

## Synthèse enzymatique d'esters de fructose

Enzymatic synthesis of fructose esters

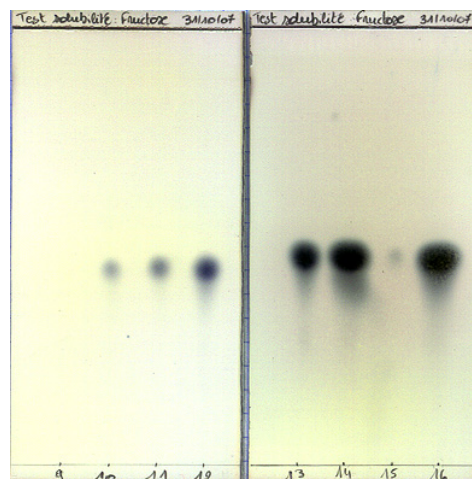
### Supporting Information

Gilles Olive\*, University of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux, Belgium, Tel: 00 32 81.62.25.64, Fax: 00 32 81.60.17.67. ; Ecole Industrielle et Commerciale de la Ville de Namur (EICVN), Rue Pépin 2B, B-5000 Namur, Belgium, Fax: 00 32 81.25.74.09. Email: gilles.olive@eicvn.be

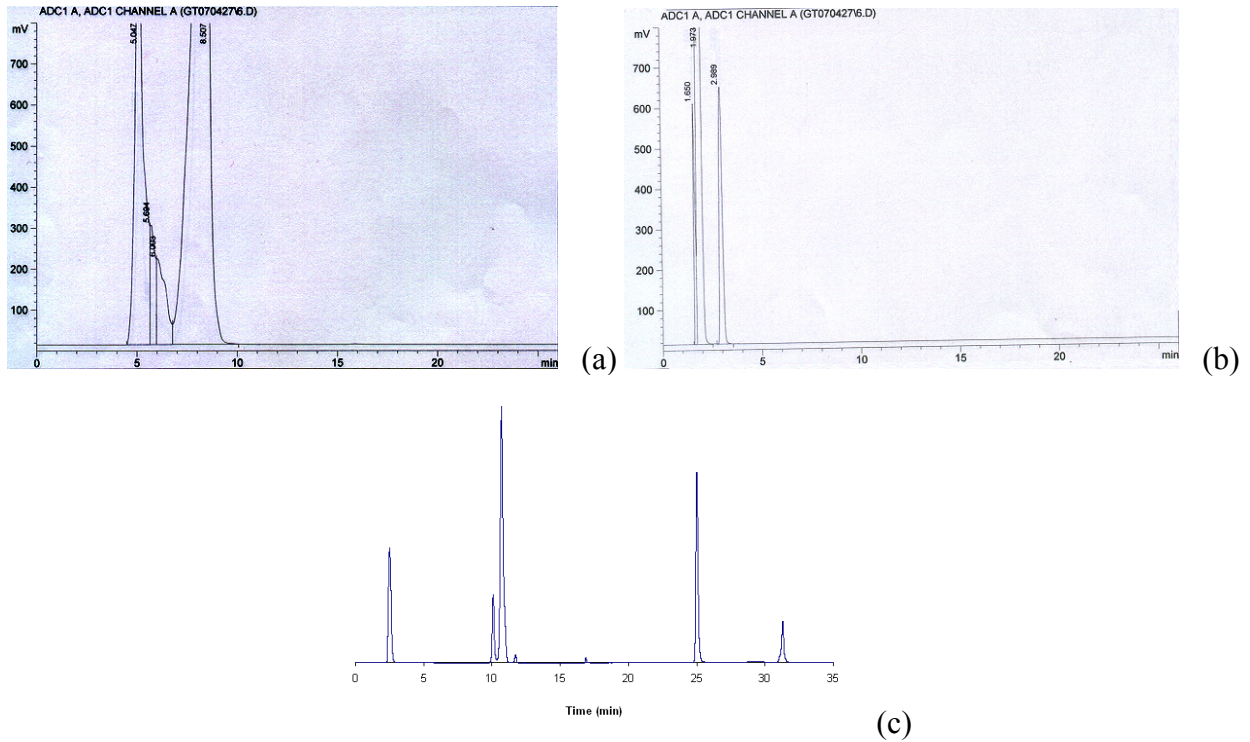
Gabriela A. Pompeu Torezan, University of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux, Belgium, Tel: 00 32 81.62.25.64, Fax: 00 32 81.60.17.67.

Christophe Blecker, University of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux, Belgium, Fax: 00 32 81.60.17.67. Email: christophe.blecker@ulg.ac.be

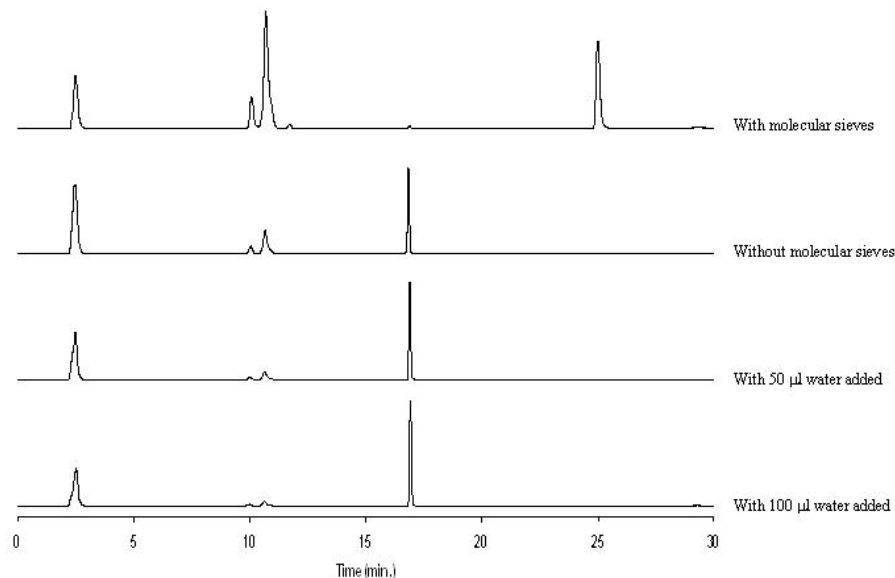
### 1. RÉSULTATS SUR LE FRUCTOSE



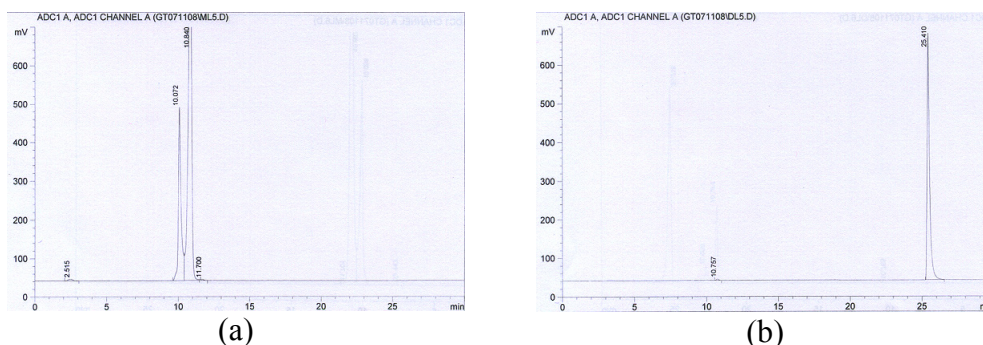
**Figure S 1** CCM test de solubilité du fructose. 9 : *n*-hexane ; 10 : acétone ; 11 : acétonitrile ; 12 : *t*-butanol ; 13 : 2-méthyl-2-butanol ; 14 : pyridine ; 15 : acétate d'éthyle ; 16 : eau.



**Figure S 2** Chromatogrammes HPLC de la réaction enzymatique entre le fructose et l'acide laurique. Mise au point de l'éluent. (a) acétonitrile/méthanol/eau (35/60/5, v/v/v) (5,0 mn fructose ; 5,9 et 6,0 mn polyesters de fructose ; 8,5 mn monoester de fructose), (b) acétonitrile/eau (65/35, v/v) (1,7 mn fructose ; 1,9 mn monoester de fructose; 2,9 mn polyesters de fructose), (c) gradient acétonitrile/eau (voir texte) (2,4 mn fructose ; 10,1 and 10,8 mn monoesters de fructose ; 16,8 mn acide laurique ; 24,5 mn polyesters de fructose).



**Figure S 3** Chrommatogramme HPLC de 4 mélanges réactionnels sélectionnés après 48 h et ajout de différentes quantités d'eau. Conditions: voir texte. Les temps de rétentions sont les suivants: 2,4 mn fructose ; 10,1 and 10,8 mn monoesters de fructose ; 16,8 mn acide laurique ; 24,5 mn polyesters de fructose.



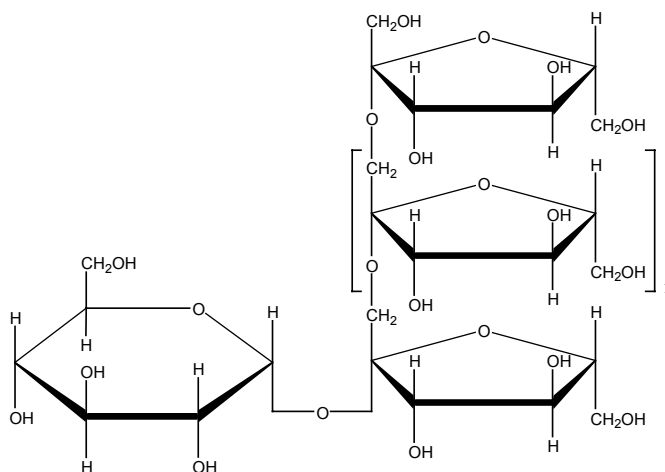
**Figure S 4** Contrôle de la pureté des esters de laurate de fructofuranosyle par HPLC-ELSD. (a) monolaurate de fructofuranosyle, (b) dilaurate ou polylaurate de fructofuranosyle (les temps de rétentions sont les suivants: 2,4 mn fructose ; 10,1 and 10,8 mn monoesters de fructose ; 24,5 mn polyesters de fructose).

**Tableau S 1** Solubilité du fructose.

Solvant	Température (°C)	Solubilité (g.l <sup>-1</sup> )	Références
Acétone	40	0,89	[1]
Acétone	60	3,1	[2]
2-méthyl-2-butanol	60	11	[3]
2-méthyl-2-butanol	30	4,7	[4]
	40	9,2	
	50	12,1	
	60	14,3	
	70	18,7	
	80	22,6	
	90	25,5	
<b>2-méthyl-2-butanol</b>	<b>60</b>	<b>10,0</b>	Cette étude
<i>t</i> -butanol	60	15,6	[2]
<b><i>t</i>-butanol</b>	<b>60</b>	<b>15,9</b>	Cette étude

## 2. RÉSULTATS SUR L'INULINE

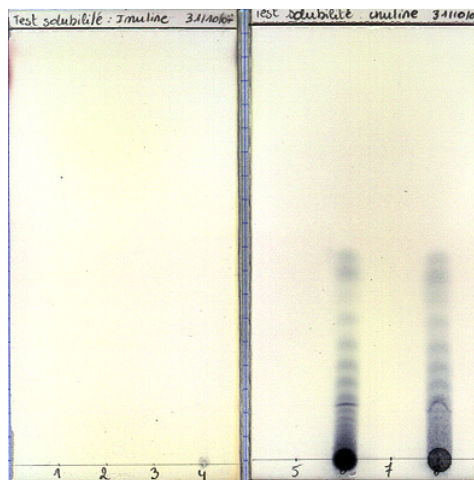
Une démarche comparable à celle du fructose a été adoptée. Deux types d'inuline étaient à notre disposition (fourni par Cosucra du groupe Warcoing), mais pour des raisons de solubilité, nos tests ont porté uniquement sur l'inuline instantanée à courtes chaînes (DP<sub>n</sub> = 10) (Figure S 5) [5].



**Figure S 5** Inuline.

## 2.1. Recherche du solvant adéquat

Il ressort de la Figure S 6 qu'en dehors de l'eau et de la pyridine, l'inuline n'est pas ou peu soluble dans les autres solvants. Rogge *et al.* [5] explique que la solubilité de celle-ci dans les solvants organiques est limitée à la pyridine (Py), le diméthylformamide (DMF) (62,5 g/100 ml à 80 °C selon Stevens *et al.* [6]), le diméthylsulfoxyde (DMSO), la *N*-méthylpyrrolidinone (NMP) et le diméthylacétamide (DMA). La non solubilité de l'inuline a été un frein à la réaction enzymatique.



**Figure S 6** CCM test de solubilité de l'inuline instantanée. 1 : *n*-hexane ; 2 : acétone ; 3 : acétonitrile ; 4 : *t*-butanol ; 5 : 2-méthyl-2-butanol ; 6 : pyridine ; 7 : acétate d'éthyle ; 8 : eau.

## 2.2. Réaction d'estérification enzymatique

En raison de la non solubilité dans les solvants classiques des réactions enzymatiques, tous les essais dans le 2-méthyl-2-butanol se sont soldés par une non réaction. Nous avons obtenu une consommation d'acide gras en dissolvant l'inuline dans la pyridine, l'acide gras dans du *tert*iobutanol et en faisant la réaction enzymatique telle qu'elle est décrite ci-dessous. Cette consommation ne s'est pas accompagnée de production d'esters. En effet, le laurate d'inuline a été synthétisé par voie chimique et nous avons donc pu faire des comparaisons sur CCM.

Nous avons alors essayé d'adapter différents protocoles de la littérature. En effet, Pedersen *et al.*, en 2002, proposaient la transestérification du saccharose par une métalloprotéase dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) [7]. Grâce à Rogge et Stevens, nous savons que l'inuline est soluble dans le DMSO [5; 6]. La transestérification du vinyle de laurate dans le DMSO par *Thermolysin Bacillus Thermoproteolyticus* (Calbiochem (Merck biosciences)) a été donc essayée. En dehors de l'apparition d'acide laurique, due à une hydrolyse, nous n'avons pas eu de réaction. De plus nous nous sommes rendu compte que le DMSO est un solvant difficile à éliminer (en effet point d'ébullition à 191 °C).

La dernière tentative a été un essai d'adaptation du protocole de Ferreira qui polytransestérifiait de l'inuline par de l'adipate de divinyle dans le diméthylformamide (DMF) [8] en essayant de transposer au vinyle de laurate. Comme lui un screening de différentes enzymes a été effectué. Les six enzymes étaient Novozym 435\* (Novo Industri), Thermolysine 2500 kU (Calbiochem (Merck biosciences)), Flavourzym 500 MG\* (Novozymes), Lipase L3126 (Sigma-Aldrich), Lipopan FBG\* (Novozymes) et Protéase P3910\* (Sigma-Aldrich). Les enzymes marquées d'une astérisque ont été aussi activées selon la méthode de Klibanov [9] qui consiste à mettre l'enzyme dans un tampon phosphate à pH 7,4 suivi d'une lyophilisation. Malheureusement, dans aucun cas il n'y eut consommation de laurate de vinyle.

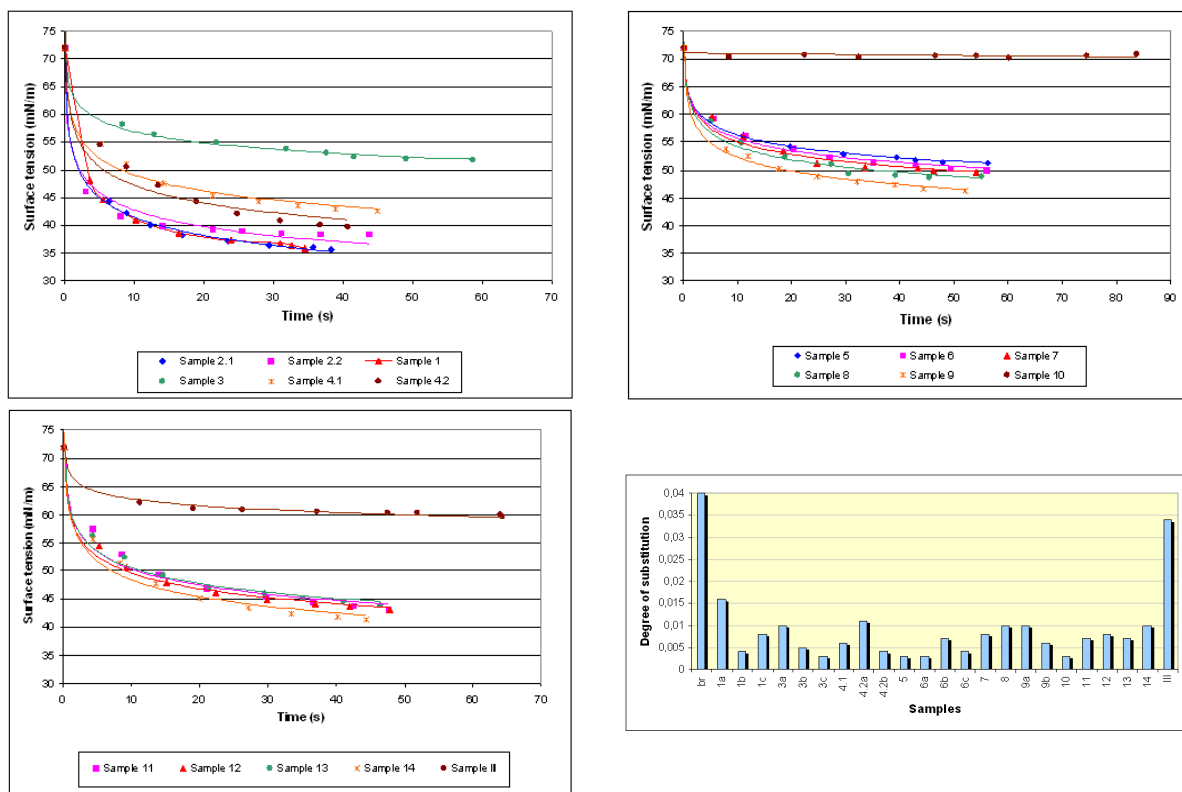
### 2.3. Réaction d'estérification chimique

La seule façon d'avoir des esters de l'inuline fut la synthèse chimique selon la méthode de Ius [10]: elle consiste à faire réagir l'inuline avec de l'anhydride laurique dans de la pyridine. Ces esters ont servi à mettre au point les méthodes analytiques et la prédétermination des propriétés interfaciales.

### 2.4. Résultats sur les propriétés interfaciales

Grâce à la synthèse chimique, il a été possible de disposer de produits de référence. Dans la littérature, hormis le brevet de Ehrhardt [11], aucune information technofonctionnelle n'a été trouvée. Il a donc été entrepris la détermination de tension de surface. En variant les conditions de synthèse et de purification, des produits avec différents degrés de substitution (estérification) ont été obtenus. Les mesures de tension de surface dynamique ont été mesurées avec une concentration de 0,1 % en esters.

Les esters les plus actifs (parlant d'abaissement de la tension superficielle) sont ceux qui ont le degré de substitution le plus bas (inférieur à 0,010). A la concentration testée, ils sont capables de réduire la tension de surface de l'eau en dessous de 40 mN.m<sup>-1</sup> (l'eau pure a une tension de surface de 72 mN.m<sup>-1</sup>). Pour comparaison, l'ester ayant le plus haut degré de substitution conduit à un équilibre de tension de surface d'environ 60 mN.m<sup>-1</sup>. Les résultats sont présentés à la Figure S 7.



**Figure S 7** Fichiers bruts du TVT (tension de surface en fonction du temps) de laurate d'inuline avec différents degrés de substitution.

### 3. RÉFÉRENCES

- [1] J. A. Arcos, M. Bernabé, C. Otero, *Enzyme Microbial Technol.* 22 (1998) 27-35.
- [2] I. S. Yoo, S. J. Park, H. H. Yoon, *J. Ind. Eng. Chem.* 13 (2007) 1-6.
- [3] F. Chamouleau, D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, *J. Mol. Catal. B - Enzymatic* 11 (2001) 949-954.
- [4] D. Coulon, M. Girardin, J.-M. Engasser, M. Ghoul, *Ind. Crop. Prod.* 6 (1997) 375-381.
- [5] T. M. Rogge, C. V. Stevens, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1799-1803.
- [6] C. V. Stevens, A. Meriggi, M. Peristeropoulou, P. P. Christov, K. Booten, B. Levecke, A. Vandamme, N. Pittevels, T. F. Tadros, *Biomacromolecules* 2 (2001) 1256-1259.
- [7] N. R. Pedersen, P. J. Halling, L. H. Pedersen, R. Wimmer, R. Matthiesen, O. R. Veltman, *FEBS Lett.* 519 (2002) 181-184.
- [8] L. Ferreira, M. H. Gil, R. Carvalho, C. F. G. C. Geraldes, D.-Y. Kim, J. S. Dordick, *Chemistry of Materials* 14 (2002) 4009-4011.
- [9] A. M. Klivanov, *Chemtech* 16 (1986) 354-359.
- [10] E. Ius, *Studio sulla sintesi di un estere laurico dell'inulina a fini alimentari*, Università Degli Studi Di Udine, Udine, Tesi di Laurea, 2003.
- [11] S. Ehrhardt, A. Haji Begli, M. Kunz, L. Scheiwe, *Aliphatic Carboxylate esters of inulin*, Sudzucker Aktiengesellschaft Mannheim/Ochsenfurt, United States, 1999, Patent N° 5,877,144.