaire est Ser-Asp/Glu- His où la sérine catalytique se trouve toujours dans un coude nucléophile situé à l'extrémité C-terminale du 5^e brin β suivi d'une hélice α . L'acide carboxylique est généralement situé à l'extrémité du 7^e brin, sauf pour la lipase pancréatique où il est situé à l'extrémité du 6^e brin alors que l'histidine est située à l'extrémité carboxylique terminal du brin de feuillet formant ainsi le repliement α/β .

Le site catalytique de la plupart des lipases est recouvert d'une boucle peptidique d'une hélice α amphiphile²⁹ qui joue le rôle d'un volet responsable de la fermeture et la réouverture du site qui contrôle l'activité de l'enzyme.

A l'état inactif, la triade catalytique est recouverte de cette boucle où la face hydrophobe est en interaction avec des résidus hydrophobes entourant le site alors que la face hydrophile est en contact avec les molécules d'eau ; dans cette conformation les substrats ne peuvent pas être en interaction avec la triade catalytique. L'activation interfaciale permet l'ouverture du site actif où la boucle se déplace de sorte que la face hydrophobe s'expose au solvant en

²⁹ Brocca, S.; Secundo, F.; Ossola, M.; Alberghina, L.; Carrea, G.; Lotti, M. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci.* **2003**,12, 2312–2319.

créant alors une surface hydrophobe qui interagit avec l'interface eau / corps gras ce qui permet l'accès des substrats au site, le mouvement de cette boucle a été démontré³⁰. En outre ce changement conformationnel réduit l'hydrophobicité de la surface d'enzyme à proximité de l'enzyme améliorant ainsi la liaison interfaciale dans cette région.

b. L'activation interfaciale de lipase

L'activité des lipases augmente dans une interface eau/ lipide au-delà de la concentration micellaire critiques de substrats. Ce phénomène appelé activation interfaciale est dû au changement conformationnel de l'enzyme lors de son contact avec les substrats micellaires qui conduit au déplacement de la boucle peptidique « lid »³¹. L'interaction entre les résidus hydrophobes et l'interface lipide de la boucle aboutit au réarrangement conformationnel de l'enzyme et à la stabilisation de la forme ouverte^{32,33}.

La comparaison de la forme ouverte de site actif de la lipase de *Candida rugosa* et de sa forme fermée indique que l'activation interfaciale de cette enzyme implique un mouvement et repliement du lid comprenant l'isomérisation de cis vers trans de l'acide proline et ce qui aboutit au déplacement de la boucle en exposant une large surface hydrophobe. Le totale de l'aire de surface hydrophobe dans la conformation à l'état fermé de la CRL est 890 Å² représentant 6% de l'enzyme. Cette proportion augmente à 1530 Å² dans sa conformation ouverte³⁴.

La conformation fermée (**Figure 4**) est supposée prédominer en milieu aqueux, en raison de la faible activité lipolytique des lipases dans l'eau tandis que la forme ouverte serait prépondérante en milieu organique et à l'interface eau/lipide^{35,36}.

³⁰ Brzozowski, A. M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z. S.; Dodson, G. G.; Lawson, D. M.; Turkenburg, J. P.; et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. **1991**,351, 491–494.

³¹ Cambillau, C.; Longhi, S.; Nicolas, A.; and Martinez, C. Acyl glycerol hydrolases: inhibitors, interface and catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 449–455

³² Derewenda, U.; Swenson, L.; Wei, Y.; Green, R.; Kobos, P.M.; Joerger, R.; Haas, M.J.; Derewenda, Z.S. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J. Lipid Res.* **1994**,35, 524–534.

³³ Grochulski, P.; Yunge, L.; Schrag, J.; Bouthillier, F.; Smith, P.; Harrison, D.; Rubin, B.; Cygler, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 12843–12847

³⁴ Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; Cygler, M. Two conformation states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **1994**,3, 82–91.

³⁵ Gutiérrez-Ayesta, C.; Carelli, A. A.; Ferreira, M. L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and Microbial Technology*. **2007**, 41, 35–43.

³⁶ Polaina Julio et MacCabe Andrew P., Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications, Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands. **2007**.

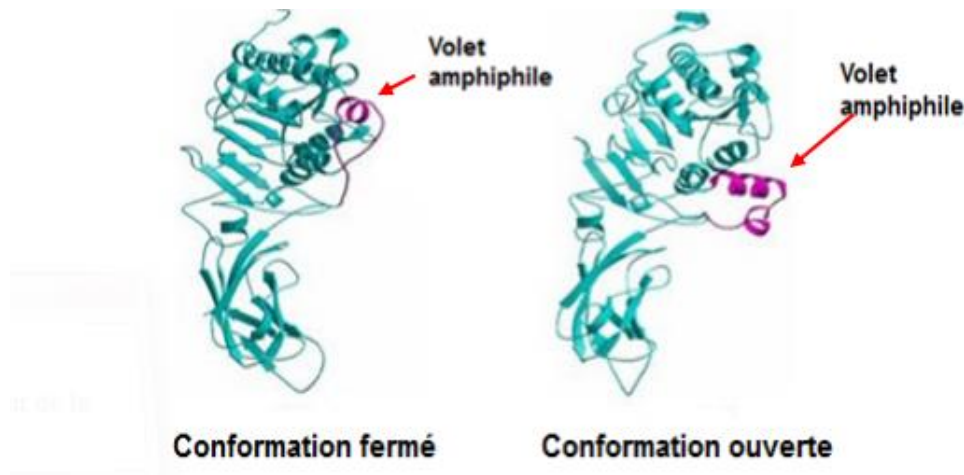


Figure 4. Schémas du volet amphiphile d'une lipase.

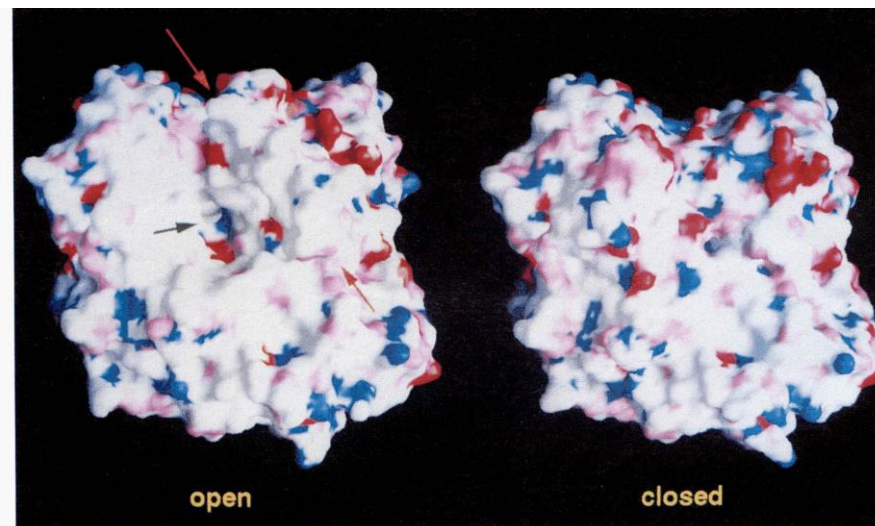


Figure 5. Surface moléculaire de deux états de conformation de la lipase *Candida rugosa* de la même direction sous le site actif, les images ont été préparé par le programme GRASP (Nicholls et al., 1991). La surface correspond aux atomes nitrogène est en bleu, les carbonyles en rose, les atomes d'oxygène en rouge

Comme le montre la **figure 5**, la surface autour de site actif dans la conformation ouverte est plus hydrophobe (la couleur blanche) par rapport au reste e la surface alors que dans son état inactif la surface de l'enzyme devient plus hydrophile³⁷.

II. Les différentes formes de lipases

Etant donné que les lipases sont de nature protéiques, l'état structural et conformationnel de ces protéines natives reflète la stabilité de la structure pliée qui dépend de l'équilibre entre les forces stabilisantes et celle déstabilisantes^{38,39}.

³⁷Nicholls, A.; Sharp,KA.; Honig,B. Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins Struct Funct Genet* .**1991**, 11, 281-296.

³⁸ Dill, K. A. Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry*. **1985**, 24, 1501.

Les forces déstabilisantes sont fournies par l'entropie conformationnelle de déploiement ainsi les liaisons d'hydrogènes avec l'eau déstabilisent la structure native. Alors que les forces stabilisantes sont fournies par des interactions non covalentes comme des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes intramoléculaires, des interactions de Van der Waals, l'entropie de déshydratation, des ponts salins et des interactions dipolaires⁴⁰.

Toute perturbation de ces liaisons réduit la stabilité de l'enzyme, comme les interactions hydrophobes augmentent en force avec l'augmentation de la température, on pense qu'elles jouent un rôle important dans la stabilisation de l'enzyme^{41,42,43}, l'eau piégée à l'intérieur de la cavité de protéine peut être également exclue des contacts défavorables avec l'intérieur hydrophobe. Pour augmenter la stabilité des enzymes certains additifs comme les polyalcools hydriques et les sels kosmotropes sont ajoutés pour s'associer avec l'eau qui hydrate la surface de la protéine et rend ainsi la protéine plus rigide donc plus stable⁴⁴. Rue et al. ont suggéré que les sels kosmotropiques exercent une influence stabilisatrice lors de la lyophilisation par le mécanisme d'hydratation préférentielle augmentant la teneur en site actif et/ou l'efficacité catalytique de l'enzyme dans les solvants organiques⁴⁵.

Il existe différentes formes de lipases selon le composé ajouté qui permet de les stabiliser et de faciliter l'étape de la déshydratation. Elles peuvent être commercialisés sous formes liquides concentrés en ajoutant des sels (Na Cl, MgSO₄), des polyols (glycérol, sorbitol ou mannitol) ou des disaccharides (lactose).

Le mécanisme par lequel les sels affectent la stabilité de l'enzyme a été expliqué par leurs effets sur la structure de l'eau et par conséquent sur la force des interactions hydrophobes. Ces additifs augmentent l'hydratation des protéines et /ou la tension de surface de l'eau en améliorant ainsi la force motrice des interactions hydrophobes ce qui stabilise l'enzyme.

Les lipases sous forme de poudre sont obtenues par l'atomisation avec l'ajout d'agent protecteurs tels que : amidon, maltodextrines, gomme arabique, sels ou en ajoutant sucres,

³⁹ Dill, K. A.; Alonso, D. V.; Hutchinson, K. Thermal stabilities of globular proteins. *Biochemistry*. **1989**, 28, 5439.

⁴⁰ Bushmarina, N. A. ; Blanchet, C. ; Vernier, G. ; Forge, V. Repliement des protéines : exemple de l' α -lactalbumine. *Journal de Physique IV (Proceedings)*. **2005**, 130, 209–228.

⁴¹ Baldwin, R. L. ; Eisenberg, D. Protein stability. In "Protein Engineering" (D. L. Oxender and C. F. Fox, eds.) **1987**, p. 127. Liss, New York

⁴² Kauzmann, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **1959**, 14, 163.

⁴³ Tanford, C. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **1968**, 23, 121

⁴⁴ Kristjansson M.M.; Kinsella J.E. Protein and enzyme Stability: structural, thermodynamic and experimental aspects. *Adv. Food Nutr. Res.* **1991**, 35, 237-258.

⁴⁵ Ru, M. T.; Hirokane, S. Y.; Lo, A. S.; Dordick, J. S.; Reimer, J. A.; & Clark, D. S. On the Salt-Induced Activation of Lyophilized Enzymes in Organic Solvents: Effect of Salt Kosmotropicity on Enzyme Activity. *Journal of the American Chemical Society*. **2000**, 122, 1565–1571.

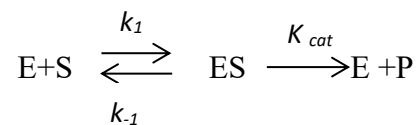
polyéthène glycol, propylène glycol, polyols, acides aminés dans le cas de la lyophilisation⁴⁶.

III. La cinétique enzymatique

Au cours d'une expérience de cinétique enzymatique, on détermine la relation entre la vitesse de la réaction V qui est la concentration de substrat disparu ou la quantité de produit formé par unité de temps : $V = - \Delta[S]/\Delta t = \Delta[P] / \Delta t$ et les conditions dans lesquelles se déroule la réaction c'est-à-dire la concentration du ou des substrats $[S1]$ $[S2]$..., la concentration des effecteurs, la concentration de l'enzyme $[E]$, la température et le pH en fonction d'un seul de ces paramètres. Ces études cinétiques permettent de déterminer le comportement de l'enzyme et les conditions optimums de son activité catalytique.

1. Théorie du complexe stéréospécifique

L'activité catalytique de l'enzyme est liée à la formation d'un complexe stéréospécifique transitoire Enzyme-Substrat (ES^*) ou les constantes de vitesse k_1 et k_{-1} gouvernent respectivement les vitesses d'association de l'enzyme E et de substrat S et leur vitesse de dissociation.



Ce complexe qui peut se décomposer pour donner le produit et régénérer l'enzyme est appelé complexe de Michaelis-Menten-Henri, sa formation s'accompagne d'une diminution de l'énergie de Gibbs (**Figure 6**).

$$\Delta G_f = - RT \ln (1/K_{-1}).$$

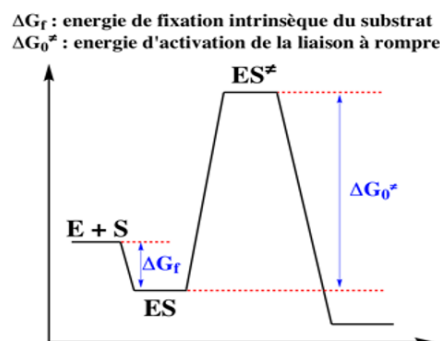


Figure 6. La variation de l'énergie de Gibbs

⁴⁶ Alloue, W.A.M.; Aguedo M. ; Destain J. ; Ghalfi H.; Thonart, Ph. ; Aguedo, M., Wathelet, J.P.; Blecker, C. Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008**, 12, 57-68.

2. Equation de Michaelis-Menten

En 1913, Léonor Michaelis et Maud Menten⁴⁷ ont déduit une équation qui prédit la vitesse initiale de la formation du produit en fonction de la concentration du substrat [S] selon une relation hyperbolique où figurent deux constantes, la vitesse maximale, V_{\max} et la constante de Michaelis, K_M . Lors de la phase initiale de la réaction enzymatique, la formation du produit P est une simple réaction du premier ordre où V_0 est proportionnel à la concentration du complexe [ES] selon l'équation suivante :

$$V_0 = k_{cat} [ES] \quad (1)$$

Etant donné que les valeurs de [ES] et k_{cat} sont inconnues, une expression de vitesse en fonction de [S] a été établie où ces valeurs n'apparaissent pas, en s'appuyant sur les considérations suivantes :

A la concentration saturante du substrat $V_0 = V_{\max}$ et toute l'enzyme est complexée ce qui signifie que la concentration de ce complexe est égale à la concentration de l'enzyme totale $[ES] = [E_T]$, on obtient alors l'équation suivante :

$$V_{\max} = k_{cat} [E_T] \quad (2)$$

A une concentration quelconque, V_0 est une fraction de V_{\max} et l'équation de vitesse est :

$$V_0 / V_{\max} = [ES] / [E_T] \quad (3)$$

La formation du complexe enzyme-substrat et sa destruction est continuellement contrôlée par deux processus k_1 et k_{-1} , la vitesse d'accumulation de ce complexe est alors exprimée par la différence entre sa vitesse de formation et sa vitesse de la dissociation selon l'équation 4 :

$$d[ES]/dt = k_1[E_L][S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] \quad (4)$$

Dans la phase stationnaire, V_0 est constante c'est-à-dire que la concentration du complexe est stable alors sa vitesse de sa formation égale à celle de sa destruction. Dans ces conditions on peut déterminer la constante de Michaelis :

$$\frac{[E_L][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_{cat})}{k_1} = K_M \quad (5)$$

La concentration d'enzyme libre $[E_L] = [E_T] - [ES]$, la substitution de sa valeur dans l'équation (5) donne la relation suivante :

$$\left(\frac{[E_T]}{[ES]} - 1\right) [S] = K_M \quad (6)$$

Par substitution de valeur de $[E_T]/[ES]$ dans l'équation (3), l'expression de la vitesse initiale V_0 en fonction de la concentration du substrat donne l'équation de Michaelis -Menten :

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (7)$$

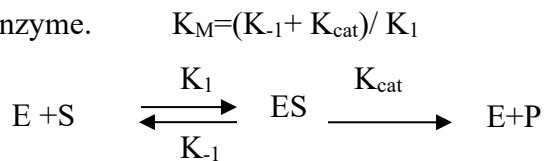
⁴⁷ Lehninger, Albert L.; Nelson, David L.; Cox, Michael M. Principles of Biochemistry (5th ed.). New York, NY: W.H. Freeman and Company. 2008. ISBN 978-0-7167-7108-1.

Il s'agit d'une relation hyperbolique permet de déterminer V_{\max} et la constante K_M , la constante de Michaelis est la concentration du substrat pour laquelle la vitesse atteint la moitié de la vitesse maximale c'est-à-dire lorsque $[S] = K_M$, $V_0 = V_{\max}/2$.

3. Signification physique de K_M et K_{cat} :

La constante catalytique s'exprime en s^{-1} , c'est une mesure directe de l'activité catalytique de l'enzyme, plus grand est K_{cat} , plus rapide sont les événements catalytiques au sein du complexe. C'est le temps requis par une molécule d'enzyme pour transformer une molécule de substrat.

La constante de Michaelis K_M s'exprime en mol, elle détermine l'affinité du substrat pour l'enzyme.



K_{-1} : La constante de sa dissociation de ES.

K_1 : La constante de formation du complexe ES.

Les valeurs de K_M sont différentes selon les enzymes ; pour nombre d'entre eux, elles se situent entre 10^{-1} et 10^{-7} .

Un K_M faible signifie que la constante de formation du complexe K_1 est supérieure à la constante de sa dissociation K_{-1} . Ce qui signifie que le substrat se lie fortement à l'enzyme pour lequel il a une forte affinité.⁴⁸

A une faible concentration de substrat, la plupart des molécules d'enzyme sont libres donc :

$$V_0 = \frac{K_{cat}}{K_M} [E_L][S] \quad (8)$$

Ces deux critères K_{cat} et K_M déterminent alors les propriétés catalytiques d'une enzyme, sa spécificité et son efficacité.

La spécificité d'un enzyme vis-à-vis de deux substrats A et B présents à des concentrations égales, peut être apprécié par le rapport :

$$\frac{V_A}{V_B} = \frac{(k_{cat} / k_M)_A [E][A]}{(k_{cat} / k_M)_B [E][B]} = \frac{(k_{cat} / k_M)_A}{(k_{cat} / k_M)_B}$$

Le rapport K_{cat}/K_M est appelée constante spécificité.

⁴⁸ Donald Voet, Judith G. Voet. 2016. Biochimie..Ed.De Boeck.pp360.

4. Le modèle cinétique Bi Bi ordonné (Réaction à deux substrats)

Les réactions ping pong Bi Bi sont qualifiées de réactions à double substrats, la plupart de ces réactions obéissent à la forme cinétique de Michaelis-Menten plus complexe où V_{max} correspond à la vitesse de réaction atteinte lorsque les deux substrats sont en concentration saturante. Chacun des substrats a sa propre K_M . Ces réactions sont à double transfert car le groupe à transférer est détaché du substrat A par l'enzyme pour former le produit P et une forme modifiée de l'enzyme. Ensuite, ce groupe est transféré vers le substrat Q et l'enzyme E se libère selon le schéma réactionnel suivant (Figure 7):

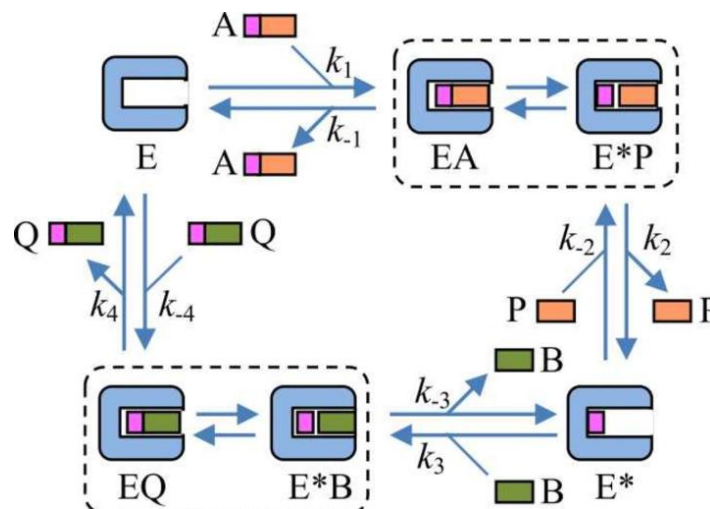


Figure 7. Schéma réactionnel selon le modèle ping pong Bi-Bi⁴⁹

Le modèle ping-pong Bi-Bi est le modèle qui décrit mieux les cinétiques des réactions catalysées par les lipases^{50,51,52}.

5. Le modèle cinétique interfacial

Le modèle de Michaelis-Menten s'applique à l'étude cinétique de l'activité enzymatique dans un milieu homogène alors que dans un milieu hétérogène un modèle cinétique interfacial a été proposé par Verger et Haas⁵³ (4). Selon eux, la réaction enzymatique à l'interface lipide-eau comporte deux étapes :

⁴⁹ Mitchell, D. A.; Krieger, N. Looking through a new lens: Expressing the Ping Pong bi bi equation in terms of specificity constants. *Biochem. Eng. J.* **2022**, *178*, 108276.

⁵⁰ Chulalaksanukul, W.; Condoret, J.S.; Delorme, P.; Willemot, R.M. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS Lett.* **1990**, *276*, 181-184.

⁵¹ Bousquet-Dubouch, M.-P.; Graber, M.; Sousa, N.; Lamare, S.; Legoy, M.-D. *Alcoholysis catalyzed by Candida antarctica lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water.* *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, *1550*, 90-99.

⁵² Paiva, A.; Balcao, V.; Malcata, F. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 187-204.

⁵³ Verger, R.; de Haas, G.H. Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem. Phys. Lipids.* **1973**, *10*, 127-136.

-Une étape d'adsorption à l'interface lipidique : d'abord l'enzyme libre E s'adsorbe à l'interface en changeant ou non sa conformation et donne l'enzyme adsorbée E*, deux constantes contrôlent cette étape ; K_p qui est la constante de pénétration ou d'adsorption de l'enzyme et K_d c'est la constante de désorption.

-Une étape catalytique : c'est une pseudo-réaction de Michaelis-Menten qui se déroule en surface donc toutes les concentrations sont exprimées en densité de surface mole.m⁻² et non pas en concentration volumique mole.m⁻³.

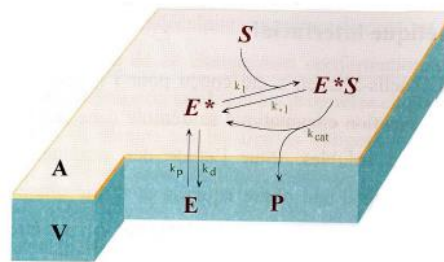
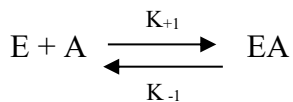


Figure 8. Modèle cinétique interfacial d'après Verger et Haas 1973.

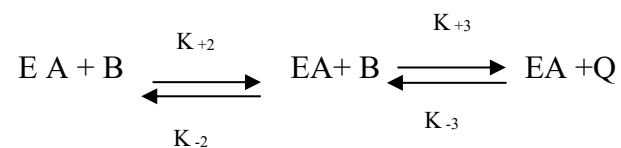
A. Représente l'interface. V. Représente la phase aqueuse.

Plusieurs modèles ont été développés pour mieux expliquer la cinétique interfaciale, parmi lesquels, le modèle de dilution de surface proposé par Carman et al⁵⁴ qui est proche à celui de Verger et permet de décrire la catalyse enzymatique de micelle mixte. La première étape consiste à la formation d'un complexe enzyme-micelle mixte (EA). Une fois le complexe formé, une molécule de lipide se fixe sur le site catalytique de la lipase et donne le complexe Michaelien (EAB). L'étape catalytique aboutit à la formation de produit Q et à la régénération du complexe (EA) selon l'équation suivante :

Étape massique



Étape de surface



L'équation cinétique de la dilution de surface a été développée :

⁵⁴ Carman, G.M.; Deems, R.A. and Dennis, E.A. Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *J Biol Chem.* **1995**, 270, 18711-18714.

$$V = \frac{V_{max}(A)(B)}{K_s k_m + k_m(A) + (A)(B)} \quad (9)$$

- $K_s = K_{-1}/K_{+1}$ c'est la constante de dissociation du complexe micelle mixte du site exprimée en concentration massique
- $K_m = (K_{-2} + K_{+3}) / K_{+2}$ c'est la constante interfaciale de Michaelis exprimée en unité de concentration de surface
- A, B sont exprimés en concentration de surface.

Un autre modèle dit « scooting and hopping modes » a été proposé par Jain et al⁵⁵ en se basant sur le phénomène de dispersions liposomales. La **Figure 9** décrit le schéma réactionnel de ce modèle⁵⁶ :

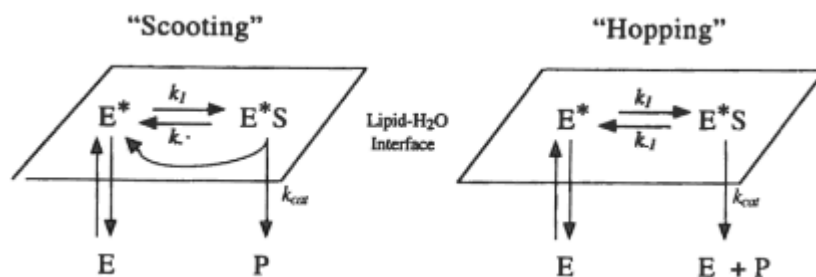


Figure 9. Catalyse interfaciale selon le modèle « scooting hopping ».

Dans le premier mode « scooting », l'enzyme ne se dissocie pas de l'interface durant plusieurs cycles de rotation et réagit seulement avec le substrat à l'interface à laquelle elle est liée, donc l'association est irréversible au cours de la réaction.

Dans le deuxième mode « hopping », l'enzyme se désorbe de l'interface après chaque ou quelques cycles de rotation. Ainsi, les vésicules en excès sont finalement accessibles pour l'hydrolyse (**Figure 10**).

⁵⁵ Jain, K.M.; Gelb, M. H.; Rogers, J.; & Berg, O. G. Kinetic basis for interfacial catalysis by phospholipase A2. *Methods in Enzymology*. **1995**, 249, 567–614.

⁵⁶ Jain, M. K.; & Berg, O. G. The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. **1989**, 1002, 127–156.

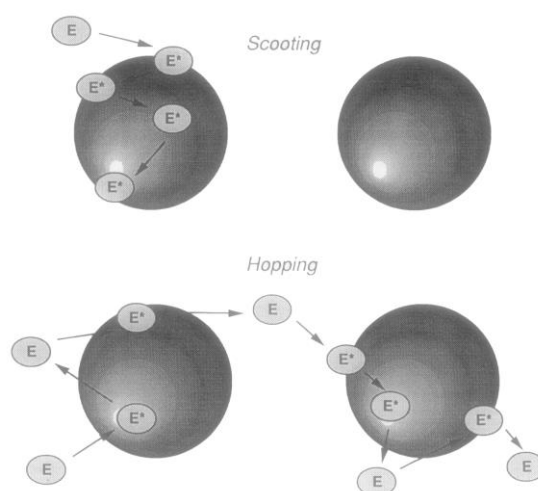


Figure 10. Illustration schématique de deux modes extrêmes de la catalyse interfaciale sur vésicules.

IV. Classification des lipases

1. Classification des lipases en fonction de la boucle « lid »

Les lipases sont des biocatalyseurs largement utilisés dans le milieu organique, la plupart de ces enzymes fonctionnent dans une interface eau/lipide en raison de la présence de la boucle qui protège le site actif et contrôle l'activité catalytique de l'enzyme. En se basant sur la structure de ce domaine on peut classer les lipases en trois groupes (**Figure 11**)⁵⁷ :

-Les lipases sans boucle « ou volet »

Ce sont des lipases dont le site actif est dépourvu du volet « lid » qui ne nécessitent pas une activation interfaciale comme la lipase de *Bacillus subtilis* lipase où le site actif est exposé au solvant^{58,59}.

-Les lipases thermostables comporte un volet à une ou plusieurs hélices

Ce type de lipase est fortement thermostable c'est le cas de la *Candida antarctica* A⁶⁰.

-Les lipases mésophiles

Les lipases avec un seul petit volet hélicoïdal comme dans la lipase de *Burkholderia cepacia*⁶¹ et la lipase de *Candida antarctica* type B⁶².

⁵⁷ Albayati, S. H.; Masomian, M.; Ishak, S. N. H.; Mohamad Ali, M. S. bin, Thean, A. L.; Mohd Shariff, F.; binti, Raja Abd Rahman, R. N. Z. Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity. *Catalysts*. **2020**, *10*, 747.

⁵⁸ Van Pouderoyen, G.; Eggert, T.; Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 215–226

⁵⁹ Verger R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32–3

⁶⁰ Ericsson, D.J.; Kasrayan, A.; Johansson, P.; Bergfors, T.; Sandström, A.G.; Bäckvall, J.E.; Mowbray, S.L. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109–119.

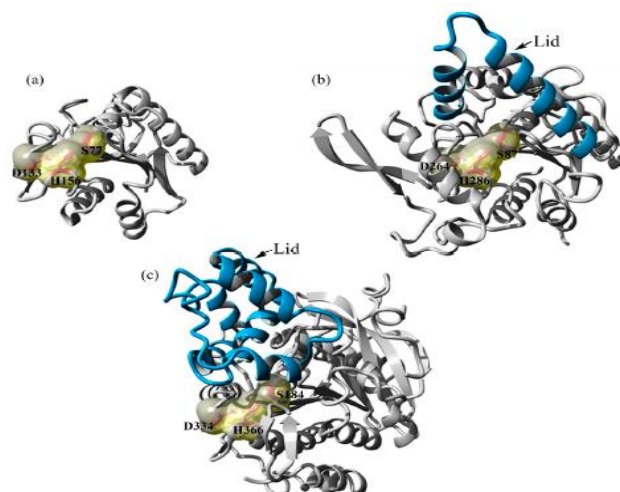


Figure 11. Les trois types de lipase en fonction de volet « lid domain ».
 a. Lipase de *Bacillus subtilis* b. lipase de *Burkholderia cepacia*, c. lipase de *Candida antarctica*.

2. Classification de lipases selon leurs trous d'oxyanion

Les lipases peuvent être classées en fonction de leurs trous oxyanion en trois types :

GX, GGGX et Y (**Figure 12**). Dans le type GX, G est une glycine conservée et X est soit un résidu hydrophobe ou hydrophile du trou oxyanion hydrophile. La lipase avec un trou d'oxyanion GX avec une sérine ou une thréonine pour le résidu X préfère généralement l'hydrolyse des substrats de longueur moyenne et longue de la chaîne de carbone. Dans le cas de la lipase CAL B, le trou oxyanion comporte la glycine 106 et la thréonine 44 pour X (**Figure 13**).

Dans le type GGGX, le résidu du trou oxyanion G est suivi d'un résidu hydrophobe conservé et ce type se révèle préférer des substrats de courte longueur de chaîne.

Le trou d'oxyanion de type Y est formé par le groupe hydroxyle du côté de la chaîne tyrosine. Ce type se trouve dans la lipase de *C. antarctica* A.

⁶¹ Mezzetti, A.; Schrag, J.D.; Cheong, C.S.; Kazlauskas, R.J. Mirror-image packing in enantiomer discrimination: Molecular basis for the enantioselectivity of *B. cepacia* lipase toward 2-methyl-3-phenyl-1-propanol. *Chem. Biol.* **2005**, 12, 427–437.

⁶² Luan, B.; Zhou, R. A novel self-activation mechanism of *Candida antarctica* lipase B. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2017**, 19, 15709–15714.

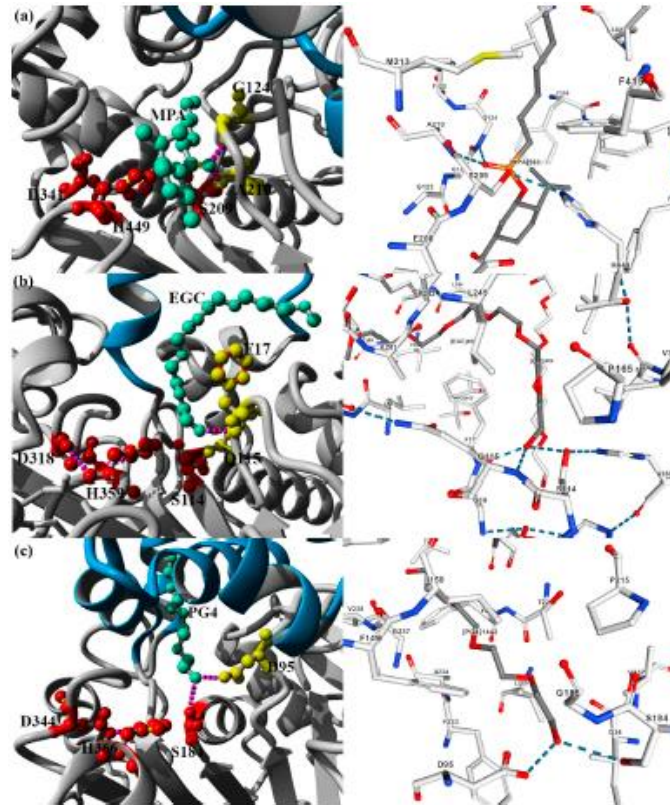


Figure 12. Les trois types de trous oxyanion : a) Le type GGGX dans la lipase de *Candida rugosa*. b) le type GX dans la lipase de *Geobacillus thermocatenulatus*, c) Le type Y dans la *Candida antarctica A*.

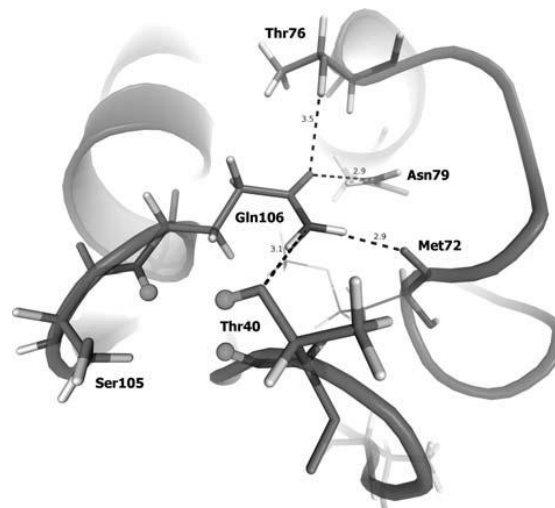


Figure 13. Le type GX dans la lipase *Candida antarctica B*⁶³.

⁶³ Suplatov, D. A.; Besenmatter, W.; Svedas, V. K.; & Svendsen, A. Bioinformatic analysis of alpha/beta-hydrolase fold enzymes reveals subfamily-specific positions responsible for discrimination of amidase and lipase activities. *Protein Engineering Design and Selection*. **2012**, *25*, 689–697.

V. La régiosélectivité et la stéréosélectivité des lipases

Le principal avantage des lipases qui différencie l'estérification enzymatique de l'estérification chimique est leur spécificité.

I. La régiosélectivité de lipase

La régiosélectivité des lipases est définie par son attaque privilégiée à une liaison d'ester par rapport à une autre dans une molécule, les esters primaires en position sn1 et sn3 sont favorablement hydrolysés par rapport aux esters secondaires (Schéma 2)⁶⁴.

Alors que seule la lipase A de *Candida antarctica* a montré une préférence pour la position sn2⁶⁵.

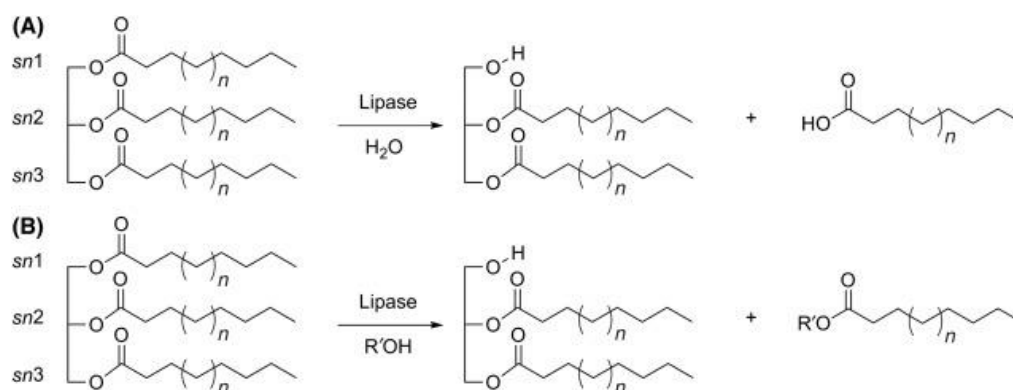


Schéma 2. (A). La lipase catalyse l'hydrolyse de triglycéride.
(B). La lipase catalyse la transestérification en utilisant un acyle-accepteur.

L'acylation par la lipase est aussi régiosélective, la lipase de *Candida antarctica* B catalyse l'estérification des nombreux composés de sucre en position 1.

Zhi Wang et al⁶⁶ ont pu catalyser la transestérification du resvératrol dans un solvant organique sous les irradiations de micro-ondes pour accélérer l'activité enzymatique de la lipase de *Candida sp.* 99–125 (CSL) et de la lipase de *Candida antarctica* B (schéma 3).

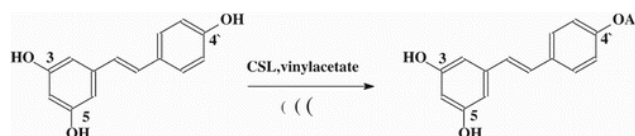


Schéma 3. Acylation Régiosélective de resvératrol catalysée par la lipase de CSL sous microonde.

2. La stéréospécificité des lipases

La stéréospécificité des lipases est la capacité des lipases à discriminer des groupements énantiotopes, elles sont également capables de distinguer les énantiomères. A Ducret et al⁶⁷

⁶⁴ Oroz-Guinea, I.; Zorn, K.; & Brundick, H. Protein engineering of enzymes involved in lipid modification. *Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes*. **2018** 11–43.

⁶⁵ Rogalska, E.; Cudrey, C.; Ferrato, F. and Verger, R. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality*. **1993**, 5, 24–30

⁶⁶ Wang, Z.; Zhang, Y.; Zheng, L.; Cui, X.; Huang, H.; Geng, X.; & Xie, X. Regioselective acylation of resveratrol catalyzed by lipase under microwave. *Green Chemistry Letters and Reviews*. **2018**, 11, 312–317.

ont utilisé la lipase de *Candida antarctica* type B pour l'estérification énantiosélective de l'ibuprofène.

3. La typo sélectivité ou acylosélectivité

C'est la capacité des lipases de distinguer plusieurs types de donneurs d'acyles, ainsi la lipase de *Geotrichum candidum* est très spécifique des acides gras présentant une double liaison cis en 9, autres comme celle de *Penicillium roqueforti* sont spécifiques à des acides gras à chaînes courtes.

VI. Les réactions catalysées par la lipase

Les lipases sont des enzymes à hautes potentialités qui sont capables de catalyser une multitude de réactions chimiques. En plus de l'hydrolyse⁶⁸ des esters, elles peuvent être utilisées en tant que biocatalyseurs en milieu non aqueux⁶⁹ dans la réaction d'estérification, acidolyse⁷⁰, de la transestérification⁷¹, l'interestérification⁷² et l'amidification^{72,73} (**Schéma 4**).

⁶⁷ Ducret, A.; Giroux, A.; Trani, M.; Lortie, R. Caractérisation de biosurfactants préparés par voie enzymatique. *Journal de l'American Oil Chemists Society*. **1996**, 73, 109-113.

⁶⁸ Zhang, Y.; Liu, J. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochemical Engineering Journal*. **2011**, 54, 4046.

⁶⁹ Zaks, A.; Klivanov, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry*, **1988**, 263, 3194-3201.

⁷⁰ Vidya, P.; Chadha, A. Pseudomonas cepacia lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester: A comparison in ionic liquids vs hexane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 6872.

⁷¹ Singh, M.; Singh, S.; Singh, R.S.; Chisti, Y.; Banerjee, U. Transesterification of primary and secondary alcohols using Pseudomonas aeruginosa lipase. *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 2116-2120.

⁷² Goto, M.; Kamiya, N.; & Nakashio, F. Enzymatic interesterification of triglyceride with surfactant-coated lipase in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*. **1995**, 45, 27-32

⁷³ Prasad, A.; Husain, M.; Singh, B.; Gupta, R.; Manchanda, V.; Olsen, C.; Parmar, V. Solvent-free biocatalytic amidation of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*. **2005**, 46, 4511-4514.

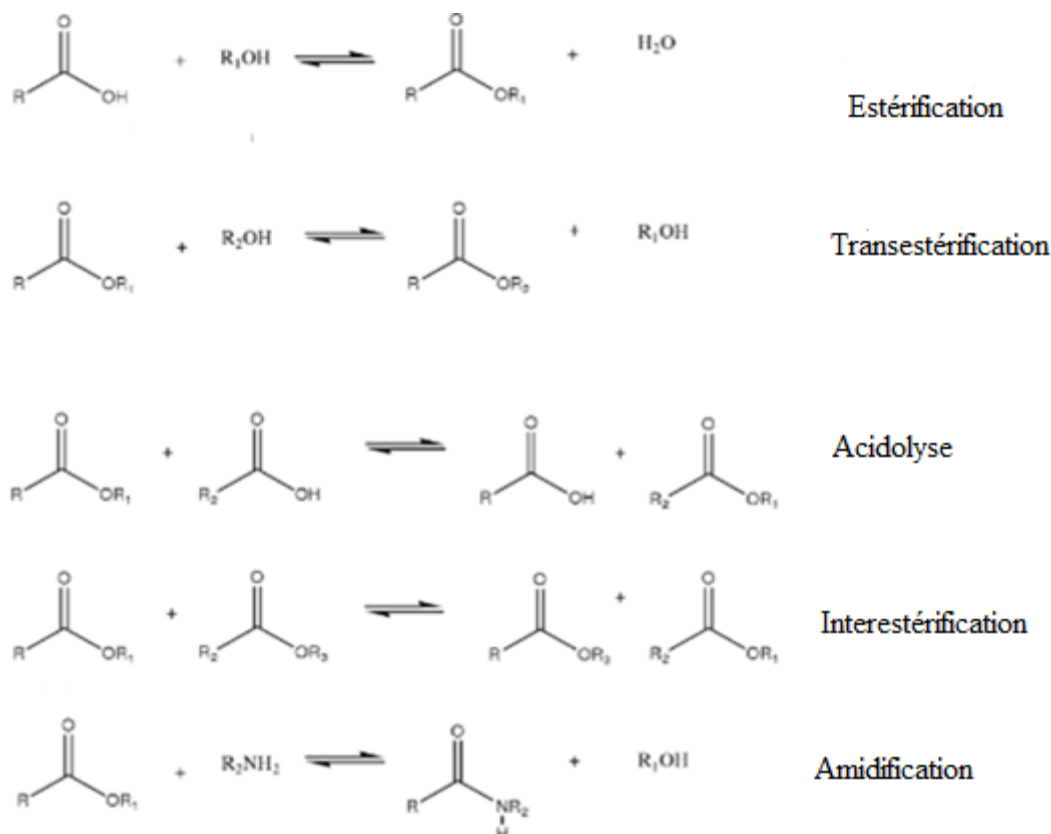


Schéma 4. Les réactions chimiques catalysées par les lipases.

VII. Mécanisme catalytique de la synthèse des esters par la lipase

1. Mécanisme de la réaction d'estérification par la CAL B

Le mécanisme catalytique pour la synthèse des esters catalysée par la CAL B (**Schéma 5**) commence par l'attaque nucléophile par la sérine hydroxyle sur le carbone de la liaison acyle sensible montré dans la **figure 5**, donnant lieu à un intermédiaire tétraédrique et à la formation d'une charge négative sur l'atome de l'oxygène du carbonyle. Les résidus Gly 39 et Thr 40 du trou d'oxyanion forme des liaisons hydrogènes avec l'atome d'oxygène du carbonyle chargé négativement et les groupements -NH de la chaîne principale. La nucléophilie de la Ser105 est renforcée par le transfert d'un proton à l'His 224 catalytique ; ce transfert est facilité par le catalyseur résidu acide Asp187 qui oriente le cycle imidazole de l'His224 pour neutraliser la charge générée sur elle. Ensuite, le proton est donné à l'oxygène de la liaison acyle sensible, ce qui entraîne le clivage et la libération d'un produit ester, tandis que la chaîne acyle est estérifiée en sérine nucléophile. Enfin, la molécule d'alcool estérifie le covalent lier et libère le produit ester.

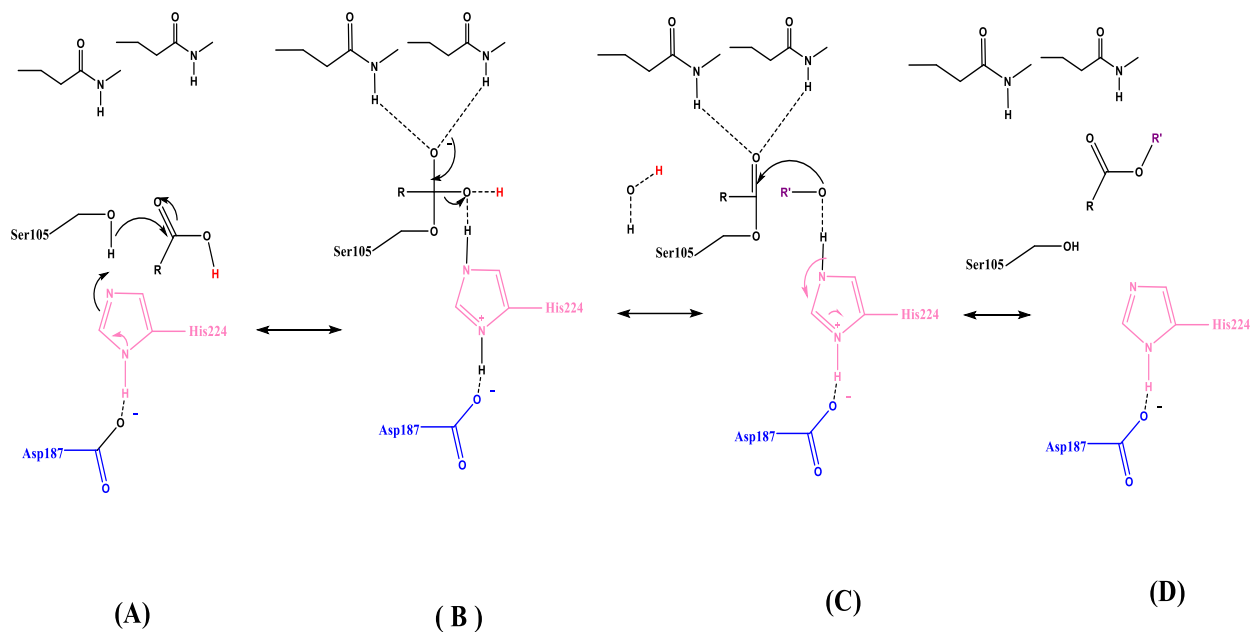


Schéma 5. Mécanisme catalytique de la réaction d'estérification par la lipase.

2. Mécanisme de la réaction de la transestérification par la CAL B

Les lipases peuvent catalyser la réaction de transestérification suivant le mécanisme Bi Bi ping pong⁷⁴(Schéma 6), il implique deux substrats et passe par deux intermédiaires tétraédriques. Par la suite l'énantiomère de l'ester est libéré en quittant l'enzyme dans sa forme originale. Ce mécanisme de la transestérification passe par deux étapes⁷⁵:

-La formation du complexe acyle-enzyme (l'acylation) : Dans cette étape la sérine 105 est déprotonée par l'azote N de H224, la charge positive du groupe imidazole de l'histidine est stabilisée par le partage d'un proton entre l'azote N γ de H224 et la fonction carboxylate de l'aspartate 187. L'ester substrat est attaqué par la fonction alcoolate (attaque nucléophile) de la sérine 105 et forme l'intermédiaire tétraédrique I chargé négativement est stabilisé par le trou oxyanionique (thréonine 40 et glutamine 106) et expulse le produit 1 (une molécule d'alcool est alors libérée R'OH)

-la désacétylation de l'enzyme : Dans cette étape, un 2^{ème} substrat (R''OH) est déprotonée par H224, l'acoolate formée du substrat fait l'attaque nucléophile au niveau du carbonyle de la sérine acylée et forme un second intermédiaire tétraédrique. Le produit se libère et la sérine récupère le proton porté par N de l'Histidine 224.

⁷⁴ Bousquet-Dubouch, M.-P. ; Graber, M. ; Sousa, N. ; Lamare, S. ; Legoy, M.-D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a ping pong bi bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochim. Biophys. Acta*. **2001**. 26, 90.

⁷⁵ Ottosson J., Fransson L., Hult K. (). Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Science*. **2002a**, 11,1462-1471.

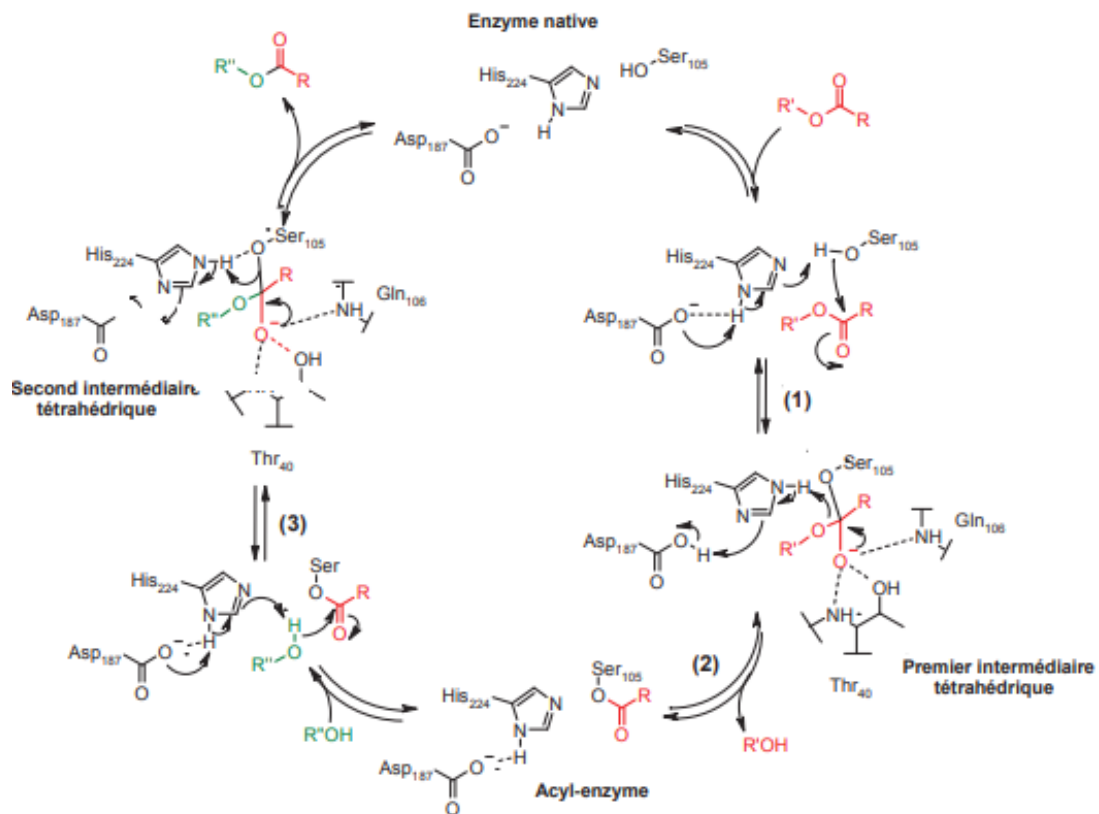


Schéma 6. Mécanisme de la transestérification enzymatique par la lipase de *Candida antarctica* type B

Introduction

Les tensioactifs sont des agents qui stimulent l'activité sur la surface. Ce sont des molécules amphiphiles qui ont une queue hydrophobe et une tête hydrophile. Selon la charge de cette dernière, ils peuvent être classés en quatre classes : tensioactifs non ioniques, tensioactifs anioniques, cationiques et amphotères (**Figure 14**).

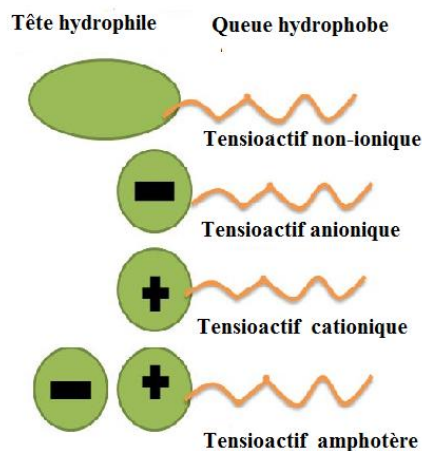


Figure 14. Les différentes classes de tensioactifs.

Les esters de sucres sont des biotensioactifs non ioniques obtenus à partir d'un sucre et d'un ou plusieurs acides gras. Ils possèdent une partie hydrophile, le groupement osidique, et une partie hydrophobe composée des chaînes grasses estérifiées sur les fonctions alcools du sucre. Ce caractère amphiphile permet aux esters de sucres d'être utilisés comme tensioactifs.

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

1. Synthèse par voie chimique

Les esters de sucre sont couramment synthétisés par la voie chimique sous des conditions extrêmes souvent en présence de catalyseurs alcalins ou acides et une pression et température élevées conduisant à des problèmes de sécurité et d'environnement et à des sous-produits indésirables.

a. Transestérification avec un catalyseur alcalin

C'est la méthode utilisée par Hass et al.⁷⁵ pour la transestérification à l'aide d'un catalyseur alcalin (K_2CO_3) dans le DMF ou le DMSO en choisissant l'ester méthylique d'acide gras comme

⁷⁵ Hass, H.B.; Snell, F.D.; York, SC.; and Osipow, L. I. to Sugar Research Foundation, Inc. . 1959, US PATENT 2893990.

agent acylant à une température élevée 90°C (**Schéma 7**), le produit a été commercialisé par Mitsubishi Kasei Food corporation en 1960.

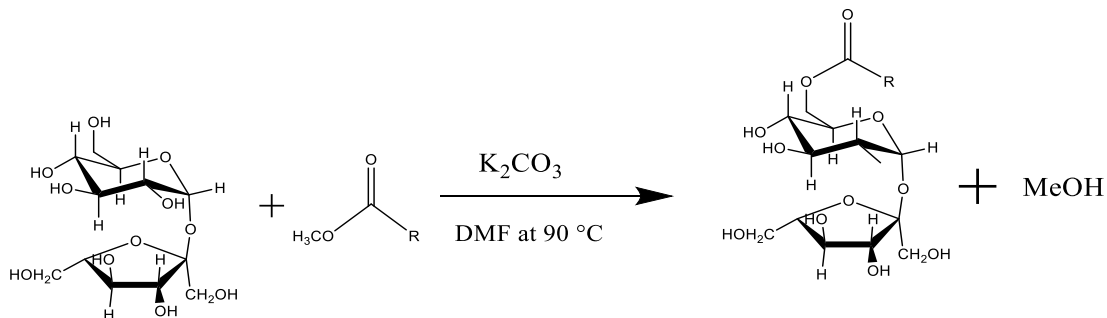


Schéma 7. Transestérification de sucrose par un catalyseur alcalin.

L'inconvénient de cette méthode est la toxicité du solvant utilisé, le coût de la purification et la faible sélectivité, en plus du méthanol produit qui doit être enlevé.

Dans le but de réduire la toxicité du solvant utilisé, ce processus a été modifié par plusieurs chercheurs, Descotes et al ont pu préparer des esters de saccharose en milieu aqueux ⁷⁶.

Lu Y et al⁷⁷ ont pu synthétiser les 1-*O* et 6-*O* mono-esters par transestérification du raffinose en milieu alcalin à 60°C sous l'irradiation ultrasonique comme méthode respectueuse de l'environnement (**Schéma 8**). Le rapport entre les deux produits est 2.2/2.6 et ils ont tous une bonne HLB avec une température d'ébullition similaire.

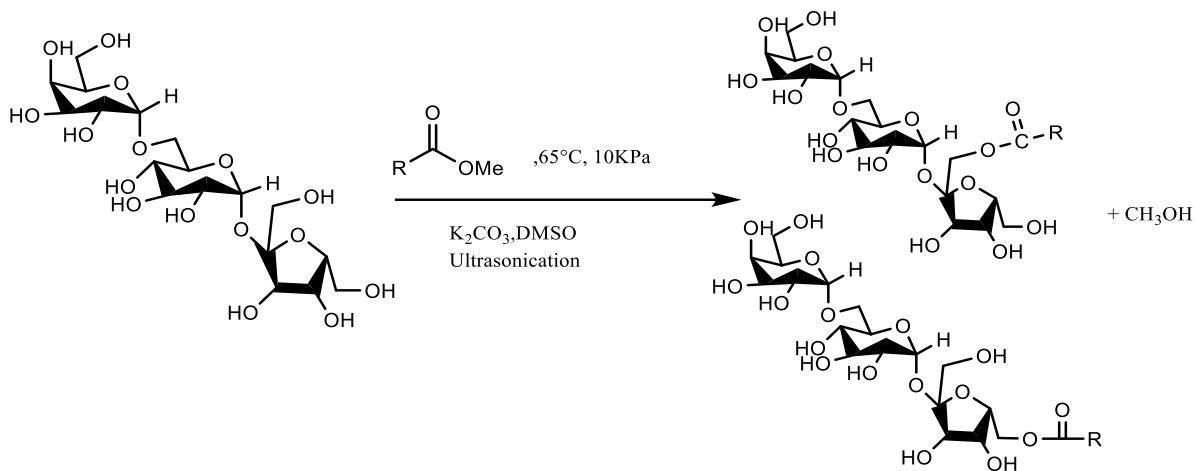


Schéma 8. Transestérification de raffinose sous l'irradiation ultrasonique par un catalyseur alcalin.

⁷⁶ Descotes, G.; Gagnaire G.; Bouchu, J.; Thevenet A.; Giry-Panaud, S.; Salanski, N.; Beniak, P.; Wherniche, S.; Porwanski, A.; Queneau, Y. Preparation of ester, ether, and acetals from unprotected sucrose. *POL J CHEM.* **1999**, 73, 1069-1077.

⁷⁷ Lu, Y.; Yan, R.; Ma, X.; & Wang, Y. Synthesis and characterization of raffinose fatty acid monoesters under ultrasonic irradiation. *European Food Research and Technology.* **2013**, 237, 237-244.

Cruces et al.^{78,79} ont pu performer la réaction de la transestérisation du saccharose en faisant réagir le laurate de vinyle dans le DMSO à 40°C en présence de l'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) comme catalyseur pour obtenir un rendement supérieur à 80% (**Schéma 9**).

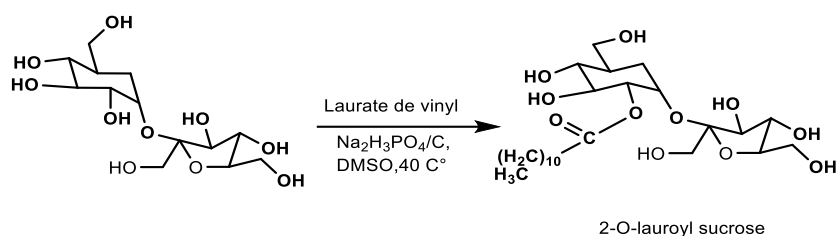


Schéma 9. Synthèse de 2-O-lauryl saccharose.

Des esters gras ont été préparés par Junistia et al.⁸⁰ avec une large gamme de degrés de substitution en faisant réagir l'amidon avec du laurate ou du stéarate de vinyle en présence de catalyseurs basiques (Na_2HPO_4 , K_2CO_3 et acétate de Na) dans le DMSO à 110°C (**Schéma 10**).

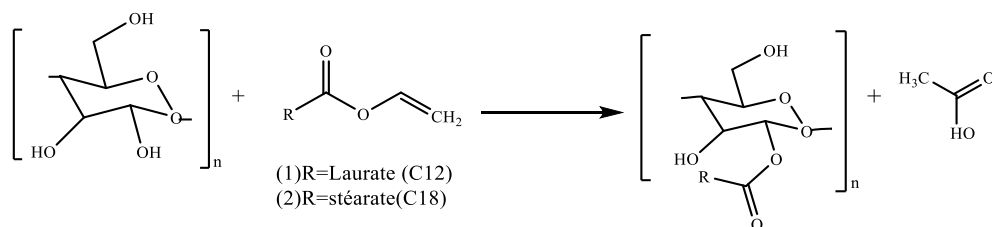


Schéma 10. Synthèse d'ester d'amidon d'acide gras.

Un nouveau procédé plus économique consiste à utiliser le savon comme solubilisant et catalyseur en raison de l'influence du cation sur le rendement de la réaction d'estérification. Le sel d'acide stéarique a été utilisé pour obtenir le monoester palmitate⁸¹ la réaction est sous des conditions basiques à une température très élevée (**Schéma 11**).

⁷⁸ Cruces, M. A.; Ploua, F.J.; Ferrer, M.; Bernabé, M.; & Ballesteros, A. Improved Synthesis of Sucrose Fatty Acid Monoesters. *J Amer Oil Chem Soc* .**2001**,78,541–546.

⁷⁹ Plou, F.J.; Pastor, E.; Cruces M.A.; Ferrer, M.; Ballesteros, A., A Procedure for the Selective Synthesis of 2-O-Lauroylsucrose, Spanish Patent .**1998**.9,802,086.

⁸⁰ Junistia, L.; Sugih, A. K.; Manurung, R.; Picchioni, F.; Janssen, L. P. B. M., & Heeres, H. J. Synthesis of Higher Fatty Acid Starch Esters using Vinyl Laurate and Stearate as Reactants. *Starch-Starke*. **2008**,60, 667-675.

⁸¹ Fitremann, J.; Queneau, Y.; Maître, J.-P.; & Bouchu, A. Co-melting of solid sucrose and multivalent cation soaps for solvent-free synthesis of sucrose esters. *Tetrahedron Letters*.**2007**,48, 4111–4114.

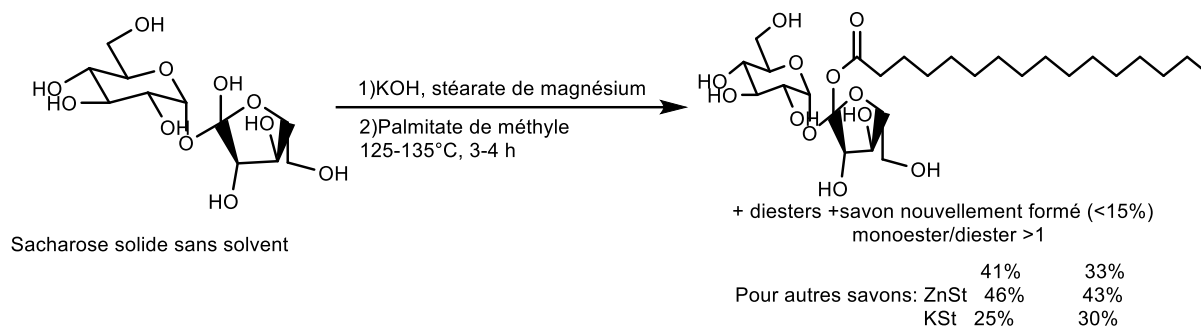


Schéma 11. Transestérification de saccharose sans solvant.

b. Estérification en présence de n-Bu Li

Pfeffer et al⁸² ont pu contrôler l'acylation de tétra-*o*-benzyl-2,3,4,6-tétrabenzyl-D-glucopyranose en favorisant la synthèse de l'un des anomères des esters en fonction du solvant choisi (THF ou benzène) en faisant réagir le chlorure d'acide sur le sel de lithium du tétrabenzyl-2,3,4,6-D-glucopyranose.

Pour la préparation de tétra-*O*-benzyl-2,3,4,6-1-*O*-acyle- α -D-glucopyranose, l'estérification se déroule dans le THF et pour l'obtention de son anomère β , les conditions sont les mêmes à l'exception que le solvant est le benzène (**Schéma 12**).

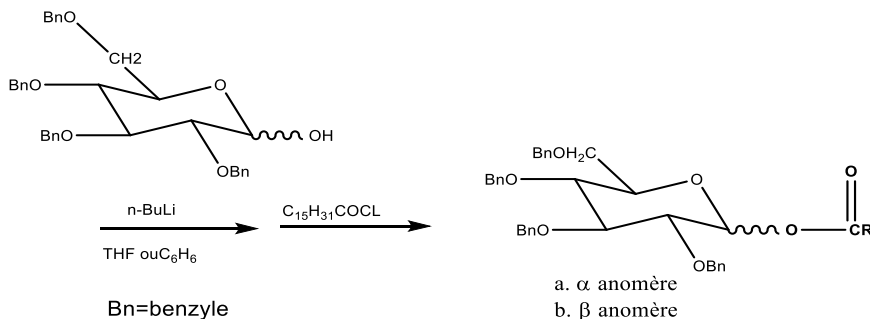


Schéma 12. Estérification à l'aide du n-BuLi.

c. Estérification par la réaction Mitsunobu

Une étude a été faite par Besset et al⁸³ sur la réactivité du raffinose et du mélézitose dans les conditions de la réaction de Mitsunobu pour la synthèse d'esters d'acide gras à partir de trisaccharide (**Schéma 13**). Les résultats montrent que le mélézitose aboutit à l'obtention des esters avec une substitution préférentielle selon l'ordre de réactivité aboutissant à la formation

⁸² Pfeffer, P. E.; Rothman, E. S.; Moore, G. G. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 2925.

⁸³ Besset, C.; Chambert, S.; Queneau, Y.; Kerverdo, S.; Rolland, H.; & Guilbot, J. Reactivity of melezitose and raffinose under Mitsunobu reaction conditions. *Carbohydrate Research*. **2008**, 343, 929-935.

des monoesters (1) et (2) correspondant à l'acylation en position 6 ou 6'' et à la formation du 6, 6''-diester (3) et 6, 6', 6''-triesters (3). Sous les mêmes conditions le raffinose est plus susceptible de se déshydrater pour former principalement le 3'', 6''-anhydrorafinose (**Schéma 14**). La sélectivité pour les groupes hydroxyles primaires dans les conditions de Mitsunobu était attendue en tenant compte de la sensibilité de cette réaction à encombrement stérique.

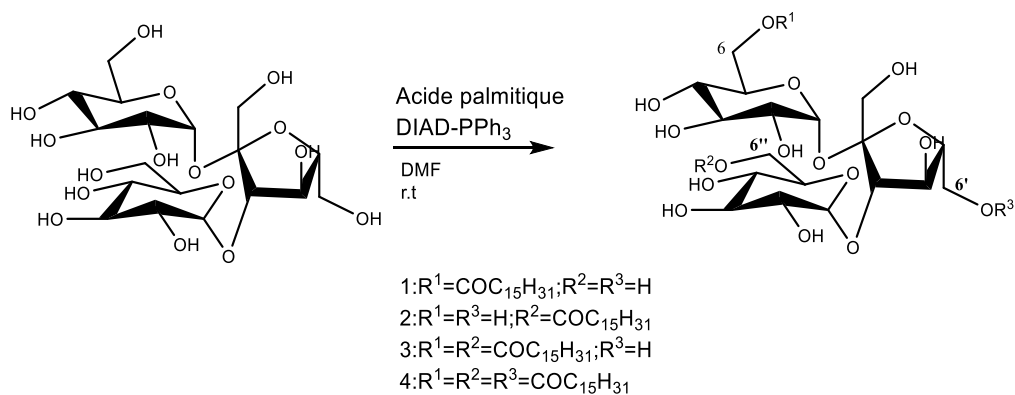


Schéma 13. Synthèse de palmitate du mélézitose

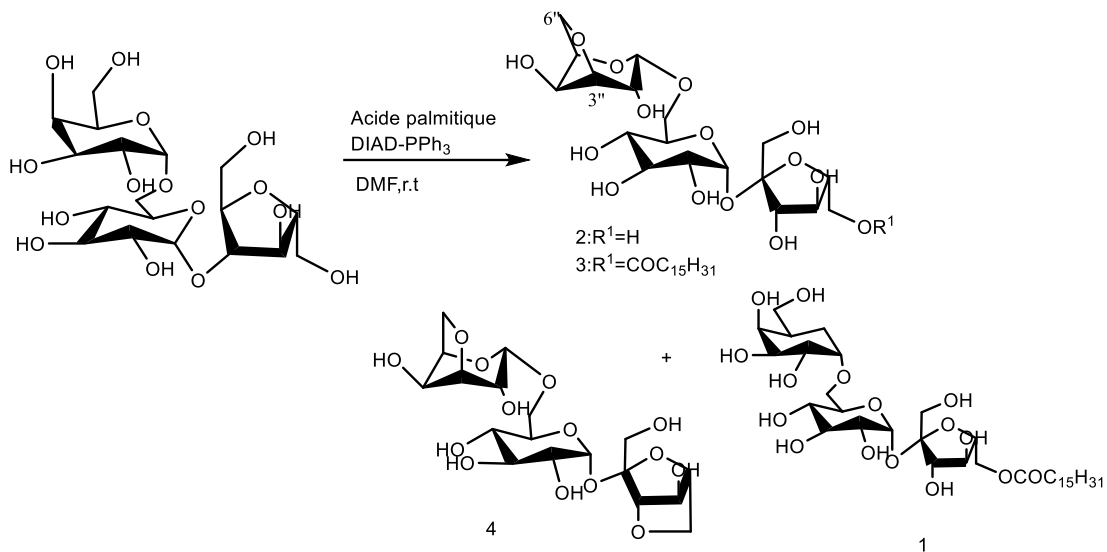


Schéma 14. Dérivés du raffinose obtenus de la réaction avec l'acide palmitique.

Molinier et al.⁸⁴ ont estérifié le saccharose par des acides gras sous les conditions de la réaction de Mitsunobu, le produit majoritaire est un monester ainsi que des diesters et des sous-produits comme des dérivés anhydrosucrozes (**Schéma 15**).

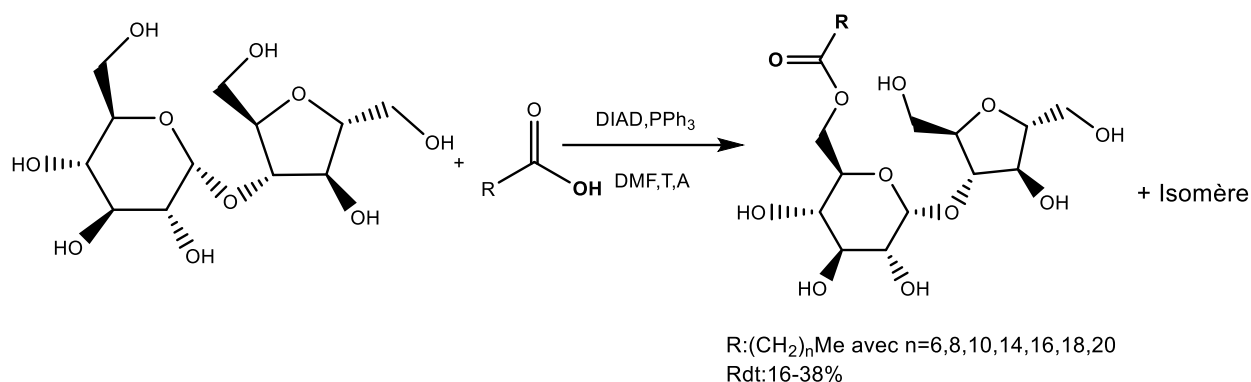
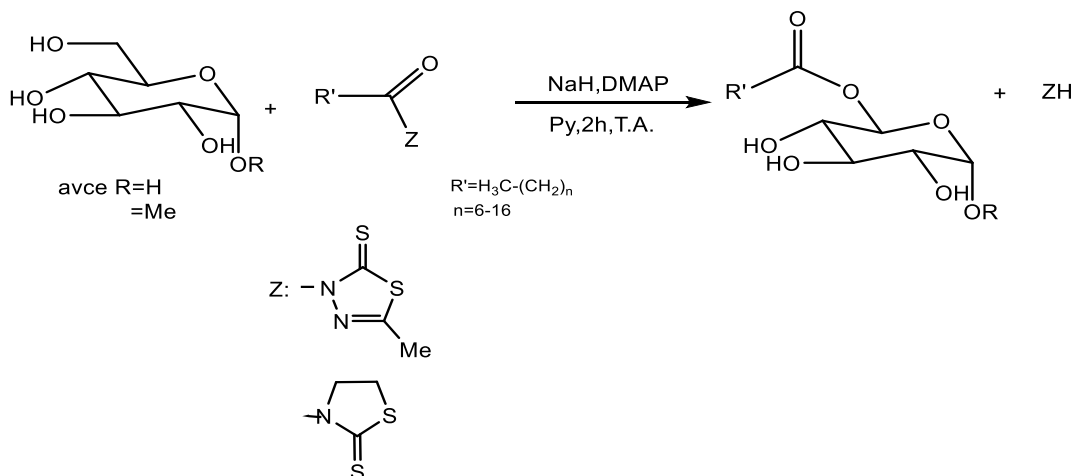


Schéma 15 : Estérification du saccharose dans les conditions de Mitsunobu.

d. Estérification en utilisant les esters actifs

Plusquellec et Baczko^{85,86} ont réalisé l'acylation régiosélective des glycopyranosides non protégés en utilisant les *N*-acyl-thiazolidine-2-thiones (**Schéma 16**) et les 3-acyl-5-méthyl-1,3,4-thiadiazole 2-(3*H*)-thiones comme réactifs d'acylation en présence d'hydrure de sodium et de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) pour obtenir des dérivés 6-*O*-acylés avec des rendements élevés.



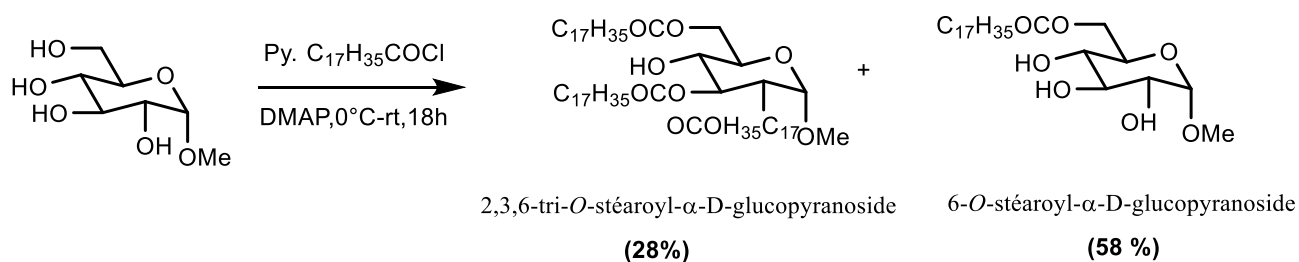
⁸⁴ Molinier, V. ; Fitremann, J. ; Bouchu, A. ; Queneau, Y. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2004**, 15, 1753.

⁸⁵ Plusquellec, D. ; Bazko. *Tetrahedron. Letters*. **1987**, 28, 3809

⁸⁶ Baczko, K. ; & Plusquellec, D. Sugar chemistry without protecting groups-III. A facile chemical synthesis of 6-*O*-acyl-D-glycopyranoses and methyl-6-*O*-acyl-d-glycopyranosides. *Tetrahedron*. **1991**, 47, 3817–3828.

Schéma 16. Acylation régiosélective de glycopyranosides.

Sanallah et al.⁸⁷ ont réalisé l'estérification du méthyl- α -D-glucopyranoside à basse température en faisant réagir une solution de méthyl- α -D-glucopyranoside dans la pyridine anhydre avec le chlorure de stéaryle et DMAP comme catalyseur. La réaction a montré une sélectivité à la position primaire C-6 et fournit un monoester le 6-*O*-stéaroyl- α -D-glucopyranoside avec un rendement de 58% et un triester, le 2,3,6-tri-*O*-stéaroyl- α -D-glucopyranoside avec 28% de rendement. Le rendement faible est dû à la formation des mélanges inséparables (14% des sous-produits)

**Schéma 17.** Estérification de méthyl α -D-glucopyranoside.

L'un des inconvénients majeurs de la synthèse chimique est la formation des produits secondaires et la nécessité de passer par plusieurs étapes de purification afin d'isoler les esters de sucres. La synthèse enzymatique par l'utilisation des biocatalyseurs que sont les enzymes, est une alternative plus verte pour l'obtention de tels composés.

2. Synthèse par voie enzymatique

La synthèse enzymatique des esters de sucre est une nouvelle approche alternative, la plus répandue ces dernières années. Contrairement au processus chimique, la catalyse enzymatique offre une haute sélectivité, la synthèse biocatalytique a reçu une grande attention en raison de l'amélioration de la durabilité de la réaction : pression et température proche à la température ambiante, l'absence de catalyseur alcalin ou acide.

⁸⁷ Sanallah, A.F.M.; Bhuiyan, M.M.H.; Matin, M.M. Stearoyl glucopyranosides: Selective synthesis, PASS analysis, in vitro antimicrobial, and SAR study. *Egyp. J. Chem.* **2022**, *65*, 329–338.

Depuis la découverte de l'estérification des sucres catalysée par la lipase dans des solvants organiques⁸⁸ dans les années 1980, la synthèse biocatalytique des esters de sucres a été largement étudiée. Cette méthode de synthèse a l'avantage de produire des produits régio-et stéréospécifiques dans des conditions de réaction modérées^{89, 90}.

Cependant, des barrières entravent l'application des lipases dans la production industrielle des esters de sucres. Le problème majeur est la non-solubilité de la lipase en milieu non-aqueux. La solubilité des substrats (polaires et non polaires) est également à prendre en compte.

Malgré la limitation d'application des enzymes dans l'industrie, elles sont largement utilisées dans la synthèse organique, de nombreux ouvrages ont été publiés (**Tableau 2**).

⁸⁸ Liu, Q.B.; Michiel, H.; Janssen, A.; Rantwijk, F.V. and Sheldon, R.A. Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations. *Green Chemistry*.**2005**,*7*, 39-42.

⁸⁹ Wei, Y.A.; Zhang, Y. and Yao, P.J. Enzymecatalyzed regioselective synthesis of sucrose vinyl adipoyl ester by an immobilized proleather. *Journal of Guangxi Normal University: Natural Science Edition*. **2009**, *34*, 484-490.

⁹⁰ Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A.P.G. and Klivanov, A.M. Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *Journal of the American Chemical Society*, **1988**,*110*, 584-589.

Tableau 2. Synthèse enzymatique des esters de sucres par des lipases dans des solvants organiques.

Substrats		Enzymes	Solvant	T (h)	Produits	Rdt	Références
Acyle accepteur	Acyle donneur						
α -D-glucose 1,2 : 3,5	Acid laurique	Lipoprotéine	tert-butanol	24h	Esters de glucose	97%	Klibanov et al. ⁹¹
bis(phenylboronate)	Huile d'olive	Lipase de				42%	
	Huile de soja	<i>Pseudomonas sp</i>				32%	
	Huile de maïs					41%	
	Huile de noyau d'abricot					54%	
	Huile de coton					47%	
D-glucose	Acétate de vinyle	PLL	Diisopropyleéther	72	6-O-acetylglucose	62%	Sharma et al. ⁹²
Glucose	Acide laurique	Novozyme 435	Acétone	72	6-O-lauroylglucose	98%	Arcos et al. ⁹³
D-glucose	Acide stéarique	Lipozyme TM20 <i>Mucor miehei</i>	Heptane	46	1-ou 6-O-stearate glucose	93%	Oguntimein et al. ⁹⁴
D-fructose	Acide stéarique	Lipozyme SP 382	tert-Butanol	46	2- ou 6-O-stearate fructose	86%	Chang et al. ⁹⁵
D-fructose	Acide oléique	Lipozyme <i>Rhizomucor miehei</i>	2-Me-2-butanol	26	Fructose oleate	83%	Khaled et al. ⁹⁶
D-fructose	Acide stéarique	LipozymeIM60	n-Heptane	12	Fructose monostearate	40%	Schlotterbecket al ⁹⁷

⁹¹ Ikeda, I.; and Klibanov, A. M. Lipase-catalyzed acylation of sugars solubilized in hydrophobic solvents by complexation. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**,42,788–791.

⁹² Sharma, A.; and Chattopadhyay, S. Lipase catalysed acetylation of carbohydrates. *Biotechnol. Lett.* **1993**,15,1145–1146.

⁹³ Arcos, J. A.; Bernabe, M. and Otero, C. Quantitative enzymatic production of 6-O-acylglucose esters. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**,57,505–509.

⁹⁴ Oguntimein, G. B.; Erdmann, H. and Schmid, R. D. Lipase catalyzed synthesis of sugar ester in organic solvent. *Biotechnol. Lett.* **1993**,15,175–180.

⁹⁵ Chang, S. W. and Shaw, J. F. Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. *New Biotechnol.* **2009**,26,109–116.

⁹⁶ Khaled, N.; Montet, D.; Pina, M. and Graille, J. Fructose oleate synthesis in a fixed catalyst bed reactor. *Biotechnol. Lett.* **1991**,13,167–172.

		<i>Rhizomucor mieheir</i>)					
D-fructose	Acide linoléique	NTG lipase	<i>tert</i> -Butanol	24	Mixture of esters	71.3%	Ku and Hang ⁹⁸
Saccharose		<i>Byssochlamys fulva</i>			Mixture of esters	36.6%	
Saccharose	Acide laurique	Lipolase100L	<i>tert</i> -amyl	24/48	6- <i>O</i> -lauroylsucrose	70%	Ferrer et al
	Acide palmitique	<i>Humicola lanuginos</i>)	Alcool : DMSO (4 :1,v/v)		6- <i>O</i> -palmitoyl sucrose	80%	
D-fructose	Acide palmitique	Novozyme SP 435 <i>C. antarctic</i>)	Acetone	72	6- <i>O</i> -palmitoyl- α -D- fructopyranose	38.8%	Chaiyaso et al. ⁹⁹
Glucose	Acide laurique	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>tert</i> -amyl Alcool:DMSO (4:1, v/v)	20	6- <i>O</i> -lauroylglucose	98%	Ferrer et al. ¹⁰⁰

⁹⁷ Schlotterbeck, A.; Lang, S.; Wary, V. and Wagner, F. Lipase catalyzed monoacylation of fructose. *Biotechnol. Lett.* **1993**,15,61–64.

⁹⁸ Ku MA., Hang YD. Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssochlamys fulva*. *Biotechnol. Lett.* 1995.17, p. 1081–1084.

⁹⁹ Chaiyaso, T.; H-kittikun, A. and Zimmermann, W. Biocatalytic acylation of carbohydrates with fatty acids from palm fatty acid distillates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**,33,338–342.

¹⁰⁰ Ferrer, M.; Solvieri, J.; Plou, F. J.; L'opez-Cort'es, N.; Reyes-Duarte, D.; Christensen, M.; Copa-Patiño, J. L. and Ballesteros, A. Synthesis of sugaresters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enz. Microb. Technol.* **2005**,36,391–398.

Les paramètres réactionnels mis en jeu

Dans le but de performer la réaction d'estérification enzymatique des sucres dans le milieu organique, plusieurs travaux de recherches ont été menés prenant en considération la sélectivité de l'enzyme aux substrats, sa stabilité au cours de la réaction et la solubilité des réactifs.

a. Effet de La nature de lipase

Toutes les lipases ont la capacité de catalyser la réaction d'estérification, cependant celles immobilisées sont les plus actives et stables par rapport aux lipases libres. Redmann et al.¹⁰¹ ont montré que l'estérification directe du glucose par l'acide gras sous les mêmes conditions aboutissait à des rendements de conversion de l'ordre de 55 % dans le cas d'enzymes immobilisées alors que la réaction n'a pas eu lieu lorsqu'on utilise des enzymes libres. Cela a été expliqué par la stabilité thermique¹⁰² de l'enzyme immobilisée et la rétention de l'eau nécessaire à l'activité catalytique par le support^{103,104}; en plus de la surface d'échange disponible dans l'enzyme immobilisée par rapport à l'enzyme libre¹⁰⁵.

La nature des lipases joue un rôle primordial dans le rendement. Les lipases de *Candida antarctica* se sont révélées stables et hautement sélectives pour de nombreuses réactions¹⁰⁶.

La lipase obtenue à partir de *Candida antarctica* type B, également connue sous le nom de CAL B, est la lipase la plus utilisée dans les réactions bio-catalysées¹⁰⁷. La lipase pancréatique porcine (PPL) est la moins chère commercialement, une enzyme non microbienne, disponible. Elle présente une thermostabilité élevée et une activité dans les milieux réactionnels anhydres. Néanmoins, les préparations enzymatiques sont souvent impures, contenant diverses hydrolases, comme les estérases, la trypsine et d'autres protéases¹⁰⁸.

¹⁰¹ Redmann, I.; Montet, D.; Bonnot, F.; Pina, M. et Graille, J. Fructose mono- and polycaprylate purification by molecular distillation. *Biotechnol. Tech.*, **1995**,9, 123-126.

¹⁰² Malcata, F.X.; Reyes, H.R.; Garcia, H.S.; Hill, C.G. et Amundson, C.H. Enzyme Microb. Technol., **1992**, 14,6, 426-446.

¹⁰³ Halling, P.J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in non conventionnai media: theory, tests and recommendatios for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, 16, 178-206.

¹⁰⁴ Garcia, T.; Martinez, M. et Aracil, J. Enzymatic synthesis of myristyl myristate. Estimation of parameters and optimization of process. *Biocatal. Biotrans.* **1996**, 14, 67-85.

¹⁰⁵ Akoh, C.C,et Mutua, L.N. Synthesis of alkylglycoside fatty acid esters: Effect of reaction parameters and theincorporation of n-3 polyunsaturated fatty acid. *Enzyme Microb. Technol*,**1994** ,16, 115-119.

¹⁰⁶ Jensen, R.G. ; Galluzzo,D.R .; Bush, V.J. La sélectivité est une caractéristique importante des lipases (acylglycéról hydrolases). *Biocatalyse*.**1990** ,3, 307-316.

¹⁰⁷ McCabe, R.W.; and Taylor, A. An investigation of the acryl-binding site of *Candida antarctica* lipase B. *Enz. Microb. Technol.***2004**,35,393-398.

¹⁰⁸ Jaeger, K. E.; and Eggert, T. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin.Biotechnol.* **2002**,13,390-397.

La catalyse enzymatique de l'estérification directe de fructose en présence de l'acide palmitique à 40 °C dans L'EMC comme solvant par différents types de lipases (Novozym 435 de *C. antarctica B*, SP 382 de *C. antarctica B* et Lipozyme IM de *R. miehei*.) a été évaluée¹⁰⁹. L'étude cinétique de cette réaction montre que les rendements les plus élevés (53%) de palmitate de fructose ont été obtenus avec la lipase SP 435 immobilisée de *C. antarctica B* et 44% avec la lipase SP 382 immobilisée également de *C. antarctica B*. Des rendements considérablement inférieurs (30%) ont été obtenus avec la lipase immobilisée IM RM de *R. miehei* (**Figure 15**).

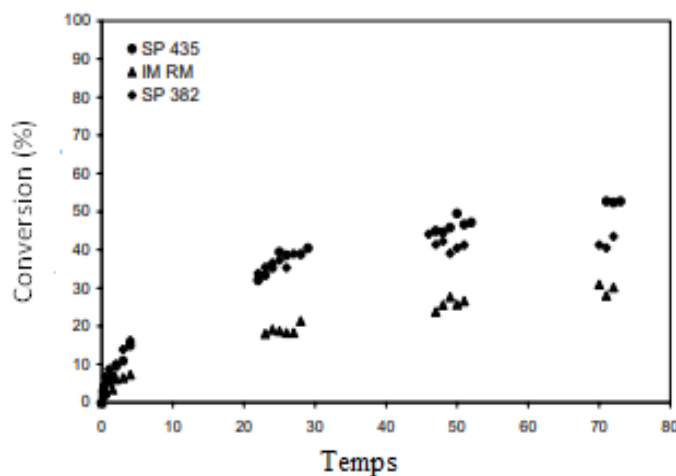


Figure 15. Effet du type de lipase sur le rendement dans la réaction d'estérification de fructose. lipase *Rhizormucor miehei* (RML), lipase pancréatique porcine immobilisée (PPL) et immobilisée, Lipase de *Candida rugosa* (CRL).

Neta et al.¹¹⁰ ont évalué la synthèse d'esters de sucres par la CAL B et la PPL en utilisant plusieurs combinaisons de sucres (fructose, saccharose et lactose), d'acides gras (oléique et acides linoléiques) et de solvants (éthanol et acétate d'éthyle). Généralement, l'utilisation de la CAL B a fourni des rendements d'estérification plus élevés et les meilleurs résultats ont été trouvés pour le lactose, l'acide linoléique et l'éthanol (83,5%). En utilisant la PPL, les rendements d'estérification les plus élevés (47,6%) ont été trouvés pour les esters de saccharose.

Trois lipases ont été testé dans la réaction de transestérification du glucose par l'ester vinylique d'acide palmitique comme agent acylant dans le liquide ionique 1-butyl-3-méthylimidazolium

¹⁰⁹ Šabeder, S.; Habulin, M.; & Knez, Ž. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering*, **2006**, 77, 880–886.

¹¹⁰ Neta, N. S.; Teixeira, J. A.; & Rodrigues, L. R. Sugar Ester Surfactants: Enzymatic Synthesis and Applications in Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2014**, 55, 595–610.

trifluoromethane-sulfonate ([Bmim][TfO])¹¹¹. Les résultats de cette étude montrent aussi l'efficacité de la CAL B qui donne le rendement le plus élevé (31.6%) et la plus haute stabilité du système par rapport aux autres enzymes (**Figure 16**). Toutes ces enzymes ont tendance à catalyser sélectivement l'estérification sélectionnée de la position 6- O-glucose.

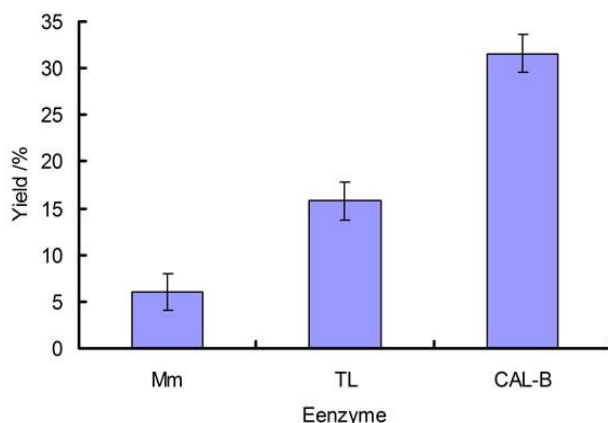


Figure 16. Effet de l'enzyme sur la réaction d'estérification de glucose.

L'influence de la nature de la lipase a été bien confirmée dans plusieurs recherches, Xiao-Sheng Lin et al.¹¹² ont examiné six lipases commerciales, dont la CAL B, la TLL, la PEL, la RCL, la AOL et la ANL pour la catalyse de la synthèse de laurate de glucose dans le 2M2B en comparant la conversion obtenue avec l'ajout de 0,5 g de chaque enzyme (**Figure 17**).

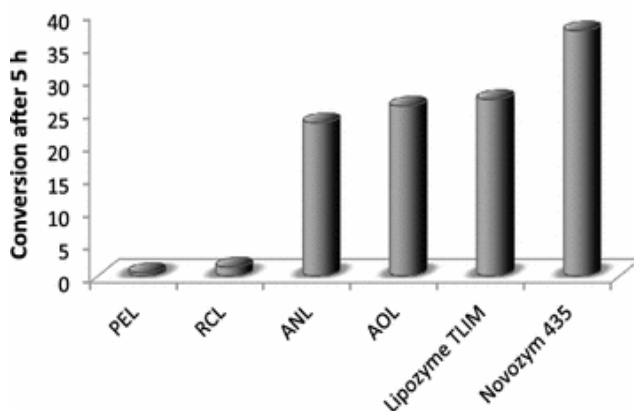


Figure 17. Conversions obtenues par différentes lipases pour catalyser la synthèse du laurate de glucose en 2M2B.

Conditions de réaction : 0,27 g de glucose (équivalent à 0,3 mol-l du système réactionnel), laurate de vinyle 0,3 M, 5,0 ml de 2M2B, 1,0 g de tamis moléculaire, 0,5 g d'enzyme, 300 tr / min, 40 ° C.

¹¹¹ Liang, J. ; Zeng, W. ; Yao, P. ; Wei, Y. Lipase-catalyzed regioselective synthesis of palmitoylglucose ester in ionic liquids, *Adv. Biol. Chem.* **2012**, 2, 226–232.

¹¹² Lin, X.-S.; Zhao, K.-H.; Zhou, Q.-L.; Xie, K.-Q.; Halling, P. J.; & Yang, Z. *Aspergillus oryzae* lipase-catalyzed synthesis of glucose laurate with excellent productivity. *Bioresources and Bioprocessing.* **2016**, 3(1).

Clairement, la CAL B a donné la conversion la plus élevée, suivi par Lipozyme TLL, AOL et ANL, alors qu'une quantité négligeable du produit d'ester de sucre a été produite par RCL et PEL.

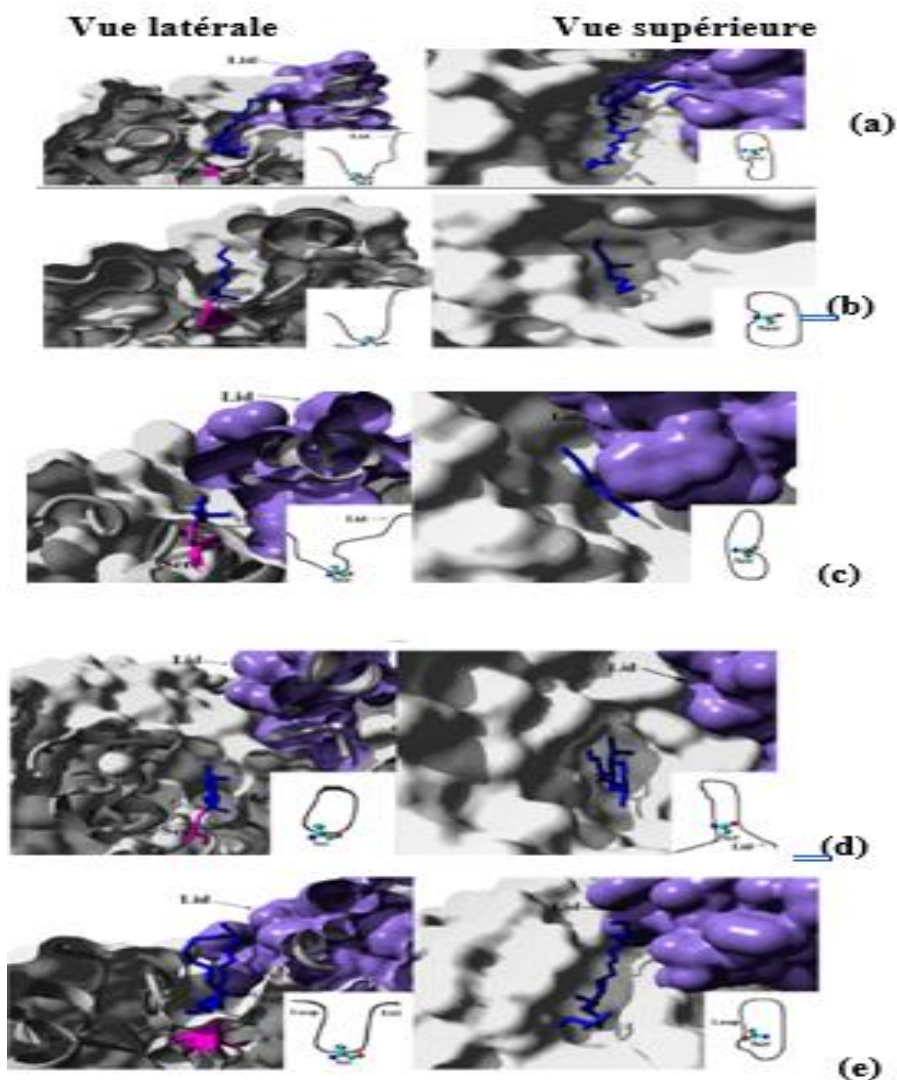


Figure 18. Formes de cinq types de site de liaisons des lipases comme identifiés par Pleiss & Fischer¹¹³ : (a) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1¹¹⁴ (b) lipase de *Candida antarctica* lipase B¹¹⁵ (c) lipase de *Rhizomucor miehei*¹¹⁶, (d) Lipase de *Candida rugosa*¹¹⁷, (e) lipase pancréatique humaine.

¹¹³ Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R.D. Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids*. **1998**, 93, 67–80.

¹¹⁴ Nardini, M.; Lang, D.A.; Liebeton, K.; Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 31219–31225.

¹¹⁵ Uppenberg, J.; Ohmer, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G.J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T.A. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*. **1995**, 34, 16838–16851.

La forme du site de liaison reflète la spécificité du substrat. Les lipases ont un long site de liaison d'acide gras scissile, hydrophobe situé à l'intérieur de la poche de liaison à la paroi d'un entonnoir de liaison ou dans une crevasse ou un tunnel. De nombreuses études ont montré que la substitution d'acides aminés à l'entrée des sites actifs enzymatiques modifiait la sélectivité du substrat enzymatique¹¹⁸. L'interaction de la zone hydrophobe de la poche de liaison au substrat dans les lipases est différente en taille, forme, profondeur, et propriétés physico-chimiques. Cinq types de sites de liaisons ont été identifiés par Pleiss et Fischer¹¹³ par simulation moléculaire (**Figure 18**).

b. Effet de la température

La solubilité des réactifs et même de produit dépend de solvant choisi et de la température, qui facilite la diffusion des substrats vers l'enzyme. Yan et al ont réussi à synthétiser l'ester du glucose à chaîne courte avec une conversion obtenue à 35°C et 40°C. À cette plage de température, le produit peut être retiré par précipitation en raison de sa faible solubilité. D'autre part, si des acides gras à longue chaîne sont utilisés, la température peut être augmentée jusqu'à 60 °C¹¹⁹ cela signifie que la température optimum dépend de la longueur de chaîne de substrat.

Cependant, la température affecte la stabilité de biocatalyseur vu sa nature protéique qui est dégradable par une température élevée ce qui provoque la chute de rendement. Elle affecte aussi son activité catalytique, tout enzyme a une température optimum au niveau de laquelle, le rendement est très élevé.

Plusieurs travaux ont montré que même la sélectivité de lipase dépend de la température. Faber et al¹²⁰ ont constaté que l'énantiosélectivité de la lipase de *Pseudomonas* sp lors de la synthèse d'alcools primaires hétérocycliques par transestérification est liée à la température, selon eux plus la température augmente plus la sélectivité diminue.

¹¹⁶ . Derewenda, U.; Brzozowski, A.; Lawson, D.M.; Derewenda, Z.S. Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in. *Biochemistry*.**1992**, 31, 1532–1541.

¹¹⁷ Cygler, M.; Schrag, J.D.; Bouthillier, F.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R.J.; Serreq, A.N.; Gupta, A.K.; Rubin, B. A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J. Am. Chem. Soc.***1994**, 116, 3180–3186.

¹¹⁸ Panizza, P.; Cesarini, S.; Diaz, P.; Rodríguez Giordano, S. Saturation mutagenesis in selected amino acids to shift *Pseudomonas* sp. acidic lipase Lip I.3 substrate specificity and activity. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 1330–1333.

¹¹⁹ Yan, Y.; Bornscheuer, U. T.; Stadler, G.; Lutz-Wahl, S.; Reuss, M.; and Schmid, R. D. Production of sugar fatty acid esters by enzymatic esterification in a stirred-tank membrane reactor: Optimization of parameters by response surface methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, 78, 147–153.

¹²⁰ Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*. 4th ed. Springer. **2000**, Berlin, Germany.

Selon une étude faite par Arcos et al.¹²¹ Sur l'impact de la température dans un intervalle allant de 5 à 60 °C sur la synthèse sélective de 1,6-diacyl fructofuranoses dans l'acétone avec la Novozym 435, une faible température dirige la réaction vers la formation de diesters alors qu'une augmentation de la température initiale favorise la synthèse des monoesters.

c. Effet de solvant

Les effets favorables des solvants organiques entraînent la solubilisation des substrats polaires et non polaires et une meilleure affinité du substrat pour la formation du complexe enzyme/substrat. La présence de solvant organique dans le site de liaison peut induire des changements de la conformation favorables des composants structurales impliqués dans le mécanisme catalytique structural.

L'influence des solvants organiques dans la synthèse enzymatique a été largement étudiée¹²² (**Schéma 18**). Les différences rapportées dans l'activité enzymatique dans les réactions ont été attribuées aux différences d'extension d'hydratation de l'enzyme^{123,124}.

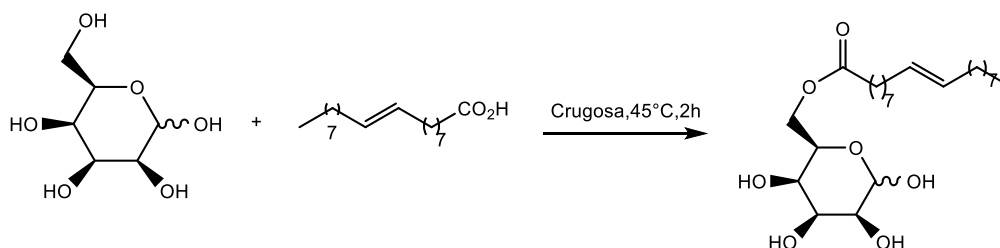


Schéma 18 : Influence de la nature du solvant.

Les lipases se comportent dans le milieu organique avec un niveau de résistance différent¹²⁵. Il est à noter que non seulement le coefficient de partage Log P affecte l'activité catalytique mais aussi des effets cumulatifs de divers paramètres comme la constante diélectrique, le moment dipolaire, la polarisabilité¹²⁶.

¹²¹ Arcos, J.A.; Bernabé, M., & Otero, C. Quantitative enzymatic production of 1,6-diacyl fructofuranoses. *Enzyme and Microbial Technology*. **1998**, 22, 27–35.

¹²² Vitisant, T.; Chulalaksananukul, W.; Piumthongkum, R.; Sinbuthong, N.; Mekthong, P.; Chulalaksananukul, S. *Int. J. Sci. Technol*, **2012**, 2, 2224.

¹²³ Zaks, A.; Klivanov, A.M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*. **1984**, 224, 1249–1251.

¹²⁴ Divakar, S.; Manohar, B. Use of lipases in the industrial production of esters. *Industrial Enzymes*. **2007**, 283–300.

¹²⁵ Zhang, K.P.; Lai, J.Q.; Huang, Z.L.; Yang, Z. Penicillium expansum lipase catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. *Bioresour Technol*. **2011**, 102, 2767–72.

¹²⁶ Khmel'nitsky, Y.L.; Levashov, A.V.; Klyachko, N.L.; Martinek, K. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb Technol*. **1988**, 10, 710–24.

Les solvants hydrophobes donnent des vitesses de réaction plus élevés que les solvants hydrophiles^{127,128}, l'hydrophobicité des solvants est déterminée par le coefficient de partage Log P qui affecte la flexibilité de l'enzyme. Il a été démontré que les faibles activités dans les solvants organiques sont dues à la flexibilité restreinte des protéines dans ces solvants¹²⁹. Trodler et al.¹³⁰ ont démontré par simulation MD que la flexibilité de la lipase B de *Candida antarctica* diminue avec l'augmentation des valeurs log P des solvants organiques. Bien que l'hydrophobicité garde l'enzyme intacte, un solvant fortement hydrophobe n'est pas un bon choix vu que les sucres y sont moins solubles¹³¹ (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Activité enzymatique et la solubilité du glucose et l'hydrophobicité du solvant

Solvants	Activité enzymatique ($\mu\text{ mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$)	Solubilité de glucose (mM)	Activité résiduelle (%)	Hydrophobicité du solvant Log P
DMSO	0	29	0	-1.3
Dioxane	1.1	7.5	53	-1.1
DMF	0	12	0	-1.0
Acétonitrile	0	1.1	27	-0.33
Acétone	3.0	2.6	56	0.23
THF	1.6	2.1	46	0.49
Pyridine	0	134	0	0.69
<i>t</i> -Butanol	3.7	12	75	0.8
<i>t</i> -Pentanol	3.6	10	71	1.4
Toluene	0	0.6	54	2.5
Hexane	0	0	80	3.5

¹²⁷ van Tol, J.B.; Stevens, R.M.; Veldhuizen, W.J.; Jongejan, J.A.; Duine, J.A. Do organic solvents affect the catalytic properties of lipase? Intrinsic kinetic parameters of lipases in ester hydrolysis and formation in various organic solvents. *Biotechnol Bioeng.* **1995**, 47,71–81.

¹²⁸ Liu, Y.; Zhang, X.; Tan, H.; Yan, Y.; Hameed, B. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. *Process Biochem.* **2010**, 45, 1176–1180.

¹²⁹ Almarsson, O.; Klivanov, A.M. Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotechnol Bioeng.* **1996**, 49, 87–92.

¹³⁰ Trodler, P.; Pleiss, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct. Biol.* **2008**, 8-9.

¹³¹ Degn, P.; & Zimmermann, W. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnology and Bioengineering.* **2001**,74, 483–491.

Cependant, une quantité d'eau est nécessaire pour la catalyse de l'enzyme, l'ajout de l'eau dans la suspension enzymatique dans les solvants anhydres améliore considérablement l'activité enzymatique parce qu'elle permet de maintenir la structure protéique et la fonction de l'enzyme¹³².

d. Effets de l'activité de l'eau

Dans la réaction d'estérification de sucre catalysée par la lipase, l'activité de l'eau dans le milieu réactionnel non aqueux est importante. La formation d'ester elle-même ne nécessite pas d'eau, mais une quantité minimum d'eau est nécessaire pour l'hydratation de l'enzyme, sa stabilité en assurant la conformation optimale de biocatalyseur et son activité catalytique¹³³.

L'activité de l'eau (a_w) a été décrite comme un paramètre important pour optimiser les réactions organiques en milieu aqueux et non aqueux et peut être ajusté par un certain nombre de méthodes. En réactions enzymatique, a_w détermine la position d'équilibre de la réaction d'hydrolase dans les systèmes à faible niveau d'eau¹³⁴.

L'activité de l'eau (a_w) dans un solvant est donnée par l'équation suivante¹³⁵ :

$$a_w = \frac{f_w \gamma_w X_w}{f_w} = [H_2O] a_f = \gamma_w X_w$$

Où f_w and f_w sont la fugacité de l'eau dans le solvant et dans l'état pur a_f est le facteur de l'activité, γ_w est le coefficient de l'activité et X_w est la fraction molaire de l'eau dans le solvant.

Des études menées par Chowdary et Prapulla¹³⁶, avec les lipases de *Rhizopus oryzae*, *Mucor javanicus*, *A. niger*, et *Penicillium roqueforti*, ont démontré qu'à des niveaux d'activité d'eau les plus élevées ($a_w=0,96$), les enzymes favorisent de rendements d'ester supérieur, probablement dus à l'agrégation des protéines. Par conséquent, l'optimum a_w dépend de la source d'enzyme, du solvant organique utilisé dans la réaction et le type de support d'immobilisation utilisé¹³⁷.

¹³² Rezaei, K.; Jenab, E.; Temelli, F. Effects of water on enzyme performance with an emphasis on the reactions in supercritical fluids. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2007**, 27,183–195.

¹³³ Caglia, F.; Canepa P. The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on 'sugar esters' production. *Bioresource Technology.* **2008**,99,4065–72.

¹³⁴ Matsue, S.; and Miyawaki, O. Influence of water activity and aqueous solvent ordering on enzyme kinetics of alcohol dehydrogenase, lysozyme, and β -galactosidase. *Enz. Microb. Technol.* **2000**,26,342–347.

¹³⁵ Kang, J.; Pfomm PH, Rezac ME. Real time measurement and control of thermodynamic water activities for enzymatic catalysis in hexane. *Journal of Biotechnology.* **2005**,119,147–54.

¹³⁶ Chowdary, G. V. and Prapulla, S. G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Proc. Biochem.* **2002**,38,393–397.

¹³⁷ Gandhi, N. N.; Patil, N. S.; Sawant, S. B.; Joshi, J. B.; Wangikar, P. P. and Mukesh, D. Lipase catalyzed esterification. *Catalysis Rev.* **2000**,42,439–480.

Dans leur étude, la lipase a présenté une activité optimum à un a_w égal à 0,55 lorsqu'elle est utilisée dans des solvants allant de l'hexane à la pentanone. En revanche, Awang et al.¹³⁸ ont rapporté qu'un a_w allant de 0,09 à 0,96 n'affecte pas les rendements de l'ester synthétisé à partir d'acide dihydroxy stéarique avec l'octanol par *Rhizomucor miehei* et les lipases Novozyme 435. Virto et al.¹³⁹ ont démontré que l'activité de l'eau dans le méthyl-*t*-butyléther (MTBE) affecte l'activité de la lipase de *Candida antarctica* B, une augmentation de l' a_w dans un intervalle allant de 0.06 à 0.75 entraîne une diminution de la conversion du dihydroxyacétone DHA et une augmentation du rapport molaire (monoester)/(monoester+diester) alors que l'activité optimum de l'enzyme est obtenue à une valeur de a_w de l'ordre de 0.33. Dutta Banik et al.¹⁴⁰ ont utilisé une approche complémentaire des techniques expérimentales par des simulations dynamiques moléculaires MD (**Figure 19**).

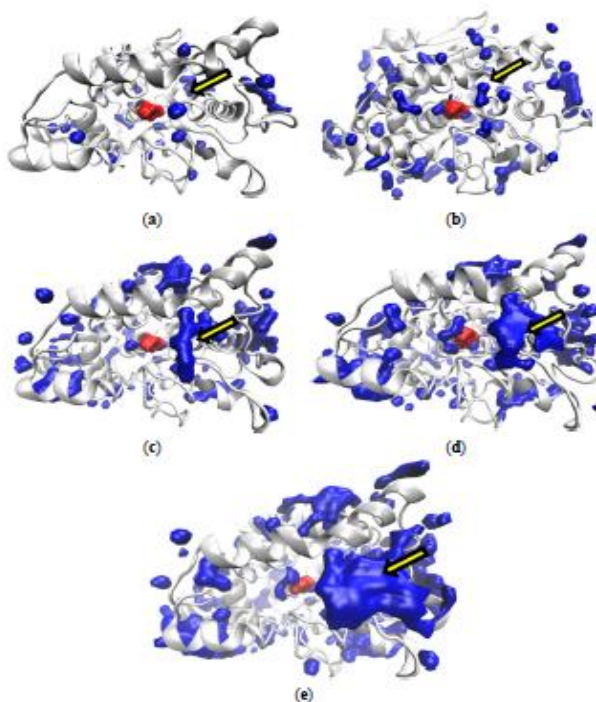


Figure 19. La distribution spatiale de l'occupation de l'eau à la surface CAL B calculée pour le CAL B/MTBE, systèmes aux activités de l'eau de (a) 0,18; (b) 0,26; (c) 0,33; (d) 0,47 et (e) 0,54 en moyenne sur la dernière 10 ns de chaque simulation.

¹³⁸ Awang, R.; Basri, M.; Ahmad, S. and Salleh, A. B. Enzymatic esterification of dihydroxystearic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 609–612.

¹³⁹ Virto, C.; Svensson, I.; et Adlercreutz, P. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of dihydroxyacetone fatty acid esters. *Biocatal. Biotrans.* **2000**, *18*, 13-29.

¹⁴⁰ Dutta Banik, S.; Nordblad, M.; Woodley, J.; & Peters, G. Effect of Water Clustering on the Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Medium. *Catalysts*. **2017**, *7*, 227.

Différentes stratégies ont été utilisées pour limiter la quantité d'eau dans le milieu réactionnel. L'eau peut être éliminée en purgeant une partie du solvant du système réactionnel, en le régénérant par distillation et le recycler^{141,142,143}. La pervaporation^{144,145} et l'irradiation par micro-ondes^{146,147} ont également été utilisées pour l'élimination de l'eau. Une autre façon de contrôler l'activité de l'eau consiste à équilibrer le milieu réactionnel avec une solution saline saturée dont l'activité de l'eau est connue⁴⁷. Cela pourrait être fait soit avant la réaction pour ajuster l'activité de l'eau, ou pendant la réaction par contact continu du milieu réactionnel avec la solution saline saturée via une membrane de silicium. Le tamis moléculaire a été largement utilisé pour limiter la quantité d'eau dans le milieu réactionnel.

e. Effet de la longueur de chaîne de l'agent acylant

La longueur de chaîne d'agent acylant a un impact considérable sur la performance de la réaction d'estérification et la spécificité de lipase. Vu que la queue hydrophobe de esters de sucres affecte également les propriétés de ces tensioactifs plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude de l'effet de la longueur de chaîne et le degré d'insaturation sur le rendement de l'estérification. Kumar et al¹⁴⁸ ont rapporté une augmentation de l'activité enzymatique avec l'augmentation de la chaîne carbonée du donneur d'acyle pour les lipases de *Staphylococcus warneri* et *Staphylococcus xylosus*.

¹⁴¹ Yan, Y.; Bornscheuer, U.T.; Stadler, G.; Lutz-Wahl, S.; Reuss, M.; Schmid, R.D. Production of sugar fatty acid esters by enzymatic esterification in a stirred-tank membrane reactor: optimization of parameters by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2001**,78,147–53.

¹⁴² Yan, Y.; Bornscheuer, U.T.; Cao, L.; Schmid, R.D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters: removal of byproducts by azeotropic distillation. *Enzyme and Microbial Technology*.**1999**,25,725–8.

¹⁴³ Yan, Y.; Bornscheuer, U.T.; Schmid, R.D. Efficient water removal in lipase catalyzed esterification using a low boiling point azeotrope. *Biotechnology and Bioengineering*.**2002**,78,31–4.

¹⁴⁴ Sakaki, K.; Aoyama, A.; Nakane, T.; Ikegami, T.; Negishi, H.; Watanabe, K., et al. Enzymatic synthesis of sugar esters in organic solvent coupled with pervaporation. *Desalination*.**2006**,193,260–6.

¹⁴⁵ Belafi-Bako, K.; Dorm, N.; Ulbert, O.; Gubicza, L. Application of pervaporation for removal of water produced during enzymatic esterification in ionic liquids. *Desalination* **2002**,149,267–8.

¹⁴⁶ Tejo, B.A.; Salleh, A.B.; Pleiss, J. Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent. *Journal of Molecular Modeling*. **2004**,10,358–66.

¹⁴⁷ Yu, D.; Tian, L.; Ma, D.; Wu, H.; Wang, Z.; Wang, L., et al. Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. *Green Chemistry*.**2010**,12,844–50.

¹⁴⁸ Kumar, R.; Modak, J.; Madras, G. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavours in supercritical carbon dioxide. *Biochemical Engineering Journal*.**2005**,23,199–202.

Zhao et al.¹⁴⁹ ont examiné la synthèse des esters de sucres et d'acides gras en utilisant des acides gras ou leurs esters vinyliques avec des longueurs de chaînes variables (**Schéma 19**).

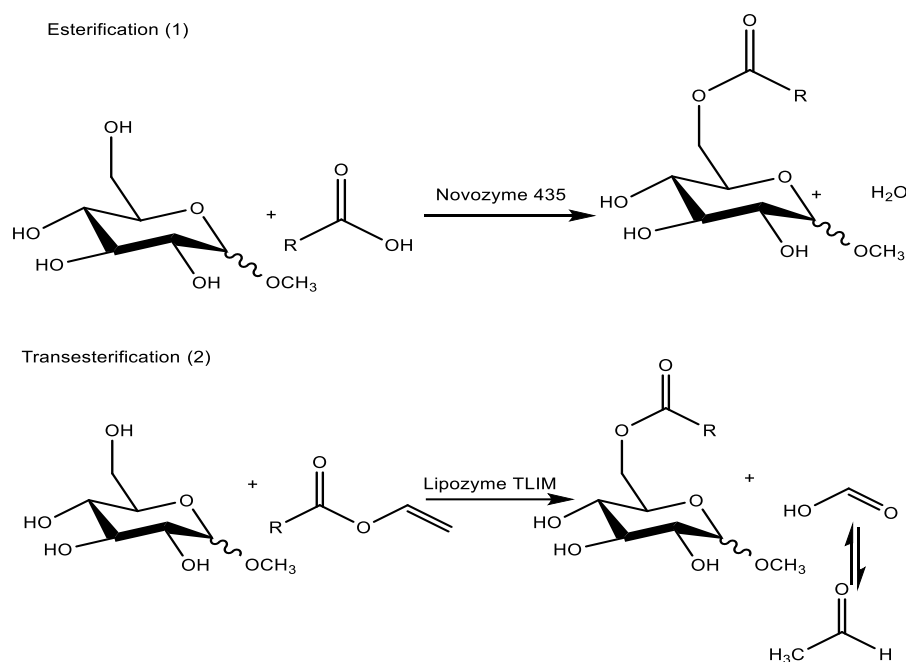


Schéma 19. (1) Estérification du méthylglucoside avec des acides gras, catalysée par Novozym 435 ; (2) transestérification du glucose avec des esters vinyliques d'acides gras, catalysés par Lipozyme TLIM.

Lorsque le glucose a été acylé avec une série d'esters vinyliques d'acides gras par transestérification catalysée par la Lipozyme TLIM dans le système bisolvant IL / 2M2B, la conversion a augmenté de façon marquée avec l'allongement de la longueur de chaîne de l'ester vinylique, de 43,2% pour le caprate de vinyle à 99,6 % pour le stéarate de vinyle. Lorsque des esters de sucres ont été produits par estérification catalysée par la Novozym 435 du méthylglucoside et des acides gras, le rendement de cette réaction était également étroitement lié à la longueur de chaîne de l'acide gras. Comme on peut le voir sur la **Figure 20**.

¹⁴⁹ Zhao, K.-H.; Cai, Y.-Z.; Lin, X.-S.; Xiong, J.; Halling, P.; & Yang, Z. Enzymatic Synthesis of Glucose-Based Fatty Acid Esters in Bisolvent Systems Containing Ionic Liquids or Deep Eutectic Solvents. *Molecules*.**2016**,*21*, 1294.

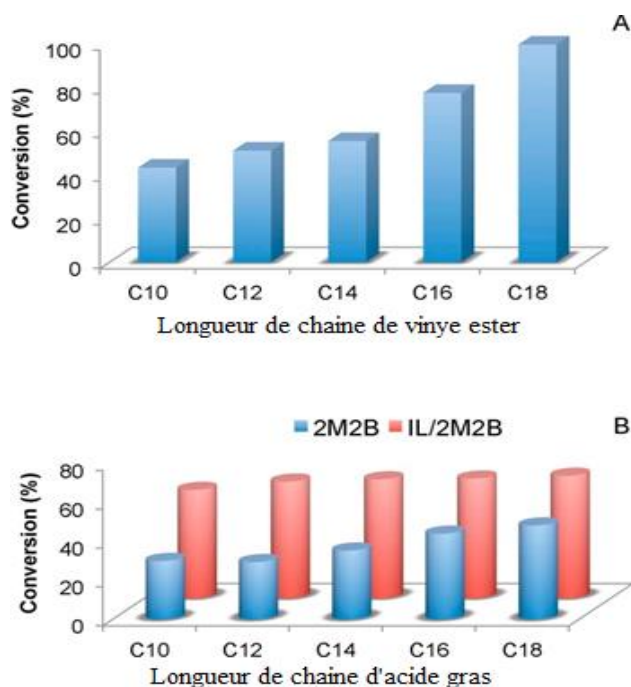


Figure 20. Variation de conversion avec la longueur de la chaîne des acides gras :

(A) Transestérification catalysée par lipozyme TLIM du glucose avec divers esters vinyliques d'acides gras pendant 7 h dans le système bisolvant [HMIm] [TfO] / 2M2B (3 : 7, v / v)

(B) Estérification du méthyl glucoside catalysée par Novozym 435 avec des acides gras de différentes longueurs de chaîne dans 2M2B pendant 21 h et dans le système bisolvant [HMIm] [TfO] / 2M2B (0,05: 0,95, v / v) pendant 24 h. C10, C12, C14, C16 et C18 désignent respectivement les esters vinyliques ou les acides de caprate, laurate, myristate, palmitate et stéarate.

e.Effet du rapport molaire entre les substrats

Le rapport entre les substrats est un paramètre important dans la synthèse des esters de sucres, il affecte la sélectivité, l'activité enzymatique¹⁵⁰ et par conséquent le rendement de la réaction mais il suscite un problème de purification à cause de produits résiduels¹⁵¹.

Il a été démontré qu'une augmentation de la concentration initiale du donneur d'acyle permet une meilleure activation de l'enzyme avec des vitesses de réaction élevées¹⁵² mais ceci généralement aux dépens de la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis des mono- et di-esters⁶⁶.

Le tableau ci-dessous montre l'effet du rapport molaire dans divers réactions d'estérification catalysées par des lipases.

¹⁵⁰ Chevandier, F.; Dubreucq, E. and Galzy, P. Lipase catalyzed synthesis of propanediol monoesters in biphasic aqueous medium. *Biotechnol. Lett.*, **1997**, 19, 913-917.

¹⁵¹ Coulon, D.; Girardin, M. and Ghoul, M. Enzymic synthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors. *Process Biochem.*, **1999**, 34, 913-918.

¹⁵² Adlercreutz, P.; and Mattiasson, B. Lipase catalyzed esterification of lactic acid. *Biotechnol. Lett.* **1997**, 19, 315-317.

Tableau 4. Effet du rapport molaire entre les substrats sur le rendement de la réaction.

Agent acylant donneur	Accepteur d'acyle	Rapport	Enzyme	Rdt	référence
acid (9Z)-Octadec-9-enoic	Fructose	5:1	Novozym 435	17 g L ⁻¹	Coulon et al. ¹⁵³
acid (9Z)-Octadec-9-enoic	Fructose	1:1	Novozym 435	6 g L ⁻¹	
acide octadécanoïque	Fructose	1:1	Lipase SP 435	80%	Soultani et al. ¹⁵⁴
acide octadécanoïque	Fructose	1:5	Lipase SP 435	26%	
acide hexadécanoïque	Glucose	1:1	Platase MR. miehei	30%	Tarahomjoo et al. ¹⁵⁵
Acide hexadécanoïque	Glucose	1:2	Platase MR. miehei	15%	
acide oléique	galactose	1 :1	Lipozyme RM IM	60%	Overbeeke et al. ¹⁵⁶
acide oléique	galactose	2 :1	Lipozyme RM IM	75%	
acide oléique	galactose	3: 1	Lipozyme RM IM	87%	

Une étude réalisée par Moreau et al.¹⁵⁷ sur l'estérification du glucose par l'acide oléique soutient ces travaux (**Figure 21**).

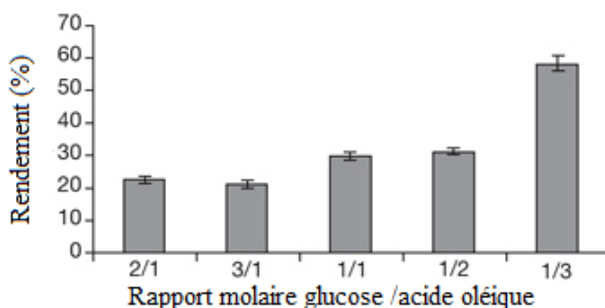


Figure 21. Influence de différents rapports molaires sur le rendement de la synthèse de l'oléate de glucose. (Réaction catalysée par la CAL B).

II. Les propriétés physico-chimiques des esters de sucres et d'acides gras

L'utilisation des esters de sucres et d'acides gras dans plusieurs domaines se base sur leurs propriétés physico-chimiques. La longueur de chaîne du groupe lipophile et la nature de la tête

¹⁵³ Coulon, D.; Ghoul, M. The enzymatic synthesis of non-ionic surfactants: the sugar esters – an overview. *Agro Food Industry Hi-Tech*.**1998**,9, 22–6.

¹⁵⁴ Soultani, S.; Engasser, J-M.; Ghoul, M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**,11,725–31.

¹⁵⁵ Tarahomjoo, S.; Alemzadeh, I. Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology* .**2003**,33,33–7.

¹⁵⁶ . Overbeeke, P. L. A.; Khalaf, G. C, N.; Jongejan, J. A.; Heijnen, J. J.J. *Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 10, 385.

¹⁵⁷ Moreau, B.; Lognay, G.C.; Blecker, C.; Brohée, J.-C.; Chéry, F.; Rollin, P,Marlier, M. Synthesis of novel d-glucuronic acid fatty esters using *Candida antarctica* lipase in tert-butanol. *Biotechnology Letters*.**2004**,26, 419–424.

hydrophobe ainsi que les différentes possibilités de liaison entre ces deux fractions confèrent à ces bio-tensioactifs des propriétés physico-chimiques particulières.

En fonction de leurs compositions, ils peuvent exister sous forme : solide, liquide ou cireux.

1. Mode d'action des tensioactifs

a. L'adsorption

Les tensioactifs y compris les esters de sucre s'adsorbent à l'interface, ce phénomène résulte de la diminution de la tension de surface qui est due au remplacement des molécules d'eau à la surface par des molécules tensioactives de l'intérieur de la solution. La partie hydrophobe s'oriente perpendiculairement à la surface et déforme la structure de l'eau de manière à diminuer l'entropie du système alors que la tête hydrophile est immergée dans le liquide.

Ces molécules forment un film macromoléculaire¹⁵⁸ (**Figure 22**).

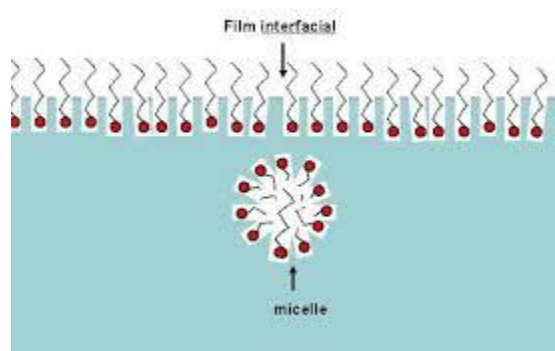


Figure 22. Le phénomène d'adsorption et de la formation de micelle

L'adsorption des tensioactifs à l'interface modifie les propriétés interfaciales, y compris la tension superficielle, qui est importante dans de nombreux domaines et dans les processus biologiques et biochimiques. Elle affecte la moussabilité et la stabilité de la mousse, la mouillabilité, les flux de revêtement, le drainage de la mousse et de nombreux autres procédés scientifiques et techniques¹⁵⁹.

Selon l'interface à laquelle ces molécules s'adsorbent, on distingue l'aspect et les propriétés des tensioactifs :

¹⁵⁸ Rosen, M. J. The relationship of structure to properties in surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1972**, 49, 293–297.

¹⁵⁹ Karakashev, S. I.; Nguyen, A. V.; & Miller, J. D. Equilibrium Adsorption of Surfactants at the Gas–Liquid Interface. *Interfacial Processes and Molecular Aggregation of Surfactants*. **2008**, 25–55.

- **Interface liquide-liquide** : équivalent à l'état liquide, les molécules sont cohérentes et dense, avec une compressibilité beaucoup plus faible et orientation plus régulière que la phase gazeuse, perpendiculaire à la surface mais la queue est moins rigide.

- **Interface liquide-solide** : les molécules sont cohérentes, rigides, incompressibles, densément emballées, avec une viscosité de surface élevée, orientée perpendiculairement à la surface. Sur la surface solide les tensioactifs réagissent en tant qu'agents mouillants et détergents.

Il est possible de mesurer le pouvoir mouillant d'une solution contenant le tensioactif à l'aide de la loi de Young-Dupré (équation) qui donne l'angle de contact en fonction de la tension de surface qui se dessine entre les trois milieux (l'air, le solide et le liquide)

$$\cos \theta = \frac{Y_{SV} - Y_{SL}}{Y_{LV}}$$

Plus l'angle de contact est faible, plus le liquide (ou la solution) mouille la surface comme ci-dessous¹⁶⁰.

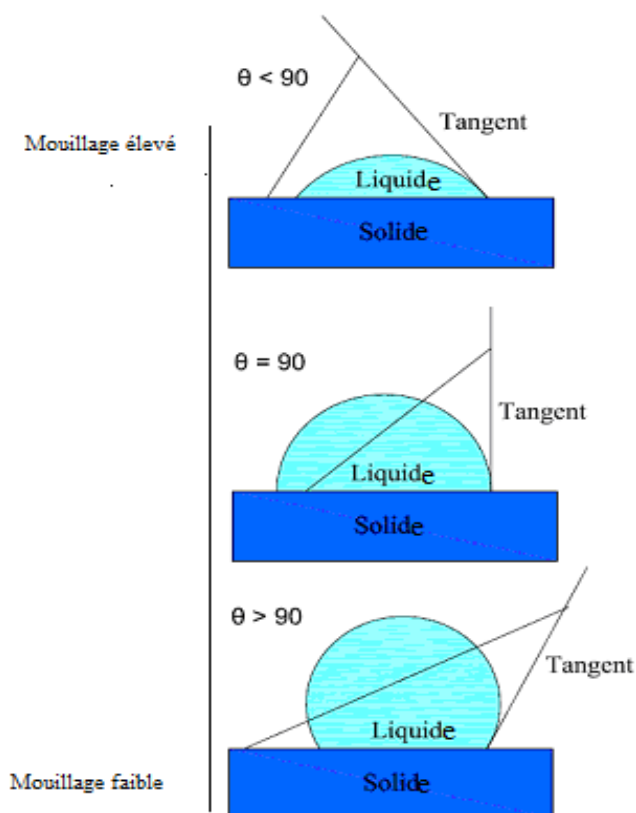


Schéma 20. Diagramme de l'angle de contact et la mesure de pouvoir mouillant.

¹⁶⁰ Fathi Azarbayjani, A.; Jouyban, A.; & Chan, S. Y. Impact of Surface Tension in Pharmaceutical Sciences. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. **2009**, 12, 218.

- **Interface liquide-gaz** : les molécules sont relativement éloignées et ont une mobilité de surface importante, les molécules agissent essentiellement indépendamment avec une orientation aléatoire, compressible.

L'adsorption à l'interface liquide-gaz aboutit à la formation des bulles et de mousses.

b. La formation de micelle

Les agents tensioactifs, dissous dans l'eau à très faibles concentrations, sont présentes sous forme de molécules individuelles, dispersion moléculaire.

La micellisation est un processus en plusieurs étapes, c'est-à-dire les monomères tensioactifs de la solution commencent à s'associer en petits agrégats à une concentration définie en dessous de la CMC, ils croissent ainsi pour former des agrégats plus gros. A mesure que la concentration augmente, des micelles se forment. A la CMC, là où les prémicelles existent encore, et enfin, à une concentration définie, un peu au-dessus de la CMC, les concentrations de monomères libres et de prémicelles restent quasiment constantes. L'analyse réalisée par Le Bard et al. en utilisant la simulation informatique montre des structures prémicellaires allant de sphériques à une forme de chaîne.^{161,162} En milieu aqueux, les micelles peuvent regrouper plusieurs dizaines voire centaines de molécules ; la dimension et la géométrie de ces conglomerats dépendent essentiellement de la structure du surfactant et de l'environnement physico-chimique.

La spontanéité de la formation des micelles est déterminée par l'énergie libre de transfert d'une molécule de surfactant de l'eau vers la micelle.

2. Les Modèles de solutions micellaires

Deux modèles peuvent interpréter l'équilibre dynamique entre les molécules monomère des tensioactifs et les agrégats micellaires.

a. Modèle de séparation de phase

Ce modèle est proposé par Shinoda et Hutchinson¹⁶³, dans lequel ils considèrent que la micelle est une pseudo-phase qui s'assimile à une "microprécipitation" où l'activité du tensioactif reste constante au-dessus de la CMC et que la concentration en espèce monomère correspond à une saturation.

¹⁶¹ LeBard, D. N.; Levine, B. G.; DeVane, R.; Shinoda, W.; Klein, M. L. Premicelles and monomer exchange in aqueous surfactant solutions above and below the critical micelle concentration. *Chemical Physics Letters*. **2012**, 522, 38–42.

¹⁶² Cui, X.; Mao, S. ; Liu, M. ; Yuan, H., & Du, Y. Mechanism of Surfactant Micelle Formation. *Langmuir*. **2008**, 24, 10771–10775.

¹⁶³ Shinoda, K.; Hutchinson, E. Pseudo-Phase Separation Model for Thermodynamic Calculations on Micellar Solutions. *J. Phys. Chem.* **1962**, 66, 577–582.

La relation entre la concentration du tensioactif sous forme monomère C_m , celle sous forme micellaire C_M et la concentration totale C_T est donc :

$$C_m = C_T \text{ pour } C_T < CMC$$

$$C_m = CMC \text{ et } C_M = C_T - C_m \text{ pour } C_T > CMC$$

b. Le modèle d'action de masse

Ce modèle proposé se base sur la loi d'action de masse classique qui définit l'équilibre chimique entre les micelles et ses constituants¹⁶⁴. La constante d'un tel équilibre s'écrit :

$$K = \frac{C_M}{C_m^n}$$

"a" correspondent aux coefficients d'activité.

2. La balance hydrophile-lipophile (HLB)

En 1949, Griffin¹⁶⁵ a développé la notion de la balance hydrophile-lipophile (HLB), dès lors plusieurs équations ont été élaborées afin de déterminer le comportement des émulsifiants dans les solvants.

La HLB est l'équilibre entre la taille et la force hydrophile /hydrophobe, sa valeur est calculée à partir du poids partiel de la fraction hydrophile de l'ensemble du composé.

Davies et Rideal¹⁶⁶ ont suggéré une méthode de calcul d'une valeur basée sur les groupes chimiques de la molécule. L'avantage de cette méthode est qu'elle prend en compte l'effet des groupes hydrophiles plus forts et plus faibles. La méthode s'applique aux tensioactifs ioniques et prend en compte les groupes fonctionnels, l'instauration sur la chaîne hydrophobe et fonctionne comme suite :

$$HLB = 7 + \sum_{i=1}^m H_i - n * 0.475$$

m : c'est le nombre de groupes hydrophile dans la molécule.

H_i : C'est la valeur de i^{-ème} groupe hydrophile (**Tableau 5**).

n : nombre de groupes lipophile dans la molécule.

¹⁶⁴ Jönsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kronberg, B. Association of surfactants. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. B. Jönsson, B. Lindman, K. Holmberg and B. Kronberg. Chichester, Wiley. **1998**,2, 33-60.

¹⁶⁵ Griffin, William C. "Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'", *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **1949**,1, 311-26.

¹⁶⁶ Davies, J. T.; Rideal, E. K. Interfacial Phenomena 2nd ed, Academic Press: New York. **1963**, P. 372.

Tableau 5. Numéro de groupe HLB¹⁶⁷

<i>Groupes hydrophile</i>	<i>Nombre de groupe</i>
-SO ₄ Na ⁺	38.7
-COO ⁻ K	21.1
-COO ⁻ Na ⁺	19.1
-N (amine tertiaire)	9.4
Ester (sorbitan ring)	6.8
Ester (free)	2.4
-COOH	2.1
Hydroxyl (free)	1.9
-O-	1.3
Hydroxyl (sorbitan ring)	0.5
<i>Groupes lipophiles</i>	<i>Nombre de groupe</i>
-CH-	
-CH ₂	- 0.475
- CH ₃	
- =CH	
<i>Groupes dérivés</i>	<i>Nombre de groupe</i>
-(CH ₂ -CH ₂ -O)-	+ 0,33
-(CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O)-	- 0.15

Pour un tensioactif non-ionique comme dans le cas des esters de sucres, elle est donnée par l'équation suivante :

$$HLB = 20 * \frac{M_h}{M}$$

M_h : c'est la masse molaire de la fraction hydrophile.

M : c'est la masse molaire du composé.

¹⁶⁷ Davies JT. "A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent", Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface, *Proceedings of the International Congress of Surface Activity*. 1957. 426-38.

La valeur de la HLB varie de 0 à 20, elle indique l'affinité de ces molécules pour l'eau ou pour l'huile, plus cette valeur est élevée, plus l'émulsifiant est hydrophile. Un émulsifiant qui a un caractère lipophile a alors une HLB faible.

La classification des tensioactifs en fonction de cette valeur permet de déterminer leurs comportements et leurs domaines d'application en tant qu'agents émulsifiants, détergents, solubilisants et autres comme illustré dans la (**Figure 23**).

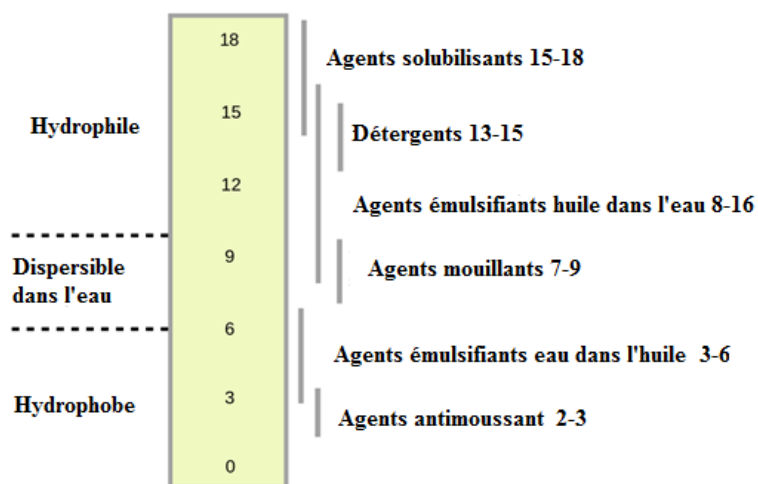


Figure 23. Classification des tensioactifs en fonction de leurs HLB.

3. La tension de surface γ

Les forces attractives entre les molécules dans un liquide sont uniformes dans toutes les directions, la résultante totale de ces forces est globalement nulle. En interagissant entre elles, elles sont en équilibre où chaque molécule est attirée dans toutes les directions de manière isotrope par les molécules aux alentours et forme des liaisons hydrogènes. Alors que les molécules qui se trouvent à la surface sont attirées par les molécules du dessous et de celles à côté ce qui produit une force dirigée vers l'intérieur. Dans ce cas on n'est plus dans une situation isotrope comme à l'intérieur du liquide, les molécules peuvent se rapprocher un peu plus (**Figure 24**). Cependant dans un liquide contenant un tensioactif les molécules ne peuvent pas former des interactions uniformes parce que les molécules en contact du gaz sont largement espacées et les interactions se font principalement entre les molécules de surface et les molécules de liquide de surface par conséquent, les molécules à la surface du liquide ont des énergies potentielles libres plus importantes que celle des molécules à l'intérieur du liquide.

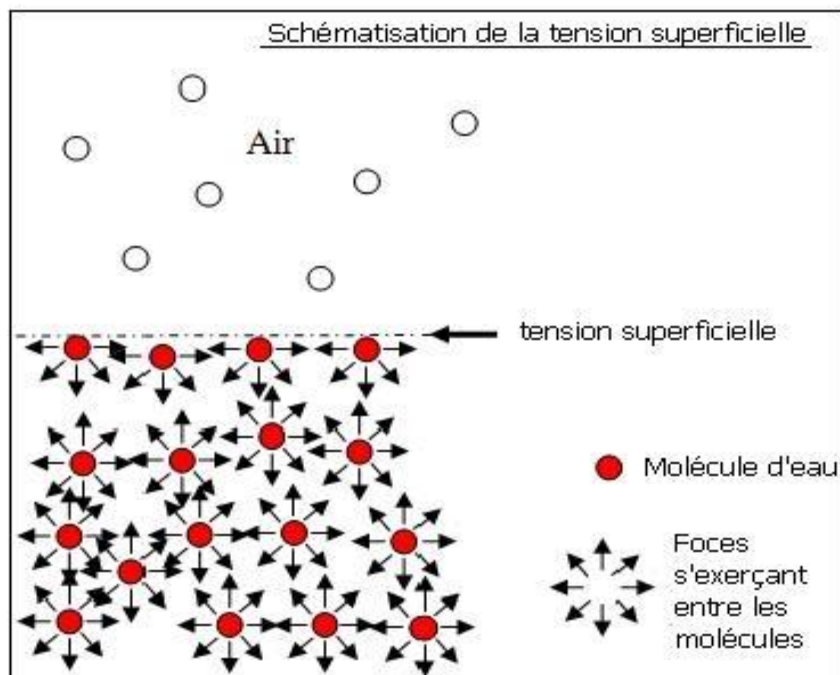


Figure 24. Schéma des forces d'attraction entre les molécules dans un liquide.

L'excès d'énergie libre par unité qui existe dans la molécule de surface est défini comme la tension superficielle. La tension de surface est une propriété thermodynamique qui peut être mesurée en fonction de la température et de pression, sa valeur représente la quantité du travail minimum requis par unité de surface pour créer une plus grande surface.

La tension de surface peut être définie au niveau moléculaire par la théorie de Bakker¹⁶⁸, mécaniquement par l'équation de Laplace et thermodynamiquement comme proposée par Gibbs. Elle peut être quantifiée soit par la mesure de l'énergie libre par unité de surface de la surface entre l'eau et l'air (exprimée en $\text{erg}\cdot\text{m}^{-2}$ ou $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$), soit par la force agissante normalement à l'interface par unité de longueur de la surface à l'équilibre (exprimée en $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-1}$ ou $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)

Due à cette force la surface liquide a tendance à une surface minimum en adoptant la forme sphérique.

Les tensioactifs ont la propriété de diminuer la tension de surface. La capacité à abaisser la tension de surface de l'eau caractérise l'efficacité des tensioactifs : plus la tension de surface γ_{cmc} est basse, plus le tensioactif est efficace.

¹⁶⁸ Bakker, Capillarity and surface tension, Leipzig Akad Publishing company. 1928.

a. Mesure de la tension superficielle avec des tensiomètres de force

Le principe de ces instruments est de mesurer les efforts exercés sur une sonde reliée à une balance et positionnée à l'interface liquide /gaz ou liquide/Liquide. La balance mesure les forces lorsque la sonde interagit avec le liquide. A partir de ces forces, la tension de surface est calculée.

La sonde est en platine pour assurer un angle de contact avec le liquide égale à zéro. Il existe deux configurations de sondes couramment utilisées (**figure25**) : l'anneau du Noüy et la plaque Wilhelmy¹⁶⁹.

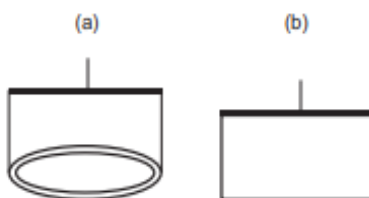


Figure 25. (a) Anneau du Noüy (b) Plaque de Wilhelmy.

i. La méthode de l'anneau Du Noüy

Dans cette méthode, l'anneau est immergé sous l'interface où le liquide est placé dans un récipient en verre, Après l'immersion de la sonde, la hauteur de la platine est diminuée et l'anneau finit par traverser l'interface avec laquelle elle forme un ménisque, l'appareil enregistre la valeur maximale de la force exercée qui dépend du volume de ménisque qui commence à baisser avant l'évènement de déchirement proprement dit en retirant la sonde.

La tensiométrie annulaire est basée alors sur l'extraction d'un anneau d'un liquide et la mesure du poids du ménisque liquide attaché selon la procédure suivante (**Figure 26**).

1. La force mesurée diminue légèrement en raison de la flottabilité de l'anneau
2. La force mesurée diminue légèrement en raison de la flottabilité de l'anneau.
3. L'anneau doit être mouillé par le liquide. Une certaine force peut être nécessaire pour immerger la sonde dans le liquide, équivalente au travail de mouillage.
4. L'anneau est immergé dans le liquide. C'est la position de départ d'une expérience de tension superficielle.
5. L'anneau est déplacé hors du liquide avec une vitesse constante.

¹⁶⁹ Ebnesajjad, S.; Landrock, A. H. Surface Tension and Its Measurement. *Adhesives Technology Handbook*. 2015, 19–34.

7. Le ménisque liquide augmente et la force s'approche d'un maximum
6. Un ménisque liquide est extrait par l'anneau. La force mesurée augmente.
8. La force dépasse le maximum et diminue à nouveau. La force maximale correspond à la tension superficielle du liquide mesuré, selon l'équation
9. Une traction supplémentaire sur l'anneau entraîne une rupture du ménisque. Ce processus doit être évité et le logiciel veille à ce que l'anneau, après que la force maximale ait été dépassée, soit à nouveau déplacé dans le liquide.

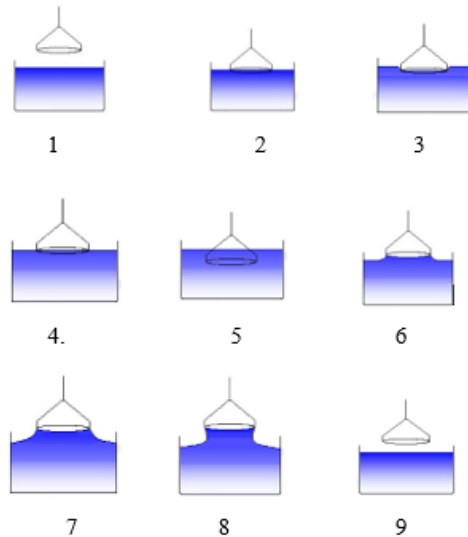


Figure 26. Procédure expérimentale de la méthode

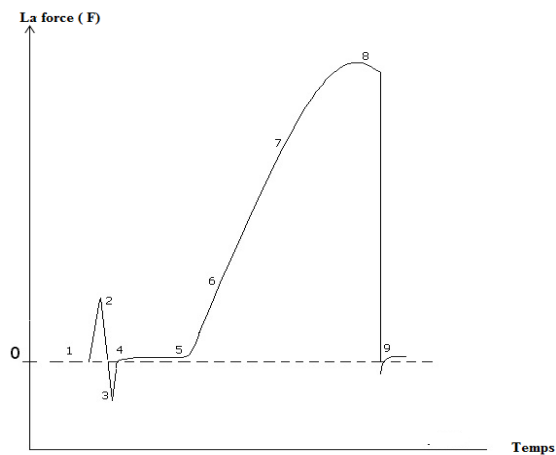


Figure 27. Changement schématique de la force mesurée pendant le processus d'une expérience de tensiomètre.

Le calcul de la tension superficielle est basé sur la mesure de la force maximale (**Figure 27**)

La valeur de la tension de surface est donnée dans l'équation suivante ¹⁷⁰:

$$\gamma = \frac{F_{\max}}{4\pi R}$$

R : C'est le rayon de l'anneau

La partie du fluide qui se trouve directement sous l'anneau n'est pas là en raison des forces de tension superficielle - mais plutôt des forces capillaires. Ce liquide contribue cependant à une lecture de force donnée par la balance et augmenterait ainsi la valeur de tension superficielle mesurée d'environ 7%. Aujourd'hui, les facteurs de correction (f) sont couramment utilisés par des calculs logiciels automatisés pour soustraire et tenir compte de cet excès de liquide.

L'équation devient alors :

$$\gamma = \frac{F_{\max}}{4\pi R f}$$

ii. Méthode de la plaque Wilhelmy

La méthode de la plaque de Wilhelmy consiste à plonger une plaque mince de platine dans un liquide et à mesurer directement la force agissant sur la plaque perpendiculairement à l'interface (**Figure 28**). L'augmentation de la force F mesurée par la balance est liée à la tension superficielle comme suite¹⁷¹ :

$$\gamma = \frac{F}{2(w+d)\cos\theta}$$

W et d sont respectivement la largeur et l'épaisseur de la plaque.

Θ est l'angle de contact, dans le cas où la plaque est entièrement mouillée Θ = 0

¹⁷⁰ L. du Noüy, J. *General Physiol.* **1919**, 1, 521

¹⁷¹ L. Wilhelmy, *Ann. Phys. Chem.* **1863**, 29, 177.

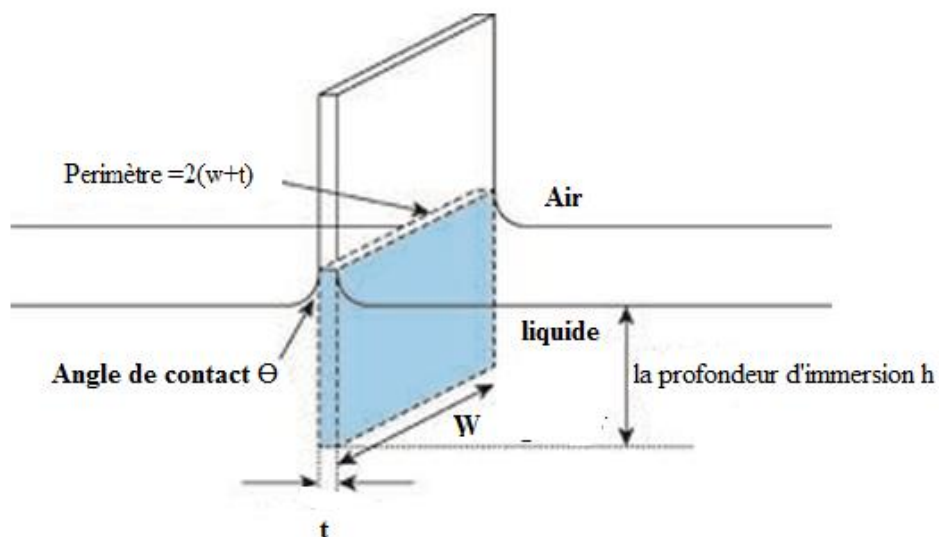


Figure 28. Illustration d'une plaque de Wilhelmy.

b. La méthode de la goutte pendante ou montante

Le principe de cette mesure repose sur l'analyse de la forme d'une goutte liquide pendante ou montante (Figure 29) qui dépend d'un équilibre entre gravité et capillarité. Un ajustement précis de la forme par une famille de courbes connues, combiné à la taille de la goutte, permet de connaître la longueur capillaire. Le profil d'une goutte obtenue sur un cliché est alors comparé à un profil théorique issu de la résolution numérique de l'équation de Young-Laplace (Figure 30 et 31) à partir de la densité du liquide, on déduit la tension superficielle qui est donné par :

$$\gamma = \frac{\Delta\rho \cdot v \cdot g}{\pi \cdot r \cdot \sin\theta}$$

ρ : masse volumique du liquide étudié.

v : volume de la goutte.

g : intensité de la pesanteur 9.8 ms^{-1} .

r : rayon de l'orifice de l'aiguille

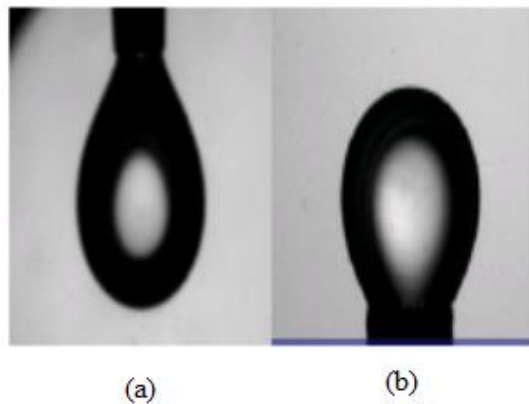


Figure 29. (a) goutte pendante (b) goutte montante

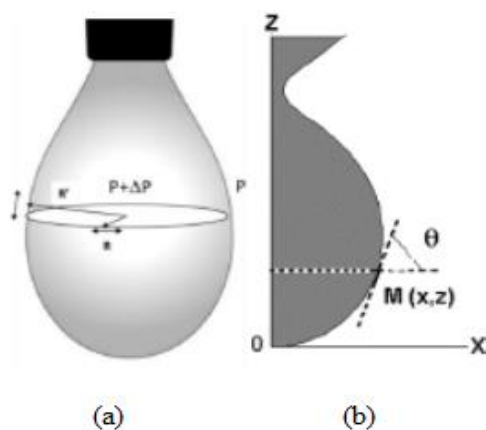


Figure 30. (a) Courbure de la surface de la goutte (b) coordonnées d'un point M de la goutte.

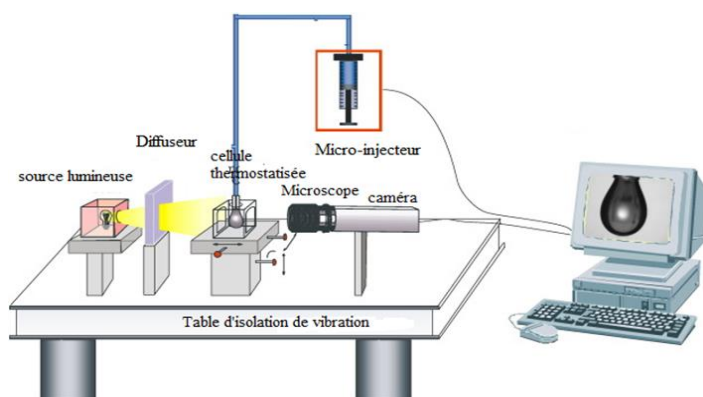


Figure 31. Montage de la tensiomètre de la goutte pendante¹⁷².

¹⁷² Maldonado-Valderrama, J.; Torcello-Gómez, A.; del Castillo-Santaella, T.; Holgado-Terriza, J. A.; & Cabrerizo-Vílchez, M. A. Subphase exchange experiments with the pendant drop technique. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2015**, 222, 488–501.

c. Mesure de la tension de surface au moyen du poids des gouttes

Appelée aussi méthode stalagmométrie (**Figure 32**), elle consiste à recueillir les gouttes formées et d'en mesurer leurs poids, la tension de surface est déterminée à l'aide de relation de Tate¹⁷³.

$$\gamma_p = \frac{m_p}{m_e} \cdot \gamma_e$$

γ_p : la tension de surface de produit

γ_e : la tension de surface de l'eau

m_p : la masse de produit

m_e : la masse de l'eau

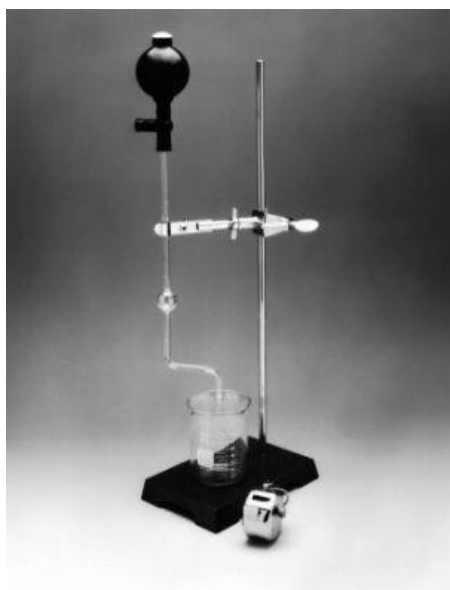


Figure 32. Méthode stalagmométrie

4. La concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique désigne la concentration d'agents tensioactifs à laquelle, les molécules tensioactives s'associent pour former des micelles et juste la moitié des tensioactifs reste sous forme de monomères (**Figure 33**).

¹⁷³ T. Tate, "On the magnitude of a drop of liquid formed under different circumstances," *Philos. Mag.* **1864**,27, 176.

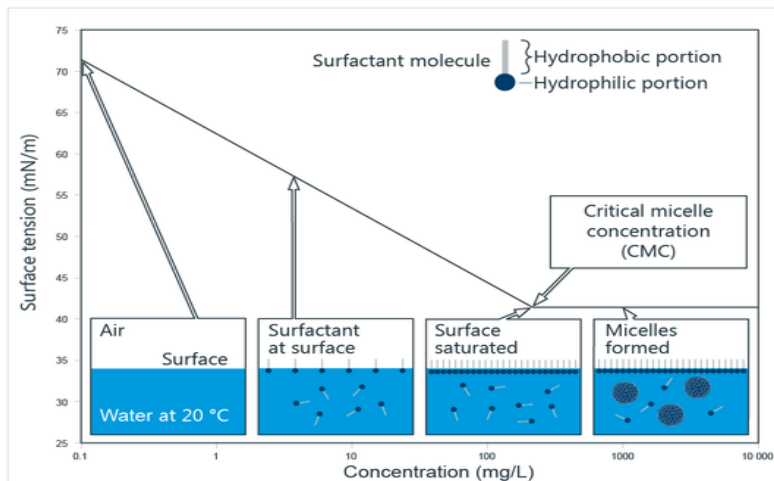


Figure 33. Tension superficielle d'une solution de tensioactif à concentration croissante, formation de micelles.

Dans une solution de tensioactifs, la formation des micelles est un processus spontané résultant en état d'énergie stable. Les micelles se forment à cause de l'aggrégation des tensioactifs entraîne la libération de plus d'énergie que dans le processus de solvation.

Mesure de la concentration micellaire critique

La CMC est déterminée avec un tensiomètre en mesurant la tension superficielle d'une série de concentrations avec les tensioactifs purs, la tension de surface dépend linéairement du logarithme de la concentration sur une large plage. Au-dessus du CMC, la tension de surface est largement indépendante de la concentration. La CMC résulte de l'intersection entre la droite de régression de la région linéairement dépendante et la droite passant par le plateau¹⁷⁴.

Elle correspond à la valeur minimale de la tension superficielle c'est-à-dire que la tension superficielle diminue à mesure que la concentration en tensioactif augmente jusqu'à la CMC¹⁷⁵ (**Figure 34**).

¹⁷⁴ Hait, S. K.; & Moulik, S. P. Determination of critical micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor-acceptor interaction with Iodine and correlation of CMC with hydrophile-lipophile balance and other parameters of the surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, **2001**, 4, 303–309.

¹⁷⁵ Rosen, M.J. and Kunjappu, J.T. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd., **2012**. New York. 615.

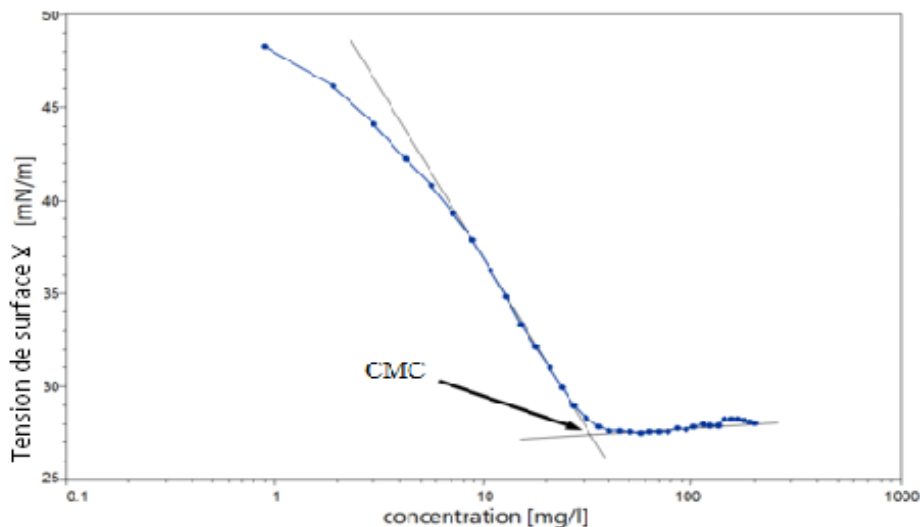


Figure 34. Détermination de la CMC avec un tensiomètre

La valeur de la concentration micellaire critique CMC est réduite lorsque la taille de la queue hydrophobe augmente alors que la partie hydrophile diminue.

Un des avantages d'utilisation des tensioactifs non-ioniques est que leurs CMC est très faibles de l'ordre de 0.05-0.5g/l en comparaison avec un anionique dont la CMC est de l'ordre de 0.5-3g/l. Un tensioactif a une CMC faible donne lieu à une solution de lavage d'un pouvoir nettoyant à faible concentration de détergent, avec la formation de de micelles, la saleté et l'huile peuvent être solubilisées et soulevées de la surface et dispersées dans la solution.

Les facteurs contribuant à la diminution de la CMC :

- L'augmentation de nombre de carbones dans la queue hydrophobe
- L'existence d'un composé organique polaire (les alcools et les amides)
- l'augmentation de la température aboutit à la formation des plus grandes micelles et à une CMC plus faible
- l'ajout du xylose et fructose

Les facteurs contribuant à l'augmentation de la CMC :

- ramification au niveau de la structure hydrophobe.
- la double liaison
- groupe polaire (O ou OH) dans la queue hydrophobe.
- augmentation du nombre de tête hydrophile
- une augmentation de la taille effective de la tête hydrophile.

5. La concentration surfacique (l'excès de surface)

C'est la concentration de surface de tensioactif, s'exprime en mol/m², sa valeur peut être déterminée par l'équation d'adsorption de Gibbs ¹⁷⁶.

$$\Gamma = -\frac{1}{nRT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln c} \right)_T$$

γ : tension superficielle (N.m⁻¹).

Γ : excès superficiel par unité de surface (mol.m⁻²).

c : concentration en tensioactif (mol.L⁻¹).

R : constante des gaz parfaits ($R = 8.314 \text{ J. mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$).

T : température (K).

n : constante de dissociation ; $n = 1$ pour le tensioactif non ionique et $n = 2$ si le tensioactif est ionique.

L'excès de surface (Γ) peut être obtenu à partir de la pente montrée dans la (**Figure 35**), il est donné alors par l'équation suivante :

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} (\text{la pente} / 2.303)$$

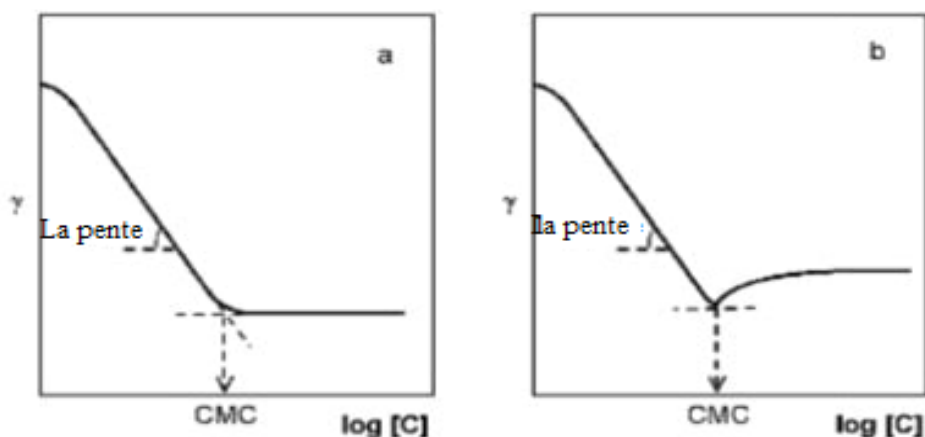


Figure 35. La tension de surface en fonction de la concentration de tensioactif dans la phase aqueuse. (a) Pour un tensioactif pur. (b) Pour un tensioactif contenant des impuretés.

6. Aire de la molécule à l'interface (A)

L'aire minimale occupée par la molécule est calculé en fonction de l'excès de surface.

$$A = \frac{10^{16}}{N\Gamma}$$

¹⁷⁶ J. W. Gibbs. The collected works of J. W. Gibbs vol. I, Longmans, Green, London. 1928, 119.

A : aire de la molécule à l'interface (m^2).

N : nombre d'Avogadro ($N = 6.023 \cdot 10^{23}$).

Γ : excès superficiel par unité de surface ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$).

7. Le paramètre d'empilement P

Les micelles peuvent s'assembler à l'échelle moléculaire sous forme de sphères, cylindres ou bicouches ; ces formes peuvent, dans certains cas, être prédites par le paramètre d'empilement.

La notion d'empilement de molécules en diverses formes d'agrégats a été introduite même dans les travaux antérieurs de Tartar¹⁷⁷ et Tanford¹⁷⁸. Ce concept a été approfondi dans les travaux de Israelachvili et al¹⁷⁹ sous la forme de paramètre d'empilement.

Ce paramètre est une description géométrique des micelles qui a été proposé par Ninham et Israelachvili¹⁸⁰, pour prédire la forme de la structure globale des agrégats (**Tableau 6**). Il est défini comme étant le rapport du volume de la partie hydrophobe de la molécule (V) sur le produit de la longueur maximale de cette partie par la surface optimale occupée par la molécule à l'interface entre l'agrégat et le solvant (A.lt) (**Figure 36**).

$$P = V / A \cdot l_t$$

V : volume de la chaîne du détergent (\AA^3). [V = 27.4 + 26.9 (nc-1)]

l_t : longueur de la chaîne (\AA). [$l_t = 1.5 + 1.265 (nc-1)$]

A : aire de la section à l'interface (\AA^2).

n: nombre de carbones de la chaîne alkyle.

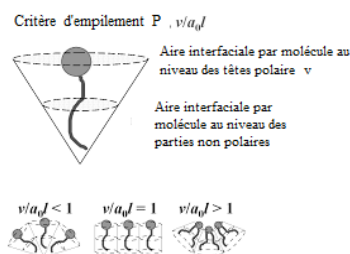


Figure 36. Représentation schématique d'un tensioactif et de l'espace qu'il occuperait dans un agrégat.

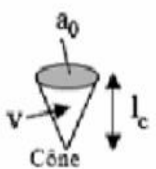




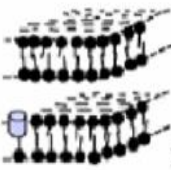


¹⁷⁷ Tartar, H. V. *J. Phys. Chem.* **1955**, 55, 1195

¹⁷⁸ Tanford, C. *The Hydrophobic Effect*; Wiley-Interscience: New York, **1973**.

¹⁷⁹ Israelachvili, J.N.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1976**, 72, p1525.

¹⁸⁰ Israelachvili b. J. N, Mitchell, D. J. Ninham B. W, *Biochim. Biophys. Acta.* **1977**, 470, 185.

Tableau 6. Types d'agrégation en fonction de paramètre d'empilement

$\frac{v}{a_0 l_c}$	Forme de la molécule de tensioactif	Structures formées
$< 1/3$	 Cône	 Micelles sphériques
$1/3 - 1/2$	 Cône tronqué	 Micelles cylindriques
~ 1	 Cylindre	 Bicouche plane
> 1	 Cône tronqué inversé	 Micelles inverses

III. Propriétés bioactives des esters de sucre

1. Activité antitumorale

Due à leur faible toxicité et non antigénicité, les esters de sucres ont été largement étudiés en tant qu'agents potentiels anti cancérogène. De nombreuses études ont montré l'efficacité des sucro-ester contre les tumeurs.

Ikekawa et al.¹⁸¹ ont examiné l'activité antitumorale des esters d'acides gras de tréhalose et de saccharose par la méthode de bioessai in vitro et in vivo, les résultats montrent un effet antitumoral contre Ehrlich ascite carcinoma.

¹⁸¹ Ikekawa, T.; Umeji, M.; Yanoma, S.; Yoshimoto, K.; & Nishikawa, Y. Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. VIII. Antitumor activity of sucrose fatty acid esters. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1979, 27, 2016–2020.

Une autre étude réalisée par Nishikawa et al.¹⁸² sur les esters de saccharose et de maltose démontre que ces derniers ont également un effet sur Enrich ascite carcinoma dans les souris. D'après leurs résultats, les monoesters sont les plus efficaces que leurs analogues substitués. Les esters de sucres synthétisés à partir de l'acide stéarique, palmitique et myristiques sont plus effectifs que les esters de sucres de chaînes courte d'acide laurique et caprique. Il a été démontré que les esters de tréhalose et d'acide gras (de C8-C12) et n-dodécyl- β -D-maltoside inhibent tous le facteur de nécrose tumorale (TNF) α ¹⁸³.

2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des esters d'acides gras et des sucres a été étudiée de manière approfondie, des résultats variables ont été rapportés sur différentes espèces bactériennes¹⁸⁴. Certaines études ont rapporté une inhibition de Gram négatif^{185,186}.

Watanabe et al.¹⁸⁷ ont testé l'activité antibactérienne du laurate de fructose et du laurate de galactose contre *Streptococcus mutans* une bactérie cariogène qui a été fortement impliquée en tant qu'organisme responsable des caries dentaires. Les résultats ont montré que ces esters ont le plus haut effet inhibiteur de croissance par rapport à leurs analogues qui ne montrent aucune activité. Ils rapportent que les activités antibactériennes des monoesters de glucides ont été grandement influencées non seulement par la longueur de chaîne du groupe acyle, mais aussi par la configuration des groupes hydroxyle dans la moitié glucide.

¹⁸² Nishikawa, Y.; Yoshimoto, K.; Manabe, T.; & Ikekawa, T. Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. VI. Further examinations on antitumor activities of stearyl esters of sucrose. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*.1977,25, 2378–2384.

¹⁸³ Okabe, S.; Suganuma, M.; Tada, Y.; Ochiai, Y.; Sueoka, E.; Kohya, H., ... Fujiki, H. Disaccharide Esters Screened for Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α Release Are New Anti-cancer Agents. *Japanese Journal of Cancer Research*.1999,90,669–676

¹⁸⁴ Zhang, X.; Song, F.; Taxipalati, M., Wei, W.; and Feng, F. Comparative study of surface-active properties and antimicrobial activities of disaccharide monoesters. *PLoS ONE*. 2014,9 : e114845.

¹⁸⁵ Ferrer, M. ; Soliveri, J. ; Plou, F. J. ; López-Cortés, N. ; Reyes-Duarte, D. ; Christensen, M. ; et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme Microb. Technol.* 2005,36, 391–398.

¹⁸⁶ Nobmann, P.; Smith, A.;Dunne, J.; Henehan, G.; & Bourke, P. The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*,2009,128, 440–445.

¹⁸⁷ Watanabe, T.; Katayama, S.; Matsubara, M.; Honda, Y.; and Kuwahara, M. Antibacterial carbohydrate monoesters suppressing cell growth of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. *Curr. Microbiol.* 2000, 41, 210–213.

Il a été rapporté que le monolaurate de saccharose a une forte activité antibactérienne contre *Escherichia coli*¹⁸⁸ et *Staphylococcus aureus*¹⁸⁹. Cependant, le monolaurate de saccharose n'a montré aucun effet inhibiteur de croissance contre *Streptococcus mutans*.

Certains, esters de sucres ont eu une activité inhibitrice de croissance contre les bactéries Gram positif¹⁹⁰. D'autres esters de sucres et d'acides gras peuvent être à la fois bactériostatiques¹⁹¹ et bactéricide¹⁹² selon la dose.

Mécanisme d'action des esters du sucre sur les bactéries

Une étude réalisée par Zhao et al.⁹ suggère que le monocaproate de saccharose a un effet antibactérien en affectant la perméabilité de la membrane cellulaire conduisant à la perte de certains composants cellulaires comme les protéines et à la réduction du sucre. Le changement de l'aspect protéique et ses contenants analysé par SDS-page, suggère que le monocaproate de saccharose interfère avec la synthèse de la protéine bactérienne et provoque la dégradation ou l'agrégation des protéines bactériennes. Ils ont même constaté un changement de morphologie général des bactéries après le test, d'après des images prises par microscope électronique à balayage électronique (**Figure 37**).

¹⁸⁸ Kato, A.; Arima, K. Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on the growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. **1971**, 42,596–601

¹⁸⁹ Kato, S.; Kobayashi, H.; Watanabe, T. Antimicrobial action of sucrose monolaurate on *Staphylococcus aureus*. *J Food Hyg. Soc. Japan*. **1987**, 28,261–266

¹⁹⁰ Devulapalle, K. S.; Gómez de Segura, A.; Ferrer, M.; Alcalde, M.; Mooser, G.; & Plou, F. J. Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. *Carbohydrate Research*. **2004**, 339,1029–1034.

¹⁹¹ Shearer, A. E.; Dunne, C. P.; Sikes, A.; & Hoover, D. G. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. *Journal of Food Protection*. **2000**, 63, 1503–1510.

¹⁹² de Lamo-Castellvi, S.; Ratphitagsanti, W.; Balasubramaniam, V. M.; & Yousef, A. E. Inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores by a combination of sucrose laurate and pressure-assisted thermal processing. *Journal of Food Protection*. **2010**, 73, 2043–2052.

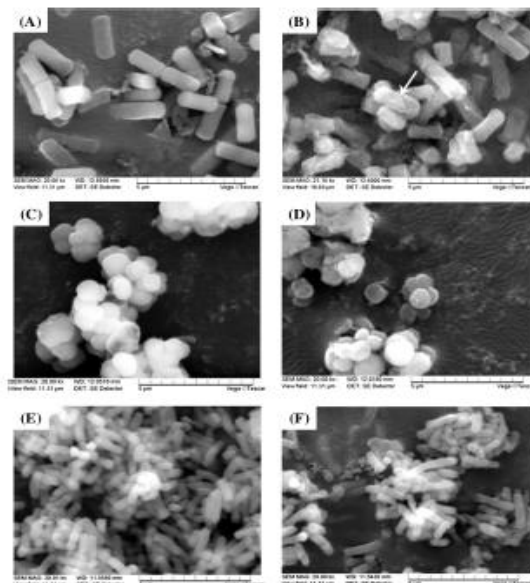


Figure 37. Effet du monocraprate de saccharose sur la morphologie de *Bacillus cereus* (A, B), *Staphylococcus aureus* (C, D) et *Escherichia coli* (E, F). (A, C, E) non traité ; (B, D, F) traités avec monocraprate de saccharose à une valeur de CMI pendant 6 h.

3. L'activité antifongique

En plus de leurs activités antimicrobiennes, certains esters de sucres ont une activité antifongique. AlFindee et al.¹⁹³ ont testé une série d'esters de sucres contre un panel de pathogènes fongiques humain et végétal (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus* et *Fusarium graminearum*) en utilisant le voriconazole (un azole antifongique de classe) et K2031 comme témoin. Les résultats montrent que les esters de mannose sont relativement actifs contre les souches testées. Ces mêmes esters ont une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*, méthicillin-résistant *S. aureus*.

IV. Applications des esters de sucres

Les esters de sucres ou sucroester sont des tensioactifs non-ioniques, non toxiques, biodégradables. En raison de leurs propriétés stabilisantes et de conditionnement ils sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire, détergente, pharmaceutique, dans la chimie fine et l'agricole.

1. Application des esters de sucres et d'acide gras dans l'industrie alimentaire

Grâce à leur activité de surface et de leurs pouvoir émulsifiant, les esters de sucres sont des prometteurs pour des applications dans l'industrie alimentaire. Les esters de saccharose à longue

¹⁹³ AlFindee, M. N.; Zhang, Q.; Subedi, Y. P.; Shrestha, J. P.; Kawasaki, Y.; Grilley, M.; et al. One-step synthesis of carbohydrate esters as antibacterial and antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 765–774.

chaîne sont les plus utilisés. Les esters de saccharose à haute valeur HLB interagissent le plus fortement avec des protéines (**Figure 38**). Des effets spécifiques sont obtenus dans différents produits alimentaires¹⁹⁴ : Ils peuvent être utilisés comme émulsifiants dans pratiquement tous les produits alimentaires, y compris les produits de boulangerie, les confiseries, les céréales, les produits laitiers, les crèmes glacées et les sauces.

- Ils empêchent la précipitation des protéines lors de la stérilisation des laits de soja.
- Dans les vinaigrettes et les sauces, les esters de saccharose stabilisent les protéines de lait grâce aux liaisons hydrophobes (**Figure 38**).
- Dans la confiserie, l'interaction de la gélatine avec les esters de saccharose donne une structure plus tendre et une durée de conservation accrue.
- Les esters de sucres permettent aussi de limiter l'adhésion des bombons et des nougats sur l'emballage.
- Il facilitent l'étalement du chocolat en réduisant sa viscosité.
- Dans les produits de boulangerie, l'ajout des esters de sucre permet d'obtenir un réseau de gluten plus flexible donc une texture plus fine et plus douce qui résiste mieux aux forces mécaniques appliquées lors du pétrissage intensif.

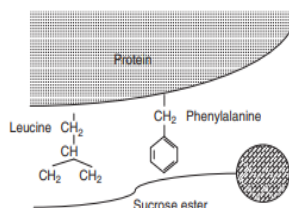


Figure 38. Liaisons hydrophobiques entre la protéine et l'ester de saccharose.

Mark Stuart Miller et Kevin James Surber¹⁹⁵ ont inventé des polyesters de saccharose qui remplace le beurre de cacao dans la production du chocolat. Les produits de chocolat améliorés ont des propriétés de texture et de sensation en bouche similaires à celles du chocolat conventionnel avec beaucoup moins de calories et une teneur en matières grasses inférieure. De plus, les propriétés de texture et de sensation en bouche peuvent être modifiées pour diverses utilisations en faisant varier les proportions relatives des polyesters d'acides gras de saccharose et de l'huile.

¹⁹⁴ Nelen, B. A. P.; Bax, L.; & Cooper, J. M. Sucrose Esters. *Emulsifiers in Food Technology*. **2014**,147–180.

¹⁹⁵ Mark Stuart Miller et Kevin James Surber. European Patent.**1995.0771150A1**.

2. Utilisation des esters de sucres comme détergents

Parker et al.¹⁹⁶ ont tenté de produire des détergents à base d'ester de saccharose pour concurrencer les tensioactifs à base de pétrole, avec l'avantage supplémentaire de la biodégradabilité. Le produit était un mélange de monoester de saccharose (27%) avec des esters supérieurs, du saccharose, des mono-, di- et tri-glycérides avec du potassium savons (30%). Cependant, en raison de difficultés de traitement, les détergents TAL™ n'ont jamais été commercialisé par Tate & Lyle.

3. Utilisation des esters de sucres en cosmétique

Les esters de sucre sont compatibles avec la peau, le cocoate de saccharose (SL-40), a été utilisé comme excipient pharmaceutique dans les produits dermatologiques. Avec un HLB de 15, c'est un émulsifiant largement utilisé dans les formulations cosmétiques émoullientes hydratantes pour la peau. Il contient un mélange d'esters de saccharose et d'acides gras de noix de coco dans une solution aqueuse d'éthanol¹⁹⁷.

Kipatrick-liverman et Miller¹⁹⁸ ont inventé des compositions cosmétiques pour bâtons transparents gélifiés contenant de l'alcool et de l'eau et au moins un ester de saccharose (par exemple le cocoate de saccharose) en tant qu'agent clarifiant.

4. Applications pharmaceutiques

En plus de leurs caractères émulsifiants et stabilisants, les esters de sucres sont utilisés dans le domaine pharmaceutique comme agents de solubilisation qui modifie la biodisponibilité des médicaments en facilitant leur absorption et leur pénétration à travers la membrane cellulaire.

De nombreux groupes de recherche se sont concentrés sur l'exploitation de la propriété amphiphile des esters de sucres pour améliorer la solubilité, la stabilité et l'absorption des médicaments par la membrane. Les esters de sucres et plus particulièrement les esters de saccharose (**Tableau 7**) peuvent être facilement hydrolysés par les enzymes digestives et éliminés par le corps¹⁹⁹.

¹⁹⁶ Parker, K.J.; James, K. & Hursford, J. Sucrose ester surfactant – a solventless process and the products thereof. In Hickson, J.L. (ed). *Sucrochemistry*. **1977**, 97–114. Washington, DC, American Chemical Society.

¹⁹⁷ Ahsan, F.; Arnold, J. J.; Meezan, E.; & Pillion, D. J. Sucrose cocoate, a component of cosmetic preparations, enhances nasal and ocular peptide absorption. *International Journal of Pharmaceutics*. **2003**, 251, 195–203.

¹⁹⁸ Kilpatrick-Liverman, LT.; Miller LA. United States. **1997**.US5776475A

¹⁹⁹ Shigeoka, T; Izawa, O.; Kitazawa, K.; Yamauchi, F. Studies on the metabolic fate of sucrose esters in rats. *Food Chem Toxicol*. **1984**, 22, 409–14.

Tableau 7. Applicabilité des esters de saccharose dans diverses formulations pharmaceutiques d'administration de médicaments.

<i>Médicaments</i>	<i>Formulation</i>	<i>Ester de sucre</i>
Ibuprofène ²⁰⁰	comprimé	Stéarate de saccharose (HLB : 1,7,15) Palmitate du saccharose (HLB :15)
Glybuzole ²⁰¹	Produit moulu Produit fondu	Stéarate de saccharose (HLB : 16)
17-β-Oestradiol hemihydrate ²⁰²	Comprimé d'extrudât fondu	Palmitate du saccharose (HLB :15)
Carmolyn sodium ²⁰³	Proniosome dérivé de noisome	Stéarates de saccharose (HLB :11,16)
Furosemide ²⁰⁴	Comprimé à désintégration rapide	Stéarates de saccharose (HLB :11,15,16)
Paracétamol ²⁰⁵	Mélange physique	Palmitate du saccharose (HLB :16) Stéarates de saccharose (HLB : 9)
Metoprolol tatratre ⁹⁶	Comprimé matriciel directement compacté	Stéarates de saccharose (HLB : 0, 1, 5, 9, 11, 15,16)
Vitamine ²⁰⁶	Granulés préparés par granulation humide, granulation à l'état fondu ou compression et broyage	Stéarates de saccharose (HLB :3,11)

Chansanroj et al.²⁰⁷ ont focalisé leurs travaux sur l'effet des propriétés hydrophiles-lipophiles sur les propriétés de compression et la libération des médicaments.

²⁰⁰ Ntawukulilyayo, J. D.; Demuynck, C.; & Remon, J. P. Microcrystalline cellulose-sucrose esters as tablet matrix forming agents. *International Journal of Pharmaceutics*.**1995**, 121, 205–210.

²⁰¹ Otsuka, M.; Ofusa, T.; Matsuda, Y. Dissolution Improvement of Water-Insoluble Glybuzole by Co-grinding and Co-melting with Surfactants and their Physicochemical Properties. *Colloids Surf B*.**1998**,10,217-226.

²⁰² Hülsmann, S.; Backensfeld, T.; Keitel, S.; & Bodmeier, R. Melt extrusion – an alternative method for enhancing the dissolution rate of 17β-estradiol hemihydrate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.**2000**,49, 237–242.

²⁰³ Abd-Elbary, A.; El-laithy, H. M.; & Tadros, M. I. Sucrose stearate-based proniosome-derived niosomes for the nebulisable delivery of cromolyn sodium. *International Journal of Pharmaceutics*.**2008**, 357,189–198.

²⁰⁴ Koseki, T.; Onishi, H.; Takahashi, Y.; Uchida, M.; & Machida, Y. Preparation and Evaluation of Novel Directly-Compressed Fast-Disintegrating Furosemide Tablets with Sucrose Stearic Acid Ester. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*.**2009**, 32, 1126–1130.

²⁰⁵ Szűts, A.; Budai-Szűcs, M.; Erős, I.; Otomo, N.; & Szabó-Révész, P. Study of gel-forming properties of sucrose esters for thermosensitive drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. **2010**, 383, 132–137.

²⁰⁶ Seidenberger, T.; Siepmann, J.; Bley, H.; Maeder, K.; & Siepmann, F. Simultaneous controlled vitamin release from multiparticulates: Theory and experiment. *International Journal of Pharmaceutics*.**2011**,412, 68–76.

²⁰⁷ Chansanroj, K.;& Betz, G. Sucrose esters with various hydrophilic–lipophilic properties: Novel controlled release agents for oral drug delivery matrix tablets prepared by direct compaction. *Acta Biomaterialia*, **2010**,6, 3101–3109.

D'après cette étude la propriété hydrophile-lipophile dépend de la proportion de monoesters dans la composition des esters de saccharose joue un rôle important dans les propriétés de compression, le taux de la libération de médicament et mécanisme de libération. L'augmentation de la quantité des monoesters à hydrophilie croissante a entraîné une augmentation dans la porosité, la reprise élastique et la résistance à la traction de la matrice comprimés ainsi que de faciliter le comportement de gonflement qui retarde le taux de libération du médicament. Les sucro-esters peuvent être introduits dans les produits médicamenteux en tant que vecteurs de principe actifs, de vitamines²⁰⁸ et d'antibiotiques²⁰⁹.

²⁰⁸ Duell, H.E. Enhancing the absorption of orally administered medicament with disaccharide fatty acid esters. United States Patents. **1964**.3160565A

²⁰⁹ Handa, Y. et Nakamura, S. Pharmaceutical composition for the treatment of skin wounds. European Patent. **1989**.EP0343671A3.

Introduction

La synthèse des esters de sucres par la voie enzymatique présente de nombreux avantages par rapport à la voie chimique classique. L'utilisation des lipases comme biocatalyseurs permet en effet de greffer un acide gras sur un sucre par estérification directe en une seule étape dans des conditions douces. Les esters de sucres sont des molécules à potentialités tensioactives dont les propriétés dépendent principalement de la longueur de la chaîne^{210,211}.

Dans ce contexte, une série homologue d'esters de D-xylose avec des longueurs de chaînes différentes (C12-C22) est synthétisée en une seule étape par simple estérification enzymatique avec une lipase. Leurs propriétés de surface sont ainsi évaluées.

L'activité catalytique de l'enzyme est fonction de plusieurs paramètres (la solubilité des substrats, leurs concentrations, la quantité du biocatalyseur, la teneur en eau, la température...). La principale difficulté de ce type de réaction est la solubilité des substrats qui sont de natures polaires différentes.

I. Etude préliminaire

1. Synthèse du 1-O-hexadécanoyl-D-xylopyranose

La synthèse des esters à base de xylose est préalablement effectuée par catalyse enzymatique avec la lipase de *Candida antarctica* B en présence de l'acide palmitique dans un solvant doux, l'éthylméthylcétone (EMC) à 60°C. La réaction est illustrée dans le schéma ci-dessous.

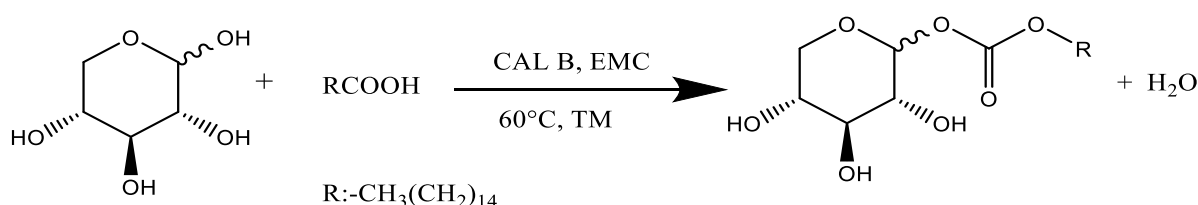


Schéma 21. Estérification enzymatique du D-xylose par l'acide palmitique.

L'étude par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire RMN ¹H et ¹³C et par la ATR IR a permis d'identifier la structure de ce composé.

Les analyses RMN ont été faites dans le CDCl₃. On note en RMN ¹H la présence d'un triplet correspondant aux protons méthyliques CH₃CH₂-, qui résonnent vers 0.88. De 1.13 à 1.46

²¹⁰ Kempen, S.E.H.J.V.; Boeriu, C.G.; Schols, H.A.; Waard, P.D.; Linden, E.V.D.; Sagis, L.M.C. Novel surface-active oligofructose fatty acid mono-esters by enzymatic esterification. *Food Chem.* **2013**, 138, 1884–1891.

²¹¹ Phanuphong, C.; Areeya, J.; Ninnapat, T.; Sarita, S.; Punyawatt, P. green synthesis optimization of glucose palm oleate and its potential use as natural surfactant in cosmetic emulsion. *Cosmetics.* **2022**, 9,1-15.

(48H) ppm, on note la présence d'un massif caractéristique des groupes méthyléniques de la chaîne hydrophobe de deux anomères. Les protons du groupement méthylène porté par le carbone C₂ de la chaîne hydrophobe résonne sous forme de multiplet entre 2.22 et 2.51 pour le palmitate de xylose. On observe un multiplet du groupement méthylène porté par C₃ (4H) qui résonne entre 1.49 et 1.75 ppm. Le massif complexe des protons appartenant au noyau xylose (18H des anomères α et β) est observé entre 3.14 et 5.64 ppm.

En RMN ¹³C, le groupe carbonyle résonne vers 174.72(CH₂C=O β) et 173.97 (CH₂C=O α). Les spectres de RMN ¹³C est caractérisés par la résonnance de C_{1'} de xylose vers 100.64 (C_{1'} α), 102.91(C_{1'} β). La présence de la fonction ester est détectée par la spectroscopie infrarouge. L'analyse des spectres montre la présence de la bande d'élongation caractéristique du OH du sucre vers 3348.40 cm⁻¹. La bande à 1035.50 est attribuée à la liaison C-O et la bande caractéristique du carbonyle C=O d'ester apparait vers 1713.84 cm⁻¹.

2. Résultats et discussion

L'étude de l'avancement de la réaction d'estérification du D-xylose en présence de l'acide hexanoïque, avec un rapport molaire de substrats (1/1), montre une augmentation progressive en fonction du temps (**Figure 39**). La conversion maximale de l'acide palmitique en ester est de 65 % au bout de 72 h. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'estérification du glucose par l'acide palmitique à un rapport équimolaire ²¹².

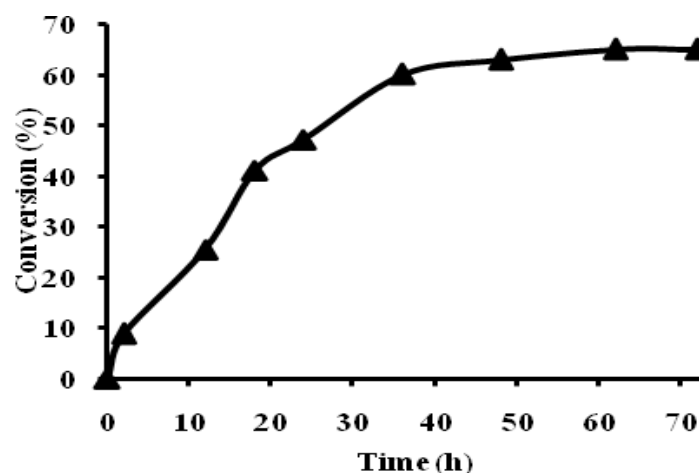


Figure. 39. Avancement de la réaction de la synthèse de hexadécanoyl-1-O-D-xylopyranose
Conditions réactionnelles : 1.33 mmol D-xylose, 1.33 mmol acide palmitique, 5 mL éthyl méthyl cétone, 30 mg CAL B, 30 mg tamis moléculaire (4A^o), à 60 °C, 250 rpm.

²¹² Tarahomjoo, S.; & Alemzadeh, I. Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, 33, 33–37.

Le coût de la lipase est une des limites à la production des esters de sucres par la méthode enzymatique. Si la lipase présente une stabilité plus élevée pendant la réaction catalytique et qu'elle peut être utilisée de nombreuses fois, le coût économique peut être réduit dans une certaine mesure. Par conséquent, la réutilisation des enzymes au cours du processus enzymatique a une importance économique. La stabilité et la réutilisabilité de la lipase de *Candida antarctica* B ont été testées dans la réaction d'estérification du xylose.

Dans le but d'évaluer l'activité enzymatique spécifique de lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) dans la réaction d'estérification du xylose (dans les mêmes conditions sus-citées) nous avons séparé l'enzyme du milieu réactionnel par simple filtration. Le biocatalyseur récupéré du 1^{er} cycle par filtration est lavée dans 20 ml de butanol. On suit le même protocole dans chaque cycle. Les résultats de la conversion et de l'activité enzymatique sont regroupés dans le **tableau 8**.

Tableau 8. Réutilisation de la CAL B.

Cycle	Conversion (%)	Activité enzymatique ($\mu\text{mols}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	65	8.67
2	63.43	8.57
3	62	8.25
4	60.48	7.90

La conversion relative en acides gras atteint après quatre cycles de réutilisation 60.48 % à 60°C. La performance catalytique de la CAL B pour produire l'ester de palmitate de xylose pendant quatre périodes consécutives est observée.

L'activité enzymatique est évaluée en utilisant l'équation ci-dessous²¹³.

$$A(\mu\text{mols}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{(V_1 - V_2)}{t \times m} \times 1000 \times \frac{V_m}{V_a}$$

où V_1 (mL) est le volume de NaOH consommé dans le titrage pris à la minute zéro de réaction, V_2 (ml) est le volume de NaOH consommé en titrage pris au moment t minutes de réaction, C (mol L^{-1}) est la concentration de NaOH, t (min) est temps de réaction, m (g) est la masse de lipase dans la réaction, V_a (mL) est le volume de l'échantillon et V_m (ml) est le volume du milieu réactionnel.

La lipase de *Candida antarctica* B reste stable, conservant la plupart de ses caractéristiques originales après des utilisations consécutives. 98,84 % et 91,11% de l'activité enzymatique

²¹³ Aguiéiras, E. C. G.; Veloso, C. O.; Bevilaqua, J. V.; Rosas, D. O.; da Silva, M. A. P. & Langone, M. A. P. Estolides Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipases. *Enzyme Research*, **2011**, (2011),1–7.

initiale de la CAL B est conservée respectivement après le deuxième et le quatrième cycle de la réutilisation de la lipase.

II. Optimisation de l'estérification du D-xylose par des acides gras.

Synthèse de nouveaux tensioactifs

Les esters de sucres sont des molécules amphiphiles constitués de deux parties, l'une hydrophile et l'autre hydrophobe. Leur comportement en tant qu'agents tensioactifs est influencé par leurs structures ; la queue apolaire joue un rôle important dans la diversité des propriétés de surface exprimées par ce type de composés. Dans ce qui suit, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'une série d'esters de D-xylose en variant la longueur de la chaîne grasse (C12, C14, C16, C20, C22). Les esters sont obtenus par estérification enzymatique catalysée par la CAL B dans l'EMC. La réaction est illustrée dans le schéma suivant :

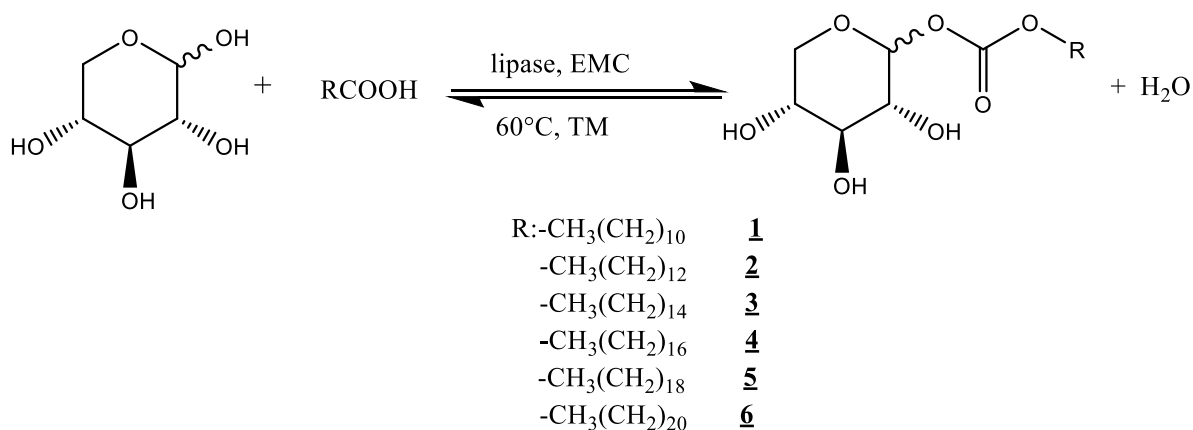


Schéma 22. Estérification enzymatique du D-Xylose par des acides gras.

L'étude par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire RMN ¹H et ¹³C et par la ATR IR nous a permis d'identifier sans ambiguïté la structure de ces composés.

Les analyses RMN ont été faites dans le CDCl₃. Nous avons noté en RMN ¹H la présence dans toutes les molécules d'un triplet correspondant aux protons méthyliques CH₃CH₂ R qui résonnent vers 0.88.

De 1.11 à 1.47 ppm, on note les massifs caractéristiques des groupes méthyléniques de la chaîne hydrophobe de deux anomères (40 H de C_{4'} à C_{13'}) pour le myristate du xylose et entre 1.15 et 1.45 observé dans le cas de béhénate du xylose (72H). De 1.08 à 1.50 ppm pour l'arachidate du xylose (64H).

Les protons du groupement méthylène porté par le carbone C_{2'} de la chaîne hydrophobe résonne sous forme de multiplet vers 2.38 ppm pour le myristate de xylose. Entre 2.26 –2.50

ppm pour le béhénate de xylose. Ils apparaissent entre 2.19-2.53 ppm dans le cas d'arachidate de xylose.

Un multiplet du groupement méthylène (**4H** de deux anomères) porté par l'atome de carbone **C₃** apparait entre 1.46 et 1.79 ppm dans la RMN ¹H de myristate de xylose, et de 1.52 et 1.76 pour la béhénate de xylose. Il résonne entre 1.52 et 1.78 ppm dans le cas d'arachidate de xylose.

Entre 3,14 et 5.67 ppm, le massif complexe des protons appartenant au noyau xylose comportant **18** protons des anomères α et β de myristate de xylose. Le même massif est observé et dans l'intervalle (5.64 – 2.94) pour la béhénate du xylose. Ce massif complexe apparait entre 3.04 et 5.40 ppm dans le cas d'arachidate de xylose

L'analyse des spectres de RMN ¹³C met en évidence la présence du groupe carbonyle dans tous les esters de sucre qui apparait vers 174.75 (CH₂CO β) et 174.03(CH₂CO α) pour les deux anomères de myristate de xylose. Ce groupe résonne vers 174.72(CH₂CO β) et 173.97 (CH₂CO α) pour les anomères de palmitate de xylose

Les carbonyles des anomères de béhénate de xylose apparaissent vers 174.92 ppm (CH₂CO de α) et 175.06 (CH₂CO de β). Ils résonnent vers 174.74 ppm (CH₂CO de α) et 177.53 (CH₂CO de β) pour l'arachidate de xylose.

Les spectres de RMN ¹³C sont caractérisés par la résonance de **C₁** du xylose vers :

- 97.01 (**C₁ β**), 95.85 (**C₁ α**) pour les anomères de myristate de xylose
- 94.15 (**C₁ β**), 94.04 (**C₁ α**) pour les anomères de béhénate de xylose
- 92.66 (**C₁ β**), 90.81 (**C₁ α**) pour les anomères d'arachidate de xylose

La présence de la fonction ester est mise en évidence par la spectroscopie infrarouge. L'analyse des spectres montre la présence de bande d'élongation vers 3356.26 cm⁻¹ et 3444.97 cm⁻¹ correspond au OH de sucre pour le myristate de xylose qui apparait vers 3440.60cm⁻¹ pour l'arachidate de xylose et une bande caractéristique du carbonyle C=O de l'ester qui apparait vers 1713.43 cm⁻¹ pour myristate de xylose et vers 1727.46cm⁻¹ pour l'arachidate.

1. Résultats et discussion

a. Effet du rapport molaire entre les réactifs

Dans un but d'optimisation, la réaction d'estérification du xylose par des acides à différentes longueur de chaîne est effectuée en variant le rapport molaire entre les réactifs. Les acides gras utilisés sont : l'acide laurique, acide myristique, acide hexadécanoïque, acide stéarique,

acide arachidique, acide béhénique respectivement C12, C14, C16, C18, C20, C22. Les résultats sont donnés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Effet du rapport molaire entre le xylose et l'agent acylant

Agent acylant	Conversion (%)							
	2h		24 h		48 h		72h	
	Rapport molaire							
	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2
Acide dodécanoïque (C12)	0	0	1.2	15	4.07	22.5	10.11	12.5
Acide tétradécanoïque (C14)	0	23.53	2.78	23.53	5.56	41.18	30.56	38.82
Acide hexadécanoïque (C16)	3.07	8.57	15.38	37.14	23.09	42.86	65	14.29
Acide octadécanoïque (C18)	0	5.56	16	16.67	25.38	43.35	38.5	41.67
Acide eicosanoïque (C20)	0	0	16.20	16.67	28.02	50.75	41.62	50.6
Acide docosanoïque (C22)	0	17.5	20	37.5	28.89	67.5	44.44	62.5

Conditions réactionnelles : 0,6 mmol α -(+) -D-Xylose, x mmol agent acylant, 30 mg Lipase B de *Candida antarctica*, tamis moléculaire (4A°) en quantité équimolaire avec les lipases, dans 2.5 ml d'EMC 60°C, 250 rpm.

Le D-xylose est estérifié par l'acide gras en présence de 30mg de lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) immobilisée sur résine. Les réactions ont lieu dans l'EMC à 60°C en variant le rapport molaire entre les réactifs (l'agent acylant et le sucre).

Afin d'évaluer l'avancement de la réaction, un dosage a été effectué à intervalle régulier. Les conversions regroupées dans le **tableau 9** montrent que le rapport entre les substrats affecte l'activité de la lipase. La réaction se déclenche au bout de 2h après l'ajout du catalyseur pour le rapport 1/2, l'activité est moins importante pour un rapport équimolaire.

Cette étude (sucre / agent acylant) montre que le rapport 1/2 donne en général les meilleures conversions 67,5% pour l'acide béhénique et 41.18% pour l'acide myristique.

On suppose également que l'augmentation de l'acide gras peut affecter le pH du milieu réactionnel et par conséquent changer la polarité du site catalytique. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons choisi l'acide béhénique pour étudier l'effet de l'excès de l'agent acylant à un rapport 1 /2,5 (**Figure 40**).

L'excès de l'acide gras dans le milieu réactionnel peut entraîner un encombrement au niveau de site actif et empêcher l'accès du substrat polaire. Ceci est confirmé par la conversion faible (36%) obtenue pour le rapport (1/2.5).

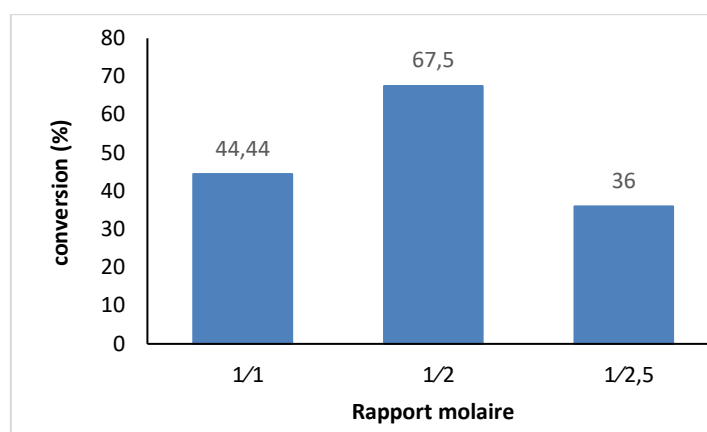


Figure 40. Effet du rapport entre les réactifs dans la réaction d'estérification du xylose par l'acide béhénique.

Conditions réactionnelles : 0.6 mmol α -(+)-D-Xylose., (0.6 /1.2/1.5) mmol acide béhénique, 30 mg Lipase B de *Candida antarctica*, tamis moléculaire (4A^o) en quantité équimolaire avec les lipases, dans 2.5 ml d'EMC, 60°C, 250 rpm.

L'augmentation de la proportion d'acide gras pourrait affecter négativement la conformation de la lipase en raison d'une acidification du milieu réactionnel, une explication suggérée par Erika Zago et al suite à leur étude de l'effet du rapport molaire dans la réaction d'estérification de l'amidon par l'acide palmitique catalysée par la CAL B²¹⁴. Des résultats similaires montrant également l'effet inhibiteur de l'excès de l'agent acylant ont été rapportés par Uswatun Hasanah Zaidan et al.²¹⁵ dans la synthèse du caprate de lactose catalysé par une lipase libre et immobilisée.

Alagöz et al.²¹⁶, ont rapporté que le pH a un impact significatif sur la protonation de l'enzyme et par conséquent sur les changements d'activité de la molécule ce qui explique la diminution de taux de la conversion.

Cette étude montre également l'effet de la longueur de la queue hydrophobe, l'agent acylant ayant la chaîne la plus longue a la conversion la plus élevée. Ce qui confirme que la réaction d'estérification par la lipase favorise le réactif le plus lipophile.

b. Effet de la longueur de chaîne

La **Figure 41** montre les meilleures conversions obtenues d'estérification du xylose en fonction de la longueur de chaîne qui sont variable d'un acide à un autre. On constate que le

²¹⁴ Zago, E.; Joly, N.; Chaveriat, L.; Lequart, V.; & Martin, P. Enzymatic synthesis of amphiphilic carbohydrate esters: Influence of physicochemical and biochemical parameters. *Biotechnology Reports* .2021. 30, e00631.

²¹⁵ Zaidan, U. H.; Abdul Rahman, M. B.; Othman, S. S.; Basri, M.; Abdulmalek, E.; Abdul Rahman, R. N. Z. R.; & Salleh, A. B. Biocatalytic production of lactose ester catalysed by mica-based immobilised lipase. *Food Chemistry*.2012,131,199-205

²¹⁶ Alagöz, D.; Çelik, A.; Yildirim, D.; Tükel, S.S.; Binay, B. Covalent immobilization of *Candida methylcya* formate dehydrogenase on short spacer arm aldehyde group containing supports. *J. Mol. Catal. B Enzym.*2016, 130, 40–47.

taux le plus élevé est obtenu pour l'acide béhénique (C22) qui a une chaîne hydrophobe très longue ce qui signifie que la lipase favorise la catalyse de substrat hydrophobe volumineux.

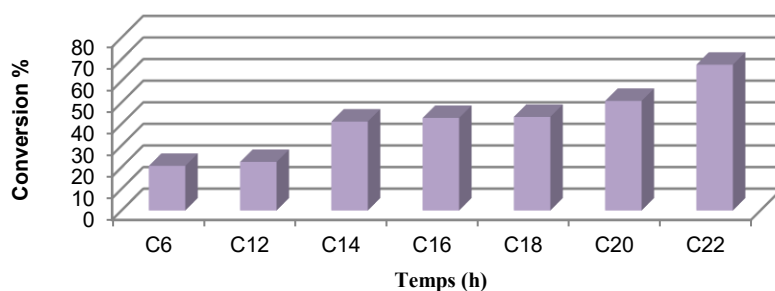


Figure 41. Effet de longueur de chaîne sur la conversion du xylose.

Conditions réactionnelles : 0.6 mmol α -(+)-D-Xylose, 1.2 mmol acide palmitique, 30 mg Lipase B de *Candida antarctica*, tamis moléculaire (4A^o) en quantité équimolaire avec les lipases, dans 2.5 ml d'EMC 60°C, 250 rpm.

Les conversions obtenues varient de 22,5 % pour l'acide dodécanoïque à 67,50 % pour l'acide docosanoïque (**Figure 41**). Dans l'estérification du xylose avec l'acide dodécanoïque, on obtient une conversion maximale de 22,5 % après 48 heures de réaction (**voir tableau 9**). La CAL B présente donc une faible activité d'estérification dans les conditions étudiées et le 1-O-dodécanoyl-D-xylopyranose **1** est obtenu. La synthèse du 1-O-hexadécanyl-D-xylopyranose a été réalisée dans les mêmes conditions avec une conversion de 42,86 % après 48 h. Cette valeur est proche de celles obtenues par l'acide tétradécanoïque (41,18 %) et l'acide octadécanoïque (43,35 %). Dans l'estérification du xylose avec l'acide eicosanoïque, on obtient une bonne conversion de 50,75 % après 48 h comme indiqué dans le **tableau 9**. On observe également une augmentation de la conversion avec l'acide docosanoïque (67,5 % après 48 h). La plus grande activité enzymatique est observée avec l'augmentation de la longueur des chaînes d'acides gras, ce qui améliore la conversion. Selon ces résultats, la longueur de chaîne du donneur d'acyle a une influence importante sur le taux de conversion et l'acide béhénique donne la plus forte conversion par rapport aux autres acides gras utilisés. En conséquence, l'acide gras à la chaîne la plus longue peut être plus favorisé pour accéder facilement au site actif. Ces résultats sont en accord avec les études publiées sur le fructose et le glucose avec différentes longueurs de chaîne^{217, 218}. La compréhension de la structure et de la fonction de l'enzyme est très importante pour expliquer ces résultats. Les lipases agissent

²¹⁷ Sabeder, S.; Habulin, H.; Knez, Z. J. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Food Eng.* **2006**, *77*, 880–886

²¹⁸ Cao, L.; Fischer, A.; Bornscheuer, U.T.; Schmid, R.D. Lipase catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester. *Biocatalysis and Biotransformation*. **1996**, *14*, 269-283.

en interface lipidique-eau²¹⁹ et lorsque la concentration du substrat est suffisamment élevée pour entraîner la formation de micelles agrégées ou d'émulsion, la lipase présente une activité élevée car elle est plus active dans un système hétérogène^{220, 221}. L'activité catalytique des lipases est contrôlée par une structure amphipathique connue sous le nom d'hélice α située au-dessus du site actif²²².

Avant d'atteindre la micellisation la lipase est inactive. L'activité enzymatique nécessite une activité interfaciale pour la mobilité du couvercle. Dans ces conditions, l'enzyme change sa conformation en déplaçant le couvercle hélicoïdal. Il est important de mentionner que l'ouverture du couvercle est déterminée par l'interaction hydrophobe avec le noyau de la micelle. En raison de la présence d'une quantité catalytique d'eau et d'acides gras, ces substrats apolaires forment des micelles. Ce changement crée une grande zone hydrophobe autour de la triade catalytique. La lipase de *Candida antarctica* B est une enzyme interfaciale, elle possède un patch hydrophobe près de la liaison lipidique et une nature hydrophile à l'arrière.

Araújo et al.²²³ ont démontré que des niveaux élevés d'activité n'ont été observés qu'en présence d'une concentration minimale de substrat, à laquelle on observe une activation interfaciale.

c. Effet des enzymes modifiées sur la réaction d'estérification du xylose par des acides gras

L'immobilisation des enzymes vise à renforcer la stabilité de l'enzyme dans le milieu organique et d'améliorer sa résistance à la température dans le milieu réactionnel. Dans cette partie nous avons utilisé des enzymes immobilisées au laboratoire par différentes méthodes : l'adsorption et l'enrobage.

Quatre lipases modifiées au laboratoire²²⁴ ont été sélectionnées : la lipase *Pancréatique de porc* immobilisée sur célite (PPLI_c), Lipase de *Candida cylindracea* immobilisée sur célite

²¹⁹ Höck, H.; Engel, S.; Weingarten, S.; Keul, H.; Schwaneberg, U.; Möller, M.; Bocola, M. Comparison of *Candida antarctica* Lipase B Variants for Conversion of ϵ -Caprolactone in Aqueous Medium—Part 2. *Polymers*. **2018**,10,1-16.

²²⁰ Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M.; Miller, R. Lipases at interfaces: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, 147, 237-250.

²²¹ Sarda, L.; Desnuelle, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*. **1958**, 30, 513-521.

²²² Marciello, M.; Filice, M.; Palomo, J.M. Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts. *Catalysis Science & Technology*. **2012**,2,1531-1543.

²²³ Araújo, R.; Casal, M.; and Cavaco-Paulo A. Application of enzymes for textiles fibres processing. *Biocatal. Biotechnol.* **2008**,26, 332-349.

(CCLI_c)²²⁵, la lipase *Pancréatique de porc* enrobée dans le span 65 (PPL C65) et la lipase de *Candida cylindracea* enrobée dans le même span (CCL C65)²²⁶.

Afin d'évaluer l'efficacité des lipases sus-cités, nous les avons testés dans la réaction d'estérification du xylose par trois acides gras (l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide arachidique) en faisant réagir un équivalent du sucre avec deux équivalents d'agent acylant dans l'EMC à 60°C.

Les résultats obtenus sont donnés ci-après (**Tableau 10,11 et 12**).

Tableau 10. Influence des lipases modifiées : cas acide myristique

Enzyme	Conversion (%)			
	2h	24h	48h	72h
PPLI _c	18.64	1.69	0	0
CCLI _c	0	1.69	3.39	5.08
PPL C65	0	25.42	0	0
CCL C65	0	5.08	6.78	0
CAL B	23.52	23.52	41.18	38.82

Conditions réactionnelles : 0.6 mmol α -(+) -D-Xylose., 1.2 mmol acide miristique, 30 mg Lipase B de *Candida antarctica*, tamis moléculaire (4A°) en quantité équimolaire avec les lipases, dans 2.5 ml d'EMC 60°C, 250 rpm.

Tableau 11. Influence des lipases modifiées : cas acide palmitique.

Enzyme	Conversion (%)			
	2h	24h	48h	72h
PPL I _c	38.03	23.94	14.08	15.49
CCL I _c	15.49	28.17	15.49	33.80
PPL C ₆₅	0	21.13	1.41	0
CCL C ₆₅	0	21.13	18.31	0
CAL B	8.57	37.14	42.86	14.29

Conditions réactionnelles : 0.6 mmol α -(+) -D-Xylose., 1.2 mmol acide palmitique, 30 mg Lipase B de *Candida antarctica*, tamis moléculaire (4A°) en quantité équimolaire avec les lipases, dans 2.5 ml d'EMC 60°C, 250 rpm.

²²⁴ Rezgui, N. Les esters de sucres. Synthèse et optimisation. Thèse de doctorat, sous la direction du Prof. Bidjou-Haiour chahra, Annaba, Université Badji Mokhtar, **2022**, 212 p.

²²⁵ Rezgui, N.; Bidjou-Haiour, C. Efficient Synthesis of Bio-Surfactant from D-Glucose by Immobilized *Candida cylindracea* Lipase-Catalyzed Reaction in Ionic Liquids. *Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci.* **2020**, *9*, 180-184

²²⁶ Rezgui, N.; Bidjou-Haiour C. Physical and chemical study of coated *Candida cylindracea* with sorbitan esters. *Res. J. Chem. Environ.* **2021**, *25*, 43-48

Tableau 12. Influence des lipases modifiées : cas acide béhénique

Enzyme	Conversion (%)			
	2h	24h	48h	72h
PPL Ic	34.25	20.55	28.77	42.47
CCL Ic	0	8.22	9.59	30.14
PPL C65	12.33	41.10	19.18	26.03
CCL C65	5.48	27.40	21.40	27.40
CAL B	17.5	37.5	67.5	62.5

Conditions réactionnelles : 0.6 mmol α -(+)-D-Xylose., 1.2 mmol acide béhénitique, 30 mg Lipase B de *Candida antarctica*, tamis moléculaire (4A°) en quantité équimolaire avec les lipases, dans 2.5 ml d'EMC 60°C, 250 rpm.

Les résultats montrent que les lipases utilisées ne sont pas très efficaces lors de ces synthèses.

Par comparaison avec la PPL Ic, la CCL Ic n'est pas du tout efficace sauf dans le cas de :

- L'acide palmitique (C=33,80%, 72h).
- l'acide béhénique (C=30,14%, 72h).

La PPL Ic pourrait être candidate pour ce type de synthèse dans le cas des acides palmitique et béhénique dans la mesure où on obtient :

- C=38,03 %, 2h, pour l'acide palmitique
- C=34,25 %, 2h, pour l'acide béhénique

En comparant les temps de réaction on pourrait conclure que l'activité catalytique de la PPL immobilisée sur célite avoisine celle de la CAL B.

La PPL C65 permet également de convertir l'acide béhénique (41.1%, 24h); une valeur proche de la conversion obtenue pour la PPL Ic (42.47%, 72h).

Les plus faibles conversions sont obtenues en présence des lipases enrobées.

En comparant tous ces résultats avec ceux obtenus en présence de la lipase de *Candida antarctica* B (**Figure 42**) on constate que cette dernière est le meilleur biocatalyseur pour ce type de synthèse probablement en raison de sa thermostabilité dans une large gamme de température^{227, 228}.

²²⁷ Majumder, A.; Ramesh, N.; Gupta M. A lipase catalyzed condensation reaction with a tricyclic diketone: yet another example of biocatalytic promiscuity. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 5190-5193

²²⁸ Kobayashi, T.; Matsuo, T.; Kimura, Y.; Adachi, S. Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures. *Journal of Oil Chemists Society*. **2008**, 85, 1081-1084.

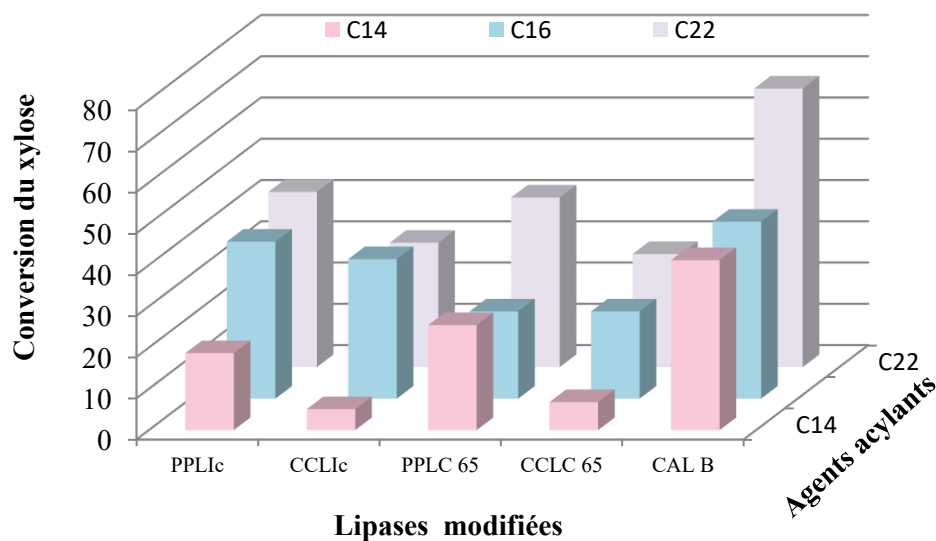


Figure 42. Effet des enzymes modifiées sur la réaction d'estérification du xylose
 Conditions réactionnelles : 0.6 mmol α -(+)-D-Xylose., 0.013mmol acide gras, 30 mg Lipase modifiée ,tamis moléculaire (4A°) en quantité équimolaire avec les lipases,dans 2.5 ml d'EMC , 60°C, 250 rpm

2. Réutilisation de la CAL B dans la réaction d'estérification du xylose par différents agents acylants

Afin d'étudier l'activité enzymatique de la CAL B dans la réaction d'estérification du xylose, nous avons choisi le méthanol comme solvant de lavage pour récupérer l'enzyme.

Nous avons utilisé six acides gras de longueur de chaînes différentes (acide hexanoïque, l'acide laurique, l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide arachidique et l'acide béhénique) pour la synthèse de monoesters du xylose. Toutes les réactions se sont déroulées dans les mêmes conditions à 60°C dans l'éthyl méthyl cétone EMC avec un rapport molaire de (1 /2) : (xylose/AA). Ces réactions sont catalysées par la même quantité de lipase optimale obtenue dans l'étude précédente.

Tous les résultats de conversions du xylose sont répertoriés dans **la figure 43**.

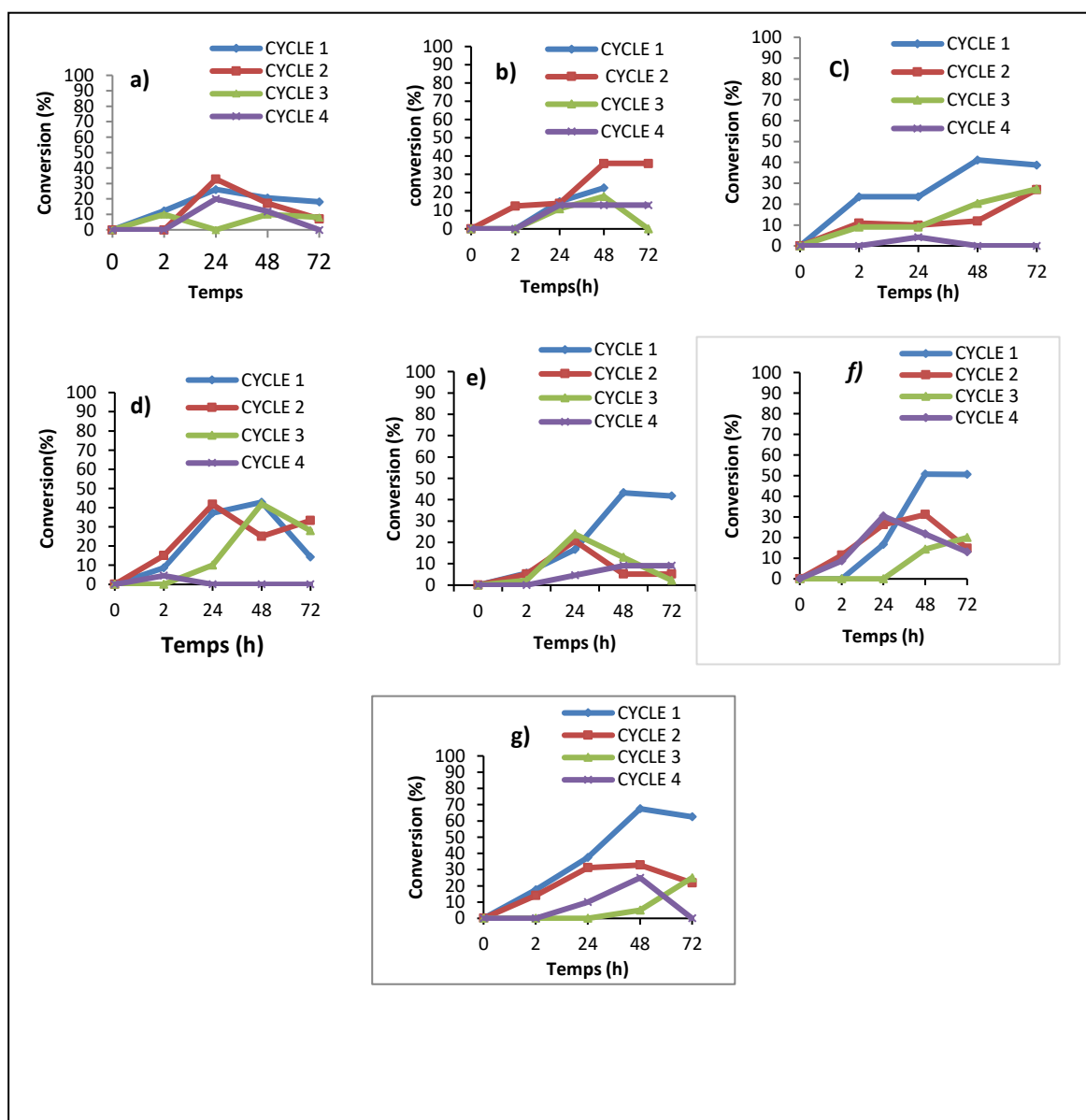


Figure 43. Réutilisation de la lipase CAL B dans la réaction d'estérification du xylose par acide gras
 a) acide hexanoïque ; b) acide dodécanoïque ; c) acide tétradécanoïque ; d) hexadécanoïque ; e) acide octadécanoïque ; f) acide eicosanoïque ; g) acide docosanoïque

La réutilisation de la CAL B dans la réaction d'estérification du xylose par l'acide hexanoïque (**Figure 43.a**) montre que l'activité catalytique augmente dans le 2^{ème} (32.86%) et 3^{ème} cycle (38%). Dans le dernier cycle la lipase reste active 48h avant sa dénaturation.

Avec un acide gras de 12 carbones (**Figure 43.b**), l'enzyme a eu une activité plus élevée au 2^{ème} cycle qui reste constante entre 48 h et 72 h où elle convertit 35.93% du substrat. Alors qu'en 1^{er} et 3^{ème} cycle à cet intervalle on observe une diminution de l'activité qui remonte au 4^{ème} cycle.

Dans le cas de l'acide myristique (**Figure 43.c**) la meilleure conversion est observée dans le 1^{er} cycle 41.18%. Dans le 2^{ème} cycle l'enzyme devient moins active mais elle reprend son activité lors de 3^{ème} cycle avec un avancement rythmique.

En présence de l'acide palmitique l'estérification du xylose, la conversion est importante dans les 3 premiers cycles, la CAL B est réutilisable jusqu'au 4^{ème} usage (**Figure 43.d**)

Selon la **Figure 43.f** les valeurs de conversion du xylose en ester en présence de l'acide stéarique sont faibles ne dépasse pas 24% alors que dans le dernier cycle on observe une activité croissante de l'activité catalytique par rapport aux autres cas.

La réutilisation de la lipase dans la réaction d'estérification du xylose par l'acide arachidique (**Figure 43.g**) et béhénique (**Figure 43.h**) montre que son activité optimale est obtenue dans le premier cycle mais elle garde une grande partie de sa performance même au dernier cycle. On déduit de cette étude que l'enzyme immobilisée est un biocatalyseur réutilisable dans le milieu organique et qu'elle peut rester stable jusqu'à sa 4^{ème} utilisation. Son comportement vis-à-vis des acides gras est variables et favorise généralement la catalyse des acides gras les plus longs.

3. Propriétés tensioactives des esters du xylose et d'acide gras

La qualité des tensioactifs provient de leurs propriétés physico-chimiques. L'intérêt de ces agents de surface réside dans leur caractère en tant qu'agents émulsifiants et leur capacité à réduire la tension de surface à une concentration la plus faible possible.

a. La balance hydrophobe-hydrophile HLB

Le numéro HLB a été introduit dans la base d'analyse complète des propriétés d'un tensioactif. C'est le moyen principal pour faire le choix optimal d'un agent émulsifiant son domaine d'application dépend de sa valeur (**Figure 44**).

Dans ce contexte, nous avons déterminé la valeur de la HLB des produits synthétisés en adaptant l'équation de Griffins¹⁶⁴. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13. HLB et propriétés des tensioactifs synthétisés

Tensioactifs synthétisés	Nbc	HLB	Etat de surfactant dans l'eau
Composé-1	C12	10.65	Emulsifiant huile /eau
Composé -2	C14	9.82	Emulsifiant huile /eau
Composé -3	C16	9.11	Emulsifiant huile /eau
Composé-4	C18	8.50	Emulsifiant huile /eau
Composé -5	C20	7.96	Emulsifiant huile /eau
Composé -6	C22	7.49	Emulsifiant huile /eau

Nbc : le nombre de carbone dans la chaîne hydrophobe.

D'après les valeurs de HLB des esters de sucres synthétisés, les différences de valeurs peuvent être attribuées à la différence de longueur de chaîne vu que la tête hydrophile est la même « xylose ». On constate que plus la longueur de chaîne hydrophobe augmente, plus la HLB diminue. Ces valeurs nous permettent de les classer suivant leurs domaines d'application²²⁹. Le numéro de la HLB ces esters révèlent leur capacité à stabiliser l'émulsion huile dans l'eau H/E.

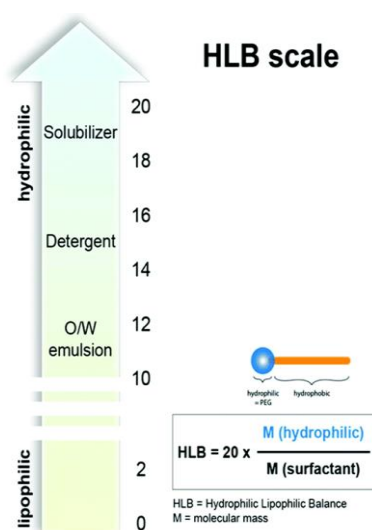


Figure 44 . L'application de tensioactif en fonction de l'échelle de la HLB²³⁰

²²⁹ Cortes-Clerget, M.; Spink, S. E., Gallagher, G. P.; Chaisemartin, L.; Filaire, E.; Berthon, J.-Y.; & Lipshutz, B. H. *MC-1*. A “designer” surfactant engineered for peptide synthesis in water at room temperature. *Green Chemistry*. **2019**, 21, 2610–2614

²³⁰ Cortes-Clerget, M. ; Spink, S. E. ; Gallagher, G. P. ; Chaisemartin, L. ; Filaire, E. ; Berthon, J.-Y. ; Lipshutz, B. H. *MC-1*. A “designer” surfactant engineered for peptide synthesis in water at room temperature. *Green Chemistry*. **2019**, 21, 2610–2614

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que tous les composés synthétisés ont la propriété d'un émulsifiant huile dans eau. Dans ce qui suit, nous nous proposons de déterminer leurs caractéristiques de surface afin de confirmer ces propriétés.

b. Les propriétés tensioactives

Mesure de la tension de surface et de la concentration micellaire critique (CMC) des esters du sucre

Afin d'établir la relation entre les propriétés tensioactives et la longueur de chaîne de l'agent acylant, la tension de surface des produits a été mesurée par la méthode de la goutte pendante à l'aide d'un tensiomètre.

C'est à partir des courbes obtenues de la tension de surface en fonction de la concentration des solutions tensioactives (**Figure 45**) que la concentration micellaire et la tension de surface des produits sont déterminées.

La CMC est un paramètre caractéristique important pour l'évaluation de l'activité de surface, calculée à partir de la méthode d'interception linéaire.

Tous les esters de xylose synthétisés abaissent la tension de surface comme le montre la **figure 45** mais différemment, chaque tensioactif se comportant en fonction de sa structure (la longueur de la chaîne hydrophobe et la nature de la tête hydrophile).

D'après les résultats répertoriés dans le **Tableau 15** les valeurs de γ_{CMC} augmentent avec l'augmentation de la longueur de la chaîne. L'ester de sucre ayant une hydrophobicité la plus faible (C14, C16) possède une capacité plus forte à réduire la tension de surface. Ces résultats sont similaires à ceux des travaux antérieurs. Ducret²³¹, Sultani¹⁵⁴ et Garofalakis²³² ont rapporté que la longueur de chaîne affecte inversement la concentration micellaire CMC en raison d'une hydrophobicité plus élevée et par conséquent une faible solubilité ce qui a été constaté.

L'excès de surface (Γ en mol m⁻²), l'aire par molécule (A en Å²) et le paramètre d'empilement (P) ont été estimés à partir des courbes de la tension superficielle et sont donnés dans le **tableau 14**

L'absorption des tensioactifs à l'interface est décrite par la concentration maximale en excès de surface (Γ_{max}), selon l'isotherme de Gibbs. Les valeurs de l'excès de surface ont été calculées par l'équation suivante :

²³¹ Ducret, A.; Giroux, A.; Trani, M.; Lortie, R. Caractérisation de biosurfactants préparés par voie enzymatique. *Journal de l'American Oil Chemists Society*. **1996**, 73, 109-113.

²³² Garofalakis, G.; Murray, B.S.; Sarney, D.B. Activité de surface et concentration d'agrégation critique d'esters de sucre purs avec différents groupes de tête de sucre. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 229, 391-398.

$$\Gamma_{max} = \frac{1}{2.303 \times n \times R \times T} \left(\frac{\delta\gamma}{\delta \log C} \right)$$

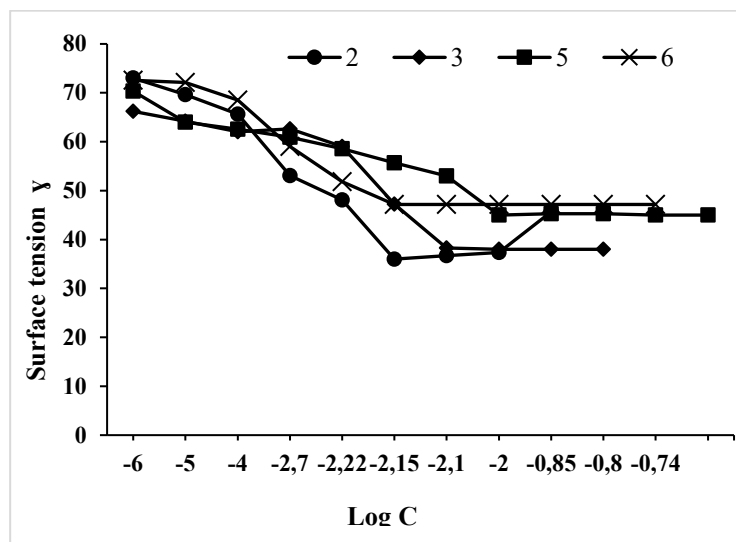


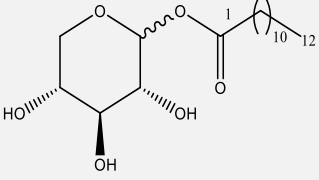
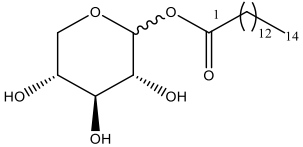
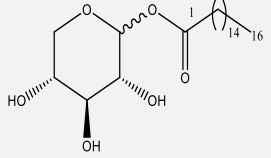
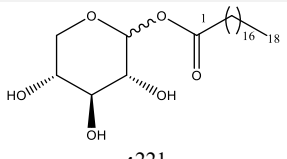
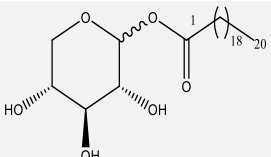
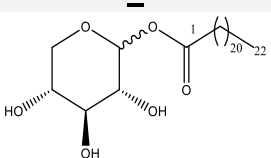
Figure 45. Mesure de la tension de surface d'ester du D-xylose dans l'eau.

2 : 1-O-tetradecanoyl-D-xylopyranose, 3 : 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose, 5 : 1-O-eicosanoyl-D-xylopyranose, 6 : 1-O-docosanoyl-D-xylopyranose

Toutes les courbes de la mesure de tension de surface montrent la réduction de la tension superficielle de l'eau.

Les résultats répertoriés dans le **tableau 14** de la mesure de la tension de surface montrent que l'augmentation de la longueur de chaîne aboutit à la diminution de la concentration micellaire. Par conséquent, plus la HLB diminue plus la concentration micellaire critique diminue. Ce phénomène est dû à des forces moléculaires déséquilibrées à l'interface eau/solide provoquant une tension superficielle.

Tableau 14. Paramètres physico-chimiques de tensioactifs synthétisés.

Composé	HLB	CMC (mmol/ L)	γ (mN/m)	$\Gamma \times 10^{-5}$ (mol/m ²)	A (Å ²)	P
 1 ²²¹	10.65	0.15	30.0	0.39	43	0.48
 2	9.82	0.028	37.78	1.97	8.43	2.49
 3	9.11	0.01	38	0.708	23.4	0.92
 4 ²²¹	8.50	0.09	25.0	0.68	24.5	0.86
 5	7.96	0.008	45	0.66	25.08	0.84
 6	7.49	0.007	47.17	0.95	17.45	1.21

L'augmentation de la chaîne carbonée entraîne une augmentation de la pression latérale²³³ et il en résulte une augmentation de la tension de surface. C'est pourquoi plus la longueur de la chaîne augmente plus les micelles se forment à faible concentration (CMC).

Dans le cas de l'arachidate du xylose **5** et du béhénate du xylose **6**, on constate une augmentation de la tension de surface cela pourrait être expliqué par l'encombrement stérique dû à l'enroulement de la chaîne hydrophobe ce qui entraîne des interactions hydrophobes qui sont plus forte que les forces de van der Waals depuis les travaux pionniers de Kauzman⁴². A cela s'ajoute la faible solubilité de ces tensioactifs dans l'eau.

Les valeurs de Γ et de A sont peu différentes pour tous les esters du sucre car ils ont le même groupe hydrophile donc de polarité similaire. A l'exception du myristate de xylose **2** l'aire A est le plus faible (8.43 \AA^2) avec un excès de surface Γ le plus élevé ($1.97 \cdot 10^{-5} \text{ mol/m}^2$).

Le paramètre d'empilement permet de prévoir la forme de la molécule et le mode d'auto-organisation des tensioactifs dans l'eau.

La forme adoptée par les micelles est déterminée en fonction du paramètre d'empilement P . A partir des résultats de calculs de ce paramètre, nous constatons que sa valeur est supérieure à 1 ($P > 1$) pour le myristate du xylose **2** et le béhénate du xylose **6** qui ont des valeurs respectives de 2.49 et 1.21, nous en déduisons alors que la forme du monomère tensioactif de ces deux esters est conique tronqué inversé et la structure de l'agglomération de l'ensemble de leurs monomères dans l'eau apparaissent sous forme de micelles inversées (**Figure 46**)²³⁴.

Les valeurs de P , 0.92 pour le palmitate du xylose **3**, 0.86 pour le stéarate du xylose et 0.84 obtenu dans le cas de l'arachidate du xylose **5** sont proches de 1 ($P \approx 1$). Ces valeurs permettent de prévoir une forme cylindrique de ce monomère dont l'ensemble forme une structure bicouche plane.

Quant au monomère du laurate du xylose, on constate une valeur égale à 0.48 ($1/3 < P < 1/2$). Dans ce cas, le monomère est sous forme conique tronquée. En contact de l'eau à une concentration micellaire critique, ses monomères s'organisent sous forme des micelles allongées.

²³³ Smit, B.; Schlijper, A. G.; Rupert, L. A. M.; & Van Os, N. M. Effects of chain length of surfactants on the interfacial tension: molecular dynamics simulations and experiments. *The Journal of Physical Chemistry*, **1990**, 94, 6933–6935

²³⁴ Israelachvili, J. Intermolecular and Surface Forces. Academic Press, London. **1991**

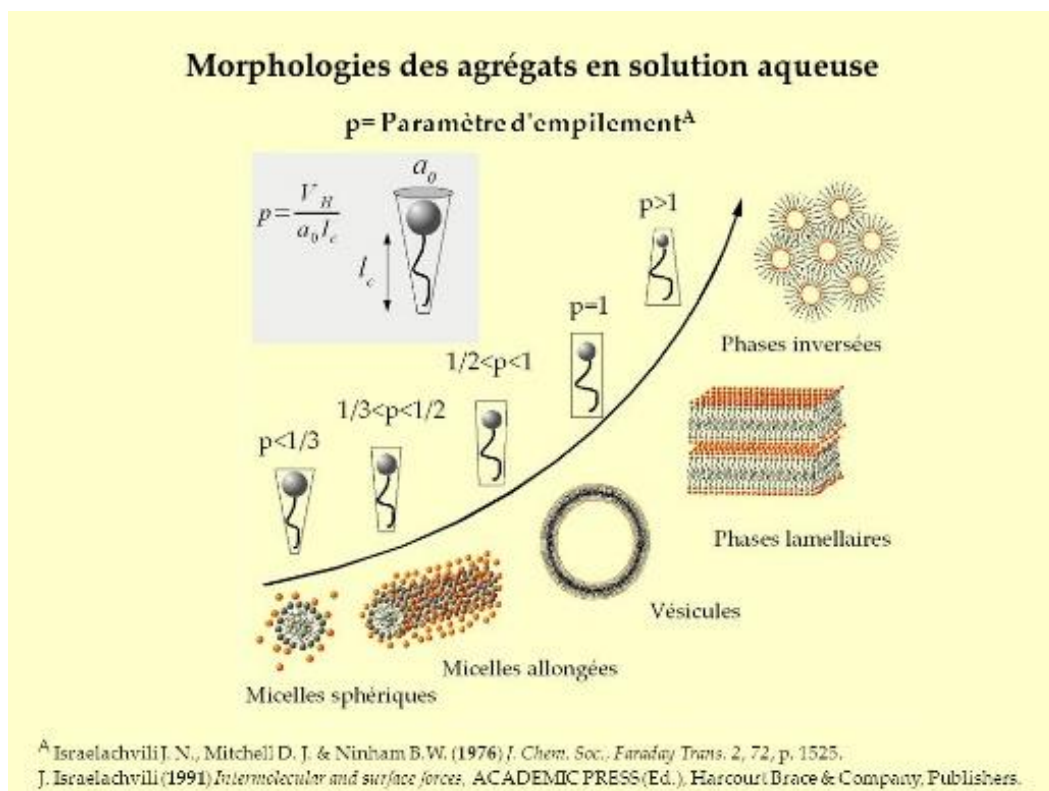


Figure 46. Forme des micelles en fonction de paramètre d'empilement.

4. Le pouvoir émulsifiant et moussant des esters du xylose

a. Le pouvoir émulsifiant et sa stabilité

La mesure de l'émulsification des produits à 25 °C donne des valeurs du pouvoir émulsifiant des composés synthétisés comprises entre 83.33 % et 100 %. La **figure 47** montre que la longueur de chaîne augmente la capacité émulsifiante des tensioactifs dans le cas des composés **1**, **2**, **3** et **4**. Les auteurs ont obtenu des résultats similaires avec des monoesters de sucres comportant des longueurs de chaîne allant de C8 à C12 ¹⁷⁵.

Excepté les composés **5** et **6** qui ont également un bon pouvoir émulsifiant supérieur à 84 %, le pouvoir émulsifiant augmente proportionnellement avec l'augmentation du nombre de groupes méthylène CH₂. Ceci peut être expliqué par les interactions hydrophobes entre la chaîne alkyle des esters et les gouttelettes d'huile.

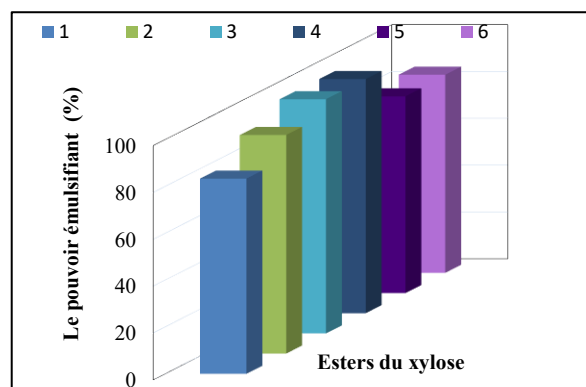


Figure 47. Le pouvoir émulsifiant des esters du xylose.

1: 1-O-dodecanoyl-D-xylanopyranose, 2: 1-O-tetradecanoyl-D-xylanopyranose, 3: 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose, 4: 1-O-octadecaoyl-D-xylopyranose, 5: 1-O-eicosanoyl-D-xylopyranose, 6: 1-O-docosanoyl-D-xylopyranose.

La stabilité émulsifiante diminue avec le temps mais reste considérable pour les composés comme indiqué sur la **figure 47**. Les produits les plus stables après 72 h sont les composés 1, 3 et 4. La stabilité des autres composés reste supérieure à 60 %. (**Figure 48**)

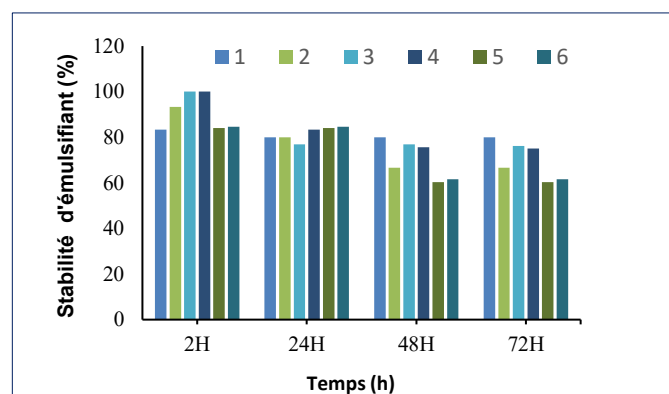


Figure 48. Stabilité d'émulsifiant.

1: 1-O-dodecanoyl-D-xylanopyranose, 2: 1-O-tetradecanoyl-D-xylanopyranose, 3: 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose, 4: 1-O-octadecaoyl-D-xylopyranose, 5: 1-O-eicosanoyl-D-xylopyranose, 6: 1-O-docosanoyl-D-xylopyranose.

b. Pouvoir moussant et stabilité de la mousse formée

Le pouvoir moussant de toutes les solutions aqueuses de tensioactifs des produits synthétisés et la stabilité de la mousse formée en fonction du temps ont été mesurées. La courbe du pouvoir moussant (**figure 49**) montre que plus la chaîne est longue, moins le tensioactif considéré mousse. Parmi les tensioactifs testés, ceux considérés comme plus efficaces sont les composés 1 et 2. Le meilleur agent moussant est le laurate de xylose (28.89 %). Le stéarate de xylose 4 a une faible capacité moussante (02.04 %) qui reste stable après 45 min. Les monoesters de xylose à chaîne longue (C20 et C22) ne montrent aucun pouvoir moussant

(0 %), ils ont une tension superficielle élevée (**Tableau 14**) indiquant qu'ils n'ont pas pu migrer rapidement vers l'interface ²³⁵.

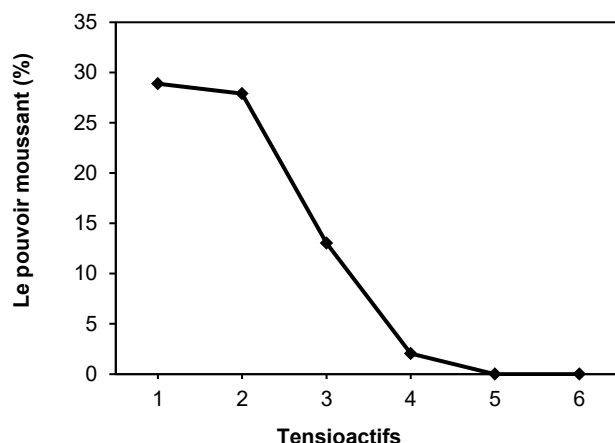


Figure 49. Le pouvoir moussant des esters du xylose.

1 : 1-*O*-dodecanoyl-D-xylopyranose, **2** : 1-*O*-tetradecanoyl-D-xylopyranose, **3** : 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose, **4** : 1-*O*-octadecaoyl-D-xylopyranose, **5** : 1-*O*-eicosanoyl-D-xylopyranose, **6** : 1-*O*-docosanoyl-D-xylopyranose.

La stabilité de la mousse des composés **1**, **2** et **3** diminue en fonction du temps tandis que la mousse formée par le stéarate de xylose reste encore stable après 45 min comme indiqué dans la **figure 50**. La stabilité plus élevée de la mousse du stéarate de xylose peut être attribuée à la forme des bulles formées et à leurs propriétés structurales.

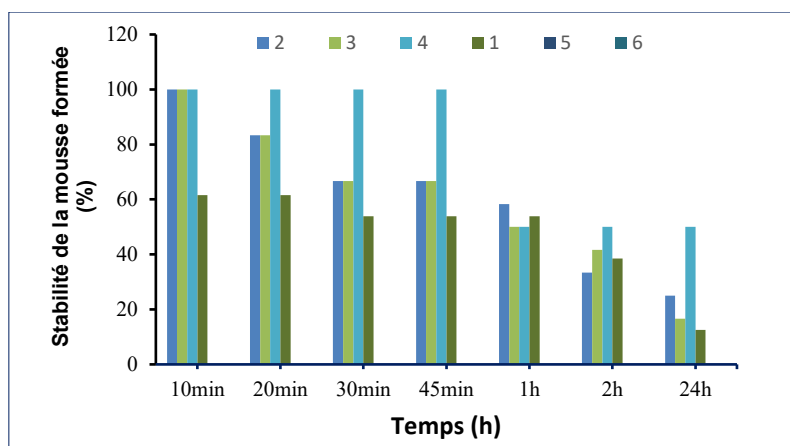


Figure 50. Stabilité de la mousse.

1 : 1-*O*-dodecanoyl-D-xylopyranose, **2** : 1-*O*-tetradecanoyl-D-xylopyranose, **3** : 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose, **4** : 1-*O*-octadecaoyl-D-xylopyranose, **5** : 1-*O*-Eicosanoyl-D-xylopyranose, **6** : 1-*O*-docosanoyl-D-xylopyranose.

²³⁵ Van Kempen, S. E. H. J.; Schols, H. A.; van der Linden, E.; & Sagis, L. M. C. Effect of Variations in the Fatty Acid Chain of Oligofructose Fatty Acid Esters on Their Foaming Functionality. *Food Biophysics*. **2013**,40, 22-29.

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons synthétisé une nouvelle série homologue de biotensioactifs à base du D-xylose par estérification enzymatique catalysée par la lipase de *Candida antarctica* B.

De ce fait, une étude préliminaire sur la synthèse du 1-*O*-hexadécanoyl-D-xylopyranose est préalablement mise en œuvre afin de déterminer les conditions optimales de la réaction.

Différents acides gras sont par la suite utilisés dans la synthèse des esters du D-xylose à potentialités tensioactives. L'influence de plusieurs paramètres réactionnels tels que la longueur de la chaîne, le rapport molaire entre les réactifs et l'utilisation de lipases modifiées est étudiée afin d'optimiser les synthèses. Les résultats révèlent que l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle du substrat gras donne les meilleures conversions, du fait que la lipase a une haute affinité pour les acides gras. L'augmentation du rapport molaire des substrats est favorable. Certaines lipases modifiées testées ont donné des conversions considérables par rapport à la CAL B.

Nous rapportons également que la réutilisation de la lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) est possible jusqu'au 4^{ème} cycle.

Les propriétés tensioactives des molécules synthétisées sont déterminées, les résultats obtenus montrent leur pouvoir en tant qu'agents émulsifiants et moussants. Dans ce contexte nous mettons en avance l'importance de la longueur de la chaîne pour l'efficacité de tels composés en tant que biotensioactifs.

Introduction

Dans le but d'étudier l'effet de la conformation sur la tension de surface des esters du sucre synthétisés nous avons séparé les anomères α et β du 1-O-dodécanoyl-D-xylopyranose **1** et du 1-O-octadécanoyl-D-xylopyranose **4**, deux produits de longueur de chaîne différente (C12) et (C18). Les propriétés physico-chimiques des anomères sont ainsi évaluées.

I. Séparation des anomères

Les esters de D-xyloses **1** et **4** sont d'abord acétylés puis séparés par chromatographie sur colonne. Les produits obtenus sont par la suite désacétylés pour obtenir les anomères des esters du sucre en question. La réaction d'acétylation a lieu selon le mécanisme suivant (Schéma 23).

a. Mécanisme d'acétylation

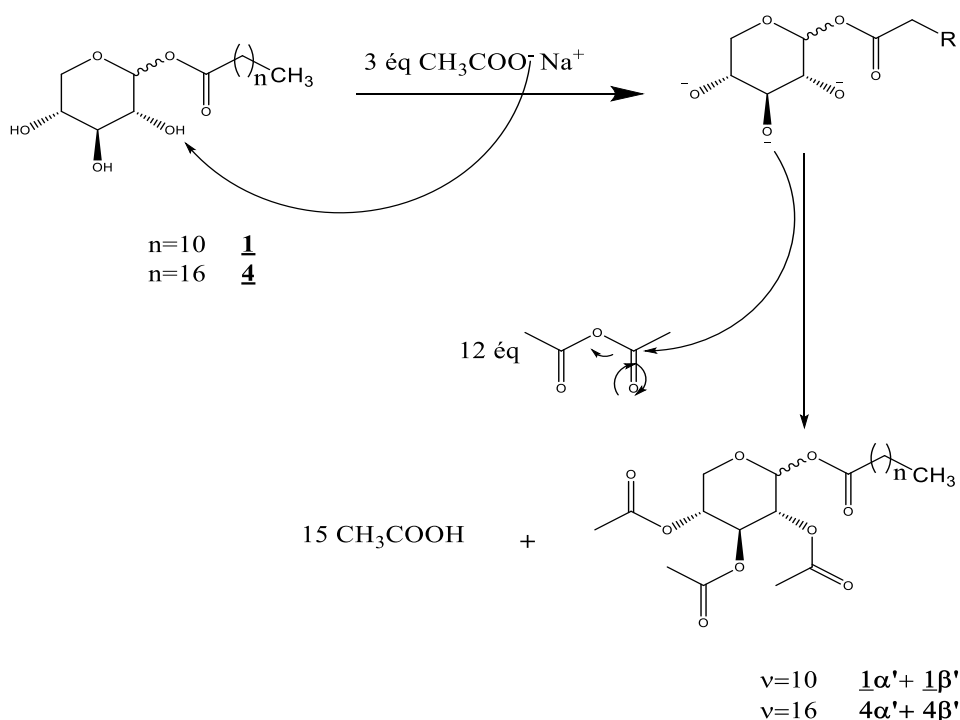


Schéma 23 : Mécanisme d'acétylation de composés **1** et **4**.

Les produits acétylés obtenus sont séparés par chromatographie sur colonne avec un éluant (EP/AcOEt) : (8,5 / 1,5). Les produits récupérés et séchés ont été désacétylés pour obtenir les anomères purs (Schéma 24).

b. Mécanisme de désacétylation

Le protocole général de désacétylation est expliqué dans la partie expérimentale.

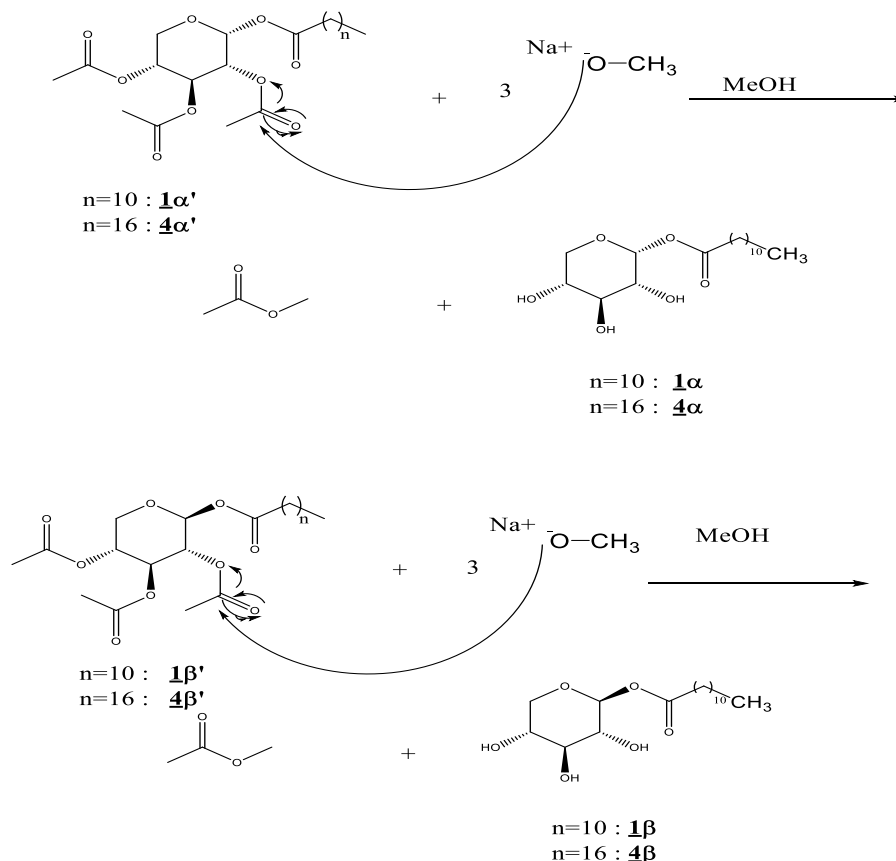


Schéma 24 : Mécanisme de désacétylation des anomères $\underline{1\alpha'}$, $\underline{1\beta'}$, $\underline{4\alpha'}$, $\underline{4\beta'}$

II. Etude spectroscopique

a. Caractérisation des produits acétylés $\underline{1\alpha'}$, $\underline{1\beta'}$, $\underline{4\alpha'}$, $\underline{4\beta'}$

L'acétylation des anomères a été confirmée par la technique RMN ^1H , RMN ^{13}C et la spectroscopie infrarouge IF-ATR.

Le spectre RMN ^1H montre l'apparition de 9 protons de groupe méthyle ($3\text{CH}_3\text{CO}$) vers 2.05 ppm dans le cas de Dodécanyol (2',3',4'-tri-*O*-acétyl) - α -D Xylopyranoside $\underline{1\alpha'}$ et vers 2.04 ppm pour son anomère β . Ces protons apparaissent vers 1.97 ppm pour le composé $\underline{4\alpha'}$ (Octadécanyol (2',3',4'-tri-*O*-acétyl)- α -D-Xylopyranoside) et le composé $\underline{4\beta'}$ (Octadécanyol (2',3',4'-tri-*O*-acétyl) - β -D-Xylopyranoside).

L'analyse de spectres RMN ^{13}C des composés acétylés indique les signes de méthyle de trois groupes acétyle vers 19.64 ppm à 20.78 dans les quatre anomères alpha et béta. Le signal de $\text{C}_{1\alpha}$ de composé $\underline{1\alpha'}$ apparaît vers 95,80 ppm alors que celui de son anomère $\text{C}_{1\beta}$ est déplacé

vers 100.66 ppm. Un pic détecté vers 94.68 ppm attribué au C_{1α} de composé **4α'**, alors que ce carbone de l'anomère bêta (composé **4β'**) se trouve à 100.67.

Le carbonyle C=O de la fonction ester apparaissent dans tous les produits acétylés entre 168 et 170.01 ppm

Le spectre infrarouge **IF-ATR** montre clairement la disparition de la bande d'élongation d'OH du xylose.

On constate une bande forte à 1230.10 cm⁻¹ de la vibration de la liaison C-O dans le spectre de composé **1α'** et à 1214.94 cm⁻¹ dans le spectre de composé **1β'**. Cette bande est repérée à 13074.31 cm⁻¹ dans le composé **4α'** et à 1216.94 cm⁻¹ dans le composé **4β'**.

La bande de vibration de C=O est observée à 1732.17 cm⁻¹ **1α'**, 1752.36 cm⁻¹ **1β'**, 1743.42 cm⁻¹ **4α'** et à 1752.50 cm⁻¹ **4β'**.

b. Caractérisation des anomères purs **1α, **1β**, **4α**, **4β****

Les spectres RMN ¹H de quatre composés montrent la disparition de 9 protons de 3 groupes méthyle (CH₃) d'acétyle.

L'analyse de spectres de la RMN du carbone 13 de ces produits prouve également la disparition de carbone caractéristique de 3 groupes méthyle d'acétyle (CH₃CO)

L'étude des spectres infrarouge **IR-ATR** montre la réapparition de bande d'élongation d'OH du xylose à 3502.80 cm⁻¹ **1α**, à 3332.01 cm⁻¹ **1β**, à 3501.37 cm⁻¹ **4α**, et à 3377.41 cm⁻¹ **4β**.

La structure de ces esters de sucres a été confirmée par la présence des bandes d'absorption caractéristiques du carbonyle C=O se trouvent autour de 1751.65 cm⁻¹ pour le composé **1α** et à 1639.36 cm⁻¹ pour le composé **1β**. Ces bandes ont été identifiées à 1642.93 cm⁻¹ et à 1561.21 cm⁻¹ dans les spectres des composés **4α** et **4β** respectivement. Alors que celles de la liaison C-O à 1037.12 cm⁻¹ **1α**, 1044.40 cm⁻¹ **1β**, 1040.40 cm⁻¹ **4β**, 1038.57 cm⁻¹ **4α**.

III. Propriétés tensioactives des anomères α et β des esters du sucre

Dans le but de faire une étude comparative sur l'effet de la configuration, la structure, ainsi que la longueur de chaîne sur les propriétés tensioactives, nous avons mesuré la tension de surface des anomères et leur concentration micellaire critique (CMC).

D'après les résultats répertoriés dans le **tableau 15**, les anomères α des esters du xylose ont les meilleures propriétés de surface avec une activité de surface plus grande que les anomères β, correspondants à des CMC élevés en raison de la solubilité élevée de ces tensioactifs dans l'eau.

Les résultats concernant les alkylxylosides obtenus (**Tableau 15**, composés **7** et **8**) dans une étude antérieure²³⁵ ont montré que les alkyl β -D-xylosides ont les meilleures propriétés de surface par rapport à leurs analogues α . Pour les anomères des esters préalablement synthétisés on observe le phénomène inverse. Ceci pourrait être dû à la présence d'un groupe carbonyle dans la chaîne alkyle. L'introduction d'un groupement CO modifie donc considérablement l'activité de surface des biosurfactants à base de xylose avec la même longueur de chaîne²³⁶.

Dans cette étude, nous avons démontré que les propriétés interfaciales des tensioactifs dépendent de la configuration adoptée par le groupe hydrophile. Le lien entre les groupes de tête polaires et la queue hydrophobe des esters de sucre, joue un rôle crucial dans la dynamique de la tension superficielle et le comportement rhéologique du film à l'interface air-eau de ces tensioactifs.

La configuration a aussi un effet sur la concentration micellaire critique des tensioactifs, les résultats montrent que la CMC des anomères α des esters du D-xylose et ceux des éthers du D-xylose est inférieure à la CMC des anomères β . Ces observations sont en accord avec une étude faite sur deux formes anomériques du n-hexadecyl-D-maltopyranoside²³⁷.

La CMC dans les deux types de tensioactifs diminuent en fonction de la longueur de chaîne ce qui confirme notre étude sur l'effet de la longueur de la chaîne. Ceci est également confirmé par la littérature, il a été prouvé que pour les tensioactifs non-ioniques avec un groupe de tête donné, la CMC diminue généralement d'un ordre de grandeur chaque fois que deux groupes CH₂ sont ajoutés à la chaîne alkyle²³⁸.

Les valeurs de la tension de surface suggèrent que la chaîne de carbone est le facteur le plus important influençant les propriétés de surface.

²³⁵ Klai, N.; Bidjou-Haiour, C.; Bouquillon, S. D-Xylose-based surfactants: Synthesis, characterization and molecular modeling studies. *Comptes Rendus Chimie*, **2015**, 18, 599-606.

²³⁶ Razafindralambo, H.; Blecker, C.; Mezdour, S.; Deroanne, C.; Crowet, J.M.; Brasseur, R.; Paquot, M. Impacts of the Carbonyl Group Location of Ester Bond on Interfacial Properties of Sugar-Based Surfactants: Experimental and Computational Evidences. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2009**, 113,8872-8877.

²³⁷ Larsson, J.; Sanchez-Fernandez, A.; Mahmoudi, N.; Barnsley, L.; Wahlgren, M.; Nylander, T.; Ulvenlund, S. The effect of the anomeric configuration on the micellization of hexadecyl maltoside surfactants. *Langmuir*. **2019**, 35, 13904-13914.

²³⁸ Mattei, M.; Kontogeorgis, G. M.; Gani, R. Modeling of the Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants with an Extended Group-Contribution Method. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, 52, 12236-12246.

Tableau 15. Propriétés tensioactives des anomères d'ester du xylose et d'éther du D-xylose.

Composé	Structure	CMC (mmol/L)	γ_{CMC} (mN/m)
<u>1</u> α		0.16	43.57
<u>1</u> β		0.17	45.19
<u>4</u> α		0.1	52,15
<u>4</u> β		-	-
<u>7</u> α		0.021	49
<u>7</u> β		0.013	47.6
<u>8</u> α		$3.7 \cdot 10^{-5}$	55
<u>8</u> β		$4.9 \cdot 10^{-5}$	51

IV. Le pouvoir émulsifiant des anomères séparés

Les esters de sucres sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire. En raison de leurs capacités d'émulsification et de stabilisation de l'émulsion. Leur caractère amphiphile leur confère un excellent pouvoir émulsifiant, aussi bien pour les émulsions eau dans huile qu'huile dans l'eau.

Mécanismes de stabilité des émulsions : Le système dispersé peut être stabilisé contre la coalescence et la séparation de phase si un autre composant, partiellement soluble dans les deux phases, est ajouté. Les molécules composées de parties solubles dans l'eau et de parties solubles dans les lipides peuvent à cet effet servir d'émulsifiants.

1. Le pouvoir émulsifiant

Le pouvoir émulsifiant des deux produits de longueurs de chaînes différentes C12 et C18 ainsi que celui de leurs anomères α et β est évalué.

Comme le montre la **figure 51**, la capacité émulsifiante de tous les produits et de leurs anomères est supérieure à 70 %. Le 1-*O*-octadécanoyl- α -D-xylopynaoside **4 α** a montré la meilleure capacité émulsifiante (100%) par rapport à son anomère β (70%) qui a la capacité d'émulsion la moins élevée en raison de sa faible solubilité dans l'eau. Le mélange des deux anomères **4** a également un pouvoir émulsifiant élevé (100%) qui peut être dû à la présence de l'anomère α . Quant au pouvoir émulsifiant du dodécanoyl-D-xylopynaoside et de ses anomères on constate que le **1 β** est l'émulsifiant le plus fort par rapport à **1 α** (70%) et au composé **1** (83,33%)

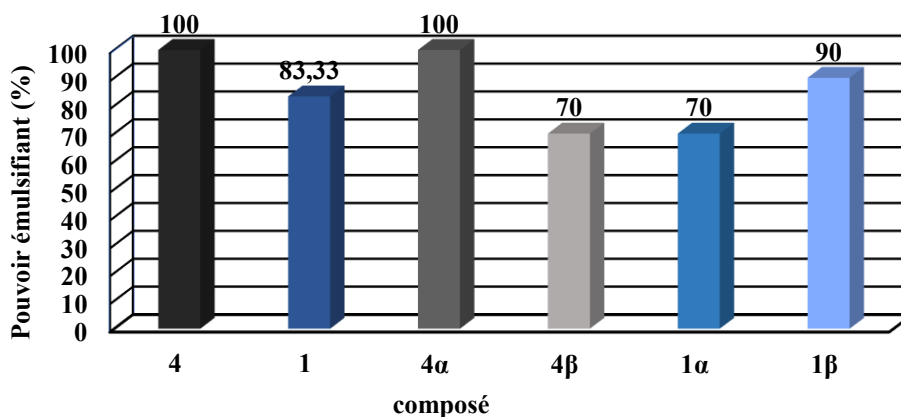


Figure 51. Pouvoir émulsifiant de solution d'esters du xylose (0,25 % p/v) à 25 C°.

2. Stabilité du pouvoir émulsifiant

Les stabilités d'émulsion en fonction du temps des différents esters sont présentées dans les **figures 52**. Tous les esters testés ont d'excellentes propriétés d'émulsion. La stabilité a diminué avec l'augmentation du temps. Les esters obtenus à partir de l'acide stéarique C18 **4**, **4 α** et **4 β** ont montré la meilleure stabilité par rapport à ceux synthétisés à partir de l'acide laurique C12.

L'anomère **4 α** obtenu à partir de l'ester **4** est le plus stable avec un pouvoir émulsifiant supérieur à l'anomère **4 β** du même ester qui atteint **100%** et reste stable jusqu'à 72h alors que les résultats du pouvoir émulsifiant de l'ester du sucre de l'acide laurique **1** montre que c'est son anomère **1 β** qui est le plus stable et le plus émulsifiant par rapport à **1 α** .

Ce phénomène a été observé dans les diverses concentrations à 0,5% (P/V) et à 0,2 (P/V). Ces résultats indiquent qu'une augmentation de la longueur de la chaîne lipophile est nécessaire, pour augmenter la stabilité de l'émulsion des ester de sucres et d'acides gras. Xi Zhang et al²³⁹ sont parvenus aux mêmes résultats dans leurs études sur des esters de sucres avec des longueurs de chaînes allant de C 8 à C12.

Une autre étude menée par Liang et al.²⁴⁰ sur les 6-O-acylglucoseesters a aussi démontré l'effet de la chaîne hydrophobe sur le pouvoir émulsifiant. Ceci est expliqué par les interactions hydrophobes entre la chaîne alkyle des esters et les gouttelettes d'huile.

Les esters testés ont d'excellentes propriétés d'émulsion. Leur stabilité diminue avec le temps, comme on peut le voir clairement à 0,25 % (p/v) de concentration. L'étude comparative de la stabilité de l'émulsifiant formé par les produits synthétisés et leurs anomères montre que pour le composé 1-O-octadécanoyl- α -D-xylose **4 α** est l'anomère le plus stable après 72 heures. Aucune stabilité n'est observée après deux heures pour le β -anomère **4 β** .

Pour le composé **1**, le dodécanoyl- β -D-xylose est encore plus stable que son anomère **1 α** et le mélange des deux anomères après 48 et 72 heures comme indiquer sur la **figure 52**.

²³⁹ Zhang, X.; Song, F.; Taxipalati, M.; Wei, W.; Feng, F. Comparative Study of Surface-Active Properties and Antimicrobial Activities of Disaccharide Monoesters. *PLoS ONE* .2014,9(12): e114845.

²⁴⁰ Liang, M. Y.; Chen, Y.; Banwell, M. G.; Wang, Y.; and Lan, P. Enzymatic preparation of a homologous series of long-chain 6-Oacylglucose esters and their evaluation as emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018. 66, 3949–3956.

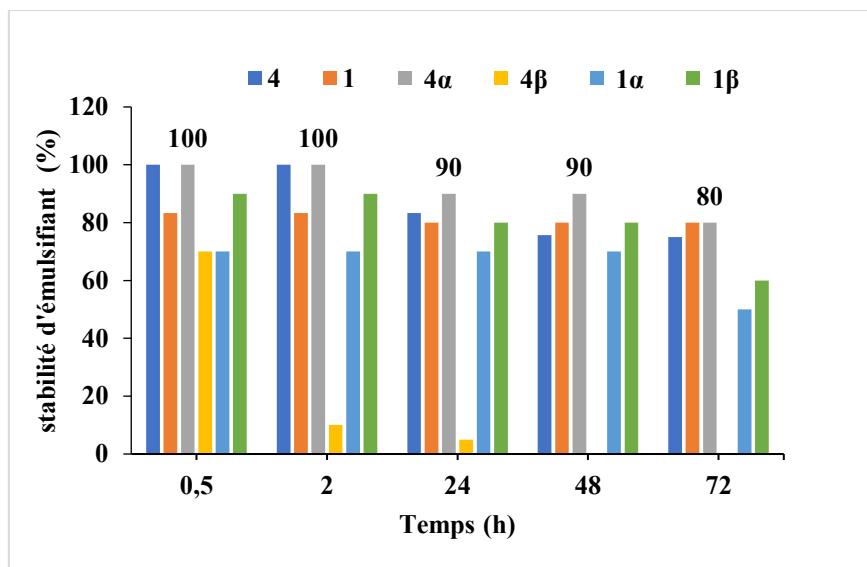


Figure 52. Stabilité d'émulsification de solutions aqueuses d'esters de xylose à 25 °C (0,25 % P/V).

V. Modélisation moléculaire des anomères

L'optimisation par Gaussian 9 nous permet d'évaluer la réactivité des molécules en calculant l'écart énergétique à partir des valeurs énergétiques des orbitales frontières (HOMO, LUMO). Nous avons réalisé dans ce chapitre une optimisation géométrique des deux anomères synthétisés (les anomères alpha et bêta du stéarate du xylose (C18) et ceux du laurate du xylose (C12).)

Dans cette étude théorique, nous avons utilisé une méthode de calcul basée sur la théorie fonctionnelle de la densité (DFT). Il s'agit d'une technique qui calcule l'énergie de l'atome au moyen d'approximation semi-classique. Elle permet de travailler sur des molécules de grande taille telles que les macromolécules biologiques. Cette méthode permet un gain de temps considérable par rapport aux méthodes post Hartree-Fock et sont très utilisées pour apprécier la surface d'énergie potentielle et optimiser la géométrie de la molécule²⁴¹.

1. Résultats et discussion

a. Optimisation moléculaire des esters du xylose

Nous avons utilisé l'ensemble des fonctions de bases de 3-21 G, 6-31 G (d,p) et 6-31G(d) conjugué avec la fonctionnelle B3LYP, le modèle de théorie fonctionnelle de densité hybride la plus connue. D'après les résultats des moyennes de longueur des bandes calculées dans le **tableau 16**, les paramètres structuraux les plus optimisés (longueur de liaison, angle de

²⁴¹ Gérard, S ; Michel, B. Jean-François, F ; Orfan, Z. René, F ; **2011**. Cinétique et catalyse, (2^{ème} éd). Paris, France: TEC1DOC.

liaison) sont obtenus par B3LYP avec la base 6-31G(d,p). La géométrie optimisée la plus stable par la méthode B3LYP/6-31G (**Figure 53**).

Tableau 16. Moyenne de longueur de bande de liaison de esters du xylose optimisés

	$\underline{4\beta}$ B3LYP/ (3-21G)	$\underline{4\alpha}$ B3LYP/ (3-21G)	$\underline{4\beta}$ B3LYP/ (6-31G (d,p))	$\underline{4\alpha}$ B3LYP/ (6-31G (d,p))
Moyenne de la longueur de bande	1,25756438	1,2570589	1,24990137	1,25005753
	$\underline{1\beta}$ B3LYP/ (3-21G)	$\underline{1\alpha}$ B3LYP/ (3-21G)	$\underline{1\beta}$ B3LYP/ (6-31G (d))	$\underline{1\alpha}$ B3LYP/ (6-31G (d))
Moyenne de la longueur de bande	1,25864909	1,26073273	1,25254182	1,25269273

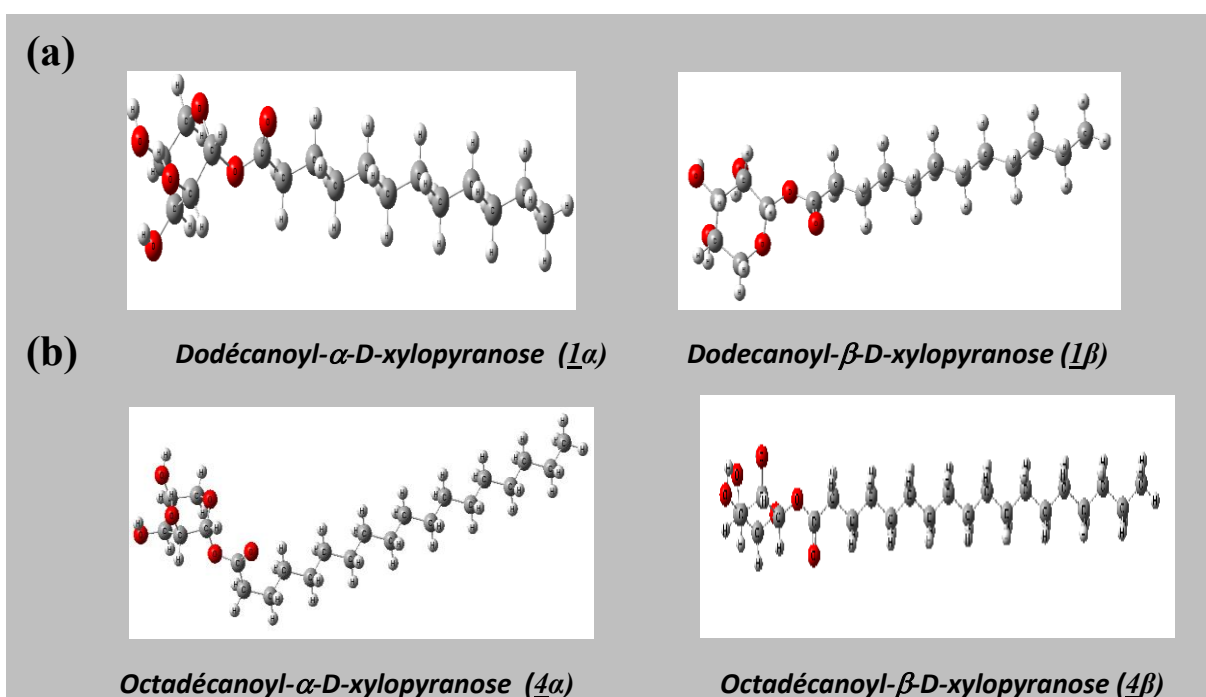


Figure 53. (a) Structures géométriques des anomères $\underline{1\alpha}$, $\underline{1\beta}$ optimisées avec la fonctionnelle B3LYP/6-31G (d). (b) Structures géométriques des anomères $\underline{4\alpha}$, $\underline{4\beta}$ optimisées avec la fonctionnelle B3LYP/6-31G (d,p)

b. Orbitales moléculaires frontières HOMO-LUMO et analyse de descripteurs de la réactivité globale

Les propriétés physico-chimiques des molécules sont conditionnées par leur structure électronique, décrite par la densité électronique. Plusieurs paramètres quantiques peuvent être déterminés : dureté chimique (η), mollesse globale (S), électronégativité (X), le potentiel d'ionisation (IP), le potentiel chimique (μ), l'affinité d'électron (A) et l'écart énergétique (ΔE) ont été obtenus en utilisant les valeurs énergétiques des orbitales moléculaires frontières au même niveau de calcul théorique (**Tableau 17**).

Ces descripteurs moléculaires quantiques ont été calculés comme suit²⁴² :

$$\Delta E = E_{LUMO} - E_{HOMO}$$

$$IP = -E_{HOMO}$$

$$A = -E_{LUMO}$$

$$\eta = \frac{E_{LUMO} - E_{HOMO}}{2}$$

$$\mu = \frac{E_{LUMO} + E_{HOMO}}{2}$$

$$\chi = -\frac{(E_{LUMO} + E_{HOMO})}{2}$$

$$S = \frac{1}{2\eta}$$

$$\omega = \frac{\chi^2}{2\eta}$$

Tableau 17. Paramètres moléculaires des anomères des esters du xylose obtenus avec les fonctionnelles B3LYP/6-31G (d, p) et B3LYP/6-31G (d)

Paramètres moléculaire	<u>1</u> α	<u>1</u> β	<u>4</u> α	<u>4</u> β
E _{total} (ha)	-1118,428854	-1118,424148	-1354,3846	-1354,380129
E _{HOMO} (eV)	-0,25801	-0,25548	-0,25866	-0,25548
E _{LUMO} (eV)	0,00493	0,00767	0,00371	0,00763
L'écart énergétique, ΔE (eV)	0,26294	0,26315	0,26237	0,26311
Potentiel d'ionisation, IP (eV)	0,25801	0,25548	0,25866	0,25548
Affinité électronique, A (eV)	-0,00493	-0,00767	-0,00371	-0,00763
Dureté chimique, η (eV)	0,13147	0,131575	0,131185	0,131555
Potentiel chimique, μ (eV)	-0,12654	-0,12391	-0,12748	-0,12393
Électronégativité, χ (eV)	0,12654	0,123905	0,127475	0,123925
Mollesse globale, (S)	3,803149	3,800114	3,811411	3,800692
Indice électrophilie, (ω)	0,060897	0,058341	0,061935	0,058369
Moment dipolaire (debye)	3,670628	2,281748	3,473110	2,285584

L'orbitale moléculaire inoccupée la plus basse (LUMO) et l'orbitale moléculaire occupée la plus élevée (HOMO) sont situées sur tout le squelette de la molécule, à l'exception des groupes méthyles de la chaîne hydrophobe (comme on peut le voir dans les **figures 54** et **55**).

²⁴² Parr, R.G.; Pearson, R.G. Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**,105, 7512–7516.

LUMO en tant qu'accepteur d'électrons représente la capacité à obtenir un électron, HOMO représente la capacité à donner un électron.

Ces orbitales frontières, jouent un rôle important dans la réactivité chimique et les interactions moléculaires²⁴³. Leurs valeurs et leurs écarts énergétiques reflètent la réactivité de la molécule. Une molécule ayant un petit espace orbital de frontière est une molécule souple avec une réactivité chimique élevée et une faible stabilité cinétique. Alors qu'un grand écart HOMO-LUMO indique une molécule dure plus stable/moins réactive²⁴⁴. Comme présenté dans le **tableau 17**, le composé qui présente l'écart énergétique le plus faible est l'octadécanoyl- α -D-xylopyranose **4 α** ($\Delta E=0,26237$ eV). Les résultats de l'écart énergétique des anomères indiquent que l'anomère alpha des deux produits 1-*O*-dodécanoyl-D-xylopyranose ($\Delta E=0,26294$ eV) et 1-*O*-octadécanoyl-D-xylopyranose ($\Delta E=0,26237$ eV) est le composé le plus mou par rapport à leurs anomères bêta ($\Delta E=0,26315$ eV) de 1-*O*-dodécanoyl- β -D-xylopyranose et ($\Delta E=0,26311$ eV) de 1-*O*-octadécanoyl- β -D-xylopyranose) qui sont plus stables.

Les valeurs de la mollesse qui est définie comme l'inverse de la dureté absolue confirment ces résultats, la mollesse globale des anomères α est supérieure à celle des anomères β , par conséquent, la dureté de ces derniers est supérieure à celle des anomères α (**tableau 17**) ce qui signifie que les anomères α des esters du xylose testés sont plus mous, c'est-à-dire plus ou moins résistants au transfert d'électron donc plus réactifs.

Les faibles valeurs d'indice d'électrophilie ω ($\omega < 1$) indiquent que ces esters ont un pouvoir électrophile faible. Le moment dipolaire indique que les composés α sont plus solubles dans des solutions polaires par rapport aux anomères β .

²⁴³ Fukui, K.; Fujimoto, H.; Frontier Orbitals and Reaction Paths: Selected Papers of Kenichi Fukui, in *World Scientific Series in 20th Century Chemistry*, vol. 7, (World Scientific Publishing, Singapore, 1997)

²⁴⁴ Yoosefian, M.; Rahmanifar, E.; & Etminan, N. Nanocarrier for levodopa Parkinson therapeutic drug; comprehensive benserazide analysis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. **2018**.1–13.

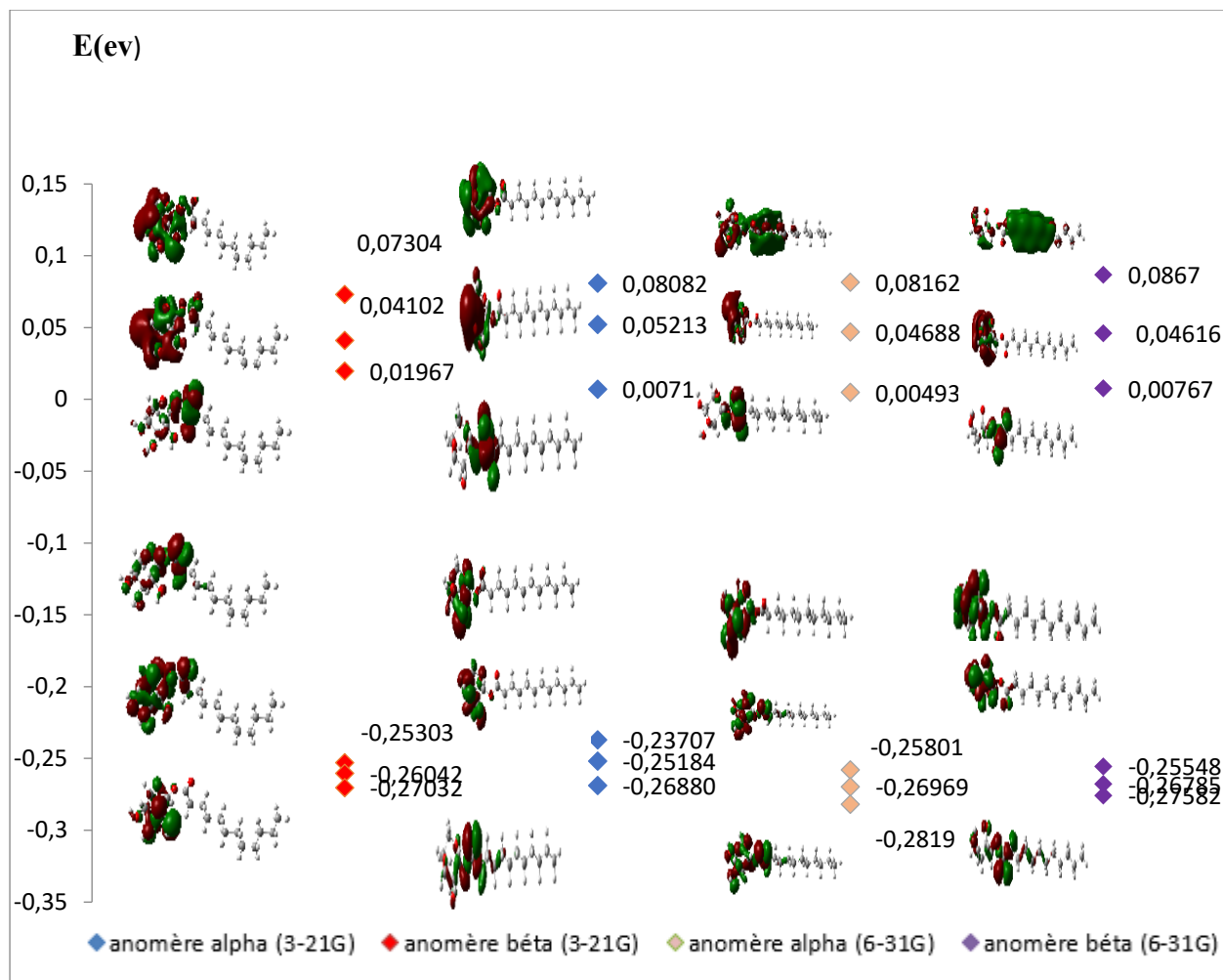


Figure 54. Diagramme énergétique de deux anomères de laurate de D-xylose obtenus avec l'ensemble des fonctions de base (3-21G et 6-31G(d))

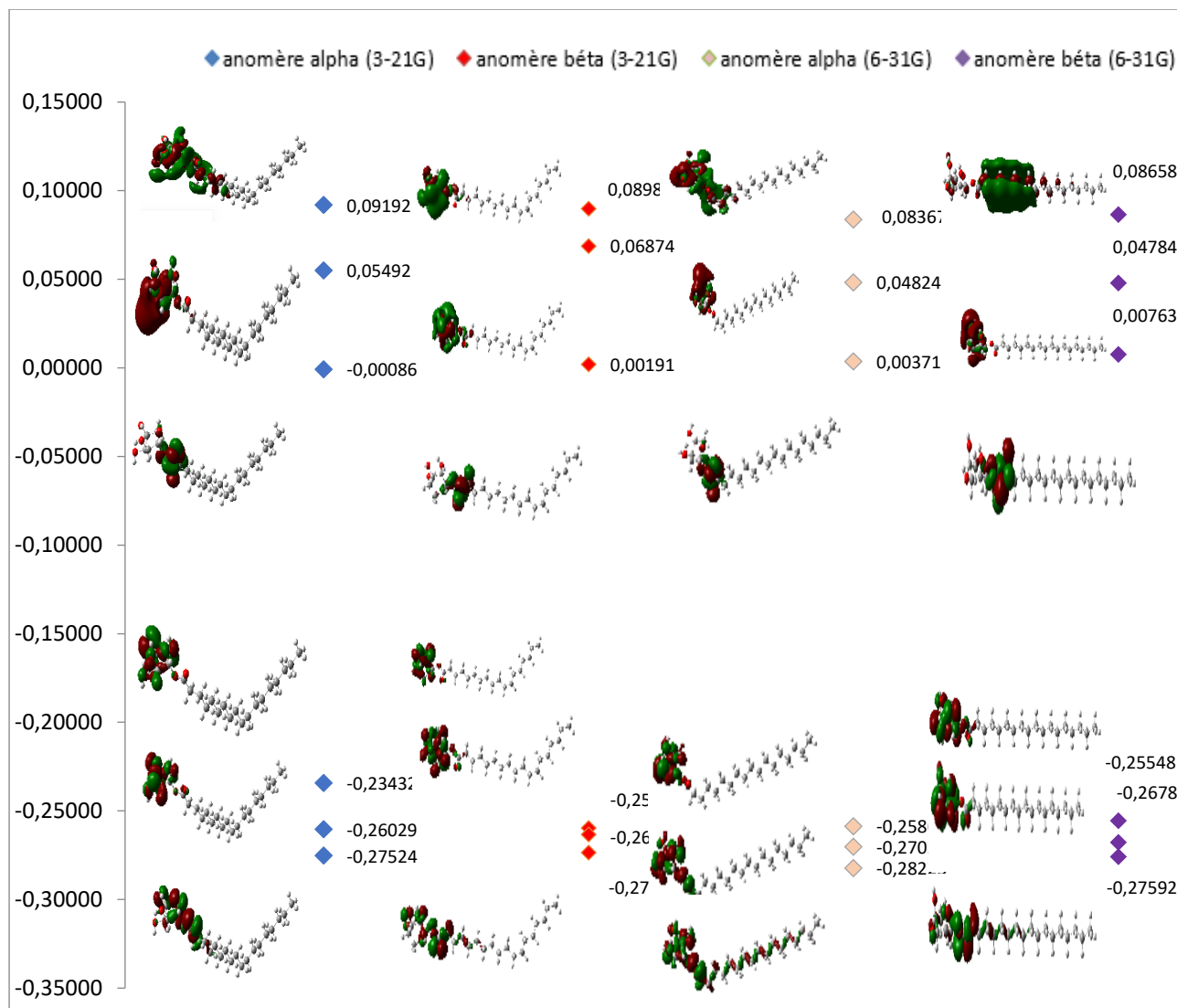


Figure 55. Diagramme énergétique de deux anomères de stéarate de D-xylose obtenus avec l'ensemble des fonctions de base (3-21G et 6-31G (d, p))

En comparant entre le ΔE obtenu par la base 6-31 G (étant donné que c'est la meilleure base de calcul), on constate que le stéarate du D-xylose a un écart énergétique le plus faible ($\Delta E=0,26237$ eV) par rapport au laurate du xylose ($\Delta E=0,26294$ eV) donc il est le produit le plus réactif.

L'anomère alpha est le plus réactif par rapport à l'anomère bêta dans les deux cas, pour les deux produits.

Le calcul effectué montre que le meilleur résultat est obtenu avec l'ensemble de fonction de base 6-31G (d, p). Les valeurs de l'écart énergétique dans les deux molécules (**1 α** , **4 α**) sont les plus faibles ce qui permet aux électrons de passer facilement de l'orbitale HOMO à l'orbitale LUMO et d'établir ainsi une liaison. Ainsi, la molécule présentant une forte réactivité chimique est l'alpha stéarate du D-xylose **4 α** .

c. Potentiel électrostatique moléculaire par les bases : 6-31 G (d, p) et 6-31 G (d)

La surface du potentiel électrostatique moléculaire (MEPS) représente un tracé du potentiel électrostatique mappé sur une surface à densité d'électrons potentielle constante. La surface MEPS est un descripteur pour comprendre et interpréter les propriétés chimiques du système moléculaire (en révélant la taille, la forme et la variation de la densité électronique, l'électronégativité et les sites de réactivité chimique). Il aide à prévoir des sites de réactivité où les régions électrophiles sont représentées par le rouge, nucléophile par le bleu et le vert indique le potentiel électrostatique neutre^{245, 246}.

La comparaison des MEPS pour les quatre anomères (**figure 56**) révèle un modèle de densité d'électrons presque similaire. Comme on le voit sur la figure, l'anomère alpha du dodécanoyl-D-xylopyranose et de l'octadécanoyl-D-xylopyranose ont presque la même forme, ainsi que pour l'anomère bêta des deux autres composés.

Dans ces surfaces MEPS pour tous les composés, la région entourant les atomes d'oxygène du carbonyle semble être orange qui est l'un avec la plus grande densité d'électrons y qui sont sensibles à l'attaque électrophiles, tandis que les régions présentant le potentiel positif sont localisées tout au long de la chaîne de l'hydrogène.

²⁴⁵ Moro, S. ; Bacilieri, M.; Ferrari, C. ; et al. Autocorrelation of molecular electrostatic potential surface properties combined with partial least squares analysis as alternative attractive tool to generate ligand-based 3D-QSARs. *Curr Drug Discov Technol.* **2005**,2,13–21.

²⁴⁶ Luque, F.J.; Lopez, J.M.; Orozco, M. Perspective on "Electrostatic interactions of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the provision of solvent effects". In: *Theoretical chemistry accounts*. Berlin: Springer; **2000**. p. 343–345.

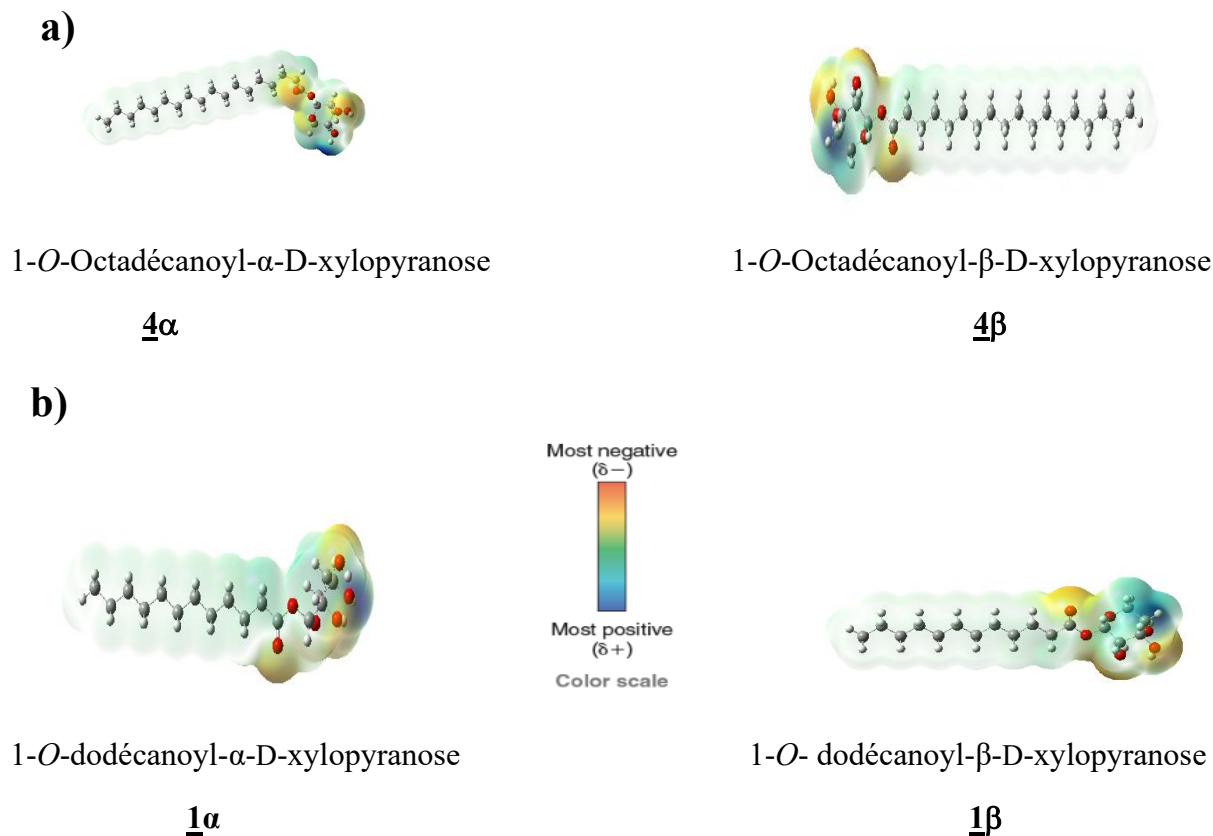


Figure 56. a) Potentiel électrostatique moléculaire des anomères **4 α** ,**4 β** obtenu avec la méthode B3LYP/6-31G (d, p). **b)** Potentiel électrostatique moléculaire des anomères **1 α** ,**1 β** obtenu avec la méthode B3LYP/6-31G (d)

VI. Activité antibactérienne

Les activités antibactériennes des anomères α et β du 1-*O*-dodécanoyl-D-xylopyranose et ceux du 1-*O*-octadécanoyl-D-xylopyranose sont également évaluées. Cinq bactéries alimentaires courantes *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif), *Bacillus subtilis* (bactérie à Gram positif), *Escherichia coli* (bactérie à Gram négatif), (bactérie à Gram négatif), et la pneumonie à *Klebsiella* (bactérie à Gram négatif) ont été testées en mesurant les diamètres des zones d'inhibition de croissance ZOI et les concentrations minimales de CMI.

1.Determination de la zone d'inhibition

Le **tableau 18** montre les propriétés antimicrobiennes des deux agents. Les résultats indiquent que les deux produits possèdent une activité antibactérienne, mais l'anomère α a eu une meilleure activité contre toutes les bactéries testées (Gram-positif et Gram-négatif) par rapport l'anomère β . Les zones d'inhibition obtenues sont dans la plage de 16,51 à 19,86 mm

pour les cinq souches bactériennes. Le diamètre de la zone d'inhibition permet d'évaluer la sensibilité des bactéries vis-à-vis des produits testés en comparant les valeurs obtenues à l'efficacité de l'antibiotique témoin « le gentamicine ». Les bactéries ayant $ZOI \geq 15$ sont sensibles (S), la catégorie est dite intermédiaire (I) si $13 < ZOI < 14$. Dans le cas où $ZOI \leq 12$, on appelle cette catégorie de bactérie la souche résistante (R).

On constate alors que toutes les bactéries testées sont sensibles à l'anomère α de dodécanoyl-D-xylopyranose **1 α** alors que trois de ces souches seulement (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) sont sensibles à l'anomère **1 β** de cet ester du sucre et deux souches sont intermédiaires.

Tableau 18. Evaluation de l'activité antibactérienne des anomères **1 α** et **1 β**

Souches bactériennes	1α		1β		Gentamicine***	
	ZOI (mm)*	CMI**	ZOI (mm)	CMI	ZOI (mm)	CMI
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.51 ± 0.74	32	14.22 ± 0.65	64	25.17 ± 0.23	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	19.86 ± 1.16	64	17.38 ± 1.24	128	27.31 ± 1.19	8
<i>Escherichia coli</i>	17.43 ± 0.82	4	16.13 ± 0.78	32	29.76 ± 1.94	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16.86 ± 0.79	16	15.03 ± 0.81	128	26.28 ± 0.86	4
<i>Klebsiella pneumonia</i>	16.55 ± 1.14	8	14.95 ± 1.05	32	28.34 ± 2.3	2

*ZOI (mm): zone d'inhibition en mm. **CMI : concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$). ***ATB Control.

Dans le cas du stéarate du D-xylose (**Tableau 19**), la *Pseudomonas aeruginosa* est résistante aux deux anomères, et le *Bacillus subtilis* est sensible à l'anomère **4 α** de cet ester et intermédiairement sensible à son anomère **4 β** . Les autres souches (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*) appartiennent à la catégorie intermédiaire (I) dans le cas des deux anomères.

Tableau 19. Evaluation de l'activité antibactérienne des anomères **4 α** et **4 β**

Souches bactériennes	4α		4β		Gentamicine***	
	ZOI (mm)*	CMI**	ZOI (mm)	CMI	ZOI (mm)	CMI
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.34 ± 0.42	64	13.18 ± 0.54	64	24.12 ± 0.18	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	15.16 ± 0.92	64	14.26 ± 0.49	128	26.25 ± 1.04	8
<i>Escherichia coli</i>	13.25 ± 0.66	32	13.33 ± 0.64	32	30.19 ± 1.67	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.51 ± 0.73	16	12.15 ± 0.52	32	26.89 ± 0.76	4
<i>Klebsiella pneumonia</i>	14.75 ± 0.84	16	13.81 ± 0.29	64	26.94 ± 1.97	2

*ZOI (mm): zone d'inhibition en mm. **CMI : concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$). ***ATB Control.

2. La concentration minimale inhibitrice

D'après le **tableau 19**, l'anomère **1 α** présente une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 4 $\mu\text{g/ml}$ contre *Escherichia coli* cette valeur est proche de la CMI obtenue par la gentamicine. Cet anomère **1 α** donne une valeur de 8 $\mu\text{g/ml}$ contre *Klebsiella pneumonia*.

Le test antimicrobien des anomères α et β de l'octadécanoyl-D-xylopyranose contre les mêmes souches bactériennes a reflété les relations entre la structure moléculaire et l'activité antibactérienne.

Les anomères α et β du dodécanoyl-D-xylopyranose (C12) ont montré les meilleures activités antimicrobiennes par rapport aux anomères α et β de l'octadécanoyl-D-xylopyranose. Ce qui signifie que la longueur de la chaîne affecte l'activité antibactérienne. Une étude faite par Xi Zhang et al montre que les esters de sucres de longueur de chaîne moyenne (entre C12 et C14) ont l'activité antibactérienne la plus élevée¹⁸⁵.

Dans le cas de l'octadécanoyl-D-xylopyranose, c'est l'anomère α qui a une activité antibactérienne plus élevée que celle de l'anomère β contre les bactéries à gram positives (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et à gram négatives (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumonia*). Ces résultats montrent également l'effet de la configuration sur les propriétés bioactives des esters testés, une étude similaire réalisé par Nobmann et al a également montré que la configuration α est généralement plus efficace que β ²⁴⁷.

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice montrent que la CMI des esters de sucres et d'acide gras testés est supérieure à la concentration utilisée par l'antibiotique témoin (gentamicine). L'anomère α est non seulement plus actif que l'anomère β , mais il est aussi efficace à une concentration inférieure. Par exemple, nous avons besoin de 16 $\mu\text{g/ml}$ d'anomère α pour inhiber la croissance de la pneumonie à *Klebsiella* et de 64 $\mu\text{g/ml}$ pour inhiber les mêmes bactéries par le β -anomère.

Conclusion

Dans cette partie du travail, les anomères α et β du laurate et du stéarate du xylose préalablement synthétisés, sont séparés par acétylation puis désacétylation du produit correspondant. L'évaluation des propriétés tensioactives des anomères ainsi obtenus montre

²⁴⁷ Nobmann, P.; Smith, A.; Dunne, J.; Henahan, G.; & Bourke, P. The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. **2009**. 128, 440–445.

que l'anomère α abaisse la tension de surface de l'eau mieux que l'anomère β . Les anomères séparés présentent également un excellent pouvoir émulsifiant qui dépend de la longueur de la chaîne grasse et de la configuration de l'ester en question.

La modélisation moléculaire des anomères séparées des esters du 1-*O*-dodécanoyl-D-xylose et 1-*O*-octadécanoyl-D-xylose montre aussi que l'anomère α est plus réactif que l'anomère β .

Les deux anomères des esters du D-xylose ont une activité antibactérienne considérable sur les souches testées de Gram+ et de Gram-.

Cette étude montre que la réactivité ainsi que les propriétés antibactériennes et tensioactives dépendent fortement de la longueur de chaîne et de la configuration des esters.

Introduction

Afin d'étudier l'effet du groupe hydrophile du biotensioactif sur l'évolution des propriétés tensioactives, le L-rhamnose est utilisé comme tête polaire à la place du D-xylose. Ce sucre végétal représente un bon ingrédient dans les produits cosmétiques en raison de ses activités anti-âge et anti-inflammatoire. Le rhamnose constitue un bon humectant/hydratant²⁴⁸ qui permet également de produire des tensioactifs de nouvelles générations²⁴⁹.

Cet aldose à six atomes de carbones appartient au groupe des méthylpentoses et des désoxyoses donc il a un atome de plus par rapport à D-xylose. Contrairement aux autres sucres naturels, il n'est présent dans la nature que sous sa forme de L et il est extrêmement rare de trouver des formes D. La présence de l'alkyle sur le carbone 5 dans le L-rhamnose et la différence de la configuration du carbone asymétrique sub-terminal par rapport à celui de D-xylose pourraient engendrer des modifications quant au comportement des esters de sucre aux interfaces.

I. Synthèse de 1-O-hexadécanoyl- L-rhamnopyranose

L'estérification enzymatique du L-rhamnose par l'acide palmitique (**schéma 25**) a été réalisée en présence de la lipase de *Candida antarctica B* (CAL B) dans les mêmes conditions opératoires de la synthèse de palmitate du xylose (**3**).

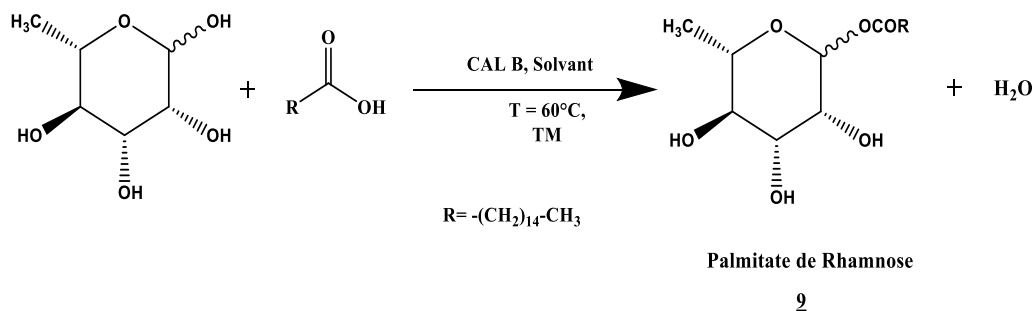


Schéma 25. Estérification enzymatique de L-rhamnose.

Au départ, nous avons utilisé l'EMC comme solvant, la meilleure conversion obtenue est faible (33.75%) par rapport à celle de la synthèse de 1-O-hexadécanoyl-D-xylopyranose **3**.

²⁴⁸ Pageon, H.; Azouaoui, A.; Zucchi, H.; Ricois, S.; Tran, C.; & Asselineau, D. Potentially beneficial effects of rhamnose on skin ageing: an *in vitro* and *in vivo* study. *International Journal of Cosmetic Science*. **2019**, 41, 213–220.

²⁴⁹ Houlmont, J.P.; Vercruyse, K.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Bordat, P.; Treilhou, M. Cosmetic use formulations containing pentyl rhamnoside and cetyl rhamnoside. *Int J Cosmet Sci*. **2001**, 23, 363-8

De ce fait une étude d'optimisation de la synthèse du palmitate de rhamnose est réalisée dans d'autres solvants et co-solvants. D'autres paramètres tels que la quantité de la lipase et le rapport entre les substrats sont aussi examinés.

II. Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons d'abord testé la solubilité du L-rhamnose dans différents solvants organiques. Les réactions sont d'abord menées dans le solvant organique seul, puis dans un mélange de solvant et de DMSO en variant le rapport solvant/co-solvant.

1. Effet de solvant sur la réaction d'estérification

a. Test de solubilité

Afin de comprendre la solubilité du sucre et son importance pour la synthèse de la réaction, différents types de solvants avec différentes polarités ont été testés. Les résultats du test de solubilité du rhamnose montrent que le meilleur solvant qui permet la dissolution quasiment complète du sucre est le DMSO. Les autres solvants organiques le dissolvent plus ou moins bien (**Tableau 20**).

Tableau 20. Solubilité du L-rhamnose dans les solvants organiques.

<i>Solvants</i>	<i>Log P</i>	<i>Solubilité</i>
DMSO	-1.35	Très bonne
Acétone	-0.23	Bonne
EMC	0.29	Bonne
AcOEt	0.68	Moyenne
n-BuOH	0.83	Bonne
Et ₂ O	0.84	Mauvaise
2M2B	0.89	Mauvaise
n-Hexane	3.50	Insoluble

A mesure que les valeurs du log P ^{250, 251, 252} augmentent la polarité diminue et par conséquent la solubilité diminue. D'après le test effectué, le rhamnose est très soluble dans le DMSO et

²⁵⁰ Ameri, A.; Shakibaie, M.; Amirpour-Rostami, S.; Ameri, A.; Adeli-sardou, M.; Khazali, P.; Rhammani, H.; Forootanfar, H. Partial purification and characterization of thermoalkalophilic lipase originated from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 and its application for ester synthesis. *Biotechnology*.**2015**,*14*,154-164.

²⁵¹ Wong, W. C.; Basri, M.; Razak, C. N. A.; Salleh, A. B. Synthesis of medium-chain glycerides using lipase from *Candida rugosa*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.**2000**, *77*, 85–88.

l'acétone a une bonne solubilité dans l'acétate d'éthyle en raison de la polarité du solvant. Il est insoluble dans le n-hexane et une mauvaise solubilité est constatée dans le 2M2B.

b. Réactions en milieu solvant organique seul

Les réactions sont ensuite menées dans les solvants organiques seuls. Les conversions obtenues sont illustrées dans le tableau ci-dessous. Elles sont dépendantes de la solubilité du sucre et de la polarité du solvant.

Tableau 21. Influence du solvant organique sur la conversion.

<i>Solvants</i>	<i>Conversion (%)</i>			
	2 h	24 h	48 h	72 h
Acétone	16.27	30.23	41.86	51.16
EMC	12.5	33.75	25	25
AcOEt	24.03	36.2	43.1	48.27
n-BuOH	18.91	35.13	47.29	52.7
Et ₂ O	12.12	22.72	25.75	25.75
2M2B	7.69	18.46	29.23	29.23
n-Hexane	11.29	20.96	30.64	30.64

Conditions réactionnelles : 1,21 D-rhamnose. 1,21 AP. 30 mg de la CAL B, tamis moléculaire en quantité équimolaire avec l'enzyme. 5 ml du solvant à 60°C pendant 72h.

Les meilleures conversions observées sont celles obtenues dans le n-Butanol (52.7 %). L'acétone (51.16 %) et l'acétate d'éthyle (48.27 %) au bout de 72h. Ceci est probablement dû à la polarité des solvants utilisés qui permettent de dissoudre les deux réactifs (**Tableau 21**).

Dans l'EMC la conversion ne dépasse pas 34 % au bout de 24 h malgré son pouvoir de dissolution. Les autres solvants donnent les plus faibles conversions n-Hexane (30.64%), 2M2B (29.23%) et l'éther diéthylique (25.75%). On en conclut que l'acétone et le n-Butanol sont les solvants les plus adéquats pour l'estérification du L-rhamnose en raison de sa bonne solubilité dans ces deux solvants.

²⁵² Leonard, V., Lamare, S., Legoy, M.-D., & Graber, M. Enantioselective acylation of R-2-pentanol in a solid/gas reactor catalysed by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**.32, 53–59.

2. Effet du co-solvant dans la réaction d'estérification**a. Solvant / DMSO : 1 ml / 0.1 ml**

Les réactions sont menées dans les mêmes solvants organiques en ajoutant une quantité du DMSO en tant que co-solvant pour améliorer la solubilité des réactifs. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 22. Influence du co-solvant sur la conversion (1ml / 0.1 ml).

<i>Solvant</i>	<i>Conversion (C %)</i>			
	2 h	24 h	48 h	72 h
Acétone / DMSO	0	28.12	29.03	24.19
EMC / DMSO	10.93	20.31	21.87	29.68
AcOEt / DMSO	0.76	18.18	18.18	18.18
n-BuOH / DMSO	5.88	29.41	31.37	35.29
Et ₂ O / DMSO	4.61	23.07	29.23	30.26
2M2B / DMSO	3.70	16.66	27.77	20.37
n-Hexane /DMSO	0	0	21.42	21.42

Conditions réactionnelles : 1.21 D-rhamnose. 1.21 AP. 30 mg de la CAL B, tamis moléculaire en quantité équimolaire avec l'enzyme. 5 ml du solvant à 60°C pendant 72h.

Les résultats qui figurent dans le **tableau 22** montrent que l'ajout du DMSO aux solvants avec un rapport de (1ml / 0.1 ml) influe négativement sur les conversions.

Nous pouvons expliquer cet effet négatif sur la conversion par la dénaturation de la lipase. En effet un solvant polaire absorbe l'eau constitutive des enzymes qui joue le rôle d'un lubrifiant pour que l'enzyme puisse conserver son activité catalytique. Les solvants polaires (log P faibles) augmentent la solubilité du sucre mais provoquent l'inactivation partielle de la lipase²⁵³. Avec un rapport 1ml/0.1ml on constate une faible activité de l'enzyme. Le n-Butanol / DMSO est le meilleur solvant (35.29 %, 72h).

Pour essayer de trouver un compromis entre la lipase et le solvant nous avons modifié la quantité de DMSO.

b. Solvant / DMSO: 1 ml / 50 µl

D'après les résultats répertoriés dans le **tableau 23** on constate que l'ajout de 50 µl DMSO dans un rapport (1ml / 50 µl) permet d'augmenter les conversions. On obtient 60% dans le

²⁵³ Jiang, H.L.; Kang, M.L.; Quan, J.S.; Kang, S.G.; Akaike, T.; Yoo, H.S.; Cho, C.S. *Biomaterials*. **2007**, *29*, 1931-1939.

mélange (acétone / DMSO), 53% dans (Et₂O / DMSO) et 45 % dans le (2M2B / DMSO). La conversion reste presque la même dans (Hexane / DMSO). En revanche on observe une diminution considérable de la conversion dans le (n-BuOH/ DMSO), (AcOEt / DMSO) et (EMC/DMSO).

La modification du rapport solvant/co-solvant (**Figure 57**) par la diminution de la quantité de DMSO a permis de dissoudre les réactifs sans dénaturer la CAL B. Le mélange (Acétone / DMSO) : (1 ml / 50 µl) est le meilleur solvant pour l'estérification enzymatique du rhamnose. Ce rapport est conservé dans la suite de cette étude.

Tableau 23. Influence du co-solvant sur la conversion (1 ml / 50 µl).

Solvant/Co-solvant	Conversion (%)			
	2 h	24 h	48 h	72 h
Acétone / DMSO	5	15	59	60
EMC / DMSO	16.36	18.18	27.27	10.91
AcOEt/ DMSO	6	6	24.76	10
n-BuOH / DMSO	24	24	28	10
Et ₂ O/ DMSO	2	4	47.92	53
2M2B / DMSO	14	14	45	30
n-Hexane / DMSO	0	17.19	21.88	20.31

Conditions réactionnelles : 1.21mmol L-rhamnose. 1.21 AP. 30 mg de la CAL B, tamis moléculaire en quantité équimolaire avec l'enzyme.
5 ml du solvant à 60°C pendant 72h.

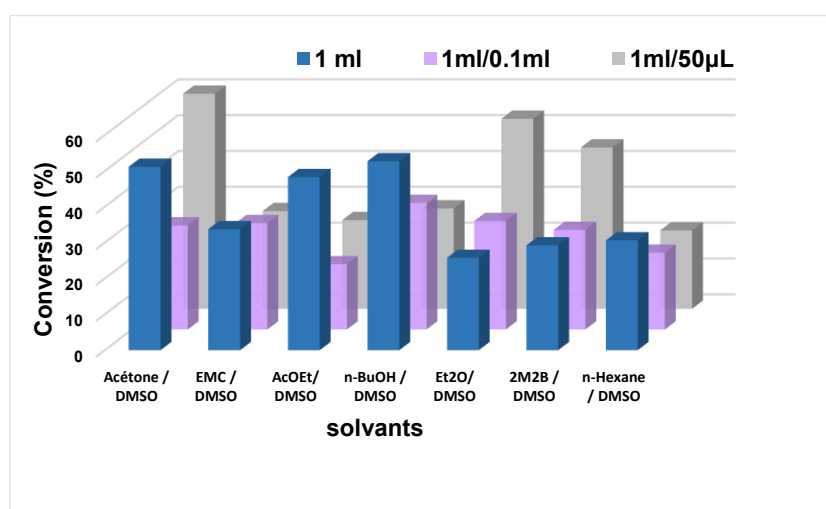


Figure 57. Effet de solvants et Co-solvants sur la réaction d'estérification du rhamnose.

3. Influence de la quantité de l'enzyme

Une étude concernant l'influence de la quantité de la lipase sur la synthèse enzymatique du palmitate de rhamnose est réalisée en variant le rapport enzyme / substrat de 10 à 50 % (w/w). Les résultats obtenus pour la conversion dans le **tableau 24** indiquent que la quantité optimale d'enzyme est de 15% pour un taux de conversion de 60 %.

Au-delà de cette valeur, on constate que plus la quantité d'enzyme augmente plus la conversion diminue à 50% w / w. L'enzyme devient presque inactive et la conversion est très faible 3.28% au bout de 72h. Cette inhibition est peut-être due à la limitation de la diffusion et du transfert de masse lors de l'acte catalytique. L'effet inhibiteur peut également être attribué à la teneur en eau, autrement dit la concentration enzymatique plus élevée entraîne une augmentation de la concentration initiale en eau due à celle déjà présente dans la matrice de la formulation enzymatique ²⁵⁴. Des résultats similaires ont été observés dans la synthèse d'ester de glucose dans des solvants organiques montrant l'effet de l'excès de lipase ²⁵⁵.

Tableau 24. Influence de la quantité de l'enzyme sur la conversion

Lipase		Conversion (%)			
w/w	m (g)	2 h	24 h	48 h	72 h
10%	0.02	0	0	24.56	26.23
15%	0.03	21.05	22.81	40.35	60
20%	0.04	3.5	22.81	33.33	49.12
25%	0.05	0	3.28	27.87	24.59
30%	0.06	27.87	9.84	24.59	18.03
35%	0.07	4.92	1.64	13.11	14.75
40%	0.08	3.28	13.11	21.31	32.79
45%	0.09	0	0	18.03	18.03
50%	0.1	3.28	1.64	18.03	3.28

Conditions réactionnelles : 1.21 L-rhamnose. 1.21 AP. 30 mg de la CAL B, tamis moléculaire en quantité équimolaire avec l'enzyme dans 5ml solvant (Acétone / DMSO : 1 ml/ 50 µl) à 60°C pendant 72h.

La figure ci-dessus montre que le taux de conversion a augmenté avec l'augmentation de la quantité de lipase jusqu'à 15%. Au-delà, on observe une diminution de la conversion

²⁵⁴ Hollenbach, R.; Ochsenreither, K.; & Syldatk, C. Enzymatic Synthesis of Glucose Monodecanoate in a Hydrophobic Deep Eutectic Solvent. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**, *21*, 4342.

²⁵⁵ Arcos, J.A.; Hill, C.G.; Otero, C. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 104–110.

probablement due à l'inhibition de l'enzyme (50% de CAL B). On peut conclure que l'augmentation de la quantité d'enzyme entraîne des conversions très faibles.

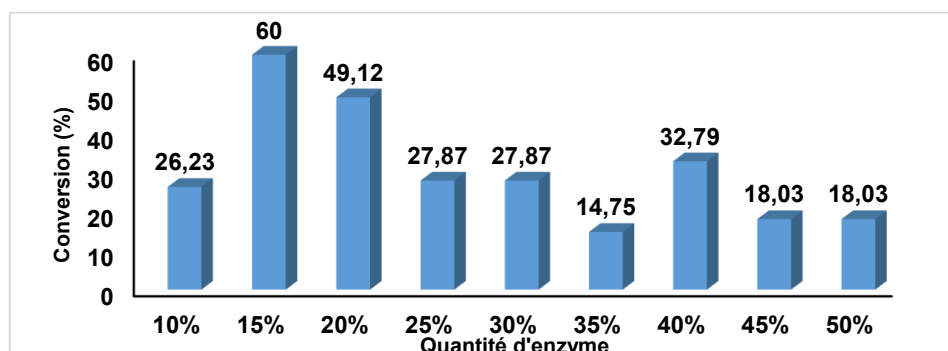


Figure 58. Influence de la quantité de l'enzyme sur la conversion.

4. Influence du rapport molaire entre les substrats

L'influence du rapport molaire entre les substrats (L-rhamnose/acide palmitique) est également un facteur à prendre en compte lors de l'optimisation. Pour cela nous avons effectué deux séries de réactions. Les résultats se rapportant à cette étude sont donnés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 25. Influence du rapport entre les substrats sur la conversion.
Variation du sucre

S/AP	Conversion (%)			
	2 h	24 h	48 h	72 h
2 / 1	22.41	22.41	58.62	55.17
3 / 1	38.1	39.29	66.67	64.29
4 / 1	42.35	42.35	54.12	67.06

Conditions réactionnelles : n mmol L-rhamnose. 1.21mmol AP.
30mg de la CAL B, tamis moléculaire en quantité équimolaire avec l'enzyme
dans 5ml solvant (Acétone / DMSO : 1 ml / 50 μ l) à 60°C pendant 72h.

D'après le **tableau 25**, on observe que l'excès d'agent acylant n'empêche pas l'avancement de la réaction. La conversion est entre 55 % et 67% après 72h.

Tableau 26. Influence du rapport entre les substrats sur la conversion.
Variation de l'acide palmitique.

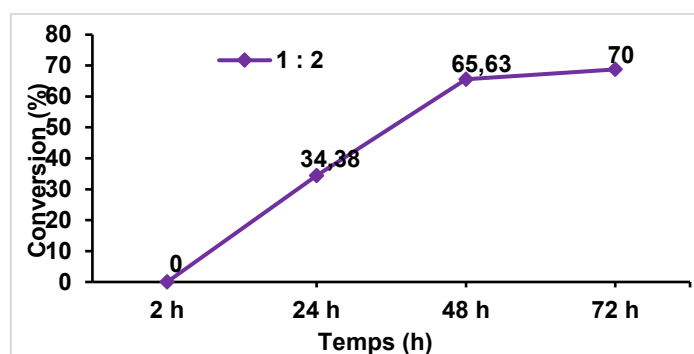
S / AP	Conversion (%)			
	2 h	24 h	48 h	72 h
1/1	21.05	22.81	40.35	60
1/2	0	34.38	65.63	70
1/3	0	20.4	24.48	35.71
1/4	15.79	24.21	55.79	63.16

Conditions réactionnelles : 1.21mmol *L*-rhamnose. AP. (0.03 g)
de CAL B, tamis moléculaire en quantité équimolaire avec l'enzyme
dans 5ml solvant (Acétone / DMSO : 1 ml / 50 μ l)
à 60°C pendant 72h.

Selon les résultats du **tableau 26** la meilleure conversion (70%) obtenue au bout de 72h est celle de la réaction dont le rapport molaire est (1/2).

Le rapport (1/3) donne la plus faible conversion. Tandis que le taux de la conversion dans le cas du rapport 1/4 est important 63.16%.

La figure ci-dessous présente la meilleure conversion obtenue.

**Figure 59.** Influence du rapport molaire entre les substrats sur la conversion.

La conversion augmente progressivement en fonction du temps. La réaction commence après 24 h avec un taux de 34.38 % puis il atteint 65.63% au bout de 48 h et 70 % au bout de 72h.

III. Etude comparative des propriétés physico-chimiques

1. Propriétés tensioactives

Nous avons également déterminé les propriétés tensioactives de 1-*O*-hexadécanoyl-*L*-rhamnopyranose **2** à partir de la tension de surface (**figure 60**) afin de les comparer avec ceux de 1-*O*-hexadécanoyl-*D*-xylopyranose **3**.

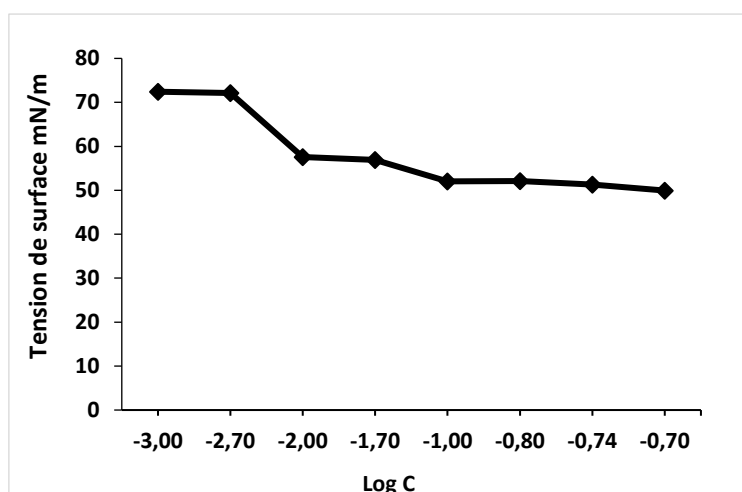


Figure 60. Tension de surface de 1-O-hexadécanoyl-L-rhamnopyranose dans l'eau.

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le **tableau 27**.

Tableau 27. Propriétés tensioactives des esters de sucres

Composé	HLB	γ (mN/m)	C (mmol/L)	$\Gamma \times 10^{-5}$ (mol/m ²)	P	A (Å ²)
<u>2</u>	8.16	54	0.04	1.99	2.52	8.34
<u>3</u>	9.11	38	0.01	0.70	0.92	23.4

L'analyse de ces résultats permet de déduire que le palmitate du xylose 3 réduit mieux la tension de surface de l'eau que le palmitate du rhamnose 2. La valeur de la HLB du composé 2 bien que plus faible que celle de 3 permet de conclure que cette molécule présente les caractéristiques d'un émulsifiant huile dans eau la présence du groupe CH₃ conduit à la diminution de cet indice parce qu'il augmente l'hydrophobicité de la molécule.

Le facteur d'empilement P obtenu pour le 1-O-hexadécanoyl-L-rhamnopyranose est 2.52 ce qui indique la formation des micelles inversées à partir de monomère sous forme de cône tronqué inversé (P >1). Concernant l'aire occupé par la molécule, les valeurs obtenues montrent que l'aire occupée par le 1-O-hexadécanoyl-D-xylopyranose est plus grande que celle du palmitate de rhamnose.

La différence entre les propriétés de surface de ces esters pourrait être due également à la position de OH sur le carbone chiral sub-terminal (L et D) des sucres. Les configurations relatives déterminent la disposition spatiale des atomes de la tête polaire et affecte ainsi l'angle de liaison dans la formation des micelles autrement dit elles influent sur la façon dont elles interagissent avec d'autres substances (dans notre cas les monomères). La taille de monomère et la stabilité des micelles formée dépendraient également de la configuration. Une étude par modélisation est en cours.

2. Le pouvoir émulsifiant et sa stabilité

Le pouvoir émulsifiant est une propriété très importante qui permet de mélanger deux phases différentes, une phase aqueuse et l'acide gras pour qu'ils puissent former une crème²⁵⁶.

La mesure du pouvoir émulsifiant de deux tensioactifs montre que ces produits sont des bons émulsifiants avec un excellent pouvoir émulsifiant (100%) qui reste stable en gardant la même valeur jusqu'à 2 heures. La comparaison entre la stabilité du pouvoir émulsifiant de de 1-*O*-hexadécanoyl-*L*-rhamnopyranose **2** et 1-*O*-hexadécanoyl-*D*-xylopyranose **3** (**Figure 61**) montre bien l'effet de la tête hydrophile sur la stabilité d'émulsifiant. La stabilité du 1-*O*-hexadécanoyl-*L*-rhamnopyranose reste presque stable pendant 24h avec une valeur de 92.31% puis elle diminue légèrement au bout de 48 h avec une valeur atteignant 84.62 %. Par contre on remarque une baisse de stabilité d'émulsifiant de composé **3** qui descend à 76.92% et reste stable jusqu'à 24 h seulement.

Nous pouvons constater que les deux tensioactifs ont un pouvoir émulsifiant élevé mais sa stabilité dépend de la tête polaire. Le palmitate du rhamnose **2** garde un bon pouvoir émulsifiant plus stable que celui de composé **3**. Ceci pourrait être expliqué par la présence du groupe alkyle et la différence de configuration entre les deux sucres.

²⁵⁶ Ihara, K., Hirota, M., Akitsu, T., Urakawa, K., Abe, T., Sumi, M., Fujii, T. Effects of emulsifying components in the continuous phase of cream on the stability of fat globules and the physical properties of whipped cream. *Journal of Dairy Science*. **2015**, 98, 2875–2883.

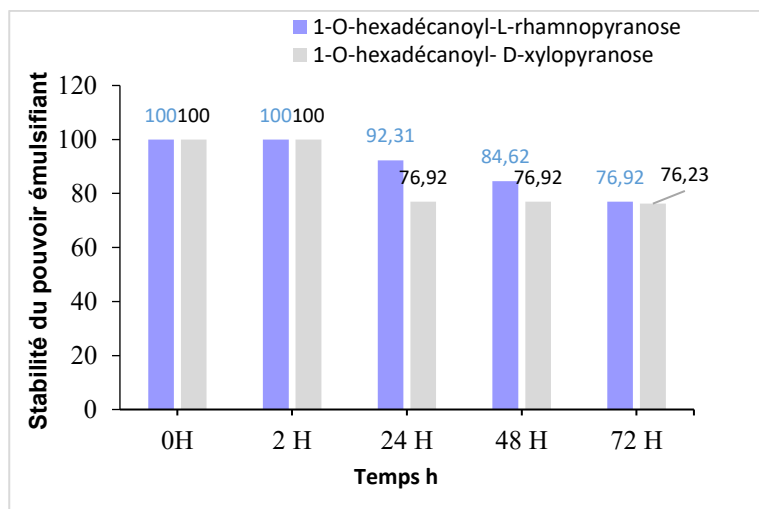


Figure 61. Stabilité du pouvoir émulsifiant de palmitate de rhamnose et de palmitate de xylose.

D'après les propriétés évaluées nous pouvons conclure que le palmitate du xylose peut être utilisé comme un bon détergent vu son efficacité à réduire la tension de l'eau et même un émulsifiant. Quant au palmitate du rhamnose, ses propriétés font de lui un bon émulsifiant à utiliser dans l'industrie cosmétique pour produire des crèmes de soin sachant que le rhamnose a des propriétés bénéfiques pour la peau. En tant qu'émulsifiants, ces esters peuvent être utilisés également comme additifs alimentaire pour améliorer l'apparence, la texture et la durée de conservation des aliments.

Conclusion

Ce chapitre concerne l'étude de l'effet de la tête polaire sur l'activité interfaciale des esters de sucres et d'acide gras pour une même longueur de la chaîne hydrophobe (C16). Dans ce sens, nous avons d'abord synthétisé le palmitate du L-rhamnose puis nous avons effectué une étude comparative entre les propriétés tensioactives de ce dernier et celles du palmitate du xylose. Les résultats obtenus montrent que le palmitate du xylose a des bonnes propriétés tensioactives par rapport au palmitate du rhamnose parce qu'il baisse mieux la tension de surface (38 mN/m). Les deux produits sont des bons émulsifiants (huile dans l'eau) mais le palmitate du rhamnose est le plus stable.

Cette différence d'activité pourrait être dû à la présence du groupe alkyle et la différence de la configuration D et L entre les deux sucres. Pour mieux comprendre l'influence des différences structurales de deux composés sur leurs propriétés, une étude théorique approfondie est en cours afin de comparer leurs réactivités et leurs géométries moléculaires.

I. Protocole général d'estérification du D-xylose

Le D-Xylose (6 g, 39,96 mmol) est dissous dans 150 ml de solvant et mis sous agitation pendant 24 heures. On ajoute 79,92 mmol de l'acide gras allant de C14 à C22 (C14/C16/C20/C22). On laisse sous agitation magnétique pendant 15 mn. La réaction est catalysée par l'ajout de 0.9 g de la *Candida antarctica* lipase B en présence d'une quantité équimolaire de tamis moléculaire (4 Å) pour éviter tout excès de l'eau dans le milieu provenant de l'estérification.

Pendant 72 h, La réaction est suivie par CCM. Le mélange réactionnel est filtré et évaporé sous pression réduite.

On ajoute de l'acétone au mélange réactionnel et on réchauffe jusqu'à 50°C puis on fait une extraction à froid (-10°C) pour se débarrasser de l'acide gras. Le filtrat est ensuite purifié sur colonne chromatographique en choisissant comme le dichlorométhane et le méthanol (9,5/0,5).

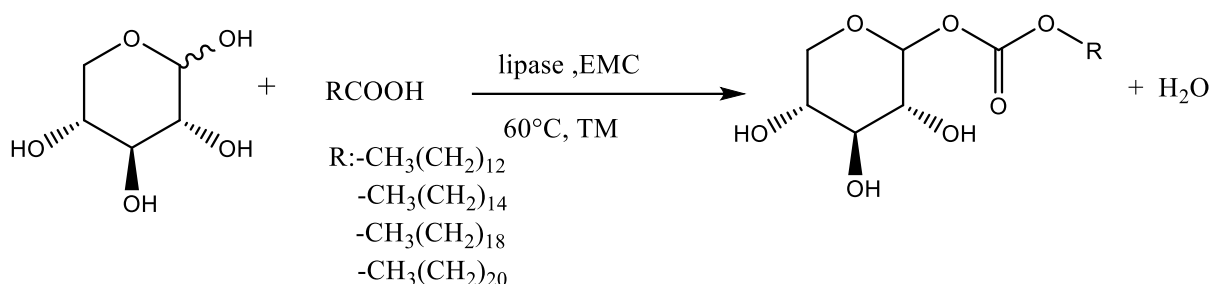


Schéma 26. Estérification enzymatique du D-Xylose.

II. Détermination du taux de conversion

La teneur en esters de sucre a été quantifiée en calculant la quantité résiduelle d'acide gras dans le mélange réactionnel, qui a été déterminée par la méthode de titrage²⁵⁴. En bref, 0.05ml d'échantillon du mélange réactionnel ont été titrés contre une solution d'hydroxyde de sodium (0,1 M) en utilisant un indicateur de phénolphtaléine. Le taux d'avancement a été calculé à l'aide de la formule :

$$C\% = [(V_0 - V_1) / V_0] * 100$$

²⁵⁴ Leitgeb, M. ; Knez, Z. L'influence de l'eau sur la synthèse de l'oléate de *n*-butyle par le mucor *miehei* lipase immobilisée. *J Am Oil Chem Soc.* **1990**,67,775-778

V_0 : le volume initial de titrage

V_1 : le volume de l'acide prélevé après l'arrêt de la réaction.

III. Appareillages et conditions générales

1. Analyse par Résonance magnétique nucléaire RMN : les produits synthétisés ont été caractérisés par un spectromètre de RMN de la marque BRUKER A 400 activement blindé de fréquence 400Hz piloté par une console de type AVANCE III HD correspondant à un champ magnétique de 9.4 Tesla ainsi qu'un logiciel d'exploitation TOPSPIN 3.5 PL6. Les solvants utilisés sont le $CDCl_3$ et $DMSO-d_6$.

2. Analyse par infrarouge

Les spectres infrarouges ont été réalisés par la technique de spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier –Réflectance Totale Atténuée (FTIR-ATR) qui est muni d'un ATR Platinum-diamant de la marque BRUKER mené de logiciel Opus®. Avec une gamme de fréquence entre $375-4000\text{ cm}^{-1}$ et une résolution de 2 cm^{-1} .

III. Mesure de la tension de surface

Les valeurs de tension superficielle ont été mesurées à 25 C par la méthode de la goutte pendante en utilisant le tensiomètre de goutte du concept informatique Tracker. La concentration micellaire critique (CMC) a été calculée à partir de la pente de la diminution des valeurs de tension superficielle avec l'augmentation de la concentration des solutions tensioactives dans le diagramme de tension superficielle par rapport au Log de la concentration

IV. Mesure du pouvoir émulsifiant

4 ml de solution des esters de sucres à concentration de 0.5 % a été centrifugé à une vitesse de 8000 rpm pendant 10 min puis 1 ml de l'huile de paraffine a été ajouté. Le mélange a été centrifugé à 25°C pour mêler les deux phases pendant 15 min.

Des solutions de monoester (4 mL) à une concentration de 0,25 % ont été préparées. Les échantillons ont été homogénéisés avec 1 ml d'huile de paraffine à l'aide d'un homogénéisateur à 800 rpm pendant 15 min à 25 C. Le pouvoir émulsifiant (EA) et la stabilité de l'émulsion (ES) ont été calculées en utilisant les équations suivantes¹⁰⁹ :

$$EA (\%) = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (1)$$

$$ES (\%) = \frac{H_2}{H_1} \times 100 \quad (2)$$

Où H_0 est la hauteur initiale des solutions et de l'huile de paraffine, H_1 est la hauteur de la couche d'émulsion mesurée immédiatement après homogénéisation. H_2 est la hauteur de la couche d'émulsion après 2, 24, 48 et 72 heures.

Le pouvoir émulsifiant des esters du xylose et sa stabilité

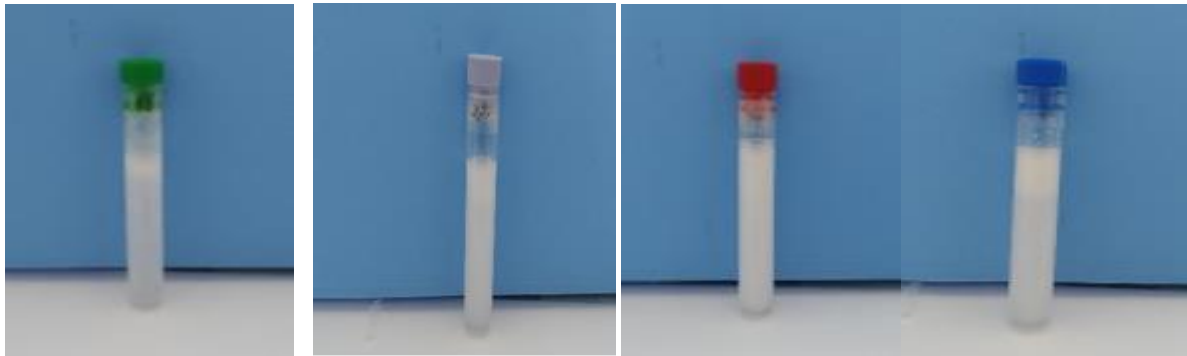


Figure 62. Le pouvoir émulsifiant des esters du xylose

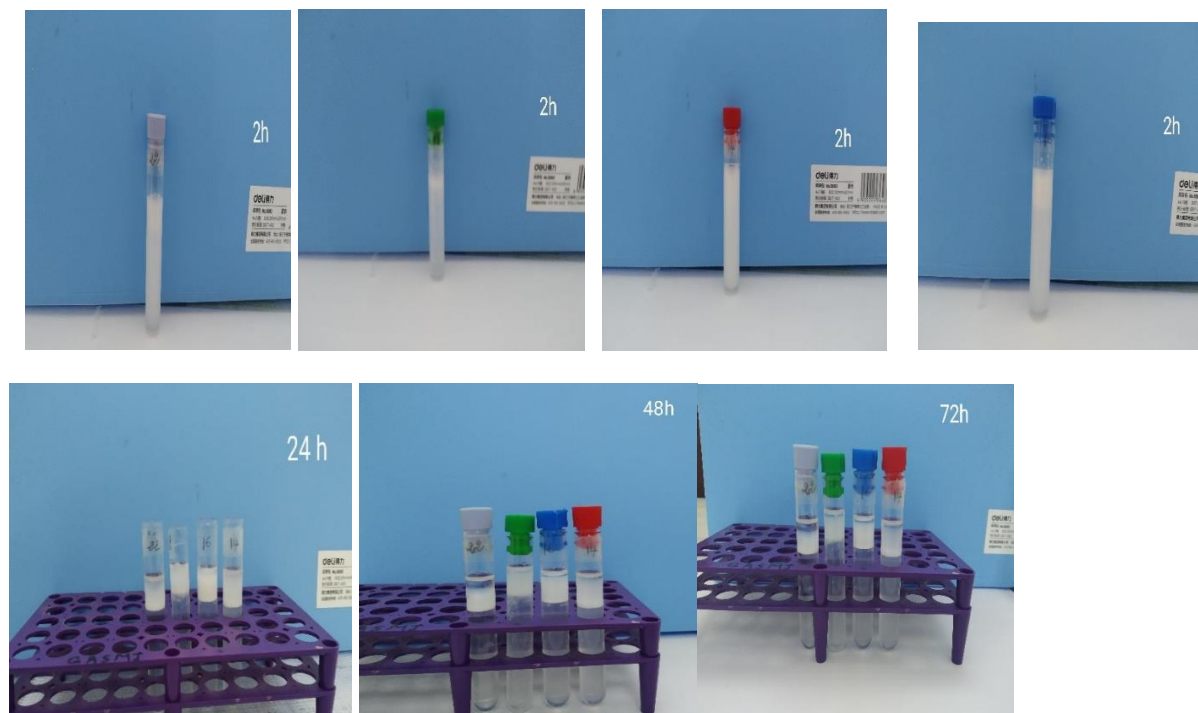


Figure 63. Stabilité de l'émulsifiant des esters du xylose .

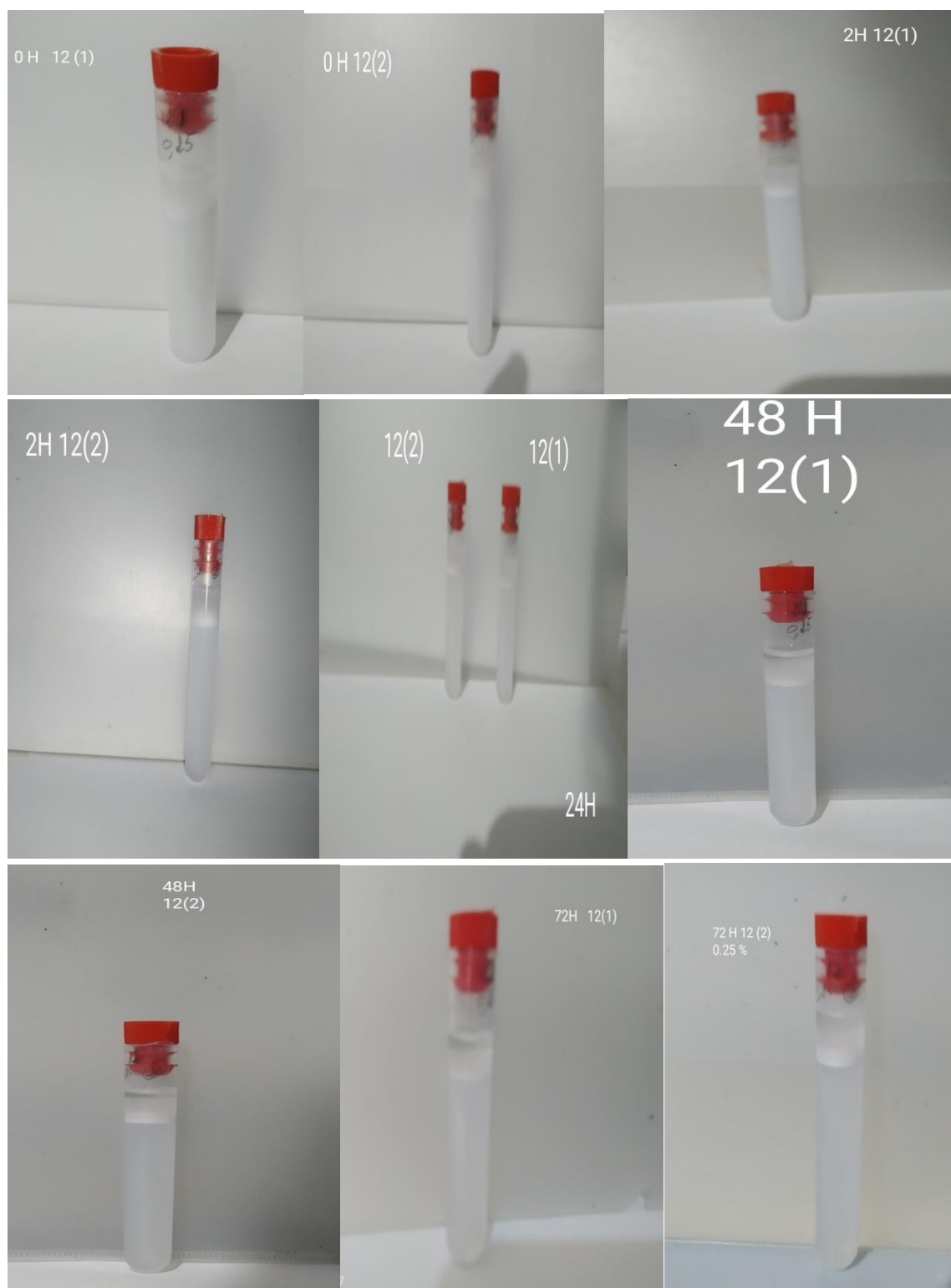
Le pouvoir émulsifiant des anomères

Figure 64. *Stabilité d'émulsifiant de produits anomères de 1-O- dodécanoyl -D-Xylopynaose (à 0,25% p/v)*

(1 alpha /2 beta)

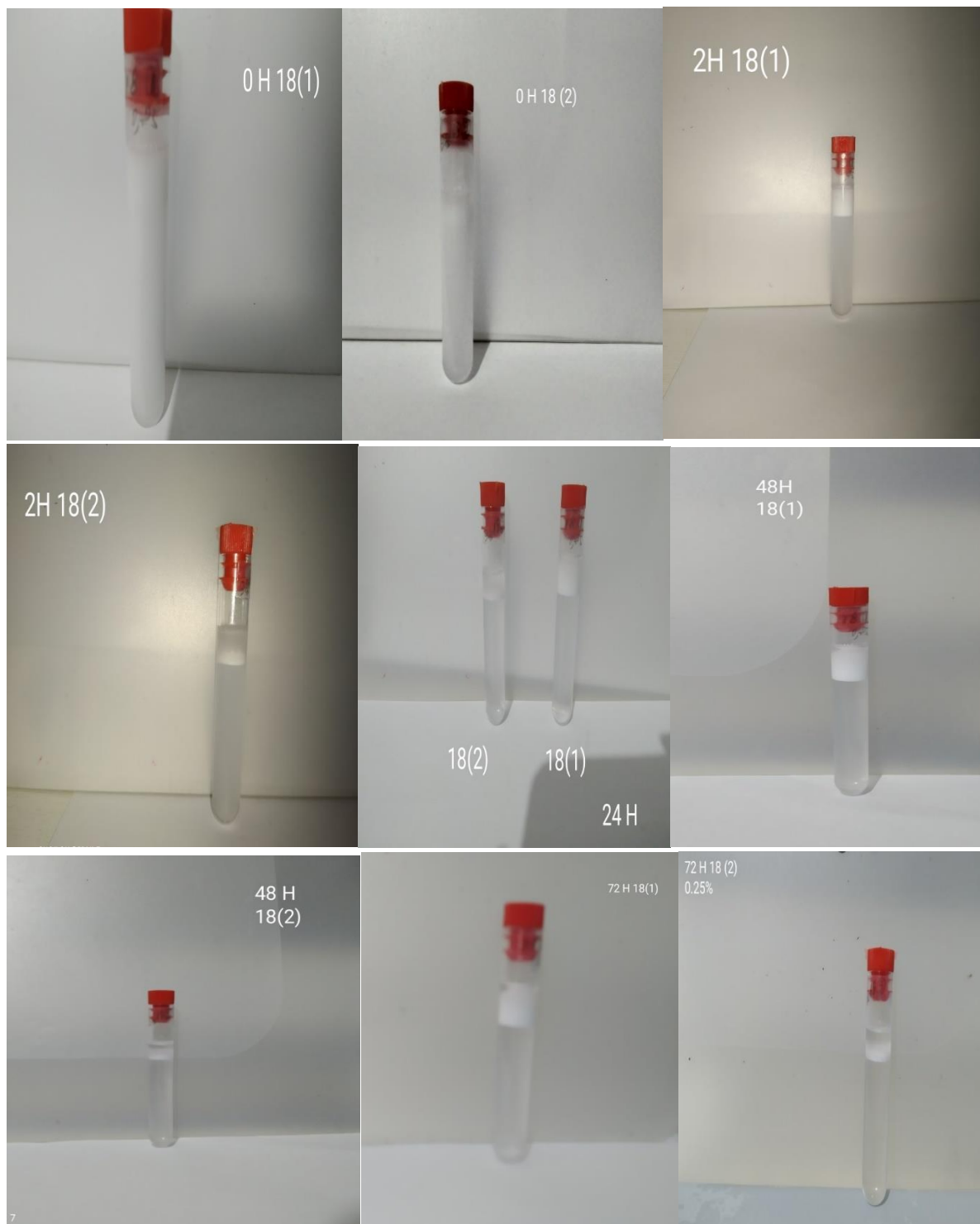


Figure 65. *Stabilité d'émulsifiant de produits anomères de 1-O- Octadécanoyl -D-Xylopyranose (à 0,25% p/v) (1 alpha /2 beta)*

V. Mesure du pouvoir moussant

4 ml de solutions aqueuses des tensioactifs obtenus (0,25 w/v) ont été placés dans des tubes de 10 ml. La hauteur (H0) a été mesurée avant l'homogénéisation des solutions et à l'aide d'un

homogénéisateur pendant 4 min à 1000 rpm et à 25 °C. La hauteur totale (H_1) et la hauteur de mousse (H_2) ont été déterminées à 0 min. Après avoir été laissé pendant 10, 20, 30, 45, 60 et 120 minutes, la hauteur de mousse (H_3) a été mesurée.

La pouvoir moussant (FA) et la stabilité à la formation de mousse (FS) ont été calculées en utilisant les équations suivantes ¹⁰⁹:

$$FA (\%) = \frac{(H_1 - H_0)}{H_0} \times 100$$

$$FS (\%) = \frac{H_3}{H_2} \times 100$$

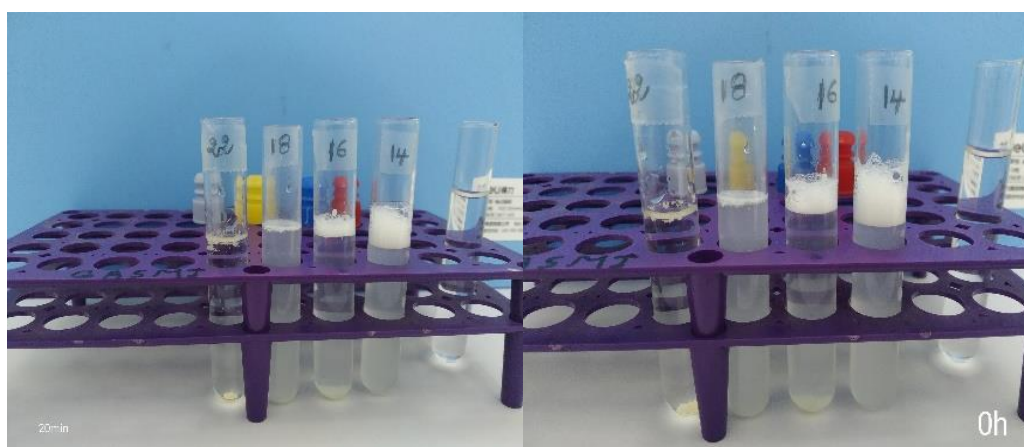


Figure 66. Stabilité de la mousse des esters du xylose

VI. Activité antibactérienne

1. Préparation de l'inoculum

Nous utilisons une boucle stérile pour prélever les colonies d'une culture de nuit sur des milieux non sélectifs. Nous suspendons les colonies dans 1 ml d'eau distillée stérile. La densité de la suspension d'inoculum doit être égale à 0,5 Mac Farland Standard (106UCF / ml), puis nous mélangeons en utilisant un mélangeur vortex. L'exactitude de la densité des normes Mc Farland peut être vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre avec un 1-cm de trajet lumineux ; un standard Mc Farland de 0,5 a une valeur d'absorbance de 0,08 à 0,1 à 625nm.

2. Détermination des diamètres de la zone d'inhibition (mm)

La technique de Kirby-Bauer a été utilisée pour déterminer l'activité antibactérienne des produits synthétisés contre cinq souches bactériennes. Les boîtes de Petri contenant la gélose de Mueller Hinton (pH 7,2 et 4 mm d'épaisseur) ont été inoculées avec des organismes d'essai.

Le papier Watman de 6 mm de diamètre a été imprégné d'un volume de 20 μL des molécules testées, déposé à la surface de l'agar. Le même volume de 5 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) a été distribué dans le puits témoin. Chaque concentration diffuse dans l'agar forme ainsi une zone d'inhibition qui sera mesurée 24 h après incubation à 37 °C par un étrier de règle.

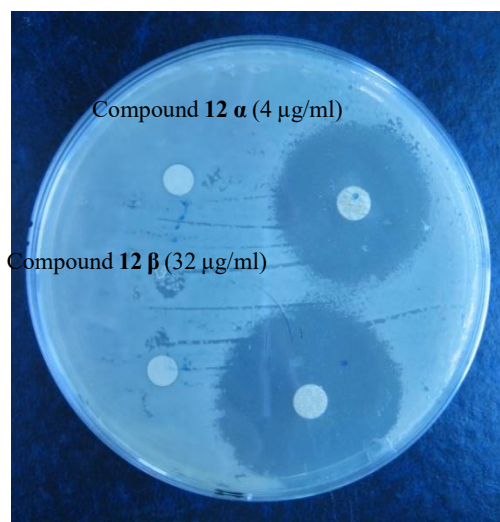


Figure 67. Détermination de la zone d'inhibition par la technique de Kirby-Bauer

3. Mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

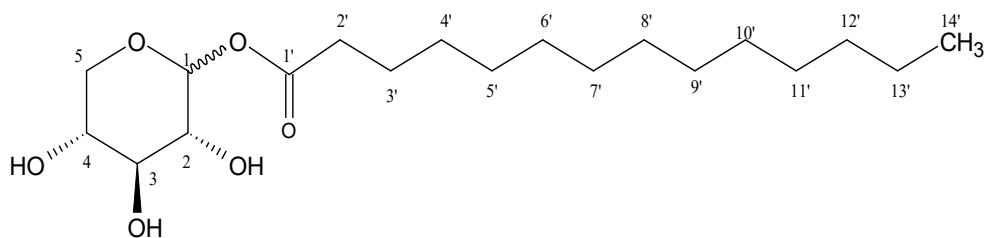
La concentration minimale d'inhibiteur (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'un antimicrobien qui inhibera la croissance visible. Pour déterminer la CMI de chaque composé, nous avons préparé une gamme de dilution des esters de sucre d'acides gras (0,25-512 $\mu\text{g/ml}$) comme suit : 512,256,128,64,32,16,4,2,1,5,0,25. Ces concentrations sont ensuite réparties sur des éprouvettes de bouillon nutritif ensemencé avec une concentration connue de la souche bactérienne. L'incubation se fait à 37 °C. La croissance bactérienne sera évaluée en fonction de l'OD obtenue. La lecture se fait par comparaison avec le tube témoin ; la dilution qui donne le premier tube clair (sans croissance bactérienne) détermine le CIM.

VII. Modélisation moléculaire

Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GAUSSIAN 09. La méthode de modélisation DFT, utilisant la fonction hybride B3LYP a été utilisée pour calculer les paramètres théoriques avec la combinaison d'ensemble de base 6-31 G (d, p) et 6-31 G (d)

VIII. Caractérisation des composés de synthèse

■ Composé 2 : 1-O-tétradécanoyl-D-Xylopyranose (Myristate du xylose)



Formule brute : C₁₉H₃₆O₆.

Masse molaire : 360.49g/mol.

Aspect : une poudre jaunâtre

Rf : 0.20 (CHCl₃/MeOH, 9,5/0,5).

Rdt : 45,84 %

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (t, *J* 6.7 Hz, 6 H_{14'α,β}), 1.47–1.11 (m, 40 H_{4'α,β-13'α,β}), 1.79–1.46 (m, 4H, H_{3'α,β}), 2.38 (t, 4H, H_{2'α,β}), 5.67–3.14 (m, 18H, α,β-xylose) ; **RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃)** δ 14.09 (C_{14'}), 22.68 (C_{13'}), 24.83 (C_{12'}), 24.87 (C_{11'}), 24.91 (C_{10'}), 31.92-29.36 (C_{4'-C_{9'}}), 34.42 (C_{2'}), 34.19 (C_{3'}), 63.41 (C_{5α}), 67.72 (C_{5β}), 69.98 (C_{4α}), 70.32 (C_{4β}), 72.37 (C_{3α}), 74.36 (C_{3β}), 90.65 (C_{2α}), 92.60 (C_{2β}), 95.85 (C_{1α}), 97.01 (C_{1β}), 174.03 (CH₂C=O_α), 174.75 (CH₂C=O_β); **IR (ATR) ν / cm⁻¹** 3356.56, 2849.76, 2914.24, 1713.43, 1037.13.

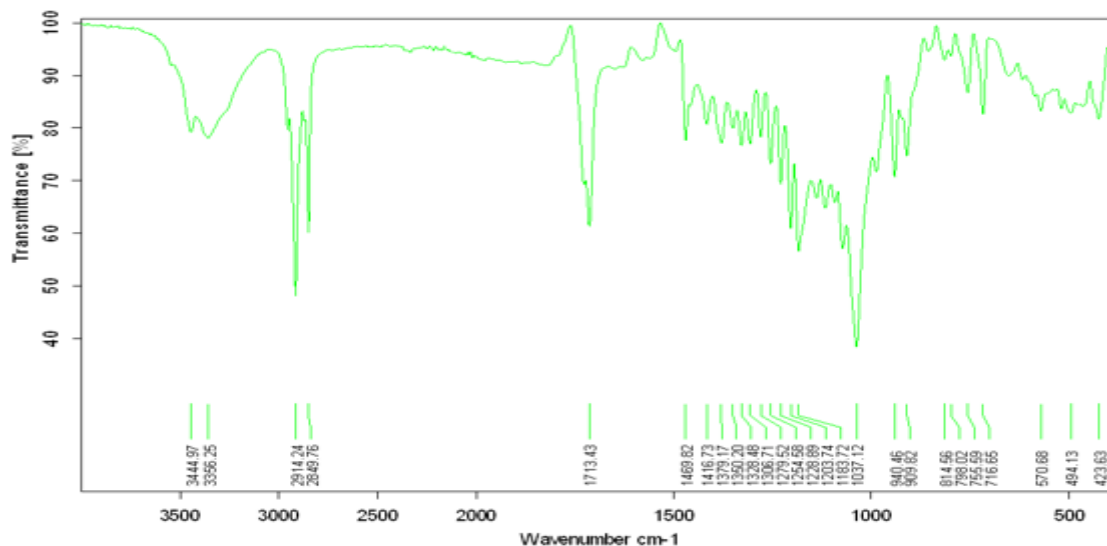


Figure 68. Spectre ATR-FTIR de composé 2

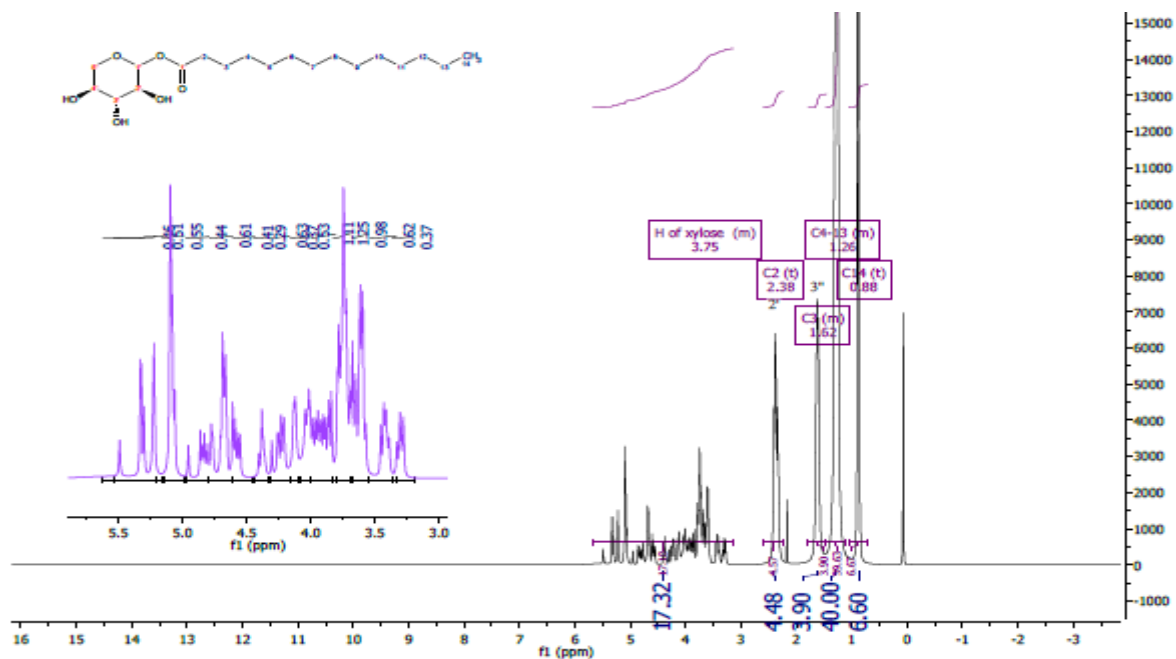


Figure 69. Spectre RMN^1H (400 MHz, CDCl_3) de composé 2

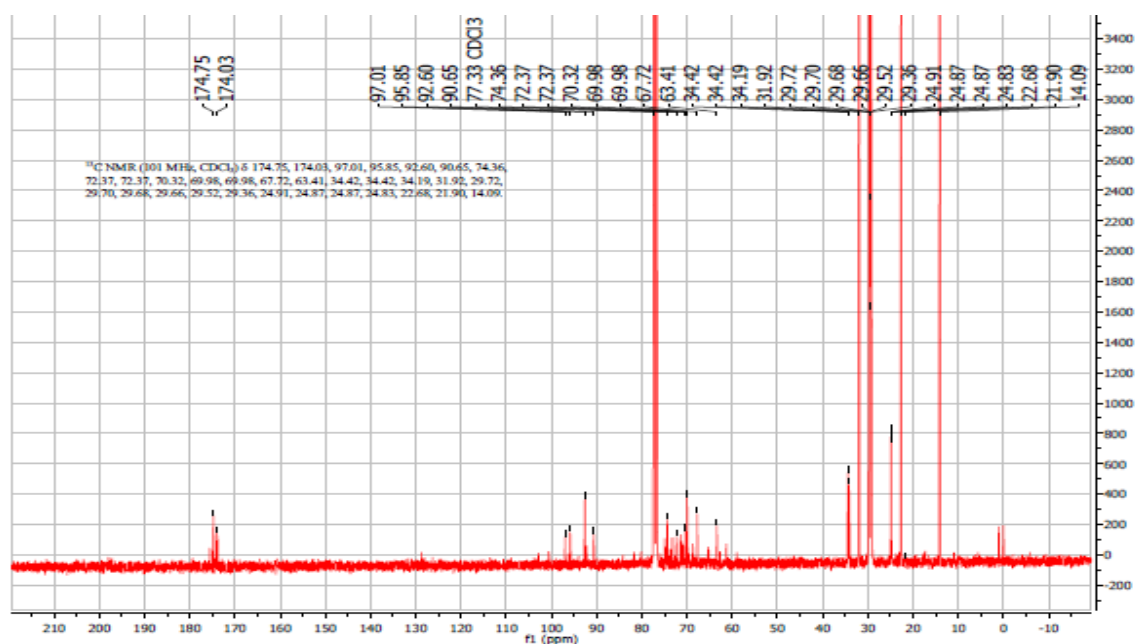
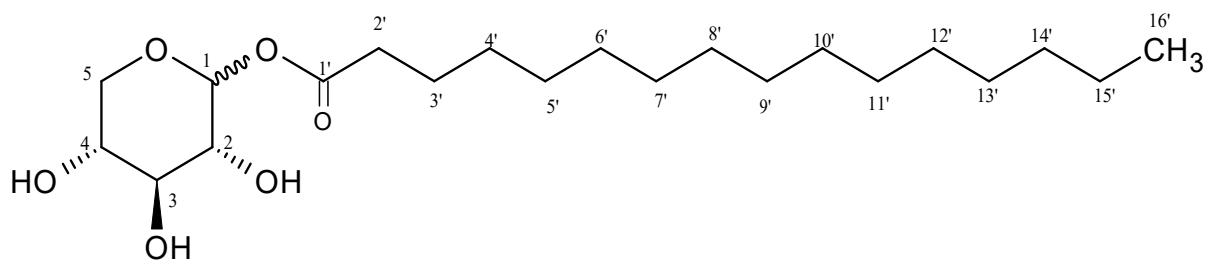


Figure 70. Spectre RMN^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de composé 2

Composé **3**: 1-*O*-hexadecanoyl-D-Xylopyranose (Palmitate du xylose)



Formule brute : C₂₁H₄₀O₆.

Masse molaire : 388.55g/mol.

Aspect : une poudre blanchâtre

Rf : 0.45 (CHCl₃/MeOH, 9,5/0,5).

Rdt : 65,44 %

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (t, *J* 6.8 Hz, 6H, H_{16'}_{α,β}), 1.46–1.13 (m, 48H, H_{4'}_{α,β}-15'_{α,β}), 1.75–1.49 (m, 4H, H_{3'}_{α,β}), 2.51–2.22 (m, 4H, H_{2'}_{α,β}), 5.64–3.14 (m, 18H, α,β-xylose) ; **RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃)** δ 14.10 (C_{16'}), 22.68 (C_{15'}), 29.36–31.92 (C_{3'}-C_{14'}), 34.39 (C_{2'}), 63.49 (C_{5α}), 67.77 (C_{5β}), 73.37 (C_{4β}), 74.42 (C_{4β}), 90.71 (C_{3α}), 92.60 (C_{3β}), 95.79 (C_{2α}), 96.22 (C_{2β}), 100.64 (C_{1α}), 102.91 (C_{1β}), 173.97 (CH₂C=O_α), 174.72 (CH₂C=O_β); **IR (ATR)** v/cm⁻¹ 3348.40, 2914.02, 2848.71, 1713.84, 1577.67, 1560.45, 1469.70, 1379.52, 1309.55, 1163.48, 1036.50, 938.70, 910.98, 861.59, 815.14, 765.34, 717.22, 537.21.

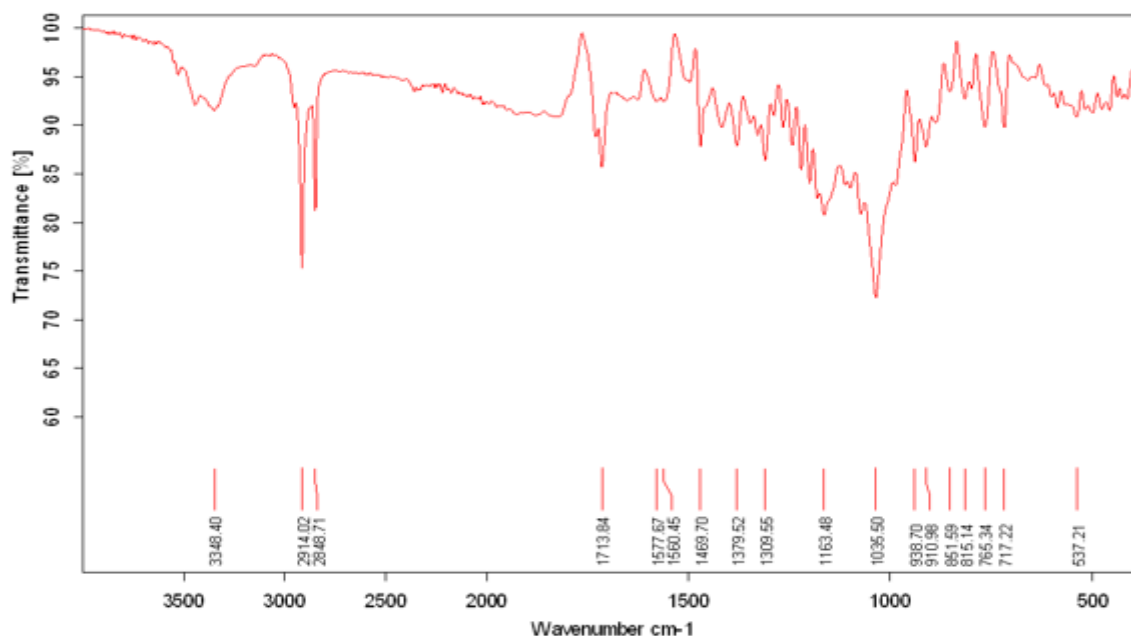
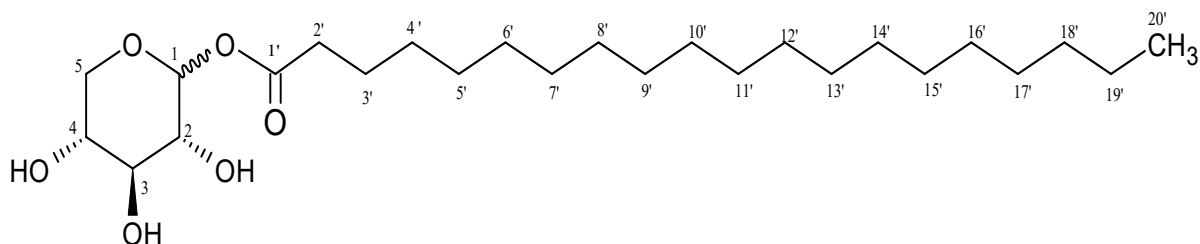


Figure 71. Spectre ATR-FTIR de composé **3**

Composé **5** : 1-*O*-eicosanoyl- α,β -D-xylopyranose (Arachidate du xylose)



Formule brute : C₂₅H₄₈O₆.

Masse molaire : 444.65g/mol.

Aspect : Une poudre blanche

Rf : 0.18 (DCM/MeOH, 9,5/0,5).

Rdt: 66,42 %

RMN ¹H (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0.88 (t, *J* 6.7 Hz, 6H H_{20 α,β}), 1.50–1.08 (m, 64 H, H_{4' α,β} , H_{19' α,β}), 1.78–1.52(m, 4H, H_{3 α,β}), 2.53-2.19 (m, 4H ,H_{2 α,β}), 5.40- 3.04 (m, 18H, α,β -xylose);

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 14.10 (C_{20'}), 22.70 (C_{19'}), 24.78 (C_{3'}), 29.12-31.95 (C_{4'-C17'}), 33.74 (C_{18'}), 34.40 (C_{2'}), 61.51 (C_{5 α}), 63.62 (C_{5 β}), 64.85 (C_{4 α}), 67.84 (C_{4' β}), 70.08 (C_{3' α}), 71.81 (C_{3 β}), 73.52 (C_{2 α}), 74.55 (C_{2 β}), 92.66 (C_{1 β}), 90.81 (C_{1 α}), 174.74 (CH₂C_{O α}), 177.53 (CH₂C_{O β});

IR (ATR) ν/cm^{-1} : 3440.60, 2914.10, 2848.61, 1727.46, 1037.14.

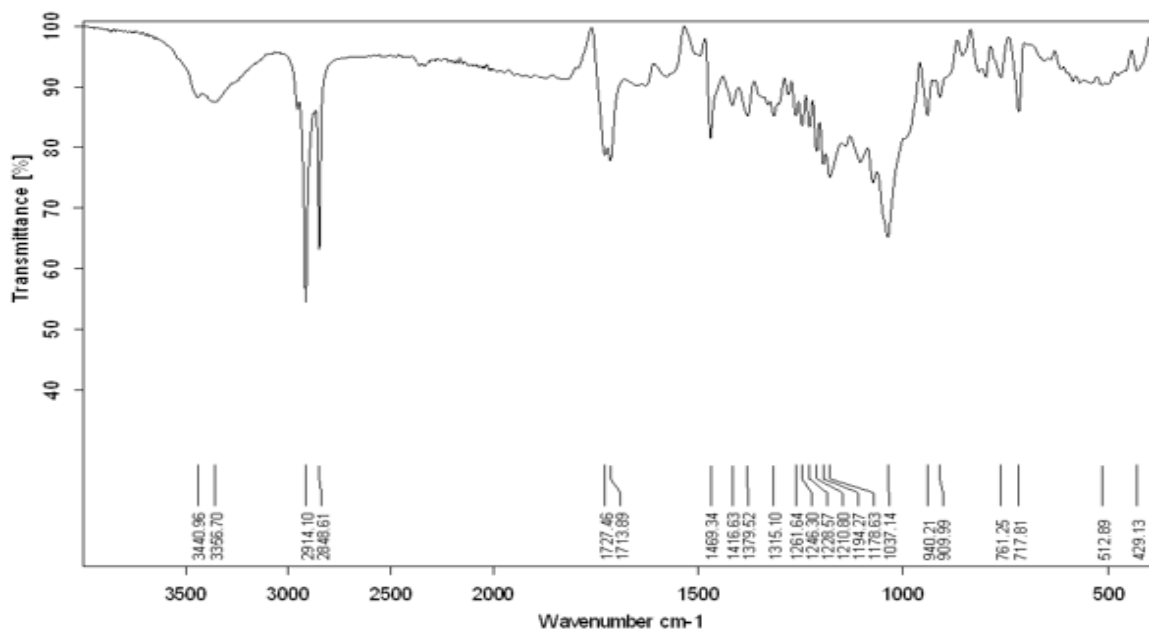


Figure 74. Spectre ATR-FTIR de composé **5**

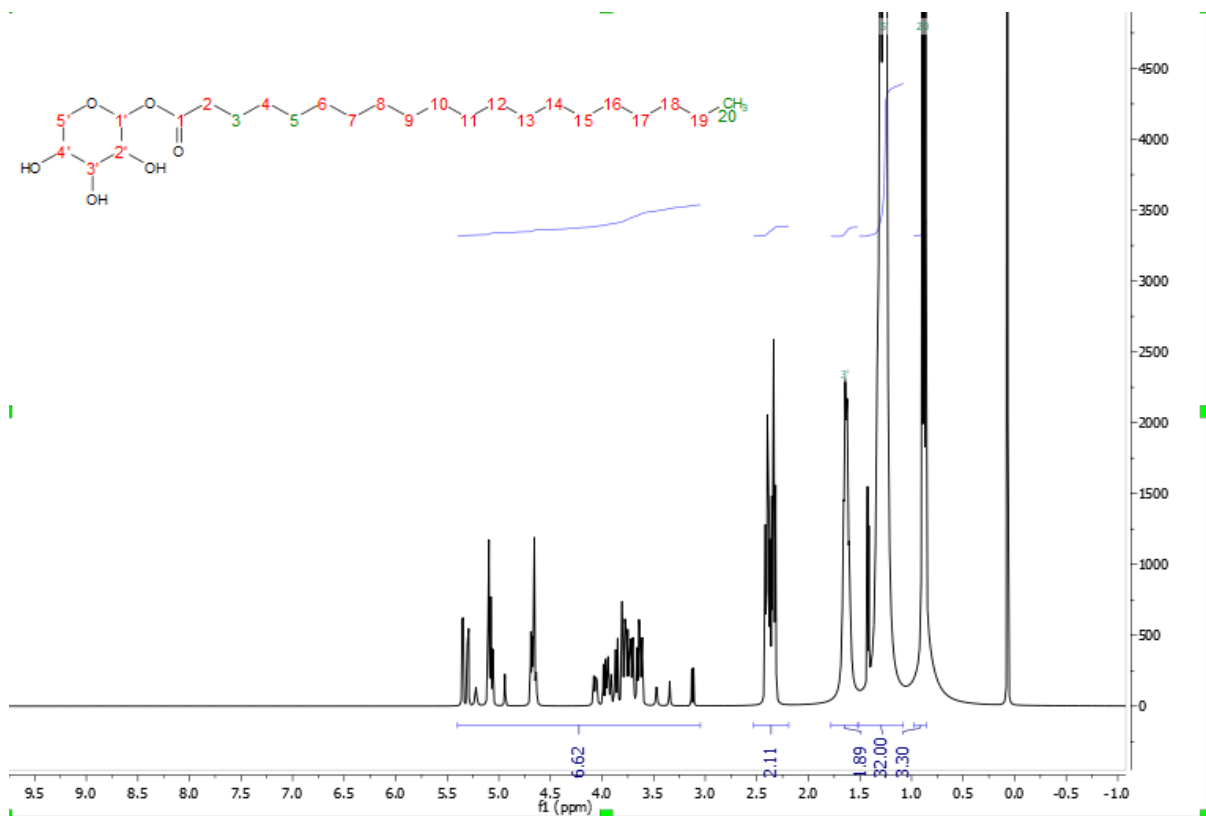


Figure 75. Spectre RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) de composé **5**

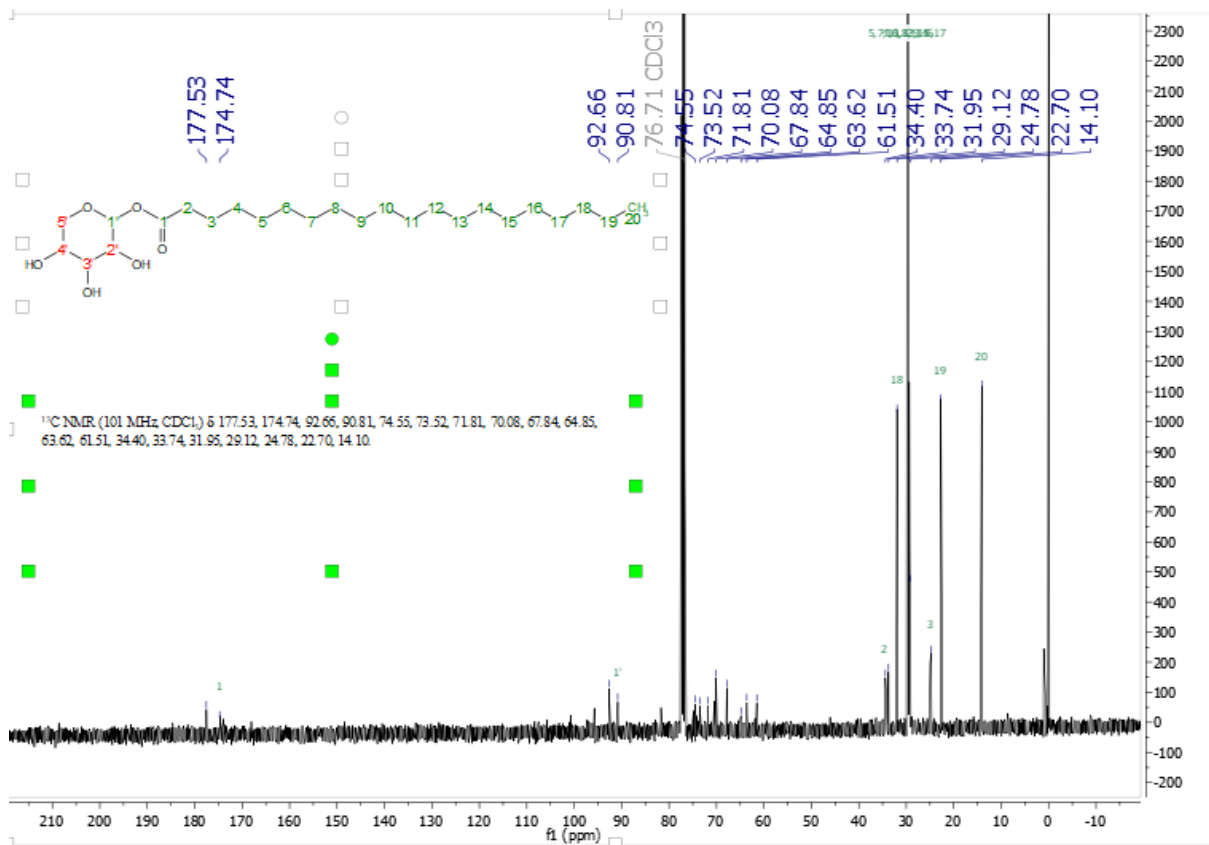
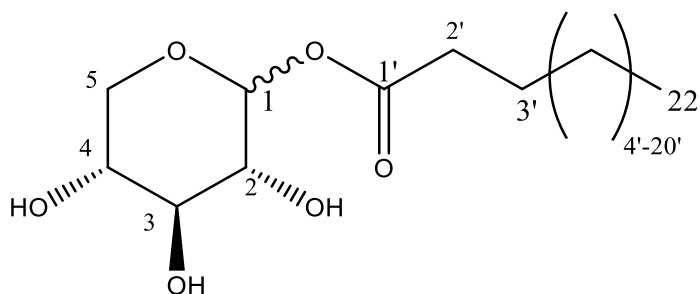


Figure 76. Spectre RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de composé **5**

Composé **6** : 1-*O*-docosanoyl- α,β -D-xylopyranose (Béhénate du xylose)



Formule brute : $C_{27}H_{52}O_6$.

Masse molaire : 472.71g/mol.

Aspect : une poudre blanche

Rf : 0.23 ($CHCl_3/MeOH$, 9,5/0,5).

Rdt: 68,07%

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.88 (t, J 6.7 Hz, 6H, $H_{22\alpha}$ and $H_{22\beta}$), 1.45–1.15 (m, 72H, $H_{4'\alpha}$, β - $21'\alpha,\beta$), 1.76–1.52 (m, 4H, $H_{3'\alpha,\beta}$), 2.50–2.26 (m, 4H, $H_{2'\alpha,\beta}$), 5.64–2.94 (m, 18H, α,β -xylose) ppm. **RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 14.06 ($C_{22'}$), 17.48 ($C_{21'}$), 22.66 ($C_{21'}$), 24.89 ($C_{3'}$), 29.10–31.91 ($C_{4'}-C_{20'}$), 34.28 ($C_{2'}$), 65.75 ($C_{5\alpha}$), 68.79 ($C_{5\beta}$), 70.06 ($C_{4\alpha}$), 72.65 ($C_{4\beta}$), 74.31 ($C_{3\alpha}$), 75.26 ($C_{3\beta}$), 92.34 ($C_{2\alpha}$), 93.91 ($C_{2\beta}$), 94.04 ($C_{1\alpha}$), 94.15 ($C_{1\beta}$), 174.92 (CH_2CO α), 175.06 (CH_2CO β). **IR (ATR)** ν/cm^{-1} 3359.59, 2912.96, 2848.40, 1734.88, 1038.74.

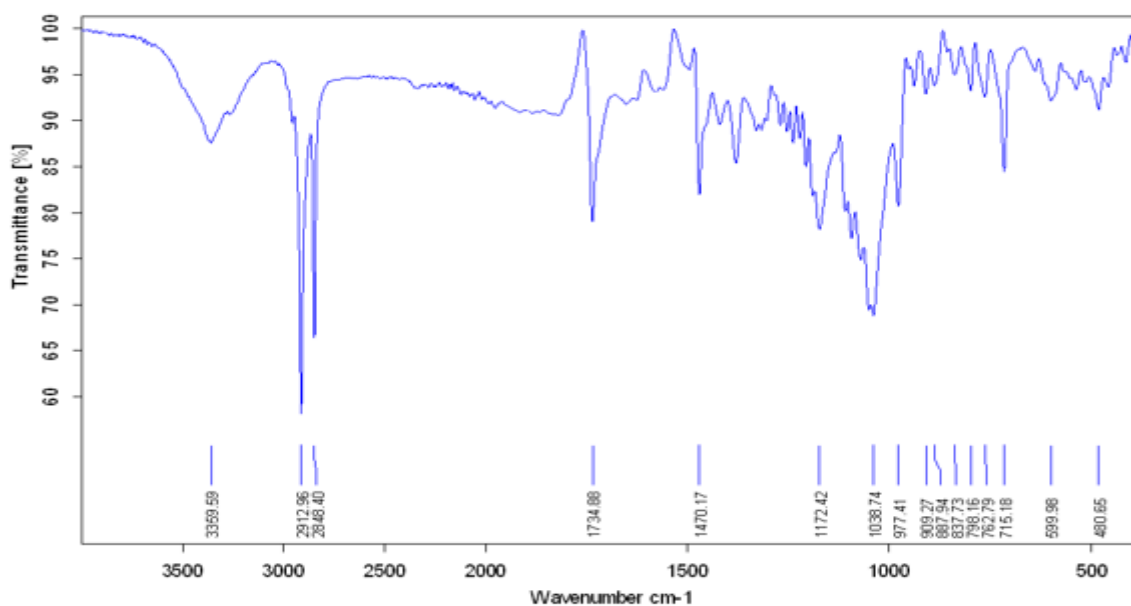


Figure 77. Spectre ATR-FTIR de composé **6**

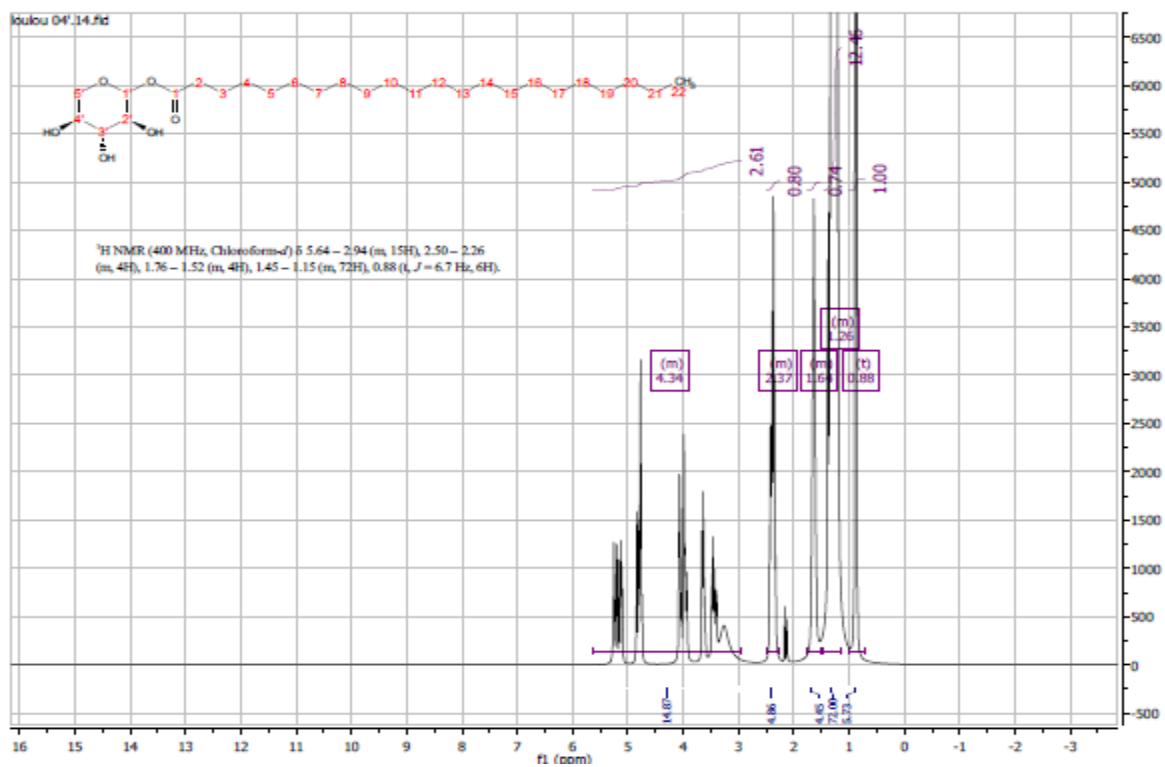


Figure 78. Spectre RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) de composé **6**

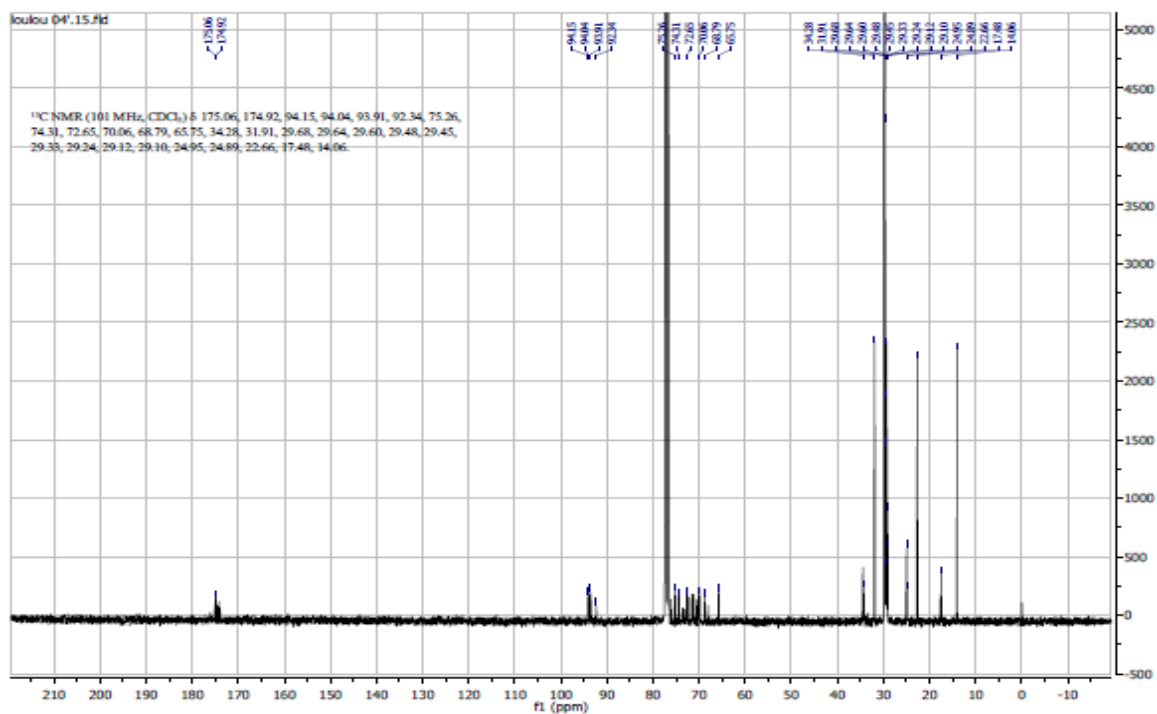


Figure 79. Spectre RMN¹³C (101 MHz, CDCl₃) de composé **6**

IX. Protocole général d'acétylation

Les glycosides synthétisés à partir de l'acide laurique (C12) et l'acide stéarique (C18) ont été acétylés avec de l'anhydride acétique (12éq) et de l'acétate de sodium (6éq) pendant 2H à 50°C sous agitation. La réaction a été suivie par CMC. La brute réactionnelle est reprise dans l'éther (50ml), lavé plusieurs fois avec d'une solution de Na₂CO₃ puis avec de l'eau jusqu'à pH 7.

La phase organique est isolée par décantation, séchée sur MgSO₄ filtrée et concentrée sous pression réduite. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (éluant EP/AcOEt 8.5 :1.5)

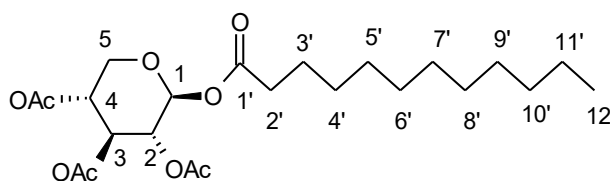
En suivant protocole général décrit ci-dessous, le dodécanoyl- α , β -D-Xylopyranoside (1.974g de 0.006mol) a été dissous dans l'anhydride acétique (12 éq) et AcONa (2.88g, 6éq). Le mélange est agité à 50°C durant 2H. Après traitement et purification deux anomères acétylés sont obtenus.

X. Protocole général de désacétylation

La déprotection de chaque composé est effectuée par le méthanolate de sodium (6 éq) dans un mélange dichlorométhane/méthanol (1/1). L'évolution de la réaction est suivie par CCM et à la fin de la réaction, la résine échangeuse de cations est additionnée afin de neutraliser le méthylate de sodium. Le milieu réactionnel est ensuite filtré et le solvant évaporé.

1. Caractérisation des produits acétylés

Composé **1 β '** : 1-O-Dodécanoyl (2', 3', 4' -tri-O-acétyl)- β -D-Xylopyranoside.



1 β '

Formule brute : C₂₃H₃₈O₉

Masse molaire : 458,25g/mol

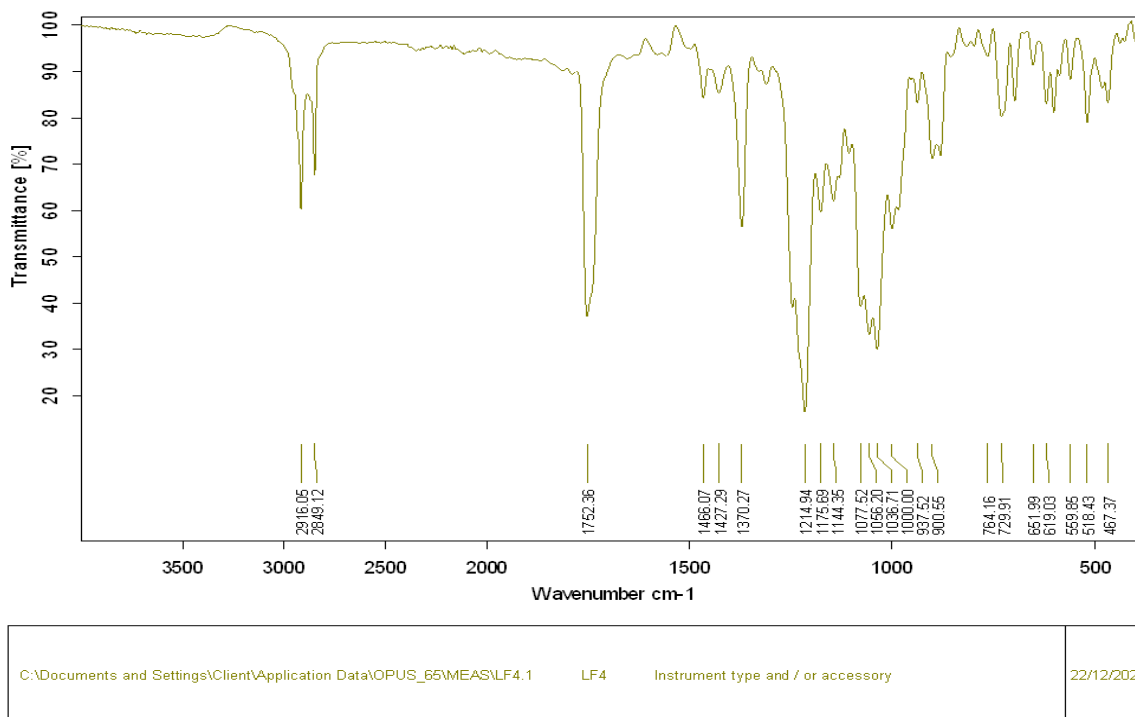
Rf : 0.25 (EP/AcOEt ,8.5/1.5)

Rendement : 50.46%

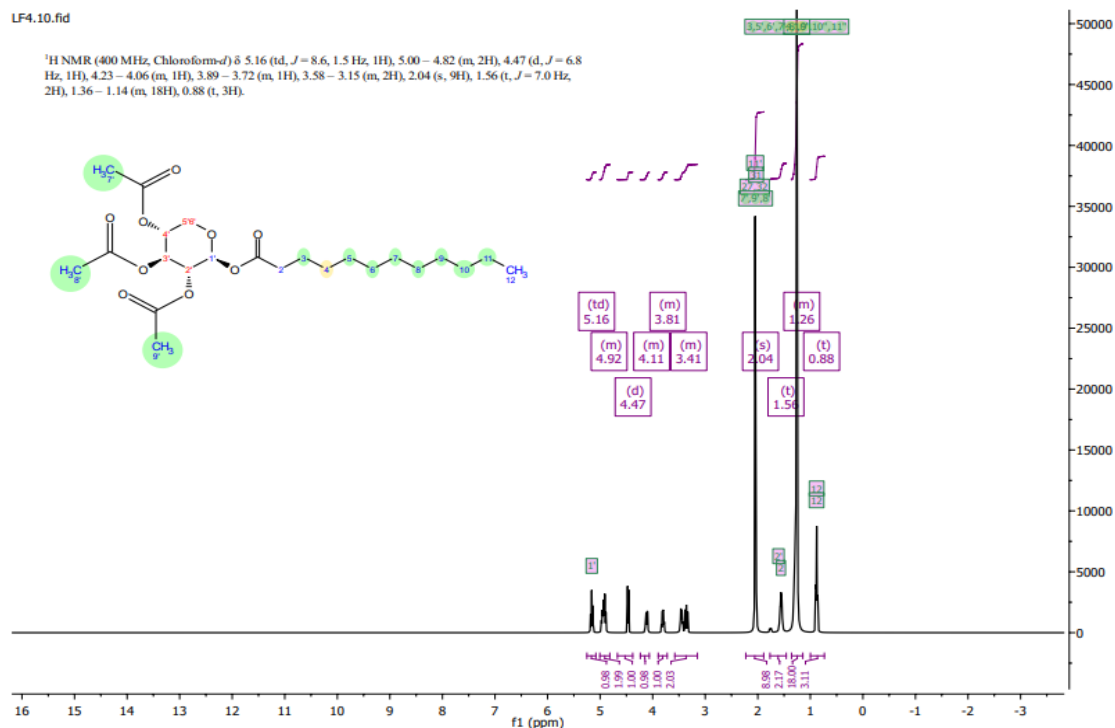
Aspect : une poudre blanche

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) : **5.16** (d, $J = 5.05$ Hz, 1H, **H_{1 β '}**), 5.00 – 4.82 (m, 2H), 4.47 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.23 – 4.06 (m, 1H), 3.89 – 3.72 (m, 1H), 3.58 – 3.15 (m, 2H), **2.04** (s, 9H), 1.56 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.36 – 1.14 (m, 18H), 0.88 (t, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz,**

CDCl_3): 169.72 ($\text{CH}_3\text{CO}/\text{CO}$), 100.66 (C_1), 71.55 (C_2), 70.90 (C_3), 68.97 (C_4), 61.99 (C_5), 31.86 (C_2'), 29.60 (C_3' , C_4' , C_5' , C_6' , C_7' , C_8' , C_9'), 25.86 (C_{10}'), 22.62 (C_{11}'), 20.62 ($3\text{CH}_3\text{CO}$), 14.03 (C_{12}'). **IR (ATR)** : 2849.12, 2916.05, 1752.36, 1466.07, 1214.94, 1370.27.



Seite 1 von 1

Figure 80. Spectre ATR-FTIR de composé $1\beta'$ Figure 81. Spectre RMN^1H (400 MHz, CDCl_3) de composé $1\beta'$

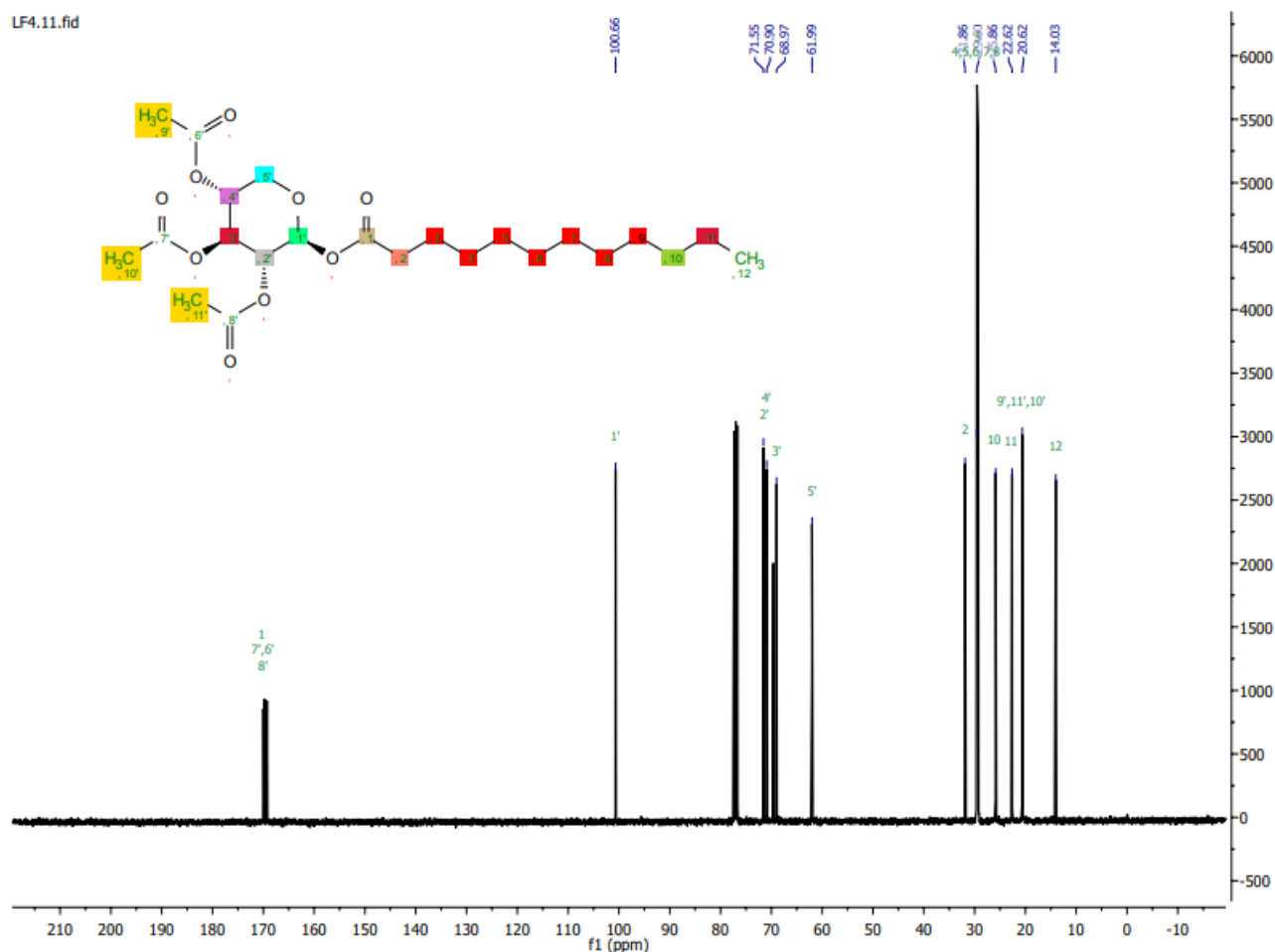
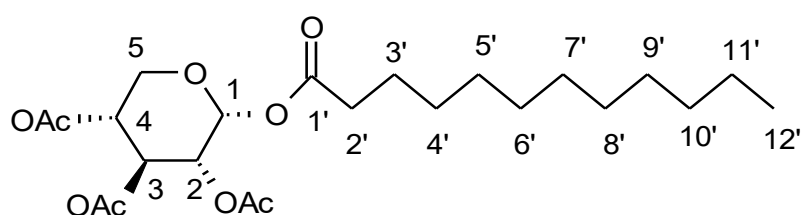


Figure 82. Spectre RMN¹³C (101 MHz, CDCl₃) de composé **1β'**

Composé **1-α'** : 1-*O*-Dodécanoyl (2', 3', 4' -tri-*O*-acétyl)-α -D-Xylopyranoside.



Formule brute : C₂₃H₃₈O₉

Masse molaire : 458,25g/mol

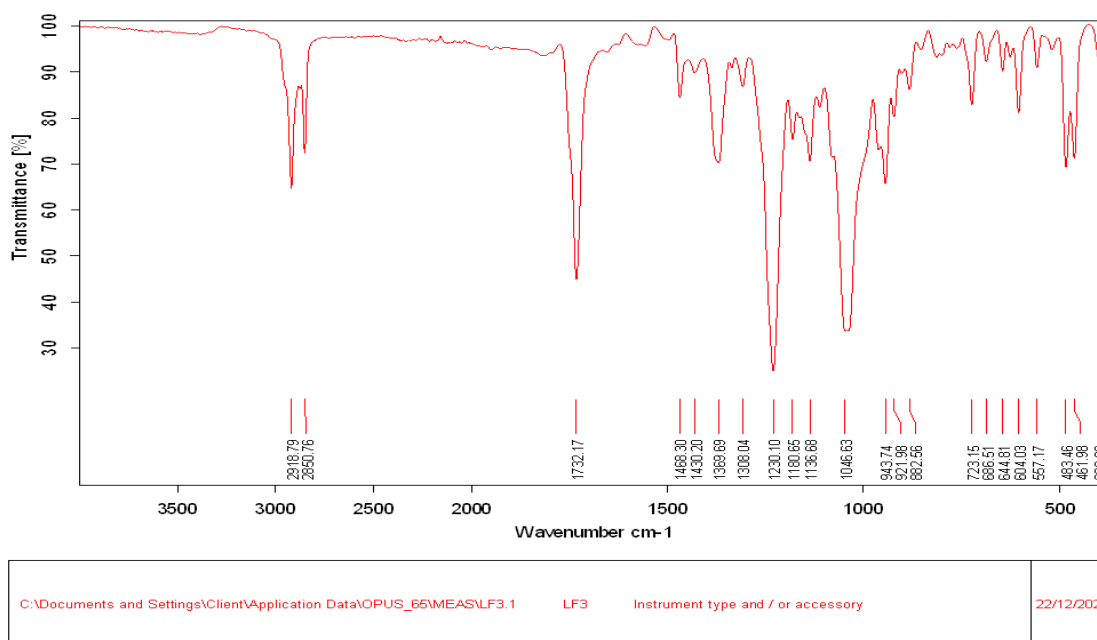
Rf : 0.35 (EP/AcOEt ,8.5/1.5)

Rendement : 49.53%

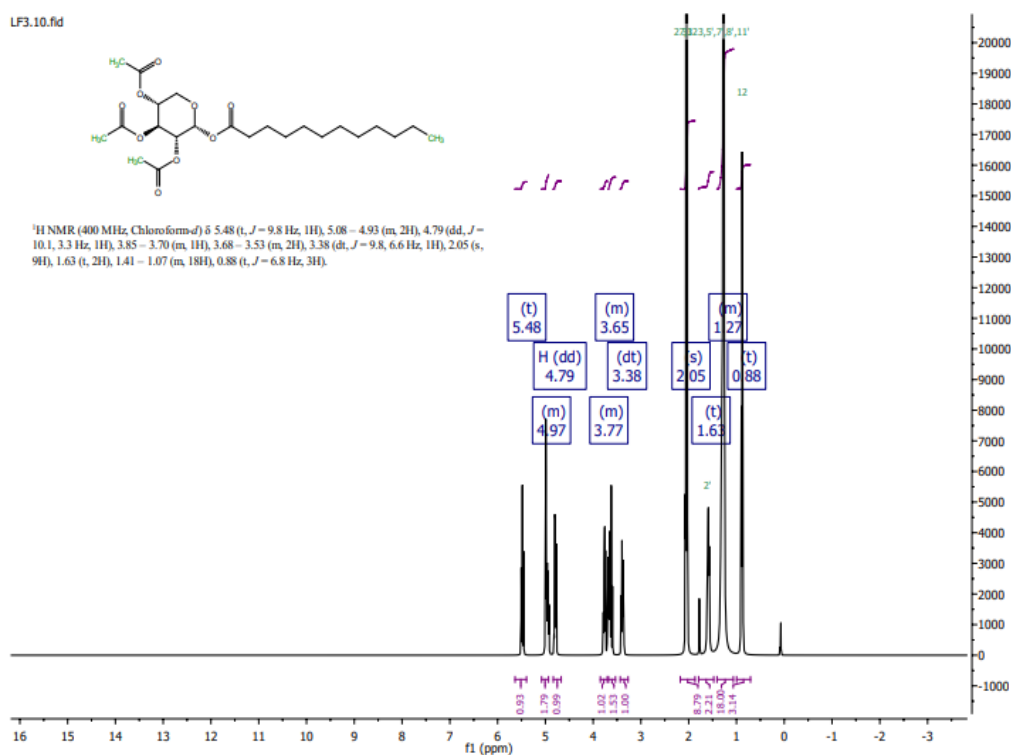
Aspect : Pâte blanche

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) : 5.48 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H_{1α'}), 5.08 – 4.93 (m, 2H), 4.79 (dd, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.85 – 3.70 (m, 1H), 3.68 – 3.53 (m, 2H), 3.38 (d, *J* = 9.8, 6.6 Hz, 1H), 2.05 (s, 9H), 1.63 (t, 2H), 1.41 – 1.07 (m, 18H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).. RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): 170.09 (CH₃C=O/C=O), 95.80(C₁), 71.37(C₂), 69.93(C₃), 68.68(C₄), 58.39(C₅),

32.02(C₂'), 29.73(C₃', C₄', C₅', C₆', C₇', C₈', C₉'), 26.15(C₁₀'), 22.78(C₁₁'), 20.78(3C_{CH₃CO}), 14.18 (C₁₂'). **IR (ATR)**, v/cm⁻¹ : 2850.76, 2918.79, 1732.17, 1468.30, 1230.10, 1369.69.



Seite 1 von 1

Figure 83. Spectre ATR-FTIR de composé **1a'**Figure 84. Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de composé **1a'**

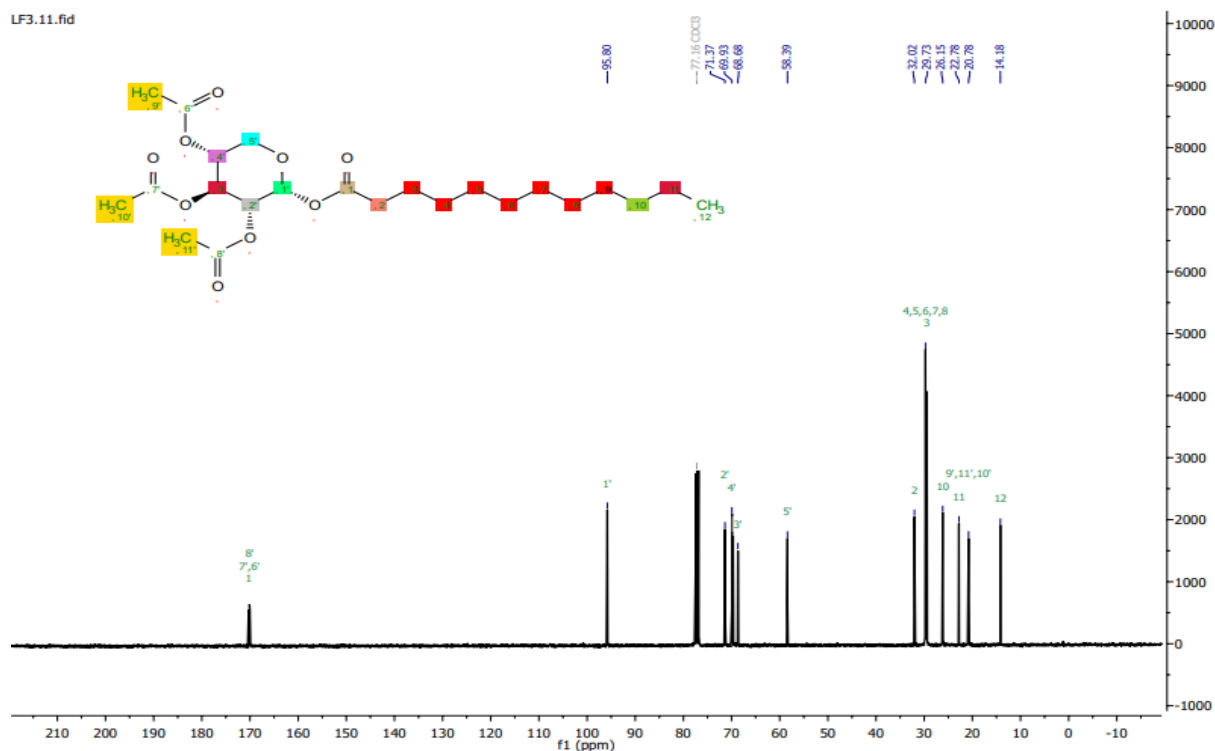
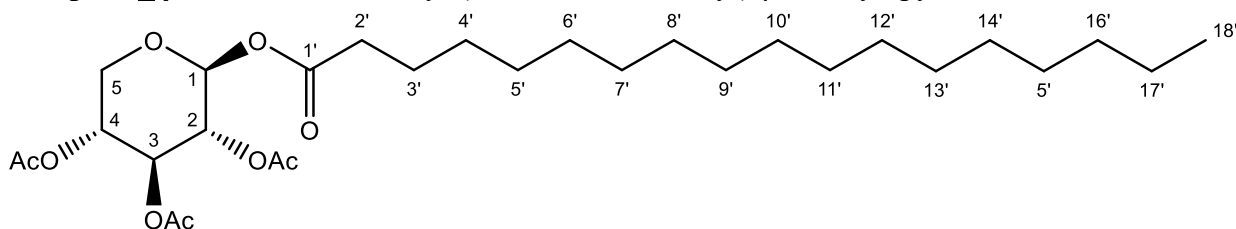


Figure 85. Spectre RMN¹³C (101 MHz, CDCl₃) de composé **1a'**

Composé 4 β' : 1-*O*-Octadécanyol (2', 3', 4' -tri-*O*-acétyl)-β-D-Xylopyranoside



Formule brute : C₂₉H₃₈O₉

Masse molaire : 542.71 g/mol

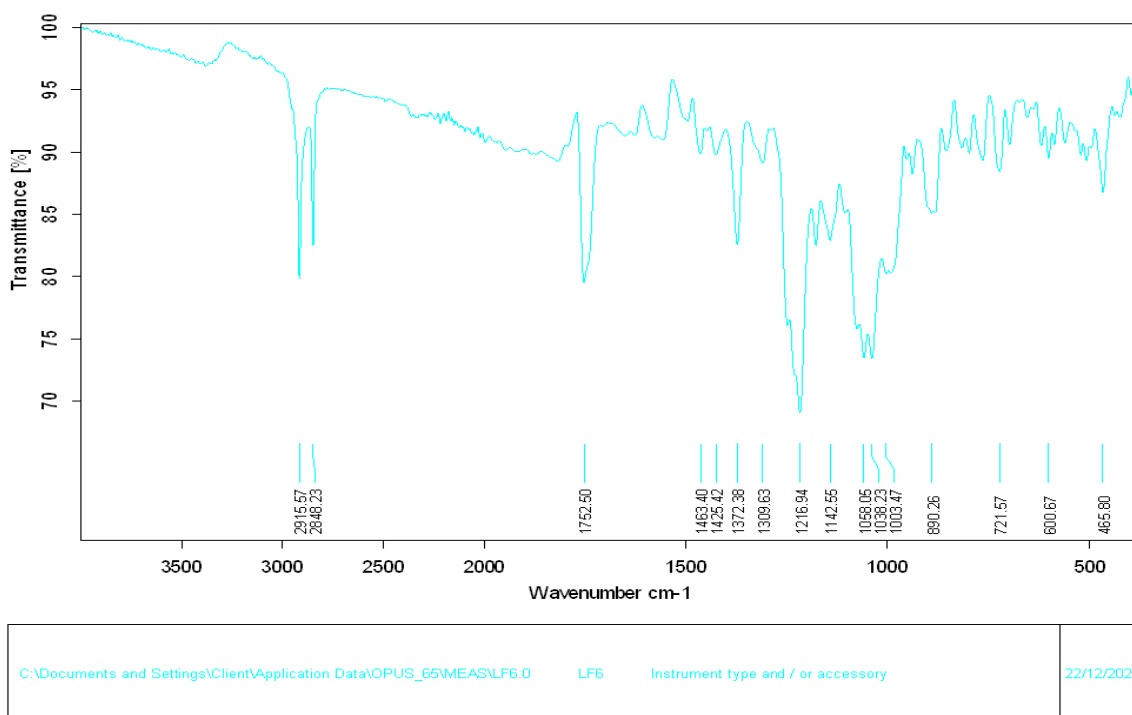
Rf : 0.30 (EP/AcOEt, 8.5/1.5)

Rendement : 67.29%

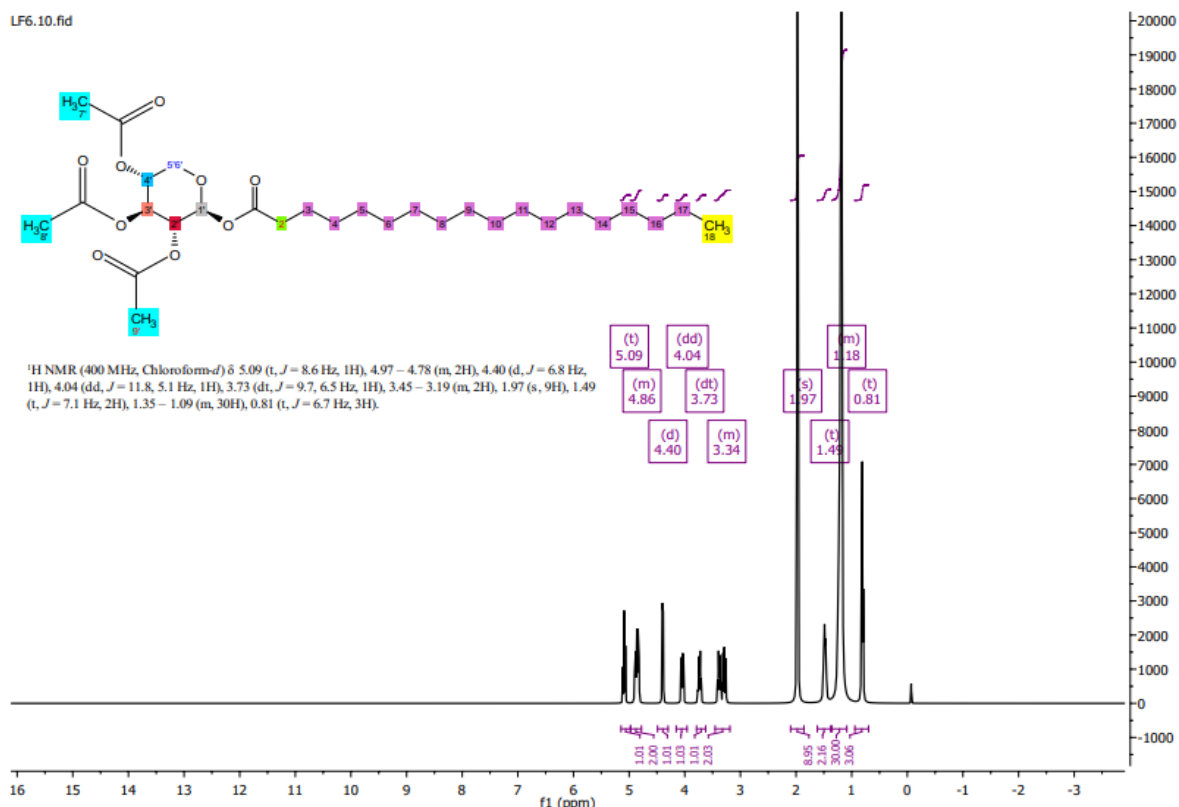
Aspect : poudre blanche

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) : **5.09** (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, **H_{1β'}**), 4.97 – 4.78 (m, 2H), 4.40 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 8.45 Hz, 1H), 3.73 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 3.45 – 3.19 (m, 2H), **1.97** (s, **9H**), 1.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.35 – 1.09 (m, 30H), 0.81 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). **RMN¹³C** : (101 MHz, CDCl₃) : 170.01 (CH₃C=O/C=O), 100.67 (C₁), 71.56 (C₂), 69.63 (C₃), 68.98 (C₄), 62.00 (C₅), 31.89 (C_{2'}), 29.66 (C_{3'}, C_{4'}, C_{5'}, C_{6'}, C_{7'}, C_{8'}, C_{9'}, C_{10'}, C_{11'}, C_{12'}, C_{13'}, C_{14'}, C_{15'}), 25.87 (C_{16'}),

22.64 (C_{17'}), 20.66 (3C_HCO), 14.04 (C_{18'}). IR (ATR), v/cm⁻¹: 2915.57, 2848.23, 1752.50, 1216.94, 1309.63.



Seite 1 von 1

Figure 86. Spectre ATR-FTIR de composé **4β'**Figure 87. Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de composé **4β'**

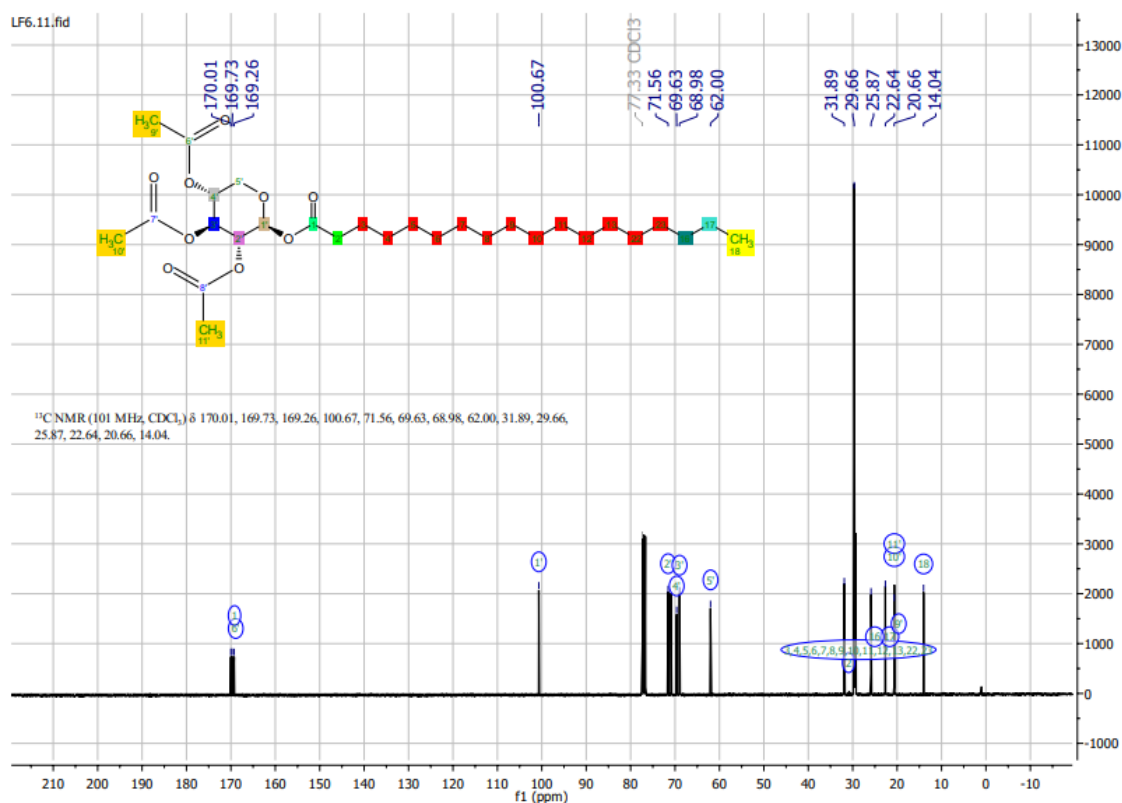
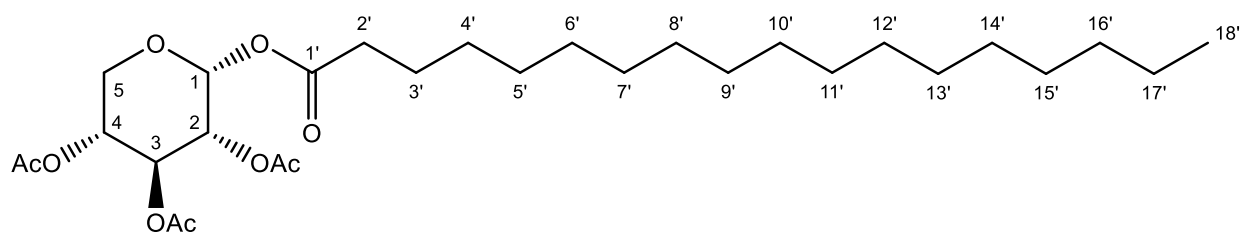


Figure 88. Spectre RMN¹³C (101 MHz, CDCl₃) de composé **4β'**

Composé **4 α'** : 1-*O*-Octadécanoyl (2',3',4' -tri-*O*-acétyl)-α-D-Xylopyranoside.



Formule brute : C₂₉H₃₈O₉

Masse molaire : 542.71 g/mol

Rf : 0.35 (EP/AcOEt, 8.5/1.5)

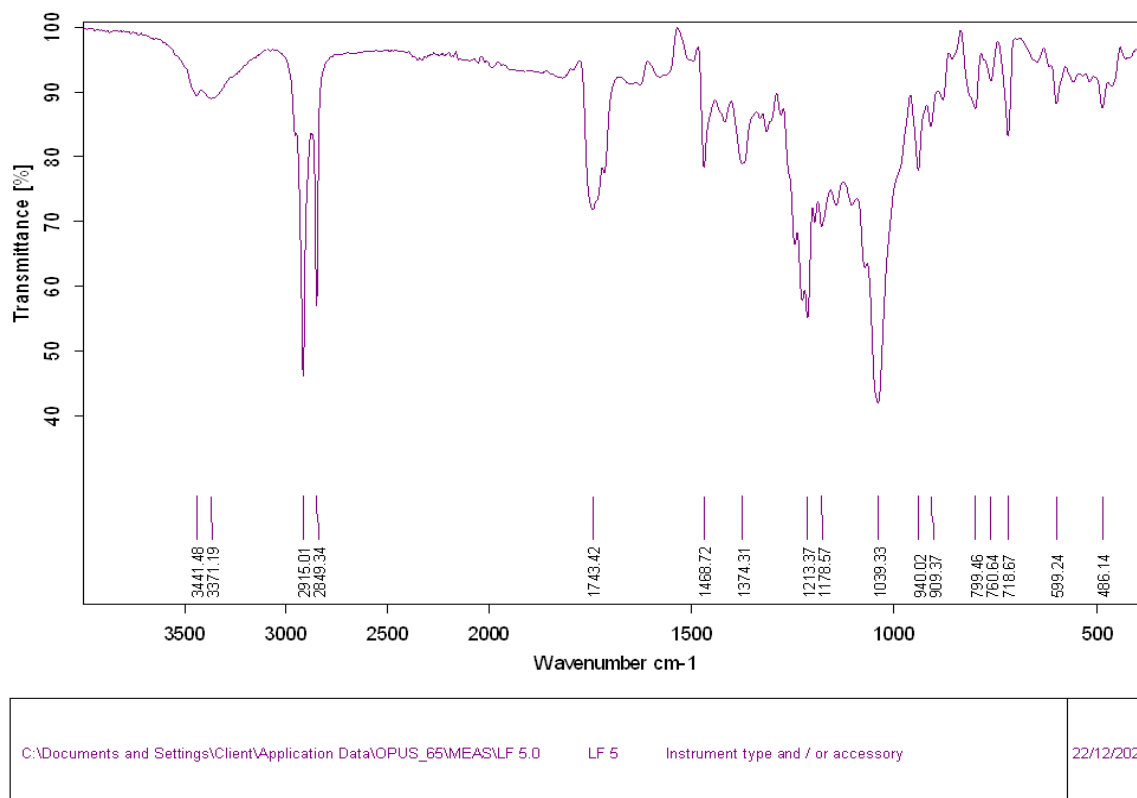
Rendement : 53,40%

Aspect : poudre blanche

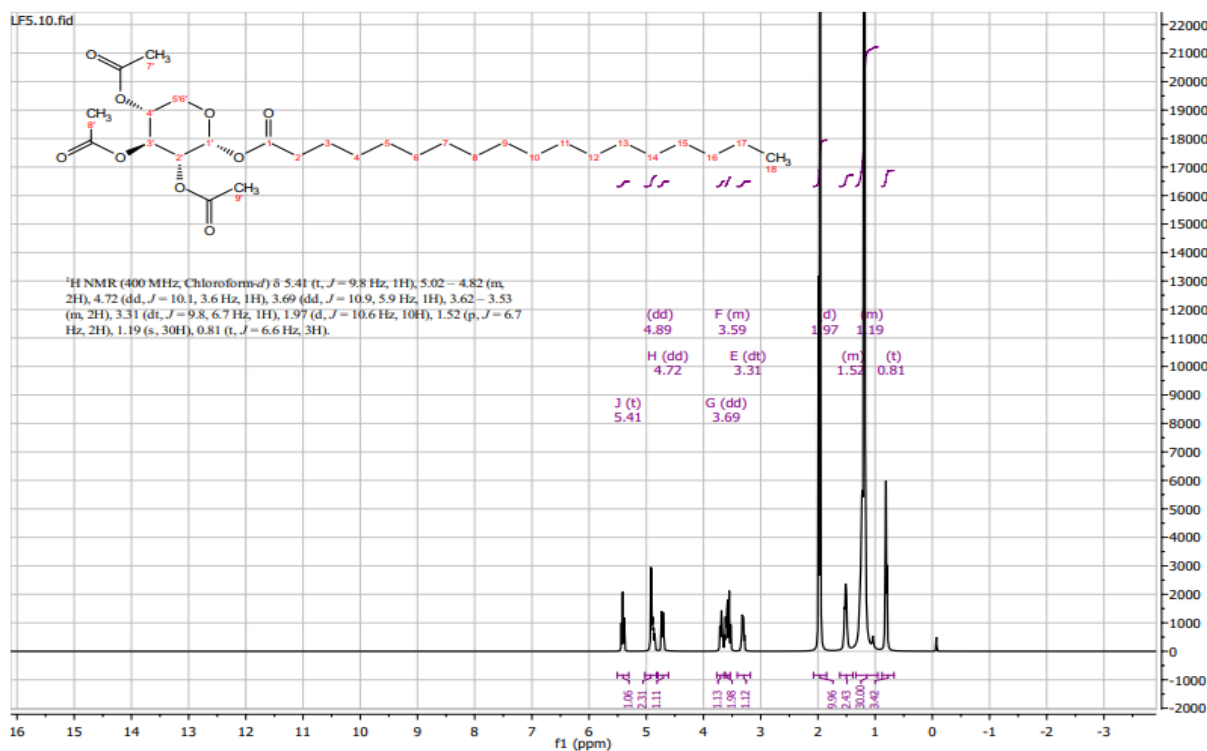
RMN¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) : **5.41** (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, **H**_{1α'}), 5.02 – 4.82 (m, 2H), 4.72 (dd, *J* = 10.1, 3.6 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.62 – 3.53 (m, 2H), 3.31 (dt, *J* = 8.25 Hz, 1H), **1.97** (s, *J* = 10.6 Hz, **9H**), 1.52 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.19 (s, 30H), 0.81 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H).

RMN¹³C (101 MHz, CDCl₃): 169.19, 168.91(CH₃C=O/C=O), 94.68(C₁), 70.25(C₂), 68.56(C₃), 67.57(C₄), 57.27(C₅), 30.92(C_{2'}), 28.69(C_{3'}, C_{4'}, C_{5'}, C_{6'}, C_{7'}, C_{8'}, C_{9'}, C_{10'}, C_{11'}, C_{12'}, C_{13'}, C_{14'}, C_{15'}), 25.04(C_{16'}), 21.67(C_{17'}), 19.64(3CH₃CO), 13.07(C_{18'}).

IR(ATR), v/cm⁻¹ : 1743.42, 1468.72, 1374.31, 2915.01, 2849.43, 1039.33



Seite 1 von 1

Figure 89. Spectre ATR-FTIR de composé **4 a'**Figure 90. Spectre RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) de composé **4 a'**

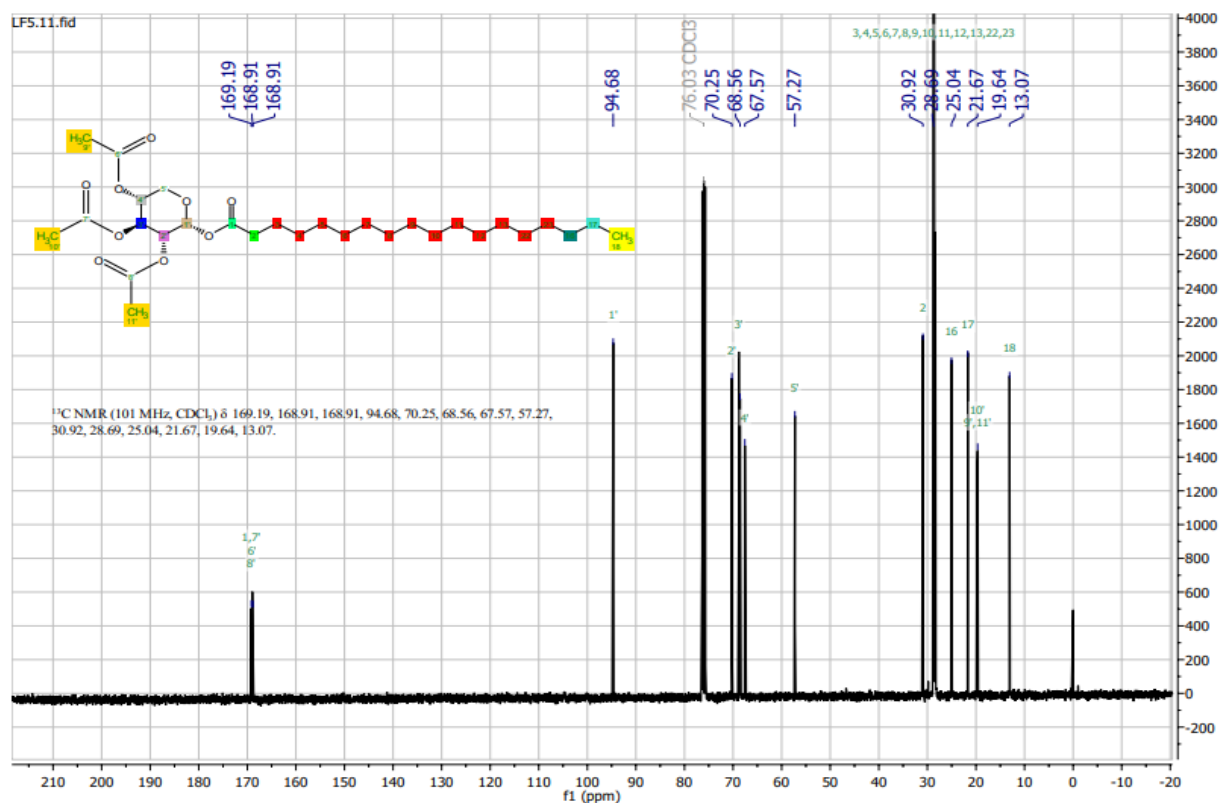
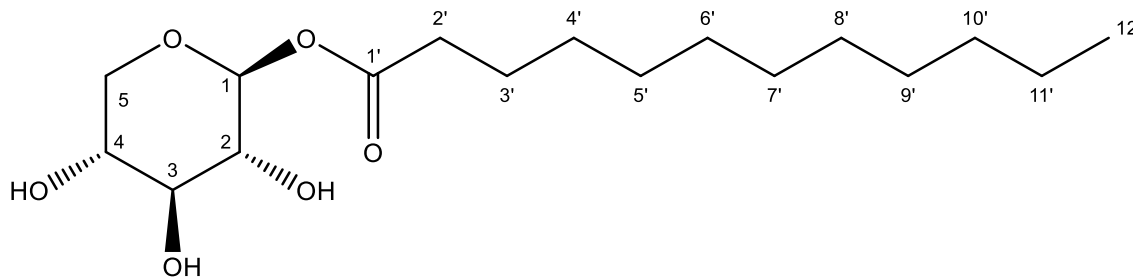


Figure 91. Spectre RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) of compound $4\alpha'$

2. Caractérisation des anomères purs

Composé 1β : 1-*O*-Dodécanoyl- β -D-Xylopynaoside



Formule brute : $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_6$

Masse molaire : 332.32

Rf : 0.35 (DCM/MeOH, 9 : 1)

Rendement : 92.48%.

Aspect : une poudre blanche

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm) : 4.83 (d, 1H, $\text{H}_{1\beta}$), 4.29 – 4.22 (m, 1H), 3.94 (dd, $J = 11.6, 4.9$ Hz, 1H), 3.87 – 3.76 (m, 1H), 3.70 – 3.59 (m, 1H), 3.51 (dd, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.49 – 3.43 (m, 1H), 3.35 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.24 (t, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.13 – 1.72 (m, 2H), 1.74 – 1.48 (m, 2H), 1.41 – 1.14 (m, 16H), 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H). **RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)**:

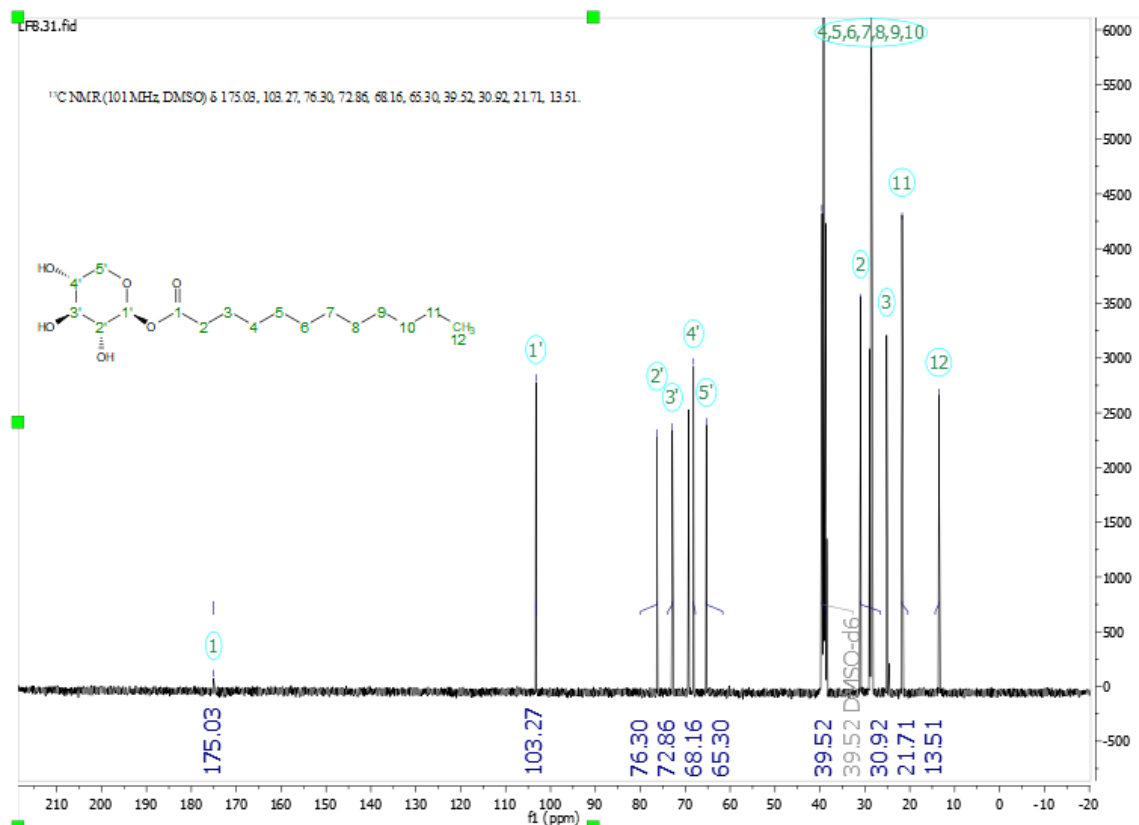
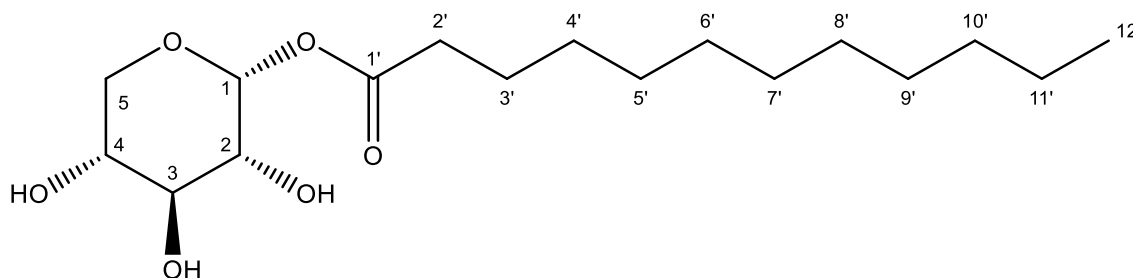


Figure 94. Spectre RMN ¹H (400 MHz, DMSO_{6d}) de composé **1β**

Composé 1α : 1-*O*-Dodécanoyl- α -D-Xylopynaoside



Formule brute : C₁₇H₃₂O₆

Masse molaire : 332.32

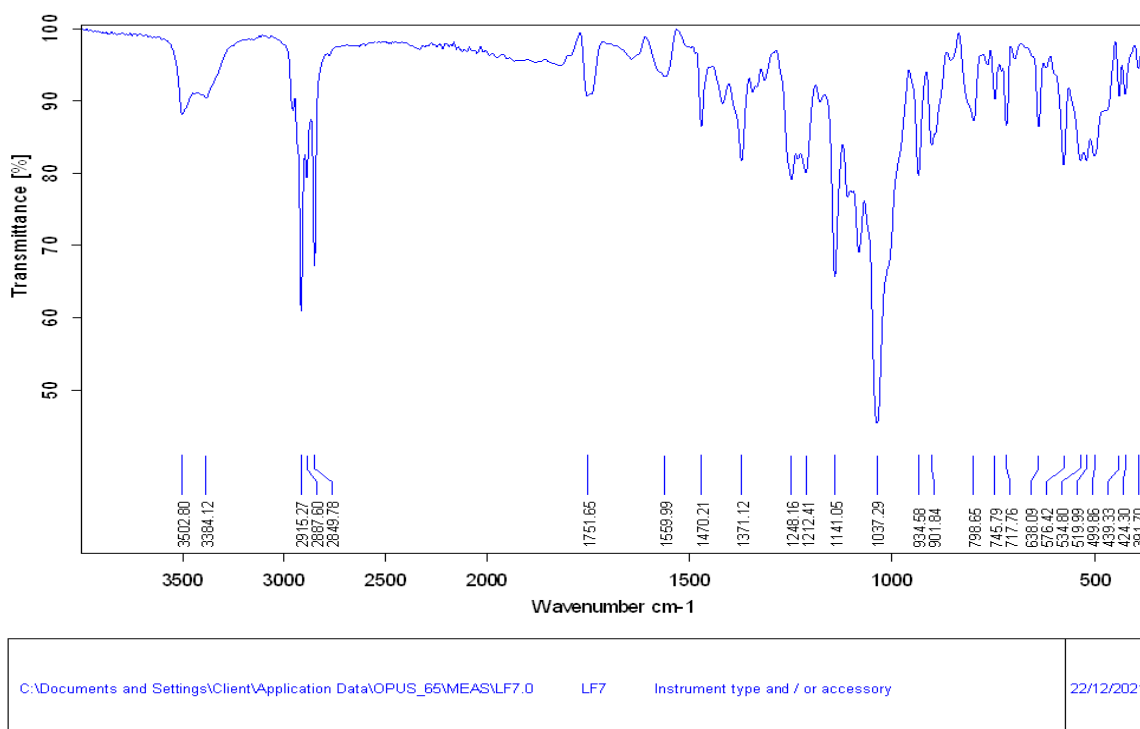
Rf : 0.55 (DCM/MeOH, 9 :1)

Rendement : 68.84 %.

Aspect : une poudre blanche

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) : 4.69 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H_{1a}), 3.61 – 3.58 (m, 1H), 3.58 – 3.55 (m, 1H), 3.54 – 3.50 (m, 1H), 3.42 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 3.40 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 3.38 – 3.30 (m, 1H), 1.99 – 1.82 (m, 0H), 1.63 – 1.46 (m, 2H), 1.29 – 1.09 (m, 17H), 0.81 (t, 3H). **RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃)** : 179.61(CO), 97.53 (C₁), 71.17 (C₂), 69.00 (C₃), 67.49 (C₄), 60.89

(C₅), 30.93 (C_{2'}), 28.70 (C_{4'}, C_{5'}, C_{6'}, C_{7'}, C_{8'}, C_{9'}), 25.08 (C_{10'}), 21.68 (C_{11'}), 13.07 (C_{12'}). **IR** (ATR), ν/cm^{-1} : 3502.80, 2915.25, 2849.78, 1751.61, 1037.29.



Seite 1 von 1

Figure 95. Spectre ATR-FTIR de composé **1a**

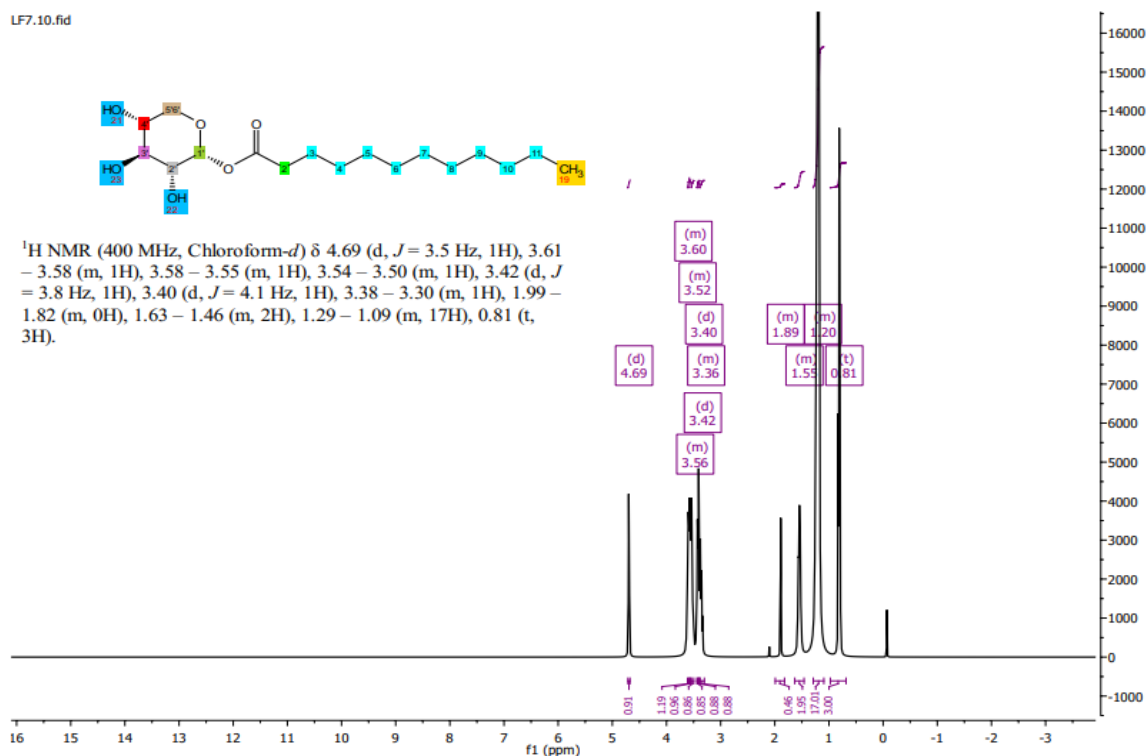


Figure 96. Spectre RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) de composé **1a**

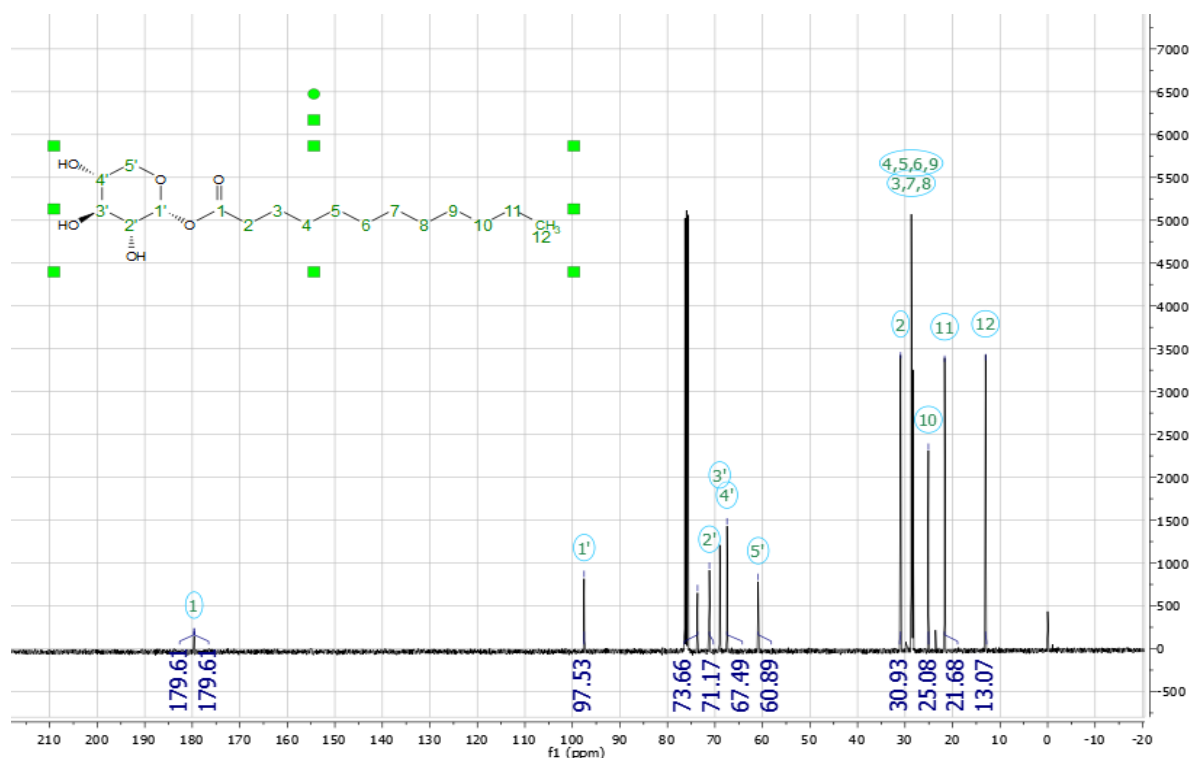
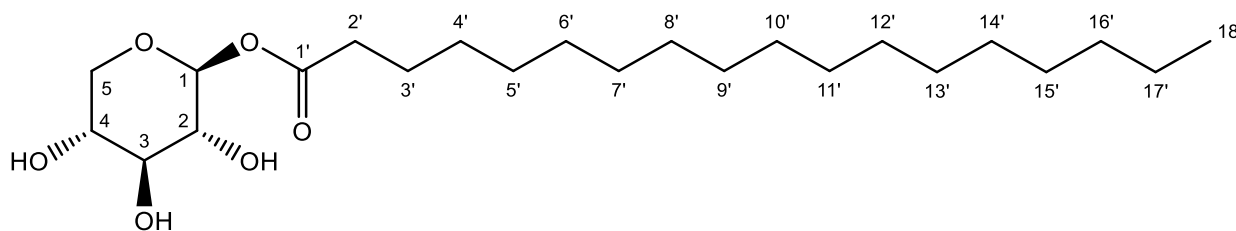


Figure 97. Spectre RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de composé **1a**

Composé 4 β : 1-*O*-Octadécanyol – β -D-Xylopynaoside



Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_6$

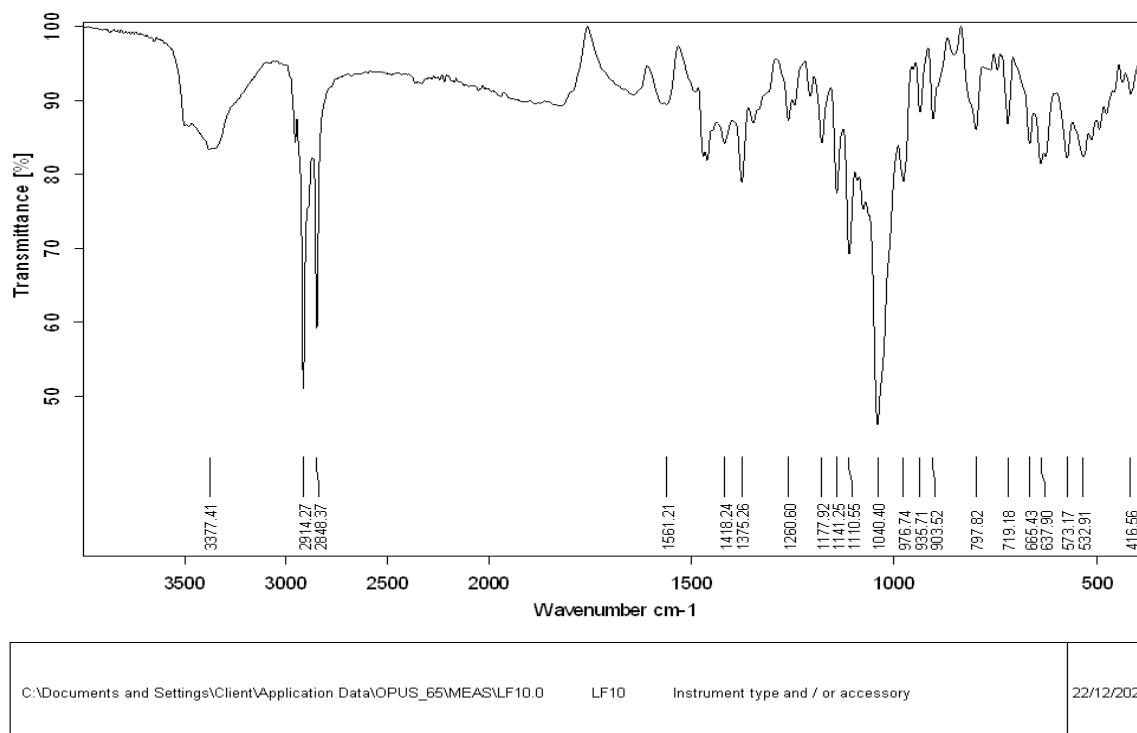
Masse molaire : 416.31

Rf : 0.57 (DCM/MeOH, 9 : 1)

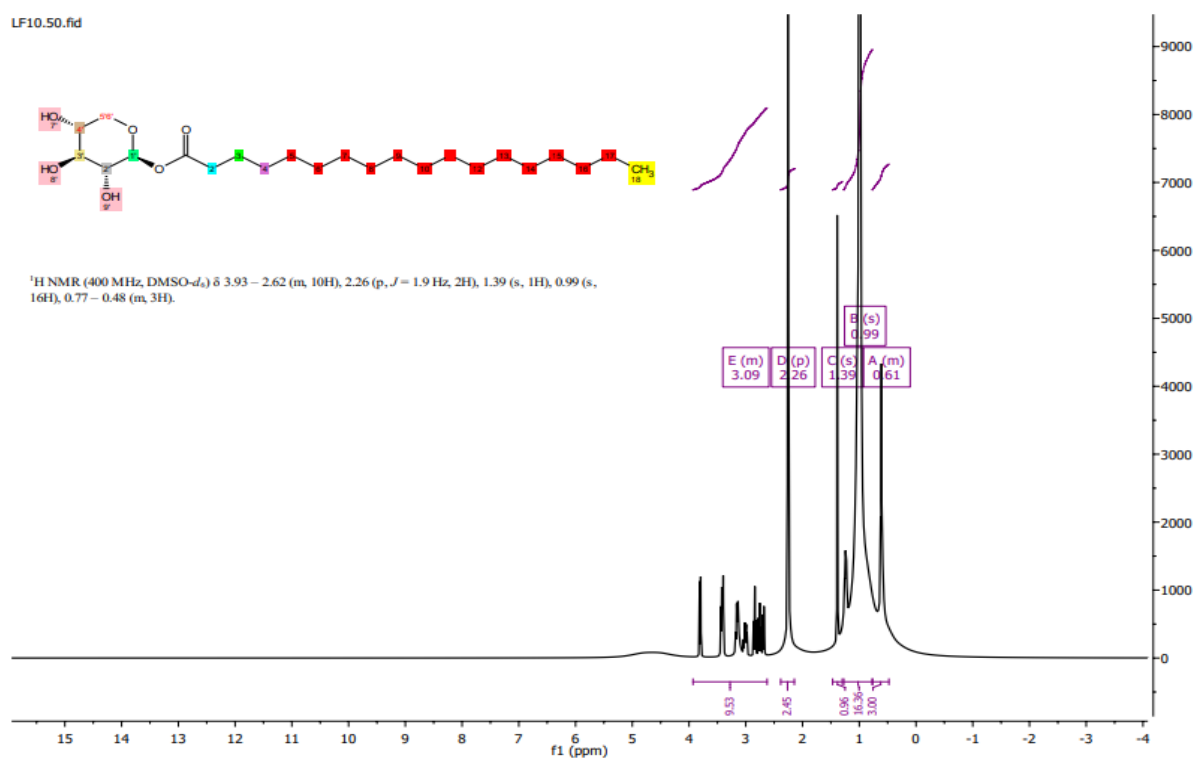
Rendement : 76.31. %

Aspect : une poudre blanche

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 3.93 – 2.62 (m, 9H, dont $\text{H}_{1\beta}$), 2.26 (p, $J = 1.9$ Hz, 2H), 1.39 (s, 2H), 0.99 (s, 28H), 0.77 – 0.48 (m, 3H). **RMN ^{13}C (101MHz, $\text{DMSO}-d_6$):** 174.76 (CO), 103.87 (C_1), 76.92 (C_2), 73.45 (C_3), 68.69 (C_4), 65.90 (C_5), 31.46 ($\text{C}_{2'}$), 29.19 ($\text{C}_4', \text{C}_5', \text{C}_6', \text{C}_7', \text{C}_8', \text{C}_9', \text{C}_{10}', \text{C}_{11}', \text{C}_{12}', \text{C}_{13}', \text{C}_{14}', \text{C}_{15}', \text{C}_{16}'$), 25.70 ($\text{C}_{3'}$), 22.25 (C_{17}'), 14.09 (C_{18}'). **IR (ATR), ν/cm^{-1} :** 3377.41, 2914.27, 2848.37, 1561.21, 1040.40.



Seite 1 von 1

Figure 98. Spectre ATR-FTIR de composé **4β**Figure 99. Spectre RMN¹H (400 MHz, DMSO_{6d}) de composé **4β**

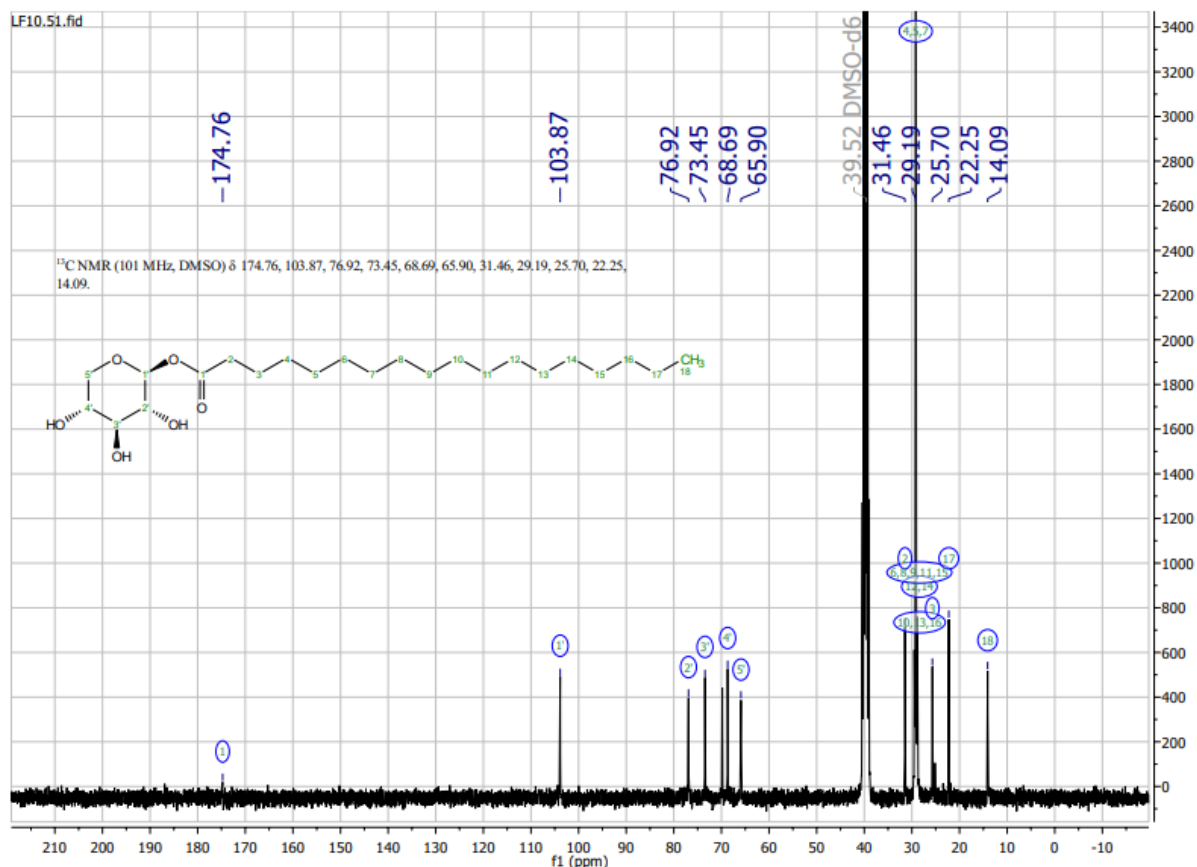
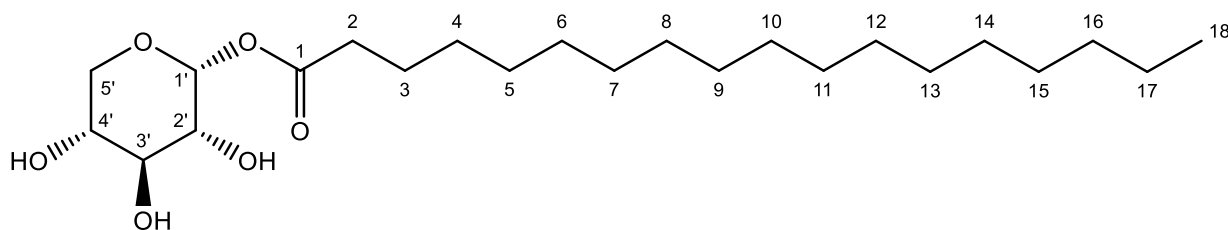


Figure 100. Spectre RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆) de composé **4β**

Composé **4a** : 1-O-Octadécanyol- α -D-Xylopyranose



Formule brute : C₂₃H₄₄O₆

Masse molaire : 416.31

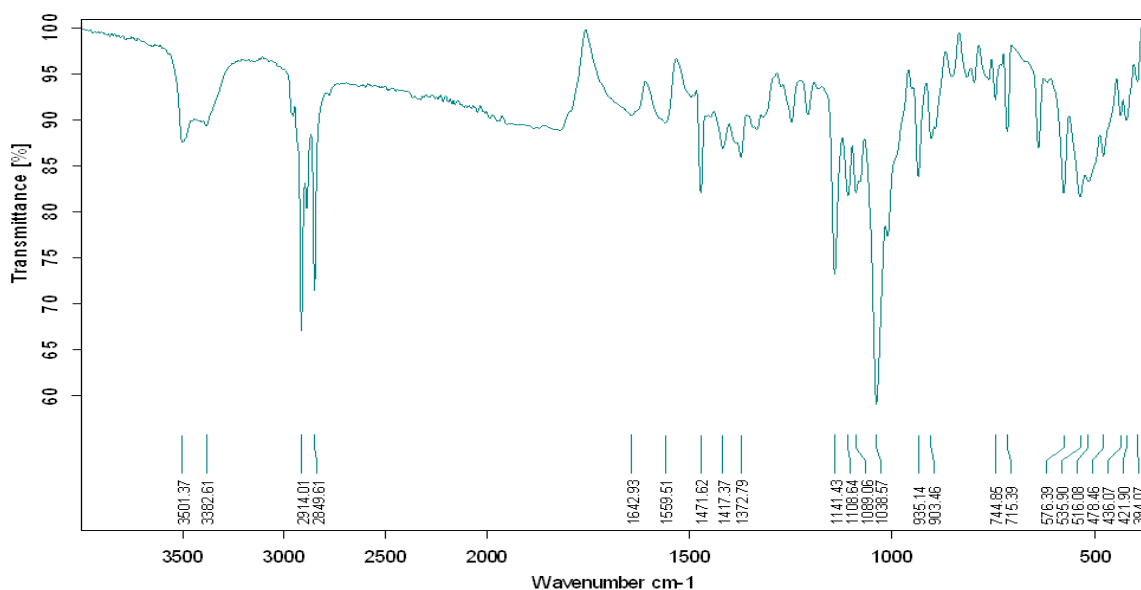
Rf : 0.65(DCM/MeOH, 9:1)

Rendement : 60 %

Aspect : une poudre blanche

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 4.55 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H_{1a}), 3.53 (dt, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.37 (q, *J* = 3.9 Hz, 1H), 3.34–3.32 (m, 1H), 3.31 – 3.28 (m, 5H), 3.26 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.66–1.55 (m, 2H), 1.54 – 1.46 (m, 2H), 1.39 – 1.10 (m, 26H), 0.85 (t, 3H).. **RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: 179.62(CH₃C=O), 97.47 (C_{1'}), 71.19 (C₂), 68.97 (C₃), 67.46 (C₄), 60.93 (C_{5'}),

30.93 (C_{2'}), 28.72 (C_{4'},C_{5'},C_{6'},C_{7'},C_{8'},C_{9'},C_{10'},C_{11'},C_{12'},C_{13'},C_{14'},C_{15'},C_{16'}), 25.09 (C_{3'}), 21.68 (C_{17'}), 13.07 (C_{18'}). IR (ATR), ν/cm^{-1} : 3501.31, 2914.01, 2849.61, 1642.93, 1038.57.



C:\Documents and Settings\Client\Application Data\OPUS_65\MEAS\LF9.2

LF9

Instrument type and / or accessory

22/12/2021

Seite 1 von 1

Figure 101. Spectre ATR-FTIR de composé **4a**

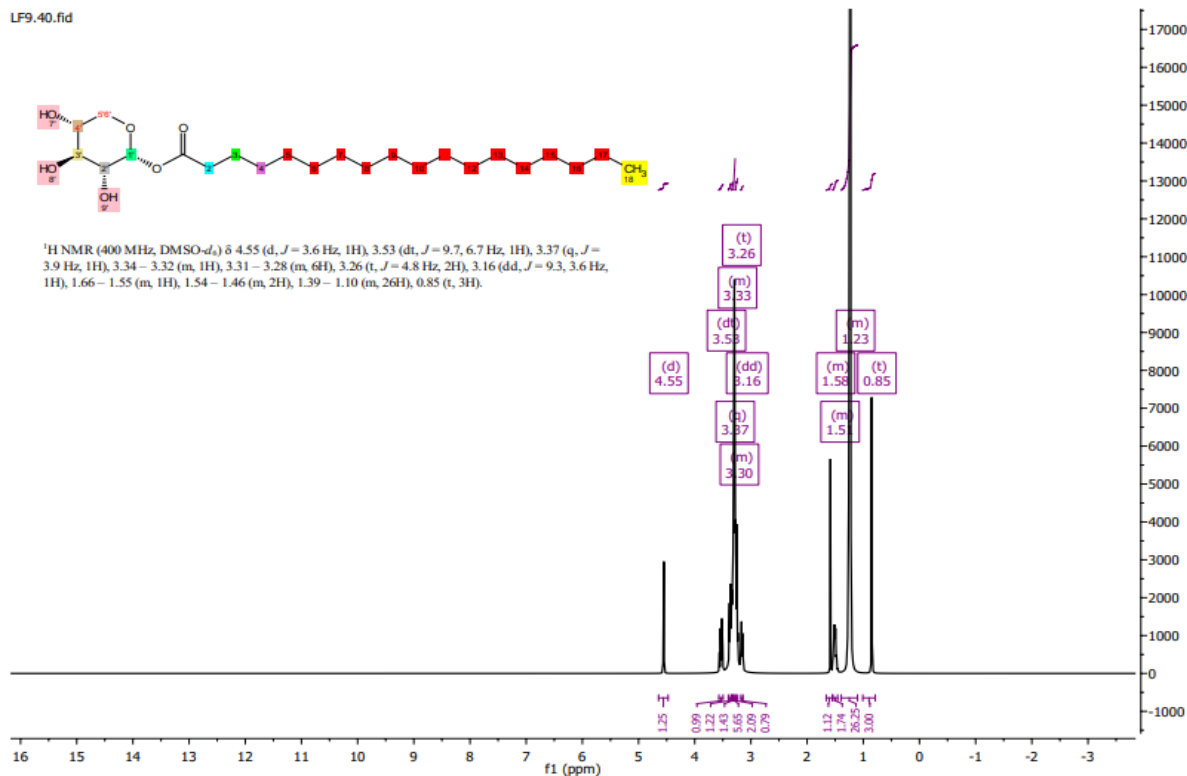


Figure 102. Spectre RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) de composé **4a**

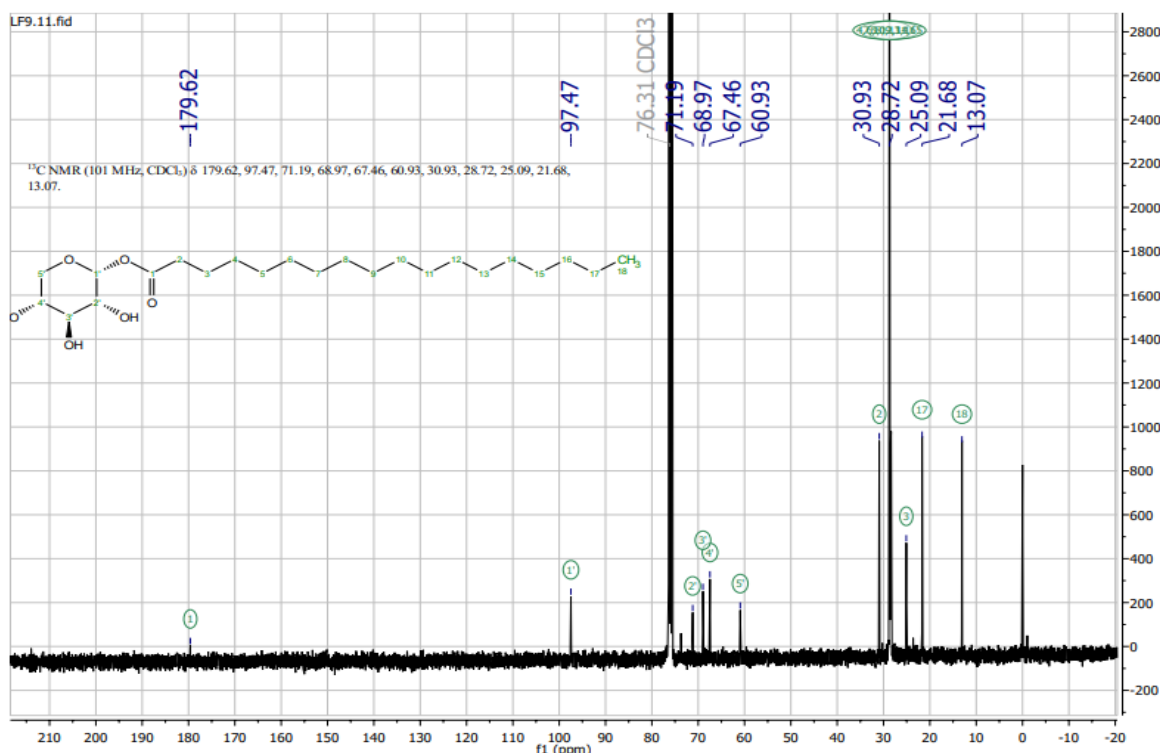
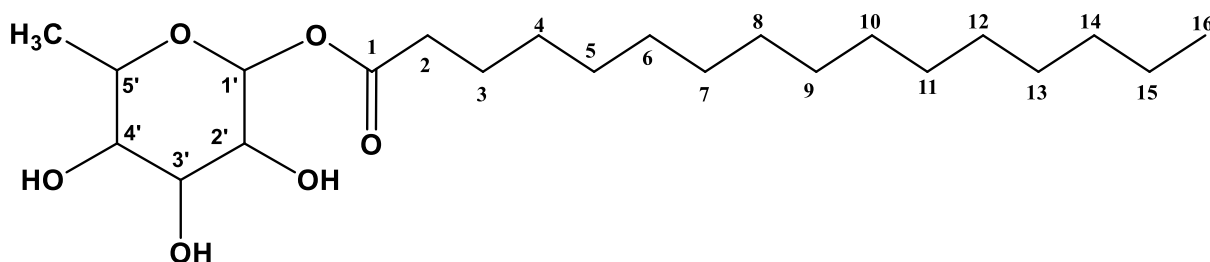


Figure 103 .Spectre RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de composé **4a**

XI. Estérification enzymatique du L-rhamnose

Le L-rhamnose (200 mg, 1.218 mmol) est dissous dans quelques ml de solvant et mis sous agitation. L'acide palmitique est alors additionné. On laisse sous agitation magnétique pendant 30 mn. L'enzyme est ensuite ajoutée ainsi que le tamis moléculaire (4 Å) en quantité équimolaire de la CAL B. Afin de contrôler la libération de l'eau dans le milieu, les tamis moléculaires sont activés pendant une nuit à 350°C et laissés dans un dessiccateur avant leur utilisation. Des échantillons sont prélevés afin d'évaluer l'avancement de la réaction. La conversion est évaluée par titrage colorimétrique

XII. Caractérisation du 1-O-hexadécanoyl-L-rhamnopyranose (composé **2**)



Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_6$.

Masse molaire : 402 g/mol.

Solide blanc.

RMN ^1H δ (ppm) : 0.9 (t, $-\text{CH}_3$, C_{16}), 0.9 (d, $-\text{CH}_3$), 1.3 ($-\text{CH}_2$, C_{4-15}), 1.7 (t, $-\text{CH}_2$, C_3), 2.4 (t, $-\text{CH}_2$, C_2), 3.3 (s, $-\text{OH}$, 3H), 3.9 (m, 4H, $\text{C}_{2'-5'}$), 5.1 (d, H, $\text{C}_{1'}$).

Les esters de sucres et d'acides gras sont des produits verts considérés comme une alternative durable respectueuse de l'environnement et qui sont très bien tolérés par la peau. Dans cette optique nous avons synthétisé une série homologue d'esters du xylose avec des longueurs de chaînes différentes (C12-C22) en une seule étape par estérification enzymatique.

Une étude préliminaire sur l'estérification enzymatique du D-xylose par l'acide palmitique d'abord réalisée en présence la lipase de *Candida antarctica* B, dans L'EMC à 60°C a permis de convertir 60% d'acide hexadécanoïque en ester du xylose. L'évaluation de l'activité enzymatique de la lipase montre une bonne performance de la CAL B après quatre cycles.

Nous avons évalué l'effet du rapport molaire entre les deux substrats, les résultats montrent que le rapport 1/2 donne les meilleures conversions pour tous les agents acylants au bout de 48 h. On remarque une augmentation du taux de conversion de l'acide palmitique (C14) après 72h.

La longueur de la chaîne a aussi un effet important sur l'estérification du xylose, l'activité de la lipase est plus grande avec la meilleure conversion (67,5 %) obtenue en présence de l'acide béhénique (C22). Plus la chaîne augmente plus la conversion augmente.

Cette voie de synthèse présente des avantages distincts, étant donné qu'elle est généralement plus verte et moins énergivore, mais la lipase de *Candida antarctica* est onéreuse. Dans le but de trouver une alternative moins chère, nous avons testés des enzymes modifiées dans notre laboratoire par deux méthodes d'immobilisation (l'enrobage et l'adsorption) pour les rendre plus résistantes dans les conditions opératoires (température et polarité de solvants). Nous avons évalué l'effet de la lipase *Pancréatique de porc* immobilisée sur célite, PPL Ic et la lipase de *Candida cylindracea* immobilisée sur célite, CCL Ic. Les mêmes enzyme PPL et CCL libres sont enrobées par le span 65. Une étude comparative de la réaction d'estérification du xylose par trois acide gras (C14, C16, C22) montre que la PPL Ic donne la meilleure conversion dans le cas de l'acide palmitique (38,03%) une valeur proche de celle obtenue par la lipase de *Candida antarctica* B (42,86). La PPL Ic a donné une conversion considérable de l'acide béhénique en ester (42,47%) par à rapport à l'enzyme commercialisée (67,5%). Dans le cas de l'acide myristique, c'est toujours la PPL Ic qui montre une certaine activité par rapport aux autres enzymes modifiées parce qu'elle reste active après 24 h.

Une étude des propriétés tensioactives des nouveaux biotensioactifs obtenus est par la suite réalisée. Les résultats obtenus et interprétés révèlent l'effet de la longueur de la chaîne sur la

tension de surface comprise entre 25 et 47,17 mN/m respectivement pour C12 et C22. La concentration micellaire critique CMC est comprise entre 0,15 et 0,007 mmol/L.

- 1-*O*-dodécanoyl-D-xylopyranose : $\gamma_{\text{CMC}} = 30$ mN/m, CMC =0.15 mmol/L.
- 1-*O*-tétradécanoyl-D-xylopyranose : $\gamma_{\text{CMC}} = 37.78$ mN/m, CMC =0.028 mmol/L.
- 1-*O*-hexadécanoyl-D-xylopyranose : $\gamma_{\text{CMC}} = 38$ mN/m, CMC =0.01 mmol/L.
- 1-*O*-octadécanoyl-D-xylopyranose : $\gamma_{\text{CMC}} = 25$ mN/m, CMC =0.09 mmol/L.
- 1-*O*-eicosanoyl-D-xylopyranose : $\gamma_{\text{CMC}} = 45$ mN/m, CMC =0.008 mmol/L.
- 1-*O*-docosanoyl-D-xylopyranose : $\gamma_{\text{CMC}} = 47.17$ mN/m, CMC =0.007 mmol/L.

-

Les biotensioactifs synthétisés ont un bon pouvoir émulsifiant qui dépasse 80% avec une stabilité considérable après 72h. Le pouvoir moussant des esters d'acides gras est moins important le meilleur agent moussant est le 1-*O*-dodécanoyl-D-xylopyranose avec un pouvoir moussant de 28,89%. Un faible pouvoir moussant est un bon indice de l'efficacité de tensioactif car la mousse compromet la performance du détergent surtout dans le processus de nettoyage à forte énergie mécanique.

Dans la suite du travail, nous avons séparé les anomères des esters de sucres en C12 et C18. Les anomères α et β sont ainsi obtenus par acétylation puis désacétylation des esters correspondants, puis séparés sur une colonne de chromatographie. Leurs propriétés tensioactives sont évaluées. Il a été trouvé que l'anomère α a de bonnes propriétés tensioactives par rapport à l'anomère β :

- 1-*O*-dodécanoyl- α -D-xylopyranose : $\gamma_{\text{CMC}} = 43.57$ mN/m, CMC =0.16 mmol/L.
- 1-*O*-dodécanoyl- β -D-xylopyranose : $\gamma_{\text{CMC}} = 45.19$ mN/m, CMC =0.17 mmol/L.
- 1-*O*-octadécanoyl- α -D-xylopyranose: $\gamma_{\text{CMC}} = 52,15$ mN/m, CMC =0.16 mmol/L.
- 1-*O*-octadécanoyl- β -D-xylopyranose: Non déterminé, solubilité faible.

La comparaison de ces valeurs à celles obtenues pour les anomères des éthers du D-xylose met en évidence l'importance du carbonyle dans la réduction de la tension de surface.

La mesure du pouvoir émulsifiant dépend également de la configuration de l'anomère, on constate que l'anomère α de stéarate du D-xylose a une capacité supérieure à celle de β contrairement à ce qui a été trouvé dans le cas du laurate du D-xylose.

La modélisation moléculaire effectuée par Gaussian 9 montre que l'anomère α de ces esters est le plus réactifs.

L'activité antibactérienne des deux anomères synthétisés est également déterminée. Le test permet de conclure que ces composés présentent une activité antibactérienne sur les cinq souches de Gram+ et Gram- utilisées. La zone d'inhibition de la croissance bactérienne et la concentration minimale inhibitrice varient d'un anomère à un autre et selon la résistance de la souche aux produits :

- 1-*O*-dodécanoyl- α -D-xylopyranose : 16.51mm <ZOI<19.86mm, 4 μ g/ml <CMI< 64 μ g/ml.
- 1-*O*-dodécanoyl- β -D-xylopyranose : 14.95mm<ZOI< 17.38mm, 32 μ g/ml <CMI< μ g/ml 128.
- 1-*O*-octadécanoyl- α -D-xylopyranose : 11.51mm <ZOI< 15.16mm, 16 μ g/ml <CMI<64 μ g/ml.
- 1-*O*-octadécanoyl- β -D-xylopyranose : 12.15mm <ZOI<14.26mm, 32 μ g/m<CMI< 128. μ g/ml.

Afin d'étudier l'effet de la tête polaire sur les propriétés tensioactives des esters de sucres et d'acides gras, le L-rhamnose est choisi comme substrat. Nous avons d'abord effectué la réaction d'estérification dans l'EMC. Les résultats obtenus pour la conversion sont faibles (25%). Nous avons par la suite testé d'autres solvants dans un but d'optimisation de la conversion. La meilleure conversion (70%) est observée dans le système de solvants (acétone / DMSO) : (1ml / 50 μ l) en présence de (30 mg) de CAL B avec un rapport molaire (rhamnose /acide palmitique) : (1/2) à 60°C au bout de 72 h.

L'étude des propriétés tensioactives des deux esters de sucres montre l'effet de la tête hydrophile sur les valeurs de la tension de surface et du pouvoir émulsifiant. Le palmitate de xylose permet de réduire la tension de surface mieux que le palmitate de rhamnose alors que ce dernier a un pouvoir plus stable que le palmitate du xylose.

En perspectives et à la suite de ces travaux, nous projetons de :

- Séparer les anomères des esters de sucres obtenus et évaluer ainsi leurs propriétés.
- Utiliser le L-rhamnose comme tête polaire dans la synthèse d'une série homologue d'esters d'acides gras et évaluer ainsi leurs propriétés tensioactives et biologiques.

Nous envisageons également d'utiliser ces nouveaux tensioactifs dans des réactions organiques (réaction de couplage C-C et C-hétéroatome ...) en milieu micellaire dans des solvants verts comme l'eau sachant qu'il n'existe que peu d'exemples réalisés en milieu aqueux. Grâce à leurs propriétés intrinsèques ces tensioactifs facilitent la solubilisation/dispersion de composés normalement insolubles dans l'eau.

Dans cette perspective, nous œuvrons à synthétiser des polyesters du sucre dans le but d'avoir des biotensioactifs ramifiés, nous allons également essayer d'améliorer la performance des lipases dans des liquides ioniques.

Références

1. Allen, D.K.; Tao, B.Y. Synthesis and Characterization of Maltose Fatty Acid Monoesters as Biosurfactants. *J. Surfactants Deterg.* **2002**, *5*, 245–255.
2. Sangiorgio, S.; Pargoletti, E.; Rabuffetti, M.; Robescu, M.S.; Semproli, R.; Ubiali, D.; Cappelletti, G.; Speranza, G. Emulsifying properties of sugar-based surfactants prepared by chemoenzymatic synthesis. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2022**, *48*, 100630.
3. Zhao, K.-H.; Cai, Y.Z.; Lin, X.S.; Xiong, J.; Halling, P.J.; Yang, Z. Enzymatic synthesis of glucose-based fatty acid esters in bisolvent systems containing ionic liquids or deep eutectic solvents. *Molecules* .**2016**, *21*, 1294.
4. Hanno, I.; Centini, M.; Anselmi, C.; Bibiani, C. Green cosmetic surfactant from rice: Characterization and application. *Cosmetics* .**2015**, *2*, 322–341.
5. Banat, I. M.;Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **2000**,*53*, 495–508.
6. <https://www.grandviewresearch.com/>
7. Fregapane, G.; Sarney, D. B. Greenberg, S. G.; Knight, D. J.; Vulfson, E. N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *71*, 87
8. Anastas, P. T.; Warner, J. C. Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, pp 30, **1998**.
9. Zhao, L.;Zhang, H.; Hao, T.; Li, S. In vitro antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters against five food-related bacteria. *Food Chemistry.***2015**,*187*, 370–377.
10. Ebringerova, A.;Heinze,T. Xylan and xylan derivatives biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**,*21*, 542-556.
11. Mats, M.; Karl H. Kinetics of triglyceride lipase. In: Wooley P. & Petersen S.B., eds. Lipases. Cambridge, UK: Cambridge University Press,**1994**,159-180.
12. Aha,B.;Berger.; Jakob ,M.B.; Haase ,B.; Hermann, J.; Machmuller ,G.; Muller, S.; Waldinger, C.; Schneider ,M.P., Bioconversion of plant materials:lipids proteins and carbohydrates, in: B. Zwanenburg, M. Micolajczyk, P. Kiebasinski (Eds.), Enzymes in Action, Green Solutions for Chemical Problems, Kluwer Academic Publishers. **2000**, pp. 323– 345.
13. Schmid,R.D.;Verger, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**,*37*,1608–1633
14. Canet, A.,Bonet-Ragel,K.,Benaiges,M.D.,&Valero, F. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. *Biomass and Bioenergy.* **2016**, *85*, 94–99.
15. Robles-Medina,A.;Gonzalez-Moreno,P.A.;Esteban-Cerd,L.;Molina-Grima,E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production, *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 398-408.
16. Parawira, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2009**, *29*, 82-93.
17. Gandolfi, R.; Converti, A.; Pirozzi, D.; Molinari, F. Efficient and selective microbial esterification with dry mycelium of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Biotechnology.* **2001**, *92*, 21–26.
18. Muderhwa,J.M. ; Pina Michel, Montet Didier, Feuillard P., Graille Jean. Interestérification enzymatique régiosélective 1-3 en milieu fondu et en réacteur continu : valorisation de l'huile de palme. *Oléagineux.* **1989**,*44*,35-43.
19. Shu,C.H.;Xu ,C.J.&Lin G.C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 734-738.

20. Lima, V.M.G.; Krieger, N.; Mitchell, D.A. & Fontana JD. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Eng.* **2004**, 18, 65-71.
21. Zhang, X.; Li ,X.; Xia,L. Expression of a thermo-alkaline lipase gene from *Talaromyces thermophilus* in recombinant *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*. **2015**,103, 263–269.
22. Veeraragavan,K.; Colpitts ,T.; Gibbs ,B.F. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1990**, 1044, 26-33.
23. Iwai M; Tsujisaka, Y. The purification and the properties of three kinds of lipase from *Rhizopus delemar*. *Agric. Biol. Chem.* **1974**, 38, 1241-1247.
24. Destain, J.;Roblain, D.; Thonart ,P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* **1997**, 19, 105-107.
25. Sugihara, A. et al. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.* **1992**, 112, 598-603.
26. Shimada, Y et al. Purification and characterisation of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, 75, 349-352.
27. Brady L. et al. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature.* **1990**, 343, 767-770.
28. Egloff M.P., Cohen, P.T., Reinemer, P., and Barford, D. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J. Mol. Biol.* **1995**,254,942–959.
29. Brocca, S.; Secundo, F.; Ossola, M.; Alberghina, L.; Carrea, G.; Lotti, M. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci.* **2003**,12, 2312–2319.
30. Brzozowski, A. M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z. S.; Dodson, G. G.; Lawson, D. M.; Turkenburg, J. P.; et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature.* **1991**,351, 491–494.
31. Cambillau, C.;Longhi, S.; Nicolas, A.; and Martinez, C. Acyl glycerol hydrolases: inhibitors, interface and catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 449–455
32. Derewenda, U.; Swenson,L.; Wei,Y.; Green,R.; Kobos,P.M.; Joerger, R.; Haas,M.J.; Derewenda ,Z.S. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J. Lipid Res.* **1994**,35, 524-534.
33. Grochuiski, P.;Yunge,L.; Schrag,J.; Bouthillier,F.; Smith,P.; Harrison,D.; Rubin ,B.; Cygler,M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 , 12843-12847
34. Grochulski, P.; Li,Y.; Schrag, JD.;Cygler,M. Two conformation states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **1994**,3, 82-91
35. Gutiérrez-Ayesta, C.;Carelli, A. A.; Ferreira, M. L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and Microbial Technology.* **2007**, 41, 35–43.
36. Polaina Julio et MacCabe Andrew P., Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications, Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands. **2007**.
37. Nicholls, A.; Sharp,KA.; Honig,B. Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins Struct Funct Genet.* **1991**,11,281-296.
38. Dill, K. A. Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry.* **1985**, 24, 1501
39. Dill, K. A.; Alonso, D. V.; Hutchinson, K. Thermal stabilities of globular proteins. *Biochemistry.* **1989**, 28,5439.

40. Bushmarina, N. A. ; Blanchet, C. ; Vernier, G. ; Forge, V. Replieement des protéines : exemple de l' α -lactalbumine. *Journal de Physique IV (Proceedings)*.**2005**.130, 209–228.
41. Baldwin, R. L.; Eisenberg, D. Protein stability. In “Protein Engineering” (D. L.Oxender and C. F. Fox, eds.) **1987**. p. 127. Liss, New York
42. Kauzmann, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **1959**, 14, 1.
43. Tanford, C. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **1968**,23, 121
44. Kristjansson M.M.; Kinsella J.E. Protein and enzyme Stability: structural, thermodynamic and experimental aspects. *Adv. Food Nutr. Res.***1991**, 35, 237-258.
45. Ru, M. T.; Hirokane, S. Y.; Lo, A. S.; Dordick, J. S.; Reimer, J. A.;& Clark, D. S. On the Salt-Induced Activation of Lyophilized Enzymes in Organic Solvents: Effect of Salt Kosmotropicity on Enzyme Activity. *Journal of the American Chemical Society*.**2000**, 122, 1565–1571.
46. Alloue,W.A.M.; Aguedo M.; Destain J.; Ghalfi H.; Thonart, Ph.; Aguedo, M.,Wathelet.J.P.; Blecker,C.Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2008**, 12, 57-68
47. Lehninger, Albert L.; Nelson, David L.; Cox, Michael M. Principles of Biochemistry (5th ed.). New York, NY: W.H. Freeman and Company. **2008**. ISBN 978-0-7167-7108-1.
48. Donald Voet, Judith G. Voet. **2016**. Biochimie..Ed.De Boeck.pp360.
49. Mitchell, D. A.; Krieger, N. Looking through a new lens: Expressing the Ping Pong bi bi equation in terms of specificity constants. *Biochem. Eng. J.* **2022**, 178, 108276.
50. Chulalaksananukul, W.; Condoret, J.S.; Delorme, P.; Willemot, R.M. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS Lett.***1990**, 276, 181-184.
51. Bousquet-Dubouch, M.-P.; Graber, M.; Sousa, N.; Lamare, S.; Legoy, M.-D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water.*Biochim. Biophys. Acta.***2001**,1550, 90-99.
52. Paiva, A.; Balcao, V.; Malcata,F. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 27, 187-204.
53. Verger R. & de Haas G.H. Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem. Phys. Lipids.***1973**,10, 127-136.
54. Carman, G.M.; Deems, R.A. and Dennis, E.A. Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *J Biol Chem.***1995**, 270, 18711-18714.
55. Jain, K.M.; Gelb, M. H.; Rogers, J.; & Berg, O. G. Kinetic basis for interfacial catalysis by phospholipase A2. *Methods in Enzymology* .**1995**,249, 567–614.
56. Jain, M. K.; & Berg, O. G. The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* .**1989**,1002,127–156.
57. Albayati, S. H.; Masomian, M., Ishak, S. N. H.; Mohamad Ali, M. S. bin, Thean, A. L.; Mohd Shariff, F.; binti, ... Raja Abd Rahman, R. N. Z. Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity. *Catalysts*.**2020**,10, 747.
58. Van Pouderoyen, G.; Eggert, T.; Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* **2001**, 309, 215–226.
59. Verger R. ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.***1997**, 15, 32–38.
60. Ericsson, D.J.; Kasrayan, A.; Johansson, P.; Bergfors, T.; Sandström, A.G.; Bäckvall, J.E.; Mowbray, S.L. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of InterfacialActivation. *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 109–119.

61. Mezzetti, A.; Schrag, J.D.; Cheong, C.S.; Kazlauskas, R.J. Mirror-image packing in enantiomer discrimination: Molecular basis for the enantioselectivity of *B. cepacia* lipase toward 2-methyl-3-phenyl-1-propanol. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 427–437.
62. Luan, B.; Zhou, R. A novel self-activation mechanism of *Candida antarctica* lipase B. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2017**, *19*, 15709–15714.
63. Suplatov, D. A.; Besenmatter, W.; Svedas, V. K.; & Svendsen, A. Bioinformatic analysis of alpha/beta-hydrolase fold enzymes reveals subfamily-specific positions responsible for discrimination of amidase and lipase activities. *Protein Engineering Design and Selection*, **2012**, *25*, 689–697.
64. Oroz-Guinea, I.; Zorn, K.; & Brundiek, H. Protein engineering of enzymes involved in lipid modification. *Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes*, **2018** 11–43.
65. Rogalska, E.; Cudrey, C.; Ferrato, F. and Verger, R. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality*. **1993**, *5*, 24-30
66. Wang, Z.; Zhang, Y.; Zheng, L.; Cui, X.; Huang, H.; Geng, X.; & Xie, X. Regioselective acylation of resveratrol catalyzed by lipase under microwave. *Green Chemistry Letters and Reviews*. **2018**, *11*, 312–317.
67. Ducret, A. ; Giroux, A, Trani, M. ; Lortie R. Caractérisation de biosurfactants préparés par voie enzymatique . *Journal de l'American Oil Chemists Society*. **1996**, *73*, 109-113.
68. Zhang, Y.; Liu J. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochemical Engineering Journal*. **2011**, *54*, 4046.
69. Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry*, **1988**, *263*, 3194–3201.
70. Vidya, P.; Chadha, A. *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester: A comparison in ionic liquids vs hexane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, *65*, 6872.
71. Singh, M.; Singh, S.; Singh, R.S.; Chisti, Y.; Banerjee U. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Bioresource Technology*. **2008**, *99*, 2116-2120.
72. Goto, M.; Kamiya, N.; & Nakashio, F. Enzymatic interesterification of triglyceride with surfactant-coated lipase in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*. **1995**, *45*, 27–32.
73. Prasad, A.; Husain, M.; Singh, B.; Gupta, R.; Manchanda V., Olsen C., Parmar V. Solvent-free biocatalytic amidation of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*. **2005**, *46*, 4511-4514.
74. Ottosson J., Fransson L., Hult K. Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Science*. **2002a**, *11*, 1462-1471.
75. Hass, H.B.; Snell, F.D.; York, SC.; and Osipow, L. I. to Sugar Research Foundation, Inc. **1959**, US PATENT 2893990
76. Descotes, G.; Gagnaire G. ; Bouchu, J. ; Thevenet A. ; Giry-Panaut, S.; Salanski, N.; Beniak, P.; Wherniche, S.; Porwanski, A.; Queneau, Y. Preparation of ester, ether, and acetals from unprotected sucrose. *POL J CHEM*. **1999**, *73*, 1069-1077
77. Lu, Y.; Yan, R.; Ma, X.; & Wang, Y. Synthesis and characterization of raffinose fatty acid monoesters under ultrasonic irradiation. *European Food Research and Technology*. **2013**, *237*, 237–244.
78. Cruces, M. A.; Plou, F.J.; Ferrer, M.; Bernabé, M.; & Ballesteros, A. Improved Synthesis of Sucrose Fatty Acid Monoesters. *J Amer Oil Chem Soc* . **2001**, *78*, 541–546.
79. Plou, F.J.; Pastor, E.; Cruces M.A.; Ferrer, M.; Ballesteros, A., A Procedure for the Selective Synthesis of 2-O-Lauroylsucrose, Spanish Patent **1998**. 9,802,086 .
80. Junistia, L.; Sugih, A. K.; Manurung, R.; Picchioni, F.; Janssen, L. P. B. M., & Heeres, H. J. Synthesis of Higher Fatty Acid Starch Esters using Vinyl Laurate and Stearate as Reactants. *Starch-Starke*. **2008**, *60*, 667-675.

81. Fitremann, J.; Queneau, Y.; Maître, J.-P.; & Bouchu, A. Co-melting of solid sucrose and multivalent cation soaps for solvent-free synthesis of sucrose esters. *Tetrahedron Letters*.**2007**,48, 4111–4114.
82. Pfeffer, P. E.; Rothman, E. S.; Moore, G. G. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 2925.
83. Besset, C.; Chambert, S.; Queneau, Y.; Kerverdo, S.; Rolland, H.;& Guilbot, J. Reactivity of melezitose and raffinose under Mitsunobu reaction conditions. *Carbohydrate Research*.**2008**, 343, 929–935
84. Molinier, V. ; Fitremann, J. ; Bouchu, A.; Queneau, Y. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2004**, 15, 1753.
85. Plusquellec, D. ; Bazko. *Tetrahedron. Letters*.**1987**,28,3809
86. Baczko, K.; & Plusquellec, D. Sugar chemistry without protecting groups-III. A facile chemical synthesis of 6-O-acyl-D-glycopyranoses and methyl-6-O-acyl-d-glycopyranosides. *Tetrahedron*.**1991**, 47, 3817–3828.
87. Sanaullah, A.F.M.; Bhuiyan, M.M.H.; Matin, M.M. Stearoyl glucopyranosides: Selective synthesis, PASS analysis, in vitro antimicrobial, and SAR study. *Egyp. J. Chem.* **2022**, 65, 329–338.
88. Liu, Q.B.; Michiel, H.; Janssen, A.; Rantwijk, F.V. and Sheldon, R.A. Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations. *Green Chemistry*.**2005**,7, 39-42.
89. Wei, Y.A.; Zhang, Y. and Yao, P.J. Enzyme catalyzed regioselective synthesis of sucrose vinyl adipoyl ester by an immobilized proleather. *Journal of Guangxi Normal University: Natural Science Edition*. **2009**, 34, 484-490.
90. Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A.P.G. and Klibanov, A.M. Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *Journal of the American Chemical Society*, **1988**,110, 584-589.
91. Ikeda, I.; and Klibanov, A. M. Lipase-catalyzed acylation of sugars solubilized in hydrophobic solvents by complexation. *Biotechnol. Bioeng.***1993**,42,788–791.
92. Sharma, A. and Chattopadhyay, S. Lipase catalysed acetylation of carbohydrates. *Biotechnol. Lett.* **1993**,15,1145–1146.
93. Arcos, J. A.; Bernabe, M. and Otero, C. Quantitative enzymatic production of 6-O-acylglucose esters. *Biotechnol. Bioeng.***1998**,**57**,505–509.
94. Oguntimein, G. B.; Erdmann, H. and Schmid, R. D. Lipase catalyzed synthesis of sugar ester in organic solvent. *Biotechnol. Lett.* **1993**,15,175–180.
95. Chang, S. W. and Shaw, J. F. Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. *New Biotechnol.* **2009**,26,109–116.
96. Khaled, N.; Montet, D.; Pina, M. and Graille, J. Fructose oleate synthesis in a fixed catalyst bed reactor. *Biotechnol. Lett.* **1991**,13,167–172.
97. Schlotterbeck, A.; Lang, S.; Wary, V. and Wagner, F. Lipase catalyzed monoacylation of fructose. *Biotechnol. Lett.* **1993**,15,61–64.
98. Ku MA., Hang YD. Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Bussochlamys fulva*. *Biotechnol. Lett.* 1995.17, p. 1081–1084.
99. Ferrer, M.; Cruces, M. A.; Bernabe, M.; Ballesteros, A. and Plou, F. J. Lipase catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnol. Bioeng.***1999**, 65,10–16.
100. Chaiyaso, T.; H-kittikun, A.; and Zimmermann, W. Biocatalytic acylation of carbohydrates with fatty acids from palm fatty acid distillates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.***2006**,33,338–342.
101. Ferrer, M.; Solvieri, J.; Plou, F. J.; L'opez-Cort'es, N.; Reyes-Duarte, D.; Christensen, M.; Copa-Patiño, J. L. and Ballesteros, A. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enz. Microb. Technol.***2005**,36,391–398.
102. Redmann, I.; Montet, D.; Bonnot, F.; Pina, M. et Graille, J. Fructose mono- and polycaprylate purification by molecular distillation. *Biotechnol. Tech.*, **1995**,9, 123-126.

103. Malcata, F.X.; Reyes, H.R.; Garcia, H.S.; Hill, C.G. et Amundson, C.H. Enzyme Microb. Technol., **1992**, 14,6, 426-446.
104. Halling, P.J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in non conventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, 16, 178-206.
105. Garcia, T.; Martinez, M. et Aracil, J. Enzymatic synthesis of myristyl myristate. Estimation of parameters and optimization of process. *Biocatal. Biotrans.* **1996**, 14, 67-85.
106. Akoh, C.C, et Mutua, L.N. Synthesis of alkylglycoside fatty acid esters: Effect of reaction parameters and the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acid. *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, 16, 115-119.
107. Jensen, R.G. ; Galluzzo, D.R. ; Bush, V.J. La sélectivité est une caractéristique importante des lipases (acylglycérol hydrolases). *Biocatalyse*. **1990** ,3, 307–316.
108. McCabe, R.W.; and Taylor, A. An investigation of the acryl-binding site of *Candida antarctica* lipase B. *Enz. Microb. Technol.* **2004**, 35, 393–398.
109. Jaeger, K. E.; and Eggert, T. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 390–397.
110. Šabeder, S.; Habulin, M.; & Knez, Ž. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering*, **2006**, 77, 880–886.
111. Neta, N. S.; Teixeira, J. A.; & Rodrigues, L. R. Sugar Ester Surfactants: Enzymatic Synthesis and Applications in Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2014**, 55, 595–610.
112. Liang, J. ; Zeng, W. ; Yao, P. ; Wei, Y . Lipase-catalyzed regioselective synthesis of palmitoylglucose ester in ionic liquids, *Adv. Biol. Chem.* **2012**, 2, 226–232.
113. Lin, X.-S.; Zhao, K.-H.; Zhou, Q.-L.; Xie, K.-Q.; Halling, P. J.; & Yang, Z. *Aspergillus oryzae* lipase-catalyzed synthesis of glucose laurate with excellent productivity. *Bioresources and Bioprocessing*. **2016**, 3(1).
114. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R.D. Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids*. **1998**, 93, 67–80.
115. Nardini, M.; Lang, D.A.; Liebeton, K.; Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 31219–31225
116. Uppenberg, J.; Ohmer, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G.J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T.A. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*. **1995**, 34, 16838–16851.
117. Derewenda, U.; Brzozowski, A.; Lawson, D.M.; Derewenda, Z.S. Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in. *Biochemistry*. **1992**, 31, 1532–1541
118. Cygler, M.; Schrag, J.D.; Bouthillier, F.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R.J.; Serreq, A.N.; Gupta, A.K.; Rubin, B. A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3180–3186
119. Panizza, P.; Cesarini, S.; Diaz, P.; Rodríguez Giordano, S. Saturation mutagenesis in selected amino acids to shift *Pseudomonas* sp. acidic lipase Lip I.3 substrate specificity and activity. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 1330–1333.
120. Yan, Y., Bornscheuer, U. T., Stadler, G., Lutz-Wahl, S., Reuss, M.; Schmid, R. D. Production of sugar fatty acid esters by enzymatic esterification in a stirred-tank membrane reactor: Optimization of parameters by response surface methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, 78, 147–153.
121. Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*. 4th ed. Springer. **2000**, Berlin, Germany.
122. Arcos, J.A.; Bernabé, M., & Otero, C. Quantitative enzymatic production of 1,6-diacetyl fructofuranoses. *Enzyme and Microbial Technology*. **1998**, 22, 27–35.

123. Vitisant, T.; Chulalaksananukul,W.; Piumthongkum, R.; Sinbuthong,N.; Mekthong,P.; Chulalaksananukul, S. *Int. J. Sci. Technol*, **2012**, 2, 2224.
124. Zaks, A.; Klibanov, A.M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*. **1984**,224,1249–1251.
125. Divakar, S.; Manohar, B. Use of lipases in the industrial production of esters. *Industrial Enzymes*.**2007**,283–300.
126. Zhang, K.P.; Lai, J.Q.; Huang, Z.L.; Yang? Z. Penicillium expansum lipasecatalyzedproduction of biodiesel in ionic liquids. *Bioresour Technol*.**2011**,102,2767–72.
127. Khmelnitsky, Y.L.; Levashov, A.V.; Klyachko, N.L.; Martinek, K. Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb Technol*. **1988**,10,710–24.
128. Van Tol, J.B.; Stevens, R.M.; Veldhuizen, W.J, Jongejan, J.A.; Duine, J.A. Do organic solvents affect the catalytic properties of lipase? Intrinsic kinetic parameters of lipases in ester hydrolysis and formation in various organic solvents. *Biotechnol Bioeng*. **1995**,47,71–81.
129. Liu, Y.; Zhang, X.; Tan, H.; Yan, Y.; Hameed, B. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized Pseudomonas cepacia lipase. *Process Biochem*. **2010**, 45, 1176–1180.
130. Almarsson, O.; Klibanov, A.M. Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotechnol Bioeng*. **1996**,49,87–92.
131. Trodler, P.; Pleiss, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct. Biol*. **2008**.8,9.
132. Degn, P.; & Zimmermann, W. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnology and Bioengineering*.**2001**,74, 483–491.
133. Rezaei, K.; Jenab, E.; Temelli, F. Effects of water on enzyme performance with an emphasis on the reactions in supercritical fluids. *Crit. Rev. Biotechnol*. **2007**,27,183–195.
134. Cauglia,F.; Canepa P. The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on ‘sugar esters’ production. *Bioresource Technology*. **2008**,99,4065–72.
135. Matsue, S.; and Miyawaki, O. Influence of water activity and aqueous solvent ordering on enzyme kinetics of alcohol dehydrogenase, lysozyme, and β -galactosidase. *Enz. Microb. Technol*. **2000**,26,342–347.
136. Kang, IJ.; Pfromm PH, Rezac ME. Real time measurement and control of thermodynamic water activities for enzymatic catalysis in hexane. *Journal of Biotechnology*.**2005**,119,147–54.
137. Chowdary, G. V. and Prapulla, S. G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Proc. Biochem*. **2002**,**38**,393–397.
138. Gandhi, N. N.; Patil, N. S.; Sawant, S. B.; Joshi, J. B.; Wangikar, P. P. and Mukesh, D. Lipase catalyzed esterification. *Catalysis Rev*. **2000**,42,439–480.
139. Awang, R.; Basri, M.; Ahmad, S. and Salleh, A. B. Enzymatic esterification of dihydroxystearic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc*.**2000**,77,609–612.
140. Virto, C.; Svensson, I.; et Adlercreutz, P. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of dihydroxyacetone fatty acid esters. *Biocatal. Biotrans*. **2000**, 18, 13-29.
141. Dutta Banik, S.; Nordblad, M.; Woodley, J.; & Peters, G. Effect of Water Clustering on the Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Medium. *Catalysts*.**2017**,7, 227.
142. Yan, Y.; Bornscheuer, U.T.; Stadler, G.; Lutz-Wahl, S.; Reuss, M.; Schmid, R.D. Production of sugar fatty acid esters by enzymatic esterification in a stirred-tank membrane reactor: optimization of parameters by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2001**,78,147–53.
143. Yan, Y.; Bornscheuer, U.T.; Cao, L.; Schmid, R.D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters: removal of byproducts by azeotropic distillation. *Enzyme and Microbial Technology*.**1999**,25,725–8.

144. Yan, Y.; Bornscheuer, U.T.; Schmid, R.D. Efficient water removal in lipase catalyzed esterification using a low boiling point azeotrope. *Biotechnology and Bioengineering*. **2002**, *78*, 31–4.
145. Sakaki, K.; Aoyama, A.; Nakane, T.; Ikegami, T.; Negishi, H.; Watanabe, K., et al. Enzymatic synthesis of sugar esters in organic solvent coupled with pervaporation. *Desalination*. **2006**, *193*, 260–6.
146. Belafi-Bako, K.; Dorm, N.; Ulbert, O.; Gubicza, L. Application of pervaporation for removal of water produced during enzymatic esterification in ionic liquids. *Desalination* **2002**, *149*, 267–8.
147. Tejo, B.A.; Salleh, A.B.; Pleiss, J. Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent. *Journal of Molecular Modeling* **2004**, *10*, 358–66.
148. Yu, D.; Tian, L.; Ma, D.; Wu, H.; Wang, Z.; Wang, L., et al. Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. *Green Chemistry*. **2010**, *12*, 844–50.
149. Kumar, R.; Modak, J.; Madras, G. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavours in supercritical carbon dioxide. *Biochemical Engineering Journal*. **2005**, *23*, 199–202.
150. Zhao, K.-H.; Cai, Y.-Z.; Lin, X.-S.; Xiong, J.; Halling, P.; & Yang, Z. Enzymatic Synthesis of Glucose-Based Fatty Acid Esters in Bisolvent Systems Containing Ionic Liquids or Deep Eutectic Solvents. *Molecules*. **2016**, *21*, 1294.
151. Chevandier, F.; Dubreucq, E. and Galzy, P. Lipase catalyzed synthesis of propanediol monoesters in biphasic aqueous medium. *Biotechnol. Lett.*, **1997**, *19*, 913–917.
152. Coulon, D.; Girardin, M. and Ghoul, M. Enzymic synthesis of fructose monooleate in a reduced pressure pilot scale reactor using various acyl donors. *Process Biochem.*, **1999**, *34*, 913–918.
153. Adlercreutz, P.; and Mattiasson, B. Lipase catalyzed esterification of lactic acid. *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19*, 315–317.
154. Coulon, D.; Ghoul, M. The enzymatic synthesis of non-ionic surfactants: the sugar esters – an overview. *Agro Food Industry Hi-Tech*. **1998**, *9*, 22–6.
155. Soultani, S.; Engasser, J.-M.; Ghoul, M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, *11*, 725–31.
156. Tarahomjoo, S.; Alemzadeh, I. Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *33*, 33–7.
157. Overbeeke, P. L. A.; Khalaf, G. C. N.; Jongejan, J. A.; Heijnen, J. J. *Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 385.
158. Moreau, B.; Lognay, G. C.; Blecker, C.; Brohée, J.-C.; Chéry, F.; Rollin, P.; Marlier, M. Synthesis of novel d-glucuronic acid fatty esters using *Candida antarctica* lipase in tert-butanol. *Biotechnology Letters*. **2004**, *26*, 419–424.
159. Rosen, M. J. The relationship of structure to properties in surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1972**, *49*, 293–297.
160. Karakashev, S. I.; Nguyen, A. V.; & Miller, J. D. Equilibrium Adsorption of Surfactants at the Gas–Liquid Interface. *Interfacial Processes and Molecular Aggregation of Surfactants*. **2008**, 25–55.
161. Fathi Azarbayjani, A.; Jouyban, A.; & Chan, S. Y. Impact of Surface Tension in Pharmaceutical Sciences. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **2009**, *12*, 218.
162. LeBard, D. N.; Levine, B. G.; DeVane, R.; Shinoda, W.; Klein, M. L. Premicelles and monomer exchange in aqueous surfactant solutions above and below the critical micelle concentration. *Chemical Physics Letters*. **2012**, *522*, 38–42.
163. Cui, X.; Mao, S.; Liu, M.; Yuan, H., & Du, Y. Mechanism of Surfactant Micelle Formation. *Langmuir*. **2008**, *24*, 10771–10775.

164. Shinoda, K.; Hutchinson, E. Pseudo-Phase Separation Model for Thermodynamic Calculations on Micellar Solutions. *J. Phys. Chem.* **1962**, 66, 577–582.
165. Jönsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kronberg, B. Association of surfactants. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. B. Jönsson, B. Lindman, K. Holmberg and B. Kronberg. Chichester, Wiley. **1998**,2, 33-60.
166. Griffin, William C. "Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'" , *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **1949**,1, 311–26
167. Davies, J. T.; Rideal, E. K. Interfacial Phenomena 2nd ed, Academic Press: New York. **1963**, P. 372.
168. Davies JT. "A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent" , Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface, *Proceedings of the International Congress of Surface Activity*.**1957**. 426–38.
169. Bakker, Capillarity and surface tension, *Leipzig Akad Publishing company*. **1928**.
170. Ebnesajjad, S., & Landrock, A. H. Surface Tension and Its Measurement. *Adhesives Technology Handbook*.**2015**,19–34.
171. L. du Noüy, J. *General Physiol.***1919**,1,521
172. L. Wilhelm, *Ann. Phys. Chem.* **1863**, 29, 177.
173. Maldonado-Valderrama, J.; Torcello-Gómez, A.; del Castillo-Santaella, T.; Holgado-Terriza, J. A.; & Cabrerizo-Vílchez, M. A. Subphase exchange experiments with the pendant drop technique. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2015**, 222, 488–501.
174. T. Tate, "On the magnitude of a drop of liquid formed under different circumstances," *Philos. Mag.* **1864**,27, 176.
175. Hait, S. K.; & Moulik, S. P. Determination of critical micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor-acceptor interaction with iodine and correlation of CMC with hydrophile-lipophile balance and other parameters of the surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*,**2001** ,4, 303–309.
176. Rosen, M.J. and Kunjappu, J.T. Surfactants and Interfacial Phenomena. 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd., **2012**.New York. 615
177. J. W. Gibbs. The collected works of J. W. Gibbs vol. I, *Longmans, Green*, London. **1928**, 119.
178. Tartar, H. V. *J. Phys. Chem.* **1955**, 55, 1195
179. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect*; Wiley-Interscience: New York, 1973
180. Israelachvili, J.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1976**, 72, 1525.
181. Israelachvili b. J. N, Mitchell, D. J. Ninham B. W, *Biochim. Biophys. Acta.* **1977**, 470, 185.
182. Ikekawa, T.; Umeji, M.; Yanoma, S.; Yoshimoto, K.; & Nishikawa, Y. Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. VIII. Antitumor activity of sucrose fatty acid esters. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. **1979**,27, 2016–2020.
183. Nishikawa, Y.; Yoshimoto, K.; Manabe, T.; & Ikekawa, T. Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. VI. Further examinations on antitumor activities of stearyl esters of sucrose. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*.**1977**,25, 2378–2384.
184. Okabe, S.; Saganuma, M.; Tada, Y.; Ochiai, Y.; Sueoka, E.; Kohya, H., ... Fujiki, H. Disaccharide Esters Screened for Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α Release Are New Anti-cancer Agents. *Japanese Journal of Cancer Research*.**1999**,90,669–676.
185. Zhang, X.; Song, F.; Taxipalati, M., Wei, W.; and Feng, F. Comparative study of surface-active properties and antimicrobial activities of disaccharide monoesters. *PLoS ONE*. **2014**,9: e114845.
186. Nobmann, P.; Smith, A.; Dunne, J.; Henahan, G.; & Bourke, P. The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*,**2009**,128, 440–445.

187. Watanabe, T.; Katayama, S.; Matsubara, M.; Honda, Y.; and Kuwahara, M. Antibacterial carbohydrate monoesters suppressing cell growth of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. *Curr. Microbiol.* **2000**, 41, 210–213
188. Kato, A.; Arima, K. Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on the growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* **1971**, 42, 596–601
189. Kato, S.; Kobayashi, H.; Watanabe, T. Antimicrobial action of sucrose monolaurate on *Staphylococcus aureus*. *J Food Hyg Soc Japan.* **1987**, 28, 261–266
190. Devulapalle, K. S.; Gómez de Segura, A.; Ferrer, M.; Alcalde, M.; Mooser, G.; & Plou, F. J. Effect of carbohydrate fatty acid esters on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity. *Carbohydrate Research.* **2004**, 339, 1029–1034.
191. Shearer, A. E.; Dunne, C. P.; Sikes, A.; & Hoover, D. G. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. *Journal of Food Protection.* **2000**, 63, 1503–1510.
192. de Lamo-Castellvi, S.; Rathitagsanti, W.; Balasubramaniam, V. M.; & Yousef, A. E. Inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores by a combination of sucrose laurate and pressure-assisted thermal processing. *Journal of Food Protection,* **2010**, 73, 2043–2052.
193. AlFindee, M. N.; Zhang, Q.; Subedi, Y. P.; Shrestha, J. P.; Kawasaki, Y.; Grilley, M.; et al. One-step synthesis of carbohydrate esters as antibacterial and antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 765–774
194. Nelen, B. A. P.; Bax, L.; & Cooper, J. M. Sucrose Esters. *Emulsifiers in Food Technology.* **2014**, 147–180.
195. Mark Stuart Miller et Kevin James Surber. European Patent. **1995**.0771150A1.
196. Parker, K.J.; James, K. & Hursford, J. Sucrose ester surfactant – a solventless process and the products thereof. In Hickson, J.L. (ed). *Sucrochemistry.* **1977**, 97–114. Washington, DC, American Chemical Society.
197. Ahsan, F.; Arnold, J. J.; Meezan, E.; & Pillion, D. J. Sucrose cocoate, a component of cosmetic preparations, enhances nasal and ocular peptide absorption. *International Journal of Pharmaceutics.* **2003**, 251, 195–203.
198. Kilpatrick-Liverman, LT.; Miller LA. United States. **1997**.US5776475A.
199. Shigeoka, T; Izawa, O.; Kitazawa, K.; Yamauchi, F. Studies on the metabolic fate of sucrose esters in rats. *Food Chem Toxicol.* **1984**, 22, 409–14.
200. Ntawukulilyayo, J. D.; Demuynck, C.; & Remon, J. P. Microcrystalline cellulose-sucrose esters as tablet matrix forming agents. *International Journal of Pharmaceutics.* **1995**, 121, 205–210.
201. Otsuka, M.; Ofusa, T.; Matsuda, Y. Dissolution Improvement of Water-Insoluble Glybuzole by Co-grinding and Co-melting with Surfactants and their Physicochemical Properties. *Colloids Surf B.* **1998**, 10, 217–226.
202. Hülsmann, S.; Backensfeld, T.; Keitel, S.; & Bodmeier, R. Melt extrusion – an alternative method for enhancing the dissolution rate of 17 β -estradiol hemihydrate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* **2000**, 49, 237–242.
203. Abd-Elbary, A.; El-laithy, H. M.; & Tadros, M. I. Sucrose stearate-based proniosome-derived niosomes for the nebulisable delivery of cromolyn sodium. *International Journal of Pharmaceutics.* **2008**, 357, 189–198.
204. Koseki, T.; Onishi, H.; Takahashi, Y.; Uchida, M.; & Machida, Y. Preparation and Evaluation of Novel Directly-Compressed Fast-Disintegrating Furosemide Tablets with Sucrose Stearic Acid Ester. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* **2009**, 32, 1126–1130.
205. Szűts, A.; Budai-Szűcs, M.; Erős, I.; Otomo, N.; & Szabó-Révész, P. Study of gel-forming properties of sucrose esters for thermosensitive drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics.* **2010**, 383, 132–137.

206. Seidenberger, T.; Siepman, J.; Bley, H.; Maeder, K.; & Siepman, F. Simultaneous controlled vitamin release from multiparticulates: Theory and experiment. *International Journal of Pharmaceutics*.**2011**,412, 68–76.
207. Chansanroj, K.; & Betz, G. Sucrose esters with various hydrophilic–lipophilic properties: Novel controlled release agents for oral drug delivery matrix tablets prepared by direct compaction. *Acta Biomaterialia*, **2010**,6, 3101–3109.
208. Duell, H.E. Enhancing the absorption of orally administered medicament with disaccharide fatty acid esters. United States Patents. **1964**.3160565A
209. Handa, Y. et Nakamura, S. Pharmaceutical composition for the treatment of skin wounds. European Patent. **1989**.EP0343671A3.
210. Kempen, S.E.H.J.V.; Boeriu, C.G.; Schols, H.A.; Waard, P.D.; Linden, E.V.D.; Sagis, L.M.C. Novel surface-active oligofructose fatty acid mono-esters by enzymatic esterification. *Food Chem.* **2013**, 138, 1884–1891.
211. Phanuphong, C.; Areeya, J.; Ninnapat, T.; Sarita, S.; Punyawatt, P. green synthesis optimization of glucose palm oleate and its potential use as natural surfactant in cosmetic emulsion. *Cosmetics* .**2022**, 9,1-15.
212. Tarahomjoo, S.; & Alemzadeh, I. Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*, **2003**,33, 33–37.
213. Agueiras, E. C. G.; Veloso, C. O.; Bevilaqua, J. V.; Rosas, D. O.; da Silva, M. A. P. & Langone, M. A. P. Estolides Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipases. *Enzyme Research*, **2011**, (2011),1–7.
214. Zago, E.; Joly, N.; Chaveriat, L.; Lequart, V.; & Martin, P. Enzymatic synthesis of amphiphilic carbohydrate esters: Influence of physicochemical and biochemical parameters. *Biotechnology Reports* .**2021**. 30, e00631.
215. Zaidan, U. H.; Abdul Rahman, M. B.; Othman, S. S.; Basri, M.; Abdulmalek, E.; Abdul Rahman, R. N. Z. R.; & Salleh, A. B. Biocatalytic production of lactose ester catalysed by mica-based immobilised lipase. *Food Chemistry*.**2012**,131,199-205
216. Alagöz, D.; Zaidan, U. H.; Abdul Rahman, M. B.; Othman, S. S.; Basri, M.; Abdulmalek, E.; Abdul Rahman, R. N. Z. R.; & Salleh, A. B. Biocatalytic production of lactose ester catalysed by mica-based immobilised lipase. *Food Chemistry*.**2012**,131,199-205
217. Sabeder, S.; Habulin, H.; Knez, Z. J. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Food Eng.* **2006**,77, 880–886.
218. Cao, L.; Fischer, A.; Bornscheuer, U.T.; Schmid, R.D. Lipase catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester. *Biocatalysis and Biotransformation*. **1996**,14, 269-283.
219. Höck, H.; Engel, S.; Weingarten, S.; Keul, H.; Schwaneberg, U.; Möller, M.; Bocola, M. Comparison of *Candida antarctica* Lipase B Variants for Conversion of ϵ -Caprolactone in Aqueous Medium—Part 2. *Polymers*. **2018**,10,1-16.
220. Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M.; Miller, R. Lipases at interfaces: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, 147, 237-250.
221. Sarda, L.; Desnuelle, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*.**1958**, 30, 513-521.
222. Marciello, M.; Filice, M.; Palomo, J.M. Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts. *Catalysis Science & Technology*. **2012**,2,1531-1543.
223. Araújo, R.; Casal, M.; and Cavaco-Paulo A. Application of enzymes for textiles fibres processing. *Biocatal. Biotechnol.***2008** ,26, 332–349.
224. Rezgui, N. Les esters de sucres. Synthèse et optimisation. Thèse de doctorat, sous la direction de Bidjou-Haiour chahra, Annaba, Université Badji Mokhtar, **2022**, 212 p.
225. Rezgui, N.; Bidjou-Haiour, C. Efficient Synthesis of Bio-Surfactant from D-Glucose by Immobilized *Candida cylindracea* Lipase-Catalyzed Reaction in Ionic Liquids. *Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci.***2020**,9,180-184

226. Rezgui, N.; Bidjou-Haiour C. Physical and chemical study of coated *Candida cylindracea* with sorbitan esters. *Res. J. Chem. Environ.* **2021**, 25, 43-48
227. Majumder, A.; Ramesh, N.; Gupta M. A lipase catalyzed condensation reaction with a tricyclic diketone: yet another example of biocatalytic promiscuity. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 5190-5193
228. Kobayashi, T.; Matsuo, T.; Kimura, Y.; Adachi, S. Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures. *Journal of Oil Chemists Society*. **2008**, 85, 1081-1084.
229. Cortes-Clerget, M.; Spink, S. E., Gallagher, G. P.; Chaisemartin, L.; Filaire, E.; Berthon, J.-Y.; & Lipshutz, B. H. *MC-1*. A “designer” surfactant engineered for peptide synthesis in water at room temperature. *Green Chemistry*. **2019**, 21, 2610–2614
230. Ducret, A.; Giroux, A., Trani, M.; Lortie R. Caractérisation de biosurfactants préparés par voie enzymatique. *Journal de l'American Oil Chemists Society*. **1996**, 73, 109-113.
231. Garofalakis, G.; Murray, B.S.; Sarney DB. Activité de surface et concentration d'agrégation critique d'esters de sucre purs avec différents groupes de tête de sucre. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 229, 391–398.
232. Smit, B.; Schlijper, A. G.; Rupert, L. A. M.; & Van Os, N. M. Effects of chain length of surfactants on the interfacial tension: molecular dynamics simulations and experiments. *The Journal of Physical Chemistry*, **1990**, 94, 6933–6935
233. Israelachvili, J. Intermolecular and Surface Forces. Academic Press, London. **1991**.
234. Van Kempen, S. E. H. J.; Schols, H. A.; van der Linden, E.; & Sagis, L. M. C. Effect of Variations in the Fatty Acid Chain of Oligofructose Fatty Acid Esters on Their Foaming Functionality. *Food Biophysics*. **2013**, 40, 22-29.
235. Klai, N.; Bidjou-Haiour, C.; Bouquillon, S. D-Xylose-based surfactants: Synthesis, characterization and molecular modeling studies. *Comptes Rendus Chimie*, 2015, 18, 599-606.
236. Razafindralambo, H.; Blecker, C.; Mezdoor, S.; Deroanne, C.; Crowet, J.M.; Brasseur, R.; Paquot, M. Impacts of the Carbonyl Group Location of Ester Bond on Interfacial Properties of Sugar-Based Surfactants: Experimental and Computational Evidences. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113, 8872-8877.
237. Larsson, J.; Sanchez-Fernandez, A.; Mahmoudi, N.; Barnsley, L.; Wahlgren, M.; Nylander, T.; Ulvenlund, S. The effect of the anomeric configuration on the micellization of hexadecyl maltoside surfactants. *Langmuir*. 2019, 35, 13904-13914.
238. Mattei, M.; Kontogeorgis, G. M.; Gani, R. Modeling of the Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants with an Extended Group-Contribution Method. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, 52, 12236–12246.
239. Zhang, X.; Song, F.; Taxipalati, M.; Wei, W; Feng F. Comparative Study of Surface-Active Properties and Antimicrobial Activities of Disaccharide Monoesters. *PLoS ONE*. **2014**, 9(12): e114845.
240. Liang, M. Y.; Chen, Y.; Banwell, M. G.; Wang, Y.; and P. Enzymatic preparation of a homologous series of long-chain 6-Oacylglucose esters and their evaluation. *Lan. b as emulsifiers. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2018**, 66, 3949–3956.
241. Gérard, S.; Michel, B. Jean-François, F.; Orfan, Z. René, F.; **2011**. Cinétique et catalyse, (2^{ème} éd). Paris, France: TEC1DOC.
242. Parr, R.G.; Pearson, R.G. Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7512–7516.
243. Fukui, K.; Fujimoto, H.; Frontier Orbitals and Reaction Paths: Selected Papers of Kenichi Fukui, in *World Scientific Series in 20th Century Chemistry*, vol. 7, (World Scientific Publishing, Singapore, 1997)

244. Yoosefian, M.; Rahmanifar, E.; & Etminan, N. Nanocarrier for levodopa Parkinson therapeutic drug; comprehensive benserazide analysis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*.**2018**.1–13.
245. Moro, S. ; Bacilieri, M.; Ferrari, C. ; et al. Autocorrelation of molecular electrostatic potential surface properties combined with partial least squares analysis as alternative attractive tool to generate ligand-based 3D-QSARs. *Curr Drug Discov Technol*. **2005**,2,13–21.
246. Luque, F.J.; Lopez, J.M.; Orozco, M. Perspective on “Electrostatic interactions of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the provision of solvent effects”. In: Theoretical chemistry accounts. Berlin: Springer; **2000**. p. 343–345.
247. Nobmann, P.; Smith, A.; Dunne, J.; Henehan, G.; & Bourke, P. The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*.2009. 128, 440–445.
248. Pagoon, H.; Azouaoui, A.; Zucchi, H.; Ricois, S.; Tran, C.; & Asselineau, D. Potentially beneficial effects of rhamnose on skin ageing: an *in vitro* and *in vivo* study. *International Journal of Cosmetic Science*.**2019**, 41, 213–220.
249. Houlmont, J.P.; Vercruyse, K.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Bordat, P.; Treilhou, M. Cosmetic use formulations containing pentyl rhamnoside and cetyl rhamnoside. *Int J Cosmet Sci*. **2001**,23,363-8.
250. Ameri, A.;Shakibaie, M.;Amirpour-Rostami, S.;Ameri, A.; Adeli-sardou, M.; Khazali, P.; Rhahmani, H.;Forootanfar, H. Partial purification and chracterization of thermoalkalophilic lipase originated from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 and its application for ester synthesis. *Biotechnology*.**2015**,14,154-164.
251. Wong, W. C.; Basri, M.; Razak, C. N. A.; Salleh, A. B. Synthesis of medium-chain glycerides using lipase from *Candida rugosa*. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*.**2000**, 77, 85–88.
252. Leonard, V., Lamare, S., Legoy, M.-D., & Graber, M. Enantioselective acylation of R-2-pentanol in a solid/gas reactor catalysed by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**,32, 53–59.
253. Jiang,H.L.; Kang, M.L.; Quan, J.S.; Kang, S.G.; Akaike, T.; Yoo, H.S.; Cho, C.S. *Biomaterials*. **2007**,29,1931-1939.
254. Hollenbach, R.; Ochsenreither, K.; & Syldatk, C. Enzymatic Synthesis of Glucose Monodecanoate in a Hydrophobic Deep Eutectic Solvent. *International Journal of Molecular Sciences*.**2020**,21, 4342.
255. Arcos, J.A.; Hill, C.G.; Otero, C. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. *Biotechnol. Bioeng*. **2001**, 73, 104–110.
256. Ihara, K., Hirota, M., Akitsu, T., Urakawa, K., Abe, T., Sumi, M., ... Fujii, T. (2015). Effects of emulsifying components in the continuous phase of cream on the stability of fat globules and the physical properties of whipped cream. *Journal of Dairy Science*.**2015**, 98, 2875–2883.

Annexe

Preparation and Evaluation of Xylose Palmitate Ester Using *Candida antarctica* Lipase B as A Reusable Biocatalyst

F. Loulou, N. Rezgui and C. Bidjou-Haiour*

LOMOP. Organic Synthesis and Modeling group. Faculty of Sciences, Badji-Mokhtar University. BP 12 El-Hadjar. 23000 Annaba. Algeria.

THE activity and stability of lipase B from *Candida antarctica* were investigated in direct enzymatic esterification of D-xylose with palmitic acid using ethylmethylketone as reaction media. The xylose palmitate was obtained under the optimized conditions, 1:1 molar ratio of xylose: palmitic acid, at 250 rpm and 60°C. Effect of the use of Butanol to wash the immobilized lipase before the enzyme reuse was evaluated. The lipase could be successfully reused four times without loss of activity. Various physicochemical characteristics of 1-O-hexadecanoyl-D- xylopyranose were also studied.

Keywords: Xylose, Lipase, Reuse, Activity, Surface active properties.

Introduction

Lipase-catalyzed reactions in organic medium have been extensively exploited for a wide range of applications in biotechnology [1,2]. Sugar Fatty acid esters (SFAE) are non-ionic surfactants [3] that can be synthesized in a single enzymatic reaction step by esterification reaction catalyzed by enzymes [4] such as lipases in non-aqueous systems [5,6]. Because of their properties of amphiphilic nature, odorless, tasteless, among others, SFAE are widely used as flavor enhancers in the food industry and fragrances in the cosmetic industry [7].

The aim of this paper was the preparation of xylose-palmitic acid ester by using immobilized *Candida antarctica* lipase B as a biocatalyst. To the best of our knowledge, the direct enzymatic esterification of D-(+)-xylose and free palmitic acid with *Candida antarctica* lipase B has never been investigated up to now. Immobilized *Candida antarctica* lipase B (CAL B), performed significantly better than many other lipases in carrying out the esterification of sugar and fatty acids. C12–C18 straight chain fatty acids are suitable acyl donors for CAL B [8]. Xylose palmitate ester was obtained using renewable substrate [9]. D-(+)-xylose is a constitutive component of arabinoxylans and other naturally occurring polysaccharides, such lignocellulose which are natural source for xylose. Using renewables as raw materials makes the conversion

processes fully ecologically friendly and the lipase-catalyzed synthesis also has the advantage that the product may be accepted as a natural product [10]. Furthermore, stability and activity of CAL B were studied in repetitive cycle reuses [11]. Butanol was used to wash the recycled lipase. Influence of solvent structure on the activity and stability of the lipase were studied. In this lipase-recycling system, the lipase was reused to synthesize the surfactant under the same conditions with a less loss of activity. In this paper we also report surface-tension data for the synthesized surfactant. Critical micellar concentration and surface tension value of the amphiphilic compound were determined and obtained parameter values were discussed.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Novozym 435 (*Candida antarctica* type B lipase immobilized on acrylic resin) was provided by Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). Xylose (Sigma-Aldrich) and palmitic acid from Merck were tested as starting materials. All other chemicals used in this work were of analytical grade and used without further purification.

Xylose Palmitate Synthesis

D-xylose (200 mg) was first dissolved in one volume of ethyl methyl ketone for one night. After that, palmitic acid was added, the mixture equilibrated for 15 min and *Candida antarctica* lipase B finally incorporated. Aliquots were

*Corresponding author e-mail: bidjouch@univ-annaba.org

DOI: 10.21608/EJCHEM.2018.5160.1458

©2017 National Information and Documentation Center (NIDOC)

removed at intervals, filtered and analyzed qualitatively by thin layer chromatography and quantitatively by volumetric titration.

Analysis

The sugar content was quantified by calculating the residual fatty acid amount in the reaction mixture. Samples were analyzed by volumetric method. 0.1 g of sample of reaction mixture was diluted in 20 mL of 0.1 wt % phenolphthalein solution in absolute ethanol and then titrated with standardized sodium hydroxide solution of 0.1 M in water.

Surface tension measurements

Surface tension values were obtained at 25°C, using the IT concept Tracker drop tensiometer. The data obtained were plotted against various concentration of surfactant solution in water. The value of CMC was determined from the plot of surface tension versus concentration. The surface parameters, maximum surface excess (Γ), surface area occupied by molecule at air-water interface (A), efficiency in surface tension reduction (γ), and the micelle packing parameter (P) were calculated from the slope of the decrease in surface tension with the increasing concentration of surface active solution.

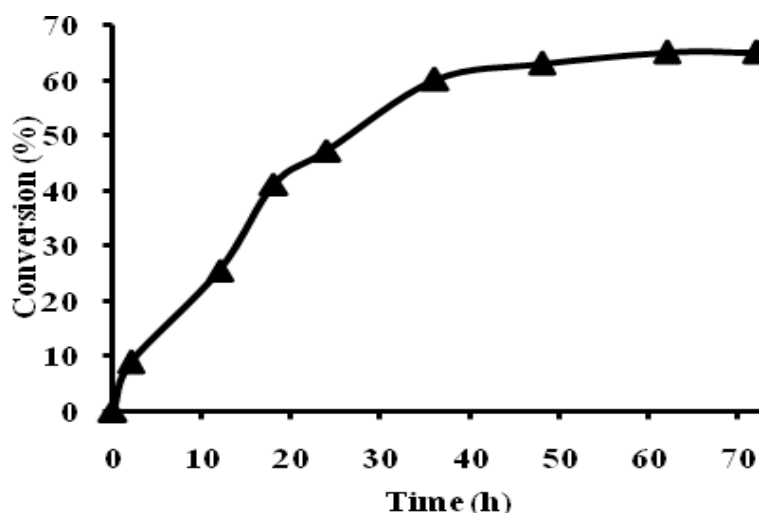
Results and Discussion

Xylose palmitate synthesis pathway

Xylose palmitate ester (1-*O*-hexadecanoyl-*D*-xylopyranose) was prepared by esterification of the corresponding sugar. The reaction was carried out in ethylmethylketone at 60 °C with

xylose: palmitic acid ratio: 1:1 and catalyzed with *Candida antartica* lipase B (CAL B), the most frequently used enzyme for sugar ester synthesis in organic solvent [12]. The progress of esterification was monitored by determining the residual acid content by titration [13]. After 72 h, the enzyme was removed by filtration and the solvent evaporated. The product was isolated on a silica gel column eluted with (dichloromethane: methanol) (9:1 v/v). The fractions containing xylose palmitate ester were combined, solvent removed by evaporation, and after drying under vacuum, the desired product was obtained as a white solid in 45% yield.

1-*O*- hexadecanoyl- *D*-xylopyranose was obtained under the optimized conditions [14]. Higher temperature, 60° C, favored the conversion. The maximum conversion of xylose palmitate obtained was 65% after 72 h reaction time in EMK with(xylose/palmitic acid) molar ratio of (1/1) at 60° C. According to the literature, a suitable temperature range for synthesis using CAL B appears to be between 30°C and 70°C although in specific cases a temperature of up to 80°C may be used [15]. In esterification of glucose [16] with palmitic acid (hexadecanoic acid), the conversion rate attained a maximum at a substrate molar ratio of (1/1). Further increase in glucose concentration reduced the conversion rate. This reduction was associated with the substrate inhibition of the enzyme. Figure 1 shows the reaction kinetics for xylose palmitate ester production.



Reaction conditions: 1.33 mmol *D*-xylose, 1.33 mmol palmitic acid, 5 mL ethyl methyl ketone, 30 mg CAL B at 60 °C, 30 mg molecular sieves (4Å), 250 rpm.

Fig. 1. Reaction kinetics for xylose palmitate production.

Infrared spectroscopy is generally used to estimate the formation of esters during the enzymatic modification of sugars [17]. The spectrum of purified xylose palmitate shows the characteristic vibrations of the ester group between 1710-1740 cm^{-1} . Combination bands of OCH and COH (1463, 1149 cm^{-1}) and C-H (2960, 2850 cm^{-1}) can be observed. The intense peaks at 3000-3600 cm^{-1} are assigned to the OH group.

The enzymatic production is advantageous over a chemical synthesis, as the regiospecificity of fatty acid chain length achieved by the lipase can be exploited to generate pure product with desired properties. ^1H NMR is generally used for the determination of the regioisomers formed. Mono-ester was obtained using *Candida antarctica* lipase B. The ^1H NMR spectrum data for 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose was as follow: (DMSO- d_6 , 250 MHz), δ (ppm): 0.85 (t, 6H, H-16'), 1.25 (m, 48H, H-4'-15'), 1.50 (m, 4H, H-3') 2.27 (m, 4H, H-2'), 3.20-4.00 (m, 6H, H-4 β , H-4 α , H-2 α , H-2 β , H-3 β , H-3 α), 4.4-4.5 (m, 2H, H-5 β , H-5 α), 4.6-4.8 (m, 8H, 8 OH), 5.1 (d, 1H, H-1 α), 5.65 (d, H-1 β).

α/β : 40/60, Rf: 0.45 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 9/1).

The ^{13}C NMR spectrum data for 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose was as follow: (DMSO- d_6 , 250 MHz), δ (ppm): 14.87 (C16'), 22.01 (C15'), 25 (C14'), 28.35-31 (C13'-3'), 34.38-35 (C2' α,β), 69.54 (C5 α), 74.00 (C5 β), 71.05 (C4 α), 70.50 (C4 β), 73.36 (C3 α), 76.65 (C3 β), 72.69 (C2 α), 75.18 (C2 β), 95.78 (C1 α), 96.76 (C1 β), 175.83 (C1' α), 176 (C1' β).

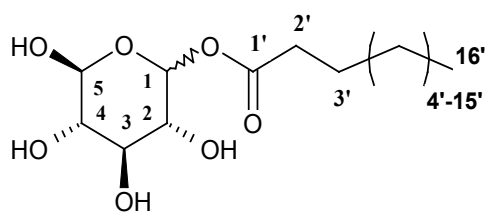


Fig. 2. 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose.

Enzyme reuse

Sugar fatty acid esters production catalyzed by immobilized lipases offers the possibility of easy reuse of the catalyst [18] which is very important to minimize costs and to make this process economically feasible. In this study, the reuse of immobilized *Candida antarctica* lipase B was investigated in enzymatic esterification

of D-xylose with palmitic acid. After the esterification reaction, the lipase was separated from the reaction medium by means of simple filtration. The recovered biocatalyst was then washed with 20 mL of Butanol ($\log P = 0.88$). Differences in solvent polarity have been used to explain their effect on the catalytic activity and specificity of reused CAL B [19]. Highest enzyme activities and stabilities are generally observed in solvents with high $\log P$ values.

Table 1 shows the conversions attained after the lipase washing with Butanol. According to this table, the relative fatty acid conversion attained after four cycle reuse is 60,48% at 60°C. The catalytic performance of CAL B to produce xylose palmitate ester during four consecutive cycles was observed. *Candida antarctica* lipase B was stable, retaining most of its original catalytic activity after consecutive uses. 98,84% and 91.11% of the original enzymatic activity of CAL B was still retained respectively after the second and the fourth cycles of the lipase reuse. It can be concluded that in most reuse assays, the behavior of CAL B was stable and the lipase could be reused for four cycles while maintaining its stability and activity.

Physicochemical Properties

Surfactants from renewable resources [20] are biodegradable and exhibit low toxicity (green surfactants) compared with those synthesized

TABLE 1. Enzyme reuse in the esterification reaction of xylose with palmitic acid

Used	Conversion (%)	Specific activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	65	8.67
2	63,42	8.57
3	62	8.25
4	60,48	7.90

from petroleum [21,22]. SFAE surfactants make up a very important group of surface active compounds due to advantages with regard to performance, consumer's health and environmental compatibility [23]. Various surface measurements were estimated, specifically Critical Micellar Concentration (CMC), effectiveness of surface tension reduction (γ_{CMC}), surface excess concentration (Γ), and area per molecule at the interface (A).

CMC and γ_{CMC} were obtained graphically from Fig. 3. 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose exhibit excellent surfactant properties characterized by a surface tension of 38 mN/m for a CMC of 0.01 mmol/L.

The surfactant surface excess concentration at the air/water interface, Γ , is estimated using the Gibbs [24] adsorption isotherm equation (1). Γ (Table 1) was obtained by calculating the slope of the straight line above the CMC in Fig. 3 and

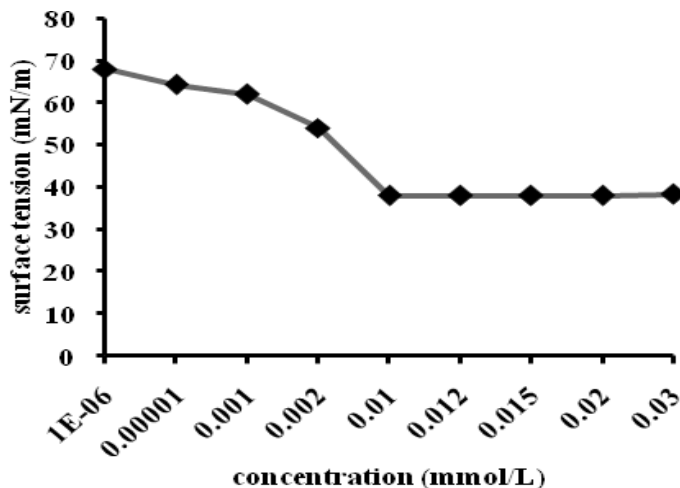


Fig. 3. Surface tension measurements for 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose in water.

calculated from:

$$\Gamma = \frac{1}{nRT} \left[\frac{\partial \gamma}{\partial \ln C} \right] \quad (1)$$

Where:

γ : surface tension ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$).

Γ : surface excess concentration ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$).

C: concentration of solution ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

R: universal gas constant ($R=8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

T: temperature (K).

n: constant of dissociation; n = 1 for nonionic surfactant.

The area per molecule, calculated from the formula (2) given below is 23 \AA^2 .

$$A = \frac{1}{Na\Gamma} \quad (2)$$

A: area per molecule at the interface (m^2).

N: Avogadro's number ($N = 6.023 \cdot 10^{23}$).

Γ : surface excess concentration (mol/m^2).

After the CMC, monomers of surfactants form aggregates called micelles. The micelle packing parameter P is calculated from (3). The equation is utilized to predict molecular self-assembly in surfactant solutions. Most probably, the value obtained for P (Table 2) is due to the length of hydrocarbon chain

and related to rodlike micelle of the adsorbed surfactant molecules.

$$P = \frac{V}{A \cdot l_t} \quad (3)$$

Where:

V: volume of the surfactant hydrocarbon chain (\AA^3).

l_t : hydrocarbon chain length (\AA).

The data (Table 2) revealed various advantages and potentials of 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose as a surfactant. According to Griffin [25], the HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) is a number on the scale of 1 to 40. It is used to predict what type of surfactant properties a molecular structure will provide. HLB is

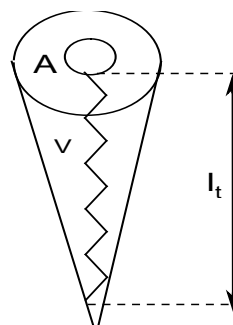
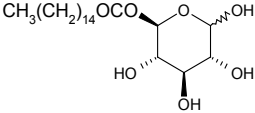


Fig. 4. Schematic illustration of surfactant volume in an aggregate.

TABLE 2. Physicochemical properties of 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose

Compound	HLB	CMC (mmol.L ⁻¹)	γ_{CMC} (mN.m ⁻¹)	Γ (mol.m ⁻²)	A (Å ²)	P (m ³)
	9,41	0,01	38	7,01.10 ⁻⁴	23	0,92

calculated from fractional ratio of hydrophobic part to hydrophilic part of surfactant [26]. Weight percentage of each type of group on a molecule predicts what behavior the molecular structure will exhibit [27]. 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose has an intermediate HLB number (Table 2) and behaves as an oil-in-water emulsifier. 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose is also characterized by a low CMC and appears very hydrophobic. A long hydrocarbon chain makes the surfactant more effective. The low value of the interfacial tension indicates the ability of using this surfactant in several applications. It can act as an emulsifier that will allow a compound that is normally insoluble to dissolve. The obtained values for surface excess concentration and the area per molecule at the interface indicate that it is characterized by good surface-active and self-aggregation properties. Due to surface activity and emulsifying capacity 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose is promising for applications in food industry [28,29].

Conclusion

Here we present the first report of xylose palmitic acid ester synthesis by enzymatic method with CAL B. Conversion of 65% is achieved in EMK and more than 90 % of initial activity of the lipase was still be retained after four cycle reuse. Surface tension measurements allow the determination of several important parameters. The most important feature of any given surfactant is its ability to reduce the surface tension of a liquid medium. 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose behaves as a nonionic-single chain surfactant. The obtained results in this paper could be further applied to predict the thickness and stability of emulsions, or the size of the rodlike micelles in solutions.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support provided by the Algerian Ministry of Scientific Research and Badji-Mokhtar University for providing financial assistance to conduct our research.

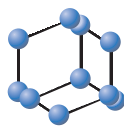
References

- Sharma, D., Sharma, B. and Shukla, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: A review. *Biotechnology*, **10**(1), 23-40 (2011).
- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 345-351 (2002).
- Sarney, D.B. and Vulfson, E.N. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol.*, **13**, 164-172 (1995).
- Yoo, I.S., Park, S.J. and Yoon, H.H. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. *J. Ind. Eng. Chem.*, **13**, 1-6 (2007).
- Klibanov, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biotechnol.*, **14**, 141-144 (1989).
- Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, New York (1995).
- Coulon D. and Ghoul M. The enzymatic synthesis of non-ionic surfactants: the sugar esters -An overview. *Agro Food Industry Hi-Tech.*, **9**, 22- 6 (1998).
- Uhl, P.B., Doderer, K., Hollmann, F., Thum, O. and Pleiss, J. Engineering of *Candida antarctica* lipase B for hydrolysis of bulky carboxylic acid esters. *J. Biotechnol.*, **150**, 474-480 (2010).
- Atanu, B., Shogren, R.L., Gordon, S., Salch, *Egypt.J.Chem.* **62**, No. 3 (2019)

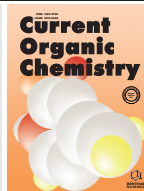
- J., Willett, J.L. and Charles, M.B. Rapid and environmentally friendly preparation of starch. *Carbohydr. Polym.*, **74**, 137-141 (2008).
10. Dhake, K.P., Thakare, D.D., Bhanage, and B.M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Frag. J.*, **28**, 71-83 (2013).
 11. Aguiéiras, E.G.C., Ribeiro, D.S., Coutinho, P.P., Bastos, C.M.B., de Queiroz, D.S., Parreira, J.M. and Langone, M.A.P. Investigation of the reuse of Immobilized lipases in biodiesel synthesis: influence of different solvents in lipase activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **179**, 485-496 (2016).
 12. Ha, S.H., Hiep, N.M., Lee, S.H. and Koo, Y.M. Optimization of lipase-catalyzed glucose ester synthesis in ionic liquids. *Bioprocess Biosys. Eng.*, **33**, 63-70 (2010).
 13. Leitgeb M. and Knez Z. The influence of water on the synthesis of n-butyl oleate by immobilized *Mucor miehei* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 775-778 (1990).
 14. Bouzaouit, N. and Bidjou-Haiour, C. Optimization of lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose ester using statistical experimental designs. *Der Pharma Chem.*, **7**(1), 261-269 (2015).
 15. Yoshida, Y., Kimura, Y., Kadota, M., Tsuno, T. and Adachi, S. Continuous synthesis of alkyl ferulate by immobilized *Candida antarctica* lipase at high temperature. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1471-1474(2006).
 16. Tarahomjoo, S. and Alemzadeh, I. Surfactant production by an enzymatic method. *Enzyme Microb. Technol.*, **33**, 33-37 (2003).
 17. Pedersen, N. R., Kristensen, J.B., Bauw, G., Ravoo, B.J., Darcy, R., Larsen, K.L. and Pedersen, L.H. Thermolysin catalyses the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**(3), 615-622 (2005).
 18. Rodrigues, R.C., Godoy, C.A., Filice, C.A., Bolivar, J.M., A. Palau-Ors, Garcia-Vargas, J.M., Romero, O., Wilson, L., Ayub, M. A. Z., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J.M. Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem.*, **44**, 641-646 (2009).
 19. Aguiéiras, E.C., Ribeiro, D.S., Coutinho, P.P., Bastos, C. M., de Queiroz, D.S., Parreira, J.M. and Langone, M.A.P. Investigation of the reuse of immobilized lipases in biodiesel synthesis: influence of different solvents in lipase activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **179**(3), 485-496 (2016).
 20. Negm, N. A., El Hashash, M. A., Ismail, E. A., Zizi Abdeen and Abdel Rahman, N. R. Polyurethane nonionic surfactants and their nanoparticles: synthesis and characterization of their structures. *Egypt. J. Chem.* **59**(4), 597-607 (2016).
 21. Baker, I.J.A., Matthews, B., Soares, H., Krodkiewska, I., Furlong, D.N., Grieser, F. and Drummond, C.J. Sugar fatty acid ester surfactants: structure and ultimate aerobic biodegradability. *J. Surf. Deterg.*, **3**, 1-11 (2000).
 22. Hebash, K.A., Ahmed, M.H.M. and El-Hady, G.F. Synthesis of nonionic surfactants by treating some petroleum derivatives, *Egypt. J. Chem.* **55**(6), 625- 638 (2012).
 23. Ron, E. Z. and Rosenberg, E. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, **3**(4), 229-236 (2001).
 24. Balbuena, L.M., Jiménez, A.A., Hernández-Zapata, E. and Márquez-Beltrán, C. Applicability of the Gibbs Adsorption Isotherm to the analysis of experimental surface-tension data for ionic and nonionic surfactants. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **247**, 178-184 (2017).
 25. Griffin, W.C. Classification of surface-active agents by 'HLB'. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1**, 311 (1949).
 26. Griffin, W.C. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **5**, 259 (1954).
 27. Pasquali, C. R., Taurozzi, M.P. and Bregni, C. Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. *Int.J.Pharm.* **356**, 44-51(2008).
 28. Weil, J.K., Stirton, A.J. and Nanez Ponzoa, M.V. Ether alcohol sulfates. The effect of oxypropylation and oxybutylation on surface active properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **43**(11), 603-606 (1966).
 29. Schramm, L.L., Stasiuk, N. S. and Marangoni D. Surfactants and their applications. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C.*, **99**, 3-48 (2003).

(Received 17/9/2018;
accepted 14/11/2018)

RESEARCH ARTICLE

BENTHAM
SCIENCE

Lipase Catalyzed Synthesis of D-xylose-based Biosurfactants and their Surface Properties

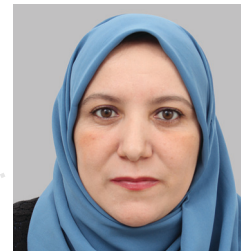
Fatma Loulou^{1*} and Chahra Bidjou-Haiour¹¹LOMOP, Organic Synthesis and Modeling Group, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Badji-Mokhtar University, BP 12 El-Hadjar, Annaba 23000, Algeria

ARTICLE HISTORY

Received: June 27, 2023
Revised: August 20, 2023
Accepted: September 05, 2023DOI:
10.2174/0113852728269186231009103910

CrossMark

Abstract: Synthesis of a homologous series of 1-O-acyl xylose esters with long and very long acyl chains derived from fatty acids was performed via enzymatic esterification in one step using *Candida antarctica* lipase B. The effect of fatty acid chain length on the activity of the lipase was evaluated. Subsequently, the surface properties of the obtained products have been determined such as hydrophilic-lipophilic balance, critical micellar concentration, and surfactant packing parameter. Foaming and emulsifying ability were also measured. The highest conversion was obtained by using docosanoic acid as an acylant agent (67.50%). The surface tension values are between 25 mN.m⁻¹ for 1-O-octadecanoyl-D-xylopyranose and 47,17 mN.m⁻¹ for 1-O-docosanoyl-D-xylopyranose. The emulsifying abilities of all esters exceeded 80%. It was found that the surface properties of the surfactants are greatly affected by the fatty acid chain length. The surface parameters results revealed that the prepared compounds have a good surface activity. Additionally, these bio-surfactants display good emulsifying ability.



Fatma Loulou

Keywords: Lipase, 1-O-acyl xylose esters, fatty acid, bio-surfactants, surface properties, enzymatic esterification.

1. INTRODUCTION

Sugar fatty acid esters (SFAE) are known as non-ionic and non-toxic amphiphilic biosurfactants. Due to their diversity, biodegradability, and biocompatibility [1, 2], they are very useful in several areas such as the food, cosmetic, and pharmaceutical industries [3]. Moreover, they have some interesting properties that make them green alternative products such as antimicrobial activities [4, 5], antitumor activity [6], and antifungal activities [7]. In addition to their biological activities, they are used for their surface-active properties such as foaming power, emulsifying ability, detergency effect, adhesion, and stabilization [8-10]. They are widely applied in pharmaceutical productions to solubilize, and stabilize drugs against degradation throughout their transport in biological systems owing to their biocompatibility and their self-assembly property [11]. The interaction between surfactants and drugs increases their bio-availability [12]. They can be synthesized by chemical or enzymatic pathway. Recently, the bio-catalysis of esterification by enzymes in organic solvents has become an important process for its sustainability [13]. Lipases are broadly involved in this type of reaction for their high selectivity, among them *Candida antarctica* lipase B (CAL B) which is actively investigated due to its stability in mild reaction conditions [14] and reusability as immobilized lipase [15, 16]. It has been chosen for its high selectivity and thermal stability. Authors find that CAL B is fully functional at high temperatures in various solvents [17]. Those properties make this enzyme an efficient, economical, and eco-friendly biocatalyst [18]. Surfactants are compounds able to create self-assembled molecular clusters. In aqueous medium, the hydrophilic groups interact with water molecules, while the hydrophobic groups are excluded from

the aqueous environment [19]. The packing of the hydrocarbon chains results from the repulsion between the polar heads. This self-organized structure phenomenon is called micelles [20]. Their aggregates take different shapes which depend on the nature of the head group and the hydrophobic chain. They are also characterized by interfacial adsorption; it is their property to adsorb to the interface between a solution and a different phase (gas/solid) due to the amphiphilic structure. These active agents decrease the interfacial tension between the two immiscible phases [21, 22]. They are also characterized by the Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) number. It is a tool that indicates the relative characteristics of nonionic surfactants which are suitable for several applications, emulsifiers, solubilizers, wetting, and antifoaming agents [23, 24]. Herein, we report CAL B-catalyzed esterification of xylose by fatty acids for the synthesis of biosurfactants in one step. In this work, xylose was selected as the starting material due to its abundance in nature. It is the second most abundant sugar obtained from the biomass [25, 26]. Fatty acid esters as bio-surfactants could be used in Heck coupling reactions to overcome the problem of diffusion of reagents between the two phases [27] like other natural biosurfactants that have been used in coupling reactions [28]. The fatty acid hydrophobic chain was varied between 12 to 22 carbon units. We also report surface-tension and critical micellar concentration data for the synthesized xylose bio-based surfactants and obtained parameter values were discussed. Emulsifying and foaming properties were also estimated.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Effect of Chain Length on Enzymatic Esterification of Xylose

Synthesis of xylose esters was carried out by immobilized *Candida antarctica* lipase B as a biocatalyst. The obtained monoesters were acylated at an anomeric position which is more reactive

*Address correspondence to this author at the LOMOP, Organic Synthesis and Modeling Group, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Badji-Mokhtar University, BP 12 El-Hadjar, Annaba 23000, Algeria; E-mail: lindabio18@yahoo.fr

than the other hydroxyl groups. The ^1H NMR spectra are not suitable to assign the anomeric configuration (very close coupling constants), especially for compounds 4 and 3. Other ^1H NMR signals also overlapped each other. However, ^{13}C NMR spectroscopy gives a clear distinction of the signals of the two esters anomers α and β . The effect of the modification of the fatty acid tail length from 12 to 22 carbon units was investigated. A significant correlation between the activity of the lipase and the length chain of the used fatty acid was found. Table 1 shows the time course of the esterification reaction.

The obtained conversions varied from 22.5% for dodecanoic acid to 67.50% for docosanoic acid. In the esterification of xylose with dodecanoic acid, a maximum conversion of 22.5% after 48 hours of reaction is obtained (Table 1). CAL B shows low esterification activity under the studied conditions and 1-*O*-dodecanoyl-D-xylopyranose **1** is obtained. The synthesis of 1-*O*-hexadecanoyl-D-xylopyranose was carried out under the same operating conditions with a conversion of 42.86% after 48 h. This value is close to those obtained by tetradecanoic acid (41.18%) and octadecanoic acid (43.35%). In the esterification of xylose with eicosanoic acid a good conversion of 50.75% is obtained after 48 h as shown in Table 1. An increase in conversion is also observed with docosanoic acid, 67.5% after 48 hours. The highest enzyme activity is observed with increasing fatty acid chain length which enhances the conversion. The obtained yields were moderate. According to these results, the chain length of acyl donors has an important influence on the conversion rate and behenic acid gives the highest conversion compared to other used fatty acids. Accordingly, the fatty acid with the longest chain may be more favored to access easily the active site. These results are in agreement with published studies on fructose and glucose with different chain lengths [29, 30].

Understanding the structure and function of enzymes is very important to explain these results. Lipases operate in a lipid-water interface [31] and when the concentration of substrate is high enough to lead to the formation of micelles aggregates or emulsion,

the lipase displays a high activity because it is more active in a heterogeneous system [32, 33]. The catalytic activity of lipases is controlled by an amphipathic structure known by the name lid helix α which is located over the active site [34]. Before reaching micellization the lipase is inactive. The enzymatic activity requires an interfacial activity for the mobility of the lid. In such conditions, the enzyme changes its conformation by moving the helicoidal lid. It is important to mention that the lid opening is driven by the hydrophobic interaction with the core of the micelle. Due to the presence of a catalytic amount of water and fatty acids, these apolar substrates form micelles. This change creates a large hydrophobic patch around the catalytic triad. *Candida antarctica* B lipase is an interfacial enzyme, it possesses a hydrophobic patch near the lipid binding and a hydrophilic nature at the back. This particular structure allows an orientation of the molecule in the water-lipid interface. According to the study realized by Zisis *et al.* [35] the volume of substrates and their hydrophobicity enhance the catalytic rate as demonstrated in our study. CAL B displays good activity for large bulky substrates composed of densely alkyl chains.

2.2. Surface-active Properties

2.2.1. Surface Tension Measurement

To establish a relationship between the chain length of the obtained xylose monoesters and their surface-active properties, surface tension (γ), critical micellar concentration (CMC), The surface excess concentration (Γ), area per molecule (A) and packing parameter (P) of synthesized compounds were determined (Table 2).

The data shown in Table 2 indicate that the surface tension values (γ_{CMC}) increase with increasing of the fatty acid chain length from 30 mN/m for xylose laureate (**1**) to 47.17 mN/m for xylose behenate (**6**). An exception is noted for compound **4** which exhibits a low (γ_{CMC}). Surfactant properties of compounds **1** and **4** were reported in our previous study [36]. These results could be explained by the steric hindrance due to the coiling of the hydrophobic chain, which leads to a hydrophobic interaction that is better

Table 1. Reaction kinetics for xylose esters production.

Fatty Acid	Conversion (%)			
	2 h	24 h	48 h	72 h
Dodecanoic acid	0	15	22.5	12.5
Tetradecanoic acid	23.53	23.53	41.18	38.82
Hexadecanoic acid	8.57	37.14	42.86	14.29
Octadecanoic acid	5.56	16.67	43.35	41.67
Eicosanoic acid	0	16.67	50.75	50.6
Docosanoic acid	17.5	37.5	67.5	62.5

Table 2. Surfactant properties of xylose esters.

Compound	HLB	CMC (mmol/L)	γ_{m} (mN/m)	$\Gamma \times 10^{-5}$ (mol/m ²)	A (Å ²)	P
1	10.65	0.15	30.0	0.39	43	0.48
2	9.82	0.028	37.78	1.97	8.43	2.49
3	9.11	0.01	38	0.708	23.4	0.92
4	8.50	0.09	25.0	0.68	24.5	0.86
5	7.96	0.008	45	0.66	25.08	0.84
6	7.49	0.007	47.17	0.95	17.45	1.21

known as stronger than the Van der Waals forces since the pioneering work of Kauzman [37], in addition to the low solubility of these surfactants in water.

Graphically the critical micellar concentration CMC is obtained at the concentration for which the surface tension remains constant. It is the point from which the molecules self-aggregate to form micelles [38]. Synthesized acyl xylose fatty esters exhibit excellent surfactant properties characterized by CMC of 0.15 to 0.007 mmol/L. Docosanoyl- α,β -D-xylopyranose (**6**) is characterized by a lower CMC and appears more hydrophobic and a more efficient surfactant. In this study, we find that the CMC decreases, when the hydrophobicity increases, so we need a low concentration of the surfactant to reduce the surface tension. From those results, we can conclude that all obtained products show an ability to reduce surface tension. Similar results have been observed in the literature [7, 21, 39].

It is worth noting that for xylose-based surfactants with the same hydrophilic head, the chain length has a great effect on the properties of the surfactant in solution. Results show that CMC values decrease with the decrease of HLB values (see Tables) which indicates the increase in chain lengths of used fatty acids in this work. The increase in the carbon chain leads to an increase in lateral pressure [40].

On the other hand, the main advantage of using surfactants with a long carbon chain is the low concentration required to reduce the surface tension which can reach 0.008 mmol for xylose arachidate (C20) and 0.007 mmol for xylose behenate (C22).

2.2.2. The Surface Excess Concentration (Γ) and the Area Per Molecule (A)

From the slope of the curve in Fig. (1) the superficial excess per unit area Γ and the corresponding molecular area A were calculated by Gibbs' adsorption isotherm relationship Eq. (1).

$$\Gamma = \frac{1}{2.303nRT} \left(\frac{\delta\gamma}{\delta \ln C} \right) \quad (1)$$

Where γ is the surface tension (N/m); Γ the surface excess per unit area (mol/m^2); C the surfactant concentration (mol/L); R the gas constant ($R = 8,314 \text{ J/mol K}$); T the temperature (K) and n the dissociation constant ($n = 1$ for the nonionic surfactant).

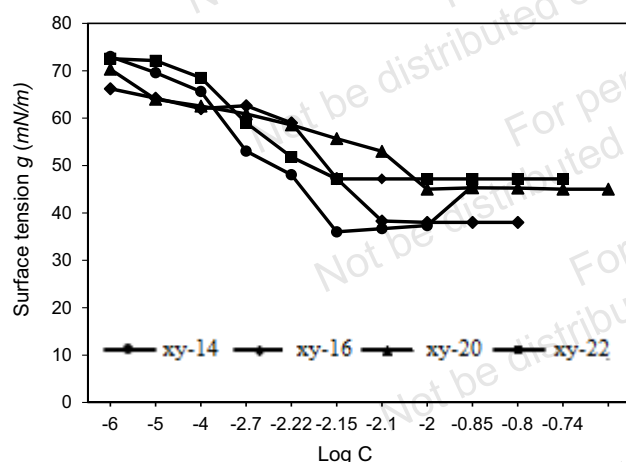


Fig. (1). Surface tension measurements for xylose esters in water. xy-14: 1-O-tetradecanoyl- α,β -D-xylopyranose, xy-16: 1-O hexadecanoyl- α,β -D-xylopyranose, xy-20: 1-O-eicosanoyl- α,β -D-xylopyranose, xy-22: 1-O-docosanoyl- α,β -D-xylopyranose. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

The values of surface excess are between $0.39 \times 10^{-5} \text{ mol/m}^2$ and $1.97 \times 10^{-5} \text{ mol/m}^2$, so those molecules form micelles by association

of their tails but they also can adsorb at interfaces, this behavior is due to monomer/micellar diffusion and micellar dissociation [41].

The area per molecule indicates the degree of aggregation and the behavior of the surfactant at the interface. It is determined from an excess of surface according to the Eq. (2):

$$A = \frac{10}{N\Gamma} \quad (2)$$

Where A is the area per molecule (m^2); N is the Avogadro number ($N = 6.023 \times 10^{23}$) and Γ is the surface excess per unit area (mol/m^2).

It is noted that the value of the surface area per molecule occupied by a surfactant molecule at the solution-air interface whose chain lengths are C16, C18, and C20 includes between 23 and 25 Å while the area of behenate of xylose is 17.45 Å. These results may be explained by the coiling of those molecules at the interface. In the case of myristate of xylose, this phenomenon is more important with a reduction of the area to 8.43 Å. Whereas in the case of xylose laurate (C12), we observe that it behaves differently with a value of 43 Å. This result may be explained by the lying flat of this molecule at the interface therefore it occupied an increased area.

2.2.3. Packing Parameter (P)

The molecule packing parameter proposed by Israelachvili *et al.* [42] is widely used to predict molecular self-assembly in surfactants. The packing parameter values P were calculated using the following Eq. (3):

$$P = V / A \cdot l_t \quad (3)$$

Where V is the volume of the detergent chain (\AA^3), l_t is the chain length (\AA), and A the area of the section at the interface (\AA^2).

The shape of the monomer and the micelle depends on the area and the packing parameter. The comparative study shows that the micellar aggregated structure of the xylose palmitate (C16), xylose stearate (C18), and xylose arachidate (C20) take the same shape, a planar bilayer ($P \approx 1$). The micelle aggregated structure of xylose myristate (C14) and xylose behenate (C22) has the shape of inverted micelles ($P > 1$). The molecules of xylose laurate cluster together to form worm-like micelles, $P = 0.48$ ($1/3 < P < 1/2$).

2.2.4. Emulsifying Ability and Stability

The measurement of the emulsifying ability of the products at 25 °C shows that the emulsifying power values of synthesized compounds are between 83.33% and 100%. Fig. (2) shows that the chain length increases the emulsifying ability of the surfactants in the case of compounds **1**, **2**, **3**, and **4**. Similar results with sugar monoesters comprising chain lengths ranging from C8 to C12 are obtained by the authors [7].

Except for compounds **5** and **6** which also have a good emulsifying power greater than 84%, the emulsifying power increases proportionately with the increase in the number of methylene groups CH_2 . This can be explained by the hydrophobic interaction between the alkyl chain of esters and oil droplets.

The emulsifying stability decreases over time but remains considerable for compound as shown in Fig. (3). The most stable products after 72 h are compounds **1**, **3** and **4**. Stability of the other compounds remains above 60%.

2.2.5. Foamability and Foaming Stability

The foamability for all aqueous surfactant solution of synthesized products and the foaming stability as a function of time has been measured. The foamability curve (Fig. 4) shows that the longer the chain, the less foaming the considered surfactant is. Among the tested surfactants those considered to be more effective are the

compound **1** and **2**. The best foaming agent is obtained by the laurate of xylose (28,89%). Whereas the stearate of xylose **4** has a low ability (2,04%) which stays stable after 45 min. Xylose monoesters with a high chain length (C20 and C22) show no foaming ability (0%), They had a high surface tension (Table 2) indicating that they were not able to migrate quickly to the interface [43].

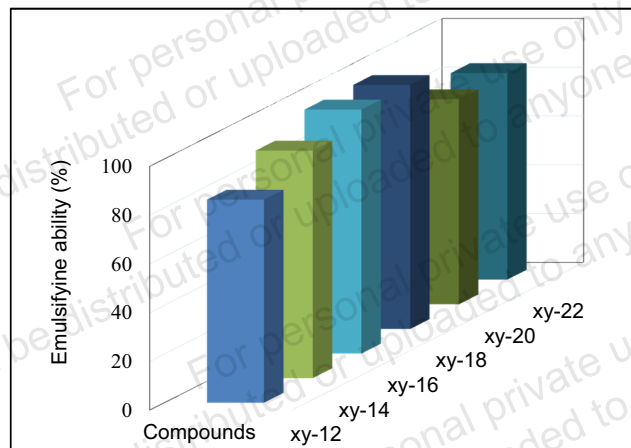


Fig. (2). Emulsifying ability of xylose esters products: xy-12: 1-O-dodecanoyl-D-xylopyranose, xy-14: 1-O-tetradecanoyl-D-xylopyranose, xy-16: 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose, xy-18: 1-O-octadecanoyl-D-xylopyranose, xy-20: 1-O-eicosanoyl-D-xylopyranose, xy-22: 1-O-docosanoyl-D-xylopyranose. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

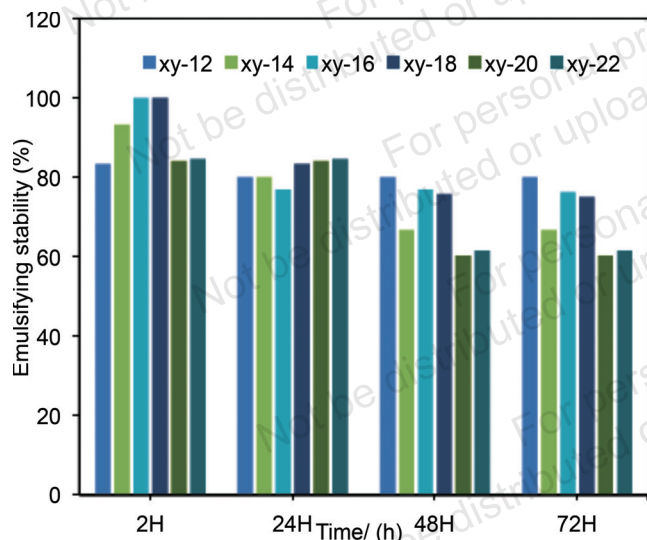


Fig. (3). Emulsifying stability of xylose esters products: xy-12: 1-O-dodecanoyl-D-xylopyranose, xy-14: 1-O-tetradecanoyl-D-xylanopyranose, xy-16: 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose, xy-18: 1-O-octadecanoyl-D-xylopyranose, xy-20: 1-O-eicosanoyl-D-xylopyranose, xy-22: 1-O-docosanoyl-D-xylopyranose. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

The foam stability of compounds **1**, **2** and **3** decreased during standing time while the foam formed by xylose stearate was still stable at 45 min as shown in Fig. (5). The higher foam stability of xylose stearate may be attributed to the shape of bubbles formed and their structures properties.

2.2.6. The Hydrophilic-lipophilic Balance (HLB)

The hydrophilic-lipophilic balance HLB value allows drawing significant conclusions on the behavior of oil/water/surfactant sys-

tems where the HLB number is usually on a scale of 0–20. The higher the HLB value, the more hydrophilic the surfactant is (high water-solubility of surfactant); and in turn, the lower the HLB value, the more lipophilic the surfactant is (high oil affinity of surfactant). HLB values were calculated from the following equation, according to Griffin [44] Eq. (4):

$$HLB = 20 \frac{M_H}{M} \quad (4)$$

Where M_H is the molar mass of the hydrophilic share and M is the total molecule mass of the surfactant.

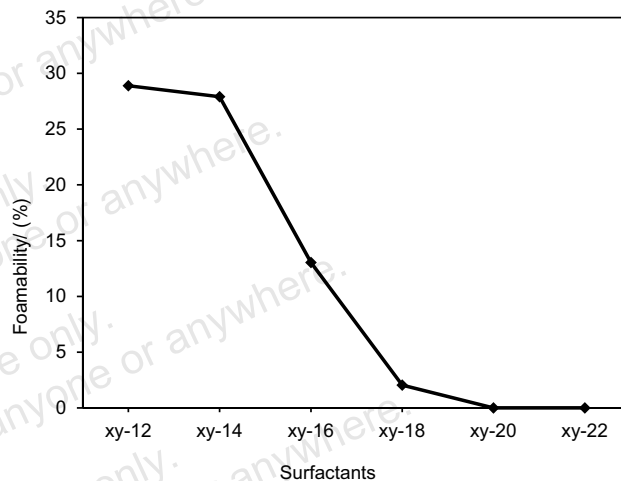


Fig. (4). Foamability of synthesized surfactants: xy-12: 1-O-dodecanoyl-D-xylopyranose, xy-14: 1-O-tetradecanoyl-D-xylopyranose, xy-16: 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose, xy-18: 1-O-octadecanoyl-D-xylopyranose, xy-20: 1-O-eicosanoyl-D-xylopyranose, xy-22: 1-O-docosanoyl-D-xylopyranose. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

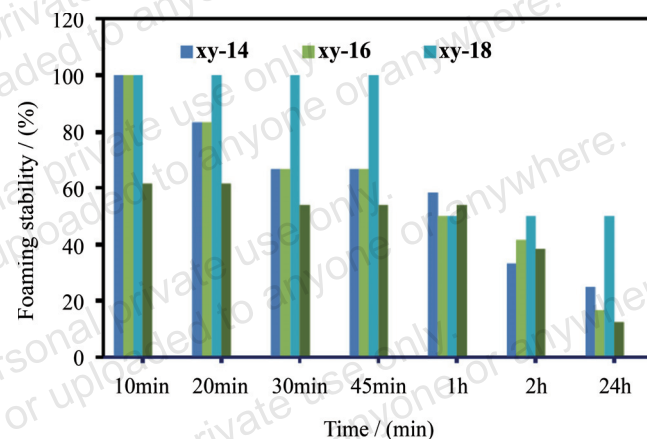


Fig. (5). Foaming stability of synthesized surfactants: xy-12: 1-O-dodecanoyl-D-xylopyranose, xy-14: 1-O-tetradecanoyl-D-xylanopyranose, xy-16: 1-O-hexadecanoyl-D-xylopyranose, xy-18: 1-O-octadecanoyl-D-xylopyranose, xy-20: 1-O-Eicosanoyl-D-xylopyranose, xy-22: 1-O-docosanoyl-D-xylopyranose. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Results summarized in Table 2 allow us to conclude that the HLB of the obtained products decreases when the chain length increases. Results show that the fatty acid with a low HLB is more favorable in the esterification of sugar because it is quite adsorbed to a hydrophobic interface and the lipase has a high affinity to these substrates.

The foamability of the tested products depends on the HLB value, products with high HLB are the most foaming. The lower the HLB, the less soluble is the product in the water and therefore the foam formation is low as in the case of compounds **5** and **6** that float on the surface. The foaming stability obtained by different surfactant solutions in Fig. (5) shows that the stability of the foam formed by compound **1** decreases over time. The most stable is compound **4** but its foamability is very weak.

Since the synthesized products have a hydrophobic part where the HLB value is between 7.45 and 10.65 (Table 2), they have an oil-in-water emulsion property [45]. The results shown in Fig. (2) demonstrated that all the surfactant has an emulsifying ability greater than 80%.

3. MATERIALS AND METHODS

Novozyme 435 (*Candida antarctica* type B lipase immobilized on acrylic resin) was purchased from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). Substrates (xylose, fatty acids), solvents, and other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich and Merck.

3.1. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

The ^1H NMR was carried out using a Bruker A 400 apparatus in CDCl_3 and DMSO-d_6 with a frequency of 400 MHz.

3.2. Spectroscopic Analysis using Fourier Transformed Infrared (FTIR)

The FTIR (ATR) spectroscopy was carried out on a Bruker apparatus. A regular scanning range of $4000\text{--}370\text{ cm}^{-1}$ was used for 32 repeated scans. All the spectra were recorded with transmission mode.

3.3. Homogenizer

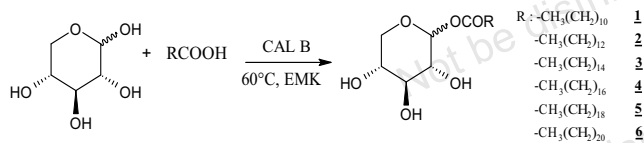
Homogenizer vertical HOHTDG (Min: 300 rpm (1 885 $\text{rad}\cdot\text{min}^{-1}$) Max: 1600 rpm (10053, $1\text{rad}\cdot\text{min}^{-1}$).

3.4. Thin-layer Chromatography

Thin-layer chromatography was performed on silica gel plates using dichloromethane-methanol (9:1 v/v) as the eluting system for compounds **1,3** and **4** and dichloromethane-methanol (9:0.5 v/v) as the eluting system for the other compounds. The purification of D-xylose esters was performed by silica gel chromatography (9385 Merck Kiesel gel 60, 230–400 mesh, 40–63 μm).

3.5. Xylose Surfactant Synthesis

SFAE were prepared by esterification of D-xylose with 2 equivalents of lauric (dodecanoic), myristic (tetradecanoic), palmitic (hexanoic), stearic (octadecanoic), arachidic (eicosanoic) and behenic (docasanoic) acids using *Candida antarctica* lipase B (CAL B) as a biocatalyst. Reactions were carried out at 60°C in ethylmethylketone (EMK) (Scheme 1).

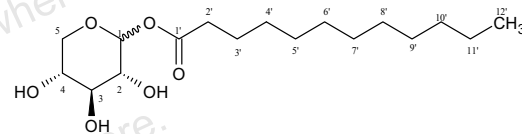


Scheme 1. Synthesis of 1-O-acyl xylose fatty esters.

The progress of the esterification was determined by the titration method [46] which makes it possible to estimate the remainder of the acid contained in the reaction medium. When the reactions reach the highest conversion that depends on reagents, the enzyme

is removed by vacuum filtration followed by the evaporation of the solvent. The cold extraction of raw product with acetone is an important phase to get rid of the excess of the acylating agent. The products are finally purified by column chromatography.

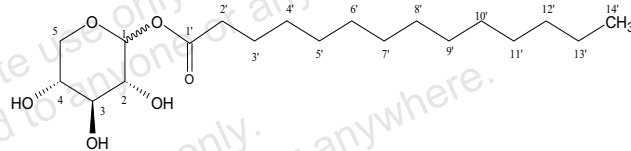
The chemical structures of the synthesized surfactants (Scheme 1) were confirmed using ^1H NMR, ^{13}C NMR and FTIR-ATR.



1-O-dodecanoyl- α,β -D-xylopyranose (**1**)

This compound (**1**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with D-xylose (1g, 6.66 mmol) in 25 mL of EMK, lauric acid (4.42 g, 13.32 mmol), 300 mg of CAL B, and molecular sieves (4 Å), 250 rpm. Yield: 32.40%, Rf: 0.66 in chloroform/methanol (9:1, v/v) as the chromatography eluent [27].

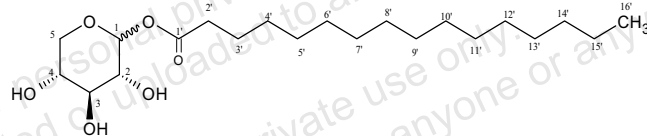
^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ 0.81 (m, 6H, $\text{H}_{12'\alpha,\beta}$), 1.24 (m, 32H, $\text{H}_{4'\alpha,\beta-11'\alpha,\beta}$), 1.5 (m, 4H, $\text{H}_{3'\alpha,\beta}$), 2.1 (m, 4H, $\text{H}_{2'\alpha,\beta}$), 5.3–3.3 (m, 18H, α,β -xylose); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 62.9 MHz) δ 13.8 ($\text{C}_{12'}$), 22.0 ($\text{C}_{11'}$), 23.0 ($\text{C}_{10'}$), 24.3 (C_9), 28.3–29.4 ($\text{C}_4\text{--}\text{C}_8$), 30.8 (C_3), 32.8 (C_2), 61.1 ($\text{C}_{5\alpha}$), 65.0 ($\text{C}_{5\beta}$), 71.0 ($\text{C}_{4\alpha}$), 71.4 ($\text{C}_{4\beta}$), 73.5 ($\text{C}_{3\alpha}$), 74.1 ($\text{C}_{3\beta}$), 75.0 ($\text{C}_{2\alpha}$), 77.6 ($\text{C}_{2\beta}$), 98.0 ($\text{C}_{1\alpha}$), 100.0 ($\text{C}_{1\beta}$), 172.5 ($\text{CH}_2\text{CO}_\alpha$), 173.6 ($\text{CH}_2\text{CO}_\beta$); IR (ATR): ν / cm^{-1} 3446.08, 2915.28, 2849.70, 1728.54, 1040.67.



1-O-tetradecanoyl- α,β -D-xylopyranose (**2**)

This compound (**2**) was obtained as a yellow powder following the general procedure previously described with D-xylose (1 g, 6.66 mmol) in 25 mL of EMK, myristic acid (4.80 g, 13.32 mmol), 300 mg of CAL B, and molecular sieves (4 Å), 250 rpm. Yield: 45.84%, Rf: 0.20 in chloroform/methanol (9.5:0.5, v/v) as the chromatography eluent.

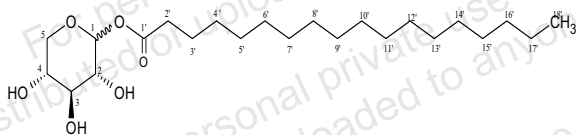
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, J 6.7 Hz, 6 $\text{H}_{14'\alpha,\beta}$), 1.47–1.11 (m, 40 $\text{H}_{4'\alpha,\beta-13'\alpha,\beta}$), 1.79–1.46 (m, 4H, $\text{H}_{3'\alpha,\beta}$), 2.38 (t, 4H, $\text{H}_{2'\alpha,\beta}$), 5.67–3.14 (m, 18H, α,β -xylose) (Fig. S1); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 14.09 ($\text{C}_{14'}$), 22.68 ($\text{C}_{13'}$), 24.83 ($\text{C}_{12'}$), 24.87 ($\text{C}_{11'}$), 24.91 ($\text{C}_{10'}$), 31.92–29.36 ($\text{C}_4\text{--}\text{C}_9$), 34.42 (C_2), 34.19 (C_3), 63.41 ($\text{C}_{5\alpha}$), 67.72 ($\text{C}_{5\beta}$), 69.98 ($\text{C}_{4\alpha}$), 70.32 ($\text{C}_{4\beta}$), 72.37 ($\text{C}_{3\alpha}$), 74.36 ($\text{C}_{3\beta}$), 90.65 ($\text{C}_{2\alpha}$), 92.60 ($\text{C}_{2\beta}$), 95.85 ($\text{C}_{1\alpha}$), 97.01 ($\text{C}_{1\beta}$), 174.03 ($\text{CH}_2\text{CO}_\alpha$), 174.75 ($\text{CH}_2\text{CO}_\beta$) (Fig. S2); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3356.56, 2849.76, 2914.24, 1713.43, 1037.13 (Fig. S3).



1-O-hexadecanoyl- α,β -D-xylopyranose (**3**)

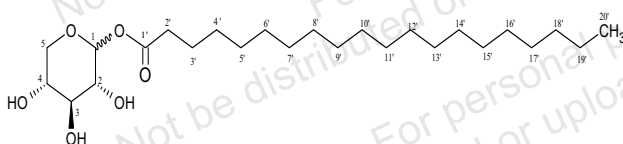
This compound (**3**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with D-xylose (1 g, 6.66 mmol) in 25 mL of EMK, palmitic acid (5.17g, 13.32 mmol), 300 mg of CAL B, and molecular sieves (4 Å), 250 rpm. Yield: 65.44%, Rf: 0.45 in chloroform/methanol (9:1, v/v) as the chromatography eluent.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, J 6.8 Hz, 6H, $\text{H}_{16(\alpha,\beta)}$), 1.46–1.13 (m, 48H, $\text{H}_{4',\alpha,\beta-15',\alpha,\beta}$), 1.75–1.49 (m, 4H, $\text{H}_{3',\alpha,\beta}$), 2.51–2.22 (m, 4H, $\text{H}_{2',\alpha,\beta}$), 5.64–3.14 (m, 18H, α,β -xylose) (Fig. S4); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 14.10 (C_{16}), 22.68 (C_{15}), 29.36–31.92 (C_3 – C_{14}) 34.39 (C_2), 63.49 ($\text{C}_{5\alpha}$), 67.77 ($\text{C}_{5\beta}$), 73.37 ($\text{C}_{4\beta}$), 74.42 ($\text{C}_{4\alpha}$), 90.71 ($\text{C}_{3\alpha}$), 92.60 ($\text{C}_{3\beta}$), 95.79 ($\text{C}_{2\alpha}$), 96.22 ($\text{C}_{2\beta}$), 100.64 ($\text{C}_{1\alpha}$), 102.91 ($\text{C}_{1\beta}$), 173.97 ($\text{CH}_2\text{CO}\alpha$), 174.72 ($\text{CH}_2\text{CO}\beta$) (Fig. S5); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3348.40, 2914.02, 2848.71, 1713.84, 1035.50 (Fig. S6).

1-O-octadecanoyl- α,β -D-xylopyranose (4)

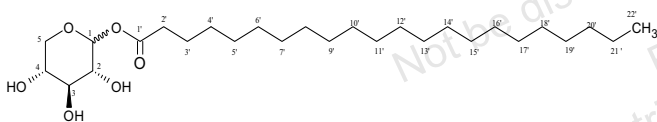
This compound (4) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with D-xylose (1g, 6.66 mmol) in 25 mL of EMK, stearic acid (5.56g, 13.32 mmol), 300 mg of CAL B, and molecular sieves (4 Å), 250 rpm. Yield 65.79%, Rf: 0.71 in chloroform/methanol (9:1, v/v) as the chromatography eluent [27].

^1H NMR (250MHz, DMSO-d_6) δ 0.80 (m, 6H, $\text{H}_{18(\alpha,\beta)}$), 1.2 (m, 56H, $\text{H}_{4',\alpha,\beta-17',\alpha,\beta}$), 1.4 (m, 4H, $\text{H}_{3',\alpha,\beta}$), 2.2 (m, 4H, $\text{H}_{2',\alpha,\beta}$), 3.1–4.9 (m, 18H, α,β -xylose); ^{13}C NMR (62.9 MHz, DMSO-d_6) δ 14.2 (C_{18}), 22.5 (C_{17}), 23.6 (C_{16}), 24.8 (C_{15}), 28.8–29.6 (C_4 – C_{14}), 31.7 (C_3), 33.9 (C_2), 61.0 ($\text{C}_{5\alpha}$), 64.1 ($\text{C}_{5\beta}$), 69.9 ($\text{C}_{4\alpha}$), 70.4 ($\text{C}_{4\beta}$), 72.5 ($\text{C}_{3\alpha}$), 73.3 ($\text{C}_{3\beta}$), 75.0 ($\text{C}_{2\alpha}$), 77.7 ($\text{C}_{2\beta}$), 97.1 ($\text{C}_{1\alpha}$), 99.6 ($\text{C}_{1\beta}$), 173.6 ($\text{CH}_2\text{CO}\alpha$), 174.1 ($\text{CH}_2\text{CO}\beta$); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3346.90, 2954.94, 2848.24, 1720.54, 1042.43.

1-O-eicosanoyl- α,β -D-xylopyranose (5)

This compound (5) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with D-xylose (1 g, 6.66 mmol) in 25 mL of EMK, arachidic acid (5.92 g, 13.32 mmol), 300 mg of CAL B, and molecular sieves (4 Å), 250 rpm. Yield: 66.42%, Rf: 0.18 in chloroform/methanol (9.5:0.5, v/v) as the chromatography eluent.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 0.88 (t, J 6.7 Hz, 6H $\text{H}_{20\alpha,\beta}$), 1.50–1.08 (m, 64 H, $\text{H}_{4',\alpha,\beta-19',\alpha,\beta}$), 1.78–1.52(m, 4H, $\text{H}_{3\alpha,\beta}$), 2.53–2.19 (m, 4H, $\text{H}_{2\alpha,\beta}$), 5.40–3.04 (m, 18H, α,β -xylose) (Fig. S7); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 14.10 (C_{20}), 22.70 (C_{19}), 24.78 (C_3), 29.12–31.95 (C_4 – C_{17}), 33.74 (C_{18}), 34.40 (C_2), 61.51 ($\text{C}_{5\alpha}$), 63.62 ($\text{C}_{5\beta}$), 64.85 ($\text{C}_{4\alpha}$), 67.84 ($\text{C}_{4\beta}$), 70.08 ($\text{C}_{3\alpha}$), 71.81 ($\text{C}_{3\beta}$), 73.52 ($\text{C}_{2\alpha}$), 74.55 ($\text{C}_{2\beta}$), 92.66 ($\text{C}_{1\beta}$), 90.81 ($\text{C}_{1\alpha}$), 174.74 ($\text{CH}_2\text{CO}\alpha$), 177.53 ($\text{CH}_2\text{CO}\beta$) (Fig. S8); IR (ATR) ν / cm^{-1} 3440.60, 2914.10, 2848.61, 1727.46, 1037.14 (Fig. S9).

1-O-docosanoyl- α,β -D-xylopyranose (6)

This compound (6) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with D-xylose (1g, 6.66 mmol) in 25 mL of EMK, behenic acid (6.29 g, 13.32 mmol), 300 mg of CAL B and molecular sieves (4 Å), 250 rpm. Yield: 68.07%,

Rf: 0.23 in chloroform/methanol (9.5:0.5, v/v) as the chromatography eluent.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, J 6.7 Hz, 6H, $\text{H}_{22\alpha}$ and $\text{H}_{22\beta}$), 1.45–1.15 (m, 72H, $\text{H}_{4',\alpha,\beta-21',\alpha,\beta}$), 1.76–1.52 (m, 4H, $\text{H}_{3',\alpha,\beta}$), 2.50–2.26 (m, 4H, $\text{H}_{2',\alpha,\beta}$), 5.64–2.94 (m, 18H, α,β -xylose) ppm (Fig. S10). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 14.06 (C_{22}), 17.48 (C_{21}), 22.66 (C_{21}), 24.89 (C_3), 29.10–31.91 (C_4 – C_{20}), 34.28 (C_2), 65.75 ($\text{C}_{5\alpha}$), 68.79 ($\text{C}_{5\beta}$), 70.06 ($\text{C}_{4\alpha}$), 72.65 ($\text{C}_{4\beta}$), 74.31 ($\text{C}_{3\alpha}$), 75.26 ($\text{C}_{3\beta}$), 92.34 ($\text{C}_{2\alpha}$), 93.91 ($\text{C}_{2\beta}$), 94.04 ($\text{C}_{1\alpha}$), 94.15 ($\text{C}_{1\beta}$), 174.92 ($\text{CH}_2\text{CO}\alpha$), 175.06 ($\text{CH}_2\text{CO}\beta$) (Fig. S11). IR (ATR) ν / cm^{-1} 3359.59, 2912.96, 2848.40, 1734.88, 1038.74 (Fig. S12).

3.6. Measurement of Surface Tension

The surface tension values were measured at 25°C by the pendant drop method using the IT concept Tracker drop tensiometer. The critical micellar concentration (CMC) was calculated from the slope of the decrease in surface tension values with the increasing concentration of surface-active solutions in the plot of surface tension *versus* the log of the concentration (Fig. 1).

3.7. Emulsifying Ability

Monoester solutions (4 mL) at a concentration of 0.25% were prepared. The samples were homogenized with 1ml of paraffin oil using a homogenizer at 800 rpm for 15 min at 25°C. The emulsifying ability (EA) Eq. (5) and emulsion stability (ES) Eq. (6) were calculated using the Eqs. (5 and 6) [7]:

$$\text{EA} (\%) = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{ES} (\%) = \frac{H_2}{H_1} \times 100 \quad (6)$$

Where H_0 is the initial height of solutions and paraffin oil, H_1 is the height of the emulsion layer measured immediately after homogenization. H_2 is the height of the emulsion layer after 2, 24, 48, and 72 hours (Figs. S14 and S15).

3.8. Foamability and Foam Stability

4 ml of aqueous solutions of the obtained surfactants (0.2w/v) were placed in 10 ml tubes. The height (H_0) before homogenization of the solutions was measured using a homogenizer for 4 min at 1000 rpm and at 25°C. The total height (H_1) and the foam height (H_2) were determined at 0 min. After standing for 10, 20, 30, 45, 60, and 120 minutes, the foam height (H_3) was measured (Fig. S13).

The foamability (FA) Eq. (7) and foaming stability (FS) Eq. (8) were calculated using equations Eqs. (7 and 8) [7]:

$$\text{FA} (\%) = \frac{(H_1 - H_0)}{H_0} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{FS} (\%) = \frac{H_3}{H_2} \times 100 \quad (8)$$

CONCLUSION

Xylose-derived biosurfactants were easily synthesized by enzymatic esterification with fatty acids incorporating long or very long chains (C12 and above) and characterized through analytical methods. This protocol generates the required esters with excellent regioselectivity and good yields. Surface-active, foaming, and emulsifying properties of xylose esters were investigated and the interfacial behaviors revealed the importance of the length of the hydrophobic chain. Xylose fatty acid esters are promising candidates as safe nonionic surfactants and the obtained results suggested their applications in the food and detergency industries.

LIST OF ABBREVIATIONS

CMC	=	Critical Micellar Concentration
EA	=	Emulsifying Ability
ES	=	Emulsifying Stability
FA	=	Foamability
FS	=	Foaming Stability
HLB	=	Hydrophilic-lipophilic Balance

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

The authors gratefully thank the Algerian Ministry of Scientific Research for the financial assistance to conduct the research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's website along with the published article.

REFERENCES

- Habulin, M.; Šabeder, S.; Knez, Ž. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. *J. Supercrit. Fluids*, **2008**, *45*(3), 338-345. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2008.01.002>
- Zhao, K.H.; Cai, Y.Z.; Lin, X.S.; Xiong, J.; Halling, P.; Yang, Z. Enzymatic synthesis of glucose-based fatty acid esters in bisolvent systems containing ionic liquids or deep eutectic solvents. *Molecules*, **2016**, *21*(10), 1294. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21101294> PMID: 27689970
- Lee, S-M.; Wagh, A.; Sandhu, G.; Walsh, M.K. Emulsification properties of lactose fatty acid esters. *Food Nutr. Sci.*, **2018**, *9*(12), 1341-1357. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2018.912096>
- Shen, Y.; Sun, Y.; Sang, Z.; Sun, C.; Dai, Y.; Deng, Y. Synthesis, characterization, antibacterial and antifungal evaluation of novel monosaccharide esters. *Molecules*, **2012**, *17*(7), 8661-8673. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17078661> PMID: 22825619
- Zhao, L.; Zhang, H.; Hao, T.; Li, S. *In vitro* antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters against five food-related bacteria. *Food Chem.*, **2015**, *187*(187), 370-377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.108> PMID: 25977039
- Ferrer, M.; Perez, G.; Plou, F.J.; Castell, J.V.; Ballesteros, A. Antitumor activity of fatty acid malotriose esters obtained by enzymatic synthesis. *Bio-technol Appl Biochem*, **2005**, *42*(Pt 1), 35-9.
- Zhang, X.; Song, F.; Taxipalati, M.; Wei, W.; Feng, F. Comparative study of surface-active properties and antimicrobial activities of disaccharide monoesters. *PLoS One*, **2014**, *9*(12), e114845. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0114845> PMID: 25531369
- Ren, K.; Lamsal, B.P. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions. *Food Chem.*, **2017**, *214*(214), 556-563. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.031> PMID: 27507510
- Husband, F.A.; Sarney, D.B.; Barnard, M.J.; Wilde, P.J. Comparison of foaming and interfacial properties of pure sucrose monolaurates, dilaurate and commercial preparations. *Food Hydrocoll.*, **1998**, *12*(2), 237-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00036-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00036-8)
- Phanuphong, C.; Areeya, J.; Ninnapat, T.; Sarita, S.; Punyawat, P. Green synthesis optimization of glucose palm oleate and its potential use as natural surfactant in cosmetic emulsion. *Cosmetics*, **2022**, *4*(4), 76. <http://dx.doi.org/10.3390/cosmetics9040076>
- Sar, P.; Ghosh, A.; Scarso, A.; Saha, B. Surfactant for better tomorrow: applied aspect of surfactant aggregates from laboratory to industry. *Res. Chem. Intermed.*, **2019**, *45*(12), 6021-6041. <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-019-04017-6>
- Das, B.; Kumar, B.; Begum, W.; Bhattarai, A.; Mondal, M.H.; Saha, B. Comprehensive review on applications of surfactants in vaccine formulation, therapeutic and cosmetic pharmacy and prevention of pulmonary failure due to COVID-19. *Chem. Africa*, **2022**, *5*(3), 459-480. <http://dx.doi.org/10.1007/s42250-022-00345-0>
- Zago, E.; Joly, N.; Chaveriat, L.; Lequart, V.; Martin, P. Enzymatic synthesis of amphiphilic carbohydrate esters: Influence of physicochemical and biochemical parameters. *Biotechnol. Rep. (Amst.)*, **2021**, *30*(30), e00631. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00631> PMID: 34094891
- Abdulmalek, E.; Hamidon, N.F.; Abdul Rahman, M.B. Optimization and characterization of lipase catalysed synthesis of xylose caproate ester in organic solvents. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2016**, *132*(132), 1-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.06.010>
- Woudenberg-van Oosterom, M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *49*(3), 328-333. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960205\)49:3<328::AID-BIT11>3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<328::AID-BIT11>3.0.CO;2-A) PMID: 18623584
- Piao, J.; Takase, K.; Adachi, S. Enzymatic synthesis of myristoyl disaccharides and their surface activity. *J. Sci. Food Agric.*, **2007**, *87*(9), 1743-1747. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2909>
- Poojari, Y.; Clarson, S.J. Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. *Bio-catal. Agric. Biotechnol.*, **2013**, *2*(1), 7-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2012.10.002>
- Shin, M.; Seo, J.; Baek, Y.; Lee, T.; Jang, M.; Park, C. Novel and efficient synthesis of phenethyl formate via enzymatic esterification of formic acid. *Biomolecules*, **2020**, *10*(1), 70. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10010070> PMID: 31906270
- Lombardo, D.; Kiselev, M.A.; Magazú, S.; Calandra, P. Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches. *Adv. Condens. Matter Phys.*, **2015**, *2015*, 1-22. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/151683>
- Zhao, S.; Yuan, H.Z.; Yu, J.Y.; Du, Y.R. Hydrocarbon chain packing in the micellar core of surfactants studied by ¹H NMR relaxation. *Colloid Polym. Sci.*, **1998**, *276*(12), 1125-1130. <http://dx.doi.org/10.1007/s003960050354>
- Garofalakis, G.; Murray, B.S.; Sarney, D.B. Surface activity and critical aggregation concentration of pure sugar esters with different sugar head-groups. *J. Colloid Interface Sci.*, **2000**, *229*(2), 391-398. <http://dx.doi.org/10.1006/jcis.2000.7035> PMID: 10985817
- Varga, I.; Mészáros, R.; Stubenrauch, C.; Gilányi, T. Adsorption of sugar surfactants at the air/water interface. *J. Colloid Interface Sci.*, **2012**, *379*(1), 78-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.04.053> PMID: 22609189
- Yamashita, Y.; Sakamoto, Y. Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Classical Indexation and Novel Indexation of Surfactant. In: *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V Set*, **2016**; pp. 570-574. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119075691.ch45>
- Rodríguez-Abreu, C. On the relationships between the hydrophilic-lipophilic balance and the nanoarchitecture of nonionic surfactant systems. *J. Surfactants Deterg.*, **2019**, *22*(5), 1001-1010. <http://dx.doi.org/10.1002/jsde.12258>
- Ricciardi, L.; Verboom, W.; Lange, J.P.; Huskens, J. Selective extraction of xylose from acidic hydrolysate—from fundamentals to process. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2021**, *9*(19), 6632-6638. <http://dx.doi.org/10.1021/acsschemeng.1c00167>
- Ashby, R.D. Xylose utilization for polyhydroxyalkanoate biosynthesis, sustainability & green polymer chemistry. In: *Biocatalysis and Biobased Polymers*; **2020**; 2, pp. 125-143. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2020-1373.ch007>
- Klai, N. Synthèse des esters et des éthers du D-Xylose amphiphiles. Evaluation physico-chimique de leurs propriétés tensioactives, PhD Thesis, UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR, Annaba, Algérie, **2016**. Available from: <https://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2019/07/These-Klai-Nadia.pdf>
- Patil, S.P.; Jadhav, S.N.; Rode, C.V.; Shejwal, R.V.; Kumbhar, A.S. Bio-surfactant: a green and environmentally benign reaction medium for ligand-free Pd-catalyzed Mizoroki-Heck cross-coupling reaction in water. In: *Transition Metal Chem.*, **2020**. <http://dx.doi.org/10.1007/s11243-020-00392-x>
- Šabeder, S.; Habulin, M.; Knez, Ž. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *J. Food Eng.*, **2006**, *77*(4), 880-886. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.016>
- Cao, L.; Fischer, A.; Bornscheuer, U.T.; Schmid, R.D. Lipase catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester. *Biocatal. Biotransform.*, **1996**, *14*(4), 269-283. <http://dx.doi.org/10.3109/10242429609110280>
- Höck, H.; Engel, S.; Weingarten, S.; Keul, H.; Schwaneberg, U.; Möller, M.; Bocola, M. Comparison of *Candida antarctica* lipase B variants for conversion of ε-caprolactone in aqueous medium-part 2. *Polymers (Basel)*, **2018**, *10*(5), 524. <http://dx.doi.org/10.3390/polym10050524> PMID: 30966558
- Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M.E.; Miller, R. Lipases at interfaces: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2009**, *147-148*(147), 237-250.

- [33] <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2008.06.001> PMID: 18691682
Sarda, L.; Desnuelle, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, **1958**, *30*(3), 513-521.
- [34] [http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002\(58\)90097-0](http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002(58)90097-0) PMID: 13618257
Marciello, M.; Filice, M.; Palomo, J.M. Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts. *Catal. Sci. Technol.*, **2012**, *2*(8), 1531-1543.
<http://dx.doi.org/10.1039/c2cy20125a>
- [35] Zisis, T.; Freddolino, P.L.; Turunen, P.; van Teeseling, M.C.F.; Rowan, A.E.; Blank, K.G. Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: Combined evidence from experiment and simulation. *Biochemistry*, **2015**, *54*(38), 5969-5979.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00586> PMID: 26346632
- [36] Bidjou-Haiour, C.; Klai, N. Lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose esters and their surfactant properties. *Asian J. Chem.*, **2013**, *25*(8), 4347-4350.
<http://dx.doi.org/10.14233/ajchem.2013.13973>
- [37] Kauzmann, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **1959**, *14*, 1-63.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60608-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60608-7) PMID: 14404936
- [38] Sar, P.; Saha, B. Potential application of Micellar nanoreactor for electron transfer reactions mediated by a variety of oxidants: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2020**, *284*, 102241.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2020.102241> PMID: 32927360
- [39] Soultani, S.; Ognier, S.; Engasser, J.M.; Ghoul, M. Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **2003**, *227*(1-3), 35-44.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00360-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00360-1)
- [40] Smit, B.; Schlijper, A.G.; Rupert, L.A.M.; Van Os, N.M. Effects of chain length of surfactants on the interfacial tension: molecular dynamics simulations and experiments. *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*(18), 6933-6935.
<http://dx.doi.org/10.1021/j100381a003>
- [41] Groenendijk, D.J.; van Wunnik, J.N.M. The impact of micelle formation on surfactant adsorption-desorption. *ACS Omega*, **2021**, *6*(3), 2248-2254.
<http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c05532> PMID: 33521464
- [42] Israelachvili, J.N.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. II*, **1976**, *72*(2), 1525.
<http://dx.doi.org/10.1039/f29767201525>
- [43] van Kempen, S.E.H.J.; Schols, H.A.; van der Linden, E.; Sagis, L.M.C. Effect of variations in the fatty acid chain of oligofructose fatty acid esters on their foaming functionality. *Food Biophys.*, **2013**, *(40)*, 22-29.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11483-013-9324-1>
- [44] Griffin, W.C. Classification of surface-active agents by "HLB". *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1949**, *(1)*, 311-326.
- [45] Setiati, R.; Siregar, S.; Marhaendrajana, T.; Wahyuningrum, D. Challenge sodium lignosulfonate surfactants synthesized from bagasse as an injection fluid based on hydrophil liphophilic balance. *IOP Conf. Series Mater. Sci. Eng.*, **2018**, *434*(434), 012083.
<http://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/434/1/012083>
- [46] Leitgeb, M.; Knez, Ž. The influence of water on the synthesis of n-butyl oleate by immobilized *Mucor miehei* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1990**, *67*(11), 775-778.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02540490>



Journal of Chemistry and Technologies

pISSN 2663-2934 (Print), ISSN 2663-2942 (Online).

journal homepage: <http://chemistry.dnu.dp.ua>
 editorial e-mail: chem.dnu@gmail.com



UDC 542.9:004.94

PHYSICO-CHEMICAL STUDY, MOLECULAR MODELING AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF α - AND β -ANOMERS OF XYLOSE ESTERS

Loulou Fatma, Bidjou-Haiour Chahra*

Laboratory of Organic synthesis, Modeling and Optimisation of chemical Processes (LOMOP), Faculty of Sciences, Badji-Mokhtar University, BP 12 El-Hadjar, 23000 Annaba, Algeria

Received 24 September 2024; accepted 30 January 2025; available online 15 April 2025

Abstract

Non-ionic surfactants obtained from renewable resources represent a new challenge in biotechnology and have a range of applications in many industries. In this context, the α - and β -anomers of synthesized D-xylose-based biosurfactants with various chain length were easily separated and characterized through analytical methods. Their surface and emulsifying properties were evaluated. To study the reactivity of the two anomers of synthesized biosurfactants, the spatial conformations of the prepared acyl-xylopyranose were obtained by molecular modeling with Gaussian 9 software using the density functional theory method. Compounds α are the softest so more reactive than the β ones. The antibacterial activity of sugar fatty acid ester anomers was also studied. The results obtained indicate the importance of anomeric form and chain length for the stability of the synthesized compounds.

Keywords: Xylose ester; anomers; surface properties; modeling; antibacterial activity.

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ, МОЛЕКУЛЯРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ α - ТА β -АНОМЕРІВ ЕСТЕРІВ КСИЛОЗИ

Лулу Фатма, Біджу-Хайур Чахра

Лабораторія органічного синтезу, моделювання та оптимізації хімічних процесів (ЛОМОР), природничий факультет, Університет Баджі-Мохтар, BP 12 El-Hadjar, 23000 Annaba, Алжир

Анотація

Отримання неіоногенних поверхнево-активних речовин з відновлюваних ресурсів є новим викликом у біотехнології, оскільки ці сполуки мають широкий спектр застосувань у багатьох галузях промисловості. У цьому контексті α - та β -аномери синтезованих біологічно активних речовин на основі D-ксилози з різною довжиною ланцюга були легко розділені та охарактеризовані за допомогою аналітичних методів. Оцінені їх поверхневі та емульгуючі властивості. Для вивчення реакційної здатності двох аномерів, синтезованих біосурфактантів, методом молекулярного моделювання за допомогою програми Gaussian 9 з використанням методу теорії функціоналу густини було отримано просторові конформації одержаної ацил-ксилопіранози. α -Сполуки є найбільш гнучкими, тому більш реакційноздатними, ніж β . Також досліджено антибактеріальну активність аномерів естерів цукрових жирних кислот. Одержані результати свідчать про важливість аномерної форми та довжини ланцюга для стабільності синтезованих сполук.

Ключові слова: естер ксилози; аномери; поверхневі властивості; моделювання; антибактеріальна активність.

*Corresponding author: e-mail: bidjouch@univ-annaba.org, bidjouch@yahoo.fr

© 2025 Oles Honchar Dnipro National University;

doi: 10.15421/jchemtech.v33i1.312010

Introduction

Sugar Fatty Acid Esters (SFAEs) are of great interest in the field of biocompatible components [1]. These molecules constitute interesting nonionic bio-surfactants. They are made from renewable, inexpensive, and readily available raw materials [2]. Because of their amphiphilic nature, non-toxicity and bio-degradability, they are often used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries [3; 4]. SFAE can be synthesized using either chemical or biological catalysts. As a result of regioselectivity and mild reaction conditions of enzymatic process [5], there is growing interest in the application of lipases as biocatalysts for carbohydrate fatty acid esters production [6; 7]. Numerous reports have shown that lipases are good biocatalyst in nonaqueous media [8].

In this study, we report the anomeric separation of α - and β -anomers of xylose esters incorporating C₁₂ and C₁₈ chains. Xylose laurate and xylose stearate were synthesized by the enzymatic way [9]. The anomerization process yielded esters of the monosaccharide. At the same time, the surfactant properties (including air-water surface tension, critical micellar concentration and emulsion power and stability) of the anomeric forms were determined. These compounds were obtained by acetylation of synthesized xylose esters and subsequent deacetylation of the resulting peracetylated anomeric forms [10; 11], a protocol that reliably generates the required esters in high yield and with excellent regioselectivity.

Molecular modeling was also applied using DFT/B3LYP method with 6-31G (d,p) basis set [12]. Stability of α - and β -anomers of 1-*O*-acylxylose esters derivatives has been analyzed to understand the forces involved in the stability of these compounds.

On the other hand, the antibacterial activities of α - and β -anomers of xylose esters against common food-related bacteria were determined by measuring the diameters of growth inhibition zones and minimum inhibitory concentration (MIC). Indeed, sugar fatty acid esters have attracted much attention in recent years because of their biological properties [13].

Material and Methods

Materials

Substrates (D-xylose, dodecanoic acid, octadecanoic acid), solvents and other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich and Merck. *Candida antarctica* type B lipase immobilized on

acrylic resin was purchased from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). All reagents used in this study were analytical grade.

Methods

The ¹H and ¹³C NMR spectrum were carried out using a Bruker A 400 apparatus in CDCl₃ and DMSO-d₆ with a frequency of 400 MHz.

The infrared spectroscopic FTIR (ATR) analysis in the range from 4000 cm⁻¹ to 370 cm⁻¹ was carried out using a Bruker apparatus. All the spectra were recorded with the transmission mode.

Xylose esters synthesis

D-xylose (1g, 6.66 mmol) was first dissolved in 25 mL of ethylmethylketone (EMK) for one night, at 60°C. After that, the acyl donor was added: lauric acid (4.42 g, 13.32 mmol) or stearic acid (5.56g, 13.32 mmol). The biocatalyst (300 mg of CAL B) and molecular sieves 4A° (300 mg) were then incorporated. Aliquots were removed at intervals, filtered and analyzed quantitatively by volumetric titration. At the end of the reaction, the lipase was removed by filtration and the solvent was evaporated to dryness under reduced pressure. The enzymatic products were found to be a mixture of α - and β -anomers.

Acetylation of xylose esters

Synthesized esters from D-xylose were acetylated with acetic anhydride (12 equivalents) and sodium acetate (6 equivalents) for 2 hours at 50 °C under stirring. The reaction was followed by thin-layer chromatography (TLC). The crude reaction mass was transferred to diethyl ether (50 mL) and washed several times with saturated Na₂CO₃ solution until neutral pH was reached. The organic phase was then isolated, dried with MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (silica gel, eluting mixture petroleum ether/AcOEt 8.5:1.5).

Deacetylation of acetylated anomeric xylose esters

The peracetylated compound was dissolved in CH₂Cl₂/MeOH (1/1) mixture. Then sodium methylate (6 equivalents) was added to the medium and the release was monitored by TLC. At the end of the reaction an ion-exchange resin was added to neutralize the excess of sodium methylate. The resulting mixture was then filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The two anomers were then separated by flash chromatography.

Measurement of surface tension

The surface tension values (γ) were measured at 25 °C by the pendant drop method using an IT

concept Tracker drop tensiometer. The critical micellar concentration (CMC) was calculated from the breaking point in γ versus \log_{10} concentration plots. γ_{CMC} is the surface tension parameter corresponding to the CMC, the concentration of surfactant above which micelles form.

Emulsion power and stability

Aqueous monoester solutions (4 mL) of different concentrations were prepared. The samples were homogenized with 1ml of paraffin oil, at 8000 rpm with a shear mixer, for 15 min at 25 °C. The emulsifying ability (EA) and emulsion stability (ES) were calculated using Equation 1 and 2.

$$EA (\%) = \frac{H_1}{H_0} \times 100 \quad (1)$$

$$ES (\%) = \frac{H_2}{H_1} \times 100 \quad (2)$$

Where H_0 is the initial height of solutions and paraffin oil, H_1 is the height of the emulsion layer measured immediately after homogenization. H_2 is the height of the emulsion layer after 2, 24, 48 and 72 hours.

Molecular modeling

All the computations were carried out using GAUSSIAN 09 software. The DFT modeling method, using the hybrid B3LYP functional, was used to calculate theoretical parameters with the basis set combination 6-31 G (d, p) and 6-31 G (d). Geometry optimization was carried out until global minima were achieved.

Antibacterial Activity

The antibacterial activity of sugar fatty acid esters was determined by the method described by Kirby-Bauer. Mueller Hinton agar (pH 7.2, 4mm depth) Petri dishes were inoculated with test organisms. Watman paper 6 mm diameter

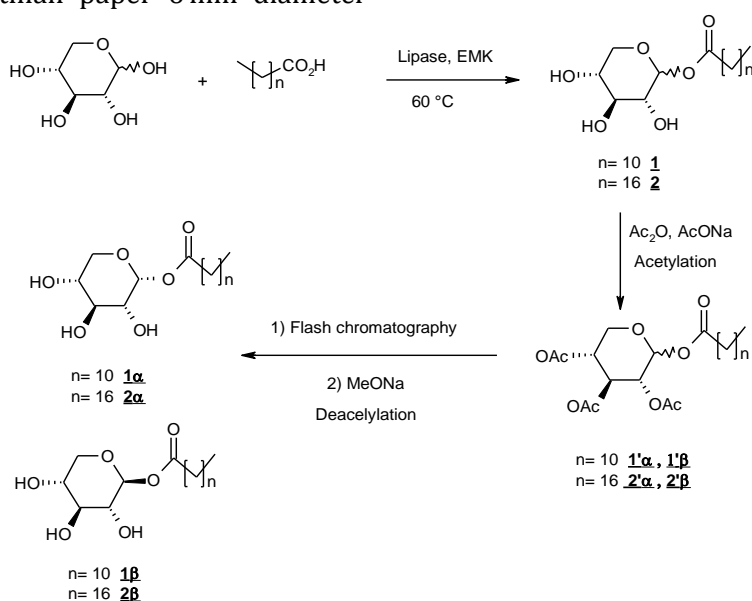
was impregnated with a volume of 20 μL of the tested molecules and deposited on the surface of the agar. Same volume of 20 μL dimethylsulfoxide was dispensed into the control well. Thus, each diffuse concentration in the agar forms an inhibition zone that will be measured 24 h after incubation at 37 °C by ruler caliper.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of micro-organism after incubation. To determinate the MIC of each compound a dilution range of fatty acid sugar esters were prepared as follows: (512, 256, 128, 64, 32, 16, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Then these concentrations are distributed to test tubes of nutrient broth seeded with a known concentration of the bacterial strain. We put the tubes in the oven at 37°C. Bacterial growth will be evaluated according to the OD obtained. The reading is done by comparison with the control tube; the dilution which gives the first clear tube (without bacterial growth), determines the MIC.

Results and discussion

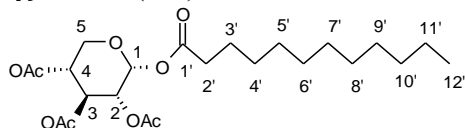
Synthesis of α,β -D-xylopyranose esters **1** and **2** was performed with lauric (dodecanoic) and stearic (octadecanoic) acids by enzymatic esterification using a lipase. At 60°C under thermodynamic control, major pyranic forms were obtained. α - and β -anomers were obtained in pure forms by *O*-acetylation and then *O*-deacetylation of the corresponding acetylated α - and β -xylopyranose **1'** and **2'** previously prepared (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of 1-O-acylxylopyranose esters.

The products are finally purified and separated by flash chromatography and their chemical structures are confirmed using ^1H NMR, ^{13}C NMR and FTIR-ATR.

1-*O*-Dodecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -*D*-xylopyranose (1' α**)**



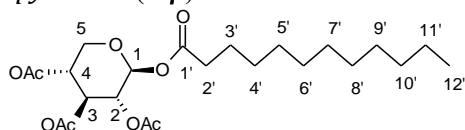
1-*O*-Dodecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -*D*-xylopyranose (**1' α**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with 1-*O*-dodecanoyl- α,β -*D*-xylopyranose (1.974g of 0.006 mol) in 7.22 ml acetic anhydride (12 equiv) and sodium acetate (2.88g, 6 equiv). Reaction time: 3 hours. Yield: 49.53 %. RF: 0.35 (petroleum ether/AcOEt, 8.5:1.5 v/v).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 5.48 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H), 5.08 – 4.93 (m, 2H), 4.79 (dd, $J = 10.1, 3.3$ Hz, 1H), 3.85 – 3.70 (m, 1H), 3.68 – 3.53 (m, 2H), 3.38 (d, $J = 9.8, 6.6$ Hz, 1H), 2.05 (s, 9H), 1.63 (t, 2H), 1.41 – 1.07 (m, 18H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 170.09 ($\text{CH}_3\text{CO}/\text{CO}$), 95.80 (C_1), 71.37 (C_2), 69.93 (C_3), 68.68 (C_4), 58.39 (C_5), 32.02 (C_2'), 29.73 ($\text{C}_3', \text{C}_4', \text{C}_5', \text{C}_6', \text{C}_7', \text{C}_8', \text{C}_9'$), 26.15 (C_{10}'), 22.78 (C_{11}'), 20.78 ($3\text{CH}_3\text{CO}$), 14.18 (C_{12}').

IR (ATR): 2850.76, 2918.79, 1732.17, 1468.30, 1230.10, 1369.69.

1-*O*-Dodecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-xylopyranose (1' β**)**



1-*O*-Dodecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-xylopyranose (**1' β**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with 1-*O*-dodecanoyl- α,β -*D*-xylopyranose (1.974 g of 0.006 mol) in acetic anhydride (12 equiv) and sodium acetate (2.88 g, 6 equiv). Reaction time: 3 hours. Yield: 50.46 %, RF: 0.25 (petroleum ether /AcOEt, 8.5:1.5 v/v).

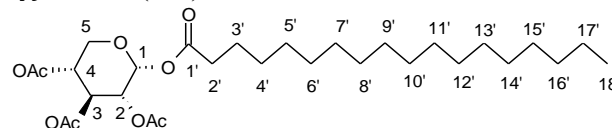
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 5.16 (t, $J = 8.6, 1.5$ Hz, 1H), 5.00 – 4.82 (m, 2H), 4.47 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.23 – 4.06 (m, 1H), 3.89 – 3.72 (m, 1H), 3.58 – 3.15 (m, 2H), 2.04 (s, 9H), 1.56 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.36 – 1.14 (m, 18H), 0.88 (t, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 169.72 ($\text{CH}_3\text{CO}/\text{CO}$), 100.66 (C_1), 71.55 (C_2), 70.90 (C_3), 68.97 (C_4), 61.99 (C_5), 31.86 (C_2'), 29.60 ($\text{C}_3', \text{C}_4',$

$\text{C}_5', \text{C}_6', \text{C}_7', \text{C}_8', \text{C}_9'$), 25.86 (C_{10}'), 22.62 (C_{11}'), 20.62 ($3\text{CH}_3\text{CO}$), 14.03 (C_{12}').

IR (ATR): 2849.12, 2916.05, 1752.36, 1466.07, 1214.94, 1370.27.

1-*O*-Octadecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -*D*-xylopyranose (2' α**)**



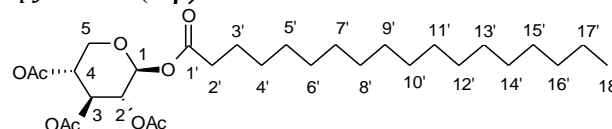
1-*O*-Octadecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -*D*-xylopyranose (**2' α**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with 1-*O*-dodecanoyl- α,β -*D*-xylopyranose (1.7 g, 0.004 mol) in 5 ml acetic anhydride (12 equiv) and sodium acetate (2.88 g, 6 equiv). Reaction time: 3 hours. Yield: 53.40 %. RF: 0.35 (petroleum ether /AcOEt, 8.5:1.5 v/v).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 5.48 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H), 5.08 – 4.93 (m, 2H), 4.79 (dd, $J = 10.1, 3.3$ Hz, 1H), 3.85 – 3.70 (m, 1H), 3.68 – 3.53 (m, 2H), 3.38 (d, $J = 9.8, 6.6$ Hz, 1H), 2.05 (s, 9H), 1.63 (t, 2H), 1.41 – 1.07 (m, 18H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 170.09 ($\text{CH}_3\text{CO}/\text{CO}$), 95.80 (C_1), 71.37 (C_2), 69.93 (C_3), 68.68 (C_4), 58.39 (C_5), 32.02 (C_2'), 29.73 ($\text{C}_3', \text{C}_4', \text{C}_5', \text{C}_6', \text{C}_7', \text{C}_8', \text{C}_9'$), 26.15 (C_{10}'), 22.78 (C_{11}'), 20.78 ($3\text{CH}_3\text{CO}$), 14.18 (C_{12}').

IR (ATR): 2850.76, 2918.79, 1732.17, 1468.30, 1230.10, 1369.69.

1-*O*-Octadecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-xylopyranose (2' β**)**



1-*O*-Octadecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-xylopyranose (**2' β**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with 1-*O*-octadecanoyl- α,β -*D*-xylopyranose (1.7 g, 0.004 mol) in 5 ml acetic anhydride (12 equiv) and sodium acetate (1.96 g, 6 equiv). Reaction time: 3 hours. Yield: 67.29 %. RF: 0.30 (petroleum ether /AcOEt, 8.5:1.5 v/v).

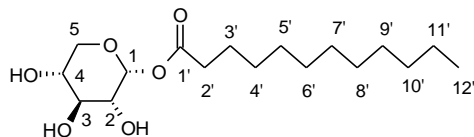
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 5.09 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.97 – 4.78 (m, 2H), 4.40 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.04 (dd, $J = 11.8, 5.1$ Hz, 1H), 3.73 (d, $J = 9.7, 6.5$ Hz, 1H), 3.45 – 3.19 (m, 2H), 1.97 (s, 9H), 1.49 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.35 – 1.09 (m, 30H), 0.81 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H).

^{13}C NMR: (101 MHz, CDCl_3): 170.01 ($\text{CH}_3\text{CO}/\text{CO}$), 100.67 (C_1), 71.56 (C_2), 69.63 (C_3), 68.98 (C_4), 62.00 (C_5), 31.89 (C_2'), 29.66

(C_{3'}, C_{4'}, C_{5'}, C_{6'}, C_{7'}, C_{8'}, C_{9'}, C_{10'}, C_{11'}, C_{12'}, C_{13'}, C_{14'}, C_{15'}), 25.87 (C_{16'}), 22.64 (C_{17'}), 20.66 (3CH₃CO), 14.04 (C_{18'}).

IR (ATR): 2915.57, 2848.23, 1752.50, 1216.94, 1309.63.

1-*O*-Dodecanoyl- α -D-xylopyranose (**1 α**)



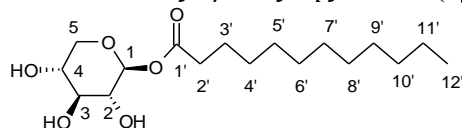
1-*O*-Dodecanoyl- α -D-xylopyranose (**1 α**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with 1-*O*-dodecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -D-xylopyranose (0.656g, 0.0014mol) in sodium methoxide (0.46 g, 0.008 mol). Yield: 88.84 %. Rf: 0.55 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1 v/v).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 4.69 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 3.61 – 3.58 (m, 1H), 3.58 – 3.55 (m, 1H), 3.54 – 3.50 (m, 1H), 3.42 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 3.40 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 3.38 – 3.30 (m, 1H), 1.99 – 1.82 (m, 0H), 1.63 – 1.46 (m, 2H), 1.29 – 1.09 (m, 17H), 0.81 (t, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 179.61(CO), 97.53 (C_{1'}), 71.17 (C_{2'}), 69.00 (C_{3'}), 67.49 (C_{4'}), 60.89 (C_{5'}), 30.93 (C₂), 28.70 (C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉), 25.08 (C₁₀), 21.68 (C₁₁), 13.07 (C₁₂).

IR (ATR): 3502.80, 2915.25, 2849.78, 1751.61, 1037.29.

1-*O*-Dodecanoyl- β -D-xylopyranose (**1 β**)



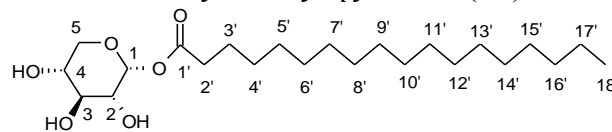
1-*O*-Dodecanoyl- β -D-xylopyranose (**1 β**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with 1-*O*-dodecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-xylopyranose (0.479g, 0.001mol) in sodium methoxide (0.32g, 0.006 mol). Yield: 92.48%. Rf: 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1 v/v).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 4.83 (s, 2H), 4.29 – 4.22 (m, 1H), 3.94 (dd, J = 11.6, 4.9 Hz, 1H), 3.87 – 3.76 (m, 1H), 3.70 – 3.59 (m, 1H), 3.51 (dd, J = 11.3, 5.3 Hz, 1H), 3.49 – 3.43 (m, 1H), 3.35 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 3.24 (t, J = 10.7 Hz, 1H), 2.13 – 1.72 (m, 2H), 1.74 – 1.48 (m, 2H), 1.41 – 1.14 (m, 16H), 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): 175.87(CO), 104.11 (C_{1'}), 77.14 (C_{2'}), 73.70 (C_{3'}), 68.99 (C_{4'}), 66.14 (C_{5'}), 31.76 (C₂), 29.48 (C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉), 25.97 (C₁₀), 22.54 (C₁₁), 14.35 (C₁₂).

IR (ATR): 1639.35, 1044.40, 3332.01, 2848.80, 2954.75.

1-*O*-Octadecanoyl- α -D-xylopyranose (**2 α**)



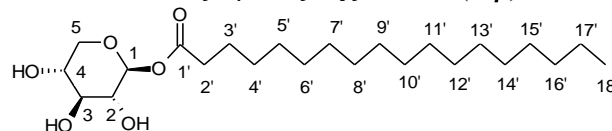
1-*O*-Octadecanoyl- α -D-xylopyranose (**2 α**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with 1-*O*-octadecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -D-xylopyranose (0.255 g, 0.00047 mol) in sodium methoxide (0.15g, 0.00282 mol). Yield: 60 %. Rf: 0.65 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1 v/v).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm): 4.55 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.53 (dt, J = 9.7, 6.7 Hz, 1H), 3.37 (q, J = 3.9 Hz, 1H), 3.34 – 3.32 (m, 1H), 3.31 – 3.28 (m, 6H), 3.26 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.16 (dd, J = 9.3, 3.6 Hz, 1H), 1.66 – 1.55 (m, 1H), 1.54 – 1.46 (m, 2H), 1.39 – 1.10 (m, 26H), 0.85 (t, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 179.62 (CH₃CO), 97.47 (C_{1'}), 71.19 (C_{2'}), 68.97 (C_{3'}), 67.46 (C_{4'}), 60.93 (C_{5'}), 30.93 (C₂), 28.72 (C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆), 25.09 (C₃), 21.68 (C₁₇), 13.07 (C₁₈).

IR (ATR): 3501.31, 2914.01, 2849.61, 1642.93, 1038.57.

1-*O*-Octadecanoyl- β -D-xylopyranose (**2 β**)



1-*O*-Octadecanoyl- β -D-xylopyranose (**2 β**) was obtained as a white powder following the general procedure previously described with 1-*O*-octadecanoyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-xylopyranose (0.689 g, 0.0012 mol) in sodium methoxide (0.38 g, 0.0072 mol). Yield: 76.31 %. Rf: 0.57 (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1 v/v).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm): 3.93 – 2.62 (m, 10H), 2.26 (p, J = 1.9 Hz, 2H), 1.39 (s, 1H), 0.99 (s, 16H), 0.77 – 0.48 (m, 3H).

¹³C NMR (101MHz, DMSO-*d*₆): 174.76 (CO), 103.87 (C_{1'}), 76.92 (C_{2'}), 73.45 (C_{3'}), 68.69 (C_{4'}), 65.90 (C_{5'}), 31.46 (C₂), 29.19 (C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆), 25.70 (C₃), 22.25 (C₁₇), 14.09 (C₁₈).

IR (ATR): 3377.41, 2914.27, 2848.37, 1561.21, 1040.40.

Surface active properties

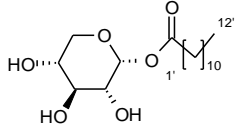
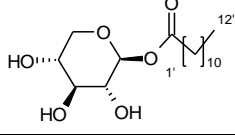
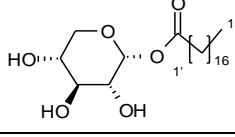
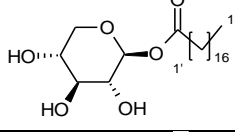
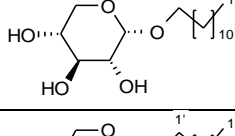
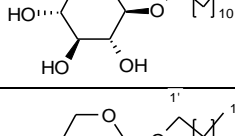
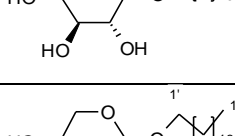
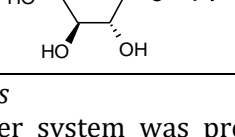
Surface tension (γ) and critical micellar concentration (CMC) of synthesized compounds **1 α** , **1 β** , **2 α** and **2 β** have been determined. The

surface active properties of compounds **1** and **2** have already been reported in the literature [9] and have shown their potential as biosurfactant since they have ability to reduce the surface tension.

In this study we demonstrated that acyl- α -D-xylopyranoses esters (Table 1, entries 1–4) have the best surface properties and exhibited a greater surface activity than the corresponding β -anomers at high CMC due to the high solubility of these surfactants in water (0.16 mmol/L for **1 α** and 0.10 for **2 α**). The results for the obtained alkyxylosides (Table 1, entries 5–8) in a previous study [14] showed that alkyl β -D-xylosides have the best surface properties. On the contrary, in

the course of this study and for the synthesized acylxyloses esters, the obtained results for the surface properties showed that the α -anomers are more active than the β -anomers. This can be explained by the increased hydrophilicity of the synthesized compounds by the addition of the carbonyl group. Introducing a carbonyl group in the alkyl chain change radically the surface activity of the xylose based-biosurfactants with the same length of the chain [15]. The obtained values of CMC and γ (Table 1, entries 1–4) are in accordance with the reported results concerning the acylxyloses esters [16]. The results showed that the carbon chain was the most important factor influencing the surface properties.

Table 1

Surface tension characteristics of acylxylose esters			
Entry	Compound	CMC (mmol/L)	γ_{CMC} (mN/m)
1	 1α	0.16	43.57
2	 1β	0.17	45.19
3	 2α	0.1	52,15
4	 2β	-	-
5	 3α [14]	0.021	49
6	 3β [14]	0.013	47.6
7	 4α [14]	3.7 · 10⁻⁵	55
8	 4β [14]	4.9 · 10⁻⁵	51

Emulsifying properties

The paraffin oil-water system was prepared with a surfactant content of 0.25 % (w/v) in the aqueous phase, in order to investigate the effect of the sugar esters on emulsion formation and

stabilization [17; 18]. The heights of the emulsion layer were measured at 25 °C for different concentrations [19]. As can be seen from Figure 1, the emulsifying ability of all products and their anomers is more than 70 %. 1-O-octadecanoyl- α -

D-xylopyranose **2 α** showed the best emulsifying ability compared to its β -anomer **2 β** and to the mixture of the anomers **2**. This sugar monoester has the highest emulsification index value from 100% after 24 hours to 90% after 72 hours, while 1-O-octadecanoyl- β -D-xylopyranose has lower emulsification capacity due to its low water solubility. Emulsifying power of 1-O-dodécanyl-D-xylopyranose **1** showed that the β -anomer **1 β** is

the most stable emulsifier compared to its β -anomer **2 β** .

This phenomenon was also observed at various concentrations, at 0.50 % (w/v) and at 0.10 % (w/v). At a concentration of 0.25 % (w/v), the emulsion power of xylose monoesters is most significant. These results indicated that an increase in the length of the lipophilic chain increases the stability of the monoester emulsion because of its compatibility with the parafine oil-water system [19].

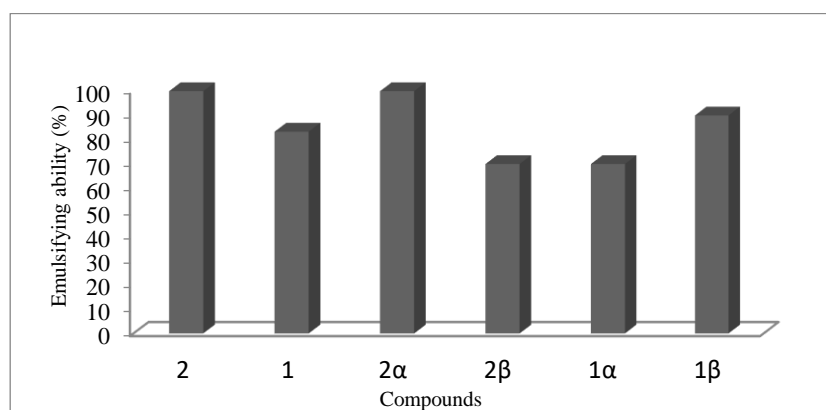


Fig. 1. Emulsifying ability of 0.25 wt % aqueous solutions at 25 °C of xylose esters

The emulsion stability as a function of time for different esters is shown in Figure 2. The tested esters have excellent emulsion properties. Their stability decreased with increasing time, which was clearly seen at a concentration of 0.25% (w/v). A comparative study of the stability of the emulsifier formed by the synthesized products and their anomers shows that for compound **2** 1-

O-octadecanoyl- α -D-xylopyranose **2 α** is the most stable anomer after 72 hours. No stability is observed after two hours for the β -anomer **2 β** . For compound **1**, 1-*O*-dodécanyl- β -D-xylopyranose **1 β** is still stable than the α -anomer **1 α** and the mixture of the two anomers **2** after 48 and 72 hours as revealed in Figure 2.

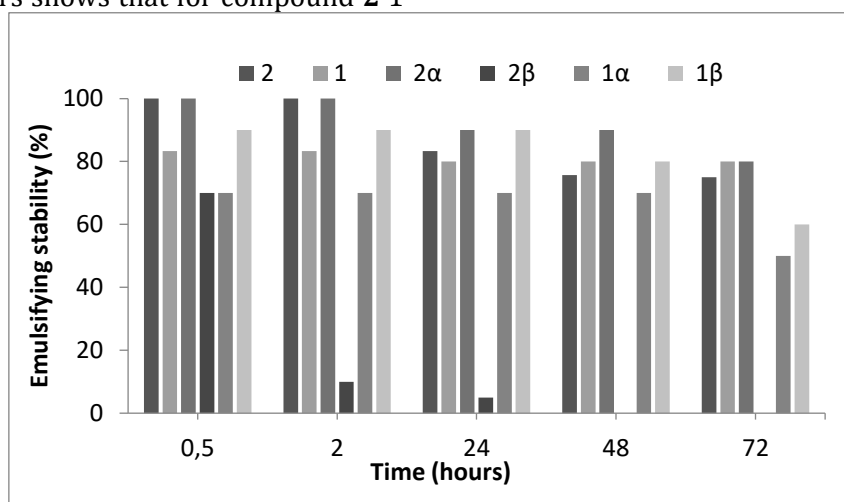


Fig. 2. Emulsifying stability of 0.25 wt % aqueous solutions at 25 °C of xylose esters

Density Functional Theory study

Gaussian 09 software [20] and DFT [21] modeling method were applied to determine the spatial conformation of the synthesized anomeric

xylose esters. We have tested two basis sets 3.21 G and 6.31 G of B3LYP, the most famous hybrid density functional theory model. The most stable optimized geometry was obtained from

B3LYP/6-31G with the basis set combination 6-31 G (d, p) and 6-31 G (d) method [22]. The atom numbering schemes of the molecules are shown in Figure 3.

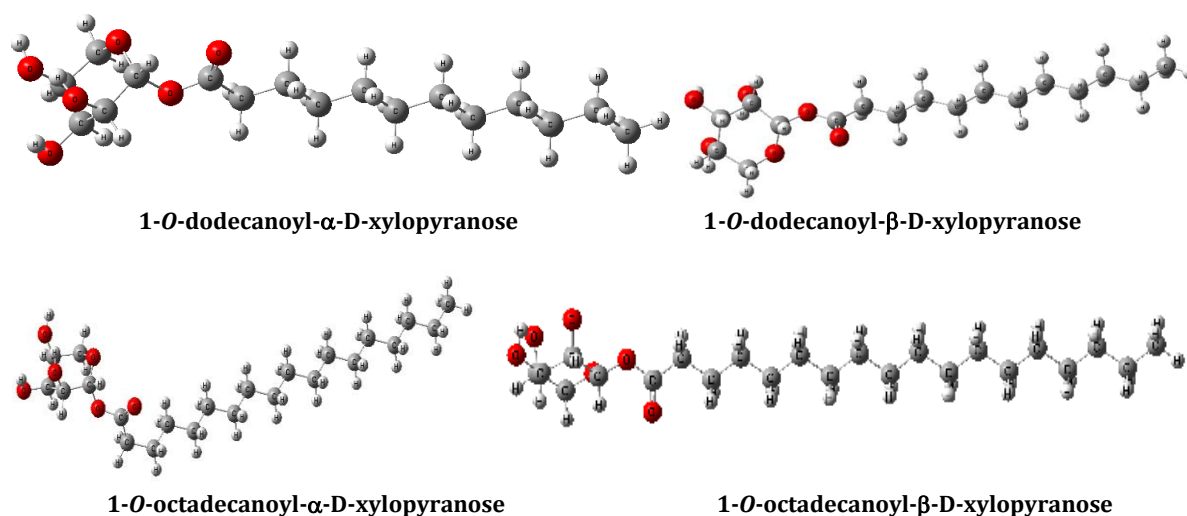


Fig. 3. Optimized molecular structure of xylose esters by Gaussian 9 Basis-set 6.31G

The frontier molecular orbitals HOMO and LUMO are the orbitals that are involved in the reactivity. The lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) and the highest occupied molecular orbital (HOMO) are located over the whole skeleton of the molecule except the methyl groups of the hydrophobic chain (Figure 3). Their energy value and their energy gaps reflect the reactivity of the molecule. A molecule having a small frontier orbitals gap is a soft molecule with a high chemical reactivity. While a large HOMO-LUMO gap indicates a hard molecule, more stable /less reactive molecule. As presented in Table 2, the compound which have the lowest energetic

gap is 1-*O*-octadecanoyl- α -D-xylopyranose ($\Delta E_{\text{gap}} = 0.26237$ eV). The results of energy gap indicate that the α -anomers of the two products 1-*O*-dodecanoyl-D-xylopyranose **1 α** ($\Delta E_{\text{gap}} = 0.26294$ eV) and 1-*O*-octadecanoyl-D-xylopyranose **2 α** ($\Delta E_{\text{gap}} = 0.26237$ eV) are the softest compounds compared to their β -anomers (1-*O*-dodecanoyl- β -D-xylopyranose, $\Delta E_{\text{gap}} = 0.26315$ and 1-*O*-octadecanoyl- β -D-xylopyranose, $\Delta E_{\text{gap}} = 0.26311$). According to these results (Table 2), the α -acylxylopyranoses are more reactive than the β ones.

Table 2

Calculated energy values using B3LYP/6-31G basis set			
Compound	HOMO	LUMO	Energy gap (ev)
1α	-0.25801	0.00493	0.26294
1β	-0.25548	0.00767	0.26315
2α	-0.25866	0.00371	0.26237
2β	-0.25548	0.00763	0.26311

Antibacterial Activity

The antibacterial activity of the synthesized α - and β -anomers of xylose fatty acid ester compounds was tested against five common food-related bacteria including *Staphylococcus aureus* (Gram-positive bacterium), *Bacillus subtilis* (Gram-positive bacterium), *Escherichia coli* (Gram-negative bacterium), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negative bacterium) and *Klebsiella pneumonia* (Gram-negative bacterium) using the paper disk diffusion assay [23] described by Kirby-Bauer. Filter discs impregnated with 20 μ l of DMSO were employed as a negative control, and standard discs

containing the antibacterial agent gentamicin were used as control for antibacterial activity.

The antibacterial activities against the five bacteria was evaluated by measuring the zone inhibition growth diameters (ZOI). Table 3 shows the antimicrobial properties of the two anomers of compounds **1 α** and **1 β** . The results indicate that both anomers have antibacterial activity against all the tested bacteria (Gram-positive and Gram-negative). The inhibition zones obtained are in the range of 16.51–19.86 mm. The tested bacteria are sensitive to the both products (ZOI \geq 12) [24].

Table 3

Bacteria strain	Inhibition zone diameter of tested bacteria strains using 1α and 1β anomers		
	Inhibition zone diameter (mm)		
	1α	1β	ATB Control ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	16.51 \pm 0.74	14.22 \pm 0.65	25.17 \pm 0.23
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	19.86 \pm 1.16	17.38 \pm 1.24	27.31 \pm 1.19
<i>Escherichia coli</i> (-)	17.43 \pm 0.82	16.13 \pm 0.78	29.76 \pm 1.94
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	16.86 \pm 0.79	15.03 \pm 0.81	26.28 \pm 0.86
<i>Klebsiella pneumonia</i> (-)	16.55 \pm 1.14	14.95 \pm 1.05	28.34 \pm 2.3

^aATB Control: Gentamicin

The antimicrobial test of compounds **2 α** and **2 β** display also an antibacterial activity against the same bacteria strains (Table 4) and the obtained ZOI are in the range of 11.51–15.16 (≥ 12).

Table 4

Bacteria strain	Inhibition zone diameter of tested bacteria strains using 2α and 2β anomers		
	Inhibition zone diameter (mm)		
	2α	2β	ATB Control ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	14.34 \pm 0.42	13.18 \pm 0.54	24.12 \pm 0.18
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	15.16 \pm 0.92	14.26 \pm 0.49	26.25 \pm 1.04
<i>Escherichia coli</i> (-)	13.25 \pm 0.66	13.33 \pm 0.64	30.19 \pm 1.67
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	11.51 \pm 0.73	12.15 \pm 0.52	26.89 \pm 0.76
<i>Klebsiella pneumonia</i> (-)	14.75 \pm 0.84	13.81 \pm 0.29	26.94 \pm 1.97

^aATB Control: Gentamicin

Depending on the fatty acid length, we observed different inhibitory effects on bacterial growth. The **1 α** and **1 β** anomers of 1-*O*-dodecanoyl-D-xylopyranose (C12) showed the best antimicrobial activity compared to the **2 α** and **2 β** anomers of 1-*O*-octadecanoyl-D-xylopyranose (C18) implying that increasing the chain length of the fatty acid decreases antimicrobial activity of the considered sugar fatty acid ester. Similar results have been reported in the literature that medium chain length of sugar esters have higher activity than long chain ones [25].

Furthermore, from Tables 2 and 3 and for all bacteria tested, the results showed that the α -anomer exhibited better activity than the β -anomer, especially against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* with the inhibition zone diameters of 19.86 \pm 1.16 and 17.43 \pm 0.82 respectively for **1 α** ; *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumonia* with the inhibition zone diameters of 15.16 \pm 0.92 and 14.75 \pm 0.84 respectively for **2 α** .

Minimum inhibitory concentrations (MIC)

The MICs of anomers of xylose esters against the tested bacteria are determined and shown in Tables 5 and 6. The anomer **1 α** showed minimum inhibitory concentrations MIC values of 4 and 8 μ g/ml against respectively *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* (Table 5). These values are close to the MIC obtained by the control antibiotic Gentamicin (1 μ g/ml). For compound **2 α** the lowest values of minimum inhibitory concentrations MIC are 16 μ g/ml against and *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia* (Table 6).

The α anomer is not only more active than the β -anomer, but also acts at a lower concentration. For example, we need 8 μ g/ml of **1 α** anomer to inhibit the growth of *Klebsiella pneumonia* and 32 μ g/ml to inhibit the same bacteria by **1 β** anomer.

From these results, it can also be concluded that, in general, the MIC antibacterial activity depends on the structure of the sugar ester molecule and increases with increasing chain length of the fatty acid.

Table 5

Bacteria Strain	Minimum inhibitory concentration (MIC) of 1α and 1β anomers		
	MIC (μ g/ml)		
	1α	1β	Gentamicin
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	64	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	64	128	8
<i>Escherichia coli</i>	4	32	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	128	4
<i>Klebsiella pneumonia</i>	8	32	2

Bacteria Strain	Minimum inhibitory concentration (MIC) of 2 α and 2 β anomers		
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	2 α	2 β	Gentamicin
<i>Staphylococcus aureus</i>	64	64	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	64	128	8
<i>Escherichia coli</i>	32	32	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	32	4
<i>Klebsiella pneumonia</i>	16	64	2

Conclusion

We report herein the preparation of the α - and β -anomers of 1-*O*-dodecanoyl-D-xylanopyranose and 1-*O*-octadecanoyl-D-xylanopyranose by acylation and then deacetylation of the corresponding acetylated xylose esters.

Surface tension measurements were used to determine the CMC of the obtained anomeric forms, where the bio-based surfactants show difference in their efficiency in reducing the surface tension of water. The present study also revealed that the incorporation of carbonyl group in xylopyranoside esters skeleton enhances their surface active properties. Oil-water emulsifying ability and emulsion stability of the monoesters

were measured. The results indicated that the surface properties were affected by the length and nature of carbon chain. In addition, the separated anomers of sugar esters with different fatty acid moieties displayed different degrees of antibacterial activity against the different bacterial strains tested.

Acknowledgments

We are grateful to the Algerian Ministry of Scientific Research for financial assistance. We also thank the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology (UBMA) for the biological activities.

References

- Perinelli, D.-R., Lucarini, S., Fagioli, L., Campana, R., Vllasaliu, D., Duranti, A., Casertari, L. (2018). Lactose oleate as new biocompatible surfactant for pharmaceutical application. *Eur J Pharm Biopharm.* 124, 55–62. doi:10.1016/j.ejpb.2017.12.008.
- Marathe, S.-J., Dedhia, N., Singhal, R.-S. (2022). Esterification of sugars and polyphenols with fatty acids: techniques, bioactivities, and applications. *Curr. Opin. Food Sci.*, 43, 163–173. doi:10.1016/j.cofs.2021.12.008.
- Tiboni, M., Elmowafy, E., El-Derany, M.-O., Benedetti, S., Campana, R., Verboni, M., Potenza, L., Palma, F., Citterio, B., Sisti, M.; Duranti, A., Lucarini, S., Soliman, M.-E., Casertari, L. A. (2022). Combination of sugar esters and chitosan to promote in vivo wound care. *International Journal of Pharmaceutics*, 616, 121508. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121508.
- Chaiwut, P., Jirarat, A., Tiensri, N., Sangthong, S., Pintathong, P. (2022). Green Synthesis Optimization of Glucose Palm Oleate and Its Potential Use as Natural Surfactant in Cosmetic Emulsion. *Cosmetics*, 9(4), 76. doi:10.3390/cosmetics9040076.
- Kennedy, J.-F., Kumar, H., Panesar, P.-S., Marwaha, S.-S., Goyal, R., Parmar, A., Kaur, S. (2006). Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81, 866–876. doi: 10.1002/jctb.1473.
- Gumel, A.-M., Annuar, M.S.M., Heidelberg, T., Chisti, Y. (2011). Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry*, 46, 2079–2090. doi: 10.1016/j.procbio.2011.07.021
- Vuillemin, M.-E., Husson, E., Laclef, S., Jamali, A., Lambertyn, V., Pilard, S., Cailleu, D., Sarazin, C. (2022). Improving the environmental compatibility of enzymatic synthesis of sugar-based surfactants using green reaction media. *Process Biochemistry*, 117, 30–41. doi: 10.1016/j.procbio.2022.03.015.
- Klibanov, A. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409, 241–246. doi: 10.1038/35051719.
- Bidjou-Haiour, C., Klai, N. (2013). Lipase Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Xylose Esters and their Surfactant Properties. *Asian Journal of Chemistry*, 25, 4347–4350. doi: 10.14233/ajchem.2013.13973.
- Sharma, R.-K., Ggarwal, N., Arya, A., Olsen, C.-E., Parmar, V.-S., Prasad, A.-K. (2009). Lipase-catalyzed regio- and stereoselective deacylation: Separation of anomers of peracylated α,β -D-ribofuranosides. *Indian Journal of Chemistry*, 48, 1727–1731.
- Jabbari, H., Khosravi, S., Azimi, S. (2022). Synthesis and Evaluation of New Derivatives of Busulfan as an Anticarcinogenic Drug against k562 Cancer Cells Using the AO / PI Method. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 16, 1–9, doi: 10.2174/18741045-v16-e2209140.
- Frisch, M.-J.; Trucks, G.-W.; Schlegel, H.-B.; Scuseria, G.-E.; Robb, M.-A.; Cheeseman, J.-R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.-A.; Nakatsuji, H. Gaussian 09 (2013). Gaussian, Inc. (Wallingford CT).
- Zhao, L., Zhang, H., Hao, T., Li, S. (2015). In vitro antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters against five food-related bacteria. *Food Chemistry*, 187, 370–377. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.108
- Klai, N., Bidjou-Haiour, C., Bouquillon, S. (2015). D-Xylose-based surfactants: Synthesis, characterization and molecular modeling studies. *Comptes Rendus Chimie*, 18, 599–606. doi: 10.1016/j.crci.2014.11.007.
- Razafindralambo, H., Blecker, C., Mezdoor, S., Deroanne, C., Crowet, J.M., Brasseur, R., Paquot, M. (2009). Impacts of the Carbonyl Group Location of Ester Bond on Interfacial Properties of Sugar-Based Surfactants: Experimental and Computational Evidences. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113, 8872–8877. doi: 10.1021/jp903187f.

- [16] Larsson, J., Sanchez-Fernandez, A., Mahmoudi, N., Barnsley, L., Wahlgren, M., Nylander, T., Ulvenlund, S. (2019). The effect of the anomeric configuration on the micellization of hexadecylmaltoside surfactants. *Langmuir*, 35, 13904–13914. doi: [10.1021/acs.langmuir.9b01960](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01960).
- [17] Zhang, X., Wei, W., Cao, X., Feng, F. (2014). Characterization of enzymatically prepared sugar medium-chain fatty acid monoesters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1631–1637. doi: [10.1002/jsfa.6863](https://doi.org/10.1002/jsfa.6863).
- [18] Jiang, Y., Xu, Y., Li, F., Li, D., Huang, Q. (2019). Pectin Extracted from Persimmon Peel: A Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties Evaluation. *Food Hydrocolloids*, 101, 105561. doi: [10.1016/j.foodhyd.2019.105561](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105561).
- [19] Zhang, X.; Song, F.; Taxipalati, M.; Wei, W., Feng, F. (2014). Comparative Study of Surface-active Properties and Antimicrobial Activities of Disaccharide Monoesters. *PLoS one*, 9, e114845. doi: [10.1371/journal.pone.0114845](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114845)
- [20] Frisch, M.-J., Trucks, G.-W.; Schlegel, H.-B., et al. (2010). Gaussian 09, Revision B.01 and Revision D.01. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [21] Stephens, P.J., Devlin, F.J., Chabalowski, C.F., Frisch, M.J. (1994). Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *Journal of Physical Chemistry B*, 98, 11623–11627. doi: [10.1021/j100096a001](https://doi.org/10.1021/j100096a001).
- [22] Hay, P.J. (1977). Gaussian basis sets for molecular calculations. The representation of 3d orbitals in transition-metal atoms. *Journal of Chemical Physics*, 66, 4377–4384. doi: [10.1063/1.433731](https://doi.org/10.1063/1.433731).
- [23] Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical*, 45, 493–496. DOI: [10.1093/ajcp/45.4 ts.493](https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4.ts.493)
- [24] (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M 100, 30th ed. 126–128. <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
- [25] Ppeum Ki, L.; Hyung Kwoun, K. (2016). Antibacterial effect of fructose laurate synthesized by *Candida antarctica* B lipase-mediated transesterification. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(9). 1579–1585, doi:<https://doi.org/10.4014/jmb.1601.01045>.