



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique
Laboratoire de Biocatalyse et des Bioprocédés

THESE

Présentée à l'INPL par

Eric HUSSON

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**SYNTHESE DE DERIVES FONCTIONNELS DE PETITS
PEPTIDES PAR VOIE ENZYMATIQUE**

Soutenue publiquement le 6 novembre 2008 devant la commission d'examen

Président & Rapporteur

M. Didier Combes

Professeur INSA, Toulouse

Rapporteur

M. Eric Dubreucq

Professeur SupAgro, Montpellier

Examineur

Mme Lucie Couturier

Chef de projet R&D, Bioeurope, Anet

Directeur de thèse

M. Ivan Marc

Directeur de Recherche, CNRS, Nancy

Co-directeurs de thèse

Mme Isabelle Chevalot

Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy

Mme Catherine Humeau

Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy

Invité

M. Frantz Fournier

Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy

à Pierre,

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés au laboratoire des Sciences du Génie Chimique en collaboration avec le laboratoire de Biocatalyse et des Bioprocédés. Je tiens donc à remercier M. Michel Sardin, directeur du LSGC de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens aussi tout particulièrement à présenter toute ma reconnaissance à M. Ivan Marc, Directeur de Recherche (CNRS, Nancy Université) Mme Isabelle Chevalot, Maître de Conférences (ENSAIA, INPL, Nancy Université) et Mme Catherine Humeau, Maître de Conférences (ENSAIA, INPL, Nancy Université) pour leur professionnalisme, leur encadrement scientifique avisé et leur disponibilité durant ces trois années de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à M. Eric Dubreucq, Professeur (SupAgro Montpellier), et à M. Didier Combes, Professeur (I.N.S.A., Toulouse) de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie aussi Mme Lucie Couturier, Chef de projet R&D, (Bioeurope, Anet) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également Mme Danièle Barth, Professeur (ENSIC, INPL, Nancy Université) pour son encadrement concernant la mise en œuvre des synthèses en CO₂ supercritique, ainsi que M. Régis Vanderesse, Chargé de Recherche (CNRS, Nancy Université) pour son aide concernant les analyses RMN et leurs interprétations.

Je remercie M. Frantz Fournier, Maître de Conférences (ENSAIA, INPL, Nancy Université) de m'avoir encadré pour la modélisation des cinétiques et de participer à mon jury de thèse en tant qu'invité.

Merci à M. Fabrice Blanchard, Ingénieur de Recherche (CNRS), M. Xavier Framboisier, Ingénieur d'Etudes (CNRS) et Mme Christelle Harscoat, Chargé de Recherche (CNRS) pour leurs compétences en techniques analytiques qu'ils m'ont apportées et enseignées sans lesquelles ce projet n'aurait pu être mené à bien.

Je remercie aussi tous les autres membres du LSGC et du LBB que je n'ai pas cités pour leur soutien, leur aide et leurs conseils.

Finalement, je remercie également les personnes qui me sont très chères (et particulièrement une), qui se reconnaîtront en lisant cela, sans qui, les choses n'auraient que peu de sens.

Abréviations

ATR	Attenuated total reflexion
SIC	Single ionic chromatogram
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
SM	Spectrométrie de masse
SM ⁿ	Spectrométrie de masse par fragmentation (n : niveaux de fragmentation)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
IRTF	Spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier
LC-ESI-MS	Liquid Chromatography ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
CAL B	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
PCL	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
DPPH	1-Diphényl-2-picrylhydraxyl
XO / X	Xanthine Oxydase / Xanthine
Trolox	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique
M ₂ B ₂	2-Méthyl-2-butanol
[Emim] ⁺	1-Ethyl-3-méthylimidazolium
[Bmim] ⁺	1-Butyl-3-méthylimidazolium
[Hmim] ⁺	1-Hexyl-3-méthylimidazolium
[Omim] ⁺	1-Octyl-3-méthylimidazolium
[Btma] ⁺	Butyltriméthylammonium
[MOEMIM] ⁺	1-Méthoxy éthyl-3-méthylimidazolium
[MEBu3P] ⁺	2-Méthoxy éthyl (tri-n-butyl) phosphonium
[N(CN) ₂] ⁻	Dicyanimide
[EtSO ₄] ⁻	Ethyle sulfate
[TfO] ⁻	Trifluorométhane sulfonate
[NTf ₂] ⁻	Bis(trifluoromethanesulfonyl) imide
[BF ₄] ⁻	Tétrafluoroborate
[PF ₆] ⁻	Hexafluorophosphate
ECOENG TM 512	Cocosalkyl pentaéthoxi-méthyl ammonium méthosulfate

Sommaire

Introduction.....	14
I. Etude bibliographique	17
1. Introduction – Préambule	17
2. La réaction d’acylation.....	18
2.1. L’acylation par voie chimique.....	18
2.2. L’acylation par voie enzymatique	19
3. Les enzymes catalysant les réactions d’acylation	20
3.1. Généralités.....	21
3.2. Les lipases	22
3.2.1. Généralités sur les lipases	22
3.2.2. Réactions catalysées par les lipases.....	23
3.2.3. Propriétés de sélectivité des lipases.	23
3.2.4. Structure des lipases	26
3.2.5. Mécanisme d’action des lipases – exemple de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	27
3.3. Autres enzymes biocatalysant la réaction d’acylation	29
3.3.1. Les acylases.....	29
3.3.2. Les carboxyl-estérases.....	31
3.3.3. Les protéases	32
3.3.4. Les acyl-transférases	33
4. Les paramètres influençant l’acylation enzymatique	35
4.1. Influence de l’eau.	36
4.2. Influence de l’état d’ionisation des substrats.	37
4.3. Influence de la structure moléculaire des substrats polyfonctionnels	40
5. Les milieux réactionnels classiques et innovants utilisés pour l’acylation enzymatique	41
5.1. Les solvants organiques	41
5.1.1. Généralités.....	41
5.1.2. Polarité	42
5.1.3. Solubilité des substrats	44
5.1.4. Procédés enzymatiques d’acylation en solvants organiques	45
5.2. Les milieux fondus.....	48
5.2.1. Généralités.....	48
5.2.2. Mise en œuvre de réactions d’acylation en milieux fondus	49
5.2.3. Maintien et orientation de la sélectivité.	51
5.3. Les liquides ioniques	52
5.3.1. Définition	52
5.3.2. Avantages et limites à l’utilisation de liquides ioniques en biocatalyse	53
5.3.3. Structure et propriétés physicochimiques	54
a) Hydrophobie.....	54
b) Viscosité.....	55
c) Polarité	56
5.3.4. Utilisation des liquides ioniques dans le domaine de la biocatalyse.....	56

5.4.	Le CO ₂ supercritique	59
5.4.1.	Présentation – Description	60
5.4.2.	Avantages d'utilisation.....	61
5.4.3.	Influence du CO ₂ supercritique sur les réactions enzymatiques d'acylation.	61
5.5.	Les milieux biphasiques	63
5.6.	Influence du milieu sur la sélectivité de l'enzyme	64
6.	Aspects cinétiques des réactions d'acylation.	66
6.1.	Les mécanismes réactionnels	66
6.1.1.	Mécanisme bi bi ordonné	66
6.1.2.	Mécanisme bi bi iso ordonné.	67
6.1.3.	Mécanisme bi bi ping-pong.....	68
6.1.4.	Mécanisme Theorell-Chance.....	69
6.2.	Exemples de modèles enzymatiques utilisés pour la modélisation.....	70
6.3.	Méthodologie d'établissement d'un modèle cinétique.....	71
6.3.1.	Choix du modèle enzymatique	71
6.3.2.	Inhibition par les substrats et/ou les produits	71
6.3.3.	Influence de la température	73
6.3.4.	Limitation par le transfert de masse et diffusion intraparticulaire	74

II. Matériel et méthodes 75

1.	Descriptif des biocatalyseurs utilisés	75
2.	Réactifs utilisés	76
3.	Détermination des propriétés physicochimiques des substrats et de leurs dérivés	77
3.1.	Détermination de la solubilité des substrats dans les différents milieux réactionnels.....	77
3.2.	Détermination des rendements d'extraction des substrats et produits.	77
4.	Mise en œuvre des réactions enzymatiques d'acylation	78
4.1.	Réacteurs de synthèse enzymatique en milieux organiques et liquides ioniques. 78	
4.2.	Réacteurs de synthèse enzymatique en CO ₂ supercritique.....	79
5.	Procédure expérimentale de synthèse	80
5.1.	Introduction des réactifs	81
5.2.	Indications supplémentaires	81
5.3.	Mise en œuvre en système biphasique aqueux.....	82
6.	Méthodes d'analyses des milieux de synthèse	82
6.1.	Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince.....	82
6.2.	Séparation et analyse quantitative par chromatographie liquide haute performance	83
6.2.1.	Matériel et protocole de séparation	83
6.2.2.	Détection et quantification	85
7.	Techniques de purification des produits de synthèse	89
7.1.	Purification du composé O-oléyl aminohexanol par chromatographie sur gel de silice.	89
7.2.	Purification du composé N,O-dioléyl aminohexanol par chromatographie sur couche mince préparative.....	90
7.3.	Purification du composé N-oléyl Lys-Ser et N-oléyl carnosine par chromatographie liquide haute performance.....	91
8.	Techniques d'analyse structurale	91
8.1.	Spectroscopie infrarouge.....	91

8.1.1.	Descriptif du matériel.....	92
8.1.2.	Traitement spectral.....	93
8.2.	Spectrométrie de masse.....	93
8.2.1.	Analyse en mode infusion directe et couplage CL-SM.....	93
8.2.2.	Analyse en mode fragmentation.....	95
8.3.	Résonance magnétique nucléaire.....	96
9.	Tests d'activité biologique.....	96
9.1.	Activité anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH de la carnosine et de son dérivé acylé.....	96
9.2.	Activité inhibitrice de la carnosine et de son dérivé acylé envers la xanthine oxydase.....	97
9.3.	Capacité de la carnosine et de son dérivé acylé à piéger le radical super oxyde.....	97
10.	Modélisation des cinétiques de bioconversion par MatLab.....	98

III. Acylation enzymatique d'une molécule bifonctionnelle : étude préliminaire. 100

1.	Introduction.....	100
2.	Etude préalable de l'acylation du 6-amino-1-hexanol.....	101
3.	Effet du ratio molaire des substrats.....	106
4.	Influence de la nature de l'agent acylant.....	107
5.	Etude de l'état d'ionisation des substrats.....	108
6.	Influence du système d'agitation des réacteurs Wheaton® et Syncore®.....	110
7.	Influence du biocatalyseur.....	111
8.	Obtention sélective du composé N-acylé.....	113
9.	Conclusion de l'étude préliminaire.....	114

IV. Influence du milieu réactionnel sur la N,O-acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol..... 116

1.	Introduction.....	116
2.	Etude de la chimio-sélectivité de la N,O-acylation enzymatique en solvants organiques et en liquides ioniques.....	117
3.	Contribution de l'article.....	136
4.	Acylation enzymatique dans [Omim] ⁺ [PF ₆] ⁻	137
5.	Acylation enzymatique en CO ₂ supercritique.....	139
6.	Conclusion.....	141

V. Etude des cinétiques de trans-acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol dans le 2-méthyl-2-butanol. Etablissement d'un modèle cinétique. 142

1.	Introduction.....	142
2.	Modélisation de la trans-acylation enzymatique d'une molécule bifonctionnelle en solvant organique.....	143
3.	Contribution de l'article.....	163

VI. Acylation enzymatique de dipeptides : influence du milieu réactionnel et de l'environnement moléculaire des groupes fonctionnels..... 164

1. Introduction 164
2. Etude de l'acylation enzymatique de dipeptides polaires : influence du milieu réactionnel et de l'environnement moléculaire des groupes fonctionnels 165
3. Contribution de l'article 185

VII. Synthèse d'un dérivé fonctionnel de carnosine par voie enzymatique..... 186

1. Introduction 186
2. Etude de l'acylation enzymatique de la carnosine en système aqueux biphasique catalysée par l'acyl-transférase de *Candida parapsilosis*. 187
3. Contribution de l'article 202

Conclusion et Perspectives.....203

Références.....209

Sommaire des Figures.

Figure I.1. Schéma général de la réaction d'acylation par voie chimique.....	18
Figure I.2. Schéma général de la réaction d'acylation catalysée par une enzyme.....	19
Figure I.3. Schéma simplifié de l'effet mémoire des enzymes en milieux organiques d'après Klibanov (2001).	21
Figure I.4. Représentation structurale du substrat et du site actif d'une lipase catalysant une N-acylation énanti-sélective d'après Gedey <i>et al.</i> , (2002).....	24
Figure I.5. Structure moléculaire de la lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (à gauche) et de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> (à droite). En bleu sont présentée les structures secondaires hélices α et en rouge les feuillets β . Les trois résidus aminés figurant sur les structures représentent la triade catalytique Ser, His et Asp d'après Uppenberg <i>et al.</i> , (1994) et Kim <i>et al.</i> , (1997).	27
Figure I.6. Mécanisme d'acylation catalysée par la triade catalytique de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> selon le modèle bi bi ping-pong d'après Malcata <i>et al.</i> , (1992) et Lopez Serrano <i>et al.</i> , (2001). A : Conformation native de l'enzyme et approche du substrat hydrophobe ; B : Formation d'un 1 ^{er} intermédiaire tétraédrique ; C : Relargage de l'alcool et formation de l'acyl-enzyme ; D : Attaque de l'accepteur d'acyle ; E : Formation d'un 2 nd intermédiaire tétraédrique ; F : Libération du produit acylé et retour à la conformation initiale de l'enzyme.	28
Figure I.7. Nouvelle possibilité de mécanisme d'action de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> catalysant la N-acylation d'après Gonzalez-Sabin <i>et al.</i> , (2006).....	29
Figure I.8. N-acylation énanti-sélective de l' α -phénylglycynonitrile par l'acide phénylacétique en milieu aqueux catalysée par la pénicilline acylase d'après Chilov <i>et al.</i> , (2003).....	30
Figure I.9. Cinétique de résolution énanti-sélective d'esters β -aminés en solvant organique par la pénicilline G acylase d'après Roche <i>et al.</i> , (1999).....	31
Figure I.10. Exemples de substrats pouvant être acylés par la famille d'enzymes WS/DGAT d'après Stoveken <i>et al.</i> , (2008).	34
Figure I.11. Schéma de réactions possibles pour la biosynthèse d'acide d'hydroxamique d'après Vaysse <i>et al.</i> , (1997).	35
Figure I.12. Influence de l'activité de l'eau initiale du milieu réactionnel sur la vitesse initiale de formation du produit et sur la concentration en produit formé à l'équilibre lors d'une réaction de trans-estérification de l'acide ascorbique dans le 2-méthyl-2-butanol à 70 °C catalysée par la lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée d'après Humeau <i>et al.</i> , (1998a).....	36
Figure I.13. Influence de l'activité de l'eau initiale du milieu réactionnel sur la vitesse initiale de réaction de N-acylation d'un alcool aminé dans le 2-méthyl-2-butanol à 70 °C catalysée par la lipase QL d' <i>Alcaligenes sp.</i> d'après Furutani <i>et al.</i> , (1996).....	37
Figure I.14. Analyse infrarouge d'un milieu réactionnel constitué d'un substrat aminé en présence d'acide oléique dans l'hexane d'après Maugard <i>et al.</i> , (1997).....	38
Figure I.15. Solubilisation de la N-méthyl glucamine permise par la formation d'un complexe paire d'ion avec le donneur d'acyle dans l'hexane d'après Maugard <i>et al.</i> , (1997b).....	38
Figure I.16. Schéma réactionnel de synthèse de vanillyloléamide d'après Dolores <i>et al.</i> , (2002).	39

Figure I.17. Proposition de mécanisme de N-acylation d'alcool aminé catalysée par une lipase spécifique de la O-acylation en solvant organique d'après Furutani <i>et al.</i> , (1996).....	40
Figure I.18. Etude du transfert d'acyle lors de l'acylation d'alcool aminé dont les groupes fonctionnels sont distants de 3 carbones d'après Torre <i>et al.</i> , (2006).....	41
Figure I.19. Stabilité de Novozym 435 [®] catalysant la trans-estérification du méthyl methacrylate à 30 °C dans divers solvants organiques. butanol (◇), tétrahydrofurane (□), acétonitrile (▲), diméthyl sulfoxyde (■), et hexane (◆) d'après Kaar <i>et al.</i> , (2003).....	44
Figure I.20. Relation entre l'hydrophobie du solvant, la température et le taux de conversion du substrat relative à la synthèse de Nε-oléyl lysine biocatalysée par Lypozyme [®] d'après Soo <i>et al.</i> , (2004).....	48
Figure I.21. Courbes cinétiques relatives à l'acylation de l'éthanolamine catalysée par Novozym 435 [®] dans l'acide laurique. Les pointillés représentent l'ajout séquentiel en deux temps de l'éthanolamine. (□) acide laurique, (Δ) amide-ester et (○) amide d'après Tufvesson <i>et al.</i> , (2007).....	50
Figure I.22. N-acylation énantiosélective d'amine primaire catalysée par une lipase en milieu fondu d'après Irimescu <i>et al.</i> , (2004b).....	51
Figure I.23. N-acylation énantiosélective d'amine primaire catalysée par CALB en milieu fondu d'après Prasad <i>et al.</i> , (2005).....	51
Figure I.24. Principaux cations et anions constitutifs utilisés en biocatalyse d'après Pitner (2004) et Sigma-Aldrich (2007).....	52
Figure I.25. Comparaison de l'organisation d'un sel inorganique classique (à gauche) et de celle d'un liquide ionique (à droite).....	54
Figure I.26. Influence de la composition en cations et anions constitutifs sur l'hydrophobie des liquides ioniques d'après Merck [®]	55
Figure I.27. Influence de la température sur la viscosité des liquides ioniques les plus couramment utilisés dans le domaine de la biocatalyse d'après Merck [®]	55
Figure I.28. Comparaison de l'activité enzymatique de trans-estérification de la lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> en solvants organiques et en liquides ioniques d'après Park <i>et al.</i> , (2003).....	57
Figure I.29. Diagramme de phase du dioxyde de carbone.....	60
Figure I.30. Cellule d'observation permettant la visualisation du passage à l'état supercritique. a) Séparation entre la phase liquide et gazeuse. b) L'interface liquide gaz commence à entrer en transition suite à une élévation de la température. c) Les deux phases ne sont plus distinctes, l'état supercritique est atteint d'après Hobbs <i>et al.</i> , (2007).....	60
Figure I.31. Schéma réactionnel simplifié d'une réaction à deux substrats.....	66
Figure I.32. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi ordonné.....	67
Figure I.33. Simulation de l'estérification du palmitate d'isopropyle catalysée par Novozym 435 [®] en système sans solvant à 70 °C et à 10 ⁵ Pa d'après Garcia <i>et al.</i> , (1999).....	67
Figure I.34. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi bi iso ordonné.....	68
Figure I.35. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi bi ping-pong.....	68

Figure I.36. Comparaison entre les vitesses calculées par modélisation et les vitesses expérimentales de la réaction d'acylation d'alcool primaire par un anhydride acétique catalysée par Novozym 435 [®] dans l'hexane pour des concentrations en alcool de 0,05 M (□), 0,075M (●), 0,1 M (▲) et 0,2 M(■) d'après Romero <i>et al.</i> , (2007).....	69
Figure I.37. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme Theorell-Chance.	69
Figure I.38. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi bi aléatoire.	69
Figure I.39. Représentation en double inverse des vitesses initiales de synthèse d'ester en fonction de la concentration en donneur d'acyle lors de la réaction de trans-estérification du benzylglycérol dans le dichlorométhane catalysée par la lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> d'après Hazarika <i>et al.</i> , (2004).....	71
Figure I.40. Mécanisme réactionnel bi-bi iso ordonné utilisé pour la modélisation des cinétiques de trans-estérification du n-octanol (A) par l'acétate de vinyle (B) en milieu fondu catalysé par Novozym 435 [®] (E) avec une inhibition par le n-octanol conduisant à la formation d'un complexe inactif (EA). EPQ correspond à l'isomère de EBA.	72
Figure I.41. Représentation de la perte d'activité hydrolytique au cours du temps de différents biocatalyseurs lors d'une incubation à 50 °C en milieu aqueux d'après Arroyo <i>et al.</i> , (1999).	73
Figure I.42. Comparaison des cinétiques modélisées et expérimentales obtenues pour la trans-acylation de l'alcool tetrahydrofurfuryle par le butyrate d'éthyle catalysée par Novozym 435 [®] dans l'heptane pour 3 rapport molaire différents à une vitesse d'agitation optimale et en considérant une taille des particules de support constantes. Les lignes représentent les courbes expérimentales et les symboles représentent les courbes simulées d'après Yadav <i>et al.</i> , (2004).	74
Figure II.1. (a) Schéma du réacteur Wheaton [®] utilisé pour la mise en œuvre des réactions d'acylation, (1. Plaque chauffante et d'agitation thermorégulée. 2. Bain d'huile. 3. Réacteur. 4. Barreau aimanté suspendu. (b) Station de synthèse Syncore Reactor [®] (Büchi).....	78
Figure II.2. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de faisabilité d'une réaction d'acylation enzymatique en CO ₂ supercritique et la visualisation du comportement des réactifs en fluide supercritique.	79
Figure II.3. Schéma du réacteur discontinu utilisé pour la mise en œuvre d'une réaction d'acylation en CO ₂ supercritique l'établissement d'un suivi cinétique.....	80
Figure II.4. Gradient utilisé pour la méthode CLHP. Phase A : méthanol (80) - eau (20) - TFA (0.1) - (v/v/v) ; phase B : méthanol (100) - TFA (0.1) - (v/v).....	84
Figure II.5. Courbes de calibrations pour le dosage CLHP du N,O-dioléyl aminohexanol (a), de l'acide oléique (b) et de l'oléate d'éthyle (c) par spectroscopie UV à 214 nm.	86
Figure II.6. Composition d'un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière.	86
Figure II.7. Représentation schématique des gouttelettes constitutives de l'aérosol polydispersé généré par le nébulisateur.....	87
Figure II.8. Représentation schématique des trois phénomènes de diffusion contribuant à la détection d'un signal par le DEDL.	87
Figure II.9. Modélisation du signal DEDL en fonction de la concentration de l'échantillon injecté d'après Chaminade (2007).	88

Figure II.10. Courbes de calibrations du 6-amino-1-hexanol (0,07 g/L à 0,7 g/L) détecté par diffusion de la lumière obtenues soit par l'application (a) d'un modèle quadratique ($R^2 = 0.999$) soit (b) d'un modèle linéaire ($R^2 = 0.991$).	88
Figure II.11. Courbes de calibrations utilisées pour le dosage CLHP du O-oléyl aminohexanol (a), de la Lys-Ser, HCl (b), du N-oléyl Lys-Ser (c), de la Ser-Leu (d), et de la carnosine (e).	89
Figure II.12. Dispositif expérimental utilisé pour la purification du O-oléyl aminohexanol. 1. Réservoir de phase mobile (butanol-acide acétique-eau 60/20/20 v/v/v). 2. Colonne de silice 300 x 2,5 mm. Collecteur automatique de fraction.	90
Figure II.13. Interféromètre de Michelson.	92
Figure II.14. Cellule ATR. Représentation schématique.	92
Figure II.15. Spectre de masse du N-oléyl Lys-Ser obtenu en mode positif électrospray par infusion directe du composé purifié et ressolubilisé dans un mélange eau/méthanol (50/50 v/v). 498,7 g.mol ⁻¹ : M + H ⁺ (N-oléyl Lys-Ser), 520,7 g.mol ⁻¹ : M + Na ⁺ (N-oléyl Lys-Ser).	94
Figure II.16. Analyse CL-SM du milieu réactionnel d'acylation enzymatique de la carnosine. (a) Chromatogramme UV (214 nm). (b) Chromatogramme ionique simple (SIC) fixé à m/z [490-492 g.mol ⁻¹]. (c) Spectre de masse du pic présentant un temps de rétention de 7,10 mn.	94
Figure II.17. Eléments constitutifs d'un spectromètre de masse à fragmentation. Représentation schématique de la chambre de collision.	95
Figure III.1. Structure moléculaire du 6-amino-1-hexanol.	100
Figure III.2. Schéma réactionnel de la réaction de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol catalysée par Novozym435 [®] .	100
Figure III.3. Plaques CCM caractéristiques obtenues après migration dans le butanol/acide acétique/eau 60/20/20 v/v/v et révélation à la ninhydrine (a) et dans le chloroforme/acide acétique/méthanol 95/0,5/4,5 v/v/v et révélation au KMnO ₄ (b) des prélèvements réactionnels de la réaction de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol catalysée par Novozym 435 [®] dans le 2-méthyl-2-butanol.	101
Figure III.4. Spectre de masse obtenu par infusion directe en ionisation par électrospray en mode positif du composé O-oléyl aminohexanol purifié solubilisé dans un mélange méthanol eau 50/50 v/v. m/z O-oléyl aminohexanol, H ⁺ = 382,6 g.mol ⁻¹ , m/z O-oléyl aminohexanol, Na ⁺ = 404,6 g.mol ⁻¹ .	103
Figure III.5. Spectres RMN du proton du composé O-oléyl aminohexanol (a) et du composé N,O-dioléyl aminohexanol (b). Spectres RMN du carbone du composé O-oléyl aminohexanol (c) et du composé N,O-dioléyl aminohexanol (d).	103
Figure III.6. Suivis cinétiques relatifs à la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence d'oléate d'éthyle (0,12 M) biocatalysée par Novozym 435 [®] , à 55 °C, dans le 2-méthyl-2-butanol (a). Les détails des deux premières heures de la cinétique sont représentés en (b) pour les substrats et (c) pour les produits.	105
Figure III.7. Influence du rapport molaire 6-amino-1-hexanol/oléate d'éthyle sur le taux de conversion du 6-amino-1-hexanol à l'équilibre lors de la réaction de trans-acylation catalysée par Novozym 435 [®] , dans le 2-méthyl-2-butanol, à 55 °C, en réacteur Wheaton [®] .	107
Figure III.8. Spectres infrarouges obtenus après traitement (correction ligne de base, lissage 13 points, normalisation min-max) lors de l'analyse de mélanges de 6-amino-1-hexanol et d'acide oléique à différentes conditions molaires en solvants organiques : (a) 2-méthyl-2-butanol et (b) hexane.	109

Figure III.9. Suivi cinétique relatif à la réaction enzymatique d'hydrolyse du N,O-dioléyl aminohexanol (0,01 M) en biocatalysée par Novozym 435 [®] à 55 °C dans le 2-méthyl-2-butanol/eau (86/14, v/v).....	113
Figure III.10. Suivis cinétiques relatifs à la réaction enzymatique d'hydrolyse du O-oléyl aminohexanol (0,095 M) biocatalysée par Novozym 435 [®] à 55 °C dans le milieu 2-méthyl-2-butanol / eau (86/14 v/v).....	114
Figure IV.1. Suivi cinétique relatif à la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence acide oléique (0,24 M) biocatalysée par Novozym 435 [®] à 55 °C dans [Omim] ⁺ [PF ₆] ⁻ en réacteur Syncore [®]	138
Figure IV.2. Suivis cinétiques relatifs à la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence acide oléique (0,24 M) biocatalysée par Novozym 435 [®] à 55 °C en CO ₂ supercritique à 200.10 ⁵ Pa.....	140

Sommaire des Tableaux

Tableau I.1. Exemples de N-acylations énantio-sélectives catalysées par des lipases d'après Gill <i>et al.</i> , (2007). 24	
Tableau I.2. Exemples d'acétylation de mono- et d'oligosaccharides catalysés par l'acyl-estérase de <i>T. reesei</i> . Efficacité et nombre de produits différents synthétisés par substrat d'après Kremnický <i>et al.</i> , (2004).....	32
Tableau I.3. Valeurs de log P de quelques solvants organiques d'après Nys (1973) et Mannhold (2000).	43
Tableau I.4. Solubilité d'un alcool aminé dans des solvants organiques aux polarités bien distinctes d'après Fernandez-Perez <i>et al.</i> , (2001).....	45
Tableau I.5. Exemples de réactions enzymatiques d'acylation mises en œuvre en liquides ioniques.....	58
Tableau I.6. Réactions enzymatiques récemment réalisées en CO ₂ supercritique.	63
Tableau I.7. Exemples d'étude de modélisation des cinétiques enzymatiques d'acylation utilisant des mécanismes enzymatiques.	70
Tableau II.1. Descriptif des réactifs utilisés pour cette étude.....	76
Tableau II.2. Temps de rétention des différents composés détectés par spectroscopie UV et par diffusion de lumière.....	85
Tableau III.1. Paramètres cinétiques relatifs à la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol en présence d'oléate d'éthyle dans le 2-méthyl-2-butanol à 55 °C catalysée par Novozym 435 [®]	106
Tableau III.2. Comparaison des performances de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence d'acide oléique ou d'oléate d'éthyle (0,24 M) catalysée par Novozym 435 [®] dans le 2-méthyl-2-butanol à 55 °C en réacteur Wheaton [®]	107
Tableau III.3. Comparaison des performances de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence d'acide oléique (0,24 M) catalysée par Novozym 435 [®] dans le 2-méthyl-2-butanol à 55 °C dans deux types de réacteurs.....	110
Tableau III.4. Comparaison des performances et de la chimio-sélectivité de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol en présence d'acide oléique catalysée par différentes enzymes dans le 2-méthyl-2-butanol ou en milieu aqueux biphasique en réacteur Syncore [®]	112

Introduction générale.

La synthèse de dérivés fonctionnels de molécules bioactives telles que les peptides, les polyphénols et les lipides insaturés constitue un domaine de recherche en pleine expansion dans le secteur de l'agroalimentaire, de la pharmacie et cosmétique. Les voies de synthèse principalement utilisées à l'échelle industrielle sont chimiques. Cependant, dans le contexte de développement durable actuel, les recherches fondamentales ou plus appliquées s'orientent de plus en plus vers les procédés de bioconversion afin de respecter certaines exigences environnementales. Afin que la bioconversion soit considérée comme une alternative prépondérante au regard des nombreux procédés chimiques de synthèse existants, la combinaison de connaissances en biochimie, en génie enzymatique et en génie des procédés est indispensable. Pour qu'un nouveau bioprocédé puisse se substituer à un procédé chimique bien connu, celui-ci doit répondre à de nombreuses conditions de nature scientifique, économique et sociétale.

Les peptides constituent une source importante de molécules à fort potentiel. Cependant, leur utilisation est souvent contrainte par certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques liées à leur structure moléculaire qui engendre des problèmes de solubilité, de stabilité et de biodisponibilité. Une solution consiste à modifier cette structure en produisant des dérivés susceptibles de faciliter la valorisation de ces molécules d'intérêt.

La mise en œuvre de bioprocédés pour la synthèse de dérivés fonctionnels de peptides est, jusqu'à présent, un domaine peu exploré dans la littérature. Cependant, les bioprocédés et plus particulièrement les procédés d'acylation enzymatique, permettent d'envisager l'obtention de peptides davantage biodisponibles, stables et solubles dans les phases lipidiques. L'étude de la synthèse de dérivés acylés fonctionnels de peptides par voie enzymatique doit tenir compte de différents paramètres susceptibles de régir le procédé. Tout d'abord, le biocatalyseur doit être choisi en fonction de certaines de ses caractéristiques : type d'enzyme, activité, sélectivité et spécificité. Actuellement, les lipases constituent les principales enzymes, utilisées le plus souvent en milieu organique pauvre en eau, pour le greffage covalent de groupes acyles sur des substrats de type alcool, amine, alcools aminés et acides aminés. Cependant, d'autres classes de biocatalyseurs peuvent également présenter des aptitudes intéressantes telles que les acylases, les acyl-transférases, les carboxylases et les protéases. Le milieu de synthèse a également un impact important sur le procédé, non seulement sur le plan technologique, mais aussi sur un plan économique et écologique. La

nécessité de développer des procédés écologiques conduit à l'emploi de nouveaux milieux réactionnels pour la mise en œuvre de ces réactions enzymatiques. Depuis quelques années, des milieux plus innovants comme les liquides ioniques et les fluides supercritiques ont fait leur apparition pour la conduite de procédés biocatalysés. Leurs principaux avantages sont des propriétés de polarité nouvelles permettant la solubilisation de composés insolubles dans les solvants organiques habituels et une toxicité limitée pour l'environnement. La plupart des travaux de recherche recensés dans la littérature abordent essentiellement la O-acylation (estérification, trans-estérification) dans ces milieux non-conventionnels, et il apparaît intéressant d'étudier la N-acylation et la sélectivité enzymatique envers la O- ou la N-acylation dans le cas de molécules polyfonctionnelles dans de tels milieux.

C'est dans ce contexte, qu'une étude approfondie concernant la synthèse de dérivés acylés fonctionnels de peptides par voie enzymatique a été envisagée. La compréhension et la maîtrise de l'influence des milieux réactionnels sur les performances (rendement, sélectivité, vitesse de réaction) des procédés enzymatiques d'acylation de peptides permettront d'ouvrir un champ nouveau d'investigations de systèmes réactionnels permettant de générer des molécules dérivées de peptides à fonctionnalités nouvelles ou modifiées.

L'objectif de l'étude est de déterminer les conditions de synthèse de la liaison amide et, plus généralement, d'acylation de molécules polyfonctionnelles telles que les alcools aminés et les dipeptides par l'acide oléique et/ou l'oléate d'éthyle, par voie enzymatique. Les potentialités des biocatalyseurs et des milieux réactionnels pour la détermination des conditions de mise en œuvre des réactions et le contrôle de leur sélectivité seront plus particulièrement étudiées.

Dans une première phase, l'étude se focalisera sur l'acylation enzymatique d'une molécule modèle bifonctionnelle : le 6-amino-1-hexanol. Les objectifs sont les suivants :

- étudier les performances de la réaction d'acylation enzymatique de cette molécule catalysée par une lipase en solvants organiques,
- déterminer le biocatalyseur le plus adéquat,
- étudier la chimio-sélectivité de la réaction et déterminer les facteurs susceptibles d'orienter cette dernière,
- comparer les performances cinétiques (vitesses initiales de synthèse) et le rendement (taux de conversion du substrat à l'équilibre) de l'acylation directe et de la trans-acylation.

- étudier la formation d'un complexe ionique entre l'accepteur et le donneur d'acyle en fonction de leur état d'ionisation et son influence sur l'efficacité de la réaction.

Une étude spécifique sera consacrée à l'influence des différents milieux réactionnels classiques et innovants sur la N,O-acylation directe du 6-amino-1-hexanol catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435[®]). Différents milieux réactionnels seront utilisés tels que des solvants organiques aux polarités bien distinctes (2-méthyl-2-butanol et hexane), des systèmes sans solvant (milieux fondus à base d'acide oléique ou d'oléate d'éthyle), différents liquides ioniques et le CO₂ supercritique. L'objectif est de caractériser leur influence sur l'efficacité et la chimio-sélectivité de la réaction d'acylation et de vérifier leur intérêt par rapport aux solvants organiques classiques.

Afin de compléter cette étude cognitive de la N-acylation, une étude expérimentale couplée à une démarche de modélisation des cinétiques sera entreprise afin de déterminer les conditions quasi-optimales de la réaction de trans-acylation de cette molécule en solvant organique (2-méthyl-2-butanol) catalysée par Novozym 435[®] et d'établir un modèle cinétique capable de prédire les cinétiques de cette réaction dans une large gamme de concentrations et de rapports molaires des substrats.

Dans une deuxième phase, l'étude sera appliquée à des dipeptides polyfonctionnels : Lys-Ser, HCl et Ser-Leu. L'influence des milieux réactionnels (solvant organique, système sans solvant et liquide ionique) sur la solubilité des substrats, sur la sélectivité de l'acylation de la Lys-Ser, HCl, et sur les performances de la réaction sera étudiée.

Plus particulièrement, l'influence de l'environnement moléculaire de certaines fonctions sur leur capacité à être acylées sera étudiée. L'étude sera ensuite appliquée à la carnosine : un dipeptide fonctionnel connu pour ses activités biologiques. Les conditions réactionnelles de son acylation seront déterminées et l'influence des milieux réactionnels sur l'efficacité de la réaction et leur aptitude à solubiliser ce substrat seront également étudiées, le but étant de développer un procédé de synthèse enzymatique efficace de dérivé acylé de carnosine.

Enfin, le développement d'un procédé de synthèse de dérivé acylé de carnosine en milieu aqueux biphasique sera abordé en utilisant l'acyl-transférase de *Candida parapsilosis*. Les activités antioxydantes de ce dérivé seront évaluées telles que l'aptitude à inhiber la xanthine oxydase, à piéger les radicaux DPPH et l'anion superoxyde afin de mesurer l'impact de l'acylation sur les activités biologiques du dipeptide initial.

I. Etude bibliographique

1. Introduction – Préambule

Les peptides sont des molécules constituées de résidus acides aminés reliés entre eux par une liaison peptidique. Ils sont soit issus des voies métaboliques de synthèse, soit de la dégradation des protéines. Ils peuvent présenter une diversité d'activités biologiques et/ou de potentiels thérapeutiques. En effet, certaines de ces molécules ont un pouvoir antioxydant tels que des peptides dérivés du collagène et le dipeptide carnosine (Togashi *et al.*, 2002 ; Babizhayev 2006). D'autres sont considérées comme des molécules anti-hypertensives ; c'est le cas de la calcitonine ou encore du peptide BPP 10c (Deng *et al.*, 2005 ; Silva *et al.*, 2008). Des activités neuroprotectrices, antimicrobiennes et antivirales ont été mises en évidence chez certains peptides démontrant ainsi leur potentiel thérapeutique (Egorov *et al.*, 2005 ; Badr 2007 ; Fouad *et al.*, 2007 ; Shen *et al.*, 2007 ; Fouad *et al.*, 2008). Cependant, leur utilisation est bien souvent limitée par leur polarité qui peut rendre difficile leur transfert à travers les membranes biologiques ou par leur sensibilité vis-à-vis de protéases endogènes affectant alors leur temps de demi-vie. Pour limiter ces contraintes, une voie consiste à modifier structurellement ces molécules en leur greffant par liaison covalente un groupe acyle : c'est l'acylation. Plusieurs études ont montré qu'il était possible d'augmenter l'hydrophobie de molécules d'intérêt en les acylant. Par exemple, le peptide BPTI, inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine, sous forme acylée, présente une hydrophobie plus marquée et interagit alors plus efficacement avec la bicouche phospholipidique que son précurseur non-acylé (Pool *et al.*, 1998). L'acylation du dipeptide Trp-Leu par l'acide myristique, augmentant ainsi sa lipophilie, permet d'améliorer son affinité pour les constituants membranaires et induit son accumulation dans le tissu cible de la muqueuse buccale (Veuillez *et al.*, 1999). L'acylation d'un peptide antimicrobien issu de l'hydrolyse de la lactoferricine améliore son affinité pour les membranes phospholipidiques (Zweytick *et al.*, 2006). Concernant la sensibilité vis-à-vis de la protéolyse, des travaux concernant l'acylation de l'insuline ont suggéré un accroissement du temps de demi-vie de la protéine acylée en fonction du nombre de carbones du donneur d'acyle (Asada *et al.*, 1994). De plus, il a été montré que l'acétylation de la carnosine diminuait sa vitesse d'hydrolyse par la carnosinase *in vitro* (Pegova *et al.*, 2000).

L'acylation peut aussi permettre la vectorisation d'un peptide vers un compartiment cellulaire cible (Baldessarini *et al.*, 2001). L'agent acylant par ses propriétés intrinsèques permet dans certains cas de former avec le peptide un complexe synergique présentant de meilleurs propriétés biologiques ; citons l'exemple du DHA, acide docosahexaénoïque reconnu pour ces propriétés antineurodégénératives (Florent *et al.*, 2006). Les molécules acylées et particulièrement les peptides ou les acides aminés libres peuvent présenter d'autres intérêts. En effet, les molécules amphiphiles résultant de l'acylation sont aussi reconnues pour leurs propriétés tensioactives (Infante *et al.*, 2004).

L'acylation de molécules et de petits peptides constitue donc une modification structurale prometteuse pour valoriser au mieux le potentiel thérapeutique, cosmétologique ou encore agro-alimentaire de ces molécules.

2. La réaction d'acylation.

La réaction d'acylation est définie comme l'établissement d'une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile telle qu'une amine ou un alcool. Le soufre est lui aussi susceptible d'être acylé formant ainsi une liaison thioester mais est peu présent dans les molécules de types acides aminés et petits peptides. Il existe deux voies d'acylation possibles : la voie chimique et la voie enzymatique.

2.1. L'acylation par voie chimique

L'acylation de biomolécules de type acides aminés et/ou peptides par voie chimique est aujourd'hui bien connue. La condensation entre un acide gras et un acide aminé est généralement réalisée par la réaction de Schotten-Baumann en présence d'un chlorure d'acide gras ou d'un anhydride à pH basique (figure I.1.).

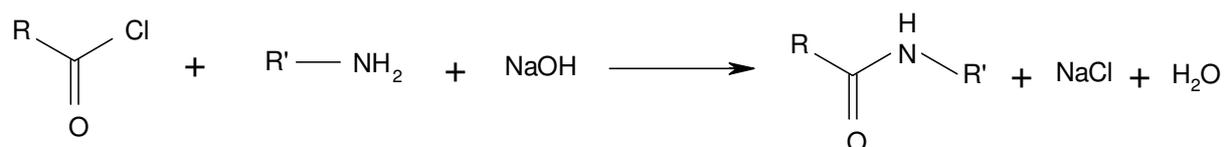


Figure I.1. Schéma général de la réaction d'acylation par voie chimique.

L'avantage de cette réaction est son rendement important de l'ordre de 70 à 80 %. Mais son manque de spécificité nécessite la mise en place de procédés de protection et déprotection, ce qui entraîne inévitablement une baisse de rendement. Les autres inconvénients de cette méthode de synthèse sont directement liés aux conditions expérimentales de mise en œuvre de la réaction : température élevée, pH extrême, utilisation de solvants toxiques (DMF, DMSO, toluène...), formation de coproduit (sel) qui ne répondent plus de nos jours aux exigences en matière d'environnement. Cependant la majorité des travaux décrits dans la littérature concernant la synthèse de dérivés acylés de peptides ont eu recours à cette voie chimique et ont pu ainsi mettre en évidence l'intérêt de l'acylation sur ces molécules (Zweytick *et al.*, 2006 ; Alminana *et al.*, 2007 ; Belsito *et al.*, 2007). Une alternative intéressante à cette voie chimique est la voie enzymatique qui consiste à employer des biocatalyseurs le plus souvent dans des milieux organiques.

2.2. L'acylation par voie enzymatique

Le principe de l'acylation enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase ou triacylglycérol acyl-hydrolase) dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, la réaction réverse de l'hydrolyse est favorisée et permet ainsi l'attachement covalent d'un groupe acyle sur une fonction nucléophile. Le schéma général de synthèse consiste soit à catalyser la formation d'une liaison ester lorsque l'accepteur d'acyle comporte une fonction hydroxyle soit la formation d'une liaison amide lorsque celui-ci comporte une fonction amine (figure I.2.).

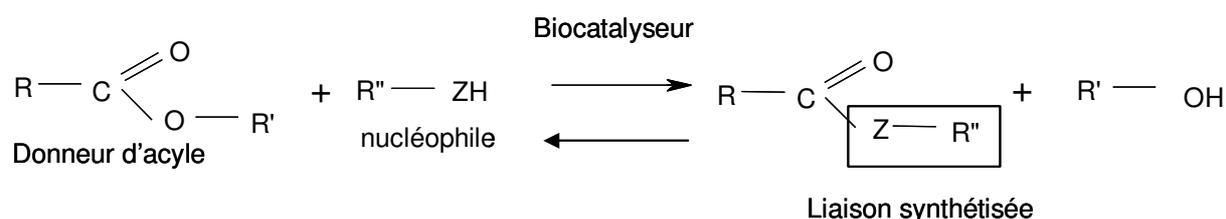


Figure I.2. Schéma général de la réaction d'acylation catalysée par une enzyme.

L'utilisation des enzymes pour la catalyse en milieu organique suscite depuis ces 20 dernières années un intérêt grandissant. Les principaux avantages liés à l'utilisation de cette voie de synthèse par rapport à la voie chimique sont :

- des vitesses de réaction plus grandes : les vitesses des réactions catalysées par des enzymes sont multipliées par des facteurs compris entre 10^6 et 10^{12} par rapport aux réactions correspondantes sans catalyseur,
- des conditions de réaction plus douces : les réactions catalysées par des enzymes peuvent avoir lieu dans des conditions relativement douces : température en dessous de 100°C , pression atmosphérique, et pH proche de la neutralité,
- une spécificité de réaction plus grande : les enzymes ont des propriétés de spécificité beaucoup plus grandes vis-à-vis de leurs substrats que les catalyseurs chimiques ; ainsi, les réactions enzymatiques ne donnent que rarement des produits secondaires.

La plupart des travaux concernant la synthèse de dérivés acylés par voie enzymatique sont consacrés à divers substrats monofonctionnels de type alcool ou amine, et polyfonctionnels tels que des alcool aminés, des acides aminés et des peptides (Gardossi *et al.*, 1991 ; Fernandez-Perez *et al.*, 2001 ; Fernandez-Perez *et al.*, 2003). Dans le cas d'un nucléophile de type hydroxyle ou amine, la réaction sera respectivement considérée comme une O ou N-acylation directe si le donneur d'acyle est un acide gras libre et comme une trans-O- ou trans-N-acylation si c'est un ester d'acide gras (Furutani *et al.*, 1995). Vu l'intérêt de biomolécules de type esters, amides, surfactants, lipopeptides, la N et/ou O-acylation par voie enzymatique ouvre un champ d'investigation porteur pour la synthèse de dérivés fonctionnels.

3. Les enzymes catalysant les réactions d'acylation

Au cours de ces 25 dernières années, la demande en produits d'intérêt thérapeutique, agroalimentaire ou cosmétique s'est fortement accrue, de même que les exigences en matière de procédés de synthèse respectueux de l'environnement. Dans ce contexte, l'utilisation de biocatalyseurs s'est fortement développée. Au niveau industriel, les avantages de leur utilisation malgré leur coût relativement élevé, sont des dépenses énergétiques faibles, des étapes de purification simplifiées, des conditions expérimentales douces, évitant la dégradation des substrats et des produits et permettant la réutilisation du biocatalyseur.

3.1. Généralités

Il est généralement admis qu'une enzyme placée en milieu organique exprime de nouvelles propriétés : augmentation de la thermostabilité, modification de la spécificité, effet mémoire de la molécule (figure I.3.) et surtout capacité à catalyser des réactions impossibles cinétiquement et thermodynamiquement en milieux aqueux telles que l'acylation en solvants organiques catalysée par des hydrolases (Klibanov 2001).

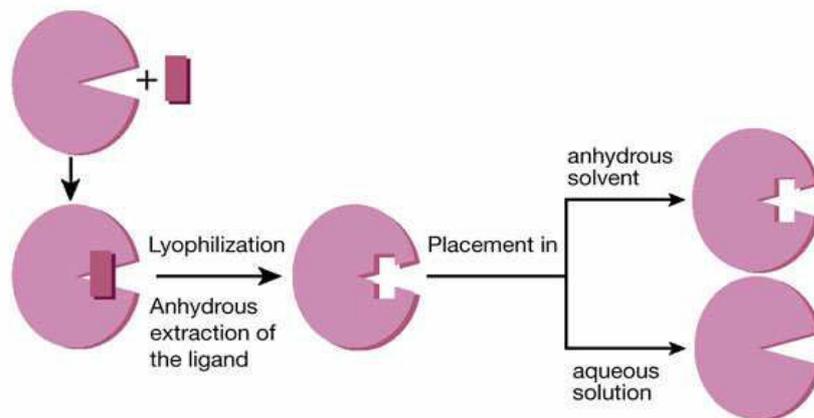


Figure I.3. Schéma simplifié de l'effet mémoire des enzymes en milieux organiques d'après Klibanov (2001).

Les principaux avantages liés à l'emploi d'un biocatalyseur enzymatique en milieu organique sont (Sheldon, 1996) :

- une augmentation de la solubilité des substrats apolaires (acides gras),
- dans de nombreux cas, une augmentation de la thermostabilité de l'enzyme,
- une modification de la spécificité pour les substrats,
- une récupération facilitée du produit par simple évaporation du solvant,
- une récupération aisée de l'enzyme par simple filtration ou centrifugation,
- la possibilité de mettre en œuvre des réactions dans des milieux pauvres en eau en vue de minimiser les réactions d'hydrolyse au profit des réactions de synthèse (déplacement des équilibres thermodynamiques),
- la possibilité de mettre en œuvre des réactions de synthèse avec d'autres nucléophiles (réactions de trans-estérification par exemple),
- une intégration aisée d'enzymes à des étapes de chimie conventionnelle,
- l'élimination de la contamination bactérienne.

La majorité des biocatalyseurs utilisés pour l'acylation de divers substrats et en particulier les peptides appartient à la famille des lipases (triacylglycerol acyl-hydrolases). L'utilisation de ces enzymes se répand de plus en plus dans de nombreux procédés de bioconversion industriels. Par exemple, Bristol-Myers-Squibb a développé un procédé de production de molécule luttant contre le cholestérol obtenue par acétylation du glutaryl coenzyme A catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée dans le toluène. Aussi, Uniquema a développé un procédé de synthèse de palmitate d'isopropyle par estérification dans le 2-propanol, biocatalysée par la lipase de *Candida antarctica* immobilisée, ces esters étant utilisés dans des formulations agroalimentaires telles que les crèmes (Hari Krishna, 2002). Ces biocatalyseurs sont, le plus souvent, utilisés sous forme immobilisée de façon à permettre leur recyclage et à faciliter la purification des produits synthétisés. Notons aussi que l'immobilisation améliore considérablement la stabilité de l'enzyme face à la température et aux stress mécaniques, grâce au maintien d'une conformation tridimensionnelle adéquate (Wandrey *et al.*, 2000).

3.2. Les lipases

3.2.1. Généralités sur les lipases

Les lipases sont des hydrolases d'esters carboxyliques et appartiennent au niveau classification internationale à la classe des triacylglycérol acyl-hydrolases (EC 3.1.1.3). Ce sont des enzymes largement répandues dans la nature. Elles ont des origines diverses (bactérienne, fongique, végétale, pancréatique, hépatique...) et présentent un panel de spécificités de substrat très large par rapport à d'autres classes. Par exemple, la lipase B de *Candida antarctica* est employée pour catalyser l'acylation d'une grande diversité de substrats tels que des alcools, des amines, des acides aminés, des sucres ou encore des flavonoïdes (Furutani *et al.*, 1996 ; Chamouleau *et al.*, 2001 ; Fernandez-Perez *et al.*, 2001 ; Ardhaoui *et al.*, 2004). Un autre avantage intéressant est que ces biocatalyseurs ne nécessitent pas la présence d'un coenzyme contrairement à beaucoup d'autres (Macrae, 1985).

3.2.2. Réactions catalysées par les lipases

En milieu aqueux, les lipases catalysent spécifiquement l'hydrolyse de liaisons esters dans des systèmes biphasiques, à l'interface entre la phase aqueuse dans laquelle elles sont solubilisées et la phase apolaire constituée par l'ester d'acide gras non solubilisé. Cette réaction constitue la fonction première des lipases dont les substrats naturels sous forme d'émulsion sont les tri-acyl glycérols. Il en résulte la libération de mono- et di-acyl glycérols, de glycérol et d'acides gras. Cette activité hydrolytique trouve des applications dans de nombreux secteurs industriels comme l'industrie laitière pour la production d'arômes ou dans le traitement des effluents. Dans les milieux pauvres en eau, les lipases catalysent la réaction inverse, c'est-à-dire la synthèse de liaisons esters. En fonction de la quantité d'eau libre présente dans le milieu, c'est l'une ou l'autre de ces deux réactions qui se trouve favorisée. La synthèse d'une liaison ester, qu'elle soit catalysée par une lipase ou par un agent chimique, peut se faire selon trois schémas réactionnels :

- la réaction d'estérification directe entre un acide et un alcool,
- la réaction de trans-estérification qui regroupe :
 - la réaction d'alcoolyse (ester + alcool = ester' + alcool'),
 - la réaction d'acidolyse (ester + acide = ester' + acide'),
- la réaction d'inter-estérification (ester + ester' = ester'' + ester''').

Dans ce dernier cas, les lipases catalysent la coupure puis la synthèse de liaisons esters de façon séquentielle. Le terme estérification fait référence à la réaction entre un acide et un alcool, toutefois les lipases présentent en réalité un spectre de substrats beaucoup plus large et sont capables de transférer un groupe acyle sur des atomes autre que l'oxygène, comme le soufre et l'azote, créant ainsi des liaisons thioesters et amides (Zaks *et al.*, 1985 ; Zaks, 1996).

3.2.3. Propriétés de sélectivité des lipases.

Les dérivés de peptides provenant de l'acylation de molécules polyfonctionnelles, il est bien souvent nécessaire pour les produire que le procédé de synthèse soit énantio-sélectif, régio-sélectif ou encore chimio-sélectif.

a) Enantio-sélectivité

L'énantio-sélectivité se définit comme la spécificité d'une enzyme pour un substrat en fonction de sa stéréochimie. Des études récentes illustrent parfaitement la capacité des lipases à catalyser la N-acylation énantio-sélective de molécules aminées à centres chiraux (Gill *et al.*, 2007 ; Gedey *et al.*, 2002). Ces propriétés d'énantio-sélectivité seraient dues à une conformation tridimensionnelle particulière des résidus aminés catalytiques de leur site actif (figure I.4.).

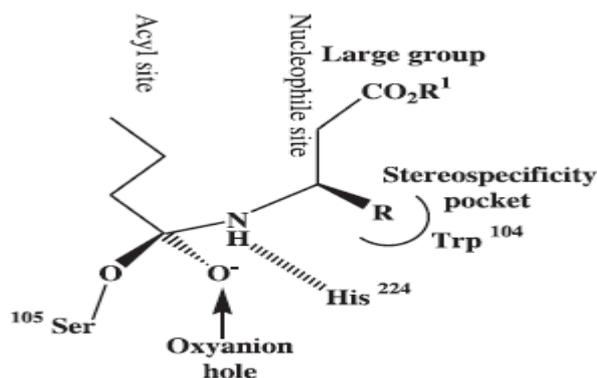


Figure I.4. Représentation structurale du substrat et du site actif d'une lipase catalysant une N-acylation énantio-sélective d'après Gedey *et al.*, (2002).

Le tableau I.1. illustre clairement l'aptitude des lipases à catalyser la N-acylation d'éthylamine en maintenant dans certains cas une énantio-sélectivité en faveur du composé de configuration R proche de 100 %.

Tableau I.1. Exemples de N-acylations énantio-sélectives catalysées par des lipases d'après Gill *et al.*, (2007).

Lipase biocatalyst	[Biocatalyst] (mg/mL)	Conversion (% HPLC)	Amide product	ee (amide) (% HPLC)
Amano Lipase-A	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-AK	25	40	(R)-2	92
Amano Lipase-API2	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-AY30	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-D	25	1	(R)-2	>99,8
Amano Lipase-F	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-FAP15	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-G	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-GC20	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-M	25	1	(R)-2	>99,8
Amano Lipase-MAP10	25	1	(R)-2	>99,8
Amano Lipase-N	25	1	(R)-2	>99,8
Amano Lipase-PS	25	5	(R)-2	>99,8
Amano Lipase-PS30	25	9	(R)-2	>99,8
Amano Lipase-R	25	0	(R)-2	0
Biocatalysts Lipase-ANL	25	0	(R)-2	0
Biocatalysts Lipase-CCL	25	1	(R)-2	>99,8
Biocatalysts Lipase-RJL	25	0	(R)-2	0
Meito Sangyo Lipase-TL	25	50	(R)-2	93
Meito Sangyo Lipase-UL	25	2	(R)-2	>99,8
Sigma Lipase-CRL	25	1	(R)-2	>99,8
Sigma Lipase-PPL	25	3	(R)-2	45
Sepracor Lipase-OF	25	2	(R)-2	>99,8
Biocatalysts Lipomod-200	100	2	(R)-2	>99,8
Boehringer Chirazyme-L2-c2	100	49	(R)-2	>99,8
Boehringer Chirazyme-L5	100	11	(S)-2	-23
Amano Lipase PS30 on Accurel	100	41	(R)-2	96
Novo Lipolase-30T	100	7	(R)-2	40
Novo Lipozym-IM60	100	6	(R)-2	77
Novo Novozym-435	100	50	(R)-2	>99,8

Citons aussi l'exemple de la trans-acylation de l'acide mandélique catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacia* en solvant organique permettant la production de O-acétyl-(S)-acide mandélique (précurseur des céphalosporines) avec une pureté optique proche de 99 % et une énantio-sélectivité proche de 100 % (Dabkowska *et al.*, 2007). Dans d'autres études, il a été aussi montré que ces enzymes présentaient selon le milieu réactionnel utilisé une régio-sélectivité plus ou moins marquée (Li *et al.*, 2007).

b) Régio-sélectivité

La régio-sélectivité qualifie la préférence d'une enzyme à interagir avec l'un des groupes fonctionnels identiques d'une molécule substrat. Les molécules de type peptides constituent souvent une problématique de régio-sélectivité enzymatique lors de leur acylation. Une étude consacrée à l'acylation du dipeptide modifié L-Phe- α -L-Lys-O-t-Bu a mis en évidence que plusieurs lipases présentaient une régio-sélectivité marquée en faveur de la fonction amine en position ϵ de la lysine plutôt que la fonction amine en position α de la phénylalanine (Gardossi *et al.*, 1991). Des observations similaires ont été faites concernant l'acylation de la lysine biocatalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei* en solvant organique (Soo *et al.*, 2004).

c) Chimio-sélectivité

La chimio-sélectivité est la capacité d'une enzyme à interagir préférentiellement avec un groupe fonctionnel donné parmi des groupes fonctionnels distincts. Une étude consacrée à l'acylation enzymatique de la sérinamide, présentant une fonction amine primaire en position α et une fonction hydroxyle sur la chaîne latérale, a montré la propriété de chimio-sélectivité de la lipase de *Candida antarctica* immobilisée (Chirazyme[®]) à catalyser essentiellement la O-acylation en solvant organique (Zhang *et al.*, 2005). Récemment, une équipe a développé un procédé d'acylation en système sans solvant utilisant la lipase B de *Candida antarctica* et conduisant à la N-acylation chimio-sélective majoritaire de l'éthanolamine (Tufvesson *et al.*, 2007). Ces caractéristiques révèlent donc de nombreuses spécificités qui sont primordiales à étudier, particulièrement lorsque ce sont des substrats polyfonctionnels comme des peptides qui sont à acyler.

3.2.4. Structure des lipases

Qualifiées d'hydrolases de type α/β , toutes les lipases de structure connue à ce jour présentent une base structurale commune composée d'un feuillet β central formé de brins principalement parallèles, reliés entre eux par des hélices α . La « machinerie catalytique » se compose essentiellement d'une triade catalytique Ser, His et Glu ou Asp similaire à celle des protéases à sérine et de quelques résidus intervenant dans la stabilisation de l'oxyanion formé (intermédiaire tétraédrique) au cours de la catalyse. Souvent, le site actif est recouvert par une boucle amphiphile appelée volet ou encore « lid » ou « flap » qui le rend totalement inaccessible au solvant, lorsque l'enzyme est sous sa forme inactive. La face hydrophobe de ce volet est alors orientée vers l'intérieur du site actif. Des études cristallographiques ont mis en évidence que le passage de la forme inactive à la forme active s'accompagne d'un mouvement de ce volet exposant ainsi sa face hydrophobe vers l'extérieur du site et créant ainsi une surface supposée interagir avec l'interface lipide/eau. Un tel mouvement est souvent accompagné de modifications structurales au niveau des boucles voisines et de quelques résidus particuliers constituant le phénomène d'activation interfaciale. Ce phénomène d'activation a été remis en cause récemment suite à une étude de modélisation moléculaire et de cristallographie aux rayons X portant sur la lipase A de *Candida antarctica* qui mettait en évidence un mécanisme plus complexe (Ericsson *et al.*, 2008).

La structure de la lipase B de *Candida antarctica* a été élucidée par (Uppenberg *et al.*, 1994). Cette enzyme d'un poids moléculaire de 33 kDa est formée de 317 résidus aminoacides. On retrouve dans sa structure le repliement α/β ainsi que la triade catalytique Ser-Asp-His. Cette lipase ne présente pas de volet à l'entrée de sa cavité catalytique contrairement à la lipase de *Pseudomonas cepacia* (figure I.5.).

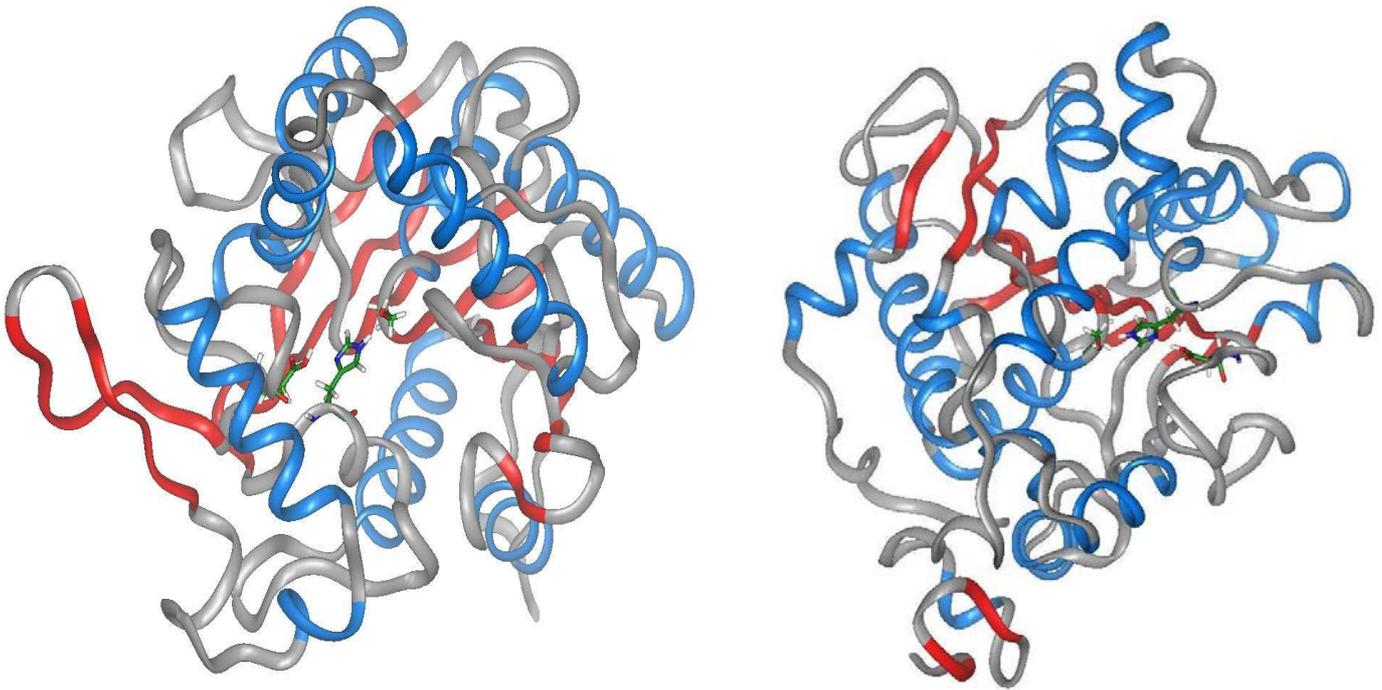


Figure I.5. Structure moléculaire de la lipase de *Pseudomonas cepacia* (à gauche) et de la lipase B de *Candida antarctica* (à droite). En bleu sont présentée les structures secondaires hélices α et en rouge les feuillets β . Les trois résidus aminés figurant sur les structures représentent la triade catalytique Ser, His et Asp d'après Uppenberg *et al.*, (1994) et Kim *et al.*, (1997).

Le site actif de la lipase B de *Candida antarctica* (CAL B) est accessible par un étroit tunnel dont les parois sont hydrophobes. Récemment, il a été mis en évidence que l'utilisation de solvants non conventionnels hydrophobes, tels que des liquides ioniques à teneur en eau de l'ordre de 2 % permet d'exercer des modifications de la structure secondaire de CAL B aboutissant alors à une conformation plus compacte et conduisant alors à une activité catalytique optimale et une meilleure stabilité (De Diego *et al.*, 2005).

3.2.5. Mécanisme d'action des lipases – exemple de la lipase B de *Candida antarctica*

Le mécanisme enzymatique à deux substrats, appelé bi bi ping-pong, est souvent utilisé pour décrire l'activité catalytique des lipases (Malcata *et al.*, 1992). Celui-ci est présenté en figure I.6.

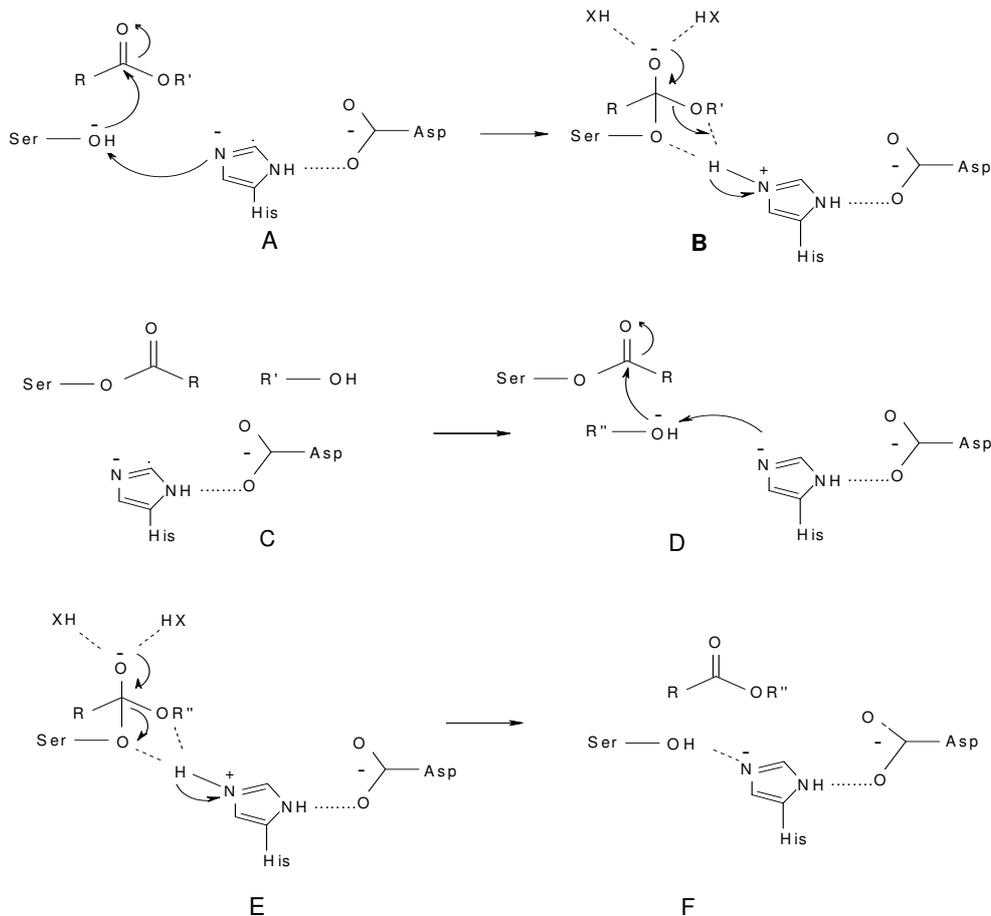


Figure I.6. Mécanisme d'acylation catalysée par la triade catalytique de la lipase B de *Candida antarctica* selon le modèle bi bi ping-pong d'après Malcata *et al.*, (1992) et Lopez Serrano *et al.*, (2001). A : Conformation native de l'enzyme et approche du substrat hydrophobe ; B : Formation d'un 1^{er} intermédiaire tétraédrique ; C : Relargage de l'alcool et formation de l'acyl-enzyme ; D : Attaque de l'accepteur d'acyle ; E : Formation d'un 2nd intermédiaire tétraédrique ; F : Libération du produit acylé et retour à la conformation initiale de l'enzyme.

La fonction hydroxyle de la sérine, suite à son activation par l'histidine, attaque le carbone de la fonction carbonyle du donneur d'acyle. Se forme ainsi un premier intermédiaire tétraédrique dont l'oxyanion est stabilisé par des liaisons hydrogènes. Au cours de cette catalyse, la liaison ester carboxylique est rompue et le groupe alcool partant (R'-OH) emporte un proton de l'ion imidazolium du résidu histidine. Le groupe acyle reste lié de manière covalente à l'enzyme sous forme d'un intermédiaire acyl-enzyme. Celui-ci est attaqué à son tour par une molécule nucléophile activée par l'histidine pour donner un deuxième intermédiaire tétraédrique qui se dissocie en libérant le groupe acyle partant (R-CO-) désormais lié au nucléophile (R-CO-X-R''), restituant ainsi la lipase dans son état initial. Cependant une étude récente de la réaction de N-acylation de la phénylcycloalkanamine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* assistée par modélisation moléculaire propose un mécanisme d'action de cette enzyme différent du mécanisme classique sérine dépendant. En effet, les auteurs suggèrent la formation favorisée d'un intermédiaire zwitterion résultant

de l'attaque directe de l'amine sur le groupe carbonyle de l'acyl-enzyme sans activation de la part de l'histidine. Dans un second temps, la déprotonation du groupe ammonium formé serait permise par l'intervention de l'histidine catalytique (Gonzalez-Sabin *et al.*, 2006). Une molécule d'eau serait alors nécessaire pour assister ce transfert de proton. Cette suggestion de mécanisme d'action est présentée dans la figure I.7.

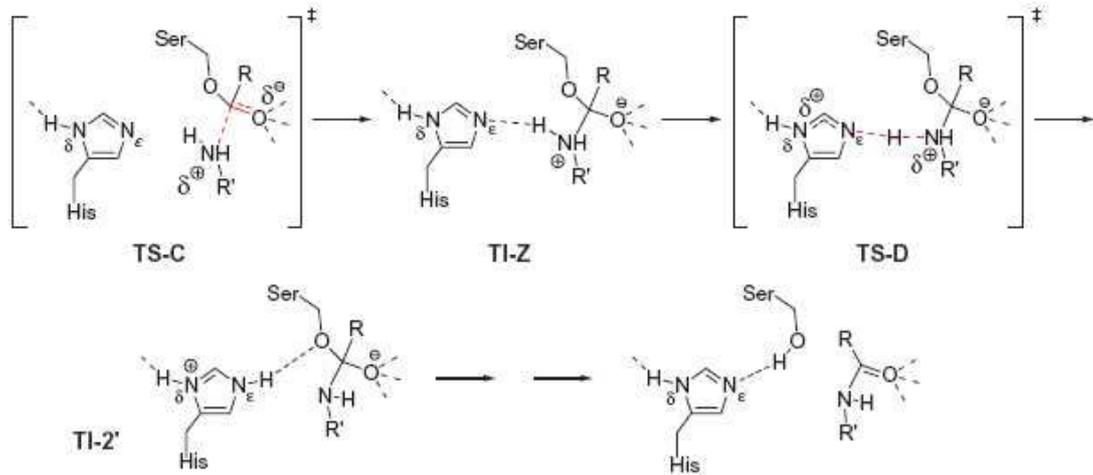


Figure I.7. Nouvelle possibilité de mécanisme d'action de la lipase B de *Candida antarctica* catalysant la N-acylation d'après Gonzalez-Sabin *et al.*, (2006).

3.3. Autres enzymes biocatalysant la réaction d'acylation

Alors que les réactions d'acylation catalysées par des lipases imposent une mise en œuvre en milieu organique pauvre en eau, certaines enzymes telles que les acylases, estérases, acyl-transférases, et protéases présentent la capacité à catalyser des réactions de synthèse d'esters et d'amides en milieux aqueux et/ou biphasiques de sorte que le problème de solubilisation de substrats polaires en milieu organique est contourné.

3.3.1. Les acylases

Les acylases sont des enzymes ayant une action sur la liaison carbone – azote essentiellement et ont pour classification internationale EC 3.5.1. Elles ont vu leur utilisation s'accroître en raison de leur capacité à synthétiser des dérivés acylés de biomolécules et pour leurs propriétés d'énantio-sélectivité et de régio-sélectivité.

a) Enantio-sélectivité

Les acylases constituent un groupe d'enzymes très souvent utilisées pour la résolution de mélanges racémiques par acylation énantio-sélective. L'acylase la plus utilisée jusqu'à ce jour est la pénicilline acylase d'*Escherichia coli*. Elle est dotée d'une capacité à catalyser la N-acylation des aminonitriles avec une énantio-sélectivité en faveur du composé S exclusive comme l'illustre la figure I.8. Ce procédé de synthèse, mis en œuvre en milieu aqueux à pH acide, permet donc la résolution énantio-sélective de composés d'intérêt thérapeutique (précurseurs d'antibiotiques) dont la récupération est d'ailleurs facilitée par la nature du milieu, et s'effectue par précipitation (Chilov *et al.*, 2003).

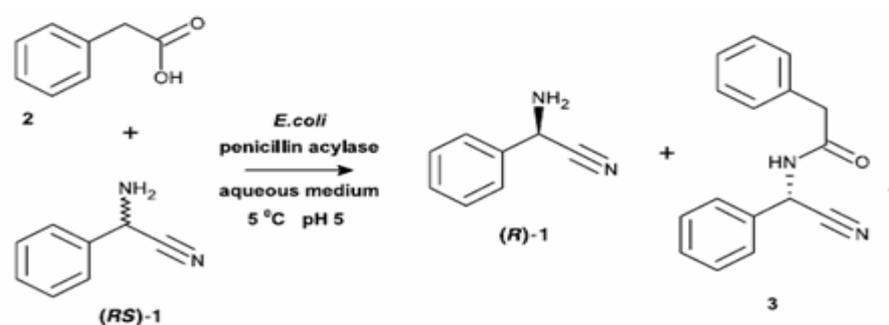


Figure I.8. N-acylation énantio-sélective de l' α -phénylglycinonitrile par l'acide phénylacétique en milieu aqueux catalysée par la pénicilline acylase d'après Chilov *et al.*, (2003).

L'immobilisation de ce biocatalyseur sur support a permis d'améliorer encore ses capacités synthétiques en milieu aqueux (Estruch *et al.*, 2008). D'autres procédés de synthèse en milieu aqueux utilisant la pénicilline acylase d'*Alcaligenes faecalis* ont permis l'acylation énantio-sélective d'amines de façon très significative (Roche *et al.*, 1999 ; van Langen *et al.*, 2000). Aussi, il a été montré que l'Acylase I commerciale d'*Aspergillus* catalyse l'acétylation énantio-sélective du (S)-1-acétoxy-1-phényléthanol à hauteur de 97 % (Virsu *et al.*, 2001). Remarquons qu'il est possible au cours d'un procédé enzymatique, d'orienter l'activité des acylases en fonction du pH soit vers la synthèse, soit vers l'hydrolyse tout en conservant leur énantio-sélectivité. Cette particularité est mise à profit pour affiner la résolution énantio-sélective de composés (Guranda *et al.*, 2001 ; Liljeblad *et al.*, 2001 ; Guranda *et al.*, 2004). L'aspect surprenant de ces enzymes est qu'elles sont capables de catalyser la racémisation de composés par acylation aussi bien en milieux aqueux qu'en milieu organique. Ainsi une étude a mis en évidence l'aptitude de ces enzymes à catalyser l'acylation énantio-sélective exclusive d'esters β -aminés dans le toluène (figure I.9.) avec un rendement significatif (Roche *et al.*, 1999).

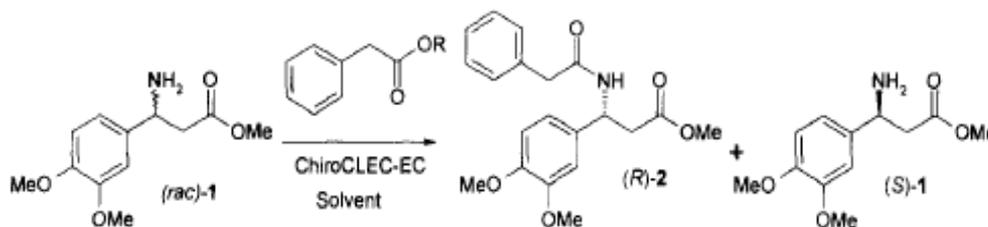


Figure I.9. Cinétique de résolution énantio-sélective d'esters β-aminés en solvant organique par la pénicilline G acylase d'après Roche *et al.*, (1999).

D'après les travaux recensés dans la littérature, l'énantio-sélectivité des acylases, est plus importante que celle des lipases au sens strict (Liljeblad *et al.*, 1999). Au vu de leur efficacité en milieux aqueux et en milieu organique, quelques études ont eu pour objectif la mise en œuvre de procédés enzymatiques catalysés par des acylases dans des systèmes biphasiques. Ce genre de milieu réactionnel augmenterait significativement l'énantio-sélectivité de la N-acylation (Van Langen *et al.*, 2000).

b) Acylation régio-sélective d'acides aminés

Les acylases sont aussi dotées d'un caractère régio-sélectif aussi bien en hydrolyse qu'en synthèse. Cette propriété paraît très intéressante pour la mise en œuvre de procédés d'acylation d'acides aminés et de peptides. De récentes études ont montré qu'en jouant sur le ratio molaire accepteur / donneur d'acyle, il est possible d'acyler régio-sélectivement la fonction amine en position ε de la lysine en utilisant une acylase issue de *Streptomyces mobaraensis* en tampon phosphate (Koreishi *et al.*, 2005a ; Koreishi *et al.*, 2005b). A titre indicatif, ces études ont montré que cette enzyme présentait aussi une spécificité de substrat en faveur des acides gras à moyenne et longue chaîne. Cette enzyme s'est aussi avérée efficace d'un point de vue rendement et régio-sélectivité pour la production de dérivés mono acylés de dipeptides en milieux aqueux (Koreishi *et al.*, 2006).

3.3.2. Les carboxyl-estérases

Les estérases (EC 3.1.1.1.) sont des enzymes capables, elles aussi, de catalyser des réactions d'acylation et particulièrement la synthèse de la liaison ester. Différents facteurs sont susceptibles d'influencer son activité. Par exemple, dans le cas de l'acétylcholine estérase, la condensation des acides gras avec différents substrats nucléophiles, semble dépendante de la concentration de la substance réagissante, de la structure de l'acide

carboxylique et du pH (Hestrin, 1950). Récemment, une étude a mis en évidence la faisabilité de la trans-acylation à partir d'esters activés en milieux aqueux, catalysée par une acétyl-estérase partiellement purifiée issue de *Trichoderma reesei*. Cette enzyme présente une sélectivité (tableau I.2.) d'acylation envers des substrats polyfonctionnels et une large spécificité de substrat (Kremnický *et al.*, 2004).

Tableau I.2. Exemples d'acétylation de mono- et d'oligosaccharides catalysés par l'acyl-estérase de *T. reesei*. Efficacité et nombre de produits différents synthétisés par substrat d'après Kremnický *et al.*, (2004).

Compound	Degree of acetylation	Number of products	Number of major + minor products
Glycerol	+++	2	1 + 1
L-Arabinose	++	3	2 + 1
D-Ribose	+++	2	1 + 1
D-Xylose	+++	2	2
D-Fructose	++	4	1 + 3
D-Galactose	+++	3	1 + 2
D-Glucose	+++	3	1 + 2
D-Mannose	+++	2	1 + 1
L-Rhamnose	+	1	1
L-Sorbose	+++	2	1 + 1
D-Glucoheptose	+	2	1 + 1

Un autre exemple est l'acylation de la catéchine par différents donneurs d'acyle, biocatalysée par la carboxyl-estérase d'*Aspergillus niger*. Cette réaction a été mise en œuvre avec succès en solvant organique et conduit à une O-acylation régio-sélective (Chebil *et al.*, 2006). L'acylation enzymatique d'un alcool aminé par l'acétate de vinyle biocatalysée par l'estérase de *Mucor miehei* révèle l'aptitude de ces enzymes à catalyser la N et/ou la O-acylation. La chimio-sélectivité de ces enzymes serait dépendante de la nature du substrat et plus particulièrement de ses groupes nucléophiles (Djeghaba *et al.*, 1991 ; Furutani *et al.*, 1997 ; Hacking *et al.*, 2000).

3.3.3. Les protéases

Ces enzymes ont une action directe sur les liaisons peptidiques et présentent une classification internationale EC 3.4. Les protéases présentent une bonne stabilité thermique et peuvent être utilisées pour catalyser la réaction d'acylation en milieu organique (Bordusa 2002).

a) Régio- et chimio-sélectivité

Les protéases présentent des propriétés de régio et/ou de chimio-sélectivité intéressantes. Une étude a consisté à réaliser une trans-estérification du glucose avec

différents donneurs d'acyle, dans différents solvants organiques, biocatalysée par la protéase alcaline de *Bacillus subtilis*. Un taux de conversion significatif du substrat et une bonne régiosélectivité ont été obtenus dans la pyridine après optimisation de l'homogénéité du milieu par ultrason (Xiao *et al.*, 2005). Dans une autre étude, des esters d'acides aminés et de sucres ont été synthétisés en utilisant une protéase commerciale (Optimase[®]) de *Bacillus licheniformis* dans la pyridine. Seules les fonctions hydroxyles primaires ont été acylées (Park *et al.*, 1999). Pour le couplage d'un acide aminé et d'un alcool aminé, l'équipe de Chinsky *et al.*, (1989) a fait réagir la fonction acide d'un peptide ou d'un acide aminé sur le 6-amino-1-hexanol, dans le 2-méthyl-2-butanol en présence de la protéase de *Bacillus subtilis* de type VIII (Subtilisine Carlsberg[®]). Les rendements étaient significatifs et la réaction était exclusivement en faveur de la formation d'une liaison amide.

b) Les limites à leur utilisation

En revanche, d'autres études réalisées par la suite concernant la N-acylation en milieu organique et tamponné, catalysée par différentes protéases, n'ont pas du tout été satisfaisantes. On peut citer par exemple l'acylation de la N-méthyl glucamine (Maugard 1996). Selon Matos *et al.*, (1987), les protéases sont trop spécifiques des liaisons peptidiques et sont peu réactives dans un solvant organique polaire tel que le 2-méthyl-2-butanol, ce qui serait susceptible d'induire l'hydrolyse de la liaison d'intérêt formée. De plus, elles sont peu spécifiques des acides gras. C'est pourquoi, les recherches de bioconversion se sont de plus en plus orientées vers l'utilisation d'hydrolases plus courantes comme les lipases.

3.3.4. Les acyl-transférases

Elles sont issues d'organismes Procaryotes et Eucaryotes. Leur classification internationale est EC 2.3.1. Cependant, certaines études concernant les réactions d'acylation catalysées par des acyl-transférases désignent plutôt ces enzymes comme des lipases à activité acyl-transférase en milieux aqueux et conserve une nomenclature de type EC 3.1.1.3. pour les désigner. Leur principal intérêt est leur capacité à catalyser l'acylation en milieux aqueux.

a) Généralités

Ces enzymes constituent une grande classe de biocatalyseurs, divisée en plusieurs familles telles que la famille des WS/DGAT (wax esters synthase/acyl coenzyme A : diacyl glycerol acyl-transférase) ou encore la superfamille des GNAT (Gcn5 acyl-transférase) qui

sont capables de catalyser l'acylation de substrats à partir d'acyl coenzyme A (Vetting *et al.*, 2005 ; Stoveken *et al.*, 2008). D'autres sont capables de catalyser l'acylation à partir d'acides gras libres et d'esters d'acide gras. Les acyl-transférases d'origine bactérienne ne semblent pas présenter une sélectivité de substrat bien marquée mais plutôt un spectre de substrats très large (figure I.10.) pouvant contenir aussi bien des alcools linéaires à deux carbones que des alcools à 18 carbones voire même cyclisés (Stoveken *et al.*, 2008).

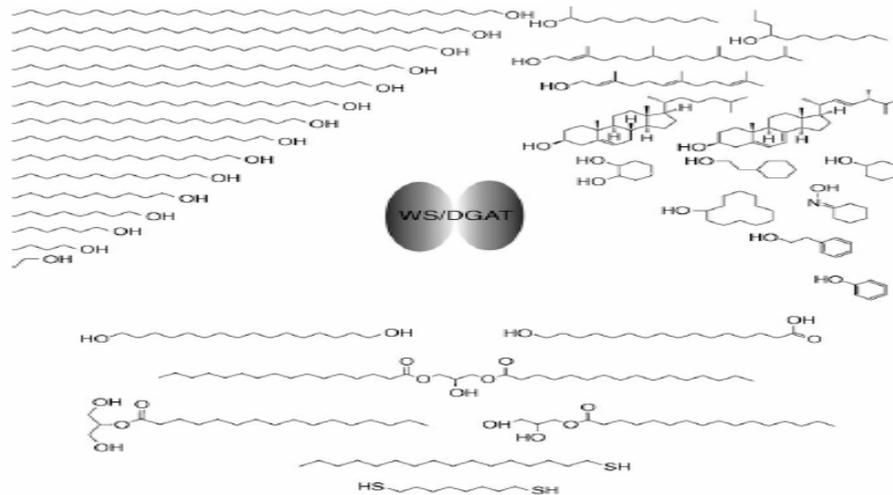


Figure I.10. Exemples de substrats pouvant être acylés par la famille d'enzymes WS/DGAT d'après Stoveken *et al.*, (2008).

L'observation de nombreuses séquences peptidiques constitutives de ces enzymes laissent supposer que le site actif serait constitué du motif suivant HHXXXDG très rarement modifié (Stoveken *et al.*, 2008). Les résidus histidines joueraient le rôle de base et déprotoneraient la fonction hydroxyle ou amine du substrat. Celle-ci exercerait alors une attaque nucléophile sur l'atome de carbone du donneur d'acyl (acide gras libre, ester ou acyl coenzyme A), ce qui conduirait à l'établissement d'une liaison amide ou ester.

b) Exemples de réactions d'acylation sélective catalysées par les acyl-transférases

Citons l'exemple de l'acyl-transférase de *Candida parapsilosis* utilisée dans différents travaux pour catalyser la synthèse d'esters ou d'amides en milieux aqueux biphasiques (Lecoite *et al.*, 1996 ; Vaysse *et al.*, 1997 ; Vaysse *et al.*, 2002). Cette enzyme est capable de synthétiser chimio-sélectivement des liaisons amides en tampon phosphate en présence d'un acide gras sous forme d'émulsion stabilisée et d'un substrat bifonctionnel en large excès : l'hydroxylamine, et est sensible aux conditions de pH et de température (Vaysse *et al.*, 1997).

L'activité synthétique de cette enzyme peut être favorisée non pas en modifiant la nature du milieu réactionnel mais en jouant sur la nature du donneur d'acyle (figure I.11.). En effet, l'utilisation d'un ester d'acide gras va favoriser l'activité aminolyse ou alcoololyse de l'enzyme au contraire d'un acide gras libre qui induit une activité hydrolytique majoritaire (Fournand *et al.*, 1998). Cette spécificité a été mise en évidence dans des travaux concernant aussi bien la N-acylation d'alcool aminé que la O-acylation de méthanol (Briand *et al.*, 1995 ; Fournand *et al.*, 1998).

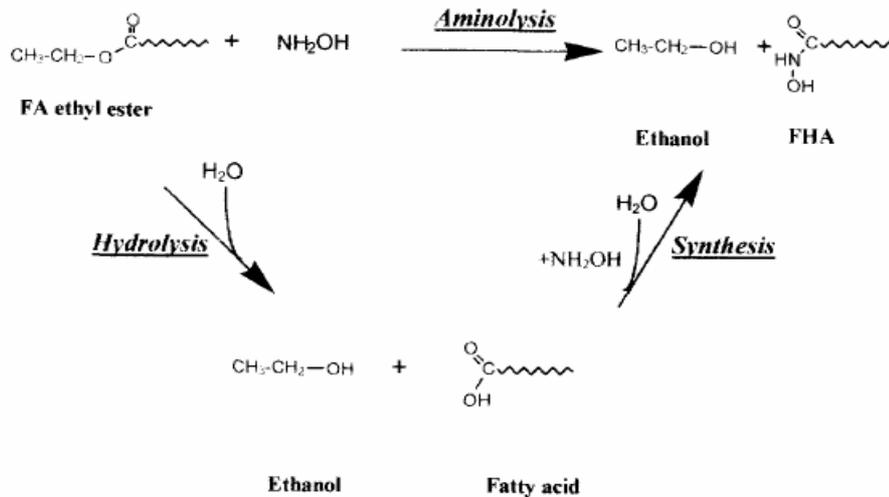


Figure I.11. Schéma de réactions possibles pour la biosynthèse d'acide d'hydroxamique d'après Vaysse *et al.*, (1997).

Les esters d'acides gras les plus adéquats pour la mise en œuvre de réaction d'acylation catalysée par cette enzyme sont les esters dont la chaîne acyle est constituée de 14 à 18 carbones avec une insaturation et un groupe alkyle de 1 à 4 carbones (Briand *et al.*, 1995). D'autres acyl-transférases sont connues pour leur aptitude à catalyser l'acylation et plus particulièrement la N-palmitoylation sélective de peptides ainsi que l'octoylation de grosses protéines en position N α terminale (Bijlmakers, 2007 ; Gutierrez *et al.*, 2008). Ce type d'enzyme permet donc de mettre en œuvre des réactions d'acylation biocatalysées en milieux aqueux et donc de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques.

4. Les paramètres influençant l'acylation enzymatique

Différents paramètres influencent l'acylation enzymatique. L'eau présente dans le milieu a une action directe sur l'activité synthétique des lipases. L'état d'ionisation des substrats au sein du milieu réactionnel est susceptible d'affecter la disponibilité de ces

derniers. Enfin, la structure moléculaire des substrats polyfonctionnels à acyler peut orienter la sélectivité de la réaction.

4.1. Influence de l'eau.

L'eau est le principal paramètre à maîtriser et contrôler pour la mise en œuvre de réactions d'acylation enzymatique catalysées par des hydrolases de type lipases. Les effets possibles de l'eau sur l'activité catalytique des enzymes et en particulier des lipases en milieu organique s'exercent selon plusieurs mécanismes et sont généralement dus à un manque d'eau ou un excès d'eau. La quantité d'eau disponible et donc susceptible d'intervenir dans la réaction, est donnée par une mesure d'activité de l'eau (a_w). De nombreuses études ont mis en évidence l'importance d'une a_w initiale du solvant organique inférieure à 0.1 (figure I.12.) afin que l'efficacité de l'acylation enzymatique soit optimale (Wehtje *et al.*, 1997a ; Wehtje *et al.*, 1997b ; Humeau *et al.*, 1998a ; Humeau *et al.*, 1998b ; Chamouleau *et al.*, 2001).

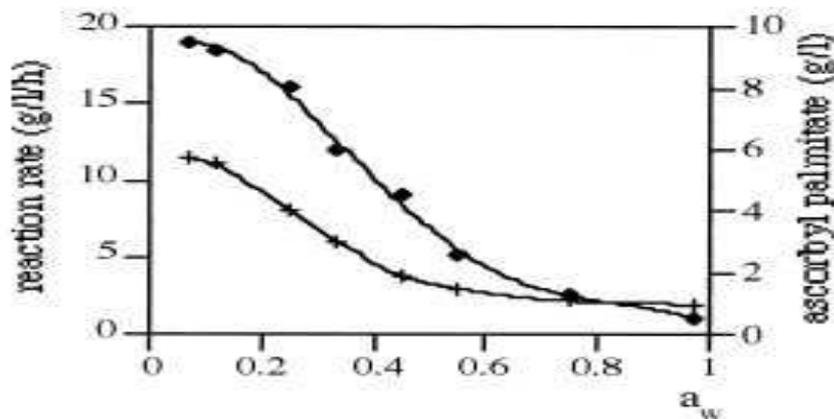


Figure I.12. Influence de l'activité de l'eau initiale du milieu réactionnel sur la vitesse initiale de formation du produit et sur la concentration en produit formé à l'équilibre lors d'une réaction de trans-estérification de l'acide ascorbique dans le 2-méthyl-2-butanol à 70 °C catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée d'après Humeau *et al.*, (1998a).

Une étude concernant l'acylation enzymatique d'alcool aminé dans le 2-méthyl-2-butanol catalysée par différentes lipases a suggérée qu'une a_w minimale était tout de même requise afin de conserver l'activité enzymatique optimale. La figure I.13. décrit cette influence.

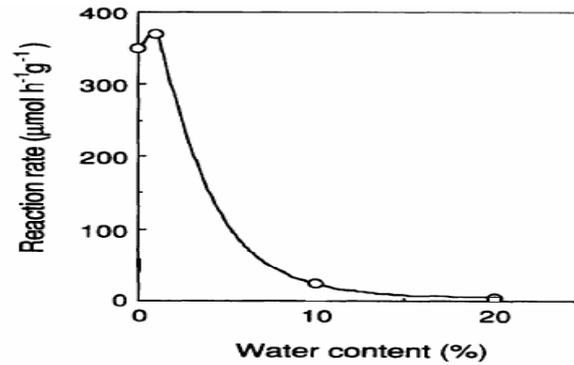


Figure I.13. Influence de l'activité de l'eau initiale du milieu réactionnel sur la vitesse initiale de réaction de N-acylation d'un alcool aminé dans le 2-méthyl-2-butanol à 70 °C catalysée par la lipase QL d'*Alcaligenes sp.* d'après Furutani *et al.*, (1996).

Ces résultats s'expliquent par l'effet de l'eau sur la polarité du site actif de la protéine, sur sa flexibilité et sur l'équilibre thermodynamique de la réaction. Les molécules d'eau sont engagées dans de multiples liaisons hydrogènes et apportent la mobilité conformationnelle indispensable à l'activité enzymatique. Une trop faible a_w résiduelle entraînerait une rigidification de la protéine induisant alors son inactivité (Klibanov, 1997 ; Klibanov, 2001). En opposition à cela, une trop grande a_w entraînerait une accumulation de molécules d'eau autour de l'enzyme constituant alors une barrière diffusionnelle pour les substrats hydrophobes et induirait une activité hydrolytique résiduelle conséquente (Valivety *et al.*, 1992a ; Valivety *et al.*, 1992b ; Valivety *et al.*, 1993). Remarquons que dans le cas d'une acylation directe catalysée par une lipase, les molécules d'eau libérées sont susceptibles d'orienter la réaction vers l'hydrolyse si les concentrations en substrats utilisés sont de l'ordre du molaire. Pour limiter cette réaction indésirable d'hydrolyse, plusieurs solutions peuvent être envisagées : ajout de tamis moléculaire ou procédé sous pression réduite (Wehtje *et al.*, 1997 ; Chamouleau *et al.*, 2001 ; Ardhaoui *et al.*, 2004).

4.2. Influence de l'état d'ionisation des substrats.

La mise en œuvre de procédés enzymatiques de N-acylation en solvant organique met souvent en jeu la formation d'un complexe ionique entre le substrat aminé et le donneur d'acyle lorsque celui-ci est sous forme d'acide gras libre. La fonction amine du substrat, sous forme protonée, interagit alors avec la fonction carboxylate de l'acide gras par interaction électrostatique. Cet état d'ionisation en solvant organique a été pour la première fois étudié par l'équipe de Maugard *et al.* (1997) dans une étude consacrée à l'acylation enzymatique de la N-méthyl glucamine par différents acides gras dans un solvant très hydrophobe, l'hexane,

catalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei*. La mise en évidence de ce complexe a été réalisée par spectroscopie infrarouge (figure I.14.). La présence de la bande caractéristique des fonctions carboxylates montre qu'une partie des molécules d'acide gras sont susceptibles d'interagir par interactions électrostatiques, avec les molécules de substrat aminé.

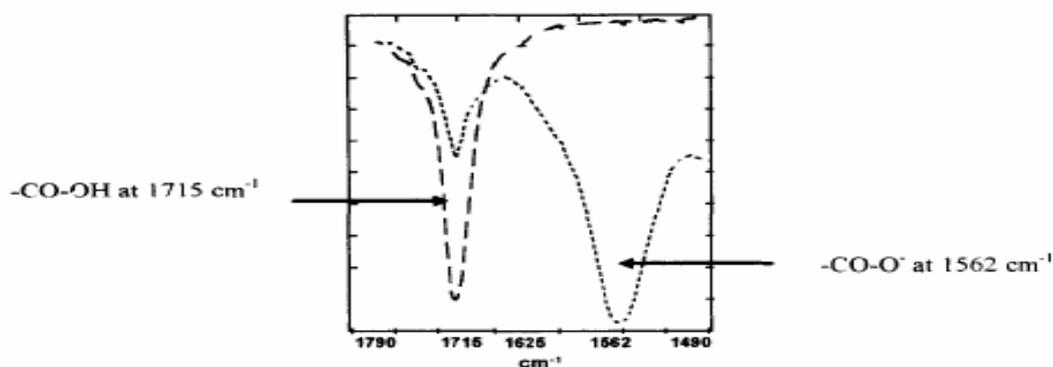


Figure I.14. Analyse infrarouge d'un milieu réactionnel constitué d'un substrat aminé en présence d'acide oléique dans l'hexane d'après Maugard *et al.*, (1997).

Au sein de ce milieu réactionnel, la formation du complexe ionique est influencée par le ratio molaire accepteur / donneur d'acyle. Plus ce ratio est faible, plus la population de molécules aminées est impliquée dans la paire d'ions (Maugard *et al.*, 1998a ; Maugard *et al.*, 1998b).

Dans certains cas (figure I.15.), lorsque le substrat n'est pas soluble dans le milieu, la formation de ce type de complexe peut permettre sa solubilisation et ainsi amorcer la réaction (Maugard *et al.*, 1997 ; Maugard *et al.*, 1998b).

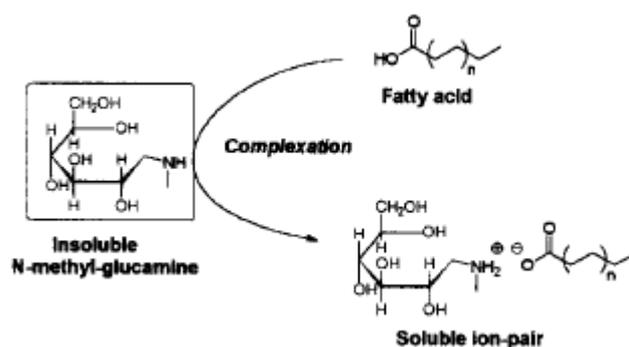


Figure I.15. Solubilisation de la N-méthyl glucamine permise par la formation d'un complexe paire d'ion avec le donneur d'acyle dans l'hexane d'après Maugard *et al.*, (1997b).

Dans d'autres études d'acylation enzymatique d'alcools aminés en solvant organique, le complexe ionique affecte la solubilité des substrats. C'est le cas de l'éthanolamine et de la diéthanolamine, qui lorsqu'elles se complexent avec les acides gras libres, forment un sel non-soluble en solvant organique. Dans ce cas, la formation de ce complexe affecte significativement la disponibilité des substrats et donc le rendement de la réaction

(Fernandez-Perez *et al.*, 2001 ; Fernandez-Perez *et al.*, 2003). Dans d'autres cas, en fonction du pouvoir dissociant du milieu réactionnel, le complexe ionique peut limiter la disponibilité des substrats et/ou de leurs groupes fonctionnels et influencer considérablement le taux de conversion des substrats et la régio-sélectivité de la réaction. Par exemple, citons le cas de la N-méthyl glucamine, qui comporte plusieurs sites potentiellement acylables (hydroxyle, amine secondaire). Le complexe ionique impliquant la fonction amine affecte sa réactivité et oriente la chimio-sélectivité de la réaction vers la O-acylation (Maugard *et al.*, 1997b). Une étude consacrée à la synthèse de vanillyloléamide (olvanil) catalysée par une lipase en solvant organique (2-méthyl-2-butanol et hexane) illustre parfaitement cette exigence en matière d'ionisation. En effet, les auteurs disposaient du substrat conditionné sous forme hydrochloride et ont mis en évidence la non-faisabilité de la N-acylation. En revanche, l'utilisation d'une base organique tertiaire inerte vis-à-vis de l'enzyme avec un ratio molaire par rapport au substrat de 18 : 1 a permis une N-acylation de ce substrat, selon le schéma réactionnel présenté figure I.16.

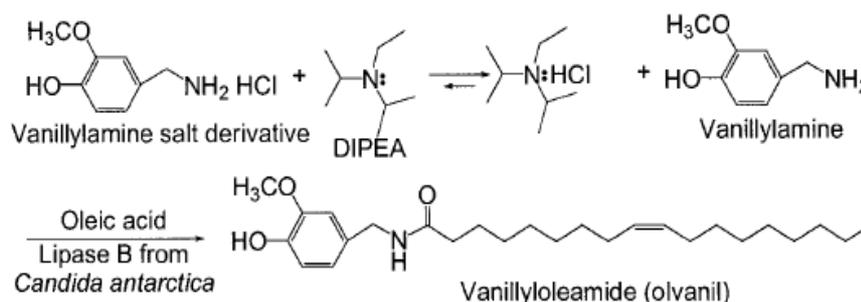


Figure I.16. Schéma réactionnel de synthèse de vanillyloléamide d'après Dolores *et al.*, (2002).

L'absence de base organique dans le milieu favorise la forme protonée de la fonction amine qui se trouve alors impliquée dans un complexe ionique avec l'acide gras. Ces conditions empêchent l'attaque nucléophile de la fonction amine sur l'acyl-enzyme (Reyes-Duartes *et al.*, 2002). La plupart des études concernant la formation de ces complexes ioniques ont été réalisées en solvants organiques. Mais il apparaît clairement qu'ils peuvent se former aussi dans d'autres milieux non-conventionnels tels que les systèmes sans solvant et les liquides ioniques (Irimescu *et al.*, 2004 ; Tufvesson *et al.*, 2007).

4.3. Influence de la structure moléculaire des substrats polyfonctionnels

La spécificité des lipases vis-à-vis de la N- ou de la O-acylation a été étudiée dans quelques travaux. Ces études mettent en jeu principalement l'acylation de substrats polyfonctionnels de type alcool aminé en solvant organique.

Il a été montré que lorsque les structures moléculaires de ces substrats sont de type $\text{HO}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ avec $n \leq 3$, la réaction conduit majoritairement à la synthèse de composé N-acylé. Au-delà de $n = 3$, une proportion importante de composé O-acylé est synthétisée. Ce comportement dans le cas de petites molécules ($n \leq 3$) est à première vue étonnant vu que les lipases sont plus spécifiques des liaisons esters (Liisa T. Kanerva 1992). Une explication suggérée par Kanerva met en jeu un phénomène spontané de transfert d'acyle : l'enzyme catalyse la synthèse de la liaison ester puis une migration chimique spontanée du groupe acyle se produit de l'atome d'oxygène de l'hydroxyle de départ vers l'atome d'azote de la fonction amine lorsque ceux-ci sont espacés au maximum de trois carbones. En se basant sur cette théorie, l'équipe de Furutani *et al.*, (1996) parvient à expliquer les résultats obtenus lors de l'acylation d'alcool aminés en solvant organique catalysée par différentes lipases. La figure I.17. illustre le mécanisme réactionnel impliquant le transfert d'acyle à l'origine de la synthèse de composés N-acylés et N,O-diacylés et justifiant l'absence d'ester lors de cette réaction.

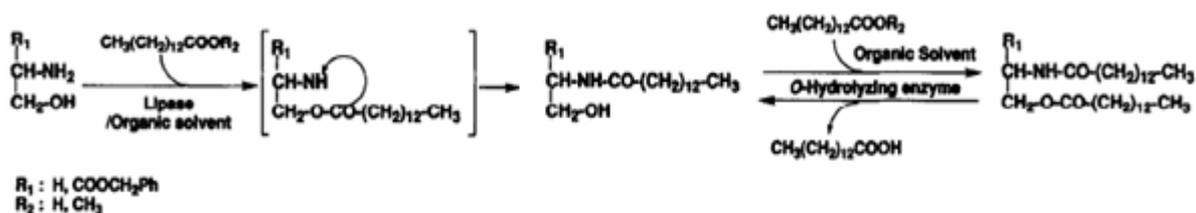


Figure I.17. Proposition de mécanisme de N-acylation d'alcool aminé catalysée par une lipase spécifique de la O-acylation en solvant organique d'après Furutani *et al.*, (1996).

Cette théorie a permis aussi d'expliquer la chimio-sélectivité obtenue dans des réactions d'acylation enzymatique de l'éthanolamine et de la diéthanolamine en solvant organique (Fernandez-Perez *et al.*, 2001 ; Fernandez-Perez *et al.*, 2003)

Enfin, une étude récente proposant d'étudier plus précisément cette théorie du transfert d'acyle et particulièrement le caractère chimique et spontané de ce transfert a été publiée (Torres *et al.*, 2007). La figure I.18. montre que la protection de la fonction amine du 3-phényl-3-amino propan-1-ol suivie du greffage d'un groupe acétyle sur son hydroxyle

conduit, après une déprotection de l'amine à un transfert spontanée intramoléculaire du groupe acétyle sur l'amine.

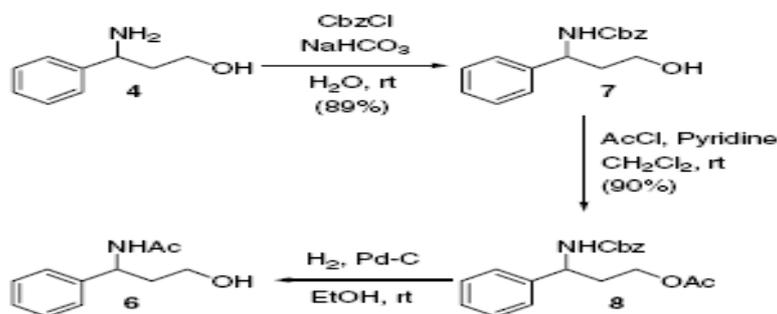


Figure I.18. Etude du transfert d'acyle lors de l'acylation d'alcool aminé dont les groupes fonctionnels sont distants de 3 carbones d'après Torre *et al.*, (2006).

5. Les milieux réactionnels classiques et innovants utilisés pour l'acylation enzymatique

L'acylation enzymatique de molécules aminées a essentiellement été mise en œuvre en solvant organiques et en milieux fondus. Plus récemment, d'autres milieux ont été développés comme substituts à ces milieux réactionnels classiques, tels que des liquides ioniques et le dioxyde de carbone supercritique, alternatives émergentes dans le domaine de la biocatalyse. Lors de la transposition d'un procédé enzymatique d'un milieu à un autre, des modifications de la sélectivité de l'enzyme peuvent être observées. L'influence du milieu sur cette propriété intrinsèque de l'enzyme sera aussi abordée dans cette partie.

5.1. Les solvants organiques

5.1.1. Généralités

Les solvants organiques sont des composés organiques contenant des atomes de carbone et présentent habituellement des températures de fusion inférieures à 100 °C, facilitant alors leur évaporation. Ils permettent, en fonction de leurs caractéristiques, de dissoudre des réactifs et de favoriser les chocs efficaces entre eux. Etant chimiquement inertes pour certains, ils constituent un milieu réactionnel propice aux réactions enzymatiques et

particulièrement celles catalysées par les lipases. Cependant, l'acylation enzymatique catalysée par les lipases va nécessiter l'utilisation de solvants organiques anhydres de façon à minimiser la présence de molécules d'eau résiduelles susceptibles de déplacer l'équilibre de la réaction vers l'hydrolyse. Leur utilisation ces 20 dernières années a permis de mettre en œuvre des réactions enzymatiques impossibles en phase aqueuse. Il est admis que ces milieux influencent considérablement l'activité, la sélectivité et la spécificité des biocatalyseurs. Les solvants organiques ont ouvert de larges potentialités à la synthèse enzymatique de produits valorisables à l'échelle industrielle (Sheldon, 1996 ; Klivanov, 2001). Ces solvants organiques, en fonction de leur nature (polarité, pouvoir dissociant, volatilité) sont considérés comme de bons milieux réactionnels pour les réactions enzymatiques à conditions qu'ils permettent une bonne solubilisation des substrats et n'affectent pas l'activité enzymatique. Cependant, une limite à leur utilisation en biocatalyse est leur toxicité à l'origine de l'émergence d'autres milieux réactionnels alternatifs.

Différents paramètres intrinsèques au solvant organique régissent la faisabilité des réactions enzymatiques d'acylation. Outre la température, dont le choix est restreint par le domaine thermique d'activité catalytique optimale du biocatalyseur, la polarité du solvant et sa capacité à dissoudre les substrats influencent considérablement la réaction d'acylation.

5.1.2. Polarité

La polarité d'un solvant est quantifiée par le logarithme de son coefficient de partition ($\log P$), qui indique sa tendance à se répartir entre des phases ou des sites de polarités différentes. Il est généralement défini dans le système biphasique standard octanol-eau. Il peut être déterminé de manière empirique, mais également par le calcul selon la méthode des constantes fragmentales d'hydrophobie développée par Nys (1973). Cependant cette méthode a été améliorée au cours de ces 10 dernières années et permet une prédiction et une estimation plus rigoureuse (Mannhold *et al.*, 1995 ; Mannhold *et al.*, 2000).

Le tableau I.3. présente quelques solvants organiques utilisés dans le cadre des bioconversions enzymatiques et leur $\log P$ respectif.

Tableau I.3. Valeurs de log P de quelques solvants organiques d'après Nys (1973) et Mannhold (2000).

Solvants	log P
Dioxane	-1,12
Diméthylformamide	-1,00
Diacétone alcool	-0,34
Acétonitrile	-0,33
Tertiobutanol	0,37
Pyridine	0,71
Ether diéthylique	0,85
2-Méthyl-2-butanol	0,89
Benzène	2,00
Toluène	2,50
Hexane	3,52
Heptane	4,00

En 1987, Laane *et al.*, ont établi une corrélation entre le log P du solvant et l'efficacité de la réaction d'acylation. Leurs résultats ont suggéré une faible activité des lipases dans les solvants polaires dont le log P est inférieur à 2, une activité modérée dans les solvants ayant un log P compris entre 2 et 4 et une activité importante dans les solvants apolaires dont le log P est supérieur à 4 (Colja Laane 1987). Cependant, cette corrélation a été par la suite contredite par de nombreuses études mettant en œuvre des réactions enzymatiques, dont l'efficacité n'est plus à prouver, dans des solvants polaires tel que le 2-méthyl-2-butanol (Maugard *et al.*, 1998a ; Zhang *et al.*, 2005).

Un autre aspect important concerne l'amélioration de la stabilité du biocatalyseur en solvant organique. Il apparaît clairement que plus le solvant est hydrophobe moins l'activité résiduelle de l'enzyme au cours du temps d'incubation est affectée (Kaar *et al.*, 2003). La figure I.19. illustre clairement cette influence par l'utilisation de différents milieux organiques.

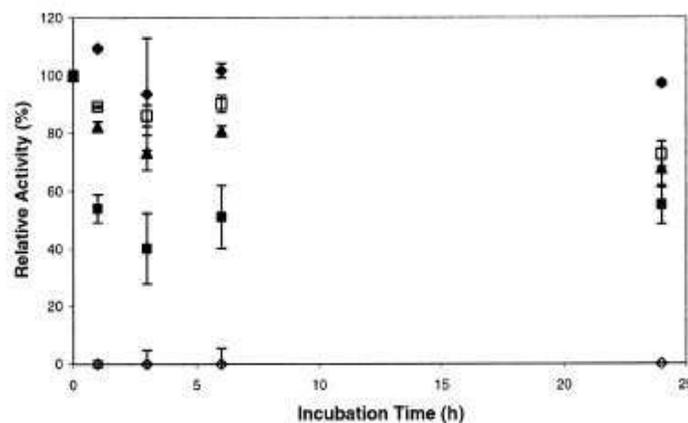


Figure I.19. Stabilité de Novozym 435[®] catalysant la trans-estérification du méthyl méthacrylate à 30 °C dans divers solvants organiques. butanol (◇), tétrahydrofurane (□), acétonitrile (▲), diméthyl sulfoxyde (■), et hexane (◆) d'après Kaar *et al.*, (2003).

Cependant, l'influence de la polarité sur l'activité enzymatique est souvent liée à un phénomène de compétition entre le solvant et l'enzyme par rapport à l'eau disponible. En effet, il a été montré que plus un solvant est polaire, plus son aptitude à piéger les molécules d'eau nécessaires à l'enzyme est grande. La conséquence de cette compétition se situe au niveau de la couche d'hydratation entourant l'enzyme. Cette couche d'hydratation, en cas de déformation, peut affecter l'activité enzymatique (Valivety *et al.*, 1992a ; Valivety *et al.*, 1992b).

5.1.3. Solubilité des substrats

La solubilisation même partielle des substrats à acyler par voie enzymatique est une condition sine qua non à toute bioconversion. Celle-ci est directement liée à la polarité du solvant et à son aptitude à solvater les molécules organiques réactives. Ce paramètre limitant est souvent source de problème pour la mise en œuvre de réactions.

Pour résoudre ce problème, différentes alternatives ont été préconisées :

- ajout d'agents de solubilisation dans des solvants très hydrophobes,
- utilisation de mélanges de solvants tels que benzène/pyridine ou tertiobutanol/heptane,
- utilisation de solvants plus polaires tels que l'acétonitrile ou le diméthylformamide (Shibatani *et al.*, 1997).

Par exemple, le tableau I.4. illustre clairement que l'utilisation de solvants organiques plus polaires que l'hexane augmente, d'un facteur 200, la solubilité de l'éthanolamine (Fernandez-Perez *et al.*, 2001).

Tableau I.4. Solubilité d'un alcool aminé dans des solvants organiques aux polarités bien distinctes d'après Fernandez-Perez *et al.*, (2001).

Product	Solvent	Solubility	
		40°C	
		mg/ml	mol l ⁻¹
Ethanolamine	Dioxane	>250	>4.20
Ethanolamine	Acetonitrile	>250	>4.20
Ethanolamine	n-Hexane	1.25	0.02

Beaucoup d'études relatives à l'acylation enzymatique concernent des substrats à acyler polaires tels que les sucres, les flavonoïdes, les acides aminés et les petits peptides. Pour de tels substrats, les solvants organiques polaires sont les plus adaptés à la mise en œuvre de réaction d'acylation comme démontré dans de récentes études (Chebil *et al.*, 2007). En effet, ils permettent, en particulier les alcools tertiaires inertes vis-à-vis de l'enzyme, une bonne solvation des substrats polaires via des interactions de type liaisons hydrogènes. Notons aussi, comme décrit précédemment, que la solubilité des substrats peut être influencée par l'éventuelle formation de complexe ionique entre les substrats dont la dissociation dépendra des propriétés du milieu.

5.1.4. Procédés enzymatiques d'acylation en solvants organiques

L'acylation par voie enzymatique a été appliquée à diverses molécules susceptibles d'être soit O-acylées dans le cas de molécules d'alcools primaires et secondaires, soit N-acylées dans le cas de molécules aminées de type amines primaires ou encore à des molécules polyfonctionnelles telles que des alcools aminés, acides aminés et peptides qui peuvent être O et/ou N-acylées.

a) O-acylation en solvant organique de molécules polyfonctionnelles

Les solvants organiques sont le siège de nombreuses réactions de O-acylation soit par estérification directe résultant de la condensation entre une fonction carboxylique et une fonction alcool soit par trans-acylation résultant d'un transfert d'un groupe acyle d'un ester sur une fonction alcool. Dans cette partie, la O-acylation de molécules de type alcool primaire, largement traitée dans la littérature, ne sera pas abordée (Zaks *et al.*, 1985 ; W. Chulalaksananukul 1990 ; Borzeix *et al.*, 1992 ; Yahya *et al.*, 1998). Un aspect intéressant, par contre, est la sélectivité de certaines enzymes à catalyser spécifiquement l'acylation d'une fonction alcool sur des molécules diols ou polyols. La trans-acylation enzymatique de

vinyl-diols en solvants organiques tels que le toluène ou le tétrahydrofurane, catalysée par différentes lipases a conduit dans certains cas à la synthèse de composés monoacylés. La lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei* n'est pas du tout régio-sélective pour ces substrats contrairement à la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Cruz Silva *et al.*, 2005). Beaucoup d'études rapportent aussi la régio-sélectivité de l'acylation enzymatique de flavonoïdes (molécules polyhydroxylées) dans le 2-méthyl-2-butanol (Ardhaoui *et al.*, 2004 ; Chebil *et al.*, 2006 ; Mellou *et al.*, 2006 ; Chebil *et al.*, 2007). Remarquons, que l'efficacité de l'estérification de composés tels que des sucres en solvants organiques catalysées par Novozym 435[®] a été améliorée par traitement continu au cours de la réaction aux ultra-sons. Le rendement a ainsi été augmenté dans la plupart des cas de 20% sans affecter la sélectivité de l'enzyme (Xiao *et al.*, 2005).

Par contre, dans certains cas, et plus particulièrement au cours de l'acylation enzymatique de résidus aminés hydroxylés, l'estérification est loin d'être évidente. Plusieurs études ont soulevé le problème de la O-acylation de la sérine et de la thréonine catalysée par des lipases en milieux organiques. L'hypothèse avancée pour expliquer l'absence de réaction est la faible solubilité de ces substrats. Celle-ci a d'ailleurs été contournée en greffant un groupe amide sur la fonction carboxylique de ces résidus. Ainsi, les auteurs sont parvenus à obtenir des rendements de conversion de ces substrats en O-lauroyl sérinamide et O-lauroyl thréoninamide de respectivement 93 % et 53 % dans le 2-méthyl-2-propanol en présence de la lipase de *Candida antarctica* immobilisée (Chirazyme[®]) (Zhang *et al.*, 2005).

b) N-acylation en solvants organiques.

La N-acylation enzymatique, quant à elle, a été nettement moins étudiée jusqu'à présent à cause probablement de la faible proportion d'enzymes capable de catalyser spécifiquement la synthèse de liaison amide. La synthèse de la liaison amide a été beaucoup étudiée pour la synthèse de peptides catalysée par des protéases. Dans certaines conditions, les lipases possèdent la propriété de catalyser la synthèse de la liaison amide, notamment pour la synthèse de lipoacides aminés non naturels, à partir de D-acides aminés ou de peptides contenant des L-lysines (Zaks *et al.*, 1985). Aujourd'hui, il est reconnu que beaucoup de lipases présentent la capacité de catalyser la N-acylation (Djeghaba *et al.*, 1991). L'étude des conditions réactionnelles de la N-acylation apparaît donc nécessaire en vue de la synthèse de lipoacides aminés et/ou de lipopeptides. Une étude a consisté à utiliser des lipases comme catalyseurs pour la préparation de dérivés acylés d'acides aminés et à combiner des procédés de synthèse enzymatique et chimique. Dans cette étude, les lipases de *Pseudomonas sp.* et

d'*Aspergillus niger* catalysaient sélectivement la réaction entre l'acétate de trifluoroéthyle et la fonction aminé en ϵ de la lysine de la molécule L-Phe- α -L-Lys-O-tBu et de la L-Ala- α -L-Lys-O-tBu dans l'acétonitrile. Les rendements obtenus étaient supérieurs à 50 % (Gardossi *et al.*, 1991). La synthèse de N ϵ -acyl-lysine a été réalisée grâce à une lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme[®]) à 90 °C dans des solvants organiques (différents éthers et hexane) en présence de triglycérides. Cette température de 90 °C peut paraître surprenante pour une enzyme, mais les auteurs démontrent que cette lipase immobilisée, en présence d'une phase aqueuse très limitée, présente une stabilité thermique remarquable. Dans ces conditions, ils obtiennent un rendement de 75 % et une régio-sélectivité en faveur de l'amine en position ϵ de la lysine de 100%. Cette étude a révélé que cette lipase catalyse facilement la réaction de trans-amidification entre l'acide oléique constitutif des triglycérides utilisés et l'acide aminé lysine (Montet *et al.*, 1990). Cependant les rendements obtenus pour l'acylation de la lysine dans cette étude sont controversés notamment par d'autres auteurs qui pour une même réaction trouvent un rendement de 10% (Jauregi *et al.*, 1994). Ce faible rendement (2-9 %) a également été mis en évidence par Valivety *et al.*, (1997) pour l'acylation d'acides aminés (L-sérine et L-lysine) libres ou éthyle/méthyle esterifiés, avec Novozyme 435[®] (lipase B immobilisée de *Candida antarctica*) et Lipozyme[®] (lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei*). Les auteurs n'ont pu améliorer le rendement de l'acylation qu'en utilisant la α -Cbz-L-sérine (92 %), réalisant, alors, non pas une liaison amide mais une liaison ester. Notons que le paramètre jugé limitant dans ces réactions est toujours la solubilité des substrats en solvants organiques d'où l'alternative d'augmenter leur hydrophobie par dérivation chimique. Seule cette méthode, jusqu'à maintenant, est décrite dans la littérature. Il est très rare que la fonction amine en position α des résidus aminés et/ou des peptides soit acylé. Cette difficulté d'acylation est montrée dans le cas de l'acylation d'homologues d'alanine, due à la présence de groupes donnant lieu à un encombrement stérique dans son environnement proche (Izumi *et al.*, 1997). Enfin, une étude méthodologique a permis d'optimiser le procédé de N-acylation de la lysine par l'acide oléique catalysée par le Lipozyme[®] en jouant à la fois sur la température, les concentrations en substrats, l'hydrophobie du solvant et la teneur en biocatalyseur. La figure I.20. illustre l'influence de l'hydrophobie du solvant organique et de la température sur le taux de conversion.

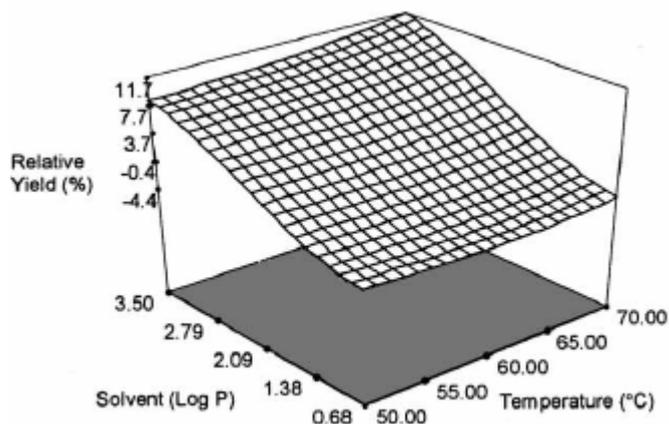


Figure I.20. Relation entre l'hydrophobie du solvant, la température et le taux de conversion du substrat relative à la synthèse de N ϵ -oléyl lysine biocatalysée par Lysozyme[®] d'après Soo *et al.*, (2004).

Ainsi, les auteurs ont suggéré que les conditions optimales de synthèse de ce dérivé acylé de lysine nécessitent une mise en œuvre du procédé dans l'hexane, une concentration en enzyme de 62 g/L, des concentrations en substrat et donneur d'acyle respectivement de 33 mM et 99 mM et une température de 57 °C pour obtenir un rendement optimal de 33 % après 96 h (Soo *et al.*, 2004).

5.2. Les milieux fondus.

Les exigences environnementales concernant la synthèse de biomolécules à intérêt thérapeutique, agroalimentaire et cosmétologique, encouragent le développement de procédés enzymatiques d'acylation en milieux fondus (Hobbs *et al.*, 2007 ; Lancaster 2008).

5.2.1. Généralités

Un milieu fondu consiste à substituer un solvant organique classiquement utilisé pour l'acylation enzymatique par un excès de donneur d'acyle jouant à la fois le rôle de substrat et de solvant. De tels procédés permettent donc de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques classiques et, la présence d'un excès de donneur d'acyle, permet de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction, catalysée généralement par des lipases, vers la synthèse. La majorité des études concernant les réactions enzymatiques en milieu fondu décrivent des bioconversions de type estérification et amidification. Un tel procédé est par exemple utilisé pour la synthèse de biodiesel par acylation enzymatique du méthanol par de l'huile de soja. Cependant, ce procédé « vert » ne permet pas de concurrencer la synthèse de biodiesel en solvant organique (Ha *et al.*, 2007). Un autre exemple d'application développé par la société royale de Chimie (The Royal Society of Chemistry[®]) est l'utilisation de ce

procédé pour la synthèse d'ester de citronnelle catalysée par Novozyme 435[®] (Lozano *et al.*, 2007b). Une étude concernant la synthèse d'oléate de butyle par trans-estérification en système sans solvant constitué d'huile de tournesol, catalysée par Lipozym[®] a mis en évidence une activité synthétique en faveur de la production d'ester de butyle de 60 % contre 95 % en solvant organique (Dossat *et al.*, 2002). Une autre étude a récemment démontré l'intérêt écologique de ce genre de milieu pour la synthèse de dérivé acylé d'alkanolamine proche des structures de céramides à intérêt cosmétologique et alimentaire (Couturier *et al.*, 2008).

5.2.2. Mise en œuvre de réactions d'acylation en milieux fondus

La mise en œuvre de réactions en milieu fondu présente différents inconvénients susceptibles d'affecter son efficacité. En effet, lorsque le donneur d'acyle est un acide gras libre, étant donné sa quantité importante, la synthèse de dérivés acylés va libérer une quantité significative de molécules d'eau pouvant augmenter l' a_w du milieu réactionnel et, ainsi, inciter la réaction inverse : l'hydrolyse. Une alternative à cet inconvénient est la mise en œuvre de la réaction sous vide de façon à éliminer au fur à mesure de la réaction les molécules d'eau libérées et ainsi favoriser la synthèse. Un tel procédé a fait ses preuves dans divers travaux tels que la résolution racémique d'alcools secondaires par acylation catalysée par CAL B en milieu fondu à une pression de 5 mm de mercure (Irimescu *et al.*, 2003). Plusieurs auteurs ont mis en avant dans leurs études le problème de la formation de complexe paire d'ions entre l'acide gras en excès et le substrat aminé susceptible d'être protoné. Il est suggéré que ce complexe ionique peut affecter le rendement de la réaction en atténuant la disponibilité des substrats (Irimescu *et al.*, 2004b ; Tufvesson *et al.*, 2007). Lors de l'acylation en milieu fondu de l'éthanolamine, le complexe ionique formé étant peu soluble, affecte le rendement de la réaction. La figure I.21. représente les performances cinétiques du procédé qui a été mis en œuvre pour palier cette limitation.

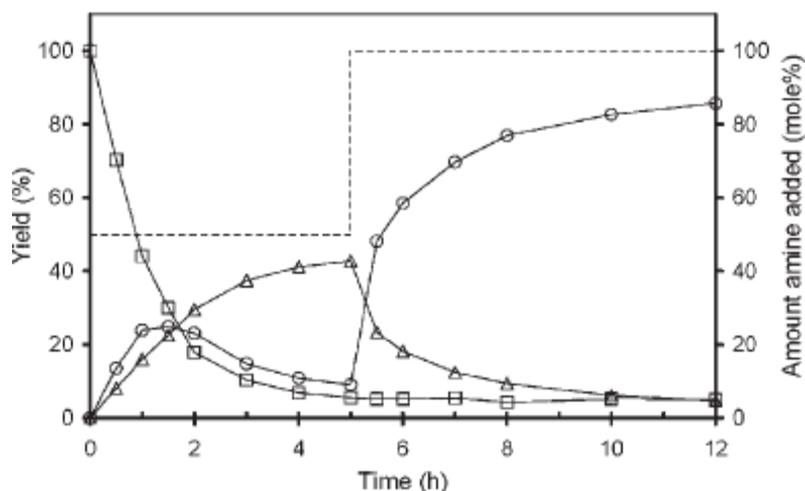


Figure I.21. Courbes cinétiques relatives à l'acylation de l'éthanolamine catalysée par Novozym 435[®] dans l'acide laurique. Les pointillés représentent l'ajout séquentiel en deux temps de l'éthanolamine. (□) acide laurique, (Δ) amide-ester et (○) amide d'après Tufvesson *et al.*, (2007).

Pour résoudre ce problème, les auteurs ont appliqué le procédé suivant :

- une mise en œuvre de la réaction sous vide avec la moitié de la quantité de substrat prévue permettant la synthèse de composé N-acylé et N,O-diacylé,
- l'ajout de l'autre moitié de substrat à acyler avec une remise à pression atmosphérique par arrêt de la pompe à vide car le substrat ajouté n'ayant pas le temps de se complexer à l'acide gras, reste très volatile,
- l'hydrolyse du composé N,O-diacylé en composé N-acylé.

De cette façon les auteurs sont parvenus à un taux de conversion du substrat en 10 h de 85 % en orientant la chimio-sélectivité de la réaction en faveur de l'amide à hauteur de 85 % (Tufvesson *et al.*, 2007).

Il apparaît clairement que la mise en œuvre de procédés enzymatiques de N-acylation en milieu fondu est une bonne alternative respectueuse de l'environnement mais nécessite la connaissance et la maîtrise de plusieurs phénomènes tels que la formation possible d'un complexe ionique en milieux organiques et un transfert d'acyle potentiel pour des molécules de type alcool-aminé. Il est également important de tenir compte de la nature des substrats à convertir à l'origine de leur solubilité et de leur volatilité dans le milieu réactionnel.

5.2.3. Maintien et orientation de la sélectivité.

Les milieux fondus permettent à l'enzyme de conserver, voire d'améliorer certaines de ces caractéristiques telles que son énanti-sélectivité. Des études concernant la N-acylation ont ainsi été réalisées dans ce genre de système. Citons par exemple la résolution racémique d'amines primaires par N-acylation biocatalysée par des lipases. Le schéma réactionnel est présenté sur la figure I.22.

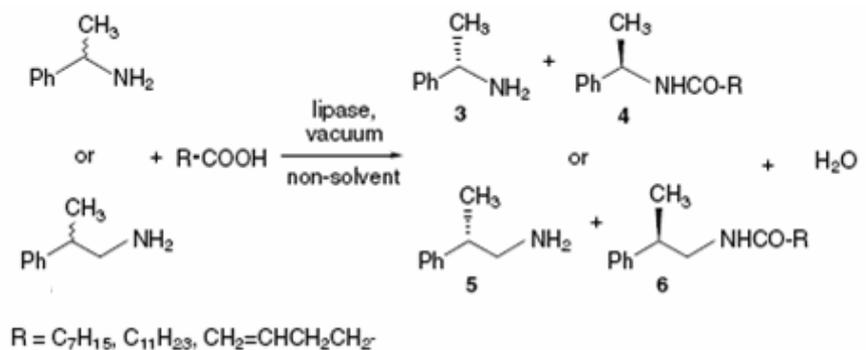


Figure I.22. N-acylation énanti-sélective d'amine primaire catalysée par une lipase en milieu fondu d'après Irimescu *et al.*, (2004b).

Dans cette réaction, la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée permet de catalyser préférentiellement la N-acylation énanti-sélective de la phényléthylamine. 97 % de l'amide synthétisée provient de l'énantiomère R avec un taux de conversion de substrat de 34 % (Irimescu *et al.*, 2004). Cette énanti-sélectivité en faveur des amines de configuration R en milieu fondu de la lipase B de *Candida antarctica* a également été mise en évidence dans d'autres réactions de N-acylation comme le présente la figure I.23.

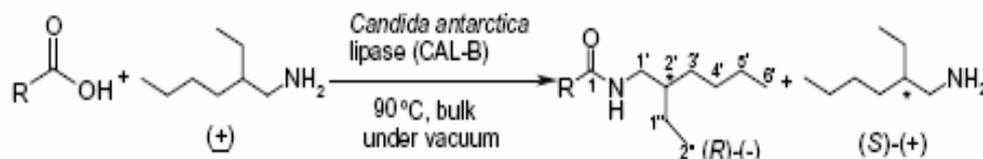


Figure I.23. N-acylation énanti-sélective d'amine primaire catalysée par CALB en milieu fondu d'après Prasad *et al.*, (2005).

Par ailleurs, une étude concernant l'acylation de phloridzine, molécule polyfonctionnelle, en milieu fondu, catalysée par Novozym 435[®] a été réalisée. Les résultats obtenus mettaient en

évidence la régio-sélectivité exclusive de cette lipase en faveur de la position 6''-O du substrat (Enaud *et al.*, 2004).

5.3. Les liquides ioniques

Au cours de ces dernières années, les liquides ioniques ont émergé dans le domaine de la biocatalyse en tant qu'alternative aux solvants organiques.

5.3.1. Définition

Les liquides ioniques sont des sels organiques constitués d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique. Ils sont caractérisés par une température de fusion inférieure à la température ambiante et une température d'ébullition souvent comprise entre 300 et 400 °C. Aujourd'hui, environ un millier de liquides ioniques (1^{ère} et 2^{ème} générations, et liquides ioniques développés plus récemment) sont décrits dans la littérature (Pitner-Merck 2004 ; Sigma-Aldrich 2007). Les principaux utilisés en biocatalyse sont constitués des cations et anions présentés dans la figure I.24.

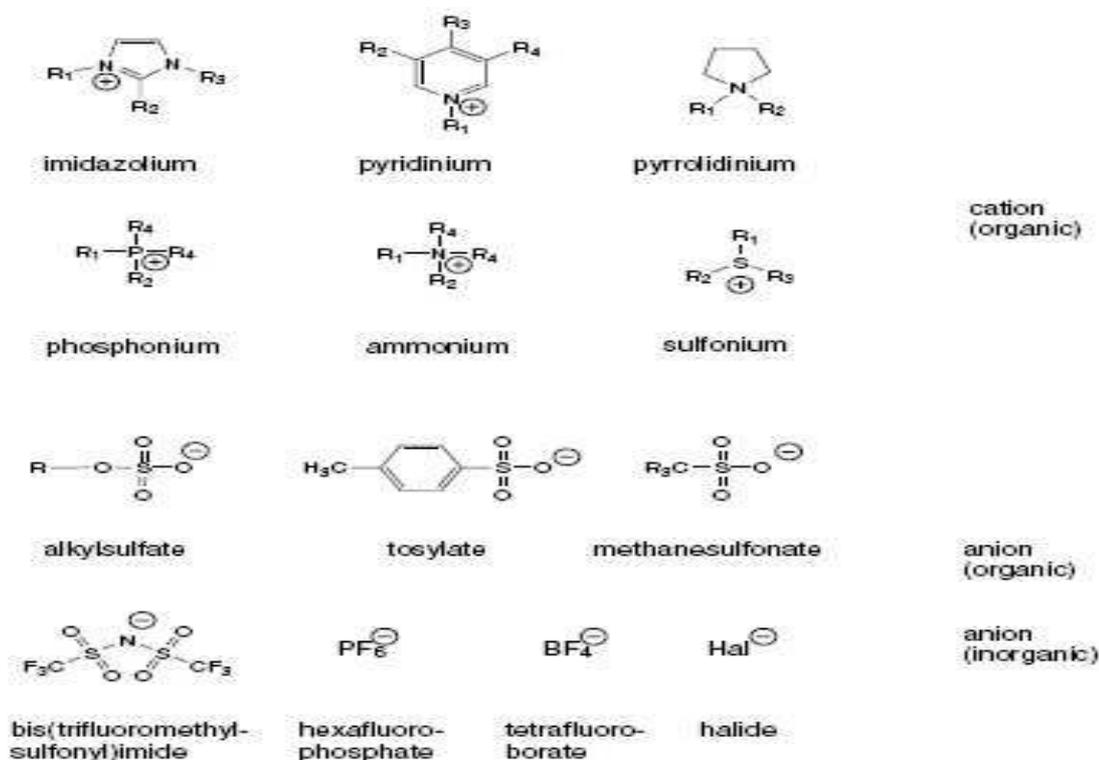


Figure I.24. Principaux cations et anions constitutifs utilisés en biocatalyse d'après Pitner (2004) et Sigma-Aldrich (2007).

5.3.2. Avantages et limites à l'utilisation de liquides ioniques en biocatalyse

Les principaux avantages à l'utilisation de liquides ioniques sont d'après Sheldon *et al.*, (2002) et Van Rantwijk *et al.*, (2003) :

- une tension de vapeur négligeable,
- leur non volatilité,
- leur non inflammabilité,
- leur grande stabilité thermique, chimique et électrochimique,
- un l'état liquide dans un large domaine de température,
- une capacité à dissoudre des composés polaires,
- une miscibilité variable avec l'eau et d'autres solvants facilitant l'extraction,
- un recyclage facilité,
- des propriétés facilement modulables.

En comparaison avec les milieux réactionnels classiques, les liquides ioniques permettent d'augmenter considérablement l'activité et la stabilité enzymatique en particulier dans le cas de réactions d'acylation (Gordon 2001 ; Lozano *et al.*, 2001 ; Sheldon *et al.*, 2002 ; Kaar *et al.*, 2003 ; Van Rantwijk *et al.*, 2003 ; Jain *et al.*, 2005). De plus, ils induisent souvent une amélioration significative de l'énantio-sélectivité et de la régio-sélectivité des biocatalyseurs.

La synthèse de ces nouveaux milieux ne nécessite pas de conditions particulièrement drastiques et fait appel à des stratégies de chimie organique classique. Par exemple, le butyl-triméthylammonium bis(trifluorométhylsulfonyl)imide utilisé pour des réactions de transestérification d'alcool est synthétisé à partir de chlorure de butyle solubilisé dans l'acétonitrile et d'une solution aqueuse de triméthylamine chauffée à 80°C. Le produit résultant (cation organique) est alors ajouté à une solution de bis(trifluorométhylsulfonyl)imide de lithium (anion) (Lozano *et al.*, 2004b). Il est possible dans certains cas que le procédé de synthèse du liquide ionique laisse des traces de contamination dans celui-ci. La présence d'impuretés dans un liquide ionique (principalement des halides, de l'eau et des espèces organiques non-réactantes) peut altérer certaines propriétés physicochimiques du liquide ionique telles que son point de fusion, sa viscosité, sa stabilité thermique et entraîner des réactions secondaires indésirables lors de la biocatalyse.

5.3.3. Structure et propriétés physicochimiques

Au sein d'un liquide ionique, les molécules constitutives ont une organisation peu symétrique comparativement à un sel inorganique (figure I.25.). Ainsi la distribution des charges du cation et de l'anion est telle qu'un très large espace est occupé par résonance des molécules. Ceci explique la solidification à faible température de ces milieux et est à l'origine de leur viscosité. Dans certains cas, et particulièrement lorsque les cations présentent de longues chaînes alkyles constitutives, on considère plutôt un état de transition vitreuse plutôt que de point de fusion.

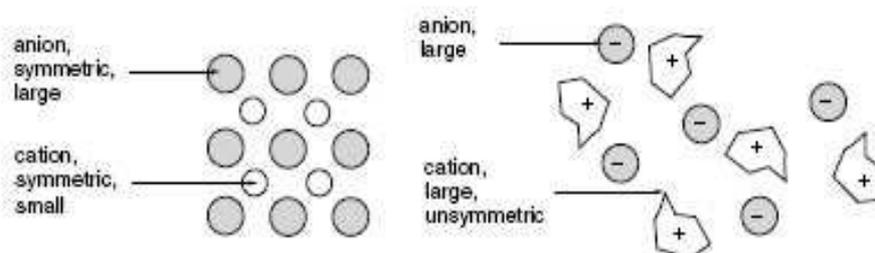


Figure I.25. Comparaison de l'organisation d'un sel inorganique classique (à gauche) et de celle d'un liquide ionique (à droite).

Les fortes interactions ioniques dans ces liquides résultent d'une tension de vapeur négligeable. Vu leur faible volatilité par rapport aux solvants organiques classiques, leur faible émission de composés organiques volatiles rend ces milieux plus respectueux de l'environnement comparativement aux solvants organiques (Gordon 2001 ; Sheldon *et al.*, 2002 ; Jain *et al.*, 2005). Les propriétés physicochimiques des liquides ioniques sont modulables en fonction du choix du cation et de l'anion constitutifs. Le cation est généralement à l'origine de la stabilité et des propriétés physiques du liquide ionique alors que l'anion définit plutôt ses propriétés chimiques et sa fonctionnalité.

a) Hydrophobie

En fonction du choix de leurs constituants, les liquides ioniques vont présenter soit un caractère hydrophobe, soit hydrophile qui leur est propre (figure I.26.).

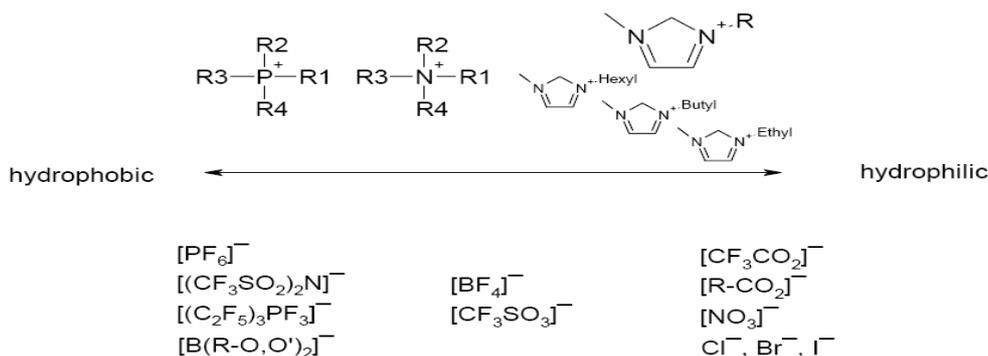


Figure I.26. Influence de la composition en cations et anions constitutifs sur l'hydrophobie des liquides ioniques d'après Merck®.

Les cations de type phosphonium accentuent le caractère hydrophobe du liquide ionique, tout comme les anions fluorés. A l'inverse, les cations de type imidazolium confèrent au liquide ionique un caractère hydrophile. Notons que les liquides ioniques à caractère hydrophile maintiennent une activité synthétique importante des lipases contrairement à des solvants organiques de même hydrophilie (Yang *et al.*, 2005).

b) Viscosité

Concernant la viscosité, il est reconnu que le choix de l'anion est déterminant. Par exemple, les liquides ioniques à anions peu volumineux tels que les dicyanimides sont beaucoup moins visqueux que les liquides ioniques à anions de type fluorés (Park *et al.*, 2003). La viscosité de ces milieux peut être considérée comme une limite à leur utilisation en biocatalyse. En effet cette propriété peut engendrer des problèmes de filtration, de dispersion des enzymes immobilisées sur support dans le milieu réactionnel, de prélèvements au cours du temps et de limitation de transfert de masse. Cependant, en jouant sur la température cette contrainte peut être contournée (figure I.27.).

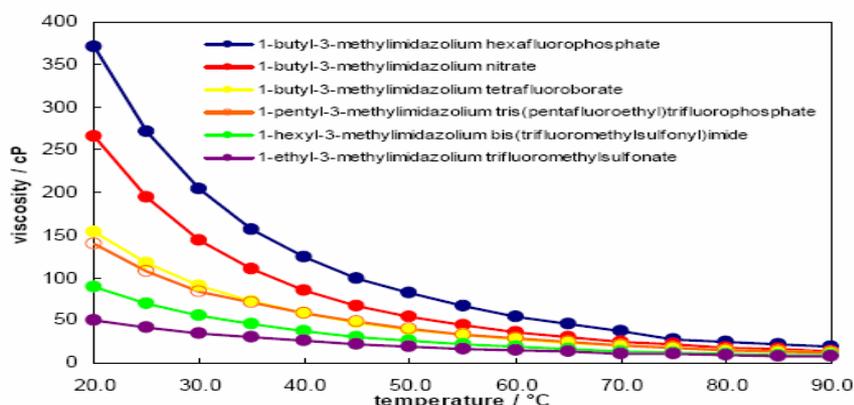


Figure I.27. Influence de la température sur la viscosité des liquides ioniques les plus couramment utilisés dans le domaine de la biocatalyse d'après Merck®.

c) Polarité

La polarité est dépendante de la nature du groupe substituant au cation (longueur de la chaîne alkyle) et de la taille de l'anion. Un liquide ionique dont le cation et l'anion sont de petite taille présentera un caractère polaire bien marqué (Yang *et al.*, 2005). Notons qu'une légère diminution de la polarité du liquide ionique augmente considérablement sa viscosité. Même s'il est reconnu que l'activité enzymatique est favorisée par un caractère apolaire du milieu, la viscosité va limiter cette amélioration en rendant le transfert de masse limitant dans certains cas. La polarité de ces milieux va aussi jouer un rôle sur la présence de molécules d'eau : dans un liquide ionique polaire les molécules d'eau se répartissent dans la totalité du milieu alors que dans un liquide ionique apolaire, ces dernières participent surtout à la couche d'hydratation de l'enzyme et permettent alors de conférer une certaine flexibilité conformationnelle à l'enzyme, améliorant ainsi son activité (Zaks *et al.*, 1988 ; Park *et al.*, 1999). Ces trois paramètres descripteurs : hydrophobie, polarité, et viscosité vont donc régir la capacité des liquides ioniques à dissoudre des composés polaires et ainsi rendre les substrats disponibles pour l'enzyme catalysant la réaction d'acylation. Une étude récente a développé une méthode permettant de forcer la solubilisation des sucres dans des liquides ioniques à cation de type dialkylimidazolium en procédant au mélange d'une solution aqueuse saturée en sucre avec un liquide ionique miscible à l'eau, suivi d'une évaporation totale de l'eau. La solubilité des sucres dans le liquide ionique est alors améliorée de plus de 400 fois (Sang *et al.*, 2008).

5.3.4. Utilisation des liquides ioniques dans le domaine de la biocatalyse.

Depuis les années 2000, les liquides ioniques ont de plus en plus remplacé les solvants organiques dans les réactions enzymatiques. La majeure partie des réactions d'acylation mises en œuvre dans ces milieux est catalysée par des lipases. Outre l'aspect respectueux de l'environnement de ces milieux, les liquides ioniques présentent trois avantages majeurs vis-à-vis de l'enzyme :

- l'amélioration de sa stabilité,
- l'amélioration de son activité,
- l'amélioration de sa sélectivité (énantio-, régio-, stéréo-).

Ainsi, les liquides ioniques relativement polaires sont capables de conserver l'enzyme active alors qu'elle aurait été inactivée dans un solvant organique de polarité similaire (Park *et al.*, 2003). La figure I.28. illustre parfaitement cette notion.

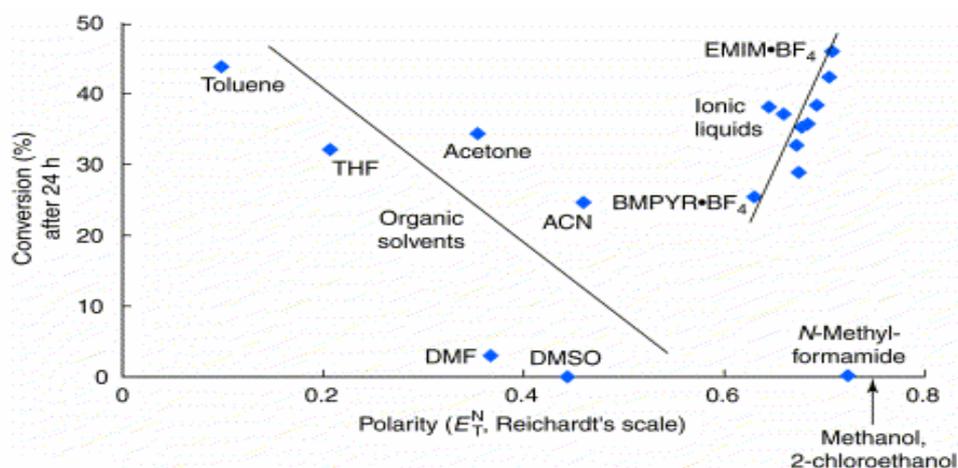


Figure I.28. Comparaison de l'activité enzymatique de trans-estérification de la lipase de *Pseudomonas cepacia* en solvants organiques et en liquides ioniques d'après Park *et al.*, (2003).

Les liquides ioniques sont des milieux réactionnels dotés d'un pouvoir dissociant important et capable d'interagir avec les solutés via des interactions électrostatiques et hydrogènes. Une étude concernant la N-acylation en liquides ioniques, a suggéré que par leur pouvoir dissociant, les liquides ioniques empêchent la formation d'un complexe ionique susceptible d'affecter la disponibilité des substrats vis-à-vis de l'enzyme ; l'activité enzymatique dans le cas de la N-acylation est donc améliorée considérablement en liquide ionique par rapport aux solvants organiques classiques (Irimescu *et al.*, 2004a). Même si dans beaucoup de liquides ioniques, l'activité enzymatique est généralement améliorée lors de réactions d'acylation par rapport aux solvants organiques, certains, en particulier les liquides ioniques à anions constitutifs de type sulfates, inhibent l'activité enzymatique. C'est le cas de $[\text{Emim}]^+[\text{EtSO}_4]^-$ qui entraîne une diminution de l'activité de la lipase B de *Candida antarctica*. Il est supposé que les anions de type sulfates se positionnent de façon coordonnée au niveau du site actif de l'enzyme, empêchant son accès aux substrats et modifiant l'état d'ionisation de l'enzyme (Sheldon *et al.*, 2002). D'autres études ont montré que certains liquides ioniques améliorent considérablement la stabilité de l'enzyme en établissant avec elle des interactions maintenant sa conformation tridimensionnelle optimale, ce qui a été démontré par dichroïsme circulaire (Lozano *et al.*, 2005). Les liquides ioniques permettent souvent d'améliorer la sélectivité (régio-, énanti- et chimio-) de réactions enzymatiques d'acylation. Ceci est suggéré du à la capacité du liquide ionique à maintenir par interaction une structure

tridimensionnelle optimale de l'enzyme (Kim *et al.*, 2003 ; Ulbert *et al.*, 2004 ; Yasmin *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008).

Le tableau I.5 présente une synthèse des principales réactions d'acylation enzymatique mises en œuvre en liquides ioniques et ayant conduit pour la plupart à une amélioration de l'activité, et/ou de la sélectivité enzymatique.

Tableau I.5. Exemples de réactions enzymatiques d'acylation mises en œuvre en liquides ioniques.

Liquides ioniques	Type de réaction d'acylation	Enzymes	Références
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	Trans-estérification du butanoate d'éthyle avec le butan-1-ol	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Madeira Lau <i>et al.</i> , 2000
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻ [Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻	Trans-estérification du 2-hydroxyméthyl-1,4-benzodioxane avec l'acétate de vinyle	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Nara <i>et al.</i> , 2002
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	Trans-estérification du méthacrylate de méthyle avec le 2-éthylhexanol Polytrans-estérification de l'adipate de divinyle avec le butan-1,4-diol	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Kaar <i>et al.</i> , 2003
[MOEMIM] ⁺ [PF ₆] ⁻ [Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	O-acylation régio-sélective du méthyl-6-O-trityl-glucoside avec l'acétate de vinyle	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003
[Bmim] ⁺ [Ntf ₂] ⁻ [Emim] ⁺ [BF ₄] ⁻ [Emim] ⁺ [PF ₆] ⁻ [Emim] ⁺ [Ntf ₂] ⁻	Trans-estérification du butyrate de vinyle par le butan-1-ol	Lipase de <i>Candida antarctica</i>	Lozano <i>et al.</i> , 2003a
[Bmim] ⁺ [Ntf ₂] ⁻ [Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻ [Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻ [mtoa] ⁺ [Ntf ₂] ⁻	Trans-estérification de l'acétyltyrosine éthylester avec le propanol	α-chymiotrypsine	
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	Polysesstérification de l'octan-1,8-dicarboxylate de diéthyle par le butan-1,4-diol	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Nara <i>et al.</i> , 2003
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻ [Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻ [Emim] ⁺ [BF ₄] ⁻ [Emim] ⁺ [PF ₆] ⁻ [Omim] ⁺ [PF ₆] ⁻	N-acylation énantio-sélective du 1-phényléthylamine et du 2-phénylpropylamine par l'acide pentèn-4-oïque	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (Chirazyme®)	Irimescu <i>et al.</i> , 2004a ; Irimescu <i>et al.</i> , 2004b
[Emim] ⁺ [Ntf ₂] ⁻	Trans-estérification énantio-sélective de glycidol (rac) avec le vinyle de butyrate	Lipase A et B de <i>Candida antarctica</i> & lipase de <i>Mucor miehei</i> libres et immobilisées	Lozano <i>et al.</i> , 2004
[Bmim] ⁺ [NTf ₂] ⁻	Trans-estérification énantio-sélective du pentan-2-ol (rac) par le propionate de vinyle	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Noel <i>et al.</i> , 2004
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻ supplémenté en triéthylamine	Trans-estérification énantio-sélective d'alcools secondaires par l'anhydride succinique	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Rasalkar <i>et al.</i> , 2004
[Emim] ⁺ [NTf ₂] ⁻ [Btma] ⁺ [NTf ₂] ⁻ [Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	Trans-estérification énantio-sélective du phényléthanol (rac) par le propionate de vinyle	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Lozano <i>et al.</i> , 2006

Liquides ioniques	Type de réaction d'acylation	Enzymes	Références
[Emim] ⁺ [TfO] ⁻	Synthèse de biodiesel par estérification d'huile de soja par le méthanol	Lipase de <i>Candida antarctica</i>	Ha <i>et al.</i> , 2007
[Bmim] ⁺ [PF ₆ ou NTf ₂] ⁻ [Emim] ⁺ [PF ₆ ou NTf ₂] ⁻ [Omim] ⁺ [PF ₆ ou NTf ₂] ⁻ [Hmim] ⁺ [PF ₆ ou NTf ₂] ⁻ Supplémenté en Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , triéthylamine	Trans-estérification du butan-1-ol avec le butyrate de vinyle	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Hernandez-Fernandez <i>et al.</i> , 2007
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻ [Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻	Trans-estérification régio-sélective de composés polyhydroxylés avec le butyrate de vinyle	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Katsoura <i>et al.</i> , 2007
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻ [Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻	Trans-estérification régio-sélective de l'éthan-1,2-diol par l'acétate d'éthyle	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Yasmin <i>et al.</i> , 2007
[MEBu3P] ⁺ [NTf ₂] ⁻	Trans-estérification rapide énantio-sélective d'alcools secondaires par le butyrate de vinyle	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	Abe <i>et al.</i> , 2008
Mélange [Bmim] ⁺ [TfO] ⁻ [Bmim] ⁺ [NTf ₂] ⁻	Trans-estérification régio-sélective de glucose par le laurate de vinyle	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Lee <i>et al.</i> , 2008
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	Estérification énantio-sélective du menthol par l'anhydride propionique	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Zhang <i>et al.</i> ,
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	N,O-acylation sélective de l'acide amino-4-benzoïque par l'éthanol	Lipase de <i>Bacillus thermocatenuatus</i>	Martín <i>et al.</i> , 2008

Annotations :

ECOENGTM 512 : cocosalkyl pentaéthoxi-méthyl ammonium methosulfate

Cations constitutifs :

[Emim]⁺: 1-éthyl-3-méthylimidazolium ; [Bmim]⁺: 1-butyl-3-méthylimidazolium ;

[Hmim]⁺: 1-hexyl-3-méthylimidazolium ; [Omim]⁺: 1-octyl-3-méthylimidazolium ;

[Btma]⁺: butyltriméthylammonium ; [MOEMIM]⁺: 1-méthoxyethyl-3-méthylimidazolium ;

[MEBu3P]⁺: 2-méthoxyéthyl(tri-n-butyl)phosphonium

Anions constitutifs.

[N(CN)₂]⁻: dicyanamide ; [EtSO₄]⁻: éthyle sulfate ; [TfO]⁻: trifluorométhanesulfonate ; [NTf₂]⁻: bis(trifluorométhanesulfonyl)imide ;

[BF₄]⁻: tétrafluoroborate ; [PF₆]⁻: hexafluorophosphate.

Enfin, une étude a récemment démontré l'intérêt d'utiliser des mélanges de liquides ioniques afin de combiner différentes propriétés intéressantes au sein d'un même milieu réactionnel. L'acylation enzymatique du glucose a ainsi été réalisé dans un mélange de deux liquides ioniques à cation 1-butyl-3-méthylimidazolium respectivement combiné à un anion [NTf₂]⁻ permettant à la fois l'amélioration de la régio-sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* et de sa stabilité et un anion [TfO]⁻ permettant une bonne solubilisation du glucose (Lee *et al.*, 2008).

5.4. Le CO₂ supercritique

L'utilisation de biocatalyseurs en fluide supercritique a été réalisée pour la première fois en 1985 par (Hammond *et al.*, 1985). Depuis, en raison de la recherche de procédés verts,

l'utilisation de biocatalyseurs combinés à des fluides supercritiques et en particulier le dioxyde de carbone émerge de plus en plus.

5.4.1. Présentation – Description

Le dioxyde de carbone, d'après son diagramme de phases possède un point critique au-delà duquel les phases liquide et vapeur deviennent indissociables (figure I.29.).

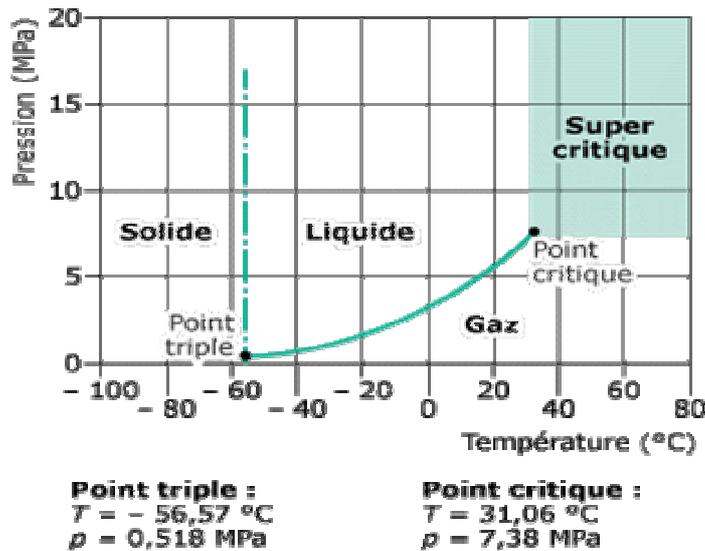


Figure I.29. Diagramme de phase du dioxyde de carbone.

Les paramètres définissant le point critique du dioxyde de carbone sont la température critique T_c de 31,1 °C et la pression critique P_c 7,38 MPa. Pour des valeurs supérieures, le CO_2 existe dans un « état » dit supercritique et possède des propriétés intermédiaires entre celles d'un liquide et celles d'un gaz comme l'illustre la figure I.30.

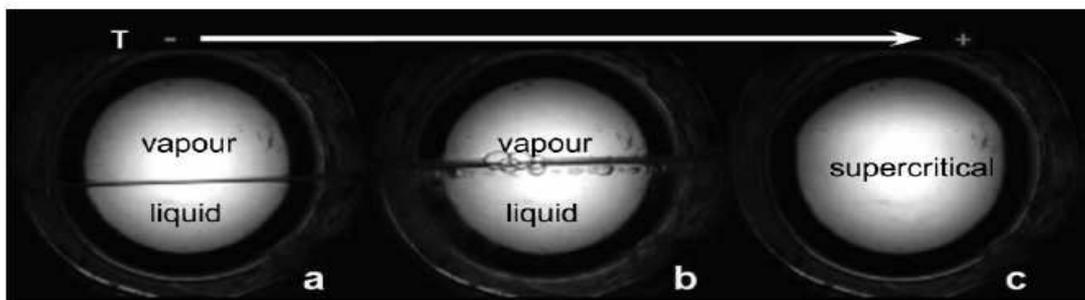


Figure I.30. Cellule d'observation permettant la visualisation du passage à l'état supercritique. a) Séparation entre la phase liquide et gazeuse. b) L'interface liquide gaz commence à entrer en transition suite à une élévation de la température. c) Les deux phases ne sont plus distinctes, l'état supercritique est atteint d'après Hobbs *et al.*, (2007).

Les propriétés de transport de fluides sensiblement supérieures à celles des liquides induisent alors une meilleure diffusion des molécules dans ce milieu.

5.4.2. Avantages d'utilisation

L'une des différences notables entre le CO₂ supercritique et des solvants organiques réside dans le fait que les fluides supercritiques peuvent être considérés comme des fluides à géométrie variable ; une simple variation de la pression modifie significativement leur masse volumique, leur capacité à dissoudre les produits et la vitesse de réaction enzymatique (Beckman 2004 ; Celia *et al.*, 2005 ; Yasmin *et al.*, 2006). Cette possibilité de modulation offre des perspectives intéressantes pour les réactions d'acylation. Aussi, d'autres avantages à utiliser le dioxyde de carbone dans sa phase supercritique en substitut aux solvants organiques habituellement utilisés pour l'acylation enzymatique de molécules diverses sont :

- l'absence de solvant résiduel,
- son inertie chimique,
- sa non-toxicité,
- sa propriété d'être inodore et insipide,
- sa non inflammabilité,
- sa haute pureté,
- son utilisation à basse température.

Le CO₂ supercritique est capable de solubiliser des composés apolaires de faible poids moléculaires et de maintenir les enzymes, essentiellement les lipases sous une conformation structurale leur garantissant une activité synthétique (Hobbs *et al.*, 2007).

5.4.3. Influence du CO₂ supercritique sur les réactions enzymatiques d'acylation.

Le plus évident des effets physiques de ce fluide supercritique réside dans ses propriétés de transport qui peuvent influencer la diffusion des substrats et donc les performances de la réaction. Remarquons que cet effet de diffusion a été mis en évidence lors de l'étude de l'acylation du 1-phényléthanol par la lipase de *Pseudomonas cepacia*. En effet, à partir de 10 MPa, pour une même température, l'activité enzymatique chute. Cette chute serait due à une augmentation de la masse volumique du milieu entraînant alors une augmentation

de sa viscosité et limitant ainsi la diffusion des substrats dans ce dernier ; d'autres travaux ont également souligné l'influence de la pression du milieu sur les performances de la synthèse par voie enzymatique (Dumont *et al.*, 1993 ; Kobata *et al.*, 2003 ; Celia *et al.*, 2005 ; Yasmin *et al.*, 2006). D'autres effets sont également associés à la nature des équilibres entre phases, en particulier la capacité des fluides à solubiliser les substrats (Hobbs *et al.*, 2007). D'autre part, la teneur en eau au niveau du biocatalyseur doit être suffisante mais pas trop importante afin de maintenir une activité de synthèse. Ainsi l'équilibre de partage de l'eau entre le support si l'enzyme est immobilisée et le fluide supercritique est à prendre en compte, comme suggéré dans certains travaux récents (Kobata *et al.*, 2003 ; Lozano *et al.*, 2004b ; Hobbs *et al.*, 2007 ; Lozano *et al.*, 2007). La mise en œuvre de réactions enzymatiques d'acylation dans le CO₂ a permis d'obtenir avec certains substrats, une acylation énantio- et régio- spécifique. Par exemple, l'augmentation de pression peut orienter très spécifiquement lors de l'estérification de sucres, catalysée par la lipase de *Candida rugosa*, la régio-sélectivité à hauteur de 100 % (Palocci *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'énantio-sélectivité de l'estérification d'un alcool primaire catalysée par la lipase CAL B immobilisée a été optimisée à près de 98 % par utilisation de CO₂ supercritique supplémenté en quantité faible de liquides ioniques qui pourraient s'organiser en couche protectrice autour de l'enzyme (Lozano *et al.*, 2006). Le tableau I.6. présente un récapitulatif de réactions enzymatiques d'acylation mises en œuvre en CO₂ supercritique depuis 2003. Il apparaît clairement que la N-acylation est jusqu'à présent peu traitée dans la littérature ainsi que l'acylation de substrats de type acide aminés libres et petits peptides dans ce milieu.

Tableau I.6. Réactions enzymatiques récemment réalisées en CO₂ supercritique.

Types de réactions	Substrats	Donneurs d'acyle	Enzymes	Remarques	Références
Trans-estérification	Ethylène glycol	Acétate d'éthyle	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CAL B) immobilisée	Augmentation du taux de conversion, sélectivité en faveur du monoacylé	Yasmin <i>et al.</i> , 2006
Estérification	1-phényl-1-éthanol	Acide propionique	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Système biphasique liquide ionique/ CO ₂ supercritique	Lozano <i>et al.</i> , 2003 ; Lozano <i>et al.</i> , 2006 ; Lozano <i>et al.</i> , 2007
Trans-estérification	Glycidol	Alkyles ester de vinyle	CAL B, CAL A et la lipase de <i>Mucor miehei</i>	Enantio-sélectivité en faveur de l'ester (R)	Lozano <i>et al.</i> , 2004a
Trans-estérification	Butan-1-ol	Butyrate de vinyle	CAL B	Mise en œuvre dans un réacteur à membrane	Lozano <i>et al.</i> , 2004b
Trans-estérification	1-phényl-1-éthanol	Acétate de vinyle	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Résolution d'énantiomère	Celia <i>et al.</i> , 2005
Transamidification	Capsaïcine	Tétradécanoate de méthyle	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Taux maximal de conversion à 19 MPa	Kobata <i>et al.</i> , 2003
Trans-estérification	6-O-trityl β-D-glucopyranoside	Acétate de vynile	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Réaction régio-sélective	Palocci <i>et al.</i> , 2008
Estérification	Citronellol	Acide laurique	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Système biphasique liquide ionique ou solvant organique/ CO ₂ supercritique	Habulin <i>et al.</i> , 2007

5.5. Les milieux biphasiques

Des travaux ont été développés concernant la combinaison de 2 milieux non-miscibles pour la mise en œuvre de réactions d'acylation enzymatique : ces systèmes sont appelés systèmes biphasiques. L'utilisation de systèmes biphasiques est de plus en plus répandue pour la mise en œuvre de réactions enzymatiques d'acylation (Gordon 2001).

Les avantages de ces systèmes pour les réactions enzymatiques d'acylation sont nombreux :

- une séparation facilitée des substrats, produits et biocatalyseurs,
- une minimisation des effets inhibiteurs des substrats ou des produits,
- un cumul des avantages spécifiques de chaque milieu constitutif.

Un premier type système biphasique souvent employé pour l'acylation enzymatique est le système biphasique aqueux constitué d'une phase majoritaire aqueuse dans laquelle est introduit un donneur d'acyle sous forme d'émulsion stabilisée. Ce genre de système s'avère très efficace pour la catalyse de liaison amide et ester par les acyltransférases (Vaysse *et al.*, 1997 ; Fournand *et al.*, 1998 ; Vaysse *et al.*, 2002). D'autres sont constitués d'un solvant organique tel que l'heptane dans lequel les substrats acide oléique et butanol sont solubilisés et d'une phase aqueuse telle qu'un tampon phosphate dans lequel le biocatalyseur est solubilisé. Par ce procédé, des auteurs sont parvenus à mettre en œuvre la synthèse d'esters catalysée par la lipase de *Rhizomucor miehei* et d'évaluer avec précision l'influence de différents paramètres (concentration, coefficient de partition, vitesse d'agitation) sur les performances de la réaction (Kraai *et al.*, 2008). Ce genre de système réactionnel est aussi été utilisé pour la synthèse d'ester de butyrate de butyle catalysée par la lipase de *Mucor miehei* (Borzeix *et al.*, 1992) ; ainsi que pour la synthèse d'oléate d'éthyle catalysé par la lipase de *Rhizopus niveus* et celle de *Mucor miehei* (Tweddell *et al.*, 1998). Une étude a montré que la régio-sélectivité de la lipase de *Pseudomonas cepacia* lors de l'acylation de la floxuridine en solvant organique était nettement améliorée par ajout de liquide ionique à hauteur de 5 % v/v (Li *et al.*, 2008). De récentes études ont mis en évidence l'intérêt de combiner au sein d'un même système du CO₂ supercritique avec soit un liquide ionique, soit un co-solvant organique. Citons l'exemple de l'estérification du citronellol par l'acide laurique catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* en CO₂ supercritique en présence de méthylketone d'éthyle conduisant à une concentration en produit synthétisé, au bout d'une heure, nettement supérieure aux valeurs décrites dans d'autres études en solvant organique (Habulin *et al.*, 2007). L'introduction de liquides ioniques dans des systèmes en CO₂ supercritique a démontré la capacité de ces milieux à protéger et à augmenter la stabilité des lipases lors de réaction d'acylation (Lozano *et al.*, 2004 ; Lozano *et al.*, 2006). Cependant, dans le cas des lipases immobilisées, il apparaît que la nature (porosité, nature chimique) du support est primordiale afin de permettre un transfert de masse intraparticulaire dans ce genre de milieu biphasique (Lozano *et al.*, 2007).

5.6. Influence du milieu sur la sélectivité de l'enzyme

La sélectivité des enzymes lors de l'acylation est un avantage considérable de la catalyse enzymatique ; c'est une de ses propriétés intrinsèques. Cependant, cette propriété varie en fonction de la nature du milieu réactionnel. En effet, dans de nombreux cas, des modifications

profondes de la sélectivité de l'enzyme ont été observées lors de la modification de milieu de réaction. Une des voies pour changer cette spécificité de substrat d'une enzyme est de remplacer l'eau par d'autres milieux réactionnels. A titre d'exemple, on constate que les spécificités de substrats pour la chymotrypsine et la subtilisine sont significativement modifiées en les plaçant dans des solvants organiques. La principale force pour une liaison enzyme-substrat, dans le cas de la chymotrypsine, est l'interaction hydrophobe entre la chaîne d'acides aminés du substrat et la poche catalytique de l'enzyme c'est pourquoi cette enzyme catalyse préférentiellement l'hydrolyse de la liaison peptidique de peptides hydrophobes en milieu aqueux. Ces interactions n'existant qu'en milieu aqueux, l'utilisation de cette enzyme en milieu organique oriente sa spécificité de substrats vers les substrats aminés hydrophile (Klibanov 2001). L'utilisation de solvants organiques est le moyen le plus facile de modifier la stéréosélectivité des enzymes (Zaks 1996). Cette propriété est largement illustrée dans la littérature par la résolution racémique d'énantiomères ou de diastéréoisomères. Notons que de nombreuses potentialités thérapeutiques de biomolécules sont liées à une chiralité spécifique.

La régio-sélectivité peut être influencée par le milieu réactionnel. Par exemple, la préférence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* pour l'un des groupes hydroxyles d'un sucre est fortement affectée par le solvant (Klibanov 2001). Cette spécificité est aussi souvent étudiée dans les travaux concernant l'acylation enzymatique de flavonoïdes. L'acylation enzymatique dans le 2-méthyl-2-butanol de l'esculine, catalysée par la lipase CAL B immobilisée, conduit spécifiquement à l'attachement covalent du groupe acyle sur l'hydroxyle en position 6 du glucoside constitutif de la molécule (Ardhaoui *et al.*, 2004).

Enfin, la chimio-sélectivité peut également être affectée par le milieu réactionnel. Pour de nombreuses lipases et protéases notamment, la préférence du site d'acylation d'un substrat est fortement dépendante du solvant (Klibanov 2001). Cette aptitude solvant dépendante a d'ailleurs été mise à profit pour la synthèse enzymatique de β -keto amides (Garcia *et al.*, 1993).

Il ressort que le choix du milieu réactionnel est primordial pour la mise en œuvre de procédé enzymatique d'acylation de molécules polyfonctionnelles telles que les peptides.

6. Aspects cinétiques des réactions d'acylation.

L'activité d'une enzyme est sous l'influence d'une diversité de paramètres : sa concentration, celle en substrat, l'effet potentiel inhibiteur de certains produits et/ou substrats, sa dénaturation due à la température de réaction et la diffusion des molécules dans le milieu réactionnel. L'étude des cinétiques réactionnelles a pour objet d'étudier ces paramètres susceptibles d'affecter l'activité enzymatique afin d'établir un modèle mathématique descripteur et prédictif de la réaction enzymatique et trouver les conditions optimales du procédé. Les réactions enzymatiques d'acylation sont toujours des réactions à deux substrats. Le schéma réactionnel classique est présenté sur la figure I.31. A et B correspondent respectivement au composé mono/poly fonctionnel à acyler et au donneur d'acyle. P et Q correspondent au dérivé acylé synthétisé et à une molécule d'eau si le donneur d'acyle est un acide gras libre ou un alcool dans le cas d'un ester.

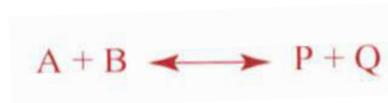


Figure I.31. Schéma réactionnel simplifié d'une réaction à deux substrats

Ces réactions enzymatiques qui mettent en jeu plusieurs substrats peuvent se dérouler suivant des chemins réactionnels très différents. Les cinétiques diffèrent alors et leur analyse permet d'obtenir des informations sur le schéma réactionnel. Dans les schémas réactionnels présentés par la suite, les deux substrats seront notés A et B et les deux produits C et D. Il convient aussi de distinguer les schémas linéaires et les schémas branchés. D'après la représentation de Cleland (1963), les états de l'enzyme sont figurés par une droite horizontale, les substrats et les produits par des flèches verticales.

6.1. Les mécanismes réactionnels

6.1.1. Mécanisme bi bi ordonné

Les substrats s'associent à l'enzyme selon un ordre défini pour former un complexe ternaire et les produits sont libérés selon un ordre séquentiel (figure I.32.).



Figure I.32. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi ordonné.

Ce modèle réactionnel a été utilisé pour l'établissement de modèle cinétique au cours de réactions d'estérification directe d'alcool primaire à partir d'acide gras libre en solvant organique et en système sans-solvant catalysée par des lipases (Garcia *et al.*, 1996 ; Garcia *et al.*, 1999a ; Garcia *et al.*, 1999b ; Garcia *et al.*, 1999c). Les modèles établis estiment alors les valeurs expérimentales avec une erreur du modèle par rapport à l'expérience de l'ordre de 15 % (figure I.33.)

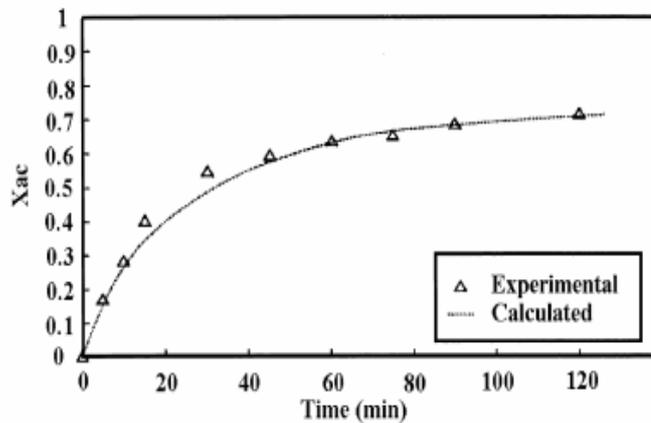


Figure I.33. Simulation de l'estérification du palmitate d'isopropyle catalysée par Novozym 435® en système sans solvant à 70 °C et à 10⁵ Pa d'après Garcia *et al.*, (1999).

Ce schéma enzymatique apparaît aussi adéquat pour la modélisation de procédé enzymatique de trans-estérification en solvant organique comme l'illustre le modèle décrivant la trans-estérification du n-octanol catalysé par Novozym 435® en solvant organique (Yadav *et al.*, 2003).

6.1.2. Mécanisme bi bi iso ordonné.

Il s'agit du même mécanisme que précédemment, mais au cours de la réaction l'enzyme subit une isomérisation ; dans une étape finale, elle reprend sa conformation initiale active (figure I.34.). Remarquons que dans ces deux types de mécanismes le complexe ternaire est le complexe réactif.

Ce genre de modèle de réactions enzymatiques à deux substrats a été utilisé pour l'établissement de modèles cinétiques de réactions enzymatiques de trans-estérification (Yadav *et al.*, 2003).

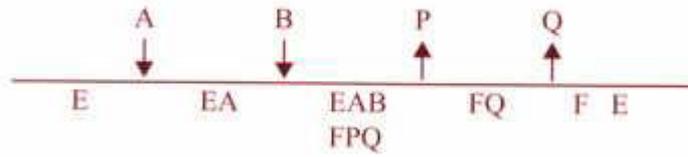


Figure I.34. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi bi iso ordonné.

6.1.3. Mécanisme bi bi ping-pong

Dans ce mécanisme, l'enzyme oscille entre deux états : l'enzyme libre et l'acyl-enzyme caractérisé par la formation d'une liaison covalente entre le donneur d'acyle et l'acide aminé catalytique (figure I.35.).

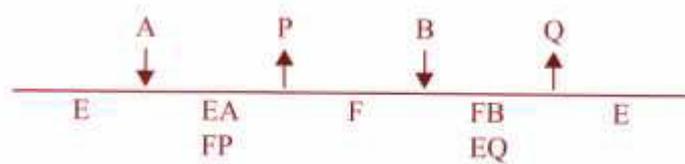


Figure I.35. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi bi ping-pong.

Ce mécanisme est le plus couramment utilisé pour la modélisation des cinétiques d'acylation catalysée par des lipases en solvants organiques. Ce modèle est apparu performant pour modéliser par exemple les cinétiques de synthèse de butyrate de tétrahydrofuryle catalysé par des lipases immobilisées en solvants organiques (Yadav *et al.*, 2004). Les cinétiques d'acylation d'alcool primaire par un anhydride acétique catalysée par Novozym 435[®] dans l'hexane présentaient aussi des vitesses de réactions prédictibles par un modèle de ce type avec un écart du modèle par rapport à l'expérience présenté dans la figure I.36. (Romero *et al.*, 2007).

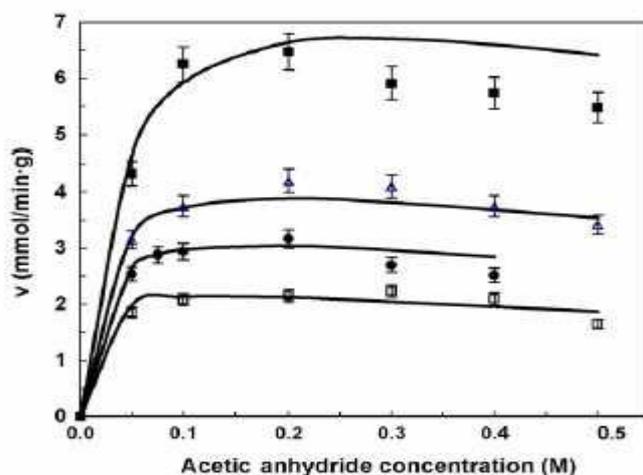


Figure I.36. Comparaison entre les vitesses calculées par modélisation et les vitesses expérimentales de la réaction d'acylation d'alcool primaire par un anhydride acétique catalysée par Novozym 435® dans l'hexane pour des concentrations en alcool de 0,05 M (□), 0,075M (●), 0,1 M (▲) et 0,2 M(■) d'après Romero et al., (2007).

6.1.4. Mécanisme Theorell-Chance

Ce mécanisme a été proposé par Chance et Theorell (1951) pour rendre compte des cinétiques de réactions catalysées par des enzymes de type alcool déshydrogénase (figure I.37.). Le substrat B en se fixant libère le premier produit de la réaction et le transforme :

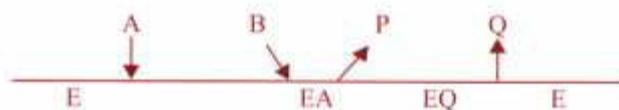


Figure I.37. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme Theorell-Chance.

Cependant dans la littérature, aucun modèle cinétique caractéristique de réactions d'acylation biocatalysées n'utilise ce schéma linéaire. A cet ensemble de schémas enzymatiques linéaires, une exception peut être ajoutée à titre indicatif : un schéma branché dit mécanisme bi bi au hasard (figure I.38.) Dans ce schéma, les deux substrats peuvent indifféremment se fixer à l'enzyme ; le complexe réactif est le complexe ternaire EAB.



Figure I.38. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi bi aléatoire.

6.2. Exemples de modèles enzymatiques utilisés pour la modélisation

Le tableau I.7. présente une revue synthétique de quelques travaux de modélisation des cinétiques d'acylation réalisées depuis ces 10 dernières années.

Tableau I.7. Exemples d'étude de modélisation des cinétiques enzymatiques d'acylation utilisant des mécanismes enzymatiques.

Réactions	Milieux Réactionnels	Catalyseurs	Modèles	Références
Estérification	Hexane	Lipase de <i>Mucor miehei</i> immobilisée	Bi Bi Ping-Pong	W. Chulalaksananukul 1990
Amidification	2-méthyl-2-butanol	Lipase de <i>Candida antarctica</i>	Bi Bi ordonnée	Maugard <i>et al.</i> , 1998
Estérification	Milieu fondu	Lipase de <i>Mucor miehi</i> immobilisée	Bi uni ordonnée	Garcia <i>et al.</i> , 2000
Estérification	Différents Solvants organiques	Différentes Lipases	Bi Bi Ping-Pong	Arcos <i>et al.</i> , 2001
Estérification	hexane	Lipase pancréatique de porc	2 ^{ème} ordre réversible	Peter <i>et al.</i> , 2002
Trans-estérification	Milieu fondu	Lipase de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Bi Bi iso-ordonnée	Yadav <i>et al.</i> , 2003
Estérification/Trans-estérification	Heptane	Lipase de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Bi bi ping-pong	Yadav <i>et al.</i> , 2004
Estérification/Trans-estérification	Diiso propyléther	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Bi bi ping-pong	Dabkowska <i>et al.</i> , 2007
Trans-estérification	hexane	Lipase de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Bi bi ping-pong	Romero <i>et al.</i> , 2007
Estérification	Milieu fondu	Lipase de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Bi bi ping-pong	Pilarek <i>et al.</i> , 2007
Trans-estérification	CO ₂ supercritique	Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Bi bi ping-pong	Palocci <i>et al.</i> , 2008
Estérification	Milieu fondu Système hétérogène	Lipase de <i>Candida antarctica</i> immobilisée	Bi bi ping-pong	Foresti <i>et al.</i> , 2008

D'après la littérature, le principal mécanisme enzymatique utilisé pour un établir un modèle descriptif d'un procédé d'acylation catalysé par une lipase est le modèle bi bi ping-pong caractérisé par la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme. Le choix du milieu réactionnel ne semble pas perturber l'adéquation entre ce mécanisme et les cinétiques obtenues. Cependant, il est très rare que seules les traductions mathématiques de ce mécanisme enzymatique suffisent à établir un modèle satisfaisant, d'autres paramètres supplémentaires sont généralement pris en compte.

6.3. Méthodologie d'établissement d'un modèle cinétique

6.3.1. Choix du modèle enzymatique

Le choix du modèle enzymatique peut s'appuyer sur une étude expérimentale d'influence du rapport molaire entre les substrats, sur les vitesses initiales de synthèse du produit. Par exemple, lorsque que sur une représentation selon Lineweaver et Burck, les droites semblent parallèles pour des concentrations en substrats élevées et semblent être sécantes en un point ($1/V_{max}$) pour des concentrations plus faibles, cela suggèrent un mécanisme enzymatique de type bi bi ping-pong. Une étude concernant l'acylation enzymatique de glycérol en solvant organique a utilisé cette représentation (figure I.39.) pour en déduire que le mécanisme enzymatique à utiliser pour modéliser ce procédé de synthèse était un modèle bi bi ping-pong. (Hazarika *et al.*, 2004)

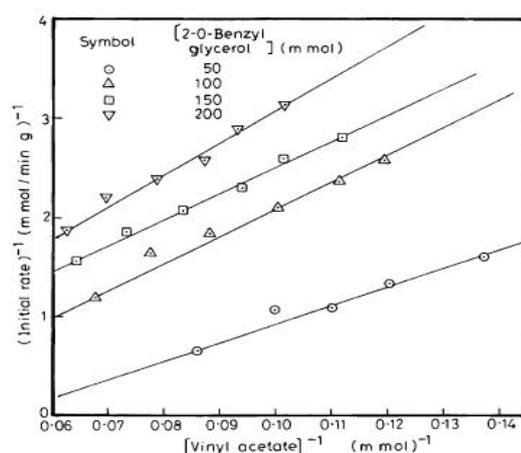


Figure I.39. Représentation en double inverse des vitesses initiales de synthèse d'ester en fonction de la concentration en donneur d'acyle lors de la réaction de trans-estérification du benzylglycérol dans le dichlorométhane catalysée par la lipase de *Pseudomonas cepacia* d'après Hazarika *et al.*, (2004).

6.3.2. Inhibition par les substrats et/ou les produits

De nombreuses études concernant l'établissement de modèles cinétiques descripteurs de réaction enzymatique d'acylation en solvant organique mettent en évidence des phénomènes d'inhibition à prendre en compte dans le modèle cinétique. Citons par exemple le cas de la trans-estérification du n-octanol par le vinyl-acétate catalysée par Novozym 435[®] en solvant organique, qui présentait une inhibition par le substrat n-octanol due à la formation

d'un complexe inactif entre l'enzyme et ce dernier. Le schéma réactionnel utilisé pour la modélisation des cinétiques est présenté dans la figure I.40.

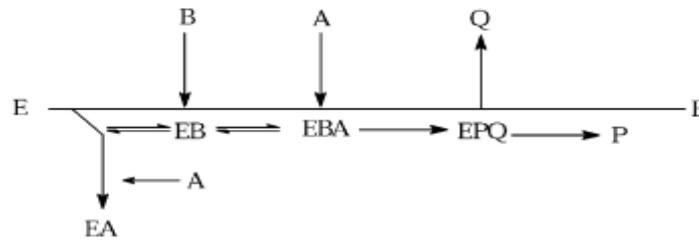


Figure I.40. Mécanisme réactionnel bi-bi iso ordonné utilisé pour la modélisation des cinétiques de transestérification du n-octanol (A) par l'acétate de vinyle (B) en milieu fondu catalysé par Novozym 435® (E) avec une inhibition par le n-octanol conduisant à la formation d'un complexe inactif (EA). EPQ correspond à l'isomère de EBA.

Une autre étude concernant l'acylation d'un époxyde par l'acide chlorobutyrique catalysée par la lipase libre de *Rhizomucor miehei* a suggéré une double inhibition compétitive par le substrat et le donneur d'acyle. L'utilisation d'un mécanisme combinant ces deux types d'inhibition a permis une minimisation satisfaisante de l'écart entre le modèle et l'expérience (Garcia *et al.*, 2000). Un même modèle a été récemment développé pour l'estérification de l'acide oléique par le n-butanol en milieu fondu (Kraai *et al.*, 2008). Remarquons que la plupart des modèles cinétiques utilisant un modèle bi bi ping-pong avec inhibition suggère une inhibition par le donneur d'acyle due à un éventuel mauvais positionnement de ce composé dans le site actif de l'enzyme (Romero *et al.*, 2007). Il apparaît que ce phénomène est aussi valable pour certaines estérifications en CO₂ supercritique (Palocci *et al.*, 2008). Ainsi, en cas de modèle bi bi ping-pong couplé à une inhibition par le substrat, comme dans le cas de la synthèse enzymatique d'acétate d'isoamyle à partir d'anhydride acétique (substrat inhibiteur) et d'isoamylalcool, l'établissement d'un modèle aboutit à une équation de vitesse de production du produit (v) de ce type :

$$v = \frac{V_{\max}[A][B]}{K_{mB}[A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{iA}}\right) + K_{mA}[B] + [A][B]}$$

où A et B correspondent aux deux substrats et K_{iA} correspond à la constante d'inhibition de l'anhydride (Romero *et al.*, 2007).

6.3.3. Influence de la température

Au cours d'un procédé enzymatique d'acylation, le biocatalyseur est soumis à une température susceptible d'affecter sa stabilité. Ainsi, il est important qu'en cas de perte de stabilité enzymatique au cours de la réaction, le modèle cinétique établi, tienne compte de cette évolution. Une étude a consisté à étudier la stabilité thermique de la lipase B de *Candida antarctica* libre et immobilisée sur différents supports au cours d'une incubation en milieu aqueux à 50 °C (Arroyo *et al.*, 1999). La figure I.41. représente cette perte d'activité au cours du temps.

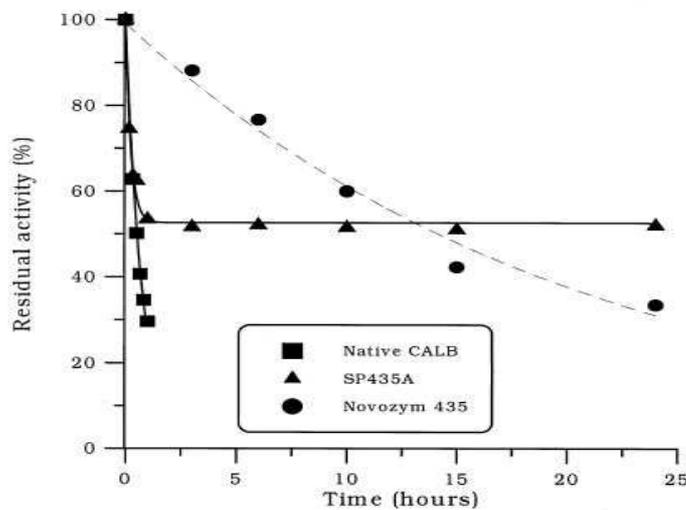


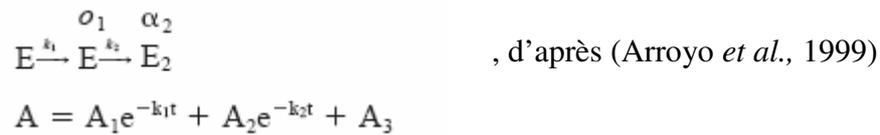
Figure I.41. Représentation de la perte d'activité hydrolytique au cours du temps de différents biocatalyseurs lors d'une incubation à 50 °C en milieu aqueux d'après Arroyo *et al.*, (1999).

Ce phénomène de perte d'activité étant non-négligeable (Figure I.41), il apparaît important de l'exprimer dans un modèle cinétique de réactions enzymatiques d'acylation en solvant organiques. Afin de décrire une cinétique de synthèse d'ester catalysée par différentes lipases commerciales, des études ont consistées à introduire dans le modèle l'évolution temporelle de l'activité enzymatique avec l'expression suivante :

$$a(t) = a_0 \exp[-k_d(t - t_0)]$$

où $a(t)$ représente l'activité enzymatique à un instant t , a_0 l'activité initiale, k_d la constante de vitesse de désactivation de premier ordre (Xiong *et al.*, 2008 ; Torres *et al.*, 2007 ; Truppo *et al.*, 2008).

D'autres modèles peuvent être utilisés pour caractériser la dénaturation thermique de l'enzyme. Citons le cas d'une dénaturation séquencée utilisée pour caractériser la perte d'activité de Novozym 435[®] décrit de la façon suivante :



6.3.4. Limitation par le transfert de masse et diffusion intraparticulaire

Dans le cas de procédés enzymatiques sous agitation utilisant un biocatalyseur immobilisé sur un support, le système devient alors un système réactionnel de type solide/liquide. Certaines études de modélisation des cinétiques d'acylation ont étudié la limitation par le transfert de masse de façon à se placer dans des conditions d'agitations pour lesquelles la résistance au transfert de masse est négligeable. Quand la résistance de masse externe est négligeable par rapport à la vitesse de réaction superficielle, la diffusion intraparticulaire devient le mécanisme prépondérant qui contrôle la réaction (Perry 1984 ; Yadav *et al.*, 2002 ; Yadav *et al.*, 2004). L'influence de la diffusion interne sur la vitesse de réaction peut être étudiée expérimentalement grâce à une représentation de la conversion du substrat en fonction du temps pour différents diamètres de particule de catalyseur. Souvent, afin de simplifier le modèle, l'activité enzymatique est considérée constante en fonction de la taille de la particule ou de ses pores. Ce genre d'approximation a été réalisé dans plusieurs études d'établissement de modèle cinétiques de réactions d'acylation et a conduit à l'élaboration d'un modèle avec un écart modèle expérience représenté par exemple dans la figure I.42. (Yadav *et al.*, 2003 ; Hazarika *et al.*, 2004 ; Yadav *et al.*, 2004).

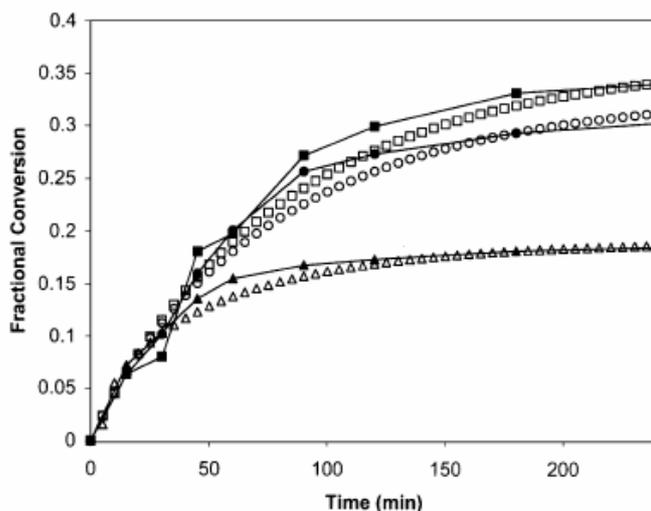


Figure I.42. Comparaison des cinétiques modélisées et expérimentales obtenues pour la trans-acylation de l'alcool tetrahydrofuryle par le butyrate d'éthyle catalysée par Novozym 435[®] dans l'heptane pour 3 rapport molaire différents à une vitesse d'agitation optimale et en considérant une taille des particules de support constantes. Les lignes représentent les courbes expérimentales et les symboles représentent les courbes simulées d'après Yadav *et al.*, (2004).

II. Matériel et méthodes

1. Descriptif des biocatalyseurs utilisés

Novozym 435[®] est une préparation industrielle produite par Novozyme Corporation et commercialisée par Sigma, résultant de l'immobilisation de la lipase B de *Candida antarctica* sur une résine acrylique macroporeuse. Cette préparation se présente sous forme de granules blanches de diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm. Elle est fournie avec une activité de 7000 PLU.g⁻¹ (Propyl Laurate Synthesis) où une unité PLU est définie comme la quantité d'enzyme qui permet la transformation d'1 µmol d'acide laurique en laurate de propyle par minute en conditions standards et équimolaires. Sa teneur en eau est de 1 à 2 % (p/p) et sa teneur en protéine enzymatique est comprise entre 1 et 10 %.

Lipozyme[®] est une préparation produite par Biochemika et commercialisée par Fluka, résultant de l'immobilisation de la lipase de *Mucor miehei* sur une résine macroporeuse échangeuse d'anions. Cette préparation se présente sous forme de granules brunes de diamètre compris 0,2 et 0,6 mm ; elle est fournie avec une activité supérieure de 42 U/g (1 unité correspond à la quantité d'enzyme qui permet la libération d'1 µmol d'acide oléique par minute à pH 8,0 à 40 °C lors de l'hydrolyse de la trioléine).

La lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur des particules de céramique est produite par Biochemika et commercialisée par Fluka. Elle se présente sous forme de petites granules beiges et est fournie avec une activité de 15 000 U/g (1 unité correspond à la quantité d'enzyme qui permet la libération d'1 µmol d'acide oléique par minute à pH 8,0 à 40 °C lors de l'hydrolyse de la trioléine).

L'acylase I d'*Aspergillus immobilisée* sur résine acrylique de type Eupergit C est produite par Biochemika et commercialisée par Fluka. Elle se présente sous forme de granules brunes de taille comprise entre 50 et 100 µm et est fournie avec une activité supérieure à 50 U/g (1 unité correspond à la quantité d'enzyme qui permet l'hydrolyse d'1 µmol de N-acétyl-L-méthionine par minute à pH 8,0 à 25 °C).

L'acyl-transférase de *Candida parapsilosis* est une enzyme produite, purifiée et fournie par l'UMR IATE de Montpellier. Elle est fournie soit en solution dans du tampon phosphate 50 mM, pH 6,5 avec une activité de 1290 U/mL soit sous forme lyophilisée avec une activité de 11 U/mg (1 unité représente la quantité d'enzyme qui permet la libération d'une µmole d'acide gras libre en 1 minute lors de l'hydrolyse de la trioléine à pH 6,5 à 45 °C).

2. Réactifs utilisés

Le Tableau II.1 ci-dessous donne un descriptif exhaustif de l'ensemble des produits chimiques utilisés pour cette étude.

Tableau II.1. Descriptif des réactifs utilisés pour cette étude.

Produits	Pureté (%)	Fournisseur	
Substrats à acyler			
6-amino-1-hexanol (M = 117,19 g.mol ⁻¹)	97	Sigma-Aldrich	
Lys-Ser, HCl (M = 269,73 g.mol ⁻¹)	99	Bachem	
Ser-Leu (M = 218,3 g.mol ⁻¹)	99	Bachem	
β-Ala-His (M = 226,2 g.mol ⁻¹)	98	Sigma-Aldrich	
Agents acylants			
Acide oléique (M = 282,47 g.mol ⁻¹)	99	Sigma-Aldrich	
Oléate d'éthyle (M = 310,53 g.mol ⁻¹)	98	Sigma-Aldrich	
Milieus réactionnels			
2-Méthyl-2-butanol	CLHP	Carlo Erba	
Hexane	CLHP	Carlo Erba	
Phosphate disodique et monosodique	98	Fluka	
Polyvinylalcool	98	Merck	
1-Butyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate	99	Solvionic/Solvent innovation	
1-Butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate	98	Solvionic	
1-Butyl-3-méthylimidazolium dicyanamide	98	Solvionic	
1-Ethyl-3-méthylimidazolium éthylsulfate	98	Solvent innovation	
Cocosalkyl pentaéthoxy-méthyle ammonium méthosulfate	98	Solvent innovation	
1-Octyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate	95	Merck	
Solvants organiques			
Méthanol	Qualité CLHP	Carlo Erba	
Acide acétique			
Chloroforme			
Butanol			
Acide trifluoroacétique			
Triéthylamine			
Autres			
Ninhydrine	Solution éthanolique 0,1 %	Fluka	
Permanganate de potassium		Merck	
Iode		Merck	
Eau osmosée		Milli pore milli-RO	
Acide chlorhydrique		Prolabo	
Soude		Merck	
Xanthine		99	Sigma Aldrich
Xanthine oxydase			
Hydroxylamine			
Acide sulfinimique			
Acide éthylène diaminotétracarboxylique		99	Sigma Aldrich
2,2-Diphényl-1-picryl-hydrazyl			
N-1-Naphtyl-éthylène diamine dihydrochloride			

3. Détermination des propriétés physicochimiques des substrats et de leurs dérivés

3.1. Détermination de la solubilité des substrats dans les différents milieux réactionnels

La solubilité des substrats dans les différents milieux réactionnels est déterminée de la façon suivante :

3 mL de milieu réactionnel placés dans les conditions d'agitation et de température requises pour la synthèse enzymatique sont amenés à saturation par introduction du substrat en excès. Après une incubation de 12 h, le surnageant est récupéré, filtré puis analysé par CLHP, après dilution dans la phase mobile. Dans le cas de liquides ioniques non-miscibles avec la phase mobile, une extraction préalable à l'hexane ou à l'eau est nécessaire. De façon à corriger la valeur de solubilité déterminée, les rendements d'extraction des substrats dans les différents systèmes de solvant employés ont été déterminés.

3.2. Détermination des rendements d'extraction des substrats et produits.

L'emploi des liquides ioniques impose souvent la mise en œuvre de procédures d'extraction pour la récupération des produits synthétisés et l'analyse quantitative des milieux réactionnels par CLHP. Afin que la quantification des différentes espèces présentes dans ces liquides ioniques soient la plus précise possible, toutes les étapes d'extraction ont été complétées par la détermination de rendements d'extraction dans les systèmes biphasiques liquide ionique/hexane ou liquide ionique/eau en fonction des propriétés de miscibilité du liquide ionique considéré. La procédure suivie est la suivante : une quantité connue de produit est introduite dans le liquide ionique, puis après solubilisation complète, une extraction (5 v/v) est réalisée avec un solvant non-miscible à ce liquide ionique (hexane ou eau). La phase solvant est ensuite récupérée puis analysée par CLHP. Le coefficient de partition correspond au rapport entre la concentration déterminée par CLHP dans le solvant d'extraction et la concentration initiale introduite dans le liquide ionique.

4. Mise en œuvre des réactions enzymatiques d'acylation

Cette étude a nécessité l'utilisation de différents réacteurs dont les caractéristiques sont présentées ci-dessous.

4.1. Réacteurs de synthèse enzymatique en milieux organiques et liquides ioniques

La mise en œuvre des réactions d'acylation enzymatiques a nécessité l'utilisation de deux types de réacteurs : réacteur Wheaton[®] d'une capacité de 50 mL et réacteur Syncore[®] de synthèse en parallèle (figure II.1.).

Le réacteur Wheaton[®] est utilisé pour les réactions de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol et d'acylation directe du dipeptide β -Ala-His. Il est équipé d'un barreau aimanté suspendu qui évite l'érosion des billes d'enzyme au cours des synthèses. Il est chauffé par une plaque chauffante thermorégulée (IKA) dans la plupart des cas à 55 °C, par l'intermédiaire d'un bain d'huile thermostaté. Afin de limiter l'évaporation du solvant au cours des synthèses, le haut du réacteur est équipé d'un dispositif de refroidissement. Pour toutes les synthèses mises en œuvre, le volume réactionnel était soit de 10 mL soit de 20 mL.

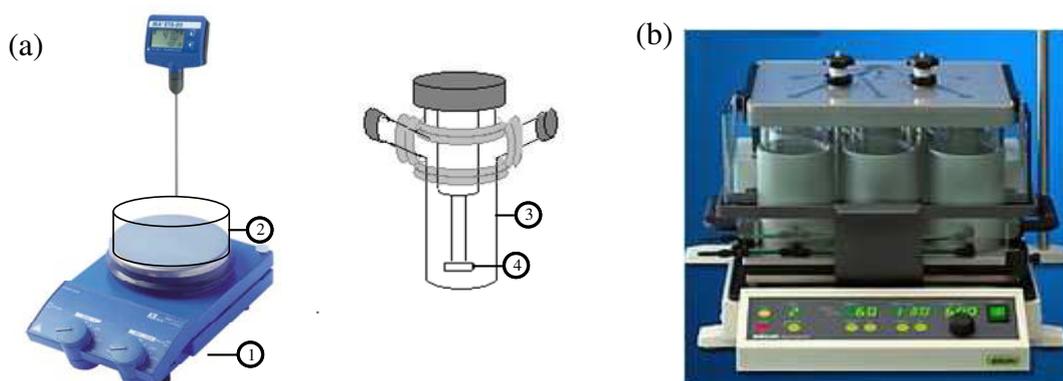


Figure II.1. (a) Schéma du réacteur Wheaton[®] utilisé pour la mise en œuvre des réactions d'acylation, (1. Plaque chauffante et d'agitation thermorégulée. 2. Bain d'huile. 3. Réacteur. 4. Barreau aimanté suspendu. (b) Station de synthèse Syncore Reactor[®] (Büchi).

Les réacteurs de synthèse en parallèle font partie d'une station Syncore[®] Reactor (Büchi). Ce matériel est particulièrement adapté pour l'étude efficace de l'influence de paramètres

réactionnels et le screening d'enzymes. Il est constitué d'une plate forme thermostatée mobile, supportant jusqu'à 24 microréacteurs d'une capacité de 30 mL et animée par agitation planaire hélicoïdale modulable. Toutes les réactions menées dans ces réacteurs ont été conduites à 55 °C sous une agitation de 250 rpm. La partie supérieure de ces microréacteurs est aussi équipée d'un système de refroidissement.

4.2. Réacteurs de synthèse enzymatique en CO₂ supercritique

L'acylation enzymatique directe du 6-amino-1-hexanol a été mise en œuvre en CO₂ supercritique. Pour cette réaction, les substrats sont toujours introduits dans le réacteur avant le CO₂. Dans un premier temps, la faisabilité de la réaction a été étudiée dans un réacteur fermé thermostaté (55 °C) à volume modulable, relié à une arrivée de CO₂ en phase liquide (4 °C). L'agitation du milieu réactionnel se fait par l'intermédiaire d'un barreau aimanté. Une partie du réacteur est constituée d'un saphire permettant la visualisation des changements de phase du milieu réactionnel lors de la montée en pression *via* une caméra reliée à un moniteur. Ce réacteur ne permet pas de réaliser de prélèvement en cours de synthèse et la pression à l'intérieur de la cellule est dépendante de la température et du volume imposé. Il est surtout utilisé pour des approches qualitatives et des essais de faisabilité (figure II.2.).

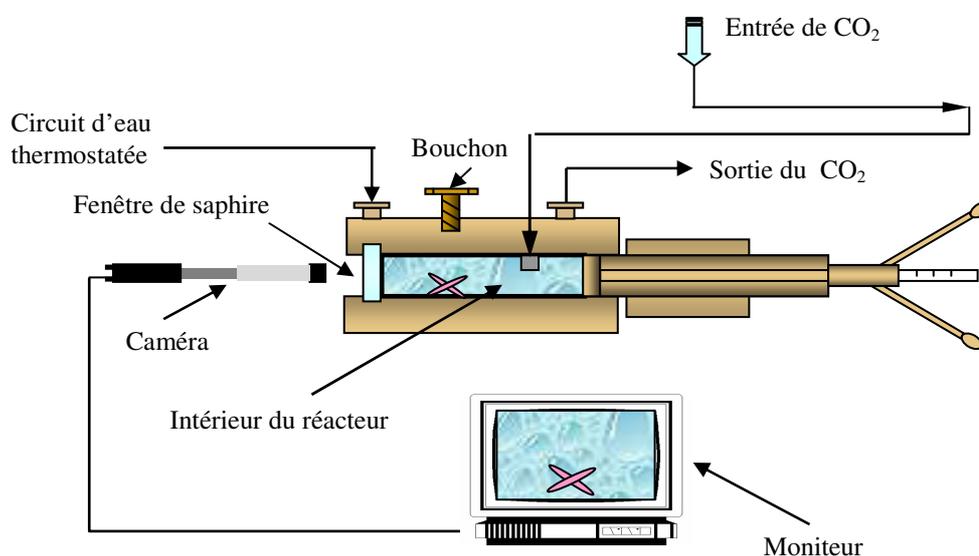


Figure II.2. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de faisabilité d'une réaction d'acylation enzymatique en CO₂ supercritique et la visualisation du comportement des réactifs en fluide supercritique.

Le second dispositif utilisé pour la mise en œuvre de cette réaction en fluide supercritique est représenté sur la figure II.3. Il est constitué d'un réacteur de volume 100 mL à double

enveloppe thermostaté (55 °C), équipé d'un système d'agitation mécanique (1350 tr.min⁻¹). Le remplissage du réacteur en CO₂ est permis par le montage en série d'un module de compression comprenant la bouteille de CO₂, d'un bain refroidissant (4°C), d'une pompe puis d'un bain chauffant à la température de réaction. Une fois le réacteur rempli, une pompe permet la montée en pression ainsi que le maintien de cette pression tout au long de l'expérience (2.10⁷ Pa). Dans le cas de milieux homogènes, une boucle de prélèvement permet de prélever des échantillons en cours de synthèse. Dans notre cas, l'utilisation de ce dispositif n'a pas permis la réalisation de prélèvements homogènes en cours de synthèse. Le suivi quantitatif a donc été réalisé en batch, en stoppant la réaction à différents temps et en analysant la totalité du milieu réactionnel.

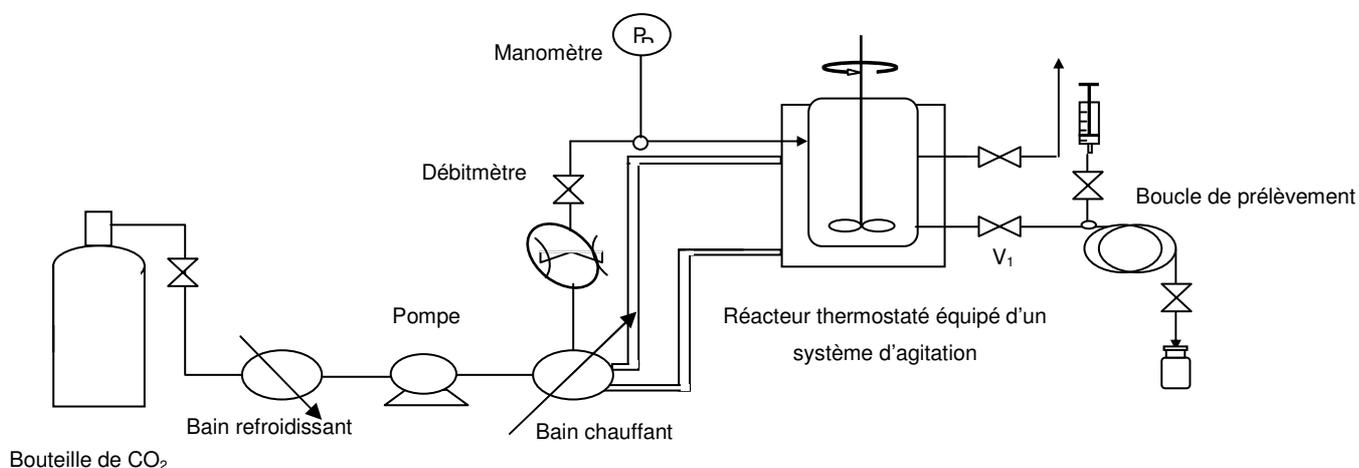


Figure II.3. Schéma du réacteur discontinu utilisé pour la mise en œuvre d'une réaction d'acylation en CO₂ supercritique l'établissement d'un suivi cinétique.

5. Procédure expérimentale de synthèse

La détermination des concentrations des substrats à utiliser a été réalisée au cours d'une étude préliminaire de l'influence du rapport molaire accepteur d'acyle / donneur d'acyle lors de l'acylation du 6-amino-1-hexanol.

5.1. Introduction des réactifs

Pour toutes les réactions d'acylation mises en œuvre, les réactifs sont toujours introduits selon le même ordre. Les substrats à acyler (6-amino-1-hexanol, Lys-Ser, HCl, Ser-Leu et carnosine) se présentant sous forme solide sont introduits en premier dans le réacteur. Puis le milieu réactionnel utilisé est ajouté, suivi de l'agent acylant (acide oléique, oléate d'éthyle). Pour les réactions en CO₂ supercritique, le dispositif expérimental impose un ordre d'introduction différent des réactifs et du biocatalyseur : les deux substrats, l'enzyme puis le milieu réactionnel. Certaines réactions ont nécessité l'ajout d'un composé supplémentaire. Dans ce cas celui-ci est ajouté en dernier. En effet, les réactions mises en œuvre dans l'hexane ont nécessité l'introduction d'un étalon interne (2,6-diméthylphénol) inerte vis-à-vis des réactifs et du biocatalyseur, pour quantifier l'évaporation du solvant en cours de synthèse. L'acylation enzymatique de la Lys-Ser, HCl, quant à elle, a requis l'introduction dans le milieu d'une base organique de type amine tertiaire : la triéthylamine comme suggérée dans une étude antérieure (Reyes-Duarte *et al.*, 2002). Une fois le milieu réactionnel constitué, celui-ci est mis sous agitation à la température réactionnelle choisie, pendant 12 h, de façon à solubiliser les substrats. La réaction est commencée par l'ajout du biocatalyseur dans le milieu à des concentrations de 10 g/L ou 20 g/L dans la plupart des réactions.

5.2. Indications supplémentaires

Selon les propriétés physicochimiques du milieu réactionnel utilisé, le suivi de la réaction est réalisé soit par des prélèvements directs dans le milieu en cours de synthèse (c'est la cas pour les réaction mises en œuvre dans le 2-méthyl-2-butanol, l'hexane et les milieux fondus), soit par la mise en œuvre de réactions en parallèle stoppées à différents temps réactionnels (c'est la cas pour les réactions mises en œuvre en liquides ioniques, leur viscosité rendant les prélèvements homogènes difficiles). Tous les liquides utilisés au cours des réactions, sont conservés soit dans un dessiccateur (liquides ioniques) soit sur tamis moléculaire (solvants organiques) afin de maintenir une a_w initiale en début de réaction inférieure à 0,1. De nombreux travaux ont en effet montré l'importance d'une faible a_w des milieux de synthèse pour l'optimisation de procédés d'acylation catalysés par le Novozym 435[®] (Wehtje *et al.*, 1997a ; Wehtje *et al.*, 1997b ; Humeau *et al.*, 1998a ; Humeau *et al.*, 1998b ; Chamouleau *et al.*, 2001 ; Ardhaoui *et al.*, 2004). Avant toute réaction, l' a_w du milieu réactionnel est mesurée à l'aide du thermoconstateur Novasina.

5.3. Mise en œuvre en système biphasique aqueux

L'acylation de la carnosine par l'acide oléique ou l'oléate d'éthyle en milieu biphasique lipide-aqueux est catalysée par l'acyltransférase de *Candida parapsilosis*. Cette enzyme a été principalement utilisée pour la mise en œuvre de réaction d'estérification d'alcools primaire et d'amidification d'hydroxylamines (Vaysse *et al.*, 1997 ; Fournand *et al.*, 1998 ; Vaysse *et al.*, 2002). Dans un premier temps, une solution de carnosine en tampon phosphate (100 mM pH = 6,8) est préparée (solution A). En parallèle, une émulsion d'agent acylant est préparée dans une solution aqueuse de polyvinylalcool (2% w/v) par ultrasons. Le polyvinylalcool est utilisé comme agent stabilisateur de microémulsions. Dans un second temps, la solution A est ajoutée à la solution B dans un réacteur Wheaton® à 45 °C sous agitation (640 rpm) pendant 12 h. Après 12 h d'incubation le milieu réactionnel est toujours homogène et l'émulsion est toujours stabilisée. A la vue de la vitesse d'agitation imposée et de la taille du réacteur, le système réactionnel est considéré comme homogène. La réaction débute à l'ajout excédentaire de 100 mg d'acyl-transférase de *C. parapsilosis* lyophilisée à 11 U/mg préalablement solubilisée dans 1 mL de tampon phosphate. La concentration en carnosine dans le milieu réactionnel final est de 0,12 M et celle en agent acylant de 0,24 M. La réaction est alors menée jusqu'à l'équilibre thermodynamique (120 h). Des prélèvements réactionnels sont réalisés directement dans le réacteur sans stopper l'agitation afin de garantir l'homogénéité de l'échantillon prélevé. Seule la carnosine est quantifiée au cours de la réaction, étant le seul substrat dont la solubilité est totale dans ce milieu. Chaque prélèvement réactionnel est placé dans la glace le temps d'être dilué dans un mélange acide méthanol/eau/TFA (80/20/0.1 v/v/v) stoppant l'activité de l'enzyme et enfin filtré avant l'analyse CLHP.

6. Méthodes d'analyses des milieux de synthèse

6.1. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince

Toutes les réactions mises en œuvre dans cette étude ont tout d'abord été analysées qualitativement par chromatographie sur couche mince.

Les plaques de silice utilisées sont de dimensions 20 x 20 cm (Silica gel 60, Merck). Des dépôts de 10 µL de prélèvements réactionnels sont effectués.

Deux types d'éluant sont utilisés :

- éluant A : butanol (60 %) eau (20 %) acide acétique (20 %) pour séparer les substrats polaires et leurs dérivés monoacylés (Soo *et al.*, 2004),
- éluant B : chloroforme (95 %) acide acétique (0.5 %) méthanol (4.5 %) pour séparer les composés apolaires tels que les dérivés diacylés, les acides gras et les esters d'acides gras (Humeau *et al.*, 1998).

En fonction de leur structure chimique, les composés sont révélés selon l'une des procédures suivantes :

- pulvérisation d'une solution éthanolique de ninhydrine à 0,1 % réagissant spécifiquement avec les fonctions amines primaires des composés et conduisant à l'apparition d'un chromophore violet (révélation destructive),
- pulvérisation d'une solution aqueuse de permanganate de potassium à 0,1 M réagissant de façon non spécifique avec tous les composés réducteurs et conduisant à l'apparition d'une coloration jaune (révélation destructive),
- exposition à des vapeurs saturées en iode colorant spécifiquement les composés présentant des doubles liaisons (révélation non-destructive).

6.2. Séparation et analyse quantitative par chromatographie liquide haute performance

6.2.1. Matériel et protocole de séparation

Le système CLHP utilisé est une chaîne Shimadzu LC 10 AD-VP (Shimadzu, France) équipée de :

- une colonne Alltima HP C18 « amide » (125 x 2,1 mm, 5µm, Alltech) munie d'une précolonne Alltima HP C18 « amide » (15 x 2,1 mm, 5µm, Alltech),
- un four de colonne CTO-10 AS VP (Shimadzu),
- un injecteur automatique d'échantillons SIL-10 AD VP (Shimadzu),
- une pompe LC-10 AD VP (Shimadzu),
- un détecteur UV à barrette de diode SPD-M10A VP 190 – 290 nm (Shimadzu),
- un détecteur évaporatif à diffusion de lumière à faible température ELSD – LT (Shimadzu),

- un logiciel d'acquisition et de traitement de chromatogrammes, LC solution soft (Shimadzu).

La colonne C18 « amide » utilisée dans ce travail a été nouvellement conçue par Alltech[®]. Elle permet de séparer des composés via des interactions hydrophobes et des interactions avec les groupes amides insérés dans la phase stationnaire. Cette colonne est adaptée pour la séparation de composés à caractère tensioactif. Elle permet aussi de retenir, malgré ses propriétés de phase inverse, les composés hydrophiles comme certains peptides et d'éviter les problèmes d'étalements (tailing) rencontrés parfois lors de l'élution de composés tensioactifs (lipopeptides).

Une méthode CLHP par gradient a été mise au point pour séparer les différents constituants des milieux de synthèse (figure II.4.).

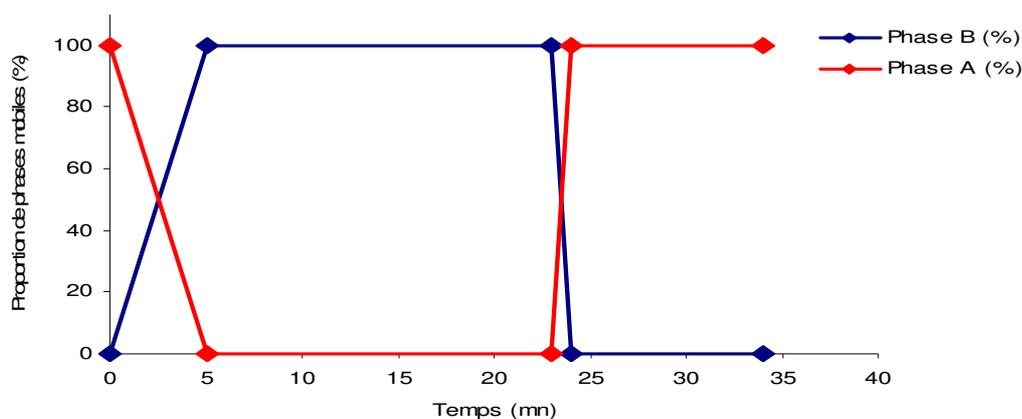


Figure II.4. Gradient utilisé pour la méthode CLHP. Phase A : méthanol (80) - eau (20) - TFA (0.1) - (v/v/v) ; phase B : méthanol (100) - TFA (0.1) - (v/v).

Les analyses ont été effectuées à une température de 25 °C, avec un débit d'élution de 0,2 mL/mn. Ces conditions ont permis de séparer et de quantifier les composés suivants :

- 6-amino-1-hexanol,
- O-oléyl aminohexanol,
- N,O-dioléyl aminohexanol,
- acide oléique,
- oléate d'éthyle,
- Lys-Ser,
- Nε-oléyl Lys-Ser,
- Ser-Leu,
- carnosine (β-Ala-His).

6.2.2. Détection et quantification

Les échantillons sont analysés tout d'abord par spectroscopie UV à 214 nm et puis par diffusion de la lumière.

L'utilisation en série de ces deux modes de détection a permis d'analyser au mieux l'ensemble des composés présents dans les milieux en une seule injection. Pour les substrats les plus polaires (6-amino-1-hexanol, Lys-Ser, HCl, Ser-Leu, carnosine) la détection par diffusion de la lumière a été privilégiée. Pour les autres composés, les deux modes de détection se sont révélés adéquats ce qui a permis, à titre indicatif de confronter les résultats obtenus d'un détecteur à l'autre. Un faible écart (moins de 5 %) a été constaté entre les valeurs fournies obtenues en spectroscopie UV et celles obtenues par diffusion de la lumière.

Les temps de rétentions des différents composés à analyser sont répertoriés dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Temps de rétention des différents composés détectés par spectroscopie UV et par diffusion de lumière.

Composés	Temps de rétention, tr (mn)	
	UV (214 nm)	Diffusion de lumière
6-Amino-1-hexanol	nd	2,87
O-oléyl aminohexanol	nd	15,22
N,O-dioléyl aminohexanol	15,87	16,22
Acide oléique	17,01	17,36
Oléate d'éthyle	19,12	19,46
Lys-Ser	nd	2,79
Nε-oléyl Lys-Ser	13,81	14,21
Carnosine	nd	2,8
Ser-Leu	nd	2,82

a) Détection et quantification en UV

L'acide oléique, l'oléate d'éthyle et le composé N,O-dioléyl aminohexanol sont dosés dans l'UV à 214 nm. Leurs courbes de calibration respectives sont présentées sur la figure II.5. et présentent leur domaine respectif de quantification.

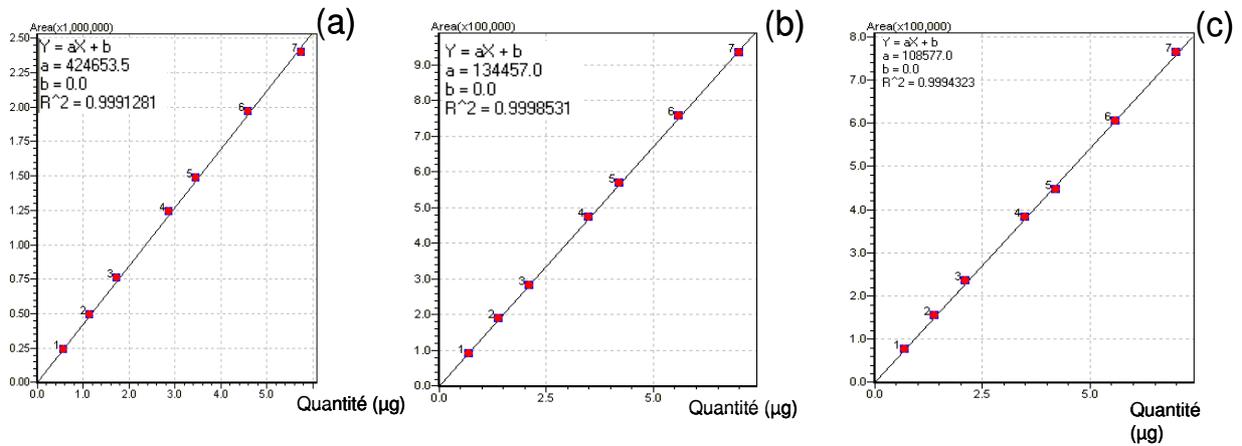


Figure II.5. Courbes de calibrations pour le dosage CLHP du N,O-dioléyl aminoalcool (a), de l'acide oléique (b) et de l'oléate d'éthyle (c) par spectroscopie UV à 214 nm.

b) Détection et quantification par diffusion de la lumière.

Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) est constitué de trois étages où ont lieu successivement la nébulisation de la phase mobile, son évaporation et la détection des solutés (figure II.6.). Le premier étage transforme la phase mobile en un aérosol grâce à un courant d'air comprimé (350 KPa). Puis cet aérosol est évaporé dans un tube chauffé ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$). A la sortie de ce tube se situe le système de détection basé sur le phénomène de diffusion de la lumière.

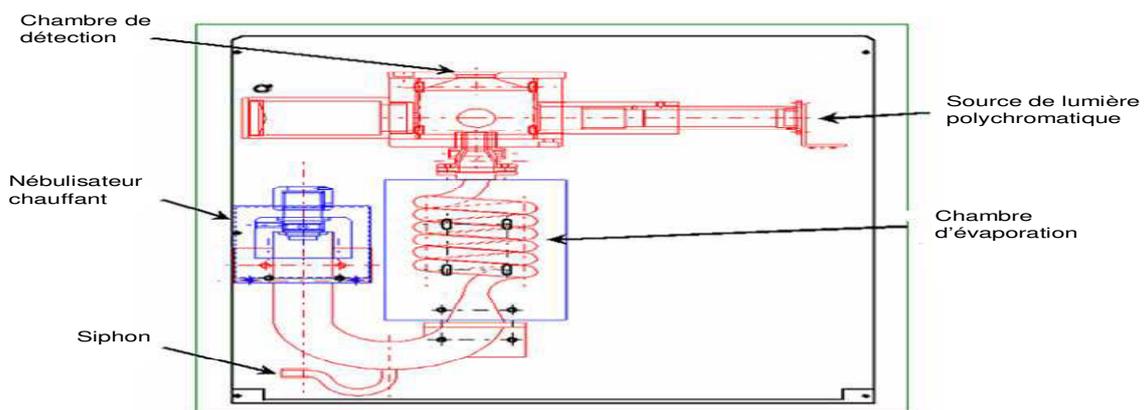


Figure II.6. Composition d'un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière.

Compte tenu de ce mode de fonctionnement, le DEDL fonctionne idéalement lorsque la phase mobile du système chromatographique est facilement évaporable. Dans ce cas, celle-ci ne donne aucun signal, ce qui évite la présence de pic d'injection sur les chromatogrammes et les

variations de ligne de base. La concentration en composé à doser de l'échantillon analysé influence la répartition des tailles des gouttelettes du nébulisât (figure II.7.)

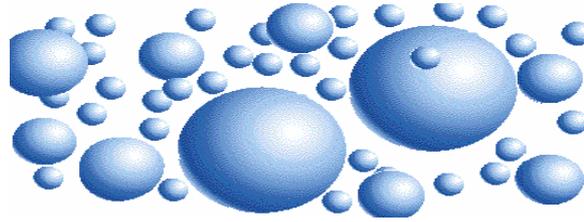


Figure II.7. Représentation schématique des gouttelettes constitutives de l'aérosol polydispersé généré par le nébulisateur.

L'évaporation de cet aérosol polydispersé conduit à la production de fines particules solides de solutés en suspension de tailles diverses. Ces particules diffusent alors la lumière selon trois phénomènes en fonction de leur rayon (r) et de la longueur d'onde du faisceau lumineux (λ) leur parvenant (figure II.8.).

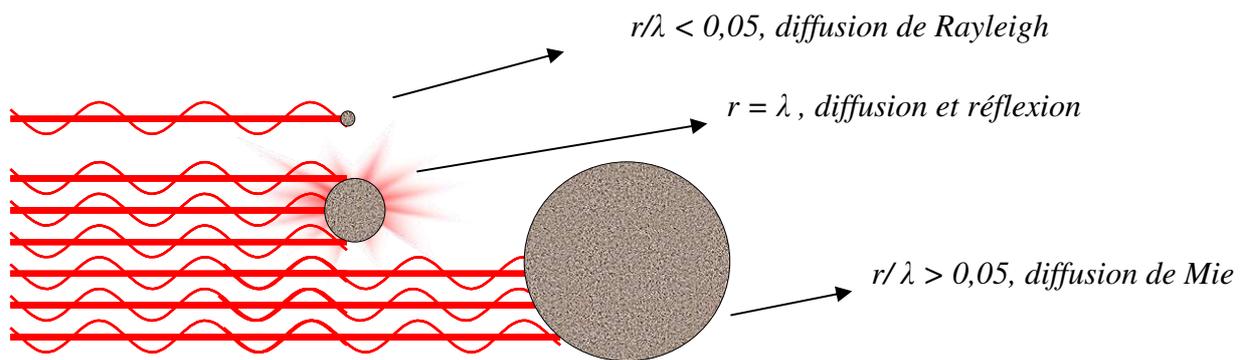


Figure II.8. Représentation schématique des trois phénomènes de diffusion contribuant à la détection d'un signal par le DEDL.

Lorsque r/λ est inférieur à 0,05, la diffusion est dite de Rayleigh, si r/λ est supérieure à 0,05 alors la diffusion est dite de Mie et pour $r = \lambda$, il y a à la fois réfraction et réflexion. Le signal détecté est souvent dû aux contributions inégales de ces trois phénomènes. Cependant, un phénomène caractéristique des composés analysés est souvent majoritaire et écrase les deux autres contributions. Ainsi la relation entre l'intensité lumineuse détectée et la concentration de l'échantillon est très peu souvent linéaire (au quel cas, elle ne passera jamais par l'origine). Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle mathématique plus adéquat tel que le modèle quadratique pour corrélérer l'aire des pics avec la concentration du composé dosé. L'expression la plus adaptée est un polynôme de degré compris entre 2/3 et 2 comme suggéré

dans différentes études (Guiochon *et al.*, 1988 ; Chaminade 2007 ; Shimadzu Corporation®) et présentée dans la figure II.9.

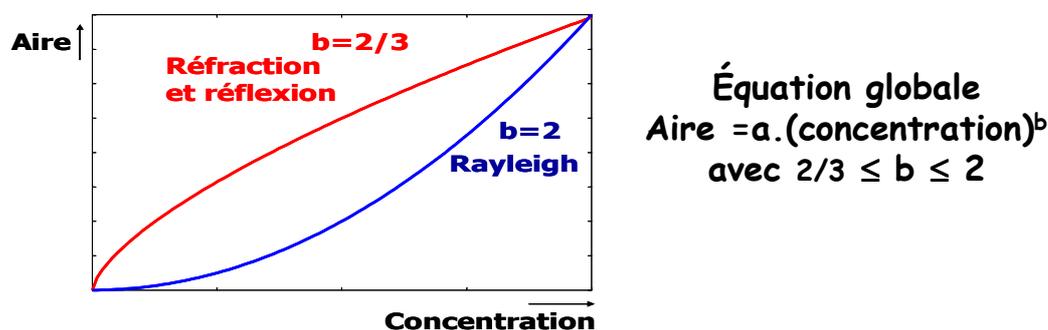


Figure II.9. Modélisation du signal DEDL en fonction de la concentration de l'échantillon injecté d'après Chaminade (2007).

Le 6-amino-1-hexanol, le O-oléyl aminohexanol, la Lys-Ser, le N-oléyl Lys-Ser, la Ser-Leu, et la carnosine sont dosés *via* une détection par diffusion de la lumière (DEDL : 40 °C, gain 6, 350 KPa) et présentent une réponse de type Reyleigh. Notons, que lors de l'établissement des courbes de calibrations de ces composés, une corrélation linéaire (traditionnellement utilisée) ne passant pas par l'origine a été tout d'abord appliquée. Le coefficient de corrélation obtenu dans ces conditions est correct mais inférieur à celui obtenu par application d'un modèle quadratique. L'exemple dans le cas du 6-amino-1-hexanol est présenté sur la figure II.10.

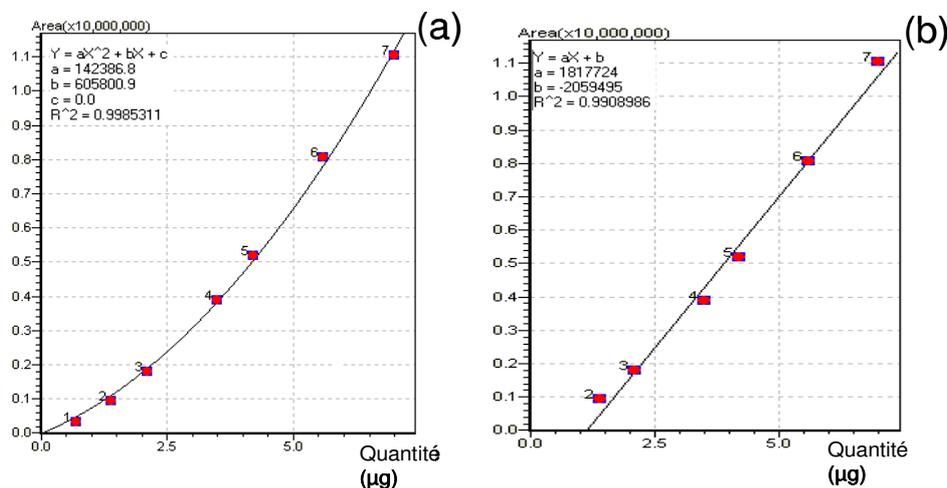


Figure II.10. Courbes de calibrations du 6-amino-1-hexanol (0,07 g/L à 0,7 g/L) détecté par diffusion de la lumière obtenues soit par l'application (a) d'un modèle quadratique ($R^2 = 0.999$) soit (b) d'un modèle linéaire ($R^2 = 0.991$).

Les autres courbes de calibrations sont présentées sur la figure II.11. et présentent le domaine respectif de quantification des autres composés à doser.

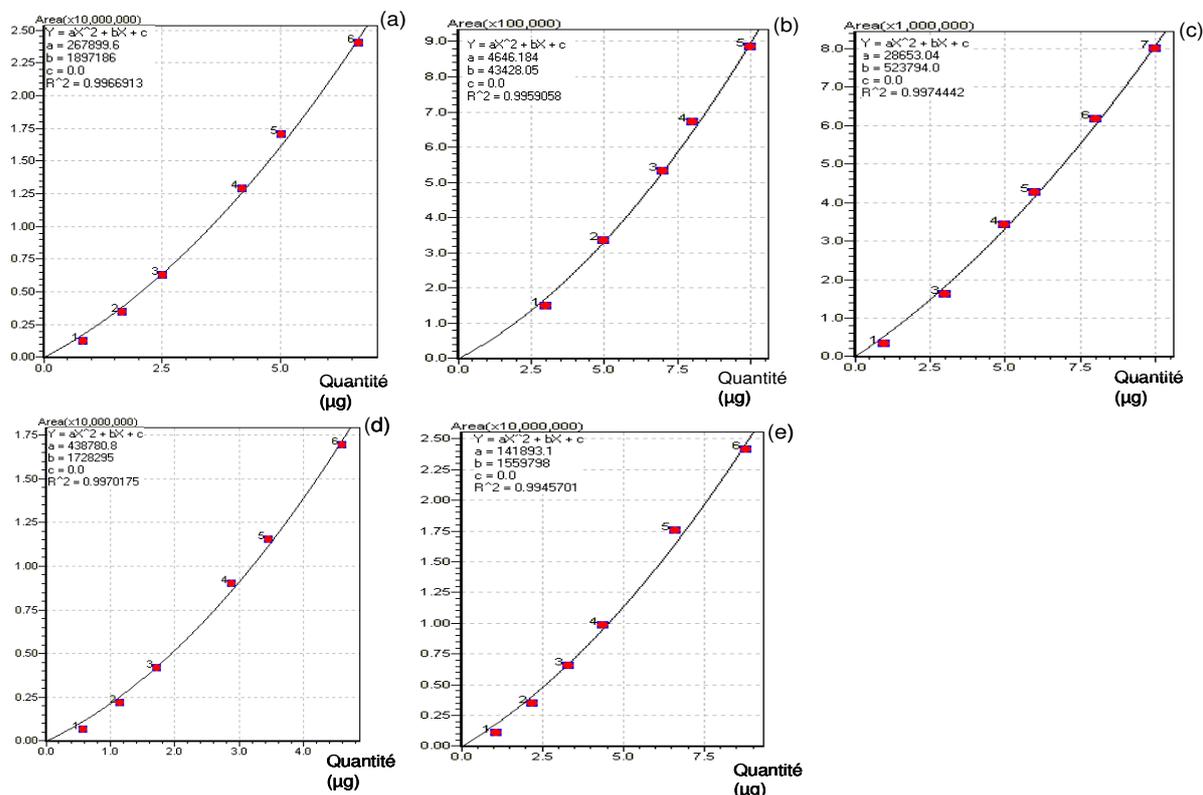


Figure II.11. Courbes de calibrations utilisées pour le dosage CLHP du O-oléyl aminohexanol (a), de la Lys-Ser, HCl (b), du N-oléyl Lys-Ser (c), de la Ser-Leu (d), et de la carnosine (e).

7. Techniques de purification des produits de synthèse

7.1. Purification du composé O-oléyl aminohexanol par chromatographie sur gel de silice.

Les réactions d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'oléate d'éthyle en solvant organique et dans les autres milieux réactionnels, biocatalysée par Novozym 435[®] sont mises en œuvre pendant 1 h 30 mn en réacteur. Les milieux réactionnels sont alors filtrés afin d'éliminer l'enzyme puis concentrés par évaporation sous vide non-totale du solvant ou extrait à l'hexane (dans le cas des liquides ioniques). L'échantillon résultant de ce traitement est alors déposé sur une colonne préparative contenant de la silice (Silica gel 60, Fluka). L'éluant utilisé est le mélange utilisé pour l'analyse par CCM et se constitue de butanol, d'acide acétique et d'eau (60/20/20 v/v/v). Un débit de 1,5 mL/mn est maintenu tout au long de la purification. Le système de purification est présenté dans la figure II.12.

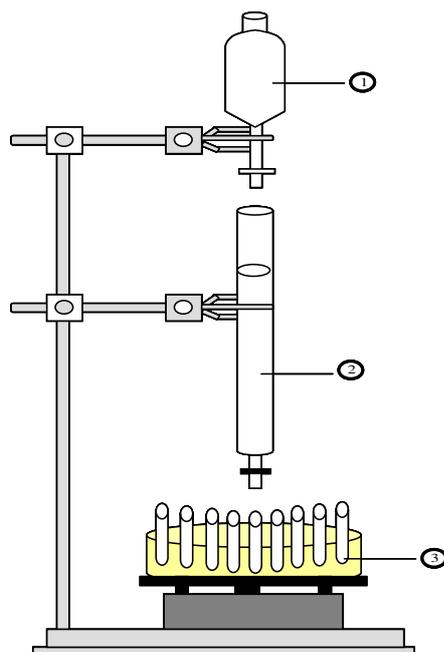


Figure II.12. Dispositif expérimental utilisé pour la purification du O-oléyl aminohexanol. 1. Réservoir de phase mobile (butanol-acide acétique-eau 60/20/20 v/v/v). 2. Colonne de silice 300 x 2,5 mm. Collecteur automatique de fraction.

Des fractions de 3mL sont collectées toutes les 2 mn et sont analysées par CCM afin de déterminer les fractions d'intérêt. Puis, celles-ci sont regroupées. L'acide acétique est éliminé par des lavages à l'eau (répété 6 fois) et son élimination totale est vérifiée par une mesure de pH de la dernière phase aqueuse récupérée. Notons qu'un lavage supplémentaire est ensuite réalisé à l'aide d'une solution aqueuse alcaline (pH 10) afin de favoriser la forme neutre des composés présentant une fonction amine primaire libre. Le butanol restant est éliminé par évaporation sous vide (40°C, 25 mbar). Le résidu sec est pesé et identifié grâce aux méthodes décrites ci-dessous (RMN et SM).

7.2. Purification du composé N,O-dioléyl aminohexanol par chromatographie sur couche mince préparative.

Les réactions d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'oléate d'éthyle biocatalysées par Novozym 435[®] sont mises en œuvre pendant 72 h dans les différents milieux réactionnels. Les milieux réactionnels sont alors filtrés afin d'éliminer l'enzyme puis concentrés partiellement par évaporation sous vide ou bien extraits à l'hexane dans le cas des liquides ioniques.

L'échantillon résultant de ce traitement est alors déposé sur une plaque de silice préparative 20 x 20 cm (Silica gel 60, Merck). La plaque est développée à l'aide d'un éluant dans une cuve saturée à base de chloroforme, d'acide acétique et de méthanol (95/0,5/4,5 v/v/v). Une fois l'éluion terminée, la plaque est mise à sécher sous vide. Une bande étroite de la plaque est révélée avec une solution aqueuse de permanganate de potassium (0,1 M) afin de localiser la zone de migration du composé d'intérêt. La silice localisée dans cette zone est alors décollée du support puis le composé est désorbé dans le méthanol, sous agitation de 250 rpm pendant 12 h. Le mélange est alors filtré puis évaporé à sec pour obtenir le composé purifié. Le produit sec récupéré est alors pesé et identifié structurellement par RMN.

7.3. Purification du composé N-oléyl Lys-Ser et N-oléyl carnosine par chromatographie liquide haute performance.

Les réactions d'acylation de la Lys-Ser et de la carnosine sont conduites jusqu'à l'équilibre thermodynamique. Les milieux réactionnels sont soit filtrés et concentrés, soit extraits à l'hexane (cas des liquides ionique) puis purifiés par injections successives sur chromatographie liquide haute performance (Biocad[®] Applied Biosystems, colonne Alltima C18 amide 250 x 4,1 mm - 5 µm et précolonne Alltima C18 amide 15 x 4,1 mm - 5 µm). Le gradient d'éluion est identique à celui employé pour les analyses CLHP. La purification est réalisée à 25 °C. Le composé N-oléyl Lys-Ser, est détecté à 214 nm. Le dérivé N-oléyl carnosine est repéré par spectrométrie de masse. Après récupération des fractions d'intérêt, le solvant est évaporé à sec et les produits identifiés par RMN et/ou SM-SM.

8. Techniques d'analyse structurale

8.1. Spectroscopie infrarouge

Dans cette étude, l'état d'ionisation des substrats (6-amino-1-hexanol et acide oléique) a été étudié par spectroscopie infrarouge dans le domaine du moyen infrarouge (MIR : 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1}).

8.1.1. Descriptif du matériel

Pour cette étude, un spectromètre à transformée de Fourier de type Tensor 27 (Brücker, Allemagne) a été utilisé. Il est constitué de quatre éléments : une source, un interféromètre de Michelson (figure II.13.), un système de présentation de l'échantillon thermostaté (55 °C) et un détecteur de type MCT (monocristal en alliage de mercure, cadmium et tellure) ; l'ensemble du système est purgé en permanence sous un flux d'air sec, afin de limiter les bruits de fond dus à la vapeur d'eau atmosphérique.

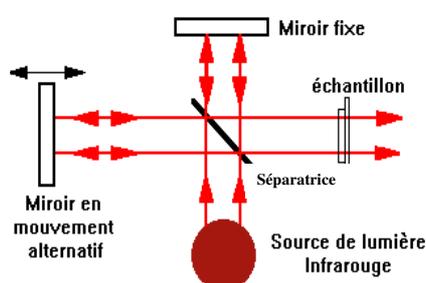


Figure II.13. Interféromètre de Michelson.

Le détecteur utilisé est un détecteur MCT constitué d'un monocristal en alliage de mercure cadmium tellure déposé sur un support inerte. Les spectres des solvants (2-méthyl-2-butanol ou hexane) et des échantillons (acide oléique solubilisé dans le solvant organique avec ou sans 6-amino-1-hexanol et prélèvements réactionnels) sont réalisés en effectuant 64 scans à une résolution de 4 cm^{-1} . La cellule sur laquelle sont déposés les échantillons est une cellule à réflexion totale atténuée (ATR) constituée d'un cristal de sélénure de zinc. La surface de ce matériau présente un indice de réfraction élevé, on parle d'élément IRE (internal reflection element) (figure II.14.).

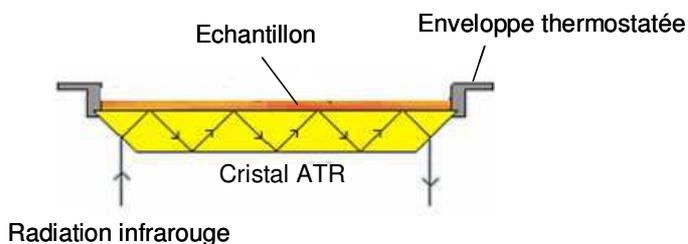


Figure II.14. Cellule ATR. Représentation schématique.

Dans un premier temps, des spectres de référence du 2-méthyl-2-butanol et de l'hexane ont été réalisés pour ensuite être soustraits à tous les autres spectres.

Pour étudier la formation du complexe ionique entre le substrat aminé et l'acide oléique, les spectres des solutions suivantes ont été réalisés :

- acide oléique solubilisé dans le 2-méthyl-2-butanol et dans l'hexane,
- mélanges de substrat aminé et d'acide oléique, à différents rapports molaires, dans le 2-méthyl-2-butanol et dans l'hexane,
- prélèvements de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'acide oléique dans le 2-méthyl-2-butanol et dans l'hexane.

8.1.2. Traitement spectral

Le traitement spectral indiqué ci-dessous a été effectué pour l'ensemble des spectres obtenus au cours de cette étude.

La correction de la ligne de base, entre des pics voire entre plusieurs spectres, est une fonction induisant une homogénéisation de cette ligne, favorisant ainsi la comparaison. Les spectres obtenus ont été soumis à ce traitement sur 200 points.

Le lissage est une fonction basée sur l'algorithme de Savitzky-Golay permettant de diminuer le bruitage d'un spectre et donc de le lisser. Le nombre de point de lissage est modulable mais peut, lorsqu'il est trop important, fausser l'intensité du signal et induire une perte d'informations. Dans cette étude, le nombre de points de lissage est de 13.

La normalisation consiste à relier le minimum de signal à 0 et le maximum à une autre valeur. Tous les spectres ont été soumis à une normalisation vectorielle.

8.2. Spectrométrie de masse

8.2.1. Analyse en mode infusion directe et couplage CL-SM

Dans cette étude, deux spectromètres de masse ont été utilisés : le SCIEX API 150EX (Perkin Elmer) et le LTQ (Thermo electron corporation[®], E.U.) avec une source d'ionisation de type ESI (electrospray ionisation). Dans ce mode, les molécules sont protonées ou déprotonées, avec la possibilité de former des adduits sodium et/ou potassium. Ces deux spectromètres de masse ont été employés en mode infusion directe. Dans ce cas l'échantillon (prélèvement ou produit purifié) est solubilisé dans un mélange méthanol/eau 50/50 (v/v) et

injecté à l'aide d'une microsiringue à débit constant dans la source (5 $\mu\text{L}/\text{mn}$). La température du capillaire est fixée à 150 $^{\circ}\text{C}$ et la tension à 5 kV. Un exemple de spectre de masse obtenu par infusion directe est présenté figure II.15.

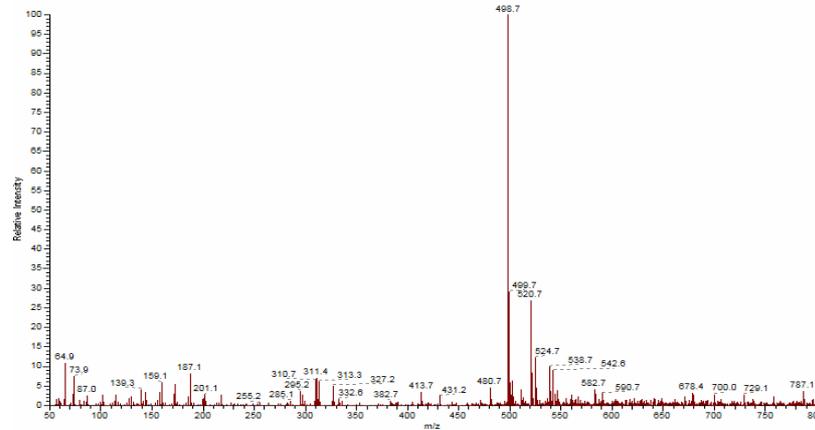


Figure II.15. Spectre de masse du N-oléyl Lys-Ser obtenu en mode positif électrospray par infusion directe du composé purifié et resolubilisé dans un mélange eau/méthanol (50/50 v/v). 498,7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$: $\text{M} + \text{H}^+$ (N-oléyl Lys-Ser), 520,7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$: $\text{M} + \text{Na}^+$ (N-oléyl Lys-Ser).

Un second mode d'analyse a été utilisé : le couplage CL/SM. Les composés de l'échantillon analysé subissent une première séparation (cf méthode CLHP décrite ci-dessus) avant d'être introduits dans le spectromètre de masse. Ainsi, à chaque pic chromatographique peut être associé un spectre de masse permettant d'identifier la molécule (figure II.16.)

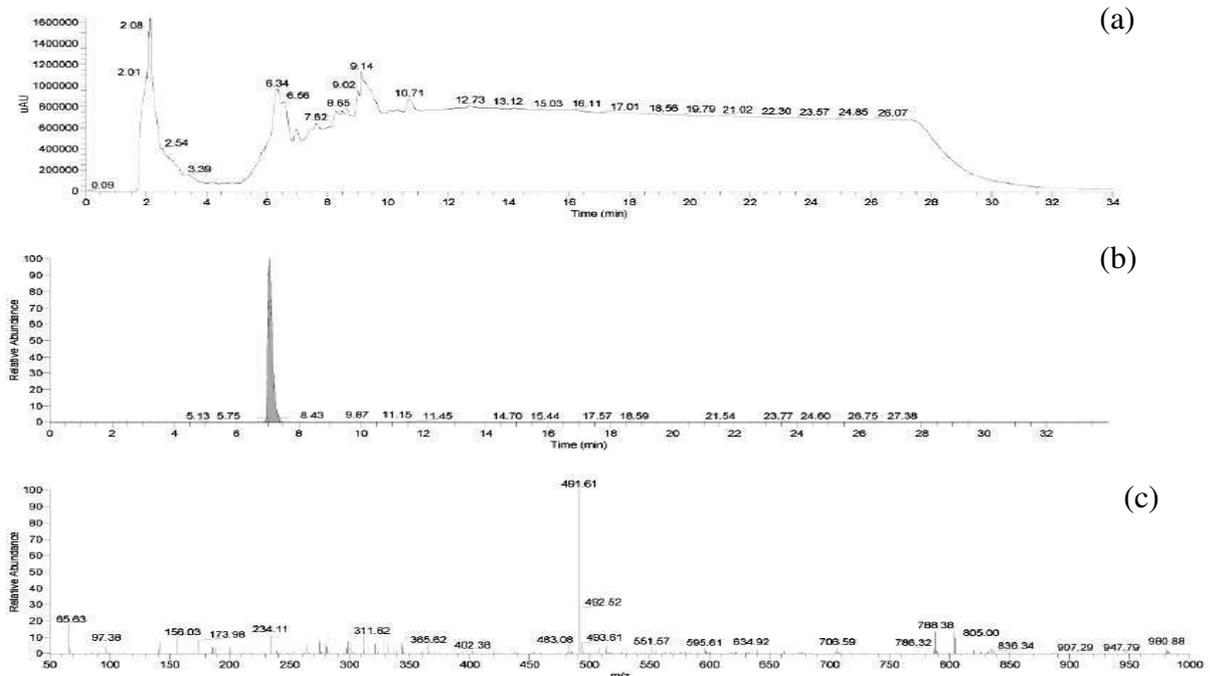


Figure II.16. Analyse CL-SM du milieu réactionnel d'acylation enzymatique de la carnosine. (a) Chromatogramme UV (214 nm). (b) Chromatogramme ionique simple (SIC) fixé à m/z [490-492 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]. (c) Spectre de masse du pic présentant un temps de rétention de 7,10 mn.

8.2.2. Analyse en mode fragmentation

Le spectromètre de masse LTQ (Thermo electron corporation[®], E.U.) a été utilisé en mode fragmentation pour déterminer précisément la structure des produits purifiés. On parle alors de SMⁿ, n étant le nombre de niveaux de fragmentation imposé à un ion d'intérêt. Les éléments constitutifs d'un spectromètre de masse par fragmentation sont présentés sur la figure II.17.

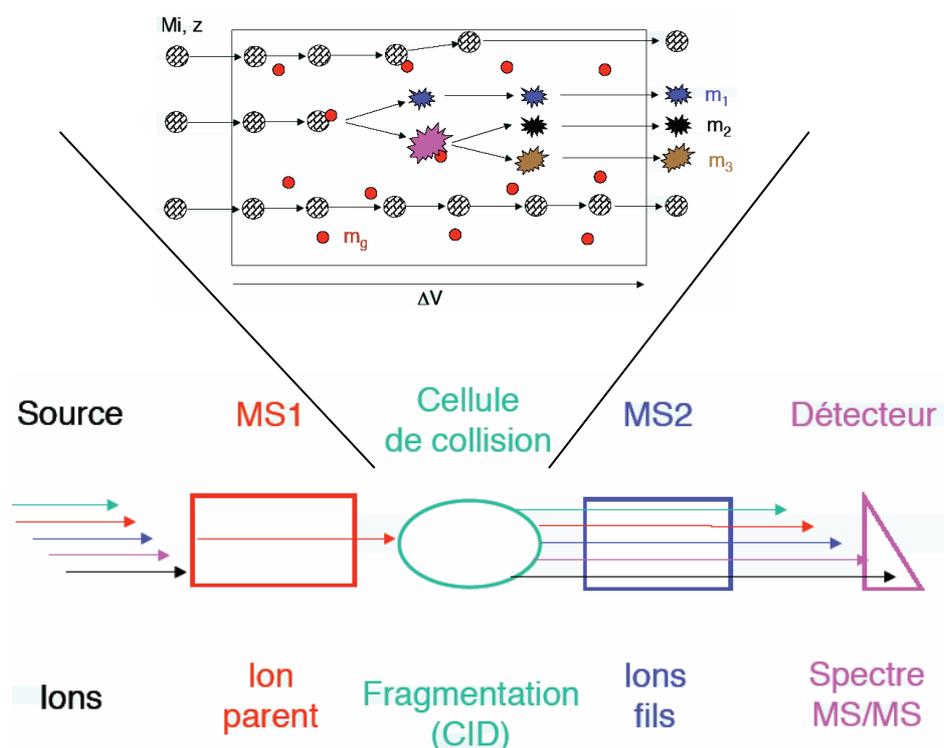


Figure II.17. Eléments constitutifs d'un spectromètre de masse à fragmentation. Représentation schématique de la chambre de collision.

Ce spectromètre de masse comporte deux analyseurs. Un premier analyseur capable de sélectionner l'ion d'intérêt. Celui-ci se retrouve ainsi purifié du mélange injecté qui peut être très complexe. L'ion « purifié » est alors fragmenté dans une chambre de collision. Un deuxième analyseur mesure alors les valeurs m/z des fragments, on parle alors de SM-SM (spectrométrie de masse en tandem). Si on répète l'opération, on fait de la SM-SM-SM ou SM³. Pour ces analyses, la température du capillaire est fixée à 300 °C et la tension à 5kV. L'identification des ions fils obtenus est réalisée à l'aide du logiciel d'identification structurale Xcalibur[®] soft (THERMO).

8.3. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C ont été effectués pour les composés suivants : O-oléyl aminohexanol, le N,O-dioléyl aminohexanol et le N-oléyl Lys-Ser. Avant analyse, les produits sont solubilisés soit dans du chloroforme deutéré (CDCl_3) soit du diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO). Le spectromètre utilisé est un Brücker 300 MHz, 7,1 T (Germany).

9. Tests d'activité biologique

9.1. Activité anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH de la carnosine et de son dérivé acylé

La capacité à piéger le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) de la carnosine et de son dérivé acylé a été évaluée selon le protocole décrit dans la littérature (Brand-Williams *et al.*, 1995). 50 μL de solution méthanolique à différentes concentrations de composé à tester sont ajoutés à 1,95 mL de solution méthanolique de DPPH à 6×10^{-5} M. Les mélanges sont alors agités vigoureusement et placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 mn. L'absorbance à 517 nm est alors mesurée par spectrophotomètre. Toutes les mesures sont réalisées trois fois. Un contrôle négatif est nécessaire pour ce test et correspond à l'échantillon sans composé à tester. La capacité à piéger le radical DPPH est calculée par l'équation suivante :

$$\text{DPPH activité anti-radicalaire (\%)} = (1 - \text{DO}_{517}\text{échantillon} / \text{DO}_{517}\text{controle}) \times 100$$

La concentration inhibitrice est exprimée en fonction de la concentration de composé puis modélisée par régression linéaire afin de déterminer la CI_{50} (concentration nécessaire pour piéger 50 % des radicaux DPPH) des composés testés. Pour interpréter ces résultats, un composé de référence est utilisé : le Trolox dont la concentration (CI_{50}) nécessaire pour piéger 50 % du radical DPPH est de 11 μM .

9.2. Activité inhibitrice de la carnosine et de son dérivé acylé envers la xanthine oxydase

Ce test d'activité est réalisé d'après la procédure décrite dans la littérature (Cos *et al.*, 1998). 2 mL de mélange réactionnel contenant 200 mM de tampon phosphate à pH 7,8, 0,2 mM d'hydroxylamine, 50 μ M de xanthine, 0,1 mM d'EDTA (pH 7.0) sont préparés. La réaction est débutée par ajout de l'enzyme (7,5 mU/mL) dans le mélange avec la carnosine ou son dérivé acylé (25 – 300 μ M). Un contrôle négatif en absence de produit à tester est utilisé comme référence. Après incubation à 37 °C pendant 30 mn, la réaction est stoppée par ajout de 200 μ L d'HCl (0,58 M). L'activité résiduelle de l'enzyme est déterminée en fonction de la présence d'acide urique libéré, mesurée par spectrophotomètre à 290 nm. Pour chaque composé et à chaque concentration testée, le pourcentage d'inhibition de l'enzyme est déterminé d'après l'équation suivante :

$$\text{Xanthine oxydase inhibition (\%)} = (1 - \text{DO}_{290}\text{échantillon} / \text{DO}_{290}\text{contrôle}) \times 100$$

La concentration inhibitrice est exprimée en fonction de la concentration de l'échantillon puis modélisée par un modèle polynomial de second ordre afin de déterminer CI_{50} (concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité de la xanthine oxydase dans ce système) de chaque composé testé. L'allopurinol est utilisé comme référence dans cette étude et présente une CI_{50} de 2,4 μ M.

9.3. Capacité de la carnosine et de son dérivé acylé à piéger le radical super oxyde

Après les mesures décrites précédemment, les milieux réactionnels sont récupérés et supplémentés en un mélange d'acide sulfinimique (300 μ g/mL), de N-(1-naphtyl)-éthylènediamine dihydrochloride (5 μ g/mL) et d'acide acétique (16,7 % v/v). Chaque tube est alors placé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 mn. La capacité de la carnosine et de son dérivé acylé à piéger le radical super oxyde est mesurée par spectrophotomètre à 550 nm. Pour chaque composé et à chaque concentration testée, le pourcentage de piégeage de l'anion superoxyde est déterminé d'après l'équation suivante :

$$\text{capacité à piéger } O_2^- (\%) = (1 - \text{DO}_{550}\text{échantillon} / \text{DO}_{550}\text{contrôle}) \times 100$$

L'activité de piégeage de l'anion superoxyde est exprimée en fonction de la concentration de l'échantillon puis modélisée par régression linéaire afin de déterminer la CI_{50} de chaque composé testé. L'allopurinol est utilisé comme référence dans cette étude et présente une CI_{50}

(concentration nécessaire pour piéger 50 % des anions superoxydes dans ce système) de 3,3 μM .

10. Modélisation des cinétiques de bioconversion par MatLab

La modélisation de cinétiques de réactions a nécessité la construction d'un programme informatique à l'aide d'un logiciel d'intégration Matlab (Matwork[®] soft). Matlab est un langage de programmation dédié au calcul scientifique. Il tire son nom, de sa grande simplicité à réaliser du calcul matriciel (Matrix Laboratory). Initialement développé pour les automaticiens, il propose aujourd'hui des dizaines de boîtes à outils d'optimisation (Toolbox) permettant d'aborder des problèmes plus variés telles que la résolution d'équations différentielles traduisant un mécanisme réactionnel.

La modélisation de cinétiques de réaction implique l'optimisation d'un ensemble de paramètres (constantes cinétiques et/ou d'équilibre) à partir de la minimisation d'une fonction objectif J , laquelle en ce cas est la somme des carrés des différences entre les données simulées et les valeurs expérimentales des concentrations des composants au cours du temps :

$$J = \sum_n \sum_m (x_{\text{exp}_{n,m}} - x_{\text{cal}_{n,m}})^2$$

Les concentrations simulées des composants sont obtenues grâce à l'intégration numérique de l'ensemble d'équations différentielles de vitesse de formation ou de disparition. Le travail d'optimisation peut se décomposer en deux étapes : une étude analytique, avec l'élection du mécanisme de réaction, et une étude numérique, avec les outils d'optimisation de Matlab, visant à déterminer le profil de commande optimal du modèle ajusté sur les données expérimentales. Pour réaliser l'optimisation d'un modèle on peut utiliser différents algorithmes, les deux principaux algorithmes sont présentés ci-dessous.

- La fonction `fminsearch`, pour l'optimisation non contrainte et sans limite sur les variables.

Elle fait partie de la boîte à outils d'optimisation de ce logiciel (Matlab Optimization Toolbox). Cette fonction utilise l'algorithme de Nelder-Mead (ou « simplexe de Nelder-Mead »). Une interprétation intuitive de cet algorithme est qu'une direction de recherche est définie par le plus mauvais point (celui dont la fonction coût est la plus élevée) et le barycentre des sommets hormis le plus mauvais. Le simplexe peut accélérer (expansion) ou décélérer (contraction) dans cette direction pour localiser une région et zoomer (rétrécissement) vers l'optimum.

Cette méthode Nelder-Mead est capable de distordre le simplexe pour mieux s'adapter à la topologie de la fonction. Ceci lui confère, à la fois, une force et une faiblesse : il gagne en vitesse de convergence, mais perd en robustesse.

- L'algorithme génétique : méthode évolutionnaire qui est souvent présentée par analogie avec la théorie de la sélection naturelle de Darwin (Perrin 1997 ; Muniglia *et al.*, 2004).

Les individus les plus performants d'une population ont une plus grande probabilité de survivre et de se reproduire, en donnant des descendants encore mieux adaptés.

La correspondance avec la minimisation d'une fonction est la suivante : un « individu » est un point x , « la population » est un ensemble de points et « la performance d'un individu x » est évalué par sa valeur de fonction objectif $J(x)$. En partant d'un échantillonnage de l'espace de recherche (population initiale), cette méthode réalise des tirages de nouvelles populations (des « générations ») à l'aide d'opérations de sélection, croisement et mutation. Ce dernier a été utilisé pour établir un modèle cinétique décrivant précisément les cinétiques de transacylation du 6-amino-1-hexanol en solvant organique biocatalysée par Novozym 435[®].

III. Acylation enzymatique d'une molécule bifonctionnelle : étude préliminaire.

1. Introduction

L'objectif de cette étude préliminaire est d'étudier la faisabilité de la N et /ou O-acylation d'une molécule bifonctionnelle, le 6-amino-1-hexanol dont la structure moléculaire est représentée dans la figure III.1.



Figure III.1. Structure moléculaire du 6-amino-1-hexanol.

Cette molécule, de par sa structure est susceptible d'être O et/ou N-acylée et constitue donc un modèle intéressant pour l'étude de la sélectivité réactionnelle lors de son acylation enzymatique en solvant organique. Dans un premier temps, la préparation commerciale de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435[®]) a été utilisée, considérant sa capacité à catalyser la N et la O-acylation en solvant organique largement illustrée dans la littérature (Maugard *et al.*, 1998b ; Klibanov 2001 ; Dolores *et al.*, 2002). Les possibilités d'acylation de cette molécule modèle sont représentées dans la figure III.2.

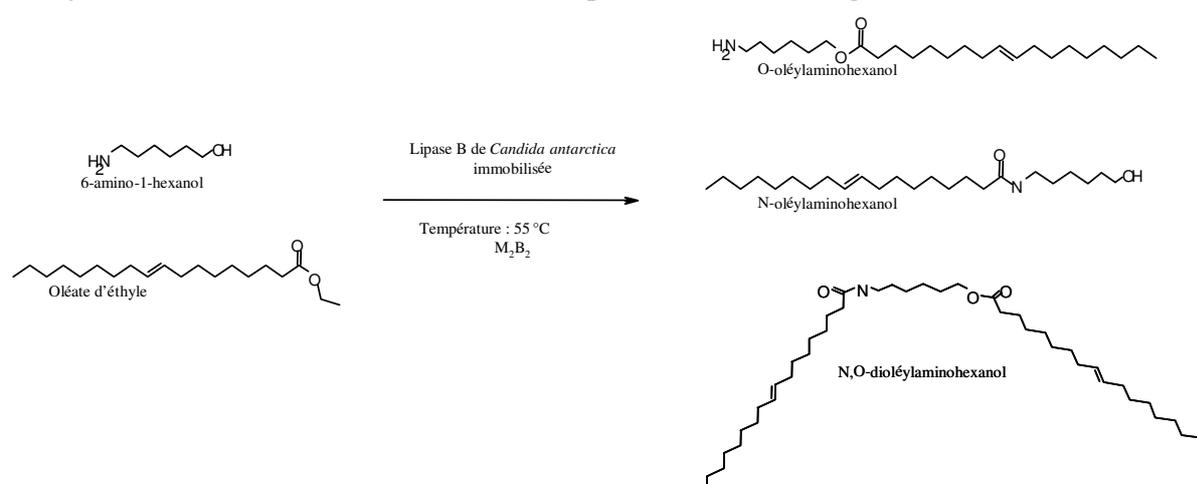


Figure III.2. Schéma réactionnel de la réaction de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol catalysée par Novozym435[®].

2. Etude préalable de l'acylation du 6-amino-1-hexanol

Les conditions opératoires appliquées pour cette étude ont été choisies en se basant sur des travaux antérieurs réalisés aux laboratoires LSGC et LBB (Humeau *et al.*, 1998b ; Jamrozik 2001). L' a_w initiale du milieu réactionnel lors des réactions d'acylation mises en œuvre dans cette étude en solvant organique est mesurée en début de réaction afin de vérifier qu'elle soit inférieure à 0.1 (Wehtje *et al.*, 1997a ; Humeau *et al.*, 1998a ; Ardhaoui *et al.*, 2004). Ainsi, nous avons opté pour la mise en œuvre d'un procédé d'acylation du 6-amino-1-hexanol en réacteur Wheaton[®], dans le 2-méthyl-2-butanol, à 55 °C sous agitation de 250 rpm (rotation par minute) en présence de l'agent acylant oléate d'éthyle et de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435[®]). Les substrats 6-amino-1-hexanol et oléate d'éthyle ont été introduits à une concentration de 0,12 M. Aussi, il a été vérifié qu'aucune réaction ne se produit en absence de biocatalyseur.

Le suivi de la réaction a été réalisé en analysant des échantillons prélevés directement dans le milieu réactionnel au cours du temps. Une première étape analytique qualitative a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM). Le résultat obtenu est présenté dans la figure III.3.

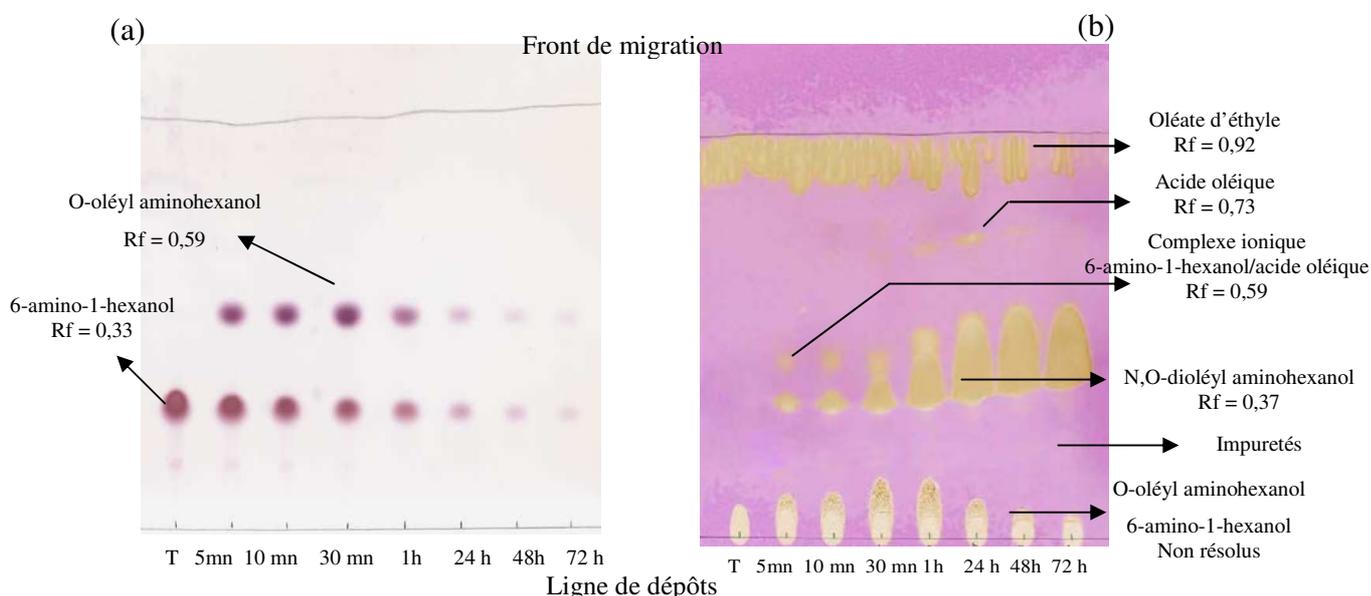


Figure III.3. Plaques CCM caractéristiques obtenues après migration dans le butanol/acide acétique/eau 60/20/20 v/v/v et révélation à la ninhydrine (a) et dans le chloroforme/acide acétique/méthanol 95/0,5/4,5 v/v/v et révélation au $KMnO_4$ (b) des prélèvements réactionnels de la réaction de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol catalysée par Novozym 435[®] dans le 2-méthyl-2-butanol.

La plaque CCM obtenue avec le premier système d'élution (figure III.3.a) et révélée à la ninhydrine (réactif spécifique des fonctions amines primaires libres) montre la transformation

du 6-amino-1-hexanol ($R_f = 0,33$) au profit de l'apparition d'un composé plus apolaire présentant une fonction amine libre et sensible à l'iode (spécifique des fonctions insaturées), supposé être le composé O-oléyl aminohexanol ($R_f = 0,59$). La seconde analyse CCM (figure 3b) met en évidence l'accumulation d'un second produit non-révéillé à la ninhydrine présentant un R_f de 0,59, supérieur à celui du composé O-acylé et également révéillé à l'iode.

D'après ces premiers résultats, la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol est possible et conduit à 2 produits : l'un présentant une fonction amine primaire libre et l'autre plus hydrophobe, n'ayant plus de fonction amine libre. Ainsi, il peut être suggéré que la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'oléate d'éthyle conduirait à la synthèse du composé O-oléyl aminohexanol et du composé N,O-dioléyl aminohexanol.

La mise en évidence de la présence d'acide oléique ($R_f = 0,73$) dans le milieu réactionnel démontre que même si l' a_w initiale du solvant est inférieure à 0,1, une hydrolyse partielle de l'oléate d'éthyle se produit. La présence transitoire d'une tâche ($R_f = 0,59$) détectée au $KMnO_4$ et non identifiée, a conduit à l'hypothèse de la formation d'un complexe ionique entre le substrat et l'acide gras libre libéré lors de l'hydrolyse résiduelle. Cette hypothèse a été vérifiée par CCM en analysant un mélange équimolaire de 6-amino-1-hexanol et d'acide oléique solubilisés dans le 2-méthyl-2-butanol. Dans ce cas, outre les spots des produits déposés, on note la présence d'un spot de R_f intermédiaire et similaire à celui observé précédemment. L'hypothèse a été formulée qu'il s'agit d'un complexe ionique entre le 6-amino-1-hexanol et l'acide oléique. Cette notion de complexe ionique en solvant organique sera étudiée de manière plus exhaustive par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) par la suite.

La purification des produits de synthèse et leur identification par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire ont été réalisées. La formation du O-oléyl aminohexanol et du N,O-dioléyl aminohexanol a ainsi pu être confirmée.

Un spectre de masse du O-oléyl aminohexanol purifié est présenté dans la figure III.4.

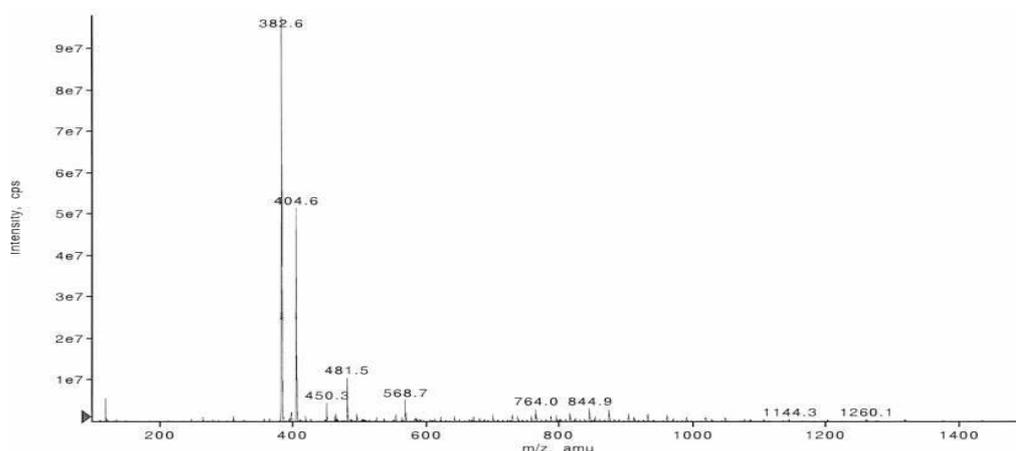


Figure III.4. Spectre de masse obtenu par infusion directe en ionisation par électrospray en mode positif du composé O-oléyl aminohexanol purifié solubilisé dans un mélange méthanol eau 50/50 v/v. m/z O-oléyl aminohexanol, H^+ = 382,6 g.mol⁻¹, m/z O-oléyl aminohexanol, Na^+ = 404,6 g.mol⁻¹.

Notons que la détermination du rapport m/z du N,O-dioléyl aminohexanol n'a pu être réalisée par spectrométrie de masse que ce soit en mode ionisation par électrospray ou en mode APCI. La figure III.5. présente les spectres RMN du proton et du carbone des deux produits de synthèse purifiés et solubilisés dans le chloroforme deutéré.

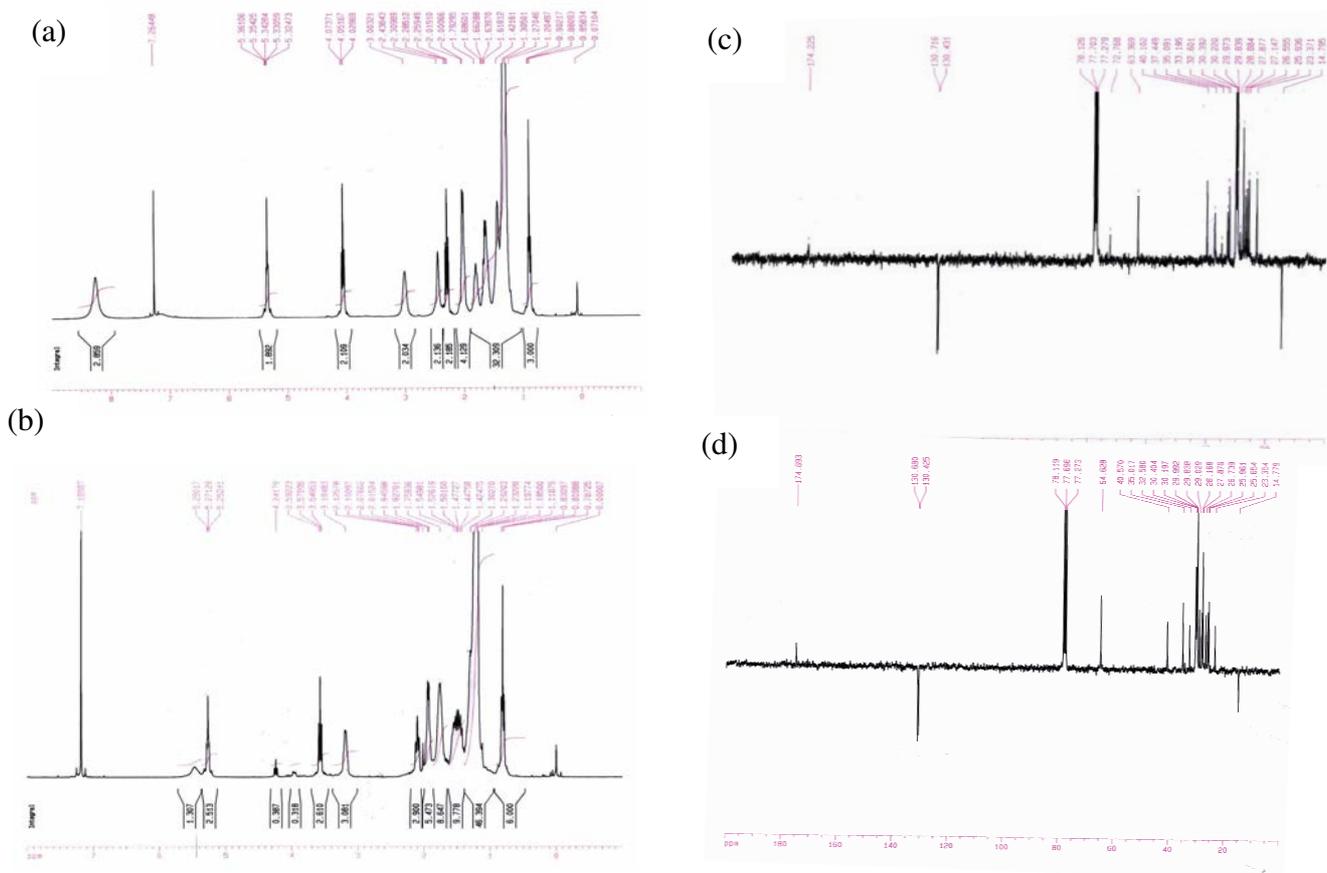


Figure III.5. Spectres RMN du proton du composé O-oléyl aminohexanol (a) et du composé N,O-dioléyl aminohexanol (b). Spectres RMN du carbone du composé O-oléyl aminohexanol (c) et du composé N,O-dioléyl aminohexanol (d).

Le descriptif exhaustif de la figure III.5. (m : multiplet, br t : broad triplet) est présenté ci-dessous :

O-oléyl aminohexanol: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$), 1,50 (m, $-\text{CH}_2-$ du 6-amino-1-hexanol), 2,30 (t, $J = 7,25$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CO-O-}$), 3,00 (br t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 4,05 (t, $J = 6,65$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$), 5,34 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH-}$), RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14,77 (1C, $-\text{CH}_3$), 23,35 (1C, $\text{CH}_3\text{-CH}_2-$), 25,65-32,58 (multiples pics, $-\text{CH}_2-$ de la chaîne oléyle), 35,02 (1C, $-\text{CH}_2\text{-CO-O-}$), 40,57 (1C, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 64,63 (1C, $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$), 130,68 (2C, $-\text{C}=\text{C-}$), 174,69 (1C, $-\text{CO-O-}$).

N,O-dioléyl aminohexanol: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0,81 (t, $J = 6,6$ Hz, 6H, 2 x CH_3), 1,29 (m, $-\text{CH}_2-$), 1,48 (m, $-\text{CH}_2-$), 1,75 (m, 8H, 2 x $-\text{CH}_2\text{-C}=\text{C-CH}_2-$), 1,93 (t, $J = 7,26$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CO-NH-}$), 2,10 (t, $J = 7,25$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO-O-}$), 3,19 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N-CO-}$), 4,24 (t, $J = 6,65$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$), 5,27 (m, 4H, 2x $-\text{CH}=\text{CH-}$), 5,43 (br t, 1H, $-\text{NH-CO-}$), RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14,79 (2C, $-\text{CH}_3$), 23,37 (2C, $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 25,94-33,19 (multiples pics, $-\text{CH}_2-$), 35,09 (1C, $-\text{CH}_2\text{-CO-O-}$), 37,45 (1C, $-\text{CH}_2\text{-CO-NH-}$), 40,10 (1C, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$), 63,36 (1C, $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$), 130,57 (4C, $-\text{CH}=\text{CH-}$), 174,2 (2C, $-\text{CO-O-}$ et $-\text{CO-NH-}$).

Une fois purifiés et identifiés, les produits de synthèse, ont permis la préparation de gammes de calibration pour la mise au point d'une méthode quantitative analytique par CLHP décrite dans la partie Matériel et Méthodes. Le suivi cinétique de la réaction de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol a ainsi pu être effectué et est représenté sur la figure III.6.

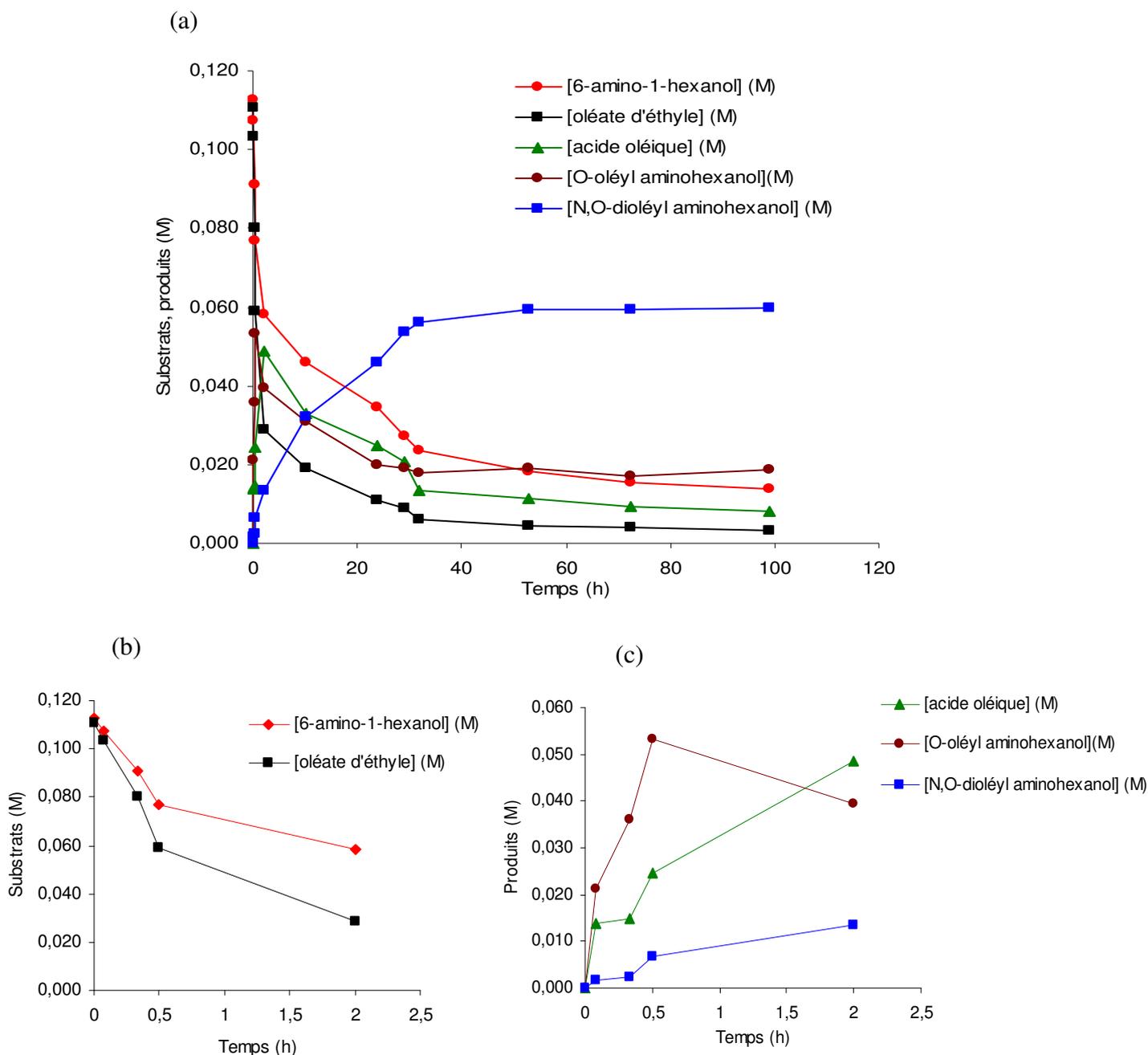


Figure III.6. Suivis cinétiques relatifs à la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence d'oléate d'éthyle (0,12 M) biocatalysée par Novozym 435[®], à 55 °C, dans le 2-méthyl-2-butanol (a). Les détails des deux premières heures de la cinétique sont représentés en (b) pour les substrats et (c) pour les produits.

Le profil des cinétiques suggère une réaction séquencée ; une première phase au cours de la première heure pouvant être qualifiée de rapide, qui conduit essentiellement à l'accumulation du O-oléyl aminohexanol avec une vitesse initiale apparente de synthèse de $120 \pm 16 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ et une seconde phase moins rapide allant jusqu'à l'équilibre thermodynamique (48 h) au cours de laquelle le composé mono-acylé est transformé et le composé N,O-diacylé s'accumule dans le milieu (tableau III.1.)

Tableau III.1. Paramètres cinétiques relatifs à la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol en présence d'oléate d'éthyle dans le 2-méthyl-2-butanol à 55 °C catalysée par Novozym 435®.

Vitesse initiale de synthèse (mM.h ⁻¹)		Taux de conversion du substrat à l'équilibre (%)
O-oléyl aminohexanol	N,O-dioléyl aminohexanol	
120 ± 16	12 ± 3	85 ± 3

Un aspect intéressant de cette réaction, est l'absence de composé N-acylé. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat :

- soit la lipase CAL B immobilisée catalyse préférentiellement l'acylation de la fonction hydroxyle du 6-amino-1-hexanol et la structure moléculaire de ce substrat est telle que le transfert d'acyle du O vers le N est impossible. Le produit résultant est donc ensuite pris en charge pour être N-acylé (Liisa T. Kanerva 1992 ; Furutani *et al.*, 1996 ; Fernandez-Perez *et al.*, 2001 ; Tufvesson *et al.*, 2007).

- soit la N-acylation du 6-amino-1-hexanol se produit mais le produit résultant est immédiatement transformé en composé N,O-diacylé, rendant alors impossible sa détection.

A l'équilibre thermodynamique, le composé N,O-diacylé est le produit majoritaire (76 %) ; l'acylation enzymatique de cette molécule bifonctionnelle est donc peu chimio-sélective.

3. Effet du ratio molaire des substrats

Au vu de la stoechiométrie de la réaction, il apparaît clairement qu'un ratio équimolaire de substrat est limitant. C'est pourquoi, l'influence d'autres rapports molaires sur le taux de conversion du 6-amino-1-hexanol à l'équilibre a été étudiée. Comme cette étude sera appliquée par la suite à des dipeptides dont la solubilité dans certains solvants organiques peut être faible, des concentrations comprises entre 0,06 M et 0,48 M seront utilisées pour cette étude. Notons qu'à ces concentrations, les substrats (6-amino-1-hexanol et donneurs d'acyle) sont totalement solubles dans les conditions réactionnelles, ce qui permet d'étudier les performances de la réaction en s'affranchissant du paramètre solubilité souvent limitant dans ces procédés enzymatiques en solvant organique. Les résultats sont présentés dans la figure III.7.

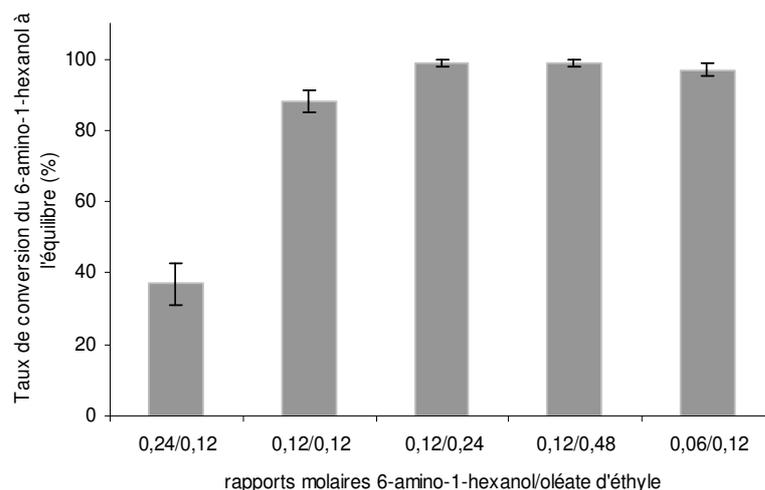


Figure III.7. Influence du rapport molaire 6-amino-1-hexanol/oléate d'éthyle sur le taux de conversion du 6-amino-1-hexanol à l'équilibre lors de la réaction de trans-acylation catalysée par Novozym 435[®], dans le 2-méthyl-2-butanol, à 55 °C, en réacteur Wheaton[®].

Ces résultats montrent que la mise en excès du donneur d'acyle permet de faire approcher le taux de conversion du 6-amino-1-hexanol vers 100 %. Le rapport molaire aminohexanol / donneur d'acyle 0,12 M / 0,24 M, permettant d'obtenir le meilleur taux de conversion tout en évitant la mise en œuvre de la réaction avec un large excès de donneur d'acyle, sera donc choisi pour la suite de l'étude.

4. Influence de la nature de l'agent acylant

La réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol catalysée par Novozym 435[®] a été mise en œuvre dans le 2-méthyl-2-butanol, soit en présence d'oléate d'éthyle, soit en présence d'acide oléique libre dans un réacteur Wheaton[®] afin de comparer les performances d'une acylation directe et d'une trans-acylation dans ces conditions opératoires. Les performances des deux réactions mises en œuvre sont indiquées dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Comparaison des performances de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence d'acide oléique ou d'oléate d'éthyle (0,24 M) catalysée par Novozym 435[®] dans le 2-méthyl-2-butanol à 55 °C en réacteur Wheaton[®].

Agents acylants	Vitesses initiales apparentes de disparition (mM.h ⁻¹)		Durée de la réaction (h)	Taux de conversion du substrat (%)
	6-amino-1-hexanol	Donneur d'acyle		
Oléate d'éthyle	340 ± 10	480 ± 7	48	98 ± 1
Acide oléique	120 ± 14	150 ± 11	64	97,5 ± 1,5

Les vitesses initiales de disparition des substrats sont 3 fois plus élevées dans le cas d'une trans-acylation qu'une acylation directe. Dans le cas d'une acylation directe, la forme libre de la fonction carboxylique de l'agent acylant peut être propice à la formation d'un complexe ionique entre les substrats affectant alors leur disponibilité, ce qui pourrait expliquer ces vitesses initiales apparentes de disparition moins élevées. Ainsi l'équilibre thermodynamique de la réaction est atteint après 64 h dans le cas d'une acylation directe contre 48 h dans le cas d'une trans-acylation. Cependant, le taux de conversion du substrat est, dans les deux cas du même ordre de grandeur. La réaction d'acylation directe est donc, dans ces conditions molaires, une réaction quasi-totale. Il apparaît que les molécules d'eau libérées lors de l'acylation directe dans le milieu réactionnel, n'affectent pas, dans ces conditions molaires, l'équilibre de la réaction. Etant donné que l'acylation directe dans ces conditions expérimentales conduit à un taux de conversion du substrat du même ordre de grandeur que dans le cas d'une trans-acylation, la suite de l'étude privilégiera l'utilisation d'un agent acylant de type acide oléique. Cet acide gras est connu pour sa présence dans l'organisme et sa faible sensibilité à l'oxydation. De plus celui-ci n'est pas soumis aux réactions d'hydrolyse résiduelle comme son homologue ester. Aussi, d'un point de vue analytique, la séparation par CLHP sera simplifiée. Par la suite, la mise en œuvre des réactions en présence d'acide oléique permettra aussi d'étudier précisément l'état d'ionisation des substrats.

5. Etude de l'état d'ionisation des substrats

Lors de la synthèse enzymatique de dérivés acylés en solvants organiques, la mise en présence d'un substrat aminé et d'un acide gras libre conduit souvent à une modification de l'état d'ionisation des deux substrats induisant alors la formation d'un complexe paire d'ions au sein du milieu réactionnel (Maugard *et al.*, 1997b ; Maugard *et al.*, 1998). La formation de ce complexe a été étudiée à différents rapports molaires de substrats dans deux solvants de polarité distincte : le 2-méthyl-2-butanol et l'hexane. L'analyse par spectroscopie IRTF de l'acide oléique dans ces deux solvants organiques met en évidence une bande à 1710 cm^{-1} , caractéristique de la fonction carboxylique. L'ajout de 6-amino-1-hexanol dans le milieu conduit à l'apparition d'une bande à 1566 cm^{-1} , caractéristique de la fonction carboxylate, accompagnée d'une diminution de l'intensité de la bande à 1710 cm^{-1} . Ainsi, ce premier résultat confirme bien la possibilité, pour ces deux composés, de former un complexe ionique

lorsqu'ils sont mis en présence dans des solvants organiques. La figure III.8. présente des spectres infrarouges obtenus en mélangeant ces deux substrats dans diverses proportions. On constate, tout d'abord, que dans les deux solvants organiques utilisés, l'excès de substrat aminé implique que la totalité de l'acide oléique se retrouve sous forme carboxylate. Ceci suggère que le donneur d'acyle dans ces conditions est totalement impliqué dans le complexe paire d'ions et serait, par conséquent, moins disponible. L'utilisation d'un rapport molaire de 1 entre les deux substrats conduit à la présence majoritaire mais non exclusive d'acide sous forme carboxylate dans le 2-méthyl-2-butanol (une partie restant sous forme carboxylique), et exclusivement sous forme carboxylate dans l'hexane. Cette différence peut s'expliquer par le pouvoir dissociant du solvant organique, plus marqué dans le cas d'un solvant polaire tel que le 2-méthyl-2-butanol. Ainsi, la disponibilité du donneur d'acyle serait plus affectée par la formation d'un complexe paire d'ions en solvant organique apolaire, dans l'hypothèse où le complexe ionique formé serait irréversible. Finalement, le rapport molaire permettant de maintenir une proportion importante de molécules d'acide gras sous forme carboxylique est le rapport 0,12 M / 0,24 M. Ainsi, cette étude montre l'avantage d'un excès d'acide gras afin d'aboutir à une bonne disponibilité du donneur d'acyle et un taux de conversion du substrat optimal proche de 100 %.

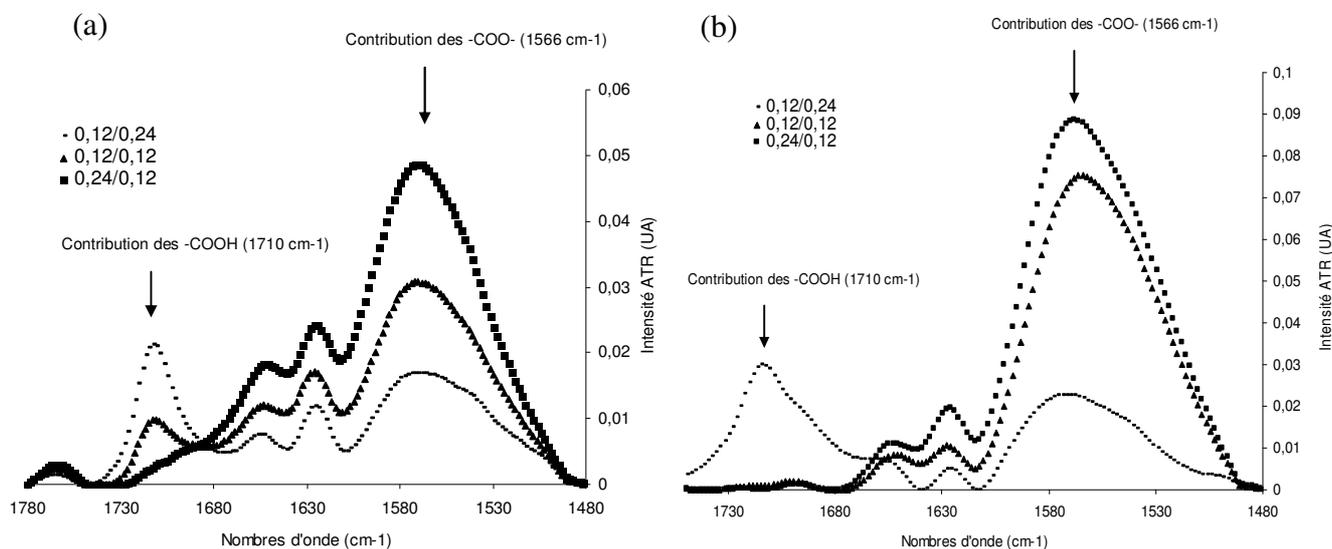


Figure III.8. Spectres infrarouges obtenus après traitement (correction ligne de base, lissage 13 points, normalisation min-max) lors de l'analyse de mélanges de 6-amino-1-hexanol et d'acide oléique à différentes conditions molaires en solvants organiques : (a) 2-méthyl-2-butanol et (b) hexane.

D'après la littérature, ce complexe ionique peut favoriser la solubilisation des substrats lorsque ceux-ci sont insolubles à l'état libre et que le complexe ionique est soluble (Maugard

et al., 1997 ; Jamrozik 2001). Si au contraire, le complexe est non soluble, il peut entraîner une précipitation des substrats et affecter considérablement leur disponibilité (Fernandez-Perez *et al.*, 2001). Dans le cas de l'acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol en présence d'acide oléique dans le 2-méthyl-2-butanol ou dans l'hexane, les substrats et le complexe ionique formé sont parfaitement solubles. Pour vérifier que ce dernier n'affecte pas la réaction, une analyse par spectroscopie infrarouge a été réalisée sur des prélèvements réactionnels au cours de la réaction d'acylation mise en œuvre dans le 2-méthyl-2-butanol et dans l'hexane. On observe que la bande caractéristique des carboxylates diminue au cours du temps et qu'une bande caractéristique de la liaison amide (1660 cm^{-1}) apparaît. Ainsi, le complexe ionique formé dans ces milieux réactionnels se dissocierait au fur et à mesure de la consommation des substrats. Cette réversibilité du complexe expliquerait les taux de conversion du 6-amino-1-hexanol de l'ordre de 90 % lorsque le donneur d'acyle est mis en double excès.

6. Influence du système d'agitation des réacteurs Wheaton® et Syncore®

Une étude comparative des performances de la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol dans deux réacteurs se différenciant de par leur système d'agitation (mécanique pour le réacteur Wheaton® et orbital pour le Syncore®) a été réalisée. L'étude des constantes cinétiques apparentes de disparition du 6-amino-1-hexanol et de l'acide oléique ainsi que la durée de la réaction sont présentés dans le tableau III.3.

Tableau III.3. Comparaison des performances de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence d'acide oléique (0,24 M) catalysée par Novozym 435® dans le 2-méthyl-2-butanol à 55 °C dans deux types de réacteurs.

Réacteurs	Vitesses initiales apparentes de disparition ($\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$)		Durée de la réaction (h)	Taux de conversion de substrat (%)
	6-amino-1-hexanol	Acide oléique		
Wheaton®	120 ± 14	150 ± 11	48	$97,5 \pm 1,5$
Syncore®	12 ± 3	24 ± 4	70	86 ± 5

Les vitesses de disparition des substrats sont beaucoup plus élevées en réacteur Wheaton[®] par rapport à celles obtenues dans le Syncore[®]. Par ailleurs, dans ce dernier, l'équilibre thermodynamique est atteint 22 h plus tard, avec un taux de conversion inférieur à celui obtenu en réacteur Wheaton[®]. Concernant la sélectivité de la réaction, aucune différence caractéristique n'a été mise en évidence. Le procédé enzymatique d'acylation est donc simplement ralenti en réacteur Syncore[®]. Cette limitation des performances de la réaction est très certainement due à une différence de mode d'agitation du milieu réactionnel. L'agitation orbitale du Syncore[®], comparativement à l'agitation mécanique par barreau aimanté du réacteur Wheaton[®] limiterait les chocs efficaces entre les réactifs et induirait une limitation du transfert de masse. Cependant, afin d'étudier l'influence de différents paramètres (biocatalyseurs, milieux réactionnels) sur cette réaction d'acylation, le réacteur Syncore[®] a été privilégié car il offre la possibilité de mener un grand nombre de synthèses en parallèles.

7. Influence du biocatalyseur

Une étude concernant l'influence de l'origine du biocatalyseur sur la sélectivité et les performances de l'acylation du 6-amino-1-hexanol a été réalisée. La réaction d'acylation directe du 6-amino-1-hexanol par l'acide oléique a été mise en œuvre en réacteur Syncore[®] avec un rapport molaire de 1 : 2.

Trois lipases ont été testées : la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435[®]), la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée et la lipase de *Rhizomucor miehei* immobilisée (Lipozyme[®]). Aussi, l'acylase I d'*Aspergillus* immobilisée et l'acyl-transférase de *Candida parapsilosis* sous forme libre ont été testées. Pour ces deux derniers catalyseurs, la réaction est mise en œuvre en milieu aqueux. Ceci représente un intérêt non négligeable dans le cadre de l'étude et du développement de procédés dits « verts ». Les réactions catalysées par les trois lipases sont mises en œuvre en solvant organique polaire (le 2-méthyl-2-butanol) étant donné leur aptitude à catalyser la synthèse de liaison ester et amide en milieu anhydre (Maugard *et al.*, 1998a ; Fernandez-Perez *et al.*, 2001 ; Fernandez-Perez *et al.*, 2003). Concernant l'acylase I d'*Aspergillus*, des études stipulent son aptitude à catalyser des réactions de N ou O-acylation dans des milieux tampon phosphate de concentration comprise entre 50 mM et 200 mM, à pH 8 et à température ambiante (Virsu *et al.*, 2001 ; Youshko *et al.*, 2001). Les conditions d'utilisation (pH, tampon et température) de l'acyl-transférase de *Candida antarctica* pour la mise en œuvre de cette réaction d'acylation sont issues de travaux

concernant l'acylation d'hydroxylamine catalysée par cette enzyme (Fournand *et al.*, 1998 ; Vaysse *et al.*, 2002 ; Brunel *et al.*, 2004). Notons que dans ces milieux aqueux, le donneur d'acyle est introduit sous forme d'émulsion stabilisée par ultrason afin de favoriser une homogénéité du milieu réactionnel. Les résultats de l'analyse quantitative des milieux réactionnels à l'équilibre thermodynamique sont présentés dans le tableau III.4.

Tableau III.4. Comparaison des performances et de la chimio-sélectivité de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol en présence d'acide oléique catalysée par différentes enzymes dans le 2-méthyl-2-butanol ou en milieu aqueux biphasique en réacteur Syncore®.

Milieux réactionnels	Température (°C)	Enzymes	Données quantitatives obtenues à l'équilibre		
			[ester] (mM)	[amide-ester] (mM)	taux de conversion de l'aminohexanol (%)
2-méthyl-2-butanol	55	Novozym 435®	7,5	73	86
2-méthyl-2-butanol	55	Lipozyme®	15	< 1	12
2-méthyl-2-butanol	55	Lipase de <i>P. cepacia</i> immobilisée	41	10	42
Tampon phosphate, pH = 8	25	Acylase I d' <i>Aspergillus</i> immobilisée	3	0	2,5
Tampon phosphate, pH = 6,5	45	Acyl-transférase de <i>C. parapsilosis</i>	34	< 1	28

Tout d'abord, l'enzyme la plus performante lors de ce procédé d'acylation directe est la préparation industrielle Novozym 435® qui permet d'atteindre un taux de conversion du substrat de 86 % en 70 h. Avec ce biocatalyseur, le produit majoritaire synthétisé est le N,O-dioléyl aminohexanol. L'utilisation de la lipase de *P. cepacia* conduit à un taux de conversion de 42 % avec une sélectivité en faveur de la O-acylation. Le biocatalyseur Lipozyme® ne semble pas adéquat pour catalyser cette réaction puisque le taux de conversion du substrat reste très faible. La sélectivité est en faveur de la O-acylation avec cette enzyme. Ainsi, parmi les trois lipases mises en œuvre en solvant organique pour catalyser l'acylation du 6-amino-1-hexanol, seule la lipase B de *Candida antarctica* se montre réellement performante. Par ailleurs, l'acylase I d'*Aspergillus* ne conduit pas à un taux de conversion du substrat significatif. Par contre, l'acyl-transférase de *Candida parapsilosis* convertit 28 % du substrat en ester exclusivement. Ceci constitue un résultat prometteur pour l'acylation de dipeptides polaires, principalement solubles en milieux aqueux.

Aucun de ces catalyseurs n'a permis la synthèse du composé N-acylé alors que l'acyl-transférase est, dans la littérature, décrite comme étant apte à catalyser spécifiquement la N-acylation d'hydroxylamine (Vaysse *et al.*, 1997).

8. Obtention sélective du composé N-acylé

L'objectif de cette étude est de voir s'il est possible d'obtenir sélectivement le composé N-acylé à partir de l'hydrolyse du composé N,O-diacylé, compte tenu de la spécificité de la lipase B de *Candida antarctica*. En fin de synthèse, la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol catalysée par Novozym 435[®] dans le 2-méthyl-2-butanol conduit exclusivement à la production du composé N,O-diacylé. Une fois l'équilibre thermodynamique atteint, la réhydratation du milieu réactionnel devrait orienter l'activité enzymatique vers l'hydrolyse et permettre l'obtention en composé N-acylé. Pour la mise au point de cette étude, la démarche suivante a été suivie. Des tests de miscibilité entre le 2-méthyl-2-butanol et l'eau ont été réalisés afin de déterminer la proportion maximale d'eau à introduire dans le milieu sans induire une séparation de phase. Il a été ainsi démontré que l'hydratation de ce milieu à hauteur de 14 % était le seuil d'homogénéité de ce système.

Une première expérience a consisté à étudier l'hydrolyse du composé N,O-diacylé par Novozym 435[®] dans le milieu 2-méthyl-2-butanol (86 %) / eau (14 %) à 55 °C. Après 24 heures de réaction, l'analyse qualitative par CCM du milieu réactionnel montre qu'aucune hydrolyse ne se produit. Le suivi quantitatif du substrat N,O-dioléyl aminohexanol, présenté dans la figure III.9. confirme bien ce résultat.

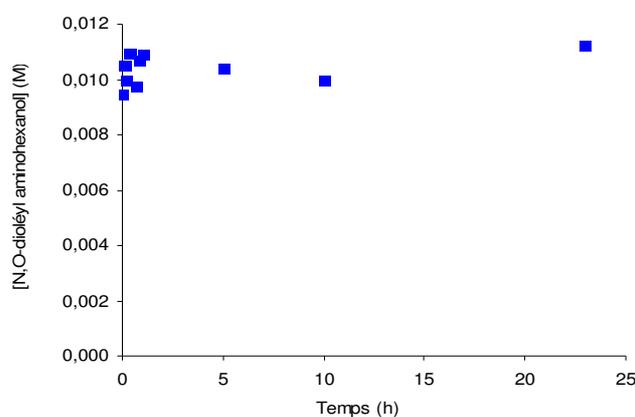


Figure III.9. Suivi cinétique relatif à la réaction enzymatique d'hydrolyse du N,O-dioléyl aminohexanol (0,01 M) en biocatalysée par Novozym 435[®] à 55 °C dans le 2-méthyl-2-butanol/eau (86/14, v/v).

La figure III.9. confirme l'absence d'hydrolyse du N,O-dioléyl aminohexanol. Ceci démontre l'incapacité de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée à catalyser l'hydrolyse de la liaison ester du composé N,O-diacylé. La lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée, hydrolase spécifique de la liaison ester a été également utilisée dans les conditions réactionnelles décrites ci-dessus. Cependant, la réaction d'hydrolyse n'a pas non plus été mise

en évidence après 24 h d'incubation à 55 °C dans ce système réactionnel. Le produit N,O-diacylé est donc un produit stable et non hydrolysable dans les conditions réactionnelles étudiées. Ainsi, la réaction permettant la synthèse du composé N,O-diacylé à partir du O-acylé peut être considérée comme une réaction irréversible dans ce système réactionnel. Suite à ce résultat, l'hydrolyse du composé O-acylé dans les conditions réactionnelles décrites ci-dessus a été vérifiée (figure III.10.)

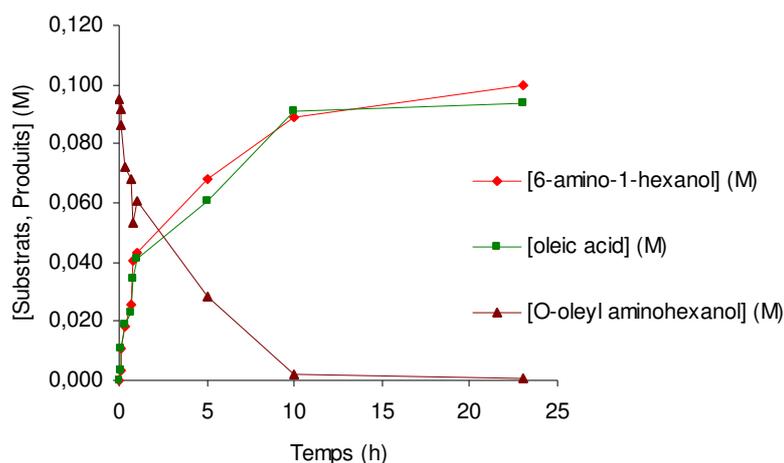


Figure III.10. Suivis cinétiques relatifs à la réaction enzymatique d'hydrolyse du O-oléyl aminohexanol (0,095 M) biocatalysée par Novozym 435® à 55 °C dans le milieu 2-méthyl-2-butanol / eau (86/14 v/v).

Les courbes cinétiques mettent en évidence que l'hydrolyse du composé O-acylé est totale et que l'équilibre thermodynamique est atteint au bout de 10 h de réaction. La vitesse initiale d'hydrolyse de ce composé est de 78 mM.h⁻¹. La réaction de O-acylation du 6-amino-1-hexanol dans ces conditions réactionnelles est donc une réaction réversible.

9. Conclusion de l'étude préliminaire

Cette étude préliminaire a permis de démontrer la faisabilité de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol, soit par l'oléate d'éthyle, soit par l'acide oléique dans le 2-méthyl-2-butanol à 55 °C catalysée par différentes enzymes et de caractériser les paramètres majeurs régissant cette réaction. La lipase B de *Candida antarctica* s'est avérée la plus performante pour cette réaction mais n'exprime pas, dans ces conditions, une propriété de chimio-sélectivité vis-à-vis de la fonction hydroxyle ou de la fonction amine. Cette réaction est caractérisée par la synthèse du composé O-acylé qui s'accumule au cours des premières heures de la réaction et du composé N,O-diacylé majoritaire une fois l'équilibre

thermodynamique atteint. Ce dernier composé est insensible à l'activité hydrolytique de la lipase B de *Candida antarctica* et de la lipase de *Pseudomonas cepacia*. Ceci suggère que l'étape réactionnelle permettant de synthétiser le N,O-diacylé à partir du O-acylé est irréversible. La trans-acylation est cinétiquement plus performante que l'acylation directe. Cependant, un taux de conversion du substrat du même ordre de grandeur est obtenu à l'équilibre thermodynamique pour ces deux types de réactions. L'acylation directe sera tout de même privilégiée car elle permet de s'affranchir de l'hydrolyse résiduelle du donneur d'acyle. L'étude de l'influence du rapport molaire des substrats a montré que les performances de la réaction (vitesse et taux de conversion du substrat) sont maximales pour un rapport molaire (6-amino-1-hexanol/agent acylant) de 1/2. Il a été aussi montré que de telles conditions molaires favorisent la présence de l'acide oléique sous forme libre, indépendamment de la polarité du solvant organique.

IV. Influence du milieu réactionnel sur la N,O-acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol.

1. Introduction

Dans le domaine des bioconversions et particulièrement celui de la N ou O-acylation de biomolécules, une diversité de milieux réactionnels émerge et présente des potentialités intéressantes telles que la solubilisation de composés polaires et l'amélioration de la sélectivité et de l'efficacité enzymatique. Après avoir vérifié la réalisation de l'acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol en solvant organique, il semblait pertinent d'étudier l'influence du milieu réactionnel sur les performances et la sélectivité de la réaction d'acylation directe de cette molécule bifonctionnelle. L'étude qui suit est présentée sous forme d'article publié dans « Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic » en 2008 (Vol 55 ; p 110-117). Dans cette étude, différents milieux réactionnels sont utilisés pour la mise en œuvre de la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol catalysée par la lipase de *Candida antarctica* immobilisée : solvants organiques aux polarités bien distinctes, systèmes sans solvant et liquides ioniques. L'impact de ces milieux sur la sélectivité et sur les performances de la réaction est décrit de manière exhaustive. Plus précisément, ce travail a pour but, dans un premier temps, d'étudier l'effet de la nature du milieu réactionnel (polarité, pouvoir dissociant) sur la disponibilité des substrats influençant directement l'efficacité de la réaction enzymatique d'acylation. Dans un deuxième temps, l'influence du milieu réactionnel sur l'état d'ionisation des substrats et sur la réactivité de leurs groupes fonctionnels a été abordée afin de comprendre la chimio-sélectivité de la réaction observée dans les différents milieux. Enfin, l'utilisation de cinq liquides ioniques a pour but d'étudier précisément l'importance de leurs cations et anions constitutifs et leur influence sur la capacité à améliorer l'efficacité et la sélectivité de l'acylation.

2. Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids.

Eric HUSSON^a, Catherine HUMEAU^b, Fabrice BLANCHARD^a, Xavier FRAMBOISIER^a,
Ivan MARC^a, Isabelle CHEVALOT^a.

^aLSGC, Nancy Université, CNRS, 2 avenue de la forêt de Haye- 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

^bLBB, Nancy Université, 2 avenue de la forêt de Haye- 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Corresponding authors: Isabelle.Chevalot@ensaia.inpl-nancy.fr

Tel: +33 383 595 795

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2008) 55: p110-117.

Abstract.

The chemo-selectivity and the efficiency of the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol have been studied in organic solvents distinct by their nature and their dissociation power, in solvent-free systems corresponding to free fatty acid or ethyl ester media and in different ionic liquids. In organic solvents and fatty acid ester media, a sequential reaction allowed the major production of the diacylated derivative at the equilibrium state. Conversely, the use of a solvent-free system with free fatty acid orientated the reaction exclusively towards the O-acylation by modifying the ionization state of the amino group and decreased the reaction time to reach the equilibrium state. Ionic liquids as 1-butyl-3-methyl imidazolium cation coupled with anions of low nucleophilicity significantly improved the efficiency of the reaction (substrate conversion and initial rate) and led also to the N,O-diacyl product. The nature of the reaction medium was shown to influence the ionization state of functional groups, then their capacity to react, and finally, the efficiency of the reaction.

Keywords: chemo-selectivity, acylation, lipase, ionic liquid, ion-pair complex.

1. Introduction.

Acylation reaction provides an excellent method to obtain more apolar derivatives of polar biomolecules. Covalent attachment of fatty acids to proteins or peptides is recognized as a common way for protein/peptide modification which has been shown to influence interaction with membranes [1, 2]. For instance, short acylated peptides are able to deeply insert into the hydrophobic core of phospholipids [3]. Generally, peptides are polyfunctional molecules depending on the constitutive amino acids and the major difficulty for the acylation of their nucleophilic sites is the control of the N- and/or O-selectivity. Different methods of synthesis of such acylated molecules have been developed mainly based on chemical reactions [1, 4, 5]. These usually lead to the formation of undesirable by-products and mixtures of products with various substitution degrees. For these reasons, biocatalysts with high specificity and selectivity are recognized as appropriate alternatives to catalyze specific acylation reactions of polyfunctional molecules [6]. In the literature, lipases (EC 3.1.1.3) are commonly used to catalyze ester or amide bond synthesis [6-12]. Few studies concern the enzymatic acylation of bifunctional molecules exhibiting both amino and hydroxyl groups in organic solvents as ethanolamine, diethanolamine, serine, and amino alcohols with variable carbon chain length like 3-amino-3-phenylpropanol [7-9, 13, 14]. In such reactions, the enzyme catalyzed the O-acylation which is followed by a chemical migration of the acyl group from the hydroxyl function to the amine function [13]. The transfer seems to be more difficult when both reactional groups (amine/hydroxyl) are spaced out three carbon or more apart [7-9]. The enzymatic acylation of amino substrate by fatty acid in organic solvent generally leads to the formation of an ion-pair complex between these two molecules depending on the acido-basic conditions of the medium. This latter plays an important role for the transfer of the hydrophilic substrate into the reaction medium [8]. The control of the fatty acid/aminoalcohol molar ratio is essential because it determines the protonation state of ionizable groups of the substrates and their availability. The solvent-free system is a convenient way to avoid the use of organic solvents which are substituted by an excess of acyl donor. Irimescu et al. [15] demonstrated, for the first time, the synthesis of amide bond under solvent-free conditions by the direct lipase-catalyzed reaction of amines with carboxylic acids for kinetic resolution of primary amines. Their results indicated that the rate of the N-enzymatic acylation in a solvent-free system is reduced due to the formation of an unreactive ion-pair complex which limits the availability of the substrate. Tufvesson et al. [16] limited the ion-pair complex formation by adding the amino alcohol progressively and by removing

the water formed during the direct acylation. This method mainly orientated the selectivity of the enzymatic acylation towards the amide synthesis. Ionic liquids have recently emerged to replace organic solvents in biocatalytic transformations especially in the case of polar substrates that are difficult to dissolve in conventional media [17]. These media were used to perform both esters and amides synthesis [12, 18, 19]. They present unique properties as no vapour pressure, capacity to be recycled and to prevent thermal deactivation of enzymes [20, 21]. These media may improve the efficiency of acylation reactions catalyzed by lipases [22-25]. Moreover, they can influence the selectivity for the acylation of polyfunctional substrates in favour of monoacylated products [26]. For instance, a recent study demonstrated that the enzymatic acylation of ethane-1,2-diol in ionic liquids allowed to obtain exclusively the corresponding monoester with a very high yield compared to conventional media [27].

The purpose of the present work was to study the chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation of a bifunctional molecule exhibiting both an amino and a hydroxyl group spaced out of more than three carbons, 6-amino-1-hexanol, by oleic acid or its corresponding ethyl ester. This reaction was catalyzed by an immobilized lipase B of *Candida antarctica* and was firstly performed in organic solvents. The formation of the ion-pair complex between the two substrates was studied and correlated to the chemo-selectivity and the efficiency of the reaction (initial rate, reaction duration, yield). Other reaction media like solvent-free system and ionic liquids were used to understand the influence of the reaction environment on performances and selectivity of the reaction.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and enzyme.

6-Amino-1-hexanol (97 %) and oleic acid (99 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Novozym 435[®] (a lipase B from *Candida antarctica* immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU.g⁻¹ and protein grade of [1-10 %] was from Novo Nordisk A/S (Bagsraerd, Danmark). 2-Methyl-2-butanol, hexane, 1-butanol, acetic acid, methanol, chloroform and trifluoroacetic acid (TFA) with 99 % of purity were acquired from Carlo Erba (Rodano, Spain). 1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim]⁺[PF₆]⁻) (99 %), 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([Bmim]⁺[BF₄]⁻) (98 %) and 1-butyl-3-methylimidazolium dicyanimides ([Bmim]⁺[N(CN)₂]⁻) (98 %) were produced by Solvionic SA (Verniole, France). 1-Ethyl-3-methyl-imidazolium-

ethylsulfate ([Emim]⁺[EtSO₄]⁻) (98 %) and cocosalkyl pentaethoxy-methyl ammonium methosulfate (ECOENGTM500) (98 %) were purchased from Solvent Innovation (Köln, Germany).

2.2. Solubility of 6-amino-1-hexanol

The solubility of 6-amino-1-hexanol in different media was determined at 55 °C as follows: 3 mL of the medium of interest was saturated with the corresponding solid substrate overnight. An aliquot of the supernatant was taken out and filtered then diluted 1000 times with a mixture of methanol/TFA (100/0.1 v/v) and subsequently quantified by HPLC. The solubility of the substrate in the different reaction media and their respective viscosity were indicated in table 1.

Table 1. Solubility of 6-amino-1-hexanol at 55 °C, in reaction media used for the enzymatic acylation and their respective viscosity at 25 °C.

Reactional media	6-Amino-1-hexanol solubility (g/L)	Viscosity* (mPa.s)
2-Methyl-2-butanol	188	5.1
Hexane	149	0.3
Oleic acid	276	27.6
Ethyl oleate	288	37.4
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	293	287.5
[Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻	254	104.2
[Bmim] ⁺ [N(CN) ₂] ⁻	173	50.2
[Emim] ⁺ [EtSO ₄] ⁻	251	109.2
ECOENG TM 500	123	3000.6

*Merck index

2.3. Acylation procedure.

The enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol in ionic liquids, solvent-free systems as well as in organic solvents was carried out in stirred flasks. In a typical acylation reaction, 6-amino-1-hexanol (0.12 M) and oleic acid or ethyl oleate (0.24 M) were added in 1 mL of ionic liquid or organic solvent previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. The initial water activity of the media was determined by a thermoconstanter Novasina[®], (Switzerland). In all cases, the flasks were incubated in a Syncore[®] parallel reactors (Büchi) equipped with a condensation system to prevent the evaporation of the solvent. In the case of hexane, an internal chemically inert standard was used (2,6-dimethylphenol at 2 g/L). Reactions were

stirred at 250 rpm and heated at 55 °C. After the dissolution of the substrates for 12 h, the acylation of 6-amino-1-hexanol was started by the addition of 10 g/L of lipase preparation. Control experiments without enzyme were also carried out. In the case of organic media, samples were withdrawn and analyzed. Concerning the ionic liquids, various flasks containing the same concentration of reactants and enzyme were prepared and incubated in the same conditions as described before. At different times, the reaction media were withdrawn in order to determine the reaction progress.

Then, the enzyme was removed by filtration and the reaction mixture was diluted with methanol/TFA (100/0.1 v/v). The substrates and the products of the reaction were separated and quantified by HPLC.

To validate the repeatability of the experiments, each reaction was repeated three times. Initial rates and substrate conversion yields are expressed as mean values with standard deviations (\pm).

2.4. Analytical methods.

2.4.1. Qualitative analyses by TLC.

Qualitative analyses of the reaction media by TLC were realized on precoated Kieselgel G 60 plates 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Germany). Two distinct mobile phases were used: butanol (60 %) / acetic acid (20 %) / water (20 %) that permitted to separate with a high resolution 6-amino-1-hexanol from the monoester product (but the more apolar compounds were not separated). Chloroform (95 %) / acetic acid (0.5 %) / methanol (4.5 %) allowed to separate the amide-ester product from the acyl donor.

The molecules exhibiting a primary amino group were detected by spraying an ethanol solution of ninhydrin (0.01 %). Other molecules were revealed by spraying an aqueous solution of KMnO_4 (0.1 M).

2.4.2. Quantitative analyses by HPLC.

The time course of each reaction was monitored using HPLC (LC 10 AD – VP, Shimadzu, France) equipped with an UV detector at 214 nm and a light-scattering low temperature evaporative detector (Shimadzu, France) in this order. The column was a newly developed C18 amide 125-2.1 mm (Altima[®], Altech, France) maintained at 25 °C. The mobile phase (0.2 mL/mn flow rate) consisted in methanol/water/TFA (80/20/0.1 v/v/v). A linear elution gradient was applied to reach methanol/TFA (100/0.1 v/v) after 5 minutes. This

methanol concentration was maintained for 18 minutes and progressively decreased to reach the initial methanol/water ratio until the end of the run (i.e. 34 min). Calibrations were performed using standard substrates and purified products. The substrate conversion rate at the thermodynamic equilibrium was determined applying the following equation:

$$r(\%) = (1 - ([\text{substrate}]_{\text{equilibrium}} / [\text{substrate}]_{\text{initial}})) \times 100.$$

Initial rates of reaction were calculated using a second order polynomial model applied to the derivatives of the five first experimental data exhibited in the figures (Software: Matlab®, MathWorks, E.U.).

When ionic liquids were not miscible to the HPLC mobile phase or interfered with the chromatograms, a preliminary extraction with hexane was applied.

The partition coefficients between ionic liquid and hexane have been determined for all compounds (substrate, acyl donor and acylated products) using the following procedure: a solution of ionic liquids with a known concentration of each compound was prepared and then extracted in hexane (5 v/v). Hexane was evaporated and the residue was solubilized in methanol, and then quantified by HPLC. The partition coefficients were defined as the ratio of final quantity to initial quantity and were mentioned in table 2. They were used to correct the concentration values.

Table 2. Partition coefficients of substrates and products in ionic liquid/hexane biphasic systems at room temperature.

Ionic liquids	Partition coefficients in hexane			
	6-Amino-1-hexanol	Oleic acid	Ester product	Amide ester product
ECOENG™ 500	0.85	0.95	0.89	0.90
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	0.90	0.99	0.96	0.98
[Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻	0.73	0.87	0.88	0.87

2.5. Purification of acylated products.

2.5.1. O-oleylaminohexanol.

After filtration of the reaction medium to remove the enzyme and partial evaporation of the solvent, the residue was applied to a silica gel column (Silica Gel 60, 230-400 mesh-Merck, Darmstadt, Germany) and eluted with butanol/acetic acid/water (60/20/20 v/v/v). Fractions were collected then analyzed by TLC (precoated Kieselgel 60 plate 20 x 20 cm (Merck)). The fractions containing the O-oleylproduct were washed with water until neutrality. To favour the neutral form of the amino group, a last wash with an alkaline aqueous solution (pH = 13) was carried out. The solvent was evaporated under reduced pressure.

2.5.2. N,O-dioleylaminohexanol.

After elimination of the enzyme, the reaction medium was concentrated by the partial evaporation of the solvent and then applied to a preparative TLC plate coated with Kieselgel 60. The mixture was developed with chloroform/acetic acid/methanol (95/0.5/4.5). A short portion of the migration band containing the N,O-dioleylaminohexanol was detected by spraying a KMnO_4 solution. The silica was collected and the amide-ester was solubilized in methanol. Silica was eliminated by filtration and methanol was evaporated under reduced pressure.

2.6. Identification of purified products

2.6.1. Electrospray ionization mass spectrometry analysis.

The mass of the monoacylated product was verified on a SCIEX API 150 EX mass spectrometer with electron spray ionization source. MS analysis was carried out with helium as the collision gas. MS parameters were tuned as following: positive and negative ionization mode, capillary temperature of 150 °C, source voltage at 5.0 kV. The positive ion ESI mass spectra were obtained by spraying the sample in methanol/water (1/1), at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Mass spectra were acquired by scanning a m/z range from 100 to 2000. O-oleylaminohexanol, MS spectra; $m/z = 382 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\text{M} + \text{H}^+$); $m/z = 405 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\text{M} + \text{Na}^+$).

2.6.2. Nuclear magnetic resonance.

The chemical structure of the purified acylated products was determined by ^{13}C NMR and ^1H NMR spectroscopic analysis in CDCl_3 on a Brücker, 300 MHz, 7.1 T spectrometer (Germany), m: multiplet, br t: broad triplet. O-oleylaminohexanol: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.50 (m, $-\text{CH}_2-$ of 6-amino-1-hexanol), 2.30 (t, $J = 7.25$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CO-O-}$), 3.00 (br t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 4.05 (t, $J = 6.65$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$), 5.34 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH-}$). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 14.77 (1C, $-\text{CH}_3$), 23.35 (1C, $\text{CH}_3\text{-CH}_2-$), 25.65-32.58 (multiple pics, $-\text{CH}_2-$ of oleyl chain), 35.02 (1C, $-\text{CH}_2\text{-CO-O-}$), 40.57 (1C, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 64.63 (1C, $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$), 130.68 (2C, $-\text{C}=\text{C-}$), 174.69 (1C, $-\text{CO-O-}$). N,O-dioleoylaminohexanol: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 0.81 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, 2 x CH_3), 1.29 (m, $-\text{CH}_2-$), 1.48 (m, $-\text{CH}_2-$), 1.75 (m, 8H, 2 x $-\text{CH}_2\text{-C}=\text{C-CH}_2-$), 1.93 (t, $J = 7.26$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CO-NH-}$), 2.10 (t, $J = 7.25$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO-O-}$). 3.19 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N-CO-}$), 4.24 (t, $J = 6.65$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$), 5.27 (m, 4H, 2x $-\text{CH}=\text{CH-}$), 5.43 (br t, 1H, $-\text{NH-CO-}$). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{ppm} : 14.79 (2C, $-\text{CH}_3$), 23.37 (2C, $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 25.94-33.19 (multiple pics, $-\text{CH}_2-$), 35.09 (1C, $-\text{CH}_2\text{-CO-O-}$), 37.45 (1C, $-\text{CH}_2\text{-CO-NH-}$), 40.10 (1C, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$), 63.36 (1C, $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$), 130.57 (4C, $-\text{CH}=\text{CH-}$), 174.2 (2C, $-\text{CO-O-}$ and $-\text{CO-NH-}$).

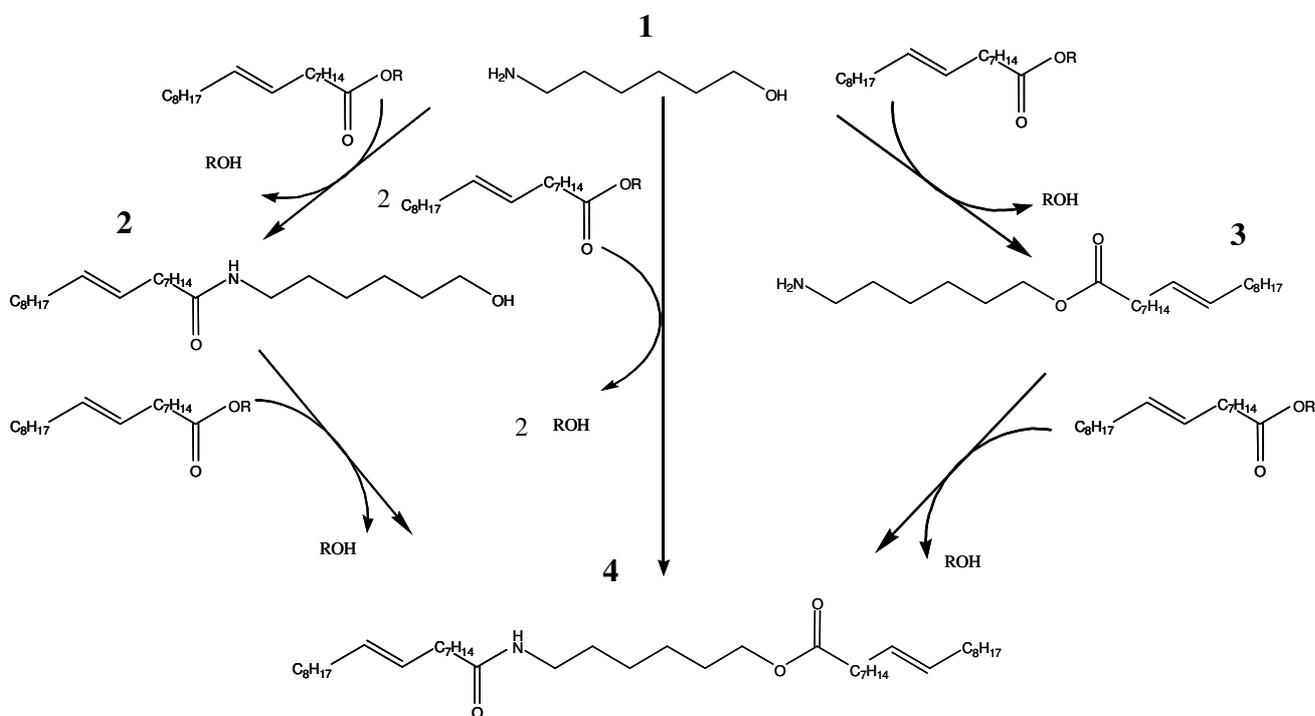
2.7. Study of the ionization state of the substrates in organic solvents.

The ionization state of 6-amino-1-hexanol and oleic acid during the acylation in 2-methyl-2-butanol was investigated by infrared spectroscopy (FTIR). The infrared (IR) spectra of samples were recorded from 400 to 4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} using a Brücker TENSOR 27 spectrometer and a total attenuated reflexion cell thermostated at 55 °C. Before the interpretation of data, a treatment (base line correction, smoothing and normalization min-max) was applied to the spectra.

3. Results and discussion.

6-Amino-1-hexanol is a bifunctional molecule with a hydroxyl group (primary alcohol) and an amino group (primary amine). Acylation possibilities of this substrate by oleic acid or ethyl oleate are presented in the figure 1. According to previous works using Novozym 435[®] in a wide range of temperature, enzymatic acylation reactions were carried out at 55 °C [7, 8, 28]. As an excess of acyl donor appeared to improve the catalytic activity, the molar ratio acyl donor to acceptor in this study was set to 2 [29].

No product was obtained in media containing 6-amino-1-hexanol and the acyl donor (oleic acid and ethyl oleate) at 55 °C, in absence of enzyme.



R: -H or -CH₂CH₃

Figure 1. Acylation possibilities of 6-amino-1-hexanol.

1: 6-amino-1-hexanol, 2: N-oleyl product, 3: O-oleyl product, 4: N,O-dioleoyl product.

3.1. N,O-enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol in organic solvents.

The N,O-enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol was studied in two organic solvents which exhibited different physicochemical properties: the 2-methyl-2-butanol is a protic and polar solvent with a log P value of 1.31 and a dielectric constant of 32.6 μS.cm⁻¹.

Hexane is an aprotic and apolar solvent ($\log P = 3.4$ and $\epsilon = 1.89 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). The solubility of 6-amino-1-hexanol in 2-methyl-2-butanol and in hexane at 55 °C is indicated in table 1 and showed that at 0.12 M, the substrate is totally solubilized in both solvents. According to the distinct physicochemical properties of these two solvents, the objectives were to study the ionization state of the substrates in these two reaction media, then its influence on the efficiency and the selectivity of the enzymatic acylation.

3.1.1. Qualitative analyses of the reaction media.

Several studies reported that in apolar media, the ionization state of substrates and the ionization state of the enzyme microenvironment can play an important role in reactions catalyzed by the immobilized lipase B of *Candida Antarctica*. Maugard et al. [30] showed that the formation of an ion-pair complex was important to favour enzymatic acylation especially in the case of insoluble substrate. However, when this ion-pair complex was less soluble than the free substrate, its presence constituted the limiting factor of the reaction.

To verify the presence of this ion-pair complex in both solvents, FTIR analyses were performed during the course of 6-amino-1-hexanol acylation. The IR spectrum of oleic acid solubilized in 2-methyl-2-butanol or in hexane at 55 °C exhibited a band at 1710 cm^{-1} which is specific of carboxylic acid function. When 6-amino-1-hexanol was added in the medium, this band diminished and a new band was detected at 1566 cm^{-1} corresponding to the carboxylate ion. This observation demonstrated that an ion-pair complex was formed when both substrates are mixed in the media as already observed in other studies [29, 30]. Before the addition of the enzyme, the majority of the substrates was under soluble ionic complex form. During the reaction the bands at 1566 cm^{-1} and at 1710 cm^{-1} diminished and a band at 1660 cm^{-1} appeared which is specific of the amide bond. In the present study, the free 6-amino-1-hexanol was totally soluble in both organic solvents and the results suggested that the soluble ionic complex did not limit the synthesis of acylated products. The availability of the amino substrate was probably influenced by the nature of the solvent, especially by its dissociating efficiency.

The time course of the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol in 2-methyl-2-butanol and in hexane was preliminary analyzed by TLC. This qualitative approach showed the rapid transformation of 6-amino-1-hexanol in favour of the synthesis of two more hydrophobic products. The first one exhibited a free amino group and was rapidly converted into a more apolar product without any free amino group. These results indicated the

sequential synthesis of two products which can result from the O-acylation of 6-amino-1-hexanol, then the N-acylation of the O-acyl product (figure 1: molecules 1, 3 and 4).

The purification and the structural elucidation by mass spectroscopy and NMR analyses confirmed the identity of these products.

3.1.2. Quantitative analysis of the reaction media.

The kinetic curves relative to the acylation reaction in organic solvents showed that the conversion of 6-amino-1-hexanol, after 70 h of reaction, was $86 \pm 5 \%$ and $69 \pm 3 \%$ in 2-methyl-2-butanol and in hexane, respectively (figure 2a and 2b).

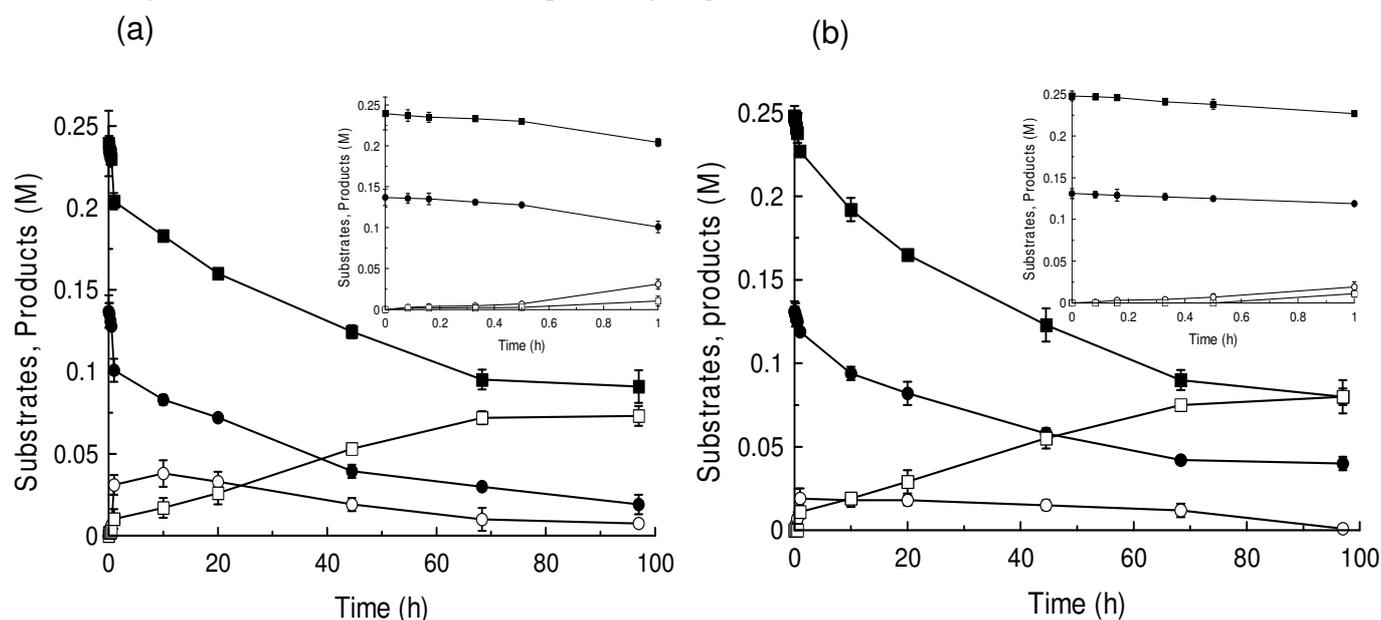


Figure 2. Kinetic curves related to the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol (0.12 M) by oleic acid (0.24 M) in 2-methyl-2-butanol (a) and in hexane (b). Reactions were carried out at 55 °C and catalyzed by Novozym 435[®]. -●- 6-amino-1-hexanol, -■- oleic acid, -○- O-oleylaminohexanol, -□- N,O-dioleylaminohexanol.

At the thermodynamic equilibrium, the major product was the N,O-diacyl product. The initial rates of synthesis demonstrated that the O-acyl product was firstly synthesized and accumulated with an initial rate of $14 \pm 3 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ in 2-methyl-2-butanol and $10 \pm 5 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ in hexane, then followed by the N,O-diacyl product ($7 \pm 1 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ in 2-methyl-2-butanol versus $1 \pm 0.8 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ in hexane). The amide product was never detected (figure 1: molecule 2). The kinetic profiles showed that the selectivity of the reaction observed in 2-methyl-2-butanol was similar than in hexane. The less conversion of 6-amino-1-hexanol in hexane may be explained by the low dissociating effect of this solvent leading to the increase of the ion-pair complex stability and consequently the decrease of the 6-amino-1-hexanol availability.

Other studies reported that during the enzymatic acylation of short bifunctional molecules, the O-acyl product was never detected [7-9]. This result was attributed to the migration of the acyl residue between the amino and hydroxyl groups. 6-Amino-1-hexanol structure constituted by two functional groups distant of 6 carbons prevents the acyl-transfer explaining the absence of the amide product [13]. Another explanation can be that the N-acylated product was synthesized but immediately converted into the N,O-diacyl product.

O-oleyl-aminohexanol was purified and was shown to be stable. This study demonstrated that Novozym 435[®] exhibited a reaction selectivity favouring the O-acylation in comparison with the N-acylation. This result is in agreement with other studies [8].

In order to study the specificity of the enzyme forward the O-acylated product in comparison with 6-amino-1-hexanol, the enzymatic acylation of O-oleyl-aminohexanol (6 mM) by oleic acid (12 mM) catalyzed by Novozym 435[®] was carried out. An enzymatic acylation using 6-amino-1-hexanol as substrate in the same conditions was performed as a reference. The kinetic curves of these two reactions showed a higher initial rate ($13 \pm 2 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$, figure 3a) for the O-oleyl-aminohexanol transformation in comparison with that of 6-amino-1-hexanol ($2 \pm 1 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$, figure 3b).

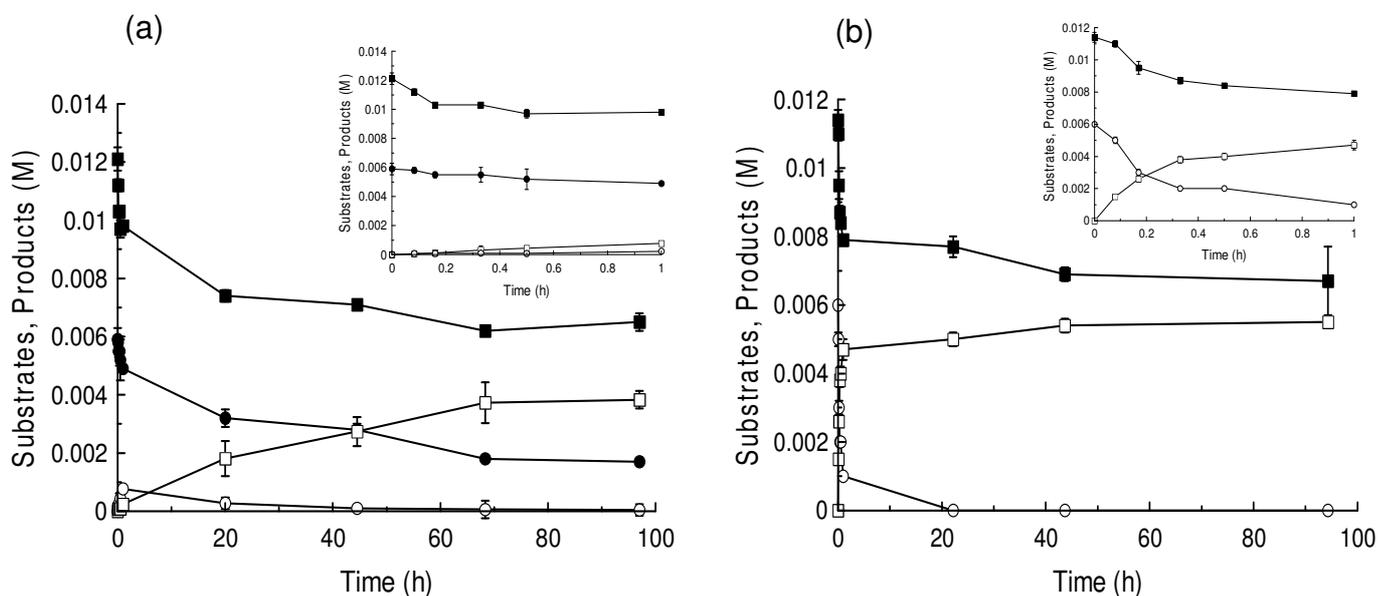


Figure 3. Kinetic curves related to the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol (0.006 M) by oleic acid (0.012 M) (2a) and the enzymatic acylation of O-oleylaminohexanol (0.006 M) by oleic acid (0.012 M) (2b) in 2-methyl-2-butanol. Reactions were carried out at 55 °C and catalyzed by Novozym 435[®]. -●- 6-amino-1-hexanol, -■- oleic acid, -○- O-oleylaminohexanol, -□- N,O-dioleylaminohexanol.

This study demonstrated that during the course of the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol, a competition between the initial substrate and the O-acyl product occurred

suggesting that the lipase B of *C. antarctica* exhibited a higher specificity for the O-acyl substrate in comparison with the unacylated molecule.

3.2. N,O-enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol in solvent-free system.

In such media, the acyl donor was introduced in a large excess and replaced the solvent. These conditions are expected to favour the displacement of the equilibrium towards the synthesis. The N,O-enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol in oleic acid and in ethyl oleate was carried out. At 55 °C, the total solubilisation of 6-amino-1-hexanol in oleic acid and in ethyl oleate (table 1) was observed (0.12 M). The initial a_w was inferior to 0.1.

Figure 4a showed that the thermodynamic equilibrium of the acylation in oleic acid was reached in 20 h only. The initial rates of the ester and the diacyl product syntheses ($64 \pm 2 \text{ mM.h}^{-1}$ and $11 \pm 1 \text{ mM.h}^{-1}$ respectively) were much higher than those obtained in organic media. The conversion of the substrate was close to 100 %. Conversely to the organic solvents, the O-acyl product was slightly transformed and only few N,O-diacyl product was detected. This result was probably due to the acidity of the medium leading to the protonation of the amino group which lost its nucleophilic property. Furthermore, the excess of fatty acid may enhance the stability of the ion-pair complex. For this reason, these reaction conditions allowed the chemo-selectivity in favour of the O-acylation, while the use of organic solvents led to the major N,O-diacyl product.

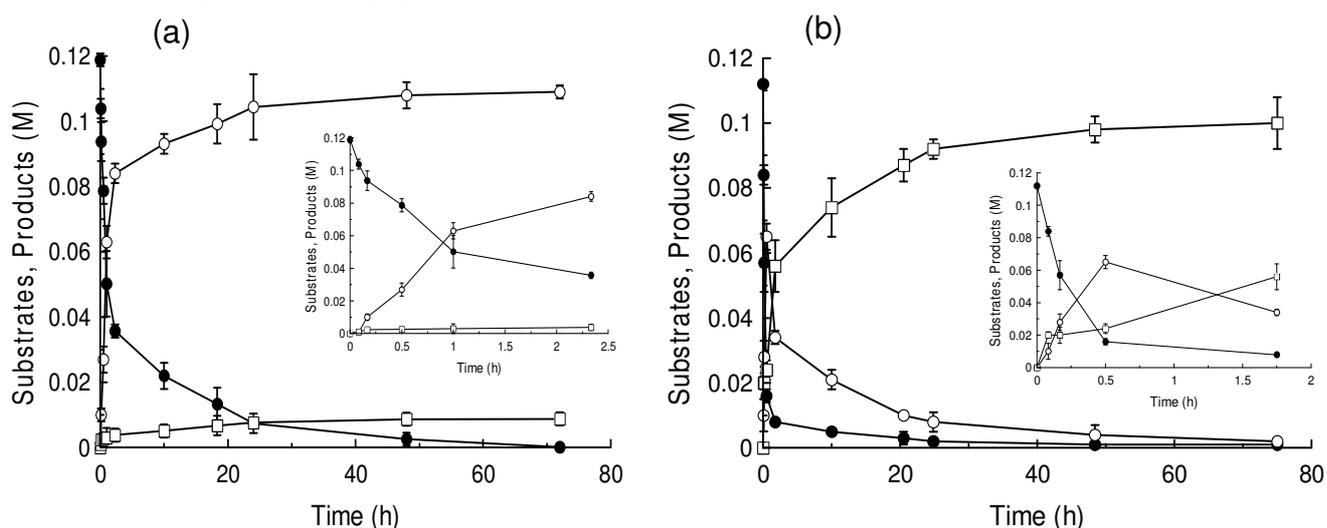


Figure 4. Kinetic curves related to the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol (0.12 M) by oleic acid (a) and ethyl oleate (b) in a solvent-free system. Reactions were carried out at 55 °C and catalyzed by Novozym 435[®]. - ●- 6-amino-1-hexanol, -○- O-oleylaminohexanol, -□- N,O-dioleylaminohexanol.

To verify the influence of the protonation state of the substrate on the selectivity, the N,O-enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol was carried out in ethyl oleate. In this case, the acyl donor was not able to protonate the amino function of the substrate. Figure 4b showed that the major product obtained at the equilibrium (reached in 50 h) was the N,O-diacylated product (initial rate of synthesis: $48 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$). The absence of chemo-selectivity was also observed as in organic solvents. These kinetic profiles suggested that in ethyl oleate, the amino group was not majoritary protonated and the trans-amidification of the O-acyl product was possible.

In conclusion, using solvent-free systems, it was possible to direct the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol either towards the O-acylation or the N,O-acylation depending on the nature of the acyl donor (free fatty acid or ester) .

3.3. N,O-enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol in ionic liquids.

In the present work, five different ionic liquids were used to investigate their ability to improve the N,O-enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol and compare the selectivity with that obtained in organic solvents.

Table 1 showed that, for all ionic liquids used, the solubility of 6-amino-1-hexanol (0.12 M or 14 g/L) was total.

3.3.1. Ionic liquids with constitutive sulphate anion.

Table 3 presented the substrate conversion obtained at the equilibrium in the five ionic liquids tested. For the ionic liquids $[\text{Emim}]^+[\text{EtSO}_4]^-$ and ECOENGTM500, the substrates conversion values were significantly less important than in organic solvents. This result can not be explained by a limited solubilisation of the substrate.

Table 3. Efficiency and kinetic parameters of the O and/or N,O-acylation of 6-amino-1-hexanol (0.12 M) by oleic acid (0.24 M) in different ionic liquids and their respective a_w . Concentrations of products and substrate conversion were determined at the thermodynamic equilibrium.

Ionic liquids	a_w	[Ester product] (mM)	[Amide ester product] (mM)	Initial rates (mM.h ⁻¹)		Substrate conversion (%)
				Ester synthesis	Amideester synthesis	
[Emim] ⁺ [EtSO ₄] ⁻	0.04	<1	nd	nd	nd	<1
ECOENG TM 500	0.10	28 ± 3	18 ± 2	nd	nd	38 ± 4
[Bmim] ⁺ [N(CN) ₂] ⁻	0.14	<1	11 ± 3	nd	nd	9 ± 1
[Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻	0.11	12 ± 3	78 ± 1	93 ± 8	48 ± 7	92 ± 2
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	0.09	3 ± 1	109 ± 2	190 ± 20	110 ± 30	97 ± 2

The acylation reaction in [Emim]⁺[EtSO₄]⁻ led to a very poor production of the O-acyl-product (inferior to 1 mM) and the amide-ester was not detected. Previous studies about O-acylation reactions in [Emim]⁺[EtSO₄]⁻ demonstrated that the activity of Novozym 435[®] in this medium was low. It was suggested that the coordination of [EtSO₄]⁻ anions to the enzyme surface can cause conformational changes leading to a loss of activity [25]. Another ionic liquid with an identical constitutive anion was used, ECOENGTM500. A substrate conversion of 38 ± 4 % was obtained and the ester was the major product at the equilibrium (28 ± 3 mM). This low efficiency can be explained by the high viscosity of this medium that can limit the diffusion of substrates.

3.3.2. Ionic liquids with constitutive 1-butyl-3-methylimidazolium cation.

Three ionic liquids based on the same constitutive cation: 1-butyl-3-methylimidazolium combined with [BF₄]⁻, [PF₆]⁻ or [N(CN)₂]⁻ were compared.

The use of the ionic liquid dicyanamide led to a very low substrate conversion (9 ± 1 %) which can be due to the hydrophilic character of this solvent (table 3). This result can be due to the difficulty to reduce the a_w of the medium which still remained at 0.14 after desiccation (table 4). For both ionic liquids with [BF₄]⁻ or [PF₆]⁻, an excellent substrate conversion (superior to 90 %) was obtained after 25 h of reaction (figure 5) in comparison with 70 h in organic solvents. All the initial rates of product synthesis were higher than in organic solvents (table 3). Figures 5a and 5b indicated that the O-acyl product was firstly synthesized followed

by the N,O-diacyl product in both ionic liquids. These results showed the absence of chemo-selectivity in ionic liquids.

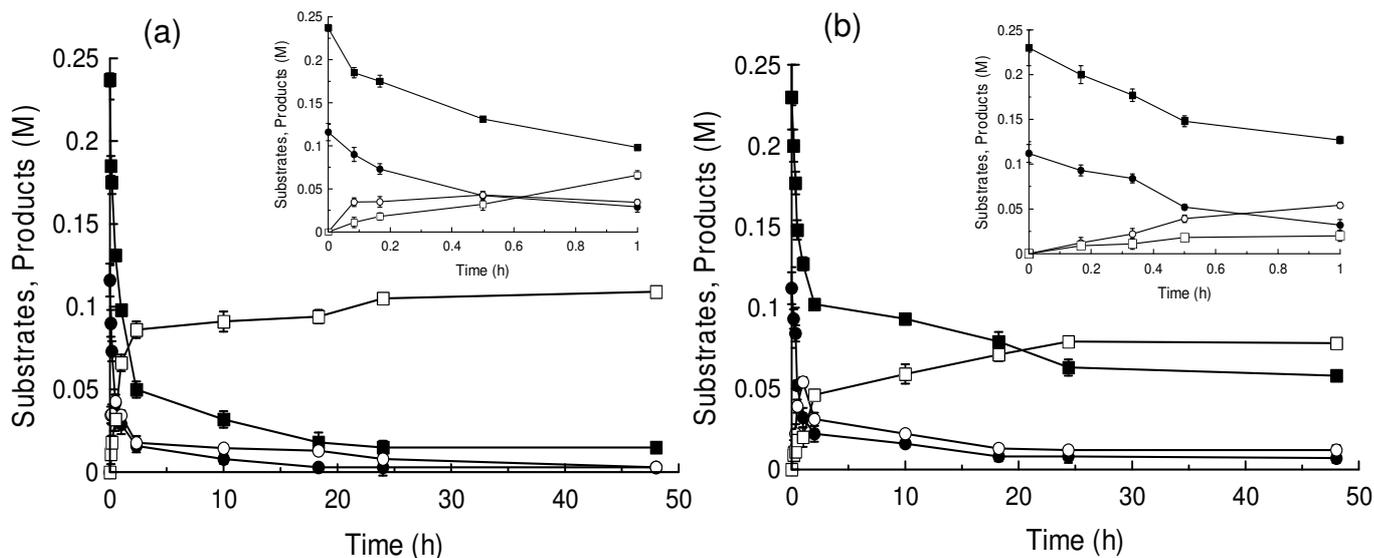


Figure 5. Kinetic curves related to the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol (0.12 M) by oleic acid (0.24 M) in $[\text{Bmim}]^+[\text{PF}_6]^-$ (5a) and in $[\text{Bmim}]^+[\text{BF}_4]^-$ (5b). Reactions were carried out at 55 °C and catalyzed by Novozym 435®. -●- 6-amino-1-hexanol, -■- Oleic acid, -○- O-oleylaminohexanol, -□- N,O-dioleylaminohexanol.

Moreover the efficiency of the N,O-enzymatic acylation was improved in these ionic liquids. This could be explained by the high polarity of such media which favoured the dissociation of the ion-pair complex. The constitutive cation can establish hydrogen bonds with the amino substrate, resulting in the availability of the acyl donor in excess as suggested by Irimescu et al. [19]. The hydrophilic character of $[\text{Bmim}]^+[\text{BF}_4]^-$ did not affect the efficiency of the acylation of 6-amino-1-hexanol as demonstrated by Irimescu et al. in the case of primary amine acylation [19]. The nucleophilicity of the constitutive anions probably played a preponderant role in the improvement of the efficiency of the N,O-enzymatic acylation [19]. The efficiency of the N,O-enzymatic acylation was higher in ionic liquids with 1-butyl-3-methylimidazolium cation coupled with anions of low nucleophilicity (table 4). These results confirmed that the anions exhibiting lower nucleophilicity would not interact with charged sites of enzyme which maintained its optimal activity [25].

3. Conclusion.

This study showed that an appropriate choice of the reaction systems (solvent, acylating agent) may allow the chemo-selective acylation of bifunctional molecule as 6-amino-1-hexanol catalyzed by the immobilized lipase B of *Candida antarctica* (table 4).

Table 4. Selectivity and efficiency for the O and/or N,O-acylation of 6-amino-1-hexanol (0.12 M) by oleic acid (0.24 M) in different media. Reactions were carried out in Syncore[®] reactors at 55 °C and catalyzed by Novozym 435[®]. Reaction duration and substrate conversion corresponded to the equilibrium state.

Reaction Media	Selectivity (%)		Reaction duration (h)	6-Amino-1-hexanol conversion (%)
	O-acylation	N,O-acylation		
2-Methyl-2-butanol	7.9	92.1	70	86 ± 5
Hexane	1.2	98.8	70	69 ± 3
Solvent-free system (oleic acid)	91.5	8.5	25	99 ± 1
Solvent-free system (ethyl oleate)	2.5	97.5	50	98 ± 2
[Bmim] ⁺ [BF ₄] ⁻	13.3	86.7	25	92 ± 2
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	2.7	97.3	25	97 ± 2

At the equilibrium, in 2-methyl-2-butanol and in hexane, the substrate conversion was close to 90 % and 70 %, respectively. The N,O-diacyl compound was obtained majoritary in these reaction media (> 90 %). The use of a solvent-free system significantly decreased the time to attempt the equilibrium. Free fatty acid medium permitted to orientate the selectivity of the reaction towards the O-acylation exclusively (91.5 %) due to the ionization state of the amine function. Ethyl ester medium allowed to restore the major synthesis of the N,O-diacyl product. Finally, the use of ionic liquids like [Bmim]⁺[BF₄]⁻ and [Bmim]⁺[PF₆]⁻ significantly improved the efficiency of the reaction. The substrate conversions were close to 100 % in [Bmim]⁺[PF₆]⁻ and 90 % in [Bmim]⁺[BF₄]⁻. The reaction duration was significantly decreased and the absence of chemo-selectivity observed in organic solvents was maintained in these ionic liquids. However, these different media did not allow the selective synthesis of the N-acyl product. Ionic liquids appeared to be effective reaction media for acylation reaction catalyzed by the immobilized lipase B of *Candida antarctica*. However, their toxicology remained unclear and cell death through apoptosis has been already suggested in the case of

some of them [31]. Supercritical carbon dioxide can be another attractive alternative to perform acylation reaction [32]. Further studies are in progress to focus on peptide acylation to find conditions for the regioselective acylation of amino acids in different media, including ionic liquids and supercritical carbon dioxide.

Acknowledgments.

We thank M. Régis Vanderesse (LCPM, Nancy University, CNRS) for structural investigation by NMR.

References

- [1] F. Veuillez, J. Deshusses, and P. Buri, *Eur. Pharm. Biopharm.*, (1999). 48(1): p. 21-26.
- [2] D. Zweytick, G. Pabst, P.M. Abuja, A. Jilek, S.E. Blondelle, J. Andra, R. Jerala, D. Monreal, G. Martinez de Tejada, and K. Lohner, *Biochim. Biophysic Acta.*, (2006). 1758(9): p. 1426-1435.
- [3] B. Yelamos, F. Roncal, J.P. Albar, I. Rodriguez-Crespo, and F. Gavilanes, *Biochem.*, (2006). 45(4): p. 1263-1270.
- [4] T.K. Chakraborty, S.U. Kumar, B.K. Mohan, G.D. Sarma, M.U. Kiran, and B. Jagadeesh, *Tetrahedron Lett.*, (2007). 48(39): p. 6945-6950.
- [5] N. Kocevar, N. Obermajer, B. Strukelj, J. Kos, and S. Kreft, *Chem. Biol.*, (2007). 69(2): p. 124-131.
- [6] A. Zaks and A.M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, (1985). 82(10): p. 3192-3196.
- [7] M. Fernandez-Perez and C. Otero, *Enzyme. Microb. Technol.*, (2003). 33(5): p. 650-660.
- [8] M. Fernandez-Perez and C. Otero, *Enzyme. Microb. Technol.*, (2001). 28(6): p. 527-536.
- [9] T. Furutani, M. Furui, H. Ooshima, and J. Kato, *Enzyme. Microb. Technol.*, (1996). 19(8): p. 578-584.
- [10] T. Furutani, H. Ooshima, and J. Kato, *Enzyme. Microb. Technol.*, (1997). 20(3): p. 214-220.
- [11] T. Furutani, R. Su, H. Ooshima, and J. Kato, *Enzyme. Microb. Technol.*, (1995). 17(12): p. 1067-1072.
- [12] V. Gotor-Fernandez and V. Gotor, *Curr. Org. Chem.*, (2006). 10(10): p. 1125-1143.
- [13] L. T. Kanerva, Eero Vääntinen, Tuomas T. Huuhtanen and Martti Dahlqvist, *Acta chem. scand.*, (1992). vol. 46(no11): p. pp. 1101-1105.
- [14] O. Torre, V. Gotor-Fernandez, and V. Gotor, *Tetrahedron Asym.*, (2006). 17(5): p. 860-866.
- [15] R. Irimescu and K. Kato, *Tetrahedron Lett.*, (2004). 45(3): p. 523-525.
- [16] P. Tufvesson, A. Annerling, R. Hatti-Kaul, and D. Adlercreutz, *Biotechnol. Bioeng.*, (2007). 97(3): p. 447-453.
- [17] R. Madeira Lau, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, and R.A. Sheldon, *Organic Lett.*, (2000). 2(26): p. 4189-4191.

- [18] N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, and S.M.S. Chauhan, *Tetrahedron*, (2005). 61(5): p. 1015-1060.
- [19] R. Irimescu and K. Kato, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, (2004). 30(5-6): p. 189-194.
- [20] U. Kragl, M. Eckstein, and N. Kaftzik, *Curr. Opin. Biotechnol.*, (2002). 13(6): p. 565-571.
- [21] F. Van Rantwijk, R.M. Lau, and R.A. Sheldon, *Trends. Biotechnol.*, (2003). 21(3): p. 131-138.
- [22] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier, and J.L. Iborra, *Biotechnol. Lett.*, (2001). 23(18): p. 1529-1533.
- [23] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier, and J.L. Iborra, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, (2003). 21(1-2): p. 9-13.
- [24] P. Lozano, T. de Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, and J.L. Iborra, *Biocatal. Biotransform.*, (2005). 23(3-4): p. 169-176.
- [25] R.A. Sheldon, R. Madeira Lau, M.J. Sorgedraeger, F. Van Rantwijk, and K.R. Seddon, *Green Chem.*, (2002). 4(2): p. 147-151.
- [26] M.-J. Kim, M.Y. Choi, J.K. Lee, and Y. Ahn, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, (2003). 26(3-6): p. 115-118.
- [27] T. Yasmin, T. Jiang, and B. Han, *Catal. Lett.*, (2007). 116(1-2): p. 46-49.
- [28] C. Humeau, M. Girardin, B. Rovell, and A. Miclo, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, (1998). 5(1-4): p. 19-23.
- [29] T. Maugard, M. Remaud-Simeon, and P. Monsan, *Biochim. Biophysic. Acta.*, (1998). 1387(1-2): p. 177-183.
- [30] T. Maugard, M. Remaud-Simeon, D. Petre, and P. Monsan, *Tetrahedron*, (1997). 53(22): p. 7587-7594.
- [31] X. Wang, Ohlin, C.A., Lu, Q., Fei, Z., Hu, J., Dyson, P.J., *Green Chem.*, (2007). 9: p. 1191-1197.
- [32] T. Yasmin, T. Jiang, B. Han, J. Zhang, and X. Ma, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, (2006). 41(1-2): p. 27-31.

3. Contribution de l'article

L'étude a démontré que lors de l'acylation enzymatique d'une molécule modèle telle que le 6-amino-1-hexanol catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée, en solvant organique (hexane et 2-méthyl-2-butanol), la réaction n'est pas chimio-sélective et conduit à une majorité de produit N,O-diacylé. La synthèse de ce produit semble résulter d'un mécanisme séquencé débutant par la synthèse spécifique du composé O-acylé. Ce dernier étant par la suite rapidement pris en charge par l'enzyme pour être N-acylé. La N-acylation du substrat précurseur, jamais observée dans cette étude, est probablement contrainte par la spécificité de substrat de l'enzyme à catalyser préférentiellement, d'une part, l'acylation de la fonction hydroxyle de l'alcool aminé, et, d'autre part, la N-acylation du composé O-acylé. Dans ces solvants organiques, la formation d'un complexe ionique entre le substrat aminé et le donneur d'acyle a été mise en évidence mais celui-ci, totalement soluble, ne semble pas affecter la disponibilité de ces derniers, et est même supposé réversible étant donné le taux de conversion élevé du substrat.

De plus, la mise en œuvre de cette réaction d'acylation en système sans solvant, d'une part dans de l'acide gras libre, et, d'autre part, dans de l'ester d'acide gras, a conduit à une différence de chimio-sélectivité de l'acylation selon le type de donneur d'acyle. L'utilisation d'un système sans solvant à base d'acide gras libre, imposerait un état protoné à la fonction amine du substrat, orientant ainsi la chimio-sélectivité de la réaction en faveur de la O-acylation contrairement à l'utilisation d'ester d'acide gras qui permet de conserver l'absence de sélectivité obtenue en solvant organique.

Enfin, l'utilisation de cinq liquides ioniques a permis de mettre en évidence que les plus adéquats pour améliorer l'efficacité de cette réaction sont de type 1-butyl-3-méthylimidazolium à anions faiblement nucléophiles. En effet, les cations de ce type sont supposés stabiliser l'enzyme dans sa conformation optimale d'activité. Les liquides ioniques à anions sulfates ne semblent pas propices à la mise en œuvre de réactions enzymatiques de ce type comme suggéré dans la littérature. Cette étude fournit ainsi des arguments supplémentaires à l'utilisation de ces milieux innovants pour l'acylation enzymatique, et démontre l'importance de leurs ions constitutifs pour l'amélioration des performances de la réaction tout en présentant la sélectivité obtenue en solvants organiques classiques.

Afin de compléter cette étude concernant l'influence des milieux réactionnels sur les performances de la réaction d'acylation, un liquide ionique supplémentaire, $[\text{Omim}]^+[\text{PF}_6]^-$, a été utilisé. Ce liquide ionique, dont l'hydrophobie est accentuée par la présence d'une chaîne octyle sur le cation constitutif s'est déjà révélé être très efficace pour l'amélioration des performances de réactions d'estérification catalysées par Novozym 435[®] (de los Rios *et al.*, 2008). La réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol a également été mise en œuvre en CO_2 supercritique. Ce dernier, de par ses propriétés respectueuses de l'environnement et son aptitude à améliorer les performances de réactions enzymatiques d'acylation est à présent un milieu réactionnel intéressant en bioconversion (Lozano *et al.*, 2002 ; Lozano *et al.*, 2003).

4. Acylation enzymatique dans $[\text{Omim}]^+[\text{PF}_6]^-$

Le liquide ionique 1-octyl-3-méthylimidazolium hexafluorophosphate a un caractère hydrophobe plus marqué que les autres liquides ioniques utilisés de par sa chaîne octyle greffée sur son cation constitutif. Il se présente sous forme d'un liquide visqueux de couleur brune. Ses avantages pour la biocatalyse, en particulier dans le cas des réactions d'estérification, ont déjà été démontrées ; en effet, dans certains travaux, il permet d'augmenter considérablement les vitesses initiales de synthèse de butyrate de butyle en solvant organique catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée comparativement au $[\text{Bmim}]^+[\text{PF}_6]^-$ (de los Rios *et al.*, 2008). Le but de cette étude complémentaire est donc d'étudier l'efficacité et la chimio-sélectivité de l'acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol par l'acide oléique, catalysée par Novozym 435[®] dans ce nouveau liquide ionique. Le 6-amino-1-hexanol a une solubilité de 162,5 g/L dans ce liquide ionique. Dans les conditions molaires utilisées, le substrat est donc totalement soluble.

Une première synthèse a permis d'atteindre un taux de conversion du substrat proche de 25 % avec une sélectivité de la réaction semblable à celle obtenue en solvant organique et en liquides ioniques $[\text{Bmim}]^+[\text{PF}_6]^-$ et $[\text{Bmim}]^+[\text{BF}_4]^-$. Ce résultat peu concluant, au vu des performances de ce liquide ionique décrites dans la littérature a soulevé le problème de sa pureté. En effet, il est courant que certains liquides ioniques, n'atteignant pas une pureté de l'ordre de 98 – 99 %, présentent des impuretés sous forme de sels comme HF ou HI exerçant une inhibition sur le biocatalyseur. Pour contourner ce problème, une extraction liquide-liquide avec 5 volumes d'eau à été réalisée sur $[\text{Omim}]^+[\text{PF}_6]^-$ (étant donné sa non-miscibilité

à l'eau). Puis il a été ensuite séché au maximum pendant 24 h à 80 °C sous vide. Une fois récupéré, le liquide ionique présente une a_w de 0,142 difficile à diminuer davantage avec le matériel disponible.

La figure IV.1. présente un suivi cinétique de la réaction remise en œuvre dans ce liquide ionique purifié et séché.

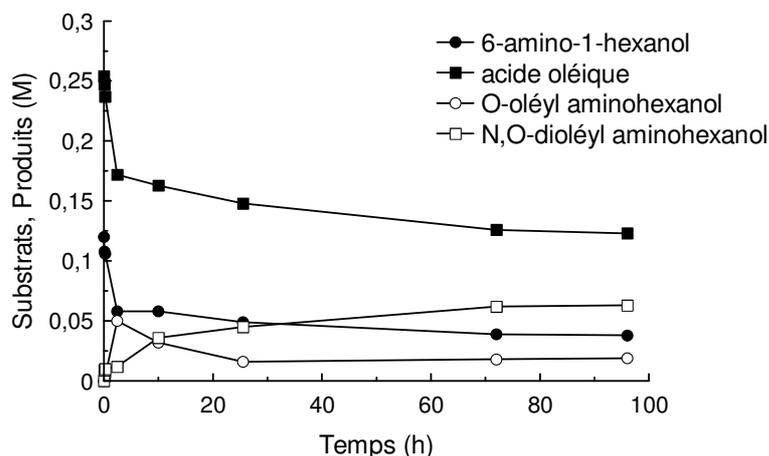


Figure IV.1. Suivi cinétique relatif à la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence d'acide oléique (0,24 M) biocatalysée par Novozym 435® à 55 °C dans [Omim]⁺[PF₆]⁻ en réacteur Syncore®.

Le profil cinétique obtenu est similaire à ceux obtenus pour les liquides ioniques [Bmim]⁺[PF₆]⁻ et [Bmim]⁺[BF₄]⁻. L'équilibre thermodynamique est atteint après 48 h de réaction pour un taux de conversion du substrat de 68,5 ± 4 %. Les vitesses initiales de synthèse du O-oléyl aminohexanol et du N,O-dioléyl aminohexanol sont respectivement de 34 ± 6 mM.h⁻¹ et 5 ± 2 mM.h⁻¹. L'équilibre thermodynamique est également dans ce cas caractérisé par une majorité de composé N,O-diacylé. Pour cette réaction, ce liquide ionique ne permet pas d'améliorer les performances cinétiques et de rendement de ce procédé d'acylation. Ces résultats peuvent s'expliquer par :

- la difficulté à minimiser l' a_w initiale du liquide ionique après lavage ; les molécules d'eau résiduelles limiteraient l'orientation de l'équilibre vers la synthèse,
- la présence d'impuretés résiduelles susceptibles d'inhiber l'enzyme,
- la viscosité importante de ce liquide ionique par rapport à celle de [Bmim]⁺[PF₆]⁻ et [Bmim]⁺[BF₄]⁻ limitant les rencontres efficaces entre les réactifs.

5. Acylation enzymatique en CO₂ supercritique.

Le CO₂ supercritique est un milieu réactionnel de plus en plus utilisé pour la mise en œuvre de réactions enzymatiques d'acylation et particulièrement des réactions d'estérification (Hammond *et al.*, 1985 ; Lozano *et al.*, 2004b ; Celia *et al.*, 2005 ; Yasmin *et al.*, 2006). La lipase B de *Candida antarctica* est connue pour résister à des conditions contraignantes telles des pressions élevées ainsi que des températures dépassant 90 °C. En CO₂ supercritique, cette enzyme conserve une activité qui souvent est améliorée par rapport à son activité en solvant organique classique surtout lorsqu'elle est immobilisée sur un support (Lozano *et al.*, 2003b ; Yasmin *et al.*, 2006 ; Lozano *et al.*, 2007a). Dans cette étude, nous avons étudié, l'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) par l'acide oléique (0,24 M) catalysée par Novozym 435[®] dans ce fluide supercritique. L'aspect innovant de cette étude consiste à étudier la sélectivité de la réaction d'acylation d'une molécule bifonctionnelle dans ce genre de milieu réactionnel, non décrit dans la littérature.

La mise en œuvre de la réaction a tout d'abord été réalisée dans un réacteur équipé d'une cellule d'observation (dispositif décrit dans la partie Matériel et Méthodes). Après avoir vérifié, grâce à ce dispositif, qu'à 55 °C et à 200.10⁵ Pa, le système réactionnel était monophasique, la réaction d'acylation a été mise en œuvre dans le second dispositif expérimental équipé d'un réacteur de 100 mL. A des temps définis, la réaction est stoppée puis l'ensemble du milieu réactionnel est entièrement solubilisé dans du méthanol à 4 °C et l'enzyme éliminée par filtration. L'analyse quantitative par CLHP de chaque milieu réactionnel a permis d'établir une cinétique de réaction présentée dans la figure IV.2. Pour 5 prélèvements sur 6, le bilan de matière est validé avec une erreur inférieure à 14 %. Peu de composés sont donc perdus lors de la détente (évacuation du CO₂ en fin de réaction).

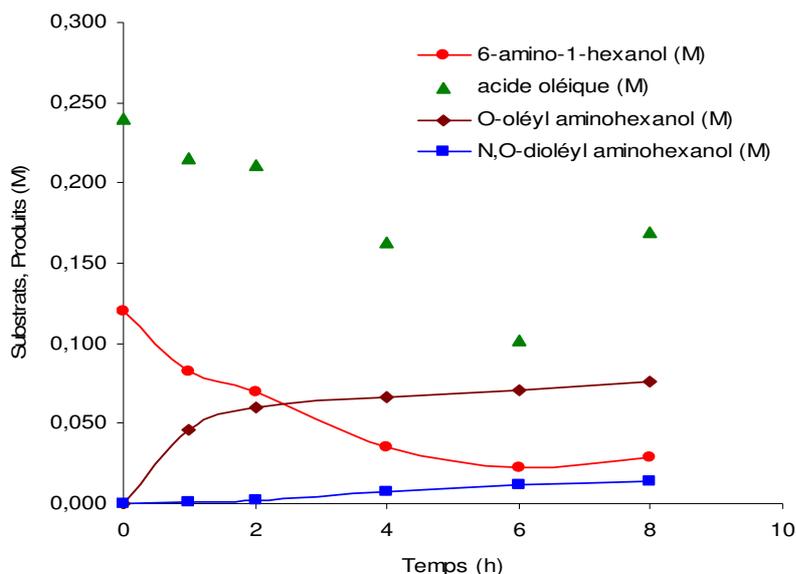


Figure IV.2. Suivis cinétiques relatifs à la réaction enzymatique d'acylation du 6-amino-1-hexanol (0,12 M) en présence d'acide oléique (0,24 M) biocatalysée par Novozym 435® à 55 °C en CO₂ supercritique à 200.10⁵ Pa.

Dans ces conditions réactionnelles, l'équilibre thermodynamique est atteint après 7 h de réaction. Ainsi, la mise en œuvre de cette réaction d'acylation dans ce fluide supercritique améliore considérablement la vitesse de la réaction. Il est difficile de déterminer une vitesse initiale de synthèse vu le mode opératoire imposé par ce procédé (10 mn de montée en pression et 30 mn de détente), ainsi le temps le plus court de réaction à 200.10⁵ Pa est 1 h.

Le taux de conversion du substrat obtenu à l'équilibre est de 76 % après 8 h de réaction avec une sélectivité en faveur de la O-acylation (85 %). Peu de N,O-diacylé est produit. Ce comportement est similaire à celui obtenu en milieu fondu dans l'acide oléique. Les performances cinétiques de la réaction apparaissent donc améliorées par rapport à celles de réactions mises en œuvre dans les autres milieux. Le CO₂ supercritique améliorerait donc considérablement l'activité de l'enzyme CAL B immobilisée comme suggéré dans la littérature (Yasmin *et al.*, 2006). La chimio-sélectivité enzymatique de la réaction suggère qu'en CO₂ supercritique, un état de protonation irréversible de la fonction amine de l'alcool aminé est imposé probablement du à l'acide oléique en excès. Ainsi, la fonction amine du 6-amino-1-hexanol peut difficilement exercer une attaque nucléophile sur l'acyl-enzyme.

6. Conclusion

La mise en œuvre de la réaction d'acylation du 6-amino-1-hexanol par l'acide oléique catalysée par Novozym 435[®] dans le liquide ionique [Omim]⁺[PF₆]⁻ n'a pas abouti à des résultats quantitativement intéressants. Il est donc difficile de conclure sur l'impact de la chaîne octyle greffée sur le cation constitutif de ce liquide ionique. Néanmoins, la chimio-sélectivité de la réaction est similaire à celle obtenue dans les deux liquides ioniques [Bmim]⁺[PF₆]⁻ et [Bmim]⁺[BF₄]⁻ et les solvants organiques utilisés (majorité de composé N,O-diacylé à l'équilibre thermodynamique). Le CO₂ supercritique a permis d'orienter la chimio-sélectivité de cette réaction spécifiquement vers la O-acylation tout en améliorant considérablement les performances cinétiques de la réaction.

Cette étude ouvre ainsi un champ nouveau d'investigation concernant les milieux réactionnels à utiliser pour l'acylation enzymatique à sélectivité contrôlée de molécules polyfonctionnelles.

V. Etude des cinétiques de trans-acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol dans le 2-méthyl-2-butanol. Etablissement d'un modèle cinétique.

1. Introduction

L'étude approfondie des cinétiques de réaction constitue une approche incontournable dans toute étude de base. Dans la littérature, beaucoup de réactions enzymatiques d'acylation de substrat monofonctionnel et principalement d'alcool primaire ont fait part de ce genre d'étude en vue de déboucher sur l'établissement d'un modèle cinétique. Dans cette partie, est présentée une étude des cinétiques de trans-acylation de la molécule bifonctionnelle du 6-amino-1-hexanol en solvant organique polaire (le 2-méthyl-2-butanol) catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435[®]). Dans un premier temps, une approche expérimentale a pour objectif d'étudier précisément l'influence de certains facteurs extrinsèques sur la cinétique de réaction tels que l'influence de la concentration en enzyme et en substrats et l'influence de la vitesse d'agitation. Cette première investigation a pour but de déterminer des conditions optimales pour lesquelles la réaction s'affranchit d'effets limitants (concentration en substrats, concentration en enzyme et transfert de masse). Nous étudierons l'évolution de la stabilité du biocatalyseur en fonction du temps d'incubation en solvant organique en vue, d'ailleurs, de prendre en compte ce phénomène dans le cadre de l'établissement d'un modèle cinétique. Les constantes cinétiques seront déterminées à l'aide d'un algorithme génético-évolutionnaire et pourront être comparées à celles issues directement de l'expérience.

Ce travail est présenté sous forme de projet de publication.

2. Modelling of enzymatic acylation of a bifunctional molecule in organic solvent.

Eric HUSSON^a, Veronica GARCIA-MATILLA^a, Catherine HUMEAU^b, Isabelle CHEVALOT^a,
Frantz FOURNIER^a, Ivan MARC^a
^aLSGC, Nancy Université, CNRS, 2 avenue de la forêt de Haye- 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy
^bLBB, Nancy Université, 2 avenue de la forêt de Haye- 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy
Corresponding author: Isabelle.Chevalot@ensaia.inpl-nancy.fr

Project of publication - Enzyme and Microbial Technology.

Abstract

The trans-acylation reaction of the 6-amino-1-hexanol by ethyl oleate in the 2-methyl-2-butanol at 55 °C biocatalyzed by Novozym 435[®] was investigated and a kinetic model was established. This reaction is a sequential synthesis of two products which can result from the O-acylation of the 6-amino-1-hexanol, then the N-acylation of the O-acyl product leading to the N,O-diacylated product. First, an experimental approach was performed to determine the influence of the operating conditions on reaction performances. However, in the assumed optimal conditions, the kinetic profiles suggested the influence of the decrease of the Novozym 435[®] activity during the incubation time in 2-methyl-2-butanol. Kinetic of enzyme deactivation was studied and a model was established and inserted in the kinetic model. The kinetic model able to describe the kinetics of this bifunctional molecule enzymatic acylation process corresponded to a bi bi ping-pong enzymatic mechanism. The kinetic parameters have been determined by using a new identification method: the genetic evolutionary algorithm. The kinetic model based on an experimental approach is in good agreement with the experimental data considering various substrates ratio (excess of 6-amino-1-hexanol, excess of acyl donor or equimolar conditions).

Keywords: acylation, immobilized lipase CAL B, organic solvent, bi bi ping-pong mechanism, kinetic modelling.

Introduction.

The acylation of peptides allows to enhance the lipophilicity of these molecules, and to improve both their transport throughout the biological membranes and their stability as described in several works concerning the acylation of insuline and carnosine [1-5]. In a few case, the covalent attachment with fatty acid maintains or improves the therapeutic or biological activities of peptides [6, 7]. Immobilized lipase-catalyzed acylation in organic solvent constitutes a promising way to the synthesis of acylated functional peptide derivatives as an alternative to the use of chemical processes that required drastic reaction conditions and function protection and/or activation [8-11]. As peptides are generally polyfunctionnal molecules, their acylation constitutes a challenge to study the chemo-selectivity of lipases. Thus, the understanding of the efficiency and of the selectivity of the polyfunctionnal substrates N,O-enzymatic acylation is required before the application of these enzymatic processes to peptides. Several studies investigated the enzymatic acylation of aminoalcohol like the ethanolamine, diethanolamine or 6-amino-1-hexanol [12-16]. The establishment of a kinetic model able to describe the kinetic profiles could lead to determine the optimal conditions of the process. However, enzymatic acylations modelling of bifunctional molecule have never been performed. In the literature, modelling concerning lipase-catalyzed acylation of primary alcohol in organic solvent have been developed. For instance, the bi bi ping-pong mechanism, characterized by the acyl-enzyme intermediate formation, have been mainly used to establish kinetic models describing O-acylation reactions catalyzed by the lipase B of *Candida Antarctica* (CAL B) immobilized in an organic solvent [17, 18]. The kinetic modelling of O-acylation processes catalyzed by other lipases as the lipase of *Mucor miehei* and of *Pseudomonas cepacia* was based on this mechanism [19-21]. The bi bi ordered mechanism, characterized by the formation of a tertiary complex, has been used in few studies concerning trans-esterification in solvent-free system catalyzed by the CAL B lipase [22, 23]. Furthermore, the study of supplementary phenomena, as deactivation of the enzyme during the incubation time in organic solvent, allowed to improve the kinetic model and the agreement between simulated curves and experimental data [24, 25].

The aim of the present work is to investigate the trans-acylation reaction of the 6-amino-1-hexanol with ethyl oleate in 2-methyl-2-butanol at 55°C biocatalyzed by the lipase of *Candida antarctica* immobilized. In a first time, an experimental approach has been performed to study three parameters susceptible to influence the performances of the reaction: the biocatalyst concentration, the molar ratio substrate/acyl donor and the stirred rate. The

deactivation of enzymes during the incubation time in 2-methyl-2-butanol at 55 °C is studied. Then, a kinetic model based on this experimental approach will be established and the kinetic parameters will be determined by using the genetical-evolutionary algorithm based method [26, 27]. Finally, the proposed kinetic model will be confronted with experimental process in extreme molar ratio condition and in comparing the predicted maximal initial rate with the determined apparent initial rate.

Material and methods.

2.1. Chemicals and enzyme.

6-Amino-1-hexanol (97 %) and ethyl oleate (99 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Novozym 435[®] (a lipase B from *Candida antarctica* immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU.g⁻¹ and protein grade of [1-10 %] was from Novo Nordisk A/S (Bagsraerd, Danmark). In this study 7000 PLU.g⁻¹ corresponded to 1 UA (arbitrary unity). 2-Methyl-2-butanol, methanol, trifluoroacetic acid (TFA) with 99 % of purity were acquired from Carlo Erba (Rodano, Spain).

2.2. Acylation procedure

The enzymatic trans-acylation reactions of 6-amino-1-hexanol in organic solvent were carried out in a batch stirred reactor (Wheaton[®]) of 50 mL volume equipped with a condensation system to prevent the evaporation of the solvent. In a typical acylation reaction, 6-amino-1-hexanol and ethyl oleate were added in 10 mL of organic solvent previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. The initial water activity of the media was determined by a thermoconstanter Novasina[®], (Switzerland) and was inferior at 0.1. Reactions were stirred at different stirred rates and heated at 55 °C. After the total dissolution of the substrates for 12 h, the acylation of 6-amino-1-hexanol was started by the addition of lipase preparation. Control experiments without enzyme were also carried out. Samples were withdrawn and analyzed by HPLC. To validate the repeatability of the experiments, each reaction was run three times. The purification and the identification of acylated products were described in a previously study [16].

2.3. Analyses by HPLC.

The time course of each reaction was monitored using HPLC (LC 10 AD – VP, Shimadzu, France) equipped with an UV detector at 214 nm and a light-scattering low temperature evaporative detector (Shimadzu, France) in this order. The column was a newly developed C18 amide 125 x 2.1 mm – 5 μm (Altima[®], Altech, France) maintained at 25 °C. The mobile phase (0.2 mL/mn flow rate) consisted in methanol/water/TFA (80/20/0.1 v/v/v). A constant elution gradient was applied to reach methanol/TFA (100/0.1 v/v) after 5 minutes. This methanol concentration was maintained for 18 minutes and progressively decreased to reach the initial methanol/water ratio until the end of the run (i.e. 34 min). Calibrations were performed using standard substrates and purified products. The substrate conversion rate at the thermodynamic equilibrium was determined applying the following equation:

$$r(\%) = (1 - ([\text{substrate}]_{\text{equilibrium}} / [\text{substrate}]_{\text{initial}})) \times 100.$$

Initial rates of reaction were calculated using a second order polynomial model applied to the derivatives of the five first experimental data (Software: Matlab[®], MathWorks, E.U.).

2.4. Study of the enzymatic stability in the course of the reaction

The biocatalyst was incubated in 2-methyl-2-butanol in Wheaton[®] reactor at 55 °C during a defined duration (0 h, 2 h, 6 h, 10 h, 24 h and 48 h). After this time, the substrate (6-amino-1-hexanol 0.12 M and ethyl oleate 0.24 M) previously solubilized were added in the reactor and the reaction was performed during 1 h. The initial rate of ethyl oleate consumption was determinate for each incubation time. The residual enzymatic activity was expressed with the following equation:

Residual activity = (Initial rate of ethyl oleate disappearance)_{incubation during a time t} / (Initial rate of ethyl oleate disappearance)_{no incubation}

2.5. Modelling experiments

According to the literature on the kinetics of lipase-catalyzed acylation, a bi bi ping-pong mechanism is the most suitable form to describe the kinetic of the acylation of 6-amino-1-hexanol with ethyl oleate, catalyzed by Novozym 435[®] in 2-methyl-2-butanol-2. After experimental investigations, a model based on such a mechanism was identified. The model (differential equations system) has been solved using the numerical tools integrated in the

Matlab[®] software (MathWorks, E.U.). Identification of the kinetic parameters was performed using a genético-evolutionary algorithm developed in our laboratory. The later has been described in the literature [26, 27]. The obtained kinetic model is described in the Results-Discussion part.

3. Results-Discussion

A previous study demonstrated that the Novozym 435[®]-catalyzed acylation of 6-amino-1-hexanol (B) by an oleyl donor (AR) in 2-methyl-2-butanol at 55 °C allowed to obtain two acylated products [16]. During this sequential reaction, the first one was the O-oleyl aminohexanol (AB) and was rapidly converted into a N,O-dioleil aminohexanol (ABA). The present work consisted to an investigation about the kinetics of trans-acylation of this bifunctionnal molecule by ethyl oleate with the same biocatalyst in a mechanical stirred reactor. Controls without enzyme have demonstrated the absence of synthesized product in all used experimental conditions. Then, a serie of enzymatic reactions of this bifunctionnal molecule have been performed with a quantitative monitoring of each compound. The time-profile of the main reactants and products are presented in figure 1 for a 1:2 molar ratio of 6-amino-1-hexanol (0.12 M) with respect to ethyl oleate (0.24 M) and with 10 g/L of Novozym 435[®].

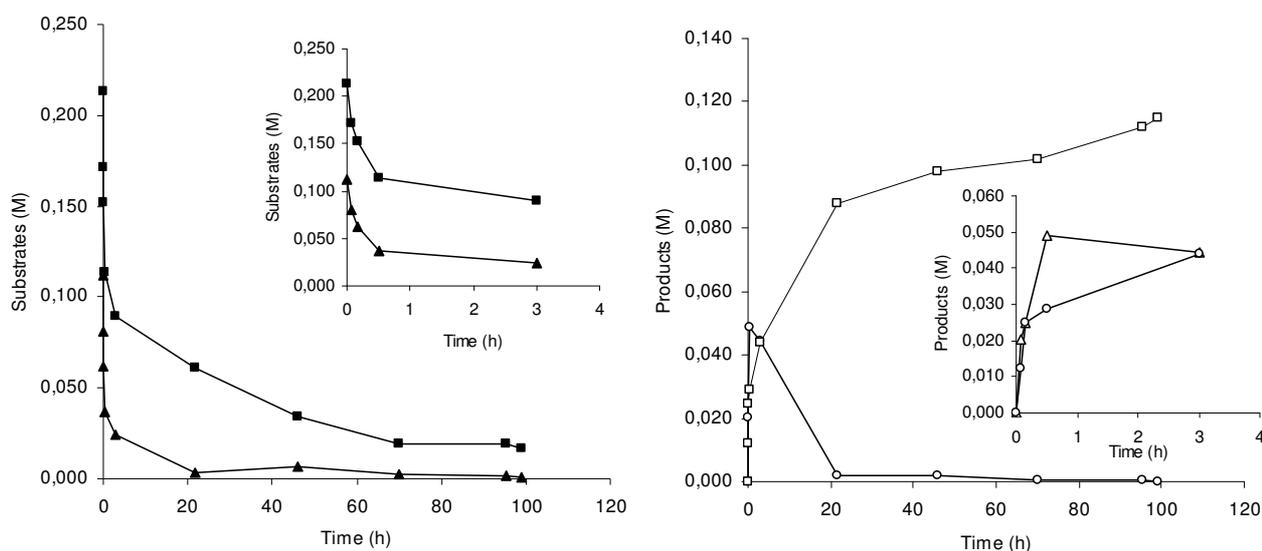


Figure 1. Kinetic curves relative to the enzymatic acylation of the 6-amino-1-hexanol (0.12 M) with ethyl oleate (0.24 M) biocatalyzed by Novozym 435[®] in 2-methyl-2-butanol at 55 °C and 250 rpm in a Wheaton[®] reactor. (■) Ethyl oleate, (▲) 6-amino-1-hexanol, (□) N,O-dioleil aminohexanol and (○) O-oleyl aminohexanol.

Figure 1 shows that the kinetic of the reaction can be divided in two parts.

- The first part takes place from the beginning of the reaction to 1 h. It corresponds to a rapid reaction: the two substrates are rapidly converted (initial apparent rate of disappearance of 6-amino-1-hexanol: $0.40 \pm 0.02 \text{ M.h}^{-1}$, initial apparent rate of disappearance of ethyl oleate: $0.55 \pm 0.02 \text{ M.h}^{-1}$) and allow the synthesis of O-oleyl and N,O-dioleoyl products. The O-oleyl product is briefly accumulated in the reaction medium during the first hour (initial apparent rate of $0.23 \pm 0.04 \text{ M.h}^{-1}$). The N,O-dioleoyl product appears progressively in the reaction medium with a initial rate of $0.14 \pm 0.01 \text{ M.h}^{-1}$ is reached.
- The second part of the conversion starts at the first hour and leads to a thermodynamic equilibrium: the reaction seems to slow down after 1 hour and the concentration of mono-acylated product, drastically decreases while the di-acylated product, is accumulated until the equilibrium.

Such concentration profiles are not usual when compared with those described in the literature. It could not be described by a single reaction mechanism. It suggests that the acylation of this bifunctional molecule is influenced by other external phenomena. It was supposed that the activity of the biocatalyst is affected during this enzymatic process in organic solvent at 55 °C. Before studying the incubation at 55 °C in 2-methyl-2-butanol influence on the Novozym 435[®] activity, the influence of the 3 main operating conditions have been investigated, namely the biocatalyst initial concentration, the stirred rate and substrate molar ratio. Then, from this study, a kinetic model based on the experimental approach will be proposed by using 10 reaction kinetic results with different molar ratios.

3.1. Influence of the biocatalyst concentration

In order to determine the optimal concentration of Novozym 435[®] for the considered enzymatic acylation, the influence of the initial biocatalyst concentration has been studied in a range of 1–15 g/L. For each initial biocatalyst concentration, initial reaction rates were calculated using the five first experimental data. Concentration profiles were fitted with a second order polynomial and derivatives were computed. The variability of the results suggests that the method presents limitations. All initial rates will be considered like apparent initial rate. Figure 2 showed that the increase of the enzyme concentration enables to improve the reaction rate and to reach a maximal apparent specific activity of $0.055 \pm 0.002 \text{ M.h}^{-1}$ per concentration unit of enzyme particle for an initial enzyme concentration of 10 g/L. At lower

initial concentration, it is supposed that the reaction rate is limited by the enzyme. At enzyme concentration of 15 g/L, the specific activity decreased and the kinetic profiles did not show greater ethyl oleate conversion. Despite of the precisely less of the calculation method, this result could be due to an overpopulation of biocatalysts particles in the reaction medium. Consequently, it could allow clashes between these particles and affect the substrate access to the active site of the immobilized lipase B of *Candida antarctica*. To perform the enzymatic trans-acylation of the 6-amino-1-hexanol in organic solvent while avoiding the enzyme limitation, the Novozym 435[®] initial concentration was set to 10 g/L.

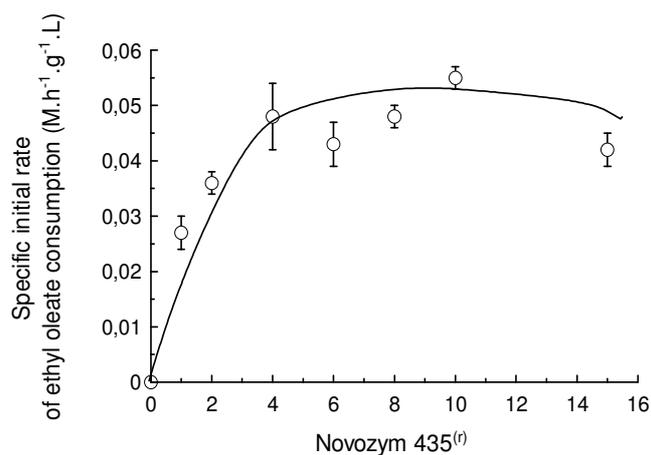


Figure 2. Influence of the initial biocatalyst concentration on the specific initial rate of ethyl oleate removal by gram of biocatalyst particles during the first hour of the 6-amino-1-hexanol enzymatic acylation in 2-methyl-2-butanol at 55 °C and 250 rpm.

3.2. Influence of the stirred rate on the acylation performances.

In the case of immobilized catalysts, the reactants have first to diffuse from the liquid bulk to the external surface of the particle and then into the interior pores of the catalyst. External mass transfer can be minimized by carrying out the reaction at an optimum speed of stirring. The effect of stirring rate on initial apparent rate of ethyl oleate removal was studied in the range of 50 – 600 rpm (figure 3).

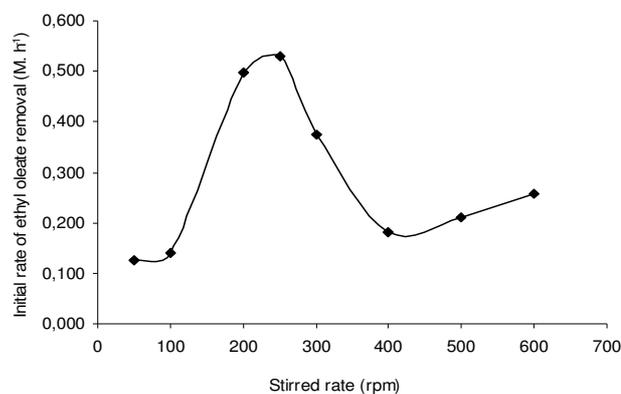


Figure 3. Influence of the stirred rate on the performances of the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol (0.12 M) with ethyl oleate (0.24 M) biocatalyzed by Novozym 435[®] (10 g/L) in 2-methyl-2-butanol at 55 °C.

To 50 rpm until 250 rpm, the initial apparent rate of ethyl oleate removal increases until a maximum value ($0.53 \text{ M}\cdot\text{h}^{-1}$). With stirred rate higher than 250 rpm, the initial rate of ethyl oleate removal sharply decreases until 400 rpm. A slight increase is then observed for stirring rate greater than 400 rpm. This result suggests that for lower stirring rates the reaction medium is not efficiently mixed and the efficient collisions between substrates and biocatalyst could be prevented by the mass transfer limitation. When stirring rate is greater than 250 rpm, the performance of the reaction seems to be affected. It was assumed that under these conditions and due to the centrifugal force, the biocatalyst particles might be packed on the wall of the reactor. The access of substrates to active enzymatic site could thus be reduced. According to the previous results, the best trade-off between transfer limitation and particle distribution in the reaction media is obtained for a stirring rate of 250 rpm. At this stirred rate, it can be considered that the performances of the reaction are controlled only by the intrinsic kinetics. The kinetic model has to be established using experimental data collected under a 250 rpm stirring rate.

3.3. Influence of 6-amino-1-hexanol / ethyl oleate molar ratio

The influence of 6-amino-1-hexanol / ethyl oleate molar ratio on the substrate conversion was studied for 11 distinct molar ratios. 10 reactions respectively with distinct molar ratio were used to identify the kinetic parameters of the model and one to validate this latter. Figure 4 presents the variation of substrate conversion during the acylation for five molar ratios: one equimolar ratio (0.12 M/0.12 M), two molar ratios with an excess of acyl donor (0.12 M/0.24 M and 0.12 M / 0.48 M) and two molar ratios with an excess of 6-amino-1-hexanol (0.24 M / 0.12 M and 0.24 M / 0.48 M). When the ethyl oleate is in excess, the substrate conversion is close to 100 % and the reaction appeared more rapid than when the 6-amino-1-hexanol was in excess. This result can be explained by the stoichiometry of the reaction. In fact, one mole of ethyl oleate is required to produce one mole of O-oleyl aminohexanol and two moles of this acyl donor are needed to the synthesize one mole of the N,O-diacylated product from the 6-amino-1-hexanol. These experimental data thus confirmed the sequential characteristics of the reaction mechanism.

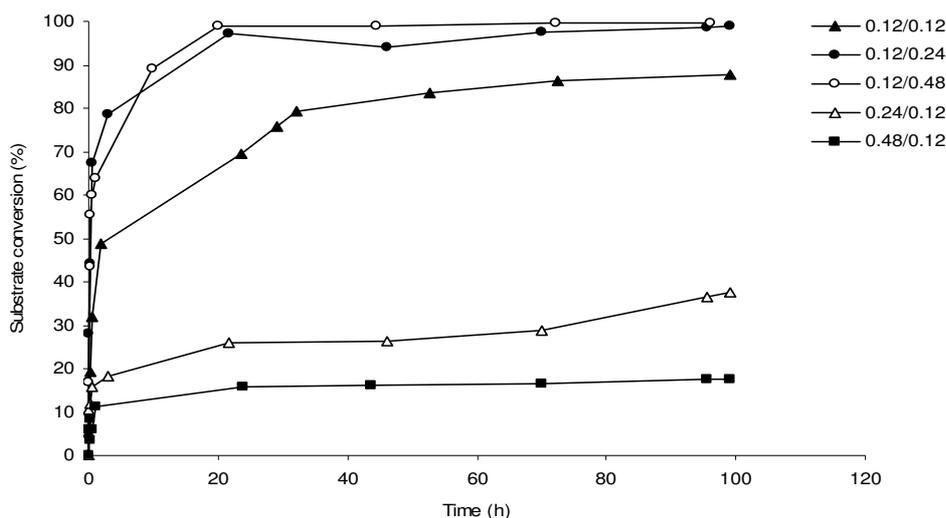


Figure 4. Influence of the 6-amino-1-hexanol/ethyl oleate molar ratio on the substrate conversion during the enzymatic acylation biocatalyzed by Novozym 435[®] (10 g/L) in 2-methyl-2-butanol at 55 °C.

The previous experimental approach allowed to identify experimental conditions to prevent enzyme and apparent mass transfer limitations during the enzymatic acylation process.

However, in the optimal conditions (250 rpm and 10 g/L of Novozym435[®]) the kinetic profiles show, for all tested molar ratios, a kinetic behaviour in two parts which can suggest the contribution of an additionally phenomenon: the evolution of the Novozym 435[®] activity during its incubation in 2-methyl-2-butanol at 55 °C.

3.3. Stability of Novozym 435[®] in organic solvent and modelling of the active enzyme

After different times of incubation in 2-methyl-2-butanol at 55 °C, the residual activity of Novozym 435[®] was determined (figure 5) and shows an important decrease of the residual activity of Novozym 435[®] all along the first eight hours of incubation. In fact, during this period the enzyme loses 30 % of its activity. Knowing that the support is composed of macroporous ceramic particles [28], the decreasing of the activity during the incubation could be explained by:

- a structural denaturation of the enzyme adsorbed on the support surface more sensibly to the incubation in 2-methyl-2-butanol at 55 °C,
- the chocks, released by the agitation, between biocatalysts particles affecting the crisp bulk of enzyme adsorbed.

But the activity becomes stabilized at a final residual activity of 0.61 ± 0.09 UA. Then, we can believe that this residual activity is due to the contribution of enzymes adsorbed inside the pores of the particles, accessible in a permanent way.

Thus, the evolution of the enzyme stability in 2-methyl-2-butanol at 55 °C could be considered like an important parameter affecting the kinetic profile.

In the model, the Novozym 435[®] residual activity has been splitted into two contributions:

$$E = E_s + E_d \quad (1)$$

E corresponds to the total enzymatic activity, E_s to the *stable* enzymatic activity and E_d the decreasing enzymatic activity during the incubation in 2-methyl-2-buanol at 55 °C and 250 rpm. The kinetic of decrease of the varying activity is supposed to follow a first order reaction:

$$E_d = E_{d0} \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \quad (2)$$

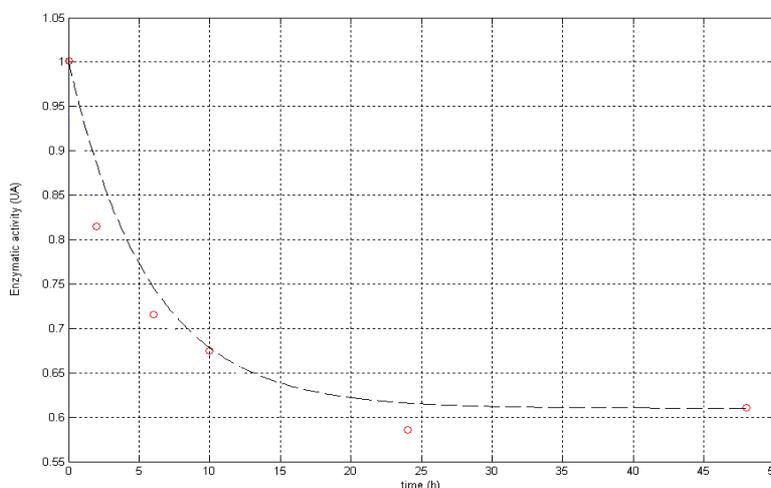


Figure 5. Influence of the incubation time at 55 °C in 2-methyl-2-butanol during the enzymatic acylation process of 6-amino-1-hexanol on the residual activity of Novozym 435[®]. --- Model fit of experimental data.

From the experimental profile of residual activity, it results $E_s = 0.61$ and $k_d = 0.174 \text{ h}^{-1}$.

In the acylation model, the enzymatic residual activity was such described by:

$$E = E_s + E_d = E_s + \exp(-k_d t) \quad (3)$$

The resulting time profile of the enzyme activity is presented in figure 5 and compared to the experimental decrease of residual activity. The first order model combined to a fractional decrease of the residual activity describes correctly the lost of Novozym 435[®] activity.

3.4. Modelling of the enzymatic acylation of the 6-amino-1-hexanol

According to the literature on the kinetics of lipase-catalyzed acylation and the experimental approach described before, a reversible sequential bi bi ping-pong mechanism with acyl-enzyme formation was considered [17-19, 21, 29]. In this mechanism, the 6-amino-1-hexanol concentration (B), the ethyl oleate concentration (AR), the O-oleyl aminoalcohol concentration (AB), the N,O-dioleoyl aminoalcohol concentration (ABA) and ethanol concentration (R) are expressed in M. The concentration of active enzyme (E) is expressed in UA, the time unit is in h. The first three reaction steps are reversible and described by kinetic constants (step 1: k_{1B} , k_{1F} , step 2: k_{2B} , k_{2F} and step 3: k_{3B} , k_{3F}) presented in figure 6. In this mechanism, it was considered that the physico-chemical properties of the microenvironment of enzyme influence the acyl-enzyme formation step. Thus the presence of 6-amino-1-hexanol (B) in the step 1 and of the O-oleyl aminoalcohol (AB) in the step 3 is indicated despite their spectator role in these steps of the mechanism. Previously study realized in our laboratory have demonstrated the incapacity of Novozym 435[®] in this enzymatic process to hydrolyze the N,O-dioleoyl aminoalcohol despite a initial increased a_w . Consequently the final step is described by only one kinetic constant (k_4)

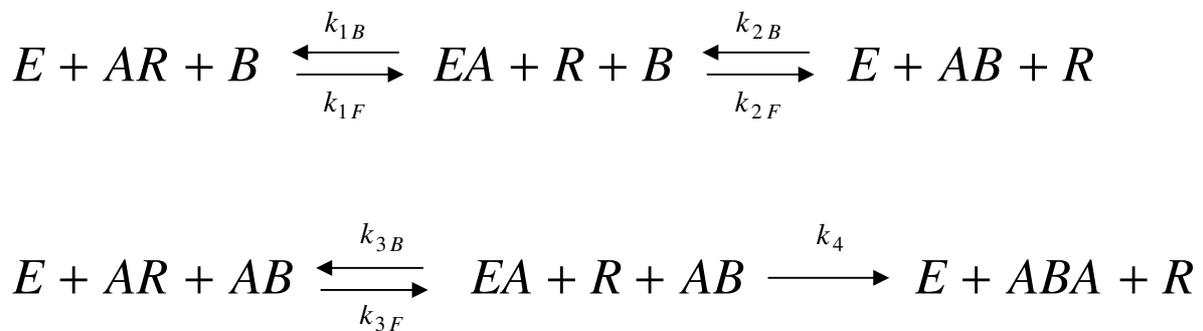


Figure 6. Bi bi ping-pong enzymatic mechanism used to describe the enzymatic process of 6-amino-1-hexanol acylation in 2-methyl-2-butanol at 55 °C.

For each reaction, a first order model is assumed. The kinetic rates are thus written as follows:

$$\begin{array}{l}
 r_{1F} = k_{1F} \cdot (E \cdot AR \cdot B) \quad r_{2F} = k_{2F} \cdot (EA \cdot R \cdot B) \quad r_{3F} = k_{3F} \cdot (E \cdot AB \cdot AR) \quad r_4 = k_4 \cdot (EA \cdot R \cdot AB) \\
 r_{1B} = k_{1B} \cdot (EA \cdot R \cdot B) \quad r_{2B} = k_{2B} \cdot (E \cdot AB \cdot R) \quad r_{3B} = k_{3B} \cdot (EA \cdot R \cdot AB)
 \end{array} \quad (4)$$

A mass balance for each compound yields the differential equation set describing the acylation model:

$$\begin{aligned}
 \frac{dB}{dt} &= -r_{2F} + r_{2B} \\
 \frac{dAR}{dt} &= -r_{1F} + r_{1B} - r_{3F} + r_{3B} \\
 \frac{dR}{dt} &= +r_{1F} - r_{1B} + r_{3F} - r_{3B} \\
 \frac{dAB}{dt} &= +r_{2F} - r_{2B} - r_4 \\
 \frac{dABA}{dt} &= +r_4 \\
 \frac{dEA}{dt} &= +r_{1F} - r_{1B} - r_{2F} - r_{2B} + r_{3F} - r_{3B} - r_4 \\
 \frac{dE_d}{dt} &= +k_d E_d \quad E = E_s + E_d
 \end{aligned} \tag{5}$$

3.4.1. Identification of the kinetic constants

Figure 6 and equations (4) indicate that the kinetic constants (k_{1B} , k_{1F}) and (k_{3B} , k_{3F}) are the parameters controlling the association and the dissociation rate of the acyl-enzyme, respectively for the O-acyl product synthesis or for the N,O-dioleoyl product synthesis. k_{2B} and k_{2F} represents the kinetic constants describing the equilibrium of ester bond synthesis/hydrolyse rate. k_4 corresponds to the kinetic constant controlling the amide bond establishment rate which allows the N,O-dioleoyl product synthesis. To identify the kinetic constants, data obtained from 10 experiments at different substrate molar ratios are used. The experimental conditions can be classified into three categories:

- reactions with an excess of acyl donor (4 experiments),
- reactions with excess of 6-amino-1-hexanol (3 experiments),
- equimolar reactions (3 experiments),

The 10 tested molar ratios are presented in table 1.

Table 1. Molar ratios of the enzymatic reactions used for the identification of the kinetic parameters.

Molar ratios used to perform acylation reaction	
6-amino-1-hexanol (M)	ethyl oleate (M)
0.12	
0.48	0.48
<hr/>	
0.06	
0.12	
0.24	0.24
0.48	
<hr/>	
0.06	
0.12	
0.24	0.12
0.48	
<hr/>	

In order to identify the 7 kinetic parameters, an objective function describing the error between experimental concentration profiles and modelled concentration profiles is defined as:

$$\begin{aligned}
 J = & w_B \sum_{i=1}^N \left(B^{\text{exp}}(t_i) - B^{\text{mod}}(t_i) \right)^2 + w_{AR} \sum_{i=1}^N \left(AR^{\text{exp}}(t_i) - AR^{\text{mod}}(t_i) \right)^2 \quad (6) \\
 & + w_{AB} \sum_{i=1}^N \left(AB^{\text{exp}}(t_i) - AB^{\text{mod}}(t_i) \right)^2 + w_{ABA} \sum_{i=1}^N \left(ABA^{\text{exp}}(t_i) - ABA^{\text{mod}}(t_i) \right)^2
 \end{aligned}$$

Where N is the number of experimental measurements, $t_i, i=1, \dots, N$, the corresponding time of measurement and $w_j, j = \{B, AR, AB, ABA\}$, the relative weight for each species error ($w_j=0.25 \forall j$). The genetical-evolutionary algorithm is used for the identification the kinetic parameters, i.e. to minimise the error criteria (6). The use of a genetical-evolutionary algorithm facilitates the identification process:

- it enables to easily define bounds in the search domain,
- it is known for its capability to scan a large search domain in order to locate global optimum (though the final convergence to the global optimum may be more time consuming),
- it allows to identify not only the optimal kinetic parameters vector but one set of kinetic parameters vector which can be considered as equivalent regarding the experiment-model error criterion.

The optimal kinetic parameters, identified for a (0.12 M / 0.24 M) 6-amino-1-hexanol / ethyl oleate ratio, are presented in table 2. In the light of these results, it appears that for both synthesis steps, the acyl-enzyme association is much more difficult than the acyl-enzyme dissociation. The order of magnitude is about 1000 less for the forward kinetic constant (k_{1F} and k_{3F}) than for the backward one (k_{1B} and k_{3B}). As far as acyl-enzyme association and mono-acylation reaction are concerned, it seems that the monoacylation is controlled by the acylation reaction (k_{2F}). As far as acyl-enzyme association and N-O-acylation reaction are concerned, the N-O-acylation reaction (k_4) seems to monitor the reaction.

Table 2. Estimated kinetic constants for enzymatic trans-acylation of 6-amino-1-hexanol (0.12 M / 0.24 M).

Kinetic constants ($M^{-1}.UA^{-1}.h^{-1}$)						
k_{1F}	k_{1B}	k_{2F}	k_{2B}	k_{3F}	k_{3B}	k_4
$5.74 \cdot 10^{-4}$	$4.87 \cdot 10^{-1}$	$6.12 \cdot 10^{-1}$	$3.91 \cdot 10^{-4}$	$5.53 \cdot 10^{-5}$	$3.04 \cdot 10^{-2}$	$4.90 \cdot 10^{-2}$

The distribution of these kinetic parameter values, which can be considered as equivalent for the model-experimental error is described in figure 7.

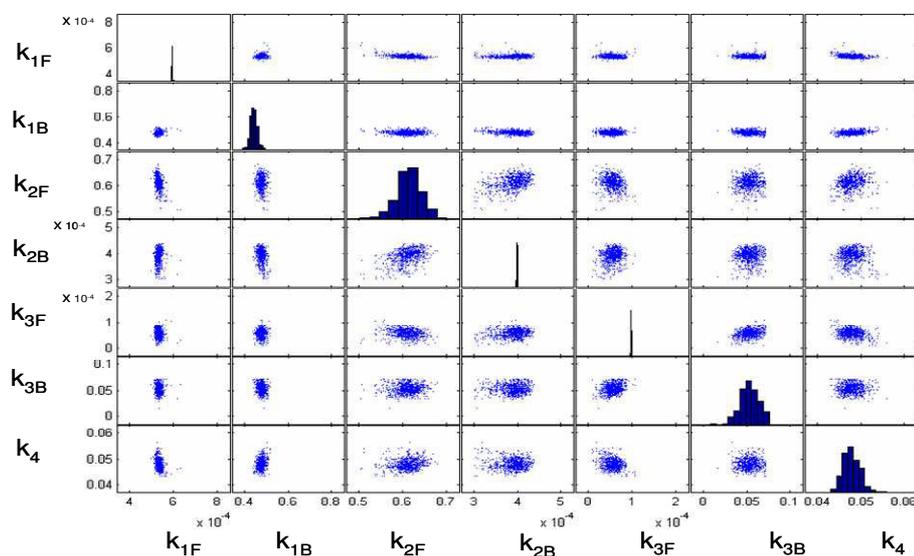


Figure 7. Identification of kinetic constants for the enzymatic acylation performed with a molar ratio 0.12 M / 0.24 M in using genetic algorithm. Values were expressed in $UA^{-1}.M^{-1}.h^{-1}$.

Figure 7 is presented as a matrix of figures. The diagonal part of the matrix shows qualitatively the distribution of all the retained kinetic parameter values. The rest of the figure

matrix presents the correlation between kinetic parameters in the retained (i.e. optimal) values. Each figure thus corresponds to a projection of a numerical, but not statistical, confidence ellipsoid. It thus provides an estimation of the joint confidence interval of the kinetic parameters. The numerical confidence interval shows that the identification leads to values which are not correlated to each other and to values that are quite accurate. The distribution of the retained optimal values is indeed quite narrow. The kinetic constant can thus be considered as reliable. These first qualitative observations suggested that the kinetic parameters allowed an agreement between modelled and experimental values, are not clearly correlated between them. Figure 8 shows the precisely modelisation of the kinetics issues to the reaction performing with the molar ratio 6-amino-1-hexanol (0.12 M) / ethyl oleate (0.24 M).

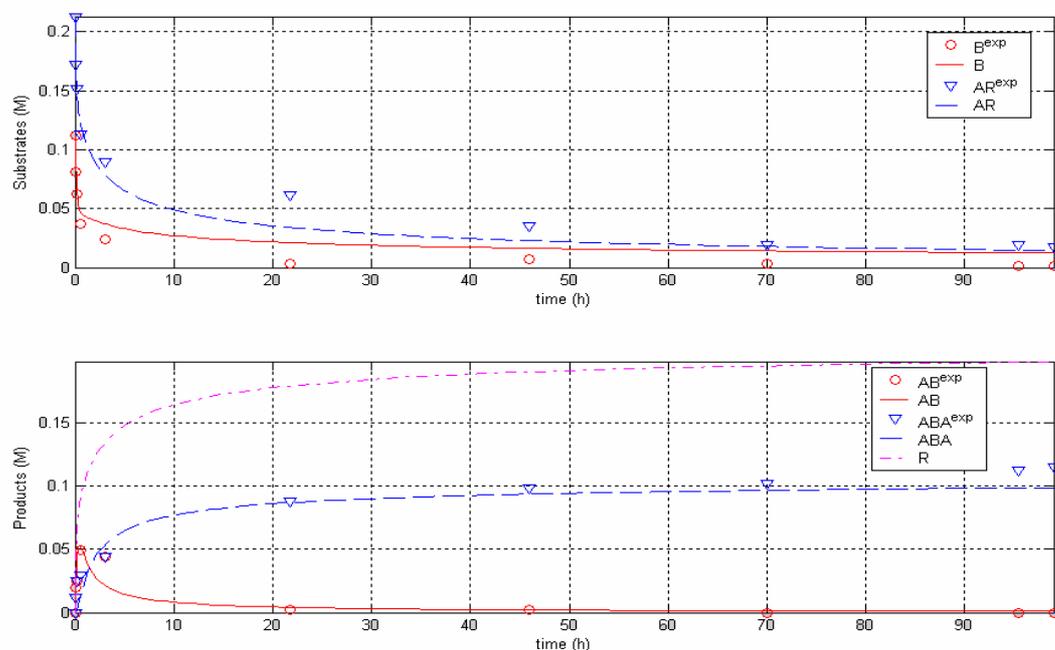


Figure 8. Kinetic curves of substrates and products relative to the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol with ethyl oleate biocatalyzed by Novozym 435[®] in 2-methyl-2-butanol at 55 °C and 250 rpm. The symbols correspond to the experimental data and the lines correspond to the modelling curves. The 6-amino-1-hexanol/ethyl oleate molar ratio is 0.12 M/0.24 M.

In order to check the pertinence of the model, the maximal rates of ethyl oleate consumption deduced from experimental data and from simulation are compared for the reference reaction 0.12 M /0.24 M molar ratio.

In the model, the initial rate of ethyl oleate removal is given by:

$$\frac{dAR}{dt} = -r_{1F} + r_{1B} - r_{3F} + r_{3B}$$

The experimental maximal rate of ethyl oleate consumption for a biocatalyst concentration of 10 g.L^{-1} was 0.55 M.h^{-1} . The calculated reaction rates during the reaction are presented in figure 9.

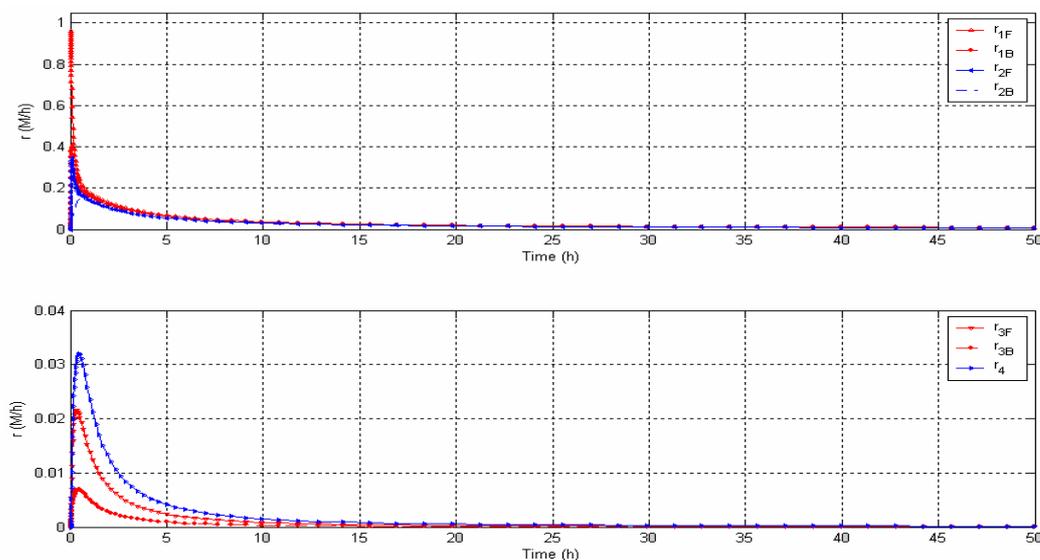


Figure 9. Simulation of all reaction rates during the Novozym 435[®]-catalysed trans-acylation of 6-amino-1-hexanol (0.12 M) with ethyl oleate (0.24 M) in 2-methyl-2-butanol at 55 °C and 250 rpm.

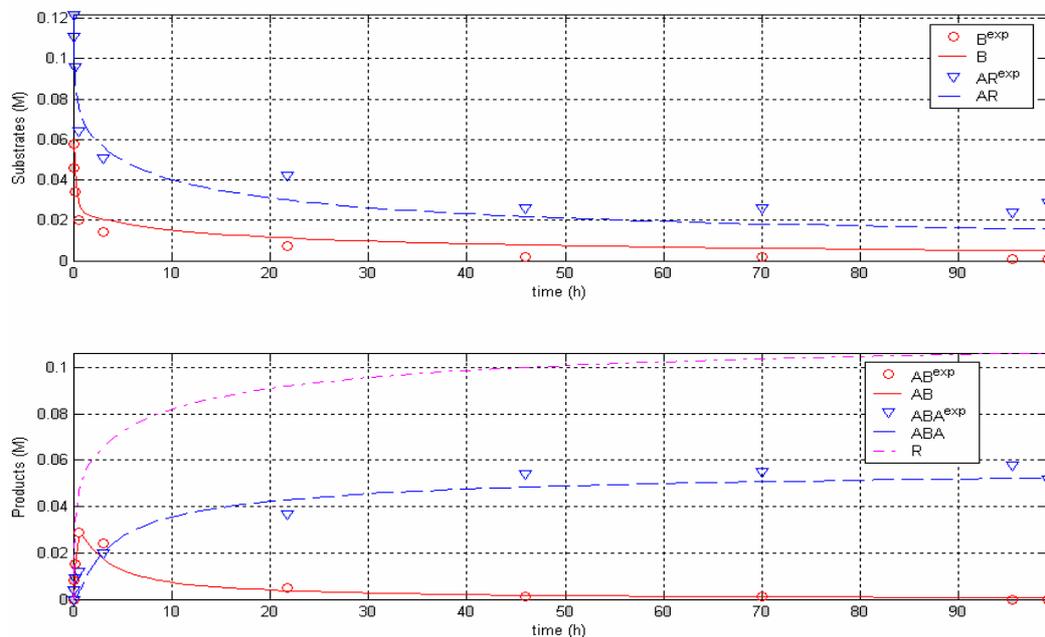
The reaction rates of figure 9 shows that the rate values reach a maximum of 0.58 M.h^{-1} which is very close with a gap of 5 % to the experimental measured rate (0.55 M.h^{-1}). Thus it confirms the reliability of the model to describe the kinetics of the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol in organic solvent in the experimental conditions. The kinetic parameters calculated for the other reactions are essentially contained in the same joint confidence interval. Thus, the parameters, determined for the reaction with molar ratio between the amino alcohol and ethyl oleate of 1 / 2, are chosen for the kinetic model.

3.4.2. Validation of the model

The simulation of the other reactions was carried out with the parameter set presented in table 2 and allowed to a good agreement between simulated curves and experimental data. By inserting of enzyme activity evolution in the reactional model, the slowing down of the kinetics was correctly simulated for all molar ratio used. Figure 10a and figure 10b present the experimental and predicted concentration profiles for the two reactions with respectively 0.06 M / 0.12 M and 0.06 M / 0.24 M, 6-amino-1-hexanol / ethyl oleate molar ratio. Figure 10a illustrates that the model is able to predict the kinetics of the reaction when the substrate concentrations are decreased in maintaining the same molar ratio. Figure 10c proves that the

model is also accurate when the molar ratio is modified with an increase of the ethyl oleate concentration.

a) Molar ratio 6-amino-1-hexanol / ethyl oleate: 0.06 M / 0.12 M



b) Molar ratio 6-amino-1-hexanol / ethyl oleate: 0.06 M / 0.24 M

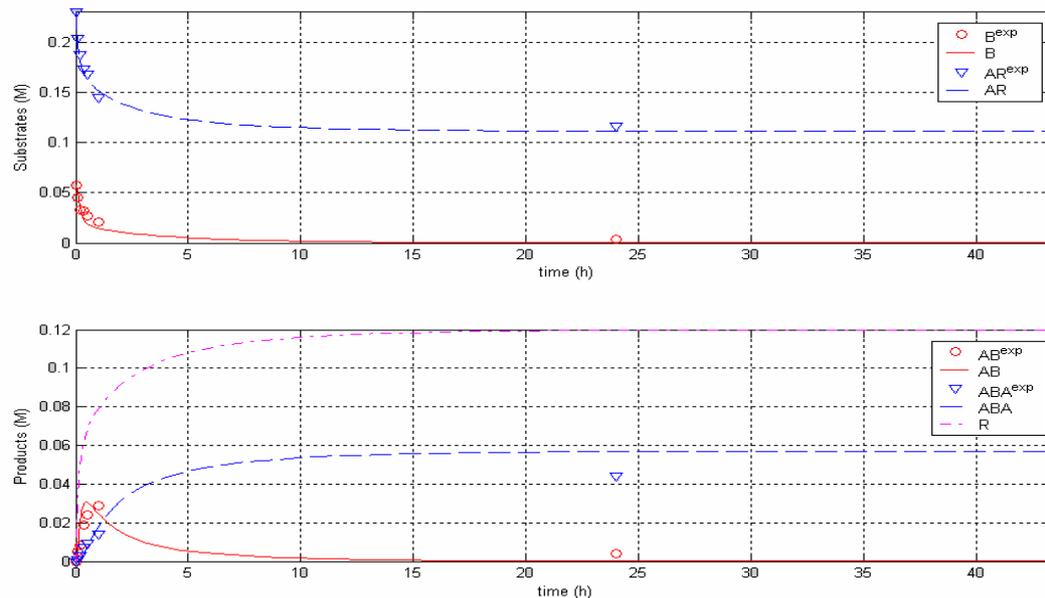


Figure 10. Kinetic curves of substrates and products relative to the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol with ethyl oleate biocatalyzed by Novozym 435[®] in 2-methyl-2-butanol at 55 °C and 250 rpm. The symbols correspond to the experimental data and the lines correspond to the modelling curves. Two 6-amino-1-hexanol/ethyl oleate molar ratios are presented: 0.06 M/0.12 M (a) and 0.06 M/0.24 M (b).

The prediction of the concentration profiles with the parameters set used (table 2) for all the molar ratios listed in table 1 are in good agreement with the experimental data, for both equimolar and excess of 6-amino-1-hexanol conditions.

Furthermore, to ensure the validity of the proposed kinetic model, an additional simulation was carried out for the reaction with the molar ratio 0.06 M 6-amino-1-hexanol / 0.48 M ethyl oleate. This molar ratio can be considered as an extreme condition because the ethyl oleate is in a very large excess. Furthermore, this molar ratio does not belong to the condition domain used to the kinetic parameters identification. The comparison between experimental and simulated data is presented in figure 11.

Molar ratio 6-amino-1-hexanol / ethyl oleate: 0.06 M / 0.48 M

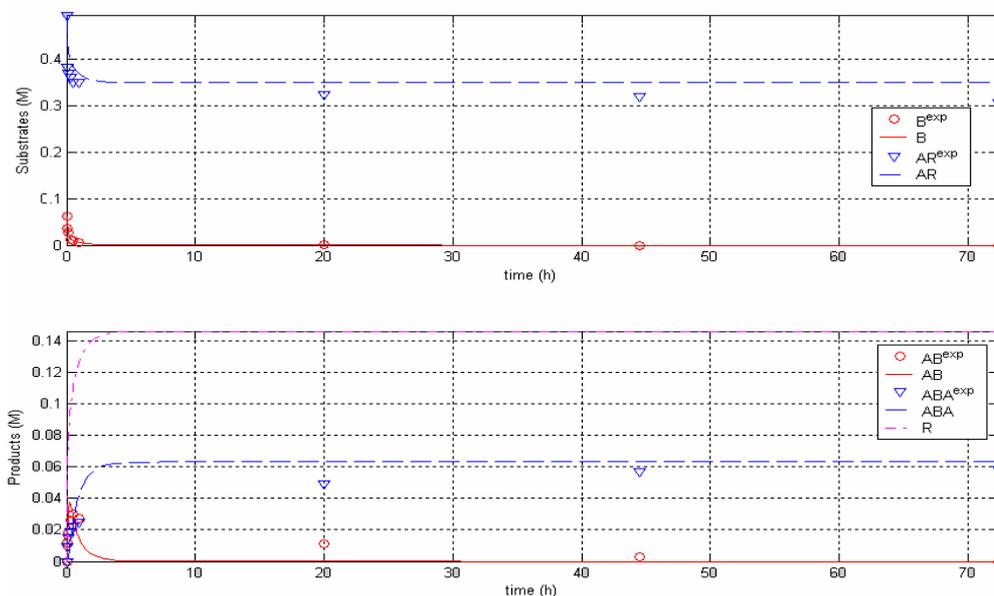


Figure 11. Kinetic curves of substrates and products relative to the enzymatic acylation of 6-amino-1-hexanol with ethyl oleat biocatalyzed by Novozym 435[®] in 2-methyl-2-butanol at 55 °C and 250 rpm. The symbols correspond to the experimental data and the lines correspond to modelling curves. 6-amino-1-hexanol/ethyl oleate molar ratio of 0.06 M / 0.48 M.

We observe that the difference between experimental and simulated data was very acceptable for this additional reaction. It can be concluded that the kinetic model is able to predict the concentration profiles of substrates and products in a large variety of initial substrates molar ratios.

Conclusion.

The Novozym 435[®] - catalyzed acylation of the 6-amino-1-hexanol with ethyl oleate in 2-methyl-2-butanol is a sequential synthesis of two products which can result from the reversible O-acylation of 6-amino-1-hexanol, then the irreversible N-acylation of the O-acyl product. The experimental approach led to determine agitation conditions which allowed to avoid apparent mass transfer limitation in the reaction medium. Furthermore, the optimal concentration of enzyme which enables this enzymatic acylation without enzyme limitation has been evaluated. Several enzymatic acylation were performed at 55 °C and 250 rpm with 10 g/L of biocatalyst particles. The resulting concentration profiles have been used to establish a kinetic model. In parallel, the decrease of the enzyme activity has been studied. The apparent enzyme activity is assumed to be a contribution of a stable enzymatic activity and a sensible activity which suffers a denaturation under our experimental conditions.

The kinetic model based on this experimental approach involved a bi bi ping-pong enzymatic mechanism in two steps, coupled with the model of the enzyme activity lost. The kinetics parameters were determined using genetic-evolutionary algorithm. The identified parameters allow simulations which are in good agreement with experimental data for distinct molar ratios of initial substrate concentrations. The kinetic model has been validated by comparing the results of a simulation of an additional reaction performed with a large excess of acyl donor. Moreover, the maximal initial rates of reaction predicted by the model have been compared with those estimated from experimental data. It confirmed the accuracy and reliability of the developed kinetic model.

An accurate and efficient original kinetic model based on experimental approach coupled with the modelling of enzyme activity evolution in organic solvent has been developed to describe a N,O-enzymatic acylation of a bifunctional molecule in organic solvent. It would be interesting to precisely understand the phenomena affecting the stability of the biocatalyst used.

Références.

- [1] Asada, H., Douen, T., Mizokoshi, Y., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A., and Muranishi, S., *Pharmaceutical Research*, (1994). 11(8): p. 1115-1120.
- [2] Pegova, A., Abe, H., and Boldyrev, A., *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, (2000). 127(4): p. 443-446.
- [3] Veuillez, F., Deshusses, J., and Buri, P., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (1999). 48(1): p. 21-26.

- [4] Zweytick, D., Pabst, G., Abuja, P.M., Jilek, A., Blondelle, S.E., Andra, J., Jerala, R., Monreal, D., Martinez de Tejada, G., and Lohner, K., *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, (2006). 1758(9): p. 1426-1435.
- [5] Yelamos, B., Roncal, F., Albar, J.P., Rodriguez-Crespo, I., and Gavilanes, F., *Biochemistry*, (2006). 45(4): p. 1263-1270.
- [6] Jagadeeshwar Rao, R., Tiwari, A.K., Kumar, U.S., Reddy, S.V., Ali, A.Z., and Rao, J.M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2003). 13(16): p. 2777-2780.
- [7] Babizhayev, M.A., *Life Sciences*, (2006). 78(20): p. 2343-2357.
- [8] Klibanov, A.M., *Chemtech*, (1986). 16(6): p. 354-359.
- [9] Klibanov, A.M., *Nature*, (2001). 409(6817): p. 241-246.
- [10] Zaks, A., In *enzymatic reactions in organic media*, (1996): p. 70-93.
- [11] Zaks, A. and Klibanov, A.M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (1985). 82(10): p. 3192-3196.
- [12] Fernandez-Perez, M. and Otero, C., *Enzyme and Microbial Technology*, (2003). 33(5): p. 650-660.
- [13] Fernandez-Perez, M. and Otero, C., *Enzyme and Microbial Technology*, (2001). 28(6): p. 527-536.
- [14] Furutani, T., Furui, M., Ooshima, H., and Kato, J., *Enzyme and Microbial Technology*, (1996). 19(8): p. 578-584.
- [15] Furutani, T., Ooshima, H., and Kato, J., *Enzyme and Microbial Technology*, (1997). 20(3): p. 214-220.
- [16] Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I., and Chevalot, I., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (2008). 55: p 110-117
- [17] Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C., and Daneshfar, A., *Journal of Biotechnology*, (2007). 127(2): p. 269-277.
- [18] Yadav, G.D. and Devi, K.M., *Chemical Engineering Science*, (2004). 59(2): p. 373-383.
- [19] W. Chulalaksananukul, J.S.C., P. Delorme and R.M. Willemot, *FEBS LETTERS*, (1990). 276(number 1,2,): p. 181-184.
- [20] Jose A. Arcos, C.G.H.J.C.O., *Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone*. 2001. p. 104-110.
- [21] Dabkowska, K. and Szewczyk, K.W., *Journal of Biotechnology*, (2007). 131(2, Supplement 1): p. S79-S80.
- [22] Yadav, G.D. and Trivedi, A.H., *Enzyme and Microbial Technology*, (2003). 32(7): p. 783-789.
- [23] Garcia, M.J., Rebolledo, F., and Gotor, V., *Tetrahedron Letters*, (1993). 34(38): p. 6141-6142.
- [24] Torres, C.F., Tore, A.M., Fornari, T., Senorans, F.J., and Reglero, G., *Biochemical Engineering Journal*, (2007). 34(2): p. 165-171.
- [25] Truppo, M.D., Pollard, D.J., Moore, J.C., and Devine, P.N., *Chemical Engineering Science*, (2008). 63(1): p. 122-130.
- [26] Muniglia, L., Nandor Kiss, L., Fonteix, C., and Marc, I., *European Journal of Operational Research*, (2004). 153(2): p. 360-369.
- [27] Perrin, E., Mandrille, A., Oumoun, M., Fonteix, C., Marc, I., *Operations Research*, (1997). 31 (2): p. 161-201.
- [28] Arroyo, M., Sanchez-Montero, J.M., and Sinisterra, J.V., *Enzyme and Microbial Technology*, (1999). 24(1-2): p. 3-12.
- [29] Arcos, J.A., Hill C.G, Jr., and Otero, C., *Biotechnology and Bioengineering*, (2001). 73(2): p. 104-110.

3. Contribution de l'article

La réaction de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol, par l'oléate d'éthyle, en solvant organique, catalysée par la lipase de *Candida antarctica* immobilisée est une réaction séquencée conduisant dans un premier temps à la synthèse d'un composé monoacylé, le O-oléyl aminohexanol puis la N-acylation de ce dernier conduit à la synthèse majoritaire du composé N,O-dioléyl aminohexanol, une fois l'équilibre thermodynamique atteint. L'étude expérimentale a permis de déterminer qu'avec une concentration en biocatalyseur de 10 g/L, la vitesse initiale apparente spécifique de disparition du donneur d'acyle est maximale. De plus, la vitesse d'agitation de 250 tr.min⁻¹ s'est montrée optimale et a ainsi permis la mise en œuvre de réactions d'acylation à différents rapports molaires de substrats en s'affranchissant de la limitation apparente de transfert de masse.

Une des originalités de ce travail est l'étude de la perte d'activité de Novozym 435[®] au cours de l'incubation en solvant organique. Cette perte d'activité a suggéré que l'activité du biocatalyseur était due à la contribution de deux populations de molécules d'enzymes immobilisées ; l'une à la surface du support sensible à la dénaturation et l'autre protégée au sein des pores intra-particulaires du support.

Le modèle cinétique établi, basé sur cette étude expérimentale, a nécessité l'utilisation d'un mécanisme enzymatique de type bi bi ping-pong couplé au modèle de perte d'activité enzymatique. L'identification des constantes cinétiques a été réalisée par utilisation d'un algorithme génétique évolutionnaire. Ces constantes cinétiques identifiées, ne présentant pas de corrélation particulière entre elles, ont permis au modèle de décrire précisément les cinétiques de réactions aussi bien en présence d'excès de donneur d'acyle, que de 6-amino-1-hexanol ou qu'en conditions équimolaires. De plus, la simulation de cinétiques d'une réaction non utilisée pour l'identification des constantes et en conditions extrêmes (très large excès de donneur d'acyle) a fourni un écart entre le modèle et l'expérience très satisfaisant. Ceci démontre bien la performance de ce modèle pour la prédiction des cinétiques de trans-acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol dans le 2-méthyl-2-butanol catalysée par Novozym 435[®].

VI. Acylation enzymatique de dipeptides : influence du milieu réactionnel et de l'environnement moléculaire des groupes fonctionnels

1. Introduction

L'acylation enzymatique de petits peptides en milieux organiques classiques et non-conventionnels est très peu décrite dans la littérature. Actuellement, l'état de l'art fait référence à des études d'acylation enzymatique d'acides aminés en solvants organiques classiques conduisant à de faibles taux de conversion et nécessitant une modification structurale du substrat au préalable afin d'augmenter sa solubilité dans de tels milieux (Valivety *et al.*, 1997 ; Soo *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2005). Certaines études d'acylation enzymatique ont tout de même été réalisées sur des dipeptides mais celles-ci ne constituaient qu'une partie de la voie de synthèse de dérivés acylés et les substrats étaient, là encore, initialement modifiés structurellement (Valivety *et al.*, 1997). Après le travail de référence entrepris précédemment sur la molécule bifonctionnelle du 6-amino-1-hexanol utilisée comme molécule modèle, une étude a été consacrée à l'acylation directe de dipeptides polyfonctionnels dans différents milieux réactionnels. L'étude qui suit est présentée sous forme d'une publication soumise au journal *Process Biochemistry* en 2008. Les substrats utilisés dans cette étude sont le dipeptide Lys-Ser, HCl présentant 3 sites potentiellement acylables et la Ser-Leu choisie pour étudier la réactivité de l'hydroxyle de la sérine constitutive. Cette étude a pour objectifs :

- d'étudier l'influence du milieu réactionnel sur les performances d'acylation enzymatique (taux de conversion du substrat, chimio-sélectivité) du dipeptide Lys-Ser, HCl en utilisant un solvant organique polaire, un système sans solvant et un liquide ionique,
- de comprendre l'importance de l'environnement moléculaire sur la réactivité de la fonction hydroxyle de la sérine constitutive d'un dipeptide au cours de son acylation.

Après cette étude fondamentale sur des dipeptides modèles, nous nous sommes orientés vers l'acylation enzymatique d'un dipeptide bioactif : la carnosine (β -Ala-His). L'intérêt de ce substrat réside dans ses nombreuses activités biologiques (Babizhayev 2006 ; Badr 2007 ;

Fouad *et al.*, 2007). Dans la littérature, l'acylation de ce peptide a déjà été réalisée par voie chimique et il a été démontré notamment que l'attachement d'un groupe acétyle augmente la résistance de ce dipeptide aux carnosinases (Pegova *et al.*, 2000).

Dans ce contexte, l'objectif final de cette étude est de développer un procédé enzymatique d'acylation en milieux organique de ce dipeptide polaire bioactif malgré sa très faible solubilité en milieu non-aqueux.

2. Enzymatic acylation of polar dipeptides: influence of reaction media and molecular environment of functional groups.

Eric HUSSON^a, Catherine HUMEAU^b, Cédric PARIS^b, Régis VANDERESSE^c, Xavier FRAMBOISIER^a,
Ivan MARC^a, Isabelle CHEVALOT^{a*}

^aLSGC, Nancy Université, CNRS, 2 avenue de la forêt de Haye- 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

^bLBB, Nancy Université, 2 avenue de la forêt de Haye- 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

^cLCPM, Nancy Université, CNRS-URA 494, BP 451, F-54001 Nancy Cedex

*Corresponding author: Isabelle.Chevalot@ensaia.inpl-nancy.fr

Process Biochemistry: Accepted manuscript

Abstract.

The enzymatic acylation of polar dipeptides was investigated. First, the Novozym435[®]-catalyzed acylation of Lys-Ser, HCl exhibiting three potential acylable sites was carried out in organic media (2-methyl-2-butanol, oleic acid) and in an ionic liquid ([Bmim]⁺[PF₆]⁻). In these reactions, the chemo-selectivity of the acylation was exclusively in favour of the N ϵ -lysine acylation and the efficiency (substrate conversion) was demonstrated to be under control of the peptide solubility. The use of [Bmim]⁺[PF₆]⁻ permitted to significantly improve the dipeptide solubility, and to enhance both substrates conversion and initial rates of acylation reaction. In the three reaction media used, the O-acylated derivative of the dipeptide was never detected suggesting a weak reactivity of the serine hydroxyl group due to its molecular environment and particularly to the presence of a free carboxylic group known for its electroattractor property.

Last, the acylation of a natural dipeptide (carnosine), exhibiting a very low solubility in organic solvents, was also performed. Carnosine was successfully N-acylated in 2-methyl-2-

butanol, and a yield of 39 % was obtained when improving the substrate solubility: a better dispersibility was obtained by application of a high pressure on the reaction medium just before starting the reaction.

Key words: *N*-acylation, lipase CAL B, dipeptide, carnosine, organic solvent, ionic liquid.

Introduction.

Some peptides exhibit various biological activities, therapeutic and cosmetic potentials [1-4]. However, this potential can be restricted by their polarity that can limit their transport through biological membranes [5]. Furthermore, their short half-life due to their sensibility towards endogenous proteases represents an additional limitation. One way to overcome these constraints is to use structural modifications as the chemical acylation of constitutive amino-acids of the peptide with activated fatty acids [6-8]. Another way can be the use of lipase-catalyzed reactions in non-aqueous solvents [9].

Amino-acids and dipeptides are generally polar polyfunctional molecules. They constitute challenging substrates, which acylation requires highly selective processes. Two principal constraints could control this reaction: the reactivity of their functional groups and their solubility which can limit their availability in the reaction medium.

For instance, the enzymatic acylation of free L-lysine which exhibits two potential acylable amino groups allowed to obtain a *N*ε-acylated derivative. This selectivity was supposed to be due to the presence of bulky groups next to the Nα amino group [10, 11]. This result was although observed in another study concerning the enzymatic acylation of dipeptides containing lysine like *L*-Phe-α-*L*-Lys-OtBu and *L*-Ala-α-*L*-Lys-OtBu [12].

The enzymatic acylation of amino acids containing hydroxyl groups like serine or threonine appeared to be very difficult to perform in organic solvent. This problem was suggested to be due to the low solubility of these substrates [13].

To overcome this difficulty, an efficient way could be to modify the nature of the reaction medium to find the appropriate one allowing both substrate solubility and enzyme activity.

In some cases, solvent-free systems which consist in using a large excess of acyl donor substrate can not only improve the solubility of polar substrates but also orientate the equilibrium of the reaction in favour of the acylation [14, 15]. However, a recent study

demonstrated that a solvent-free system constituted by free fatty acid may affect the ionization state of amino groups and can prevent their acylation [14].

Ionic liquids recently emerged as an alternative to organic solvents in some biocatalytic transformations and appeared to be well adapted in the case of polar substrates that were difficult to dissolve in dry media [16]. A large diversity of reactions as *O* and *N*-enzymatic acylations were performed in ionic liquids [17, 18]. They present unique properties as low vapour pressure, capacity to be recycled [19, 20]. Several works showed that they can improve the stability of lipases and then the efficiency of acylation reactions catalyzed by these enzymes [21-25].

Another alternative could be to modify the molecular structure of substrates by covalent attachment of a chemical group to improve their solubility. For instance, when a chemical group was attached on the terminal amino group of serine, the reaction led to the *O*-acylation with a good efficiency [26].

By amidification of serine carboxyl group, Zhang et al. [27] developed an enzymatic process permitting an efficient conversion of this serinamide. The chemoselectivity of the reaction was in favour of the *O*-acylation showing an absence of reactivity of the *N* α group. However, in another work concerning the enzymatic acylation of serine benzylester, the chemoselectivity was oriented toward the *N* α -acylation due to a spontaneous *O* \rightarrow *N* α intramolecular transfer of the acyl group explained by the short distance between these two functional groups [28].

The structural modifications were usually performed in order to improve the solubility/availability of the substrate in the reaction medium but this approach could be also used to modify the molecular environment of amino acid or dipeptide functional groups and then their reactivity.

The aim of the present work was to study the influence of the macro-environment and the molecular environment of functional groups on the selectivity and the efficiency of short peptides acylation by enzymatic way. The chemo-selectivity and the efficiency of Lys-Ser, HCl acylation by oleic acid were studied in an organic solvent, then in a solvent-free system and in an ionic liquid. Moreover, the influence of the chemical environment of serine hydroxyl group on its acylation was investigated. Finally this study was applied to the enzymatic acylation of a natural polar dipeptide, the β -Ala-His (carnosine).

2. Material and methods.

2.1. Chemicals and enzyme.

Lys-Ser, HCl (> 99 %) and Ser-Leu (> 99 %) were from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Carnosine (β -Ala-His; 99 %), oleic acid (99 %) and triethylamine (99 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Novozym 435[®] (lipase B from *Candida antarctica* immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU.g⁻¹ and protein grade of 1-10 % was from Novo Nordisk A/S (Bagsraerd, Danmark). 2-Methyl-2-butanol, 1-butanol, acetic acid, chloroform, methanol, and trifluoroacetic acid (TFA) with 99 % of purity were acquired from Carlo Erba (Rodano, Italy). 1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim]⁺[PF₆]⁻) (99 %), was produced by Solvionic SA (Verniole, France).

2.2. Solubility of Lys-Ser, Ser-Leu and β -Ala-His.

3 mL of the reaction medium (2-methyl-2-butanol, oleic acid or ionic liquid) was saturated with the corresponding solid substrate overnight at different temperatures and stirring rates. To determine the solubility of each substrate in the 2-methyl-2-butanol, an aliquot of the supernatant was taken out and filtered. The organic solvent was evaporated (50 °C, 14 mbar) and the residue was solubilized in water. Concerning the solubility of Lys-Ser, HCl in oleic acid and in [Bmim]⁺[PF₆]⁻, and the solubility of carnosine in [Bmim]⁺[PF₆]⁻, an extraction with water (5/1 v/v) was required and the aqueous phase was analyzed by HPLC. To precisely determine the concentration in the aqueous phase, partition coefficients in ionic liquid/water, and oleic acid/water biphasic systems were determined for each substrate using the following procedure: ionic liquid and oleic acid solutions with a known concentration of dipeptide were prepared and extracted with water (5/1 v/v) and the aqueous phases were analyzed by HPLC. Data concerning Lys-Ser are mentioned in table 1. They were used to correct the concentration values.

Table 1. Solubility values of Lys-Ser, HCl determined at 55 °C, in different reaction media for the enzymatic acylation and their respective viscosity at 25 °C.

Reaction media	Solubility of Lys-Ser, HCl (g.L ⁻¹)	Partition coefficients	
		in water/reaction medium	Viscosity at 25 °C (mPa.s)
2-Methyl-2-butanol	1.18		5.1
Oleic acid	6.37	0.87	27.6
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	14.05	0.92	287.5

The partition coefficient of carnosine in a water/[Bmim]⁺[PF₆]⁻ biphasic system was superior to 0.98. The solubility of carnosine in the different reaction media used was mentioned in the table 2.

Table 2. Solubility of carnosine in different reaction conditions used for the enzymatic acylation.

Reaction media	Temperature (°C)	Solubility of carnosine (g.L ⁻¹)
2-Methyl-2-butanol	55	0.29
2-Methyl-2-butanol	80	0.33
2-Methyl-2-butanol	80	0.43
French Press 1kbar		
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	55	< 0.05
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	80	< 0.10

2.3. Acylation procedure of Lys-Ser, HCl, Ser-Leu and carnosine.

The enzymatic acylation of Lys-Ser, HCl in ionic liquid, solvent-free system as well as in 2-methyl-2-butanol was carried out in stirred flasks. In a typical acylation reaction, dipeptide, oleic acid were added in 1 mL of ionic liquid or 10 mL of organic medium previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. The initial water activity of the media was decreased below 0.1 to favour the lipase synthetic activity and controlled by a thermoconstanter Novasina[®], (Switzerland) [29-31]. The molar ratio acyl donor/dipeptide was fixed at 2. Triethylamine was added to the reaction media in a large excess (2.4 M) for the release of the salt derivative and to favour the neutral form of amino groups [32].

In all cases, the flasks were incubated in an orbital stirred Syncore[®] parallel synthesis station (Büchi) equipped with a condensation system to prevent the evaporation of the solvent. Reactions were stirred at 250 rpm and heated at 55 °C. After incubation of the substrates for

12 h, the acylation was started by the addition of 10 g.L⁻¹ of enzyme preparation. Control experiments without enzyme and/or without triethylamine were also carried out in the three media. In the case of organic media, samples were withdrawn and analyzed. Concerning the ionic liquid, various flasks containing the same concentration of reactants and enzyme were prepared and incubated in the same conditions as described before. At different times, the reaction media were withdrawn in order to determine the reaction progress.

The enzymatic acylation of Ser-Leu was only carried in 2-methyl-2-butanol as indicated before and did not require the addition of the tertiary amine.

According to difficulties to solubilize and acylate the β -Ala-His, its enzymatic acylation was performed in a reactor equipped with a mechanical stirring system and a condensation system (Wheaton®) favouring a better homogenisation of the medium. Carnosine and oleic acid were added in 10 mL organic media or ionic liquid, previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. To improve the dispersibility of the substrate particles, the reaction medium can be submitted to a pressure of 1 kbar before adding the enzyme (Constant Cell Disruption Systems®, Daventry, United Kingdom).

After the end of the reaction, the enzyme was removed by filtration and the reaction mixture was diluted with methanol/TFA (100/0.1 v/v). The residual acyl donor and/or the product of the reaction were separated and quantified by HPLC.

To validate the repeatability of the experiments, each reaction was repeated in triplicate. Initial rates and substrate conversion yields were expressed as mean values with standard deviations (\pm).

2.4. Analytical methods.

2.4.1. Qualitative analyses by TLC.

Qualitative analyses of the reaction media by TLC were realized on precoated Kieselgel G 60 plates 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase used: butanol/acetic acid/water (60/20/20 v/v/v) permitted to separate peptide substrates from the acyl product with a high resolution. Chloroform/acetic acid/methanol (95/0.5/4.5 v/v/v) were used to separate eventual more apolar products (di or triacyl products) from the acyl donor.

The molecules exhibiting a primary amino group were detected by spraying an ethanol solution of ninhydrin (0.01 %). Other molecules were revealed by spraying an aqueous solution of KMnO₄ (0.1 M).

2.4.2. Quantitative analyses by HPLC.

The time course of dipeptides acylation was monitored using HPLC (LC 10 AD – VP, Shimadzu, France) equipped with an UV detector at 214 nm and a light-scattering low temperature evaporative detector (Shimadzu, France) in this order. The column was a newly developed C18 amide 125-2.1 mm (Altima[®], Altech, France) maintained at 25 °C. The mobile phase (0.2 mL/min flow rate) consisted in methanol/water/TFA (80/20/0.1 v/v/v). A linear elution gradient was applied to reach methanol/TFA (100/0.1 v/v) after 5 minutes. This methanol concentration was maintained for 18 minutes and progressively decreased to reach the initial methanol/water ratio until the end of the run (i.e. 34 min). Calibrations were performed using purified product and acyl donor. In the case of enzymatic acylation of Lys-Ser, the kinetic curves of product synthesis were directly established by measuring the product. In the case of Ser-Leu and carnosine acylation, only the consumption of acyl-donor was measured and the kinetics of product synthesis was established by stoichiometry (1:1). The substrate conversion rate at the thermodynamic equilibrium was determined applying the following equation:

$$r(\%) = (1 - [\text{substrate}]_{\text{equilibrium}} / [\text{substrate}]_{\text{initial}}) \times 100.$$

Initial rates of reaction were calculated using a second order polynomial model applied to the derivatives of the five first experimental data (Software: Matlab[®], MathWorks, E.U.).

As the ionic liquid interfered with the chromatograms, a preliminary extraction with hexane was applied. The partition coefficients between ionic liquid and hexane were determined for each acyl donor and acyl product using the following procedure: a solution of ionic liquids with a known concentration of each compound was prepared and then extracted in hexane (5v/v). Hexane was evaporated and the residue was solubilized in methanol, and then quantified by HPLC. The partition coefficient of oleic acid and *N*ε-oleyl Lys-Ser in hexane/[Bmim]⁺[PF₆]⁻ biphasic system were 0.98 and 0.87 respectively.

2.5. Identification of acylated product by ESI-MSⁿ analytical procedure and ¹H NMR.

After filtration of each reaction medium to remove the enzyme (and liquid/liquid extraction in the case of ionic liquid), samples were analyzed by mass spectrometry with electrospray ionization source (LTQ, Thermo electron corporation[®], E.U.). MS measurement was carried out with helium as the collision gas in the ion trap and nitrogen as sheath, sweep

and auxiliary gas (50/10/10) in the source. MS parameters were tuned as following: electrospray ionization mode, capillary temperature of 300 °C, source voltage at 5.0 kV.

Peptide derivatives were purified by semi-preparative HPLC using the conditions described before. ¹H NMR spectra were recorded in deuterated DMSO on a Brücker Advance 300 spectrometer (Germany).

3. Results and discussion.

Enzymatic acylation of peptides (figure 1) was performed with an molar ratio acyl donor to acyl acceptor of 2 at 55 °C or 80 °C as reported in a previous study [14]. No product was obtained in media without enzyme and/or triethylamine.

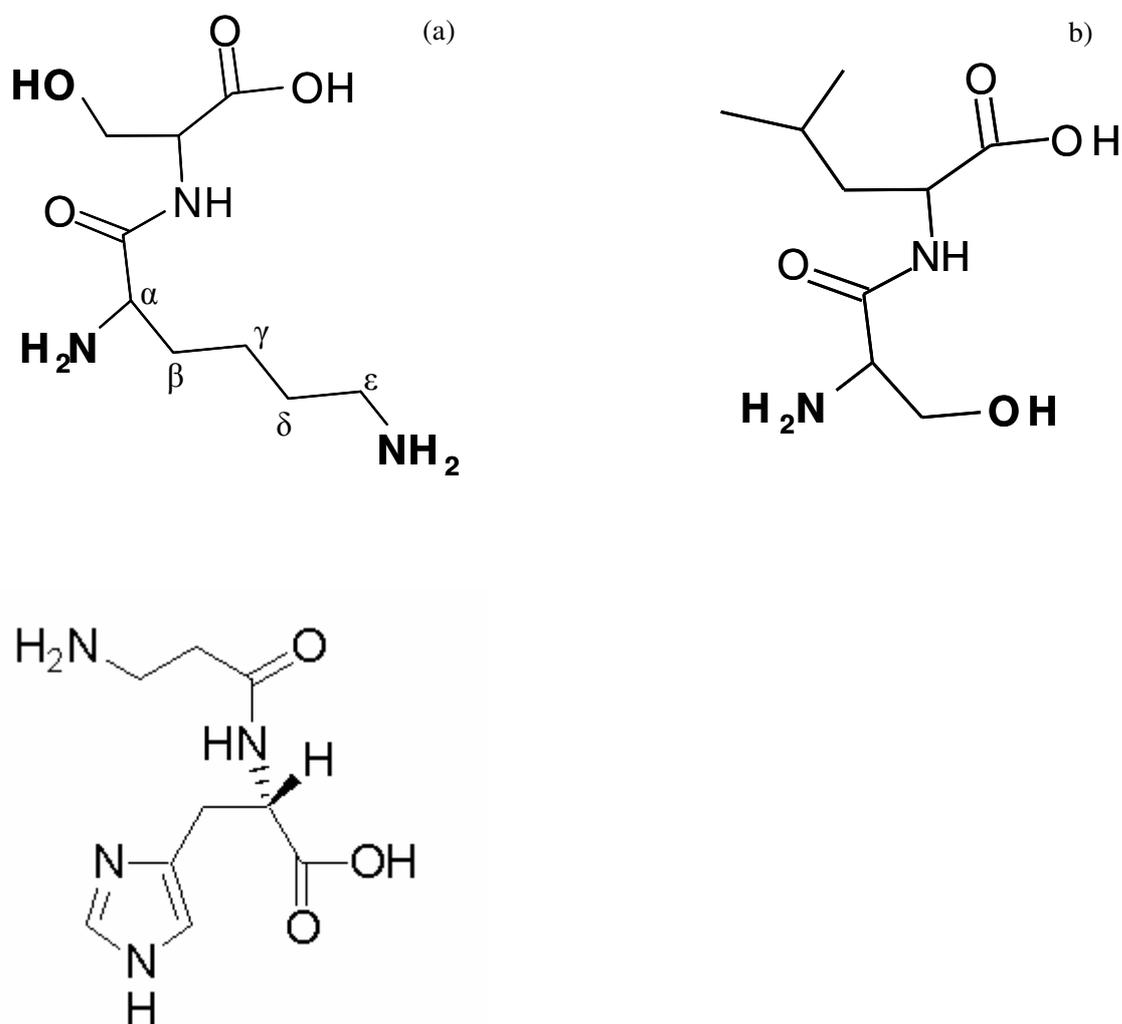


Figure 1. Molecular structures of Lys-Ser (a), Ser-Leu (b) and β -Ala-His (c). Different potential sites of acylation are indicated in bold.

3.1. Enzymatic acylation of polyfunctionnal dipeptides in different media.

3.1.1. Selectivity of enzymatic acylation of Lys-Ser.

The Lys-Ser, HCl dipeptide was used as a model molecule to study the selective *N* and/or *O*-acylation as its molecular structure exhibits three potential sites of acylation: two free amino groups in position α and ϵ positions of lysine and the hydroxyl group of serine (figure 1a).

To verify the reactivity of the commercial Lys-Ser, HCl an enzymatic acylation was performed in 2-methyl-2-butanol, in oleic acid and in an ionic liquid ($[\text{Bmim}]^+[\text{PF}_6]^-$) in the presence of the immobilized CAL B. The time course of each reaction was preliminary analyzed by TLC. This qualitative approach showed the absence of transformation of Lys-Ser, HCl, despite the significant solubility of this substrate, suggesting a very low reactivity of its functional groups (table 1). This result was partially explained by the protonated form of the amino groups which were unable to carry out the nucleophilic attack required for the reaction. Another explanation could be that these conditions favoured the formation of an un-reactive ion-pair complex between the acyl donor and the dipeptide affecting the availability of the substrate [33].

To overcome the drawback of the ionization state of the substrate, triethylamine was added in each reaction medium with a dipeptide:triethylamine molar ratio of 1:20 as suggested by Dolores *et al.* [32]. The qualitative analyses of the three reaction media by TLC after 70 h, suggested the formation of a new compound, revealed by ninhydrin and that was more apolar than the dipeptide. This result confirmed the feasibility of the enzymatic acylation of the dipeptide in these three media in presence of a strong organic base. The synthesized product in each reaction medium was purified and identified by ESIⁿ mass analyses. The mass spectra were similar regardless of the reaction medium.

The positive ion spectrum (figure 2a) indicated the following molar mass:

- (1) 498.6 g.mol⁻¹: M (*mono oleylLys-Ser* + H^+)
- (2) 520.6 g.mol⁻¹: M (*mono oleylLys-Ser* + Na^+)
- (3) 538.4 g.mol⁻¹: M (*mono oleylLys-Ser* + K^+)

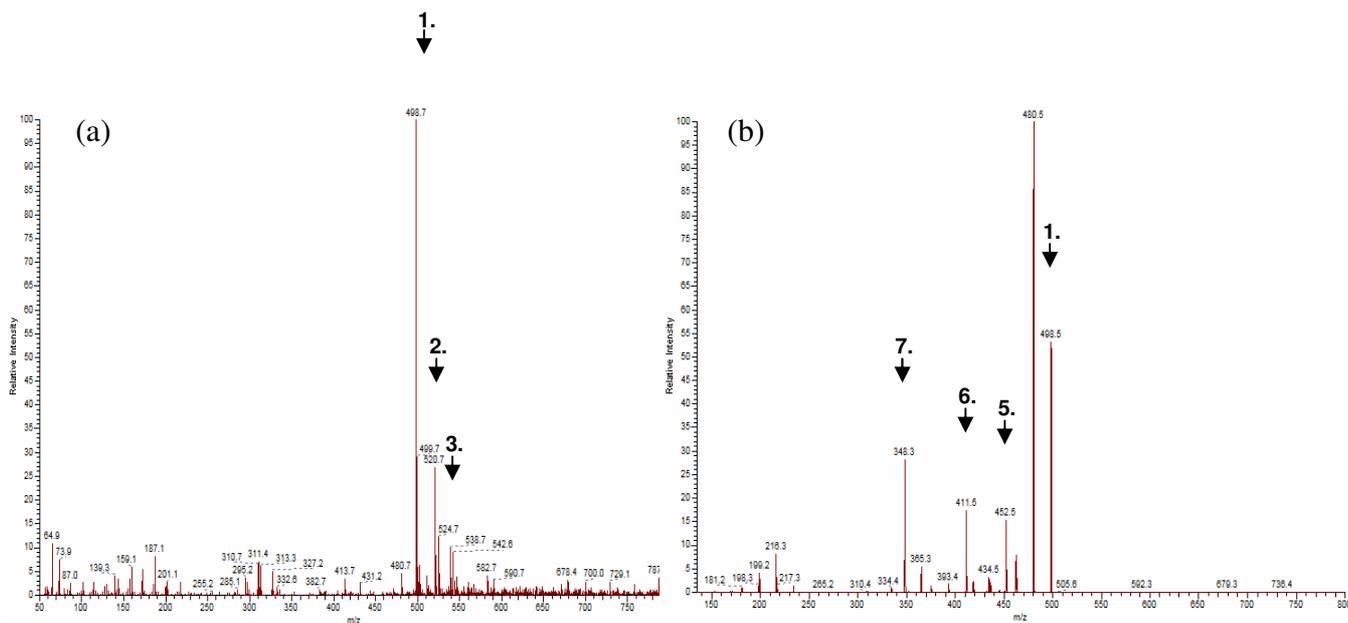


Figure 2. Mass analyses by fragmentation of $N\epsilon$ -oleyl Lys-Ser. Mass spectrum of the acyl product and their corresponding adducts (a). Mass spectrum obtained after fragmentation of the principal ion (b).

This mass determination confirmed the synthesis of a mono acylated derivative of Lys-Ser. To elucidate the site of acylation, a MS fragmentation in positive mode was applied on the principal ion ($m/z = 498.6 \text{ g.mol}^{-1}$). The mass spectrum is presented in the figure 2b.

The first fragmentation (MS^2) allowed to obtain following m/z ions corresponding to:

- (4) 480.5 g.mol^{-1} , $M(\text{mono oleylLys-Ser} - H_2O + H^+)$,
- (5) 452.5 g.mol^{-1} , fragment of $N\epsilon$ -oleylLys-Ser predicted by MASS FRONTIER 4.0 (Xcalibur, soft) with high probability.
- (6) $411.19 \text{ g.mol}^{-1}$, $M(\text{mono oleylLys} + H^+)$
- (7) 348.3 g.mol^{-1} , fragment of $N\epsilon$ -oleyl Lys-Ser predicted by MASS FRONTIER 4.0 (Xcalibur, soft) with high probability.

These results indicated that the acylation occurred on the lysine amino group, probably on its ϵ -amino group.

To confirm the acylation site, ^1H NMR spectra were recorded. The 2D COSY spectrum (homonuclear COrelated SpectroscopY) showed all the signals of the different moieties of the molecule (lysine, serine and oleic acid) and the assignment of the different protons can be made through their cross-peaking with their vicinal protons (figure 3a).

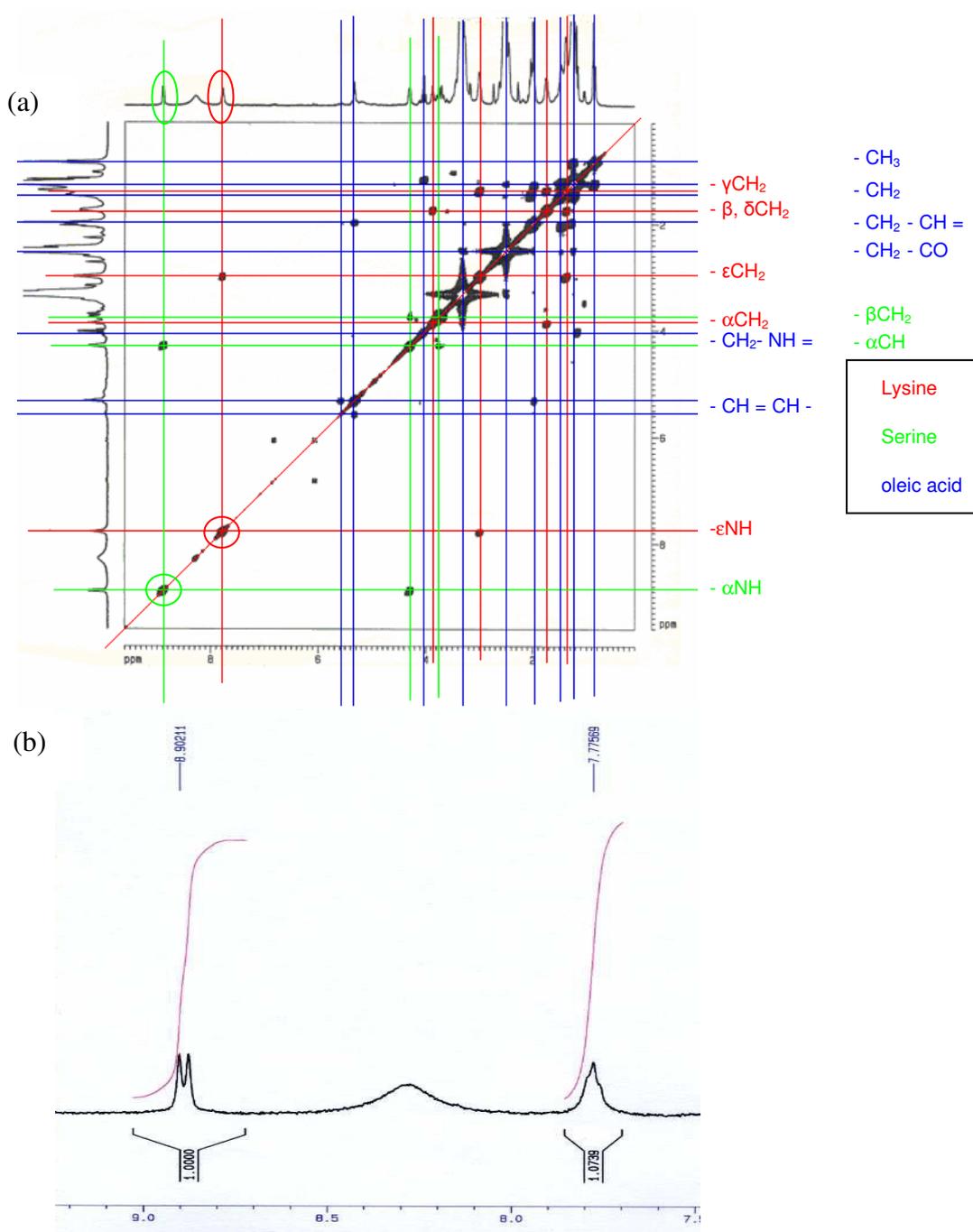


Figure 3. Characteristic 2D NMR (COSY) analysis of the N ϵ -oleylLys-Ser (a). Magnification of the amide region (b).

Thus, the α NH of serine (encircled in green) and the ϵ NH of lysine (encircled in red) were clearly identified. Moreover, the magnification of the amide region of the 1D spectrum (Figure 3b) showed that the ϵ NH of lysine integrated for one proton compared to the α NH of serine taken as a reference. This fact proved that the amino group in ϵ position of lysine was implied in an amide bond. These results confirmed the identity of the product: *N* ϵ -oleyl Lys-Ser. This structural analysis demonstrated that the chemo-selectivity of the enzymatic acylation of Lys-Ser was exclusively orientated towards the *N* ϵ -acylation independently of the medium used.

The absence of *N* α -oleyl product could be explained by the presence of bulky groups in α position which prevents the accessibility of the α amino group as described in a previous work concerning the enzymatic acylation of free lysine [10]. *O*-acylated product was never detected. The absence of serine *O*-acylation was already reported by another study [28]. The explanation suggested by the authors was the low solubility of the substrate preventing its availability in the reaction medium. However, in the present work, in spite of an improved solubility of the dipeptide in [Bmim]⁺[PF₆]⁻, the *O*-acylated derivative was never detected.

3.1.2. Lys-Ser, HCl acylation kinetics in different reaction media.

The Lys-Ser, HCl solubility was low in 2-methyl-2-butanol (table 1). The kinetic curves relative to its acylation in this solvent showed that its conversion after 70 h of reaction was 36 ± 5 % (figure 4a). This result was probably due to its weak solubility (1.18 g.L^{-1}). In these conditions, the *N* ϵ -oleyl Lys-Ser was produced with an initial rate of synthesis of $1 \pm 0.5 \text{ mM.h}^{-1}$ (table 3).

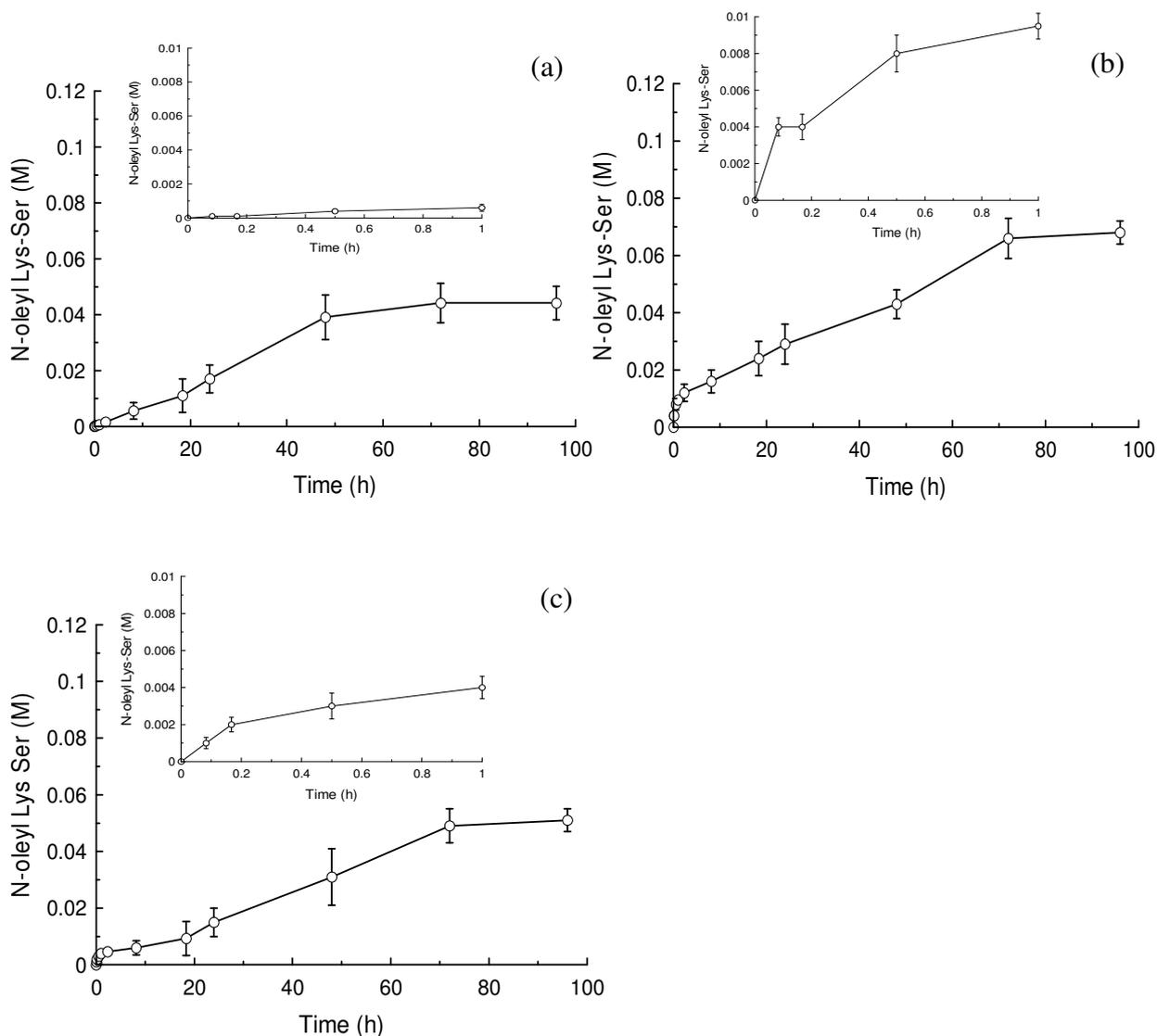


Figure 4. Kinetic curves related to the enzymatic acylation of Lys-Ser (0.12 M) by oleic acid (0.24 M) in 2-methyl-2-butanol (a), [Bmim]⁺[PF₆]⁻ (b) and oleic acid (c). Reactions were carried out at 55 °C and catalyzed by Novozym 435[®]. -○- Nε-oleyl Lys-Ser.

To verify the limiting effect of the substrate solubility on this acylation process, two other media were used: the 1-butyl-3-methyl imidazolium hexafluorophosphate [Bmim]⁺[PF₆]⁻ and a solvent-free system, known to displace the equilibrium toward the synthesis.

The solubility of Lys-Ser, HCl in the ionic liquid was significantly improved (table 1). The kinetic curve of the reaction in this medium is presented in the figure 4b. Both the substrate conversion ($57 \pm 3 \%$) at the equilibrium and the initial rate of the reaction ($32 \pm 4 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$) was higher than in 2-methyl-2-butanol (table 3). This could be explained by the better solubility of the dipeptide in such medium. This ionic liquid with constitutive cation 1-butyl-

3-methyl imidazolium coupled with a low nucleophilic anion was then adequate to improve the efficiency of the enzymatic acylation of this dipeptide as described in the literature for other substrates (alcohol, amine and amino alcohol) [14, 25].

Table3. Efficiency and kinetic parameters of the enzymatic acylation of Lys-Ser (0.12 M) by oleic acid (0.24 M) in different reaction media and their respective a_w . Concentration of product and substrate conversion were determined at the thermodynamic equilibrium.

Reaction media	a_w	[Nε-oleyl-Lys-Ser] (mM)	Initial rate (mM.h ⁻¹) N-oleyl-Lys-Ser synthesis	Substrate conversion (%)
2-Methyl-2-butanol	0.05	44 ± 7	1 ± 0.5	36 ± 5
Solvent-free (oleic acid)	0.08	51 ± 4	9 ± 2	43 ± 3
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	0.09	68 ± 3	32 ± 4	57 ± 3

The use of oleic acid to substitute the solvent allowed a better solubilization of the Lys-Ser, HCl (table 1) in comparison with 2-methyl-2-butanol, but in lower extent than [Bmim]⁺[PF₆]⁻. The kinetic curve of the reaction is presented in the figure 4c. The initial rate of the Nε-acyl product synthesis (9 ± 2 mM.h⁻¹) was higher than that previously obtained in organic solvent but the substrate conversion at equilibrium was not improved (table 3). This result could be explained by the ionization of the substrate amino groups due to the excess of oleic acid in spite of the presence of triethylamine.

The present study showed an efficient acylation of Lys-Ser using ionic liquid, without requiring any preliminary structural modification of the substrate.

The absence of O-acylated product of this dipeptide appeared to be essentially due to a low reactivity of the serine hydroxyl function which may be explained by its molecular environment.

3.1.3. Enzymatic acylation of Ser-Leu.

To understand the absence of O-acylation during the lipase-catalyzed acylation of Lys-Ser, HCl and the influence of the molecular environment on the reactivity of serine hydroxyl group, a dipeptide Ser-Leu (figure 1b) was used. The electro-attraction effect of the serine carboxylic group may be diminished as this group is implied in an amide bond whereas in the

Lys-Ser, it is free. This dipeptide exhibits two potential acylable sites among which the N α group was difficult to acylate as mentioned in several studies [13, 27].

The time course of Ser-Leu acylation in 2-methyl-2-butanol (Ser-Leu solubility: 6.11 g.L⁻¹) was preliminary analyzed by TLC. The presence of one compound which was more apolar than the dipeptide and which presented a primary amine function was observed. To determine the structure of this product, the reaction medium was analyzed by mass fragmentation spectrometry. The principal ion $m/z = 483.4 \text{ g.mol}^{-1}$ (M *oleylSer-Leu* + H^+) corresponding to a Ser-Leu monoacylated derivative was detected, and the corresponding sodium adduct (505.3 g.mol⁻¹) was also observed. The fragmentation (MS²) allowed to obtain following m/z ions: 465.4 g.mol⁻¹ (M *oleylSer-Leu* - H_2O + H^+) and 370.3 g.mol⁻¹ (M *oleylSer* + H^+). These results confirmed the synthesis of the O-oleylSer-Leu.

Ser-leu conversion was evaluated by measurement of oleic acid consumption and reached $45 \pm 3 \%$ after 50 h of reaction. The chemo-selectivity of the reaction was in favour of the O-acylation. This study demonstrated that it was possible to O-acylate the serine when its carboxylic group was implied in an amide bond. This results was in agreement with a previous study concerning the serinamide acylation [27]. Moreover, the O \rightarrow N α intramolecular transfer of the acyl group was not detected conversely to that described in the case of serine benzylester [28].

These results showed that the enzymatic acylation of a dipeptide depended on (i) the solubility of the substrate which can limit the efficiency of the reaction (substrate conversion and initial rate of synthesis) and (ii) the reactivity of its functional groups depending on their molecular environment.

3.2. Enzymatic acylation of a bioactive dipeptide: carnosine.

Several studies recently demonstrated that carnosine (β -Ala-His) presented antihypertensive, antioxidative and neuroprotective properties [34-36]. Moreover, it was demonstrated that the N-acetylation of carnosine improves its antioxydative potential [1]. In the literature, this dipeptide has never been acylated by an enzymatic way.

Carnosine exhibits one N-acylable site (figure 1c). The aim of this investigation was to study both the reactivity of carnosine primary amino group and the influence of carnosine solubility in different media on the performance of its enzymatic acylation.

The enzymatic acylation of carnosine was performed in 2-methyl-2-butanol at 55 °C. The ESI⁺-MS analysis of the reaction medium, after 72 h of reaction, indicated a principal ion $m/z = 491.3 \text{ g.mol}^{-1}$ ($M \text{ oleylcarnosine} + H^+$), and the corresponding sodium adduct (513.6 g.mol^{-1}). This result confirmed the synthesis of a monoacylated derivative of carnosine. The fragmentation (MS^2) led to following m/z ions: 473.3 g.mol^{-1} ($M \text{ oleylcarnosine} - H_2O + H^+$), 455.4 g.mol^{-1} , 445.3 g.mol^{-1} , 429.3 g.mol^{-1} , 355.1 g.mol^{-1} , 227.3 g.mol^{-1} ($M \text{ carnosine} + H^+$). These fragments were all predicted with high probability for N-oleylcarnosine fragmentation by MASS FRONTIER 4.0 (Xcalibur, soft). These results confirmed the synthesis of N-oleyl- β -Ala-His.

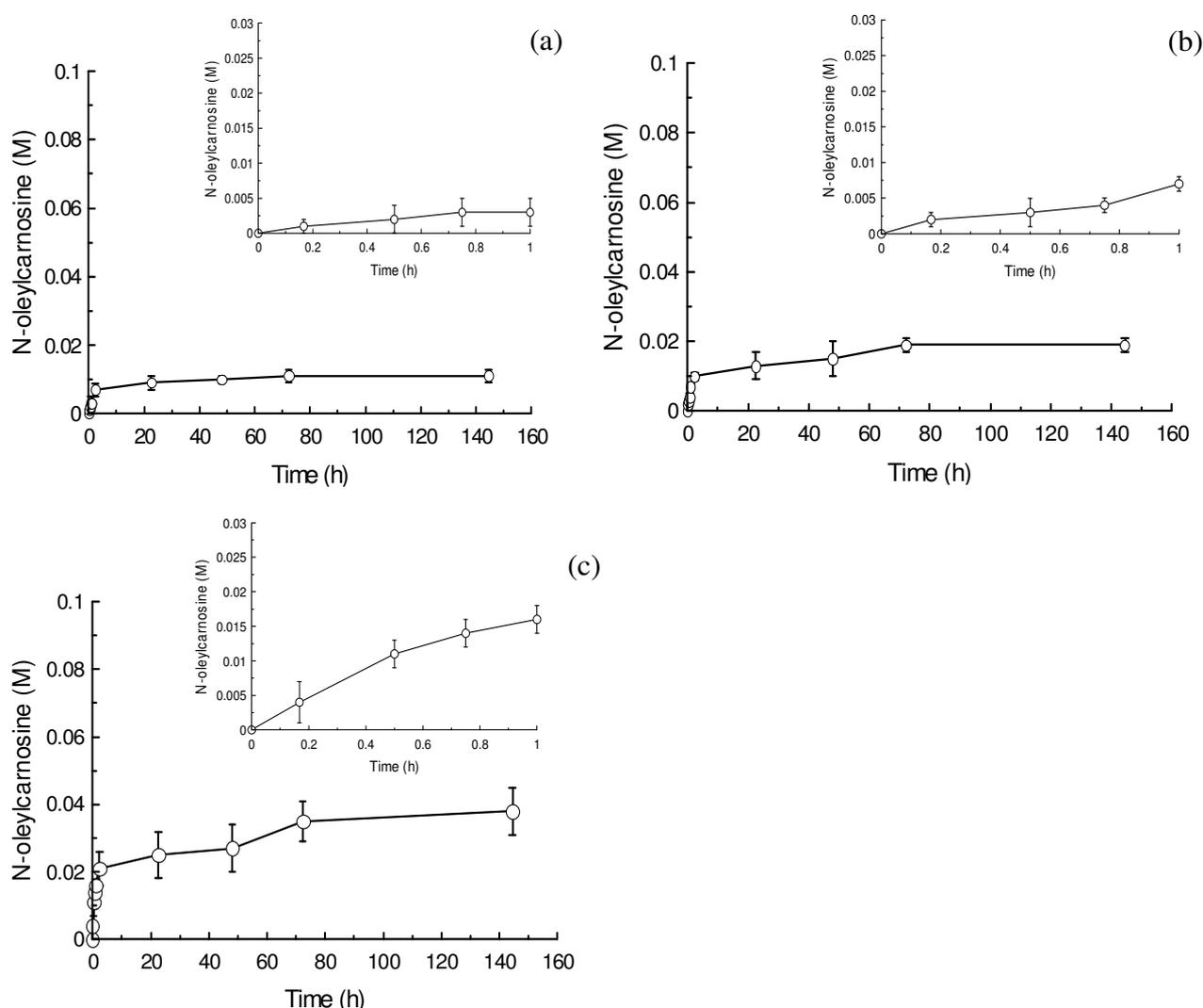


Figure 5. Kinetic curves related to the enzymatic acylation of carnosine (0.12 M) by oleic acid (0.24 M) in 2-methyl-2-butanol, at 55 °C (a), 80 °C (b) and 80 °C after treatment of the reaction medium at 1 kbar (c). Reactions were catalyzed by Novozym 435[®]. -○- N-oleyl carnosine.

In 2-methyl-2-butanol at 55 °C, the solubility of carnosine was very low (table 2). The kinetic curve of the reaction is presented in the figure 5a. Both the substrate conversion (9.5 ± 1.5 %) at the equilibrium (72 h) and the synthesis initial rate (5 ± 3 mM.h⁻¹) were very weak in these conditions (table 4). It can be suggested that the solubility of this substrate in such conditions dramatically limited the performances of the reaction.

Table 4. Efficiency and kinetic parameters of the enzymatic acylation of carnosine (0.12 M) by oleic acid (0.24 M) in different conditions and their respective a_w . Concentration of product and substrate conversion were determined at the thermodynamic equilibrium.

Reaction media	Temperature (°C)	a_w	[N-oleyl carnosine] (mM)	Initiale rate (mM.h ⁻¹)	
				Product synthesis	Substrate conversion (%)
2-Methyl-2-butanol	55	0.04	11 ± 2	5 ± 3	9.5 ± 1.5
2-Methyl-2-butanol	80	0.06	19 ± 2	7 ± 4	16 ± 2
2-Methyl-2-butanol french press 1kbar	80	0.05	38 ± 7	25 ± 4	32 ± 7
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	55	0.09	nd	nd	nd
[Bmim] ⁺ [PF ₆] ⁻	80	0.09	< 3	nd	< 2.5

nd: not detected

In order to improve the solubility of carnosine, the reaction was performed at a higher temperature (80 °C) in the same organic solvent (table 2). Kinetic curve and kinetic parameters were presented in the figure 5b and table 4 respectively. These results confirmed that the improvement of the substrate solubility permitted to slightly enhance the substrate conversion at the equilibrium (16 ± 2 %) but not the initial rate of the reaction (7 ± 4 mM.h⁻¹). Another way to improve the solubility of polar substrate could be the use of an ionic liquid, [Bmim]⁺[PF₆]⁻ [18, 25]. However, the solubility of carnosine in this solvent was very weak, at both 55 °C and 80 °C (table 2). Even at 80 °C, a very weak substrate conversion was obtained (table 4).

The use of free-solvent system containing oleic acid was not chosen because a recent work demonstrated that the use of this medium favours the protonation of amino groups affecting their nucleophilic property and preventing their acylation [14]. Finally, 2-methyl-2-butanol at 80°C seemed to be the most appropriate reaction medium to achieve carnosine acylation. However, the substrate conversion in 2-methyl-2-butanol, at 80 °C, remained low and was suggested to be due to an unefficient dispersion of the substrate particles which was mainly present as solid aggregates.

In some studies, different processes were described to optimize the solubility of proteins as ultra sound or high pressure [37, 38]. The solubility of carnosine in 2-methyl-2-butanol was slightly improved by applying a high pressure (1 kbar) to the reaction medium, before the addition of the enzyme (table 2). A higher homogeneity of the reaction medium was observed which suggested a better dispersion of carnosine.

The synthesis kinetic curve (figure 5c) showed that the substrate conversion was $32 \pm 7 \%$ at the equilibrium. The initial reaction rate was $25 \pm 4 \text{ mM.h}^{-1}$ (table 4). The application of a high pressure (1 kbar) to the reaction medium seemed to enhance the availability of carnosine and then improved the performances of the reaction. For the first time, the enzymatic acylation of carnosine in organic solvent was performed with a significant yield.

Conclusion.

The chemo-selectivity and the efficiency of the lipase-catalyzed acylation of Lys-Ser depended on (i) the functional groups reactivity and (ii) the peptide solubility. The enzymatic acylation of Lys-Ser in three reaction media (organic solvent, oleic acid and ionic liquid) exhibited a chemo-selectivity in favour of the *N* ϵ -amino group. The use of $[\text{Bmim}]^+[\text{PF}_6]^-$ permitted to significantly improve the solubility of the Lys-Ser, HCl and to enhance the synthesis initial rate and the conversion of the dipeptide without requiring structural modification of this latter. However, the hydroxyl group of serine in C-terminal position was not acylable due to its low nucleophilicity. The possibility to *O*-acylate serine residue seemed to depend on its position in the peptidic sequence.

Furthermore, for the first time to our knowledge, the feasibility of the lipase-catalyzed *N*-acylation of an active dipeptide (carnosine) in organic media was demonstrated. By enhancing the temperature and the dispersibility of substrate particles, it was possible to reach a significant yield of *N*-acylation. Further studies about the biological activities of the carnosine acylated derivative are in progress.

These investigations constituted a promising enzymatic way to produce active peptides derivatives exhibiting enhanced properties, in a single step process.

References.

- [1.] M.A. Babizhayev, Biological activities of the natural imidazole-containing peptidomimetics n-acetylcarnosine, carcinine and l-carnosine in ophthalmic and skin care products, *Life Sci*, (2006), 78(20): p. 2343-2357.

- [2.] M. Charnley, A.J.G. Moir, C.W. Ian Douglas, and J.W. Haycock, Anti-microbial action of melanocortin peptides and identification of a novel X-Pro-D/L-Val sequence in Gram positive and Gram negative bacteria, *Peptides*, In Press.
- [3.] P.-Y. Deng and Y.-J. Li, Calcitonin gene-related peptide and hypertension, *Peptides*, (2005), 26(9): p. 1676-1685.
- [4.] T.A. Egorov, T.I. Odintsova, V.A. Pukhalsky, and E.V. Grishin, Diversity of wheat anti-microbial peptides, *Peptides*, (2005), 26(11): p. 2064-2073.
- [5.] H. Khandelia, J.H. Ipsen, and O.G. Mouritsen, The impact of peptides on lipid membranes, *Biochim Biophys Acta - Biomembranes* In Press, Corrected Proof.
- [6.] D.H. Na, Y.S. Youn, S.D. Lee, M.-W. Son, W.-B. Kim, P.P. DeLuca, and K.C. Lee, Monitoring of peptide acylation inside degrading PLGA microspheres by capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, *J Control Release*, (2003), 92(3): p. 291-299.
- [7.] N. Alminana, M.A. Alsina, and F. Reig, New GHK hydrophobic derivatives: Interaction with phospholipid bilayers, *Colloids Surfaces B*, (2007), 57(2): p. 243-249.
- [8.] F. Veuillez, J. Deshusses, and P. Buri, Synthesis and characterization of an acylated di-peptide (Myr-Trp-Leu) with modified transmucosal transport properties, *Eur J Pharmaceut Biopharmaceut*, (1999), 48(1): p. 21-26.
- [9.] A. Zaks and A.M. Klibanov, Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl Acad Sci USA*, (1985), 82(10): p. 3192-3196.
- [10.] T. Izumi, Y. Yagimuma, and M. Haga, Enzymatic syntheses of N-Lauroyl-alanine homologs in organic media, *JAOCS*, (1997), 74(7): p. 875-878.
- [11.] E.L. Soo, A.B. Salleh, M. Basri, R.N.Z.A. Rahman, and K. Kamaruddin, Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants, *Process Biochem*, (2004), 39(11): p. 1511-1518.
- [12.] L. Gardossi, D. Bianchi, and A.M. Klibanov, Selective acylation of peptides catalyzed by lipases in organic solvents. *J Am Chem Soc* (1991), p. 6328-6329.
- [13.] A. Nagao and M. Kito, Synthesis of O-Acyl-L-Homoserine by lipase, *JAOCS*, (1989), 66(5): p. 710-713.
- [14.] E. Husson, C. Humeau, F. Blanchard, X. Framboisier, I. Marc, and I. Chevalot, Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids, *J Mol Cat B: Enzym* (2008), 55 p. 110-117.
- [15.] P. Tufvesson, A. Annerling, R. Hatti-Kaul, and D. Adlercreutz, Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides, *Biotechnol Bioeng*, (2007), 97(3): p. 447-453.
- [16.] R. Madeira Lau, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, and R.A. Sheldon, Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Org Lett*, (2000), 2(26): p. 4189-4191.
- [17.] V. Gotor-Fernandez and V. Gotor, Enzymatic aminolysis and ammonolysis processes in the preparation of chiral nitrogenated compounds, *Curr Org Chem*, (2006), 10(10): p. 1125-1143.
- [18.] N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, and S.M.S. Chauhan, Chemical and biochemical transformations in ionic liquids, *Tetrahedron*, (2005), 61(5): p. 1015-1060.
- [19.] U. Kragl, M. Eckstein, and N. Kaftzik, Enzyme catalysis in ionic liquids, *Curr Opin Biotechnol*, (2002), 13(6): p. 565-571.
- [20.] F. Van Rantwijk, R.M. Lau, and R.A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trend Biotechnol*, (2003), 21(3): p. 131-138.
- [21.] R. Irimescu and K. Kato, Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines, *J Mol Cat B: Enzym*, (2004), 30(5-6): p. 189-194.

- [22.] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier, and J.L. Iborra, Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis, *Biotechnol Lett*, (2001) 23(18): p. 1529-1533.
- [23.] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier, and J.L. Iborra, Enzymatic ester synthesis in ionic liquids, *J Mol Cat B: Enzym*, (2003), 21(1-2): p. 9-13.
- [24.] P. Lozano, T. de Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, and J.L. Iborra, Dynamic structure-function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids, *Biocatal Biotransform*, (2005), 23(3-4): p. 169-176.
- [25.] R.A. Sheldon, R. Madeira Lau, M.J. Sorgedraeger, F. Van Rantwijk, and K.R. Seddon, Biocatalysis in ionic liquids, *Green Chem*, (2002), 4(2): p. 147-151.
- [26.] R. Valivety, P. Jauregi, I. Gill, and E. Vulfson, Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants, *JAOCS*, (1997), 74(7): p. 879-886.
- [27.] X. Zhang, S. Adachi, Y. Watanabe, and R. Matsuno, Lipase-catalyzed synthesis of O-lauroyl L-serinamide and O-lauroyl L-threoninamide, *Food Res Int*, (2005), 38(3): p. 297-300.
- [28.] T. Furutani, M. Furui, H. Ooshima, and J. Kato, -acylation of [beta]-amino alcohol by acyl migration following enzyme-catalyzed esterification, *Enzyme Microb Technol*, (1996), 19(8): p. 578-584.
- [29.] M. Ardhaoui, A. Falcimaigne, J.-M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, and M. Ghoul, Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst, *J Mol Cat B: Enzym*, (2004), 29(1-6): p. 63-67.
- [30.] C. Humeau, M. Girardin, B. Rovel, and A. Miclo, Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate, *J Biotechnol*, (1998), 63(1): p. 1-8.
- [31.] E. Wehtje and P. Adlercreutz, Water activity and substrate concentration effects on lipase activity, *Biotechnol Bioeng*, (1997), 55(5): p. 798-806.
- [32.] R.-D. Dolores, C. Edmundo, M. Roberto, and L.-M. Agustín, Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents, *Biotechnol Lett*, (2002), 24(24): p. 2057-2061.
- [33.] M. Fernandez-Perez and C. Otero, Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine, *Enzyme Microb Technol*, (2001), 28(6): p. 527-536.
- [34.] H.M. Badr, Antioxidative activity of carnosine in gamma irradiated ground beef and beef patties, *Food Chem*, (2007), 104(2): p. 665-679.
- [35.] A. Boldyrev, E. Bulygina, T. Leinsoo, I. Petrushanko, S. Tsubone, and H. Abe, Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds, *Comp Biochem Physiol B*, (2004), 137(1): p. 81-88.
- [36.] C.A. Silva, F.C.V. Portaro, B.L. Fernandes, D.A. Ianzer, J.R. Guerreiro, C.L. Gomes, K. Konno, S.M.T. Serrano, N. Nascimento, and A.C.M. Camargo, Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of *Bothrops jararaca*, *Toxicon*, (2008), 51(4): p. 515-523.
- [37.] A.R. Jambrak, T.J. Mason, V. Lelas, Z. Herceg, and I.L. Herceg, Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions, *J Food Eng*, (2008), 86(2): p. 281-287.
- [38.] A. Gracia-Julia, M. Rene, M. Cortes-Munoz, L. Picart, T. Lopez-Pedemonte, D. Chevalier, and E. Dumay, Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: A comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments, *Food Hydrocolloids*, (2008), 22(6): p. 1014-1032.

3. Contribution de l'article

Cette étude a démontré que la sélectivité et la performance de la réaction d'acylation de dipeptides, catalysée par Novozym 435[®], sont influencées par la réactivité des groupes fonctionnels et la solubilité des dipeptides dans le milieu réactionnel. L'acylation enzymatique de Lys-Ser, HCl en solvant organique, en milieu fondu et en liquide ionique a nécessité l'ajout d'une base organique dans le milieu réactionnel afin de rendre les fonctions amines primaires réactives. L'acylation de ce substrat, quel que soit le milieu réactionnel, conduit à une chimio-sélectivité en faveur de l'acylation de la fonction amine en position ϵ de la lysine. Le milieu fondu de type acide gras libre, de par ses propriétés physico-chimiques, n'apparaît pas propice à la mise en œuvre de réaction de N-acylation. Il est suggéré que le large excès d'acide gras libre dans le milieu favorise, malgré l'ajout d'une base organique, la protonation d'une partie de la population de molécules de dipeptide. Ainsi, malgré une solubilité augmentée du dipeptide dans ce milieu, le taux de conversion n'est pas amélioré par rapport à celui obtenu en solvant organique.

Le liquide ionique [Bmim]⁺[PF₆]⁻ permet d'augmenter significativement la solubilité du dipeptide et d'aboutir à un taux de conversion du substrat plus élevé que dans les autres milieux sans avoir recours à une quelconque modification structurale du substrat comme cela est souvent décrit dans la littérature. Aucun composé O-acylé n'est détecté dans ces trois milieux.

L'absence de O-acylation de la sérine est supposée due à l'environnement moléculaire de la fonction hydroxyle de ce résidu aminé. En effet, la fonction carboxylique en position Cterminale, du dipeptide Lys-Ser, HCl étant très électro-attractrice, est supposée affecter le caractère nucléophile de l'hydroxyle. La modification de la séquence peptidique (utilisation de Ser-Leu) a permis de confirmer cette hypothèse en synthétisant exclusivement du O-acylé.

Enfin, la N-acylation enzymatique de la carnosine, dipeptide bioactif, a été réalisée dans le 2-méthyl-2-butanol avec un rendement satisfaisant de 32 ± 7 % après 120 h de réaction. Ce résultat a été obtenu après avoir augmenté la dispersibilité des particules de substrats et la solubilité des molécules de substrats par application d'une pression de 10^8 Pa sur le milieu réactionnel, avant l'ajout d'enzyme. Cette étape d'amélioration de la solubilité en solvants organiques apparaît comme prometteuse pour résoudre les difficultés à acyler des substrats très polaires comme certains peptides.

VII. Synthèse d'un dérivé fonctionnel de carnosine par voie enzymatique.

1. Introduction

La carnosine ou β -Ala-His est un dipeptide présent à des concentrations de l'ordre du mM dans les tissus musculaires des animaux. Ce dipeptide est devenu, à ce jour, une molécule d'intérêt, du fait de son activité antioxydante et antiradicalaire. Ainsi, la carnosine serait dotée d'un potentiel thérapeutique neuroprotecteur, hépatoprotecteur ou encore néphroprotecteur (Abe *et al.*, 1995 ; Babizhayev 2006 ; Badr 2007 ; Fouad *et al.*, 2007 ; Shen *et al.*, 2007). Une autre propriété intéressante de la carnosine est sa capacité à protéger les cellules contre la toxicité du peptide amyloïde responsable de la maladie d'Alzheimer (Guiotto *et al.*, 2005). Cependant, comme la plupart des peptides, son potentiel thérapeutique est contraint par sa sensibilité vis-à-vis des carnosinases et sa polarité qui limite son transfert à travers les membranes biologiques (Pegova *et al.*, 2000 ; Babizhayev 2006). Une voie pour limiter ces contraintes est son acylation afin d'augmenter son hydrophobie et favoriser son passage à travers les membranes biologiques comme suggéré dans différents travaux d'acylation de peptides (Yelamos *et al.*, 2006 ; Zweytick *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été démontré que l'acétylation de la carnosine augmentait son temps de demi-vie en présence de carnosinases et que le greffage d'un groupe oléyle maintenait son activité antioxydante envers la peroxydation des lipides (Murase *et al.*, 1993 ; Pegova *et al.*, 2000). Tous ces travaux d'acylation ont été réalisés par voie chimique.

Ainsi, cette étude consiste à développer un procédé de synthèse de dérivé acylé de carnosine par voie enzymatique. L'étude précédente a démontré que la principale contrainte à cette réaction, est la très faible solubilité de la carnosine en solvant organique polaire et en liquide ionique. Une approche enzymatique en milieu aqueux biphasique a donc été privilégiée afin de s'affranchir de ce problème de solubilité, en utilisant un biocatalyseur original : l'acyl-transférase de *Candida parapsilosis*. Plusieurs études ont montré l'aptitude de cette enzyme à catalyser la synthèse de liaison amide dans ce genre de milieu réactionnel (Vaysse *et al.*, 1997 ; Fournand *et al.*, 1998)

De plus, l'utilisation d'un système aqueux biphasique s'inscrit particulièrement bien dans le domaine des procédés écologiques de synthèse.

L'objectif final est d'évaluer l'impact de l'acylation sur certaines propriétés biologiques de ce dipeptide afin de valoriser ou non la synthèse de ce dérivé acylé.

Ce travail est présenté sous forme de projet de « short communication » dans « Journal of Biotechnology ».

2. Enzymatic acylation of carnosine in biphasic lipid-aqueous medium catalyzed by the acyl-transferase of *Candida parapsilosis*.

Eric HUSSON^a, Catherine HUMEAU^b, Christelle HARSCOAT^a, Xavier FRAMBOISIER^a, Eric DUBREUCQ^c,
Ivan MARC^a, Isabelle CHEVALOT^a.

^a LSGC, Nancy Université, CNRS, 2 avenue de la forêt de Haye-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b LBB, Nancy Université, 2 avenue de la forêt de Haye-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^c Montpellier SupAgro, UMR IATE, 2 place Viala-34060 Montpellier cedex 1, France

Corresponding author: Isabelle.Chevalot@ensaia.inpl-nancy.fr

Project of short communication - Journal of Biotechnology

Abstract.

Carnosine (β -Ala-His) is a polar bioactive dipeptide. Its solubilisation is very difficult in organic solvent limiting the efficiency of its lipase-catalyzed N-acylation. In the present work, an efficient process of N-acylation of carnosine was developed using the acyl-transferase of *Candida parapsilosis* in lipid-aqueous biphasic medium. This medium allowed to reach a peptide conversion yield of $47.5 \pm 4 \%$ and $37 \pm 3 \%$ with ethyl oleate and oleic acid respectively. After purification, the product was identified as N-oleyl β -Ala-His. Xanthine oxydase inhibition activity of carnosine and corresponding amide were shown to be similar. Furthermore, the N-oleyl carnosine appeared to be a better free-radical superoxyde scavenger than the natural dipeptide. However, none of the two molecules was efficient to scavenge the free DPPH radical. This study demonstrated that the use of this acyl-transferase

in lipid-aqueous media may be a good alternative to classical amidification reactions catalyzed by lipases in dry organic media in which polar peptides are poorly solubilized.

Keywords: Carnosine, acylation, acyl-transferase, biphasic medium, antioxidant activity.

Introduction.

Many peptides exhibit various biological activities, therapeutic and cosmetic potentials [1-4]. Histidine-based dipeptides are well known for their biological activities like neuroprotective, hepatoprotective or enzyme activity regulation effects [1, 5, 6]. For instance, β -alanyl-L-histidine (carnosine), β -alanylhistamine (carcinine) and L-prolylhistamine were shown to contribute to the protection of biological membranes from lipid-peroxyde induced-damages, to the inactivation of reactive oxygen species or to the reverse of normal features of senescent fibroblasts [1, 7]. Carnosine accumulates in excitable tissues (brain, heart and skeletal muscles) of vertebrates reaching more than 10 mM per wet mass [7]. This dipeptide (β -Ala-His) is known to present a large diversity of biological properties. Some studies reported a neuroprotector effect against reactive oxygen species [6, 8-11]. Its antioxidant properties have been demonstrated by other studies which suggest the preponderant implication of constitutive histidine [1, 12]. The antioxidant mechanism of carnosine was attributed to its chelating effect against metal ions, its super oxide dismutase (SOD)-like activity, its ROS and free radicals scavenging ability. Thanks to these properties, carnosine has been used to prevent damage due to radiation therapy, necrotic and apoptotic cell death in hepatic tissue due to ischemia/reperfusion [13, 14]. Few studies investigated the impact of the covalent attachment of an acyl group on this dipeptide. It appeared that the acetyl derivative of carnosine exhibited improved antioxidant activities in the liposome peroxidation system. Moreover its transfer throughout biological membranes was increased due to a higher hydrophobicity than the carnosine [1]. Another study demonstrated that carnosine acylation with long chain acyl functions like oleyl considerably improved its capacity to suppress the oxidation of phosphatidylcholine liposome induced by ferrous ion and ascorbic acid [15]. In addition, carnosine N-acetyl derivative showed a higher stability than carnosine towards carnosinase in mammalian cells [16]. The classical way to acylate peptides usually followed the chemical procedure of acylation requiring organic solvent and protection /activation of functional groups [1, 16-19]. An other way can be the use of enzyme-catalyzed reactions in

organic solvents [20-23]. Some studies have demonstrated the feasibility of the enzymatic N-acylation of amino acids or dipeptides catalyzed by lipases in organic solvents [11, 24, 25]. However, the efficiency of such processes is often limited by the availability of the polar substrate due to its low solubility in these media. To overcome this limitation, several authors modified the molecular structure of dipeptides and free amino acids by attachment of a hydrophobic group allowing a better solubilization in reaction media [22, 24, 26, 27]. An alternative could be the use of other enzymes able to catalyze the N-acylation reaction in biphasic aqueous media. For instance, the efficient enzymatic N-acylation of hydroxylamine was performed in a fatty acid / phosphate buffer emulsified medium using the acyl-transferase of *Candida parapsilosis*.

The aim of this work was to study the N-enzymatic acylation of carnosine in a biphasic lipid-aqueous system catalyzed by the acyl-transferase of *Candida parapsilosis* in presence of free fatty acid or fatty acid ester. The influence of acylation on carnosine ability to scavenge the DPPH and superoxide radical and to inhibit the xanthine oxydase is evaluated.

2. Material and Methods.

2.1. Chemicals and enzyme.

Carnosine or β -Ala-His (99 %), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (99 %) (DPPH), xanthine, hydroxylamine, sulfanilic acid, N-(1-naphtyl-ethylene diamine dihydrochloride), ethylene diaminetetracarboxylic acid (EDTA) and oleic acid (99 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Acyl transferase from *Candida parapsilosis* lyophilized, 11 U / mg, (one enzyme unit is the quantity of enzyme that releases 1 μ mol free fatty acid in 1 mn at 45 °C and pH 6.5 in the presence of triolein as substrate) was produced by the laboratory IATE (Montpellier, France). Suspension in 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ containing 1 mM sodium salicylate of xanthine oxydase from milk (0.2 U/mg) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). One unit converts 1.0 μ mol of xanthine to uric acid per min at pH 7.5 at 25 °C. Polyvinyl alcohol, methanol, acetic acid and trifluoroacetic acid (TFA) with 99 % of purity were acquired from Carlo Erba (Rodano, Italy). $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (99 %) was from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Solubility of carnosine in aqueous medium.

3 mL of the reaction medium (phosphate buffer 100 mM, pH 6.5) was saturated with the carnosine at 45 °C and stirred at 640 rpm overnight. An aliquot of the supernatant was taken out and filtered. The carnosine present in the supernatant was quantified by HPLC.

2.3. Enzymatic acylation procedure.

The enzymatic acylation of carnosine in aqueous system was carried out in a mechanically stirred reactor (Wheaton[®]). In a typical acylation reaction, carnosine was added in 8 mL of phosphate buffer 100 mM, pH 6.5. Then the acyl donor was emulsified by sonication in 1 mL of aqueous polyvinyl alcohol (2 % w/v) solution favouring the stabilization of the micro emulsion [28]. Finally, the emulsion was added to aqueous carnosine solution and incubated at 45 °C and stirred at 640 rpm during 12 h. The final concentration of carnosine and acyl donor were 0.12 M and 0.24 M respectively. After the incubation of the substrates, the homogeneity of the reaction medium was verified by measuring the concentration of carnosine by direct sampling withdrawals. The concentration was in agreement with the initial concentration of this substrate with a standard error of 8 %. The acylation reaction was started by the addition of 100 mg of lyophilized enzyme preparation previously solubilized in 1 mL of phosphate buffer. Control experiments without enzyme were also carried out in the medium. As the reaction medium was homogeneous at 640 rpm in the Wheaton[®] reactor, samples were directly withdrawn, kept at 0 °C, and the reaction was stopped by adding the acid mixture of methanol/water/TFA (80/20/0.1 v/v). Then, the sample was filtered and the residual carnosine was quantified by HPLC. Each reaction was repeated three times. Initial rates and substrate conversion yields were expressed as mean values with standard deviations (\pm).

2.4. Analytical methods.

2.4.1. *Qualitative analyses by TLC.*

Qualitative analyses by TLC of the reaction media were performed on precoated Kieselgel G 60 plates 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Germany). The plates were developed with butanol / acetic acid / water, (60/20/20 v/v/v) elution system. The molecules exhibiting a

primary amino group were detected by spraying an ethanol solution of ninhydrin (0.01 %). Other molecules were revealed by spraying an aqueous solution of KMnO_4 (0.1 M).

2.4.2. Quantitative analyses by HPLC.

The time course of carnosine acylation was monitored using HPLC (LC 10 AD – VP, Shimadzu, France) equipped with a light-scattering low temperature evaporative detector (40 °C, 350 bar) (Shimadzu, France). The column was a newly developed C18 amide 125 x 2.1 mm – 5 μm (Altima[®], Altech, France) maintained at 25 °C. The mobile phase (0.2 mL/min flow rate) consisted in methanol/water/TFA (80/20/0.1 v/v/v). A constant elution gradient was applied to reach methanol/TFA (100/0.1 v/v) after 5 min. This methanol concentration was maintained for 18 minutes and decreased in 1 min to reach the initial methanol/water ratio until the end of the run (i.e. 34 min). Calibrations were performed using carnosine previously solubilized in phosphate buffer. The consumption of carnosine was measured and the kinetics of product synthesis was established by stoichiometry (1:1). The substrate conversion rate at the thermodynamic equilibrium was determined applying the following equation:

$$r(\%) = (1 - ([\text{substrate}]_{\text{initial}} - [\text{substrate}]_{\text{equilibrium}}) / [\text{substrate}]_{\text{initial}}) \times 100.$$

Initial rates of reaction were calculated using a second order polynomial model applied to the derivatives of the six first experimental data during the first hour exhibited in figures (Software: Matlab[®], MathWorks, E.U.).

2.5. Identification of acylated product by LC-ESI-MSⁿ.

After dilution of the reaction medium in the mobile phase and filtration, samples were analyzed by HPLC (Thermo Fisher Scientific, France) equipped with a UV detector (214 nm) coupled with mass spectrometer with electron spray ionization source (LTQ, Thermo electron corporation[®], E.U.). The HPLC method was identical to the quantitative analysis described above. MS measurements were carried out with helium as the collision gas in the ion trap and nitrogen as sheath (50), sweep (10) and auxiliary (10) gas in the source. MS parameters were tuned as follow: electrospray ionization mode, capillary temperature of 300 °C, source voltage at 5.0 kV. The acylated product exhibited a retention time of 7.05 min but only mass measurement permitted its detection. The presence of phosphate ions in the samples required the disconnection of HPLC from MS during the first five minutes to prevent the pollution of

mass spectrometer capillary. The mass spectra obtained after fragmentation were described in the results-discussion part.

2.6. Purification of the N-acylated product.

The reaction medium at the equilibrium was extracted with hexane (5 v/v). Then, the apolar phase was evaporated. The residue was solubilized in methanol and injected in HPLC (Biocad 700 E, Applied Biosystems, France) equipped with fraction collector (Cobra, Applied Biosystems, E.U.). The conditions used were described above using a column C18 amide (250 x 4.1 mm – 5 µm) and a flow rate of 1 mL/min. The separation was performed 50 times and the eluate was collected around the retention time of N-oleyl carnosine. The collected fractions were analyzed by mass spectrometry with electron spray ionization source (SCIEX API 150EX, Perkin Elmer, France) in the infusion mode to check the presence of N-oleyl carnosine. Then the fractions were pooled together and the mobile phase was evaporated at ambient temperature under vacuum (15 mm Hg). The product of interest was resolubilized in methanol for further analyses and stored at 4 °C. To verify the stability of the product after one month and its purity, a mass analysis of the solution was performed.

2.7. DPPH radical scavenging activity.

The DPPH radical scavenging activity of carnosine and N-oleyl carnosine was measured according to the procedure described in the literature [29]. A 50 µL aliquot of each tested compound in methanol was added to 1.95 ml of 6×10^{-5} M methanol solution of DPPH. The mixture was vigorously shaken and allowed to stand in the dark at room temperature for 30 min. The decrease in absorbance at 517 nm of the resulting solution was then measured against methanol. All measurements were made in triplicate and the average standard deviations were determined. A negative control was used for this test, containing the methanol solution of DPPH except the test sample. The ability to scavenge DPPH radical was calculated by the following equation:

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (1 - \text{DO}_{517\text{sample}} / \text{DO}_{517\text{control}}) \times 100$$

The extent of DPPH scavenging radical was expressed as the chemical concentration required to prevent 50% of DPPH radical formation (IC₅₀) using a linear regression analysis.

A reference molecule was used, the trolox exhibiting an IC₅₀ in these conditions of 11 µM.

2.8. Xanthine oxidase assay and O_2^- radical scavenging activity.

The xanthine oxidase assay was performed as described in the literature [30]. The assay consisted of a 2 mL reaction mixture containing 200 mM phosphate buffer pH 7.8, 0.2 mM hydroxylamine, 50 μ M xanthine as the substrate, 0.1 mM EDTA (pH 7.0), carnosine or N-oleyl carnosine (25 – 300 μ M). The assay was initiated by adding the enzyme (7.5 mU/mL) to the reaction mixture. A negative control containing all reagents except of the test sample was used. After incubation at 37 °C during 30 mn, the reaction was stopped by adding 200 μ L of HCl (0.58 M). The enzyme activity was evaluated by measuring uric acid formation at 290 nm. For each compound concentration tested, the percentage of xanthine oxidase inhibition was calculated by the following equation:

$$\text{Xanthine oxidase inhibition (\%)} = (1 - DO_{290\text{sample}} / DO_{290\text{control}}) \times 100$$

The extent of inhibition was expressed as the chemical concentration required to inhibit 50% of the enzyme activity (IC_{50}) using a second order polynomial model. Allopurinol was used as reference compound. These media were stored to further study the O_2^- radical scavenging activity. A mixture of sulfinic acid (300 μ g/mL), N-(1-naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride (5 μ g/mL) and acetic acid (16.7 % v/v) was added to each sample and incubated at ambient temperature in the dark during 30 min. The O_2^- radical scavenging activity was measured by the absorbance at 550 nm of the radical sulfanimyl. For each concentration tested, the percentage of O_2^- radical scavenging activity was calculated by the following equation:

$$O_2^- \text{ radical scavenging activity (\%)} = (1 - DO_{550\text{sample}} / DO_{550\text{control}}) \times 100$$

The extent of O_2^- radical scavenging activity was expressed as the chemical concentration required to scavenge 50% of O_2^- radical (IC_{50}) using a linear regression.

3. Results and discussion.

Carnosine dipeptide is a substrate with only one acylable site which is the primary amino group of the β -Ala (figure 1).

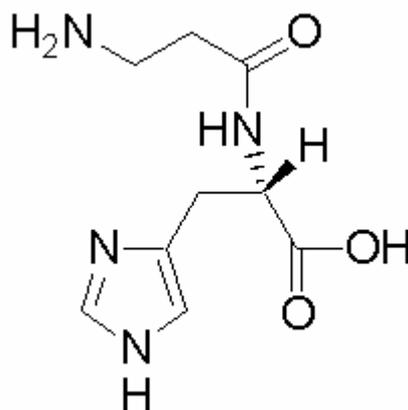


Figure 1. Molecular structure of β -Ala-His.

Previous study recently demonstrated that the limiting factor of carnosine enzymatic acylation in organic solvent was its solubility. Indeed, the solubility of carnosine in 2-methyl-2-butanol at 55 °C or 80 °C was inferior to 0.5 g/L (0.002 M) while its solubility in aqueous phase at 45 °C was 228.5 g/L (1.01 M). To overcome this problem, the enzymatic acylation of this dipeptide was performed in a lipid-aqueous biphasic medium (phosphate buffer/acyl donor emulsion). At 0.12 M, the substrate was totally solubilized in this reaction medium. Enzymatic acylations were performed with a molar ratio of acyl donor to acyl acceptor of 2, at 45 °C as reported in previous studies [28, 31, 32]. No product was obtained in reaction medium containing dipeptide and the acyl donor without enzyme.

3.1. Enzymatic acylation of carnosine in biphasic lipid-aqueous medium.

Acylation reactions catalyzed by the acyl-transferase of *Candida parapsilosis* were performed with oleic acid as acyl donor. The reaction medium was firstly analyzed by TLC. The revelation of the plates by ninhydrin (specific for primary amino groups) showed the disappearance of carnosine with time but did not allow to detect the presence of the acylated product as this one did not exhibit any primary amino function.

To check the presence of N-oleyl carnosine, the reaction medium (after 120 h of reaction) was filtered, diluted in methanol/water/TFA (80/20/0.1 v/v/v) and analyzed by LC-MS. The corresponding chromatogram and spectrum are presented in the figure 2.

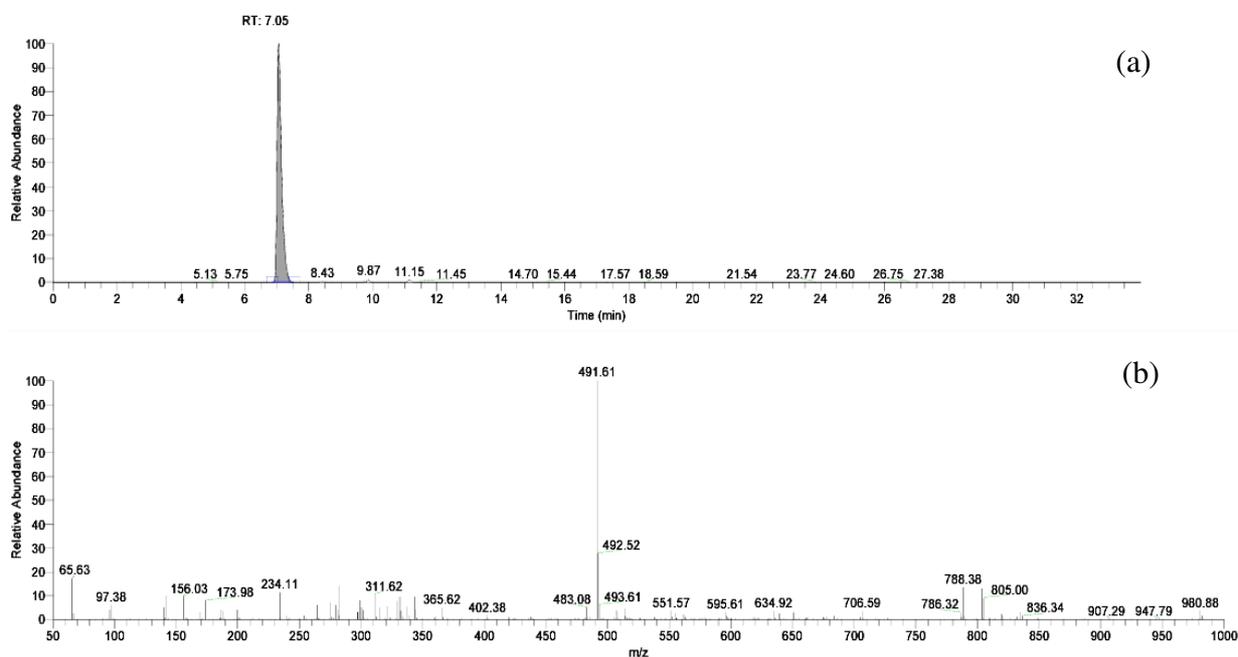


Figure 2. LC-MS analysis of the reaction medium at the end of the acyl-transferase catalyzed acylation of carnosine in lipid-aqueous medium. a) Single ionic chromatogram set between 490-492 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. b) Mass spectrum of the eluted fraction at the retention time of 7.05 min.

These analyses led to confirm the presence, in the reaction medium, of a molecule exhibiting a retention time close to 7.05 min and a m/z of 491.6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (in positive mode). This mass analysis confirmed the presence of a product corresponding to a mono acylated derivative of carnosine.

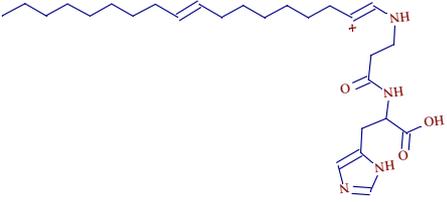
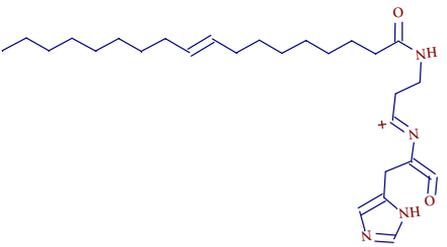
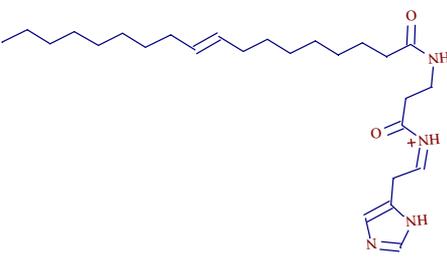
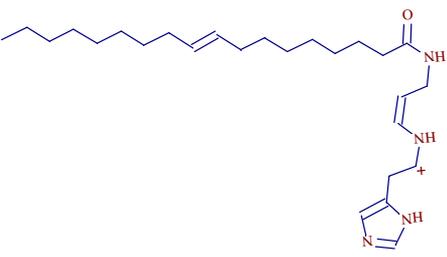
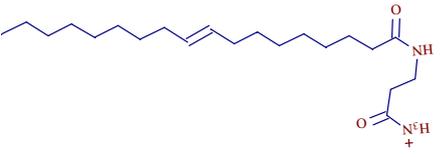
To check the chemical structure of the product, a mass spectrometry analysis by fragmentation was applied on the purified product. The first MS analysis without fragmentation in methanol, in positive mode, confirmed the presence of:

$m/z = 491.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ corresponding to $M + H^+$ (oleyl carnosine)

$m/z = 513.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ corresponding to $M + Na^+$ (oleyl carnosine)

The first fragmentation of the parent ion (491.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) allowed to obtain the fragments presented in the table 1, which confirmed the identity of the product: N-oleyl β -Ala-His.

Table 1. Mass fragments analysis of purified N-oleyl β -Ala-His. Mass of fragments obtained from the parent ion (491.3 g.mol⁻¹) and their corresponding structure predicted by Xcalibur soft[®].

Mass of Fragments (g.mol ⁻¹)	Structure of fragments predicted by Xcalibur Soft [®]
473.3	
455.4	
445.3	
429.3	
354.9	

This study demonstrated that the N-enzymatic acylation of carnosine in biphasic lipid-aqueous medium catalyzed by the acyl-transferase of *Candida parapsilosis* can occur. The acyl transferase is able to catalyze the amide bond synthesis as described in previous studies that showed the N-acylation of hydroxylamine in the same reaction medium but with different substrate molar ratio [28, 32]. The authors showed that the efficiency of the reaction was improved by using a fatty acid ester as acyl donor. In order to compare the efficiency of the reaction with two distinct acyl donors (oleic acid and ethyl oleate), a kinetic study was performed.

3.2. Kinetic study of acylation reaction.

The kinetics monitoring of the enzymatic acylation process was established by quantifying the residual carnosine. The stoichiometry of the reaction allowed to deduce the kinetic curve of production of the N-oleyl β -Ala-His.

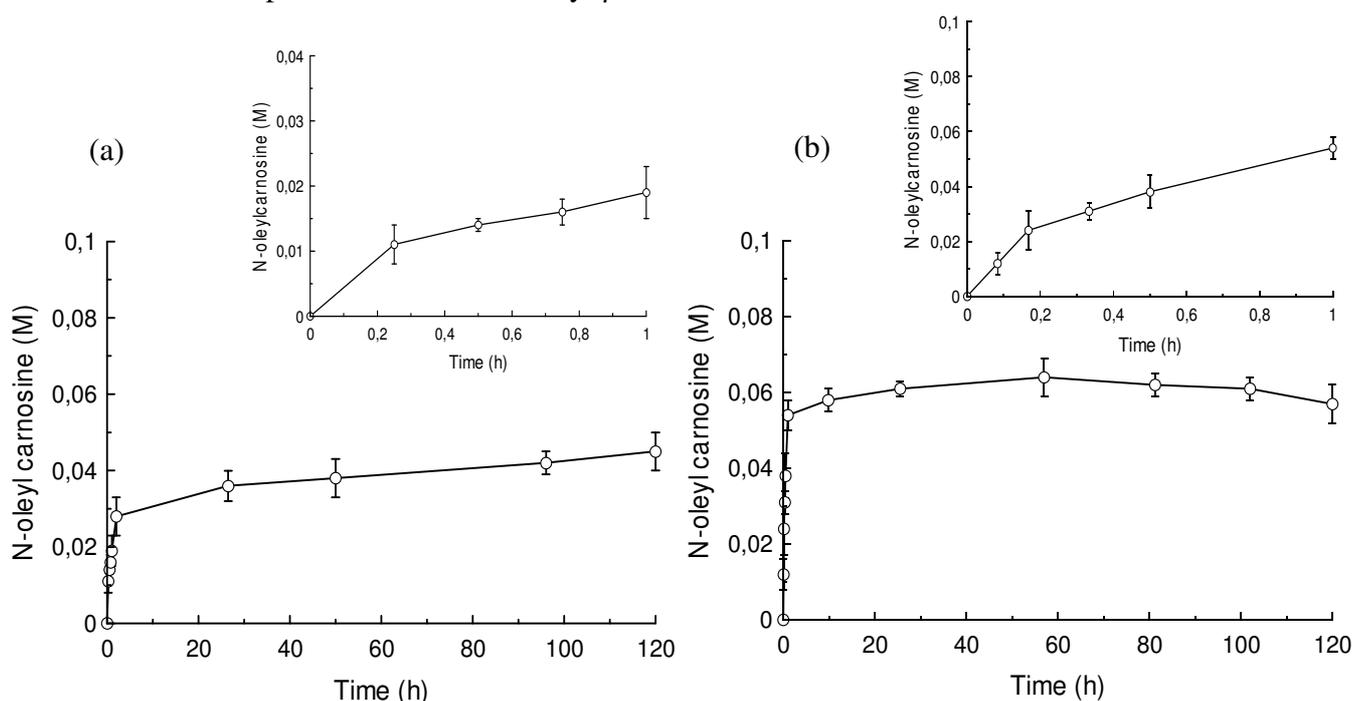


Figure 3. Kinetic curves relative to the acylation of carnosine (0.12 M) catalyzed by the acyl transferase of *Candida parapsilosis* in lipid-aqueous biphasic medium (phosphate buffer 100 mM, pH 6.5 / oil emulsion of oleic acid (a) or ethyl oleate (b) (0.24 M in aqueous polyvinyl alcohol solution) at 45 °C.

The figure 3a presented the kinetic curves relative to the N-acylation of carnosine in the presence of free oleic acid as acyl donor. At the equilibrium, the substrate conversion yield was $37 \pm 3 \%$, whereas the initial rate of the reaction was $39 \pm 5 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$. This average

result could be explained by a competition between the synthetic way and the hydrolytic one during the equilibrated acylation reaction. Two studies suggested that the hydrolytic activity of the acyl-transferase of *Candida parapsilosis* can be reduced by using a trans-acylation reaction [28, 32]. To verify if this phenomenon occurred in the present reaction, the N-acylation of carnosine was performed with ethyl oleate as acyl donor. The figure 3b presents the kinetic relative to this reaction. At the equilibrium, the substrate conversion was $47.5 \pm 4\%$. The initial rate of the reaction was $116 \pm 33 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$. The kinetic performances of the trans-acylation reaction were significantly improved in comparison with the direct amidification. In order to evaluate the contribution of the residual hydrolysis in this reaction, oleic acid and ethyl oleate were quantified. At the equilibrium, the remaining acyl donor was mainly under the form of free oleic acid ($0.131 \pm 0.008 \text{ M}$ versus $0.043 \pm 0.007 \text{ M}$ of ethyl oleate) which demonstrated that the enzyme maintained a high hydrolytic activity in such conditions. As suggested in previous studies the synthetic way of the equilibrium could be improved by using a large excess of acyl acceptor [31-33]. However, such conditions are unsuitable to develop bioconversion processes involving bioactive peptides that are not available in large quantities.

3.3. Evaluation of antioxidant potential of N-oleyl carnosine.

Imidazole-based peptides are known to present antioxidant properties like radical scavenging or xanthine oxidase inhibition [1].

In order to evaluate the influence of acylation on carnosine antioxidant properties, DPPH free-radical scavenging activity was evaluated for both carnosine and N-oleyl carnosine at different concentrations. The absorbance measurements showed that neither carnosine nor N-oleyl carnosine exhibited a DPPH free-radical scavenging activity at these concentrations, compared to Trolox which exhibited an IC_{50} of $11 \pm 3 \mu\text{M}$. Thus, acylation did not allow to improve the carnosine antiradical activity.

Then, the xanthine oxydase inhibition property of both carnosine and N-oleyl carnosine was evaluated and expressed as IC_{50} values (table 2). The carnosine IC_{50} value in the xanthine/xanthine oxydase system was close to the value reported in a previous study [12]. Furthermore, the IC_{50} value of carnosine derivative was similar to that of carnosine suggesting that carnosine acylation did not modify its xanthine oxydase inhibition property. The dipeptide and its acylated derivative presented a significant xanthine oxydase inhibition activity. However this capacity remained lower than this of allopurinol.

Table 2. IC₅₀ values of carnosine and N-oleyl carnosine for free radical DPPH scavenging activity, inhibition of XO in XO/X system and superoxide scavenging activity. Trolox and Allopurinol were used as references.

Compounds	IC ₅₀ (μM)		
	Free radical DPPH scavenging activity	Inhibition of XO in XO/X system	Superoxyde scavenging activity
Trolox	11 ± 3	nd	nd
Allopurinol	nd	2.4 ± 0.1	3.3 ± 0.3
Carnosine	None	73 ± 4	137 ± 3
N-oleyl carnosine	None	63 ± 8	107 ± 11

The superoxyde radical scavenging activity was determined for both compounds and IC₅₀ values were expressed in the table 2. The results showed that the N-acylation of carnosine seemed to improve the superoxyde scavenging activity of the free dipeptide (107 μM versus 137 μM). This result could be explained by the higher hydrophobicity and consequently the higher availability of this dipeptide derivative in the reaction system [12, 15, 34].

4. Conclusion.

Acyl-transferase-catalyzed acylation of peptide in biphasic aqueous medium can be considered like an ecological alternative to lipase-catalyzed peptide acylation in organic solvent. For the first time reported in the literature, a bioactive dipeptide (carnosine) was N-acylated by the use of the acyl-transferase of *Candida parapsilosis* in biphasic lipid-aqueous medium with both ethyl oleate and oleic acid as acyl donor. This N-enzymatic acylation process can be considered as a promising way to synthesize functional peptides derivatives but still remains limited by the hydrolytic activity of the enzyme. The covalent attachment of an oleyl group on the primary amino function of this dipeptide did not affect its property of xanthine oxydase inhibition but improved its superoxide free radical scavenging activity. Some studies reported that the acylation of peptides allowed to favour their interactions with phospholipids membranes [19, 35, 36].

Further work is in progress to evaluate the influence of carnosine acylation on its sensitivity toward the hydrolysis carnosinase and its bioavailability in biological membranes systems.

References

- [1] Babizhayev, M.A., *Life Sciences*, (2006). 78(20): p. 2343-2357.
- [2] Charnley, M., Moir, A.J.G., Ian Douglas, C.W., and Haycock, J.W., *Peptides*. (2008). 29: p. 1004-1009.
- [3] Deng, P.-Y. and Li, Y.-J., *Peptides*, (2005). 26(9): p. 1676-1685.
- [4] Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., and Grishin, E.V., *Peptides*, (2005). 26(11): p. 2064-2073.
- [5] Fouad, A.A., El-Rehany, M.A.-A., and Maghraby, H.K., *European Journal of Pharmacology*, (2007). 572(1): p. 61-68.
- [6] Shen, Y., Fan, Y., Dai, H., Fu, Q., Hu, W., and Chen, Z., *Neuroscience Letters*, (2007). 414(2): p. 145-149.
- [7] Abe, H. and Mommsen, P.W.H.a.T.P., *Chapter 14 Histidine-related dipeptides: distribution, metabolism, and physiological function*, in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. 1995, Elsevier. p. 309-333.
- [8] Liu, W.-h., Liu, T.-c., and Yin, M.-c., *Food and Chemical Toxicology*. (2008). 46: p. 1503-1509.
- [9] Mehmetcik, G., Ozdemirler, G., Kocak-Toker, N., Cevikbas, U., and Uysal, M., *Peptides*. (2008). 99: p. 425-429.
- [10] Tomonaga, S., Yamane, H., Onitsuka, E., Yamada, S., Sato, M., Takahata, Y., Morimatsu, F., and Furuse, M., *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. (2008). 89: p. 627-632.
- [11] Boldyrev, A., Bulygina, E., Leinsoo, T., Petrushanko, I., Tsubone, S., and Abe, H., *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, (2004). 137(1): p. 81-88.
- [12] Klebanov, G.I., Teselkin, Y.O., Babenkona, I.V., Lyubitsky, O.B., Rebrova, O.Y., Boldyrev, A.A., and Vladimirov, Y.A., *Biologicheskie Membrany*, (1998). 15(1): p. 81-82.
- [13] Guney, Y., Ozel Turku, U., Hicsonmez, A., Nalca Andrieu, M., Guney, H.Z., Bilgihan, A., and Kurtman, C., *Medical Hypotheses*, (2006). 66(5): p. 957-959.
- [14] Badr, H.M., *Food Chemistry*, (2007). 104(2): p. 665-679.
- [15] Murase, H., Nagao, A., and Terao, J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1993). 41(10): p. 1601-1604.
- [16] Pegova, A., Abe, H., and Boldyrev, A., *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, (2000). 127(4): p. 443-446.
- [17] Lapidot, Y., Rappoport, S., and Wolman, Y., *Journal of lipid research*, (1967). 8(2): p. 142-145.
- [18] Yamamoto, A., Setoh, K., Murakami, M., Shironoshita, M., Kobayashi, T., Fujimoto, K., Okada, N., Fujita, T., and Muranishi, S., *International Journal of Pharmaceutics*, (2003). 250(1): p. 119-128.
- [19] Veuillez, F., Deshusses, J., and Buri, P., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (1999). 48(1): p. 21-26.
- [20] Zaks, A. and Klivanov, A.M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (1985). 82(10): p. 3192-3196.
- [21] Fernandez-Perez, M. and Otero, C., *Enzyme and Microbial Technology*, (2001). 28(6): p. 527-536.
- [22] Furutani, T., Furui, M., Ooshima, H., and Kato, J., *Enzyme and Microbial Technology*, (1996). 19(8): p. 578-584.

- [23] Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I., and Chevalot, I., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (2008). 55: p 110-117.
- [24] Gardossi, L., Bianchi, D., and Klibanov, A.M., *Journal of American Chemical Society*, (1991). 113(16): p. 6328-6329.
- [25] Montet, D., Servat, F., Pina, M., Graille, J., Galzy, P., Arnaud, A., Ledon, H., and Marcou, L., *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, (1990). 67(11): p. 771-774.
- [26] Valivety, R., Jauregi, P., Gill, I., and Vulfson, E., *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, (1997). 74(7): p. 879-886.
- [27] Gong, Y.-x., Wang, H.-j., Zhu, Y.-p., Zhang, W.-p., Dai, H.-b., Zhang, S.-h., Wei, E.-q., and Chen, Z., *Neuroscience Letters*, (2007). 422(1): p. 34-38.
- [28] Vaysse, L., Dubreucq, E., Pirat, J.L., and Galzy, P., *Journal of Biotechnology*, (1997). 53(1): p. 41-46.
- [29] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C., *LWT - Food Science and Technology*, (1995). 28(1): p. 25-30.
- [30] Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Vanden Berghe, D., *Journal of Natural Products*, (1998). 61(1): p. 71-76.
- [31] Vaysse, L., Ly, A., Moulin, G., and Dubreucq, E., *Enzyme and Microbial Technology*, (2002). 31(5): p. 648-655.
- [32] Fournand, D., Vaysse, L., Dubreucq, E., Arnaud, A., and Galzy, P., *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, (1998). 5(1-4): p. 207-211.
- [33] Briand, D., Dubreucq, E., Grimaud, J., and Galzy, P., *Lipids*, (1995). 30(8): p. 747-754.
- [34] Philip E. Hartman, Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds. 1990. p. 59-66.
- [35] Jagadeeshwar Rao, R., Tiwari, A.K., Kumar, U.S., Reddy, S.V., Ali, A.Z., and Rao, J.M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2003). 13(16): p. 2777-2780.
- [36] Yelamos, B., Roncal, F., Albar, J.P., Rodriguez-Crespo, I., and Gavilanes, F., *Biochemistry*, (2006). 45(4): p. 1263-1270.

3. Contribution de l'article

L'acylation enzymatique de la carnosine par l'acide oléique ou l'oléate d'éthyle a été réalisée en milieu aqueux biphasique catalysée par l'acyltransférase de *Candida parapsilosis*. Ce procédé constitue une alternative écologique au problème de solubilité, souvent rencontré dans la mise en œuvre d'acylations enzymatiques de dipeptides en milieu organique. La réaction de trans-acylation a conduit à un taux de conversion du substrat de $47 \pm 4 \%$ en 10 h et le produit synthétisé, le N-oléyl carnosine a été purifié. Le procédé de trans-acylation conduit plus rapidement à un meilleur taux de conversion de la carnosine comparativement à celui d'acylation directe. Cependant, l'activité hydrolytique de l'enzyme envers l'oléate d'éthyle semble être un paramètre limitant non négligeable. Les mesures d'activité antioxydante réalisées sur la carnosine et son dérivé acylé mettent en évidence pour ces deux molécules, une propriété inhibitrice de la xanthine oxydase ainsi que la capacité à piéger les radicaux superoxydes. Il semble que l'acylation de la carnosine par un groupe oléyle n'affecte pas ces activités biologiques. Cette étude démontre l'intérêt de l'acylation enzymatique de dipeptides permettant de générer des dérivés fonctionnels de peptides en milieu écologiquement acceptable grâce au développement de nouveaux systèmes réactionnels à une seule étape. Concernant le dérivé acylé de carnosine, il reste à vérifier si le greffage du groupe oléyle permet de diminuer sa sensibilité aux carnosinases et d'augmenter significativement sa biodisponibilité dans les systèmes biologiques.

Conclusion et perspectives

Cette thèse a eu pour objectif :

- étudier l'acylation enzymatique d'une molécule modèle bifonctionnelle, le 6-amino-1-hexanol et caractériser l'influence de différents paramètres (biocatalyseurs, agent acylant, état d'ionisation des substrats et milieux réactionnels) sur son efficacité et sa sélectivité,
- établir un modèle cinétique basé sur une approche expérimentale, capable de décrire les cinétiques de réaction de la trans-acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol en solvant organique,
- étudier l'acylation enzymatique de dipeptides polyfonctionnels dans différents milieux réactionnels et caractériser l'influence de ces milieux sur la solubilité des substrats, l'efficacité et la sélectivité de la réaction,
- étudier la N-acylation enzymatique d'un dipeptide bioactif et de l'impact de son acylation sur ses propriétés biologiques.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail apporte des contributions importantes concernant la N,O-acylation enzymatique de molécules polyfonctionnelles et s'organisent autour de trois axes :

1. L'influence des caractéristiques chimiques du micro-environnement réactionnel et de l'environnement moléculaire des fonctions potentiellement acylables sur la sélectivité et les performances de la réaction.
2. L'intérêt de la maîtrise des procédés mis en œuvre pour pallier certaines limitations,
3. Le choix du biocatalyseur et du couple biocatalyseur-solvant.

Les principales conclusions sont :

1. Influence du milieu réactionnel et de l'environnement moléculaire des fonctions acylables sur les performances de la réaction.

Le milieu réactionnel influence la disponibilité des substrats au cours de la réaction.

En effet, par exemple, lors de l'acylation enzymatique de la Lys-Ser, HCl, le choix d'un liquide ionique tel que [Bmim]⁺[PF₆]⁻ a permis une nette amélioration de la solubilité de

ce substrat (14 fois supérieure) par rapport aux solvants organiques testés. Cependant pour certains dipeptides très polaires tels que la carnosine, aucune amélioration notable de la solubilité n'a été obtenue dans ce liquide ionique. De manière attendue, cette étude démontre que le choix d'un milieu réactionnel appropriée, en augmentant la solubilité du substrat permet d'augmenter l'efficacité de la réaction.

L'environnement réactionnel influence l'état d'ionisation des substrats.

Il a été montré que la mise en présence d'un substrat aminé et d'acide gras libre en milieu solvant organique peut conduire à la formation d'un complexe ionique. La proportion de molécules impliquées dans ce complexe ionique dépend du rapport molaire entre les substrats utilisés. Dans le cas de l'acylation enzymatique du 6-amino-1-hexanol par l'acide oléique, ce complexe a été montré réversible, comme le suggère le taux de conversion du substrat supérieur à 90 % obtenu à l'équilibre. Cette réversibilité est hautement dépendante du pouvoir dissociant du milieu réactionnel, ce qui expliquerait l'obtention de rendements plus faibles d'acylation du 6-amino-1-hexanol dans l'hexane que dans le 2-méthyl-2-butanol.

La formation d'un tel complexe ionique entre le donneur et l'accepteur d'acyle est un phénomène qui mérite d'être étudié de manière plus exhaustive car son impact sur la disponibilité des substrats et par suite sur l'efficacité de la réaction est dans certains cas prépondérant.

L'environnement réactionnel est susceptible d'influencer la chimio-sélectivité de la réaction.

L'utilisation de système sans solvant à base d'acide gras libre a permis d'orienter la chimio-sélectivité de la réaction enzymatique d'acylation d'alcools aminés en faveur de la O-acylation. Ceci suggère que ce système réactionnel, de part son excès en acide gras libre affecte le caractère nucléophile de la fonction amine en favorisant sa protonation. Le CO₂ supercritique, oriente lui aussi la chimio-sélectivité de la réaction d'acylation directe d'alcools aminés en faveur de la O-acylation. Pour expliquer ce résultat, on peut formuler l'hypothèse que la fonction amine est sous forme protonée dans un tel milieu.

Afin de comprendre plus précisément l'influence de l'environnement réactionnel sur la chimio-sélectivité de ces réactions d'acylation de substrats polyfonctionnels, les interactions entre le solvant et les substrats, entre l'enzyme et les substrats et entre les substrats eux-mêmes, en fonction de l'état d'ionisation de ces derniers seront étudiés par modélisation moléculaire. Ce travail pourrait permettre de déterminer si l'environnement réactionnel

influence la chimio-sélectivité de la réaction en affectant la réactivité de certaines fonctions acylables ou en favorisant des orientations préférentielles des substrats dans la poche catalytique des enzymes.

L'environnement chimique des groupes fonctionnels influence la chimio-sélectivité de l'acylation.

Nous avons mis en évidence que dans le cas de molécules polyfonctionnelles telles que des dipeptides, la fonction amine en position N-terminal est difficilement acylable par voie enzymatique quel que soit le dipeptide et ses groupes fonctionnels constitutifs. Ceci laisse supposer une faible réactivité de cette fonction. Dans le cas de la Lys-Ser, HCl, l'absence de O-acylation de l'hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine a suggéré une faible réactivité de cette fonction. Notre étude a démontré que la séquence peptidique de ce peptide présentant une fonction carboxylique électro-attractrice à proximité de la fonction hydroxyle affecte considérablement sa réactivité et empêche son acylation. Par contre, cette fonction hydroxyle peut être acylée dans le cas du dipeptide Ser-Leu, le groupe carboxylique à proximité de l'hydroxyle étant impliqué dans une liaison peptidique. Une fonction acylable à proximité d'un groupe électro-attracteur est donc peu réactive vis-à-vis de l'acylation enzymatique catalysée par les lipases.

2. Influence du procédé mis en œuvre pour accroître les performances de la réaction d'acylation.

La solubilité et la disponibilité des substrats peuvent être améliorées par le procédé mis en œuvre (température, pression et système d'agitation).

Il a été montré que la très faible solubilité de la carnosine en solvant organique peut être améliorée en augmentant la température réactionnelle de 55 °C à 80 °C. Cette meilleure disponibilité du substrat a permis d'augmenter le rendement de la réaction d'acylation de 50 %. Toutefois, une telle solution n'est applicable qu'à des substrats stables et reste limitée par le domaine de thermostabilité du biocatalyseur.

Un autre procédé qui a été montré efficace dans ce travail, pour augmenter cette faible solubilité est l'application d'une pression de 10^8 Pa sur le milieu réactionnel contenant les particules de substrats, avant l'ajout du biocatalyseur. De cette façon, il est possible d'améliorer la dispersion des particules de substrats, de diminuer la taille de celles-ci et

d'augmenter la solubilité du dipeptide en solvant organique de 67 % et d'aboutir ainsi à une amélioration significative du rendement d'acylation.

L'une des perspectives envisagée pour approfondir ce point est l'étude de l'influence de la dispersibilité et de la taille des particules du dipeptide en solvant organique sur l'efficacité de son acylation par la lipase B de Candida antarctica immobilisée.

Enfin, un dernier paramètre important à ne pas négliger est le choix de la configuration du réacteur et plus particulièrement de son système d'agitation. Il a été démontré que les systèmes d'agitations les plus propices pour favoriser le transfert de masse au sein du milieu réactionnel et donc une meilleure efficacité de la réaction d'acylation sont de type mécanique. Ainsi nous avons comparé un système à agitation orbitale et un système à agitation mécanique et montré que l'agitation mécanique est la plus adaptée. De plus, l'étude des cinétiques de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol catalysé par une lipase immobilisée en réacteur à agitation mécanique a mis en évidence l'existence d'une vitesse d'agitation optimale au-delà de laquelle les particules de biocatalyseurs se collent par force centrifuge aux parois du réacteur. En réacteur Wheaton[®], la vitesse d'agitation optimale pour une réaction d'acylation catalysée par Novozym 435[®] est de 250 tr.min⁻¹.

Les performances de la réaction enzymatique d'acylation peuvent être maintenues voire améliorées par la mise en œuvre de procédés dans des milieux réactionnels plus respectueux de l'environnement.

Cette étude a mis en évidence que l'utilisation de liquides ioniques à cation imidazolium et à anions peu nucléophiles pour l'acylation de certains substrats (6-amino-1-hexanol, Lys-ser, HCl) permet une amélioration considérable des performances de la réaction d'un point de vue vitesse de réaction et rendement à l'équilibre. Ces résultats permettent de montrer que ces solvants peuvent être une alternative aux solvants organiques classiques, d'autant plus qu'il est maintenant possible de concevoir des liquides ioniques à façon en associant cations et anions variés en fonction de la réaction considérée. Cependant, bien que ces milieux réactionnels s'inscrivent dans le cadre de procédés verts, leurs utilisations font encore l'objet de réticence à cause du manque d'études sur leur toxicité, la nécessité de recourir à des extractions liquide/liquide des produits en employant des solvants organiques et leur coût limitant encore leur utilisation à l'échelle industrielle.

L'approfondissement de ces résultats par une étude comparative des potentialités d'une plus grande diversité de liquides ioniques serait intéressant d'être réalisé. Ainsi, par une approche

d'ingénierie du solvant, les cations et les anions constitutifs les plus adéquats pourraient être déterminés en fonction des propriétés physico-chimiques du peptide à acyler et du biocatalyseur utilisé.

L'étude de la toxicité des liquides ioniques présentant des potentialités intéressantes pour l'acylation enzymatique de dipeptides bioactifs reste incontournable pour valider leur utilisation.

Un autre milieu réactionnel prometteur est le CO₂ supercritique qui permet d'améliorer considérablement les performances de l'acylation enzymatique d'une molécule bifonctionnelle en termes de cinétique réactionnelle.

Ce milieu s'inscrit très bien dans le domaine des procédés verts et la réalisation d'études d'acylation de dipeptides bioactifs dans ce fluide supercritique apparaît comme pertinente.

3. Importance du couple milieu réactionnel – enzyme.

L'ensemble de cette étude a démontré les performances de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée pour catalyser l'acylation d'alcools aminés et de dipeptides dans les différents milieux réactionnels pauvres en eau. La large spécificité de substrats de cette enzyme a permis l'acylation du 6-amino-1-hexanol, de la Lys-ser, de la Ser-Leu et de la β -Ala-His. Nous avons également montré que sa stabilité et son activité étaient maintenues voire améliorées dans des milieux réactionnels de type liquide ionique et CO₂ supercritique. Cependant, il a été démontré lors de l'étude cinétique de trans-acylation du 6-amino-1-hexanol en solvant organique catalysée par Novozym 435®, que cette enzyme perdait 40 % de son activité au bout de 8h de réaction, malgré son immobilisation.

La limitation de cette perte importante d'activité est un point important à aborder prochainement ainsi que la découverte d'un autre support d'immobilisation lui permettant de maintenir une activité optimale plus longtemps.

Dans le cas de l'acylation enzymatique de la carnosine, ce catalyseur ne semble pas le plus approprié. En effet, celui-ci présente une activité hydrolytique résiduelle importante, même en présence de très faibles quantités d'eau. Son utilisation nécessite l'emploi de milieux de très faibles a_w, qui solubilisent difficilement les petits peptides polaires comme la carnosine. Nous nous sommes ainsi orientés vers l'utilisation d'un autre biocatalyseur : l'acyl-transférase de *Candida parapsilosis*. Il a été démontré que ce catalyseur permet la N-acylation

de la carnosine en milieu lipide-aqueux biphasique et conduit à un rendement supérieur à celui obtenu avec Novozym 435[®] en solvant organique. Cette alternative constitue donc une approche prometteuse pour la synthèse de liaison amide lors de l'acylation de peptides polaires en milieu aqueux tamponné, constituant en plus un milieu plus respectueux de l'environnement.

Les premiers résultats sont très encourageants et permettent d'envisager l'optimisation du procédé d'acylation de la carnosine catalysé par ce biocatalyseur. Il est également envisagé de se tourner vers la recherche de nouveaux catalyseurs microbiens capables d'acyler des peptides en milieux aqueux telles que des amino-acylases, susceptibles de se substituer aux lipases classiquement utilisées pour l'acylation.

L'application de cette étude à un dipeptide bioactif, la carnosine, a montré que l'acylation n'affectait pas certaines de ses propriétés biologiques. Au contraire, le greffage d'un groupe oléyle permet d'augmenter sa capacité à piéger les anions superoxydes. Ce nouveau dérivé synthétisé apparaît être une molécule prometteuse pour vectoriser la carnosine vers ses cibles biologiques

L'étude doit donc être approfondie en étudiant la résistance de ce dérivé par rapport aux carnosinases qui sont des enzymes endogènes présentes dans les systèmes biologiques.

Il est également indispensable d'étudier la biodisponibilité de cette molécule par des études in vitro sur des cellules CaCo2 ou ex vivo par l'emploi de chambre de Ussing permettant de mettre en évidence le transfert entérocytaire de molécules.

Afin de synthétiser des molécules multi-fonctionnelles, le greffage sur la carnosine, par acylation enzymatique, d'un acide gras bioactif tel que le DHA (acide docosahéxaénoïque) est envisagé.

Ainsi, notre étude apporte une contribution importante dans le domaine de la fonctionnalisation de peptides, tant d'un point de vue cognitif que d'un point de vue applicatif. Ce travail ouvre donc un large champ d'investigations pour le développement de procédés performants, sélectifs et respectueux de l'environnement pour la production de molécules d'intérêt à base peptidique.

Références

- Abe, H. and Mommsen, P. (1995). Chapter 14 Histidine-related dipeptides: distribution, metabolism, and physiological function. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Elsevier. Volume 4: 309-333.
- Abe, Y., Kude, K., Hayase, S., Kawatsura, M., Tsunashima, K. and Itoh, T. (2008). "Design of phosphonium ionic liquids for lipase-catalyzed transesterification." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 51(3-4): 81-85.
- Alminana, N., Alsina, M. A. and Reig, F. (2007). "New GHK hydrophobic derivatives: Interaction with phospholipid bilayers." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 57(2): 243-249.
- Arcos, J. A., Hill C.G, Jr. and Otero, C. (2001). "Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone." Biotechnology and Bioengineering 73(2): 104-110.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Moussou, P., Pauly, G. and Ghoul, M. (2004). "Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 29(1-6): 63-67.
- Arroyo, M., Sanchez-Montero, J. M. and Sinisterra, J. V. (1999). "Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media." Enzyme and Microbial Technology 24(1-2): 3-12.
- Asada, H., Douen, T., Mizokoshi, Y., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A. and Muranishi, S. (1994). "Stability of acyl derivatives of insulin in the small intestine: Relative importance of insulin association characteristics in aqueous solution." Pharmaceutical Research 11(8): 1115-1120.
- Babizhayev, M. A. (2006). "Biological activities of the natural imidazole-containing peptidomimetics n-acetylcarnosine, carnosine and l-carnosine in ophthalmic and skin care products." Life Sciences 78(20): 2343-2357.
- Badr, H. M. (2007). "Antioxidative activity of carnosine in gamma irradiated ground beef and beef patties." Food Chemistry 104(2): 665-679.
- Baldessarini, R. J., Campbell, A., Webb, N. L., Swindell, C. S., Flood, J. G., Shashoua, V. E., Kula, N. S., Hemamalini, S. and Bradley, M. O. (2001). "Fatty acid derivatives of clozapine: Prolonged antidopaminergic activity of docosahexaenoylclozapine in the rat." Neuropsychopharmacology 24(1): 55-65.
- Beckman, E. J. (2004). "Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing." The Journal of Supercritical Fluids 28(2-3): 121-191.
- Belsito, E., Di Gioia, M. L., Greco, A., Leggio, A., Liguori, A., Perri, F., Siciliano, C. and Viscomi, M. C. (2007). "N-methyl-N-nosyl-3-amino acids." Journal of Organic Chemistry 72(13): 4798-4802.
- Bijlmakers, M. J. (2007). "Palmitoylation: Putting on fat." Biochemist 29(4): 28-31.
- Bordusa, F. (2002). "Proteases in organic synthesis." Chemical Reviews 102(12): 4817-4867.
- Borzeix, F., Monot, F. and Vandecasteele, J.-P. (1992). "Strategies for enzymatic esterification in organic solvents: Comparison of microaqueous, biphasic, and micellar systems." Enzyme and Microbial Technology 14(10): 791-797.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." LWT - Food Science and Technology 28(1): 25-30.
- Briand, D., Dubreucq, E., Grimaud, J. and Galzy, P. (1995). "Substrate specificity of the lipase from *Candida parapsilosis*." Lipids 30(8): 747-754.

- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F. and Dubreucq, E. (2004). "High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*." Journal of Biotechnology 111(1): 41-50.
- Celia, E., Cernia, E., Palocci, C., Soro, S. and Turchet, T. (2005). "Tuning *Pseudomonas cepacea* lipase (PCL) activity in supercritical fluids." Journal of Supercritical Fluids 33(2): 193-199.
- Chaminade, P. (2007). Principe, fonctionnement et application du détecteur évaporatif à diffusion de lumière. Chimie analytique. Université Paris Sud.
- Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M. and Ghoul, M. (2001). "Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 11(4-6): 949-954.
- Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J. M. and Ghoul, M. (2007). "Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity." Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(23): 9496-9502.
- Chebil, L., Humeau, C., Anthony, J., Dehez, F., Engasser, J. M. and Ghoul, M. (2007). "Solubility of flavonoids in organic solvents." Journal of Chemical and Engineering Data 52(5): 1552-1556.
- Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M. and Ghoul, M. (2006). "Enzymatic acylation of flavonoids." Process Biochemistry 41(11): 2237-2251.
- Chilov, G. G., Moody, H. M., Boesten, W. H. J. and Svedas, V. K. (2003). "Resolution of (RS)-phenylglycinonitrile by penicillin acylase-catalyzed acylation in aqueous medium." Tetrahedron Asymmetry 14(17): 2613-2617.
- Chinsky, N., Margolin, A. L. and Klibanov, A. M. (1989). "Chemoselective enzymatic monoacylation of bifunctional compounds." Journal of the American Chemical Society 111(1): 386-388.
- Colja Laane, S. B. K. V. C. V. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. 30: 81-87.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J. and Vanden Berghe, D. (1998). "Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers." Journal of Natural Products 61(1): 71-76.
- Couturier, L., Taupin, D. and Yvergnaux, F. "Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic In Press, Corrected Proof.
- Cruz Silva, M. M., Riva, S. and Sa e Melo, M. L. (2005). "Regioselective enzymatic acylation of vicinal diols of steroids." Tetrahedron 61(12): 3065-3073.
- Dabkowska, K. and Szewczyk, K. W. (2007). "Kinetics of enantioselective enzymatic acylation of mandelic acid." Journal of Biotechnology 131(2, Supplement 1): S79-S80.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2005). "Understanding structure - Stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids." Biomacromolecules 6(3): 1457-1464.
- de los Rios, A. P., Hernandez-Fernandez, F. J., Tomas-Alonso, F., Gomez, D. and Villora, G. (2008). "Synthesis of esters in ionic liquids. The effect of vinyl esters and alcohols." Process Biochemistry 43(8): 892-895.
- Deng, P.-Y. and Li, Y.-J. (2005). "Calcitonin gene-related peptide and hypertension." Peptides 26(9): 1676-1685.

- Djeghaba, Z., Deleuze, H., De Jeso, B., Messadi, D. and Maillard, B. (1991). "Enzymes in organic synthesis VII: enzymatic acylation of amines." Tetrahedron Letters 32(6): 761-762.
- Dolores, R.-D., Edmundo, C., Roberto, M. and Agustín, L.-M. (2002). "Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents." Biotechnology Letters V24(24): 2057-2061.
- Dossat, V., Combes, D. and Marty, A. (2002). "Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil." Enzyme and Microbial Technology 30(1): 90-94.
- Dumont, T., Barth, D. and Perrut, M. (1993). "Continuous synthesis of ethyl myristate by enzymatic reaction in supercritical carbon dioxide." The Journal of Supercritical Fluids 6(2): 85-89.
- Egorov, T. A., Odintsova, T. I., Pukhalsky, V. A. and Grishin, E. V. (2005). "Diversity of wheat anti-microbial peptides." Peptides 26(11): 2064-2073.
- Enaud, E., Humeau, C., Piffaut, B. and Girardin, M. (2004). "Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 27(1): 1-6.
- Ericsson, D. J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandström, A. G., Bäckvall, J.-E. and Mowbray, S. L. (2008). "X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation." Journal of Molecular Biology 376(1): 109-119.
- Estruch, I., Tagliani, A. R., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Alcantara, A. R., Toma, L. and Terreni, M. (2008). "Immobilization of the acylase from *Escherichia coli* on glyoxyl-agarose gives efficient catalyst for the synthesis of cephalosporins." Enzyme and Microbial Technology 42(2): 121-129.
- Fernandez-Perez, M. and Otero, C. (2003). "Selective enzymatic synthesis of amide surfactants from diethanolamine." Enzyme and Microbial Technology 33(5): 650-660.
- Fernandez-Perez, M. and Otero, C. (2001). "Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine." Enzyme and Microbial Technology 28(6): 527-536.
- Florent, S., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., Kriem, B., Koziel, V., Escanye, M. C., Fifre, A., Sponne, I., Leininger-Muller, B., Olivier, J. L., Pillot, T. and Oster, T. (2006). "Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-oligomers." Journal of Neurochemistry 96(2): 385-395.
- Foresti, M. L., Pedernera, M., Ferreira, M. L. and Bucala, V. (2008). "Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems." Applied Catalysis A: General 334(1-2): 65-72.
- Fouad, A. A., El-Rehany, M. A.-A. and Maghraby, H. K. (2007). "The hepatoprotective effect of carnosine against ischemia/reperfusion liver injury in rats." European Journal of Pharmacology 572(1): 61-68.
- Fouad, A. A., Morsy, M. A. and Gomaa, W. (2008). "Protective effect of carnosine against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice." Environmental Toxicology and Pharmacology 25(3): 292-297.
- Fournand, D., Vaysse, L., Dubreucq, E., Arnaud, A. and Galzy, P. (1998). "Monohydroxamic acid biosynthesis." Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic 5(1-4): 207-211.
- Furutani, T., Furui, M., Ooshima, H. and Kato, J. (1996). "N-acylation of [beta]-amino alcohol by acyl migration following enzyme-catalyzed esterification." Enzyme and Microbial Technology 19(8): 578-584.
- Furutani, T., Ooshima, H. and Kato, J. (1997). "Preparation of N,O -diacyl ethanolamine from -acyl ethanolamine using lipase preparations." Enzyme and Microbial Technology 20(3): 214-220.

- Furutani, T., Su, R., Ooshima, H. and Kato, J. (1995). "Simple screening method for lipase for transesterification in organic solvent." Enzyme and Microbial Technology 17(12): 1067-1072.
- Garcia, R., Garcia, T., Martinez, M. and Aracil, J. (2000). "Kinetic modelling of the synthesis of 2-hydroxy-5-hexenyl 2- chlorobutyrate ester by an immobilized lipase." Biochemical Engineering Journal 5(3): 185-190.
- Garcia, M. J., Rebolledo, F. and Gotor, V. (1993). "Chemoenzymatic aminolysis and ammonolysis of [beta]-ketoesters." Tetrahedron Letters 34(38): 6141-6142.
- Garcia, R., Martinez, M., Garcia, T., Aracil, J. and Waugh, G. F. F. a. K. C. (1999a). Kinetic modelling of enzymatic chiral resolution of (+/-)2-methyl butyric acid. Studies in Surface Science and Catalysis, Elsevier. Volume 122: 317-324.
- Garcia, T., Coteron, A., Martinez, M. and Aracil, J. (1996). "Kinetic modelling of esterification reactions catalysed by immobilized lipases." Chemical Engineering Science 51(11): 2841-2846.
- Garcia, T., Martinez, M., Garcia, D., Aracil, J. and Waugh, G. F. F. a. K. C. (1999b). Regioselective synthesis of monoglycerides. Kinetic modelling. Studies in Surface Science and Catalysis, Elsevier. Volume 122: 325-332.
- Garcia, T., Sanchez, N., Martinez, M. and Aracil, J. (1999c). "Enzymatic synthesis of fatty esters: Part I. kinetic approach*." Enzyme and Microbial Technology 25(7): 584-590.
- Gardossi, L., Bianchi, D. and Klibanov, A. M. (1991). "Selective acylation of peptides catalyzed by lipases in organic solvents." Journal of American Chemical Society. 113(16): 6328-6329.
- Gedey, S., Liljeblad, A., Lazar, L., Fulop, F. and Kanerva, L. T. (2002). "Structural effects on chemo- and enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B - Resolution of -amino esters." Canadian Journal of Chemistry 80(6): 565-570.
- Gill, I. I., Das, J. and Patel, R. N. (2007). "Enantioselective enzymatic acylation of 1-(3'-bromophenyl)ethylamine." Tetrahedron: Asymmetry 18(11): 1330-1337.
- Gonzalez-Sabin, J., Lavandera, I., Rebolledo, F. and Gotor, V. (2006). "Redesigning the mechanism of the lipase-catalysed aminolysis of esters." Tetrahedron: Asymmetry 17(8): 1264-1274.
- Gordon, C. M. (2001). "New developments in catalysis using ionic liquids." Applied Catalysis A: General 222(1-2): 101-117.
- Guiochon, G., Moysan, A. and Holley, C. (1988). "Influence of various parameters on the response factors of the evaporative light scattering detector for a number of non-volatile compounds." Journal of Liquid Chromatography 11(12): 2547-2570.
- Guiotto, A., Calderan, A., Ruzza, P. and Borin, G. (2005). "Carnosine and carnosine-related antioxidants: A review." Current Medicinal Chemistry 12(20): 2293-2315.
- Guranda, D. T., Khimiuk, A. I., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. and Svedas, V. K. (2004). "An 'easy-on, easy-off' protecting group for the enzymatic resolution of (+/-)-1-phenylethylamine in an aqueous medium." Tetrahedron: Asymmetry 15(18): 2901-2906.
- Guranda, D. T., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. and Svedas, V. K. (2001). "Highly efficient and enantioselective enzymatic acylation of amines in aqueous medium." Tetrahedron: Asymmetry 12(11): 1645-1650.
- Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Perkins, D. R., Willency, J. A., Knierman, M. D., Jin, Z., Witcher, D. R., Luo, S., Onyia, J. E. and Hale, J. E. (2008). "Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(17): 6320-6325.

- Ha, S. H., Lan, M. N., Lee, S. H., Hwang, S. M. and Koo, Y.-M. (2007). "Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids." Enzyme and Microbial Technology 41(4): 480-483.
- Habulin, M., Sabeder, S., Paljevac, M., Primožic, M. and Knez, Z. (2007). "Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media." The Journal of Supercritical Fluids 43(2): 199-203.
- Hacking, M. A. P. J., Akkus, H., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A. (2000). "Lipase and esterase-catalyzed acylation of hetero-substituted nitrogen nucleophiles in water and organic solvents." Biotechnology and Bioengineering 68(1): 84-91.
- Hammond, D. A., Karel, M., Klibanov, A. M. and Krukonis, V. J. (1985). "Enzymatic reactions in supercritical gases." Applied Biochemistry Biotechnology. 11(5): 393-400.
- Hari Krishna, S. (2002). "Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media." Biotechnology Advances 20(3-4): 239-266.
- Hazarika, S. and Dutta, N. N. (2004). Transesterification of 2-O-Benzylglycerol with Vinyl Acetate by Immobilized Lipase: Study of Reaction and Deactivation Kinetics. 8: 229-237.
- Hernandez-Fernandez, F. J., de los Rios, A. P., Rubio, M., Gomez, D. and Villora, G. (2007). "Enhancement of activity and selectivity in lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids by the use of additives." Journal of Chemical Technology and Biotechnology 82(10): 882-887.
- Hestrin, S. (1950). "Acylation reactions mediated by purified acetylcholine esterase II." Biochimica and Biophysica Acta 4: 310-321.
- Hobbs, H. R. and Thomas, N. R. (2007). "Biocatalysis in supercritical fluids, in fluoruous solvents, and under solvent-free conditions." Chemical Reviews 107(6): 2786-2820.
- Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B. and Miclo, A. (1998a). "Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate." Journal of Biotechnology 63(1): 1-8.
- Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B. and Miclo, A. (1998b). "Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 5(1-4): 19-23.
- Infante, M. R., Perez, L., Pinazo, A., Clapes, P., Moran, M. C., Angelet, M., Garcia, M. T. and Vinardell, M. P. (2004). "Amino acid-based surfactants." Comptes Rendus Chimie 7(6-7): 583-592.
- Irimescu, R. and Kato, K. (2004a). "Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 30(5-6): 189-194.
- Irimescu, R. and Kato, K. (2004b). "Lipase-catalyzed enantioselective reaction of amines with carboxylic acids under reduced pressure in non-solvent system and in ionic liquids." Tetrahedron Letters 45(3): 523-525.
- Irimescu, R., Saito, T. and Kato, K. (2003). "Enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols by esterification with FA under vacuum." Journal of the American Oil Chemists' Society 80(7): 659-663.
- Izumi, T., Yagimuma, Y. and Haga, M. (1997). "Enzymatic syntheses of N-Lauroyl- β -alanine homologs in organic media." Journal of the American Oil Chemists' Society 74(7): 875-878.
- Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S. and Chauhan, S. M. S. (2005). "Chemical and biochemical transformations in ionic liquids." Tetrahedron 61(5): 1015-1060.
- Jamrozik, C. (2001). "Mise en œuvre d'enzymes hydrolytiques pour l'acylation de la lysine par des acides gras en milieu organique " (Thèse No : 01 INPL 028N) Vandoeuvres-Nancy, FRANCE

- Jauregi, P., Valivety, R., Gill, I. and Vulfson, E. (1994). Enzymatic approach to the synthesis of amino acid based surfactants. Institution of Chemical Engineers Symposium Series.
- Kaar, J. L., Jesionowski, A. M., Berberich, J. A., Moulton, R. and Russell, A. J. (2003). "Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability." Journal of the American Chemical Society 125(14): 4125-4131.
- Katsoura, M. H., Polydera, A. C., Katapodis, P., Kolisis, F. N. and Stamatis, H. (2007). "Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids." Process Biochemistry 42(9): 1326-1334.
- Kim, M.-J., Choi, M. Y., Lee, J. K. and Ahn, Y. (2003). "Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 26(3-6): 115-118.
- Klibanov, A. (1997). "Why are enzymes less active in organic solvents than in water" Trends in Biotechnology 15(3): 97-101.
- Klibanov, A. M. (2001). "Improving enzymes by using them in organic solvents." Nature 409(6817): 241-246.
- Kobata, K., Kobayashi, M., Kinpara, S. and Watanabe, T. (2003). "Supercritical CO₂ as a reaction medium for synthesis of capsaicin analogues by lipase-catalyzed transacylation of capsaicin." Biotechnology Letters 25(18): 1575-1578.
- Koreishi, M., Asayama, F., Imanaka, H., Imamura, K., Kadota, M., Tsuno, T. and Nakanishi, K. (2005a). "Purification and characterization of a novel aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 69(10): 1914-1922.
- Koreishi, M., Kawasaki, R., Imanaka, H., Imamura, K. and Nakanishi, K. (2005b). "A novel -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of N-acyl-L-lysines." JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society 82(9): 631-637.
- Koreishi, M., Zhang, D., Imanaka, H., Imamura, K., Adachi, S., Matsuno, R. and Nakanishi, K. (2006). "A novel acylase from *Streptomyces mobaraensis* that efficiently catalyzes hydrolysis/synthesis of capsaicins as well as N-acyl-L-amino acids and N-acyl-peptides." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(1): 72-78.
- Kraai, G. N., Winkelman, J. G. M., de Vries, J. G. and Heeres, H. J. "Kinetic studies on the *Rhizomucor Miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system." Biochemical Engineering Journal In Press, Accepted Manuscript.
- Kremnicky, L., Mastihuba, V. and Cote, G. L. (2004). "Trichoderma reesei acetyl esterase catalyzes transesterification in water." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 30(5-6): 229-239.
- Lancaster, M. (2008). "Renewable resources." Green Chemistry 166-209.
- Lecointe, C., Dubreucq, E. and Galzy, P. (1996). "Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases." Biotechnology Letters 18(8): 869-874.
- Lee, S. H., Ha, S. H., Hiep, N. M., Chang, W.-J. and Koo, Y.-M. (2008). "Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid ester using ionic liquids mixtures." Journal of Biotechnology 133(4): 486-489.
- Li, N., Ma, D. and Zong, M.-H. (2008). "Enhancing the activity and regioselectivity of lipases for 3'-benzoylation of floxuridine and its analogs by using ionic liquid-containing systems." Journal of Biotechnology 133(1): 103-109.
- Li, N., Zong, M. H., Liu, X. M. and Ma, D. (2007). "Regioselective synthesis of 3-O-caproyl-floxuridine catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 47(1-2): 6-12.

- Liisa T. Kanerva, M. K., Eero Vanttinen, Tuomas T. Huuhtanen and Martti Dahlqvist, (1992). "Studies on the chemo- and enantio-selectivity of the enzymatic monoacylations of amino alcohols." Acta chemica scandinavica. 46(no11): pp. 1101-1105.
- Liljeblad, A., Aksela, R. and Kanerva, L. T. (2001). "Use of enantio-, chemo- and regioselectivity of acylase I. Resolution of polycarboxylic acid esters." Tetrahedron: Asymmetry 12(14): 2059-2066.
- Liljeblad, A. and Kanerva, L. T. (1999). "Enzymatic methods for the preparation of enantiopure malic and aspartic acid derivatives in organic solvents." Tetrahedron: Asymmetry 10(22): 4405-4415.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2001). "Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis." Biotechnology Letters 23(18): 1529-1533.
- Lozano, P., de Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2002). "Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide." Chemical communications (Cambridge, England)(7): 692-693.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2003a). "Enzymatic ester synthesis in ionic liquids." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 21(1-2): 9-13.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2003b). "Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150°C." Biotechnology Progress 19(2): 380-382.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2004a). "Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide." Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 214(1): 113-119.
- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2004b). "Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems." Biotechnology Progress 20(3): 661-669.
- Lozano, P., de Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2005). "Dynamic structure-function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids." Biocatalysis and Biotransformation 23(3-4): 169-176.
- Lozano, P., De Diego, T., Larnicol, M., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2006). "Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol in ionic liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems." Biotechnology Letters 28(19): 1559-1565.
- Lozano, P., De Diego, T., Sauer, T., Vaultier, M., Gmouh, S. and Iborra, J. L. (2007a). "On the importance of the supporting material for activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media." Journal of Supercritical Fluids 40(1): 93-100.
- Lozano, P., Piamtongkam, R., Kohns, K., Diego, T. D., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2007b). "Ionic liquids improve citronellyl ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in solvent-free media." Green Chemistry 9(7): 780-784.
- Lozano, P., Villora, G., Gomez, D., Gayo, A. B., Sanchez-Conesa, J. A., Rubio, M. and Iborra, J. L. (2004c). "Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide." Journal of Supercritical Fluids 29(1-2): 121-128.
- Macrae, A. R. H., R. C. (1985). "Present and future applications of lipases " Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 3: 193-217
- Madeira Lau, R., Van Rantwijk, F., Seddon, K. R. and Sheldon, R. A. (2000). "Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids." Organic Letters 2(26): 4189-4191.

- Mannhold, R. and Rekker, R. F. (2000). "The hydrophobic fragmental constant approach for calculating log P in octanol/water and aliphatic hydrocarbon/water systems." Perspectives in Drug Discovery and Design 18: 1-18.
- Mannhold, R., Rekker, R. F., Sonntag, C., Ter Laak, A. M., Dross, K. and Polymeropoulos, E. E. (1995). "Comparative evaluation of the predictive power of calculation procedures for molecular lipophilicity." Journal of Pharmaceutical Sciences 84(12): 1410-1419.
- Martín, J. R., Nus, M., Gago, J. V. S. and Sánchez-Montero, J. M. (2008). "Selective esterification of phthalic acids in two ionic liquids at high temperatures using a thermostable lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: A comparative study." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 52-53: 162-167.
- Matos, J. R., West, J. B. and Wong, C. H. (1987). "Lipase catalysed synthesis of peptides: Preparation of a penicillin G precursor and other peptides." Biotechnology Letters 9(4): 233-236.
- Maugard, T. (1996). "Synthèse par amidification enzymatique d'amines hydroxylées N-acylées." Thèse. Institut national des Sciences appliquées de Toulouse : Biologie et génétique moléculaires et cellulaires, Toulouse.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M. and Monsan, P. (1998a). "Kinetic study of chemoselective acylation of amino-alditol by immobilized lipase in organic solvent: Effect of substrate ionization." Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology 1387(1-2): 177-183.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. and Monsan, P. (1997a). "Lipase-catalysed synthesis of biosurfactants by transacylation of N-methyl-glucamine and fatty-acid methyl esters." Tetrahedron 53(22): 7629-7634.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. and Monsan, P. (1997b). "Lipase-catalyzed chemoselective N-acylation of amino-sugar derivatives in hydrophobic solvent: Acid-amine ion-pair effects." Tetrahedron 53(22): 7587-7594.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. and Monsan, P. (1998b). "Enzymatic amidification for the synthesis of biodegradable surfactants: Synthesis of N-acylated hydroxylated amines." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 5(1-4): 13-17.
- Mellou, F., Loutrari, H., Stamatis, H., Roussos, C. and Kolisis, F. N. (2006). "Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells." Process Biochemistry 41(9): 2029-2034.
- Montet, D., Servat, F., Pina, M., Graille, J., Galzy, P., Arnaud, A., Ledon, H. and Marcou, L. (1990). "Enzymatic synthesis of N-acyllysines." Journal of the American Oil Chemists' Society 67(11): 771-774.
- Muniglia, L., Nandor Kiss, L., Fonteix, C. and Marc, I. (2004). "Multicriteria optimization of a single-cell oil production." European Journal of Operational Research 153(2): 360-369.
- Murase, H., Nagao, A. and Terao, J. (1993). "Antioxidant and emulsifying activity of N-(long-chain-acyl)histidine and N-(long-chain-acyl)carnosine." Journal of Agricultural and Food Chemistry 41(10): 1601-1604.
- Nara, S. J., Harjani, J. R. and Salunkhe, M. M. (2002). "Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study." Tetrahedron Letters 43(16): 2979-2982.
- Nara, S. J., Harjani, J. R., Salunkhe, M. M., Mane, A. T. and Wadgaonkar, P. P. (2003). "Lipase-catalysed polyester synthesis in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid." Tetrahedron Letters 44(7): 1371-1373.

- Noel, M., Lozano, P., Vaultier, M. and Iborra, J. L. (2004). "Kinetic resolution of rac-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl) sulfonyl]amide." Biotechnology Letters 26(4): 301-306.
- Nys, G. G. e. R., R. F. (1973). "Statistical analysis of a series of partition coefficients with special reference to the predictability of folding of drug molecules. The introduction of hydrophobic fragmental constants (f values)." Chimie Thérapeutique 5: 521-535.
- Palocci, C., Falconi, M., Chronopoulou, L. and Cernia, E. (2008). "Lipase-catalyzed regioselective acylation of tritylglycosides in supercritical carbon dioxide." The Journal of Supercritical Fluids 45(1): 88-93.
- Park, O. J., Jeon, G. J. and Yang, J. W. (1999). "Protease-catalyzed synthesis of disaccharide amino acid esters in organic media." Enzyme and Microbial Technology 25(3-5): 455-462.
- Park, S. and Kazlauskas, R. J. (2003). "Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology." Current Opinion in Biotechnology 14(4): 432-437.
- Pegova, A., Abe, H. and Boldyrev, A. (2000). "Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 127(4): 443-446.
- Perrin, E., Mandrille, A., Oumoun, M., Fonteix, C., Marc, I., (1997). "Optimisation globale par stratégie d'évolution : Technique utilisant la génétique des individus diploïdes." Operations Research 31 (2): 161-201.
- Perry, R. H., Green, D.W. (Eds.) (1984). Perry's Chemical Engineers' Hand Book. Ed: McGraw-Hill. pp. 3-287.
- Peter, F. and Preda, G. (2002). "Characterisation of pancreatic lipase substrate specificity in organic reaction media by a kinetic method." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 19-20: 467-472.
- Pilarek, M. and Szewczyk, K. W. (2007). "Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases." Journal of Biotechnology 127(4): 736-744.
- Pitner-Merck, W. (2004). "Ionic liquids: Properties and Applications." Royal society of chemistry. Workshop.
- Pool, C. T. and Thompson, T. E. (1998). "Chain length and temperature dependence of the reversible association of model acylated proteins with lipid bilayers." Biochemistry 37(28): 10246-10255.
- Rasalkar, M. S., Potdar, M. K. and Salunkhe, M. M. (2004). "*Pseudomonas cepacia* lipase-catalysed resolution of racemic alcohols in ionic liquid using succinic anhydride: role of triethylamine in enhancement of catalytic activity." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 27(4-6): 267-270.
- Roche, D., Prasad, K. and Repic, O. (1999). "Enantioselective acylation of [beta]-aminoesters using penicillin G Acylase in organic solvents." Tetrahedron Letters 40(19): 3665-3668.
- Romero, M. D., Calvo, L., Alba, C. and Daneshfar, A. (2007). "A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane." Journal of Biotechnology 127(2): 269-277.
- Sang, H. L., Dung, T. D., Sung, H. H., Chang, W. J. and Koo, Y. M. (2008). "Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid sugar ester using extremely supersaturated sugar solution in ionic liquids." Biotechnology and Bioengineering 99(1): 1-8.
- Sheldon, R. A. (1996). "Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media." Enzymatic Reactions in Organic Media: 266-307.
- Sheldon, R. A., Madeira Lau, R., Sorgedraeger, M. J., Van Rantwijk, F. and Seddon, K. R. (2002). "Biocatalysis in ionic liquids." Green Chemistry 4(2): 147-151.

- Shen, Y., Fan, Y., Dai, H., Fu, Q., Hu, W. and Chen, Z. (2007). "Neuroprotective effect of carnosine on necrotic cell death in PC12 cells." Neuroscience Letters 414(2): 145-149.
- Shibatani, S., Kitagawa, M. and Tokiwa, Y. (1997). "Enzymatic synthesis of vinyl sugar ester in dimethylformamide." Biotechnology Letters 19(6): 511-514.
- Sigma-Aldrich (2007). "Enabling Technologie - Ionic liquid." ChemFiles Vol 5 N° 6.
- Silva, C. A., Portaro, F. C. V., Fernandes, B. L., Ianzer, D. A., Guerreiro, J. R., Gomes, C. L., Konno, K., Serrano, S. M. T., Nascimento, N. and Camargo, A. C. M. (2008). "Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of *Bothrops jararaca*." Toxicon 51(4): 515-523.
- Soo, E. L., Salleh, A. B., Basri, M., Rahman, R. N. Z. A. and Kamaruddin, K. (2004). "Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants." Process Biochemistry 39(11): 1511-1518.
- Stoveken, T. and Steinbuechel, A. (2008). "Bacterial acyltransferases as an alternative for lipase-catalyzed acylation for the production of oleochemicals and fuels." Angewandte Chemie (International ed. in English) 47(20): 3688-3694.
- Togashi, S.-I., Takahashi, N., Iwama, M., Watanabe, S., Tamagawa, K. and Fukui, T. (2002). "Antioxidative Collagen-Derived Peptides In Human-Placenta Extract." Placenta 23(6): 497-502.
- Torres, C. F., Tore, A. M., Fornari, T., Senorans, F. J. and Reglero, G. (2007). "Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study." Biochemical Engineering Journal 34(2): 165-171.
- Truppo, M. D., Pollard, D. J., Moore, J. C. and Devine, P. N. (2008). "Production of (S)-[gamma]-fluoroleucine ethyl ester by enzyme mediated dynamic kinetic resolution: Comparison of batch and fed batch stirred tank processes to a packed bed column reactor." Chemical Engineering Science 63(1): 122-130.
- Tufvesson, P., Annerling, A., Hatti-Kaul, R. and Adlercreutz, D. (2007). "Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides." Biotechnology and Bioengineering 97(3): 447-453.
- Tweddell, R. J., Kermasha, S., Combes, D. and Marty, A. (1998). "Esterification and Interesterification Activities of Lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in Three Different Types of Organic Media: A Comparative Study." Enzyme and Microbial Technology 22(6): 439-445.
- Ulbert, O., Frater, T., Belafi-Bako, K. and Gubicza, L. (2004). "Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 31(1-3): 39-45.
- Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T. and Jones, T. A. (1994). "Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*." Journal of Molecular Biology 235(2): 790-792.
- Valivety, R., Jauregi, P., Gill, I. and Vulfson, E. (1997). "Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants." Journal of the American Oil Chemists' Society 74(7): 879-886.
- Valivety, R. H., Halling, P. J. and Macrae, A. R. (1992a). "Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents." Biochimica and Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology 1118(3): 218-222.
- Valivety, R. H., Halling, P. J. and Macrae, A. R. (1993). "Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media." Biotechnology Letters 15(11): 1133-1138.
- Valivety, R. H., Halling, P. J., Peilow, A. D. and Macrae, A. R. (1992b). "Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity."

- Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology 1122(2): 143-146.
- Van Langen, L. M., Oosthoek, N. H. P., Guranda, D. T., Van Rantwijk, F., Svedas, V. K. and Sheldon, R. A. (2000). "Penicillin acylase-catalyzed resolution of amines in aqueous organic solvents." Tetrahedron Asymmetry 11(22): 4593-4600.
- van Langen, L. M., Oosthoek, N. H. P., Guranda, D. T., van Rantwijk, F., Svedas, V. K. and Sheldon, R. A. (2000). "Penicillin acylase-catalyzed resolution of amines in aqueous organic solvents." Tetrahedron: Asymmetry 11(22): 4593-4600.
- Van Rantwijk, F., Lau, R. M. and Sheldon, R. A. (2003). "Biocatalytic transformations in ionic liquids." Trends in Biotechnology 21(3): 131-138.
- Vaysse, L., Dubreucq, E., Pirat, J. L. and Galzy, P. (1997). "Fatty hydroxamic acid biosynthesis in aqueous medium in the presence of the lipase-acyltransferase from *Candida parapsilosis*." Journal of Biotechnology 53(1): 41-46.
- Vaysse, L., Ly, A., Moulin, G. and Dubreucq, E. (2002). "Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium." Enzyme and Microbial Technology 31(5): 648-655.
- Vetting, M. W., S. de Carvalho, L. P., Yu, M., Hegde, S. S., Magnet, S., Roderick, S. L. and Blanchard, J. S. (2005). "Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases." Archives of Biochemistry and Biophysics 433(1): 212-226.
- Veuillez, F., Deshusses, J. and Buri, P. (1999). "Synthesis and characterization of an acylated di-peptide (Myr-Trp-Leu) with modified transmucosal transport properties." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 48(1): 21-26.
- Virsu, P., Liljeblad, A., Kanerva, A. and Kanerva, L. T. (2001). "Preparation of the enantiomers of 1-phenylethan-1,2-diol. Regio- and enantioselectivity of acylase I and *Candida antarctica* lipases A and B." Tetrahedron: Asymmetry 12(17): 2447-2455.
- W. Chulalaksananukul, J. S. C., P. Delorme and R.M. Willemot (1990). "Kinetic study of esterification by immobilized lipase in vt-hexane." FEBS Letters 276(number 1,2.): 181-184.
- Wandrey, C., Liese, A. and Kihumbu, D. (2000). "Industrial biocatalysis: Past, present, and future." Organic Process Research and Development 4(4): 286-290.
- Wehtje, E. and Adlercreutz, P. (1997a). "Lipases have similar water activity profiles in different reactions." Biotechnology Letters 19(6): 537-540.
- Wehtje, E. and Adlercreutz, P. (1997b). "Water activity and substrate concentration effects on lipase activity." Biotechnology and Bioengineering 55(5): 798-806.
- Xiao, Y.-m., Wu, Q., Cai, Y. and Lin, X.-f. (2005). "Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents." Carbohydrate Research 340(13): 2097-2103.
- Xiong, J., Wu, J., Xu, G. and Yang, L. (2008) "Kinetic study of lipase catalyzed asymmetric transesterification of mandelonitrile in solvent-free system." Chemical Engineering Journal In Press, Corrected Proof.
- Yadav, G. D. and Devi, K. M. (2002). "Enzymatic synthesis of perlauric acid using Novozym 435." Biochemical Engineering Journal 10(2): 93-101.
- Yadav, G. D. and Devi, K. M. (2004). "Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: Comparison and kinetic modeling." Chemical Engineering Science 59(2): 373-383.
- Yadav, G. D. and Trivedi, A. H. (2003). "Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media." Enzyme and Microbial Technology 32(7): 783-789.

- Yahya, A. R. M., Anderson, W. A. and Moo-Young, M. (1998). "Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions." Enzyme and Microbial Technology 23(7-8): 438-450.
- Yang, Z. and Pan, W. (2005). "Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis." Enzyme and Microbial Technology 37(1): 19-28.
- Yasmin, T., Jiang, T. and Han, B. (2007). "Novozym 435 catalyzed regioselective acylation of ethane-1,2-diol in the presence of ionic liquids." Catalysis Letters 116(1-2): 46-49.
- Yasmin, T., Jiang, T., Han, B., Zhang, J. and Ma, X. (2006). "Transesterification reaction catalysed by Novozym 435 in supercritical carbon dioxide." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 41(1-2): 27-31.
- Yelamos, B., Roncal, F., Albar, J. P., Rodriguez-Crespo, I. and Gavilanes, F. (2006). "Influence of acylation of a peptide corresponding to the amino-terminal region of endothelial nitric oxide synthase on the interaction with model membranes." Biochemistry 45(4): 1263-1270.
- Youshko, M. I., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A. (2001). "Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by aminoacylase I." Tetrahedron Asymmetry 12(23): 3267-3271.
- Zaks, A. (1996). "New enzymatic properties in organic media." In enzymatic reactions in organic media: 70-93.
- Zaks, A. and Klibanov, A. M. (1985). "Enzyme-catalyzed processes in organic solvents." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82(10): 3192-3196.
- Zaks, A. and Klibanov, A. M. (1988). "The effect of water on enzyme action in organic media." Journal of Biological Chemistry 263(17): 8017-8021.
- Zhang, D.-H., Bai, S., Ren, M.-Y. and Sun, Y. "Optimization of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (+/-)-menthol in ionic liquid." Food Chemistry In Press, Corrected Proof: 109.
- Zhang, D.-H., Bai, S., Ren, M.-Y. and Sun, Y. (2008). "Optimization of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (\pm)-menthol in ionic liquid." Food Chemistry 109(1): 72-80.
- Zhang, X., Adachi, S., Watanabe, Y. and Matsuno, R. (2005). "Lipase-catalyzed synthesis of O-lauroyl L-serinamide and O-lauroyl L-threoninamide." Food Research International 38(3): 297-300.
- Zweytick, D., Pabst, G., Abuja, P. M., Jilek, A., Blondelle, S. E., Andra, J., Jerala, R., Monreal, D., Martinez de Tejada, G. and Lohner, K. (2006). "Influence of N-acylation of a peptide derived from human lactoferricin on membrane selectivity." Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1758(9): 1426-1435.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Eric DUBREUCQ, Professeur, Montpellier SupAgro, INRA, Montpellier
Monsieur Didier COMBES, Professeur, INSA, Toulouse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur HUSSON Eric

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique"

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDOEUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 23 octobre 2008

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT



Titre : Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique.

Résumé : Ce travail a consisté à étudier la N et/ou O acylation enzymatique d'alcool aminés et de dipeptides.

Une étude préliminaire consacrée à l'acylation enzymatique d'une molécule modèle, le 6-amino-1-hexanol a démontré la capacité de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée à catalyser l'acylation de ce substrat dans différents milieux réactionnels. La mise en œuvre de cette réaction en solvants organiques (hexane, 2-méthyl-2-butanol) a conduit à la formation du produit diacylé avec un rendement de 85 % montrant l'absence de chimio-sélectivité de la réaction. L'utilisation de système sans solvant à base d'acide gras libre et de CO₂ supercritique a permis d'orienter la chimio-sélectivité de la réaction en faveur de la O-acylation. Les liquides ioniques à cation de type imidazolium et à anions faiblement nucléophiles ont conduit à un taux de conversion de l'alcool aminé de l'ordre de 99 % tout en conservant l'absence de chimio-sélectivité observée en solvant organique.

L'étude s'est ensuite focalisée sur l'acylation de dipeptides modèles tels que la Lys-Ser,HCl et la Ser-Leu. L'étude de l'acylation catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée de la Lys-Ser,HCl a montré une sélectivité exclusive en faveur de l'acylation de la fonction amine en position ε, indépendamment du milieu réactionnel. La O-acylation de la Ser-Leu a permis de mettre en évidence l'influence du groupe carboxylique Cterminal électro-attracteur de Lys-Ser sur la réactivité de la fonction hydroxyle de la sérine.

Enfin, la N-acylation enzymatique d'un dipeptide naturel bioactif, la carnosine a été réalisée d'une part en solvant organique, catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée et d'autre part, en milieu aqueux biphasique catalysée par l'acyl-transférase de *Candida parapsilosis*. L'acylation de la carnosine, conduisant à la synthèse de N-oléyl carnosine, n'affecte pas son activité inhibitrice de la xanthine oxydase et semble améliorer son activité anti-radicalaire vis-à-vis de l'anion superoxyde.

Mots clés : N et/ou O-acylation, dipeptides, lipase CAL B, acyl-transférase, solvant organique, système sans solvant, liquide ionique, CO₂ supercritique, sélectivité.

Title: Synthesis of functional derivative of short peptides by enzymatic way.

Abstract: The present work consisted in studying the N and/or O-enzymatic acylation of amino alcohols and dipeptides.

A preliminary study was firstly undertaken about the enzymatic acylation of a bifunctional model molecule, 6-amino-1-hexanol and demonstrated the ability of the lipase B of *Candida antarctica* to catalyze the acylation of this substrate in different reaction media. The reaction performed in organic solvents (hexane, 2-methyl-2-butanol) allowed to the synthesis of the diacylated product with a substrate conversion yield of 85 %, showing the absence of chimio-selectivity of the reaction. The use of a solvent-free system constituted of free fatty acid and the use of supercritical carbon dioxide permitted to orientate the selectivity of the reaction in favour of the O-acylation. Ionic liquids with imidazolium cation and few nucleophilic anions led to a substrate conversion of 99 % and to maintain the absence of chemo-selectivity observed in organic solvents.

Then, the study focused on the acylation of model dipeptides like Lys-Ser, HCl and Ser-Leu. Results relative to the acylation of Lys-Ser, HCl catalyzed by the lipase B of *Candida antarctica* immobilized showed a selectivity in favour of the acylation of the ε-amino function independently of the reaction medium. The Ser-Leu O-acylation permitted to demonstrate the influence of the molecular environment (electro-attractor C terminal carboxylic group) on the reactivity of the serine hydroxyl function.

Finally, the enzymatic acylation of a bioactive dipeptide was catalyzed by the lipase B of *Candida antarctica* immobilized in organic solvent and by the acyl-transferase of *Candida parapsilosis* in lipid-aqueous biphasic medium. The acylation of carnosine allowed the N-oleyl carnosine synthesis. The acylation of carnosine did not affect its xanthine oxydase inhibition activity and seemed to improve its superoxyde anion scavenging property.

Keywords: N and/or O-acylation, dipeptides, lipase CAL B, acyl-transferase, organic solvent, solvent-free system, ionic liquid, supercritical carbon dioxide, selectivity.