

**La pronase immobilisée sur poly(N-acryloylpipéridin-4-one) :
un catalyseur d'hydrolyse L-énantiospécifique des α -aminonitriles**

Jacques Taillades*, Laurence Garrel, Franck Guillen, Hélène Collet, Auguste Commeyras

*Hétérochimie et Aminoacides, URA 1097 CNRS,
Université des Sciences et Techniques du Languedoc, place E-Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France*

(reçu le 14 juin 1994, accepté le 5 décembre 1994)

Summary – Pronase immobilized on poly(*N*-acryloylpiperidin-4-one) : a L-enantiospecific hydrolysis of α -aminonitriles with immobilized amidase. α -Aminonitriles are not substrates for *pronase* (an amidase) in the homogeneous phase but become substrates for pronase when it is immobilized on polymer matrix with ketonic sites (piperidin-4-one). In this paper we show that under low basic aqueous conditions (pH 10-11), the hydration of α -aminonitriles can be efficiently catalyzed by poly(*N*-acryloylpiperidin-4-one) crosslinked with 1,4-bis acryloylpiperazine (A(80:20) in the presence of phosphate or borate buffers. These conditions comply with the hydrolysis of α -aminoamides by *pronase* immobilized on poly(*N*-acryloylpiperidin-4-one) crosslinked with 1,4-bis(acryloyl)piperazine (A(80:20/p). Thus, in a buffered borate solution at pH 10.5, α (DL)-aminonitrile is enantiospecifically hydrolyzed into α (D)-aminoamide and α (L)-amino acid.

α -aminonitriles / α amino acids / L-enantiospecific hydrolysis / polymer-supported catalysis / nitrilase activity

Introduction

Dans la synthèse d' α -aminoacides optiquement actifs, les procédés de synthèse alliant chimie organique et biotechnologie, dans lesquels le ou les précurseurs de l'acide α -aminé sont fournis à un micro-organisme, sont généralement très performants. Dans ce cadre, la capacité de certains micro-organismes à utiliser des mélanges racémiques d' α -aminonitriles obtenus par voie chimique [1] à partir des aldéhydes correspondants est une voie potentiellement très intéressante de synthèse stéréospécifique d' α -aminoacides. Parmi les nombreuses souches bactériennes présentant une activité nitrilase, *Brevibacterium R 312* permet [2], par exemple, de transformer un DL α -aminonitrile en un mélange de 50% d' α (L)-aminoacide et de 50% d' α (D)-aminoamide. Mais ce résultat ne peut pas être généralisé puisque d'autres souches bactériennes sont connues pour conduire par hydrolyse de l' α -aminonitrile à l' α -aminoacide racémique ou même à la formation de 87% de L-alanine dans l'hydrolyse du DL α -aminopropiononitrile en présence de cellules immobilisées de *Acinetobacter* [3]. Il semble donc que ces micro-organismes possèdent, du moins dans l'hydrolyse de nitriles aliphatiques, deux systèmes enzymatiques permettant respectivement l'hydratation du nitrile (nitrile hydratase) et l'hydrolyse de l'amide (amidase) qui ont d'ailleurs pu être extraits et purifiés dans certains cas [4].

L'accès relativement difficile aux enzymes à activité nitrilasique et surtout généralement leur absence d'épantiosélectivité, nous ont conduit à envisager, dans

la transformation d'un aldéhyde (RCHO) en acide α -aminé (RCH(CO₂H)NH₂), l'élaboration d'un catalyseur présentant deux entités chimique et enzymatique immobilisées (schéma 1) sur support polymère qui, en ayant globalement une activité nitrilasique, permettraient de réaliser l'hydrolyse énantiosélective d' α -aminonitriles.

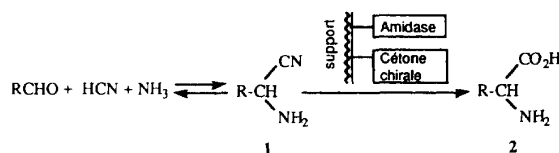


Schéma 1

L'entité chimique co-immobilisée qui, en fait, jouerait par rapport à l'enzyme, le rôle de groupement prosthétique, devrait permettre l'hydratation L-énantiosélective de l' α -aminonitrile **1** en équilibre de racémisation via l'aldéhyde précurseur. Nous avons effectivement montré dans un travail précédent que des cétones chirales dérivées de la *R*-carvone pouvaient, en phase homogène [5] ou supportées [6] sur résine acrylique (schéma 2), catalyser de façon énantiospécifique l'hydratation des α -aminonitriles.

Par exemple, le rapport des deux constantes de vitesse d'hydratation k_D/k_L des α -aminobenzylacétonitriles énantiomères (α -aminobenzénepropanenitriles) catalysée par la résine chirale **4** (schéma 3) est de

* Correspondance et tirés à part

0,5, conduisant à 50% d'avancement réactionnel, à un excès énantiomérique de 25% de phénylalaninamide L **3a** (schéma 2).

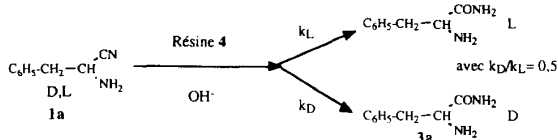


Schéma 2

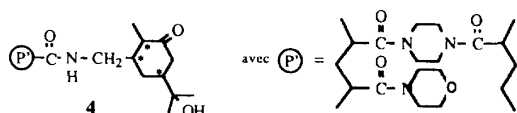


Schéma 3

Parmi les nombreuses préparations enzymatiques à activité amidasique capables de catalyser l'hydrolyse L-énantiospécifique de l'α-aminoamide formé, nous avons retenu la *pronase*. Elle présente une bonne activité pour un large éventail de substrats. Dans un travail préalable, nous avons décrit son immobilisation sur une résine poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one), A(80/20)* [7]. Cette préparation, outre les avantages pratiques bien connus liés à l'immobilisation de l'enzyme, présente dans l'hydrolyse du phénylalaninamide une activité comparable à celle de l'enzyme en phase homogène, avec une remarquable stabilité dans le temps.

Tout en poursuivant par ailleurs les recherches menées sur l'hydratation énantiospécifique d'α-aminonitriles par voie chimique, nous nous sommes attachés dans le travail présenté ici, à définir des conditions biocompatibles d'hydratation du substrat (α-aminonitrile) autorisant le fonctionnement concomitant de la *pronase* dans l'hydrolyse de l'α-aminoamide formé (schéma 4).

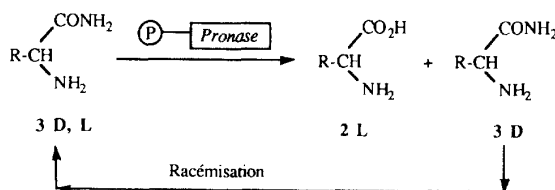


Schéma 4

C'est effectivement à ce niveau que se situe la principale difficulté de cette démarche puisque, bien que la *pronase* possède dans son système enzymatique au moins une amidase alcaline, elle présente dès pH 11 une baisse d'activité appréciable accompagnée d'ailleurs

d'une perte non négligeable d'énantiosélectivité [8]. D'autre part, sur la base des travaux réalisés dans notre groupe de recherche, l'hydratation des α-aminonitriles, catalysée par les composés cétoniques en solution [9] ou supportés [10] sur polymère insoluble nécessite une concentration appréciable en ions hydroxyde dans le milieu. Il nous a donc paru intéressant de tirer partie des potentialités de la catalyse supportée en dégageant des conditions d'hydratation d'α-aminonitriles à température ambiante, en milieu modérément basique, à des pH de l'ordre de 10,5-11.

Résultats et discussion

Avant d'exposer les résultats que nous avons obtenus dans l'hydrolyse de l'α-aminobenzylacétonitrile en milieu faiblement basique, catalysée par la résine A(80/20/p) résultant de l'immobilisation de la *pronase* (8 mg/g de résine), nous rappelons les travaux réalisés au laboratoire [11] sur le comportement de cette préparation enzymatique dans l'hydrolyse d'α-aminoamides et plus particulièrement du phénylalaninamide **3a** (schéma 5).

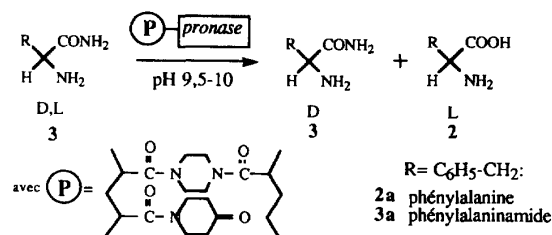
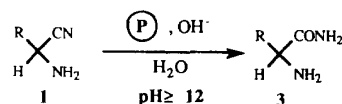


Schéma 5

Contrairement à la *pronase* en phase homogène qui présente deux maxima d'activité en milieux neutre et faiblement basique, l'activité de la *pronase* immobilisée présente un seul maximum aux alentours de pH 9,5-10 et décroît de façon importante au delà de pH 10,5 (fig 1). En effet, au dessus de pH 10,5-11, l'activité de la *pronase* immobilisée est relativement faible en milieu non tamponné et en absence de cofacteurs métalliques, surtout si l'hydrolyse chimique compétitive de l'α-aminoamide est prise en compte.

Comme nous l'avons déjà souligné dans l'introduction, le support d'immobilisation de la *pronase* a été utilisé comme catalyseur d'hydratation des α-aminonitriles dans d'autres conditions nettement plus basiques (schéma 6).



R = CH₃: **1b** α-aminopropionitrile
R = C₆H₅-CH₂: **1a** α-aminobenzylacétonitrile

Schéma 6

* Cette résine poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one) réticulée à 20% par de la 1,4-bisacryloylpipérazine et présentant 80% de motifs pipéridin-4-one sera symbolisée A(80/20). Le symbole A(80/20)_{NaOH} caractérisera la résine conditionnée dans une solution aqueuse de soude. Après immobilisation de la *pronase* par piégeage dans le réseau macromoléculaire, cette résine sera symbolisée A(80/20/p).

Une étude cinétique menée plus précisément sur l'hydratation de l'α-aminopropionitrile **1b**, catalysée par la

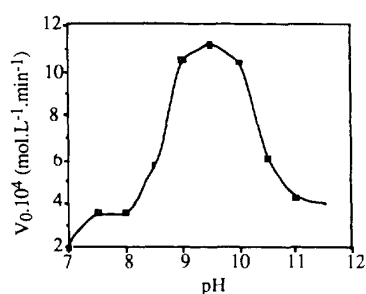


Fig 1. Evolution de la vitesse initiale d'hydrolyse du L-phénylalaninamide **3a** catalysée par la pronase immobilisée (A(80/20/p)) en fonction du pH, $t = 37^\circ\text{C}$, V (volume réactionnel) = 8 mL, [A(80/20/p)] (concentration en résine essorée) = 100 mg/mL, [amD.L] (concentration initiale en amide D,L) = 10 mg/mL.

résine A(80/20), a pu montrer que les lois de vitesse et le mécanisme de la catalyse supportée étaient, du moins pour ce substrat, comparables à ceux du processus catalytique en phase homogène, sans intervention notable de limitations cinétiques d'origine diffusionnelle [11].

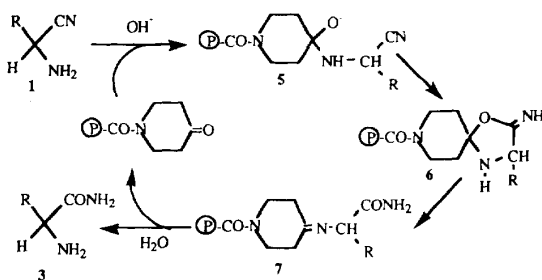


Schéma 7

Ce processus catalytique (schéma 7), constitué de nombreuses étapes élémentaires, peut être simplifié cinétiquement en deux réactions consécutives : la formation de l'intermédiaire imine de l'α-aminoamide **7** et l'apparition de l'α-aminoamide **3** en solution. Dans le premier stade de ce processus, l'étape limitante est la cyclisation de l'α-aminoalcoolate **5** formé dans un prééquilibre rapide et défavorisé, qui se traduit expérimentalement par une vitesse du premier ordre par rapport, à la concentration initiale en α-aminonitrile [nit], à la masse de résine par unité de volume réactionnel (c'est-à-dire en fait, à la concentration en cétone immobilisée [CO]) et par rapport à la concentration en ions hydroxyde [OH⁻] :

$$-d[\text{nit}]/dt = k_1[\text{nit}][\text{CO}][\text{OH}^-]$$

Les études cinétiques menées sur la résine A(80/20) préalablement conditionnée en milieu basique (A(80/20)_{NaOH}), dans une gamme de concentrations en soude allant jusqu'à 1 N (fig 2), ont montré que la vitesse initiale de disparition de l'α-aminonitrile, p_{10} varie de façon quasi linéaire seulement pour des concentrations en soude comprises entre 0,015 et 0,05 N, traduisant effectivement, dans ces conditions, une loi de

vitesse d'ordre 1 par rapport à la concentration en ions hydroxyde.

Au delà d'une concentration en soude de 0,05 N, la loi de vitesse présente un ordre inférieur à 1. L'aplatissement de la courbe $p_{10} = f([\text{OH}^-])$ qui est d'autant plus significatif que la concentration en ions hydroxyde est importante, a été interprété [11] par l'ionisation, à ces pH très basiques, des espèces immobilisées sur le support, comme l'hydrate du composé carbonylé ou l'α-aminoalcoolate intermédiaire de l'hydratation de l'α-aminonitrile. Dans la zone de pH qui nous intéresse (pH 10,5-11,5), la résine A(80/20)_{NaOH} présente une activité très faible qui n'augmente que très peu avec le pH. Il est clair que dans ces conditions, la vitesse initiale de disparition de l'α-aminonitrile est tellement faible que la décomposition compétitive de l'α-aminonitrile ("rétro Strecker") devient non négligeable.

Dans les différents travaux menés au laboratoire, la cyclisation directe de l'α-carbinolamine nitrile **8** par catalyse basique générale (schéma 8) qui pourrait se produire à des pH faiblement basiques n'a jamais été observée.

De même, l'utilisation de catalyseurs acido-basiques bifonctionnels comportant à la fois une fonction basique et acide (phosphate, borate, par exemple) n'a pas permis de mettre en évidence un processus catalytique concerté d'arrachement du proton de l'alcool et de protonation du nitrile à l'état de transition. Il est donc clair que le passage à l'α-aminoalcoolate **5**, thermodynamiquement défavorisé, est nécessaire pour permettre l'attaque intramoléculaire de la fonction nitrile.

Ainsi, par exemple, dans l'hydratation de l'α-amino-benzylacétonitrile **1a** catalysée par des cétones d'activités très différentes comme l'acétone ou la 1-acétylpipéridin-4-one, l'apparition de l'α-aminoamide n'est pas accélérée dans une solution de tampon phosphate 0,1 M de pH régulé à 11, mais se trouve même ralentie quel que soit le catalyseur cétonique (fig 3).

L'absence de catalyse basique générale par les tampons phosphate est donc accompagnée, de façon assez surprenante, par une certaine inhibition, à force ionique contrôlée, de l'activité de la cétone dans l'hydratation des α-aminonitriles. Il faut cependant souligner que l'essai réalisé en présence d'acétone peut ne pas être totalement significatif étant donné la lenteur de la vitesse d'hydratation observée; la faible quantité d'α-aminoamide formé peut résulter d'une catalyse par les produits de décomposition de l'α-aminonitrile, en particulier le benzène acétaldéhyde.

En revanche, l'influence des tampons phosphate sur l'hydratation des α-aminonitriles est totalement différente en présence d'un catalyseur cétonique supporté. En effet, lorsque l'hydratation de l'α-aminobenzylacétonitrile **1a**, catalysée par la résine (A(80/20)), est menée en présence de tampons phosphate de concentrations variables (de 0 à 0,4 M) à un pH régulé à 11, la vitesse initiale de disparition de l'α-aminonitrile, p_{10} augmente avec la concentration en phosphate total (fig 4). Cette vitesse atteint un palier vers une concentration en phosphate de 0,2 M, à un niveau environ quatre fois plus élevé qu'en solution non

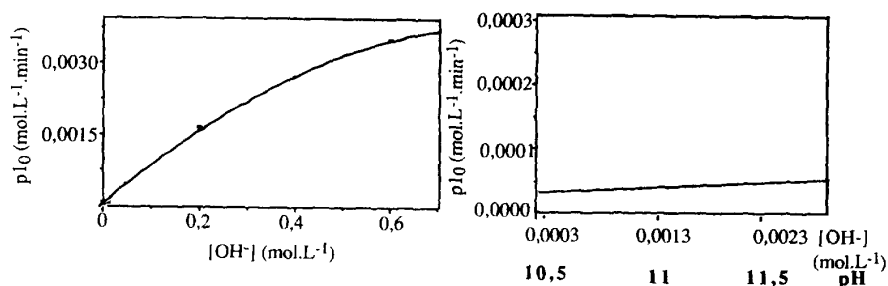


Fig 2. Evolution des vitesses initiales p_{10} de disparition de l' α -aminonitrile avec la concentration en ions hydroxyde, lors de l'hydratation de l' α -aminobenzylacétonitrile **1a**, à 25°C, catalysée par la résine A(80/20) $_{NaOH}$ préalablement conditionnée en milieu basique concentré. Conditions : $m_{rés} = 100$ mg, $[nit]_0 = 0,048$ mol L^{-1} , $V = 8,5$ mL.

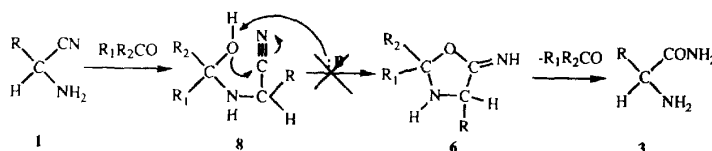


Schéma 8

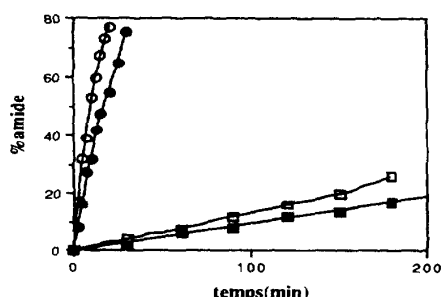


Fig 3. Hydratation, à 25°C et à pH 11, de l' α -aminobenzylacétonitrile **1a** catalysée par l'acétone (0,16 mol L^{-1}) en présence (■) et en l'absence (□) de tampon phosphate 0,1 M et catalysée par la 1-acétylpipéridin-4-one (0,16 mol L^{-1}) en présence (●) et en l'absence (○) de tampon phosphate 0,1 M.

tamponnée au même pH. Ce résultat est moins significatif en présence d'une résine B(15/5) faiblement réticulée (5% de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine), dans laquelle les motifs pipéridin-4-one (15%) sont dilués par des motifs morpholine (80%), alors que cette résine B(15/5) présente [6] en milieu nettement plus basique (0,001 M $< [NaOH] < 0,1$ M) une activité catalytique comparable à celle de la résine A(80/20) dans les mêmes conditions (fig 4).

Sur la base des travaux réalisés en phase homogène, cet effet catalytique des tampons phosphate dans la catalyse d'hydratation des α -aminonitriles en présence de cétones supportées ne semble pas être lié à une éventuelle catalyse générale de la première étape de la réaction d'hydratation, c'est-à-dire la formation de l'imine de l' α -aminoamide **7**. De plus, l'analyse en RMN ^{13}C du solide de la résine A(80/20), préalable-

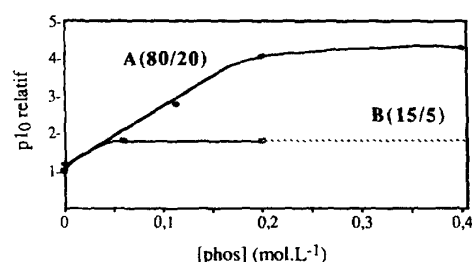


Fig 4. Influence de la concentration en phosphate sur les vitesses initiales (p_{10}) de disparition de l' α -aminonitrile **1a** en présence de résine A(80/20) (○) et B(15/5) (□). Conditions expérimentales : Volume réactionnel = 8,5 mL, $m_{rés} = 250$ mg, $[phosp] = 0; 0,1; 0,2$ et $0,4$ mol L^{-1} , pH 11, $t = 25^\circ C$.

ment traitée par une solution de phosphate 0,1 M à pH 11, ne laisse pas apparaître de modifications particulières de la structure du catalyseur si ce n'est, de façon très analogue à la résine traitée par de la soude 0,1 N, l'apparition d'un signal à 80 ppm caractéristique du cétole (schéma 9).

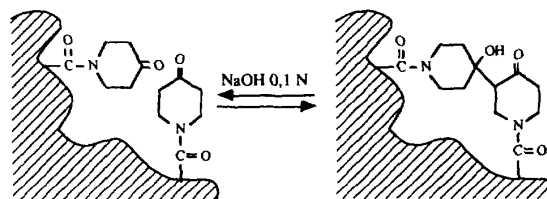


Schéma 9

Nous rappelons que le traitement de la résine par une solution aqueuse de soude 0,1 N se traduit, malgré le fort taux de réticulant utilisé, par une baisse limitée de sa capacité en groupements cétoniques (de 4 méquiv/g à 2,75 méquiv/g) attribuée à la formation de cétoles résultant de la condensation de sites pipéridin-4-one adjacents ou voisins [12]. Les motifs cétoniques cétoles (1,25 méquiv/g) sont catalytiquement inactifs dans l'hydratation des nitriles α -aminés non seulement en raison de leur fort encombrement mais surtout à cause de la lenteur de la réaction de décétolisation en milieu basique non tamponné.

En conséquence, nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'effet du phosphate en milieu basique résulte d'une activation du catalyseur cétonique supporté au sein de la résine acrylique qui accélère l'établissement de l'équilibre cétone/cétol. Cet effet, surtout visible lorsque la concentration locale en motifs cétoniques est relativement élevée (résine A(80/20)), permettrait d'atteindre une situation dans laquelle tous les motifs pipéridin-4-one introduits (cétones libres et cétoles) deviennent potentiellement catalytiques dans l'hydratation de l' α -aminonitrile. Cette potentialité catalytique n'apparaît que dans la mesure où le temps de séjour du nitrile dans le microenvironnement du site cétonique est suffisant, soit en raison d'un effet de partage favorable, soit en raison d'une diffusion interne ralentie du substrat. Il faut cependant souligner qu'en phase homogène, dans le cas particulier très étudié [13] de la diacétone alcool par exemple, aucune catalyse basique générale, théoriquement possible, n'a pu être détectée dans la réaction de décétolisation qui nécessite spécifiquement la présence d'ions hydroxyde. En contrepartie, une étude cinétique par RMN ^1H de la décétolisation en phase homogène du cétole **9** de la 1-acétylpipéridin-4-one **10**, molécule modèle du motif cétonique supporté, montre qu'à pH 11, l'équilibre cétone/cétol est atteint plus rapidement en présence de tampons phosphate (schéma 10).

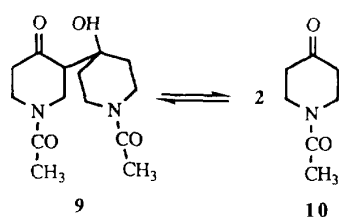


Schéma 10

Ce comportement des cétoles en présence de phosphates devrait pouvoir être généralisé aux résines cétoniques poly(N-acryloylpipéridin-4-one). Nous avons d'ailleurs constaté que dans l'hydratation de l' α -aminobenzylacétonitrile catalysée par A(80/20) en présence de phosphate (0,2 M), à pH constant (pH 11), la vitesse initiale de disparition de l' α -aminonitrile restait directement proportionnelle à la masse de résine, donc à la concentration en motifs cétoniques potentiellement catalytiques. De plus, la vitesse de disparition du nitrile croît beaucoup plus rapidement avec le pH (10-11,5) en

milieu tamponné par les phosphates (0,2 M) qu'en l'absence de phosphate. Ce type de catalyse, observé également en présence de tampons borate, devient inexistant dans les tampons d'espèces basiques monofonctionnelles comme la triéthanolamine par exemple. Il est probable que la spécificité de la nature du tampon acido-basique tient à la concertation nécessaire des réactions d'arrachement du proton alcoolique du cétole et de protonation du carbanion de la cétone (schéma 11).

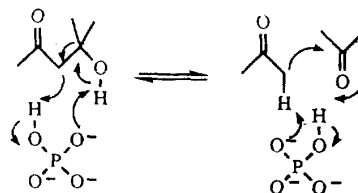


Schéma 11

Dans ces résines, il est possible, étant donné la forte concentration locale en motifs cétoniques, que l'étape lente de la réaction de cétolesation ne soit plus exclusivement l'attaque favorisée du carbanion sur la cétone [13] mais plutôt l'arrachement du proton en α de la cétone et son transfert vers l'alcoolate [14]. Une étude cinétique plus poussée est actuellement en cours au laboratoire. Quoiqu'il en soit, nous venons de montrer qu'en présence de tampon phosphate ou borate ([phosp], [bor] $\geq 0,1$ M), le catalyseur cétonique supporté reste opérationnel à des pH faiblement basiques (de l'ordre de 10-11,5), compatibles avec le domaine d'activité de la pronase immobilisée dans l'hydrolyse de l' α -aminoamide correspondant. De plus, en milieu tamponné, l'énergie d'activation apparente de l'hydratation de l' α -aminonitrile est beaucoup plus élevée (25 kcal/mol) qu'en l'absence de ces tampons (5 kcal/mol), ce qui permet de réaliser l'hydratation à une température de l'ordre de 40°C, sans trop favoriser la réaction compétitive de décomposition de l' α -aminonitrile (20 kcal/mol) [15].

Nous avons alors réalisé l'hydrolyse de l' α -aminobenzylacétonitrile catalysée par A(80/20/p), à 37°C, à pH 10,5 et en présence d'un tampon borate 0,1 M.

Nous devons toutefois signaler ici que, dans ce milieu réactionnel, l'enzyme supportée n'a aucune influence sur les équilibres de cétolesation/décétolisation au sein de la résine puisque la vitesse de disparition de l' α -aminonitrile (à une concentration donnée) observée lors de son hydratation catalysée par la résine A(80/20) est identique à celle observée lors de son hydrolyse catalysée par la résine A(80/20/p).

À de faibles concentrations (inférieures à environ $5 \cdot 10^{-3}$ M, dans les conditions utilisées), l' α -aminonitrile DL conduit à pH 10,5, à un mélange d' α (L)-aminoacide et d' α (D)-aminoamide, qui n'est pas un substrat pour l'enzyme (fig 5).

La vitesse d'hydratation de l' α -aminonitrile contrôle la vitesse globale d'hydrolyse, puisque l' α (L)-aminoamide formé dans la résine en présence de pronase immobilisée, est hydrolysé rapidement, à une vitesse plus élevée que sa diffusion de la résine vers la solution (schéma 12).

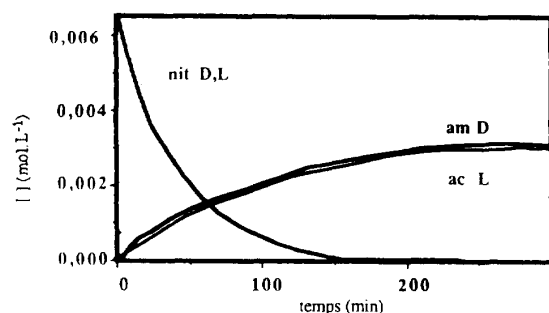


Fig 5. Hydrolyse de l'α-aminobenzylacétonitrile **1a** catalysée par la résine A(80/20/p). $[\text{nit}]_0 = 0,0017$ M, $m_{\text{rés}} = 500$ mg, pH = 10,5, $V = 5$ mL, $t = 37^\circ\text{C}$, $[\text{bor}] = 0,1$ M.

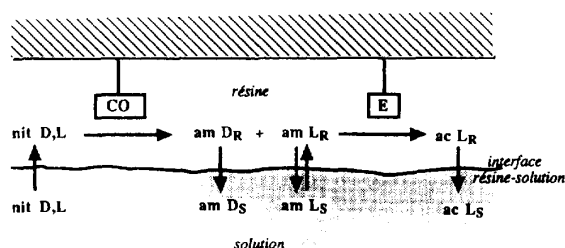


Schéma 12

Tout comme en cinétique enzymatique classique, la vitesse d'apparition de l'α(L)-aminoacide en solution devient pratiquement constante dès que la concentration en α-aminonitrile est suffisante (supérieure à environ $5 \cdot 10^{-3}$ M, dans les conditions utilisées). Cette situation de saturation de l'enzyme par son substrat (α(L)-aminoamide) correspond à un changement d'étape lente qui n'est plus, comme cela a été observé pour de faibles concentrations en α-aminonitrile, l'hydratation de l'α-aminonitrile mais l'apparition de l'α-aminoacide. Dans ces conditions, la concentration de l'α-aminoamide dans la résine devient suffisamment importante pour pouvoir observer sa diffusion dans la solution à une concentration supérieure à celle de l'α-aminoacide, ce qui se traduit par la présence d'α(L)-aminoamide en solution dont nous avons pu évaluer la concentration indépendamment de la quantité d'α(L)-aminoacide formé (fig 6).

Au cours du temps, la concentration en α(L)-aminoamide en solution passe par un maximum. En effet, lorsque la concentration en α-aminonitrile et donc en α-aminoamide chimiquement généré dans la résine devient faible, l'apport d'α(L)-aminoamide dans la résine par diffusion de la solution vers l'enzyme immobilisée conduit finalement, après un temps suffisamment long, à une hydrolyse L-énantiospécifique et quantitative de l'α(L)-aminonitrile.

Si l'α(DL)-aminonitrile se comporte cinétiquement comme un substrat de l'enzyme immobilisée, il faut cependant constater que la vitesse maximale d'hydrolyse de l'α(DL)-aminobenzylacétonitrile (environ

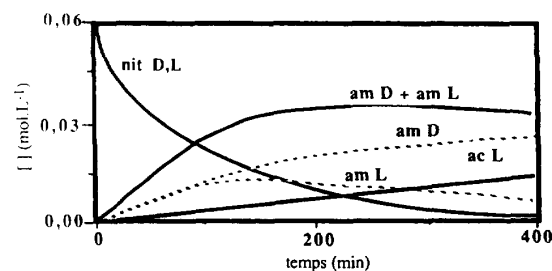


Fig 6. Hydrolyse de l'α-aminobenzylacétonitrile **1a** catalysée par la résine A(80/20/p). $[\text{nit}]_0 = 0,06$ M, $m_{\text{rés}} = 500$ mg, pH = 10,5, $V = 5$ mL, $t = 37^\circ\text{C}$, $[\text{bor}] = 0,1$ M.

$4,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ min⁻¹ pour une concentration d'enzyme immobilisée de 1,2 mg/mL) est vingt fois plus faible en présence du bicatalyseur A(80/20/p) que celle observée en absence de tampons phosphate ou borate dans l'hydrolyse du DL phénylalaninamide (tableau I).

Tableau I. Vitesses maximales d'hydrolyse de différents substrats par la résine A(80/20/p) à 37°C et à pH 10,5.

Substrats	$V_{\text{max}} \cdot 10^4$ (mol L ⁻¹ min ⁻¹)
phénylalaninamide DL	8,4
phénylalaninamide DL tampon borax 0,1 M	2,1
α-aminobenzylacétonitrile tampon borate 0,1 M	0,4-0,5

Nous montrons par ailleurs que cette baisse d'activité ne résulte pas d'une inhibition par les produits de décomposition de l'α-aminonitrile ("rétro Strecker") et qu'elle ne peut pas être attribuée complètement à la formation d'α(D)-aminoamide, inhibiteur compétitif de la *pronase*, dans la résine. En revanche, elle peut être liée à la présence de tampons borate ou phosphate connus en phase homogène [16] pour inhiber l'activité de la *pronase* par leur capacité à chélater les cations métalliques présents dans ses métallo-enzymes.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons élaboré un catalyseur constitué d'une amidase immobilisée sur résine cétonique présentant globalement une activité nitrilasique. Un tel catalyseur permet de convertir un α-aminonitrile racémique obtenu classiquement à partir de l'aldéhyde correspondant, en un mélange d'α(D)-aminoamide et d'α(L)-aminoacide. Le comportement de ce bicatalyseur chimique et enzymatique est analogue à celui de micro-organismes de type *Brévibactérium R 312*, *Pseudomonas Chloraphis B23*, etc... dont les nitriles hydratases contiendraient comme groupement prosthétique, la pyrroloquinoline quinone (PQQ) **11** [17] (schéma 13) dont le rôle, dans ces enzymes non oxydoréductases, n'a jamais été parfaitement défini.

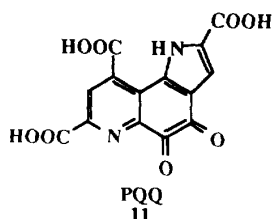


Schéma 13

Dans le cas des nitriles aliphatiques, plusieurs hypothèses ont été envisagées, le PQQ permettrait "l'activation des molécules d'eau" [17], par formation de l'hydrate du composé carbonylé, qui se fixeraient sur la triple liaison carbone-nitrile (schéma 14) :

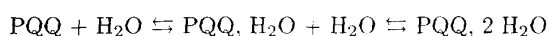


Schéma 14

ou la réduction du PQQ en PQQH₂ suivie de son oxydation par l'oxygène moléculaire libérerait une molécule d'eau oxygénée (schéma 15) qui hydraterait le nitrile [18] selon la réaction de Radziszewski [19] :

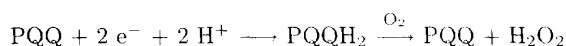


Schéma 15

Dans le cas des α -aminonitriles qui nous intéressent plus particulièrement, une troisième hypothèse, basée sur les résultats que nous avons obtenus, pourrait être établie. En effet, le PQQ qui possède une fonction cétone suffisamment réactive en C₅ [20], pourrait catalyser l'hydratation de l' α -aminonitrile de façon très semblable à la fonction catalytique du groupement cétonique pendant (pipéridin-4-one) du support d'immobilisation de la *pronase* que nous avons décrit.

Partie expérimentale

Les températures de fusion des produits synthétisés ont été mesurées sur un appareil de marque Buchi 520. Les spectres infrarouge ont été réalisés sur un spectromètre Perkin-Elmer 1420. Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés sur des appareils Varian EM 360 (60 MHz) et Bruker AC 250 (250 MHz) et les spectres RMN ¹³C du solide sur un spectromètre Bruker AM 300. Les spectres UV ont été réalisés sur un appareil UV Kontron Uvikon. Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre Perkin-Elmer 241. Les dosages de la capacité en groupements cétoniques des résines utilisées ainsi que la régulation du pH au cours des cinétiques d'hydratation des α -aminonitriles et d'hydrolyse des α -aminoamides ou des α -aminonitriles ont été effectués sur un ensemble de titrage potentiométrique Tacussel (TT 200, TT 100, burette électronique et enregistreur Ecoscript) ou sur un titrimètre Methrom 308. Les analyses en HPLC ont été faites sur un appareil Varian muni d'un détecteur UV Varian 2550 ou Jasco 975, d'une pompe Varian 2510 ou Shimadzu LC.6A et d'un intégrateur Varian 4290 ou Shimadzu C-R6A. Les colonnes utilisées sont des Nucléosil RP C18 (5 μ , 100 Å) ou, selon les cas, des Kromasil C18 (5 μ , 100 Å), de 15 ou de 30 cm.

Synthèse de l' α -(DL)-aminobenzylacétonitrile

Une solution de 0,116 mol de benzèneacétaldéhyde (13,94 g) dans 50 mL d'éthanol absolu est additionnée avec un débit de 0,3 mL/min à une solution de 125 mL d'ammoniaque à 32% contenant 0,142 mol de KCN (9,26 g) et 0,230 mol de NH₄Cl (12,35 g). Le milieu réactionnel est laissé une heure à température ambiante. Les sels sont filtrés et le mélange NH₃/MeOH est évaporé du milieu réactionnel sous pression réduite. La phase aqueuse restante est extraite à plusieurs reprises à l'éther qui est séché sur Na₂SO₄, puis évaporé sous vide. L'huile ainsi obtenue cristallise dans l'éther à -20°C. Poids obtenu : 12,9 g (solide).

Rendement = 76%.

F = 39,5-40,5°C.

IR (CCl₄) cm⁻¹ : 3 320-3 390 (NH₂), 2 220 (CN).

RMN ¹H (CCl₄/TMS) δ (ppm) : 1,65 (s, 2H, NH₂), 3,0 (d, 2H, CH₂), 3,91 (t, 1H, CH), 7,33 (s, 5H, C₆H₅).

Synthèse des comonomères

• Synthèse de la 1-acryloylpipéridin-4-one

Cette synthèse résulte d'une modification du mode opératoire proposé par Epton *et al* [21] :

- le temps de contact entre les réactifs (26,6 g de chlorhydrate de la 1-acryloylpipéridin-4-one (0,173 mol), 17,2 mL de chlorure d'acryloyle (0,19 mol) et 43,6 g de NaHCO₃ (0,519 mol)) est plus long : 1 h entre -5 et 0°C, puis 1 h à température ambiante.

- l'extraction du filtrat au chloroforme est plus poussée. Poids obtenu : 17 g (liquide visqueux à température ambiante).

Rendement : 64%.

IR (CHCl₃) cm⁻¹ : 1 725 (C=O cétonique), 1 640 (C=O amide), 1 600 (CH₂=CH).

RMN ¹H (CDCl₃/TMS) δ ppm : 2,53 (t, 4H, CH₂ (cycle)), 3,93 (t, 4H, CH₂ (cycle)), 5,66 à 7,07 (m, 3H, CH₂=CH).

• Synthèse de la 1,4-bis(acryloyl)pipérazine

Cette synthèse résulte d'une modification de la préparation de la *N,N'*-bis(acryloyl)éthylènediamine proposée par Arshady *et al* [22]. Réactifs utilisés : 4,3 g de pipérazine (0,05 mol), 8,94 mL de chlorure d'acryloyle (0,11 mol) et 13,9 mL de triéthylamine (0,1 mol). Poids obtenu après recristallisation dans un mélange Et₂O-MeOH (85-15) : 5,34 g (solide).

Rendement : 55%.

F = 100°C.

RMN ¹H (CDCl₃/TMS) δ ppm : 3,75 (s, 8H, CH₂ cycle), 5,7 à 6,95 (m, 3H, CH₂=CH).

• Synthèse de la 4-acryloylmorpholine

0,11 mol de morpholine (8,72 mL) et 0,1 mol de triéthylamine (13,94 mL) sont ajoutées successivement, sous atmosphère d'azote, à 350 mL de dichlorométhane préalablement distillé sur chlorure de calcium. La solution est refroidie à 5°C. On ajoute ensuite 0,11 mol de chlorure d'acryloyle (8,94 mL) pendant 1,5 h. Le mélange est maintenu 1 h à 0°C, puis 1 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite lavé par 2 fois 10 mL d'eau, 10 mL d'une solution de HCl (1 M) puis à nouveau par 10 mL d'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée, en présence de quelques cristaux d'hydroquinone, à 30°C. Le produit résultant est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant éther-méthanol : 1-1). Poids obtenu : 12,1 g (liquide visqueux).

Rendement : 78%.

IR (CHCl₃) cm⁻¹ : 1 600 (double liaison acrylique), 1 640 (C=O amide).

RMN ¹H (CDCl₃/TMS) δ ppm : 3,53 (s, 8H, CH₂ cycle), 5,66 à 7,1 (m, 3H, CH₂=CH).

Synthèse de la poly(N-acryloylpipéridin-4-one) réticulée à 20%, A(80/20) et de la poly(N-acryloylpipéridin-4-one) à motifs morpholine (80%) et réticulée à 5%, B(15/5)

– *A(80/20)* : 8 g de 1-acryloylpipéridin-4-one (0,0522 mol) et 2,03 g de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine (0,01305 mol) sont solubilisés dans 20 mL d'eau. L'oxygène dissous est éliminé par barbotage d'azote pendant 1 h. Après addition de 22,5 µL de *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine, le mélange est refroidi à 0°C. La polymérisation est initiée par addition de 3,3 mL d'une solution aqueuse de persulfate d'ammonium 3% préalablement dégazée. On maintient l'atmosphère d'azote dans le réacteur pendant toute la durée de la polymérisation (1 h environ). Le produit insoluble résultant est broyé puis lavé abondamment à l'eau, au méthanol et à l'éther (sur fritté n°3). Il est ensuite séché au dessiccateur chauffant. Poids obtenu : entre 9,5 et 9,8 g (résine).

Rendement : 95-98%.

IR (KBr) cm⁻¹ : 1 730 (C=O cétone), 1 640 (C=O amide).

RMN ¹³C (solide) δ ppm : 25-50 (C chaînes macromoléculaires, motifs pipéridin-4-one et pipérazine), 174 (C fonctions amides), 209 (C cétones).

– *B(15/5)* : Même protocole, avec 1,45 g de 1-acryloylpipéridin-4-one (0,00947 mol), 7,14 g de 4-acryloylmorpholine (0,0505 mol) et 0,612 g de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine (0,00315 mol), 18 mL d'eau, 22 µL de *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine et 3 mL d'une solution aqueuse de persulfate d'ammonium 3% préalablement dégazée. Poids obtenu : 8,75 g (résine).

Rendement : 95%.

Conditionnement des résines

– *en milieu aqueux* : les résines sont mises en suspension dans de l'eau, sous agitation et à 25°C. RMN ¹³C (solide) δ ppm : 25-50 (C chaînes macromoléculaires, motifs pipéridin-4-one et pipérazine), 174 (C fonctions amides), 209 (C cétones), 92 (C hydrates).

– *en milieu basique* : les résines sont conditionnées par agitation, à température ambiante, pendant 3,5 h dans une solution de potasse 0,1 N (0,035 mg de résine sèche par mL de KOH), puis abondamment lavées à l'eau distillée. RMN ¹³C (solide) δ ppm : 25-50 (C chaînes macromoléculaires, motifs pipéridin-4-one et pipérazine), 174 (C amide), 209 (C cétones), 92 (C hydrates), 70 (C cétoles).

– *en milieu tamponné* : les résines sont conditionnées par agitation, à température ambiante, pendant 3,5 h dans une solution de phosphate de sodium 0,1 M à pH 11 (0,035 mg de résine par mL de solution). RMN ¹³C (solide) δ ppm : 25-50 (C chaînes macromoléculaires, motifs pipéridin-4-one et pipérazine), 174 (C amide), 209 (C cétone), 92 (C hydrate), 70 (C cétole).

Dans chacun de ces milieux, la résine A(80/20) présente un taux de gonflement G ($G = (m_1 - m_2)/m_2 \cdot d$, avec m_1 : masse de polymère gonflé, m_2 : masse de polymère sec et d : densité du milieu gonflant) compris entre 2 et 2,1.

Dosage des groupements carbonyles par le chlorhydrate d'hydroxylamine

100 mg de résine sèche sont ajoutés à 25 mL d'une solution aqueuse molaire de chlorhydrate d'hydroxylamine, thermostatée à 60°C, dont le pH est maintenu constant par l'addition automatique d'une solution de potasse 0,1 N au moyen

d'un pHstat. La totalité des groupements cétoniques est dosée quand le volume de potasse ajouté reste constant. Le dosage des groupements carbonyle (libres et cétoles) a été également effectué après le traitement de la résine en milieu basique.

Synthèse de la résine A(80/20/p)

Dans un réacteur muni d'un barbotage d'azote, 5 g de 1-acryloylpipéridin-4-one, 1 g de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine et 40 mg à 100 mg de *pronase* lyophilisée (Boehringer Mannheim n°165921 ou Serva n°33635) sont dissous dans 6 mL d'eau. Le réacteur est posé sur de la glace et le barbotage d'azote est maintenu pendant 1 h afin d'assurer une bonne homogénéisation. Par la suite, 40 µL de *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine et 40 µg de persulfate d'ammonium (NH₄)₂S₂O₈ dissous dans 1 mL d'eau et préalablement dégazés à l'azote sont rapidement additionnés. Le réacteur est alors laissé posé sur de la glace pendant 1 h, puis maintenu 1 h à température ambiante. La résine obtenue est ensuite broyée, lavée à l'eau. La résine non séchée se conserve à 4°C. Poids de résine séchée obtenu (5,9 g). Rendement quantitatif.

Le conditionnement de cette résine par agitation pendant plusieurs heures dans l'eau, une solution de soude ou une solution tamponnée par les phosphates à pH 10-11 n'a pas permis de mettre en évidence un éventuel relargage de l'enzyme en solution.

Protocole des cinétiques d'hydrolyse

• du phénylalaninamide catalysée par la résine A(80/20/p)

L'avancement de l'hydratation de l'α-aminoamide est suivi en HPLC, l'éluant utilisé étant une solution de tampon phosphate-MeOH obtenue en mélangeant dans les proportions 30/70 du méthanol et une solution aqueuse d'hydrogénophosphate de potassium (0,05 M) ajustée à pH 6. Nous avons utilisé comme étalon interne, le phénol. Dans un récipient thermostaté à 37°C et soumis à une agitation par vibreur de 1 200 tr/min, 50 mg de phénylalaninamide sont additionnés à 5 mL d'une solution de tampon borate ([borax total] = 0 à 0,1 M) ou phosphate ([phosphate total] = 0 à 0,2 M), à pH 10,5, 11 ou 11,5, contenant 1 mg/mL de phénol. Après dissolution totale de l'α-aminoamide, la résine A(80/20/p) préalablement rincée à l'eau et essorée (500 mg) est introduite dans le mélange réactionnel et le pH est constamment régulé par une solution de soude 0,1 N au moyen d'un pHstat. Des prélèvements d'environ 0,1 mL sont effectués de façon régulière, puis chaque prélèvement, placé dans environ 2 mL d'éluant est analysé en HPLC. Les temps de rétention des différentes espèces sont à un débit de 1 mL/min et une pression de 180 atm : t_R (amide) = 4,2 min; t_R (phénol) = 10,6 min; t_R (nitrile) = 12,5 min; t_R (acide) = 3 min (avec une colonne Nucléosil RP C18 de 15 cm).

• de l'α-aminobenzylacétonitrile catalysée par la résine A(80/20/p)

Dans un récipient thermostaté à 37°C est soumis à une agitation par vibreur de 1 200 tr/min, 1 à 100 mg d'α-aminobenzylacétonitrile L ou DL sont dissous dans 5 mL d'une solution de borax 0,1 M à pH 10,5 contenant 1 mg/mL de phénol. Par la suite, 250 à 500 mg de résine A(80/20/p) préalablement rincée à l'eau et essorée sont introduits dans le mélange réactionnel. Le pH de la solution est alors constamment régulé à 10,5 par une solution de soude 0,1 N, au moyen d'un pHstat. Les cinétiques sont suivies en HPLC selon la méthode décrite ci-avant.

Afin d'analyser la nature de l'amide et de l'acide formé, nous avons repris cette réaction sur des quantités de substrat et de catalyseur plus élevées ($m_{\text{nit}} = 270$ mg, $m_{\text{rés}} = 3$ g, $V_{\text{sol}} = 30$ mL). En fin de réaction (9 h), le milieu réactionnel est filtré et la résine est lavée à l'eau. Les phases aqueuses sont rassemblées et concentrées (de moitié). Le phénylalaninamide est extrait au dichlorométhane et le pH est ajusté à 10 par addition constante de NH_4OH . Dans la solution aqueuse, la disparition de l'amide est contrôlée par CCM (éluant, $\text{NH}_4\text{OH}/\text{Pr}-2\text{-OH} : 3/7$). La phase organique contenant le phénylalaninamide, séchée sur Na_2SO_4 , est ensuite évaporée sous pression réduite. L'excès énantiomérique en α -aminoamide formé est évalué enzymatiquement par l'utilisation d'une amidase L-énantiospécifique (la *pronase*) en solution aqueuse. L' α (D)-aminoamide obtenu n'est pas un substrat pour l'enzyme. La phase aqueuse contenant la phénylalanine est ensuite ramenée à pH neutre et évaporée sous pression réduite. L' α -aminoacide brut est alors purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3 : 50/50/5$) et son pouvoir rotatoire est mesuré : $[\alpha]_D = -35,6^\circ$ ($C = 1,6$, H_2O , 20°C). L' α (L)-aminoacide ainsi obtenu avec un excès énantiomérique de 91% ($[\alpha]_D = -36,25^\circ$ ($C = 1,6$, H_2O , 20°C) pour la L-phénylalanine Aldrich-Chemie, pureté optique 98,5%), mais nous devons souligner qu'il y a 10% de racémisation de la L-phénylalanine commerciale lors de son passage sur une colonne de gel de silice dans les conditions expérimentales citées ci-dessus (éluant, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3 : 50/50/5$).

Protocole des cinétiques d'hydratation

- de l' α -aminobenzylacétonitrile catalysée par l'acétone et la 1-acétylpipéridin-4-one

L' α -aminobenzylacétonitrile, préalablement dissous dans un minimum de méthanol est introduit dans une solution aqueuse de cétone (0,16 M) contenant 1 mg/mL de phénol, en présence et en absence de phosphate de sodium (0,1 M), à 25°C . Le pH de la solution est constamment régulé à 11 par addition d'une solution de soude 0,1 N tout au long de la cinétique. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC selon le protocole décrit précédemment.

- de l' α -aminobenzylacétonitrile catalysée par la résine A(80/20) et la résine B(15/5)

D'une façon générale, la résine sèche (100 à 250 mg) est mise en suspension dans 7,5 mL d'une solution de tampon ($[\text{phosphate total}] = 0$ à 0,4 M, $[\text{borax total}] = 0$ à 0,15 M, $[\text{triéthanolamine}] = 0,1$ M) contenant 1 mg/mL de phénol, dont le pH ($10,5 < \text{pH} < 11$) est constamment régulé au

moyen d'un pHstat par addition de soude 0,1 N, l'avancement de la réaction est suivi en HPLC selon le protocole décrit précédemment.

Références

- 1 Béjaud M, Mion L, Commeyras A, *Bull Soc Chim Fr* (1976) 9-10, 1429
- 2 Arnaud A, Galzy P, Jallageas J, *Bull Soc Chim Fr* (1980) 2, 87
- 3 Macadam AM, Knowles G, *Biotechnol Lett* (1985) 12, 865
- 4 Ansano Y, Yasuda T, Tani Y, Yamata H, *Agric Biol Chem* (1982) 46, 1183-1189
- 5 Taillades J, Lagriffoul PH, Tadros Z, Commeyras A, *J Chem Soc Perkin Trans 2* (1992) 2
- 6 Taillades J, Garrel L, Lagriffoul PH, Commeyras A, *Bull Soc Chim Fr* (1992) 129, 191-192
- 7 Taillades J, Boussac P, Collet H, Brugidou J, Commeyras A, *Bull Soc Chim Fr* (1991) 128, 423-429
- 8 Yamskov A, Tikhonova TV, Davankov VA, *Enz Microb Technol* (1986) 8, 211-214
- 9 Pascal R, Taillades J, Commeyras A, *Bull Soc Chim Fr* (1978) 172, 3-4
- 10 Sola R, Brugidou J, Taillades J, Commeyras A, *Nouv J Chim* (1984) 7, 459
- 11 Sola R, Taillades J, Brugidou J, Commeyras A, *New J Chem* (1989) 13, 881
- 12 Sola R, Brugidou J, Taillades J, Commeyras A, *New J Chem* (1986) 10, 499-506
- 13 Frost A, Pearson G, *Kinetics and Mechanism*, Wiley, New York
- 14 Nelson WE, Butler JAV, *J Chem Soc* (1938) 957
- 15 Pascal R, Taillades J, Commeyras A, *Tetrahedron* (1978) 24, 2275-2281
- 16 Narahashi Y, Yanagita M, *J Biochem* (1967) 62, 6
- 17 Nagasawa T, Yamada H, *Biochem Biophys Res Commun* (1987) 147, 701-709
- 18 Itoch S, Ohshiro Y, Agawa Y, *Bull Chem Soc Jpn* (1986) 59, 1911-1914
- 19 Radziszewski B, *Ber* (1884) 17, 1289
- 20 Duine Johannis A, Jongejan Jacob A, *Vitamins and Hormones* (1989) 45, 223
- 21 Epton R, Marret G, Shackly AT, *Polymer* (1981) 22, 553
- 22 Arshady R, Atherton E, Clive DLJ, Sheppard R, *J Chem Soc Perkin Trans I* (1981) 529-537