

# Influence de l'ajout de co-solvant pour l'estérification du D-mannose et de l'acide D-glucuronique assistée par les lipases

G. Richard <sup>(1),(2)</sup>, Alison Brognaux <sup>(1),(2)</sup>, K. Nott <sup>(1),(2)</sup>, M. Paquot <sup>(1)</sup>, J.-P. Wathelet <sup>(2)</sup>

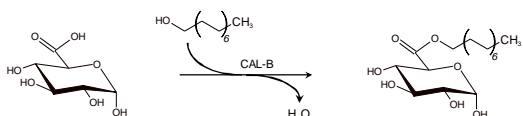
<sup>(1)</sup> Unité de Chimie Biologique Industrielle  
Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Passage des Déportés, 2, B – 5030 Gembloux, Belgique

<sup>(2)</sup> Unité de Chimie Générale et Organique

En parallèle à la production de biocarburant, le second objectif du bioraffinage est la transformation des sucres issus de l'hydrolyse de la lignocellulose en produits d'intérêt, qui se substitueront aux produits de la vie courante issus du pétrole. L'une des voies de valorisation envisageable est la synthèse de molécules amphiphiles par greffage de chaînes grasses sur le sucre. Ces composés trouveraient alors des applications dans de très nombreux domaines utilisant les tensioactifs (alimentaire, détergence, peinture...).<sup>1</sup> Afin de conférer un caractère amphiphile aux sucres, les lipases ont été utilisées comme outils d'estérification. Ces triglycérides hydrolases sont en effet capables de catalyser ce type de réaction dans des milieux organiques microaqueux. En outre, l'utilisation d'enzymes et non de catalyseurs chimiques permet d'éviter les réactions de protection/déprotection coûteuses en étapes intermédiaires, en déchets et en énergie, et au contraire de bénéficier de la spécificité de ces outils de biotechnologie blanche. De nombreux exemples dans la littérature démontrent le fort potentiel industriel de ces enzymes<sup>2,3</sup>.

Dans le cadre du programme d'excellence TECHNOSE et du projet d'Action de Recherche Concertées SUPERZYM, deux sucres ont été testés : un polyol, le D-mannose (Man), et un sucre acide, l'acide D-glucuronique (GlcA). Le greffage d'une chaîne tétradécyle a été mise en œuvre dans le *tertio*-butanol (*t*-BuOH) avec la lipase de *Candida antarctica* B (CAL-B, Novozyme 435), démontrée comme étant la lipase la plus adéquate. De par la faible solubilité des sucres dans les solvants organiques, l'influence de l'ajout de co-solvant pour améliorer leur estérification a été étudiée.

## Estérification de l'acide D-glucuronique<sup>4</sup>



### Conditions de référence

Les concentrations en substrats ont été optimisées pour obtenir les résultats ci-dessous.

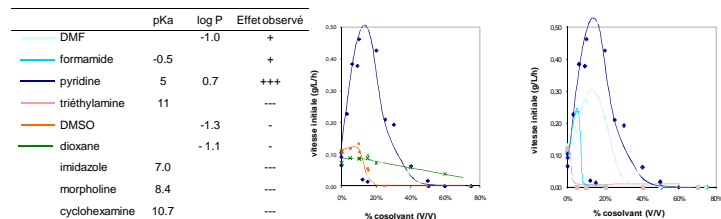
[GlcA] = 0.04 mol/L  
[C14OH] = 0.25 mol/L  
CAL-B = 10 g/L

Vitesse initiale = 0.12 g/L/h  
Rendement 24h = 20%

La vitesse et le rendement sont relativement faibles (en comparaison au glucose ou au Man). Par ailleurs, l'inconvénient de la modification des sucres en milieu organique est leur faible solubilité (0.015M) : pour palier ce problème, l'influence de l'ajout de différents co-solvants a été étudiée, avec l'objectif d'améliorer les cinétiques.

### Influence de l'ajout de co-solvants

Plusieurs co-solvant ont été testés. Ils diffèrent par :  
- leur polarité (évaluée par le « log P ») : l'ajout de co-solvant va modifier la polarité du *t*-BuOH (log P = 0.8), et donc la solubilité du GlcA  
- leur basicité (évaluée par le pKa) : de part le caractère acide du GlcA, l'ajout de co-solvant basique peut également modifier la solubilité du GlcA.



La pyridine est donc le meilleur des co-solvants : pour une teneur optimale de 10%, la vitesse initiale et le rendement sont fortement améliorés :

[GlcA] = 0.04 mol/L  
[C14OH] = 0.25 mol/L  
CAL-B = 10 g/L  
Pyridine = 10% V/V

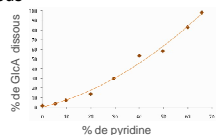
Vitesse initiale = 0.48 g/L/h (x 5)  
Rendement 24h = 40% (x 2)

L'effet « basique » du co-solvant ne semble pas jouer de rôle, puisqu'aucune corrélation entre le pKa et l'effet positif du co-solvant n'est mise en évidence.

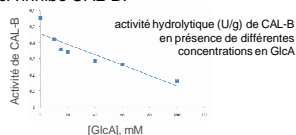
### Rôle de l'ajout de pyridine

L'effet de la teneur en pyridine sur la vitesse initiale suit une courbe en forme de cloche, ce qui s'explique par 2 effets antagonistes :

- l'ajout de pyridine augmente effectivement la concentration en GlcA dissous



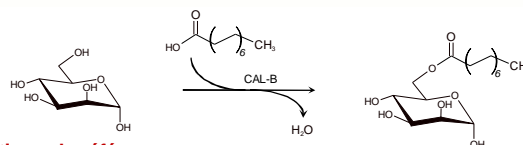
- l'activité de CAL-B diminue quand la concentration en GlcA augmente : le GlcA inhibe CAL-B.



La première différence entre GlcA et Man est la cinétique d'estérification : ce dernier est plus rapidement estérifié. Cela peut s'expliquer par l'inversion des rôles de donneur et accepteur d'acyle : le GlcA (sucre acide) est certainement un donneur d'acyle moins efficace que l'acide myristique (acide gras).

La seconde différence est le co-solvant optimal : bien que pour les deux sucres, l'ajout de co-solvant permet d'améliorer très nettement les vitesses initiales et rendements, le meilleur des co-solvants est la pyridine pour le GlcA et le DMSO pour le Man. Pour la pyridine, son influence positive est maximale pour un optimum de 10% V/V. En dessous de cet optimum, l'ajout de pyridine permet de dissoudre davantage de GlcA, d'où des vitesses supérieures ; par contre, au-delà de l'optimum, trop de GlcA est dissous, ce qui inhibe la lipase et diminue les vitesses. D'autres exemples de la littérature illustrent l'inhibition de lipases par des acides polaires (acide acétique, acide lactique)<sup>6</sup>. Quant au Man avec le DMSO, l'optimum en co-solvant est de 10% V/V, et s'explique également par une dissolution accrue du Man aux faibles teneurs, mais une inhibition directe de la lipase par le DMSO aux forts pourcentages. Dans ce cas, aucune inhibition de CAL-B par le Man n'a été constatée.

## Estérification du D-mannose<sup>5</sup>



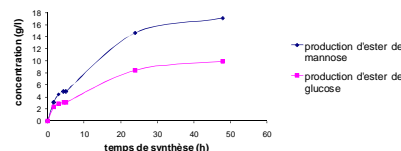
### Conditions de référence

Les concentrations en substrats ont été optimisées pour obtenir les résultats ci-dessous.

[Man] = 0.1 mol/L  
[C14OH] = 0.6 mol/L  
CAL-B = 2 g/L

Vitesse initiale = 1.3 g/L/h  
Rendement 24h = 55%

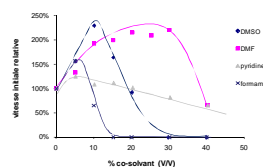
La synthèse de myristate de mannose présente une vitesse initiale plus importante que pour le glucuronate de myristyle. Elle est également plus rapide que pour la production d'ester de glucose, comme le graphique ci-dessous le montre.



Comme pour le GlcA, la solubilité du Man dans le *t*-BuOH est faible (0.036M). Sa disponibilité pourrait également être améliorée par l'utilisation de co-solvants.

### Influence de l'ajout de co-solvants

Les quatre mêmes co-solvants ont été testés dans le cadre de cette synthèse.



Le DMSO est le meilleur des co-solvants : vitesse initiale et rendement sont significativement améliorés : gain de 130% pour la vitesse initiale à faible pourcentage v/v (10% V/V). L'effet de la teneur en DMSO sur la vitesse initiale suit également une courbe en forme de cloche

### Rôle de l'ajout du DMSO

CALB a été soumise à différents pourcentages volumiques de DMSO durant 5h, avant d'être réutilisée pour la synthèse de myristate de mannose. Les rendements obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous (référence : réaction sans pré-traitement de la lipase au DMSO).

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

On constate ainsi que le DMSO inhibe lui-même la lipase : à 15% V/V, près de 50% de l'activité est perdue.

Par contre, le DMSO permet une meilleure solubilisation du Man (jusqu'à 0.085M dissous dans le milieu réactionnel), sans que celui-ci inhibe la lipase.