

CHROM. 11,245

APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE À L'ÉTUDE DES NITRILASES ET AMIDASÉS

J. C. JALLAGEAS

Laboratoire de Chimie Organique, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 Montpellier Cedex (France)

et

A. ARNAUD et P. GALZY

Chaire de Génétique et Microbiologie, École Nationale Supérieure Agronomique, 34060 Montpellier Cedex (France)

(Reçu le 12 mai 1978)

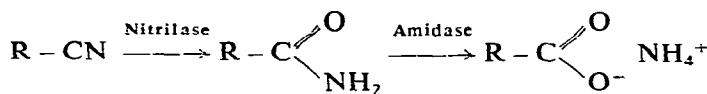
SUMMARY

Use of gas-liquid chromatography for the study of nitrilases and amidases

A gas-liquid chromatographic procedure is described for the determination of nitrilase and amidase activities. This method allows to monitor the kinetics of the hydrolysis of volatile nitriles and amides and because of its sensitivity, to determine the Michaelis constants K_m of the acetonitrilase and the acetamidase of *Brevibacterium* R 312. For these enzymes, a correlation is shown between the kinetics monitored by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas-liquid chromatography.

INTRODUCTION

L'hydrolyse biologique des nitriles et des amides met en œuvre des systèmes nitrilasiques et amidasiques:



L'étude de ces réactions enzymatiques présente des difficultés dues à l'absence de méthodes analytiques simples permettant de montrer la disparition ou l'apparition des produits impliqués.

La mise en évidence de ces activités repose généralement sur le dosage de l'ammoniaque¹⁻⁷. Seuls, Digeronimo et Antoine⁸ chez un *Nocardia* et Mimura *et al.*⁹ chez un *Corynebacterium* ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour l'étude du métabolisme de l'acétonitrile et du propionitrile.

La plupart des méthodes appliquées aux cinétiques d'hydrolyse des nitriles et

des amides sont délicates et discontinues^{1-7,10-12}. De plus, l'interférence des protéines exclut parfois toute utilisation de broyats bactériens bruts¹³.

Aussi, nous avons mis au point une méthode analytique simple en continu basée sur la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN)¹⁴. Cependant cette technique nécessite des concentrations importantes en substrat voisines de $10^{-1} M$ et n'est appropriée qu'aux réactions entraînant une différenciation importante au niveau des déplacements chimiques de certains hydrogènes du substrat et des produits de réaction. Ceci limite son utilisation lors des études de systèmes enzymatiques; en particulier elle ne permet pas de déterminer les constantes de Michaelis, K_m , des enzymes.

Nous avons donc recherché une méthode simple plus sensible permettant une analyse rapide et en continu de solutions de nitriles et de leurs produits d'hydrolyse. Dans ce but, nous avons adapté la chromatographie en phase gazeuse, déjà appliquée pour l'identification de ces composés^{8,9}, à l'étude des cinétiques d'hydrolyse de nitriles et d'amides. Cette technique n'avait été utilisée en discontinu précédemment que dans deux cas particuliers: l'hydrolyse de l'acétate de naphthyle par une estérase du foie de bœuf¹⁵ et la réduction de l'acétylène en éthylène par une nitrogénase chez différents organismes^{16,17}.

La présente note décrit l'application de la CPG à l'étude de l'hydrolyse biologique des nitriles et des amides pour la mise en évidence qualitative de ces réactions et l'analyse des cinétiques correspondantes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique

Nous avons utilisé une souche de *Brevibacterium* appelée R312, à activité nitrilasique. Les conditions d'isolement et les spectres nitrilasiques et amidasiques ont été précédemment décrits¹⁸⁻²⁰.

Conditions de culture

La souche R312 est cultivée sur un milieu à base de yeast carbon base Difco à la concentration de 1.17%. La source azotée est soit l'acétonitrile, soit l'acétamide. Ces deux composés sont à la concentration finale de 0.5% (p/v). Le pH du milieu est amené à 6.5 au moyen de potasse. Les cultures sont faites dans les deux cas en erlenmeyers remplis au dixième de leur volume; elles sont soumises à l'agitation à 28° (80 oscillations/min, amplitude 8 cm). L'ensemencement est effectué au moyen d'une préculture sur le même milieu.

Techniques de broyage

Les techniques de broyage ont été précédemment décrites²¹.

Origine des produits utilisés

Tous les nitriles et leurs produits d'hydrolyse, à l'exception de quelques amides, sont des produits commerciaux. Certains amides ont été obtenus par action de l'acide chlorhydrique sur les nitriles en milieu acide formique²².

Conditions d'hydrolyse des nitriles et amides par les cellules entières

Les cellules bactériennes (20 à 40 g de matière sèche par litre) sont mises en suspension dans une solution aqueuse à 4% de nitrile ou d'amide ajustée au préalable à pH 7 et soumise à l'agitation pendant 4 à 5 h. Après centrifugation, le surnageant est analysé par CPG.

Appareillage

Les analyses en CPG sont faites au moyen d'un chromatographe Girdel série 300 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Un intégrateur-calculateur LTT modèle ICAP 5 est utilisé pour mesurer les surfaces des pics.

La colonne utilisée est une colonne inox d'une longueur de 50 cm et d'un diamètre de $\frac{1}{8}$ ème de pouce. Elle est garnie de Porapak Q (80-100 mesh). Les conditions de température sont: détecteur 300°, injecteur 250°, four 130° à 250° suivant la nature du composé étudié. Les débits gazeux sont les suivants: air 400 ml/min, hydrogène 25 ml/min et azote 30 ml/min.

Des courbes d'étalonnage ont été établies dans le domaine des concentrations utilisées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Identification des nitriles et de leurs produits d'hydrolyse

La détermination des activités nitrilasiques et amidasiques repose sur la mise en évidence de la disparition des substrats: nitriles ou amides, et l'apparition des produits d'hydrolyse: amides ou acides, caractérisés par leur temps de rétention en CPG. Aussi dans un premier temps, nous avons testé, en chromatographie, les nitriles les plus communs et leurs produits d'hydrolyse correspondants. Il convient de préciser que l'analyse des acides organiques n'est possible que pour des solutions acides; d'autre part, certaines précautions opératoires, pour éviter les pics "fantômes" doivent être prises dans la détermination qualitative et quantitative de ces acides²³.

Seuls les composés suivants ont pu être mis en évidence en CPG dans les conditions utilisées: acétonitrile, propionitrile, butyronitrile, isobutyronitrile, valeronitrile, isovaleronitrile, pivalonitrile, acrylonitrile, méthacrylonitrile, crotononitrile, cyanure d'allyle et leurs amides et acides correspondants, cyanamide, formamide, benzonitrile, *o*-, *m*-, *p*-tolunitriles, malonitrile, succinonitrile, adiponitrile, nicotino-nitrile, isonicotinonitrile.

La température maximale d'utilisation de la colonne Porapak Q (250°) limite l'application de cette technique d'analyse aux composés assez volatils. Cette difficulté pourrait être détournée, soit par l'utilisation de nouveaux composés de remplissage de colonnes, soit par l'adaptation de la chromatographie en phase liquide à haute performance à de telles analyses.

La mise au point effectuée nous a permis de montrer que tous les nitriles et amides testés à l'exception de l'acrylamide et du méthacrylamide étaient hydrolysés par la souche R 312^{18,19}.

Étude des cinétiques de l'hydrolyse enzymatique de nitriles et d'amides

Les cinétiques sont effectuées en vase thermostaté, dans lequel on réalise un mélange de tampon et de substrat agité magnétiquement et préincubé pendant 2 ou 3

min. La réaction est déclenchée par addition de l'extrait enzymatique convenablement dilué. Des parties aliquotes du mélange réactionnel sont prélevées à intervalles de temps réguliers au moyen d'une seringue de chromatographie et injectées directement dans le chromatographe ce qui bloque instantanément l'activité enzymatique.

Les pourcentages d'hydrolyse sont calculés à partir des hauteurs ou des surfaces des pics. La surface ou la hauteur au temps 0 est obtenue à partir du pic correspondant à l'injection de la solution avant addition de l'extrait enzymatique et après correction pour tenir compte de la dilution. Chaque cinétique est répétée plusieurs fois afin d'effectuer une détermination moyenne de l'activité.

Le chromatogramme correspondant à une cinétique enzymatique d'hydrolyse de l'acétonitrile est représenté sur la Fig. 1. Si on trace la courbe donnant le pourcentage d'hydrolyse en fonction du temps (Fig. 2), on observe que la cinétique est rectiligne sur 7 min au minimum.

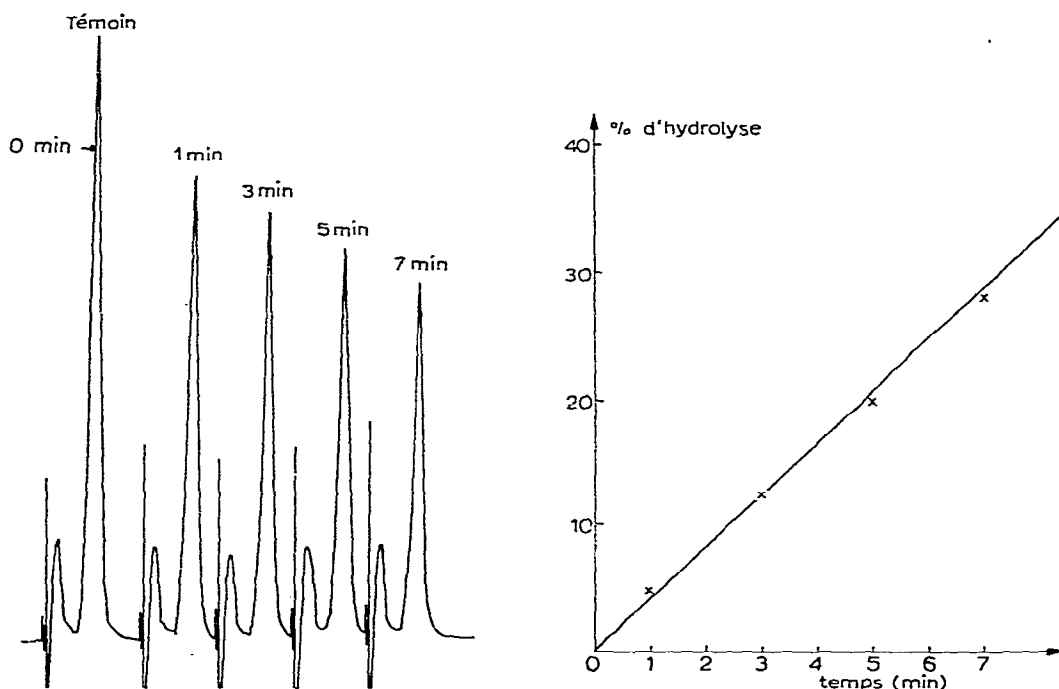


Fig. 1. Exemple de cinétique enzymatique en chromatographie en phase gazeuse. Mélange réactionnel: 1.6 ml de tampon phosphate 0.1 M pH 7; 0.4 ml d'acétonitrile 10^{-2} M et 0.5 ml d'extrait bactérien. Température, 25°; volume injecté, 5 μ l; atténuation, 1×16 .

Fig. 2. Hydrolyse enzymatique de l'acétonitrile en fonction du temps à 25°.

Il est ainsi possible de mesurer les vitesses d'hydrolyse pour les différents nitriles et amides précédemment mentionnés.

Cette méthode, du fait de sa sensibilité, nous a permis de déterminer les K_m d'une acétonitrilase²¹ et d'une acétamidase²⁴, ce qui nécessitait l'utilisation de concentrations en substrat comprises entre 10^{-3} M et 10^{-2} M.

Pour ce faire, nous avons effectué des cinétiques avec une concentration constante en extrait enzymatique et des concentrations variables en acétonitrile ou acétamide. Il est ainsi possible de calculer la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration initiale en substrat. La Fig. 3 représente un exemple de détermination de K_m pour l'acétonitrilase de R 312: les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat sont exprimées en coordonnées inverses selon Lineweaver et Burk.

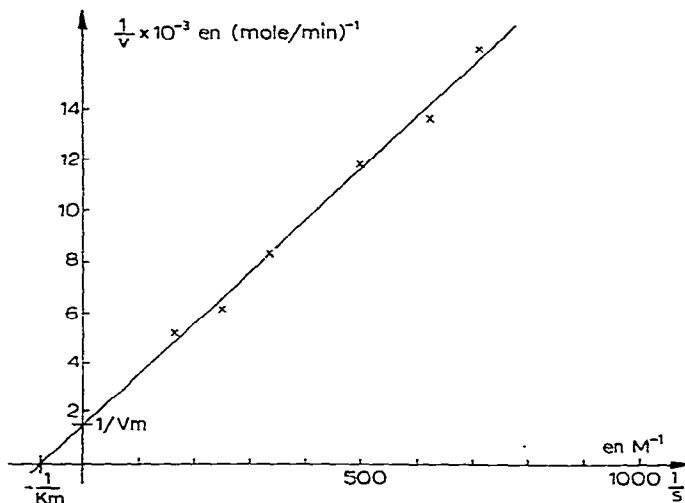


Fig. 3. Détermination du K_m de l'acétonitrilase de R 312 à 25°.

Nous avons comparé, pour un même extrait enzymatique et pour des concentrations où cela était possible ($c \geq 10^{-1} M$), des cinétiques en RMN et en CPG. La Fig. 4, représentant les pourcentages d'hydrolyse de l'acétonitrile en fonction du temps obtenus par les deux techniques, montre une très bonne corrélation entre la RMN et la CPG. Ceci est aussi valable pour l'hydrolyse de l'acétamide.

Pendant, la CPG est la technique la plus sensible; nous avons ainsi pu suivre des cinétiques d'hydrolyse de l'acétonitrile et de l'acétamide à des concentrations supérieures à $5 \cdot 10^{-4} M$. Pour des concentrations inférieures, une interférence entre un pic parasite de temps de rétention inférieur à 30 sec et le pic du substrat, diminue la précision de la méthode. La sensibilité est évidemment plus importante pour les nitriles et les amides à chaîne carbonée plus longue.

Une étude sur la reproductibilité de la méthode a montré qu'elle est très nettement comparable à celle des techniques classiques utilisées en enzymologie: spectroscopie UV, colorimétrie, etc. ou à celle de la RMN. Une simplification de la méthode, accompagnée d'une amélioration de la reproductibilité, pourrait être obtenue au moyen d'un système de prélèvement et d'injection automatique. C'est cette modification technologique que nous essaierons d'apporter lors de l'étude des nitrilases et des amidases, en particulier pour la détermination des K_m et V_m correspondant à l'hydrolyse de différents nitriles.

En conclusion, la détermination qualitative et quantitative d'un grand nombre de nitrilases et d'amidases peut être faite au moyen de la chromatographie

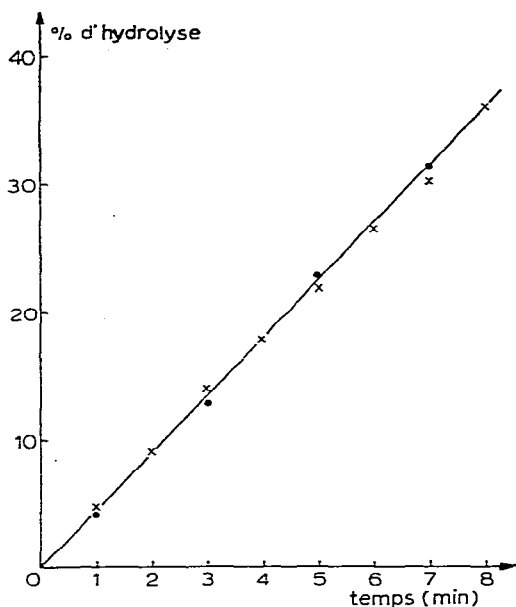


Fig. 4. Comparaison des cinétiques d'hydrolyse enzymatique de l'acétonitrile à 25° suivies par RMN (x) et CPG (●).

en phase gazeuse. Cette méthode est assez sensible, facile à mettre en œuvre et reproductible, mais elle est limitée aux nitriles et amides assez volatils. Son application pourrait être étendue à toutes les cinétiques enzymatiques impliquant des substrats ou des produits de réaction volatils, dosables par cette technique.

RÉSUMÉ

Un procédé utilisant la chromatographie en phase gazeuse est décrit pour la détermination d'activités nitrilasiques et amidasiques. Cette méthode permet de suivre les cinétiques d'hydrolyse des nitriles et des amides volatils et, par sa sensibilité, de déterminer les constantes de Michaelis K_m d'une acétonitrilase et d'une acétamidase de *Brevibacterium* R 312. Une corrélation entre des cinétiques suivies en résonance magnétique nucléaire du proton et en chromatographie en phase gazeuse, pour ces enzymes, est effectuée.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. S. Thimann et S. Mahadevan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 105 (1964) 133.
- 2 W. G. Robinson et R. H. Hook, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 4257.
- 3 D. B. Harper, *Biochem. J.*, 167 (1977) 685.
- 4 D. B. Harper, *Biochem. J.*, 165 (1977) 309.
- 5 J. D. Findlater et B. A. Orsi, *Anal. Chem.*, 58 (1974) 294.
- 6 Y. Z. Huang, *Anal. Chem.*, 61 (1974) 464.
- 7 H. C. van Anken et M. E. Schiphorst, *Clin. Chim. Acta*, 56 (1974) 151.
- 8 M. J. Digeronimo et A. D. Antoine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 31 (1976) 900.
- 9 A. Mimura, T. Kawano et K. Yamaga, *J. Ferment. Technol.*, 47 (1969) 631.

- 10 A. Szewezuck, *Chem. Anal.*, 4 (1959) 971.
- 11 R. B. Bruce, J. W. Howard et R. F. Hanzal, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 1346.
- 12 M. W. Scoggins et J. W. Miller, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 152.
- 13 J. C. Jallageas, A. Arnaud et P. Galzy, résultats non publiés.
- 14 J. C. Jallageas, A. Arnaud et P. Galzy, *Anal. Biochem.*, (1978) soumis pour publication.
- 15 J. G. Navarro et E. S. Cornwell, *J. Chromatogr.*, 138 (1977) 423.
- 16 R. H. Burris, *Methods Enzymol.*, 24 (1972) 415.
- 17 W. D. P. Stewart, G. P. Fritzgerald et R. H. Burris, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 58 (1967) 2071.
- 18 A. Arnaud, P. Galzy et J. C. Jallageas, *C. R. Acad. Sci. Ser. D*, 287 (1976) 571.
- 19 A. Arnaud, P. Galzy et J. C. Jallageas, *Rev. Ferment. Ind. Aliment.*, 31 (1976) 39.
- 20 A. Arnaud, P. Galzy et J. C. Jallageas, *Folia Microbiol.*, 21 (1976) 178.
- 21 A. Arnaud, P. Galzy et J. C. Jallageas, *Agric. Biol. Chem.*, 41 (1977) 2183.
- 22 F. Becke, H. Fleig et P. Pasler, *Liebigs Ann. Chem.*, 749 (1971) 198.
- 23 J. C. Du Preez et P. M. Lategan, *J. Chromatogr.*, 124 (1976) 63.
- 24 J. C. Jallageas, A. Arnaud et P. Galzy, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 24 (1978) 103.