

PRÉPARATION DES SUBSTRATS FIBREUX POUR L'IMMOBILISATION DES ENZYMES

PREPARATION OF FIBROUS SUPPORTS FOR THE COVALENT IMMOBILIZATION OF ENZYMES

Andrei SÂRBU,^{a*} Ion UDREA,^b Mariana BEDA^a et Liliana SÂRBU^a

^a INCDPC-ICECHIM Bucarest, Spl. Independenței nr. 202, secteur 6, Bucarest, Roumanie, 060021

^b Université de Bucarest, Faculté de Chimie, Boulevard Mihail Kogălniceanu nr. 36-40, secteur 5
Bucarest, Roumanie

Reçu le 31 octobre 2005

On a obtenu des fibres d'alcool polyvinylique par la méthode de filage de solution par la voie humide. Les fibres d'alcool polyvinylique ont été activées avec l'aldéhyde glutarique, pour introduire des groupements CHO, qui servent de place pour l'immobilisation covalente des enzymes. Le travail présente l'influence des paramètres de réaction (rapport de baigne, concentration d'aldéhyde glutarique, concentration de sulfate de sodium, concentration d'acide sulfurique, température et durée) sur le degré d'acétalisation. On présente aussi les caractéristiques physico-mécaniques et l'activité enzymatique de la xylanase, immobilisée de façon covalente sur des supports fibreux.

Polyvinyl alcohol fibers were obtained by wet spinning from solution. The polyvinyl alcohol fibers were activated with glutaraldehyde in order to insert CHO groups, which are the place for the covalent immobilization of enzymes. The work presents the influence of the reaction parameters (bath ratio, glutaraldehyde concentration, sodium sulfate concentration, temperature and time) on the acetalisation degree. It is also presented the physico-mechanical characteristics and the enzymic activity of the xylanase, covalently immobilized onto fibrous supports.

INTRODUCTION

L'immobilisation covalente des enzymes peut être réalisée en plusieurs manières, en dépendance du substrat polymérique sur lequel on a l'intention de faire la liaison. Les procédures d'immobilisation sont bien présentées dans la littérature.^{1,2} Le principe général consiste dans l'utilisation d'un groupement réactif du polymère, ou de créer un tel groupement.

Vu que les enzymes immobilisées sur des supports polymériques fonctionnent comme des catalyseurs hétérogènes, la surface a une grande importance. On sait que, grâce au grand rapport entre la longueur et le diamètre, les fibres ont la plus grande surface spécifique de tous les genres de matériaux polymériques. C'est pourquoi on a essayé d'immobiliser les enzymes sur des supports fibreux. Pratiquement, toutes les fibres peuvent servir comme support pour l'immobilisation des enzymes : des fibres naturelles, comme par exemple le coton,^{3,4} des fibres artificielles comme la rayon⁵

ou les fibres de triacétate de cellulose⁶ et les fibres synthétiques : acryliques,⁷ de polyester,⁸ de polyamide⁹ et de polyoléfines.¹⁰

Parmi les fibres synthétiques pour l'immobilisation des enzymes on utilise aussi les fibres d'alcool polyvinylique. Dans deux procédures on fait l'immobilisation par une méthode physique (inclusion).^{11, 12} Une troisième procédure fait l'immobilisation par des méthodes chimiques : ionique ou covalente, mais pour cela on réalise, antérieurement, l'inclusion dans l'alcool polyvinylique d'un polymère au groupement réactifs : selles quaternaires d'ammonium du chitosan ou chitosan tel quel.¹³

On sait que lorsqu'on fait l'insolubilisation des fibres d'alcool polyvinylique avec de l'aldéhyde glutarique une partie des groupements CHO restent libres;¹³ d'autre part on sait que les groupements CHO peuvent servir de place pour l'immobilisation covalente des enzymes, par la réaction de ceux-ci avec les groupements NH₂ de l'enzyme.¹

* Corresponding author: andr.sarbu@gmail.com

Le but de ce travail a été d'étudier la possibilité d'immobilisation covalente des enzymes sur les fibres d'alcool polyvinylique par des réactions polymère analogues en utilisant l'aldéhyde glutarique. On a étudié en détail l'influence des conditions de réaction sur les degrés d'acétalisation et on a déterminé l'activité enzymatique dans la dépolymérisation du xylan, après l'immobilisation de la xylanase, et les propriétés physico-mécaniques des fibres enzymatiques. Les monosaccharides et les oligosaccharides qui pourraient être obtenus peuvent servir de base pour de nouveaux doucisseurs.¹⁴

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. L'influence des paramètres technologiques sur la réaction d'acétalisation de l'alcool polyvinylique avec aldéhyde glutarique

La Fig. 1 présente l'influence de la concentration du catalyseur (H_2SO_4) sur les degrés d'acétalisation

des fibres d'alcool polyvinylique. Sur la Fig. 1 on voit que dans le domaine étudié les degrés d'acétalisation augmentent de façon linéaire.

L'influence de la concentration de sulfate de sodium décahydrate sur les degrés d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique est présentée sur la Fig. 2. On peut voir que dans les conditions des expériences, la concentration de sulfate de sodium n'a pas d'influences sur les degrés d'acétalisation.

La Fig. 3 présente l'influence de la concentration d'aldéhyde glutarique sur les degrés d'acétalisation. On peut remarquer, que, dans le domaine de variation étudié les degrés d'acétalisation s'accroissent linéairement.

L'influence du rapport de baigne sur les degrés d'acétalisation est présentée dans la Fig. 4. Sur cette figure on peut observer, que, dans le domaine de variation exploré, les degrés d'acétalisation des fibres augmentent linéairement avec la croissance du rapport de baigne.

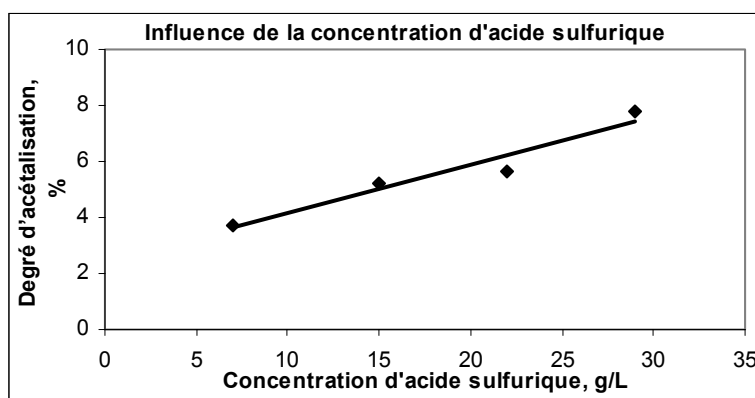


Fig. 1 – L'influence de la concentration d'acide sulfurique sur le degré d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique. Les expériences se sont déroulées dans les suivantes conditions constantes : rapport de baigne 1:250, concentration de glutaraldéhyde : 100 g/L, concentration de sulfate de sodium : 200 g/L, température de réaction : 80 °C, durée de réaction : 20 min.

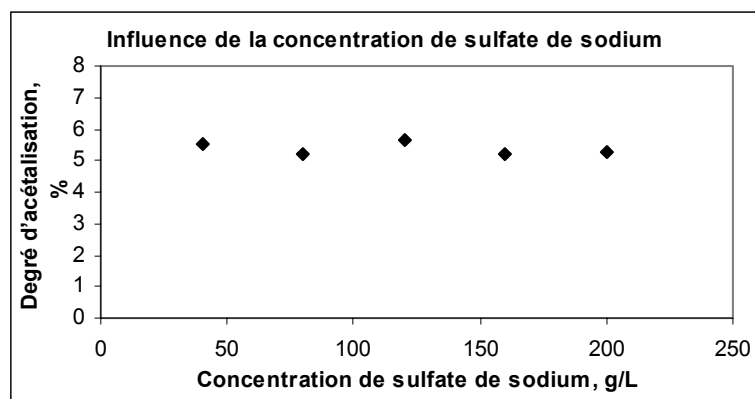


Fig. 2 – L'influence de la concentration de sulfate de sodium décahydrate sur les degrés d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique. Les expériences se sont déroulées dans les suivantes conditions constantes : rapport de baigne 1:250, concentration de glutaraldéhyde : 100 g/L, concentration d'acide sulfurique : 22 g/L, température de réaction : 80 °C, durée de réaction : 20 min.

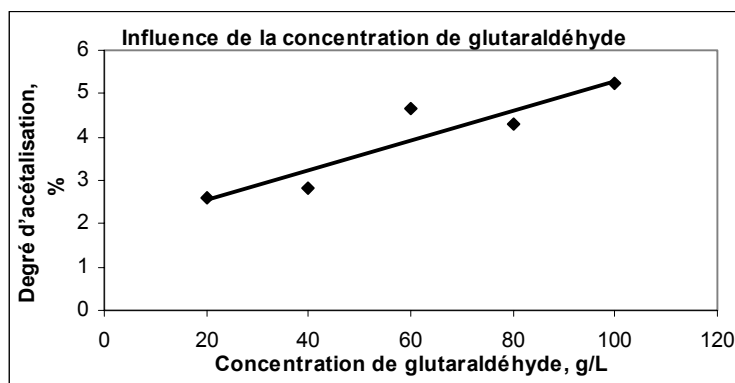


Fig. 3 – L'influence de la concentration de glutaraldéhyde sur les degrés d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique. Les expériences se sont déroulées dans les suivantes conditions constantes : rapport de baigne 1 :250, concentration de sulfate de sodium décahydrate : 120 g/L, concentration d'acide sulfurique : 22 g/L, température de réaction : 80 °C, durée de réaction : 20 min.

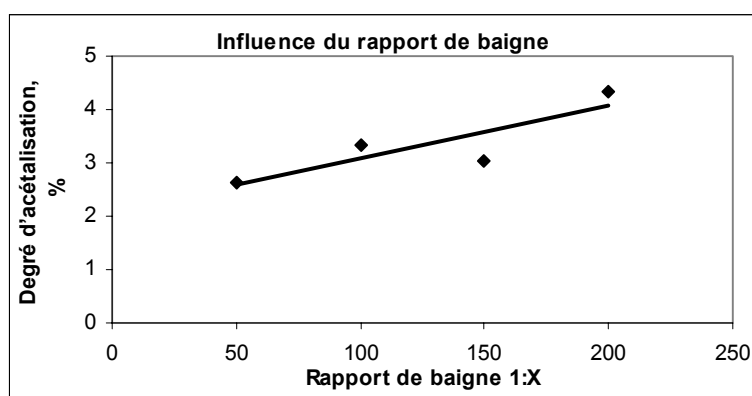


Fig. 4 – L'influence du rapport de baigne sur les degrés d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique. Les expériences se sont déroulées dans les suivantes conditions constantes : concentration de glutaraldéhyde : 60 g/L, concentration de sulfate de sodium décahydrate : 120 g/L, concentration d'acide sulfurique : 22 g/L, température de réaction : 80 °C, durée de réaction : 20 min.

Les résultats obtenus dans les expériences concernant l'influence de la variation de la température de réaction sur les degrés d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique sont montrés sur la Fig. 5. De cette figure on remarque une augmentation linéaire des degrés d'acétalisation avec la température de réaction.

Sur la Fig. 6 on présente l'influence de la durée de réaction sur les degrés d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique. On peut voir que, dans le domaine étudié, les degrés d'acétalisation s'accroissent linéairement avec l'augmentation de la durée de réaction.

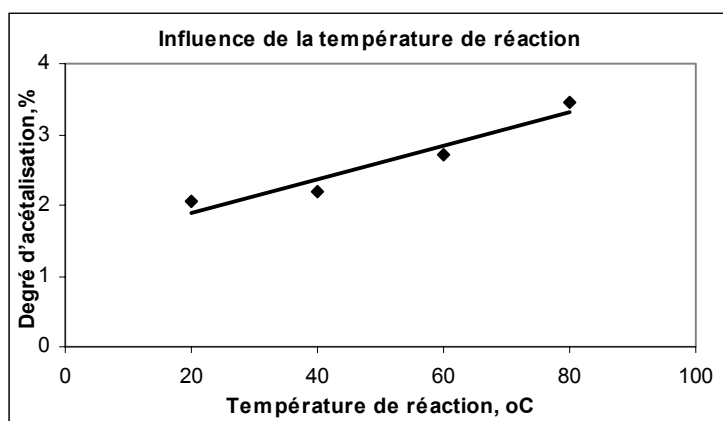


Fig. 5 – L'influence de la température de réaction sur les degrés d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique. Les expériences se sont déroulées dans les suivantes conditions constantes : rapport de baigne 1:100, concentration de glutaraldéhyde : 60 g/L, concentration de sulfate de sodium décahydrate : 120 g/L, concentration d'acide sulfurique : 22 g/L, durée de réaction : 20 min.

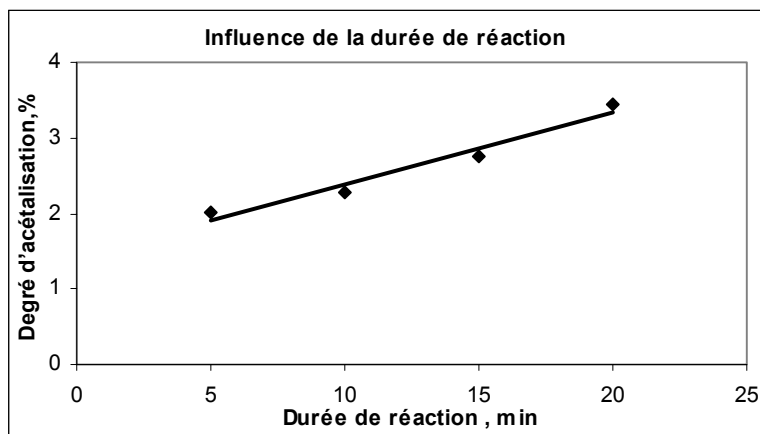


Fig. 6 – L'influence de la durée de réaction sur les degrés d'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique. Les expériences se sont déroulées dans les suivantes conditions constantes : rapport de baigne 1 :100, concentration de glutaraldéhyde : 60 g/L, concentration de sulfate de sodium décahydrate : 120 g/L, concentration d'acide sulfurique : 22 g/L, température 80 °C.

Toutes les fibres acétalisées obtenues dans les expériences décrites ci-dessus ont été insolubles dans l'eau bouillante, ce qui démontre que la réaction d'acétalisation s'est vraiment passée.

2. Les caractéristiques physico-mécaniques et l'activité enzymatique de la xylanase immobilisée de façon covalente sur les fibres d'alcool polyvinylique

Les fibres obtenues après le filage, l'acétalisation et l'immobilisation covalente des enzymes ont été caractérisées du point de vue physico-mécanique. Les résultats sont présentés dans le Tableau 1. La fibre acétalisée a eu un degré d'acétalisation de 4,17% et un contenu de CHO libre de 0,47% et a été utilisée pour l'immobilisation covalente de la xylanase, en obtenant un contenu d'enzyme de 9,02%.

Comme on peut le voir sur le Tableau 1, par la suite de l'acétalisation il se produit une diminution de la finesse, de la résistance et de la ténacité et une augmentation de l'allongement jusqu'à la rupture. Ceci peut être expliqué d'une part par l'augmentation de la masse de la fibre et d'autre part par les processus de relaxation des chaînes du polymère à la suite des traitements thermiques. L'immobilisation de l'enzyme diminue aussi la finesse (à cause de l'augmentation de masse), se qui conduit à la réduction de la ténacité, tandis que la résistance mécanique et l'allongement jusqu'à la rupture ne sont plus affectés. Les propriétés physico- mécaniques des fibres analysées se trouvent dans le domaine textile.

Les résultats pour l'activité de la xylanase immobilisée sur les fibres d'alcool polyvinylique sont présentés sur le Tableau 2.

Tableau 1

Caractéristiques physico-mécaniques des fibres intermédiaires et finies

No.	Caractéristiques	Fibre non acétalisée	Fibre acétalisée	Fibre avec enzyme
1	Finesse, den	1,52	1,64	1,83
2	Résistance, gf	5,87	5,31	5,32
3	Allongement jusqu'à la rupture, %	22,3	24,8	24,4
4	Ténacité, gf/den	3,86	3,24	2,91

Tableau 2

Activité de la xylanase immobilisée sur les fibres d'alcool polyvinylique

Nr. crt	Epreuve	Quantité de CHO, g/L	Degré moyen de polymérisation	Rapport de réduction de la masse molaire face au xylan initial.
1	Solution xylan	0,011	199	-
2	Solution incubation 1	0,035	62,85	3,18
3	Solution incubation 2	0,032	68,75	2,91
4	Solution incubation 3	0,030	73,33	2,73

Du Tableau 2 on peut remarquer que la fibre d'alcool polyvinylique contenant de la xylanase a présenté d'activité enzymatique, en provoquant une réduction d'environ 3 fois de la masse molaire du xylan, seulement après une heure de réaction. Ce qui est très important c'est que dans les trois incubations successives le rapport de réduction de la masse molaire du xylan initial diminue faiblement, ce qui prouve l'immobilisation covalente de l'enzyme.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

a) Matières premières

Comme matière première on a utilisé un alcool polyvinylique préparé en laboratoire par la polymérisation radicalaire, de l'acétate de vinyle en solution de méthanol, initié avec azoizobutirodinitrile, suivie par la méthanolyse du polyvinyle acétate. L'alcool polyvinylique obtenu a présenté les caractéristiques suivantes :

Degré de polymérisation : 1840 :

Degré d'hydrolyse : 99,9% :

Contenue d'acétate de sodium : 1,77%.

Toutes les autres substances utilisées : aldéhyde glutarique, sulfate de sodium décahydrate, acide sulfurique 98%, acide acétique et acétate de sodium ont été des réactives pour analyse.

L'enzyme immobilisée a été la xylanase provenant de *Thermococcus lanuginosus* (SIGMA).

b) L'obtention des fibres d'alcool polyvinylique

Les fibres d'alcool polyvinylique ont été obtenues en laboratoire, par le filage de solution par la voie humide. La solution de filage a été constituée par une solution d'alcool polyvinylique dans l'eau ayant la concentration de 15%. La coagulation c'est passée dans une baigne de solution aqueuse supra saturée de sulfate de sodium, ayant la température de 43-47 ° C. L'étirage humide c'est passé dans une baigne de solution aqueuse de sulfate de sodium 330 g/L ayant la température de 90-95 ° C à un rapport d'étirage de 1:3. Le câble des filaments a été déposé sur une bobine. Puis on a fait le séchage du câble, dans une étuve à circulation d'air, pendant 1 heure à 70-80 ° C et une pré thermo fixation en état tensionné (sur la bobine) dans la même étuve pendant 5 minutes à 150 ° C. Le câble thermo fixé a été subi à un étirage sec, sur une surface chauffée à 175 ° C, à un rapport d'étirage de 1:2 et on l'a déposé sur une autre bobine. En final le câble a été coupé et a été soumis à une thermo fixation en état relaxé, pendant 5 minutes à 185 ° C, dans l'étuve à circulation d'air.

c) L'acétalisation des fibres d'alcool polyvinylique avec l'aldéhyde glutarique

Les fibres d'alcool polyvinylique ont été acétalisées dans une solution aqueuse contenant aldéhyde glutarique (réagent), sulfate de sodium (protecteur structural), et acide sulfurique (catalyseur). Le rapport entre les fibres et la solution aqueuse est défini comme rapport de baigne. L'acétalisation s'est effectuée dans un ballon de verre au fond rond (de 250 mL), prévu à la bouche avec un condenseur vertical refroidi à l'eau et situé dans une baigne thermo statée.

d) L'immobilisation de l'enzyme

L'immobilisation de l'enzyme sur les fibres d'alcool polyvinylique acétalisées, a été effectuée dans une solution 0,7% xylanase dans tampon acétate de sodium 0,2 M (pH=5). La réaction c'est passé dans un ballon de verre au fond plat (de 250 mL), situé dans un réfrigérateur (+ 4 ° C). Le rapport de baigne entre les fibres acétalisées et la solution d'enzyme a été de 1 : 250 et la durée de réaction de 150 min.

e) Les méthodes analytiques spécifiques

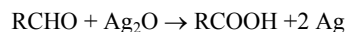
- La détermination du degré d'acétalisation (contenue de glutaraldéhyde) a été effectué par l'hydrolyse des groupements acétal avec H₂SO₄ 20% (masse), suivie par l'entraînement au vapeurs d'eau qui sont attrapés dans une solution de chlorhydrate de hydroxylamine, en libérant HCl, qui est mesuré par titrage. On prépare une solution aqueuse d'acide sulfurique 20%. On introduit 50 mL de cette solution et une quantité mesurée de fibre (environ 0,1 g) dans un ballon au fond rond de 250 mL. Le ballon est maintenu 1 heure à 90 ° C, après quoi on commence le barbotage des vapeurs d'eau par la solution résultée. Les vapeurs sont condensés dans un condenseur vertical refroidi à l'eau et sont collectés dans un flacon Erlenmeyer, dans lequel on a mis en préalable 50 mL solution aqueuse 7% de chlorhydrate de hydroxylamine. Le condensé est collecté jusqu'au moment quant la quantité totale de liquide dans le flacon Erlenmeyer est de presque 200 mL. Le liquide du flacon Erlenmeyer est puis passé dans un ballon coté de 200 mL et puis est apporté au signe avec de l'eau distillé. De ce liquide on prend des échantillons de 50 mL et on fait le titrage de HCl avec une solution aqueuse 0.05 M NaOH, en présence du bleu de bromophénol, jusqu'à l'apparition de la couleur mauve. En parallèle on fait une épreuve témoin, sans fibre, dans les mêmes conditions.

Le calcul du degré d'acétalisation (DA) se fait avec la formule :

$$DA (\%) = \frac{(V-V_0) \cdot 0.00215 \cdot 200 \cdot 100}{g_p \cdot 50}$$

dans laquelle: V- le volume de solution NaOH utilisé pour le titrage de l'échantillon (mL), V₀- le volume de solution NaOH utilisé pour le titrage de l'épreuve témoin (mL) et g_p- la masse de fibre analysée (g).

- La détermination du contenu de groupement CHO sur la fibre a été effectuée par une méthode potentiométrique de détermination du contenu d'aldéhyde par réduction de Ag₂O. La méthode utilise l'oxyde d'argent comme agent d'oxydation pour les aldéhydes :



On a utilisé un potentiomètre à l'échelle de 1 à 1400 mV, un électrode de référence de K₂SO₄, un électrode indicateur de Ag et un agitateur électromagnétique.

Le réactif Tollens a été préparé dans la manière suivante: dans un flacon Erlenmeyer (prévu avec bouchon), de 250 mL, on a introduit 50 mL solution aqueuse de AgNO₃ 0,1 N (au facteur connu). Puis on a ajouté 1 mL NaOH 6 N, et le mélange a été bien agité. Il se forme un précipité, qui est dissout en ajoutant petit à petit, sous agitation continue, de l'ammoniac concentré (25 %). La quantité d'ammoniac ne dépasse pas 2 mL. Dans le réactif Tollens fraîchement préparé on a ajouté environ 0,1 g fibre acétalisée et le mélange de réaction a été bien agité pendant quelques minutes. L'apparition du miroir d'argent ou d'une turbidité noire

indique une réaction positive. L'échantillon ainsi préparé est laissé en repos, en obscurité, pendant 2 heures. Puis, la solution est transférée dans un verre Berzelius de 250 mL et l'excès des ions d'argent est titré potentiométriquement avec une solution KI 0,1 N (au facteur connu). Le calcul du contenu d'aldéhyde (CA) se fait avec la formule :

$$CA (\%) = \frac{(V_1 f_1 - V_2 f_2) * 0,00145 * 100}{g_p}$$

dans laquelle: V_1 -le volum de $AgNO_3$, 0,1 N dans le réactif Tollens (mL), f_1 , le facteur de la solution de $AgNO_3$, V_2 - le volume de solution KI 0,1 N utilisé pour le titrage (mL), f_2 - le facteur de la solution de KI, 0,00145- l'équivalent de CHO pour chaque mL de $AgNO_3$, 0,1 N, g_p - la masse de fibre (g).

- La détermination du contenu de l'enzyme liée sur la fibre a été effectuée selon le contenu de nitrogène de la fibre après l'immobilisation de l'enzyme, déterminé par la méthode Kjeldal. Avant la détermination de nitrogène, la fibre est très bien lavée avec du tampon 0,2 M d'acétate de sodium, pour l'élimination de l'enzyme adsorbée.

- La détermination de l'activité enzymatique de la xylanase immobilisée sur les fibre a été effectué dans la manière suivante: On a préparé une solution 1% de xylan de bouleau ainsi: on a dissout 1 g de xylan dans 50 mL solution aqueuse 0,05 M NaOH par agitation à 40-50 ° C, pendant 30 minutes. La solution obtenue a été versée dans 50 mL solution tampon 0,2 M d'acétate de sodium. La solution obtenue a eu le pH 5. 10 mL de cette solution de xylan ont été incubés avec 0,1 g fibre enzymatique, pendant 1 heure à la température de 50 ° C. Après la réaction le ballon de réaction a été refroidi en glace et la fibre a été bien lavée avec du tampon 0,2 M d'acétate de sodium (pH=5) et a été réintroduite dans deux autres incubations successives dans les mêmes conditions (avec lavage intermédiaire de la fibre dans le tampon). Après chaque incubation, le contenu de groupements aldéhyde a été déterminé selon la méthode SIGGIA, décrite auparavant. Du contenu d'aldéhyde on a calculé le degré de polymérisation du xylan hydrolysé. L'activité enzymatique est exprimée aussi par le rapport entre

le contenu d'aldéhyde de l'épreuve incubée et le contenu d'aldéhyde du xylan initial.

BIBLIOGRAPHIE

1. J.F. Kennedy and J.M.S. Cabral, "Immobilized enzymes. In Solid phase biochemistry: analytical and synthetic aspects", Scouten W.H. (Ed), Wiley, New York, 1983, 253-391.
2. V.M. Balcao, A.L. Paiva and F.X. Malcata, *Enzyme Microb. Technol.*, **1996**, *18*, 315-71.
3. N. Albayrak and S.-T. Yang, *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, *77*, 8-19.
4. N. Albayrak and S.-T. Yang, *Biotechnology Progress*, **2002**, *18*, 240-251.
5. L.S. Liubich, G.P. Vlasov and L.A. Bol'f, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **1980**, *16*, 218-221.
6. W. Marconi, F. Bartoli, R. Gianna, F. Morisi and G. Spotorno, *Biochimie*, **1980**, *62*, 575-580.
7. Y.F. Li, F.Y. J.R. Jia, Li, G. Liu and Y.Z. Li, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2001**, *33* (part 1), 29-34.
8. E.A. Kulik, K. Kato, M.I. Ivanchenko and Y. Ikada, *Biomaterials*, **1993**, *14*, 763-769.
9. L. Shemer, R., R. Granot, A. Freeman, M. Sokolovsky and L. Goldstein, *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, *21*, 1607-1627.
10. V.V. Ryl'tsev, R.V. Virnik, N.Iu. Plekhanova and V.N. Filatov, *Radiobiologiya*, **1989**, *29*, 425-427.
11. A.D. Virnik, V.K. Gostishchev, N.R. Kil'deeva, P.I. Tplstykh and K.P. Khomiakov, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **1987**, *23*, 78-83.
12. J. Wang, (Qinghua Univ.), China Pat. 1302863, July 11, 2001; cf. *Chem. Abstr.* **2001**, *136*, 50295x.
13. K. Takakura, S. Satoh, K. Tsuyutani, Y. Sugihara and H. Hayashi, *Bull. Okayama Univ. Sci.*, **2000**, *36*, 225-234.
14. R. P. Afflick, "Recovery of Xylitol from Fermentation of Model Hemicellulose Hydrolysates using Membrane Technology" PHD thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2000, 26-39.