

Optimisation de l'estéification enzymatique du mannose par l'utilisation de co-solvants

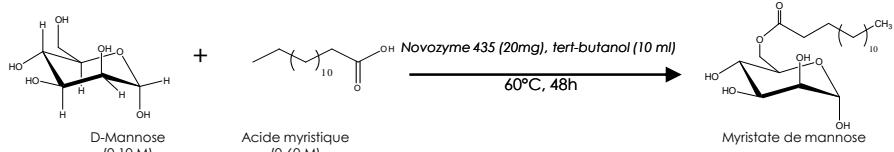
A.Brognaux,^a A.Favrelle,^b K.Nott,^c M.Deleu,^a G.Richard,^a A.Debuigne,^b C.Jérôme,^b J.-P.Wathelet,^c C.Blecker,^d M.Paquot,^a

^abrognaux.a@fsagx.ac.be, ^{a,c,d}Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, B-5030 Gembloux

^bCERM, Université de Liège, Sart-Tilman, Bat B6a, B-4000 Liège

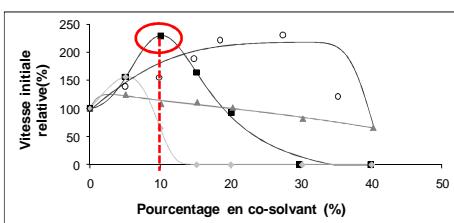
Les esters de sucres sont des surfactants non-ioniques ayant de nombreuses applications dans les industries alimentaire et pharmaceutique. Le mannose est un sucre lignocellulosique intéressant au niveau biologique puisque des récepteurs de mannose sont présents à la surface des cellules présentatrices d'antigène: des oligomères de chitosanes et des liposomes porteurs de mannose peuvent être utilisés en tant que vecteur de médicaments ou de vaccins à ADN nu [1,2,3]. Cette étude rapporte l'optimisation de la synthèse du myristate de mannose, catalysée par la lipase immobilisée B de *Candida antarctica* (Novozyme 435). Les concentrations optimales en mannose et en acide myristique sont respectivement de 0,1 et 0,6 M dans du *tert*-butanol pur à 60°C. Afin d'améliorer la vitesse initiale de la réaction, différents mélanges de *tert*-butanol et de co-solvants polaires ont été testés. Les solvants polaires (log P faibles) augmentent la solubilité des sucres mais provoquent l'inactivation partielle des lipases [4]. Le but de cette étude est donc de trouver un compromis entre la solubilité du sucre et le maintien de l'activité enzymatique, mais aussi d'étudier plus en profondeur l'effet des co-solvants.

Estéification du D-Mannose catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozyme 435)

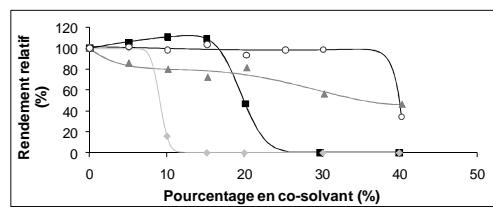


Réaction de référence
Rendement = 55%
Vitesse initiale = 1,3 g/l.h
Anomère à majoritaire (α/β 90/10)

Influence des co-solvants sur les vitesses initiales et les rendements de production du myristate de mannose



■ DMSO
▲ Pyridine
● Formamide
○ DMF

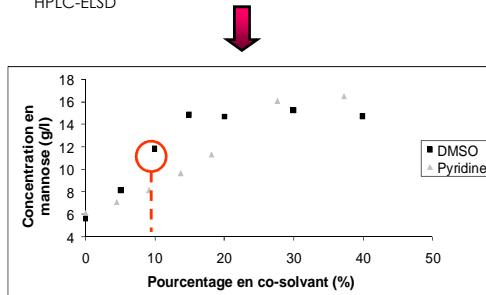


Ajout d'une faible proportion de co-solvant : augmentation des vitesses initiales de réaction MAIS ajout d'une quantité trop importante néfaste.
DMSO = le plus efficace car permet le meilleur gain de vitesse initiale, 130 %, à faible pourcentage v/v (10 % vol.).
Pyridine = moins bon des co-solvants testés.

Rendement de réaction diminue lors d'un ajout trop conséquent de co-solvant.
Seul le DMSO augmente légèrement le rendement de la réaction (11%) à faible pourcentage v/v (inférieur à 20 % vol.).

Influence du DMSO et de la pyridine sur la solubilité du mannose

Détermination de la concentration en mannose dissous pour différents pourcentages de DMSO et de pyridine par HPLC-ELSD



Influence du DMSO et de la pyridine sur l'activité de la Novozyme 435

Soumission de la Novozyme 435 à différents pourcentages v/v de DMSO et de pyridine durant 5 h, puis nettoyage et réutilisation dans le cadre de la réaction de référence. Comparaison avec les résultats obtenus avec la Novozyme 435 non soumise aux co-solvants (blanc).

Pourcentage de DMSO auquel l'enzyme a été soumise	Rendement à 48 h par rapport au blanc	Pourcentage de pyridine auquel l'enzyme a été soumise	Rendement à 48 h par rapport au blanc
10 %	86 %	10 %	105 %
15 %	58 %	15 %	106 %
20 %	25 %	20 %	105 %
30 %	0 %	30 %	102 %
40 %	0 %	40 %	96 %

DMSO : permet une meilleure solubilisation du mannose (jusqu'à 85 % du mannose total dissous dans le milieu réactionnel)

Augmentation des vitesses initiales de réaction MAIS effet inhibiteur sur l'enzyme.

Pyridine : augmentation de la solubilité du mannose, pas de dénaturation de l'enzyme, MAIS pas d'augmentation de la vitesse initiale de réaction

Pyridine pourrait déprotoner la fonction acide de l'acide myristique et ainsi réduire sa disponibilité

Conclusions

Cette étude nous a permis d'évaluer l'influence des quatre co-solvants sur les vitesses initiales et les rendements de production du myristate de mannose. L'anomère a s'est révélé être le plus stable. Les réactions ont été conduites à 60 °C avec 2 mg/ml de Novozyme 435. Les concentrations optimales en mannose et en acide myristique sont respectivement de 0,1 M et 0,6 M. Dans ces conditions, la vitesse initiale est de 1,3 g/l.h et le rendement de réaction est de 55 %. L'ajout de co-solvant permet d'accélérer la réaction: le meilleur système est le mélange DMSO / *tert*-butanol dans les proportions 10 / 90 v/v. La vitesse initiale de réaction est alors accrue de 130 %, ce qui mène à une vitesse initiale de 3,2 g/l.h.

Remerciements: Le projet « Superzyme » est financé par la Communauté Française de Belgique dans le cadre du programme « d' Action de Recherches Concertées – ARC »

Références

[1] Jiang.H.L., Kang M.L., Quan J.S., Kang S.G., Akaike T., Yoo H.S., Cho C.S. *Biomaterials* 29 (2007) 1931-1939.

[2] Wijagkanan W., Kawakami S., Takenaga M., Igarashi R., Yamashita F., Hashida M. *Journal of Controlled Release* 125 (2007) 121-130.

[3] Zhou X., Liu B., Yu X., Zha X., Zhang X., Wang X., Chen Ya., Chen Ye., Chen Yu., Shan Y., Jin Y., Wu Y., Liu J., Kong W., Shen J. *Biomaterials* 28 (2007) 4684-4692.

[4] A.R.M. Yahya, W.A. Anderson, M.Moo-Young, *Enzyme and Microbial Technology*. 23 (1998) 438-450