

## Immobilisation d'enzymes sur poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one). Influence chimique du support

Jacques Taillades\*, Laurence Garrel, Ziad Tadros, Louis Mion, 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 7 avril 1995, accepté le 27 juillet 1995)

**Summary – Immobilization of enzymes on poly(*N*-acryloylpiperidin-4-one). Chemical influence of the support.** Poly(*N*-acryloylpiperidin-4-one) resin is an immobilization support of enzymes as varied as urease (hydrolase), glucose oxidase (oxidoreductase) or pronase (protease). These preparations of immobilized enzymes have a good storage stability, an acceptable catalytic activity and a good stability in continuous functioning. Moreover, the ketonic functions (piperidin-4-one) of the support play an important role in the stability of the immobilized enzyme (glucose oxidase) and even in the selectivity of the enzymatic catalyst (pronase). In this work, the chemical action of the support during catalysis allows the prevention of glucose oxidase deactivation by hydrogen peroxide, since the hydrogen peroxide produced by glucose oxidation in the presence of oxygen is fixed on the ketonic sites by the formation of  $\alpha$ -hydroxyhydroperoxide.

urease / glucose oxidase / pronase / supported enzymatic catalysis / enzyme immobilization

### Introduction

De nombreuses méthodes d'immobilisation d'enzymes sur des supports insolubles dans l'eau peuvent conduire à des préparations ayant une activité et une stabilité dans le temps tout à fait remarquables [1, 2a]. Sans revenir sur les avantages comparés de ces différentes méthodes, qui ont été analysés par ailleurs [1, 2a], nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'utilisation d'un support acrylique fortement réticulé présentant des groupements cétoniques pendants potentiellement réactifs en solution aqueuse. Ce support, une résine poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one), est obtenu par polymérisation radicalaire de 1-acryloylpipéridin-4-one en présence de 20% de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine comme agent de réticulation (fig 1).

Le caractère nettement hydrophile de cette résine est illustré par la présence de motifs cétoniques hydratés

(détectée en RMN  $^{13}\text{C}$  du solide, voir fig 9), qui est d'ailleurs en accord avec la bonne réactivité du motif 1-acryloylpipéridin-4-one, déjà observée en phase homogène [3].

La polymérisation radicalaire du mélange monomère/réticulant peut être conduite en masse, en présence d'une solution aqueuse diluée de l'enzyme à immobiliser ou en suspension, par exemple, dans un mélange hexane/fréon (50/50), en utilisant une solution aqueuse tamponnée d'enzyme comme phase discontinue. Si, étant donné les conditions expérimentales utilisées, l'enzyme doit préférentiellement se trouver piégée dans la matrice du polymère, son immobilisation par création de liaisons covalentes entre le motif cétonique immobilisé et les fonctions amine libres des chaînes protéiques de l'enzyme (fig 2) ne peut pas *a priori* être exclue. D'ailleurs, dans un travail voisin concernant l'immobilisation de l'uréase sur *N*-(polyacryloylaminoacétaldéhyde) [4], l'établissement de liaisons covalentes de type *gem*-aminoalcool entre les fonctions amine de la chaîne protéique et les fonctions aldéhyde immobilisées a été mise en évidence.

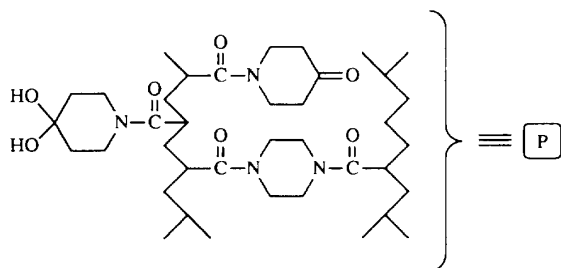


Fig 1

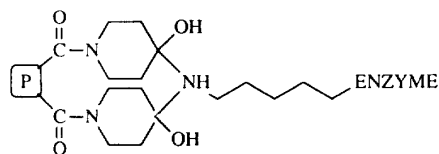


Fig 2

\* Correspondance et tirés à part

Bien que la question de la nature de l'immobilisation de l'enzyme sur ou dans ce support reste toujours posée, nous nous proposons dans ce travail de montrer la généralisation de l'immobilisation d'enzymes sur résine poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one) ainsi que les effets de synergie catalytique des groupements cétoniques se trouvant dans le microenvironnement de l'enzyme immobilisée.

En effet, dans ce cadre, nous avons montré précédemment [5] que ce support s'adaptait fort bien à l'immobilisation de protéases comme la pronase. Cette préparation multienzymatique a été immobilisée pour son caractère amidasique L-énantiospécifique qui permet entre autres, en milieu faiblement basique, la transformation du phénylalaninamide DL en un mélange facile à séparer de phénylalanine L et de phénylalaninamide D (fig 3).

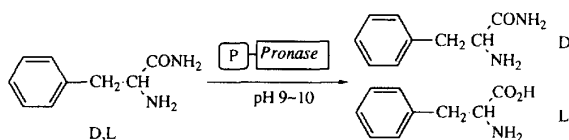


Fig 3

De façon plus surprenante, alors qu'en phase homogène la pronase ne présente aucune activité nitrilasique, la pronase immobilisée sur la résine poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one) permet l'hydrolyse du phénylalaninonitrile ( $\alpha$ -aminobenzènepropanenitrile) DL en phénylalanine L et en phénylalaninamide D (fig 4) dans des conditions douces (température ambiante, pH voisin de 10 en milieu tampon borate ou phosphate) [6, 7].

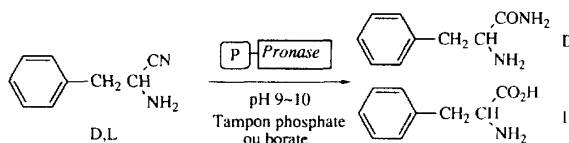


Fig 4

Dans ces conditions, ce comportement de type nitrilasique reflète le caractère bicatalytique de la pronase immobilisée sur poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one). Le support cétonique spécifiquement activé en milieu faiblement basique en présence de tampon borate ou phosphate peut, même dans ces conditions extrêmement douces, catalyser l'hydratation de l' $\alpha$ -aminonitrile, selon un processus que nous avons décrit par ailleurs [6, 7]. Le phénylalaninamide L ainsi formé dans le microenvironnement de l'enzyme est hydrolysé rapidement et ne diffuse pas dans la solution, dans laquelle apparaît seulement le mélange aminoamide D et aminoacide L (fig 5).

Dans le travail que nous présentons ici, nous montrons que l'immobilisation d'enzymes sur poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one) peut être généralisée à d'autres enzymes de type hydrolase (l'uréase, par exemple) ou de

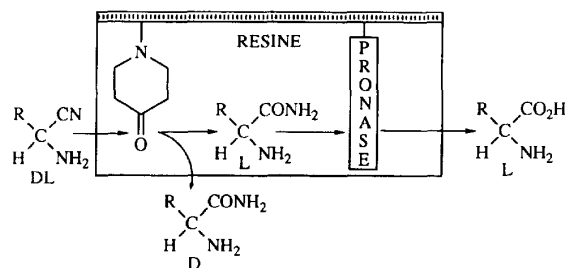


Fig 5

type oxydoréductase (glucose oxydase, par exemple). Dans ce dernier cas, l'intervention chimique du support permet de prévenir la désactivation de l'enzyme par les produits formés (l'eau oxygénée, dans ce cas).

## Résultats et discussion

### Immobilisation de l'uréase

L'uréase est une enzyme appartenant à la famille des hydrolases qui hydrolysent la liaison amide non peptidique (fig 6) [8].

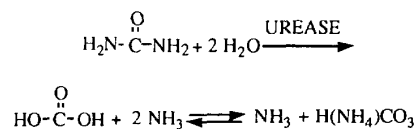
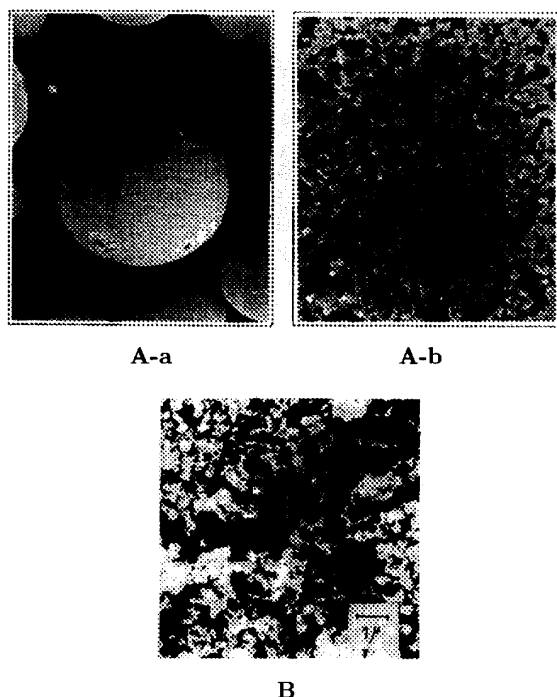


Fig 6

Son immobilisation par adsorption ou par piégeage dans la matrice d'un polymère est devenue extrêmement classique [9, 10] et peut constituer une référence dans la définition des performances d'un support d'immobilisation. Elle est actuellement très utilisée en analyse biomédicale de l'urée ainsi que dans les hémodialyseurs qui permettent le traitement des personnes urémiques [2b]. Dans ce dernier cas, outre les problèmes de stabilité et d'activité de la préparation, la biocompatibilité du support est un argument déterminant qui a pu, par exemple, conduire à rejeter l'utilisation de l'uréase adsorbée sur alumine.

Nous avons immobilisé, sur support poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one), l'uréase lyophilisée ayant une activité catalytique de 85 UI/mg (1 Unité Internationale représentant le nombre de  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NH}_3$  libéré par minute à 25°C et à pH 7). Avant d'être piégée dans la matrice du polymère, l'enzyme a été préalablement mise en contact avec le monomère (23 mg d'uréase/g de monomère). Le processus de polymérisation radicalaire est déclenché soit en masse (résine I), soit en suspension, en utilisant comme phase continue l'huile de vaseline (résine II) ou le système hexane/fréon 50/50 (v/v) (résine III). Nous donnons ci-joint (fig 7) quelques clichés, réalisés par microscopie électronique à balayage, de ces résines macroréticulées ainsi qu'une vue à moins grande échelle, des billes obtenues par polymérisation en suspension dans un mélange hexane/fréon (50/50 en volume).



**Fig 7.** A – Clichés, en microscopie électronique à balayage, des grains de résine obtenus par polymérisation en suspension dans l'hexane/fréon 50/50 (v/v), a) vue d'un grain de résine (0,54 cm = 30  $\mu$ m), b) vue détaillée de la surface du grain (0,54 cm = 1  $\mu$ m). B – Cliché, en microscopie électronique à balayage, des grains de résine obtenus par polymérisation en masse (0,4 cm = 1  $\mu$ m).

L'avancement de la réaction d'hydrolyse de l'urée en présence d'uréase immobilisée est suivie directement dans ce milieu hétérogène par la technique du pHstat. Cette méthode a été validée par comparaison avec une méthode colorimétrique classique de dosage de l'urée [11, 12] par le 4-diméthylaminobenzaldéhyde. Les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique, catalysée par l'uréase en phase homogène, que nous avons obtenus à 38°C ( $k_{cat} = 171 \mu\text{mol/mg}$  d'enzyme et  $K_M = 3,44 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) sont compatibles, aux erreurs expérimentales près, avec les valeurs données dans la littérature [9] ( $K_M = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Les différentes préparations d'uréase immobilisée sur poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one), résines I, II et III, présentent des activités appréciables (tableau I), comparables à celle des préparations commercialisées (570-

**Tableau I.** Activité enzymatique (en UI/g de résine) de l'uréase (85 UI/mg) immobilisée sur poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one), à pH 7 et à 25°C, selon le mode de polymérisation utilisé (résine I : polymérisation en masse, résine II : polymérisation en suspension (huile de vaseline), résine III : polymérisation en suspension (fréon/hexane)).

Résine	I	II	III
Activité (en UI/g de résine)	200/390	130/270	450/600

690 UI/g pour une uréase immobilisée sur polymère acrylique SERVA).

Dans l'hypothèse, d'ailleurs peu vraisemblable, où les activités des enzymes homogènes et immobilisées seraient identiques, les résultats obtenus conduiraient à un taux maximum d'immobilisation d'uréase active de l'ordre de 7 mg par g de résine sèche.

A l'inverse de ce que nous avons observé dans le cas de l'immobilisation de la pronase [13], l'uréase immobilisée dans une résine obtenue par polymérisation en suspension (fréon/hexane), la résine III, conduit à une préparation présentant une très bonne activité enzymatique. Par contre, lorsque cette polymérisation en suspension est conduite dans l'huile de vaseline comme phase continue (résine II), l'activité enzymatique chute de façon très importante. Ce comportement nous paraît être lié aux lavages répétés de la résine par les solvants organiques. Ces lavages, nécessaires pour éliminer toute trace de phase continue (huile de vaseline), conduisent à une inactivation de l'uréase, que nous avons d'ailleurs constatée en traitant la résine I (polymérisation en masse) par de l'hexane.

D'autre part, nous avons évalué la stabilité dans le temps (2 mois) de la meilleure préparation obtenue, la résine III, selon la température de stockage (4°C et 25°C) (tableau II).

**Tableau II.** Etude de l'évolution de l'activité enzymatique, à pH 7 et à 25°C, d'une résine de type III (suspension dans fréon/hexane) en fonction du temps, après stockage à 4°C et à 25°C.  $A_0$  est l'activité initiale de la résine,  $A_1$  et  $A_2$  les activités mesurées sur cette préparation après respectivement 1 et 2 mois de stockage.

Activité (en UI/g)	$t$ (en °C)	
	4	25
$A_0$	470	470
$A_1$	355	259
$A_2$	311	194

Après un mois de stockage, la baisse d'activité enzymatique est nettement ralentie, surtout pour la résine conservée à 4°C. Dans ces conditions, étant donné les bons résultats qui avaient été obtenus sur la stabilité dans le temps des préparations de pronase immobilisée par polymérisation en masse [5], nous avons repris l'étude du vieillissement d'une résine de type I présentant une activité uréasique au départ de 400 UI/g pour constater qu'après lyophilisation et stockage 12 mois à température ambiante, cette résine possède encore une activité très appréciable de 190 UI/g.

#### Immobilisation de la glucose oxydase

La GOD (glucose oxydase), oxydoréductase extraite d'*Aspergillus niger* [2c] est hautement spécifique de l'anomère  $\beta$  du D-glucose [2c] qu'elle oxyde, en présence d'oxygène moléculaire comme accepteur d'hydrogène, en D-glucono- $\delta$ -lactone et en eau oxygénée, la lactone étant ensuite hydrolysée en acide D-gluconique [14] (fig 8).

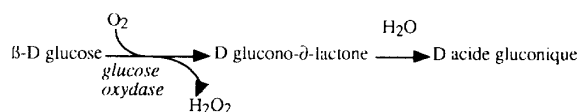


Fig 8

Le maximum d'activité de cette enzyme se situe entre pH 4,5 et 7 et à des températures de 30 à 60°C [15]. Outre les ions métalliques (tels  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ...) qui inhibent son activité, même à de faibles concentrations ( $\leq 10^{-3}$  M) [16], l'eau oxygénée issue de l'oxydation du glucose désactive l'enzyme, surtout lorsque le temps de contact enzyme- $\text{H}_2\text{O}_2$  est suffisant [17, 18]. Ainsi, par exemple, Kleppe [17], en prenant pour référence l'activité (100%) de la glucose oxydase non traitée par l'eau oxygénée, a montré que la glucose oxydase réduite traitée par une solution diluée d'eau oxygénée ne présentait plus qu'une activité de 0,5%. L'utilisation répétitive, discontinue ou continue, de la glucose oxydase immobilisée implique donc l'absence d'eau oxygénée dans le microenvironnement de l'enzyme, afin d'éviter la désactivation du catalyseur.

De nombreux travaux [19] ont été réalisés afin de tirer partie de la catalase, catalyseur de dismutation de l'eau oxygénée, qui coexiste d'ailleurs dans la préparation brute de glucose oxydase, mais qui est également dénaturée par l'eau oxygénée [19, 20]. D'autres moyens ont donc été mis en œuvre pour détruire l'eau oxygénée [21], par exemple, Carter [19] a immobilisé la GOD sur des supports inorganiques imprégnés d'oxydes métalliques (les meilleurs résultats furent obtenus avec de la GOD adsorbée sur sphérosil XOB-30 imprégné de ruthénium), mais si ces catalyseurs inorganiques permettent la décomposition de l'eau oxygénée, ils sont également empoisonnés par le gluconate produit.

L'immobilisation de la GOD sur la poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one), résine fonctionnalisée par des groupements cétoniques (motifs pipéridin-4-one) susceptibles de fixer l'eau oxygénée sous forme d' $\alpha$ -hydroxyhydroperoxydes [22] permet, comme nous allons le montrer, de pallier ce problème.

La résine poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one) A est obtenue par polymérisation en masse de 80% de 1-acryloylpipéridin-4-one et de 20% de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine (réticulant). L'aptitude de cette résine A à fixer l'eau oxygénée a été comparée à celle d'une résine B dans laquelle tous les motifs cétoniques (> 99%) sont préalablement acétalisés par de l'éthylène glycol.

Lorsque la résine A (100 mg soit 0,45 méquiv de groupements pipéridin-4-one) est mise en présence d'eau oxygénée (0,35 mmol) dans un tampon phosphate à pH 6 et à 23°C (fig 9), 65% de l'eau oxygénée de la solution disparaissent rapidement ( $t_{1/2} \approx 5$  min). Par contre, dans le cas de la résine acétalisée B, cette disparition est trop faible pour être vraiment significative.

Il faut enfin noter que, dans le cas de la résine A, la proportionnalité entre le taux d'eau oxygénée consommée et la quantité de résine utilisée met bien en évidence l'importance de la présence des groupements cétoniques supportés au sein du polymère.

La formation d' $\alpha$ -hydroxyhydroperoxyde sur les motifs pipéridin-4-one supportés a pu être mise en évidence directement par RMN  $^{13}\text{C}$  de la résine A préalablement

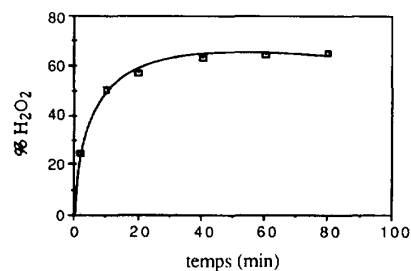


Fig 9. Consommation d'une solution d'eau oxygénée (0,35 mmol) dans un tampon phosphate à pH 6 et à 23°C par 100 mg de résine sèche (0,45 méquiv cétone).

conditionnée dans une solution d'eau oxygénée. À côté du signal du carbone de l'hydrate à 92 ppm, un signal relativement intense à 101 ppm correspondant au carbone de l' $\alpha$ -hydroxyhydroperoxyde correspondant est observé (fig 10).

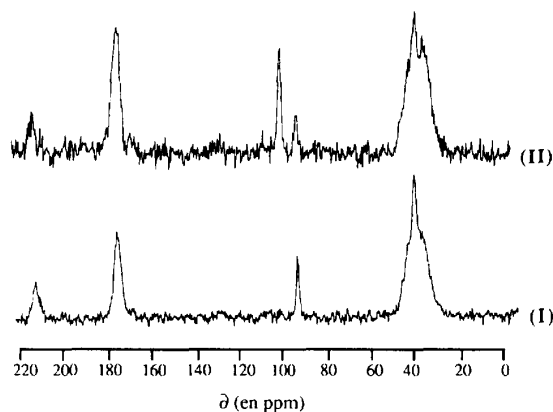


Fig 10. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la résine A : (I) : résine A au contact de l'eau, (II) : résine A dans une solution d'eau oxygénée.

L'addition d'eau oxygénée sur les composés carbonyles est une réaction équilibrée catalysée aussi bien par les bases que par les acides [22]. Dans le cas particulier de l'acétone, en milieu alcalin ou faiblement acide, elle conduit à un seul produit, le 2-hydroxy-2-hydroperoxyde (en équilibre avec l'acétone et l'eau oxygénée) avec une constante d'équilibre ( $K_{\text{H}_2\text{O}_2} = 5,3 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}$  à 35°C) environ 2000 fois plus grande que celle de formation de l'hydrate ( $K_{\text{H}_2\text{O}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  à 35°C) [22]. Un écart du même ordre de grandeur a d'ailleurs pu être observé pour de nombreux composés carbonyles (formaldéhyde, acétaldéhyde...) [23]. Par conséquent, la grande stabilité des produits d'addition sur la pipéridin-4-one et particulièrement de  $\text{H}_2\text{O}$  ( $K_{\text{H}_2\text{O}} = 0,3 \text{ M}^{-1}$  à 25°C [3b]) explique la bonne affinité de la résine A pour l'eau oxygénée qui se fixe sur le support selon la réaction (fig 11).

L'immobilisation de la glucose oxydase a été effectuée par incorporation de l'enzyme dans la résine A en cours de polymérisation (11 mg d'enzyme par g de monomère), la glucose oxydase est mise en présence d'une

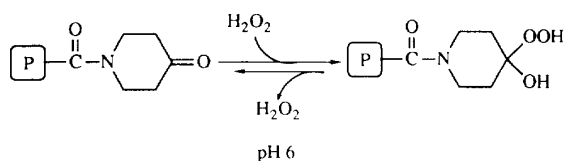


Fig 11

solution de 1-acryloylpipéridin-4-one pendant 2 h avant l'addition du réticulant et l'initiation de la polymérisation en masse.

L'activité catalytique des résines A-GOD et B-GOD, obtenues selon le même mode opératoire, (1 à 3 g de résine essorée, soit 0,370 à 1,180 g de résine sèche) a été étudiée lors de l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose (0,018 à 1 g/L) en milieu aqueux à 23°C, sans ajout préalable d'oxygène dans la solution, dans des conditions où la concentration en motifs cétoniques est très supérieure devant la concentration en  $\beta$ -D-glucose initiale ([cétone]/[ $\beta$ -D-glucose]  $\geq$  250). Le suivi des cinétiques a été réalisé par évaluation du glucose restant (dosage polarographique de l'eau oxygénée) ou de l'oxygène (électrode à oxygène).

Si lors de l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose catalysée par la résine acétalisée B-GOD, l'eau oxygénée est toujours présente dans la solution, en présence de la résine cétonique A-GOD, même en utilisant des concentrations en glucose de 1 g/L, la concentration en eau oxygénée est toujours très faible.

Les cinétiques suivent le modèle enzymatique de Michaelis-Menten (fig 12).

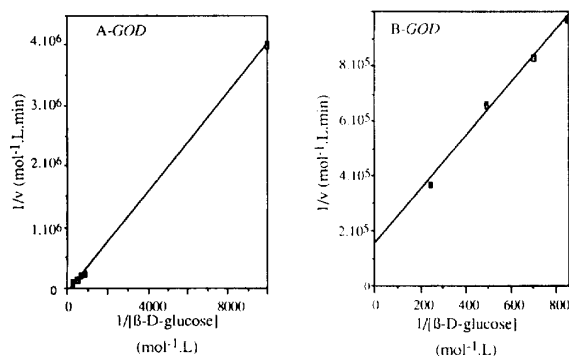


Fig 12. Représentation de Lineweaver et Burk. Oxydation du  $\beta$ -D-glucose ( $1 \cdot 10^{-4}$  à  $4 \cdot 10^{-3}$  mol/L) catalysée par les résines A-GOD et B-GOD (1 g de polymère sec) à pH 6 et à 23°C.  $V_{\text{sol}} = 5$  mL.

Les résines A-GOD et B-GOD présentent une activité enzymatique acceptable de l'ordre de 7-12  $\mu\text{mol/g/min}$  (par exemple, la glucose oxydase-polyacrylamide SERVA a une activité de 15 à 35  $\mu\text{mol/g/min}$  à 30°C) et une bonne affinité pour le substrat ( $K_M$  de l'ordre de  $5 - 6 \cdot 10^{-3}$  mol L $^{-1}$  (tableau III)).

Si la meilleure activité de la résine A-GOD peut être attribuée à une inactivation moins importante par l'eau oxygénée, il est aussi vraisemblable que le taux d'enzyme immobilisée sur la résine cétonique peut être plus

Tableau III. Activité catalytique des résines A-GOD et B-GOD pour 1 g de résine sèche, à pH 6, 23°C. [ $\beta$ -D-glucose] = 0,018 à 1 g/L.

	A-GOD	B-GOD
$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol/min}$ )	12	7
$K_M$ (mol L $^{-1}$ )	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$6,7 \cdot 10^{-3}$

important dans ce cas où la création de liaisons covalentes entre les chaînes protéiques de l'enzyme et les motifs cétoniques est possible [4]. Une étude comparative de l'activité de ces résines avec celle de la glucose oxydase en phase homogène et dans les mêmes conditions (150  $\mu\text{mol/mg/min}$  à pH 6 et 23°C) permet d'estimer la quantité d'enzyme immobilisée sur ces résines à environ 0,2 mg par g de résine sèche pour A-GOD et 0,1 mg par g de résine sèche pour B-GOD.

La bonne stabilité en fonctionnement de la résine A est illustrée dans la figure 13 ci-dessous dans lequel cinq essais successifs de cette préparation sont réalisés, sans perte appréciable d'activité. Entre ces essais, la résine est lavée à l'eau afin de régénérer les sites cétoniques accepteur d'eau oxygénée.

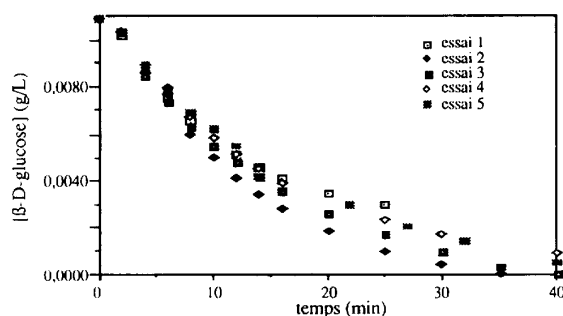


Fig 13. Utilisations successives de A-GOD (1 g de résine essorée) : essai 1, essai 2,... dans l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose (0,013 g/L) à 23°C et à pH 6. La résine est abondamment lavée à l'eau entre chaque essai puis essorée avant d'être remise en réaction.

En fonctionnement continu sur colonne (débit : 1 mL/min, [glucose] = 2 g/L, 23°C, pH 6), la résine B-GOD ne peut être utilisée que pendant 48 heures sans perte d'activité (en effet, au delà, elle perd jusqu'à 50% de son activité initiale). Ce résultat déjà encourageant peut être en partie lié à un processus lent d'hydrolyse en milieu neutre des cétons, faisant apparaître quelques motifs cétoniques susceptibles de piéger, du moins en partie, l'eau oxygénée formée. Cet effet a été bien mis en évidence lors de l'utilisation en continu, dans les mêmes conditions, de glucose oxydase immobilisée sur des supports ayant des taux de motifs pipéridin-4-one croissant, 5%, 10%, 80%, puisque nous avons constaté que l'activité des préparations était d'autant plus durable que le taux de motifs cétoniques dans la résine était élevé. En effet, si la résine à 5% de motifs pipéridone a pu être utilisée pendant 4 jours sans perte d'activité, la résine à 10% a pu être utilisée pendant plus de 10 jours en lavant la résine abondamment à l'eau tous les 5 jours pour régénérer les sites cétoniques.

Les préparations obtenues, présentent par ailleurs une bonne stabilité, stockée à 4°C pendant plus de trois mois, elles conservent leurs activités initiales.

## Conclusion

La résine poly(*N*-acryloylpipéridin-4-one) se prête à l'immobilisation d'enzymes aussi différentes que l'uréase, la pronase ou la glucose oxydase. Outre son caractère hydrophile bien adapté à la catalyse enzymatique en solution aqueuse, ces préparations présentent une bonne stabilité de stockage et une bonne stabilité en fonctionnement, avec une activité catalytique toujours appréciable. De plus, le support d'immobilisation peut participer activement à l'acte catalytique. En effet, la fonctionnalisation du support par les motifs pipéridin-4-one permet non seulement, dans le cas de la glucose oxydase, d'accroître la stabilité de l'enzyme lors de son utilisation, en limitant son inactivation par le produit de la réaction, mais aussi, dans le cas d'une protéase comme la pronase, de modifier la spécificité du catalyseur pronase-support en lui conférant, dans des conditions bien précises, un caractère nitrilasique.

## Partie expérimentale

### Immobilisation de l'uréase

#### • Par polymérisation en masse (résine I)

Dans un réacteur cylindrique muni d'un barbotage d'azote, 60 mg d'uréase SERVA sont mis en présence de 3 g 1-acryloylpipéridin-4-one [6a] dans 4 mL d'un tampon phosphate 0,05 M à pH 7 contenant 2 g/L d'EDTA pendant 1 h. Ensuite, 0,6 g de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine [6a] sont additionnés et le mélange est dégazé pendant 10 min. Le mélange réactionnel est refroidi par un bain de glace et la polymérisation est initiée par ajout de 25 µL de *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et 60 mg de persulfate d'ammonium préalablement dissous dans 1 mL d'eau. La résine est ensuite lavée à l'eau, puis par une solution d'EDTA (50 mg/L)-NaCl 0,2 M et enfin par une solution de tampon phosphate 0,05 M à pH 6. Elle est essorée et conservée à 4°C.

#### • Par polymérisation en suspension

— *résine II (phase continue : huile de vaseline)* : dans un réacteur à baffles de 250 mL, 180 mL de vaseline (CODEX E Dolia C230) et 1 mL d'agent tensioactif (15 g de SPAN 85 par litre d'huile) sont introduits. Le mélange est dégazé pendant toute une nuit. 3 g de 1-acryloylpipéridin-4-one [6a] et 62 mg d'uréase SERVA sont mis en contact dans 4 mL d'un tampon phosphate 0,05 M à pH 7 contenant 2 g/L d'EDTA pendant 30 min. Ensuite, 0,6 g de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine [6a] sont additionnés et le mélange, préalablement dégazé pendant 30 min est mis dans le réacteur. L'initiateur (60 mg de persulfate d'ammonium) est dissous dans 1 mL d'eau en présence de TEMED et dégazé préalablement à la polymérisation pendant 3 min. Au moment de la polymérisation, le courant d'azote en surface est maintenu et l'agitation est fixée à 400 tr/min. 15 à 45 s après l'initiation de la réaction, l'agitation est réduite à 60 tr/min pendant 6 à 7 min avant d'être stoppée. Au bout de 3 à 4 h, le contenu du réacteur est filtré sur fritté n°3, lavé abondamment à l'éther, à l'alcool puis à nouveau à l'éther. La résine est ensuite séchée sous pression réduite à 40°C.

— *résine III (phase continue : fréon 113/hexane 50/50 (v/v))* : même protocole que celui présenté ci-dessus. Phase continue : 150 mL d'un mélange fréon 113/hexane 50/50 (v/v).

### Evaluation de l'activité catalytique de l'uréase immobilisée

#### • Méthode colorimétrique [11, 12]

Des solutions de réactif coloré (à 2 g de 4-(diméthyl-amino)benzaldéhyde dissous dans 100 mL d'éthanol à 95°C et refroidi à -10°C sont additionnés 10 mL d'acide chlorhydrique concentré au goutte à goutte), des solutions tampon tris/HCl 0,05 M à pH 9 contenant 3 g/L d'urée et des solutions tampon phosphate 0,05 M à pH 7 contenant 100 mg/L d'uréase sont préalablement préparées. Les cinétiques d'hydrolyse de l'urée catalysée par l'uréase en phase homogène ou immobilisée sont suivies par UV à 440 nm. Dans la cuve de référence 2 mL de la solution enzymatique et 10 mL de la solution de réactif coloré sont introduits et le mélange est complété à 25 mL par de l'eau. Dans la cuve de mesure, la solution d'urée ou 400 mg de résine essorée (soit 100 mg de résine sèche) et centrifugée préalablement introduite dans 5 mL de tampon phosphate et 2 mL de solution enzymatique sont introduits. La réaction est bloquée au bout d'un temps *t* par addition de 10 mL de la solution de réactif coloré et complétée à 25 mL par addition d'eau.

#### • Méthode par pHstat

Lors de l'hydrolyse de l'urée en présence d'uréase libre ou immobilisée (fig 14), le pH du milieu réactionnel est maintenu constant par addition d'acide chlorhydrique de concentration *C* au moyen d'un pHstat, ce qui permet la neutralisation du carbonate d'ammonium formé, sachant que la neutralisation du carbamate d'ammonium, produit initial de la réaction d'hydrolyse, n'est pas cinétiquement limitante. Soit *v* le volume d'acide ajouté et *V*, le volume initial de la solution, le nombre de mole d'acide ajouté pour maintenir le pH constant est :

$$v \cdot C = (V + v)([\text{NH}_4^+] - 2[\text{CO}_3^{2-}] - [\text{HCO}_3^-]),$$

c'est-à-dire, en exprimant les concentrations en  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , en fonction de la concentration en urée :

$$v \cdot C = (V \cdot U_0 - (V - v) \cdot U) \cdot K,$$

expression dans laquelle *K* est uniquement fonction du pH de la solution et vaut 1,172 à pH 7 et à 25°C.

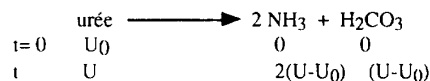


Fig 14

Dans ces conditions, la vitesse de disparition de l'urée devient :

$$-dU/dt = (dv/dt)C/(V + v)K + (dv/dt)U/(V + v)$$

et l'activité de l'uréase (en µmol/min/mg d'enzyme) est donnée par :

$$A = (dv/dt)C \cdot 10^3 / K \cdot m$$

avec *m*, masse d'enzyme dans la solution (en mg).

### Synthèse des résines A et B

8 g de 1-acryloylpipéridin-4-one [6a] (0,0522 mol) ou 10 g de 1-acryloylpipéridin-4-one acétal [3a] (0,0522 mol) et 2,03 g

de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine [6a] (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  $\mu$ L de TEMED, 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)  $\text{cm}^{-1}$  : 1 730 (C=O cétone), 1 640 (C=O amide). RMN  $^{13}\text{C}$  (solide)  $\delta$  ppm : 25-50 (C chaînes macromoléculaires, motifs pipéridin-4-one et pipérazine), 174 (C fonctions amide), 209 (C cétones).

#### Conditionnement des résines A et B

##### • En milieu aqueux

Les résines sont mises en suspension dans de l'eau, sous agitation et à 25°C. RMN  $^{13}\text{C}$  (solide)  $\delta$  ppm : 25-50 (C chaînes macromoléculaires, motifs pipéridin-4-one et pipérazine), 174 (C fonctions amide), 209 (C cétones), 92 (C hydrates).

##### • Dans une solution d'eau oxygénée

La résine A est conditionnée par agitation, à température ambiante, pendant 3,5 h dans une solution d'eau oxygénée 0,12 N. RMN  $^{13}\text{C}$  (solide)  $\delta$  ppm : 25-50 (C chaînes macromoléculaires, motifs pipéridin-4-one et pipérazine), 174 (C fonctions amide), 209 (C cétones), 101 (C  $\alpha$ -hydroxyhydroperoxydes), 92 (C hydrates).

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 de la résine A 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.

#### Suivi des cinétiques de disparition de $\text{H}_2\text{O}_2$

##### • Résine A

100 mg de résine A sèche (0,455 méquiv cétone) sont mis en présence de 3 mL d'une solution d'eau oxygénée 0,118 M dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 6 et à 23°C.

##### • Résine B

100 mg de résine B sèche (0,455 méquiv cétone) sont mis en présence de 1,25 mL à 2,5 mL d'une solution d'eau oxygénée  $1,9 \cdot 10^{-3}$  M dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 6 et à 23°C.

L'avancement de la réaction est suivi par polarographie impulsionnelle. Des prélèvements de 0,1 mL sont effectués au cours du temps. Chaque prélèvement est dilué dans 5 mL d'un tampon phosphate 0,05 M à pH 6. Ensuite 0,5 mL de cette solution sont prélevés et dilués dans 7 mL d'une solution de KCl 0,1 M et enfin analysés. L'intensité de diffusion est mesurée au sommet du pic de réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $E_{1/2} = -1,1$  V) par rapport à l'électrode de calomel saturée.

#### Synthèse des résines A-GOD et B-GOD

Dans un réacteur cylindrique muni d'un barbotage d'azote, 40 mg de glucose oxydase SERVA sont mis en présence de 3 g de 1-acryloylpipéridin-4-one [6a] ou de 3,75 g de 1-acryloylpipéridin-4-one acétal [3a] dans 4 mL d'eau pendant 2 h. Ensuite, 0,6 g de 1,4-bis(acryloyl)pipérazine [6a] sont additionnés et le mélange est dégazé pendant 10 min. Le mélange réactionnel est refroidi par un bain de glace et la polymérisation est initiée par ajout de 25  $\mu$ L de TEMED et 60 mg de persulfate d'ammonium préalablement dissous dans 1 mL d'eau. La résine est ensuite lavée à l'eau, puis par une solution d'EDTA (50 mg/L)-NaCl 0,2 M et enfin par une solution de tampon phosphate 0,05 M à pH 6. Elle est essorée et conservée à 4°C.

#### Préparation des solutions de $\beta$ -D-glucose (50 g/L)

Dans un Erlen de 250 mL, 25 g de D-glucose sont dissous dans 150 mL d'eau. La solution est portée à 50°C pendant 2 h afin d'atteindre l'équilibre entre l'anomère  $\alpha$  et l'anomère  $\beta$ . La solution est ensuite complétée à 500 mL avec de l'eau est stockée à 4°C. Les dilutions sont effectués à partir de cette solution. Les solutions obtenues contiennent 64% d'anomère  $\beta$ .

#### Suivi des cinétiques d'oxydation du $\beta$ -D-glucose

1 à 3 mg de GOD ou 1 à 3 g de résine A-GOD ou B-GOD essorées sont mis en présence de 5 à 10 mL de solution de  $\beta$ -D-glucose (0,018 à 1,2 g/L de D-glucose) à pH 6 et à 23°C. L'avancement de la réaction est suivi par polarographie impulsionnelle.

Dosage de  $\text{H}_2\text{O}_2$  : Des prélèvements de 0,25 mL sont effectués au cours du temps. Chaque prélèvement est dilué dans 6 mL d'une solution de KCl 0,1 M, dégazé et enfin analysé.

#### Dosage du $\beta$ -D-glucose

Des prélèvements de 0,25 mL sont effectués au cours du temps. Chaque prélèvement est placé dans 1 mL d'une solution de GOD (1 mg d'enzyme dans 5 mL d'un tampon phosphate 0,05 M à pH 6) pendant 15 min, puis 1  $\mu$ L de HCl 3 N sont ajoutés et 1 mL du mélange est dilué dans 6 mL d'une solution de KCl 0,1 M, dégazé et enfin analysé. La concentration en  $\beta$ -D-glucose est donnée par la différence entre les concentrations en  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtenues.

Nous avons préalablement vérifié que la GOD commerciale (SERVA) ne contenait pas suffisamment de catalase pour détruire l'eau oxygénée.

Les cinétiques ont été également suivi par électrode à oxygène ORION. 1 g de résine A essorée ou 1 à 23 mg de GOD sont mis en présence de 10 mL d'une solution de  $\beta$ -D-glucose ( $[\beta\text{-D-glucose}] < 0,03$  g/L) en présence ou en absence de catalase Boehringer Mannheim (100 à 200  $\mu$ L).

#### Fonctionnement de la GOD immobilisée en continu

Le fonctionnement de la GOD immobilisée est étudié en continu sur une colonne de 25 cm de hauteur et de 9 mm de diamètre dans laquelle circule une solution de D-glucose (0,5 à 2 g/L) avec un débit de 1 mL/min. L'efficacité de la préparation enzymatique est évaluée par polarographie comme ci-dessus.

#### Références

- 1 a) Linko Y-Y, Linko P, In : *Biocatalysts in Organic Synthesis*, Tramper J, Van der Plas H-C, Linko P Eds,

- Elsevier, 1985, session IV, p 159  
 b) Lilly M-D, Woodley J-M, In : *Biocatalysts in Organic Synthesis*, Tramper J, Van der Plas H-C, Linko P Eds, Elsevier, 1985, session IV, p 179
- 2 a) Kennedy J-F, Cabral J-M-S, In : *Biotechnology*, Rehm H-J, Reed G Eds, 1987, Vol 7a, p 347  
 b) Karube I, In : *Biotechnology*, Rehm H-J, Reed G Eds, 1987, Vol 7a, p 694  
 c) Frost G-M, Moss D-A, In : *Biotechnology*, Rehm H-J, Reed G Eds, 1987, Vol 7a, p 108
  - 3 a) Sola R, Brugidou J, Taillades J, Commeyras A, *Nouv J Chim* (1984) 8, 459-467  
 b) Sola R, Brugidou J, Taillades J, Commeyras A, *Nouv J Chim* (1986) 10, 499-506
  - 4 Epton R, Mac Laren J-V, Thomas T-H, *Polymer* (1974) 15 (9), 564-568
  - 5 Taillades J, Boussac P, Collet H, Brugidou J, Commeyras A, *Bull Soc Chim Fr* (1991) 128, 423-429
  - 6 a) Taillades J, Garrel L, Guillen F, Collet H, Commeyras A, *Bull Soc Chim Fr* (1995) 132, 119-127  
 b) Taillades J, Garrel L, Guillen F, Collet H, Commeyras A, *Reactive Polymers* (1995) 24, 261-269
  - 7 Taillades J, Garrel L, Guillen F, Commeyras A, *C R Acad Sci Paris* (1995) 320, Série II b, 545-550
  - 8 May S-W, Li N-N, *Biochem Biophys Res Commun* (1972) 47, 1179
  - 9 Carr P-W, Bowers L-D, In : *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, Wiley, New York, 1980, p 182
  - 10 Shtilman M-I, In : *Immobilization on Polymers*, VSP, Utrecht, The Netherlands, 1993
  - 11 Watt G, Chrisp J-O, *Anal Chem* (1954) 26, 452
  - 12 Cline R-E, Fink R-M, *Anal Chem* (1956) 28, 47
  - 13 Tadros Z, *Thèse de doctorat*, USTL Montpellier, 1990
  - 14 Röhr M, Kubicek C-P, Kominck J, In : *Biotechnology*, H-J Rehm, G Reed Eds, 1983, vol 3, p 455
  - 15 Scott D, In : *Oxydoreductases, Enzymes in Food Processing*, Academic, 2nd ed, San-Francisco, 1975
  - 16 Nakamura S, Ogura Y, In : *Kinetic studies on the Reaction of Glucose Oxydase, Flavins and Flavoproteins*, Proc 2nd conf, Yagik Ed, Univ Park Press, Maryland, 1968
  - 17 Kleppe K, *Biochemistry* (1966) 5 (1), 139
  - 18 Greenfield P-F, Krittell J-R, Laurence R-L, *Anal Biochem* (1975) 65, 109
  - 19 Carter S, *The Desactivation Behavior of Immobilized Glucose Oxidase/Catalase on Hydrogen Peroxyde Decomposing Supported*, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, 1980
  - 20 Lueck H, *Biochem Z* (1957) 329, 165
  - 21 Pifferi P-G, Vaccari A, Ricci G, Poli G, Ruggeri O, *Biotechnol Bioeng* (1982) 24, 2155-2165
  - 22 Hine J, Redding R-W, *J Org Chem* (1970) 35, 8
  - 23 Sander G, Jenck W-P, *J Am Chem Soc* (1968) 90, 16