Nouveaux matériaux biohybrides multifonctionnels pour la biocatalyse

Rima Mahdi

▶ **To cite this version:**

Rima Mahdi. Nouveaux matériaux biohybrides multifonctionnels pour la biocatalyse. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22648 . tel-01674166

HAL Id: tel-01674166
https://theses.hal.science/tel-01674166

Submitted on 2 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'Ordre : 2648

CLERMONT UNIVERSITE – UNIVERSITE BLAISE PASCAL
(U.F.R. Sciences et Technologies)

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES
N°: 852

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
Spécialité : Chimie

Par

Rima MAHDI

Master Recherche Chimie Organique de l'Université Libanaise

Nouveaux matériaux biohybrides multifonctionnels pour la biocatalyse

Soutenue publiquement le 11 décembre 2015, devant la commission d'examen :

M. Renato Froidevaux	Professeur (Université Lille 1)	**Président et rapporteur**
M. Didier Tichit	Directeur de Recherche – CNRS (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier)	**Rapporteur**
M. Roland Wohlgemuth	Senior Scientist chez Merck (Suisse)	**Examinateur**
Mme Marielle Lemaire	Professeur (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	**Co-directrice de thèse**
M. Claude Forano	Professeur (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	**Co-directeur de thèse**
Mme Céline Laroche	Maitre de conférences HDR (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	**Co-directrice de thèse**

Maman

Sans ta présence, je ne serais jamais arrivée jusque-là. Il m'est impossible de trouver les mots pour dire à quel point je t'aime.

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein de trois laboratoires : Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB) et Matériaux Inorganiques (MI) de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) et Génie des Procédés Energétiques et Biosystèmes (GePEB) de l'Institut Pascal.

D'abord, je tiens à remercier mes directeurs de thèse à l'ICCF, **Marielle Lemaire** et **Claude Forano**, professeurs à l'Université Blaise Pascal, pour l'attention qu'ils m'ont portée durant ces trois ans, pour la qualité de leur encadrement tant sur le plan scientifique que sur le plan humain, pour leur patience, leur disponibilité, leurs conseils précieux ainsi que leur investissement dans la correction de ce manuscrit. Leurs expériences et leurs compétences ont permis l'accomplissement de ce travail. J'adresse mes remerciements également à la co-directrice de ma thèse à l'Institut Pascal, Madame **Céline Laroche**, Maitre de conférences à l'Université Blaise Pascal, pour son aide, ses conseils et son soutien.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur **Didier Tichit**, directeur de recherche CNRS à l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier et Monsieur **Renato Froidevaux**, professeur à l'université de Lille 1, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir acceptés de participer à ce jury comme rapporteurs.

Je tiens à remercier également Monsieur **Roland wohlgemuth**, Senior Scientist à Merck, pour sa collaboration avec notre équipe ainsi que pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

Un grand merci à Madame **Christine Guérard-Hélaine**, Maitre de conférences à l'Université Blaise Pascal, pour sa disponibilité, ses qualités humaines, son encadrement de qualité et son aide qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Je remercie également Madame **Vanessa Prévot**, Chargée de recherche-CNRS à l'Université Blaise Pascal, pour sa disponibilité, ses conseils ainsi que pour son aide précieux pour la microscopie. Je tiens également à remercier Monsieur **Philippe Michaud**, Professeur à l'Université Blaise Pascal pour son aide et ses conseils avisés.

Je remercie Mme **Véronique de Berardinis**, responsable du laboratoire de criblage des activités de bioconversion au génoscope, pour son aide concernant la production des enzymes.

Mes remerciements s‘adressent également à tous les membres permanents, chercheurs et techniciens des trois équipes **MI**, **SEESIB** et **GePEB**. Je n‘oublie pas de remercier tous mes amis des trois laboratoires, déjà docteurs ou futurs docteurs, avec qui j‘ai partagé tant de moments inoubliables.

Je remercie spécialement **ma famille au Liban** et en particulier ma mère pour sa confiance et son aide.

Pour finir, un grand merci s‘adresse à mes **amis libanais** à Clermont pour les jolis moments ainsi que pour leur encouragement. J‘ai pu compter sur votre présence pour dépasser beaucoup de moments difficiles.

Liste des abréviations

AAP	Aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica*
ABTS	2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
$AcOPO_3^{2-}$	Acétyl phosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AlP	Phosphatase alcaline
AK	Acétate kinase
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovine
CEA	Capacité d'échange anionique
CLEAs	Cross-linked enzyme aggregates
CLECs	Cross-linked enzyme crystals
CMC	Carboxyméthyl cellulose
DHA	Dihydroxyacétone
DHAK	Dihydroxyacétone kinase
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DERA	2-désoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase
D-F6P	D-fructose-6-phosphate
D-G3P	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
DDS	Dodécylsulfate
DMF	Diméthylformamide
E. coli	*Escherichia coli*
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
FruA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
FSA	Fructose-6-phosphate aldolase
FucA	Fuculose-1-phosphate aldolase
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GA	Glycolaldéhyde

GAm	Glucoamylase
GDH	Glycérol déshydrogénase
GDHt	Glycérol déshydratase
GePEB	Génie des Procédés Énergétiques et Biosystèmes
GK	Glycérol kinase
GI	Glucose isomérase
GOx	Glucose oxydase
GPI	Glucose-6-phosphate isomérase
GPO	Glycérol phosphate oxydase
HA	Hydroxyacétone
HB	Hydroxybutanone
HDL	Hydroxydes doubles lamellaires
HK	Hexokinase
HRP	Peroxydase de raifort
ICCF	Institut de Chimie de Clermont-ferrand
IDA	Acide iminodiacétique
KDa	Kilo Dalton
KDGA	2-céto-3-désoxygluconate aldolase
KDN	Acide 2-céto-3-désoxy-D-glycérogalactononulosonique
KDO	3-désoxy-D-manno-octulosonate
KDPG	2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate
KDPGal	2-céto-3-désoxy-6-phosphogalactonate
K_m	Constante de Michaelis
M^{II}	Métal divalent
M^{III}	Métal trivalent
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission
MI	Matériaux Inorganiques
MPS	Macrophomate synthase
MWNT	Nanotube de carbone multifeuillet
NAD^+	β-nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit

$NADP^+$	β-nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	β-nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NBNR	Nitrobenzène nitroréductase
NeuA	N-acétylneuraminic acid aldolase
NeuAc	Acide N-acétyl neuraminique
NTA	Acide nitriloacétique
NTC	Nanotube de carbone
LOX	Lipoxygénase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PCN	pH de charge nulle
PDOR	1,3-propanediol-oxydoréductase
PhoN	Phosphatase acide
PFK	Fructose-6-phosphate kinase
p.i.e.	Point isoélectrique
pK_{sp}	Constante de solubilité
PK	Pyruvate kinase
PLP	Phosphate de pyridoxal
ppi	Pyrophosphate
PTS	Phosphotransferase system
RAMA	FruA issue du muscle du lapin
RhuA	Rhamnulose-1-phosphate aldolase
SHMT	Sérine hydroxyméthyltransférases
SWNT	Nanotube de carbone monofeuillet
TA	Thréonine aldolase
TagA	Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase
TPI	Triosephosphate isomérase
TK	Transcétolase
XR	Xylose réductase

Sommaire

Introduction générale 1

Chapitre I : Etude bibliographique générale 5

I.1. Catalyse enzymatique 7

I.1.1. Actualités et enjeux 7

I.1.2. Les enzymes : catalyseurs biochimiques 10

I.1.2.1. Introduction générale sur les enzymes 10

I.1.2.2. L'immobilisation d'enzymes 11

I.2. Les hydroxydes doubles lamellaires: structures hôtes pour les enzymes 24

I.2.1. Structure des HDL 24

I.2.1.1. Description cristallochimique 24

I.2.1.2. Description cristallographique 26

I.2.2. Propriétés physico-chimiques des HDL 27

I.2.2.1. Propriétés d'échange anionique 27

I.2.2.2. Stabilité chimique et thermique 28

I.2.2.3. Propriétés morphologiques 29

I.2.3. Les biohybrides HDL/enzymes 29

I.2.3.1. Généralités sur les biohybrides HDL/biomolécules 29

I.2.3.2. Stratégie d'immobilisation des enzymes dans les HDL 31

I.2.3.3. Structure et morphologie des biohybrides 40

I.2.3.4. Interactions HDL/enzymes 41

I.3. Les aldolases 42

I.3.1. Définition et classification 42

I.3.2. La fructose-6-phosphate aldolase 50

I.3.2.1. Présentation 50

I.3.2.2. Application de la FSA en synthèse 53

I.3.3. Immobilisation des aldolases 56

I.3.3.1. Immobilisation par complexation 56

I.3.3.2. Immobilisation par liaison covalente 58

I.3.3.3. Immobilisation par réticulation 61
I.3.3.4. Immobilisation par adsorption 61
I.3.3.5. Immobilisation par encapsulation 62
I.4. Réactions en cascade enzymatique 69
I.4.1. Généralités 69
I.4.2. Cascades en phase homogène 71
I.4.2.1. Cascades pour la production du DHAP et son utilisation en synthèse 72
I.4.2.2. Cascades pour la synthèse de sucres et analogues 74
I.4.3. Cascade en phase hétérogène 79
I.4.3.1. Introduction 79
I.4.3.2. Cascades enzymatiques conçues dans des nanostructures 80
I.5. Problématique 87

Chapitre II : Etude de l'immobilisation de la Fructose-6-phosphate aldolase dans les hydroxydes doubles lamellaires 89

II.1. Introduction 91
II.2. Résultats 91
II.2.1. Introduction 91
II.2.2. ‗Immobilisation of FSA on Layered Double Hydroxides: toward efficient biocatalyst nanocomposites' en cours de préparation pour soumission à ‗*Journal of colloid and Interface Science*' 92
II.3. Conclusion 93

Chapitre III : Encapsulation de la fructose-6-phosphate aldolase dans une matrice hybride polysaccharide/HDL 119

III.1. Introduction 121
III.1.1. Généralités 121
III.1.2. Encapsulation des enzymes dans les polysaccharides 121

III.1.3. Nanocomposite HDL/polysaccharide 130

III.2. Encapsulation d'une enzyme dans les billes hybrides polysaccharides/HDL 131

III.2.1. Introduction 131

III.2.2. Matériels et méthodes 132

III.2.3. Résultats et discussions 132

III.2.3.1. Introduction 132

III.2.3.2. Criblage de polysaccharides 133

III.2.3.3. Polysaccharide-Layered Double Hydroxide-aldolase biohybrid beads for biocatalysed C-C bond formation' parue dans Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic . 134

III.3. Elaboration de matrices poreuses HDL-polysaccharide 146

III.3.1. Introduction 146

III.3.2. Matériels et méthodes 148

III.3.3. Résultats et discussions 148

III.3.3.1. Caractérisation de l'HDL 148

III.3.3.2. Préparation des mousses HDL/Polysaccharide 149

III.4. Conclusion 152

Chapitre IV : Conception de cascades enzymatiques pour la synthèse des sucres phosphorylés 155

IV.1. Introduction générale 157

IV.2. Elaboration des bionanoréacteurs HDL/enzymes pour la synthèse des composés phosphorylés 157

IV.2.1. Introduction 157

IV.2.2. Résultats 164

IV.2.2.1. Introduction 164

IV.2.2.2. Design of Artificial Metabolisms in Layered Nanomaterials for the Enzymatic Synthesis of Phosphorylated Sugars' parue dans ChemCatChem 165

IV.3. Synthèse des sucres phosphorylés de série L via une réaction en cascade enzymatique 190

IV.3.1. Introduction 190

IV.3.2. Résultats 192

IV.3.2.1. Introduction 192

IV.3.2.2. „Straightforward Synthesis of L-Terminally Phosphorylated Sugars via Multienzymatic Cascade Reactions‘ parue dans Advanced Synthesis & Catalysis 193

IV.3.2.3. Réalisation de la cascade en phase hétérogène 208

IV.4. Conclusion 208

Conclusion et perspectives 211

Annexes 217

Références bibliographiques 231

Introduction générale

Les systèmes biologiques présentent généralement une combinaison intelligente de processus fonctionnels, dynamiquement reliés entre eux en une harmonie extraordinaire. Imiter ou reproduire ces systèmes biologiques est devenu l'un des objectifs majeur en biotechnologie et plus précisément en biocatalyse. L'un des moyens pour atteindre cet objectif est de concevoir des cascades réactionnelles multienzymatiques *in vitro*. Ce concept en pleine émergence permet notamment la préparation stéréosélective de composés multifonctionnels en système *one-pot* respectant notre environnement et répondant aux principes de la chimie verte.

L'élaboration de biohybrides et de matériaux biomimétiques attire de plus en plus l'attention des chercheurs en raison de l'extrême diversité de leurs applications potentielles et grâce au contrôle toujours plus affiné de leurs propriétés. L'effet synergique généré lors de l'assemblage de matériaux inorganiques avec des molécules biologiques peut conférer aux biohybrides obtenus des propriétés différentes de celles de chacun des composants pris séparément. Les exemples de ce type d'assemblage sont nombreux, on peut citer par exemple l'immobilisation des enzymes dans des matrices inorganiques pour des applications en biocatalyse ou en tant que biocapteur ou encore l'encapsulation de principes actifs afin de contrôler leur relargage dans l'organisme. L'immobilisation des enzymes a souvent l'avantage d'améliorer leur stabilité ou leur résistance à des conditions extrêmes, de permettre leur réutilisation et faciliter leur séparation du milieu réactionnel. Cependant, le choix de la méthode et de la matrice d'immobilisation est d'une importance capitale. Ainsi depuis quelques années, l'immobilisation des enzymes dans des nanostructures inorganiques a démontré son efficacité grâce aux caractéristiques contrôlables à façon de ces matériaux. Plus particulièrement, les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) offrent des propriétés très intéressantes pour le confinement des enzymes. Leur structure bidimensionnelle ouverte, leur taux d'hydratation important, leurs propriétés de surface, leur biocompatibilité ainsi que les conditions douces de synthèse font de ces HDL des matrices de choix pour l'immobilisation des enzymes.

C'est dans ce cadre que mes travaux de thèse se sont donc intéressés à la conception de nouveaux matériaux biohybrides pour la biocatalyse en choisissant d'une part d'élaborer un système hiérarchisé mixte HDL/polysaccharide capable d'immobiliser une enzyme et d'autre part d'explorer pour la première fois la capacité des HDL à co-immobiliser un système multienzymatique biomimétique. L'un des objectifs à terme est de proposer un procédé efficace de synthèse stéréosélective de composés multifonctionnels tels que des sucres phosphorylés. La fructose-6-phosphate aldolase (FSA) catalysant la formation stéréosélective de liaisons C-C pour conduire à des polyols chiraux a été choisie comme enzyme clé. Elle a été immobilisée récemment avec succès dans des HDL et sa polyvalence en biocatalyse a été largement démontrée au travers de nombreuses applications.

Ce travail collaboratif et pluridisciplinaire impliquant la biocatalyse et la chimie des matériaux s'appuie sur les compétences de trois groupes de recherche : le groupe Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL) de l'équipe Matériaux Inorganiques (MI) de l'Institut de Chimie de Clermont-Fd

(ICCF), le groupe Biocatalyse et Métabolisme (Biométa) de l'équipe Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB) de l'ICCF et enfin, l'équipe Génie des Procédés Énergétiques et Biosystèmes (GePEB) de l'Institut Pascal (IP). Ce travail est intégré dans un projet BIo3 " Matériaux hybrides innovants à propriétés de surface bioactives et biocatalytiques" financé par la région Auvergne et le FEDER (2012-2015).

Dans un premier temps, nous avons envisagé de revisiter de manière plus exhaustive l'immobilisation de la FSA dans les HDL conduisant à un bionanoréacteur nommé FSA@HDL. Dans un deuxième temps, la structuration à l'échelle macroscopique de ce dernier a été étudiée dans une matrice polysaccharide (FSA@HDL/polysaccharide) et son rôle en biocatalyse a été évalué. Dans un troisième temps après cette étude de bionanoréacteurs monoenzymatiques, nous nous sommes intéressés au développement d'un bionanoréacteur multienzymatique enzymes@HDL pour réaliser des cascades réactionnelles *one-pot* en phase hétérogène, permettant la synthèse de sucres phosphorylés. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des résultats antérieurs obtenus par le groupe Biométa lors de la conception de cascades dédiées à la synthèse de sucres de série D en phase aqueuse homogène. Puis nous avons envisagés l'extension de ce travail à la synthèse de sucres de série L.

Le manuscrit de cette thèse est structuré en quatre chapitres. Un premier chapitre bibliographique dresse un état de l'art concernant l'immobilisation des enzymes ainsi que la descripion des hydroxydes doubles lamellaires. Une description des aldolases, de leurs propriétés et de leur immobilisation est également présentée. Une dernière section est consacrée à l'étude des cascades enzymatiques en phase homogène et hétérogène. Les trois chapitres suivants sont consacrés à la présentation et à la discusssion des résultats. Le chapitre 2 traite de l'étude détaillée des différents aspects de l'immobilisation de la FSA dans les HDL. Dans le chapitre 3, nous présentons l'étude de l'immobilisation de la FSA dans une matrice hybride HDL/polysaccharide et son application en biocatalyse. Le chapitre 4 s'intéresse pour sa part aux réactions en cascade enzymatique. Une première étude a été menée sur la conception d'une cascade enzymatique en phase hétérogène en immobilisant les enzymes impliquées dans des HDL. Les bionanoréacteurs enzymes@HDL obtenus ont alors été exploités en biocatalyse pour la synthèse de sucres phosphorylés de série D. Une deuxième étude a été consacrée à la mise au point d'une cascade enzymatique en phase homogène pour la synthèse de sucres phosphorylés de série L. Les deux études avaient pour objectif commun de partir de substrats simples et achiraux pour répondre aux critères de la chimie durable.

Enfin, une conclusion générale clôt ce manuscrit de thèse et ouvre de nouvelles perspectives d'étude.

Chapitre I : Etude bibliographique générale

I.1. Catalyse enzymatique

I.1.1. Actualités et enjeux

L'évolution marquée et incontestable de la chimie vers la chimie verte permet de répondre aux nouvelles exigences de gestion des ressources de la planète et à la préservation de la qualité de notre environnement. Cette réorientation oblige les chercheurs à résoudre les défis scientifiques en termes de nouveaux concepts de synthèse ou d'optimisation des procédés existants, pour aller vers une chimie dite plus propre et plus durable. Cela nécessite une nouvelle approche qui vise à diminuer la consommation des matériaux et produits chimiques, l'intensité énergétique des procédés, à réduire ou éliminer la dispersion de produits chimiques nocifs dans l'environnement, à maximiser l'utilisation des ressources renouvelables et à prolonger la durabilité et la recyclabilité des produits d'une manière qui augmente la compétitivité industrielle. Une synthèse chimique idéale à l'échelle industrielle combine donc différents objectifs environnementaux et économique (Schéma I.1) permettant l'obtention de produits d'intérêt, avec de bons rendements, sans gaspillage et sans danger pour l'environnement, en partant de composés disponibles et non toxiques[1].

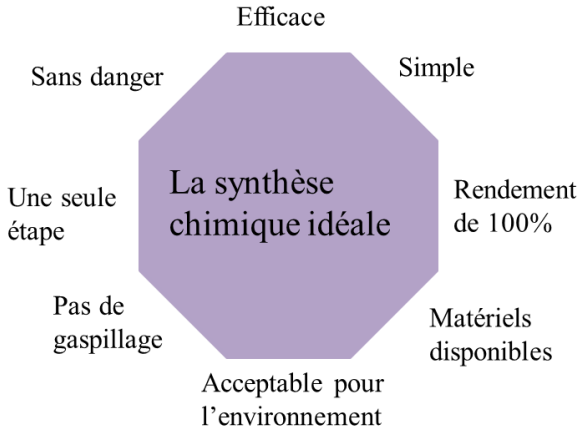


Schéma I.1 : La synthèse chimique idéale[1]

Parmi les domaines de la chimie concernés par la mise en œuvre des 12 principes de la chimie verte, la biocatalyse est apparue au cours des 15 dernières années, comme une alternative très complémentaire des voies de synthèse chimique classique en termes d'écoconception, d'efficacité chimique et énergétique et de sélectivité. L'utilisation des biocatalyseurs permet la synthèse stéréosélective écocompatible de produits tout en limitant la formation de déchets toxiques. De plus, 80% des réactions biocatalysées sont réalisées dans l'eau, ce qui limite l'utilisation des solvants

organiques toxiques. Enfin, les réactions biocatalysées permettent d'économiser de l'énergie en catalysant les réactions dans la plupart des cas à température ambiante.

Tout ceci a conduit à l'obtention de nombreux prix dont notamment ceux attribués par l'Agence américaine de protection de l'environnement EPA (US Environmental Protection Agency). Cette agence accorde cinq prix chaque année dans le cadre du *Presidential Green Chemistry Award Challenge*. Ces prix se focalisent sur le respect des 12 principes de la chimie verte et la sécurité des travailleurs. Ainsi, depuis 2000, 16 prix ont été attribués à des chercheurs en biocatalyse[2]. Pour cela, les chercheurs utilisent de plus en plus les biocatalyseurs pour préparer une large gamme de composés qui ont été traditionnellement préparés par des processus purement chimiques[3]. Cette émergence est due aux avancées majeures de la technologie de l'ADN et de la bioinformatique qui ont permis la découverte de nouvelles enzymes et/ou l'amélioration de biocatalyseurs existants. Les chercheurs ont ainsi pu améliorer les rendements des réactions, élargir les capacités catalytiques de certaines enzymes, augmenter leur sélectivité afin de limiter l'apparition des produits secondaires. Ces améliorations s'illustrent entre autres dans la synthèse enzymatique des macromolécules d'ADN et d'ARN, qui ne peuvent pas être obtenues aujourd'hui par des processus chimiques[4]. Dans le même registre, la synthèse chimique d'analogues de sucres nécessite plusieurs étapes de protection/déprotection, ce qui peut être évité en utilisant des enzymes[5].

Historiquement, la biocatalyse a consisté en l'utilisation de cellules bactériennes entières principalement selon des procédés nommés bioconversions. Les applications étaient limitées en raison de la complexité des voies métaboliques *in vivo* ou de la présence de multiples enzymes pouvant réagir avec un même substrat, l'utilisation des enzymes purifiées s'est alors révélée comme une alternative attractive. Les premières enzymes isolées à avoir été utilisées en synthèse sont les hydrolases (lipases, estérases, protéases, acylases et amidases). Puis, un certain nombre de biocatalyseurs ont été découvert et isolé, élargissant considérablement la boîte à outils pour les biotransformations[6]. Parmi ces enzymes, se trouve : les cétoréductases, les oxygénases, les alcools oxydases, les peroxydases, les halogénases, les aldolases…

Actuellement, grâce aux récents progrès dans le domaine du criblage génomique, une grande diversité d'enzymes est maintenant disponible sur le marché. La recherche d'un biocatalyseur aujourd'hui (Schéma I.2) commence par un criblage afin de sélectionner l'enzyme dotée des meilleures propriétés catalytiques. Cette enzyme est ensuite caractérisée biochimiquement. L'ingénierie[7] (l'évolution dirigée, la synthèse de gènes, l'analyse de séquences, la bio-informatique et la modélisation) permet la modification raisonnée de ses propriétés catalytiques (sa gamme de substrat, sa tolérance aux solvants organiques ainsi que sa spécificité). Cette enzyme peut alors être utilisée sous forme libre ou immobilisée, dans des réactions mono- ou multi-enzymatiques.

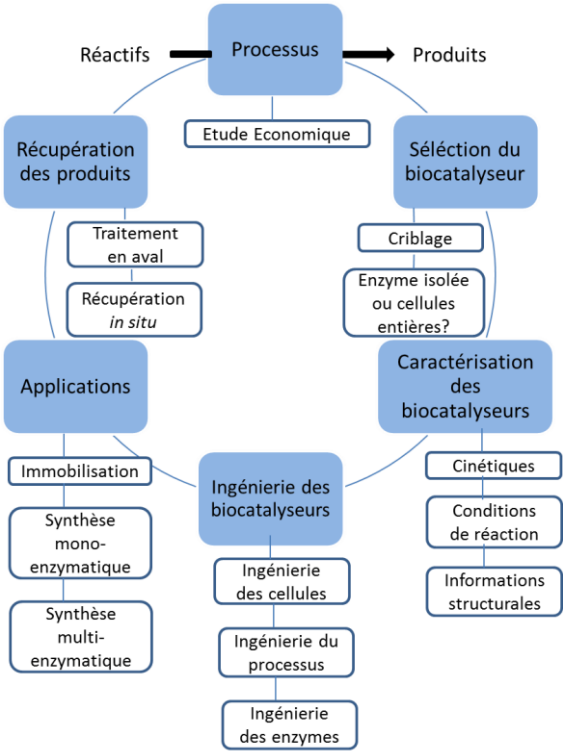


Schéma I.2 : Le cycle des biocatalyseurs[8]

D'un point de vue industriel, de nos jours, plusieurs centaines de procédés enzymatiques sont déjà utilisés, les enzymes et les cellules les plus impliquées ont été modifiées génétiquement[8].

Un des procédés industriels d'optimisation des réactions enzymatiques implique l'immobilisation des enzymes. Cela permet leur séparation du milieu réactionnel et leur réutilisation. Souvent, des améliorations en termes de plus grande stabilité dans une gamme de température et/ou de pH plus large sont également obtenues.

On retrouve les enzymes immobilisées dans de nombreuses applications biomédicales et industrielles : elles peuvent être utilisées comme des biocapteurs[9] pour le diagnostic médical et la détection des toxines dans les aliments et l'eau. Elles sont également employées dans l'industrie agro-alimentaire, pour la production d'antibiotiques comme les β-lactames[10], pour la production du biodiesel ainsi que pour la bio-remédiation.

De nouvelles stratégies d'immobilisation sont développées en continu pour élaborer des procédés enzymatiques toujours plus efficaces. Les développements récents dans la conception de nouveaux supports d'immobilisation ayant une porosité contrôlée et des fonctionnalités de surface, ont permis un contrôle plus sophistiqué du processus d'immobilisation. Il n'existe pas une méthode d'immobilisation universelle à toutes les enzymes. Des simulations des caractéristiques de surface des enzymes impliquées peuvent être utilisées pour aider à la conception du support approprié. Comme les structures et les mécanismes d'action des enzymes sont connus actuellement, des procédés d'immobilisation de plus en plus affinés permettant la préservation des activités catalytiques ont été

développés. Les recherches en matériaux biohybrides intégrant les fonctionnalités enzymatiques au sein même de matériaux organiques ou inorganiques visent à concevoir des biocatalyseurs plus innovants encore. Dans ce domaine, pour le développement de systèmes enzyme/matrice, on cherchera à mieux contrôler le microenvironnement entourant l'enzyme et à combiner le pouvoir catalytique de l'enzyme avec les caractéristiques physicochimiques de la matrice. On pourra ainsi accéder à un biohybride ayant des fonctionnalités améliorées par rapport à chacun des deux composants pris séparément. Ceci peut être illustré par deux exemples assez remarquables. Pour le premier, une augmentation de l'activité d'une aldolase de 157% a été évaluée après son immobilisation dans des mousses mésoporeuses de silice[11] et pour le second, une peroxydase immobilisée dans des nanotubes de carbone est devenue beaucoup plus stable à températures élevées et en présence d'un solvant organique[12].

Une autre stratégie d'optimisation des réactions enzymatiques est la conception de cascades multienzymatiques. Cela permet de synthétiser des composés chiraux via des procédés plus économes et plus respectueux de l'environnement. Il s'agit de réaliser plusieurs transformations enzymatiques selon un processus *one-pot* sans isoler les intermédiaires. Les avantages d'une telle stratégie sont les suivants : le déplacement favorable des équilibres gouvernant les réactions réversibles, la réduction du temps global et du coût total de la synthèse, la limitation de réactions secondaires, la minimisation des concentrations en intermédiaires toxiques et/ou instables. C'est un secteur de la biocatalyse en pleine émergence et de nombreuses cascades biocatalytiques ont été développées au cours de la dernière décennie pour produire des produits chiraux à haute valeur ajoutée comme des sucres phosphorylés et des acides aminés[13,14]. La mise en place de cascades comporte néanmoins des verrous techniques à lever comme trouver des conditions opérationnelles permettant le fonctionnement optimum de toutes les enzymes en même temps ou la levée des phénomènes d'inhibition dus à la présence simultanée de multiples produits.

En conclusion, la biocatalyse et toutes ses applications sont promises à un bel avenir dans ce domaine très large de la chimie durable et éco-compatible. Elle deviendra dans certains cas la *méthode de choix* et non plus prise par défaut, complémentaire des approches de la chimie traditionnelle.

I.1.2. Les enzymes : catalyseurs biochimiques

I.1.2.1. Introduction générale sur les enzymes

Les enzymes sont des protéines qui catalysent les réactions biochimiques et interviennent dans des processus métaboliques parfois très complexes. Elles sont très spécifiques, et c'est une propriété réellement remarquable. Par exemple, si une protéine moyenne contient 300 acides aminés, il existe

donc théoriquement 20^{300} (soit 10^{390}) copies possibles de ce biopolymère. L'univers dans tout son entier ne suffirait pas à contenir toutes les copies d'une seule enzyme. En effet, en chiffres « ronds », 10^{80} atomes sont estimés dans la partie accessible à nos yeux de notre univers. D'où l'idée de cette « redoutable » efficacité. Les enzymes permettent l'accès à la chiralité et donc sont fréquemment utilisées en synthèse organique pour obtenir des produits chiraux polyfonctionnels.

Les enzymes sont répertoriées en six classes[6], en fonction du type de réaction qu'elles catalysent :

1. oxydo-réductases (E.C.1) : ce sont les enzymes qui catalysent des réactions d'oxydoréduction. Exemples : déshydrogénase, oxydase, oxygénase, peroxydase.
2. transférases (E.C.2) : elles catalysent le transfert d'un groupe d'une molécule à une autre. Exemples : transaminase, glycosyltransférase, transaldolase.
3. hydrolases (E.C.3) : elles catalysent la coupure hydrolytique des liaisons carbone-azote, carbone-oxygène et carbone-carbone. Exemples : lipase, protéase, estérase, nitrilase, phosphatase.
4. lyases (E.C.4) : elles catalysent la coupure d'une liaison carbone-carbone, carbone-azote et carbone-oxygène. Exemples : décarboxylase, déshydratase, aldolase.
5. isomérases (E.C.5) : elles catalysent l'isomérisation d'une molécule. Exemples : racémase, mutase, épimérase.
6. ligases ou synthétases (E.C.6) : elles catalysent la formation d'une liaison (C-C, C-N etc.) entre deux molécules. Exemples : ADN ligase, pyruvate carboxylase.

I.1.2.2. L'immobilisation d'enzymes

I.1.2.2.1. Intérêt de l'immobilisation

Comme les enzymes sont des catalyseurs biologiques, ils peuvent être utilisés en théorie de façon répétée aussi longtemps qu'ils restent actifs. Cependant, dans la plupart des procédés en phase homogène, les enzymes sont mélangées en solution avec des substrats et ne peuvent pas être récupérées économiquement après la réaction ou même peuvent subir des réactions de dégradation. Ils sont donc en général à usage unique. Ainsi, il y a une incitation à utiliser des enzymes sous une forme immobilisée ou insolubilisée de sorte qu'elles puissent être plus facilement récupérées par séparation de phases et utilisées plusieurs fois.

L'immobilisation présente plusieurs avantages, elle permet le contrôle de la durée d'une réaction (l'arrêt de la réaction à n'importe quel moment est possible), la stabilisation de l'enzyme,

l'amélioration de ses propriétés catalytiques, la facilité de séparation et purification des produits, la réutilisation de l'enzyme. Tout ceci est important pour le secteur industriel.

L'amélioration des propriétés de l'enzyme[15], due à une rigidification partielle de la protéine, au changement de son environnement et au blocage de certains poches où une distorsion peut se produire[16] est l'un des avantages les plus remarquables de l'immobilisation. Parmi les caractéristiques enzymatiques améliorées, on peut citer les suivantes : énantiosélectivité et régiosélectivité (lipases[17,18], Pénicilline G acylase[19]) ; performance dans les synthèses cinétiquement contrôlées (Pénicilline G acylase[20], β-galactosidase[21]) ; inhibition réduite (β-galactosidase[22], protéases[23], nitrile hydrolases[24]) ; minimisation de la modification chimique par les produits secondaires de la réaction (par ex le peroxyde d'hydrogène[25]) ; réactivation de l'enzyme[26]. Donc, l'immobilisation peut être extrêmement utile et puissante dans l'amélioration des performances de l'enzyme[27].

Cependant, le choix du support, de la méthode et des conditions d'immobilisation est extrêmement important pour stabiliser les enzymes. Il a été montré que l'immobilisation de l'enzyme dans un solide poreux peut éviter quelques causes d'inactivation comme l'agrégation ou les interactions avec les surfaces hydrophobes[28,29]. En outre, la structure de l'enzyme peut être rigidifiée par attachement covalent multipoint ce qui la rend plus stable[16].

Par ailleurs le développement des nanomatériaux pour des applications en biodiagnostique, biosynthèse ou vectorisation a fait émerger une nouvelle famille de composés associant nanostructures inorganiques et fonctionnalités organiques ou bioorganiques[30] ciblant des performances nouvelles (amélioration de l'activité, de la sélectivité, des domaines d'utilisation). La structure hôte inorganique n'est plus simplement envisagée comme un support de la fonctionnalité biologique mais apporte ses propres propriétés chimiques (catalyseur acide, surface basique, médiateur redox) et physiques (conduction ionique, conduction électronique) dans une association synergique des 2 partenaires organiques et inorganiques. Ainsi, par exemple, dans le cas du greffage d'enzymes sur des nanotubes de carbone pour la conception de biocapteurs : les nanotubes permettent le transfert d'électrons entre l'enzyme redox et l'électrode grâce à leur bonne conductivité, de ce fait, plusieurs biocapteurs ont été construits selon ce concept[31].

I.1.2.2.2. Méthodes d'immobilisation

Historiquement, les enzymes ont été immobilisées en suivant plusieurs stratégies : l'encapsulation dans des capsules ou billes de polymères[32], le piégeage dans des matrices inorganiques[32], l'adsorption à la surface d'un support[33]. Ces trois méthodes d'immobilisation impliquent des interactions faibles ce qui permet le maintien de la flexibilité structurale et de l'activité

enzymatique. L'immobilisation peut se faire aussi par la formation de complexes avec des métaux.

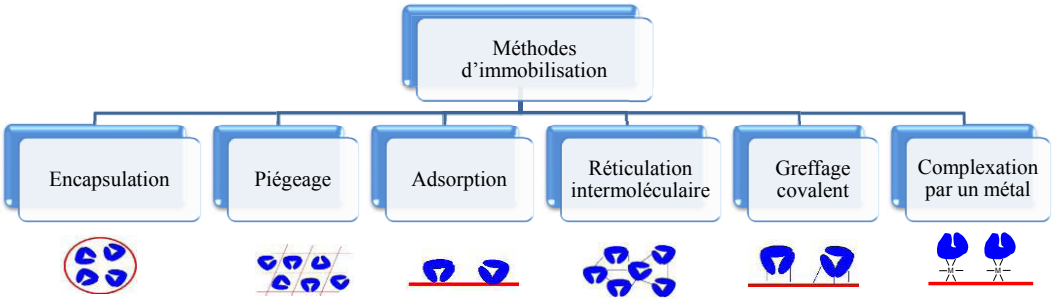


Figure I.1 : Les différentes méthodes d'immobilisation des enzymes

I.1.2.2.2.1. Immobilisation par adsorption[33] :

Cette méthode est basée sur l'adsorption physique d'une enzyme sur la surface d'un support insoluble dans l'eau. Elle consiste à mettre en contact l'enzyme avec le support dans des conditions appropriées de pH, température, force ionique etc. Les liaisons qui s'établissent entre le support et l'enzyme sont purement physiques (liaisons de van der waals, liaisons hydrogène, interactions électrostatiques). L'adsorption peut mettre en jeu des interactions faibles (physisorption) ou des interactions chimiques importantes (chimisorption). Les interactions entre l'enzyme et la matrice dépendent surtout des propriétés physico-chimiques de la surface ainsi que de la nature des groupements fonctionnels présents sur la surface de la matrice. Les enzymes ayant une large surface hydrophilique vont interagir avec des surfaces hydrophiles. La charge de surface de chacun des deux partenaires est un paramètre important qui caractérise l'intensité des interactions entre l'enzyme et la matrice. Ces interactions dépendent alors du pH de la solution, du point isoélectrique (p.i.e.) de l'enzyme et du point de charge nulle de la matrice (PCN). La chitinase (p.i.e.= 6.8) a été adsorbée[34] avec succès sur une kaolinite (argile cationique) à pH 4.6, pH auquel l'enzyme est chargée positivement.

Cette méthode est la plus directe pour immobiliser des enzymes parce qu'elle est simple à appliquer, généralement elle ne cause pas de changement conformationnel de l'enzyme et donc elle préserve son activité. À l'inverse pour certaines enzymes, l'adsorption peut aboutir à une amélioration des propriétés catalytiques par rigidification partielle de la structure. Pour illustrer cela, on peut citer le cas de l'adsorption d'une lipase sur des supports hydrophobes, où l'activité a été 20 fois plus importante que celle de l'enzyme libre. Il faut préciser qu'une lipase est une protéine qui fonctionne naturellement dans un environnement plutôt lipophile et présente un site actif hydraté protégé par une sorte de couvercle (partie de chaîne protéique qui s'ouvre et se ferme). L'augmentation de l'activité a

été expliqué par le changement de la conformation lors de l'immobilisation de la lipase : elle est alors adsorbée avec un site actif ‗ouvert', rendu plus accessible[35].

Comme autre avantage après adsorption, les problèmes de diffusion de substrats ne sont pas observés. Les inconvénients sont le relargage possible de l'enzyme ou une accessibilité trop grande pour les processus de dégradation (attaques chimique ou microbienne).

La surface spécifique d'une matrice, la taille des particules ainsi que la porosité sont des paramètres essentiels qui influencent le processus d'adsorption. L'immobilisation peut se faire sur la surface de la matrice, ou dans des pores accessibles. L'accrochage de l'enzyme dans des nanopores peut présenter un avantage par rapport à des macropores en limitant la mobilité de la protéine, la stabilisant de façon différente. Des particules plus petites fournissent une plus grande surface pour l'adsorption, conduisant à de plus grands taux d'encapsulation[36]. Les matériaux mésoporeux par la distribution homogène de la porosité ainsi que par leur géométrie de pores définie sont des matrices de choix pour l'immobilisation des enzymes[37].

I.1.2.2.2.2. Immobilisation par encapsulation[38]:

L'encapsulation des enzymes à l'intérieur de structures poreuses, de réseaux de gels ou de polymères est une autre méthode d'immobilisation physique. Les résultats de l'encapsulation sont influencés par les conditions de la réaction (pH, température, réactifs chimiques, solvants) ainsi que par le microenvironnement entourant l'enzyme, une fois immobilisée.

L'encapsulation peut améliorer la stabilité mécanique et minimiser le relargage. Cependant, l'inconvénient majeur de ce type d'immobilisation est la limitation de la vitesse de diffusion des substrats.

L'encapsulation des enzymes inclut leur piégeage dans les espaces interstitiels d'un polymère naturel ou synthétique et leur confinement dans des microcapsules ou billes de polymère. Elle se fait dans la plupart des cas par la formation de la matrice autour de l'enzyme par polymérisation ou gélification *in situ*. Les exemples sont nombreux : les polysaccharides, les polymères et les matrices inorganiques. La formation des matrices inorganiques se fait dans des conditions douces compatibles avec la préservation de l'activité enzymatique. L'utilisation des matrices inorganiques offre plusieurs avantages par rapport aux polymères organiques ou bio-organiques, en raison de leur rigidité structurale, leur biocompatibilité, leur stabilité chimique et thermique, leurs propriétés contrôlables de surface et de porosité, leur facilité de préparation ainsi que leur faible coût[38].

I.1.2.2.2.3. Greffage sur un support[38] :

Cette méthode est basée sur la formation d'une liaison covalente irréversible entre l'enzyme et le support. Les avantages de cette méthode sont la rigidification de la structure de l'enzyme d'une

façon irréversible grâce à la formation de plusieurs liaisons covalentes qui réduisent la flexibilité structurale et les vibrations thermiques. Cependant, la réaction de liaison doit être effectuée dans des conditions qui ne provoquent pas la perte de l'activité enzymatique, et le site actif de l'enzyme ne doit pas être affecté par les réactifs utilisés. Dans la plupart des cas, les groupements amino périphériques de l'enzyme sont impliqués dans la liaison covalente comme par exemple les résidus lysine. Cependant, d'autres groupements fonctionnels de l'enzyme peuvent être également impliqués (hydroxyle, carboxyle)[38]. Les groupements nucléophiles peuvent réagir avec un époxyde ou un aldéhyde présent sur la surface de la matrice[38].

Etant donné que l'enzyme est liée de manière covalente au support, très peu de fuite de protéines est observé.

I.1.2.2.2.4. Réticulation intermoléculaire[38] :

Les enzymes peuvent être immobilisées par réticulation intermoléculaire, ou par réticulation avec une autre protéine. Cette méthode cause partiellement la perte de l'activité enzymatique. Elle est généralement utilisée pour stabiliser les enzymes et pour éviter leur relargage. L'agent de réticulation le plus utilisé est le glutaraldéhyde[39]. Cet agent a plusieurs avantages: la réaction entre la protéine et le glutaraldéhyde est rapide, la modification de la protéine est irréversible et on attend que l'enzyme soit stabilisée dans des conditions de pH et de température plus étendues.

De nouvelles stratégies d'immobilisation se sont révélées intéressantes pour améliorer les propriétés enzymatiques comme les CLEAs[40] (cross-linked enzyme aggregates) ou les CLECs (cross-linked enzyme crystals). La préparation des CLEAs (ou des CLECs) commence par la précipitation (ou la cristallisation) de l'enzyme suivi d'une réticulation par un agent de réticulation, généralement un dialdéhyde comme le glutaraldéhyde. Les CLEAs et les CLECs ont par rapport aux enzymes libres une durée de vie et une stabilité opérationnelle sensiblement améliorée, ils sont facilement récupérables et sont complètement stable contre le relargage en milieu aqueux[40].

Dans les années 90, les CLECs ont été introduits en milieu industriel[41]. La méthode était applicable à une large gamme d'enzymes du moment que l'on puisse les faire cristalliser. Les CLECs ont montré une stabilité significative contre la dénaturation par la chaleur, les solvants organiques et la protéolyse comparée à l'enzyme libre. Ces biocatalyseurs ont été très intéressants à l'échelle industrielle grâce à leur stabilité opérationnelle, la taille contrôlée des particules ainsi que leur recyclabilité. Cependant, une limitation inhérente aux CLECs est la nécessité de cristalliser l'enzyme, une procédure laborieuse et coûteuse exigeant une enzyme de haute pureté[40]. De ce fait, la cristallisation a été remplacée par la précipitation, une méthode plus simple, moins coûteuse et ne nécessitant pas d'enzymes de grande pureté. Une nouvelle sorte d'enzymes immobilisées, les CLEAs, a été ainsi développée[42].

L'addition de sels, de solvants organiques miscibles à l'eau ou de polymères non-ioniques, aux solutions aqueuses de protéines provoque leur précipitation sous forme d'agrégats physiques qui sont maintenus ensemble par une liaison non-covalente sans perturbation de leur structure tertiaire. Le phénomène est réversible. L'addition d'eau à ces précipités entraîne leur dissolution. Par contre, la réticulation de ces agrégats par réaction des groupements fonctionnels de l'enzyme (via des résidus lysines) avec un agent bifonctionnel comme le glutaraldéhyde (Schéma I.3) rend ces agrégats insolubles sachant que l'on maintient leur macrostructure et leur activité catalytique[40]. La majorité des CLEAs qui ont été rapportés à ce jour concernent des hydrolases[43,40], puisque ces enzymes sont très utilisées à l'échelle industrielle.

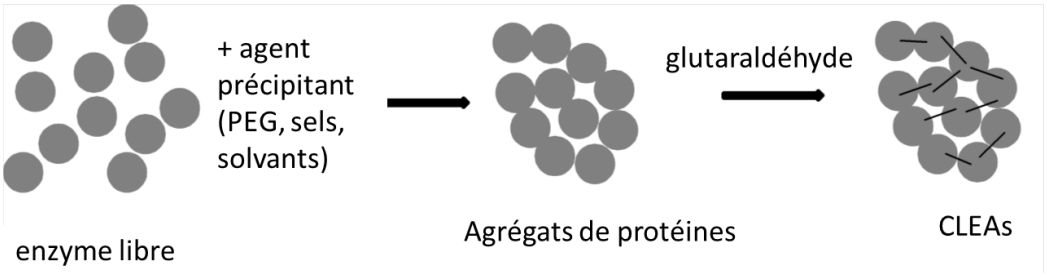


Schéma I.3 : Préparation des CLEAs[40]

I.1.2.2.3. Matrices d'immobilisation

I.1.2.2.3.1. Les polymères

Les polymères sont des macromolécules formés par la répétition d'un motif. Leur synthèse met en jeu une réaction de polymérisation qui consiste à associer des monomères par liaison covalente. La structure chimique et la conformation des chaînes confèrent aux polymères des fonctionnalités spécifiques (capacité à former des gels, capacité d'absorption d'eau). Ils sont couramment utilisés pour immobiliser des enzymes grâce à leurs propriétés mécaniques, thermiques et électriques. Les polymères peuvent être classés en deux catégories : les polymères naturels et les polymères synthétiques.

Polymères naturels

Les polymères naturels sont d'origine végétale, microbienne ou animale de milieux marins et terrestres. Les polysaccharides sont les polymères naturels qui ont été les plus étudiés et utilisés pour l'immobilisation d'enzymes[44]. Le Tableau I.1 présente quelques exemples d'immobilisation d'enzymes dans les billes de polysaccharides. Elle se fait généralement par encapsulation dans des

billes du polysaccharide. Les résultats de l'encapsulation dépendent fortement du type d'enzymes, du polysaccharide choisi et de la méthode utilisée. Des résultats contrastés ont été obtenus lors de l'encapsulation d'une β-glucosidase dans deux polysaccharides : l'alginate (240 U/mL) et le chitosane (1240 U/mL), sachant que le taux d'encapsulation de l'enzyme dans les deux gels était du même ordre (44-50%). Cette différence pourrait être due aux interactions ioniques entre l'enzyme et l'alginate qui désactivent l'enzyme[45]. On constate pour une estérase un taux d'immobilisation particulièrement bas (87 μg/g)[46]. Nous développerons l'étude complète de l'encapsulation dans les polysaccharides dans le chapitre 3.

Tableau I.1. Quelques polysaccharides utilisés pour l'immobilisation d'enzymes

Polysaccharide	Enzymes	Taux d'immobilisation (mg/g de supports)	Activité immobilisée	Réf
Alginate	Chlorophyllase	10.45	2.96 U/g	[47]
	Lipase	6.32	94.83 U/g	[47]
	β-glucosidase	-	240 U/mL	[45]
k-Carraghénane	Estérase	0.087	48%	[46]
	Lipase	4.68	41%	[48]
	Lipase	1.5	100%	[49]
Chitosane	β-glucosidase	-	1240 U/mL	[45]

Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont des polymères d'addition ou des polymères de condensation. Ils ont été largement employés pour immobiliser des enzymes[50]. Ils présentent plusieurs avantages par rapport aux polysaccharides : ils ont une meilleure stabilité chimique, mécanique et thermique sans oublier qu'ils sont moins exposés aux attaques microbiennes. Le Tableau I.2 montre des exemples d'immobilisation d'enzymes dans différentes formes structurales de polymères : des nanofibres, des particules (résines) et des membranes.

Les résultats de la littérature montrent que l'activité enzymatique retrouvée dans le biohybride n'est pas toujours directement proportionnelle au taux d'immobilisation. Un taux d'immobilisation de 100 mg de lipase par g de support a été obtenu en utilisant les résines de polyméthylméthacrylate alors que l'activité retenue n'est que de 43%. Par contre, en utilisant les nano-fibres de polyacrylonitrile, 21.2 mg de lipase ont été immobilisées par g de support avec une très bonne activité retenue de 81.3%.

Tableau I.2 : Quelques polymères synthétiques utilisés pour immobiliser des enzymes[51]

Enzyme	Support	Taux d'immobilisation (mg prot/g de support)	Activité retenue (%)	Réf.
α-Chymotripsine	Nano-fibres de polystyrène fonctionnalisé	14.0	65	[52]
Lipase	Nano-fibres de poly (acrylonitrile-*co*-maleicacid)	21.2 ± 0.71	37.6 ± 1.8	[53]
Lipase	Nano-fibres de polyacrylonitrile	21.2 ± 1.3	81.3 ± 1.1	[54]
Lipase	Composite de nanofibres de pristinepolystyrene/poly(styrene-co-maleic anhydride)	5.6 ± 2.2	16.5	[55]
Lipase	Résines de polyméthylméthacrylate	100	43.0	[56]
Lipase	Membranes de polypropylène	82.7 ± 2.6	57.5 ± 2.8	[57]
Lipase	Membranes de poly(acrylonitrile-co-maleic acid)	23.3	114	[58]

La recherche d'un effet amplificateur de la matrice sur l'activité enzymatique est un objectif important. Une impressionnante activité retenue de 114% a été obtenue en immobilisant une lipase dans des membranes de poly(acrylonitrile-co-maleic acid) en milieu organique, avec un taux d'immobilisation de 23.3 mg prot/g de support[58]. Ceci a été expliqué par les auteurs par des interactions hydrophobes qui sont à l'origine de l'augmentation de l'activité de l'enzyme immobilisée. La liaison covalente a pu également augmenter la stabilité de l'enzyme en milieu organique. Malheureusement ce n'est pas un cas général.

I.1.2.2.3.2. Matériaux inorganiques :

Les matériaux inorganiques sont couramment utilisés pour immobiliser des enzymes en raison de leurs caractéristiques de porosité et de surface spécifique variables. Parmi ces matériaux, on trouve les zéolithes, la silice, les argiles, etc.

Le Tableau I.3 présente les principales caractéristiques de différentes familles de matériaux inorganiques. Ces matériaux peuvent avoir différentes surfaces spécifiques selon la méthode de synthèse. Une large variété d'enzymes peut être immobilisée sur ces matériaux grâce à cette surface spécifique mais aussi grâce à leur porosité qui varie entre micro- méso- et macro-pores[31].

Les zéolithes

Les zéolithes sont des cristaux tridimensionnels microporeux formés d'un squelette alumino-silicate. Des cations et de l'eau sont situés dans les pores. Ce sont des échangeurs de cations et de minéraux.

Les zéolithes sont capables d'adsorber des molécules organiques ou minérales en solution aqueuse. Ces matériaux possèdent des micropores, d'une dimension qui rend impossible l'encapsulation des enzymes dans leur structure. Les propriétés des zéolithes comme l'acidité de surface et la composition en cations affectent le taux d'immobilisation et l'activité retenue des enzymes immobilisées[59]. Goncalves et coll. ont démontré que l'utilisation des zéolithes acides a un effet négatif sur la rétention de l'activité enzymatique[59].

La composition des zéolithes influence les résultats d'immobilisation notamment le rapport Si/Al. En effet, la composition en aluminium de la structure cristalline détermine la charge globale et joue sur les caractéristiques structurales (hydrophilie/hydrophobie, acide/base) du matériau. Goncalves et coll. ont testé plusieurs zéolithes non acides avec des rapports Si/Al différents pour immobiliser une cutinase. Les résultats montrent que l'activité retenue augmente quand le rapport Si/Al augmente, dû à une meilleure hydrophilie de la surface. Cependant, un relargage des protéines a été observé sans être quantifié[59].

La silice

Deux types de silice (SiO_2) sont utilisés pour immobiliser des enzymes : les nanoparticules de silice à surface spécifique élevée et les silices mésoporeuses à surface spécifique élevée. Le procédé sol-gel est particulièrement intéressant pour la production de gels de silice. Il permet de contrôler en utilisant des conditions douces c'est à dire proches de l'ambiante (température et pression), la taille des particules ainsi que leur morphologie grâce à la modulation des paramètres de la réaction. Le procédé sol-gel, correspondant à l'abréviation « solution-gélification », s'apparente au procédé de polymérisation utilisé en chimie des polymères. Un réseau macromoléculaire d'oxyde est créé lors de l'hydrolyse et de la condensation de précurseurs moléculaires généralement des alcoxides en milieu dissouts dans des alcools. Avant que l'état de gel ne soit atteint, une dispersion stable de particules colloidales (appélé sol) est obtenue. Une étape de vieillissement est ensuite indispensable pour obtenir un gel. A partir du sol ou du gel de nombreuses mises en forme sont envisageable selon le mode de séchage sélectionné.

Les matériaux obtenus par cette méthode sont très purs et biocompatibles. La structure moléculaire des silices contenant une large quantité d'eau durant l'encapsulation est bénéfique pour la conservation de l'activité et de la structure des enzymes.

Tableau I.3 : Caractéristiques des différents matériaux inorganiques

Argiles	Formule chimique	Structure	Echangeurs d'ions	Surface spécifique (m^2/g)	Porosité	Propriétés acido-basiques/ éléctroniques	Réf
Zéolithe Ex. Faujasite	$(Na_2,Ca,Mg)_{3.5}[Al_7Si_{17}O_{48}]$ .32(H2O)	3D	Cations	400-700	Micropores	Propriétés acido-basiques	60
Silice	SiO_2	2D ou 3D	Cations	300-1000	Mésopores	Propriétés acido-basiques	61
Argiles Ex. Montmorillonite	$[(Al_{2-x}Mg_x)(Si_4O_{10})(OH)_2][Na_x.nH_2O]$	2D	Cations	30-800	Micro-, méso ou macro- pores	Propriétés acido-basiques	62
Zirconium phosphate	$Zr(HPO_4)_2 \cdot nH_2O$	2D ou 3D	Cations	80-550	Mésopores	Propriétés acido-basiques	63
Nanotubes de carbone	Carbone	1D	-	400-900 (monofeuillets) 150-450 (multifeuillets)	Méso ou macro-pores	Propriétés électroniques (conducteurs)	64
HDL	$[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2{}^{x+}][X^{q-}_{x/q}.nH_2O]$	2D	Anions	20-85	Micro-, méso ou macro-pores	Propriétés acido-basiques	65

Soleimani et al. ont étudié l'immobilisation d'une α-amylase par adsorption sur des nanoparticules de silice pour l'utiliser dans des formulations de détergents afin d'améliorer sa résistance aux conditions drastiques[66]. Pour cette étude, les silices ont été choisies pour leurs propriétés de surface spécifique élevée, leur structure ordonnée, stabilité chimique et résistance vis-à-vis des détergents. Les silices ont des propriétés de surface acide en lien avec la liaison Si-O polarisée. Cette polarisation a des conséquences sur la protonation de surface, son pH. Le taux d'adsorption de l'α-amylase dépend donc de la compatibilité entre les propriétés de charge de surface des deux composants. Le pH optimal pour l'adsorption de l'enzyme est inférieur à 6, celui où les nanoparticules de silice sont chargées positivement et l'enzyme est chargée négativement. A un pH supérieur à 6, le taux d'enzyme adsorbée diminue, à ce pH les nanoparticules de silice sont chargées négativement. L'influence du rapport amylase/silice a été examiné, le pourcentage d'encapsulation le plus élevé obtenu était de 79% avec un rapport amylase/silice de 1/0.75. Le taux d'enzymes immobilisées est alors de 1056 mg/g de nanoparticules de silice. L'enzyme immobilisée a été plus efficace que l'enzyme libre dans les formulations avec des détergents[66].

Les argiles

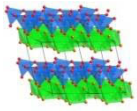
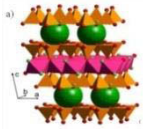
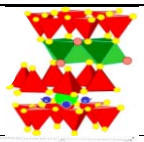
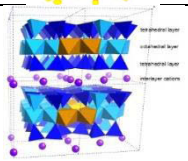
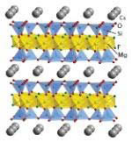
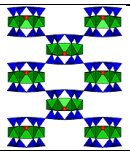
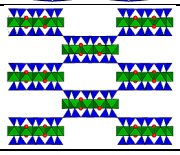
Les argiles sont des aluminosilicates naturels ou synthétiques lamellaires[67] à feuillets neutres ou chargés (smectites), fréquemment utilisées pour immobiliser des biomolécules et en particulier des enzymes. Leur intérêt provient de leur structure bidimensionnelle permettant l'échange de cations et l'intercalation de molécules et biomolécules, leur surface spécifique élevée, leur facilité de préparation et leur biocompatibilité. Le Tableau I.4 présente les argiles utilisées pour l'immobilisation d'enzymes.

Sinegani et coll. ont étudié l'immobilisation d'une cellulase dans plusieurs argiles : la kaolinite, la montmorillonite, la palygorskite et l'illite[68]. Le meilleur taux d'adsorption a été obtenu sur la palygorskite qui présente grâce à sa morphologie fibreuse, la plus grande surface spécifique. Il a été remarqué que l'immobilisation de la catalase (tétramère de 60kDa) dans ces argiles ne causait pas l'expansion de leurs structures cristallines.

La laponite permet la préparation d'électrodes enzymatiques ayant une haute sensibilité et contribue à la stabilisation longue durée du biocapteur. Shan et coll. ont préparé un biocapteur ampérométrique pour la détection du catéchol[69] en immobilisant la polyphénol oxydase dans la laponite. L'élaboration de l'électrode modifiée consiste à immobiliser l'enzyme dans un gel de laponite et à réticuler le mélange par le glutaraldéhyde puis à déposer l'hybride argile/enzyme à la surface de l'électrode. Cengiz et coll. ont montré que l'immobilisation d'une catalase dans la bentonite et la sépiolite[70] permettait d'améliorer notablement sa stabilité et ses propriétés catalytiques. La stabilité thermique à 45°C est meilleure une fois la protéine immobilisée. Cet effet protecteur induit néanmoins des modifications structurales de la protéine et en particulier au voisinage de son site actif. Ces changements sont attestés par les constantes de Michaelis (K_m) de l'enzyme immobilisée dans les deux argiles (55.6 mM pour la bentonite et 49.2 mM pour la sépiolite) qui sont plus basses que celle

de l'enzyme libre (116.8 mM). L'adsorption des enzymes à l'interface solide-liquide peut avoir un effet sur le pH optimal d'activité du fait des propriétés tampons des surfaces de matrices d'immobilisation. Dans le cas de cette étude, le pH optimal d'activité pour la catalase immobilisée dans la bentonite et la sépiolite est de 2 unités plus élevé que pour l'enzyme libre.

Tableau I.4 : Quelques argiles utilisées pour l'immobilisation d'enzymes

Argiles	Formule	Structure	enzymes
Kaolinite	$Al_2Si_2O_5(OH)_4$		cellulase[68]
Montmorillonite	$[(Al_{2-x}Mg_x)(Si_4O_{10})(OH)_2][Na_x.nH_2O]$		cellulase[68] glucoamylase[71]
Bentonite	$(Al_{2-y}Mg_y^{2+})(Si_{4-x}Al_x)O_{10}(OH)_2E^+_{x+y}.n$ H2O		catalase[72]
Illite	$[(Al,Mg,Fe)_2(Si,Al)_4O_{10}[(OH)_2][(K,H_3O).H_2O)]$		cellulase[68]
Laponite	$[(Mg_{3-x}Li_x)(Si_4O_{10})(OH)_2][Na_x.nH_2O]$	Colloidal synthetic hectorite 	polyphénol oxydase[69] uréase[73]
Palygorksite	$(Mg,Al)_2(Si_4O_{10})(OH)_4(H_2O)$		cellulase[68]
Sépiolite	$Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2.6(H_2O)$		catalase[70]

Dans un certain nombre d'études, l'immobilisation d'enzymes dans des argiles a conduit à des modifications structurales importantes dues à l'intercalation du polymère entre les feuillets de l'argile. Cela se traduit par une expansion du domaine interlamellaire, identifiée en diffraction des rayons X sur poudre par un déplacement des raies de diffraction (00l) vers les bas thêtas et une augmentation de la distance interlamellaire. Sanjay et Sugunan ont étudié l'immobilisation d'une glucoamylase (120 kDa, pH_{opt}= 4.5-5.0) par adsorption et par greffage covalent sur une montmorillonite activée par du silane[71] et ont mis en évidence une intercalation de la glucoamylase entre les feuillets de montmorillonite. La

glucoamylase étant une protéine de taille importante (10 nm), dans les conditions d'immobilisation utilisée, son intercalation complète n'a pas été observée. L'intercalation des chaînes latérales de l'enzyme explique l'expansion structurale obtenue, le squelette du polypeptide restant à la périphérie de la matrice. Les spectres de RMN confirment la forte attraction de l'enzyme par la matrice. Les mesures d'adsorption de diazote montrent une forte baisse de la surface et du volume des pores du support dans le cas de l'enzyme immobilisée par liaison covalente, ce qui indique le blocage des pores. L'activité retenue était de 49% pour l'enzyme adsorbée et de 66% pour l'enzyme immobilisée par liaison covalente. L'immobilisation a permis de gagner en stabilité thermique, mais a diminué l'affinité de l'enzyme envers son substrat (l'amidon), révélé par l'augmentation de la valeur de K_m.

I.1.2.2.3.3. Les nanotubes de carbone :

Les nanomatériaux à base de carbone constituent une famille variée de composés comprenant les fullerènes, les nanotubes simple ou multi-murs, les nanofibres, les graphènes, et dont les principales caractéristiques proviennent de leurs propriétés de conduction électronique, leur capacité à la fonctionnalisation ou greffage covalent, leur réactivité oxydante ou réductrice. L'association d'enzymes à ces matériaux est envisagée principalement pour l'élaboration de biocapteurs et la biocatalyse[74].

Les nanotubes de carbone (NTC) ressemblent à des feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes et fermés à leurs extrémités par des demi-sphères semblables à des fullerènes. On distingue deux familles de nanotubes : les monofeuillets (SWNT) et les multifeuillets (MWNT). Ces matériaux possèdent des propriétés exceptionnelles. Ils possèdent une rigidité excellente tout en étant légers. Ce sont de bons conducteurs électriques et thermiques. Ils ont des propriétés de surface spécifique importante. Lors du processus d'immobilisation, l'enzyme forme une dispersion stable et garde un microenvironnement hydrophile, ce qui est compatible avec la préservation de son activité et de sa structure. En plus, les propriétés électroniques uniques des NTC permettent le transfert d'électrons au sein de la matrice et donc améliore les propriétés catalytiques d'une enzyme redox immobilisée. Par exemple, l'HRP a été immobilisée par adsorption sur ces nanotubes. Les résultats montrent l'augmentation de l'activité de 7 à 9 fois dans l'eau par rapport à l'enzyme libre et de 1500 à 3500 fois dans des mélanges biphasiques eau-solvant organique[75].

I.2. Les hydroxydes doubles lamellaires: structures hôtes pour les enzymes

I.2.1. Structure des HDL

I.2.1.1. Description cristallochimique

Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) sont des minéraux qui s'apparentent à l'hydrotalcite naturelle $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3.4H_2O$ dans laquelle des cations divalents (M^{II}) ont été partiellement substitués (x) par des cations trivalents (M^{II}). La formule générale d'un HDL est donc $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2^{x+}][X^{q-}_{x/q}.nH_2O]$.

Ce sont des matériaux inorganiques constitués d'empilements alternés de feuillets plans d'octaèdres $M(OH)_6$ incluant des cations métalliques divalents et trivalents (Figure I.2). Ces feuillets ont une charge positive, la densité de charge est alors proportionnelle à la quantité de métal trivalent x = $M^{III}/(M^{II}+M^{III})$. Afin d'assurer l'électro-neutralité globale, les espaces interfeuillets contiennent des anions ainsi que des molécules d'eau comme représenté dans la Figure I.2. Les feuillets d'HDL ont une grande densité de charge liée à la valeur de x[76]. Leur structure lamellaire, leur composition chimique variable, leur capacité d'échange anionique, leur densité de charge variable ainsi que leurs propriétés rhéologiques rapprochent les HDL des argiles. C'est pourquoi, ils sont aussi appelés argiles anioniques.

Les éléments qui contribuent à la cohésion de la structure des HDL sont les suivants : les liaisons hydrogènes qui s'établissent entre les anions interlamellaires, les groupements hydroxyles des feuillets et les molécules d'eau et les interactions électrostatiques entre les anions et les feuillets métalliques.

Les métaux divalents et trivalents qui forment les feuillets appartiennent essentiellement aux périodes 3 et 4 de la classification périodique des éléments:

- métaux divalents : Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}...
- métaux trivalents : Al^{3+}, Cr^{3+}, Fe^{3+}, Co^{3+}, Mn^{3+}, V^{3+}, Ga^{3+}...

Les rayons atomiques sont de l'ordre de 0.65-0.80 Å pour les cations divalents et de 0.62-0.69 Å pour les cations trivalents (avec un seul exception, Al : 0.50 Å)[76].

Le rapport M(II)/M(III) peut varier selon les conditions de synthèse et les concentrations initiales en sels. Dans la formule générale $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2^{x+}][X^{q-}_{x/q}.nH_2O]$, x est la fraction molaire de M(III) par la quantité totale en métaux. En général, x varie comme suit : $0.10 \leq x \leq 0.33$.

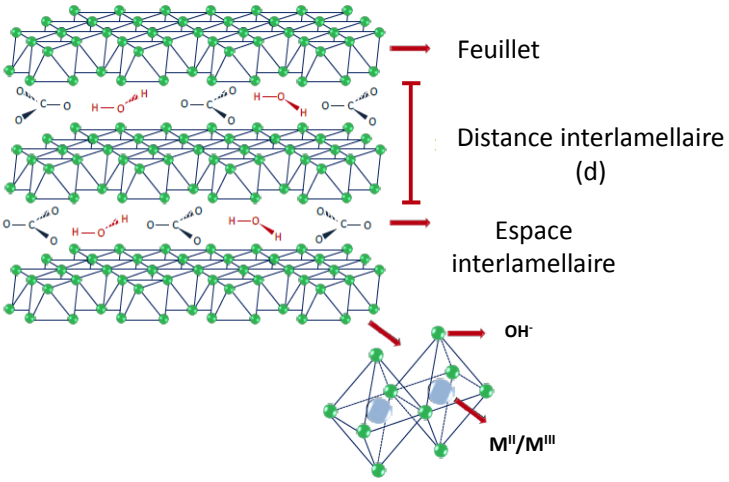


Figure I.2 : Structure des HDL[77]

Le domaine interlamellaire peut contenir des anions, des molécules d'eau ainsi que d'autres espèces chargées ou neutres. Dans la plupart des cas, uniquement des liaisons faibles se créent entre les ions ou molécules interlamellaires et la structure hôte. De ce fait, une grande variété d'espèces peut être localisée entre les feuillets durant la formation de la structure lamellaire ou par échange anionique. (Tableau I.5)

Tableau I.5 : Quelques compositions en anions de l'espace interlamellaire

Anions inorganiques	F^-, Cl^-, NO_3^- , CO_3^{2-}, ClO^-
Complexes	$[Fe(CN)_6]^{3-}$, $[Fe(CN)_6]^{4-}$, $[MCl_4]^{2-}$ (avec M=Pd, Pt, Ni),
Anions organiques	tartrate, malonate, téréphtalate, acétate, dodécylsulfate, acides aminés, cyclodextrine
Polymères	polyacrylate, polystyrène sulfonate, polyaniline, polyéthylène glycol,
Biomolécules	brins d'ADN, ATP, acides aminés, protéines, nucléosides, polysaccharides

Généralement, les HDL contiennent un taux variable d'eau, une partie se trouve dans le domaine interlamellaire, une deuxième est adsorbée sur la surface et une troisième est libre entre les particules. Le contenu en eau intrinsèque dépend de la nature, de la taille et de la concentration des anions et des conditions de lavage et séchage mais aussi de la nature des cations métalliques des feuillets[76].

Selon la taille, la charge et la disposition des espèces interlamellaires, l'espace entre les feuillets sera modifié. Du fait de la variété des cations qui forment les feuillets et des anions qui s'intercalent entre les feuillets, la famille des HDL comprend un nombre très important de composés.

I.2.1.2. Description cristallographique

La plupart des HDL de synthèse cristallise dans le groupe d'espace R-3m, structure hexagonale à symétrie rhomboédrique. Les études structurales[65] ont permis de déterminer les paramètres cristallographiques **a** et **c** (Figure I.3) de la structure ainsi que les distances et angles interatomiques.

La compréhension de l'organisation ordonnée, à courte et longue distance, des atomes ou des unités polyatomiques demeurent un sujet d'étude d'actualité car les propriétés d'ordre et de désordre affectent la réactivité et les propriétés physiques des matériaux en général. Les développements récents se sont focalisés sur les effets des contraintes microcristallines sur les distorsions locales ainsi que l'organisation des anions dans les espaces interfolliaires[78]. Les développements récents sur l'élaboration et la mise en forme de nanoplaquettes d'HDL et de nanocomposites HDL/polymères et HDL/biomolécules montrent les limites des investigations structurales par la technique de diffraction des rayons X. Les diffractogrammes de poudre ne permettent souvent que d'accéder à des valeurs approchées des paramètres de mailles à partir des quelques raies de diffraction visibles (00l et hk0) : a = 2 d(110) et c = 3d(003) où :

- « a » correspond à la distance entre deux cations métalliques voisins.
- « c » correspond à trois fois la distance entre deux feuillets hydroxylés.

La plupart des HDL sont décrits par les paramètres de maille hexagonale avec a = b ≈ 3 Å, c = mc_0, α = β = 90°, γ = 120°.

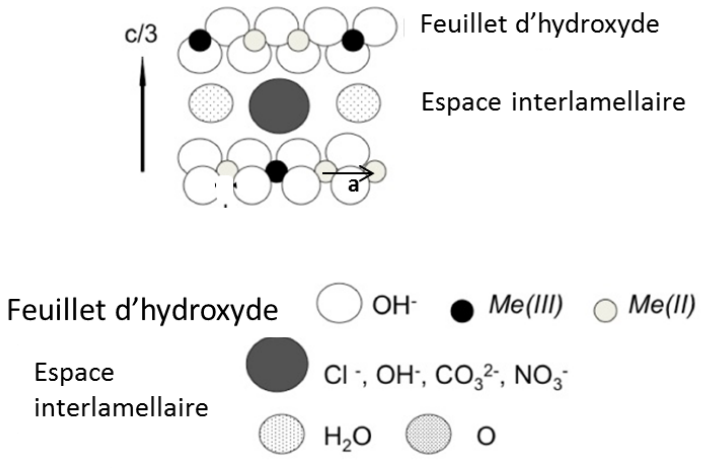


Figure I.3 : Paramètres structuraux des HDL

I.2.2. Propriétés physico-chimiques des HDL

Les HDL possèdent plusieurs propriétés intéressantes en lien avec la composition chimique variable des feuillets et des domaines interlamellaires.

I.2.2.1. Propriétés d'échange anionique

Une des caractéristiques remarquables des HDL est le fait que l'anion interlamellaire est échangeable. Grâce à cette capacité d'échange anionique, les HDL peuvent être utilisés comme adsorbants pour éliminer les polluants anioniques. La capacité d'échange anionique (CEA) des HDL dépend du rapport des cations, de la capacité de l'anion à stabiliser la structure lamellaire ainsi que des masses moléculaires des cations et des anions impliqués. Elle s'exprime en moles de charge électrique par unité de masse et dépend de la quantité de charges électriques positives portée par la surface des HDL. Comme reporté par Leroux et Besse[79] en 2004, les valeurs de CEA pour les HDL peuvent être entre 200 et 400 cmol/kg. Ces valeurs sont très importantes par comparaison avec celles des argiles.

En calculant les constantes d'équilibre des réactions d'échange, l'ordre de l'affinité des HDL pour les anions[80] a été listé pour les anions monovalents comme suit : $OH^- > F^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$ et pour les anions divalents: $CO_3^{2-} > C_{10}H_4N_2O_8S^{2-} > SO_4^{2-}$, sachant que l'affinité est plus grande pour les anions divalents que pour les anions monovalents. Ces résultats montrent la très forte affinité de la matrice HDL pour les ions carbonates et soulignent la nécessité de synthétiser, si nécessaire, les HDL sous une atmosphère exempte de CO_2 pour éviter la carbonatation. Les HDL contenant des nitrates ou des chlorures sont donc les meilleurs précurseurs pour l'échange anionique.

Cet ordre est la conséquence de la densité de charge des anions et de leur capacité à promouvoir des liaisons hydrogènes avec les feuillets. Donc les anions liés faiblement peuvent être remplacé par les anions qui se lient fortement par échange anionique. Ceci se fait simplement par l'agitation d'un mélange contenant l'HDL que l'on veut échanger avec le sel de l'anion que l'on veut intercaler.

La densité de charge des HDL varie de 0.25 à 0.40 charge/nm^2.[79] La densité de charge positive des HDL permet l'échange anionique ainsi que l'adsorption de molécules chargées négativement. Cette densité augmente avec l'augmentation du taux des ions trivalents dans les feuillets. La distance interlamellaire diminue avec l'augmentation de la densité de charges des feuillets grâce à l'attraction électrostatique entre les feuillets d'hydroxyde et les anions interlamellaires.

Le potentiel zêta mesure la charge de surface d'un composé. Sa valeur dépend fortement du pH. Le potentiel zêta est aussi très influencé par l'adsorption des anions ou l'échange anionique. Les potentiels zêtas ainsi que les PCN de quelques HDL sont présentés dans le Tableau I.6. Par exemple,

ce paramètre a été mesuré pour des HDL de type Mg_2Al-Cl et Mg_2Al-CO_3 à pH 8, les valeurs obtenues sont 41 et 34 mV respectivement[81].

Tableau I.6 : PCN et potentiel zêta de quelques HDL[82]

HDL	PCN	Réf
Mg_2Al-NO_3	11.39	83
Mg_2Al-CO_3	11.19	83
$Zn_{0.69}Al_{0.31}$-Cl	11.03	84
$Zn_{0.47}Fe_{0.26}Al_{0.27}$	10.00	84
$Zn_{0.27}Mg_{0.37}Al_{0.36}$	9.63	85
$Zn_{0.19}Mg_{0.60}Al_{0.21}$	10.60	85
HDL	**Potentiel zêta**	**Réf**
Mg_2Al-Cl (pH 8)	+41	81
Mg_2Al-CO_3 (pH 8)	+34	81
$Mg_{1.92}Al$-CO_3 (pH 7)	+30	86
$Mg_{1.92}Al$-CO_3 (pH 9)	+20	86

I.2.2.2. Stabilité chimique et thermique

La réactivité ou stabilité chimique des HDL en solution est une propriété très importante pour la conception de nouveaux matériaux qui doivent fonctionner dans des conditions d'interface avec des milieux liquides et en particulier des solutions aqueuses. L'évaluation de la stabilité chimique des HDL englobe principalement leurs propriétés de solubilité dans des conditions données de pH et leur réactivité d'échange dans le milieu de travail. La solubilité est évaluée par la constante de solubilité dans l'eau pK_{sp}. En prenant en compte les valeurs de pK_{sp}, la stabilité des HDL [M^{2+}-M^{3+}] a été classée comme suit[87] : $Mg^{2+} < Mn^{2+} < Co^{2+} \approx Ni^{2+} < Zn^{2+}$ pour les cations divalents et $Al^{3+} < Fe^{3+}$ pour les cations trivalents (pH = 6-10). Allda et al. ont montré que l'anion interlamellaire peut influencer la stabilité des HDL, ainsi les carbonates, les silicates et les borates diminuent la solubilité par rapport aux nitrates et sulfates qui l'augmentent[88].

Une autre propriété importante des HDL est leur stabilité thermique. La température de décomposition dépend de leur composition chimique (nature des cations et des anions, taux d'hydratation interlamellaire) et de leur structure (structure ordonnée, nature du polytype). La cristallinité des HDL affecte la cinétique de décomposition. La décomposition des feuillets se produit par déshydroxylation à des températures comprises entre 250°C à 300°C. Cette étape déterminante fait suite à l'élimination des molécules d'eau interlamellaires (processus continu entre 150°C-250°C) et se poursuit par la décomposition des anions interlamellaires à des températures plus hautes[65].

Les HDL étant stables dans la gamme de température à laquelle les enzymes peuvent l'être, cela laisse envisager une utilisation des enzymes dans des domaines de température et de pH plus large.

I.2.2.3. Propriétés morphologiques

Les propriétés physiques des HDL comme la surface spécifique, la porosité, la taille et la morphologie des particules, sont des propriétés extrêmement importantes qui conditionnent leur réactivité, leur mise en forme ainsi que leurs performances selon les applications recherchées. La variété des méthodes et conditions de synthèses permettant la préparation des HDL conduit à la conception de matériaux à morphologie contrôlée.

La surface spécifique des HDL dépend fortement de leur méthode de synthèse, elle est aussi reliée à leur composition cationique et anionique.

Pour les HDL préparés dans les conditions standards de coprécipitation, la surface spécifique[65] peut varier entre 20 et 85 m^2/g. Pour les MgAl-HDL contenant des anions comme les carbonates, les chlorures ou les nitrates, la surface spécifique est inférieure à 100 m^2/g[89–92]. Les traitements après la synthèse comme le vieillissement et les traitements hydrothermiques peuvent influencer la surface spécifique. Des valeurs dans la gamme de 111-289 m^2/g ont été mesurés pour des phases d'HDL (MgAl, NiAl, MgNiAl, MgCuAl, CoNiAl) synthétisées par la méthode sol-gel[93].

Les HDL sont avant tout des matériaux non ou faiblement poreux. La densité de charge élevée et la surface hydroxylée des feuillets favorables à l'empilement des feuillets et à l'agrégation des plaquettes en sont les raisons principales. La formation d'HDL poreux nécessite des stratégies de synthèses adaptées. Ainsi, il est possible de faire varier la porosité entre micropores, mésopores[77] et macropores[94].

La taille des particules d'HDL peut varier énormément selon la composition de l'HDL et sa cristallinité. Elle peut être contrôlée par un traitement hydrothermique après la synthèse. Les HDL contenant des anions inorganiques ont généralement une morphologie hexagonale[95]. Cependant, parfois des fibres sont obtenues[96].

I.2.3. Les biohybrides HDL/enzymes

I.2.3.1. Généralités sur les biohybrides HDL/biomolécules

L'association de molécules biologiques avec des matériaux inorganiques permet de combiner les fonctionnalités spécifiques des biomolécules (chiralité, reconnaissance et activités chimiques/biologiques) avec les propriétés des matériaux (propriétés mécaniques, électroniques, chimiques et magnétiques). Le développement de ces matériaux biohybrides multifonctionnels vise à

améliorer les propriétés et les performances de la fonction biologique immobilisée[82]. Un grand nombre de biomolécules (acides aminés, polypeptides, oligo- et polysaccharides, ADP, ATP, nucléosides, ADN,…) existent sous une forme anionique dans des conditions de pH proche de la neutralité ou basique et peuvent interagir favorablement avec les échangeurs anioniques tels que les HDL. En effet, les HDL ont la capacité d'intercaler et de confiner des biomolécules grâce à leur structure bidimensionnelle ouverte. La littérature rapporte l'immobilisation de biomolécules de tailles très différentes : acides-aminés, fragments d'ADN, protéines, virus et bactéries (Figure I.4).

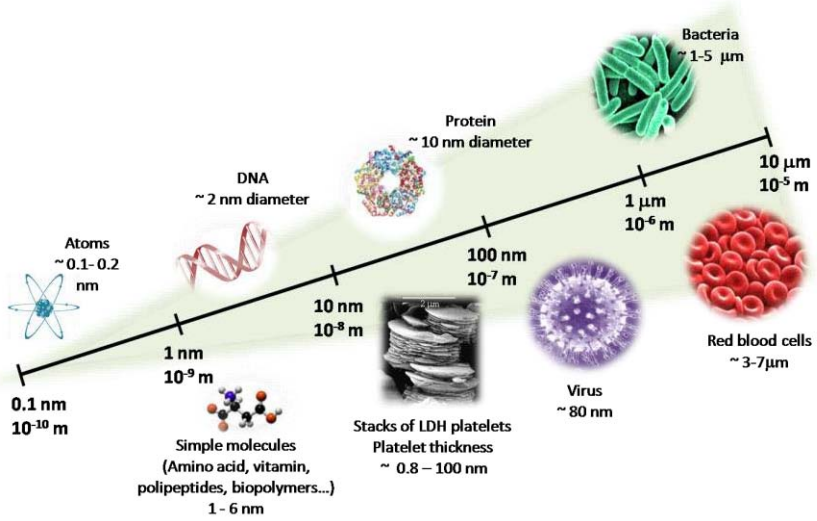


Figure I.4 : Immobilisation de biomolécules de diverses dimensions dans les HDL[82]

Un très grand nombre de biomolécules a été immobilisé dans les HDL : des acides aminés (L-phenylalaline[97], L-tyrosine[97], L-cystéine[98], phenylalanine[99,100], glycine[101]), des protéines (Albumine de sérum bovine (BSA)[102], hémoglobine[102], myoglobine[103]), l'ATP[104], le cytochrome C[105] ainsi que des molécules d'ADN[106]. Cette capacité remarquable est permise grâce aux conditions douces d'immobilisation sur les HDL, qui respectent la structure et la conformation des biomolécules. Les HDL possèdent des propriétés de surface et d'échange anionique qui permettent d'interagir avec les biomolécules par des interactions électrostatiques ou par des liaisons hydrogènes, ce qui facilite la formation de l'assemblage HDL/biomolécule. La variété des méthodes de synthèse disponibles fournit un grand choix de préparation de matrices HDL[82].

Récemment, les biohybrides HDL-enzymes ont trouvé plusieurs domaines d'applications en biocatalyse ou en tant que biocapteurs. L'immobilisation des enzymes dans les HDL permet la préservation des propriétés catalytiques des enzymes, l'amélioration de leurs stabilités chimique et thermique[107] et augmente la durée de stockage.

La plupart des biohybrides HDL-enzymes a été utilisée comme biocapteurs électrochimiques, pour détecter des substrats comme le glucose, les dérivés du phénol, l'urée, le cholestérol, le lactate, etc. avec des bonnes limites de détection[108]. Ainsi, l'uréase a été immobilisée dans l'HDL [ZnAl] par coprécipitation à pH constant afin d'utiliser le biohybride obtenu pour élaborer des biocapteurs

d'urée[109]. L'immobilisation s'est faite dans des conditions de chimie douce, ce qui a contribué à la préservation de la structure et de l'activité de l'enzyme.

Une grande partie des polluants environnementaux réagissent comme inhibiteurs des enzymes. Des biocapteurs ont été développés pour détecter le cyanure[110,111], l'arsenate[112] et le fluorure[110] à l'échelle nanomolaire. Tous ces polluants sont chargés négativement et peuvent donc s'adsorber à la surface de l'HDL.

La biodégradation de substances chimiques nocives comme les pesticides peut être réalisée en utilisant des bactéries qui le font par le biais de réactions catalysées par leurs enzymes. Besse-Hoggan et al. ont étudiés la biodégradation de l'atrazine par des bactéries (*Pseudomonas sp.*) adsorbées sur Mg_2Al-HDL. Ils ont déterminé que la biodégradation a été 26 fois plus importante en utilisant le biohybride que celui réalisé par les cellules libres. Les auteurs ont proposé plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène : pH local optimal pour l'action des bactéries (propriétés tampons de l'HDL), relargage du cofacteur Mg^{2+} des feuillets d'HDL (nécessaire pour l'action des bactéries), etc.[113,114]

I.2.3.2. Stratégie d'immobilisation des enzymes dans les HDL

L'élaboration de matériaux biohybrides HDL/enzyme est réalisée suivant deux stratégies principales. La première est basée sur l'assemblage de plaquettes d'HDL déjà formées avec l'enzyme à immobiliser, via un mécanisme d'adsorption ou d'échange anionique. L'utilisation de suspensions colloïdales de plaquettes délaminées permet d'améliorer la dispersion et le taux d'immobilisation d'enzymes.[82]

La deuxième stratégie concerne la formation *in situ* d'HDL en présence de l'enzyme dans des conditions douces de synthèse permettant la coprécipitation simultanée de l'HDL (coprécipitation) et de l'enzyme.[82]

Parallélement, la calcination/reconstruction est une autre méthode impliquant la déstructuration d'un HDL déjà préparé, pour le régénérer ensuite en phase aqueuse en présence de l'enzyme.[82]

Enfin la fonctionnalisation de surface peut être obtenue par greffage covalent d'enzyme sur des feuillets HDL via l'utilisation d'un agent de couplage préalablement intercalé.[82]

Les HDL ont été utilisés pour immobiliser une grande variété d'enzymes (Tableau I.7) qui sont largement différentes par leurs structures, leurs propriétés ainsi que leurs mécanismes d'action. Comme le montre le Tableau I.7, la composition des HDL est très diversifiée.

Tableau I.7 : Enzymes immobilisées dans les HDL par différentes méthodes

Méthode d'immobilisation	Enzyme immobilisée	HDL	Références
Adsorption	Trypsine	Mg_2Al-Cl, Zn_2Al-Cl	[115]
	Lipase	Mg_4Al-NO_3, Zn_4Al-NO_3, Ni_4Al-NO_3	[116]
	Phosphatase alcaline	Mg_2Al-CO_3, Zn_2Al-Cl	[117]
	Uréase	Zn_RAl-Cl, R =2, 3, 4	[118]
	Lipase	Mg_4Al-dodecylsulfate Mg_4Al-NO_3, Zn_4Al-NO_3 Zn_4Al-dodecylsulfate	[119,120]
	Transcétolase	Mg_2AlNO_3, Zn_2AlNO_3	[121]
	aminopeptidase	Mg_2Al-CO_3	[122]
	Phosphatase acide	Mg_2Al-CO_3	[107]
	laccase	Mg_2Al-Cl modifié par le glutamate	[123]
	Alliinase	Mg_2Al-NO_3	[124]
	Lipase	Mg_3Al-SDS-KH550	[125]
	Lipoxygénases	Zn_3Al-azelate	[126]
Délamination/ réagrégation	Uréase	Zn_3Al–dodecyl sulfate Zn_RAl–Cl, R=2, 3, 4	[118,127]
	HRP	Ni-Al NO_3	[128]
	Lipase	Mg_2Al-NO_3	[102]
	β-galactosidase	MgAl-dodecylsulfate	[129]
Greffage covalent	Penicilline G acylase	Mg_2Al-CO_3	[130]
Calcination/ reconstruction	Phosphatase acide	$MgAl$-CO_3	[107]
	Penicilline G acylase	Mg_RAl-CO_3, R=1.6, 2, 3, 4 Zn_2Al-CO_3	[131]
	Lipase	Mg_4Al-NO_3	[132]
Coprécipitation	Trypsine	Mg_2Al-Cl, Zn_2Al-Cl	[115]
	Transcétolase	Mg_2AlNO_3, Zn_2AlNO_3	[121]
	Uréase	Zn_RAl-Cl, R = 2, 3, 4	[109,118]
	Phosphatase alcaline	Mg_2Al-CO_3	[133]
	FSA	Mg_2AlNO_3	[134]
	GOx	$NiAl$-NO_3	[135]

I.2.3.2.1. Immobilisation par adsorption

L'adsorption de macromolécules telles que les enzymes présentant des tailles, des répartitions de charge surfacique, des groupements fonctionnels variables à la surface d'échangeurs ioniques comme les argiles est un processus physique complexe qui n'a pas encore été décrit par un modèle thermodynamique intégrant les différentes contributions d'interactions. En effet, les surfaces d'argiles et en particulier les surfaces d'HDL, présentent une distribution de sites d'adsorption via des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques, des interactions de Van der Waals ainsi que des sites d'échange ionique. Pour chaque enzyme l'ensemble de ces interactions est mis en jeu. Malgré cette multiplicité d'interactions, la communauté scientifique s'accorde à modéliser les phénomènes d'adsorption des enzymes sur un support selon les modèles simples d'interactions gaz-solide décrit par les isothermes de Langmuir ou de Freundlich,[136] ces 2 modèles considérant des sites d'adsorption uniques. Concernant l'adsorption d'enzymes à la surface des HDL, peu d'études sont reportées dans la littérature.

L'adsorption de l'enzyme sur un HDL préparé peut fournir des informations sur l'affinité entre les deux composants. L'isotherme d'adsorption est un moyen utilisé pour identifier ces interactions, il est obtenu en traçant la quantité de produit adsorbé (**Cs**) en fonction de la concentration d'adsorbat à l'équilibre (**Ce**). Les isothermes d'adsorption sont classées[137] en quatre grands types (Figure I.5) : type C (partition Constante), type L (Langmuir), type H (Haute affinité) et type S (Sigmoïde). Les isothermes de la classe C se caractérisent par un partage constant entre la solution et le support. Les sites d'adsorption sont créés au cours du processus. Les isothermes de classe L impliquent des interactions fortes entre la molécule et son support, l'adsorption se produit en une seule couche, dans des sites d'adsorption énergétiquement équivalents qui ne peuvent contenir qu'une seule molécule par site. Les isothermes de la classe H présentent une partie initiale presque verticale, la quantité adsorbée apparaît importante à concentration quasiment nulle du soluté dans la solution. Les isothermes de classe S présentent, à faible concentration, une concavité tournée vers le haut. La première partie de la courbe correspond à une adsorption monomoléculaire, ensuite il se forme une couche multimoléculaire d'épaisseur indéfinie. Les molécules adsorbées favorisent l'adsorption ultérieure d'autres molécules.

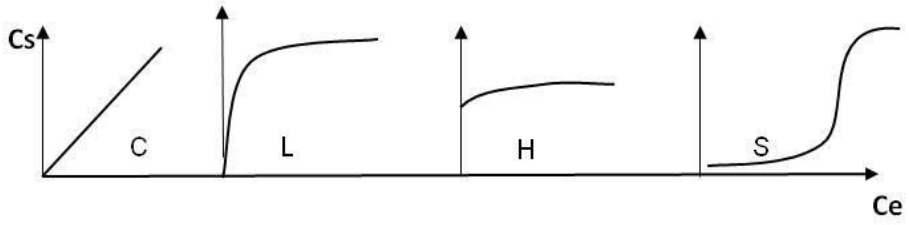


Figure I.5 : Différentes types d'isothermes d'adsorption

L'adsorption des enzymes sur les HDL a été évaluée par les isothermes d'adsorption. Les résultats montrent clairement l'effet des conditions de pH, de la surface spécifique, de la porosité de l'HDL, de sa composition ainsi que des caractéristiques de l'enzyme notamment son p.i.e. sur les résultats obtenus.

En général, les HDL montrent des grandes capacités d'adsorption à un pH plus haut que le p.i.e. de l'enzyme (Tableau I.8). L'adsorption de la lipase[138] (p.i.e.=5.5) sur un hydrotalcite synthétique augmente de 0.5 à 13 mg/g en augmentant le pH de 6.0 à 8.5.

Tableau I.8 : Isothermes d'adsorption et capacité d'adsorption maximale pour quelques biohybrides HDL-enzymes[82]

HDL	Enzyme	Type d'isotherme	Capacité d'adsorption maximale (mg prot/g)	Réf
$Zn_{0.66}Al_{0.33}$-Cl (pH 7)	Uréase (p.i.e. 5.1)	Freundlich	325	118
$Zn_{0.75}Al_{0.25}$-Cl (pH 7)	Uréase (p.i.e. 5.1)	Freundlich	228	118
$Zn_{0.80}Al_{0.20}$-Cl (pH 7)	Uréase (p.i.e. 5.1)	Freundlich	215	118
Mg_2Al-Lactate	Lipase (p.i.e. 5.5) de pancréas de porc	-	9000	139
Mg_2Al-Lactate exfolié	Lipase (p.i.e. 4.8)	-	22000	102,139
Mg_2Al-Lactate exfolié	BSA (p.i.e. 4.7)	Langmuir	350	102
MgAl-CO_3	Phosphatase acide (p.i.e. 5)	-	0.25	107
MgAl-CO_3 calciné	Phosphatase acide (p.i.e. 5)	-	0.25	107

L'adsorption des enzymes sur les HDL s'explique par les interactions électrostatiques mais aussi par la génération d'un réseau de liaisons hydrogènes comme les surfaces des HDL (12 OH/nm^2) et des protéines sont hautement hydrophiles[82].

Les résultats mettent en évidence le rôle de la composition chimique des feuillets sur la capacité d'adsorption. Les isothermes ont été modélisées par le modèle de Freundlich. On observe que les capacités d'adsorption maximales augmentent avec la diminution de R de 215 mg/g à 325 mg/g pour l'HDL Zn_RAl-Cl (R = 2, 3, 4), mettant en évidence une relation directe entre la densité de charge et le taux d'adsorption. Les études cinétiques ont montré que l'adsorption se fait très rapidement (moins d'une heure).

Les enzymes portant des groupements de surface négatifs (aspartate, pKa = 3,90 ; glutamate, pKa = 4,07) peuvent s'échanger avec les anions de compensation de charge des feuillets HDL positifs et être immobilisées irréversiblement à la surface. Les charges de surface apparaissent

déterminantes dans ce mécanisme et les conditions de pH ou de force ionique de la solution influencent nécessairement les réactions à l'interface solide/liquide.

L'intensité des interactions intervenant dans l'adsorption dépend donc de plusieurs facteurs physico-chimiques :

- la taille et la masse de l'enzyme, son p.i.e. et son potentiel zêta.
- la taille des particules d'HDL, leur PCN.
- les propriétés physico-chimique de la solution (pH, force ionique, nature du tampon) ainsi que de la température.

Le pH de l'adsorption est un paramètre clé qui peut fortement affecter l'adsorption de l'enzyme sur les HDL : la valeur du pH détermine la charge globale de l'enzyme qui est caractérisée par une charge positive à un pH inférieur à son p.i.e. et une charge négative à un pH supérieur. L'adsorption est alors efficace à un pH supérieur au p.i.e.[82]. De cette façon, l'alliinase (p.i.e. = 6.3) a été immobilisée par adsorption sur un HDL Mg_2Al-NO_3 à un pH de 8.2 où l'enzyme est chargée négativement[124].

La nature des cations divalents influence aussi l'adsorption d'enzymes puisqu'elle détermine en partie les propriétés de surface des HDL. Par exemple, une trypsine (p.i.e. = 10.1) a été adsorbée sur Mg_2Al-Cl et Zn_2Al-Cl à pH 7. Mg_2Al-Cl apparait comme meilleur support avec un taux d'immobilisation de 44% par rapport au Zn_2Al-Cl (15%)[115]. De la même manière, l'HDL Mg_2Al-CO_3 a montré une capacité d'adsorption plus importante pour une phosphatase alcaline (AlP) (84%) par rapport à Zn_2Al-Cl (52%). Le biohybride AlP@Mg_2Al-CO_3 était également plus stable dans une large gamme de pH que AlP@Zn_2Al-Cl[117]. Le même résultat a été obtenu avec la lipase : en changeant la composition des feuillets des HDL, différents taux d'immobilisation d'une lipase : 71%, 67% et 58% sont obtenus en utilisant le Mg_4Al-NO_3, le Zn_4Al-NO_3 et le Ni_4Al-NO_3 respectivement[119]. Dans toutes ces études, la capacité d'adsorption n'est pas ramenée par unité de surface spécifique ce qui limite l'évaluation de son effet.

La nature de l'anion interlamellaire peut aussi influencer le processus d'adsorption. Rahman et al.[119] ont démontré que la présence des anions organiques dans la composition des HDL comme le dodécylsulfate (DDS) ou le dioctylsulfosuccinate améliore l'adsorption de la lipase. Le pourcentage d'immobilisation de la lipase était de 70.8% sur le Mg_4Al-dodecylsulfate (531 mg/g) et de 36.9% sur le Mg_4Al-NO_3 (277 mg/g). Egalement, l'adsorption de la lipase[120] sur le Zn_4Al-dodecylsulfate a été plus efficace que sur le Zn_4Al-NO_3. La présence du composant organique améliore le pourcentage de l'immobilisation qui était de 79% (pour 63% sans le composant organique).

Un des principaux inconvénients de l'adsorption est la possibilité de relargage. L'aminopeptidase d'*Aeromonas proteolytica* (AAP) a été immobilisée par adsorption dans un HDL Mg_2Al-CO_3 pour optimiser la dégradation des hormones peptidiques. Le lavage du biohybride avec une solution saline (0.2 M NaCl) a causé le relargage de 15 à 20% de l'AAP[122]. Cependant, le

biohybride obtenu est réutilisable plusieurs fois sans perte importante de son activité. Du fait des petites quantités d'enzymes utilisées (rapports enzyme/HDL entre 1/1500 et 1/50), l'adsorption de l'AAP est totale après 15 min. L'analyse du biohybride obtenue par DRX montre que l'enzyme n'est pas intercalée entre les feuillets, mais adsorbée à la surface du matériau.

L'immobilisation d'extraits enzymatiques de cellules a été aussi réalisée par adsorption sur des HDL. Un Zn_3Al-azelate (CO_2^--$(CH_2)_7$-CO_2^-) préparé par coprécipitation, a été utilisé pour immobiliser l'extrait enzymatique de *Penicillium camemberti*, contenant une lipoxygénase (LOX)[126]. En immobilisant 40 mg de protéine dans 1 g d'HDL, le pourcentage d'encapsulation observé est de 99.3% et l'activité spécifique est de 76.2%. De la même façon, l'extrait enzymatique de *Saccharomyces cerevisiae* contenant une transcétolase (TK) a été immobilisé dans les HDL[121].

I.2.3.2.2. Immobilisation par délamination/réagrégation :

Afin d'accroître le taux d'adsorption d'enzymes par les phases HDL, la délamination des feuillets a été envisagée. La délamination des HDL est réalisée dans des solvants organiques (butanol, formamide) ou dans l'eau en utilisant des phases HDL échangées par l'anion lactate ($CH_3CHOHCO_2^-$) ou le méthoxyde (CH_3O^-). L'intercalation des solvants ou des anions diminue les interactions attractives feuillets/feuillets et conduit à la décohésion de la structure. Des nanoplaquettes de quelques feuillets empilés sont alors dispersées dans la solution. La réaction de ces solutions colloïdales d'HDL avec des solutions d'enzymes conduit à un assemblage HDL/Enzyme par transfert et précipitation dans la phase aqueuse. Cette méthode a permis le confinement de l'uréase[118,127], l'HRP[128], la lipase[102] et la β-galactosidase[129] dans les phases Zn_RAl-Cl (R = 2, 3, 4), $NiAl$-NO_3, Mg_2Al-NO_3 et MgAl-DDS respectivement. Dans le cas de l'immobilisation de la lipase et de l'HRP, un empilement de feuillets d'HDL et de l'enzyme, préférentiellement orientés a été obtenu après séchage[102,128].

Récemment, la β-galactosidase a été immobilisée dans un HDL MgAl préparé par délamination de MgAl-dodecylsulfate suivi d'une reconstruction de la structure lamellaire en présence de l'enzyme. L'immobilisation de l'enzyme a changé sa conformation d'une façon significative grâce aux interactions allostériques induites par le Mg^{2+}. Le biohybride obtenu a montré une activité catalytique 30 fois plus importante que l'enzyme libre, ce qui suggère que l'effet allostérique de Mg^{2+} joue un rôle essentiel dans l'amélioration de la performance de l'enzyme[129].

I.2.3.2.3. Immobilisation par greffage covalente :

Le greffage covalent est une autre méthode utilisée pour immobiliser et stabiliser les enzymes dans les HDL. La pénicilline G acylase a été immobilisée par liaison covalente dans les HDL en trois étapes[130]. Le glutamate a été intercalé dans les HDL puis réticulé avec du glutaraldéhyde. L'enzyme est ensuite accrochée par réaction de condensation avec le glutaraldéhyde (Schéma I.4). L'enzyme

immobilisée garde 40.6% de son activité initiale. Son stabilité thermique est améliorée : elle a gardé toute son activité à 50°C pendant 4h, des conditions qui causent la perte de 60% de l'activité de l'enzyme libre.

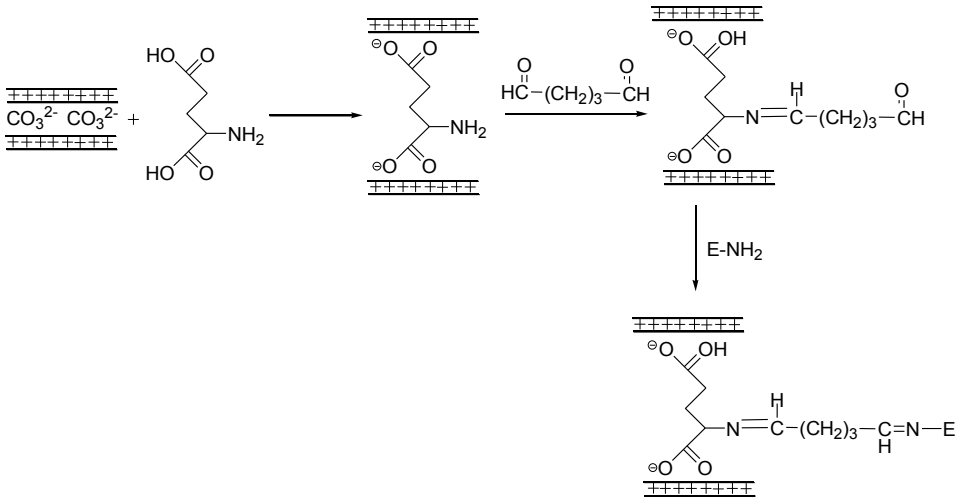


Schéma I.4 : Immobilisation de la PGA dans les HDL en trois étapes[130]

La fonctionnalisation de la surface des HDL par des agents de couplage, pouvant donner une condensation peptidique avec les résidus amines des chaines latérales de surface de l'enzyme, a permis d'obtenir des résultats d'immobilisation satisfaisants. Dans une approche comparable, une phase HDL MgAl-CO_3 coprécipitée a été traitée par de l'acide glutamique afin de réaliser un échange anionique. La diffraction des rayons X a montré que les anions glutamates n'ont pas été intercalés dans l'espace interlamellaire mais uniquement échangés en surface. La laccase de *Myceliophthora thermophilia*[123] a été immobilisée par condensation covalente entre les fonctions amine des lysine de l'enzyme et les fonctions glutamate des phases HDL sans agent activateur. L'activité retenue de l'enzyme est de 97%.

I.2.3.2.4. Immobilisation par calcination/reconstruction

Certains HDL (Mg-Al, Ni-Al) ont la propriété de pouvoir régénérer leurs structures lamellaires bidimensionnelles originales après calcination à des températures modérées (T < 500°C) et réhydratation. Cette propriété est mise à profit pour synthétiser des HDL ayant des compositions chimiques en anions difficile à obtenir par échange anionique direct. La méthode de synthèse consiste à calciner les HDL aux températures de déshydroxylation (300°C < T < 500°C) et de décomposition de l'anion pour obtenir des oxydes mixtes amorphes (composés dits préspinelle), avant cristallisation irréversible des oxydes simples et de la phase spinelle. La reconstruction de la structure d'HDL se fait alors en mettant ces oxydes mixtes dans une solution contenant l'anion à intercaler sous une atmosphère exempte de CO_2, si l'anion n'est pas CO_3^{2-}. La pénicilline G acylase a été immobilisée[131]

par adsorption sur des HDL calcinés, $Mg_RAl\text{-}NO_3$ (R = 1.6, 2, 3, 4) et $Zn_2Al\text{-}NO_3$. Les HDL calcinés possèdent une structure poreuse, une surface spécifique importante et un grand nombre de sites d'adsorption. Les résultats montrent que le pourcentage d'immobilisation diminue si R augmente, et que la matrice MgAl a une capacité d'adsorption supérieure à celle de ZnAl. Ceci est expliqué par la surface spécifique de ZnAl plus petite que celle de MgAl[131]. D'autres enzymes comme la phosphatase acide[107] et la lipase[132]ont aussi été immobilisées sur des phases HDL calcinées et reconstruites.

I.2.3.2.5. Immobilisation par encapsulation in situ (coprécipitation) :

Cette méthode consiste à ajouter les solutions de sel (contenant les métaux divalents et trivalents dans des proportions adéquates) et de base simultanément à une vitesse constante dans un réacteur contenant l'enzyme ou la protéine à immobiliser, à un pH constant et sous azote pour empêcher l'intercalation des carbonates. Le maintien du pH constant au cours de l'addition des sels permet d'obtenir un composé très homogène du point de vue de sa composition chimique. Lorsque l'addition est finie, le produit est centrifugé puis lavé plusieurs fois afin d'éliminer les biomolécules en excès.

La précipitation des HDL peut être conduite à des pH choisis sur une large gamme de valeur, compatibles avec la formation de la structure minérale et la stabilité de la biomolécule. Si le pH de coprécipitation est supérieur au p.i.e. de l'enzyme, alors globalement chargée négativement, son association avec les feuillets positifs est plus favorable. Ainsi, l'uréase[118], l'AlP[133], la trypsine[115], la FSA[134] et la TK[121] ont été immobilisées par coprécipitation directe avec des HDL. En utilisant cette procédure, la quantité de l'enzyme immobilisée peut être contrôlée en modifiant la densité de charge de l'HDL ou le rapport massique enzyme/HDL (Q). Selon les propriétés intrinsèques de l'enzyme, différents taux d'immobilisation sont observés d'une enzyme à l'autre. Pour $Q \leq 1$, un taux d'immobilisation de 100% a été trouvé par la coprécipitation directe de l'uréase[118] sur une matrice $Zn_RAl\text{-}Cl$ (R = 2, 3, 4) et de la FSA[134] (Q = 1) sur une matrice $Mg_2Al\text{-}NO_3$, tandis que pour la TK[121], 100% d'immobilisation (et 99% d'activité retenue) ont été trouvé pour un Q de 0.38 en utilisant deux phases qui sont Mg_2AlNO_3 (pH=9) et Zn_2AlNO_3 (pH=8). (Figure I.6).

La coprécipitation directe permet l'immobilisation d'une grande quantité d'enzymes en une seule étape. Il est souvent plus efficace que le processus d'adsorption. En plus, une fois les enzymes immobilisées par cette stratégie, aucun relargage n'est observé dans les solutions aqueuses[82]. La coprécipitation de l'enzyme dans les HDL donne des résultats différents (pourcentage d'immobilisation, activité retenue, stabilité au cours du temps) selon la nature de l'enzyme et/ou de la phase HDL utilisé.

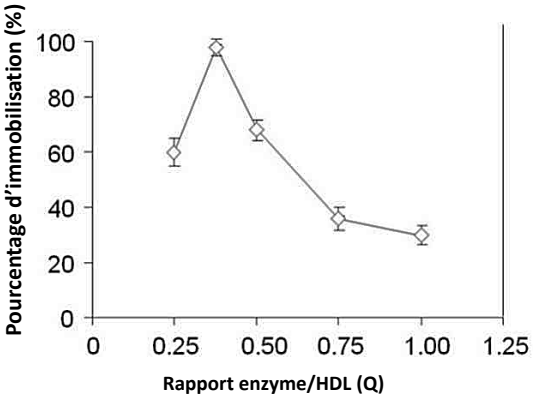


Figure I.6 : Influence du rapport Q sur le pourcentage d'immobilisation de la TK dans une phase Zn_2Al[121]

La FSA[134] et la TK[121] ont été immobilisées sur des phases Mg_2Al sans perte d'activité mettant en évidence que le site actif reste intact durant la coprécipitation. Au contraire, la trypsine[115] et l'AlP[133] immobilisées aussi sur des phases Mg_2Al, montrent une diminution de leurs activités avec rétention de 10% et 44% respectivement.

L'immobilisation dans les HDL a pour avantage de stabiliser l'enzyme au cours du temps. Ceci a été montré pour la TK[121], la FSA[134] où les biohybrides, stockés en tant que suspensions colloïdales, ont gardé toute leurs activités pendant plus de trois mois. De plus, les paramètres cinétiques et les propriétés catalytiques de ces biohybrides étaient comparables à ceux des enzymes libres. Les catalyseurs biohybrides étaient réutilisables : 80% d'activité ont été gardées après 6 cycles pour le biohybride TK@HDL et 87% d'activité ont été gardées après 4 cycles pour le biohybride FSA@HDL.

En outre, les conditions de stockage peuvent influencer l'activité enzymatique. Un séchage lent dans l'air a causé la perte de toute l'activité de l'AlP obtenu par coprécipitation[133]. Ce comportement s'explique par la perte de la structure originale de l'enzyme dû à la contraction de la structure organique après séchage du fait de la contrainte mécanique des feuillets HDL. Pour surmonter ce problème, il est préférable de stocker le biohybride à l'état de gel ou de suspension colloïdale dans un tampon. La lyophilisation peut apparaitre aussi comme une bonne alternative pour le stockage. Par exemple, la poudre lyophilisée du biohybride TK@HDL stockée pendant 3 mois à -18°C, garde 83-92% de son activité[121]. Par contre, le biohybride FSA@HDL perd toute son activité après lyophilisation[134].

I.2.3.3. Structure et morphologie des biohybrides

La structure et la morphologie des biohybrides HDL/enzyme obtenus dépendent fortement de la méthode de synthèse. L'adsorption des enzymes sur la surface de l'HDL maintient la structure de ce dernier ce qui se traduit généralement par un diffractogramme de rayons X typique d'un HDL comme cela a été montré dans le cas de l'adsorption de l'uréase sur la phase Zn_3Al-HDL[118]. On note parfois, cependant, en immobilisant la même enzyme par adsorption, une légère modification de la taille et de la morphologie par rapport à l'HDL référence[118].

D'autres méthodes de synthèse aboutissent à une forte modification de la structure et de la morphologie de l'HDL. La méthode délamination/réagrégation aboutit parfois à la perte de la structure ordonnée des HDL : le biohybride uréase@HDL obtenu par la méthode délamination/ réagrégation montre une forte diminution de la cristallinité (diminution de l'intensité des raies de diffraction et élargissement de certaines raies)[118]. Cependant, dans le cas de l'immobilisation de la lipase et de l'HRP par délamination/ réagrégation, un empilement bien organisé constitué des feuillets d'HDL et de l'enzyme a été obtenu après séchage[102,128]. Ceci dépend de l'intensité des interactions entre l'enzyme et l'HDL.

La coprécipitation aboutit en général à une forte déstructuration de cet empilement et réduit le nombre de feuillets empilés. La diminution de l'intensité du pic (001) et l'élargissement des raies confirment la réduction de la taille des particules. La préservation des pics (012) et (110) met en évidence la formation de la structure lamellaire. Cependant, la présence de l'enzyme joue un rôle sur la structure et la morphologie des HDL : les enzymes ont une large surface chargée négativement où se déroule la nucléation des HDL. La croissance cristalline se fait alors à l'interface liquide/enzyme et conduit à la formation d'un biohybride HDL/enzyme avec une déstructuration importante de la structure lamellaire et une diminution de la taille des particules. La perte de cet empilement ordonné augmente avec l'augmentation du rapport enzyme/HDL, induisant une transition progressive d'une structure anisotropique à une structure isotropique[118,133]. L'absence de raies (001) à des valeurs de thêta inférieures à 5°($\theta < 5°$) confirme que l'enzyme n'est pas intercalée entre les feuillets d'HDL[121,134]. Ceci est dû au fait que les enzymes utilisées sont volumineuses : les poids moléculaires de la FSA, la TK et l'AlP sont de 220, 150 et 156 KDa respectivement. En effet, l'intercalation ordonnée des enzymes n'a jamais été observé par cette méthode. L'immobilisation par coprécipitation conduit à une dispersion homogène de l'enzyme au sein de la matrice inorganique. Ceci génère une structure compacte 2D, ayant une architecture poreuse comme dans le cas de Zn_2Al-uréase[109] et le Mg_2Al-FSA[134]. La coprécipitation de MgAl-AlP conduit à la formation d'une structure ‗spongy gel-like' qui maintient l'intégrité structurale de l'AlP[133].

I.2.3.4. Interactions HDL/enzymes

La nature physique et chimique des supports, leurs nanostructures, leurs propriétés hydrophiles ou hydrophobes, leurs charges, ainsi que la nature des interactions établies entre la matrice et l'enzyme, influencent les caractéristiques biocatalytiques de l'enzyme. Le défi des applications des nanomatériaux est de contrôler la taille des particules et leur morphologie, pour permettre une immobilisation efficace des enzymes.

Un grand nombre d'enzymes a été immobilisé durant la formation des HDL où l'enzyme agit comme centre de nucléation. Les feuillets inorganiques se forment alors à la surface de l'enzyme, ce qui permet l'obtention d'une structure poreuse assurant la protection de l'enzyme mais aussi permettant la diffusion des substrats et des produits, ce qui est démontré par la préservation de la fonction catalytique des enzymes immobilisées[118,121,134].

Les interactions HDL/enzyme peuvent être caractérisées et identifiées par la spectroscopie infrarouge. Les spectres infrarouges des enzymes sont caractérisés par la présence de bandes correspondantes aux groupements amides : les bandes d'amide I ($\upsilon_{C=O}$ *stretching* et υ_{C-N} *stretching*) se situent entre 1600 et 1700 cm^{-1} et les bandes d'amide II (δ_{N-H} *bending*, υ_{C-N} *stretching* et υ_{C-C} *stretching*) sont présentes entre 1500 et 1600 cm^{-1}. Un réseau de liaison hydrogène est présent autour des groupements amides. Une dénaturation ou un changement de l'environnement de l'enzyme modifie ces interactions : les bandes des amides se déplacent alors. Ces bandes sont utilisées pour déceler les changements de structure. Lorsqu'une hélice α est dénaturée, la bande de l'amide I se déplace de 1650 cm^{-1} à 1640 cm^{-1}, par contre celle de l'amide II se déplace vers les hautes fréquences[82].

Les conditions douces de préparation des biohybrides enzyme/HDL permettent la préservation de la structure protéique. La coprécipitation du biohybride AlP@MgAl a conduit au maintien de l'intégrité structurale de l'enzyme : les spectres IR montrent que les hélices α n'ont pas été perturbées après l'immobilisation. Par contre, les liaisons hydrogènes entre la matrice et la protéine sont responsables du déplacement des bandes des amides II de 15 cm^{-1} vers les hautes fréquences.

Une forte amorphisation de la structure lamellaire a été remarquée dans le cas de l'immobilisation de la FSA[134] par coprécipitation avec un rapport HDL/enzyme de 1/1. Ceci est due à la perte de la cohésion structurale et de la rigidité des feuillets. Les auteurs ont noté un déplacement des bandes correspondantes aux amides I et II de la FSA de 43 et 17 cm^{-1} respectivement, dû au changement de l'environnement de l'enzyme. Cependant, aucun déplacement des bandes de l'uréase n'avait été observé après son immobilisation dans les HDL[118].

I.3. Les aldolases

I.3.1. Définition et classification

La réaction d'aldolisation est reconnue depuis longtemps comme l'une des plus utiles pour la synthèse organique. L'aptitude à former des liaisons carbone-carbone et à générer jusqu'à deux nouveaux centres asymétriques permet la synthèse d'une large gamme de composés polyfonctionnels. Le contrôle de la stéréochimie des produits de l'aldolisation peut se faire par l'utilisation des acides de Lewis chiraux[140], des organocatalyseurs[141] et des auxiliaires chiraux[142]. Par ailleurs, l'utilisation des enzymes et notamment des aldolases pour la formation de liaisons C-C est une alternative attractive pour plusieurs raisons : le procédé enzymatique est plus économique, non toxique, hautement spécifique et stéréosélectif. Il existe de nombreuses aldolases impliquées dans différentes voies métaboliques. Leur diversité et leurs propriétés catalytiques (notamment la stéréosélectivité) font de ces biocatalyseurs des outils bien établis en synthèse organique depuis de nombreuses années.

Les aldolases sont des enzymes qui appartiennent au groupe des lyases (EC 4.1.2). Elles catalysent l'addition stéréosélective d'un composé donneur (nucléophile) sur un composé accepteur (électrophile). Le schéma général de la réaction est présenté ci-dessous :

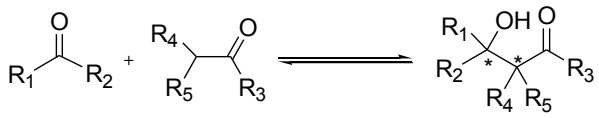


Schéma I.5 : La réaction d'aldolisation

Cette réaction consiste en une attaque du carbone α (nucléophile) d'un aldéhyde ou d'une cétone sur le carbonyle (électrophile) d'un autre aldéhyde ou cétone, générant ainsi un β-hydroxyaldéhyde ou une β-hydroxycétone.

Les aldolases sont généralement regroupées selon leur mécanisme catalytique en deux classes : on distingue ainsi les aldolases de classe I où l'intermédiaire réactionnel est une base de Schiff formée entre le substrat nucléophile et le résidu lysine de l'enzyme et celles de classe II où l'intermédiaire est un énolate. Les aldolases de classe II ont besoin d'un co-facteur, métal divalent (souvent Zn^{2+}), pour fonctionner. Le Schéma I.6 illustre les deux mécanismes simplifiés pour une aldolase dihydroxyacétone phosphate (DHAP)-dépendante de chaque classe.[143]

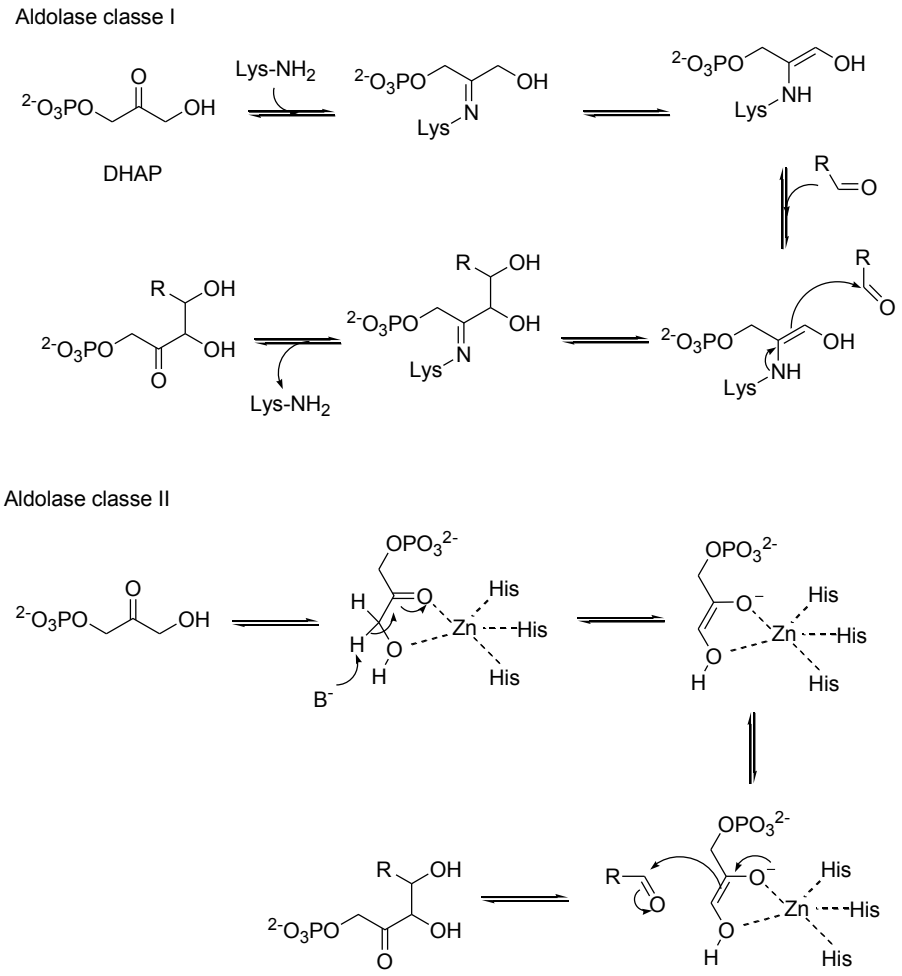
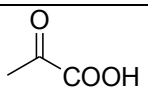
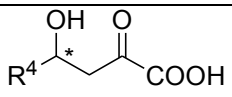
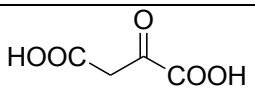
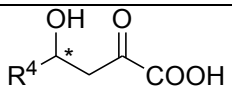
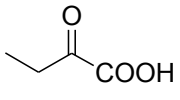
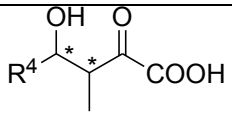
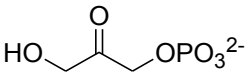
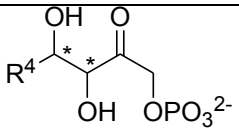
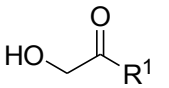
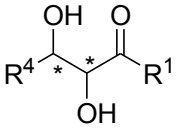
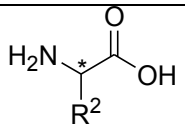
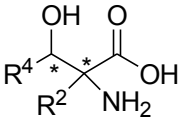
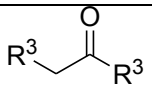
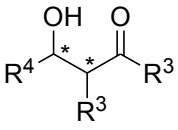


Schéma I.6 : Mécanismes simplifiés des aldolases DHAP-dépendantes de classe I et II[144]

Les aldolases sont en général très spécifiques de leur substrat donneur naturel et n'acceptent quasiment pas de variation structurale pour ce dernier. Cette spécificité pour le substrat donneur a conduit à proposer une autre classification des aldolases[145]. Selon le substrat donneur, 5 familles d'aldolases sont connues et sont représentées dans le Tableau I.9.

Tableau I.9: Classification des aldolases[145]

Famille d'aldolases	Substrat donneur	Produit	Aldolase (exemple)
Pyruvate/oxaloacétate/ 2-oxobutyrate dépendantes			N-acétylneuraminic acid aldolase
			Macrophomate synthase (MPS)[a]
			SanM aldolase
DHAP-dépendantes			L-Rhamnulose-1-phosphate aldolase
Dihydroxyacétone dépendantes (ainsi que d'autres analogues non phosphorylés)	 R^1 = H, CH_2OH, CH_3, C_2H_5		D-Fructose-6-phosphate aldolase
Glycine/alanine dépendantes	 R^2 = H, CH_3		D,L-thréonine aldolases
Acétaldéhyde dépendantes	 R^3 = H, CH_3		2-désoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA)

[a] Ce n'est pas la réaction naturelle de la MPS

On distingue cinq principales familles d'aldolases : (i) pyruvate/oxaloacétate/2-oxobutyrate-dépendantes, (ii) dihydroxyacétone phosphate (DHAP)-dépendantes, (iii) dihydroxyacétone (DHA)-dépendantes ainsi que les autres analogues non phosphorylés, (iv) glycine/alanine-dépendantes et (v) acétaldéhyde-dépendantes.

a) Les aldolases DHAP-dépendantes :

Les quatre principales enzymes de cette famille sont la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FruA, EC 4.1.2.17), la fuculose-1-phosphate aldolase (FucA, EC 4.1.2.17), la rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhuA, EC 4.1.2.19) et la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase (TagA, EC 4.1.2.40). La FruA additionne le DHAP sur le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (D-G3P) pour former le D-fructose-1,6-bisphosphate (FBP) avec une stéréochimie 3*S*,4*R*. En utilisant les mêmes

substrats, la TagA conduit au D-tagatose-1,6-bisphosphate de stéréochimie 3*S*,4*S* (Schéma I.7). La FucA et la RhuA catalysent l'addition du DHAP sur le L-lactaldéhyde pour donner le L-fuculose-1-phosphate et le L-rhamnulose-1-phosphate, de stéréochimie 3*R*,4*R* et 3*R*,4*S*, respectivement (Schéma I.7)[144]. La FruA et en particulier celle issue du muscle du lapin (RAMA) est la plus étudiée de cette famille[146]. La constante d'équilibre de la réaction de 10^4 M^{-1} favorise clairement le sens de la synthèse[147], ainsi une centaine d'aldéhydes ont été testés illustrant les nombreuses applications en synthèse organique[148].

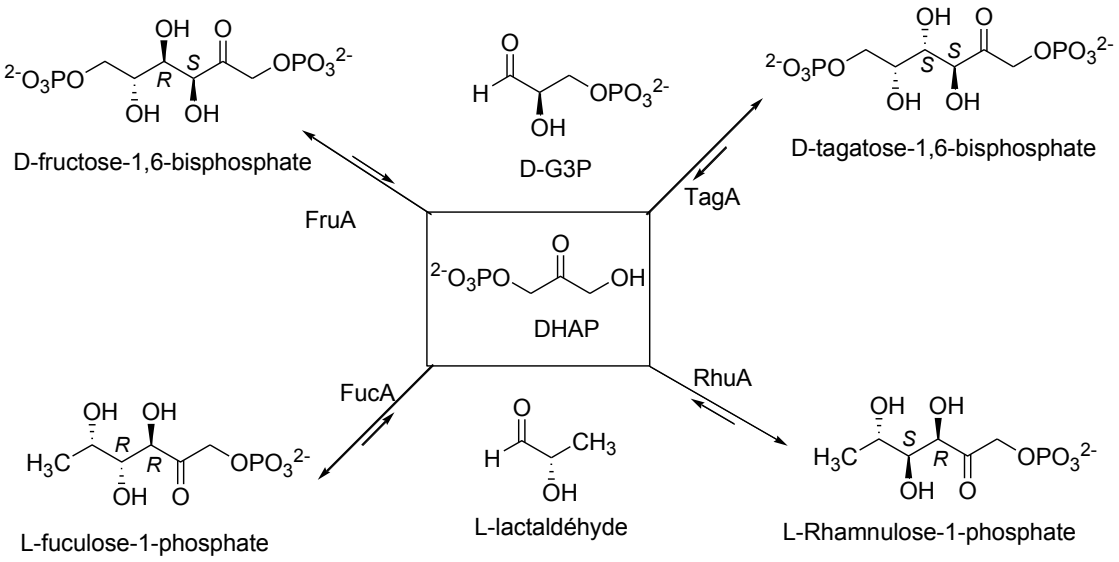


Schéma I.7: Réactions catalysées naturellement par les DHAP-aldolases[144]

Employées en synthèse organique, ces enzymes catalysent l'addition asymétrique du DHAP sur des aldéhydes permettant ainsi l'obtention d'aldols de différentes stéréochimies (Schéma I.8). Les aldolases DHAP-dépendantes contribuent à la création de deux nouveaux centres asymétriques avec souvent une excellente énantio et diastereosélectivité sauf pour la TagA qui est nettement moins stéréosélective. Leur large tolérance vis-à-vis du substrat accepteur est un atout majeur[140,144]. Cependant leur dépendance au DHAP nécessite l'usage quasi incontournable de ce produit phosphorylé coûteux et assez instable.

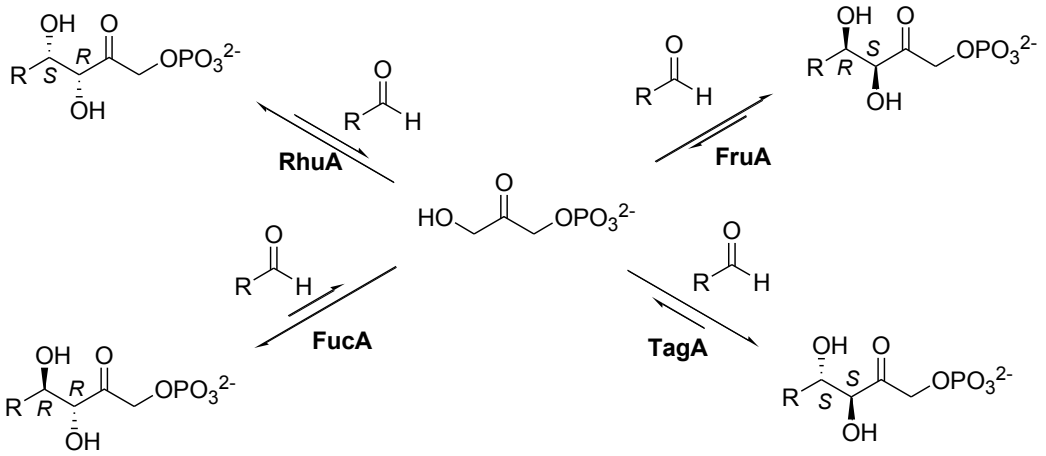


Schéma I.8 : Stéréocomplémentarité des aldolases DHAP-dépendantes[144]

b) Les aldolases pyruvate et phosphoénolpyruvate dépendantes :

Ces aldolases catalysent la réaction d'aldolisation entre le pyruvate ou le phosphoénolpyruvate (PEP) et un aldéhyde générant des produits avec un nouveau centre asymétrique (Tableau I.9). Elles ont été utilisées pour synthétiser des α-céto-acides. A titre d'exemple, la N-acétylneuraminic acid aldolase (NeuA) accepte uniquement le pyruvate comme donneur mais une large gamme d'aldéhydes comme accepteurs[144]. Cette enzyme a été utilisée pour synthétiser notamment des analogues des acides D- et L- sialiques[149].

Tableau I.10 : Quelques aldolases pyruvate-dépendantes d'intérêt synthétique[144]

Accepteur naturel	Enzyme	Produit
N-acétyl mannosamine	NeuA (EC 4.1.3.3)	Acide N-acétyl neuraminique (NeuAc)
D-arabinose	KDO-aldolase (EC 4.1.2.23)	KDO
D-G3P	KDPG-aldolase (EC 4.1.2.14)	KDPG
D-G3P	KDPGal-aldolase (EC 4.1.2.21)	KDPGal

La famille des aldolases pyruvate et PEP dépendantes inclut plusieurs enzymes. Les plus importantes sont la NeuA, la 3-désoxy-D-manno-octulosonate (KDO) aldolase, la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase et la 2-céto-3-désoxy-6-phosphogalactonate (KDPGal) aldolase. Leurs accepteurs naturels ainsi que les produits formés sont représentés dans le Tableau I.10.

c) Les aldolases acétaldéhyde-dépendantes ou DERA :

La DERA est le seul membre connu de la famille des aldolases acétaldéhyde-dépendantes. C'est une aldolase de type I qui a été isolée à partir de tissus animaux[150] et de microorganismes[151]. La DERA a la particularité de catalyser une réaction d'aldolisation croisée entre deux aldéhydes : l'acétaldéhyde et le D-G3P (Schéma I.9)[144]. La spécificité vis-à-vis du substrat donneur n'est pas aussi stricte que pour la plupart des autres aldolases et par ailleurs, elle tolère plusieurs accepteurs non naturels[144]. Cela en fait un outil intéressant pour la synthèse organique.

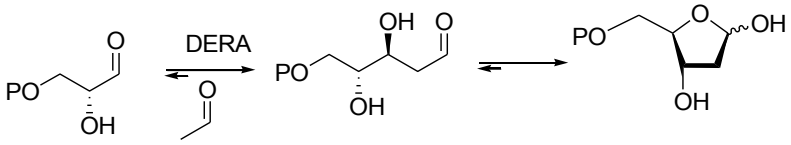
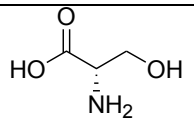
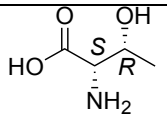
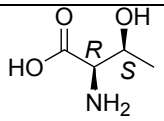
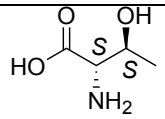
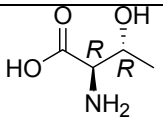


Schéma I.9 : Réaction naturelle catalysée par la DERA[144]

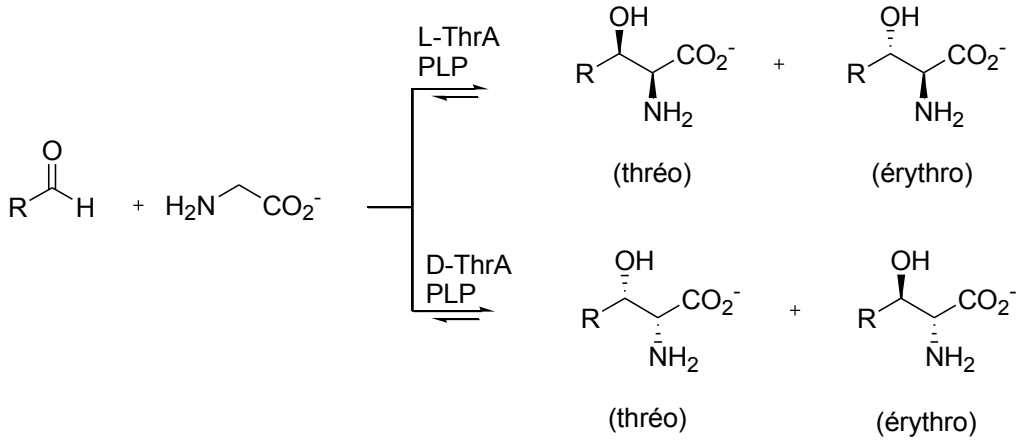
d) Les aldolases glycine-dépendantes :

Ce sont des enzymes qui utilisent le PLP comme cofacteur et catalysent l'aldolisation de la glycine comme donneur sur différents aldéhydes générant des β-hydroxy-α-aminoacides comportant deux nouveaux centres asymétriques. Il existe deux types d'aldolases glycine-dépendantes. Les sérine hydroxyméthyltransférases (SHMT) constituent le premier type, catalysant *in vivo* la réaction entre le formaldéhyde et la glycine pour générer la L-sérine (Tableau I.11). Les thréonines aldolases (TA) constituent le deuxième type avec quatre enzymes stéréo-complémentaires : les D, D-*allo*, L et L-*allo* -TA[152] catalysant la réaction *in vivo* entre la glycine et l'acétaldéhyde pour donner les D, D-*allo*, L et L-*allo*- thréonines respectivement (Tableau I.11).

Tableau I.11 : Les aldolases glycine-dépendantes[144]

Accepteur naturel	Enzyme	Produit
Formaldéhyde	SHMT	 L-Sérine
Acétaldéhyde	L-TA	 L-Thréonine
Acétaldéhyde	D- TA	 D-Thréonine
Acétaldéhyde	L-*allo*-TA	 L-*allo*-Thréonine
Acétaldéhyde	D-*allo*-TA	 D-*allo*-Thréonine

Les TA acceptent une large gamme de substrats accepteurs[153]. Typiquement, les TA ont une très haute stéréospécificité en formant le nouveau centre α-amino, mais la sélectivité est faible pour la configuration thréo/érythro. Les conditions réactionnelles (température, temps,…) peuvent modifier ce rapport. Le Schéma I.10 montre quelques exemples de réactions catalysées par la D- ou la L-TA.



R	Enzyme	Rapport (D/ L)	Rapport (thréo/érythro)	Rendement (%)	Réf
Me	L-TA d'*E. coli*	>1 :99	1:99	34	[154]
iPr	D-TA de *X. oryzae*	>99 :1	93:7	49	[154]
CH_2OBn	L-TA de *C. humicola*	>1 :99	8:92	78	[153]
CH_2N_3	L-TA de *C. humicola*	>1 :99	30:70	45-75	[153]

Schéma I.10 : Quelques exemples des réactions catalysées par les TA

e) Les aldolases DHA dépendantes

Dans un paragraphe précédent, il a été souligné l'instabilité et le cout du DHAP. La dépendance stricte des DHAP-aldolases vis-à-vis de ce substrat est un frein au développement de procédés industriels. Suite à ces problèmes, de nouvelles approches ont été développées comme l'ingénierie enzymatique pour modifier les propriétés des enzymes. La recherche de nouvelles enzymes est aussi une alternative très utile et a abouti, il y a moins de 20 ans, à la découverte d'une aldolase qui utilise un substrat non phosphorylé, la DHA, au lieu du DHAP. Cette enzyme a été identifiée en 2001 dans le génome d'*E. coli* et a été nommée fructose-6-phosphate aldolase (FSA). En effet, lors de sa découverte, la catalyse réversible de la réaction d'aldolisation entre la DHA et le D-G3P générant le D-fructose-6-phosphate (D-F6P) a été mise en évidence (Schéma I.11)[155]. Cependant, son rôle biologique n'a pas encore été élucidé. Une étude détaillée de la FSA sera présentée dans la partie suivante comme elle constitue l'un des principaux objets d'étude de ce travail.

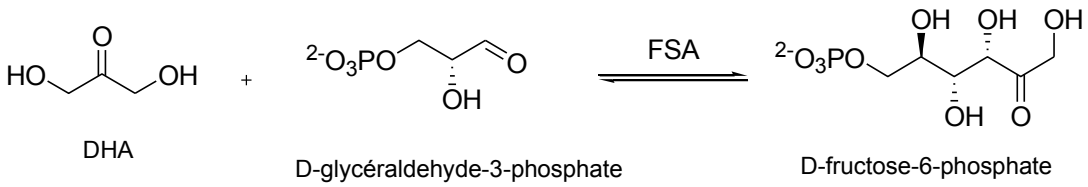


Schéma I.11 : Réaction catalysée par la FSA

I.3.2. La fructose-6-phosphate aldolase

I.3.2.1. Présentation

Comme mentionné dans un paragraphe plus haut, la FSA_{wt} d'*E. coli* est une aldolase DHA dépendante récemment découverte par Shurmann et Sprenger[156]. On ne connait pas encore son rôle biologique mais comme lors de sa découverte, le groupe de Sprenger a mis en évidence sa capacité à rétroaldoliser le D-F6P, elle a été nommée « fructose six-phosphate aldolase » (FSA) (Schéma I.11). Comme illustré dans le schéma, l'enzyme est hautement stéréosélective conduisant uniquement à l'isomère 3*S*,4*R* dans le sens de l'aldolisation.

C'est une enzyme atypique parmi les aldolases car elle montre une tolérance inhabituelle vis-à-vis de plusieurs substrats donneurs. En effet, si la DHA est le substrat donneur historique, on sait maintenant qu'elle accepte aussi l'hydroxyacétone (HA)[155], et l'hydroxybutanone (HB)[157] des analogues plus apolaires de la DHA. Très remarquablement, un aldéhyde, le glycolaldéhyde (GA) est aussi substrat donneur[158]. Ainsi c'est la deuxième aldolase connue capable de catalyser une aldolisation entre deux aldéhydes après la DERA. On devine aisément toutes les potentialités d'applications en synthèse organique, elles feront l'objet du paragraphe I.3.2.2.) ci-après.

Depuis d'autres FSAs ont été découvertes dans la biodiversité grâce à un projet ANR Genozyme mené en collaboration entre le Génoscope d'Evry et notre équipe Biométa de l'ICCF[159]. Une dizaine de protéines ont été identifiées comme de nouvelles aldolases DHA-dépendantes aux propriétés réellement similaires à celle d'*E. coli*. L'objet d'étude de ce travail de thèse étant l'enzyme d'*E. coli*, nous allons la décrire plus précisément.

Sur le plan structural cette enzyme se présente sous la forme d'un homodécamère de masse moléculaire 257 (±20) KDa (Figure I.7). Elle ressemble à un disque ayant un diamètre de 105 Å environ, et une épaisseur de 65 Å. Elle est constituée de deux anneaux (Figure I.7-B), chacun d'eux comportant cinq monomères (Figure I.7-A). Ces deux anneaux sont empilés l'un sur l'autre de telle sorte que les sites actifs sont construits à partir de deux monomères en vis-à-vis (Figure I.7-C et D)[160].

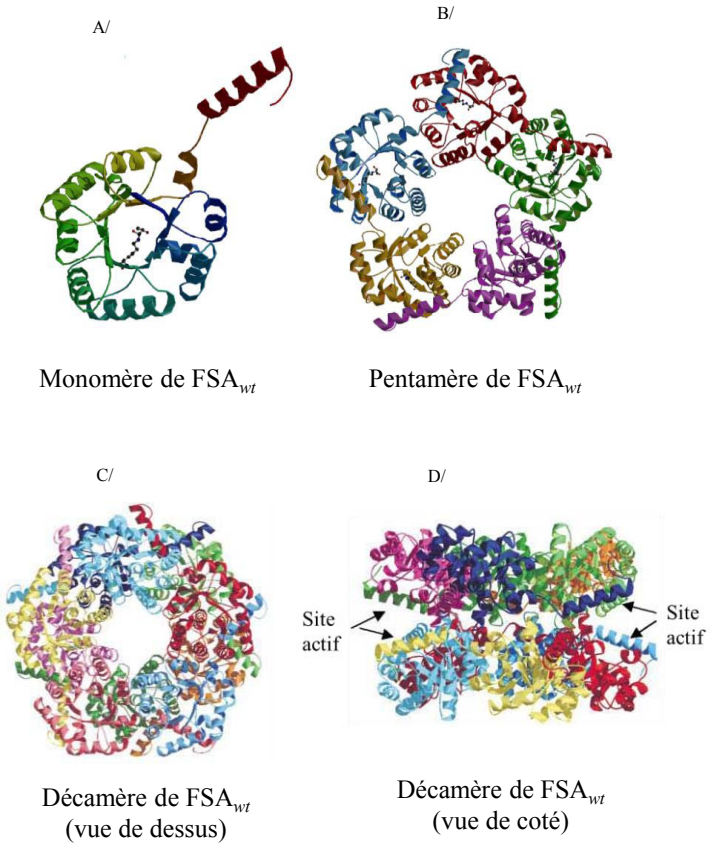


Figure I.7 : Structure de la FSA[160]

La FSA appartient à la famille des aldolases de type I c.-à-d. que le mécanisme réactionnel implique la formation d'une énamine par la réaction d'addition entre le donneur et une lysine du site actif de l'enzyme. Un modèle de mécanisme réactionnel dans le sens de la rétroaldolisation est illustré dans le Schéma I.12. Les rôles précis des différents résidus du site actif en dehors de ceux impliqués dans la fixation du substrat n'ont pas encore été complètement élucidés. On sait par ailleurs qu'ils sont très conservés chez ces aldolases, la Figure I.8-A[159] les met en évidence pour la FSA$_{wt}$ d'*E. coli*. En particulier le résidu tyrosine (Tyr131) est indispensable à l'activité aldolase (Figure I.8-B)[161]. Ce dernier est défini comme résidu acido-basique et sert notamment à protoner le carbanion intermédiaire en C3 avant l'hydrolyse de l'imine.

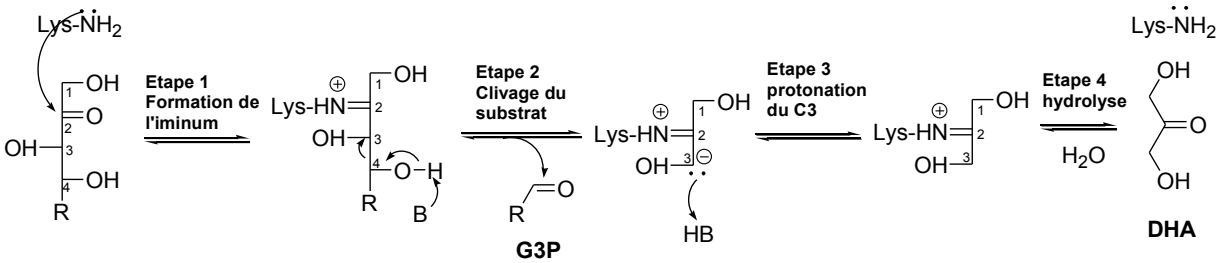


Schéma I.12 : Mécanisme de rétroaldolisation catalysée par la FSA, adapté de Sautner et al.[161]

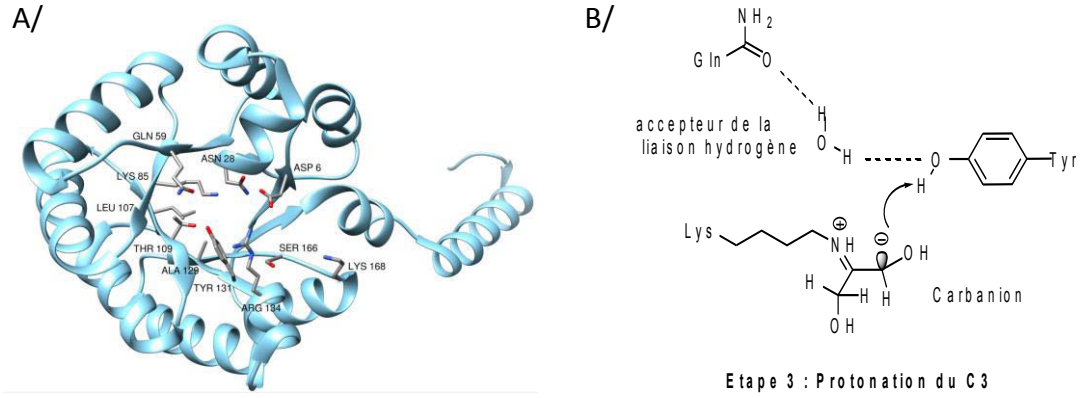


Figure I.8 : (A) : Structure 3D d'un monomère de la FSA$_{wt}$ montrant les résidus du site actif[159] ; (B) Modèle du site actif illustrant le rôle de résidus[161]

L'efficacité catalytique de la FSA$_{wt}$ envers ses substrats peut être évaluée par les valeurs de k_{cat}/K_m. Si cette valeur augmente, l'enzyme a une plus grande efficacité envers son substrat. Les k_{cat}/K_m pour les différents substrats ont été mesurés et sont représentés dans le Tableau I.12. Les meilleurs substrats donneurs de la FSA$_{wt}$ sont HA et GA. L'efficacité catalytique de l'enzyme vis-à-vis de la DHA est faible (k_{cat}/K_m = 4 $s^{-1}.mM^{-1}$). Le meilleur accepteur de la FSA$_{wt}$ est le G3P.

Il est connu que la mutation de certains acides aminés des enzymes peut améliorer leurs propriétés catalytiques. Dans ce but, plusieurs variants de la FSA ont été construits pour modifier ses propriétés catalytiques, notamment vis-à-vis des substrats donneurs. Parmi les premiers variants préparés, on peut citer le travail sur une mutation qui remplace l'alanine en position 129 par une sérine[162]. En effet, le site actif du côté donneur présente des résidus plutôt apolaires (Figure I.8-A), favorisant l'activité vis-à-vis de HA ou HB. Les auteurs ont supposé qu'en les remplaçants par des résidus plus polaires, l'activité en lien avec la DHA pouvait être augmentée. Ainsi le variant obtenu FSA$_{A129S}$[162] s'est révélé 17 fois plus actif que la FSA$_{wt}$ vis-à-vis de la DHA (Tableau I.12).

Tableau I.12 : paramètres cinétiques de la FSA$_{wt}$ et de son mutant FSA A129S[156, 162, 158]

substrat	k_{cat}/K_m FSA$_{wt}$ (s^{-1} mM^{-1})	k_{cat}/K_m FSA$_{A129S}$ (s^{-1} mM^{-1})
DHA	4	69
HA	145	41
GA (donneur)	83	25
GA (accepteur)	0.3	0.4
4-Nitrobutanal	0.5	1
D-G3P	216	422

Deux variants de l'enzyme : la FSA_{A129S} et la $FSA_{A129S/A165G}$, ont été employés pour améliorer l'aldolisation entre la DHA et le *N*-Cbz-3-aminopropanal qui se fait dans un mélange aqueux/organique à cause de la faible solubilité de l'aldéhyde dans l'eau. Trois co-solvants ont été étudiés : l'acétate d'éthyle, l'acétonitrile et le DMF. La stabilité de ces enzymes a été étudiée en fonction du solvant organique utilisé et de sa concentration. Ces trois solvants inactivent fortement l'enzyme, cependant de petites concentrations (jusqu'à 10%) peuvent être utilisées en synthèse pour minimiser l'inactivation de l'enzyme[163].

I.3.2.2. Application de la FSA en synthèse

Une caractéristique importante de la FSA est qu'elle accepte la DHA, donneur non phosphorylé, permettant d'éviter la synthèse longue, couteuse et fastidieuse d'un produit instable, le DHAP jusqu'alors utilisé avec les DHAP aldolases. Elle a ainsi supplanté la RAMA, conduisant au même type de sucres et analogues lorsque le donneur est la DHA[144,145]. La tolérance d'une enzyme à différents substrats est ce que l'on appelle la promiscuité de substrat (enzyme « promiscuitaire »). Ce terme a été introduit par Jensen at al.[164] Cette propriété est largement répandue dans beaucoup de familles d'aldolases mais surtout vis-à-vis de l'accepteur. La FSA est à ce titre vraiment particulière car elle est aussi bien promiscutaire du côté accepteur que du côté donneur. Cela fait d'elle un outil biocatalytique efficace pour la synthèse organique.

Dans le Schéma I.13 sont présentés différents exemples permettant d'illustrer les potentialités de cette aldolase. Comme le D-G3P est le meilleur substrat de cette enzyme, elle a été utilisée pour préparer facilement le D-F6P (Schéma I.13-F) à l'échelle de la centaine de mg[165,166]. La FSA_{wt} a montré un potentiel catalytique important et a permis la synthèse d'une large variété de composés comme les sucres, les désoxy-sucres, les nitrocyclitols, les sucres phosphorylés et les iminocyclitols. Elle a été utilisée pour la production stéreosélective de composés polyhydroxylés comme le D-désoxyfructose, le D-xylulose et le 1-désoxy-D-xylulose en utilisant la DHA, l'HB ou l'HA en tant que donneur et divers aldéhydes comme accepteur (Schéma I.13)[155,157,167,168].

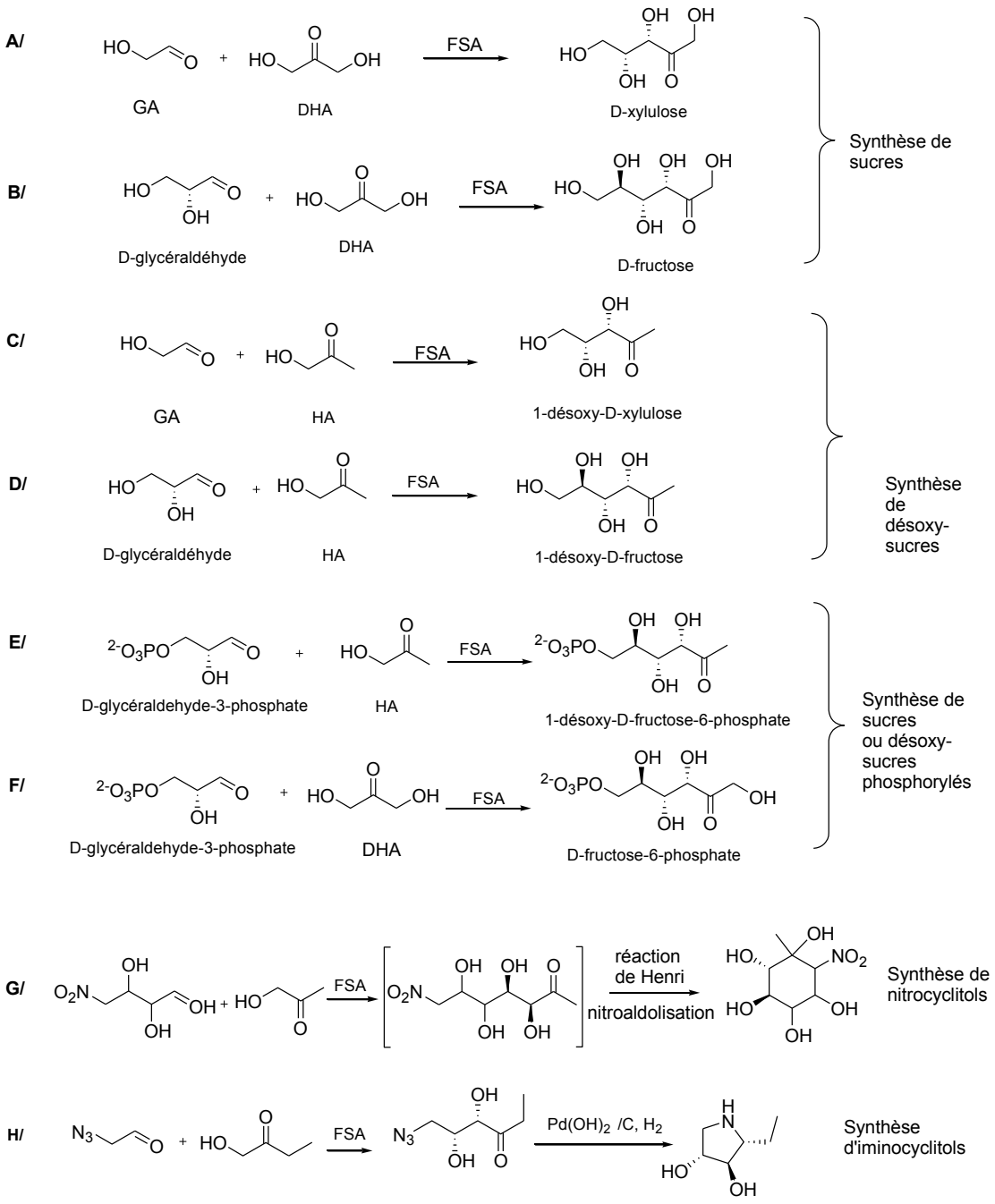


Schéma I.13 : Quelques applications synthétiques de la FSA[155,157,167,168]

Comme mentionné précédemment, de façon exceptionnelle, la FSA est capable de catalyser l'aldolisation entre deux molécules de GA, l'une qui réagit comme donneur, l'autre comme accepteur pour générer le D-(-)-thréose (Schéma I.14). Le Tableau I.12 montre que l'enzyme native présente une effcacité très forte pour ce donneur, meilleure que celle pour la DHA. La réaction d'autoaddition est difficile voire impossible à éviter si l'accepteur n'est pas un très bon substrat.[158] Cependant cette activité est très attractive, offrant l'opportunité de développer de nouvelles stratégies biocatalytiques pour la synthèse stéreosélective d'aldoses polyfonctionnels. Ainsi pour une exploitation plus rationnelle en synthèse, le groupe de Clapés a développé des variants dédiés à l'aldolisation croisée de façon plus maitrisée[169,170].

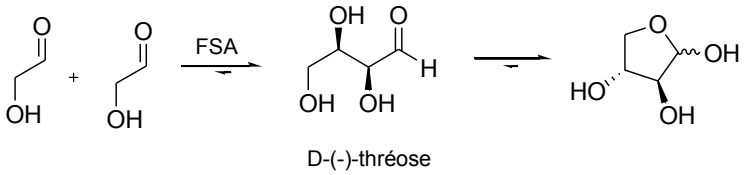


Schéma I.14 : Réaction d'autoaddition du GA catalysée par la FSA[158]

Comme la position A129 influence l'activité et la sélectivité vis-à-vis du donneur, elle a été choisie comme point de départ pour modifier cette sélectivité. Parmi les variants préparés, la FSA_{A129G} est le meilleur et catalyse la réaction de formation du D-thréose 20 fois plus rapidement que la FSA_{wt}. Ce dernier a été préparé avec une conversion de 98% en 24 heures. Par la suite, une boite à outils constituée de différents variants de la FSA a été construite, étendant largement ses capacités biocatalytiques pour la préparation d'aldéhydes[159,169]. Szekrenyi et al. ont préparés plusieurs variants afin de contrôler la taille et la configuration des produits obtenus. La réaction d'aldolisation d'un substrat peut se faire avec une ou deux molécules de GA comme donneur (double addition) selon le variant utilisé. Ainsi par exemple, la $FSA_{A129T/A165G}$ a été utilisée pour synthétiser le L-xylose par la réaction d'aldolisation du formaldéhyde avec deux molécules de GA. Une conversion de 98% a été obtenue après 24h de réaction. Le D-idose a été synthétisé avec une conversion de 85% (96 h) à partir de trois molécules de GA, en utilisant le même mutant[170].

Si la FSA_{wt} accepte beaucoup d'aldéhydes comme substrats accepteurs, le groupe de Clapés a mis en évidence une limitation lorsqu'un méthyl est en position alpha de l'aldéhyde ou de façon plus générale lorsque le substrat est encombré. Pour lever cet inconvénient, Clapés et al. ont construit le variant $FSA_{A129S/A165G}$.[171] Ce variant a des propriétés catalytiques améliorées non seulement vis-à-vis de l'accepteur mais aussi du donneur. A titre d'exemple, cette aldolase a été employée pour catalyser la réaction entre la DHA et deux accepteurs, le (*S*)- et le (*R*)-*N*-Cbz-alaninal, les produits ont été obtenus avec des rendements de 78 et de 95% respectivement (Schéma I.15). Remarquablement, aucune trace de produit n'a été détectée en utilisant la FSA_{wt}, la FSA_{A129S} ou la FSA_{R134A}.

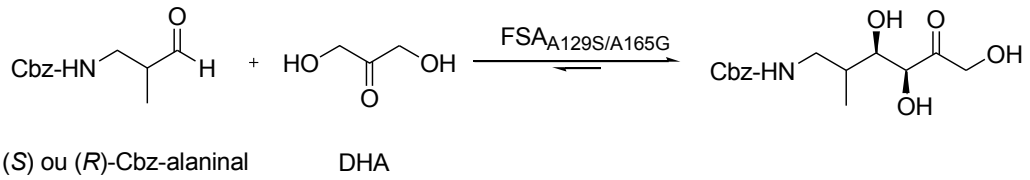
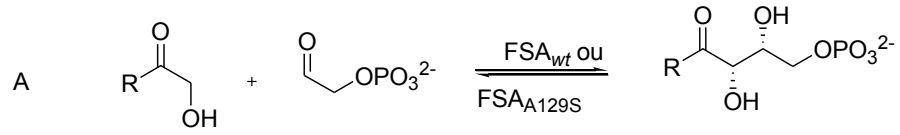


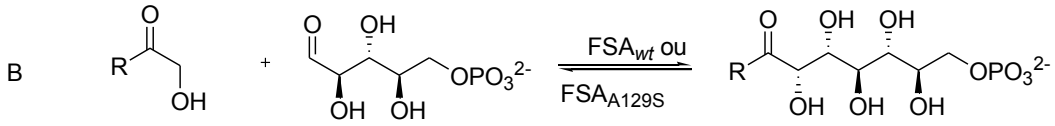
Schéma I.15 : Réaction d'aldolisation entre la DHA et le Cbz-alaninal[171]

La FSA a été impliquée également pour préparer des sucres phosphorylés en position terminale en partant de divers aldéhydes phosphorylés et en les combinant avec les quatre donneurs connus[166,172]. Les procédés mis en œuvre sont des réactions en cascades en un seul pot et une ou plusieurs étapes selon les cas. De façon plus générale, la FSA et ses variants ont été utilisés très souvent dans des procédés en cascade, purement enzymatiques ou alliant parfois des étapes de chimie classique. Les

cascades enzymatiques seront détaillées dans la partie ‗cascade enzymatique' de ce chapitre. Simplement ici pour terminer l'illustration des applications en synthèse, nous résumons un exemple à partir du glycolaldéhyde phosphate et du D-ribose-5-phosphate. Ces deux substrats ont permis la synthèse de sucres phosphorylés de longueur de chaine de C5 à C9. L'aldolisation entre le glycolaldéhyde phosphate et trois donneurs génère des sucres phosphorylés en C5 et C6 avec des bons rendements (Schéma I.16-A). Le GA n'a pas pu être utilisé comme donneur car le glycolaldéhyde phosphate est trop mauvais substrat et la réaction d'autoaddition du GA est alors largement majoritaire. Par ailleurs, les sucres phosphorylés en C8 ou C9 ont été produits à partir du D-ribose-5-phosphate (Schéma I.16-B). Il faudra noter que selon la structure du donneur la FSA_{A129S} et la FSA_{wt} sont choisies de manière appropriée.[172]



R= CH_2OH (89%), CH_3 (85%) ou C_2H_5 (77%)



R= CH_2OH (90%), CH_3 (77%) ou C_2H_5 (79%)

Schéma I.16 : Synthèse de sucres phosphorylés catalysée par la FSA_{wt} ou la FSA_{A129S}[172]

I.3.3. Immobilisation des aldolases

Malgré de nombreuses applications en synthèse organique, peu de procédés d'immobilisation d'aldolases ont été décrits dans la littérature. Différentes stratégies ont été utilisées pour les immobiliser : (i) par complexation à l'aide d'une résine de type métal-acide nitriloacétique (NTA), (ii) par liaison covalente sur un support, (iii) par réticulation de l'enzyme (cross-linking), (iv) par adsorption physique, (v) par encapsulation dans un réseau. Chacune des méthodes présente des avantages et des inconvénients.

I.3.3.1. Immobilisation par complexation

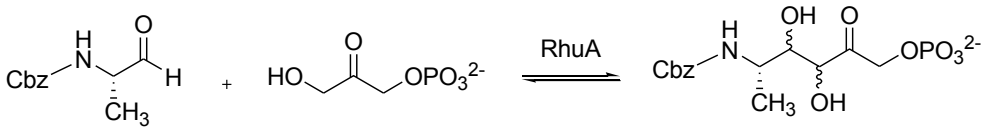
Plusieurs travaux d'immobilisation d'aldolases ont été réalisés en se basant sur la complexation de la protéine sur une résine comportant un métal chélatant. Cela nécessite de construire

une protéine recombinante comportant ce que l'on appelle une étiquette de six histidines (His-tag) en C ou en N-terminal. Ainsi, des interactions entre ces résidus histidines périphériques de l'enzyme et le métal chélatant (nickel, cobalt) se mettent en place. Il s'agit en réalité du « détournement » d'une méthode de purification des protéines qui profite du phénomène de complexation pour piéger la protéine sur la résine de chromatographie. Les protéines sont alors directement immobilisées à partir de l'extrait cellulaire après la surexpression dans *E. coli*.

Le type de résine peut influer fortement sur le processus d'immobilisation. Les résines NTA possèdent quatre sites chélatants pour le cation métallique, contre trois pour les résines iminodiacetic acid (IDA). La nature de l'ion complexé sur la résine joue un grand rôle sur les résultats de l'immobilisation puisque les interactions avec l'enzyme dépendent surtout de la nature et de la taille de l'ion. Dans une étude réalisée en 2006, le cobalt a donné les meilleurs résultats par rapport aux autres cations (Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+})[173]. En outre, les résines de densité élevé (20-35 µmol de métal divalent/mL de support) sont plus efficaces que celles de faible densité (5-20 µmol de métal divalent/mL de support)[173].

Trois aldolases (FucA, RhuA, KDGA) ont été immobilisées selon ce principe. Pour la $FucA_{coli}$, une résine Co-IDA de haute densité a été choisie comme support par Ardao et al. pour réaliser une étape combinée de purification/immobilisation à partir d'un lysat. Ce choix résulte d'une étude préalable sur enzyme purifiée qui a mis en évidence une meilleure activité et un meilleur rendement d'immobilisation en présence du cobalt comme métal chélatant. En partant de 50 U de FucA et 1 mL de résine, le matériau final présente une activité de 15 U/mL. Aucune activité aldolase dans les eaux résiduelles n'a été observée, signifiant que toute la protéine d'intérêt a été retenue sur le support. Cette activité retenue de 30% seulement a été attribuée à des problèmes de diffusion des substrats. Ce résultat a été validé par le fait qu'en décrochant l'aldolase par de l'imidazole toute l'activité est récupérée. Il est à noter que l'enzyme immobilisée est 21 fois plus stable que l'enzyme libre dans un mélange DMF/tampon (1:4) à 25°C, le DMF servant de cosolvant pour dissoudre l'aldéhyde choisi comme substrat[173].

Le même type d'étude a été mené avec la $RhuA_{coli}$. Dans un premier travail, plusieurs essais d'immobilisation ont été réalisés par Ruiz at al. en faisant varier les proportions enzyme/support (de 1 à 50 U/mL de support Co-IDA). Cette étude a montré que les limitations dues à la diffusion deviennent néfastes pour des valeurs au-delà de 10 U/mL de résine. En effet, pour une valeur de 5 U/mL, le pourcentage d'immobilisation et l'activité retenue sont encore de 95%[174]. Dans un deuxième travail, en partant d'un rapport de 9.5 U/mL de support, 95% d'immobilisation et 92% de rétention d'activité (8.7 U/mL) ont été obtenus. Remarquablement, le temps de demi-vie de l'enzyme immobilisée est de 37 jours contre 2,8 jours pour l'enzyme libre. L'enzyme immobilisée a été utilisée pour la catalyse de la réaction d'aldolisation entre le DHAP et le (*S*)-Cbz-alaninal (Schéma I.17) avec une très bonne sélectivité et un bon rendement analytique (83%)[175].



(*S*)-Cbz-alaninal DHAP

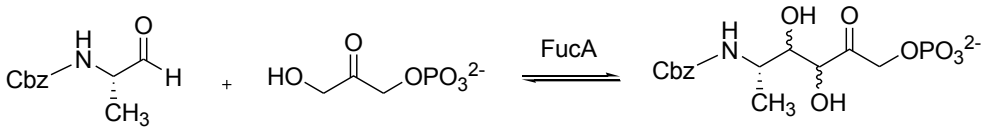
Schéma I.17 : La réaction d'aldolisation entre le (S)-Cbz-alaninal et le DHAP catalysée par la RhuA immobilisée sur Co-IDA

Lamble et al. ont immobilisé la 2-céto-3-désoxygluconate aldolase (KDGA)[176] de *Sulfolobus solfataricus* par chélation sur une résine Ni^{2+}-NTA. L'objectif des auteurs était de créer un réacteur où passe un flux continu de pyruvate et d'aldéhydes (D- et L-glycéraldéhyde, D- et L-érythrose, D- et L-thréose) pour synthétiser des acides 3-désoxy-2-ulosoniques *syn* ou *anti*. En utilisant le L-thréose, un excellent substrat de cette enzyme, le (4*S*,5*S*,6*S*)-3-désoxy-L-*lyxo*-hept-2-ulosonate a été synthétisé avec un rendement de 70% et une proportion diastéréoisomérique > 99 :1. Aucune perte d'activité de l'aldolase n'a été observée pour une utilisation du réacteur pendant 60h.

I.3.3.2. Immobilisation par liaison covalente

D'autres aldolases ont été immobilisées par liaison covalente avec un support. Cette méthode implique des interactions fortes qui évitent le relargage de l'enzyme. Par contre, ces interactions aboutissent parfois à la perte de l'activité enzymatique probablement à cause de l'engagement dans la réticulation de résidus essentiels pour la fonction catalytique ou de la modification trop importante de la conformation de la protéine. Ceci est traduit par une perte d'activité importante des enzymes comme la FucA immobilisée sur un gel glyoxal-agarose[177,178] et de la FruA immobilisée sur un support de silice[179].

Dans le cas de la $FucA_{coli}$, en partant de 2160 U d'enzyme et 1 mL de support, un matériau correspondant à 14.7 U/mL a été obtenu par Suau et al.. La perte d'activité enzymatique est parvenue durant l'immobilisation et est due également aux limitations de diffusion. L'enzyme immobilisée a été utilisée pour réaliser l'aldolisation entre le DHAP et le (*S*)-Cbz-alaninal (Schéma I.18) avec une conversion de 88%[177,178]. Aucune information sur la stabilité de l'enzyme immobilisée n'a été fournie.



(*S*)-Cbz-alaninal DHAP

Schéma I.18 : La réaction d'aldolisation entre le (S)-Cbz-alaninal et le DHAP catalysée par la FucA immobilisée

La FruA du muscle de porc a été accrochée par liaison covalente à un support de silice greffé par des groupements aldéhydes. Horvath et al. ont mis en réaction 37 U en présence de 1g de support. L'activité spécifique de la protéine immobilisée est alors de 1.9 U/mg correspondant à 21% de l'activité de l'enzyme libre. Une grande quantité d'enzyme a été inactivée durant le couplage, mais cette perte d'activité a été compensée par l'amélioration de la stabilité opérationnelle après immobilisation : l'enzyme garde 90% de son activité pendant un mois[179]. Cette enzyme a été également immobilisée par liaison covalente sur un support de polyacrylamide ayant des groupements acides carboxyliques activés par des carbodiimides disubstitués solubles dans l'eau[180]. Ces carbodiimides fonctionnent comme agents d'activation d'acides carboxyliques pour former des amides par couplage avec des amines primaires. Les auteurs ont étudié l'effet des substituants du carbodiimide sur le taux d'immobilisation et l'activité immobilisée et ont pu immobiliser entre 49 et 267 mg d'enzyme par g de support en retenant 20-50% de l'activité initiale selon les substituants choisis. Le plus grand taux d'activité immobilisée a atteint 108 U/g de support correspondant à la rétention de 50% de l'activité. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend fortement de ces substituants, plus ils sont volumineux, moins l'enzyme est stable[180].

Fu et al. ont immobilisé la TA de *Thermotoga maritima* sur de l'Eupergit (billes macroporeuses polymériques) en utilisant deux méthodes : une méthode où l'enzyme est directement liée à la surface du support et une méthode indirecte où l'enzyme sera liée à un bras espaceur lié au support afin de permettre la mobilité de l'enzyme (Schéma I.19). Pour la méthode directe, le taux d'immobilisation a été de 8,64 mg/g (99% d'immobilisation) et l'activité retenue de 0,85 U/g, soit 52% de l'activité initiale. Pour la méthode indirecte, ces valeurs ont été de 5,79 mg/g (78% d'encapsulation) et de 1,14 U/g (89% de l'activité initiale) respectivement. Dans le cas de l'immobilisation directe, l'enzyme et le support sont en contact direct l'un avec l'autre ce qui donne un taux d'immobilisation important par rapport à la méthode indirecte, mais l'accrochage multipoint peut bloquer le site actif ce qui cause la diminution de l'activité retenue. Les auteurs ont démontré l'absence de problèmes de diffusion, par l'intermédiaire de calculs théoriques. Cependant, uniquement l'enzyme immobilisée sur Eupergit par greffage direct est stable à 80°C[181,182]. Cette enzyme a été aussi immobilisée sur des nanofils de silice (*nanosprings*) d'épaisseurs différentes. Les auteurs ont trouvé que la rétention d'activité augmente avec l'épaisseur des nanofils. Ils ont pu immobiliser au maximum 201 mg/g, correspondant à 25,9 U/g soit 13% de l'activité initiale.

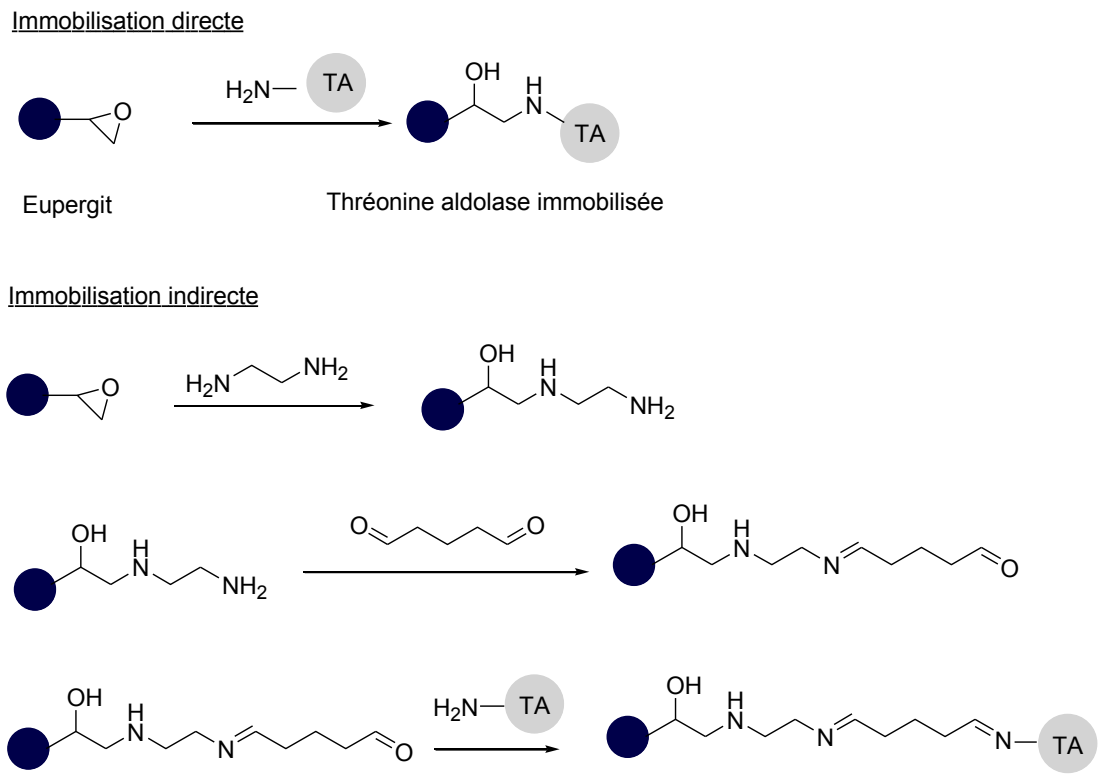


Schéma I.19 : Immobilisation de la TA sur Eupergit par greffage direct et indirect[182]

L'immobilisation par liaison covalente a été parfois bénéfique grâce au gain d'activité obtenu comme en témoigne l'exemple qui suit. La DERA d'*E. coli* a été immobilisée par liaison covalente dans des mousses mésoporeuses de silice (*mesocellular silica foams*) en utilisant la *p*-benzoquinone comme agent réticulant sous irradiation microondes. Sous une puissance microonde de 30 W et après 3 minutes, 88,4% de l'enzyme ont été immobilisées. L'activité spécifique de l'enzyme obtenue est de 2,24 U/mg, 149% plus grande que celle de l'enzyme libre et 157% plus grande que l'enzyme immobilisée sans microondes. La stabilité thermique de l'enzyme a également été améliorée. De plus, l'enzyme immobilisée garde 85% de son activité après 64 jours[11].

Dans une autre étude, la DERA d'*E. coli* a été immobilisée sur un nanomatériau magnétique par une liaison covalente qui s'établit entre les groupes amino de l'enzyme et les groupes aldéhydes greffés sur la surface du support. 2,18 mg de protéine ont été immobilisées sur 10 mg de support, avec une activité de 2,71 U/mg de support. L'enzyme immobilisée montre une stabilité thermique améliorée : elle garde 65% de son activité après un chauffage à 80°C pendant 10 minutes, des conditions qui inactivent complètement l'enzyme libre. Elle montre également une plus grande tolérance vis-à-vis des solvants organiques par rapport à l'enzyme libre[183].

I.3.3.3. Immobilisation par réticulation

La réticulation de l'enzyme sur elle-même par des agents réticulants a été utilisée pour immobiliser des aldolases. La présence de protéines inertes comme la BSA durant la réticulation peut éviter l'inactivation des enzymes. D'Souza et al. ont travaillé sur une méthodologie dérivant des CLEAs. La FruA d'*Haloferax mediterranei* a été immobilisée[184] à partir des extraits cellulaires traités, en présence de 10% BSA, par le glutaraldéhyde (0.5%) pendant 15 minutes. L'enzyme réticulée a retenu 60% de son activité initiale. L'augmentation de la concentration en glutaraldéhyde et/ou du temps engendre une diminution sévère de l'activité retenue. La présence de la BSA protège l'enzyme contre l'inactivation et favorise l'agrégation. Les essais de protection du site actif de l'enzyme par le substrat naturel (FBP) n'ont rien changé. L'immobilisation a permis le déplacement de la température optimale de l'enzyme de 55°C pour l'enzyme libre à 65°C pour l'enzyme immobilisée.

Des CLEAs de la NeuA de *Staphylococcus carnosus* avec de la BSA (enzyme/BSA : 1/5) ont été préparés pour améliorer la synthèse de l'acide 2-céto-3-désoxy-D-glycérogalactononulosonique (KDN), un bloc de construction important pour accéder à des glycolipides à activité biologique. 70% de l'activité initiale a été retenue. Une conversion en KDN de 95% a été obtenue après optimisation des conditions de la réaction. L'enzyme agrégée a montré une thermostabilité améliorée par rapport à l'enzyme libre : son temps de demi-vie a doublé à 60°C. Elle a pu être réutilisée pour dix cycles sans perte d'activité[185].

I.3.3.4. Immobilisation par adsorption

Peu d'aldolases ont été immobilisées par des méthodes qui impliquent des interactions faibles entre l'enzyme et le support (adsorption), malgré leur intérêt majeur. En effet, la préservation de la structure protéique et de l'activité enzymatique est assurée. Par ailleurs, en raison de l'adsorption en surface, il n'y a pas de problèmes de diffusion. La limite de performance est liée au relargage important de protéines qui est observé parfois.

La RhuA d'*E. coli* a été immobilisée sur des nanoparticules d'or par Ardao et al.. L'enzyme immobilisée a catalysée quatre fois plus rapidement la réaction d'aldolisation entre le DHAP et le (S)-Cbz-alaninal[186]. Cependant, une désorption de 38% des protéines a été observée après 3h. Le temps de demi-vie de l'enzyme immobilisée est de 50 jours contre 2,8 jours seulement pour l'enzyme libre.

La DERA d'*E. coli* a été immobilisée sur des MWCNTs. Parmi la variété de procédures employées, l'adsorption directe de l'enzyme sur des nanotubes de carbone multifeuillets oxydés (ox-MWCNTs) a donné les meilleurs résultats. Subrizi et al. ont fait varier le rapport quantité d'enzyme/support, les résultats sont présentés dans le Tableau I.13. Pour un rapport support/DERA de 35/1 (en masse), le pourcentage d'immobilisation et l'activité immobilisée ont été de 98% et 18%

respectivement, générant un matériau à 1 U/mg de support. En augmentant ce rapport, l'activité retenue commence à diminuer (Tableau I.13)[187]. L'enzyme adsorbée garde toute son activité après 15 jours de stockage à 4°C, ce qui ne représente pas un gain de stabilité important par rapport à la DERA libre. Le matériau trouve son utilité dans la recyclabilité (85% d'activité après 5 cycles) et dans stabilité accrue à fortes concentrations en acétaldéhyde.

Tableau I.13 : Rendements d'immobilisation et d'activité pour la DERA[187]

support : DERA (en masse)	Rendement d'immobilisation (%)	Rendement d'activité (%)	Activité (U/mg)
10 : 1	65	1.0	0.13
20 : 1	89	2.5	0.56
35 : 1	>98	18.0	1.00
45 : 1	>98	4.2	0.60

I.3.3.5. Immobilisation par encapsulation

Par encapsulation des enzymes dans un réseau insoluble, on peut obtenir des avantages intéressantes comme stabiliser ces enzymes, empêcher le relargage fréquemment présent lors de l'adsorption par liaison faible ainsi que réduire la dénaturation souvent observée lors de la réticulation.

Une aldolase DHAP-dépendante, la RAMA a été immobilisée dans des matrices sol-gel et plus particulièrement dans un réseau de verres mono et polysilicates par Gill et al.[188]. Pour des quantités comprises entre 1 et 100 mg d'enzyme par g de support, les taux d'encapsulation obtenus ont été de 91-97%. Les activités retenues correspondantes ont varié de 73 à 93%. La stabilité de la RAMA dans les solutions aqueuses ainsi que dans des solvants organiques polaires a été améliorée et le catalyseur hybride s'est révélé réutilisable en gardant toute son activité après six cycles.

Dans l'ICCF, les équipes SEESIB et MI de l'ICCF ont mené une étude sur l'immobilisation de la FSA dans des HDL de type $Mg_2Al(OH)_6NO_3.nH_2O$ par coprécipitation[134]. La phase Mg_2Al a été choisie parce qu'elle permet de travailler au pH optimal de l'enzyme (pH = 8,5), ainsi que pour ses propriétés avantageuses de surface spécifique importante. La coprécipitation des sels métalliques (nitrate de magnésium et d'aluminium) se fait en utilisant de la soude (NaOH) comme base, dans un réacteur contenant la FSA mis dans une solution tampon de glycylglycine (50 mM) qui assure un environnement protecteur de l'enzyme. L'immobilisation se fait sous une atmosphère inerte (azote), afin d'éviter l'intercalation des carbonates dans les HDL. En partant d'un rapport HDL/enzyme de 1:1, 90% de la quantité initiale de protéines ont été immobilisées dans la phase HDL selon les analyses UV-visible du surnageant.

Les activités spécifiques de la FSA libre et immobilisée ont été déterminées en utilisant le D-F6P comme substrat en rétroaldolisation. En partant d'un échantillon contenant 56 U, 50 U ont été mesurées dans le matériau. Tenant compte des 90 % de protéines immobilisées, ceci correspond à une conservation totale de l'activité enzymatique de la FSA une fois immobilisée. On pense que ce résultat exceptionnel est dû aux interactions fortes entre les feuillets d'HDL chargés positivement et l'enzyme chargée négativement à ce pH (p.i.e. = 7.1). La nanostructuration des feuillets d'HDL autour de la FSA maintient la conformation de la protéine et laisse son site actif accessible au substrat.

L'analyse des diffractogrammes des rayons X (Figure I.9-A) montre que la structure HDL obtenue après immobilisation est amorphe, les raies sont très élargies par rapport à une phase de référenceMg_2AlNO_3. Ainsi, la FSA n'a pas été intercalée entre les feuillets au cours du procédé comme cela se produit généralement en présence de petits anions. Cependant, la structure lamellaire est présente ce qui est confirmée par la présence des raies des plans (012) et (110). Les spectres infrarouges correspondants (Figure I.9-B) révèlent l'amorphisation de la structure lamellaire avec des bandes de vibration des liaisons MOH, MO et OMO élargies en lien avec la perte de la cohésion structurale et de la rigidité des feuillets. Le confinement de l'enzyme dans le matériau a été confirmé par la présence des vibrations caractéristiques d'une enzyme à 1600 et à 2900 cm^{-1} respectivement pour les liaisons N-H et C-H.

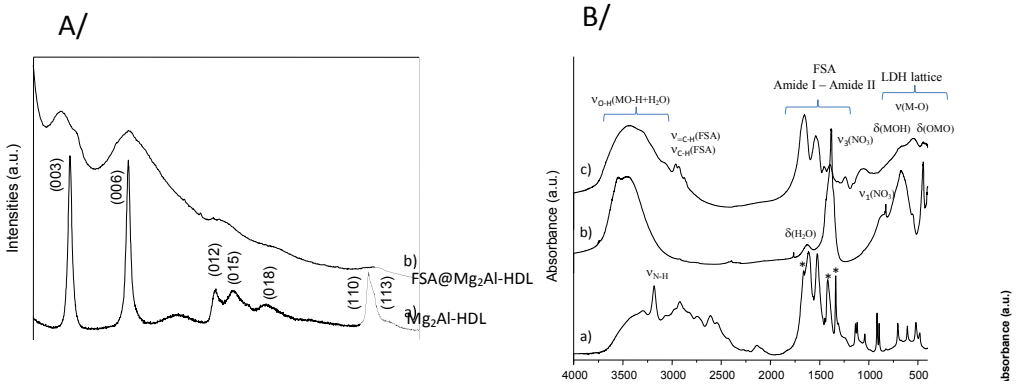


Figure I.9 : DRX (A) et IR (B) de (a) FSA, (b) Mg_2Al-NO_3 (c) FSA@Mg_2Al- NO_3[134]

Les images de microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie électronique en transmission (MET) montrent la formation d'une phase biohybride poreuse FSA@Mg_2AlNO_3 (Figure I.10). La taille des particules est inférieure à 50-70 nm.

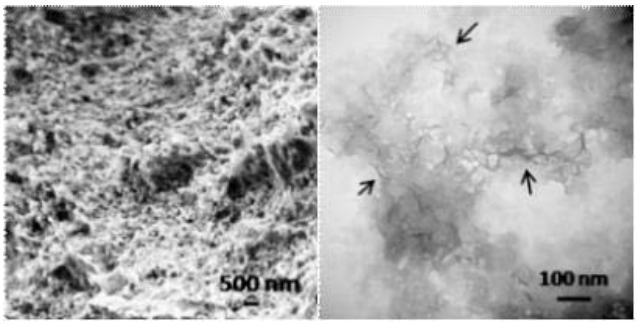


Figure I.10 : Images MEB (gauche) et MET (droite) du biohybride FSA@Mg_2Al-NO_3[134]

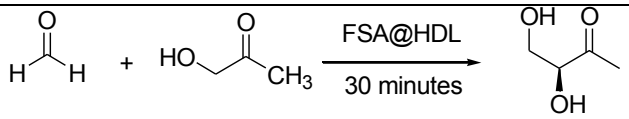
Pour évaluer l'efficacité catalytique du biohybride obtenu, des réactions d'aldolisation entre deux donneurs de la FSA et divers aldéhydes accepteurs ont été effectuées. Les produits de réactions ont été facilement isolés après élimination du biohybride par centrifugation et évaporation de l'eau sans autre étape de purification. Les produits ont été obtenus avec de bons rendements (Tableau I.14), leur pureté a été confirmée par RMN.

Tableau I.14 : Rendements des différentes synthèses catalysées par le biohybride[134]

R_1	R	Rendement (%)
H	CH_3	95
$CH_2CH_2CH_3$	CH_3	90
$CH_2CH(OCH_3)_2$	CH_3	98
CH_2OH	H	60

La recyclabilité du biohybride a été évaluée avec la réaction d'aldolisation entre HA et le formaldéhyde comme modèle. Le biohybride s'est révélé réutilisable pour 4 cycles au moins sans une perte significative d'activité (Tableau I.15). Le biohybride obtenu peut être gardé en solution à 4°C pendant 3 mois conservant quasiment toute son activité. A noter cependant que la lyophilisation entraine la perte totale de l'activité et ne peut donc pas être utilisée.

Tableau I.15 : Conversion de HA et activité du biohybride durant 4 cycles[134]



Cycle	1	2	3	4
Conversion de HA (%)	70	67	63	61
Activité totale de la FSA	100	95	90	87

Pour terminer cette partie sur l'immobilisation des aldolases, nous présenterons les travaux de Kurjatschij et al. concernant la TA d'*E. coli*. Les résultats obtenus en suivant les stratégies d'immobilisation décrites précédement sont résumés dans le Tableau I.16. L'enzyme a été tout d'abord immobilisée par adsorption sur de l'amberlite XAD-2, de l'alumine (Al_2O_3), du calcaire ($CaCO_3$), de la Cellulose et l'Alginit (composé minérale naturel). L'activité retenue en utilisant ces supports est trop faible (1 à 6%). Le décrochage de l'enzyme de son support a permis de récupérer plus de 93% de son activité, ce qui montre que l'enzyme n'est pas dénaturée par ce processus et que ce sont les interactions entre l'enzyme et le support qui aboutissent à cette perte d'activité. Le même résultat a été obtenu en immobilisant l'enzyme par liaison covalente sur l'Eupergit® C ou le chitosane (réticulé ou non avec le glutaraldéhyde). L'inclusion de l'enzyme dans des billes d'alginate a abouti à la rétention de 5 à 12% d'activité. Le piégeage de l'enzyme dans un réseau poreux d'orthosilicates a donné le meilleur résultat conduisant à 30% de rendement en activité et 50 U/g de support. L'enzyme immobilisée a gardé toute son activité pendant 10 semaines à 4°C, sachant que l'enzyme libre garde 16% de son activité après 6 semaines.

Tableau I.16 : Criblage de différents méthodes pour l'immobilisation de la TA[189]

Technique	Support	Activité résiduelle (%)
Encapsulation	Billes d'alginate	5-12
	Orthosilicates	≤ 30
Adsorption	Amberlite XAD-2	< 6
	Al_2O_3	< 1
	$CaCO_3$	< 1
	Cellulose	< 1
	Alginit	< 1
Liaison covalente	Eupergit® C	< 1
	Chitosane	5

Le Tableau I.17 résume les différentes stratégies utilisées pour immobiliser des aldolases ainsi que les résultats obtenus. Les plus grandes activités spécifiques des biohybrides ont été obtenues pour la DERA immobilisée sur le nanomatériau magnétique (2.71 U/mg) et sur les mousses mésoporeuses de silice sous des irradiations microondes (2.24 U/mg). Malgré les pertes d'activité importantes observées dans quelques cas, le gain en stabilité et/ou en recyclabilité peut compenser cette perte.

Tableau I.17 : Résultats d'immobilisation des différentes aldolases

Mode d'immobilisation	Aldolase	Support	Activité spécifique du biohybride ou donnée d'activité	Stabilité	Autres (relargage, recyclabilité,…)	Réf
Complexation	FucA d'*E. coli*	Résines Co-IDA	15 U/mL	Stable 21 fois plus que l'enzyme libre dans DMF/tampon 1 :4 à 25°C	limitations dues à la diffusion	173
	RhuA d'*E. coli*	Résines Co-IDA	8.7 U/mL	-Stable 13 fois plus que l'enzyme libre dans du Tris-20% DMF -temps de demi-vie de 37 jours (2.8 jours pour l'enzyme libre)	Pas de relargage d'enzyme	174,175
	KDGA de *Sulfolobus solfataricus*	Résines Ni-NTA	L'efficacité catalytique a été démontrée en synthétisant un produit avec un rendement de 70% et une proportion diastéréoisomérique >99 :1	Aucune perte d'activité pour une utilisation en continu de 60h	-	176
Liaison covalente	FucA d'*E. coli*	Gels glyoxal-agarose	14.7 U/mL	-	-	178
	FruA du muscle de porc	Silice	37 U/g	Garde 90% de son activité après un mois	-	179
	FruA du muscle de porc	Polyacrylamide fonctionnalisé	108 U/g	Stabilité améliorée à 50°C	-	180
	TA de *Thermotoga maritima*	Eupergit (méthode directe)	0.85 U/g	Stabilité thermique améliorée à 80°C	Pas de relargage d'enzymes	181
		Eupergit (méthode indirecte)	1.14 U/g			
	TA de *Thermotoga maritima*	Nanofils de silice	25.9 U/g	-	Pas de relargage d'enzymes	181

	DERA d'*E. coli*	Mousses mésoporeuses de silice sous irradiations microondes	2.24 U/mg	Stabilité thermique améliorée, garde 85% de son activité après 64 jours	-	[11]
	DERA d'*E. coli*	Nanomatériau magnétique	2.71 U/mg	-Garde 65% de son activité après chauffage à 80°C pendant 10 min -Stabilité améliorée vis-à-vis des solvants organiques	-	[183]
Réticulation	FruA d'*Haloferax mediterranei*	Réticulation par le glutaraldéhyde	60% de rétention d'activité	-	-	[184]
	NeuA de *Staphylococcus carnosus*	CLEAs	70% de rétention d'activité	-sa demi-vie est doublée à 60°C -Garde toute son activité pendant plusieurs semaines	Réutilisable pour 10 cycles sans perte d'activité	[185]
Adsorption	RhuA d'*E. coli*	Nanoparticules d'or	La vitesse de la réaction entre DHAP et (S)-Cbz-alaninal était 4 fois plus grande que celle de l'enzyme libre	-demi-vie doublée -garde toute son activité pendant plusieurs semaines	38% des protéines ont été désorbés	[186]
	DERA d'*E. coli*	ox-MWCNTs	1 U/mg	Gain de stabilité en présence de concentrations élevées en acétaldéhyde	Garde 85% de son activité après 5 cycles	[187]
Encapsulation	RAMA	Verres mono et polysilicates	Pour des taux de 1 à 100 mg/g de support, on avait 91-97% d'encapsulation et 73 à 93% de rétention d'activité	Stabilité amélioré dans les solutions aqueuses et en présence des co-solvants	Réutilisable 6 cycles sans perte d'activité	[190]
	TA d'*E. coli*	Orthosilicates	50 U/g	Garde toute son activité pendant 10 semaines	-	[189]
	FSA d'*E. coli*	HDL	0.9 mg/mg d'HDL (100% de rétention d'activité)	Garde toute son activité pendant 1 mois	Garde 87% de son activité après 4 cycles	[134]

I.4. Réactions en cascade enzymatique

I.4.1. Généralités

Le développement de nouveaux processus chimiques efficaces est devenu un des buts majeurs de la recherche en chimie organique. Les chercheurs ont pris conscience que même si la synthèse organique progresse très rapidement, ce domaine nécessite encore des améliorations de type écologique[191,192]. Le remplacement des processus stœchiométriques en processus catalytiques, l'utilisation d'enzymes isolées ou de microorganismes entiers en synthèse organique et la combinaison de plusieurs réactions en une étape dite *one-pot* sans isolement des intermédiaires sont considérés comme des stratégies majeures pour développer des procédés plus respectueux de l'environnement[13]. En effet, les processus de ce type réduisent les temps de réaction et les déchets permettant ainsi d'éviter l'accumulation d'intermédiaires instables ou toxiques et les purifications. Ceci conduit à des procédés plus sécurisés où les réactions secondaires sont évitées et de meilleurs rendements sont obtenus. Plusieurs expressions sont utilisées pour qualifier l'enchainement de réactions, réactions domino, réactions en cascade ou encore réactions tandem. En ce qui concerne ce manuscrit nous adopterons le terme cascade, plus communément rencontré dans le domaine de la biocatalyse pour qualifier un procédé *one-pot*.[193]

Une grande variété de réactions enzymatiques s'effectue dans les organismes vivants et plus particulièrement dans le cytosol. Reproduire ces enchainements naturels est un secteur de recherche en plein essor, grâce aux outils de la biologie moléculaire facilitant l'accès aux enzymes.[193] Par conséquent, de nombreuses recherches ont été menées pour copier ou mimer ces cascades enzymatiques *in vitro*, parfois même en associant la notion de compartiment grâce à l'immobilisation des enzymes. Des systèmes multienzymatiques d'une complexité remarquable ont été alors développés. Ces dernières années on voit aussi apparaître des travaux sur la construction de cascades dans une cellule hôte en sur-exprimant deux ou trois enzymes cibles, la cascade est alors produite « in cellulo »[194]. Nous ne présenterons pas ce type de résultats dans cette partie bibliographique.

Certaines réactions comme les réactions d'oxydo-réduction, de transfert d'un groupement amino ou phosphate nécessitent la présence d'un cofacteur. Cependant, lorsque le cofacteur a un coût élevé ou et qu'il provoque des phénomènes d'inhibition, la mise en place d'un système de régénération permettant de maintenir le cofacteur à une concentration catalytique est absolument indispensable. La conséquence directe est alors l'association d'une ou plusieurs enzymes dédiées à cette régénération. De tels systèmes de régénération ont été développés pour l'adénosine triphosphate (ATP)[195] et les nicotinamides (NAD(P) + / NAD(P)H)[196].

Les cascades enzymatiques peuvent être classées en quatre principales catégories[13] :

(i) Les cascades linéaires dans lesquels un substrat unique est converti en un produit en passant par un ou plusieurs intermédiaires selon une réaction *one-pot* (Schéma I.20-A). De plus, elles facilitent le déplacement des réactions réversibles dans un sens unique, puisque le produit de la réaction sera consommé par la réaction suivante qui doit être irréversible.

(ii) Les cascades orthogonales (Schéma I.20-B) dans lesquelles les transformations du substrat en produit sont couplées avec d'autres réactions dans le but de régénérer les cofacteurs ou les cosubstrats ou bien encore d'éliminer les produits secondaires.

(iii) Les cascades parallèles dans lesquelles deux substrats sont convertis en deux produits par deux réactions biocatalytiques différentes mais couplées grâce à l'utilisation de cofacteurs ou de cosubstrats communs (Schéma I.20-C). Dans ce type de cascade, les deux produits sont d'intérêt et sont isolés, ce qui n'est pas le cas pour les cascades orthogonales où les sous-produits sont éliminés.

(iv) Les cascades cycliques dans lesquelles un substrat est sélectivement converti en un intermédiaire qui est ensuite transformé à nouveau en produit de départ (Schéma I.20-D). Ce concept a été fréquemment utilisé pour effectuer la déracémisation[197] d'acides aminés, d'acides alpha-hydroxylés et d'amines.

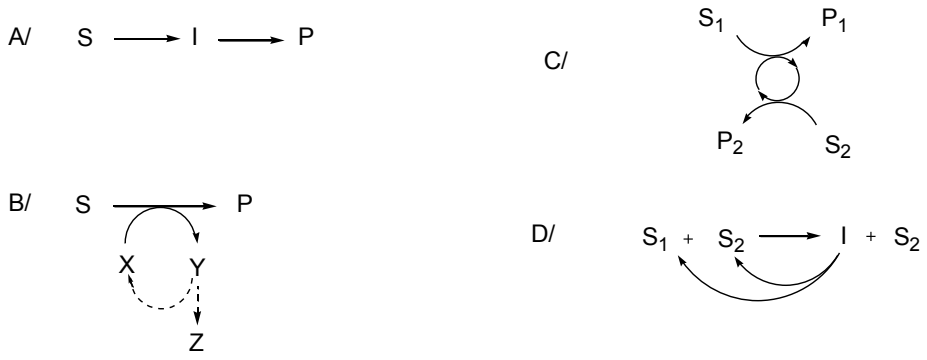


Schéma I.20 : Différentes conceptions des cascades enzymatiques : A/ cascade linéaire, B/ cascade orthogonale, C/ cascade parallèle, D/ cascade cyclique[13]

La classification présentée ci-dessus n'est pas stricte puisque la conception de la cascade est souvent une combinaison de ces différents types. Par exemple, une étape d'une cascade linéaire pourrait nécessiter une réaction orthogonale supplémentaire pour régénérer un cofacteur. De même, la dégradation d'un sous-produit de réaction dans une cascade orthogonale peut impliquer plus d'une étape et donc constituer une séquence en cascade linéaire qui lui est propre[13].

Les synthèses enzymatiques *one-pot* peuvent être effectuées en ajoutant toutes les enzymes en une seule fois, soit simultanément ou séquentiellement dans le récipient. Les avantages d'une synthèse *one-pot* sont les suivants[13] : (i) déplacement de l'équilibre d'une réaction réversible, (ii) simplification de la purification et meilleurs rendements, (iii) augmentation de la vitesse de la réaction, (iv) disparition des effets d'inhibition, (v) élimination des problèmes de solubilité. Surtout dans le cas de

composés stéréo-isomères, une conversion et une sélectivité > 99% sont souhaitées dans l'industrie parce que la séparation des produits peut être très coûteuse[198]. Le déplacement de l'équilibre dans une réaction *one-pot*, sans introduire d'autres opérations, est un moyen efficace pour atteindre cet objectif[199,200]. Lorsqu'une ou plusieurs réactions réversibles sont en série avec une réaction irréversible, les rendements et la sélectivité sont améliorés[201]. Cela signifie également une réduction des coûts opérationnels et des coûts en matières premières en raison de la conversion complète des substrats en produits souhaités. Lorsque le substrat ou le produit est inhibiteur, les réactions sont caractérisées par des vitesses lentes et des conversions faibles[202]. Dans ce cas, les réacteurs *one-pot* présentent un réel gain[203]. En effet, le composé responsable de l'inhibition est formé puis retiré en continu du milieu réactionnel, il ne peut donc pas s'accumuler. De plus, ce procédé est aussi particulièrement intéressant dans le cas de réactions qui impliquent des intermédiaires instables, à durée de vie très courte. À peine formé, ils sont directement transformés par la réaction suivante, des conversions élevées sont alors attendues.

Les réactions multienzymatiques *one-pot* présentent cependant quelques inconvénients[13]. Lorsque deux réactions sont exécutées séparément, les conditions optimales pour chacune peuvent être choisies. Par contre, lorsque plusieurs réactions sont exécutées dans le même réacteur, les conditions optimales pour chacune ne peuvent souvent pas être satisfaites. Un compromis doit être trouvé. De plus, il n'est pas rare de rencontrer des problèmes d'inhibition, le substrat d'une enzyme pouvant se révéler inhibiteur de la deuxième.

Ces biotransformations peuvent être faites avec des enzymes qui sont soit libres en solution (catalyse homogène) soit immobilisées (catalyse hétérogène). L'utilisation des enzymes co-immobilisées permet de conjuguer les bénéfices de l'immobilisation et ceux des réactions en cascade simultanément. On se rapproche alors de systèmes naturels où plusieurs enzymes sont organisées dans des compartiments. Les termes « métabolisme artificiel » sont adjoints pour définir une cascade biomimétique, immobilisée ou non.

I.4.2. Cascades en phase homogène

De nombreuses réactions multienzymatiques effectuées en solution ont été rapportées. Il serait trop ambitieux de présenter ici cette littérature de façon exhaustive. Seuls quelques exemples ont été sélectionnés, en lien avec la production de DHAP et l'utilisation d'aldolases pour la synthèse de sucres et analogues. On en profitera pour mettre l'accent sur des préparations de sucres phosphorylés, objets d'étude de ce travail de thèse.

I.4.2.1. Cascades pour la production du DHAP et son utilisation en synthèse

Le DHAP est un intermédiaire essentiel pour la synthèse d'une variété de composés d'intérêt. Du fait de l'importance de ce substrat, de nouvelles méthodes de synthèse sont mises au point régulièrement. Nous présentons ci-dessous les cascades enzymatiques qui ont été utilisés pour le générer *in situ*. En effet, à cause de son instabilité à pH neutre et basique, plusieurs cascades ont été conçues pour le libérer *in situ* et le faire réagir afin de synthétiser le produit désiré. Dans la littérature, trois approches différentes pour la génération *in situ* du DHAP, sont distinguées[13] : l'oxydation du glycérol-3-phosphate par la glycérol phosphate oxydase (GPO), la phosphorylation du DHA et la formation du DHAP à partir du FBP.

Le DHAP peut être préparé par voie enzymatique par retro-aldolisation du FBP en utilisant la FruA et la triosephosphate isomérase (TPI) (Schéma I.21)[166,204,205]. Cette cascade linéaire a été utilisée pour générer 2 équivalents de DHAP à partir d'un équivalent de FBP. Le DHAP est utilisé immédiatement dans une réaction d'aldolisation supplémentaire catalysée par la FruA ou la FSA, conduisant ainsi à une variété de sucres avec des rendements excellents [166,204,205].

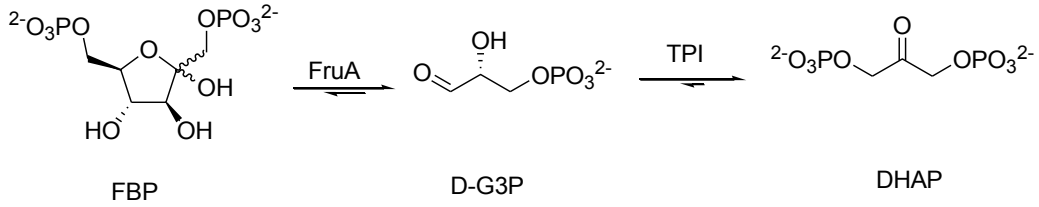


Schéma I.21 : Synthèse enzymatique du DHAP par retro aldolisation du D-FBP en utilisant la FruA et la TPI[166,204,205]

La phosphorylation enzymatique de la DHA est l'une des méthodes les plus utilisées pour préparer le DHAP (Schéma I.22). Les enzymes employés dans cette cascade orthogonale sont la glycérol kinase (GK)[206–209] ou la dihydroxyacétone kinase (DHAK)[210,211]. Ces deux enzymes utilisent de l'ATP comme donneur de phosphate, d'où la nécessité d'un système de régénération de cette molécule. Les deux systèmes de régénération de l'ATP sont le phosphoenolpyruvate/pyruvate kinase (PEP/PK) et l'acétyl phosphate/acétate kinase ($AcOPO_3^{2-}$/AK). Ces deux systèmes de régénération ont été utilisés avec la DHAK et la GK et ont permis l'obtention du DHAP avec un très bon rendement (80-95%). [206–211]. L'intérêt de ce procédé est que le DHAP peut être isolé et donc il est obtenu pur.

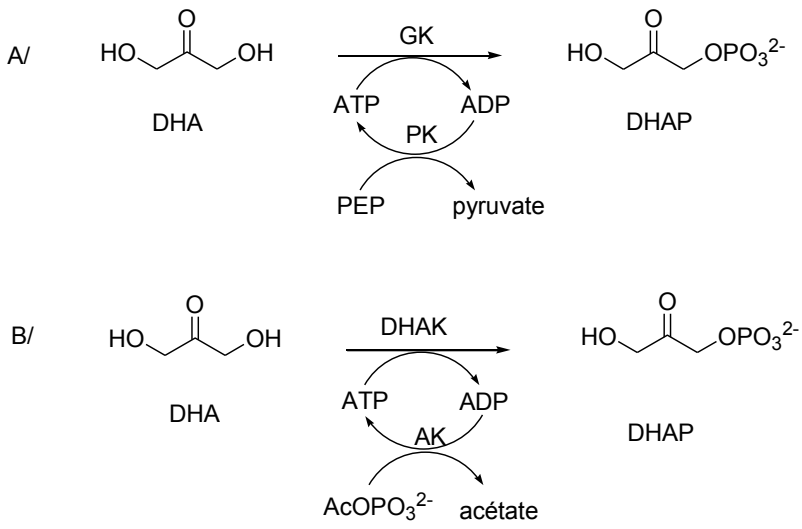


Schéma I.22 : Génération enzymatique du DHAP *in situ* à partir de la DHA[206–211]

Deux systèmes tri-enzymatiques ont été utilisés pour produire le DHAP à partir du glycérol. (Schéma I.23). Le premier système (Schéma I.23-A) utilise la phytase (nécessité du pyrophosphate (ppi) comme donneur de phosphate), la catalase et la GPO[212]. Le deuxième système implique la GK, l'AK, la catalase et la GPO (Schéma I.23-B). Cette dernière cascade ne peut être réalisée en une seule étape à cause de la faible tolérance de la GK à l'O_2[213,214]. En utilisant ces deux cascades, Le rendement en DHAP est inférieur à 50% puisqu'uniquement le L-glycérol-3-phosphate s'oxyde en DHAP, l'isomère D reste intact.

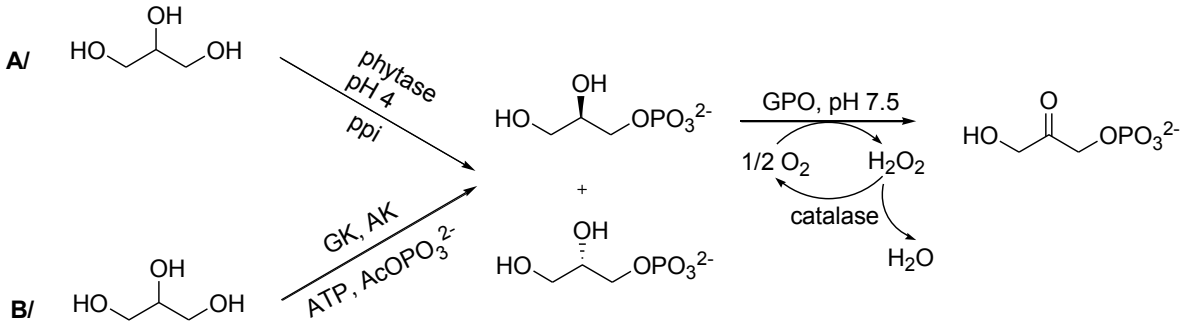


Schéma I.23 : génération enzymatique *in situ* du DHAP à partir du glycérol[212–214]

Les méthodes décrites ci-dessus sont fréquemment utilisées grâce à leur simplicité. Cependant, d'autres systèmes plus complexes et notamment plus couteux ont été conçus pour la synthèse du DHAP. Fessner et al. ont synthétisé le DHAP à partir du saccharose, en utilisant un système multienzymatique constitué de 6 enzymes disponibles commercialement (Schéma I.24), créant ainsi

un métabolisme artificiel de complexité remarquable permettant de synthétiser des sucres phosphorylés avec d'excellents rendements[215]. L'invertase transforme le saccharose en glucose et fructose. Le fructose est ensuite phosphorylé par action de l'hexokinase (HK) en F6P. Le glucose est transformé en glucose-6-phosphate par action de l'HK puis en F6P par action de la glucose-6-phosphate isomérase (GPI). La fructose-6-phosphate kinase 1 (PFK) catalyse ensuite la phosphorylation du F6P en FBA qui est transformé en DHAP par action de deux enzymes : la FruA et la TPI. L'HK et la PFK utilisent l'ATP comme donneur de phosphate d'où la nécessité de son système de régénération PEP/PK.

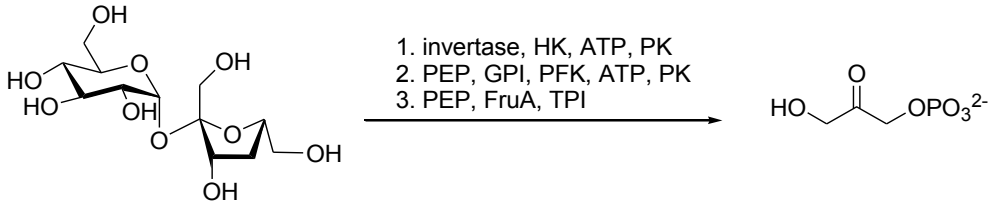


Schéma I.24 : Synthèse du DHAP à partir du saccharose par un métabolisme artificielle[215]

Nous avons présenté les principales cascades enzymatiques conçues pour générer le DHAP. La méthode la plus simple et la plus efficace est celle qui implique une phosphorylation de la DHA du fait de son cout faible et de la simplicité de la procédure. Le DHAP est un intermédiaire important pour la génération de sucres phosphorylés. Dans la partie suivante, nous présentons les différentes cascades enzymatiques utilisés pour préparer des sucres phosphorylés.

I.4.2.2. Cascades pour la synthèse de sucres et analogues

Deux systèmes multienzymatiques *one-pot* ont été décrits par Sanchez-Moreno et coll.. Dans les deux cas, le DHAP a été synthétisé à partir de la DHA en utilisant la DHAK (ATP-dépendante) et le système $AcOPO_3^{2-}$/AK pour régénérer l'ATP. Ensuite, une réaction d'aldolisation enzymatique entre le DHAP et un substrat accepteur permet l'obtention de divers sucres polyhydroxylés. La FucA (Schéma I.25-A)[210] et la FruA (Schéma I.25-B)[211] ont été employées dans ce but. Les rendements obtenus sont excellents pour certains accepteurs et faibles pour d'autres (Schéma I.25).

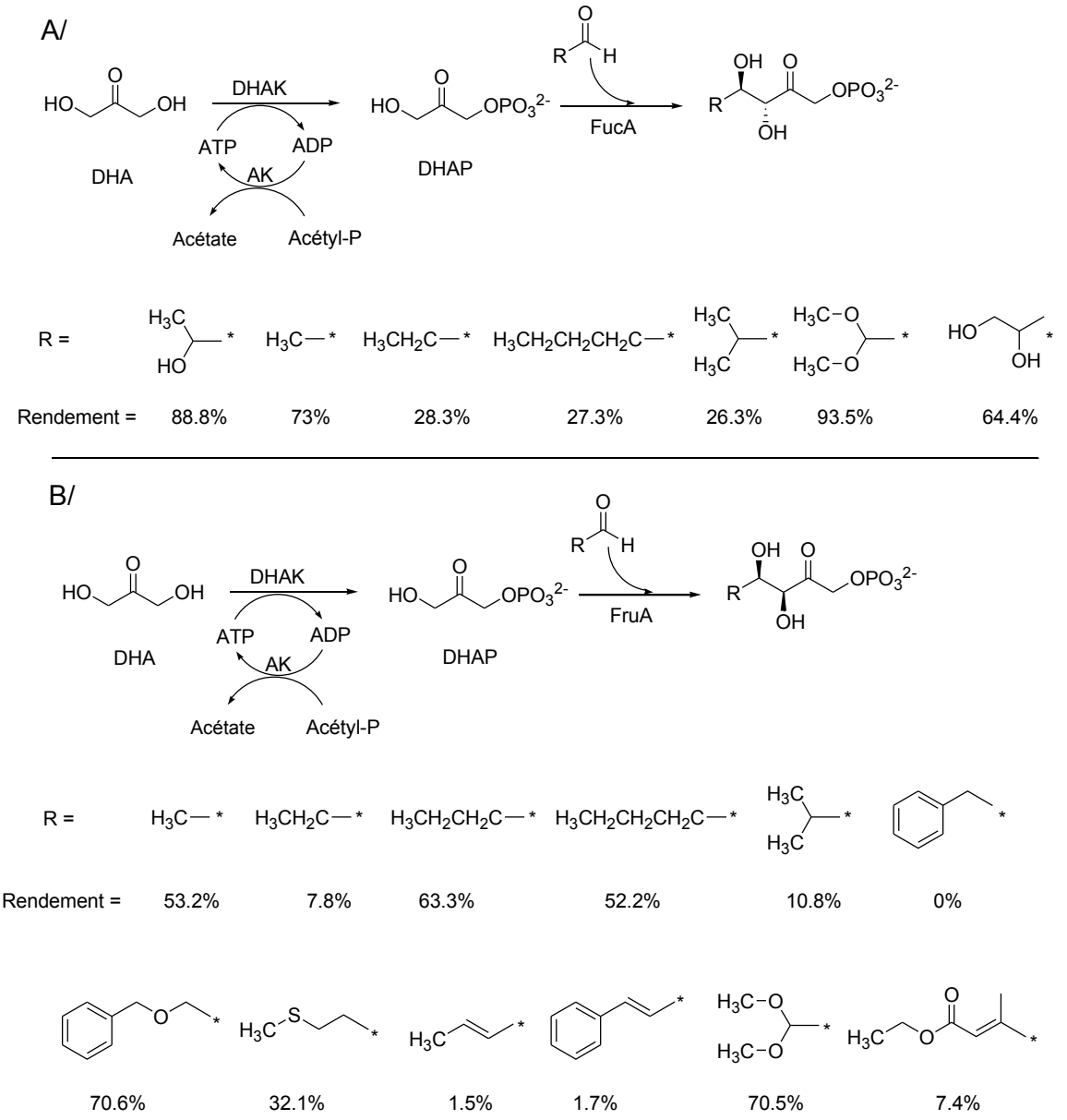


Schéma I.25 : Systèmes multienzymatiques assurant une réaction d'aldolisation entre le DHAP généré *in-situ* et différents aldéhydes pour la synthèse de sucres phosphorylés[210,211]

Schoevaart et ses collaborateurs[212] ont synthétisé des sucres et analogues à partir du glycérol en concevant une cascade enzymatique en quatre étapes (Schéma I.26). La première étape consiste en la phosphorylation du glycérol par réaction avec le ppi en présence de phytase pour conduire au glycérol-3-phosphate racémique. L'énantiomère L subit ensuite une oxydation sélective en présence de la glycérolphosphate oxydase et de la catalase pour donner le DHAP. Par la suite, la FruA catalyse la réaction d'aldolisation du DHAP avec le butanal. Enfin, la déphosphorylation du produit obtenu est réalisée par la phytase (Schéma I.26). Le 5-désoxy-5-éthyl-D-xylulose a été synthétisé avec un rendement de 29% à partir du glycérol. Cette alliance de quatre enzymes différentes dans une cascade

one-pot constitue un procédé intéressant pour réaliser des réactions d'aldolisation avec les aldolases DHAP-dépendantes à partir du glycérol et de ppi, molécules commerciales et non couteuses. De cette manière, différents sucres d'intérêt biologique peuvent être synthétisés à partir du glycérol. Cette cascade est faite en quatre étapes parce que chacune des enzymes a un pH spécifique (4 pour la phytase et 7.5 pour la GPO et la FruA).

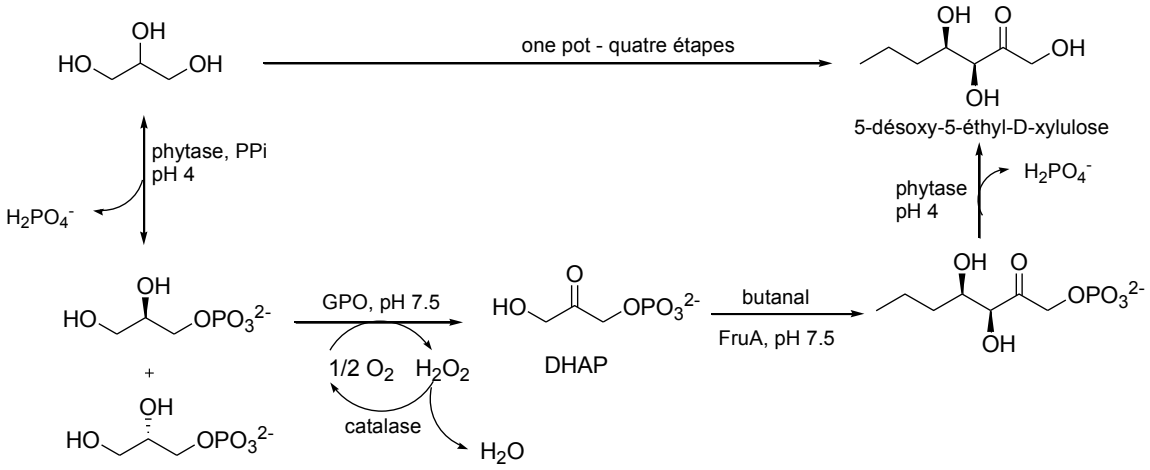


Schéma I.26 : Biotransformation du glycérol en un céto-triol via le DHAP selon une cascade tétraenzymatique[212]

Les deux exemples présentés conduisent à des sucres phosphorylés sur le carbone 1. D'autres exemples existent conduisant à des sucres phosphorylés en position terminale.

La synthèse enzymatique des sucres phosphorylés en position terminale à partir du glycérol, a été proposée par Fessner et al. en 1979[213]. Plus tard, Fessner et ses collaborateurs[165] décrivent deux stratégies de réactions en cascade pour synthétiser le D-F6P et son analogue 1-désoxy (Schéma I.27). La première stratégie consiste à rétroaldoliser le FBA par la FruA qui génère le DHAP et le D-G3P. La TPI isomérise le DHAP en D-G3P qui réagit ensuite avec un donneur en présence de la FSA pour donner le D-F6P ou son analogue 1-désoxy, selon le donneur utilisé (Schéma I.27-A). La deuxième stratégie se base sur une aldolisation entre l'hydroxypropanone et le glycéraldéhyde catalysée par la FSA, qui génère le 1-désoxyfructose qui sera phosphorylé par une HK qui est ATP dépendante (Schéma I.27-B). L'ATP qui est un substrat cher, a été ajoutée en continu dans la réaction sans l'utilisation d'un système de régénération. D'excellents rendements ont été obtenus pour le D-F6P : 94% par la voie 1 (286 mg) et 88% par la voie 2 (67 mg) ainsi que pour le 1-déoxy-D-F6P : 96% par la voie 1 (2.55 g) et 73% par la voie 2 (34 mg).

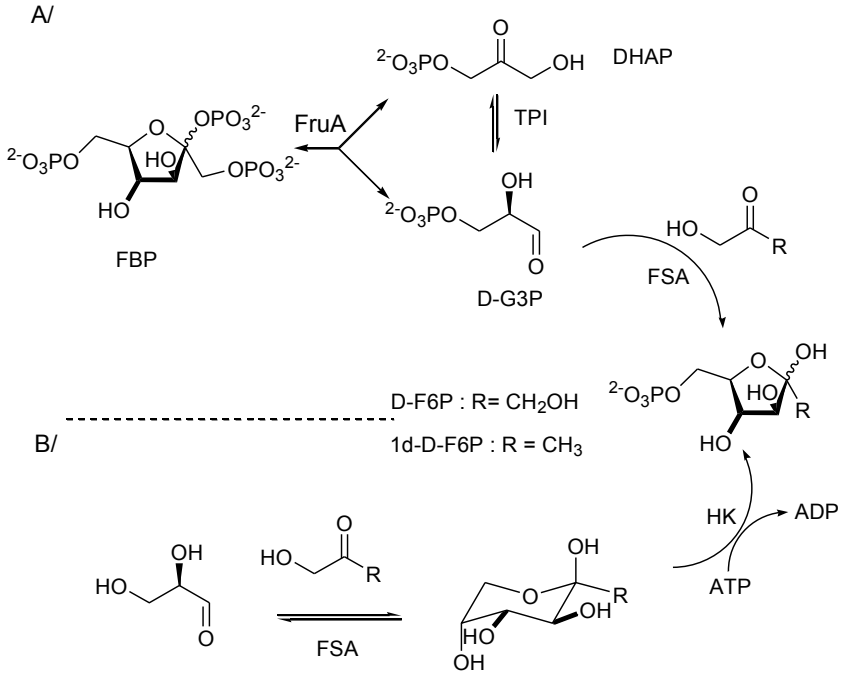


Schéma I.27 : Synthèse du F6P et de son analogue désoxy selon deux cascades enzymatiques[165]

Dans notre équipe Biocatalyse, Christine Hélaine, Israel Sanchez-Moreno et coll. ont exploré une stratégie de réactions multienzymatiques pour la synthèse de divers sucres monophosphorylés en position terminale d'intérêt biologique[166]. Cette synthèse est une réaction *one-pot* comprenant deux étapes basée tout d'abord sur la formation *in situ* du D-G3P pour ensuite mettre en place une réaction d'aldolisation catalysée par la FSA (Schéma I.28). La DHAK catalyse la phosphorylation de la DHA en DHAP en consommant un équivalent d'ATP qui est régénéré via le système PEP/PK. Le D-G3P est alors obtenu par isomérisation du DHAP en utilisant la TPI. Enfin, l'action de la FSA sur le D-G3P et un substrat donneur produit divers sucres phosphorylés. Cette stratégie permet d'obtenir de nouveaux composés avec de très bons rendements (80-95%).

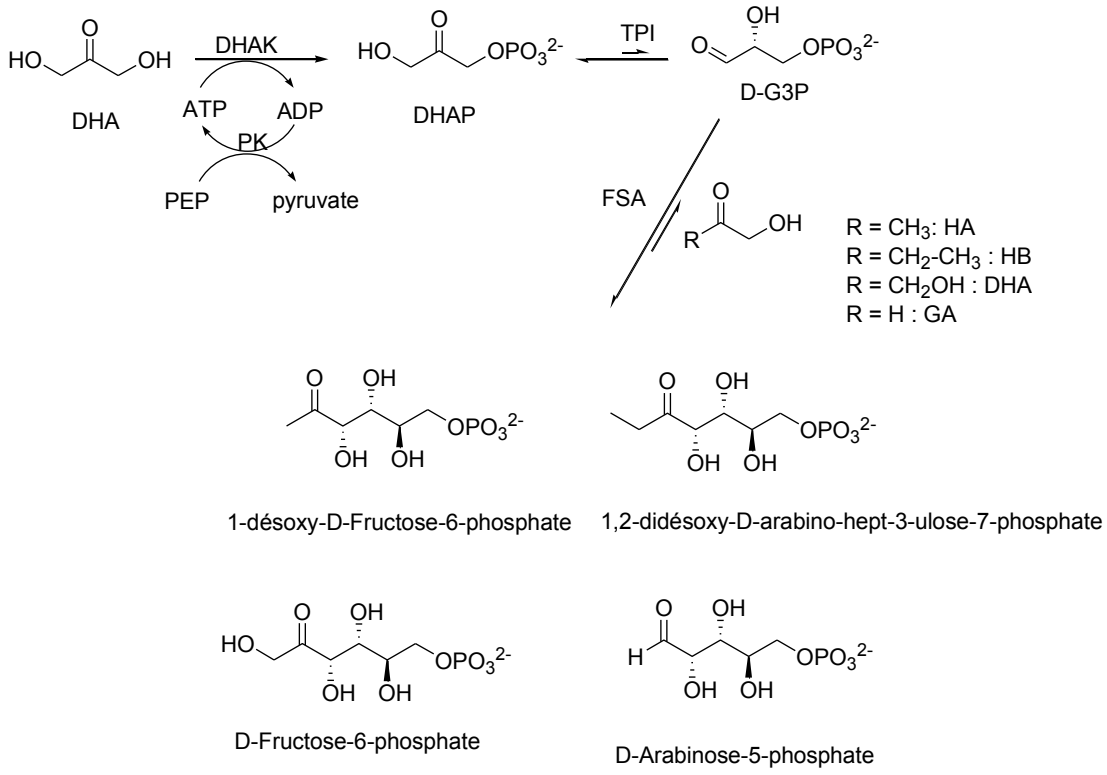


Schéma I.28 : Synthèse de divers sucres phosphorylés par une cascade enzymatique[166]

Nous venons de décrire quelques exemples permettant de générer le DHAP qui est ensuite utilisé avec des aldolases. Cependant comme nous l'avons décrit précédemment le DHAP grâce à la TPI, est facilement convertit en D-G3P. Ce dernier peut également trouver des applications avec des transférases. Ainsi, le D-xylulose-5-phosphate a été synthétisé par une cascade enzymatique en partant de deux substrats disponibles commercialement, le FBP et l'hydroxypyruvate (Schéma I.29). Le D-G3P a été généré à partir de la FBP en utilisant la FruA et la TPI comme vue précédemment (Schéma I.21). Sa réaction avec l'hydroxypyruvate, catalysé par une TK, produit le D-xylulose-5-phosphate avec un rendement de 82%[216].

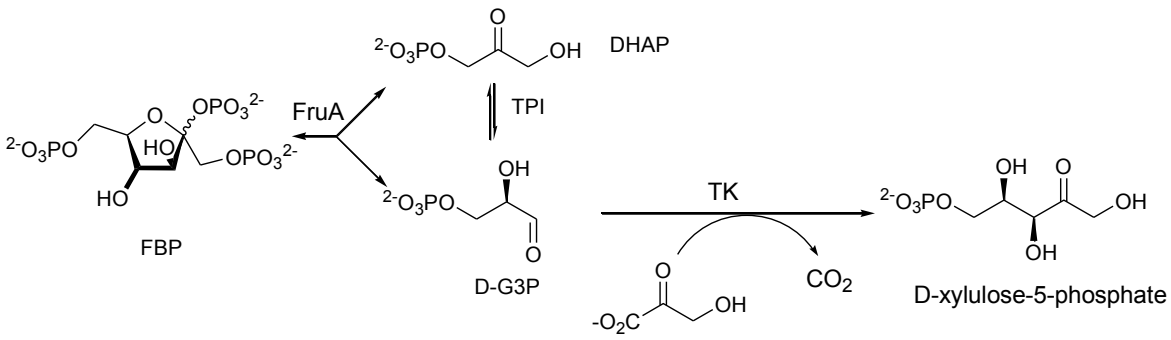


Schéma I.29 : Cascade enzymatique pour la synthèse du D-xylulose-5-phosphate[216]

I.4.3. Cascade en phase hétérogène

I.4.3.1. Introduction

La co-immobilisation de plusieurs enzymes dans un support présente à la fois des avantages et des inconvénients. Cinétiquement, la co-immobilisation est avantageuse : la deuxième enzyme agit sur un produit qui est présent en grande concentration dans les pores du support. Comme mentionné dans l'introduction de cette partie sur les cascades, le milieu biologique exploite très bien cet avantage avec l'organisation en réseaux des enzymes ou l'existence d'enzymes multifonctionnelles. C'est la canalisation métabolique, avec un gain sur le plan cinétique. Par mime de ces systèmes biologiques en co-immobilisant on peut alors parfois observer ce phénomène de canalisation. Cependant, cette stratégie impose des conditions réactionnelles communes (pH, température…) qui ne sont pas forcément les conditions optimales pour chaque enzyme. De plus, l'efficacité du système sera gouvernée par l'enzyme la moins stable.

Lors d'un processus de co-immobilisation, selon la méthode utilisée, on peut obtenir différents degrés d'organisation dans l'assemblage multi-enzymatique. Ainsi la localisation des différents types d'enzymes dans un support peut être aléatoire (*random co-immobilization*) ou contrôlée plus ou moins fortement (Figure I.11)[217]. Par encapsulation non-covalente dans des nanostructures ou accrochage covalent à un support, la distribution des protéines les unes par rapport aux autres se fera majoritairement de façon aléatoire (Figure I.11-A). Un certain degré d'organisation peut cependant être obtenu par construction de systèmes multi compartiments en réalisant par exemple des dépôts couche par couche.[218]

C'est par immobilisation par liaison covalente ou hydrogène que le contrôle de l'organisation sera le plus grand. À un premier degré, la co-immobilisation séquentielle s'obtient en contrôlant l'ordre des enzymes immobilisées en utilisant le même type de fixation pour toutes les protéines, par exemple avec le glutaraldéhyde (Figure I.11-B). Ce principe est bien adapté pour une cascade linéaire, cependant les biocatalyseurs sont compartimentés sans réelle proximité. À un deuxième degré, en introduisant des étiquettes de « reconnaissance », notamment un oligonucléotide (petit brin d'ADN) différent pour chaque protéine, une co-immobilisation positionnelle peut être réalisée avec un support sur lequel les sites complémentaires auront été fixés (Figure I.11-C). Ces deux types de co-immobilisation impliquent pour l'accrochage au support des groupements fonctionnels répartis aléatoirement sur les protéines, c'est ce qui est décrit comme « non spécifique » en Figure I.11-B et C. Enfin, plus sophistiquée, la co-immobilisation dite par « site spécifique » (Figure I.11-D) se fait par une liaison à un endroit ciblé de la chaîne protéique et un site activé du support, comme le montre la Figure I.12. Ce processus nécessite la fonctionnalisation de la protéine (introduction d'un acide aminé

non protéinogène par biologie moléculaire) d'une part et du support d'autre part. La réaction entre les deux groupements fonctionnels doit être chimiosélective[219].

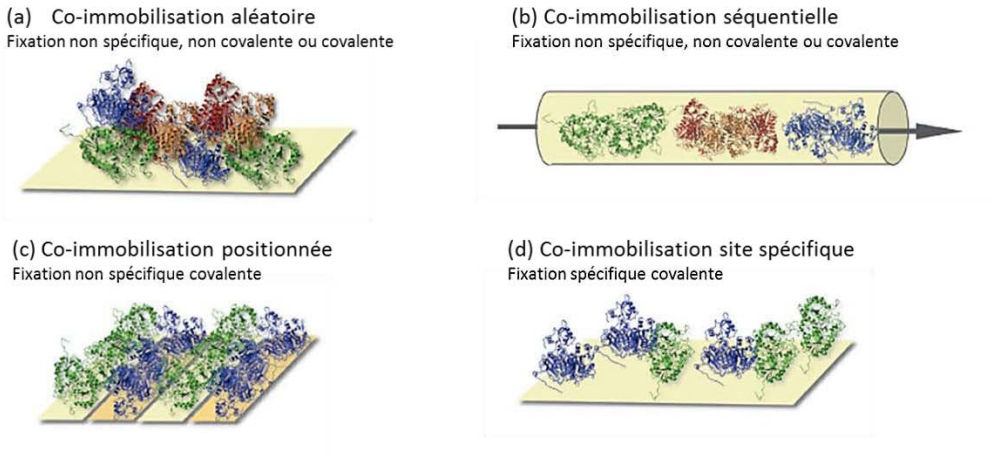


Figure I.11 : Les différentes approches pour la co-localisation des systèmes multienzymatiques (adapté de Schoffelen et al.)[217]

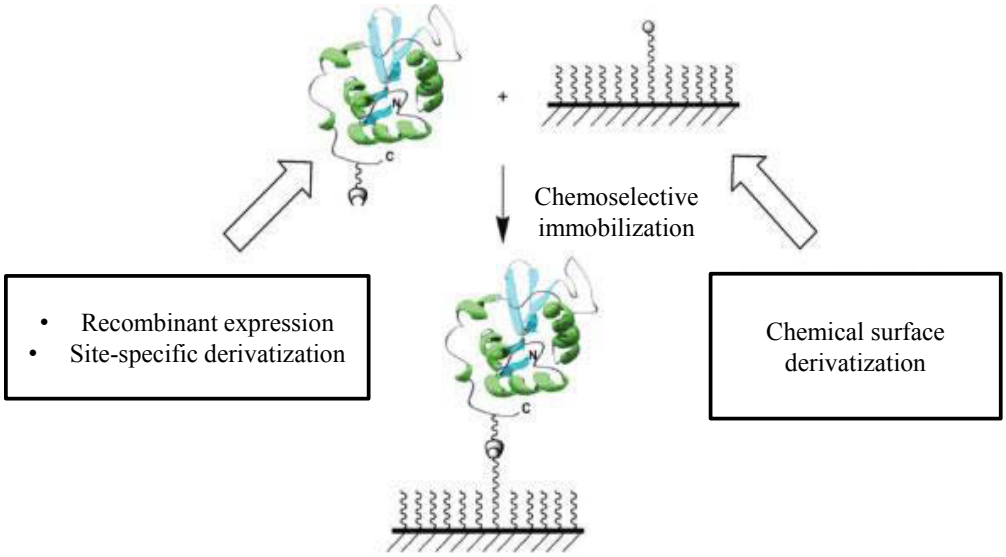


Figure I.12 : Immobilisation site-spécifique des enzymes[219]

Pour illustrer cette partie bibliographique, nous avons ciblé les exemples impliquant des nanostructures.

I.4.3.2. Cascades enzymatiques conçues dans des nanostructures

Avec leurs propriétés adaptables, les nanostructures permettent un meilleur contrôle du microenvironnement entourant les enzymes. Elles conduisent souvent à des performances nettement

améliorées, et renforcent la stabilité des enzymes[220]. Cependant, jusqu'à présent, les applications de systèmes multienzymatiques immobilisés dans des nanostructures sont peu développées.

Nous proposons comme plan les différents types de structuration présentées dans la Figure I.11.

I.4.3.2.1. Co-immobilisation aléatoire

C'est la stratégie la plus utilisée pour co-immobiliser des enzymes en raison de sa simplicité de mise en oeuvre. Il faut noter qu'elle ne conduit pas forcément à une augmentation de l'efficacité catalytique du système.

Des nanoparticules de TiO_2 ont été utilisées pour co-immobiliser trois enzymes qui sont la glycérol déshydrogénase (GDH), la 1,3-propanediol-oxidoreductase (PDOR) et la glycérol déshydratase (GDHt) par adsorption. Ces enzymes catalysent la biosynthèse du 1,3-propanediol (Schéma I.30). Ce travail a permis de mettre en évidence que les conditions d'immobilisation ont une grande influence sur le taux d'immobilisation. Après optimisation des conditions ce support permet l'immobilisation de 104.1 mg d'enzymes par g de support. Aucune amélioration dans la vitesse de la réaction n'a été observée par rapport au système libre. Cependant, la stabilité thermique de la GDH a été améliorée à 70°C : l'enzyme immobilisée garde 78% de son activité, celle libre en garde 12% uniquement.[221]

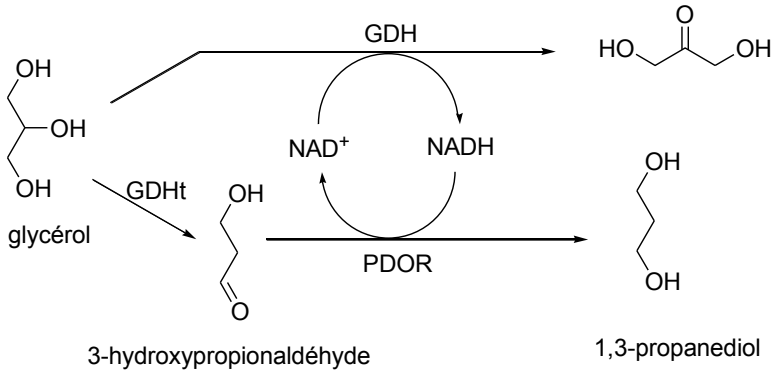


Schéma I.30 : Synthèse bienzymatique du 1,3-propanediol avec régénération du cofacteur[221]

La GDH et la xylose réductase (XR) ont été immobilisées par liaison covalente sur des nanoparticules polymériques afin de les utiliser pour produire simultanément la DHA et le xylitol. la XR catalyse la réduction de la xylose en xylitol en utilisant le NADH, la GDH catalyse la production de la DHA à partir du glycérol en présence du NAD^+ (Schéma I.31). De cette façon, le cofacteur de l'une est régénéré par l'autre. Pour la GDH, le taux d'immobilisation et l'activité retenue était de 20 mg/g et 71%, ceux de la XR étaient de 53 mg/g et de 35%. Aucun changement dans la vitesse de la réaction n'est à nouveau observé par rapport aux enzymes libres. À nouveau, les enzymes

immobilisées ont une stabilité améliorée. De plus, le système est réutilisable jusqu'à dix cycles avec cependant perte de 50% des activités des enzymes[222].

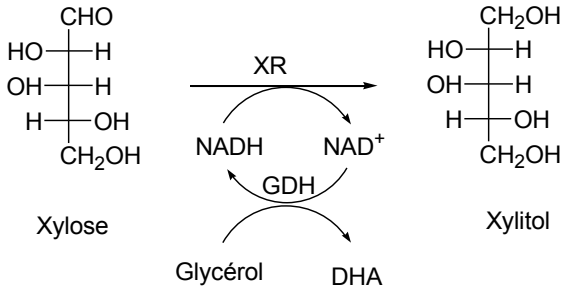


Schéma I.31 : cascade parallèle pour la synthèse du DHA et du xylitol[222]

Cependant, certains travaux mentionnent la possibilité d'observer une augmentation de la vitesse de la réaction due à la proximité des sites actifs des enzymes une fois co-immobilisées, par rapport à la vitesse observée sur les enzymes libres en solution. Betancor et ses collaborateurs[223] ont décrits la co-encapsulation de deux enzymes, la nitrobenzène nitroréductase (NBNR) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) dans des particules de silice afin de les utiliser dans la réaction de réduction des nitrobenzènes. La G6PDH assure la régénération du cofacteur NADPH. La co-immobilisation est réalisée d'une façon aléatoire, les deux enzymes sont encapsulées simultanément et sont ainsi localisées dans le même compartiment. Les auteurs décrivent un pourcentage d'immobilisation de 100% des deux enzymes avec une activité immobilisée de 52% pour la NBNR et de 33% pour la G6PDH. Le système obtenu permet la conversion du nitrobenzène en hydroxylaminobenzène par la NBNR en recyclant le NADPH par la G6PDH (Schéma I.32). La vitesse de la réaction est augmentée de 125 fois par rapport aux enzymes libres.

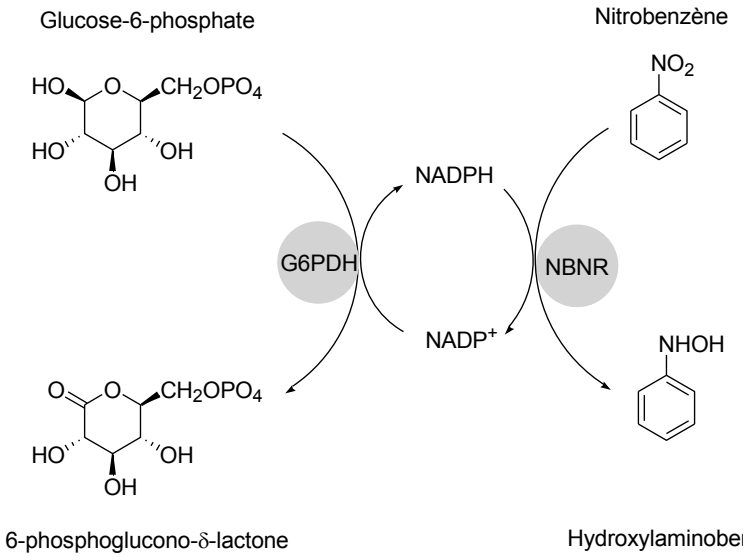


Schéma I.32 : Cascade catalysée par deux enzymes immobilisées dans des nanoparticules de silice[223]

Deux autres exemples (mode d'immobilisation aléatoire) d'observation d'augmentation de vitesse sont décrits pour la synthèse des sucres phosphorylés. Le premier a été rapporté par Mosbach et ses collaborateurs[224] qui ont co-immobilisé deux enzymes : l'HK et la G6PDH sur deux supports différents, le sépharose et un copolymère acrylamide-acide acrylique. Ces deux enzymes ont été accrochées aux deux matrices par liaison covalente. Les auteurs démontrent une augmentation de la vitesse de la réaction due à un effet de canalisation des substrats. Cet effet se traduit par l'augmentation d'un facteur 2 de la vitesse de formation du NADPH (Schéma I.33), par rapport à l'utilisation des enzymes libres[220].

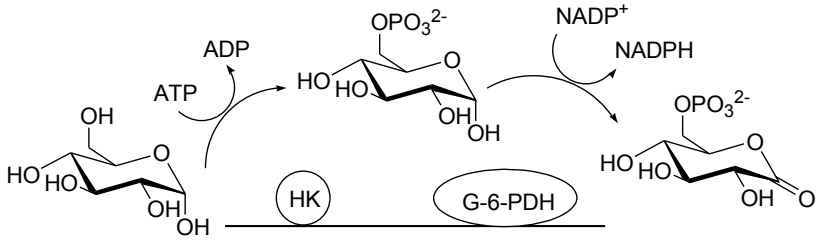


Schéma I.33 : Réaction catalysée par deux enzymes immobilisées par liaison covalente[220]

Le deuxième exemple concerne des nanoparticules magnétiques contenant de la cellulose microcrystalline (A-MNPs). Elles ont été utilisées pour co-immobiliser la TPI, la FruA et la fructose-1.6-bisphosphatase (FBPase) par adsorption. Ces trois enzymes comportent une étiquette CBM (*carbohydrate-binding module*) permettant leur liaison au support cellulosique. Le réacteur obtenu a été employé pour synthétiser le F6P à partir du G3P. La TPI catalyse l'isomérisation du G3P en DHAP, ensuite la FruA catalyse l'aldolisation de DHAP et du G3P pour générer le FBP, enfin la FBPase catalyse la conversion du FBP en F6P (Schéma I.34). Une augmentation de la vitesse de la réaction d'un facteur 4.6 a été trouvée en utilisant les enzymes co-immobilisées sur les A-MNPs, par rapport aux enzymes libres[225].

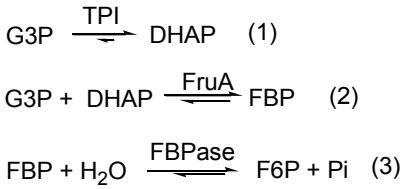


Schéma I.34 : Synthèse enzymatique du F6P à partir du G3P[225]

La GOx et l'HRP ont été immobilisées sur des nanoparticules de polystyrène (ayant des groupes carboxyles sur la surface), par liaison covalente avec également observation de cet effet chanel. Ce système a été utilisé pour quantifier le glucose. L'HRP a d'abord été immobilisée suivie de la GOx, l'inversement de cet ordre aboutit à la perte de l'activité de la GOx durant l'élimination de l'HRP non

immobilisée. L'effet chanel observé ici est caractérisé par une augmentation de vitesse d'un facteur 2 que ce soit par comparaison avec les enzymes libres ou immobilisées séparément sur ces nanoparticules[226].

Quelques facteurs peuvent être contrôlés lors de la co-immobilisation aléatoire comme le rapport enzymes/support et les proportions de chacune des enzymes. Kang et al. ont ainsi co-immobilisé trois enzymes dans des nanostructures semi-conductrices (CdSe−ZnS core/shell quantum dots). Ces trois enzymes (MenF, MenD et MenH) interviennent dans la biosynthèse de la ménaquinone et ont des étiquettes 6 histidines en C ou N-terminal, ce qui permet leur immobilisation sur la surface de ces nanoparticules. Grâce à une modulation du rapport [enzymes]/[support], les auteurs sont parvenus à contrôler la distance entre les enzymes (plus le rapport est grand, plus la distance est faible). Ils ont pu également contrôler l'accumulation de l'intermédiaire de la réaction en changeant le rapport MenF/MenD/MenH : par exemple, la vitesse de la réaction est quatre fois plus grande pour un rapport de 20/5/5 comparé à celle pour un rapport de 5/20/5. Ce résultat a été observé pour un rapport enzymes/support de 15/1.[227]

I.4.3.2.2. Co-immobilisation séquentielle

Cette stratégie implique l'immobilisation de chaque enzyme individuellement et la réalisation d'un réacteur avec des chambres contenant chacune une des enzymes immobilisées. La cascade se déroule dans ce cas d'une façon séquentielle. Ceci est intéressant dans le cas d'une cascade linéaire, où le produit de l'enzyme A est substrat de l'enzyme B et le produit de l'enzyme B est substrat de l'enzyme C, etc[217]. Cette stratégie n'aboutit pas à l'augmentation de la vitesse de la réaction puisque les enzymes ne sont pas proches les unes des autres, cependant les autres bénéfices de l'immobilisation peuvent être présents (stabilité, recyclabilité, pureté des produits). À notre connaissance, un seul exemple existe de ce type de co-immobilisation dans les nanostructures.

Babich et ses collaborateurs[228] ont réalisé deux systèmes bi-enzymatiques pour la synthèse d'analogues chiraux de sucres à partir de réactifs achiraux, en immobilisant deux enzymes : la phosphatase acide (PhoN) et une aldolase, la FruA ou la RhuA. Elles ont été immobilisées séparément, par liaison covalente, sur des billes méthacryliques poreuses réticulées par des monomères ayant des fonctions époxy (Sepabeads). Un système de synthèse continue des analogues de sucres a été préparé et est représenté dans le Schéma I.35. Dans la première colonne du réacteur, seule la phosphatase acide immobilisée (PhoN-Sf) est présente, cette enzyme catalyse la phosphorylation de la DHA en DHAP. L'aldolase immobilisée est quant à elle dans la deuxième colonne et catalyse l'aldolisation du DHAP formé avec un aldéhyde. La troisième colonne contient à nouveau la phosphatase acide immobilisée qui va déphosphoryler le produit formé.

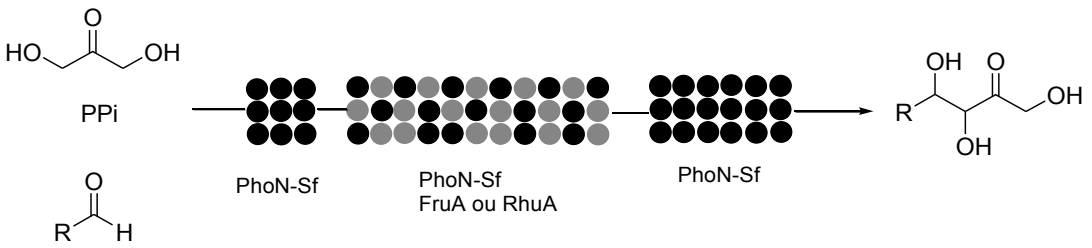
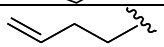
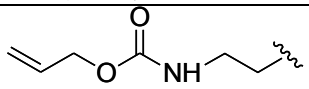


Schéma I.35 : réacteur conçu en immobilisant deux enzymes dans des billes méthacryliques[228]

Différentes synthèses ont été lancées sur ce réacteur pendant 5 jours en flux continu. Les conversions obtenues, le premier et le 5ème jour, sont représentées dans le Tableau I.18. En utilisant la FruA avec le propanal comme accepteur, une conversion de 68% a été observé le premier jour. Après 5 jours, ce pourcentage tombe à 51%, indiquant une légère diminution de l'activité de l'enzyme. En utilisant la FruA, 80% du pent-4-ènal ont été convertis le premier jour. Ce pourcentage diminue fortement (7%) le 5ème jour, ce qui montre l'effet inhibiteur de l'aldéhyde. En utilisant la RhuA, une légère perte d'activité a été observée après 5 jours, qui était traduite par la diminution des conversions des aldéhydes.

Tableau I.18 : efficacité catalytique du réacteur préparé[228]

Aldolase	Groupe R	Conversion (%)	
		Jour 1	Jour 5
FruA		68	51
FruA		80	7
FruA		70	10
RhuA		30	22
RhuA		25	13

D'autres exemples de l'action synergique de deux enzymes ont été reportés dans la littérature. La glucoamylase (GAm) et la glucose isomérase (GI) sont deux enzymes nécessaires à la production du fructose à partir de l'amidon et de la dextrine selon un processus en deux étapes. Ces deux enzymes ont été co-immobilisées d'une façon semi-contrôlée, sur des billes macroporeuses de polystyrène. Une première couche d'enzymes (GI) a été immobilisée par adsorption sur les billes, une molécule bipolaire a été ajouté dans une deuxième étape, cette molécule facilite l'adsorption d'une deuxième couche d'enzymes (GAm). Des bonnes activités immobilisées ont été obtenues : 942 et 1242 U/g de gel sec pour la GAm et la GI, respectivement. Cette technique de dépôt moléculaire permet la génération de deux couches d'enzymes sur le support poreux. La proximité des deux enzymes a

permis de réduire le temps de diffusion du substrat ce qui a augmenté la vitesse de la production du fructose d'un facteur 1.9 par rapport aux enzymes libres[229].

I.4.3.2.3. Co-immobilisation en contrôlant la position de chaque enzyme

La fonctionnalisation chimique des protéines a permis l'introduction de domaines de liaison afin de co-localiser des enzymes sur des supports d'ADN. On accroche au biocatalyseur un oligonucléotide d'ADN. Dans le cas de systèmes multienzymatiques, les séquences des oligonucléotides liées de façon covalente diffèrent d'une enzyme à l'autre et sont complémentaires à une région particulière du support greffé par de l'ADN. Ces approches élégantes permettent un haut niveau de contrôle de l'arrangement spatial des différentes enzymes du système.

Fu et al. ont co-immobilisés deux enzymes (GOx et HRP) sur des nanostructures d'ADN afin de les utiliser pour quantifier le glucose. Les auteurs ont mesuré l'efficacité catalytique du système en fonction de la distance entre les deux enzymes. Cette distance peut être modifiée (de 10 à 65 nm) en changeant la distance entre les deux sites de liaison de ces enzymes. Une augmentation de 15 fois de l'activité totale des enzymes par rapport aux enzymes libres, a été trouvée pour une distance de 10 nm. Lorsque cette distance augmente, l'activité totale diminue[230,231].

I.4.3.2.4. Co-immobilisation site-spécifique

Ce type de co-immobilisation implique la formation d'une liaison entre le support et un groupement spécifique de l'enzyme par des réactions de cycloaddition azoture-alcyne ou de transamination en position N-terminale, par exemple.[217] Ce groupe spécifique, un acide aminé non protéinogène est introduit par ingénierie moléculaire. À notre connaissance, cette méthode n'a jamais été employée pour co-immobiliser des enzymes sur des nanostructures.

Les exemples discutés ci-dessus illustrent les différentes stratégies employés pour co-localiser des enzymes au sein d'une matrice. La co-immobilisation aléatoire des enzymes peut donner de bons résultats dus à la proximité physique des enzymes. Cependant, le contrôle de la distance entre les enzymes ainsi que de leur position permet une meilleure régulation de la cascade enzymatique.

I.5. Problématique

Le but de ce projet est le développement de nouveaux matériaux multi-fonctionnels biohybrides pour les utiliser dans des réactions mono ou multi-enzymatiques. Les résultats rapportés dans ce mémoire s'articulent autour de trois chapitres.

Dans le chapitre 2, nous avons étudié les différents aspects de l'immobilisation de la FSA dans les HDL. Un travail initial mené en 2011 par C. Guérard-Hélaine a permis de renforcer la collaboration entre les groupes HDL et Biométa et d'asseoir avec confiance ce projet de thèse. La FSA avait été immobilisée avec succès dans ces matériaux par coprécipitation. Cependant, l'influence de différents paramètres ainsi que les interactions impliquées n'avaient pas été explorées. A présent, il s'agit de réaliser l'immobilisation de la FSA selon deux méthodes, la coprécipitation et l'adsorption. Dans le cas de la coprécipitation, l'effet de la composition des feuillets d'HDL et du rapport HDL/enzyme est étudié. La stabilité thermique et celle en présence d'un solvant organique ainsi que le profil de catalyse en fonction du pH sont représentés. L'effet de la composition des matrices d'HDL sur l'adsorption est aussi étudié : les interactions entre l'enzyme et le support sont examinés grâce aux isothermes d'adsorption et à des études calorimétriques. Les taux d'encapsulation maximaux obtenus par les deux méthodes sont comparés.

Le chapitre 3 est dédié à l'étude de l'immobilisation de la FSA dans une matrice hybride polysaccharide/HDL. Notre stratégie compte sur deux niveaux d'immobilisation : la nanostructuration de l'enzyme dans les HDL puis la macrostructuration du biohybride obtenu dans une matrice de polysaccharides. L'objectif étant de créer des microréacteurs opérationnels pour la biocatalyse. L'immobilisation des enzymes sur une matrice hybride constituée de deux supports différents confère aux bionanoréacteurs obtenus des propriétés catalytiques intéressantes telles que la stabilité et la simplicité de mise en œuvre. Cette organisation hiérarchisée de microréacteurs pourrait trouver notamment des applications en biotechnologie. Le développement de ces matériaux biohybrides multifonctionnels permettra la synthèse des molécules d'intérêt biologique tel que des sucres et des analogues. Nous présentons dans le chapitre 3, le criblage réalisé pour choisir le polysaccharide le mieux adapté pour encapsuler l'enzyme sous forme de billes de polymère gélifié. Ensuite, une étude détaillée de l'encapsulation de la FSA et du matériau biohybride FSA@HDL dans les billes du polysaccharide choisi sera conduite. Le bionanoréacteur structuré à l'échelle macroscopique est caractérisé par des méthodes physiques. Son efficacité catalytique ainsi que sa recyclabilité sont présentés vis-à-vis d'une réaction modèle.

Le chapitre 4 concerne une approche biomimétique de réactions en cascade multienzymatique. Ce chapitre est divisé en deux parties. Les deux études basées sur la construction de métabolismes artificiels ont pour objectif commun la synthèse de molécules d'intérêt biologique.

Dans la première partie nous avons élaboré des bionanoréacteurs multienzymatiques par co-immobilisation dans les HDL des enzymes constitutives de ces cascades. Pour choisir la matrice HDL la mieux adaptée au système multienzymatique, un criblage de matrices HDL en faisant varier la composition du cation est présenté. En effet, la co-immobilisation contraint de trouver un compromis, les enzymes devant toutes fonctionner dans les mêmes conditions. Nous souhaitons concevoir deux bionanoréacteurs. Le premier bienzymatique est utilisé pour la synthèse du DHAP à partir de la DHA. Le deuxième bionanoréacteur est composé de quatre enzymes qui sont impliquées dans la synthèse du D-F6P à partir de la DHA. L'efficacité catalytique de ces bionanoréacteurs est étudiée. Ils sont caractérisés par des méthodes physiques classiques.

Dans la deuxième partie de ce chapitre 4, nous décrivons la conception d'une cascade multienzymatique en solution pour la synthèse de sucres rares de série L à partir des réactifs simples et non coûteux. La problématique ici consiste à mettre au point les conditions réactionnelles optimum : proportion d'enzymes, de substrats, pH etc. pour que les équilibres évoluent dans le sens souhaité. Nous tentons ensuite de réaliser cette cascade en phase hétérogène, c.-à-d. en immobilisant les enzymes impliquées dans les HDL.

En conclusion, ce travail de thèse s'intègre à une interface pluridisciplinaire impliquant la chimie des matériaux et la biocatalyse, et à une approche alliant des expériences en laboratoire pour étudier la conception des bionanoréacteurs mono- et multi-enzymatiques. Il permet une approche rationnelle de la conception des cascades immobilisées et apporte une meilleure compréhension des paramètres importants à régler pour atteindre un système efficace.

Chapitre II : Etude de l'immobilisation de la Fructose-6-phosphate aldolase dans les hydroxydes doubles lamellaires

II.1. Introduction

La FSA_{wt} a été immobilisée dans une phase HDL de composition Mg_2Al-HDL par coprécipitation, comme détaillé dans l'étude bibliographique présentée dans le premier chapitre. Les résultats obtenus précédemment au laboratoire étaient intéressants en termes du taux d'encapsulation (0.9 mg de prot/mg d'HDL), de la rétention d'activité (100%) ainsi que de la stabilité et de la recyclabilité du matériau biocatalytique. Vues les bons résultats, il était intéressant d'approfondir cette étude sur l'immobilisation de cette enzyme la FSA dans les HDL afin de comprendre l'effet de la méthode d'immobilisation et de la composition de l'HDL sur la structure et l'activité des biohybrides.

Les principaux objectifs de ce chapitre sont :

- Examiner les interactions entre l'enzyme et différentes compositions d'HDL en traçant les isothermes d'adsorption.
- Etudier la structuration, la morphologie, le taux d'encapsulation et la rétention d'activité des biohybrides obtenus en fonction de la méthode d'immobilisation (adsorption et coprecipitation) et de la composition de l'HDL.

II.2. Résultats

II.2.1. Introduction

Les résultats de cette partie sont présentés sous forme d'une publication dont le titre est « Immobilization of FSA on Layered Double Hydroxides : Toward Efficient Biocatalyst Nanocomposites » en cours de préparation pour une soumission au *Journal of Colloid and Interface Science*' (IP 3.368).

Dans ces travaux, j'ai participé :

- à la réalisation des expériences en laboratoire ;
- à la caractérisation des matériaux et des produits de synthèses
- à l'interprétation des résultats
- à la rédaction de l'article.

Ces résultats ont été présentés également sous forme de :

Communication orale dans le congrès **Euroclay 2015**‘ qui s‘est déroulé à Edimbourg (UK) en juillet 2015 sous le titre « Nanostructured multienzymatic@LDH biohybrid as one-pot biocatalyst for polyalcohol synthesis » (Orateur : C. Forano)

II.2.2. ‘Immobilisation of FSA on Layered Double Hydroxides: toward efficient biocatalyst nanocomposites’ en cours de préparation pour soumission à ‘*Journal of colloid and Interface Science*’

Immobilisation of FSA on Layered Double Hydroxides: toward efficient biocatalyst nanocomposites

Rima Mahdi,[a],[b] Vanessa Prévot,[a],[b] Ulla Gro Nielsen,[c] Suraj Pushparaj,[c] Christine Guérard-Hélaine,[a],[b] Marielle Lemaire,*[a],[b] and Claude Forano* [a],[b]

[a] Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 Clermont- Ferrand, France.
[b] CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63177 Aubière, France.
[c]Department of Physics, Chemistry, and Pharmacy, University of Southern Denmark, 5230 Odense M, Denmark.

Abstract

A study of the immobilization of an interesting mutant of the fructose-6-phosphate aldolase (FSA_{A129S}), by coprecipitation and adsorption methods, in different layered double hydroxides matrices was performed. This enzyme is proved to be effective in the creation of C-C bond for the synthesis of interesting sugars. The effects of the layers composition and of the ratio LDH/enzyme on the encapsulation efficiency, the retained activity, the structural and the morphological properties of the biohybrids, prepared by coprecipitation, were studied. A decrease of crystallinity was observed for the biohybrids prepared by coprecipitation, when the amount of encapsulated enzyme increases due to the preferential aggregation of LDH nanoplatelets on the enzyme surface. A maximum of activity (7.7 U/mg of solid) was reached for FSA_{A129S} immobilized in Mg_2Al-LDH by coprecipitation. Immobilization of the enzyme in LDH matrices did not change the substrate/enzyme affinity, which was confirmed by the Michaelis constant values. The stability of immobilized enzyme in the presence of DMF was higher compared to that of the free enzyme. Adsorption isotherms of FSA_{A129S} on different LDH matrices were of L-type. The immobilization efficiency of the coprecipitated enzyme was higher than that of the adsorbed one.

Introduction

Today, due to a very low ecological impact, biocatalytic processes have become a cornerstone of green and sustainable chemistry because they appear as an interesting alternative to chemical catalysis[1] for the synthesis of fine organic products. Enzymes are able to catalyze various reactions and to synthesize a large variety of compounds with high selectivity and specificity, avoiding the use of organic solvents or toxic compounds. Indeed, they offer a fully direct catalytic way to valuable molecules, with exclusive chemo- regio- and stereoselectivity, high atom economy and limited waste. In several areas of asymmetric synthesis, biocatalysis is bound to become the method of choice rather than the one of replacement.[1]

These advantageous perspectives lead to increase continuously the applications of enzymes in different industries[2]. However development of enzymatic catalytic applications at the industrial scale suffers of a lack of long-term operational stability and shelf-storage life, cumbersome recovery and re-use[2]. These drawbacks can generally be overcome by immobilization of enzymes. In fact, a major challenge in industrial bio-catalysis is the development of stable, robust, and preferably insoluble biocatalysts[2]. Enzyme immobilization permits to enhance the thermal and the storage stability of the enzyme and to re-use[2] it for several cycles in an economic fashion.

Immobilization can be carried out by different strategies: encapsulation, cross-linking, covalent binding, complexation and adsorption[3]. However, the strategy of enzyme immobilisation, originally developed to allow their reuse or their easy separation,[4] has very recently moved to the modern and innovative concept of nano-bioreactors where the biological reactions take place in a nanoscale confined environment organised in a bio-inspired fashion. In such concept, the nanosized container becomes an active component of the overall reaction process.[5]

Among the various immobilization matrices, the nanostructures were able to enhance the storage and thermal stability overcoming the diffusion limitations observed with other matrices[6,7]. Besides silica

and other metal oxide systems, Layered Double Hydroxides (LDH) are inorganic compounds, formed by a stacking of positively charged layers composed of metal hydroxides ($[M^{II}_{1-x}M^{III}_{x}(OH)_2^{x+}]$, where M^{II} and M^{III} are respectively divalent and trivalent metal cations), separated by an interlamellar space which contain anions and water molecules ($[A^{q-}_{x/q}.nH_2O]$) (Figure 1-A). Due to their tunable surface properties, their bidimensional structure and their high hydration rate, LDH have already proved their high efficiency and biocompatibility for hosting enzymatic[8], multi-enzymatic systems[9] and even microorganisms[10]. Embedding enzymes or proteins in LDH has been obtained through various soft chemistry processes, adsorption or anion exchange[11], cross-linking[12], in-situ coprecipitation[13], delamination/restacking[14] and grafting[15]. LDH matrices were widely used to immobilize enzymes like urease[13], alkaline phosphatase[16], transketolase[17], laccase[18], aminopeptidase[19], and recently fructose-6-phosphate aldolase (FSA_{wt}) (Figure 1-B)[20]. The FSA_{wt} is a new discovered enzyme[21], which catalyze the C-C bond formation reaction stereoselectively. It has attracted considerable interest due to its unique utilization of unphosphorylated donors which are dihydroxyacetone (DHA), hydroxybutanone (HB), hydroxyacetone (HA) and glycolaldehyde (GA), as well as a large variety of aldehydes as acceptors[22–25]. This enzyme was intensively used to synthesize various interesting compounds like sugars[22], phosphorylated sugars[26], iminocyclitols[27] and nitrocyclitols[28]. Several variants of FSA_{wt} were constructed to improve its activity toward various substrates[29–31]. Among designed variants, FSA_{A129S} was 17 times more active than the FSA_{wt} towards DHA[29].

The FSA_{wt} was successfully immobilized in layered double hydroxides without any loss of activity[20]. Mg_2Al-LDH was chosen as matrix because it has allowed working at the optimal pH (pH = 8.5) for enzyme activity. The biohybrid was efficiently applied in biocatalysis and could be reused without a significant loss of activity. Recently, we demonstrated the ability of the Mg_2Al-LDH to enhance the encapsulation efficiency of the FSA_{wt} in polysaccharide beads due to the favorable electrostatic interactions between the polysaccharide and the LDH layers[32].

In this study, we have focused on the immobilization of FSA_{A129S} in various LDH. FSA_{A129S} was chosen to perform the study because of its high activity toward the DHA. Parameters of coprecipitation of FSA_{A129S} and LDH were explored in order to determine the optimal conditions for the preparation of a FSA_{A129S}@LDH biohybrid catalyst with the highest catalytic activity. Effects of both the layer composition (divalent metal) and the LDH/FSA ratio were studied. The prepared biohybrids were characterized by powder x-ray diffraction, FTIR spectroscopy and thermogravimetric analysis. Enzymatic activities, pH profile, thermal and organic solvent stability of the immobilized enzyme were investigated. Adsorption isotherms were plotted in order to characterize the interactions between the enzyme and the different LDH matrices.

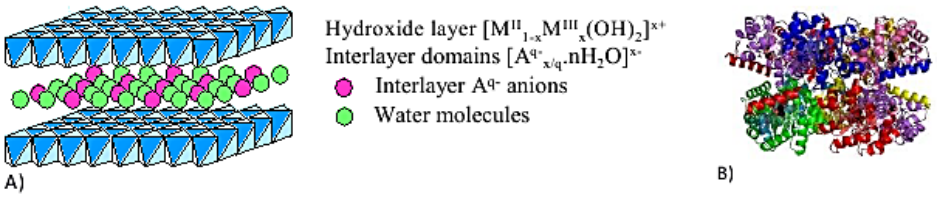


Figure 1 : A) Structure of Layered Double Hydroxides and B) Structure of the FSA_{ec} according PDB (1L6W).

Experimental section

1- Materials

Triose-phosphate isomerase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Cellulomonas sp.* and D-fructose-6-phosphate sodium salt were purchased from Sigma-Aldrich.
$Mg(NO_3)_2.6H_2O$, $Al(NO_3)_3.9H_2O$, KCl, NaOH, glycylglycine were purchased from Aldrich chemicals. All aqueous salt solutions were prepared using deionised water.

2- Instrumentation

Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns were obtained on dried samples (40°C, 12h, oven) with a Siemens D501 X-ray diffractometer using Cu Kα radiation (λ= 1.5415 A°) and fitted with a graphite back-end monochromator. The samples were scanned from 2° to 70° (2θ) using steps of 0.08° and a counting time of 50 s per step. Infrared transmission spectra (FTIR) were recorded using the KBr pellet technique with a Nicolet 5700 spectrometer from Thermo Scientific. A total of 2 % (w/w) of sample, with respect to the potassium bromide was mixed with dry KBr. Each KBr disc was scanned over a wavenumber region of 400–4000 cm^{-1}. Thermal analyses were recorded using a Setaram Instrumentation SETSYS Evolution TGA. Zeta potentials were measured with a Zetasizer nanoZS Malvern instrument. Nitrogen adsorption-desorption experiments for surface and porosity quantification were performed at -196 °C with a Micromeritics ASAP 2020. Before analysis, samples were pretreated at 80 °C under vacuum for 12 h. The surface areas were estimated by using the Brunauer-Emmett-Teller method. The materials were studied by transmission electron microscopy (TEM) using a Hitachi 7650 microscope at an acceleration voltage of 80 kV. To perform the characterization, a drop of the aqueous suspension was deposited on a 400 mesh holey carbon-coated copper grid and dried at room temperature. ^{27}Al SSNMR spectra were obtained at 20.5 T (850 MHz for proton) on an Agilent VNMRS spectrometer using a 1.6 mm MAS probe. Chemical shifts were referenced to 1M $AlCl_3$ (0.0 ppm) for ^{27}Al. ^{27}Al MAS NMR spectra were recorded using single pulse excitation and 15 kHz spinning speed. The ^{27}Al NMR spectra were acquired using a 10 s relaxation delay, a 10° non-selective flip angle.

3- Procedures

1- Fructose-6-phosphate aldolase production:
FSA_{A129S} was over-expressed and purified from *E. coli* as described previously[33]. Protein concentration was determined by the Bradford protein assay reagent kit[34]. The soluble and immobilized FSA_{A129S} activities were quantified as previously described[20,29] at 25°C using 50 mM D-fructose-6-phosphate as substrate in 50 mM glycylglycine buffer (pH=8.0). The enzyme unit is defined as the amount of enzyme needed to cleave 1 µmol of D-fructose-6-phosphate, amount equivalent to one mmol of oxidised NADH.

2- Preparation of LDH and FSA_{A129S}@LDH via coprecipitation :

Mg_2Al-LDH was prepared by the coprecipitation method as described previously[35]. The other reference materials (Mg_4Al-LDH, Zn_2Al-LDH and MgZnAl-LDH) were prepared using the same protocol.
Mg_2Al-CO_3 and Mg_2Al-DDS were prepared by anionic exchange on Mg_2Al-NO_3. Mg_2Al-CO_3:126 mg of Mg_2Al-NO_3 were suspended in 30 mL of deionised water containing 95 mg of Na_2CO_3 for 24 hours; Mg_2Al-DDS: 136 mg of Mg_2Al-NO_3 were suspended in 30 mL of deionised water containing 300 mg of dodecyl sulfate for 24 hours.
All LDH materials were extensively centrifuged, washed with water and stored as colloidal suspensions.

Immobilization of FSA_{A129S} in LDH matrices (FSA_{A129S}@LDH) was realised by a similar coprecipitation synthesis under adapted conditions.

Coprecipitation of FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH: Typically, 10.7 mL of a magnesium and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma[Mg^{2+}+Al^{3+}]$=0.1M, Mg/Al : 2/1) were added into a reactor containing an amount of FSA_{A129S}/glycylglycine (45 mg of protein/100 mg of powder) dissolved in 30 mL of water at pH 9.0, under stirring and nitrogen atmosphere. Several FSA_{A129S} amounts were chosen corresponding to an LDH/enzyme mass ratio of 1/0.25, 1/0.5, 1/1, 1/2 and 1/4, thus 55 mg, 111 mg, 222 mg, 444 mg and 888 mg of FSA_{A129S}/glycylglycine (45 mg of protein/100 mg of powder). The coprecipitation was completed within 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles in deionised water and then stored for further uses in deionised water (8-10 mg/mL).
Coprecipitation of FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH achieved in 1 hour: 3 mL of a magnesium and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma[Mg^{2+}+Al^{3+}]$=0.1M, Mg/Al : 2/1) were added into a reactor containing 74 mg of FSA_{A129S}/glycylglycine (45 mg of protein/100 mg of powder), dissolved in 10 mL of water at pH 9.0, under stirring and nitrogen atmosphere. The coprecipitation was completed within 60 min. The precipitate prepared as described above (8 mg/mL).

Coprecipitation of FSA_{A129S}@Mg_4Al-LDH: 7.71 mL of a magnesium and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma[Mg^{2+}+Al^{3+}]$=0.1M, Mg/Al: 4/1) were added into the reactor containing 111 mg of FSA_{A129S}/glycylglycine (45 mg of protein/100 mg of powder) dissolved in 15 mL of water at pH 9.0, under stirring and nitrogen atmosphere.
Coprecipitation of FSA_{A129S}@Zn_2Al-LDH: 8.39 mL of a zinc and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma[Zn^{2+}+Al^{3+}]$=0.1M, Zn/Al: 2/1) were added to a reactor containing 222 mg FSA_{A129S}/glycylglycine (45 w %), dissolved in 30 mL of water at pH 8.0, under stirring and nitrogen atmosphere.
Coprecipitation of FSA_{A129S}@MgZnAl-LDH: 4.74 mL of a magnesium, zinc and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma[Mg^{2+}+Zn^{2+}+Al^{3+}]$=0.1M, Mg/Zn/Al: 1/1/1) were added into the reactor containing 111 mg of FSA_{A129S}/glycylglycine (45 mg of protein/100 mg of powder) dissolved in 15 mL of water at pH 9.0, under stirring and nitrogen atmosphere.
Washed water fractions were collected after centrifugation and the concentration of protein in solution was measured using the Bradford test[34] to determine the immobilization ratio.

3- Adsorption of FSA_{A129S} on LDH materials:

The adsorption of FSA_{A129S} on different LDH matrices was carried out in batch reaction by suspending 8 mg of LDH in 10 mL of an aqueous solution containing different initial concentration (C_i) of FSA_{A129S} (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 mg of protein per 10 mL). Mixtures were stirred overnight in a water bath at 20°C. Supernatants were collected by centrifugation and the concentrations of protein in solution at equilibrium condition (Ce) were determined using the Bradford test[34].
The adsorption isotherms were obtained by plotting the amount of adsorbed FSA_{A129S} (Cs, w/w) *vs.* the equilibrium concentration in the solution (Ce, $mg.mL^{-1}$) where:

$$Cs = \frac{(Ci - Ce)V}{m}$$

V (mL) represents the volume of the suspensions; and m (mg) is the weight of the adsorbent.
Kinetics of FSA_{A129S} adsorption by Mg_2Al-NO_3 were carried out by mixing 35 mg of the enzyme with 4 mg of LDH suspended in 1 mL of water at pH = 8.0, replicated in 10 eppendorfs. FSA_{A129S} concentration was measured in the supernatants after 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 and 12 h.

Results and discussion

1- Adsorption/desorption of the FSA_{A129S} at the LDH surfaces

Adsorption/desorption of FSA_{A129S} on Mg_2Al-LDH and Mg_4Al-LDH

The affinity between FSA_{A129S} and Mg_2Al-LDH matrix has been investigated by the adsorption method. Figure 2 shows the adsorption kinetic of FSA_{A129S} by Mg_2Al in water (pH 8.0, T 20°C).

Clearly, the adsorption rate of FSA_{A129S} processes through two mechanisms. A very fast adsorption occurs in a 1st step (0 – 30 min) where 71% of the enzyme (0.5 mg/mg) is quickly adsorbed. This fast adsorption arises from the easy diffusion to the accessible surface sites of the LDH platelets. Then adsorption slows down in a nearly linear manner at a mean rate of 0.2 mg prot/mg for for 240 min. This 2nd diffusion mechanism is probably due to the interparticle diffusion, through pores with restricted size. The maximum adsorption capacity (0.7 mg/mg) was achieved within 300 minutes.

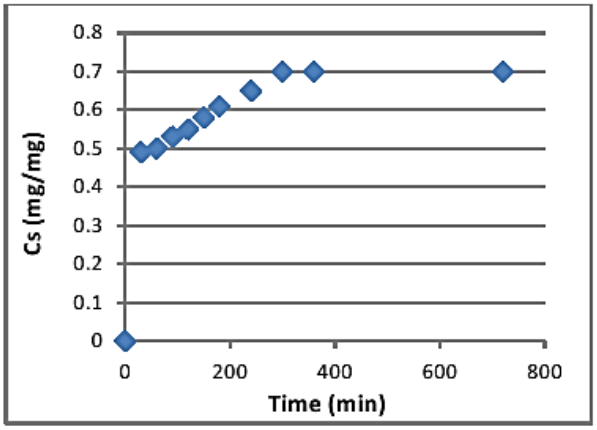


Figure 2 : Adsorption kinetic of FSA_{A129S} on Mg_2Al-NO_3 LDH

In order to compare the effect of surface property of the MgAl LDH sorbent MgAl with different anions and charge density (M^{2+}/Al^{3+}) surface properties, Mg_2Al-DDS, Mg_2Al-CO_3 and Mg_4Al-NO_3 LDH were prepared. The first two were obtained by anionic exchange starting from Mg_2Al-NO_3 while the last by direct coprecipitation. Adsorption isotherms of FSA_{A129S} were recorded for each different LDH materials: Mg_2Al-NO_3 at pH = 7, 8, and 9, Mg_2Al-CO_3, Mg_2Al-DDS and Mg_4Al-NO_3 at pH = 8.

The adsorption isotherms (Figure 3) were of L-type and showed the strong affinity between FSA_{A129S} and the various LDH materials. Isotherms were best fitted using the Freundlich model which better accounts the heterogeneity of LDH/enzyme interactions, multiple-site binding, heterogeneous nature of the surface, and cooperative interactions. Freundlich constants are reported in Table 1.

Table 1 : Freundlich constants for the adsorption of FSA_{A129S} onto various LDH.

LDH	pH	Freundlich parameters		
		K_f (mg/g)	n	R^2
Mg_2AlNO_3	7,0	680	11	0.99
	8,0	660	15	0.95
	9,0	846	14	0.93
Mg_4AlNO_3	8,0	308	12	0.83
Mg_2AlCO_3	8,0	640	11	0.93
Mg_2AlDDS	8,0	351	11	0.88

Adsorptions were conducted at pH values equal to the isoelectric point of FSA_{A129S} (8.1), above (9.0) and below (7.0) in order to evaluate the effect of the charge of the FSA surface on t²he rate of adsorption. Indeed, FSA has an overall positive charge when adsorption is conducted at pH 7, positive and negative charges are equally balanced at pH = 8.0 and, the enzyme surface is mostly negative at pH 9. Results for adsorption on $Mg_2Al\text{-}NO_3$, under these 3 pH conditions highlight an effect of the change of the enzyme surface charge. The same adsorption capacity is observed at pH 7 or 8 (680 mg/g and 660 mg/g respectively), while at pH = 9, the adsorption capacity increases to 846 mg/g correlated to the negative charge of the enzyme. Therefore it is clear that an anion exchange reaction mechanism appeared to be the driving force of the surface adsorption phenomena. Impact of the counter-anion nature (NO_3^-, CO_3^{2-}, DDS^-) was also evaluated. Kf decreases in the series $Mg_2Al\text{-}NO_3$ (660 mg/g) > $Mg_2Al\text{-}CO_3$ (640 mg/g) > Mg_2Al-DDS (351 mg/g) in coherence with the anion/LDH affinity for the inorganic anion intercalated and with the unfavourable hydrophobicity of the lipophilic DDS. The LDH modification by a long alkyl chain anion ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-$) reduces the hydrophilicity of the surface and as a consequence the amount of adsorbed FSA. However, still 47% of adsorption is obtained when compared to the nitrate analogue, meaning that some hydrophobic interactions may stabilize the immobilized FSA. Finally, the most effective parameter on the adsorption capacity is the charge density of the LDH layer. A reduction of about 59% of the adsorption capacity for $Mg_4Al\text{-}NO_3$ compared to $Mg_2Al\text{-}NO_3$ is in agreement with the decrease of the layer charge density from 4.24 e/nm² to 2.47 e/nm² for $Mg_2Al\text{-}NO_3$ and $Mg_4Al\text{-}NO_3$ respectively. This strong effect confirms that electrostatic interactions between the FSA and LDH are the main component of the adsorption phenomenon, beside hydrogen and van der Waals bonding.

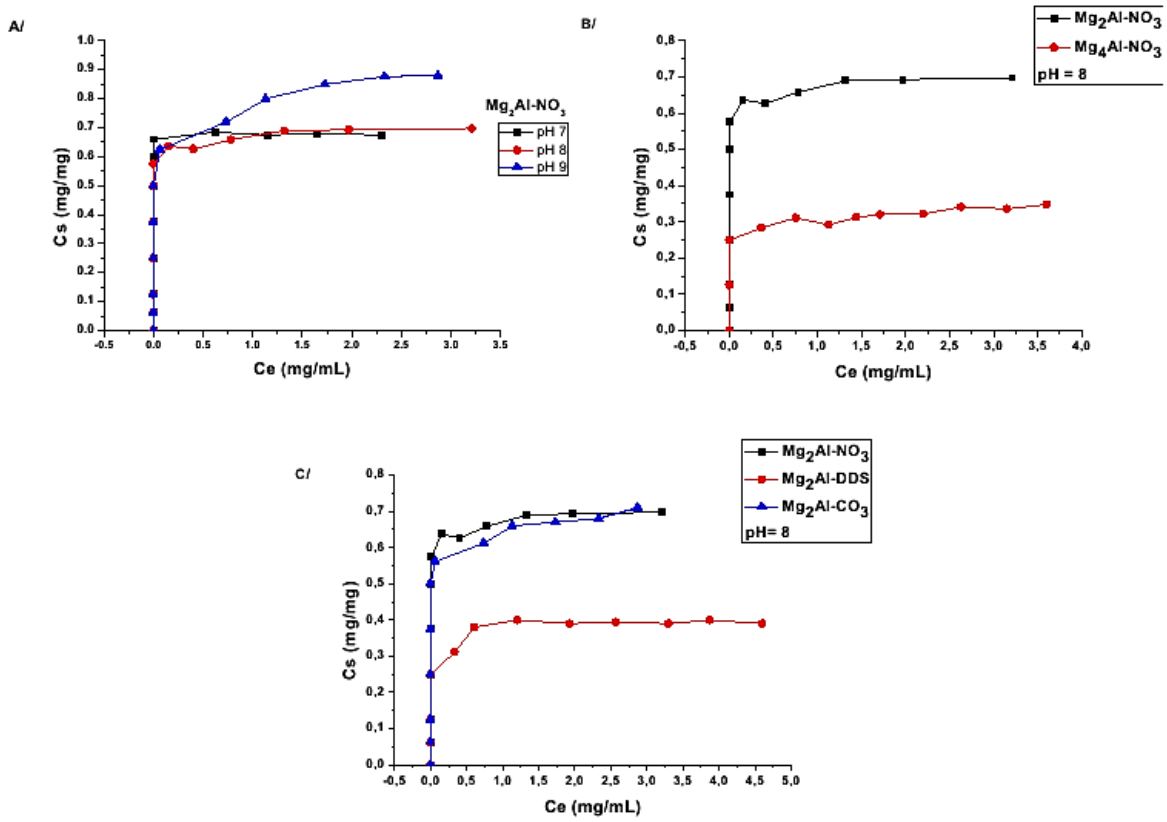


Figure 3 : Adsorption isotherms of FSA_{A129S} on different LDH materials

A desorption study was performed on the 0.7 mg of adsorbed FSA per mg of $Mg_2Al\text{-}NO_3$, by washing the sample with 10 mL of water, repeated 5 times. The desorbed enzyme was fully collected within the first desorption batch. 0.03 mg of FSA per mg of LDH was desorbed from a total of 0.7 mg/mg. So we

must consider that 0.67 mg of FSA per mg of Mg_2Al LDH corresponds to the amount of chemisorbed enzyme, in agreement with the K_f (660mg/g). This result indicates that the polypeptides were adsorbed on Mg_2Al-NO_3 (pH 8) by chemisorption, as a little quantity of the enzyme was desorbed. The interactions between the polymeric chains and the LDH nanoplatelets were strong.

As adsorption is governed by dynamic diffusion through a solid/liquid interface, the electrochemical potential of this interface (Zeta potential, ζ) may play a key role on the adsorption efficiency. All LDH sorbents display positive zeta potential with values in the range +18.5 mV to +36.0 mV (Table 2). These positive potentials are due to the presence of a diffuse layer of positive co-cations to the surface, mostly H_3O^+ when adsorption is conducted in water. FSA_{A129S} has a negative ζ, favourable to electrostatic interactions with LDH materials, as discussed above. ζ of the LDH follows the decreasing order: Mg_2Al-NO_3 > Mg_2Al-CO_3 > Mg_4Al-NO_3 > Mg_2Al-DDS in agreement with the adsorption capacity (k_f) variation. Inversion between Mg_4Al-NO_3 and Mg_2Al-DDS may be explained by the hydrophobic behaviour of Mg_2Al-DDS in water. All these observations are supported by previously reported study[36,37].

Table 2 : Zeta potentials measured for FSA_{A129S} and LDH materials

LDH	Zeta potential (± 3 mV)
Mg_2Al-NO_3	+36.0
Mg_4Al-NO_3	+20.6
Mg_2Al-CO_3	+24.0
Mg_2Al-DDS	+18.5
FSA_{A129S}	-27.0

To further characterize the textural properties of the materials, N_2 adsorption experiment was performed on dried samples (Figure 4). For both, isotherms of type II according to the IUPAC classification were obtained. Such isotherms are characteristic of mesoporous materials displaying a hysteresis. This evidences a distribution of pore sizes and shape not well-defined and/or irregular. Mg_2Al-LDH displays a higher surface area compared to Mg_4Al, evidencing the influence of the layer composition on the particle size, aggregation and the textural properties. Interestingly, adsorption of FSA_{A129S} on Mg_2Al leads to an increase of the surface area into the materials (Table 3). This seems to indicate that enzyme adsorption increases the interparticular area after drying.

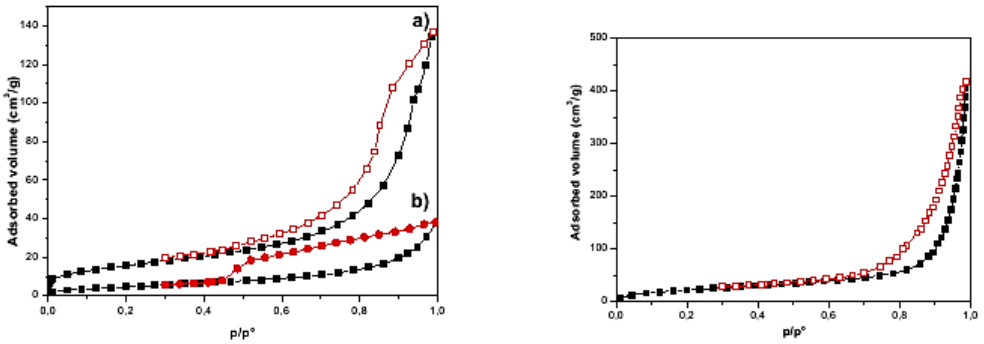


Figure 4: N_2 adsoprtion desorption isotherms for on the left a) Mg_2Al-LDH and b) Mg_4Al- LDH and on the right FSA adsorbed on Mg_2Al-LDH ($[FSA_{A129S}@Mg_2Al]_{ads.}$).

Table 3 : Surface properties of some LDH materials

Sample	S_{BET} (m^2/g)	Vp (cm^3/g)
Mg_2Al-NO_3	**59**	**0.2**
Mg_4Al-NO_3	**19**	**0.06**
[FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH]ads	**82**	**0.6**

In conclusion, Mg_2Al-NO_3 LDH is proven the most efficient adsorbent for the immobilisation of FSA_{A129S}.

In order to determine the capacity of irreversible adsorption (chemisorption), we performed an adsorption reaction on a Mg_2Al-NO_3 compound, using a large excess of FSA (FSA/LDH: 2/1 w/w) at pH 8 and 20°C for 24h. The solid residue was abundantly washed with water in order to extract the physisorbed FSA. Amount of chemisorbed FSA was quantified at 700 mg/g of LDH, a value near the K_f (660mg/g) obtained from the corresponding isotherm.

These results together with those reported in the literature[8,13,17] confirm the high capacities of adsorption displayed by LDH (Table 4). With transketolase (TK_{GS}), aldolase (FSA_{A129S}) is one of the enzymes which display one the highest affinity for LDH.

Table 4 : Adsorption of enzymes on LDH

LDH	Enzymes	Adsorption model	Adsorption capacity (mg/g)	pH	Reference
Mg_3Al-CO_3	α-Amylase	Langmuir	66	7.5	[11]
Zn_2Al-Cl	Trypsin	Langmuir	56	7.5	[14]
Zn_2Al-Cl	α-Chymotrypsin	Langmuir	93	7.5	
Zn_2AlCl	Urease	Freundlich	325	7.0	[13]
Zn_3Al-Cl			228		
Zn_4AlCl			215		
Mg_2Al-CO_3	Ac. phosphatase	-	24		[38]
Mg_2Al-NO_3	Transketolase - TK_{GS}	Freundlich	1000	7.5	[39]
Mg_2Al-NO_3	FSA_{A129S}	Freundlich	700	8.0	This study

$[FSA_{A129S}@Mg_2Al]_{ads.}$ exhibits a similar diffraction pattern (Figure 5) than the LDH precursor used for adsorption (Mg_2Al-NO_3): two 00l diffraction lines (003 and 006) plus four hkl lines (012, 015, 018,110). The shift of (003) and (006) diffraction lines to high theta values arises from a structural change due to a nitrate anion exchange by carbonate anion, as confirmed by typical basal spacing values of 0,883 nm and 0,786 nm respectively. Adsorption experiments are conducted under air atmosphere and contamination by CO_2 cannot be avoided. The huge size of the FSA (105x105x65 $Å^3$) combined to the high charge density of the LDH prevents the intercalation of FSA_{A129S} in between the LDH layers $(Mg_2Al(OH)_6)_n^{n+}$, otherwise series of (00l) lines would have occurred at low theta values (<5°). Consequently, FSA was adsorbed at the layer surface. FTIR analysis (Figure 6) confirms that the irreversible bonding between FSA_{A129S} and MgAl surface preserves the integrity of the structure of each partner. Both LDH lattice vibrations (500 – 950 cm^{-1}) and Amide I and II vibrations (1654 cm^{-1} and 1546 cm^{-1} respectively) display the same feature than for the pure compounds.

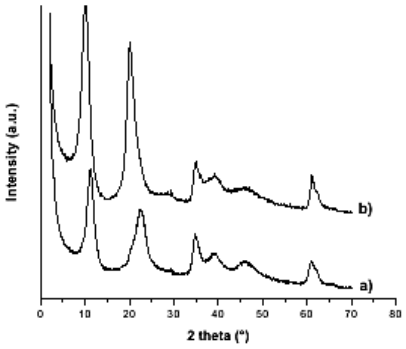


Figure 5: PXRD of a) $[FSA_{A129S}@\ Mg_2Al]_{ads.}$ and b) $Mg_2Al\text{-}NO_3$ LDH.

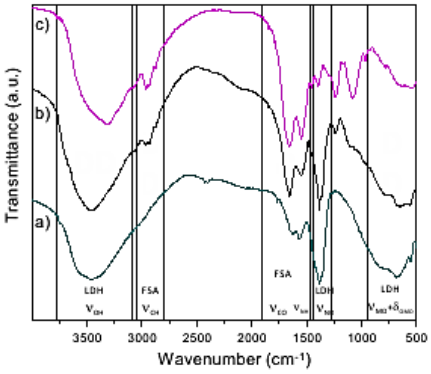


Figure 6: FTIR of a) $Mg_2Al\text{-}NO_3$, b) $[FSA_{A129S}@\ Mg_2Al]_{ads.}$ c) FSA_{A129S}.

2- Entrapment of FSA_{A129S} in LDH by coprecipitation

The most efficient method to immobilize enzymes in LDH is the coprecipitation[40], as it promotes a high immobilization yield overcoming the limit of accessibility to the full adsorbent surface area in the adsorption process and preventing enzyme leaching. This method was used to immobilize enzymes like transketolase[17], urease[13] and alkaline phosphatase[16,41]. Indeed, this "soft chemistry" technique for biohybrid preparation is a very tunable process for the preservation of the enzyme structure and activity. It allows choosing the most suitable conditions (pH, temperature, buffer) avoiding structural change of the enzyme and loss of its catalytic activity[13].

The immobilization of FSA_{A129S} in LDH was conducted by varying the nature of the divalent metal and the ratio of divalent/trivalent metal, to modulate the physico-chemical properties of the surface and determine the best matrix for the enzyme immobilization. Thus, four LDH matrices were studied: Mg_2Al-LDH, Mg_4Al-LDH, Zn_2Al-LDH and MgZnAl-LDH. For comparison purpose, the LDH/enzyme ratio was systematically set at 1/1 (w/w). The conditions of coprecipitation (pH, metal salt concentrations, coprecipitation duration) of both nitrate and FSA LDH were constraints to the FSA stability.

Among the LDH materials prepared in standard coprecipitation conditions, Mg_2Al display the highest surface area and the lowest platelet aggregation. This is favorable to the immobilisation of enzymes[8]. The immobilisation capacity of Mg_2Al was determined by varying the LDH/enzyme ratio (w/w) (1/0.25, 1/0.5, 1/1, 1/2 and 1/4) used in the coprecipitation reaction.

Table 5 gives the amount of immobilized FSA for all materials. When the ratio LDH/Enzyme (mass) increases from 1/0.25 to 1/1, all the enzyme mass was immobilized. Starting from a ratio of 1/2, 50% of the enzyme was immobilized. Interestingly, a biohybrid Mg_2Al/FSA_{A129S} with a ratio 1/1.6 was obtained when an initial ratio of 1/4 was used. 1 mg of LDH was able to immobilize 1.6 mg of enzyme.

Table 5: Amount of immobilized FSA in Mg2Al-LDH

Initial Mg_2Al/FSA_{A129S}	1/0.25	1/0.5	1/1	1/2	1/4
Final Mg_2Al/FSA_{A129S}	1/0.25	1/0.5	1/1	1/1	1/1.6

Structural characterization of the biohybrids

The PXRD patterns of the different FSA_{A129S}@LDH samples prepared by coprecipitation are proposed in Figure 7 and Figure 8. The diffractograms of LDH reference materials (Nitrate intercalated Zn_2Al-LDH, Mg_2Al-LDH, Mg_4Al-LDH and MgZnAl-LDH) were also plotted for comparison.

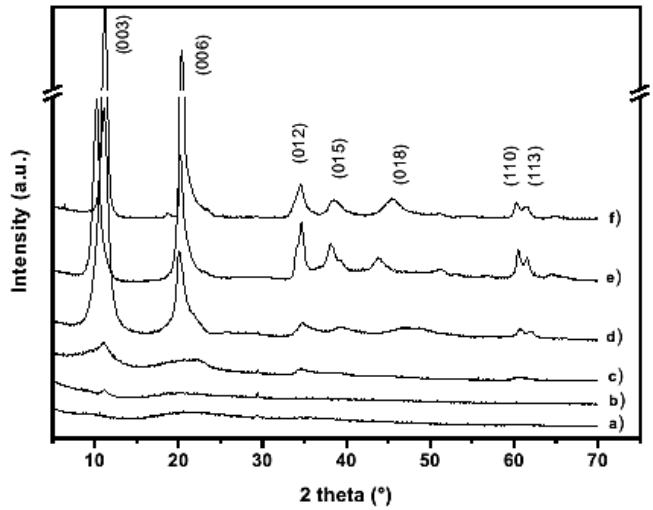


Figure 7 : Powder XRD patterns of (a) FSA_{A129S} @MgZnAl-LDH, (b) FSA_{A129S} @Zn_2Al-LDH, (c) FSA_{A129S} @Mg_4Al-LDH, (d) MgZnAl-LDH, (e) Zn_2Al-LDH, (f) Mg_4Al-LDH

The PXRD patterns of LDH reference materials show a structural feature of pure LDH compounds with the characteristic series of 00l, hk0 and hkl diffraction lines. However, they display a poor crystallinity due to the diluted concentration of salts and bases used (0.1M) and the short duration of the coprecipitation (3h) that limited the crystal growth. The lattice parameters, refined on the hexagonal setting with rhombohedral symmetry (space group: R-3m), are gathered in Table 6. The interlayer distances calculated from the (003) line (8.7-8.9 A°), confirm the presence of nitrate anions between the layers, as reported in the literature[42].

The PXRD patterns of the FSA_{A129S}@Mg_4Al-LDH, FSA_{A129S}@Zn_2Al-LDH and FSA_{A129S}@MgZnAl-LDH, coprecipitated with a ratio LDH/FSA_{A129S} of 1/1, show a strong decrease in crystallinity (Figure 7) compared to the nitrate LDHs. A strong decrease of the (00l) diffraction line intensities and an enlargement of the diffraction lines confirm both a reduction of the particle size according to the Laue-Scherrer law, and a greater disorder of the structure with a clear turbostratic effect. The formation of the layer structure is evidenced by the preservation of the (012) and (110) diffraction lines especially for the Mg_4Al matrix. Similarly to the $[FSA_{A129S}@Mg_2Al]_{ads}$ adsorbed phase (Figure 5), the absence of diffraction lines at low 2θ angles (< 5°) indicates that the enzyme was not intercalated between the LDH layers in the case of these four biohybrid materials. If the FSA_{A129S} was inserted between the layers, the spacing between the diffracting planes (d) would increase. FSA_{A129S} from *E. coli* is a voluminous decameric enzyme with a molecular weight of 257 (± 20) KDa and a size near that of FSA_{wt}[43] (105x105x65 $Å^3$), whose cross-sectional area is much larger than the exchange site surface of the LDH (2.5 e^-/nm^2) and cannot be intercalated between the LDH layers. Consequently, the enzymes are embedded in the interparticle region, influencing their own aggregation. The morphology and the structure of the LDH matrices are influenced by the presence of the enzyme which acts as nucleation center of the $M^{II}Al$ hydroxide clusters. Crystal growth probably occurs at the liquid/enzyme interface, as reported previously by several coworkers[16,20,44], embedding the enzyme inside the LDH nanoplatelets during their formation.

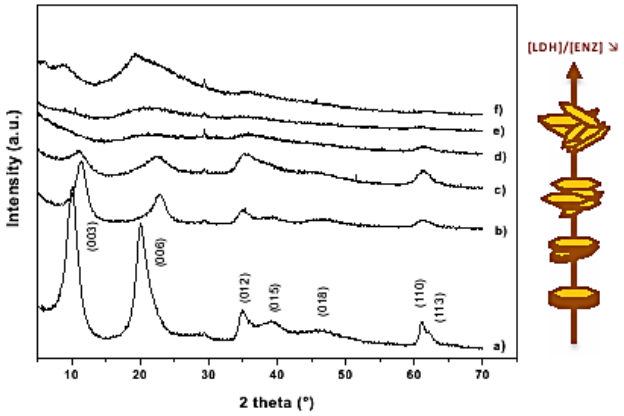


Figure 8 : PXRD patterns of (a) Mg_2Al-LDH and FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH with LDH/enzyme ratio of: (b) 1/0.25, (c) 1/0.5, (d) 1/1, (e) 1/2, (f) 1/4

For the Mg_2Al-LDH/FSA_{A129S} series, the increase of the amount of FSA_{A129S} (decrease of the LDH/FSA_{A129S} mass ratio from 1/0.25 to 1/4) deteriorates even more the crystallinity (fall of the (00l) diffraction line intensities and enlargement of diffraction lines due to a loss of a layer stacking order (Figure 8). Higher the amount of enzyme in the medium, lower the crystallinity. These observations were similar to that reported for the urease[13]. The number of diffraction lines was progressively lowered compared to the reference material. The (012) and (110) diffraction lines are clearly observed up to the 1/1 ratio evidencing the formation of the layered structure. Above in presence of larger amount of enzymes in the reaction medium mainly amorphous compounds are formed. Strikingly, for the LDH formed in presence of enzyme at ratio 1/0.25 and 1/0.5, the 00l lines are shifted to higher angles (2θ =11.4 and d = 7.8 A° for ratio 1/0.25, 2θ = 10.92 and d= 8.1 A° for ratio 1/0.5) compared to precursor phase traducing a smaller interlamellar distance and consequently a modification of the orientation or nature of the interlamellar species (CO_3^{2-}).The lattice parameters and the interlayer distances of different LDH reference materials are presented in Table 6.

Table 6 : Lattice parameters and interlayer distances of different LDH reference materials

PXRD data	Zn_2Al-NO_3	MgZnAl-NO_3	Mg_2Al-NO_3	Mg_4Al-NO_3
a (Å)	3.07	3.02	3.02	3.04
c (Å)	26.7	26.4	26.4	26.1
d (Å)	8.9	8.8	8.8	8.7

FTIR spectra were recorded to further characterize the different biohybrids (Figure 9 and Figure 10). For all the LDH materials, vibration bands typical of the LDH structure are systematically observed (υ_{OH}: 3450 cm^{-1}; δ_{HOH}: 1620 cm^{-1}; υ_{M-O}: 845-647 cm^{-1} and δ_{O-M-O}: 446 cm^{-1}) indicating the successful formation of the LDH structure[45]. However, the enlargement of the vibration bands of the M-OH, M-O and the O-M-O in the FSA_{A129S}@LDH biohybrids spectra, traduces the amorphisation of the LDH structure and can be explained by the loss of the structural cohesion of the layers. The intensity of the nitrate group band (1368 cm^{-1}) was also reduced after incorporation of the enzyme in the layered nanomaterials which is in good agreement with the decrease of the inerlamellar distance observed on PXRD. This behaviour is attributed to a partial surface anion exchange by negatively charged FSA_{A129S}. Indeed, under the coprecipitation conditions (pH=9.0) the FSA bears an overall negative

charge which can counterbalance the positive charge of the LDH cationic layers. Electrostatic interactions between FSA and inorganic layers ensure their tight bonding. However, due to FSA size intercalation in between the LDH layers is not expected. Interlamellar anion could then be hydroxyl species. The immobilization of FSA_{A129S} was further confirmed by the presence of the bands at 1660, 1540 and 1230 cm^{-1} characteristic of amide I (C=O stretching), II (CN stretching, NH bending) and III (CN stretching, NH bending) groups and at 2960 cm^{-1} characteristic of CH_2, CH_3 stretching bands. The bands of the immobilized enzyme are at a wavenumber position similar to the free enzyme, indicating that the α-helix segments were not disturbed by the immobilization process.

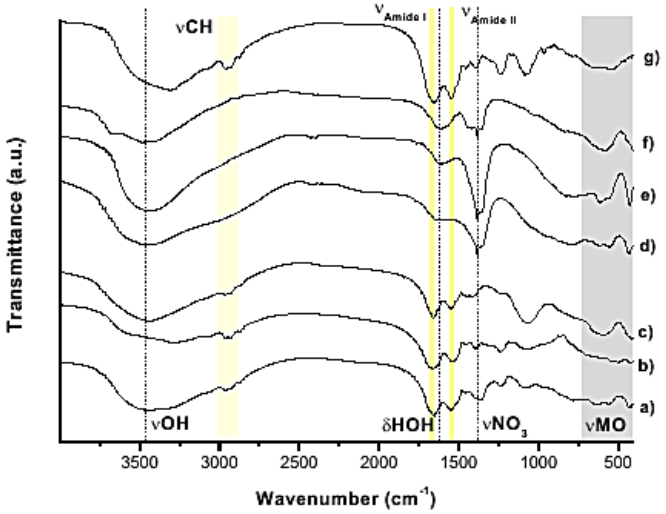


Figure 9 : FTIR spectra of (a) FSA_{A129S} @MgZnAl-LDH, (b) FSA_{A129S} @Zn_2Al-LDH, (c) FSA_{A129S} @Mg_4Al-LDH, (d)MgZnAl-LDH, , (e) Zn_2Al-LDH, (f) Mg_4Al-LDH, (g) FSA_{A129S}

The increase of the relative intensity of the FSA_{A129S} vibration bands (Figure 10) with the increase of FSA_{A129S}/LDH mass ratio traduces an increasing amount of FSA_{A129S} immobilised in the inorganic support (Figure 10). In the same time, the intensity of the nitrate vibration band (1368 cm^{-1}) extinguish progressively due to the modification of the nature of the charge compensating species in presence of enzyme.

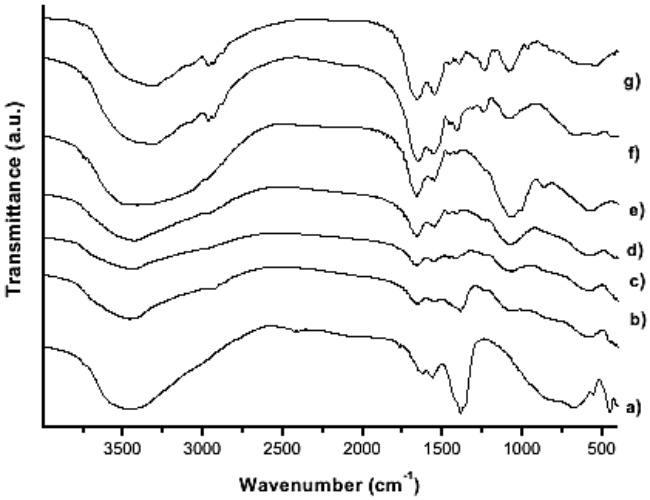


Figure 10 : FTIR spectra of (a) Mg_2Al-LDH, FSA_{A129S} @Mg_2Al-LDH with LDH/enzyme ratio of: (b) 1/0.25, (c) 1/0.5, (d) 1/1, (e) 1/2, (f) 1/4 , (g) FSA_{A129S}

Solid-state NMR was used to provide detailed structural information on the local environment and dynamic behaviour of the nucleus ^{27}Al. The ^{27}Al spectra is fitted using two Al site model *i.e.,* an ordered LDH site and a "defect" site with Al-O-Al linkage. Moreover, the identification and quantification of aluminum in octahedral and tetrahedral coordination is possible from the ^{27}Al NMR spectra. The ^{27}Al NMR spectrum of a typical LDH shows a single sharp resonance around 8-10 ppm, which is an indication of aluminium co-ordinated in a purely octahedral fashion within the Mg-Al-LDH brucite-like layers of the LDH[46]. The percentage of tetrahedral Al (Al_{IV}) and the position of Al peak for different LDH and biohybrid materials are shown in Table 7.

Mg_2Al-NO_3 LDH was prepared using base and salt solutions of 1 M concentration in order to compare its purity with Mg_2Al-NO_3 prepared with 0.1 M concentrations. The results (Figure 11, Table 7) show that the LDH prepared with 1 M solutions concentrations was less pure than that prepared with 0.1 M solutions concentrations.

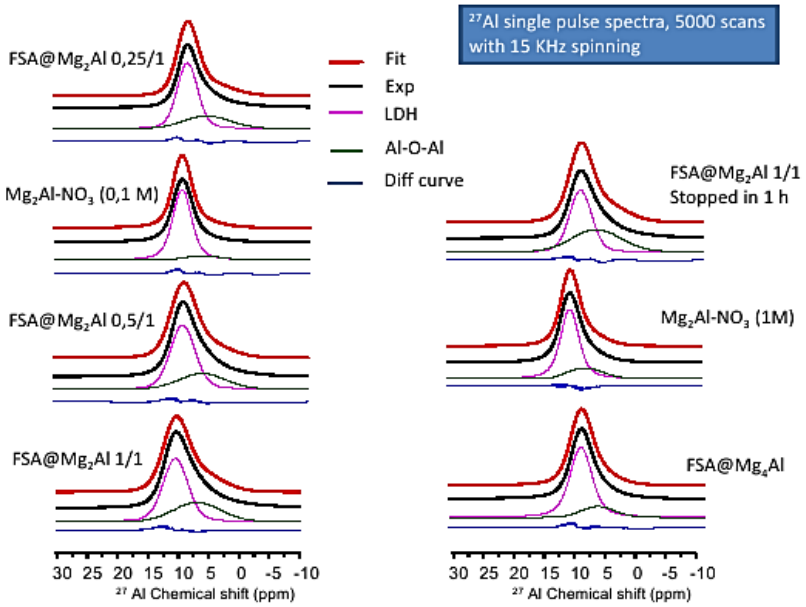


Figure 11 : NMR spectra of different LDH and biohybrid materials

No major differences were observed between FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH coprecipitated with LDH/enzyme ratio of 1/0.25 and 1/0.5. Purity of the Mg_2Al-NO_3 phase is the same. However, when increasing the ratio to 1/1, the contribution of the 2nd phase increases.

To get insight on the evolution of the ordering during coprecipitation with the enzyme, the reaction was stopped after 60 min, the biohybrid was washed, dried and subjected to ^{27}Al NMR analysis. The results show that longer the reaction time, better the purity of LDH in terms of composition. The samples of the coprecipitated enzyme stopped after 1h, contain 8% of tetrahedral Al compared to 2-3 % for the samples coprecipitated in the optimal conditions (200 min). This observation leads to the conclusion that the AlO_4 units have been preferentially converted to AlO_6 sites during the coprecipitation and aging of the phases. In parallel, the PXRD pattern of this short time formed biohybrid displays the characteristic diffraction peaks of LDH materials (Figure 12). However, a partial exfoliation of the LDH nanoplatelets can be observed clearly even though it is less pronounced compared to three hours aged compound.

The FSA_{A129S}@Mg_4Al-LDH phases were more pure than the FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH. This indicates that when the ratio M^{2+}/M^{3+} of the starting metal solution increases, the purity of LDH phase decreases.

Table 7 : ^{27}Al NMR data for different LDH and biohybrid materials

Parameter	Al_{IV}	A_L
Mg_2Al-NO_3 (1 M)	3%	11.3 ppm (81%)
Mg_2Al-NO_3 (0.1 M)	2%	10.5 ppm (91%)
FSA_{A129S}@Mg_2Al 1/1	3%	11.0 ppm (66%)
FSA_{A129S}@Mg_2Al 1/0.5	2%	10.2 ppm (71%)
FSA_{A129S}@Mg_2Al 1/0.25	3%	9.6 ppm (72%)
FSA_{A129S}@Mg_4Al 1/1	2%	9.9 ppm (84%)
FSA_{A129S}@Mg_2Al 1/1 (stopped after 1h)	8%	9.6 ppm (58%)

These results prove that the six-coordinated (octahedral) aluminum is found in all LDH and biohybrid materials studied. Indeed, only 2-3% of 4-fold coordinated (tetrahedral) aluminium were found in these materials, indicating the efficiency of the protocol used to prepare such pure LDH materials even in presence of biomacromolecules.

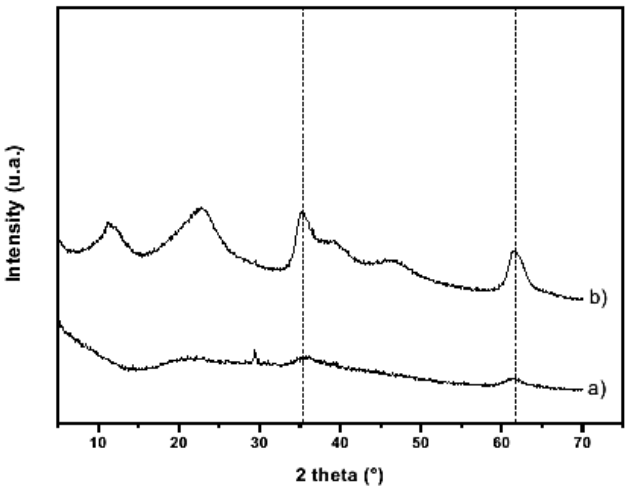


Figure 12 : PXRD patterns of (a) FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH (1/1) obtained in 200 min (b) FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH (1/1) for which coprecipitation was achieved after 60 min

The biohybrid prepared by anionic exchange reaction was purer than the coprecipitated one as revealed by the ^{27}Al NMR data (Table 8).

Table 8 : ^{27}Al NMR data of the biohybrid prepared by anionic exchange reaction compared to that prepared by coprecipitation

Parameter	Al_{IV}	A_L
FSA_{A129S}@Mg_2Al 1/1	3%	11.0 ppm (66%)
FSA_{A129S}/Mg_2Al prepared by anionic exchange	2%	10.9 ppm (76%)

Morphological characterization of the biohybrids

The influence of the enzyme on the LDH materials morphologies were examined by TEM imaging. Figure 13 and Figure 14 show the TEM images of Mg_4Al-LDH and FSA_{A129S}@Mg_4Al-LDH and Mg_2Al-LDH and FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH coprecipitated with different LDH/enzyme ratios. LDH reference materials (Mg_2Al-LDH and Mg_4Al-LDH) present hexagonal platelet morphology with a large particle size distribution in the range of 50-400 nm. In presence of enzyme, the particle morphology and their aggregation are completely modified. Large and dense aggregates are seen in the images of different biohybrids even for the lowest amount of enzymes, in which small and ill-defined platelets are associated in a 3D network. Intermediate ratios (1/0.5 and 1/1) lead to the denser aggregates. These observations have been reported previously for the transketolase[17] and alkaline phosphatase[16] coprecipitated in LDH materials.

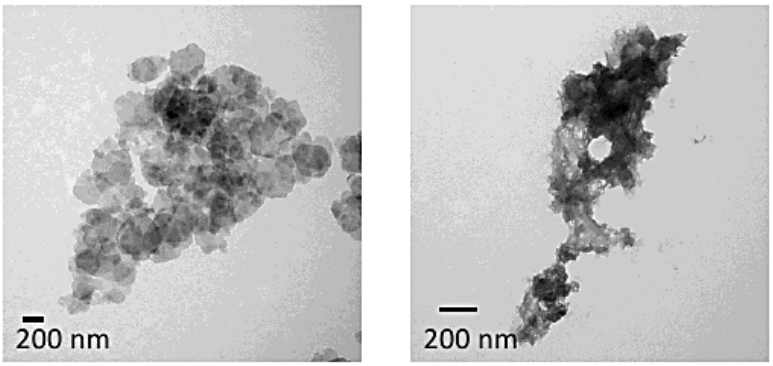


Figure 13 : TEM images of Mg_4Al-LDH (left) and FSA_{A129S}@Mg_4Al-LDH (right)

The decrease of the crystal size and shape anisotropy in biohybrids can be attributed to the inhibition of the crystal growth caused by the enzyme surface[32].

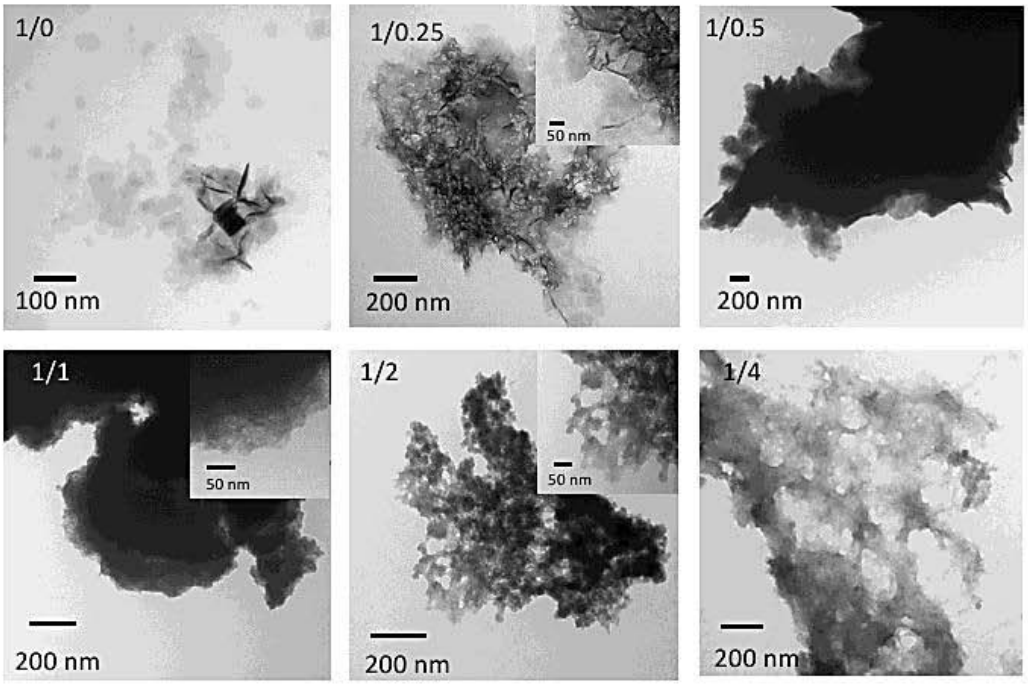


Figure 14 : TEM images of FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH with different ratio LDH/ FSA_{A129S} (1/0 : Mg_2Al-LDH)

N_2 adsorption isotherm of FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH (1/1) was compared with the isotherm of the pure LDH (Figure 15, Table 9). Obviously, the presence of the enzyme induces a clear decrease of the surface area from 59 to 18 m^2/g, probably due to the high level of aggregation previously evidenced on TEM images.

Table 9 : Surface properties of some LDH materials

Sample	S_{BET} (m^2/g)	Vp (cm^3/g)
Mg_2Al-NO_3	59	0.2
FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH (1/1)	18	0.035

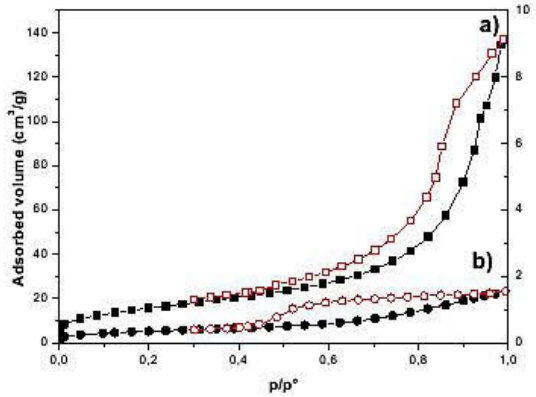


Figure 15: N_2 adsoprtion desorption isotherms for a) Mg_2Al-LDH and b) FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH (1/1)

Activity of FSA_{A129S}@LDH biohybrids

The immobilization yields and the FSA_{A129S} activity of the different biohybrid were measured to investigate the influence of both the chemical composition of the LDH layer (Mg_2Al-LDH, Mg_4Al-LDH, MgZnAl-LDH and Zn_2Al-LDH) and the ratios Mg_2Al-LDH/enzyme. The immobilization yields and the retained activities are summarised in Table 10. For the ratios Mg_2Al-LDH/enzyme below 1/1, immobilization yields of 100% were systematically obtained and the retained activity varied in the range of 92 to 100%. In increasing the amount of enzyme above 1/1, the immobilization yields decreased to 50% and 40% for the LDH/enzyme ratios of 1/2 and 1/4, respectively. However, the immobilised enzyme was always active (89-96%), indicating the absence of substrate diffusional limitations in this matrix. As evidenced in the Figure 16; even if the immobilisation rate decreases for the higher ratio, the corresponding total enzyme activity per mg of LDH increases. The maximum immobilization rate was then obtained for the ratio 1/4 leading to a biohybrid formed by 1.6 mg of enzyme/mg of LDH, which corresponded to 7.7 U/mg of LDH.

High rate of FSA_{A129S} immobilization was also obtained in using MgZnAl-LDH or Mg_4Al-LDH composition, (Table 10). A slight decrease in the immobilized enzyme activity is however noted (83-89%). When Zn_2Al-LDH composition is involved in the coprecipitation reaction, the immobilization yield was lowered to 50% and the immobilised activity was only 72%. It should be reminded that on the one hand the pH used for the coprecipitation is 8 for Zn_2Al-LDH, 10 for Mg_4Al-LDH and 9 for both Mg_2Al-LDH and MgZnAl-LDH. On the other hand, the best pH range for the enzyme is 7.5-8.5, even though the biohybrid stability toward pH was similar to that of free enzyme.

These results can be explained by the surface charge of the enzyme relative to that of LDH. Considering Zn_2Al-LDH and Mg_2Al-LDH, these two matrices display similar density of charge owing to their similar M^{2+}/Al^{3+} molar ratio and structural cell parameters. The main differences arise from their surface basicity, which can be related to the metal nature in the hydroxide layers[16]. The lower the value of Δ[iep(enzyme)-pzc(LDH)] (Table 11), the lower the electrostatic interactions and the enzyme loading. As the i.e.p. of the FSA_{A129S} (8.1) and pzc(Zn_2Al-LDH) have almost identical values; it is not in favour of optimal immobilisation.

The Michaelis constants (Km) of the enzyme toward D-Fructose-6-phosphate (D-F6P) were determined for all the biohybrids (Table 10). This constant characterizes the interactions between the substrate and the enzyme; the lower the Km value, the stronger the affinity of substrate for the enzyme is. The determined Km of the free FSA_{A129S} in this study was 6.8 mM. Comparable Km values were obtained for the free and immobilized FSA_{A129S} regardless of the matrix, suggesting that the FSA_{A129S} immobilization did not affect its affinity for the substrate.
In summary, these results point out the exceptional capacities of different LDH matrices in the immobilization of enzymes. The 'soft chemistry' conditions of the immobilization process and the coulombic attractions between the matrix and the enzyme might lead to the full preservation of the enzyme activity. In addition, the affinity between the enzyme and its substrate was unchanged after immobilization.

Table 10 : Immobilization yields and retained activities of the biohybrids

Biohybrid	LDH : enzyme ratio	Immobilization yield (%)	Immobilised activity (%)	Retained activity / Theoretical immobilised activity	Immobilised activity (U/mg of LDH)	Km (F6P) (mM)
FSA_{A129S}@Mg_2Al -LDH	1 : 0.25	100 %	94%	60U/64U	1,2	6.8
	1 : 0.5	100 %	100%	96 U/97 U	1,92	8,6
	1 : 1	100 %	92%	183 U/200 U	3,7	7.7
	1 : 2	50 %	96%	208 U/217 U	4,2	6.2
	1 : 4	40 %	89%	384 U/432 U	7,7	9.1
FSA_{A129S}@Mg_4Al -LDH	1 : 1	90%	83%	207 U/251 U	4.2	9.1
FSA_{A129S}@Zn_2Al-LDH	1 : 1	50%	72%	302 U/418 U	1.5	5.6
FSA_{A129S}@MgZn Al-LDH	1 : 1	100%	88%	211 U/240 U	4.2	6.6

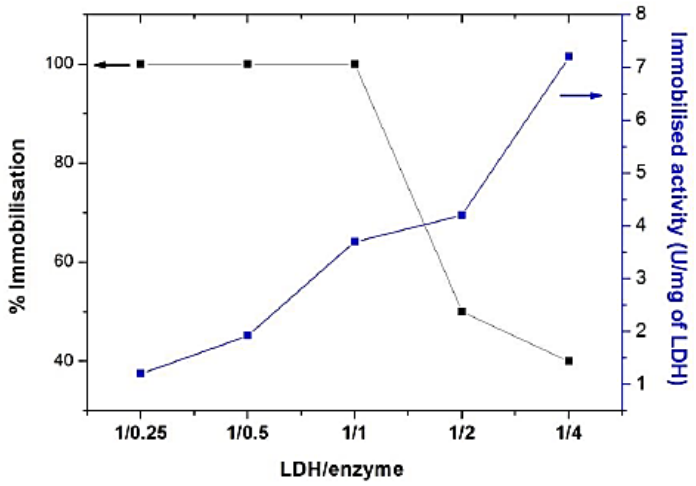


Figure 16 : Results of FSA_{A129S} immobilization in Mg_2Al-LDH with different ratio

Table 11 : Surface charge properties of the LDH materials related to pH value

LDH	Zn_2Al	MgZnAL	Mg_2Al	Mg_4Al
pH_{pzc}	9,1	9.6	10,1	-

Stability of FSA_{A129S}@LDH biohybrids

In a first approach, we focussed on the best way to store the biohybrids. We observed that they retained 100% of their activity when they were stored at 4°C as liquid suspension, for at least one month. However, they lost all their activity when they were freeze-dried or dried at 20°C.

Then, the effect of the temperature on the activity of the free and the immobilized enzyme was investigated in the range of 4-90°C (Figure 17). It was carried out after 1h incubation at various temperatures. Two different biohybrids were chosen to accomplish this study: FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH with a LDH/enzyme ratio of 1/1 and 1/0.25. The FSA_{A129S} is known for its thermal stability since it can be incubated 1h at 70°C without any loss of activity[29]. As shown in Figure 17, the biohybrids show approximately the same thermal stability profile as the free enzyme, highlighting that the inorganic matrices do not affect the enzyme thermal stability

The effect of the pH variation on the activity of the free and the immobilised enzyme was also studied (Figure 17). The activity assay of the enzyme was carried out in different buffers (pH from 6 to 11.5). The free and the immobilised enzyme have the same pH profile, as shown in Figure 17.

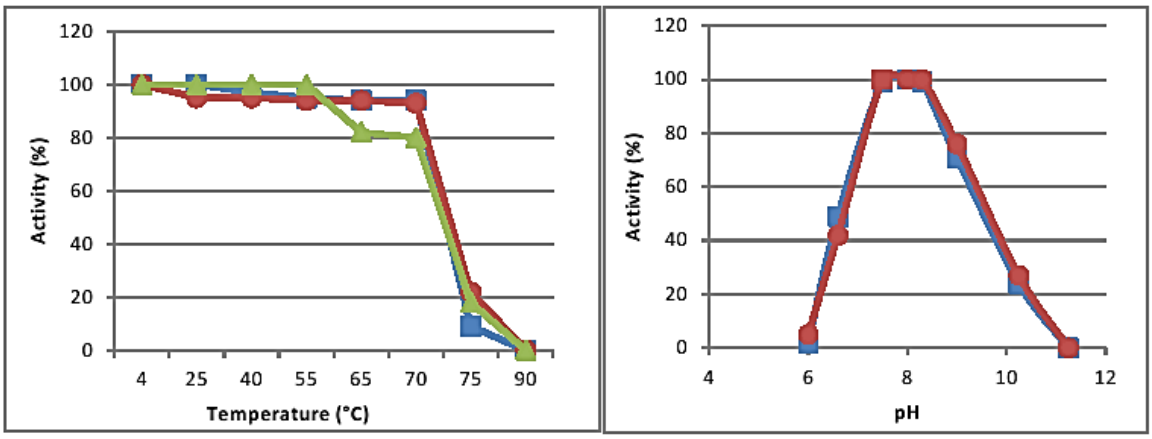


Figure 17 : Thermal stability (left) for FSA_{A129S} (square),FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH with ratio LDH/enzyme of 1/1 (circle) and 1/0.25 (triangle). pH profile (right) of FSA_{A129S} (square) and FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH with a ratio of 1/1 (circle). Conditions for thermal stability: 3 U of free or immobilised FSA_{A129S} were incubated for 1h at the desired temperature. Conditions for pH profile: free and immobilized enzyme were assayed in different pH buffers, the auxiliary enzymes were put in excess to limit their inactivation

Concerning the enzyme stability in the presence of dimethylformamide (Figure 18), it was evidenced that in a solution containing 30% of DMF, the free and immobilised FSA_{A129S} retain 57 and 85% of their activity, respectively. All the activity of the free FSA_{A129S} was lost at 50% DMF, while the biohybrid retains 11%. The immobilization with no effect on thermal and pH stability, allowed increasing its tolerance towards organic solvent such as DMF.

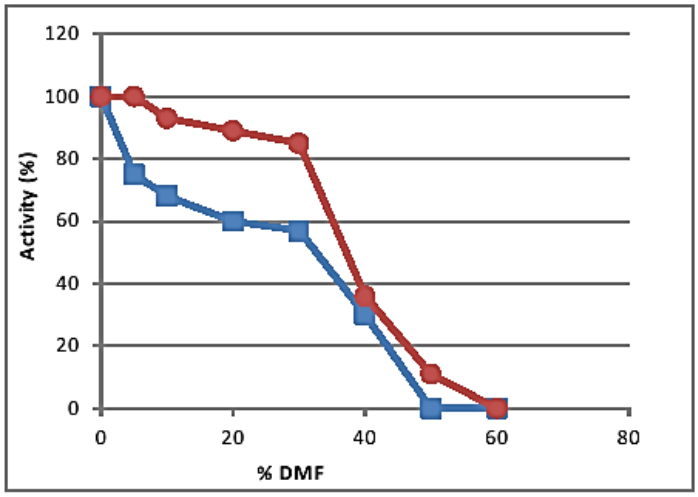


Figure 18 : Stability of FSA_{A129S} (square) and FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH with a ratio LDH/enzyme of 1/1 (circle) in the presence of DMF. Conditions: 0.6 U of FSA_{A129S} and FSA_{A129S}@Mg_2Al-LDH were incubated for 45 minutes in an aqueous/DMF solution (5%-50% of DMF)

Conclusions

The immobilization of the FSA_{A129S} was carried out using two methods, adsorption and coprecipitation.

Mg_2Al-NO_3 LDH was proven the most efficient adsorbent for the immobilization of FSA_{A129S}. 660 and 846 mg of protein/g of LDH were immobilized at pH 8 and 9 respectively. Very little desorption was observed indicating that the polypeptides were adsorbed on Mg_2Al-NO_3 (pH 8) by chemisorption. The interactions between the polymeric chains and the LDH nanoplatelets were strong. The adsorption isotherms of the different LDH matrices were of L-type and showed the strong affinity between FSA_{A129S} and the differently composed LDH materials. The adsorption was proven to occur at the surface of the LDH using various solid characterizations.

However, the coprecipitation method was revealed more efficient than the adsorption one as the immobilized amount of enzyme on the LDH materials was higher. The effect of the composition of the layers and the LDH/enzyme ratios on the nanostructuration and the catalytic activity of biohybrids was studied. Among the tested composition (Mg_4Al-LDH, Zn_2Al-LDH, MgZnAl-LDH, Mg_2Al-LDH), Mg_2Al-LDH was the best matrix for enzyme catalytic activity preservation. The maximum embedded enzyme quantity and activity were 1.6 mg/mg and 7.7 U/mg of Mg_2Al-LDH, respectively. In such soft chemistry conditions, the structural conformation and the activity of the enzyme were preserved. The affinity between the enzyme and its substrate (D-F6P) was not modified after immobilization. The immobilisation was found to improve the organic solvent stability of the enzyme. The enzyme quantity strongly affected the structure and the morphology of the LDH materials. The enzyme was not intercalated between the LDH layers. Indeed, the crystal growth occurred at the enzyme liquid interface leading to a strong decrease of LDH crystallinity.

These results highlight once more the exceptional ability of different LDH matrices to immobilize quantitatively FSA_{A129S} with no significant loss of activity. The method of choice for use in biocatalysis is the coprecipitation, however the adsorption might be interesting in case of pH sensitive enzymes.

References

(1) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. Enzymes for Chemical Synthesis. *Nature* **2001**, *409* (6817), 232–240.

(2) Homaei, A. A.; Sariri, R.; Vianello, F.; Stevanato, R. Enzyme Immobilization: An Update. *J. Chem. Biol.* **2013**, *6* (4), 185–205.

(3) Mohamad, N. R.; Marzuki, N. H. C.; Buang, N. A.; Huyop, F.; Wahab, R. A. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29* (2), 205–220.

(4) Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (8-9), 1289–1307.

(5) Ruiz-Hitzky, E.; Darder, M.; Aranda, P.; Ariga, K. Advances in Biomimetic and Nanostructured Biohybrid Materials. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (3), 323–336.

(6) Kumar, C. V.; Chaudhari, A. Unusual Thermal Stabilities of Some Proteins and Enzymes Bound in the Galleries of Layered α-Zr(IV)phosphate/phosphonates. *Microporous Mesoporous Mater.* **2003**, *57* (2), 181–190.

(7) Lee, S. Y.; Lee, J.; Chang, J. H.; Lee, J. H. Inorganic Nanomaterial-Based Biocatalysts. *BMB Rep.* **2011**, *44* (2), 77–86.

(8) Prevot, V.; Mousty, C.; Forano, C. State of the Art in Biomolecule and Layered Double Hydroxides. In *Advances in chemistry research*; Taylor, J. C., Ed.; Nova Publishers, 2012; Vol. 17, pp 35–84.

(9) Mahdi, R.; Guérard-Hélaine, C.; Prévot, V.; de Berardinis, V.; Forano, C.; Lemaire, M. Design of Artificial Metabolisms in Layered Nanomaterials for the Enzymatic Synthesis of Phosphorylated Sugars. *ChemCatChem* **2015**, *7* (19), 3110–3115.

(10) Besse-Hoggan, P.; Alekseeva, T.; Sancelme, M.; Delort, A.-M.; Forano, C. Atrazine Biodegradation Modulated by Clays and Clay/humic Acid Complexes. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (10), 2837–2844.

(11) Bruna, F.; Pereira, M. G.; Polizeli, M. de L. T. M.; Valim, J. B. Starch Biocatalyst Based on α-Amylase-Mg/Al-Layered Double Hydroxide Nanohybrids. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (33), 18832–18842.

(12) Mousty, C.; Vieille, L.; Cosnier, S. Laccase Immobilization in Redox Active Layered Double Hydroxides: A Reagentless Amperometric Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (8), 1733–1738.

(13) Vial, S.; Prevot, V.; Leroux, F.; Forano, C. Immobilization of Urease in ZnAl Layered Double Hydroxides by Soft Chemistry Routes. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *107* (1–2), 190–201.

(14) Mansouri, H.; Forano, C.; Prévot, V.; Jaffrezic-Renault, N.; Ben Haj Amara, A. Layered Double Hydroxides/Trypsin Based Conductometric Biosensors. *Sens. Lett.* **2009**, *7* (5), 888–895.

(15) Kallenberg, A. I.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Immobilization of Penicillin G Acylase: The Key to Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347* (7-8), 905–926.

(16) Mousty, C.; Kaftan, O.; Prevot, V.; Forano, C. Alkaline Phosphatase Biosensors Based on Layered Double Hydroxides Matrices : Role of LDH Composition. *Sens. Actuators B Chem.* **2008**, *133* (2), 442–448.

(17) Benaissi, K.; Hélaine, V.; Prévot, V.; Forano, C.; Hecquet, L. Efficient Immobilization of Yeast Transketolase on Layered Double Hydroxides and Application for Ketose Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (9), 1497–1509.

(18) Córdova, C.; Isidoro, D.; Morales Borges, R.; Arizaga, G. G. C.; Wypych, F.; Krieger, N. Immobilization of Laccase on Hybrid Layered Double Hydroxide. *Quím. Nova* **2009**, *32* (6), 1495–1499.

(19) Frey, S. T.; Guilmet, S. L.; Egan III, R. G.; Bennett, A.; Soltau, S. R.; Holz, R. C. Immobilization of the Aminopeptidase from Aeromonas Proteolytica on Mg2+/Al3+ Layered Double Hydroxide Particles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2* (10), 2828–2832.

(20) Guérard-Hélaine, C.; Légeret, B.; Fernandes, C.; Prévot, V.; Forano, C.; Lemaire, M. Efficient Immobilization of Fructose-6-Phosphate Aldolase in Layered Double Hydroxide: Improved Stereoselective Synthesis of Sugar Analogues. *New J. Chem.* **2011**, *35* (4), 776–779.

(21) Schürmann, M.; Sprenger, G. A. Fructose-6-Phosphate Aldolase Is a Novel Class I Aldolase from Escherichia Coli and Is Related to a Novel Group of Bacterial Transaldolases. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (14), 11055–11061.

(22) Schürmann, M.; Schürmann, M.; Sprenger, G. A. Fructose 6-Phosphate Aldolase and 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase from Escherichia Coli as Tools in Enzymatic Synthesis of 1-Deoxysugars. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19–20*, 247–252.

(23) Castillo, J. A.; Calveras, J.; Casas, J.; Mitjans, M.; Vinardell, M. P.; Parella, T.; Inoue, T.; Sprenger, G. A.; Joglar, J.; Clapés, P. Fructose-6-Phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Preparation of D-Fagomine, N-Alkylated Derivatives, and Preliminary Biological Assays. *Org. Lett.* **2006**, *8* (26), 6067–6070.

(24) Concia, A. L.; Lozano, C.; Castillo, J. A.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P. D-Fructose-6-Phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Cascade Chemical-Enzymatic Preparation of Sugar-Related Polyhydroxylated Compounds. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (15), 3808–3816.

(25) Garrabou, X.; Castillo, J. A.; Guérard-Hélaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Clapés, P. Asymmetric Self- and Cross-Aldol Reactions of Glycolaldehyde Catalyzed by D-Fructose-6-Phosphate Aldolase. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (30), 5521–5525.

(26) Sánchez-Moreno, I.; Hélaine, V.; Poupard, N.; Charmantray, F.; Légeret, B.; Hecquet, L.; García-Junceda, E.; Wohlgemuth, R.; Guérard-Hélaine, C.; Lemaire, M. One-Pot Cascade Reactions Using Fructose-6-Phosphate Aldolase: Efficient Synthesis of D-Arabinose 5-Phosphate, D-Fructose 6-Phosphate and Analogues. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354* (9), 1725–1730.

(27) Sugiyama, M.; Hong, Z.; Liang, P.-H.; Dean, S. M.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H. D-Fructose-6-Phosphate Aldolase-Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (47), 14811–14817.

(28) Camps Bres, F.; Guérard-Hélaine, C.; Fernandes, C.; Castillo, J. A.; Lemaire, M. Fructose-6-Phosphate Aldolases as Versatile Biocatalysts for Nitrocyclitol Syntheses. *Tetrahedron Asymmetry* **2013**, *24* (18), 1075–1081.

(29) Castillo, J. A.; Guérard-Hélaine, C.; Gutiérrez, M.; Garrabou, X.; Sancelme, M.; Schürmann, M.; Inoue, T.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Gefflaut, T.; et al. A Mutant D-Fructose-6-Phosphate Aldolase (Ala129Ser) with Improved Affinity towards Dihydroxyacetone for the Synthesis of Polyhydroxylated Compounds. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352* (6), 1039–1046.

(30) Szekrenyi, A.; Soler, A.; Garrabou, X.; Guérard-Hélaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Bujons, J.; Clapés, P. Engineering the Donor Selectivity of D-Fructose-6-Phosphate Aldolase for Biocatalytic Asymmetric Cross-Aldol Additions of Glycolaldehyde. *Chemistry* **2014**, *20* (39), 12572–12583.

(31) Szekrenyi, A.; Garrabou, X.; Parella, T.; Joglar, J.; Bujons, J.; Clapés, P. Asymmetric Assembly of Aldose Carbohydrates from Formaldehyde and Glycolaldehyde by Tandem Biocatalytic Aldol Reactions. *Nat. Chem.* **2015**, *7* (9), 724–729.

(32) Mahdi, R.; Guérard-Hélaine, C.; Laroche, C.; Michaud, P.; Prévot, V.; Forano, C.; Lemaire, M. Polysaccharide-Layered Double Hydroxide–aldolase Biohybrid Beads for Biocatalysed CC Bond Formation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *122*, 204–211.

(33) Sánchez-Moreno, I.; Nauton, L.; Théry, V.; Pinet, A.; Petit, J.-L.; de Berardinis, V.; Samland, A. K.; Guérard-Hélaine, C.; Lemaire, M. FSAB: A New Fructose-6-Phosphate Aldolase from Escherichia Coli. Cloning, over-Expression and Comparative Kinetic Characterization with FSAA. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *84*, 9–14.

(34) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (1–2), 248–254.

(35) Bouhent, M. M.; Derriche, Z.; Denoyel, R.; Prevot, V.; Forano, C. Thermodynamical and Structural Insights of Orange II Adsorption by MgRAlNO3 Layered Double Hydroxides. *J. Solid State Chem.* **2011**, *184* (5), 1016–1024.

(36) Xu, Z. P.; Jin, Y.; Liu, S.; Hao, Z. P.; Lu, G. Q. (Max). Surface Charging of Layered Double Hydroxides during Dynamic Interactions of Anions at the Interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *326* (2), 522–529.

(37) Xu, Z. P.; Stevenson, G.; Lu, C.-Q.; Lu, G. Q. (Max). Dispersion and Size Control of Layered Double Hydroxide Nanoparticles in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (34), 16923–16929.

(38) Zhu, J.; Huang, Q.; Pigna, M.; Violante, A. Immobilization of Acid Phosphatase on Uncalcined and Calcined Mg/Al-CO3 Layered Double Hydroxides. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *77* (2), 166–173.

(39) Touisni, N.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Forano, C.; Hecquet, L.; Mousty, C. Optimized Immobilization of Transketolase from E. Coli in MgAl-Layered Double Hydroxides. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *112*, 452–459.

(40) Mansouri, H. Elaboration et Caractérisation de Matériaux Biohybrides Hydroxydes Doubles Lamellaires/Enzyme. Applications A La Réalisation de Biocapteurs, Université Blaise Pascal, 2010.

(41) Geraud, E.; Prevot, V.; Forano, C.; Mousty, C. Spongy Gel-like Layered Double Hydroxide-Alkaline Phosphatase Nanohybrid as a Biosensing Material. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2008**, No. 13, 1554–1556.

(42) Cavani, F.; Trifirò, F.; Vaccari, A. Hydrotalcite-Type Anionic Clays: Preparation, Properties and Applications. *Catal. Today* **1991**, *11* (2), 173–301.

(43) Thorell, S.; Schürmann, M.; Sprenger, G. A.; Schneider, G. Crystal Structure of Decameric Fructose-6-Phosphate Aldolase from Escherichia Coli Reveals Inter-Subunit Helix Swapping as a Structural Basis for Assembly Differences in the Transaldolase Family. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319* (1), 161–171.

(44) Vial, S.; Ghanbaja, J.; Forano, C. Precipitation of Zn2Al LDH by Urease Enzyme. *Chem. Commun.* **2006**, No. 3, 290–292.

(45) Kloprogge, J.T.; Frost, R.L. Infrared and Raman Spectroscopic Studies of Layered Double Hydroxides (LDHs): Present and Future. In *Layered double hydroxides : present and future*; Vicente, R., Ed.; Nova Publishers: New York, 2001; pp 1–39.

(46) Sideris, P. J.; Gan, Z.; Nielson, U. G.; Grey, C. P. Mg/Al Ordering in Layered Double Hydroxides Revealed by Multinuclear NMR Spectroscopy. *Science* **2008**, *321*, 113–117.

II.3. Conclusion

L'immobilisation de la FSA dans les HDL a été réalisée selon deux méthodes : par adsorption sur des HDL préparés au préalable et par la formation de la structure d'HDL directement en présence de l'enzyme par coprécipitation.

Pour la premère méthode, l'adsorption de l'enzyme a été réalisée à pH = 8 sur des HDL de différentes compositions (Mg_2Al-CO_3, Mg_2Al-NO_3, Mg_2Al-DDS, Mg_4Al-NO_3). De fortes interactions entre l'enzyme et l'HDL ont été mise en évidence. L'enzyme s'adsorbe fortement jusqu'à la saturation des sites du support (isothermes d'adsorption de type Langmuir). Le taux d'adsorption maximal est obtenu avec la matrice Mg_2Al-NO_3 (0.7 mg d'enzymes/mg d'HDL). L'HDL Mg_2Al-NO_3 présente une capacité d'adsorption supérieure à celle d'une phase Mg_4Al-NO_3, ce qui s'explique à la fois par une densité de charge et une surface spécifique supérieures. L'augmentation de la valeur du pH lors de l'adsorption de 8.0 à 9.0 améliore lee taux d'immobilisation atteignant alors 0.9 mg d'enzymes/mg d'HDL. Cette tendance est à corrèler avec le point isoélectrique élevé (7.1) de cette enzyme. L'augmentation du pH augmente le nombre de sites négatifs à la surface de l'enzyme succeptibles d'interagir avec la matrice HDL. Les interactions entre l'enzyme et la surface de l'HDL lors du phénomène d'adsorption/échange anionique avec la FSA induit une modification de l'agrégation des plaquettes, traduite par une augmentation de la surface spécifique.

Concernant la deuxième méthode, nous avons fait varier la composition des feuillets en testant différents métaux ainsi que le rapport enzyme/HDL pour déterminer leurs effets sur les taux d'encapsulation, les activités retenues, la structure et la morphologie des biohybrides. En partant d'un rapport enzyme/HDL de 1/1 (en masse), des taux d'encapsulation de 0.9 -1 mg de protéines par mg d'HDL ont été obtenus dans les matrices Mg_2Al-HDL, Mg_4Al-HDL et MgZnAl-HDL et de 0.5 mg/mg dans la matrice Zn_2Al-HDL. Les pourcentages d'activité retenue sont compris entre 72 et 92% pour ces matrices. En faisant varier le rapport enzyme/HDL de 0,25/1 à 4/1 dans une matrice Mg_2Al-HDL, le taux d'encapsulation optimal est de 1,6 mg prot/mg HDL pour un rapport 4/1 correspondant à un biohybride d'activité spécifique de 7,7 U/mg de gel. Ces résultats illustrent la capacité exceptionnelle des différentes matrices d'HDL à confiner efficacement des enzymes tout en préservant leur conformation et leur activité. Par ailleurs, la stabilité de la FSA en présence du DMF, co-solvant le plus utilisé pour dissoudre certains aldéhydes accepteurs, est améliorée de 20% lorsque cette enzyme est immobilisée. Sur le plan structural, en faisant varier le rapport enzyme/HDL de 0,25/1 à 4/1 dans Mg_2Al-HDL, une exfoliation progressive de la structure lamellaire a été observée, ce qui se traduit par la diminution de l'intensité et l'élargissement des raies du diffractogramme de RX. La présence de l'enzyme durant la formation des feuillets d'HDL induit un changement de la morphologie et de la taille des particules.

En conclusion, la coprécipitation et l'adsorption sont deux stratégies bien adaptées à l'immobilisation de la FSA au sein des matrices HDL grâce aux conditions douces compatibles avec la préservation de l'activité enzymatique. En accord avec d'autres études sur l'immobilisation d'enzymes par le groupe HDL de l'ICCF, la coprécipitation s'avère être la méthode de choix conduisant à un taux d'encapsulation nettement meilleur que celui obtenu par adsorption.

Chapitre III : Encapsulation de la fructose-6-phosphate aldolase dans une matrice hybride polysaccharide/HDL

III.1.Introduction

III.1.1. Généralités

Les polysaccharides sont des polymères linéaires ou ramifiés, formés par polycondensation d'un nombre élevé (de 10 à plusieurs milliers) d'unités monomériques osidiques ou de dérivés osidiques. Généralement les liaisons glycosidiques se situent entre le carbone 1 anomérique d'un motif et le carbone 4 ou le carbone 6 de l'autre motif. Les polysaccharides peuvent être homogènes s'ils résultent de la condensation d'une même unité osidique, ou hétérogènes si les unités sont différentes[232].

En raison de leur grande diversité structurale, les polysaccharides ont des propriétés physico-chimiques variées donnant accès à de multiples applications. Ils sont biodégradables, de source abondante et donc peu coûteux et biocompatibles. Par exemple, certains sont utilisés en agroalimentaire en raison de leurs propriétés épaississantes ou gélifiantes. En ce cas, il s'agit de macromolécules pouvant être réticulées par des cations ou d'autres molécules, générant des macrostructures. C'est cette propriété en particulier qui nous intéresse dans le cadre de ces travaux de thèse. Les conditions de gélification des polysaccharides sont douces comme on évite l'utilisation des solvants organiques et on économise de l'énergie (température modérée) et de la matière (utilisation de la matière renouvelable). Pour ces raisons, les polysaccharides sont souvent employés pour immobiliser des enzymes ou des cellules entières.

III.1.2. Encapsulation des enzymes dans les polysaccharides

Dans cette partie, nous allons présenter une étude bibliographique concernant l'encapsulation des enzymes dans quelques polysaccharides comme l'alginate et le carraghénane. Ces deux polysaccharides ont été choisis parce qu'ils constituent l'objet de notre étude.

a) L'alginate

Le polymère naturel le plus utilisé pour encapsuler des enzymes est l'alginate. Il est extrait à l'échelle industrielle à partir de diverses espèces d'algues brunes (*Phaeophyceae*). Les deux monomères retrouvés dans l'alginate sont le mannuronate (M) et le guluronate (G) (Figure III.1). La structure polymérique est alors constituée par des régions homopolymériques de M ou de G, ainsi que

par des régions de blocs MG. L'alginate ne possède pas donc une unité répétitive régulière[233]. Les propriétés physiques et chimiques des alginates peuvent varier selon les proportions de ces deux monomères. Sa composition est déterminée par l'espèce d'algue qui le produit.

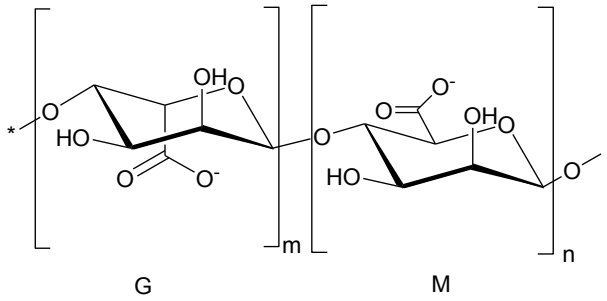


Figure III.1 : Structure de l'alginate

Le processus de gélification de l'alginate est basé sur sa capacité à se lier aux cations divalents[234], notamment Ca^{2+} et Mg^{2+}. Les expériences ont montré que la liaison ionique de l'alginate avec ces métaux augmente de façon remarquable avec l'augmentation du taux de guluronate dans la chaine. Une chélation se produit entre le métal divalent et les blocs G. Ce processus a été expliqué par le modèle de la boîtes à œufs (*egg-box*)[235] qui est représenté dans la Figure III.2.

Grâce à ses propriétés gélifiantes, l'alginate a été fréquemment utilisé en agroalimentaire. Il est utilisé comme additif alimentaire pour améliorer, modifier et stabiliser la texture des aliments puisqu'il augmente leur viscosité et stabilise les solutions et dispersions aqueuses.

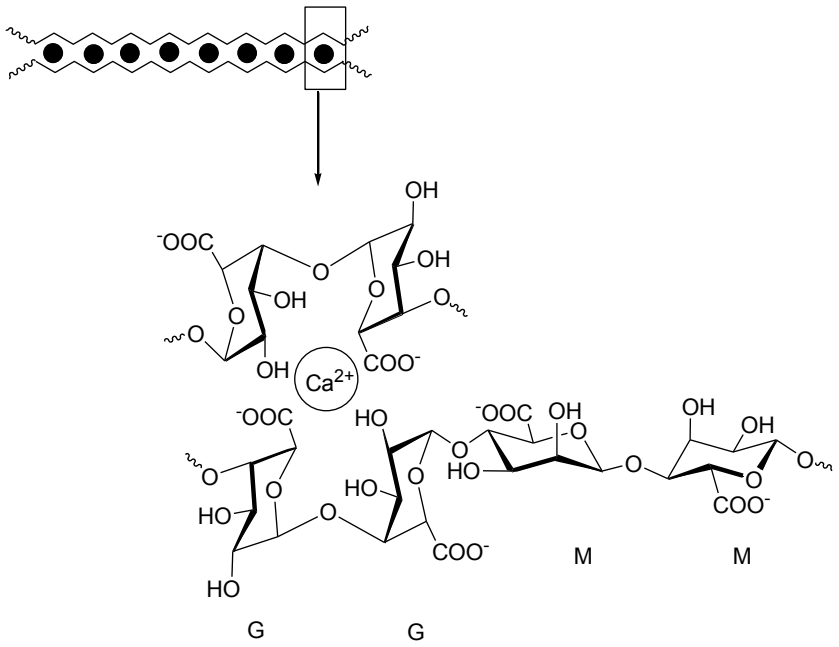


Figure III.2 : Modèle de boites d'œufs[235]

L'alginate a été utilisé couramment pour immobiliser différents types d'enzymes. Cependant, des résultats contrastés ont été obtenus : les pourcentages d'encapsulation étaient bons pour certaines

enzymes comme la β-xylosidase[236] et la β-D-glucosidase[237] et faibles pour d'autres comme la lactase[238]. Une perte de l'enzyme comprise entre 33% et 70% durant l'étape de gélification a été rapportée dans la littérature.[239–241] Les activités retenues étaient également variables, bonnes pour certaines enzymes comme l'invertase[242], la β-xylosidase[236] et l'endo-β-glucanase[243] et modestes pour d'autres comme la β-D-glucosidase[237] et la lipase[45]. L'hétérogénéité de ces résultats peut être liée à plusieurs facteurs comme la composition de l'alginate, une limitation dans la diffusion des substrats ainsi que les interactions ioniques entre l'enzyme et l'alginate puisque l'alginate est chargée négativement.

Arruda et al. ont démontré que les résultats de l'encapsulation de l'invertase dépendait du pH de la solution de $CaCl_2$. Les pourcentages des protéines non encapsulés étaient de 50, 48 et 34% en utilisant des solutions salines tamponnées de pH 4, 7 et 8. Les auteurs ont trouvé que les valeurs de V_{max} et de K_m de l'enzyme libre étaient 2.6 et 5.7 fois plus grandes respectivement que celles de l'enzyme immobilisée. L'activité de l'enzyme immobilisée était plus grande (112%) que celle de l'enzyme libre pour des concentrations en substrat (saccharose) inférieures à 25 mM. Au-delà de cette valeur, l'activité de l'enzyme libre devient plus grande que celle de l'enzyme immobilisée, car la vitesse de diffusion commence à gouverner le processus catalytique.[242]

La limitation de la vitesse de diffusion des substrats constitue l'inconvénient majeur de l'immobilisation dans les gels de polysaccharides. La β-D-glucosidase de *Pseudomonas picketti* et celle d'*Aspergillus niger* ont été immobilisées dans des billes d'alginate[237]. En partant de solutions initiales de 121.1 (*P. picketti*) et de 294.5 (*A. niger*) U par mL de polymère, des pourcentages d'encapsulation de 60% et de 50% respectivement ont été mesurés. Les activités immobilisées ne représentent que 15% et 26% des valeurs initiales respectivement. Cette perte d'activité lors de l'encapsulation a été attribuée à des problèmes de diffusion des substrats dans les billes. Pour l'enzyme du *P. picketti*, les valeurs de l'enzyme libre et immobilisée sont similaires, celle de V_{max} de l'enzyme immobilisée est de 30 fois plus petites que celle de l'enzyme libre, respectivement. Pour l'enzyme de l' *A. niger,* Le valeurs de K_m de l'enzyme immobilisée était deux fois plus grand que celle de l'enzyme libre, celle de V_{max} de l'enzyme immobilisée était 15 fois plus petite que celle de l'enzyme libre. L'augmentation de la valeur du K_m est due surtout à la limitation de la vitesse de pénétration des substrats et des produits. Ces changements de propriétés sont dus à des modifications du microenvironnement et de la conformation de l'enzyme.

Betigeri et al.[45] ont montré que les interactions ioniques entre l'alginate et l'enzyme peuvent diminuer fortement l'activité immobilisée. Ils ont étudié l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* en utilisant trois biopolymères qui sont l'alginate, le chitosane et l'agarose. L'agarose a été exclu rapidement de l'étude en raison de l'instabilité des billes et du relargage de l'enzyme. Le pourcentage d'encapsulation de l'enzyme a atteint la fourchette de 44-50% dans le cas de l'alginate et du chitosane (Tableau III.1). L'activité enzymatique dans les billes d'alginate à 2% est beaucoup plus

basse que celle mesurée dans les billes de chitosane (Tableau III.1). Ceci peut être dû aux interactions ioniques qui ont lieu entre l'enzyme et l'alginate et qui désactiveraient l'enzyme, le chitosane étant une molécule neutre (Figure III.3). L'encapsulation dans le chitosane 1.5% donne le meilleur résultat en activité (1240 ± 100 U/mL). Les études ont montré que le relargage de l'enzyme est plus important dans le cas de l'alginate (5-25%) que dans le cas du chitosane (10-12%).

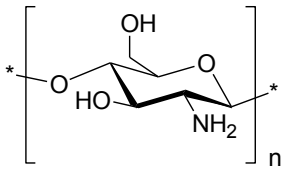


Figure III.3 : Structure du chitosane

Tableau III.1: Résultats d'immobilisation de la lipase dans les polysaccharides[45]

Polysaccharide	Concentration de polysaccharides (%(m/v))	Pourcentage d'encapsulation (%)	Activité retenue (U/mL)
Alginate	0.5	43.8 ± 5.9	nd
	1.0	48.4 ± 4.0	nd
	1.5	44.5 ± 5.5	nd
	2.0	44.6 ± 3.5	240 ± 32
Chitosane	1.5	45.7 ± 4.0	1240 ± 100
	2.0	51.6 ± 6.7	1110 ± 51
	2.5	47.9 ± 2.6	850 ± 100

nd : non déterminé

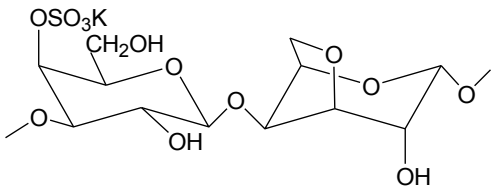
Un autre paramètre, comme l'ajout d'une deuxième protéine, peut influencer favorablement l'immobilisation dans les alginates. En effet, il a été montré que la présence d'une protéine inerte comme la BSA peut augmenter le pourcentage d'encapsulation et l'activité retenue pour certaines enzymes, puisqu'elle forme avec l'enzyme d'intérêt des agrégats qui sont mieux retenus dans les billes. La β-xylosidase thermostable de *Sulfolobus solfataricus*, surexprimée dans *E. coli*, a été immobilisée par encapsulation dans l'alginate. Différentes quantités de l'enzyme ont été encapsulées dans un premier essai, les pourcentages d'encapsulation et les activités retenues sont restées inférieures à 45%. En mélangeant différentes quantités d'enzyme avec la BSA (100 µL, 10 mg/mL), les auteurs ont pu améliorer les résultats et immobiliser jusqu'à 196 mU/g de billes (Tableau III.2). Une fois immobilisée, l'enzyme est plus stable, attesté par son activité maintenue au-delà de 85°C alors que celle de l'enzyme libre chute rapidement. La stabilité au cours du temps a été améliorée également : l'enzyme immobilisée a perdu 16% de son activité après 4 mois de stockage à 4°C, sachant que libre elle perd 50% après 2 mois. L'enzyme immobilisée a gardé 84% de son activité après 4 cycles de réutilisation[236].

Tableau III.2 : Résultats de l'immobilisation de la β-xylosidase en présence de la BSA dans les billes d'alginate[236]

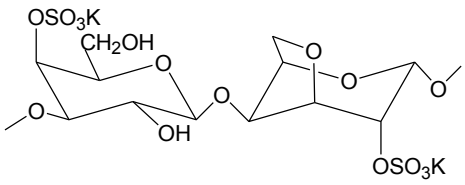
Activité de la β-xylosidase (mU/g de billes)			Rendement d'immobilisation (%) [(A-B)/A×100]	Rendement d'activité (%) (C/A ×100)
Ajouté (A)	Non encapsulé (B)	Encapsulé (C)		
24.5	3.2	21.3	87	87
49	0	49	100	100
98	0	98	100	100
196	0	196	100	100

b) Le carraghénane

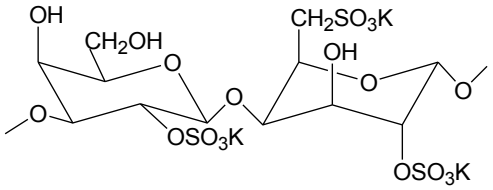
D'autres polymères naturels sont aussi utilisés pour immobiliser des enzymes comme les carraghénanes. Ce sont des polysaccharides extrait d'algues rouges de la classe des *Rhodophytina*. Les carraghénanes sont des polymères de haut poids moléculaire (>100 kDa) constitués d'unités répétitives de D-galactose et de 3,6 anhydrogalactose (3,6-AG). Les unités sont reliées par des liaisons glycosidiques α-1,3 et β-1,4 alternées. Il existe trois types de carraghénane qui sont le kappa (κ), le lambda (λ) et l'iota (ι) qui diffèrent par le degré de sulfatation et par leur contenu en 3,6-AG (Figure III.4). Le κ-carraghénane contient 25-30% d'ester sulfate et 28-35% de 3,6-AG, l'iota-carraghénane 28-30% et 25-30% respectivement, alors que le lambda-carraghénane c'est 32-39% et pas de 3,6-AG[244]. Des pourcentages plus élevés en sulfate signifient une température de dissolution plus basse et une gélification plus difficile. De ce fait, le κ-carraghénane n'est soluble qu'à chaud et il gélifie plus efficacement que les autres. L'iota-carraghénane est soluble à température ambiante et forme des gels en présence de cations. Le lambda-carraghénane est soluble à température ambiante et ne forme pas de gels. En pratique, le type de carraghénane varie en fonction de l'algue à partir de laquelle il est extrait et de la technique de préparation.



Kappa Carraghénane



Iota Carraghénane



Lambda Carraghénane

Figure III.4 : Les trois types de carraghénane

Les carraghénanes sont utilisés comme gélifiants, épaississants, agents stabilisants et en particulier dans les aliments et les sauces. Ils sont utilisés aussi en médecine expérimentale, dans les formulations pharmaceutiques et les cosmétiques.

La gélification des iota et kappa carraghénanes peut se faire par chauffage puis refroidissement, en présence de cations (K^+) ou bien en présence d'amines[245]. Les cations neutralisent la charge négative des groupements sulfates et minimisent donc les répulsions entre deux groupements sulfates. Donc les chaines s'associent par liaisons hydrogènes. Le mécanisme de gélification du carraghénane (iota et kappa) fait encore l'objet de débats entre deux théories (Schéma III.1) : la première théorie supporte la formation d'agrégats de doubles hélices en présence de cations (K^+)[246–248]. La deuxième théorie supporte la formation d'agrégats de simples hélices en présence de cations[249–253]. Les deux théories sont basées sur des méthodes de caractérisation variées comme la diffraction des rayons X, la rotation optique, la RMN du ^{13}C, la diffraction de la lumière et la calorimétrie.

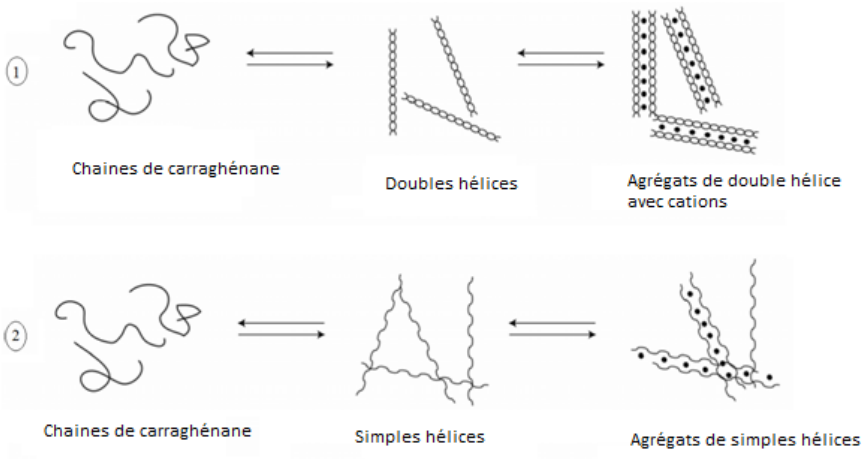


Schéma III.1: les deux mécanismes de gélification des carraghénanes[254]

Le gel de κ-carraghénane a été utilisé pour immobiliser plusieurs enzymes. Les essais réalisés conduisent à des pourcentages d'encapsulation et de rétention d'activité modestes à moyennes. Cependant, l'encapsulation a amélioré la stabilité thermique et au cours du temps et a permis la réutilisation des enzymes. Nous présentons ci-dessous quelques exemples bibliographiques des enzymes encapsulées dans des billes de κ-carraghénane.

L'estérase du foie de porc a été encapsulée dans les billes de κ-carraghénane. L'effet de la quantité d'enzyme a été étudié en utilisant 50 à 300 µg d'estérase avec 3 mL de κ-carraghénane 3%. Peu de protéines ont été immobilisées dans les billes (à l'échelle de µg par g de support). Aucune information sur l'activité spécifique du matériau (U/g) n'a été fournie. En utilisant 200-300 µg de l'enzyme, les résultats optimaux ont été obtenus : 32-44% des protéines ont été encapsulés et 47-48% des protéines encapsulés étaient actives (Tableau III.3). Le tableau présenté est reproduit à l'identique de l'article. On notera cependant une précision excessive ou non démontrée. La stabilité thermique a été améliorée par encapsulation. L'enzyme immobilisée perd 50% de son activité après 7 jours tandis que l'enzyme libre perd le même pourcentage en 2 jours. L'estérase immobilisée était recyclable conservant 50% de son activité après 8 cycles. Le K_m de l'enzyme immobilisée était du même ordre de grandeur que celui de l'enzyme libre, indiquant qu'il n'y a pas de changement conformationnel dû à l'encapsulation[255].

Tableau III.3: Effet de la concentration d'enzyme sur l'immobilisation[255]

Masse d'enzyme (µg)	µg de protéine/g de support	Protéine encapsulé (%)	µg de protéine active/g de support	Protéine active (%)	Rétention de l'activité enzymatique dans les billes (%)
50	13.6	27	6.3	13	46.3
100	32.0	32	14.7	15	45.9
200	87.9	44	42.4	21	48.2
300	96.9	32	45.7	15	47.2

Une autre étude a concerné la lipase de pancréas de porc. [48]. La capacité d'encapsulation du carraghénane a été évaluée en faisant varier les quantités de protéines (1-20 mg) et en utilisant 3 mL de κ-carraghénane (solution à 3%). Les résultats présentés dans le Tableau III.4 montrent qu'en augmentant la quantité d'enzyme, la quantité des protéines encapsulés et l'activité immobilisée augmentent. Le tableau présenté est reproduit à l'identique de l'article. On notera cependant une précision excessive ou non démontrée. Les résultats optimaux sont observés pour une quantité d'enzyme de 10 mg : 4.68 mg/g ont été immobilisés avec une rétention d'activité de 41%. Le matériau séché (déshydraté) a gardé 50% de son activité après 4 jours à 35°C, cependant il y a perte totale de l'activité en 4 jours et 2 jours pour le matériau stocké dans l'eau et pour l'enzyme libre respectivement. L'enzyme immobilisée est recyclable et garde 59% de son activité après 5 cycles.

Tableau III.4 : Effet de la quantité d'enzyme sur l'immobilisation[48]

Masse d'enzyme (mg)	mg de protéine/g de support	Protéine encapsulée (%)	mg de protéine active/g de support	Protéine active (%)	Rétention de l'activité enzymatique dans les billes (%)
1	0.56	56	0.184	18	33
5	2.79	56	0.960	19	32
10	4.68	47	1.930	19	41
20	7.60	38	2.962	15	39

La lipase de *Burkholderia cepacia* a été immobilisée pour la production de biodiesel à partir d'huile de palme. En partant d'une solution de 3.5 mg/g de κ-carraghénane, le rendement en protéine immobilisée était de 42% (1.5 mg/g de κ-carraghénane). Les valeurs de K_m et de Vmax étaient similaires pour l'enzyme libre et immobilisée. L'enzyme immobilisée a gardé 72% de son activité après 6 cycles. La stabilité de la lipase immobilisée dans divers solvants organiques (méthanol, éthanol, *n*-hexane, *n*-heptane) a été améliorée[49]. Dans les conditions optimisées, une conversion de 100% a été observée dans la réaction de transesterification de l'huile de palme (10 g) avec du méthanol en utilisant les billes obtenues[256].

Très peu d'essais d'immobilisation ont été réalisés avec l'ι-carraghénane. L'HRP a été immobilisée dans des billes de ι-carraghénane réticulées par des amines. Des taux d'immobilisation variables ont été obtenus selon la nature de l'amine utilisée. En partant d'une solution de 0.1 mg d'enzymes par mL d'ι-carraghénane (de concentration 0.6 mM), le meilleur résultat a été obtenu avec la tetraéthylène pentamine : le taux d'encapsulation a atteint 72% et l'activité retenue 100%. Cependant, 98% des protéines ont été relarguées dans un tampon phosphate en 100 min[257].

Le Tableau III.5 résume les exemples des enzymes immobilisées dans les polysaccharides que nous avons décrits dans cette partie.

Tableau III.5 : Exemples d'enzymes immobilisées dans les polysaccharides

Polysaccharide	Données d'activité, taux d'encapsulation	Stabilité	Autres (Recyclabilité, cinétique)	Réf
Alginate	0.036 U/mL	Stabilité thermique amélioré (à une température > 50°C)	-Les valeurs de K_m et Vmax étaient 5.7 et 2.6 fois plus grande que celles de l'enzyme immobilisée -Limitation de diffusion à une [saccharose] > 25 mM	242
Alginate	50-60% d'encapsulation 15-26% d'activité immobilisée	-	-Augmentation de Vmax après immobilisation -Déplacement du pH optimal vers le pH basique	237
Chitosane	1240 U/mL	-	Relargage d'enzymes plus important en cas de l'alginate qu'en cas du chitosane	45
Alginate	240 U/mL			
Alginate	196 mU/g	Amélioration de la stabilité thermique et au cours du temps	L'enzyme immobilisée garde 84% après 4 cycles	236
κ-carraghénane	Immobilisation de 87.9 µg prot/g de billes avec rétention de 48% d'activité	Amélioration de la stabilité thermique et au cours du temps	L'enzyme immobilisée garde 50% de son activité après 8 cycles	46
κ-carraghénane	Immobilisation de 4.7 mg/g de billes avec rétention de 41% d'activité	-stabilité pH et thermique amélioré -L'enzyme immobilisée séché est plus stable que celui aqueux ou libre	L'enzyme immobilisée garde 59% de son activité après 5 cycles	48
κ-carraghénane	Immobilisation de 1.5 mg/g de κ-carraghénane avec rétention de 100% d'activité	Stabilité amélioré dans les solvants organiques	L'enzyme immobilisée garde 72% de son activité après 6 cycles	49
ι-carraghénane	En partant de 0.1 mg prot/mL de carraghénane, 72% encapsulés avec rétention de 100% d'activité	-	98% d'enzymes ont été relargués dans un tampon phosphate en 100 minutes	257

III.1.3. Nanocomposite HDL/polysaccharide

L'association des hydroxydes doubles lamellaires aux polysaccharides permet de créer des nanocomposites hybrides de fonctionnalités améliorées. Plusieurs nanocomposites HDL/polysaccharides ont été préparés et étudiés en raison de leurs nouvelles propriétés hybrides.

Par exemple, la présence d'un polysaccharide peut améliorer la capacité des HDL à échanger ou adsorber des ions polluants et toxiques. En utilisant des nanocomposites cellulose-Zn/Al, la capacité de défluoruration de l'eau par les HDL a été augmentée de 4 à 5 fois par rapport à l'HDL seul[258]. Cette augmentation a été expliquée par une plus grande dispersion des particules d'HDL dans le réseau polymérique, ce qui a augmenté la surface exposée et facilité l'accessibilité aux sites d'adsorption. Egalement, afin d'enlever les ions fluorures ainsi que le 2-naphtol orange, des phases d'HDL (Zn/Al et Mg/Al) intercalés par l'alginate ont été préparé par Mandal et al. Les composites obtenus étaient plus efficaces que les deux composants séparés[259] : L'intercalation de l'alginate permet l'expansion de la structure interlamellaire, le rendant plus accessible pour intercaler ces ions.

Les nanocomposites peuvent être utilisés aussi comme des biocapteurs. Une nouvelle famille de nanocomposites a été préparée en intercalant divers polysaccharides anioniques (alginate, pectine, κ-carraghénane, ι-carraghénane, xanthane) dans un hydroxyde double lamellaire $[Zn_2Al(OH)_6]Cl.nH_2O$ en utilisant la méthode de coprécipitation[260]. Par conséquence, la capacité d'échange d'anions des HDL a été transformée en capacité d'échange des cations à cause de la présence des chaines de polysaccharides chargés négativement qui n'ont pas interagit avec l'HDL. Comme les polysaccharides intercalés gélifient en présence de l'ion calcium, les nanocomposites obtenus ont été utilisés pour l'identification des ions calcium en solution par potentiométrie. Les meilleurs capteurs sont l'alginate-HDL et l'ι-carraghénane-HDL.

L'acide alginique a été intercalé entre les feuillets d'un hydroxyde double lamellaire (Zn_2Al) par coprécipitation[261]. Le polysaccharide incorporé a eu un effet stabilisant vis-à-vis de la température durant la calcination du matériau. L'oxyde de zinc généralement observé à 200°C pour la phase Zn_2Al-Cl(ZnO) lors d'une calcination est apparu à 350°C pour le nanocomposite.

Des nanocomposites HDL/alginate ont été aussi utilisés pour la vectorisation d'un principe actif, l'ibuprofène afin de pouvoir libérer d'une façon contrôlé dans l'intestin[262]. L'HDL Mg_2Al a été encapsulé dans des billes d'alginate afin de les utiliser pour piéger les ions phosphates dans les solutions aqueuses[263]. Le pourcentage de piégeage était de 14% avec des billes d'alginate sans HDL et de 96% en présence des HDL (4% dans la solution d'alginate).

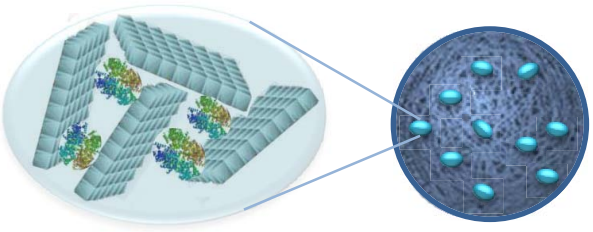
III.2. Encapsulation d'une enzyme dans les billes hybrides polysaccharides/HDL

III.2.1. Introduction

Le but de notre étude est de développer de nouveaux matériaux biohybrides multifonctionnels en combinant à la fois un matériau organique (polysaccharide) et un autre inorganique (HDL) et dont la propriété catalytique sera apportée par un troisième composant, une enzyme.

Dans ce chapitre, nous présenterons la conception et la caractérisation d'un bionanoréacteur Polysaccharide/HDL/FSA_{wt} et son application en biocatalyse. La FSA_{wt} a déjà été encapsulée dans les HDL (Mg_2Al-HDL) par les groupes du prof. C. Forano et du prof. M. Lemaire, et son intérêt catalytique a été démontré[134]. En revanche, l'immobilisation de la FSA_{wt} dans des billes de polysaccharides n'a jamais été décrite dans la littérature. Nous pourrons alors à cette occasion, comparer les trois systèmes, FSA_{wt}@HDL, FSA_{wt}@polysaccharide et FSA_{wt}@HDL/polysaccharide. Les HDL et enzyme@HDL se présentent sous la forme de poudres très fines et la structuration sous forme de billes grâce à un polysaccharide serait un avantage certain pour la manipulation ou le développement de réacteurs industriels.

Ainsi nous comptons sur deux niveaux d'immobilisation pour la FSA_{wt}: la nanostructuration de l'enzyme dans les HDL puis la macrostructuration du biohybride obtenu dans une matrice de polysaccharides (Figure III.5). Un tel assemblage pour faciliter l'élaboration et la mise en œuvre de microréacteurs pour des applications en biotechnologie. Le développement de ces matériaux biohybrides multifonctionnels permettra la synthèse des molécules d'intérêt biologique tel que des sucres et des analogues.



Biohybrides FSA_{wt}@Mg_2Al-HDL

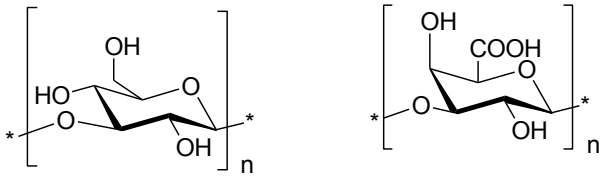
Billes FSA_{wt}@Mg_2Al-HDL/ι-Carr

Figure III.5 : Assemblage hiérarchique du bionanoréacteur FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr

III.2.2. Matériels et méthodes

Les polysaccharides choisis pour ce travail (compléments d'informations à l'article qui va suivre)

L'expertise de l'équipe GePEB de l'Institut Pascal dans le domaine des polysaccharides, nous a permis d'accéder à différents types de polysaccharides commerciaux ou préparés par cette équipe. En plus de l'alginate et du κ et ι-carraghénane qui ont été présentés dans l'introduction de ce chapitre, les structures des polysaccharides commerciaux (acide polygalacturonique, curdlane) qui ont été utilisés dans cette étude sont présentées dans la Figure III.6.



Curdlane Acide polygalacturonique

Figure III.6 : Structures du curdlane et de l'acide polygalacturonique

La cellulose oxydée (β-(1-3)-acide polyglucuronique) a été préparée par Delattre et al.[264] en oxydant le cellulose par le TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) en présence de NaOCl et NaBr. La structure de la cellulose oxydée est présentée dans la Figure III.7.

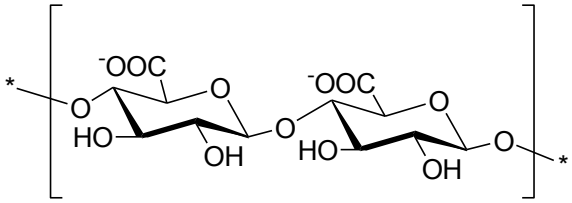


Figure III.7 : Structure de la cellulose oxydée[264]

III.2.3. Résultats et discussions

III.2.3.1. Introduction

Dans cette section, les résultats sont présentés sous la forme d'une publication dont le titre est « Polysaccharide-Layered Double Hydroxide-aldolase biohybrid beads for biocatalysed C-C bond formation » parue dans la revue ‗Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic' (*122* (**2015**) 204–211).

Dans ces travaux, j'ai participé :

- à la réalisation des expériences en laboratoire ;
- à la caractérisation des matériaux et des produits de synthèses
- à l'interprétation des résultats
- à la rédaction de l'article.

Ces résultats ont été également présentés sous forme de :

- Poster dans le **Sysbiocat summer school**' (COST Action CM1303) à Sienne (Italie) en mai 2014 sous le titre « New multifunctional biohybrid materials for biocatalysis ». (Oratrice : R. MAHDI).
- Poster dans le congrès **Euroclay 2015**' qui s'est déroulé à Edimbourg (UK) en juillet 2015 sous le titre « Design of novel biocatalysis microreactor based on hierarchical structuration of Enzyme/Layered Double Hydroxide/Polysaccharide beads ». (Orateur : C. Forano).
- Communication orale au congrès **2nd international conference on bioinspired and biobased chemistry & materials**' qui s'est tenu en 2014 à Nice (France) sous le titre «Enzyme@Layered Double Hydroxide embedded in polysaccharide beads - Novel nanobioreactors for biocatalysis » (Orateur : C. Forano)
- Communication orale au **25ème colloque du Club Bioconversions en Synthèse organique** qui s'est tenue en juin 2014 à Carry le Rouet (France) sous le titre « Nouveaux matériaux hybrides multifonctionnels pour la biocatalyse » (Oratrice : R. Mahdi)

III.2.3.2. Criblage de polysaccharides

Neuf polysaccharides ont été testés afin de choisir ceux qui ont des conditions de gélification compatibles avec l'enzyme. Ces polysaccharides sont : le curdlane, le curdlane oxydé, l'acide polygalacturonique, la cellulose oxydée, l'ι-carraghénane, le carboxyméthylcellulose, le xanthane, l'alginate et un mélange xanthane/guar. Le but étant de gélifier ces polysaccharides par des cations, sous forme des billes.

Le curdlane est solubilisé à pH 11-12. On forme les billes en ajoutant la solution du curdlane (1.5%) goutte à goutte dans une solution d'acide chlorydrique (1M). Ces conditions de solubilisation et de gélification ne sont pas compatibles avec l'activité enzymatique qui a un pH optimum entre 7.5 et 9.

L'acide polygalacturonique (0.8%) est solubilisé en chauffant à 80°C dans 2h. Ce polysaccharide forme ensuite des billes dans une solution de dichlorure de calcium. Ce polysaccharide n'a pas été utilisé pour encapsuler l'enzyme puisque le chauffage à 80°C pendant 2h désactive

l'enzyme. Nous avons essayé également de le refroidir jusqu'à 40°C puis d'ajouter l'enzyme mais ceci n'était pas possible puisque le refroidissement était rapide et a entrainé la gélification immédiate du polysaccharide. Ceci nécessite un appareil sophistiqué qui n'était pas disponible.

Trois polysaccharides étaient soluble à température ambiante et donnaient des billes dans les solutions salines : l'ι-carraghénane (1-1.5%) dans du chlorure de potassium, l'alginate (1-2%) et la cellulose oxydée (1-2%) dans du dichlorure de calcium.

Le curdlane oxydé (0.3%), le carboxyméthylcellulose (0.5%) et le xanthane (0.5%) étaient solubles à température ambiante mais n'ont pas formé des billes dans les solutions salines. le mélange xanthane/guar préparé avec des rapports 1/1, 1/2, 1/3, 1/6 et avec une concentration totale de 0.2%, n'a pas formé des billes dans les solutions salines.

III.2.3.3. 'Polysaccharide-Layered Double Hydroxide-aldolase biohybrid beads for biocatalysed C-C bond formation' parue dans Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 122 (2015) 204–211

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

Polysaccharide-layered double hydroxide–aldolase biohybrid beads for biocatalysed CC bond formation

Rima Mahdi[a,b], Christine Guérard-Hélaine[a,b], Céline Laroche[c,d], Philippe Michaud[c,d], Vanessa Prévot[a,b], Claude Forano[a,b,*], Marielle Lemaire[a,b,*]

[a] Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, ICCF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
[b] CNRS, UMR 6296, ICCF, BP 80026, F-63171 Aubière, France
[c] Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
[d] CNRS, UMR 6602, IP, F-63171 Aubière, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 April 2015
Received in revised form 23 July 2015
Accepted 28 July 2015
Available online 5 August 2015

Keywords:
Aldolase
Layered double hydroxide
ι-Carrageenan
Biohybrid
Nanomaterial

ABSTRACT

This study describes the design a novel microbioreactor for the biocatalysed asymmetric synthesis of polyhydroxylated compounds. The bioreactor was elaborated by a hierarchical assembly of a recombinant fructose-6-phosphate aldolase (FSA_{wt}), layered double hydroxides (LDH) nanoplatelets and polysaccharide beads. Various polysaccharides were tested to encapsulate FSA_{wt} and pre-immobilised FSA_{wt} in LDH (FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH). ι-Carrageenan appears as the most suitable candidate to prepare biohybrid beads. The retained activities in ι-carrageenan beads were measured for both free FSA_{wt} and immobilised FSA_{wt} revealing a 3 fold higher activity in favour of the pre-immobilised FSA. This result was probably due to a positive interaction between the negatively charged polysaccharide and the positively charged LDH layers. The catalytic activity, the recyclability and the storage of the beads were studied in addition to the leakage of FSA_{wt} activity from beads. Nanostructuration of both FSA_{wt}/ι-carr and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr was investigated by structural and textural characterization techniques.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The strategy of enzyme immobilization originally developed to allow their reuse or their easy separation [1,2] has recently moved to the concept of bio-nanoreactor where the biological reactions take place in a nanoscale confined environment. The immobilization matrix and the biological material are no more seen as independent entities that insure separated functions, respectively an active biological reagent embedded in an inert host structure. The design of bio-nanoreactors aims to mimic the natural environment surrounding a biological agent with all its chemical, physical and biological functions. This concept is based on the design of a nanosized container (vesicle, nanodroplet, polymersomes, micelles, biopolymer beads, porous solids) which is no more a simple holding vessel but a determinant component of the overall reaction process [3]. In such small restricted domains, molecular diffusion and molecular dynamics, as well as mass transfer and chemical transformations obey to specific thermodynamic and kinetic specificities. The biocatalytic reactions in confined medium may be strongly affected by the diffusion limitations, the biointerface between the matrix and the biomolecule and also by the size, shape and pore structure [2].

Among the various confinement systems for enzymes, inorganic nanostructures [4,5] display stronger mechanical strength, higher resistance to organic solvents and thermal stability and have demonstrated positive abilities to enhance chemical (pH,) and thermal stability of enzymes and to behave as efficient barriers against their biodegradation. Moreover in such nanoreactors, the enzyme/solid biointerface appears to prevent enzyme deactivation through favourable enthalpy increase and entropy decrease contributions to the structural free energy (ΔG) of the enzyme native state. These interactions often broaden enzyme specificity and enhance both activity and selectivity. Enzymes bound to solids often improved their enzymatic activities by more than 100% [6,7] and may sustain activities at temperatures that are close to the boiling point of water [8,9]. Consequently, inorganic supports display specific properties that may open a larger range of operational conditions for enzyme catalysis.

Layered double hydroxides (LDH) also named anionic clays are inorganic nanostructures, displaying stacked positively charged layers composed of metal hydroxides ($[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2^{x+}]$, where

* Corresponding author. Fax.: +33 4 7340 7717.
E-mail addresses: claude.forano@univ-bpclermont.fr (C. Forano), marielle.lemaire@univ-bpclermont.fr (M. Lemaire).

http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.07.014
1381-1177/© 2015 Published by Elsevier B.V.

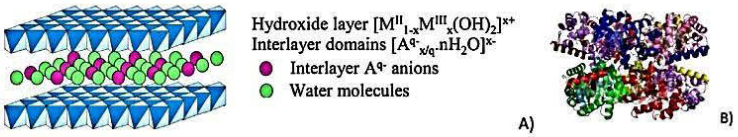


Fig. 1. (A) Structure of Layered Double Hydroxides and (B) Structure of the FSAec according UniProtKB databank.

M^{II} and M^{III} are respectively divalent and trivalent metal cations) separated by interlayer anions and water molecules ($[X^{q-}_{x/q}.nH_2O]$) [10] (Fig. 1A). Their bidimensional structure, tunable chemical and surface properties, high hydration rate and unique anion exchange capacities [11] allow intercalation and immobilization of a large series of various organic molecules and biomolecules. They offer favourable interlayer environments for the design of enzyme-based bionanoreactors and LDH/Enzyme biohybrid materials may be of great interest in food technology, biotechnology, biomedicine, and analytical chemistry. LDH was widely used to immobilise enzymes like transketolase [12], horserardish peroxidase [13], laccase [14], urease [15] and aminopeptidase [16]. Such matrices favour a high loading of enzymes, increase their stability and retain their activity. The preparation method using soft chemistry conditions is a guaranty of the structure and bioactivity preservation.

Gels or beads of polysaccharides such as agarose, alginate, chitosan or carrageenan [17] were also used as matrices for enzyme immobilization. They offer a favorable chemical environment which maintains the native structure of enzyme and prevents enzyme aggregation due to the presence of binding functional groups (—OH, NH_2, $—COO^-$) and a high hydrophilicity that contributes to build a stable water layer around the enzyme [18]. However polysaccharide beads display soft structure with nearly a quasi-liquid environment (density closed to that of water) where the enzyme diffusion is facilitated, a low mechanical strength and large pore size due to either a low crosslinks density or crosslinking bounds sensible to chemical hydrolysis (H_2O, H_3O^+). The porosity of the polysaccharides beads must be accurately controlled in order to prevent the leakage of the enzyme [19]. Interestingly, hybrid clay/polysaccharide beads have demonstrated an increase in mechanical and thermal stabilities [20]. Due to their large surface/volume ratio, high specific surface area, ion exchange properties low dimensional clay and LDH structures favour stable self-assemblies with polyelectrolyte such as some polysaccharides. They have been blended with polysaccharides to increase their density and strengthen their physical properties [21–23]. For instance, bionanocomposites based on alginate-zein LDH and pectin-chitosan-LDH associations were described as drug delivery systems [24,25].

Discovered in *Escherichia coli* [26,27], the fructose-6-phosphate aldolase (FSA_{wt} EC 4.1.2) (Fig. 1B) is a powerful enzyme to catalyse a stereoselective aldol addition, a cornerstone reaction for CC bond formation. FSA_{wt} belongs to the class I aldolase family in which an enamine is formed by reaction of the donor with a lysine residue (Schiff-base mechanism) [28]. Being a non-phosphorylated donor dependant aldolase, it has been used intensively to achieve the stereoselective synthesis of sugars and analogs [29]. Indeed, this enzyme accepts a large variety of aldehydes as acceptors and in combination with the different known donors (dihydroxyacetone, hydroxyacetone hydroxybutanone and glycolaldehyde) it has led to the preparation of biologically active molecules such as iminocyclitols, nitrocyclitols and phosphorylated sugars [30–32]. Illustrating its high interest, a genome mining approach was developed in order to discover new enzymes able to catalyse dihydroxyacetone addition on aldehydes. Several new FSA-like aldolases were thus revealed from various microorganisms and were fully characterized [33]. The FSA_{wt} from *E. coli* was successfully embedded in a Mg_2Al LDH without any loss of activity. Moreover, the tunable pH buffering property of LDH permitted to work at pH optimum (pH 8.5) for enzyme activity. The biohybrid was efficiently applied in biocatalysis and could be reused without a significant loss of activity [34].

Therefore, encapsulation of enzyme/clay systems in polysaccharide beads may combine interesting properties of an efficient bionanoreactor encapsulated in polysaccharide microspheres, both assembled in stable interaction. The main objective of this work is the development of new multifunctional biohybrid materials based on the multiscale nanostructuration of FSA, LDH nanoplatelets and polysaccharides by different synthetic strategies and their use in biocatalysed organic synthesis. The LDH provide a host structure and a favorable environment for the enzyme and the biocatalytic reaction. The polysaccharide provides the mesoscopic gelation for the nanohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH encapsulation and facilitates its use. This novel bionanocomposite based microreactor would have promising developments for applications in biotechnology.

2. Experimental part

2.1. Materials

Carboxymethylcellulose (CMC) was from Fluka (21904), polygalacturonic acid from Sigma–Aldrich (P3850), sodium alginate (RARESEA) from Degussa Texturant Systems (France), curdlan from Kirrin Food Tech company (110319B) κ-carragenaan from Sigma–Aldrich and ι-carrageenan from Rhodia. Oxidized cellulose was prepared according to Delattre and co-workers [35,36].

Triose-phosphate isomerase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Cellulomonas* sp. and D-fructose-6-phosphate sodium salt were purchased from Sigma–Aldrich.

$Mg(NO_3)_2{\cdot}6H_2O$, $Al(NO_3)_3{\cdot}9H_2O$, KCl, NaOH, glycylglycine were purchased from Aldrich chemicals. All aqueous salt solutions were prepared using deionized water. Hydroxyacetone was purified by distillation and kept under argon before use.

2.2. Fructose-6-phosphate aldolase

FSA_{wt} was over-expressed and purified from *E. coli* as described previously [37]. Protein concentration was determined by the Bradford protein assay reagent kit [38]. The soluble and immobilized FSA_{wt} activities were quantified as previously described [39] at 25 °C using 50 mM D-fructose-6-phosphate as substrate in 50 mM glycylglycine buffer. The enzyme unit is defined as the amount of enzyme needed to cleave 1 mmol of D-fructose-6-phosphate, amount equivalent to one mmol of oxidised NADH.

2.3. Preparation of LDH and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH bionanoreactors

Mg_2Al-NO_3 LDH and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH were prepared by the coprecipitation method as described previously [34]. Immobilization of FSA_{wt} was realised as follow. Typically, 10.7 mL of a magnesium and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma[Mg^{2+} + Al^{3+}] = 0.1$ M, Mg/Al: 2/1) was added into a reactor containing 280 mg of FSA_{wt}/glycylglycine (35wt%) dissolved in 30 mL of water at pH 9.0, under stirring and nitrogen atmosphere. The immobilization was

Table 1
FSAwt encapsulation rate and retained activity in different polysaccharide beads (percentage of activity is referred to the initial value).

Weight of FSA_{wt}(mg)	Activity of FSA_{wt}(U)	Alginate beads[a]		Oxidised cellulose beads[b]		i-Carr beads[c]	
		FSA_{wt}immobilised (mg)	Activity (U)	FSA_{wt} immobilised (mg)	Activity (U)	FSA_{wt}immobilised (mg)	Activity (U)
0.6	1.5	0.08 (13%)	0.13 (9%)	0.1 (17%)	0.15 (10 %)	0.15 (25%)	0.18 (12 %)
1.2	3	0.2 (17%)	0.33 (11%)	0.2 (17%)	0.33 (11 %)	0.3 (25%)	0.54 (18 %)
2.4	6	0.3 (13%)	0.78 (13%)	0.4 (17%)	0.60 (10 %)	0.56 (23%)	1.20 (20 %)

[a] Alginate (15 mg/mL), CaCl2 (0.5 M).
[b] Oxidised cellulose(15 mg/mL) , CaCl2 (0.5 M).
[c] ι-carr (15 mg/mL), KCl (2 M).

completed in 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles in deionized water and then stored for further uses in deionized water at a suspension concentration of 5 mg/mL.

2.4. Polysaccharide gelation

Polymer beads were prepared by dropping 1 mL of each polymer solution (alginate, oxidised cellulose and ι-carrageenan at 15 mg/mL) mixed with the enzyme: 1.5, 3 and 6 U which corresponds to 0.6, 1.2 and 2.4 mg in a calcium chloride 0.5 M solution for alginate and the oxidized cellulose, and a potassium chloride 2 M solution for the ι-carrageenan. The obtained beads were left for 1.5 h in the salt solution for hardening, and then washed twice with distilled water in order to remove reagent excess.

2.5. Microreactors preparation

FSA_{wt}, Mg_2Al–NO_3 LDH and the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH biohybrid were all individually encapsulated in ι-carrageenan beads following the immobilization procedure. Briefly, several quantities of FSA_{wt} (1, 2, 4, 8, 12, 16 U) or LDH (0.5, 1.25, 2.5, 5, 10 mg) or FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH (1, 2, 4, 8, 12, 16 U which corresponds to 0.625, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 mg of FSA@Mg_2Al-LDH respectively) were added to 1 mL aqueous solution containing 1.5% w/v ι-carrageenan. This mixture was dropped into 2 M KCl solution (10 mL) for reticulation. The obtained beads (noted hereafter FSA_{wt}/ι-carr and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr) were left for 1.5 h in the salt solution for hardening, and then washed twice with distilled water to remove reagent excess. A part of beads were freeze-dried to perform physical characterizations.

The amount of protein in the beads was determined indirectly from the difference between the initial amount of protein and the amount of protein remaining in the supernatant and washing solutions. Protein concentration was measured using an evolution 500 UV–visible spectrophotometer (Nicolet). A calibration curve was constructed from the absorbance at 277 nm (absorbance bands of Tyr and Trp) of FSA_{wt} standard solutions. For the FSA_{wt}/ι-carr beads, the initial weight of FSA_{wt} was 0.4, 0.8, 1.6, 3.1, 4.7, 6.3 mg of proteins. From the results of the calibration curve, the encapsulated weights are 0.067, 0.27, 0.66, 1.26, 1.23, 1.27 mg. The activity of the beads was measured. Then, to study the diffusion limitations, the beads were crushed and their activity was measured again.

2.6. Physical characterization

Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns were obtained on dried sample (40 °C, 12 h, oven) with a Siemens D501 X-ray diffractometer using Cu Kα radiation (λ = 1.5415 A°) and fitted with a graphite back-end monochromator. The samples were scanned from 2° to 70° (2θ) using steps of 0.08° and a counting time of 4 s per step. Infrared transmission spectra (FTIR) were recorded using the KBr pellet technique with a Nicolet 5700 spectrometer from Thermo Scientific. A total of 2% (w/w) of sample, with respect to the potassium bromide was mixed with dry KBr. Each KBr disc was scanned over a wavenumber region of 400–4000 cm^{-1}. SEM characteristics of the samples were imaged by a JSM-7500F FESEM operating at 3 kV. Specimens were mounted on conductive carbon adhesive tabs.

2.7. Catalytic properties and stability of FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr

Catalytic efficiency of the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads was tested on an aldol addition of hydroxyacetone and formaldehyde to produce (3*S*)-3,4-dihydroxybutan-2-one. The reaction was conducted in a flask containing 1.2 mmol hydroxyacetone, 0.6 mmol formaldehyde and 500 mg FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads (0.4 U). The final volume was 3 mL. After 3 h, the beads were filtrated and washed with deionized water. The product was obtained after evaporation and the yield was calculated. The product was characterized by NMR ^1H. The spectrum was identical to that already described [34].

General protocol for each cycle in reusability study: a reaction between hydroxyacetone (0.12 mmol) and formaldehyde (0.2 mmol) in 3 mL of potassium chloride solution 1 M (pH 8) was performed in the presence of 410 mg FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads (0.4 U). Each run lasted 90 min after which the beads were separated, washed with deionised water and their activity was assayed. The concentration of hydroxyacetone was measured by a spectrophotometric assay: 950 μL of glycylglycine (50 mM pH 8), 20 μL NADH (10 mg/mL), 20 μL GDH (U) and 10 μL of reaction medium.

Leakage study: the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads (300 mg) and the FSA_{wt}@ι-carr beads (300 mg) were incubated at 25 °C, under 200 rpm stirring in deionized water. The enzyme leakage was studied by measuring the protein concentration (absorbance at 280 nm) and/or the activity of the enzyme.

Storage stability: FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH (2.25 U/mL) and the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads (500 mg of the most charged beads) were stored in water and in potassium chloride solution (1 M) at 4 °C. Their activities were measured periodically over a total duration of two weeks.

3. Results and discussion

3.1. Polysaccharide screening for optimal FSA_{wt} encapsulation

A preliminary study was conducted in order to select a suitable polysaccharide for FSA_{wt} encapsulation among six polysaccharides (alginate, polygalacturonic acid, κ-carrageenan, ι-carrageenan, curdlan and oxidised cellulose). Only alginate (alg), oxidised cellulose and ι-carrageenan (ι-carr) displayed gelation properties compatible with the chemical and biological stability of the enzyme, that is, gelation pH between 7 and 9.5 and temperature

Table 2
Immobilization of FSAwt and FSAwt@Mg2Al-LDH in ι-carr. Values are a mean of three experimental results.

Biohybrid	Initial activity (U)	Embedded Activityfor beads (U)	Embedded activity for crushed beads (U)
$FSA_{wt}@Mg_2Al$	251 ± 5	207 ± 5 (82 %)	-
	1.00 ± 0.05	0.09 ± 0.01 (9%)	0.09 ± 0.01 (9%)
	2.0 ± 0.10	0.20 ± 0.01 (11%)	0.30 ± 0.02 (16%)
	4.0 ± 0.20	0.60 ± 0.03 (16%)	0.90 ± 0.05 (21%)
	8.0 ± 0.40	0.60 ± 0.03 (8%)	1.20 ± 0.06 (16%)
	12.0 ± 0.40	0.70 ± 0.03 (6%)	1.20 ± 0.05 (10%)
FSA_{wt}/i-carr	16.0 ± 0.50	0.70 ± 0.03 (4%)	1.20 ± 0.05 (8%)
	1.0 ± 0.05	0.20 ± 0.01 (17%)	0.40 ± 0.02 (40%)
	2.0 ± 0.10	0.30 ± 0.01 (14%)	0.70 ± 0.04 (34%)
	4.0 ± 0.20	0.40 ± 0.01 (10%)	0.80 ± 0.03 (21%)
	8.0 ± 0.30	0.80 ± 0.03 (10%)	2.00 ± 0.06 (26%)
	12.0 ± 0.40	1.10 ± 0.03 (10%)	3.20 ± 0.06 (27%)
$FSA_{wt}@Mg_2Al$-LDH/i-carr	16.0 ± 0.40	1.10 ± 0.03 (7%)	3.40 ± 0.06 (21%)

lower than 70 °C [37]. In order to test the enzyme stability in presence of these three polymers, the enzyme was incubated for 1 h in the 1.5% polymer solutions. The FSA_{wt} retained its activity, which indicated that the polymers did not inhibit the enzyme.

The ability of polysaccharides to encapsulate FSA_{wt} was determined for various amounts of enzyme (Table 1). As a general comment, the maximum amount of immobilized enzyme was 0.02 mg FSA_{wt}/mg alg for alginate beads (i.e. 13 % of the initial value), 0.03 mg FSA_{wt}/mg for oxidized cellulose (i.e. 17 % of the initial value) and 0.04 mg FSA_{wt}/mg ι-carr for ι-carr (i.e. 23% of the initial value). Note that the immobilized enzyme was active and the best results were obtained with ι-carr.

These results show that the rate of FSA_{wt} encapsulation is proportional to the initial FSA_{wt} amount. Indeed as presented in Fig. S2a, a linear behavior is observed for all polysaccharides. A similar behavior is observed for the evolution of the FSA_{wt} activity after immobilization compared to the initial FSA_{wt} activity involved in the process (Fig. S2b).

The limitation of the enzyme stability and low entrapment efficiency by this microencapsulation procedure are well known, especially with water-soluble substances like proteins [40]. This loss in the manufacturing process has been reported by several other workers [41–43] and it varies from approximately 33% to 70% of weight depending on the enzyme and the encapsulation method. The lipase was immobilized in alginate and chitosan beads, the encapsulation efficiency was about 50% of weight for these biopolymers [44]. Recently, several supports were tested to immobilise the threonine aldolase from *E. coli* [45]. In alginate beads, the retained activity was 5–12% while 30% was obtained using the orthosilicates as immobilization matrix.

The difference of the activity yields between alginate, oxidised cellulose and ι-carr could be due to the differences in the gelation mechanism of these biopolymers [46,47].

Obviously, gelation mechanism of alginate and oxidised cellulose involved a higher rate of reticulation connection. Moreover complexes formed between Ca^{2+} and carboxylate groups strengthen and densify the beads more effectively than for κ- and ι-carr. Both structural constrains are probably a cause of higher exclusion of enzyme in alginate and oxidized cellulose.

Finally, our results evidenced that up to 1.20 U FSA_{wt} activity was retained in ι-carr beads evidencing that 87% of the encapsulated FSA_{wt} retain its enzymatic activity. Consequently, we focused our further investigations on ι-carr as the best matrix for FSA_{wt} embedding.

3.2. FSA_{wt} and $FSA_{wt}@Mg_2Al$-LDH encapsulation in ι-carr and FSA_{wt} activity

3.2.1. Preparation of $FSA_{wt}@Mg_2Al$-LDH

As mentioned in the introduction, LDH were frequently used to immobilise anionic biomolecules and enzymes [12,34]. FSA_{wt} was immobilized in the Mg_2Al–NO_3 LDH following the coprecipitation conditions described previously [34]. $Mg_2Al(OH)_6NO_3 \cdot nH_2O$, ($Mg_2Al$–$NO_3$) LDH was chosen for FSA_{wt} immobilization, due to its high charge density for FSA_{wt} attractions, its high anion exchange capacity (3600 mmol kg^{-1}) for FSA_{wt} loading and because it enables working at an appropriate pH for the FSA_{wt} activity. Indeed, the FSA, with an isoelectric point of 8.1 has an overall negative charged under formation of the biohybrid material that favor electrostatic assembly with the positive LDH layers. The coprecipitation is the most developed synthesis method to prepare LDH. It is

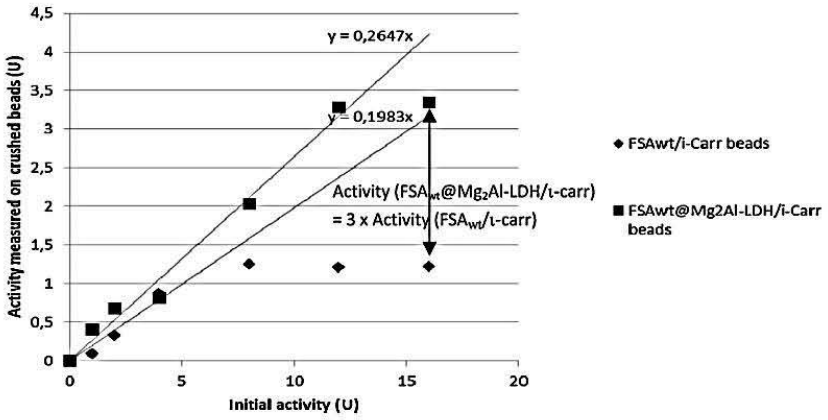


Fig. 2. Activity measured for crushed beads for FSAwt/ι-carr and FSAwt@Mg2Al-LDH/ι-carr.

a soft chemical process conducted in mild conditions (room or even lower temperature, in aqueous medium with controlled pH). This method is very well appropriated for the immobilization of fragile biomolecules, particularly enzymes, which may suffer of structural denaturation or chemical degradation in aggressive environments. It allows preserving the conformation of the enzyme and favours the encapsulation of the enzyme when LDH nanoplatelets form, grow and aggregate. Leakage of the enzyme is then avoided compared to what is generally observed for surface adsorption processes of enzymes [55]. The experimental M^{II}/M^{III} ratio determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) chemical analysis was 1.97 which confirms the expected Mg_2Al structure. The percentage of embedded protein was 95%. The enzymatic activity in the biohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH was 82% which is similar to the value previously reported [34]. This LDH-enzyme material (nearly 1:1 in wt) is one of the highest loading of enzyme in inorganic material supports.

3.2.2. *FSA_{wt} and FSA_{wt}@Mg_2A-LDH embedding in ι-carr beads*

To test the chemical stability of the biohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH in the presence of ι-carr polymer, the biohybrid was kept in a ι-carr solution (1.5% w:v) for 1 h under stirring. After centrifugation and removal of the supernatant, the enzymatic activity was measured for the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH material. Obviously, even though LDH are known to strongly adsorb or intercalate biopolymers [56], the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH interactions appeared to be stronger. Finally, the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH material was kept in a potassium chloride solution (2 M) for 4 h. After centrifugation, the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH has conserved all of its activity and no protein was found in the KCl solution. In conclusion, FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH could be encapsulated in ι-carr with the conservation of its structural assembly.

Biohybrid beads immobilizing several quantities (Table 2, second column) of FSA_{wt} and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH biohybrid were prepared by using a ι-carr solution (1.5%, pH 8). Gelation conditions (KCl 2 M) used were the same than for gelation of ι-carr without enzyme. Therefore such reticulation conditions were compulsory to maintain the structural cohesion even though a loss of FSA_{wt} accessibility was generated as previously described in the literature [57].

In order to quantify the total amounts of FSA_{wt} embedded in the i-carr beads, FSA_{wt} activity remaining in the supernatant was measured. These results were confirmed by measuring the total activity of the encapsulated FSA_{wt} for the crushed beads. It must be noticed that for all experiments, FSA_{wt} maintains its activity. In regards to the initial activity used, the encapsulation efficiency varied between 17 and 40% (see experimental section). One limitation of the encapsulation efficiency is due to the loss of enzyme during the initial gelation period when the drop is not yet fully gelled to form the bead. This loss was previously described in the literature [44].

As illustrated in Table 2 entries 2–7 column 3, the retained activities were 4–16% when encapsulated in the ι-carr beads. The measured activity increases (8–21%, column 4) when the beads are crushed, revealing that due to diffusion limitations the enzyme is not totally accessible in the beads. This phenomenon has been observed in similar studies [58]. It should be noted that crushed beads form a gel that do not leach the enzyme when put in water, as no free enzyme was detected in the assay medium. These results of low embedded activity in polysaccharide beads were similar to those described previously in the literature: the encapsulation of the threonine aldolase in alginate beads (5–12%) [45] and the esterase in κ-carragenan beads (13–21%) [59] can be cited as examples.

When the biohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH was encapsulated in the ι-carr beads (Table 2, entries 8–13), the activity yield was higher than that of the encapsulation of the free enzyme. The maximum activity yield was 17% (0.15 U/1 U) for the beads and 40% (0.4 U/1 U) for the crushed beads (entry 8 columns 3 and 4). This enhancement of encapsulation efficiency can be due to the favourable electrostatic interactions between the positively charged LDH and the negatively charged polymer. LDH nanoplatelets seems to behave as a crosslinker in the reticulation mechanism of the polysaccharide because of this electrostatic attraction used before to intercalate the ι-carr between the sheets of the LDH [56].

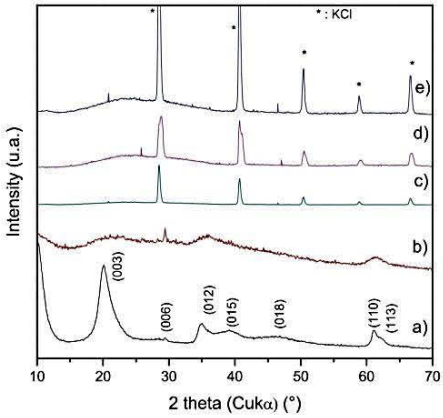


Fig. 3. Powder X-Ray diffractogram of a) Mg2Al-LDH, b) FSAwt@Mg2Al-LDH, c) Mg2Al-LDH/ι-carr beads, d)ι-carr beads and FSAwt@Mg2Al-LDH/ι-carr beads.

To compare these results, the activity measured in the crushed beads versus the initial activity was plotted in Fig. 2. The graph shows that the encapsulation efficiency is increased when the biohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH was encapsulated when compared to the encapsulated free enzyme. The retained activity in the gel (crushed beads) increases when the amount of FSA_{wt} or FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH increases. Then the retained activity becomes constant and independent of the added enzyme amount, around 8 units for the FSA_{wt} and 12 units for the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH (Table 2). Thus, the gel was saturated in enzyme or biohybrid. The activity of the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr (3.35 U) was 3 fold higher than the activity of the FSA_{wt}/ι-carr beads (1.22 U). The proportional coefficient α was in the same range for the FSA_{wt} ($\alpha = 0.2$) and the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH ($\alpha = 0.26$) taking into account the linear section of the curves. The FSA_{wt} and the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH were encapsulated similarly until the gel saturation which was higher for the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH.

3.3. *Bionanoreactor characterization*

The nanostructuration of FSA_{wt} in the different host structures was investigated using powder X-ray diffraction (PXRD). PXRD patterns of the biohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH, the LDH, the LDH/ι-carr beads and the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads are displayed in Fig. 3 and compared with the diffractogram of Mg_2Al–NO_3 LDH reference material, coprecipitated in similar conditions than FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH.

Mg_2Al–NO_3 LDH phase displays a poor crystallinity, due to the diluted concentration used. The lattice parameters refined from the hexagonal setting with a rhombohedral symmetry (space group: R-3 m) are $a = 0.302$ nm, $c = 2.64$ nm and a typical basal spacing for NO_3^- intercalate of 0.88 nm in agreement with the literature [60].

The diffractogram of the biohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH shows a typically amorphous structure. The formation of the layer structure is confirmed by the presence of the (0 1 2) and (1 1 0) diffraction lines. The enzyme influences the structure and the morphology of

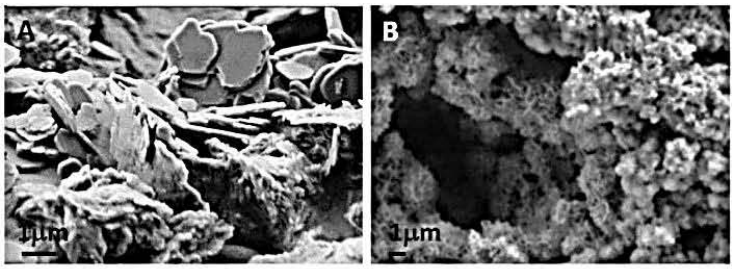


Fig. 4. SEM images of (A) Mg2Al LDH and (B) FSAwt@Mg2Al-LDH.

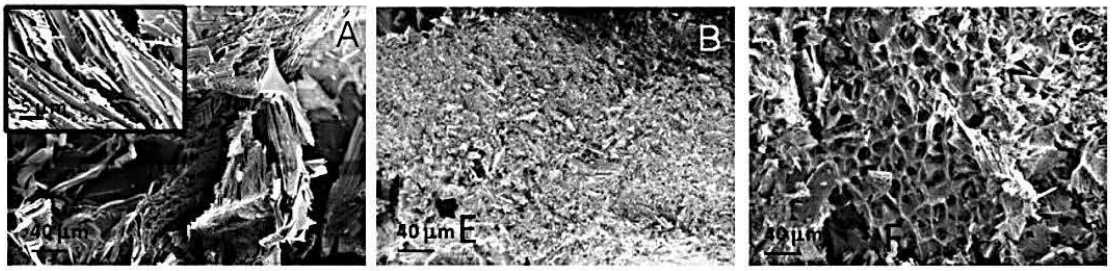


Fig. 5. SEM images of (A) ι-carr beads, (B) Mg2Al-LDH/ι-carr beads and (C) FSAwt@Mg2Al-LDH/ι-carr beads.

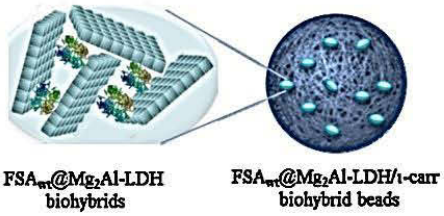


Fig. 6. Hierarchical assembly of FSAwt@Mg2Al-LDH/ι-carr bionanoreactor.

the inorganic matrix as nucleation and crystal growth occur at the surface of the enzyme, acting as nucleation centres.

The presence of high amounts of crystallized KCl salt in the beads, as shown on LDH/ι-carr beads and the FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH/ι-carr beads diffractograms, evidences the formation of closed pores.

Nanoplatelets of the Mg$_2$Al LDH phase are clearly observed on the scanning electron microscopic (SEM) images (Fig. 4A). The particles size distribution is rather large due to a face to face preferential aggregation tendency. In comparison, SEM image of the biohybrid FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH (Fig. 4B) reveals the strong influence of the enzyme on the modification of the LDH structure. The decrease of crystal sizes (200–400 nm basal plane) and shape anisotropy is caused by a crystal growth inhibition due to the enzyme surface.

After gelation, uniform spherical beads of diameter 2.6 mm (±0.2) were obtained. The beads conserved the same diameter after lyophilization. The ι-carr adopts a ruban like morphology with different density of aggregation (Fig. 5A). We notice domains of highly packed and dense ι-carr fiber aggregation which probably host closed pores retaining highly concentrated KCl solution, as confirmed by powder X-ray diffraction.

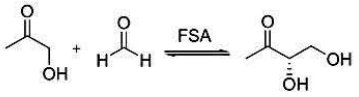
Incorporation of Mg$_2$Al-LDH in i-carr beads strongly modifies their morphology, (Fig. 5B), the size of the rubans and their self-agregation. This leads to an increase in size distribution where as the porosity of the FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH/ι-carr system (Fig. 5C) appears to be higher than for the Mg$_2$Al-LDH/ι-carr and the ι-carr systems. This result may explain why the retained activity was higher in the case of FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH/ι-carr beads when compared to the FSA$_{wt}$/ι-carr beads.

The roughness of the surface is increased when LDH or FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH was encapsulated and in both cases the nanoplatelets of the LDH or the FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH cannot be seen clearly in the carrageenan network.

Encapsulation of FSA$_{wt}$ in LDH occurs inside the mesopores formed by the aggregation of LDH nanoplatelets in a house of card morphology. This assembly favors the preservation of FSA$_{wt}$ structure. The hydroxylated surfaces of the Mg$_2$Al-LDH layers maintain a high rate of hydration in and out of the interlayer domains. This hydration environment insures the preservation of the enzyme stereochemical conformation. This smooth FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH assembly is confirmed by the infrared spectroscopy (supporting information). Indeed, the enzyme bands, appearing at 1660 and 1540 cm^{-1} characteristic of amide groups and at 2960 cm^{-1} characteristic of CH bond, do not show any significant change when the FSA$_{wt}$ is immobilized in one or both matrix.

The enlargement of the vibration bands of the M—OH, M—O and the O—M—O pointed respectively at 844, 668 and 446 cm^{-1} traduces the amorphization of the LDH structure and can be explained by the loss of the structural cohesion of the layers. When the LDH is immobilized in the ι-carr matrix, there is no enlargement of these peaks revealing the conserved structural cohesion of the Mg$_2$Al-LDH in the polymer matrix. The intensity of the vibration band of the nitrate group (at 1368 cm^{-1}) is reduced after immobilization due to the partial anion exchange by the enzyme. For the FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH, the presence of the enzyme is evidenced by the bands at 1660 and 1540 cm^{-1} characteristic of amide groups and at 2960 cm^{-1} characteristic of CH bond.

The carrageenan bands at 1240 cm^{-1} characteristic of OSO vibration, 840 cm^{-1} characteristic of the sulfate in axial position and 930 cm^{-1} characteristic of the 3,6-anhydrogalactose bridge, were not shifted neither after reticulation nor after encapsulation of different entities. This reveals that the biopolymer chains do not undergo strong modifications at the molecular scale, while anion exchange reactions by biopolymer sulfate at the surface of the LDH layers has been reported [56].



Scheme 1. FSAwt@Mg2Al-LDH/ι-carr beads mediated synthesis of L-1-deoxyerythrulose.

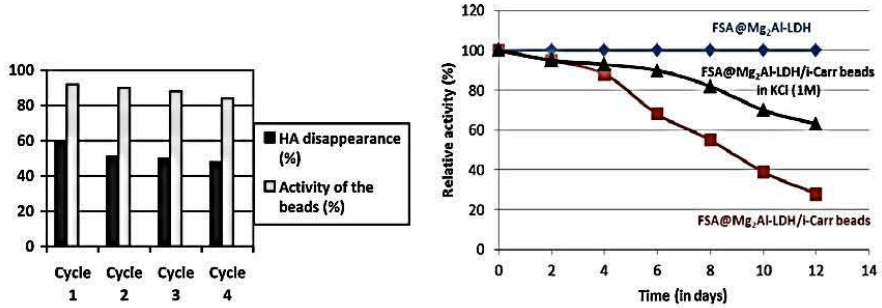


Fig. 7. Left: recyclability of the FSAwt@Mg2Al-LDH/ι-carr beads, 410 mg of beads (0.4 U) were used to perform aldolization between hydroxyacetone (0.12 mmol) and formaldehyde (0.2 mmol) in KCl (1 M), pH 8. Each run lasted 90 min. Right: stability of the FSAwt@LDH/ι-carr beads with or without KCl compared to the FSAwt@Mg2Al-LDH upon storage.

Clearly, the characterization of the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr bionanocomposite material, from the nanoscale to the microscale, evidences the embedding of FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH biohybrid nanomaterial in the ι-carrageenan beads (Fig. 6). The assembly of FSA_{wt} and Mg_2Al LDH nanoplatelets is built on favourable electrostatic interactions between the decameric FSA_{wt} and the LDH layers. The LDH nanoplatelets have been formed by inclusion of the large decameric FSA_{wt} enzyme ($10.5 \times 10.5 \times 6.5\ nm^3$), then creating mesoporosity and diffusion pathways inside this biohybrid nanomaterial. In parallel to their behaviour as host structure for FSA_{wt} LDH can be considered as crosslinker for ι-carr chains and reinforcing agent for ι-carr beads.

The thermal stability of the FSA_{wt}, the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH, the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads was studied by measuring the enzyme activity after one hour of heating at different temperatures (Fig. S3 in SI). Indeed, FSA_{wt} is known to be stable at 70 °C for 1 h [37]. As illustrated in Fig. S3, the two matrix had no real influence on this property, FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads giving approximately the same profile as the free enzyme. To note, the preservation of the structure of the Mg_2Al-LDH/ι-carr beads under such thermal conditions reveals the mechanical stability of this bionanocomposite.

3.4. Catalytic performances for aldol reaction

These studies were done using the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads which have been found more efficient than the FSA_{wt}/ι-carr beads. To prove their catalytic efficiency, the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads were used to perform an aldolization between hydroxyacetone (HA) as donor and formaldehyde as acceptor (Scheme 1). 1.2 mmol of HA, 0.6 mmol of formaldehyde and 0.4 U of beads (500 mg) were used. The product was isolated with a yield of 80% after 3 h.

The same reaction was used to test the recyclability of the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads but the conditions were changed, the reaction was carried in KCl 1 M with an excess of formaldehyde. The reaction was stopped after 90 min and the concentration of hydroxyacetone was measured by spectrophotometric assay. After each cycle, the beads were filtrated, washed, and reused in the same reaction. A sample of the beads was assayed after each cycle. The results are shown in Fig. 7.

As illustrated in Fig. 7, the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads transforms 60% of the hydroxyacetone in the first cycle, and about 50% in the second, the third and the fourth cycle. Simultaneously, the activity after each cycle was measured and shows a slight decrease after four cycles. Thus, the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads can be used four times without a notable loss of activity. It is important to mention that the activity of the biohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH was fully recyclable. The presence of the KCl may avoid the disintegration of the beads, previously described in the literature [61]. Similar experiments performed in water have led to rapid decrease of the activity.

To study the leakage of the enzyme, the FSA_{wt}/ι-carr and the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads were stirred in water for 48 h. Then, the activity of the supernatant was assayed and the concentration of protein in the supernatant was determined using Bradford kit. No leakage of the enzyme or the biohybrid was observed under these conditions.

The activity of the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH and the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads (with or without KCl) measured regularly under the same storage conditions is shown in Fig. 7 (right). As illustrated, the activity of the FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH was constant for 12 days. The activity of the beads decreased progressively to reach 28% of their initial activity for the beads after 12 days. Indeed, one of the problems when using natural polymer is the disintegration of the carrier within a short period [61]. However, the activity of the beads kept in KCl 1 M solution decreases more slowly than the beads without KCl, to reach 60% after 12 days, which means that the ι-carr beads are stabilised in the presence of KCl.

4. Conclusion

In this study the encapsulation of FSA_{wt} and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH in a polysaccharide matrix was investigated. Compared to the system where the free enzyme was encapsulated in biopolymer, the presence of Mg_2Al-LDH has increased the loading and the activity of the catalyst. Indeed, the nanostructuration of the enzyme in the LDH provides surface and anion exchange properties very favourable to the efficient immobilization of enzymes. In addition, the macrostructuration of the biohybrid FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH in a polysaccharide matrix facilitates the separation of the catalyst and partially preserves the structure and biological properties of the enzyme compared to FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH biohybrid. Gain of recy-

clability was obtained when operating in 1 M KCl solution which allowed the conservation of the structural cohesion of the beads without enzyme inhibition.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Auvergne region and ERDF (European Regional Development Fund, RM fellowship).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.07.014.

References

[1] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Biotechnology 3 (2013) 1–9.
[2] R.A. Sheldon, Adv. Synth. Catal. 349 (2007) 1289–1307.
[3] A. Ostafin, K. Landfester (Eds.), Nanoreactor Engineering for Life Sciences and Medicine, first ed., Artech House, Boston, MA, 2008.
[4] S.Y. Lee, J. Lee, J.H. Chang, J.H. Lee, BMB Rep. 44 (2011) 77–86.
[5] I.K. Deshapriya, C.V. Kumar, Langmuir 29 (2013) 14001–14016.
[6] H.H.P. Yiu, P.A. Wright, J. Mater. Chem. 15 (2005) 3690–3700.
[7] J.T.W. Yong-Jin Han, J. Mol. Catal. B Enzym. 17 (2002) 1–8.
[8] C.V. Kumar, A. Chaudhari, Microporous Mesoporous Mater. 57 (2003) 181–190.
[9] K.M.R. Kallury, W.E. Lee, M. Thompson, Anal. Chem. 65 (1993) 2459–2467.
[10] C. Forano, U. Costantino, V. Prévot, C. Taviot-Gueho, in: F. Bergaya, G. Lagaly (Eds.), Handb. Clay Sci., Elsevier Amsterdam, The Netherlands, 2013, pp. 745–782.
[11] P. Nalawade, B., Aware, V. J. Kadam, R. S. Hirlekar, 68 (2009) 267-272.
[12] K. Benaissi, V. Hélaine, V. Prévot, C. Forano, L. Hecquet, Adv. Synth. Catal. 353 (2011) 1497–1509.
[13] Z.M. Baccar, I. Hafaiedh, Int. J. Electrochem. 2011 (2011) 934893–934897.
[14] C. Córdova, D. Isidoro, R. Morales Borges, G.G.C. Arizaga, F. Wypych, N. Krieger, Quím. Nova 32 (2009) 1495–1499.
[15] S. Vial, C. Forano, D. Shan, C. Mousty, H. Barhoumi, C. Martelet, N. Jaffrezic, Mater. Sci. Eng. C 26 (2006) 387–393.
[16] S.T. Frey, S.L. Guilmet, R.G. Egan III, A. Bennett, S.R. Soltau, R.C. Holz, ACS Appl. Mater. Interfaces 2 (2010) 2828–2832.
[17] A.M. Stephen, G.O. Phillips (Eds.), Food Polysaccharides and Their Applications, second ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2006.
[18] E. Górecka, M. Jastrzębska, Biotechnol. Food Sci. 75 (2011) 65–86.
[19] M.I. González Siso, E. Lang, B. Carrenõ-Gómez, M. Becerra, F. Otero Espinar, J. Blanco Méndez, Process Biochem. 32 (1997) 211–216.
[20] G. Cavallaro, A. Gianguzza, G. Lazzara, S. Milioto, D. Piazzese, Appl. Clay Sci. 72 (2013) 132–137.
[21] F. Adzmi, S. Meon, M.H. Musa, N.A. Yusuf, J. Microencapsulation 29 (2012) 205–210.
[22] M.A.V.J. Herney-Ramirez, Appl. Catal. B Environ. (2010) 10–26.
[23] Y.W. Lin Liu, Chem. Eng. J. 187 (2012) 210–216.
[24] L.N.M. Ribeiro, A.C.S. Alcântara, M. Darder, P. Aranda, F.M. Araújo-Moreira, E. Ruiz-Hitzky, Int. J. Pharm. 463 (2014) 1–9.
[25] A.C.S. Alcântara, P. Aranda, M. Darder, E. Ruiz-Hitzky, J. Mater. Chem. 20 (2010) 9495–9504.
[26] M. Schürmann, G.A. Sprenger, J. Biol. Chem. 276 (2001) 11055–11061.
[27] S. Thorell, M. Schürmann, G.A. Sprenger, G. Schneider, J. Mol. Biol. 319 (2002) 161–171.
[28] A.K. Samland, G.A. Sprenger, Appl. Microbiol. Biotechnol. 71 (2006) 253–264.
[29] P. Clapés, W.-D. Fessner, G.A. Sprenger, A.K. Samland, Curr. Opin. Chem. Biol. 14 (2010) 154–167.
[30] S.M. Dean, W.A. Greenberg, C.-H. Wong, Adv. Synth. Catal. 349 (2007) 1308–1320.
[31] F. Camps Bres, C. Guérard-Hélaine, C. Fernandes, J.A. Castillo, M. Lemaire, Tetrahedron Asymmetry 24 (2013) 1075–1081.
[32] C. Guérard-Hélaine, M. Debacker, P. Clapés, A. Szekrenyi, V. Hélaine, M. Lemaire, Green Chem. 16 (2014) 1109–1113.
[33] C. Guérard-Hélaine, V. de Berardinis, M. Besnard-Gonnet, E. Darii, M. Debacker, A. Debard, C. Fernandes, V. Hélaine, A. Mariage, V. Pellouin, A. Perret, J.L. Petit, M. Sancelme, M. Lemaire, ChemcatChem (2015) (in press).
[34] C. Guérard-Hélaine, B. Légeret, C. Fernandes, V. Prévot, C. Forano, M. Lemaire, New J. Chem. 35 (2011) 776–779.
[35] C. Delattre, P. Michaud, R. Elboutachfaiti, B. Courtois, J. Courtois, Cellulose 13 (2006) 63–71.
[36] C. Delattre, L. Rios, C. Laroche, N.H.T. Le, D. Lecerf, L. Picton, J.Y. Berthon, P. Michaud, Int. J. Biol. Macromol. 45 (2009) 458–462.
[37] I. Sánchez-Moreno, L. Nauton, V. Théry, A. Pinet, J.-L. Petit, V. de Berardinis, A.K. Samland, C. Guérard-Hélaine, M. Lemaire, J. Mol. Catal. B Enzym. 84 (2012) 9–14.
[38] M.M. Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
[39] J.A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, M. Gutiérrez, X. Garrabou, M. Sancelme, M. Schürmann, T. Inoue, V. Hélaine, F. Charmantray, T. Gefflaut, L. Hecquet, J. Joglar, P. Clapés, G.A. Sprenger, M. Lemaire, Adv. Synth. Catal. 352 (2010) 1039–1046.
[40] A. Dashevsky, Int. J. Pharm. 161 (1998) 1–5.
[41] D.A. Wood, T.L. Whateley, J. Pharm. Pharmacol. 34 (1982) 552–557.
[42] R.T. Patil, T.J. Speaker, J. Microencapsulation 14 (1997) 469–474.
[43] R. Pommersheim, J. Schrezenmeir, W. Vogt, Macromol. Chem. Phys. 195 (1994) 1557–1567.
[44] S.S. Betigeri, S.H. Neau, Biomaterials 23 (2002) 3627–3636.
[45] S. Kurjatschij, M. Katzberg, M. Bertau, J. Mol. Catal. B Enzym. 103 (2014) 3–9.
[46] G.T. Grant, E.R. Morris, D.A. Rees, P.J.C. Smith, D. Thom, FEBS Lett. 32 (1973) 195–198.
[47] N.S. Anderson, J.W. Campbell, M.M. Harding, D.A. Rees, J.W.B. Samuel, J. Mol. Biol. 45 (1969) 85–97.
[55] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Adv. Colloid Interface Sci. 162 (2011) 87–106.
[56] M. Darder, M. López-Blanco, P. Aranda, F. Leroux, E. Ruiz-Hitzky, Chem. Mater. 17 (2005) 1969–1977.
[57] R. Mahajan, V.K. Gupta, J. Sharma, Indian J. Pharm. Sci. 72 (2010) 223–228.
[58] M.D. Busto, N. Ortega, M. Perez-Mateos, Process Biochem. 30 (1995) 421–426.
[59] P.D. Desai, A.M. Dave, S. Devi, J. Appl. Polym. Sci. 108 (2008) 2617–2622.
[60] F. Cavani, F. Trifirò, A. Vaccari, Catal. Today 11 (1991) 173–301.
[61] K.R. Jegannathan, E.-S. Chan, P. Ravindra, J. Mol. Catal. B Enzym. 58 (2009) 78–83.

Further reading

[48] E.R. Morris, D.A. Rees, G. Robinson, J. Mol. Biol. 138 (1980) 349–362.
[49] C. Viebke, L. Piculell, S. Nilsson, Macromolecules 27 (1994) 4160–4166.
[50] K. Bongaerts, H. Reynaers, F. Zanetti, S. Paoletti, Macromolecules 32 (1999) 683–689.
[51] S. Paoletti, O. Smidsrod, H. Grasdalen, Biopolymers 23 (1984) 1771–1794.
[52] C. Rochas, M. Rinaudo, Biopolymers 23 (1984) 735–745.
[53] O. Smidsrød, Carbohydr. Polym. 2 (1982) 270–272.
[54] O. Smidsrød, in: A. Varmavuori (Ed.), 27th Int. Congr. Pure Appl. Chem., New York, 1980, 2015, pp. 315–327.

Supporting information

Polysaccharide-layered double hydroxide-aldolase biohybrid beads for biocatalysed C-C bond formation

Rima Mahdi[a,b], Christine Guérard-Hélaine[a,b], Céline Laroche[c,d], Philippe Michaud[c,d], Vanessa Prévot[a,b], Claude Forano[a,b]* and Marielle Lemaire[a,b]*

[a] Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, ICCF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.
Fax: (+33)-4-7340-7717; email: claude.forano@univ-bpclermont.fr and marielle.lemaire@univ-bpclermont.fr

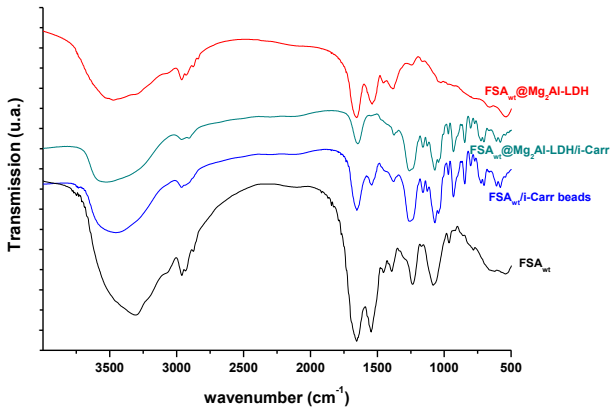
[b] CNRS, UMR 6296, ICCF, BP 80026, F-63171 Aubière, France.

[c] Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

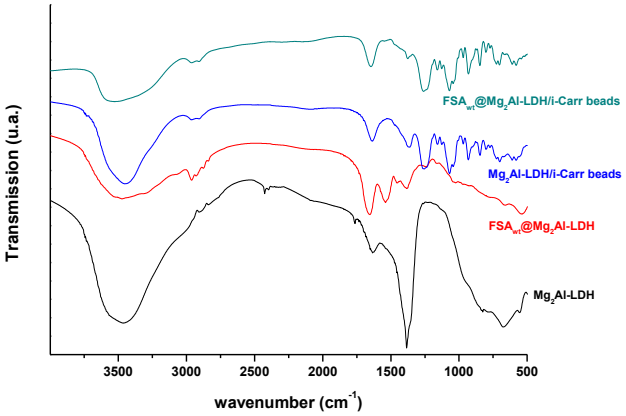
[d] CNRS, UMR 6602, IP, F-63171 Aubière, France

1-Infrared spectra

A-



B-



C-

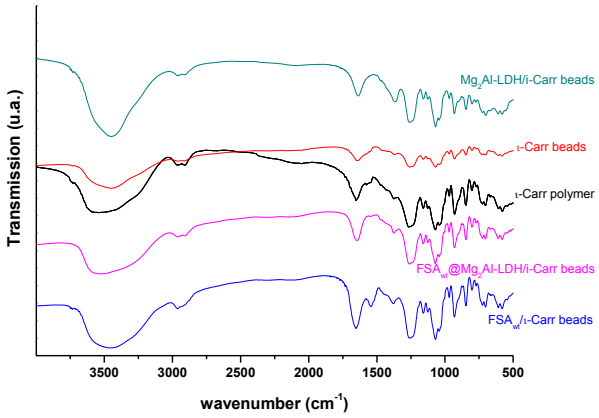
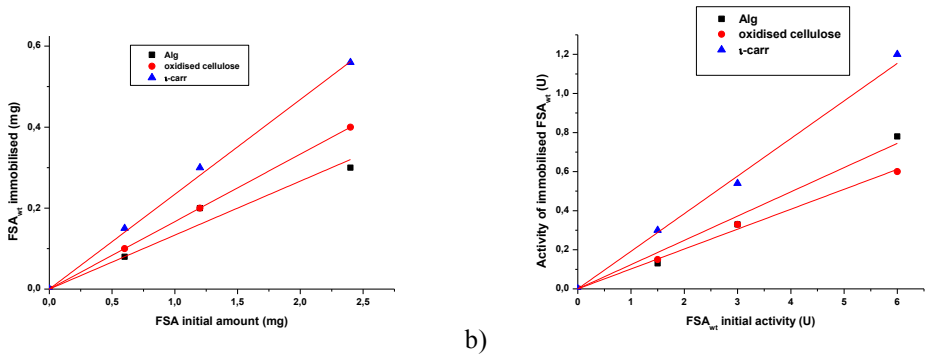


Fig. 1. Infrared spectra of different entities: A)FSA$_{wt}$, FSA$_{wt}$/ι-carr beads, FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH/ι-carr beads and FSA$_{wt}$/Mg$_2$Al-LDH. B) Mg$_2$Al-LDH, FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH, Mg$_2$Al-LDH/ι-carr beads and FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH/ι-carr beads. C) FSA$_{wt}$/ι-carr beads, FSA$_{wt}$@Mg$_2$Al-LDH/ι-carr beads, ι-carr polymer, ι-carr beads, Mg$_2$Al-LDH/ι-carr beads.



a) b)

Fig. 2. a) Evolution of FSA$_{wt}$ immobilised amount and b) activity of immobilised FSA$_{wt}$ vs FSA$_{wt}$ initial activity
in the different polysaccharides.

The slopes (α) of the curves follows the increasing series: α(oxidised cellulose) = 0.1 < α(alg) = 0.12 < α(ι-carr) = 0.19. We must notice that the sizes of different polysaccharide beads are similar (millimetric range). ι-Carr beads display a structure more favourable to a higher FSA_{wt} encapsulation rate compared with those obtained using alginate and oxidised cellulose rate (1.9, 1.2 and 1 respectively).

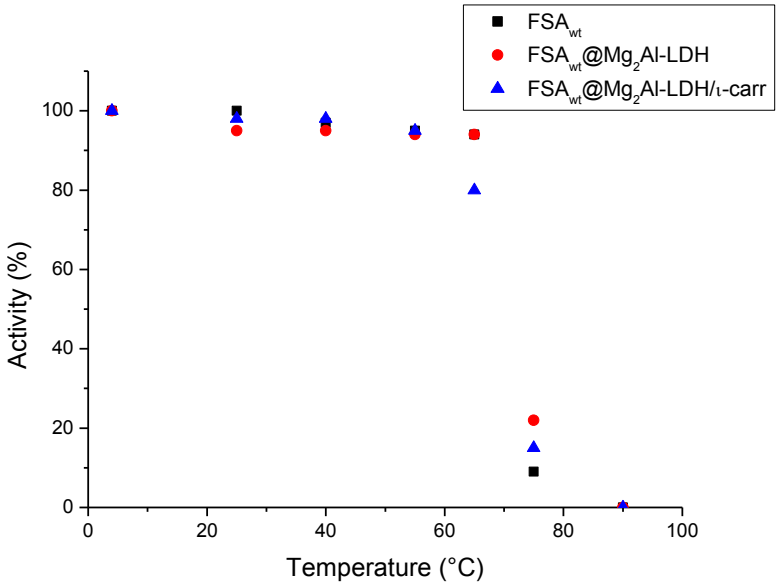


Fig. 3. Thermal stability of FSA_{wt}, FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH, and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads. 0.1 U of FSA_{wt} (0.035 mg), FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH (0.07 mg) and FSA_{wt}@Mg_2Al-LDH/ι-carr beads (100 mg) were incubated one hour at each temperature.

III.3.Elaboration de matrices poreuses HDL-polysaccharide

III.3.1. Introduction

Les polysaccharides forment dans l'eau des réseaux qui s'appellent hydrogels, c.-à-d. que les chaines se connectent entre elles via des nœuds, formant un réseau contenant de l'eau. Lorsque ces hydrogels sont lyophilisés, ils forment des mousses[265]. Nous avons alors essayé de préparer des matrices, sous forme de mousses poreuses de polysaccharides réticulés par les HDL, afin de les utiliser comme support pour immobiliser des enzymes. Quand on mélange l'HDL avec un hydrogel, il va y avoir une sorte de réticulation ionique entre les HDL de charge positive et le polysaccharide de charge négative (Figure III.8). En lyophilisant les mousses polysaccharide/HDL, nous espérons former une matrice insoluble qui pourrait servir à confiner des enzymes. Grâce à leurs caractéristiques contrôlables, leur faible coût ainsi que leur biocompatibilité, ce type de matrice parait attractif pour l'immobilisation des enzymes.

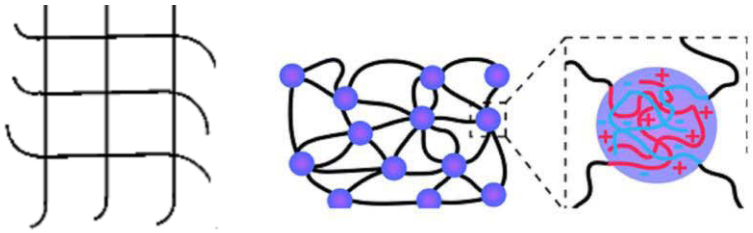
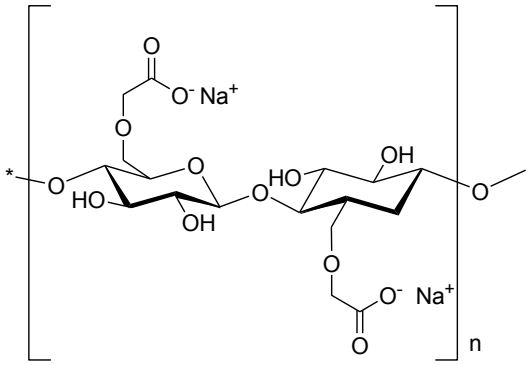


Figure III.8 : Modèle d'hydrogel (à gauche) ; Réticulation des chaines de polysaccharide par les HDL (à droite)

Les polysaccharides choisis pour cette étude sont le carboxyméthylcellulose (CMC) et le xanthane. Ces deux polysaccharides ont été sélectionnés en raison de leur capacité à former des mousses réticulées après lyophilisation de leurs solutions.

A/



B/

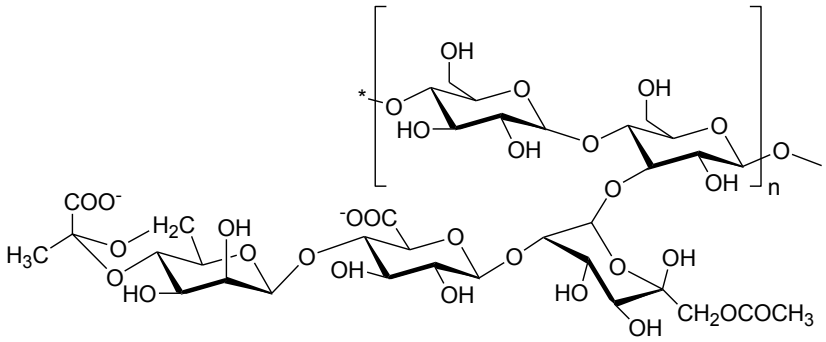


Figure III.9 : Structure du CMC (A) et du xanthane (B)

Le CMC est un polysaccharide synthétique constitué d'une chaine de β-D-glucose contenant des groupements carboxyméthyles liés à certains groupements hydroxyle (Figure III.9-A). Il est souvent sous forme de sel de sodium. Il est utilisé comme additif alimentaire puisqu'il permet de modifier la viscosité des solutions et de stabiliser les émulsions.

Le xanthane est un polyoside naturel ramifié de masse moléculaire élevée. Il est formé d'une combinaison de quatre monomères : le glucose, le mannose, l'acide glucuronique et l'acide pyruvique. La chaine principale est constituée de monomères D-glucose, liés entre eux par liaison glycosidique (β1-4). Cette chaine porte une ramificationtous les 2 glucoses (Figure III.9-B). Elle est constituée de trois sucres : l'α-D-mannose qui contient un groupe acétyle lié à la chaine principale par liaison osidique (1-3), l'acide β-D-glucuronique lié au premier mannose par liaison osidique (1-2) et le β-D-mannose lié à l'acide glucuronique par liaison osidique (1-4) qui peut être associé via une fonction acétal à un pyruvate en position 4 et 6. Il est soluble dans l'eau à froid et donne des solutions de forte viscosité. Il est utilisé comme additif alimentaire grâce à ses propriétés épaississantes et gélifiantes.

III.3.2. Matériels et méthodes

- Préparation de l'HDL : Une solution colloïdale d'HDL a été préparée par ajout d'une solution d'ammoniaque (6%) à une solution de sel (0.1 mol KNO_3, 0.12 mol $Mg(NO_3)_2.H_2O$, 0.06 mol $Al(NO_3)_2.9H_2O$) à une vitesse de 6 mL/min sous azote jusqu'à atteindre un pH de 9.5. Le précipité obtenu est laissé à vieillir pendant 1.5h. Après trois cycles de lavage/centrifugation, l'HDL sera chauffé à reflux dans l'eau à 80°C pendant 24h[266].
- Préparation des mousses de polysaccharides/HDL : Pour chaque polysaccharide, six échantillons ont été préparés en fixant le % du polysaccharide (CMC et xanthane) à 0.5% (masse/volume) qui est le pourcentage maximale de solubilisation dans l'eau et en faisant varier celui de l'HDL entre 0-0.25-0.5-1-2-5 % (masse/volume). Les solutions préparées sont agitées pendant 2h puis lyophilisées.

III.3.3. Résultats et discussions

III.3.3.1. Caractérisation de l'HDL

Les particules obtenues avaient une taille moyenne de 330 nm, mesuré par DLS (Dynamic Light Scattering). Le DRX de l'HDL Mg_2AlNO_3 obtenu (Figure III.10) montre une phase d'HDL bien cristalline. Les paramètres de la maille calculés sont a = 0.306 nm et c = 2.66 nm. La position des raies (003) et (006) permet de calculer une distance interlamellaire de 0.88 nm, caractéristique des ions NO_3^-.

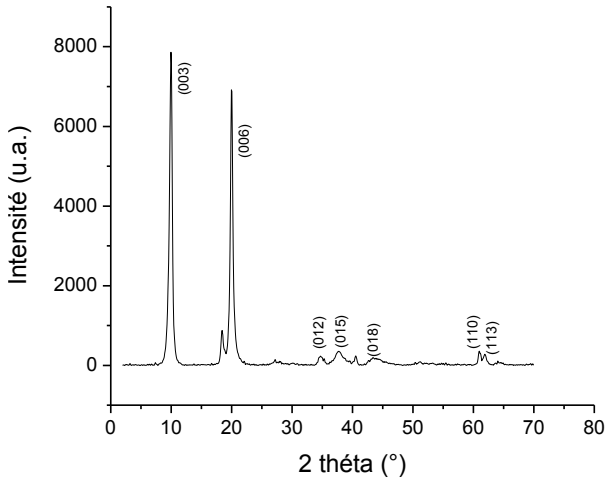


Figure III.10 : DRX de l'HDL préparé

Les images MEB de l'HDL préparé montrent des particules hexagonales de taille hétérogène, pouvant atteindre 200 nm (Figure III.11). Cette hétérogénéité est due aux conditions de synthèse.

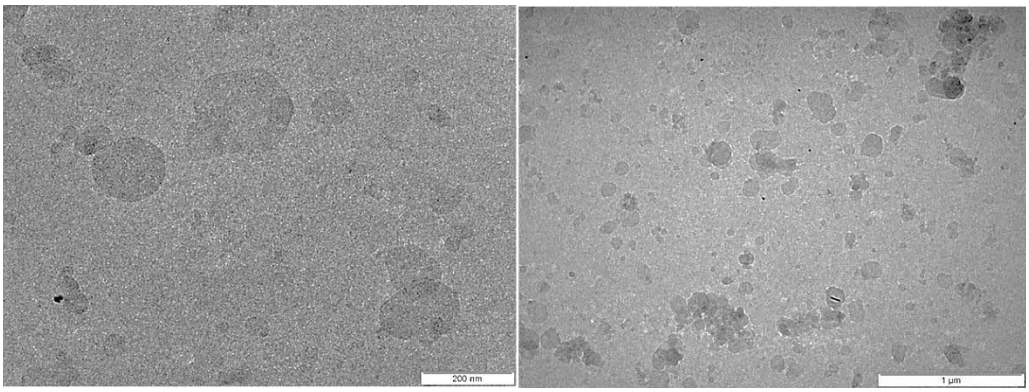


Figure III.11 : Clichés MEB de l'HDL préparé

III.3.3.2. Préparation des mousses HDL/Polysaccharide

Nous avons donc préparé six échantillons selon la description proposée précédement. Les photos des mousses obtenues sont présentées dans la Figure III.12.

Nous avons obtenu des mousses de textures différentes selon le % d'HDL utilisé. Au-delà de 5 % en HDL, nous avions des solutions hétérogènes. Les mousses lyophilisées correspondantes se sont effritées facilement.

Figure III.12: Photos des mousses obtenues

Les DRX des mousses de xanthane et du CMC ont été enregistrés et sont représentés dans les Figure III.13 et Figure III.14. La présence des pics caractéristiques de l'HDL confirme l'absence d'une modification de sa structure par le polysaccharide : le polysaccharide n'est pas intercalé durant le processus. Ces pics sont d'autant mieux définis avec l'augmentation du pourcentage de l'HDL dans le réseau polymérique.

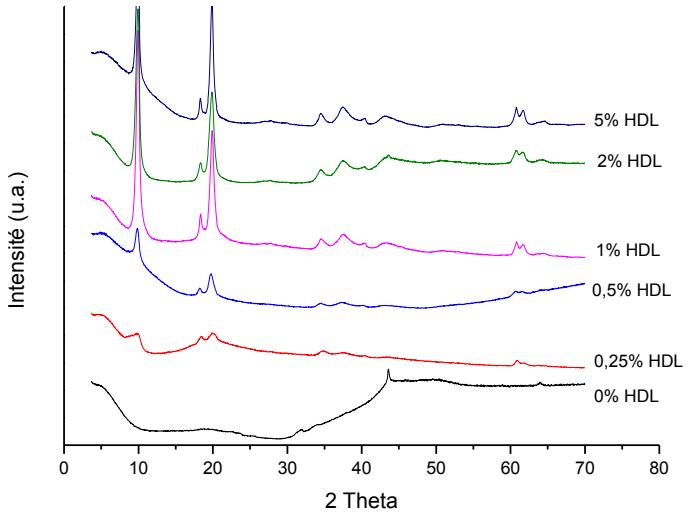


Figure III.13 : DRX des mousses à base de xanthane

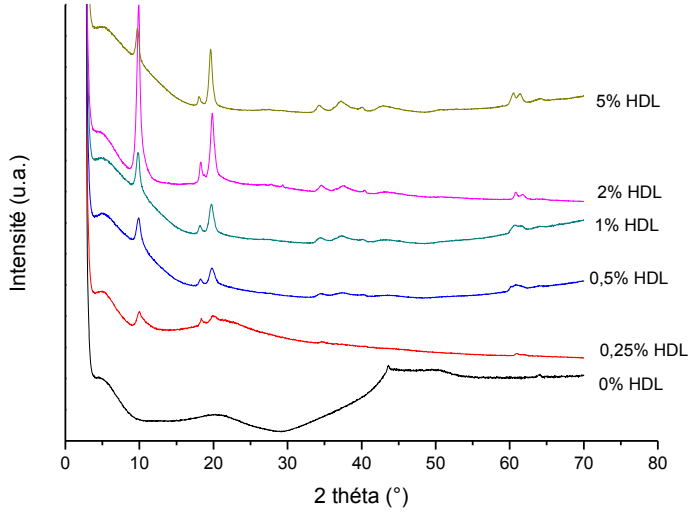


Figure III.14 : DRX des mousses à base de CMC

Les images MEB des mousses obtenues montrent des structures fortement poreuses, aussi bien pour le CMC (Figure III.15-A) que pour le xanthane (Figure III.15-C). Cependant, la présence de l'HDL (0.25% en solution) ne modifie pas cette structure dans le cas du CMC (Figure III.15Figure III.15-B). Dans le cas du xanthane, l'HDL modifie clairement la structure du polysaccharide et on observe la formation de feuillets de polysaccharide dans ce cas (Figure III.15-D).

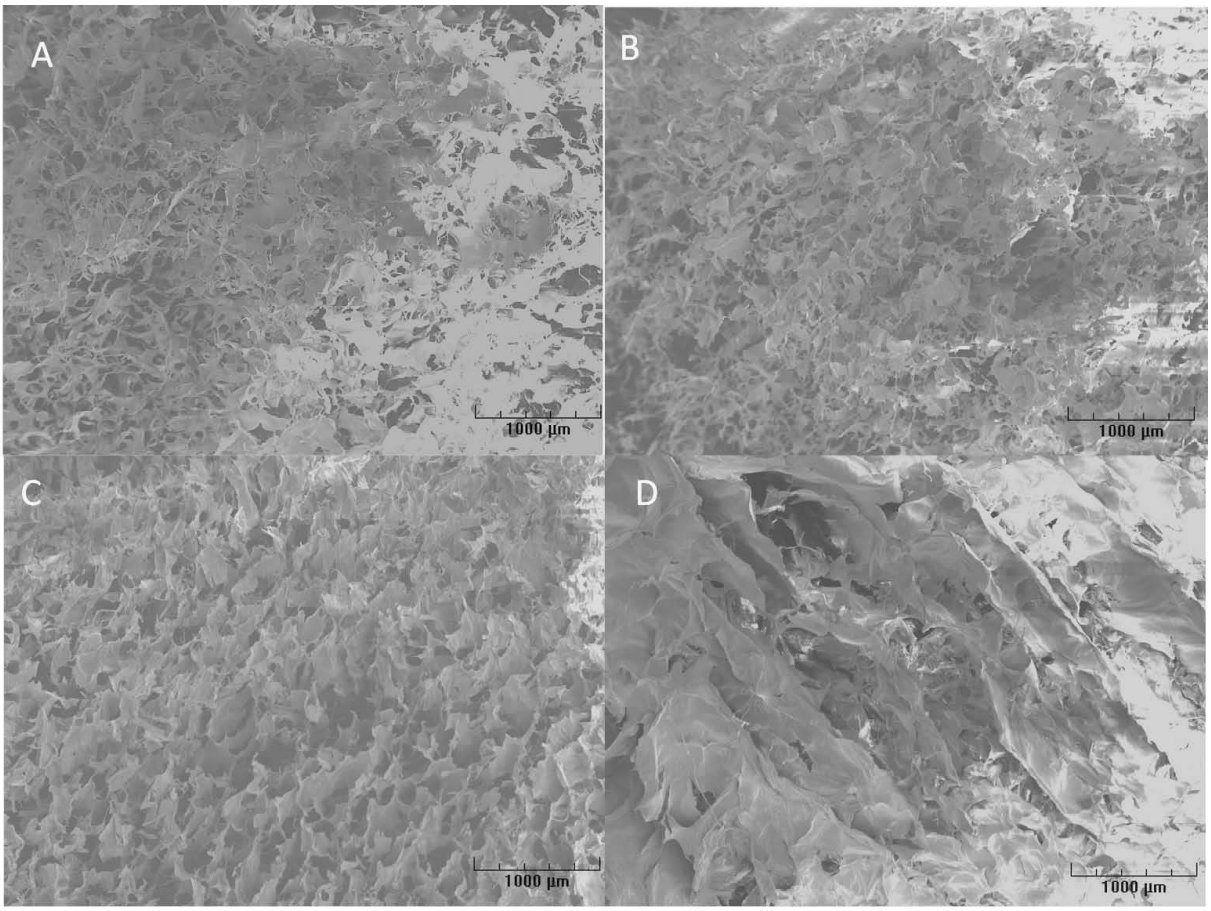


Figure III.15 : Clichés MEB des mousses A) CMC (0% HDL) B) CMC (0.25% HDL) C) xanthane (0% HDL) D) xanthane (0.25% HDL)

Nous avons ensuite testé la stabilité de ces mousses dans l'eau sous agitation. Nous avons trouvé qu'en immergeant les mousses lyophilisées, celles à base de CMC sont dissoutes en quelques minutes, celles à base de xanthane sont un peu plus résistantes, et sont dissoutes complètement en 3h.

La réticulation était un peu plus forte et la mousse plus résistante en diminuant le % en polysaccharide à 0.2% et en augmentant celui en HDL à 1.5%. Cependant, le résultat était toujours insatisfaisant pour des applications en biocatalyse.

Vu la faible stabilité de ce type de réticulation dans l'eau, les mousses obtenues ne peuvent pas être utilisées comme support d'une enzyme. Ce type de polysaccharide peut être réticulé par liaison covalente. Cependant, ces réticulations se font souvent dans des conditions qui sont incompatibles avec une préservation de l'activité enzymatique, par exemple la réticulation du CMC par l'épichlorydrine à pH basique (11-12)[267].

III.4. Conclusion

Pour la première fois, l'encapsulation de la FSA_{wt} et du biohybride $FSA_{wt}@Mg_2Al$-HDL dans une matrice de polysaccharides a été étudiée. La littérature présentée dans le chapitre 1 et en introduction de ce chapitre ci, montre que la quantité d'enzyme immobilisée est souvent basse, ce qui peut représenter un inconvénient quand on dispose d'une enzyme de faible activité spécifique, telle que la FSA_{wt}. En effet, on est alors confronté à une forme de dilution du catalyseur qui contraindrait à utiliser beaucoup de matériau pour arriver à catalyser efficacement une réaction. Nous avons cherché à immobiliser des quantités de FSA_{wt} du même ordre de grandeur que celles dans l'HDL. Malheureusement, le résultat est plus décevant dans les polysaccharides que dans le matériau inorganique. Les polyoses sont moins efficaces pour contenir l'enzyme. Par ailleurs, l'expérience sur le broyage des billes montre que l'enzyme est assez inaccessible dans l' ι -carraghénane. Les propriétés mécaniques ne sont pas très bonnes non plus et si l'idée de réaliser les synthèses dans du KCl a porté ses fruits, cela reste un inconvénient pour des applications en synthèse car cela complique la purification des produits. Ainsi le matériau inorganique reste le meilleur pour encapsuler l'aldolase seule.

L'association des deux méthodes d'immobilisation est intéressante puisqu'elle permet dans le principe de nanostructurer l'enzyme dans l'HDL, aux propriétés de surface et d'échange anionique très favorables à l'encapsulation des enzymes, puis de macrostructurer le biohybride $FSA_{wt}@Mg_2Al$-HDL dans une matrice de polysaccharides facilitant la séparation du biocatalyseur et préservant les propriétés structurales et biologiques de l'enzyme. Si on compare avec le système FSA@polysaccharide, l'utilisation de l'enzyme immobilisée au préalable dans l'HDL, a permis d'augmenter l'activité encapsulée. Nous pensons que cela peut être dû aux interactions électrostatiques favorables entre les chaines de polysaccharide et les feuillets d'HDL. C'est le résultat le plus remarquable de ce travail.

La caractérisation du bionanocomposite $FSA_{wt}@Mg_2Al$-HDL/ι-Carr, confirme l'encapsulation du biohybride $FSA_{wt}@Mg_2Al$-HDL dans les billes d'ι-carraghénane. La FSA_{wt} est associée préférentiellement aux feuillets d'HDL après l'encapsulation du biohybride $FSA_{wt}@Mg_2Al$-HDL dans les billes. L'HDL joue donc deux rôles importants : c'est une structure hôte de l'enzyme ainsi qu'un réticulant pour les chaines d'ι-carraghénane.

L'efficacité catalytique des billes $FSA_{wt}@Mg_2Al$-HDL/ι-Carr, a été démontrée en lançant une réaction d'aldolisation entre l'hydroxyacétone et le formaldéhyde. Le produit a été obtenu avec un rendement de 80%. De plus, un gain de recyclabilité a été trouvé en faisant la réaction dans du KCl 1M, qui contribue au maintien de la cohésion structurale des billes sans inhiber l'enzyme. L'enzyme immobilisée était réutilisable pour 4 cycles sans une perte significative d'activité.

L‘autre approche qui consistait à structurer d‘abord l‘HDL et le polysaccharide sous forme de mousse n‘a pas été concluante. Cette matrice est trop soluble dans l‘eau.

Chapitre IV : Conception de cascades enzymatiques pour la synthèse des sucres phosphorylés

IV.1. Introduction générale

Les sucres phosphorylés chiraux sont des métabolites importants qui interviennent principalement dans la voie des pentoses phosphates et le cycle de Calvin. Ils sont utilisés pour étudier diverses maladies métaboliques et plus généralement les voies métaboliques d'une cellule.[268]

Si les sucres naturels de série D sont les plus abondants, ceux de série L sont plus rares. Le concept de réactions en cascade enzymatique est bien adapté à la synthèse de sucres phosphorylés de série D ou L. Il permet d'isoler dans des conditions douces des composés de haute valeur ajoutée souvent fragiles et sensibles aux variations de pH. Pour ces raisons, plusieurs voies enzymatiques ont été élaborées *in vitro* pour synthétiser les sucres phosphorylés de série D[166,211,269] ou L[270,271].

Les deux principaux objectifs de ce chapitre sont :

- Préparer des bionanoréacteurs en immobilisant plusieurs enzymes dans les HDL afin de les utiliser pour synthétiser des composés phosphorylés d'intérêt (DHAP, D-F6P) par des réactions en cascade enzymatique.
- Concevoir une cascade enzymatique en solution afin de synthétiser des sucres phosphorylés de série L en partant de substrats achiraux. Une fois mise au point, nous chercherons à co-immobiliser les enzymes pour confiner cette cascade dans des HDL.

IV.2. Elaboration des bionanoréacteurs HDL/enzymes pour la synthèse des composés phosphorylés

IV.2.1. Introduction

Nous profitons de ce paragraphe pour apporter des compléments bibliographiques, notamment en ce qui concerne les trois autres enzymes qui ont été associées à la FSA_{A129S} dans une cascade. Il s'agit de la DHAK, de la PK et de la TPI.

Pour la synthèse de composés phosphorylés, une cascade enzymatique permet la minimisation de la concentration en intermédiaires instables, coûteux ou ayant des effets inhibiteurs. On peut ranger dans ces catégories-là, l'ADP et ATP, le G3P et le DHAP. Ce dernier est un substrat donneur très important pour la synthèse de sucres phosphorylés en position 1 catalysée par des aldolases DHAP-

dépendantes.[146,272] Comme elles sont très spécifiques du DHAP[273], leur usage nécessite au préalable le développement d'une synthèse efficace et économique de ce composé. Cependant, le DHAP a une cinétique de décomposition accélérée au-delà de pH 7 et génère des phosphates inorganiques et le 2-oxopropanal (méthylglyoxal), inhibiteurs d'aldolases. Le DHAP peut être préparé selon des voies chimiques, enzymatiques ou en combinant les deux[274]. Bien que les voies chimiques aient plusieurs inconvénients, rendement global bas, toxicité des réactifs ou catalyseurs, les voies enzymatiques nécessitent le contrôle des activités de plusieurs enzymes en même temps et peuvent souffrir de la formation de produits secondaires. Les deux voies nécessitent clairement des améliorations pour des applications potentielles à l'échelle industrielle.

Un autre avantage corrélé à la préparation du DHAP est l'accès relativement facile au D-G3P *in situ*. En effet, la TPI catalyse l'isomérisation du DHAP en D-G3P et même si l'équilibre de cette réaction est en faveur de la cétone, en associant une autre réaction consommant l'aldéhyde formé, cette dernière permet de déplacer l'ensemble du système. C'est basé sur ce concept que C. Guérard-Hélaine et al. ont développé une méthode de synthèse efficace de sucres phosphorylés en position terminale. Le D-G3P formé in situ à partir du DHAP est pris en charge par la FSA et en présence des différents donneurs connus de cette enzyme, on peut préparer 4 sucres différents.[166] Une étude bibliographique détaillée de ce travail est présentée dans le paragraphe suivant puisqu'il constitue le point de départ de la première partie de cette étude.

Ces 4 sucres phosphorylés préparés en solution aqueuse homogène à partir de la DHA en une cascade enzymatique *one-pot*/une ou deux étapes sont présentés dans le Schéma IV.1[166]. Dans une première étape, la DHA a été phosphorylée en DHAP par la DHAK en présence d'ATP, régénéré par le système PEP/PK. Cette méthode de synthèse du DHAP[211,275,276] a été choisie pour sa simplicité ainsi que pour les excellents rendements et pureté du produit obtenu. Par ailleurs dans un système multienzymatique, la grande spécificité des kinases est un avantage certain, cela permet d'éviter la phosphorylation d'autres substrats. Le système de régénération de l'ATP originellement décrit avec l'acétyl phosphate et l'AK,[275] a été remplacé par celui PEP/PK pour les raisons suivantes : le PEP accessible facilement par synthèse au laboratoire est plus stable que l'acétyl phosphate et la PK est moins coûteuse que l'AK. Le DHAP est isomérisé en D-G3P par la TPI. Par la suite, l'aldolisation entre le D-G3P et l'un des 4 substrats donneurs (DHA, HA, HB ou GA), catalysée par la FSA_{wt} ou FSA_{A129S} génère l'un des quatre sucres phosphorylés attendus.

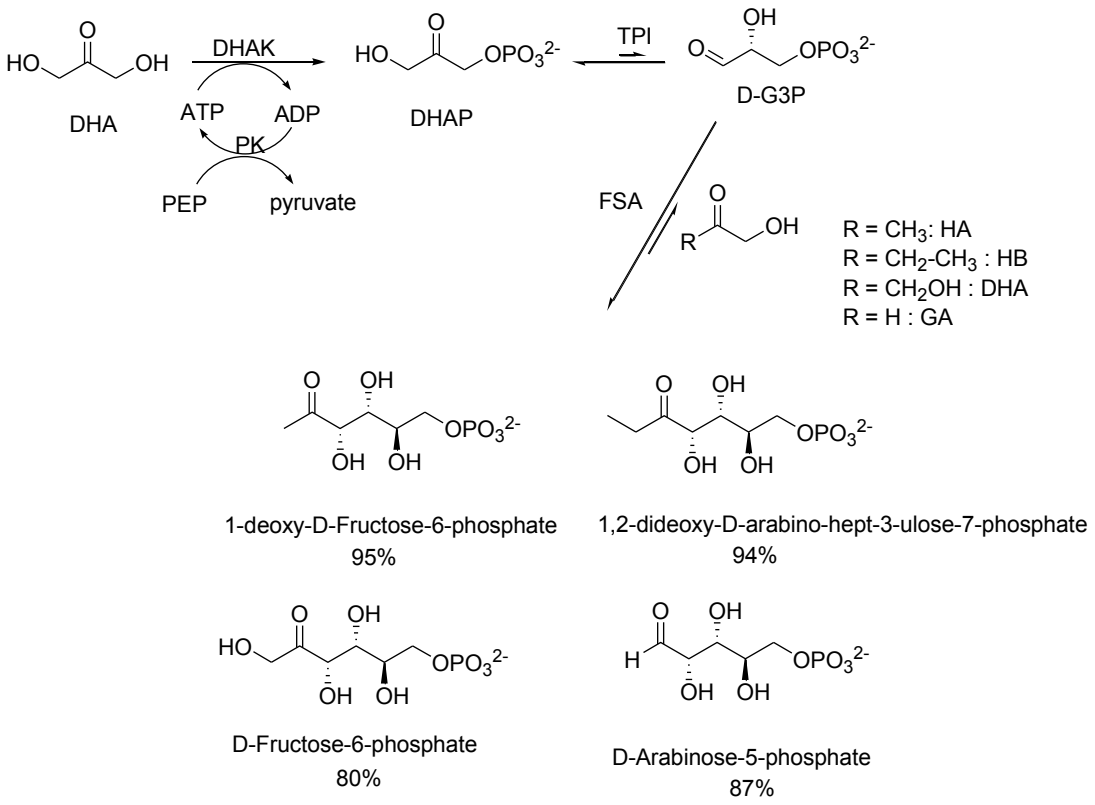


Schéma IV.1 : Cascade enzymatique pour la synthèse de sucres phosphorylés en position terminale[166]

En appliquant le meilleur rapport de 1.0/0.8/0.66 en DHA/PEP/ATP, le DHAP peut être synthétisé avec un rendement de 95%. Puis en ajoutant les substrats donneurs de la FSA, les auteurs ont pu synthétiser les quatre sucres phosphorylés : le 1-désoxy- D-fructose-6-phosphate, le 1,2-didésoxy-D-arabino-hept-3-ulose-7-phosphate, le D-F6P et le D-arabinose-5-phosphate. Les quantités d'enzymes utilisées étaient de 11, 13, 400 et 13 U pour la DHAK, la PK, la TPI et la FSA_{wt}, respectivement. Dans le cas de la DHA, le mutant FSA_{A129S} (50 U) a été utilisé grâce à son grande affinité pour ce substrat donneur.

En ajoutant trois équivalents du substrat donneur, un mélange de produit final et DHAP a été obtenu avec des proportions allant de 90/10 à 95/5 selon le substrat donneur utilisé. Ainsi, afin de déplacer l'équilibre complètement, 6 à 12 équivalents des différents substrats donneurs ont été nécessaires. Cela a permis d'isoler les phosphates souhaités par simple précipitation sans plus de purification.

On peut noter que la réaction était plus lente dans le cas de l'HB par rapport aux autres substrats donneurs, en effet c'est un moins bon donneur de la FSA_{wt}. Les sucres phosphorylés ont été obtenus avec de bons rendements compris entre 80 et 95%. Ils ont été isolés par précipitation sous forme de leur sel de barium.

Dans ce qui suit, une petite étude bibliographique des trois enzymes impliquées dans cette cascade (DHAK, PK et TPI) est proposée.

La DHAK

Les DHAK (E.C. 2.7.1.29) sont des enzymes qui jouent un rôle dans le catabolisme du glycérol ou dans l'assimilation du méthanol par les microorganismes méthylotrophes[277]. Elles sont la plupart du temps ATP-dépendantes mais certaines sont incluses dans un complexe hétéro-oligomérique appelé *phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system* (PTS). Les ATP-dépendantes échangent rapidement l'ATP/ADP dans leur site actif tandis que les PTS-dépendantes associent irréversiblement l'ADP dans une des unités du complexe enzymatique. Ainsi, pour ces dernières c'est le PEP qui permet l'apport du groupe phosphate. Cela fonctionne comme une sorte de système intégré de régénération de l'ATP.[278]. Plusieurs DHAK ATP-dépendantes sont connues comme celle de *Klebsellia pneumoniae*[279] et celle de *Citrobacter freundii*[280] mais seule cette dernière a été cristallisée.[281]

La DHAK issue de *Citrobacter freundii,* surexprimée dans *E. coli*, a été utilisée en synthèse par Sanchez-Moreno[275] et al. en 2004. Elle est formée d'un homodimère de 120 kDa[280]. Chaque monomère est formé de deux sous-unités de 39 et de 21 KDa (Figure IV.1). En plus de l'ATP, elle utilise des métaux divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} comme co-facteurs. Quatre sites de liaison de Mg^{2+} ont été identifiés par molécule d'enzyme. Ses propriétés cinétiques ont été déterminées (voir Tableau IV.1) et son mécanisme élucidé[275,282].

Cette enzyme est assez spécifique de la DHA, à ce jour n'est connu que le D-glycéraldéhyde comme autre substrat.[275,283,284] On sait par exemple qu'elle ne phosphoryle pas l'hydroxyacétone, la chlorohydroxyacétone et l'hydroxypyruvate.[282]

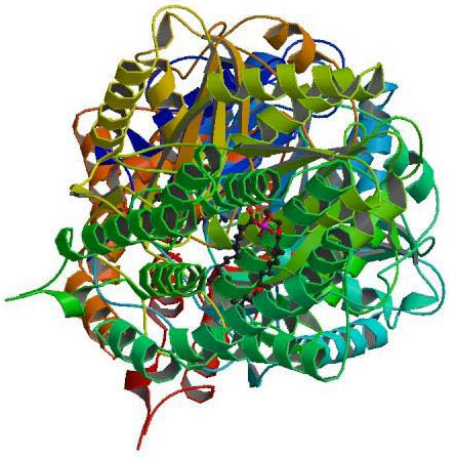


Figure IV.1 : Structure de la DHAK (*Source : PDB 1UN9*)

Les paramètres cinétiques de la DHAK de *citrobacter freundii* sont représentés ci-dessous (Tableau IV.1).[275] D'après les constantes de Michaelis-Menten et la valeur de K_{cat}/K_m, on peut conclure que cette enzyme a une plus grande affinité pour la DHA et une plus grande efficacité catalytique que d'autres DHAK décrites dans la littérature[285].

Tableau IV.1 : Paramètres cinétiques de la DHAK[275]

Substrat	K_m(mM)	V_{max}/µmol.min^{-1} (mg de protéine)$^{-1}$	$K_{cat}K_m^{-1}$ (mM^{-1}s^{-1})
DHA	0.86×10^{-3}	22	5.4×10^4
ATP	1.9	35	39.4
Mg^{2+}	1.7	38	47.4

Le pH optimum de cette enzyme est 7.5. Son point isoélectrique est estimé à 5.57[286]. La charge globale de l'enzyme sera donc négative à pH 8 et 9, valeurs de travail pour la formation des HDL (respectivement avec Zn^{2+} et Mg^{2+}). Nous pensons que ceci va favoriser son encapsulation dans les feuillets d'HDL chargés positivement. Il faut noter qu'à notre connaissance, l'immobilisation de la DHAK n'a encore jamais été décrite dans la littérature.

La PK

La PK (EC 2.7.1.40) est une enzyme qui intervient dans la glycolyse. Elle catalyse le transfert d'un groupe phosphate du PEP à l'ADP générant de l'ATP[287,288]. De ce fait, elle est utilisée en biocatalyse dans les réactions qui consomment de l'ATP afin de pouvoir le régénérer. Cette réaction est la dernière étape dans les voies de glycolyse, elle est irréversible dans les conditions physiologiques. La PK joue un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire, le pyruvate produit de la réaction est impliqué dans diverses voies métaboliques[289].

La PK est une enzyme dont l'activité est dépendante de la présence d'un métal divalent (Mg^{2+}), elle se présente souvent sous forme d'un homotétramère avec quatre sites de liaison pour le métal[290]. L'enzyme est aussi activée par d'autres métaux de transition divalents[291,292,293] comme Mn^{2+}, Ni^{2+} et Co^{2+}. La plupart des PK ont besoin aussi d'un métal monovalent le K^+ pour maintenir leur activité catalytique.[294]

Les deux PK que nous avons utilisés dans ce travail sont celle du muscle du lapin et de *Geobacillus stearothermophilus* (anciennement *Bacillus stea*.). Celle du muscle de lapin (source commerciale) est un homotétramère de poids de 237 KDa[295], chaque monomère faisant 57 KDa. Son pH optimum est de 7.5[296]. Son point isoélectrique donné par le fournisseur (Sigma-Aldrich) vaut 7.6. Cette enzyme catalyse aussi la phosphorylation du glycolate en utilisant l'ATP[297].

La PK de *Geobacillus stearothermophilus* a été purifiée en 1986[298] et cristallisée en 2005[299]. Son poids moléculaire vaut environ 250 KDa. Elle est formée de quatre sous-unités de 62-64 KDa chacune (Figure IV.2). Elle possède une séquence C-terminale supplémentaire composé de 110 acides aminés avec un motif de liaison pour le PEP[300]. Elle est stable à haute température et se conserve longtemps à basse température contrairement aux autres PK[298]. Son activité spécifique (333 U/mg à 30°C) est également supérieure comparée aux activités spécifiques des autres PK : par exemple celles

d'*E. coli* et du muscle du lapin ont une activité spécifique de 110 et de 240-280 U/mg à 25°C[298]. Son point isoélectrique estimé vaut 6,04[286].

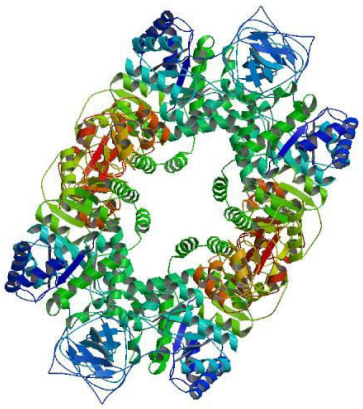


Figure IV.2 : Structure de la PK_{Gstea} (*Source PDB 2E28*)

L'ADP à forte concentration contribue à l'inhibition de l'enzyme, mais cette inhibition varie avec la concentration de Mg^{2+}. Ceci peut être expliqué par le fait que le substrat réel de l'enzyme est un complexe ADP-Mg^{2+} et que l'ADP libre est un inhibiteur potentiel[301]. L'ATP et les phosphates inorganiques ont été également rapportés comme inhibiteurs de l'activité de l'enzyme. Les phosphates inorganiques inhibent en diminuant l'affinité du PEP envers l'enzyme. L'ATP inhibe de la même façon, avec en plus une capacité à chélater les ions magnésium[298]. Les paramètres cinétiques des deux PK (Tableau IV.2) montrent la forte affinité des deux PK envers le PEP.

Tableau IV.2 : Paramètres cinétiques des pyruvate kinase utilisées dans cette étude[298,302,303]

Enzyme	Substrat	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$K_{cat}K_m^{-1}$ ($mM^{-1}s^{-1}$)
PK muscle du lapin[302]	Complexe ADP-Mg	0.379 ± 28	1287 ± 44	3395
	PEP	0.047 ± 6.8	963 ± 39	20489
PK_{Gstea}[304]	Complexe ADP-Mg	nd	nd	nd
	PEP	0.186 ± 0.03	3204 ± 74	17225

nd : non déterminé

Dans la littérature, on peut trouver quelques études d'immobilisation de la PK du muscle du lapin par liaison covalente. Ainsi par exemple, cette enzyme a été immobilisée sur un support de polyacrylamide (Akrilex C) contenant des groupements carboxyliques par des liaisons amides. Les auteurs ont pu immobiliser 26.9 mg prot/g de gel sec, ce qui a donné 190 U/g de gel sec (13.6% de rétention de l'activité initiale)[305].

L'immobilisation de la PK_{Gstea} n'a encore jamais été décrite dans la littérature.

La TPI

La TPI de *S. cerevisiae* (source commerciale, utilisée dans cette étude) est une enzyme de poids moléculaire de 53 KDa. Elle existe sous forme d'un dimère (Figure IV.3). Les acides aminés (Asn11, Lys13, His95 et Glu167) qui s'associent au substrat et catalysent la réaction sont localisés sur la même sous-unité, mais seul le dimère est actif[306]. Son pH optimum est à 7.0 sachant qu'elle est stable entre 7.0 et 8.5[307]. Son point isoélectrique est particulièrement élevé, il vaut 9.85.[308]

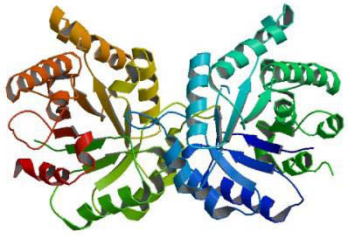


Figure IV.3 : Structure de la TPI (*Source PDB 1NEY*)

La TPI catalyse la réaction d'interconversion du D-G3P en DHAP. La réaction est réversible mais l'équilibre est déplacé en faveur du DHAP (rapport 20 : 1)[309]. Le K_m pour le D-G3P vaut 1.27 mM [307]. La valeur de K_{cat}/K_m vaut 10^9 $M^{-1}.s^{-1}$, révélant l'efficacité de cette enzyme. Cette enzyme ubiquitaire joue un rôle essentiel dans la glycolyse et la gluconéogenèse.[310]

En ce qui concerne l'immobilisation, on peut citer deux exemples. Dans le premier datant de 1975, la TPI du muscle de poule a été immobilisée, par couplage au sépharose (billes d'agarose) en utilisant le bromure de cyanogène (Br-CN) comme agent de couplage. Les auteurs ont montré que l'activité immobilisée augmente avec l'augmentation de la quantité de BrCN ajouté. Le matériau obtenu contenait 8 U/mL de gel.[311]

Dans le deuxième exemple datant de 1992, la TPI du muscle du porc a été immobilisé par liaison covalente sur des supports à base de silice activés par de la p-benzoquinone ou possédant des groupements aldéhydes ainsi que sur des billes de polyacrylamide possédant des groupements acide carboxylique ou activés par la p-benzoquinone. Le meilleur résultat est donné pour le support à base de silice activée par de la p-benzoquinone et où 67.4 U/mL de gel ont été immobilisées ce qui ne représente que 3.3% d'activité immobilisée. La résistance de l'enzyme vis-à-vis de l'urée (un agent dénaturant de l'enzyme) et du traitement thermique a été améliorée[312].

Les objectifs de notre travail sont :

- De réaliser un travail préliminaire d'immobilisation des enzymes prises séparément en faisant varier la composition de la matrice HDL.

- Préparer un bionanoréacteur bienzymatique, en co-immobilisant deux enzymes (PK et DHAK) dans les HDL, afin de l'utiliser pour la synthèse du DHAP.
- Tester l'efficacité catalytique du bionanoréacteur ainsi préparé, sa recyclabilité ainsi que son emploi avec une aldolase DHAP-dépendante libre, pour la synthèse des sucres phosphorylés.
- Préparer un bionanoréacteur, en co-immobilisant les quatre enzymes impliquées dans la synthèse du D-F6P et étudier son efficacité catalytique.

IV.2.2. Résultats

IV.2.2.1. Introduction

Les résultats de cette partie sont présentés sous forme d'une publication dont le titre est « Design of Artificial Metabolisms in Layered Nanomaterials for the Enzymatic Synthesis of Phosphorylated Sugars » paru dans la revue ChemCatChem en 2015, vol 7, pp 3110-315. Il s'agit d'un numéro spécial biocatalyse dédié à l'anniversaire des 60 ans de W.-D. Fessner, professeur de l'Université de Darmstadt en Allemagne, d'envergure internationale et pionnier dans l'utilisation des aldolases et des cascades multienzymatiques. L'originalité de cet article a aussi été reconnue par la proposition du comité éditorial de faire une page de couverture.

Dans ces travaux, j'ai participé :

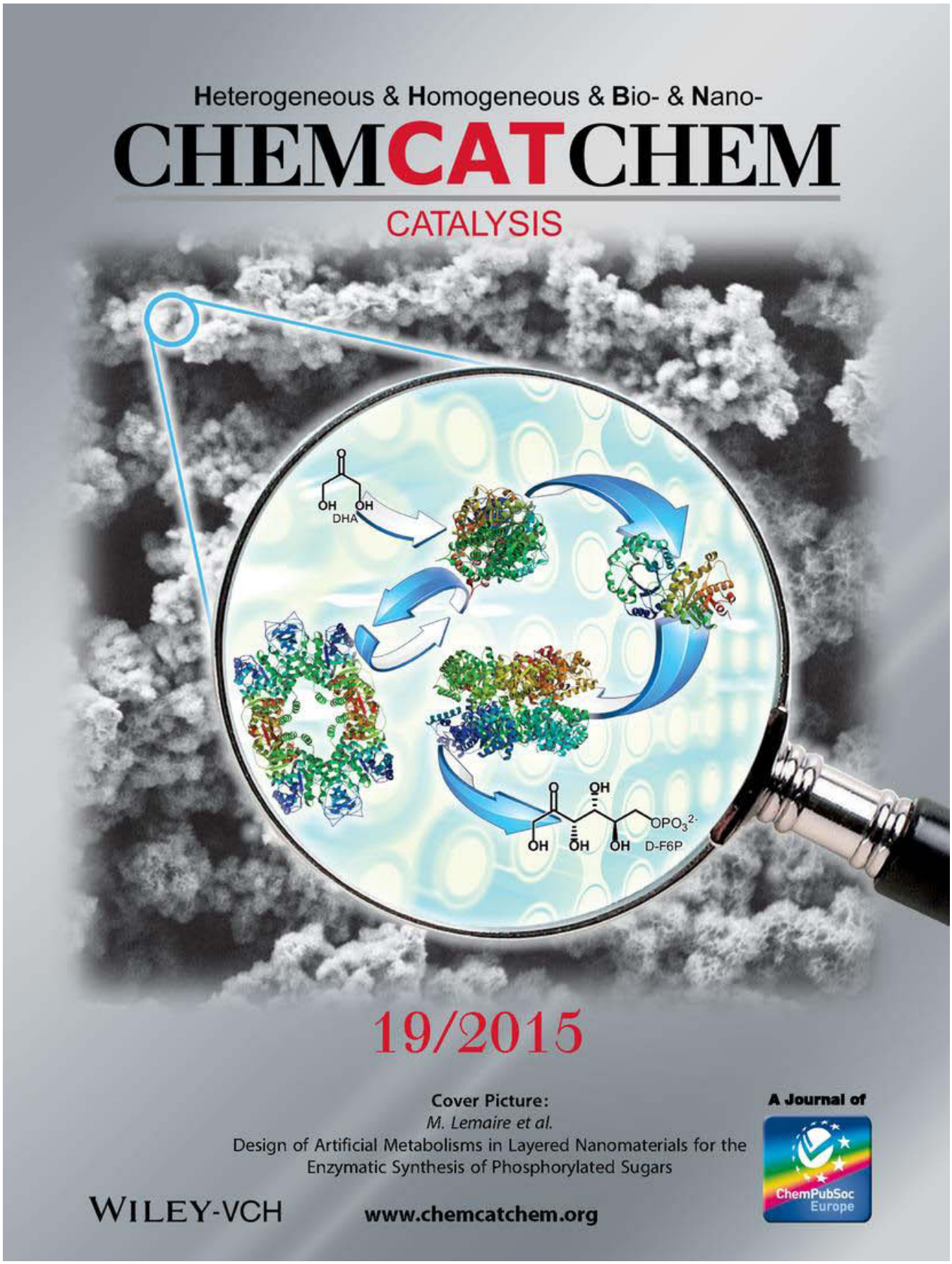
- à la réalisation des expériences en laboratoire ;
- à la caractérisation des matériaux et des produits de synthèses
- à l'interprétation des résultats
- à la rédaction de l'article.

Ces résultats ont été présentés également sous forme de :

- Poster dans le congrès **Biotrans 2015**' qui s'est déroulé à Vienne (Autriche) en juillet 2015 sous le titre « Artificial metabolisms in layered nanomaterials for the synthesis of phosphorylated sugars » (Présenté par M. Lemaire).
- Communication orale dans le congrès **International conference on Materials Chemistry**' qui s'est déroulé à York (UK) en juillet 2015 sous le titre « LDH based nanoreactors for enzymatic catalyzed cascade reactions» (Orateur : C. Forano)
- Communication orale dans le congrès **Euroclay 2015**' qui s'est déroulé à Edimbourg (UK) en juillet 2015 sous le titre « Nanostructured multienzymatic@LDH biohybrid as one-pot biocatalyst for polyalcohol synthesis » (Orateur : C. Forano)

- Communication orale dans le **13ème colloque du groupe français des argiles** qui s'est tenue à Clermont-Ferrand (France) en mai 2015 sous le titre « Conception de métabolismes artificiels dans les hydroxydes doubles lamellaires » (Oratrice : R. Mahdi). Le prix de la meilleure présentation orale a été attribué à cette communication.

IV.2.2.2. 'Design of Artificial Metabolisms in Layered Nanomaterials for the Enzymatic Synthesis of Phosphorylated Sugars' parue dans ChemCatChem


Heterogeneous & Homogeneous & Bio- & Nano-
CHEMCATCHEM
CATALYSIS
OH OH
DHA
OH
OH OH OH
OPO_3^{2-}
D-F6P
19/2015
Cover Picture:
M. Lemaire et al.
Design of Artificial Metabolisms in Layered Nanomaterials for the Enzymatic Synthesis of Phosphorylated Sugars
A Journal of
ChemPubSoc Europe
WILEY-VCH
www.chemcatchem.org

ChemPubSoc Europe
DOI: 10.1002/cctc.201500606
CHEMCATCHEM Communications

Design of Artificial Metabolisms in Layered Nanomaterials for the Enzymatic Synthesis of Phosphorylated Sugars

Rima Mahdi,[a, b] Christine Guérard-Hélaine,[a, b] Vanessa Prévot,[a, b] Véronique de Berardinis,[c, d, e] Claude Forano,*[a, b] and Marielle Lemaire*[a, b]

This manuscript is dedicated to Wolf-Dieter "Woody" Fessner on the occasion of his 60th birthday.

Biohybrid nanoreactors operating in one-pot cascade reactions were designed by co-immobilization of enzymes in an inorganic layered matrix, namely, layered double hydroxides. These biohybrid systems were devoted to prepare dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and phosphorylated sugars through stereoselective C–C bond formation. In the first system, two kinases were exploited for the in situ generation of DHAP. Increasing the complexity, the second nano-bioreactor combined up to four enzymes to lead to D-fructose-6-phosphate from the aldol-catalyzed addition of dihydroxyacetone to D-glyceraldehyde-3-phosphate generated in situ from DHAP. The biohybrid catalyst showed the same reaction rate as that of the free enzymes and was reusable.

Tandem and cascade reactions were highlighted by Trost et al. in 2008[1] as being of fundamental importance to develop greener syntheses. Biocatalysis takes a major place in this field, in particular enzymatic cascades, which create artificial pathways for the preparation of chiral or complex chemicals.[2] This emerging concept was recently termed "system biocatalysis" by Fessner.[3] Nature can be mimicked by designing artificial metabolic and non-natural biocatalytic pathways in vitro. In such multienzymatic systems, enzymes are brought together in the same reaction vessel, in which the product of one enzyme is the substrate of the other. The reaction parameters (e.g., pH, enzyme quantity, substrate concentration, cosolvent, temperature, etc.) are easier to control than in in vivo systems and can be adjusted to reach high yields and purities.[4–6] To approach natural systems for which the cooperating enzymes are organized in specific assemblies leading, in some cases, to a channeling effect, the artificial metabolic pathways can be immobilized following different strategies. They have been nicely reviewed by Schoffelen et al.[5] The strategies are classified in order of increasing control of the enzyme organization: random co-immobilization to a solid support (e.g., agarose,[7] chitin,[8] nylon,[8] polystyrene,[9] polyvinyl chloride[10]) or nanoparticles (e.g., gold nanoparticles,[11] sol–gel matrix[12]), sequential immobilization in microfluidic channels, positional immobilization on DNA nanostructures, site-specific enzyme immobilization, and finally scaffold-free cross-linking.

In this work, we aim to design cascade reactions for the enzymatic synthesis of phosphorylated sugars following the random co-immobilization of enzymes embedded in layered double hydroxide (LDH) nanoplatelets. Indeed LDHs, $M^{II}_{1-x}M^{III}_{x}(OH)_2X_{x/q}\cdot n\,H_2O$ (Supporting Information, Scheme S1), owing to their two-dimensional structure, physicochemical properties, and controllable nanoplatelet aggregation,[13] offer a suitable microenvironment that favors a high loading of enzymes, an increase in their stability, and preservation of their activity.[14] In the course of our work on green by design, efficient cascades for the enzymatic synthesis of terminally phosphorylated sugars as key metabolites were implemented. They were based on the in situ formation of chiral or achiral synthons[15,16] such as, for example, D-glyceraldehyde-3-phosphate (D-G3P) from dihydroxyacetone phosphate (DHAP)[17] (Scheme S2). The key enzymes fructose-6-phosphate aldolase wildtype (FSA_{wt}) from *Escherichia coli* and its variant (i.e., FSA_{A129S}) were involved in stereoselective C–C bond formation. The wild-type aldolase was efficiently immobilized in LDH,[18] and more recently, a bioreactor was elaborated by hierarchical assembly of FSA_{wt}, LDH nanoplatelets, and polysaccharide.[19] To build a complex cascade system and to reach the concept of an immobilized artificial metabolism, four different enzymes, two kinases [i.e., dihydroxyacetone kinase (DHAK) and pyruvate kinase PK_{Gsteg}], a triosephosphate isomerase (TPI), and fructose-6-phosphate aldolase (FSA_{A129S}) were immobilized. Such a LDH-based biohybrid was evaluated in particular to produce D-fructose-6-phosphate (D-F6P) by using dihydroxyacetone (DHA) as a donor substrate for the aldolase (Scheme 1). In addition, DHAP production will be studied inde-

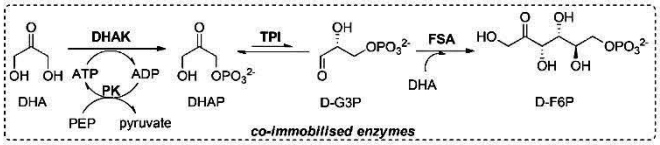
[a] R. Mahdi, Dr. C. Guérard-Hélaine, Dr. V. Prévot, Prof. C. Forano, Prof. M. Lemaire
Institut de Chimie de Clermont-Ferrand
Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal
BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand (France)
E-mail: marielle.lemaire@univ-bpclermont.fr
claude.forano@univ-bpclermont.fr
[b] R. Mahdi, Dr. C. Guérard-Hélaine, Dr. V. Prévot, Prof. C. Forano, Prof. M. Lemaire
CNRS, UMR 6296, ICCF
F-63177 Aubière (France)
[c] Dr. V. de Berardinis
CEA, DSV, IG, Genoscope
BP 91057 Evry (France)
[d] Dr. V. de Berardinis
CNRS, UMR 8030
91057 Evry (France)
[e] Dr. V. de Berardinis
Université d'Evry Val d'Essonne
BP 91057 Evry (France)

Supporting Information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/cctc.201500606.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

CHEMCATCHEM Communications



Scheme 1. Synthesis of D-F6P from DHA by using a four-enzyme bio-nanoreactor. AD(T)P = adenosine di(tri)phosphate; PEP = phosphoenolpyruvate.

pendently by the immobilization of two kinases and used with non-immobilized aldolases.

To promote enzyme co-immobilization, a direct LDH co-precipitation strategy was systematically followed consisting of metal salt precipitation in the presence of enzymes at an appropriate pH and under soft conditions (e.g., room temperature, water). Given that the physicochemical surface properties (e.g., charge density, acido-basicity) of LDHs strongly depend on the layer metal cations that impact the enzyme adsorption and activity,[20] three different compositions of the LDHs were considered: Mg_2Al-LDH, Zn_2Al-LDH, and MgZnAl-LDH. The four enzymes involved in the process were DHAK[21] (E.C. 2.7.1.29 from *Citrobacter freundii*), PK_{Gstea} (E.C. 2.7.1.40 from *Geobacillus stearothermophilus*), TPI (E.C. 5.3.1.1 from *Saccharomyces cerevisiae*), and the variant FSA_{A129S}[22] (E.C. 4.1.2 from *E. coli*). The enzyme/LDH ratios were fixed according to the specific activities of the enzymes and the results described for the non-immobilized system involved to prepare D-F6P.[17] The results obtained for the four enzymes are gathered in Table 1.

Preliminarily, two commercially available PK from rabbit muscle and from *G. stearothermophilus* (PK_{Gstea}) were tested, and it was revealed that PK_{Gstea} was the more stable enzyme, as 90% activity loss of PK from rabbit muscle was observed after immobilization. Owing to its high cost, the chosen PK_{Gstea} (Unitprot ID Q02499) was thus cloned, overexpressed in *E. coli* as N-terminal histidine (His)-tagged recombinant protein, and purified (see the Supporting Information). TPI was used as a commercial preparation, and DHAK and FSA_{A129S} were prepared as previously described.[21,22]

For the whole set of enzymes, the same conditions as those previously reported for FSA_{wt} immobilization were applied.[18]

Table 1. Results of immobilization of PK_{Gstea}, DHAK, TPI, and FSA_{A129S}.

Enzyme	Matrix	LDH/enzyme	Encapsulation efficiency [%]	Retained activity/immobilized theoretical activity [U]	Retained activity [%]
PK_{Gstea}	Mg_2Al	1:0.14	100	158/353	45±5
	Zn_2Al	1:0.14	100	187/369	51±5
	MgZnAl	1:0.14	100	194/360	54±5
DHAK	Mg_2Al	1:1	100	9.5/21	45±5
	Zn_2Al	1:1	100	9/20	45±5
	MgZnAl	1:1	100	10/20	50±5
TPI	Mg_2Al	1:0.005	100	540/1495	36±5
	Zn_2Al	1:0.005	100	1342/1470	90±5
	MgZnAl	1:0.005	100	1281/1480	87±5
FSA_{A129S}	Mg_2Al	1:1	100	183/200	92±5
	Zn_2Al	1:1	50	302/418	72±5
	MgZnAl	1:1	100	70/80	88±5

Up to 100% of the protein quantities (Bradford assay) were immobilized in the Mg_2Al, Zn_2Al, and MgZnAl LDH matrices, except in the case of FSA_{A129S} in Zn_2Al (50%). This demonstrates the exceptional ability of the LDH materials to encapsulate a large variety of enzymes in their structure. Unlike TPI, the most suitable LDH matrices were those containing Mg, for which FSA_{A129S} was totally immobilized with 90% retained activity. The Zn-based matrix gave lower immobilization rates with only 50% trapped protein but the activity was acceptably maintained at 72%. In this latter case, by taking into account the high loading of the enzyme (1:1), this selectivity may be explained by the surface charge of the enzyme relative to that of LDH, as the isoelectric point [iep(FSA_{A129S})] and pH_{pzc}(LDH) have almost identical values; the lower the value of Δ[iep(enzyme)−pH_{pzc}(LDH)] (Table S1), the lower the electrostatic interactions and the enzyme loading.

None of these enzymes were previously immobilized in inorganic matrix, and these results open the field for elaboration of a novel generation of biohybrid supported catalysts.

To comment on the retention of enzymatic activity, the LDH host structures offer a suitable microenvironment for the preservation of the biocatalytic performances. Indeed, between 36 and 92% of the activity of the free enzyme was kept. However, the chemical composition of the LDH matrix has a noticeable effect on the catalytic activity of the immobilized enzymes. Interestingly, with some enzymes, tuning the metal cation composition allows the amount of retained activity to be improved (Table 1). For both kinases (i.e., PK_{Gstea} and DHAK), a decrease in the activity by 50% was observed after immobilization, regardless of the M^{II} composition (Table 1, entries 1 and 2). If TPI was immobilized in Mg_2Al, the retained activity was only 36%. Interestingly, if Mg was diluted into the three metal cation layer MgZnAl a higher value of retained activity was measured (87%). Even better, very good results were obtained for immobilized TPI within the Zn-based LDH matrix with quantitative immobilization of the protein and a retained activity of 90% (Table 1, entry 3). Note that as a result of the very high specific activity of TPI (≈10000 U mg^{-1}), a very low amount of this enzyme was used for immobilization onto the LDH matrix (LDH/TPI = 1:0.005).

The storage stability at 4 °C of the different biohybrids (colloidal suspension) was investigated and compared to the stability of the free enzymes (Figure 1, see also Figure S1). Concerning FSA_{A129S}, TPI, and PK_{Gstea}, enhanced enzyme stability was observed once immobilized within LDH. The stabilizing effect is particularly highlighted. The most interesting results were obtained for immobilized PK_{Gstea}, which retained 95% of its activity after 1 month of storage, whereas free PK_{Gstea} lost 50% of its activity within the same timeframe. However, DHAK is a noteworthy exception because DHAK immobilization in LDH causes

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

CHEMCATCHEM Communications

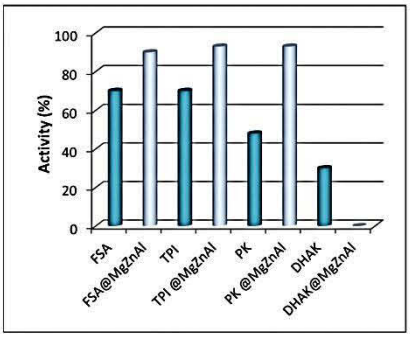


Figure 1. Storage stability at 4 °C of free enzymes (dark) and biohybrids (light) after 30 d except for DHAK (4 d). The conditions of storage for each enzyme were water, pH 7.5 for FSA_{A129S}; Tris buffer (15 mM), pH 7.5 for TPI; Tris buffer (15 mM), $MgCl_2$ (5 mM), KCl (5 mM), pH 7.5 for PK_{Gstea}; and Tris buffer (15 mM), $MgCl_2$ (5 mM), pH 7.5 for DHAK.

an increase in enzyme instability relative to that of the free enzyme (Figure S1). Free or immobilized, DHAK is unstable, and its instability increases upon immobilization. This instability could be due to the His tag or/and a negative allosteric effect of the Mg cation, as discussed recently by Wang et al.[23]

The activity was completely lost after 4 days, whereas the free enzyme retained 40% of its activity. To circumvent this disadvantage, we are looking for a more stable DHAK with a different His tag construction or found in the biodiversity.

The nanostructures of the enzyme@LDH biohybrid materials were investigated by powder X-ray diffraction and FTIR spectroscopy (see the Supporting Information). The diffractograms of the different biohybrids (Figure 2, see also Figure S2) show typically amorphous structures as a result of the preferential structuration of the LDH nanoplatelets around the enzyme, which act as nucleation promoters. However, it should be noted that the systematic presence of the (0 1 2) and (1 1 0) diffraction lines and the typical LDH lattice vibration bands, M–OH, M–O, and O–M–O at $\tilde{\nu}$ = 844, 668, and 446 cm^{-1}, respectively, confirm the formation of the LDH hexagonal layer structure (i.e., space group $R\bar{3}m$). As previously reported,[24] the layer stacking (or crystal growth in the *c* direction) is strongly limited by surface adsorption of the enzyme, as evidenced by the almost total absence of any 0 0 L diffraction lines, whereas the enzyme-free LDH phase prepared under the same conditions displays the 0 0 1 and 0 0 2 peaks characteristic of a 0.88 nm basal spacing. The amorphization of the layered structure caused by the presence of an enzyme was also confirmed by enlargement of the lattice vibration bands of the biohybrid materials relative to the bands of the nitrate-intercalated LDH reference materials.

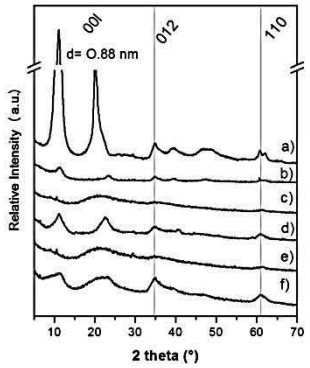


Figure 2. PXRD patterns of a) MgAlZn–NO_3 LDH, and MgAlZn prepared in the presence of b) TPI, c) DHAK, d) PK_{Gstea}, e) FSA_{A129S}, and f) the four enzymes TPI, DHAK, PK_{Gstea}, and FSA_{A129S}.

Enzyme immobilization was further evidenced for all biohybrids by FTIR spectroscopy (vibration bands of the amide group at $\tilde{\nu}$ = 1660 and 1540 cm^{-1} and the CH bond at $\tilde{\nu}$ = 2960 cm^{-1}). Notably, the decrease in the intensity of the $-NO_3$ valence band ($\tilde{\nu}$ = 1368 cm^{-1}) evidences partial anion exchange by the enzymes (Figure S3).

In the first part of this work, the two kinase enzymes were conjointly immobilized in a LDH bio-nanoreactor to produce DHAP from DHA by using DHAK; the pyruvate kinase/phosphoenolpyruvate (PK_{Gstea}/PEP) system allowed regeneration of the required ATP cofactor (Scheme 1).

To determine the efficiency of the biohybrids, DHAP synthesis was performed and compared to the same synthesis with the free enzyme by keeping the number of units of each enzyme constant (see the Supporting Information). The rate of DHAP formation by using co-immobilized enzymes (Figure 3, see also Figure S4 a, b) was the same as that with the free enzymes. To determine the recyclability of the system, three cycles were performed with the biohybrid (Figure S4 c, d). A high level of enzyme activity was kept over a few biocatalysis reaction cycles. Only after the third cycle did the PK_{Gstea} and DHAK activities fall to 75 and 30%, respectively, but the formation of DHAP was still ensured (Table S2). For the first time, two kinases were co-immobilized and used to produce a highly valuable phosphorylated synthon.

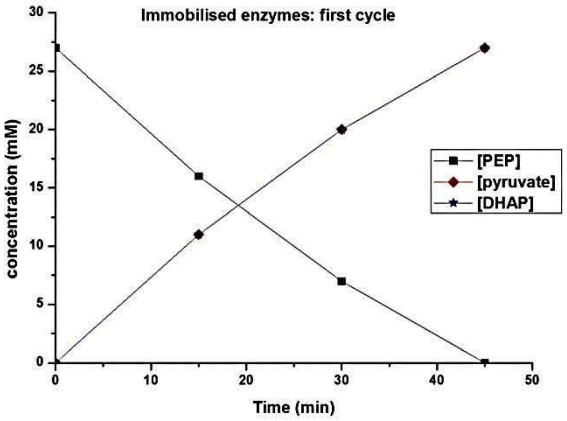


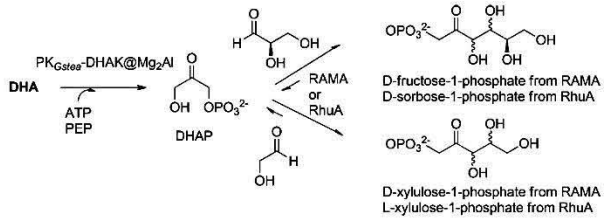
Figure 3. Rate of DHAP formation by using the PK_{Gstea}–DHAK@Mg_2Al nanobioreactor. Conditions: DHA (0.4 mmol), PEP (0.64 mmol), ATP (52 μmol), $MgCl_2$ (10 mM); pH adjusted to 7.5; DHAK (20 U) and PK_{Gstea} (20 U). Concentrations of PEP, pyruvate, and DHAP were followed by using a spectrophotometric assay.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

CHEMCATCHEM Communications

Given that DHAP is a key substrate for DHAP-dependent aldolases to prepare various 1-phosphorylated sugars,[17,25,26] the efficiency of the PK_{Gstea}–DHAK@Mg_2Al biohybrid was evaluated for four reactions by using commercially available rabbit muscle aldolase (RAMA, 3*S*,4*R* stereoselective) and rhamnulose aldolase (RhuA, 3*R*,4*S* stereoselective) produced and purified as already described.[27] These aldolases were used with two acceptors, glycolaldehyde and D-glyceraldehyde (Scheme 2, see also Scheme S3). The three matrices give similar results with the two kinases (encapsulation efficiency of 100% and immobilized activities of 50%; Table 1), and to limit DHAP isomerization into D-G3P, the co-immobilization was preferentially conducted in Mg_2Al–LDH to minimize TPI activity (36% of retained activity, see Table 1), often present as a contaminant enzyme. Indeed, TPI can afford D-G3P, which can react with DHAP in the presence of RAMA to produce D-fructose-1,6-bisphosphate as a byproduct. Under these conditions, RAMA provides D-xylulose-1-phosphate[28] and D-fructose-1-phosphate,[29] whereas RhuA leads to L-xylulose-1-phosphate[28] and D-sorbose-1-phosphate.[30] To completely shift the equilibrium to sugar formation, 2 equivalents of acceptor aldehydes was added and no more DHAP was detected. All the products were successfully purified by barium precipitation (see the Supporting Information), and yields of 75, 80, 79, and 78% were obtained for L-xylulose-1-phosphate, D-fructose-1-phosphate, D-sorbose-1-phosphate, and D-xylulose-1-phosphate, respectively.



Scheme 2. Enzymatic cascade reactions with the PK_{Gstea}–DHAK@Mg_2Al biohybrid for the preparation of phosphorylated sugars.

Encouraged by these very good results, we decided to design, in the second part of the work, a four-enzyme bionanoreactor involving PK_{Gstea}, DHAK, TPI, and FSA_{A129S} to synthesize D-F6P as a model reaction (Scheme 1). This sequence was performed in a one-pot cascade reaction. First, DHAP is formed by phosphorylation of DHA by using ATP-dependent DHAK. Then, isomerization of DHAP into D-G3P occurs under catalysis of TPI.[17] Finally, aldolization between DHA and D-G3P by using FSA_{A129S} shifts the equilibrium (Scheme 1) to the formation of D-F6P.

According to the results obtained for the individual enzyme immobilizations, the MgZnAl-LDH matrix was selected to prepare such a biohybrid, as it displayed higher enzyme loading and retained higher enzyme activity. Direct coprecipitation was performed in a medium containing a determined quantity of each enzyme, following the previous results obtained for the free enzyme system[17] and taking into account the observed loss in activity in the LDH. Typically, 45 mg of DHAK (182 U), 2.5 mg of FSA_{A129S} (13 U), 1 mg of PK_{Gstea} (92 U), and 0.1 mg of TPI (1638 U) were used, corresponding to an enzyme/LDH ratios of 1:1, 1:20, 1:50, and 1:500 for DHAK, FSA_{A129S}, PK_{Gstea}, and TPI, respectively. Note that owing to its instability, a larger amount of DHAK was involved in the biohybrid. As a result, 100% of the proteins were immobilized, and the retained activities were in the same order of magnitude as those obtained if the individually immobilized enzymes were considered: 50, 50, 90, and 92% for DHAK, PK_{Gstea}, TPI, and FSA_{A129S}, respectively. As observed for single enzymes, the XRD pattern of the biohybrid traduced the formation of an ill-defined LDH structure (Figure 2 f), which confirmed for the first time the possibility to extend such a strategy to multi-enzymatic LDH preparation. The efficiency of this bio-nanoreactor was compared with that of the free enzymes. The rate of D-F6P formation was the same as that if the immobilized system or the free enzyme were used (see the Supporting Information). Owing to the high quantity of DHAK, DHA phosphorylation was faster than the aldolization, as indicated by the higher rate of pyruvate formation relative to that of D-F6P. The D-F6P generated by the biohybrid was purified and isolated in 90% yield, as confirmed by NMR spectroscopy (see the Supporting Information).

The biohybrid was reusable over three cycles (Figure 4, see also Figure S5). After each cycle, the activity of DHAK diminished as showed in Table 2, whereas the activities of FSA_{A129S}, PK_{Gstea}, and TPI remained stable at approximately 85% over the three cycles. As a consequence, this decreased activity of DHAK led to increased reaction times from 60 min for the second cycle to 70 min for the third one. In this latter case, the rates of formation of DHAP and D-F6P were the same, and consequently, the determinant step was probably the formation of

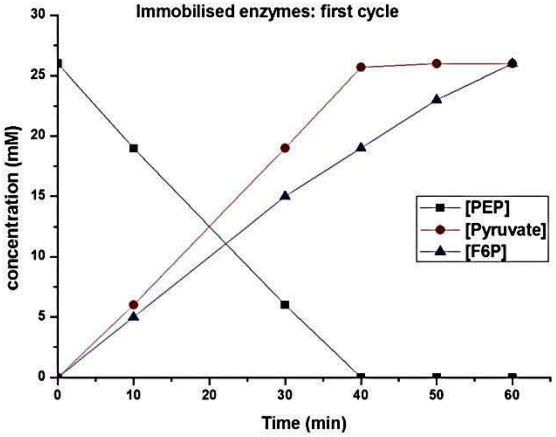


Figure 4. Rate of D-F6P formation by using the PK_{Gstea}–DHAK–TPI–FSA_{A129S}@MgZnAl biohybrid. Conditions: DHA (0.8 mmol, 2 equiv.), PEP (0.32 mmol), ATP (36 μmol), $MgCl_2$ (10 mM); pH adjusted to 7.5; DHAK (20 U), PK_{Gstea} (11 U), FSA_{A129S} (3 U), and TPI (288 U). The concentrations of pyruvate, D-F6P, and PEP were measured by spectrophotometric assays.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

CHEMCATCHEM Communications

Table 2. Retained activities after each cycle for the PK_{Gstea}–DHAK–TPI–FSA_{A129S}@MgZnAl biohybrid.

Cycle	FSA_{A129S} activity [%]	PK_{Gstea} activity [%]	DHAK activity [%]	TPI activity [%]
1	96	95	60	97
2	88	90	36	90
3	84	86	22	85

DHAP. Finally, for the same quantity of D-F6P formed, the immobilized system allowed the use of 3-fold less U of FSA and TPI and 1.5-fold less U of DHAK and PK.

Concerning the stability of each enzyme in the bio-nanoreactor, it was observed that if the four-enzyme bio-nanoreactor was conserved in Tris buffer (15 mM), $MgCl_2$ (5 mM), and KCl (5 mM), the activity of DHAK was lost in 4 days, whereas the activities of PK_{Gstea}, FSA_{A129S}, and TPI remained unchanged for 1 month (Figure 5).

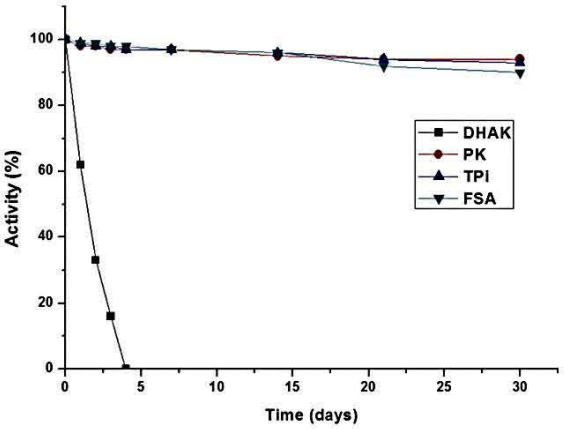


Figure 5. Storage stability of the four-enzyme biohybrid. The conditions of storage were Tris buffer (15 mM), $MgCl_2$ (5 mM), KCl (5 mM), pH 7.5.

In summary, we presented for the first time a study on multi-enzyme co-immobilization in layered double hydroxides (LDHs). A biohybrid system consisting of PK_{Gstea}—DHAK@Mg_2Al (PK_{Gstea} = pyruvate kinase, DHAK = dihydroxyacetone kinase) was first designed to synthesize dihydroxyacetone phosphate (DHAP). The same rate of DHAP formation was observed upon using the nano-biomaterial or the corresponding free enzymes; the biohybrid was reusable over three cycles. It was then employed to efficiently produce 1-phosphorylated sugars by adding a DHAP-dependent aldolase and an aldehyde acceptor to the reaction medium. Second, a four-enzyme system including an aldolase PK_{Gstea}–DHAK–TPI–FSA_{A129S}@MgZnAl (TPI = triosephosphate isomerase, FSA_{A129S} = fructose-6-phosphate aldolase) was designed to prepare D-fructose-6-phosphate (D-F6P) from dihydroxyacetone (DHA). The MgZnAl-LDH matrix showed 100% encapsulation efficiency and fair retained activities for the enzymes (≈50% for DHAK and PK_{Gstea}, 90% for FSA_{A129S} and TPI). D-F6P was obtained in 90% yield. This nano-biomaterial was reusable over three cycles and retained approximately 85% of the activities of PK_{Gstea}, FSA_{A129S}, and TPI and 22% of the activity of DHAK.

Experimental Section

Synthesis of DHAP

Co-immobilization of DHAK and PK_{Gstea} was realized as follows. Typically, a magnesium and aluminum nitrate salt solution (10.7 mL, $\Sigma[Mg^{2+}+Al^{3+}]=0.1$ M, Mg/Al = 2:1) was added to a reactor containing DHAK (325 U, 90 mg) and PK_{Gstea} (295 U, 2.8 mg) dissolved in Tris buffer (50 mM, pH 9.0, 15 mL). With stirring and under a nitrogen atmosphere, the pH was kept at 9.0 during the immobilization process, which was complete in 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles with deionized water. The biohybrid (160 mg) was obtained with 0.97 U DHAK (mg biohybrid)$^{-1}$ and 0.93 U PK_{Gstea} (mg biohybrid)$^{-1}$. The yield of the coprecipitation was 80%. The encapsulation efficiency was 100%, and the retained activities were 50% for DHAK and 48% for PK_{Gstea}. The biohybrid was conserved as a colloidal suspension in deionized water at 4 °C.

The synthesis of DHAP by using free or immobilized enzymes was realized as described previously with minor modifications.[17] DHA (0.4 mmol), phosphoenolpyruvate (PEP, 0.32 mmol), ATP (52 μmol), and $MgCl_2$ (10 mM) were mixed in the reaction medium. The free enzymes (20 U DHAK, 20 U PK_{Gstea}) or immobilized enzymes (20 U DHAK, 20 U PK_{Gstea} in 20.8 mg of biohybrid) were then added. The final volume was 12 mL. The reactions were followed by spectrophotometric assay of pyruvate, PEP, and DHAP and were completed within 45 min. The analytical yield of DHAP was 100%.

Synthesis of D-F6P

Co-immobilization of FSA_{A129S}, DHAK, PK_{Gstea}, and TPI was done as follows: a magnesium, zinc, and aluminum nitrate salt solution (4.7 mL, $\Sigma[Mg^{2+}+Zn^{2+}+Al^{3+}]=0.1$ M, Mg/Zn/Al = 1:1:1) was added into a reactor containing DHAK (182 U, 45 mg), PK_{Gstea} (92 U, 1 mg), TPI (1638 U, 0.1 mg), and FSA_{A129S} (13 U, 2.5 mg) dissolved in Tris buffer (50 mM, pH 9.0, 15 mL). With stirring and under a nitrogen atmosphere, the pH was kept at 9.0 during the immobilization process, which was complete in 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles with deionized water. The biohybrid (85 mg) was obtained with the following activities per mg of biohybrid: 0.14 U of FSA_{A129S}, 1.1 U of DHAK, 0.66 U of PK_{Gstea}, and 18 U of TPI. The yield of the coprecipitation was 85%. The encapsulation efficiency was 100%, and the retained activities were 50, 50, 90, and 92% for DHAK, PK_{Gstea}, TPI, and FSA_{A129S}, respectively. The biohybrid was conserved as a colloidal suspension in deionized water at 4 °C.

D-F6P was prepared by a one-pot cascade reaction by using free[17] or immobilized enzymes. Reaction mixtures were prepared with the following reagents: DHA (0.8 mmol, 2 equiv.), PEP (0.32 mmol), ATP (36 μmol), and $MgCl_2$ (10 mM). The free enzymes (20 U DHAK, 11 U PK_{Gstea}, 288 U TPI, and 3 U FSA_{A129S}) or immobilized enzymes (20 U DHAK, 11 U PK_{Gstea}, 288 U TPI, and 3 U FSA_{A129S} in 16 mg of biohybrid) were then added. The final volume was 12 mL. The reactions were followed by spectrophotometric assay of pyruvate, PEP, and D-F6P. D-F6P was isolated in 90% yield by using the co-immobilized enzymes.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

CHEMCATCHEM Communications

Acknowledgements

This work was financially supported by the Auvergne region (Conseil regional de la region Auvergne) and the European Regional Development Fund (ERDF) through a fellowship to R.M.

Keywords: domino reactions · enzymes · immobilization · nanomaterials · phosphorylated sugars

[1] C.-J. Li, B. M. Trost, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13197–13202.
[2] E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2239–2262.
[3] W.-D. Fessner, *New Biotechnol.* **2014**, DOI: 10.1016/j.nbt.2014.11.007.
[4] S. Schoffelen, J. C. M. van Hest, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1736–1746.
[5] S. Schoffelen, J. C. M. van Hest, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 613–621.
[6] I. Oroz-Guinea, E. García-Junceda, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 236–249.
[7] J. Rocha-Martín, B. de Las Rivas, R. Muñoz, J. M. Guisán, F. López-Gallego, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1279–1288.
[8] F. Vaillant, A. Millan, P. Millan, M. Dornier, M. Decloux, M. Reynes, *Process Biochem.* **2000**, *35*, 989–996.
[9] Y. Ge, Y. Wang, H. Zhou, S. Wang, Y. Tong, W. Li, *J. Biotechnol.* **1999**, *67*, 33–40.
[10] N. Chauhan, J. Narang, C. S. Pundir, *Indian J. Med. Res.* **2014**, *139*, 603–609.
[11] D. Zeng, W. Luo, J. Li, H. Liu, H. Ma, Q. Huang, C. Fan, *Analyst* **2012**, *137*, 4435–4439.
[12] A. Salinas-Castillo, I. Pastor, R. Mallavia, C. R. Mateo, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 1053–1056.
[13] C. Forano, U. Costantino, V. Prévot, C. Taviot-Gueho in *Handbook of Clay Science* (Eds.: F. Bergaya, G. Lagaly), Elsevier Amsterdam, The Netherlands, **2013**, pp. 745–782.
[14] V. Prévot, C. Mousty, C. Forano, *Adv. Chem. Res.* **2013**, *17*, 35–83.
[15] C. Guérard-Hélaine, M. Debacker, P. Clapés, A. Szekrenyi, V. Hélaine, M. Lemaire, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1109–1113.
[16] V. Hélaine, R. Mahdi, G. V. Sudhir Babu, V. de Berardinis, R. Wohlgemuth, M. Lemaire, C. Guérard-Hélaine, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1703–1708.
[17] I. Sánchez-Moreno, V. Hélaine, N. Poupard, F. Charmantray, B. Légeret, L. Hecquet, E. García-Junceda, R. Wohlgemuth, C. Guérard-Hélaine, M. Lemaire, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1725–1730.
[18] C. Guérard-Hélaine, B. Légeret, C. Fernandes, V. Prévot, C. Forano, M. Lemaire, *New J. Chem.* **2011**, *35*, 776–779.
[19] R. Mahdi, C. Guérard-Hélaine, C. Laroche, P. Michaud, V. Prevot, C. Forano, M. Lemaire, *J. Mol. Catal. B* **2015**, unpublished results.
[20] C. Mousty, O. Kaftan, V. Prevot, C. Forano, *Sens. Actuators B* **2008**, *133*, 442–448.
[21] I. Sánchez-Moreno, J. F. García-García, A. Bastida, E. García-Junceda, *Chem. Commun.* **2004**, *14*, 1634–1635.
[22] J. A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, M. Gutiérrez, X. Garrabou, M. Sancelme, M. Schürmann, T. Inoue, V. Hélaine, F. Charmantray, T. Gefflaut, et al., *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1039–1046.
[23] M. Wang, S.-W. Huang, D. Xu, W.-J. Bao, X.-H. Xia, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5831–5836.
[24] F. Cavani, F. Trifirò, A. Vaccari, *Catal. Today* **1991**, *11*, 173–301.
[25] I. Sánchez-Moreno, L. Iturrate, E. G. Doyagüez, J. A. Martínez, A. Fernández-Mayoralas, E. García-Junceda, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2967–2975.
[26] W.-D. Fessner, D. Heyl, M. Rale, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1596–1601.
[27] F. Camps Bres, C. Guérard-Hélaine, V. Hélaine, C. Fernandes, I. Sánchez-Moreno, M. Traikia, E. García-Junceda, M. Lemaire, *J. Mol. Catal. B* **2015**, *114*, 50–57.
[28] W.-D. Fessner, G. Sinerius, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 209–212; *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 217–220.
[29] M. D. Bednarski, E. S. Simon, N. Bischofberger, W. D. Fessner, M. J. Kim, W. Lees, T. Saito, H. Waldmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 627–635.
[30] W.-D. Fessner, G. Sinerius, A. Schneider, M. Dreyer, G. E. Schulz, J. Badia, J. Aguilar, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 555–558; *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 596–599.

Received: May 30, 2015
Revised: July 1, 2015
Published online on September 1, 2015

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Supporting information

Design of artificial metabolisms in layered nanomaterials for the enzymatic synthesis of phosphorylated sugars

Rima Mahdi,[a],[b] Christine Guérard-Hélaine,[a],[b] Vanessa Prévot,[a],[b] Véronique de Berardinis,[c],[d],[e] Claude Forano*[a],[b] and Marielle Lemaire*[a],[b]

[a] Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, ICCF, BP 10448 F-63000 Clermont-Ferrand, France. Fax: (+33)-4-7340-7717; email: marielle.lemaire@univ-bpclermont.fr; claude.forano@univ-bpclermont.fr
[b] CNRS, UMR 6296, ICCF, BP 80026, F-63171 Aubière, France.
[c] CEA, DSV, IG, Genoscope, BP 91057 Evry, France.
[d] CNRS, UMR8030, 91057 Evry, France.
[e] Université d'Evry Val d'Essonne, BP 91057 Evry, France.

1- Materials

Dihydroxyacetone (DHA), glycolaldehyde (GoA) were purchased from sigma-aldrich. D-glyceraldehyde, D-fructose-6-phosphate dipotassium salt (D-F6P), D,L-glyceraldehyde 3-phosphate diethyl acetal barium salt (D,L-G3P), β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced dipotassium salt (NADH) and β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate (NADP) were purchased from Sigma-Aldrich. Phosphoglucose isomerase (PGI), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), lactic acid dehydrogenase (LDH), α-glycerophosphate dehydrogenase (GPDH), triosephosphate isomerase (TPI) from *Saccharomyces cerevisiae*, rabbit muscle aldolase (RAMA) and pyruvate kinase (PK) from rabbit muscle were purchased from Sigma-Aldrich. Enzymes were produced as previously reported: glycerol dehydrogenase (GDH),[313] fructose-6-phosphate aldolase (FSA_{A129S}),[314] dihydroxyacetone kinase (DHAK),[166] rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhuA).[315]

$Mg(NO_3)_2.6H_2O$, $Zn(NO_3)_2.6H_2O$, $Al(NO_3)_3.9H_2O$, $MgCl_2$, KCl, NaOH were purchased from Aldrich chemicals. All aqueous salt solutions were prepared using deionised water.

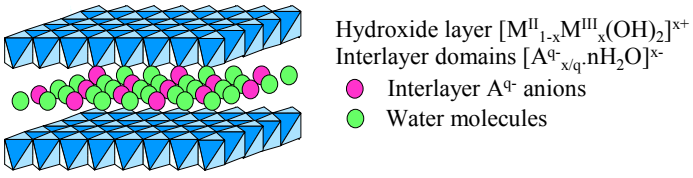
2- Methods

1- Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were measured in deuterated water (D_2O) on a Bruker AC-400 spectrometer, operating at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C. Residual solvent signals were used as internal reference. Chemical shifts (δ) are reported in ppm, coupling constant values (*J*) are given in hertz (Hz).

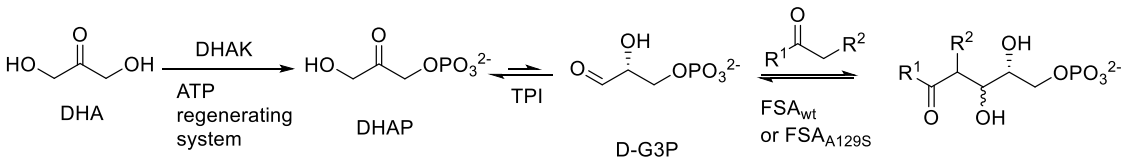
2- Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns were obtained on dried samples (40°C, 12h in an oven) with a Siemens D501 X-ray diffractometer using Cu Kα radiation (λ= 1.5415 A°) and fitted with a graphite back-end monochromator. The samples were scanned from 2° to 70° (2θ) using steps of 0.08° and a counting time of 48 s per step.

3- Infrared transmission spectra (FTIR) were recorded using the KBr pellet technique with a Nicolet 5700 spectrometer from Thermo Scientific. A total of 2 % (w/w) of sample, with respect to the potassium bromide was mixed with dry KBr. Each KBr disc was scanned over a wavenumber region of 400–4000 cm^{-1}. SEM characteristics of the samples were imaged by a JSM-7500F FESEM operating at 3 kV. Specimens were mounted on conductive carbon adhesive tabs.

3- Schemes and figures



Scheme S1. Structure of Layered Double Hydroxides



DHAK : Dihydroxyacetone kinase
TPI : Triosephosphate isomerase
FSA : Fructose-6-phosphate aldolase

Scheme S2. One-pot enzymatic synthesis of terminally phosphorylated sugars

Table S1. Surface charge properties related to pH value

LDH	Zn_2Al	MgZnAL	Mg_2Al	
pH_{pzc}	9,1	9.6	10,1	
Enzyme	DHAK	PK_{Gstea}	FSA_{A129S}	TPI
iep	5.57	6.04	8.1	9.85

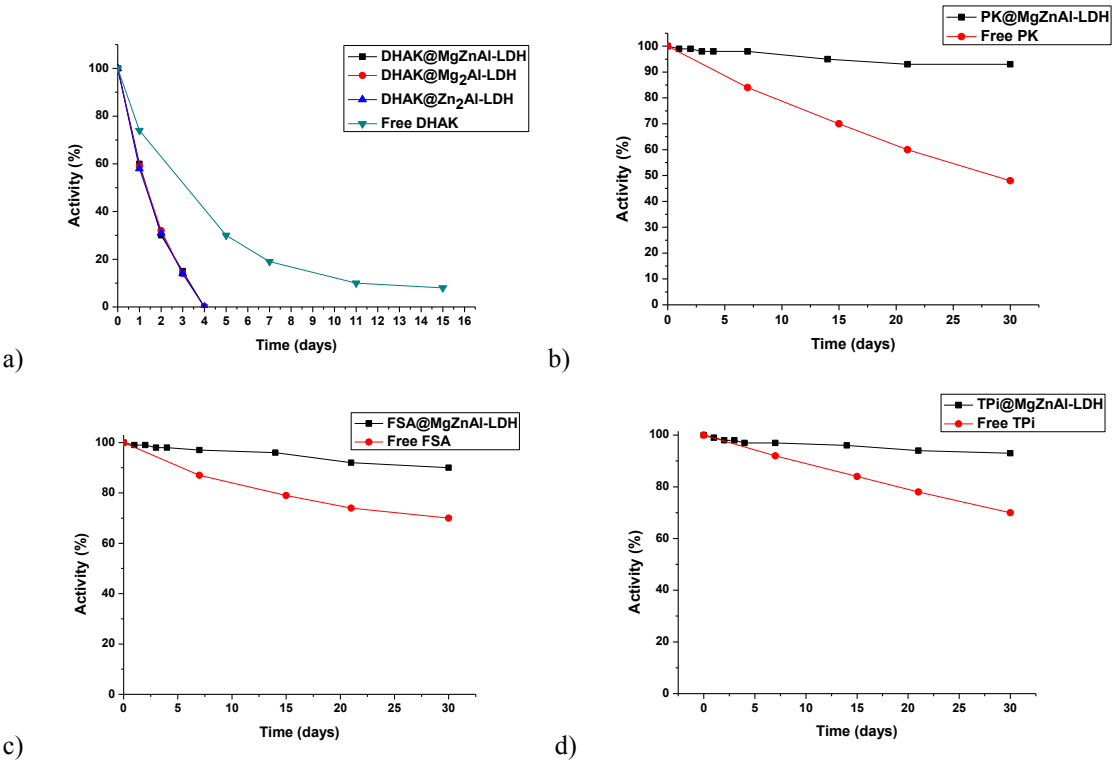
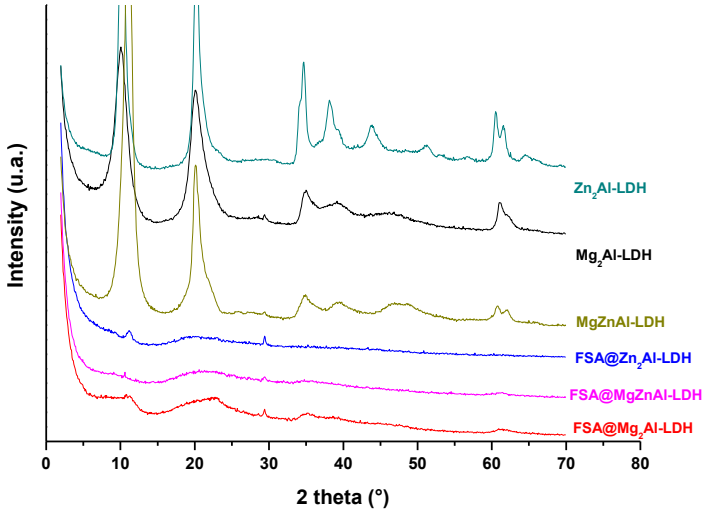
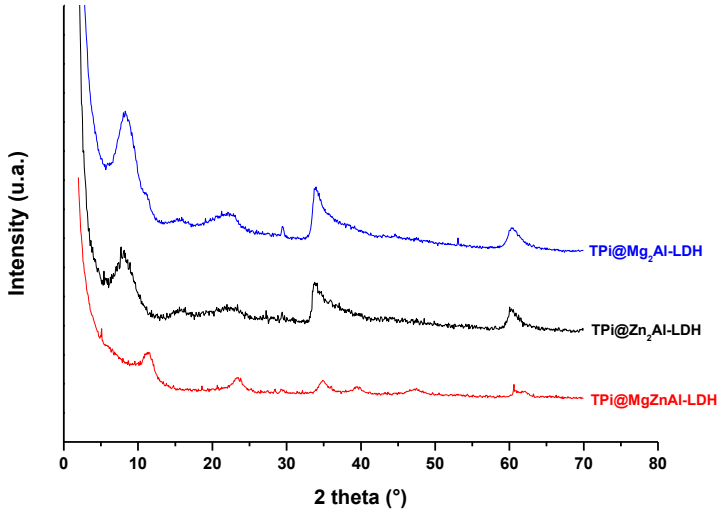


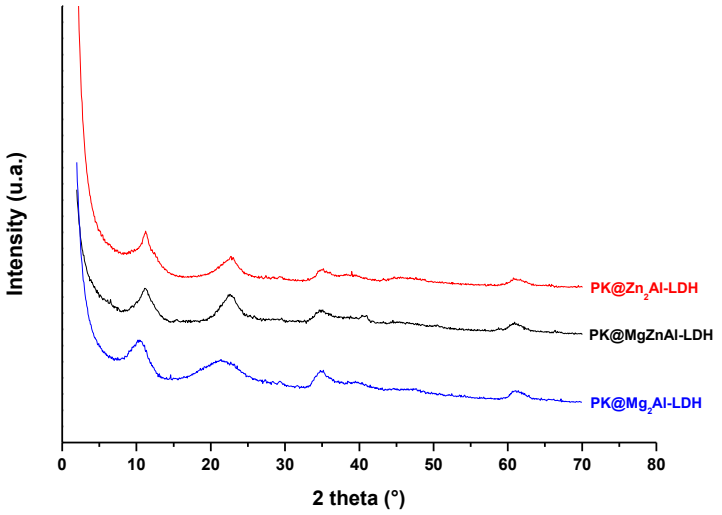
Figure S1. Storage stability of free enzymes and biohybrids. The conditions of storage of each enzyme were: a) Tris buffer (15 mM), $MgCl_2$ (5mM). b) Tris buffer (15 mM), $MgCl_2$ (5mM), KCl (5 mM). c) Eau, pH=7.5. d) Tris buffer (15 mM).



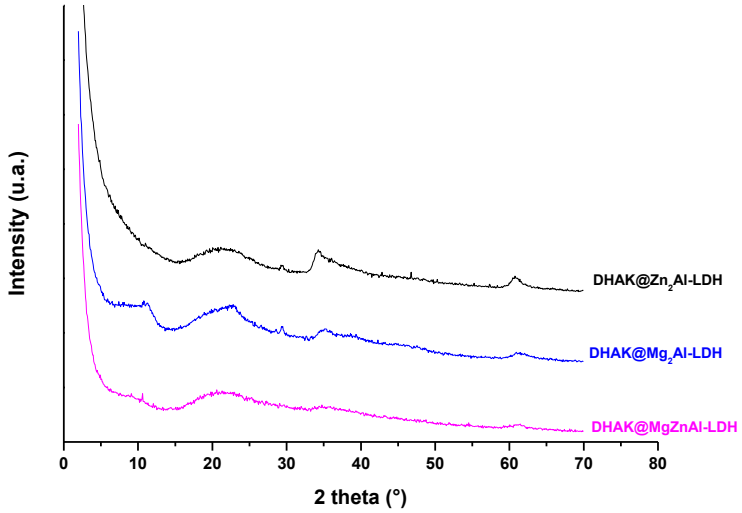
a)


Intensity (u.a.)
TPi@Mg2Al-LDH
TPi@Zn2Al-LDH
TPi@MgZnAl-LDH
0
10
20
30
40
50
60
70
80
2 theta (°)

b)


Intensity (u.a.)
PK@Zn2Al-LDH
PK@MgZnAl-LDH
PK@Mg2Al-LDH
0
10
20
30
40
50
60
70
80
2 theta (°)

c)



d)

Figure S2. XRD of Enzyme@LDH biohybrids: a) with FSA_{A129S}, b) with TPI, c) with PK_{Gstea}, d) with DHAK

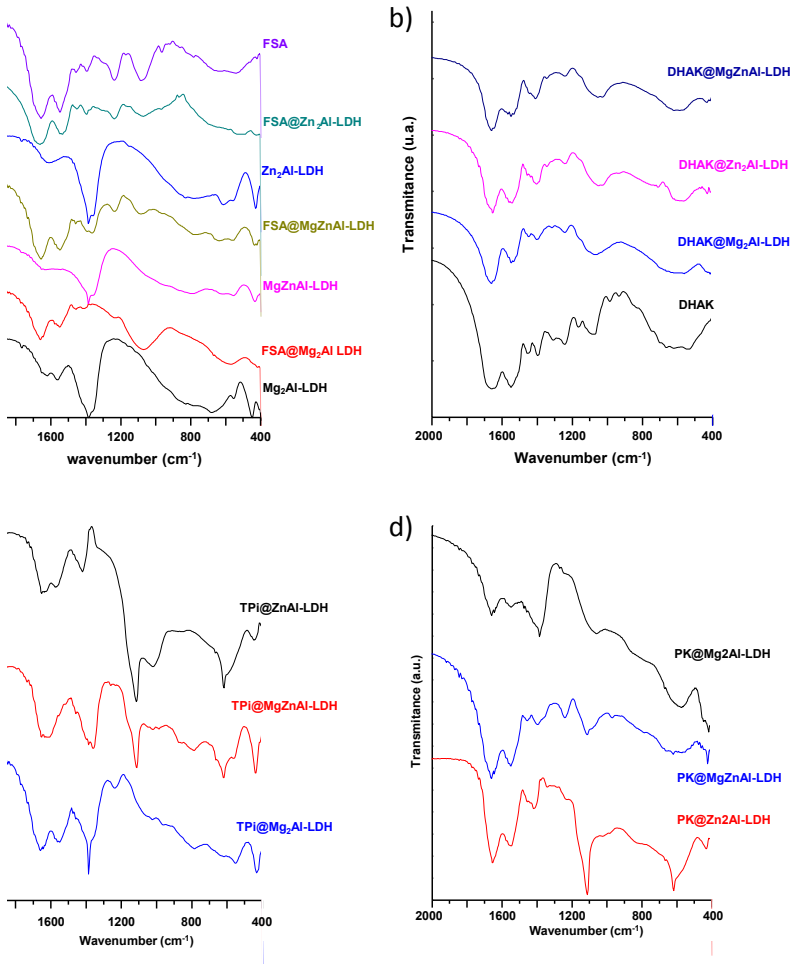


Figure S3. Infrared spectra of enzyme containing LDH .

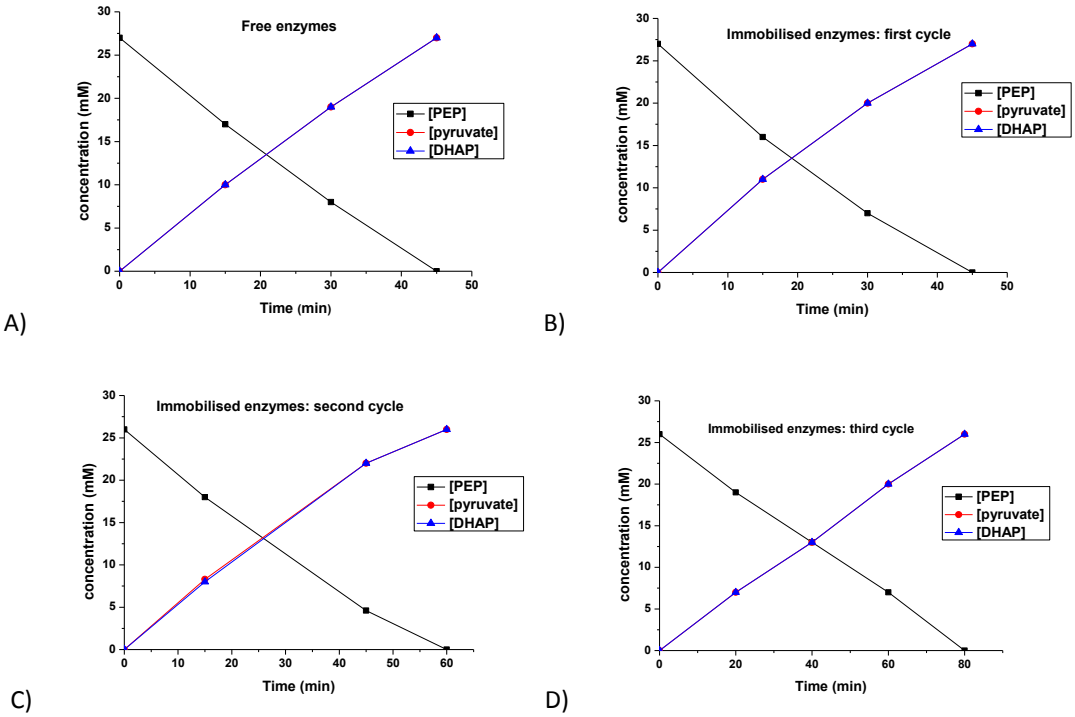


Figure S4. Comparison of the rates of the DHAP formation using free enzymes (A), immobilised enzymes (B) and the use of the immobilised enzymes for a second (C) and a third cycle (D). The conditions were: DHA (0.4 mmol), PEP (0.64 mmol), ATP (52 µmol), $MgCl_2$ (10 mM); pH adjusted to 7.5; DHAK (20 U) and PK_{Gstea} (20 U).

Table S2. Measured activities after each cycle

	DHAK activity (%)	PK_{Gstea} activity (%)
cycle 1	70	90
cycle 2	50	82
cycle 3	30	75

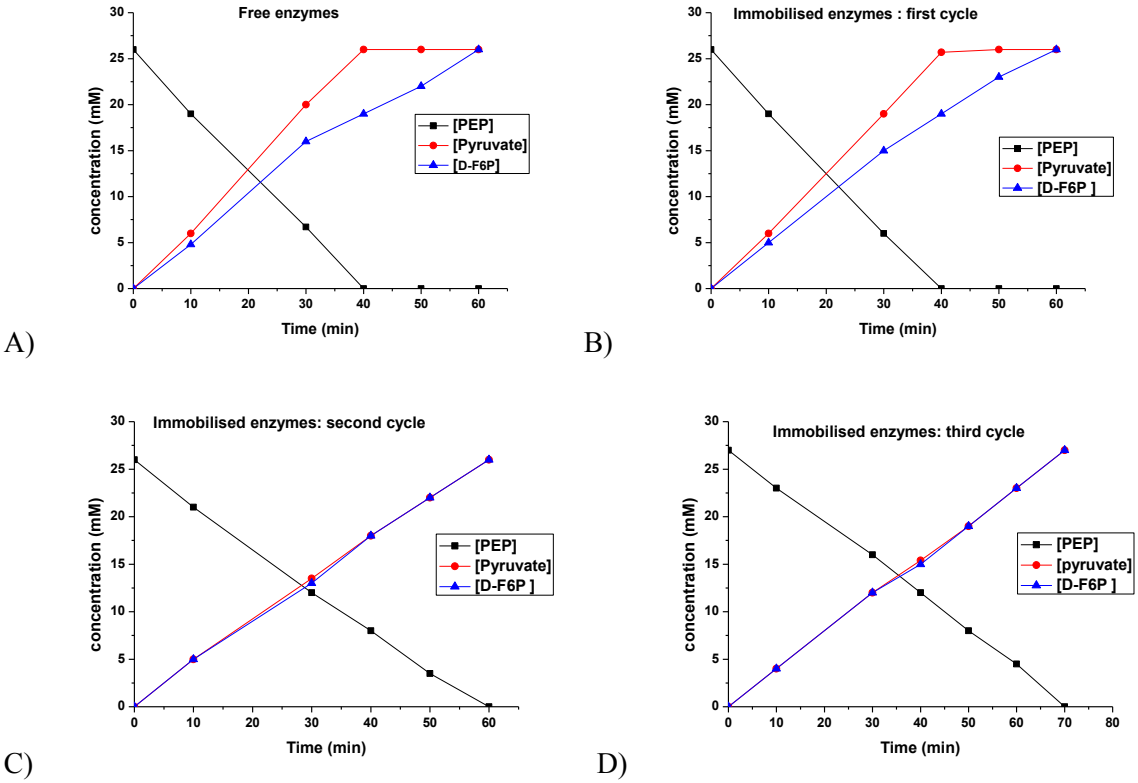
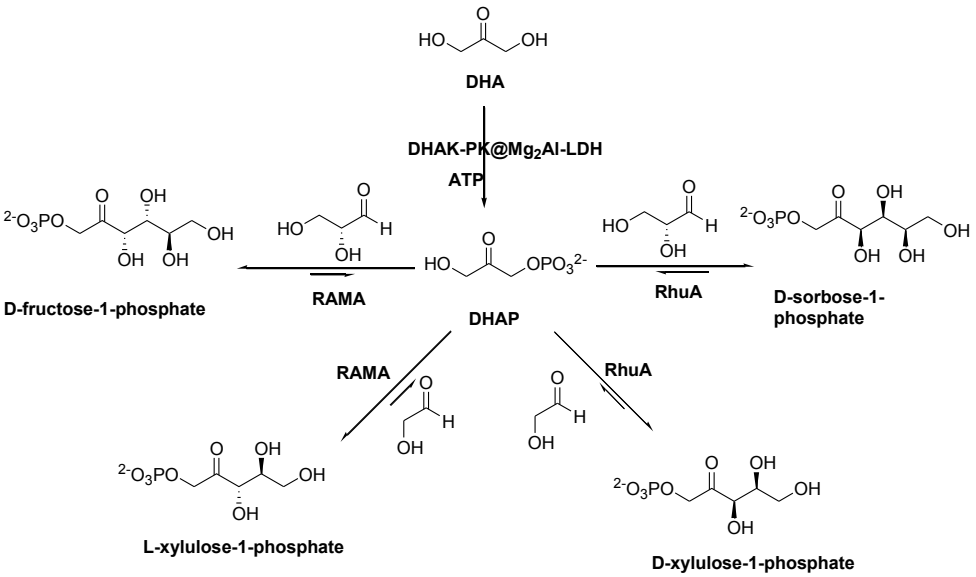


Figure S5. Comparison of the rates of the reaction using free enzymes (A), immobilised enzymes (B) and the use of the immobilised enzymes for the second (C) and the third cycle (D). The conditions were: DHA (0.8 mmol, 2 eq), PEP (0.32 mmol), ATP (36 µmol), $MgCl_2$ (10 mM); pH adjusted to 7.5; DHAK (20 U), PK_{Gstea} (11 U), FSA_{A129S} (3 U) and TPI (288 U).



Scheme S3. Synthesis of 1-phosphorylated sugars, DHAP as donor for DHAP-dependent aldolases.

4- Protocols

Cloning, production and purification of pyruvate kinase

Gene corresponding to pyruvate kinase (Q02499) from *Geobacillus Stearothermophilus* (DSM 2027/ATCC29609)[316] was used as sequence template for PCR primer design: PK_5HIS AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATAAGCGGAAAACGAAAATCGT CTGCACG and PK_3PRIM GTGTAATGGATAGTGATCTTACAACACGCTGG-CATGGCCG. Specific extensions were added to the primers for cloning into our plasmid pET22b(+) (Novagen) modified for ligation independent cloning. [317] The forward primers introduced a hexahistidine sequence in the proteins after the initial methionine for purification purposes. The gene amplification by PCR was done on genomic DNA from *Geobacillus Stearothermophilus* (DSM 132040/CIP 106956), usually used in the laboratory. Sequencing of the gene was done to obtain the nucleotide sequence of $PK_{GS132040}$. PKGS132040 gene has 89% of identity with PK_{GS2027} gene. The corresponding proteins shares 96% of identity.

> $PK_{GS132040}$ (gene)

ATGCATCATCACCATCACCATAAGCGGAAAACGAAAATCGTCTGTACGATCGGGCCGGC
AAGCGAGAGCGTAGACAAGCTCGTGCAATTGATCGAAGCGGGGATGAACGTGGCGCGCC
TCAACTTTTCGCACGGAGATCATGAGGAACACGGGCGGCGCATCGCCAACATTCGCGAG
GCGGCGAGGCGGACGGGCCAAACGGTCGCCATTTTGCTCGATACGAAAGGTCCGGAAAT
CCGCACGCACAATATGGAGAACGGCGCCATCGAACTGAAGGAAGGGGCAAAGCTCATCA
TTTCGATGAGCGAAGTGCTCGGCACGCCGGAAAAAATTTCTGTCACCTATCCGGGGCTGA
TCGATGATGTGTCCGTTGGTTCGAAAATTTTGCTGGACGACGGGTTGATCGGCCTTGAAG
TCAACGCGGTCGACAAGCAAGCTGGAGAAATTGTCACGACCGTCTTAAACAGCGGTGTG
CTCAAAAACAAAAAAGGGGTCAATGTCCCCGGCGTGCGTGTCAATTTGCCGGGCATCACC
GAGAAGGACCGAGCCGATATTTTATTTGGCATCCGCCAAGGCATCGACTTCATCGCCGCC
TCGTTTGTGCGCCGGGCGTCTGATGTGCTCGAAATCCGCGAGCTGCTCGAGGCGAATGAC
GCCTTACATATCCAAATTATCGCGAAAATTGAAAATGAAGAAGGCGTCGCCAACATCGAT
GAAATTTTGGAAGCCGCCGATGGCCTCATGGTGGCGCGCGGCGACCTTGGCGTTGAGATT
CCGGCTGAGGAAGTGCCTCTCATTCAAAAAATGCTCATTAAAAAGTGCAACATGCTTGGC
AAGCCGGTCATCACGGCGACGCAAATGCTCGACTCGATGCAGCGCAATCCGCGGCCGAC
GCGGGCTGAGGCGAGCGATGTCGCCAACGCCATTTTTGACGGCACCGACGCCGTCATGCT
TTCCGGAGAAACCGCAGCCGGCCAGTATCCGGTCGAAGCGGTAAGGACGATGCACCAAA
TCGCGCTCCGCACCGAGCAGGCGTTGGAGCATCGCGACATTTTGTCCCAGCGCACGAAAG
AGAGCCGAACGACGATCACCGATGCCATCGGCCAATCGGTCGCCCACACGGCGCTCAATT
TGGATGTCGCGGCGATCGTGACGCCGACGGTGAGCGGAAAAACGCCGCAGATGGTGGCG
AAATACCGCCCGAAAGCCCCGATCATCGCGGTGACATCAAACGAAGCGGTCTCGCGGCG
GCTGGCGCTCATTTGGGGCGTGTATACGAAAGAAGCACCGCATGTCAATACAACCGATGA
AATGCTCGATGTGGCGGTCGACGCGGCAGTGCGCTCCGGCTTGGTGAAGCACGGCGACTT
GGTCGTCATCACGGCCGGCGTGCCGGTCGGCGAAACGGGATCGACGAACTTAATGAAAG
TGCACGTCATCAGCGACTTGCTTGCCAAAGGGCAAGGCATCGGCCGCAAGTCGGCATTCG
GCAAGGCGGTCGTCGCCAAAACGGCGGAAGAGGCGTGCCGAAAAATGGTAGAGGGCGG
CATTTTAGTCACCATCAGCACCGATGCCGATATGATGCCGGCTCTCGAAAAAGCAGCGGC
GATCATTACTGAGGAAGGCGGGTTGACGAGCCATGCGGCGGTCGTCGGCTTAAGCCTTGG
CATTCCGGTCGTCGTCGGGGTGGAAAATGCCACAAGCTTGTTTAAAGATGGGCAAGAGAT
CACGGTCGATGGCGGCTTTGGCGCCGTCTACCGCGGCCATGCCAGCGTGTTGTAA

>$PK_{GS132040}$(protein)
MHHHHHHKRKTKIVCTIGPASESVDKLVQLIEAGMNVARLNFSHGDHEEHGRRIANIREAAR
RTGQTVAILLDTKGPEIRTHNMENGAIELKEGAKLIISMSEVLGTPEKISVTYPGLIDDVSVGSK
ILLDDGLIGLEVNAVDKQAGEIVTTVLNSGVLKNKKGVNVPGVRVNLPGITEKDRADILFGIR
QGIDFIAASFVRRASDVLEIRELLEANDALHIQIIAKIENEEGVANIDEILEAADGLMVARGDLG
VEIPAEEVPLIQKMLIKKCNMLGKPVITATQMLDSMQRNPRPTRAEASDVANAIFDGTDAVM
LSGETAAGQYPVEAVRTMHQIALRTEQALEHRDILSQRTKESRTTITDAIGQSVAHTALNLDV
AAIVTPTVSGKTPQMVAKYRPKAPIIAVTSNEAVSRRLALIWGVYTKEAPHVNTTDEMLDVA
VDAAVRSGLVKHGDLVVITAGVPVGETGSTNLMKVHVISDLLAKGQGIGRKSAFGKAVVAK
TAEEACRKMVEGGILVTISTDADMMPALEKAAAIITEEGGLTSHAAVVGLSLGIPVVVGVENA
TSLFKDGQEITVDGGFGAVYRGHASVL

The gene cloning was done according the ligation independent cloning procedure as previously reported. The plasmid was then introduced into *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) strains (Navagen) for overexpression. Cell cultures, isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction and cell extracts were then conducted as previously reported.[6] Lysates were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to check for recombinant protein production.[318]

Larger quantities of PK_{Gstea} were produced as follow: *E. coli* colonies containing the plasmids were cultured in the presence of selection antibiotic (ampicillin) at 37°C with shaking. When the culture reached 0.5 $OD_{600\ nm}$, protein expression was induced with IPTG (0.5 mM) and the temperature was dropped to 30°C. The culture was incubated for a further period of 12h. Cells (4 g) were harvested by centrifugation, washed twice and resuspended in 35 mL Tris buffer (50 mM, pH 7.5). Cell suspension was disrupted by sonication 40 min (10 s on, 15 s off) in an ice bath. The cell lysate was then centrifuged at 12 500 rpm for 20 min. The supernatant was loaded onto a Ni^{2+}-NTA agarose column (Qiagen, h= 2.5 cm; Ø = 2.5 cm) prealably washed with water (pH 7.5). The column was washed with the wash buffer (Tris-HCl 50 mM, imidazole 20 mM, pH 7.5). The elution buffer (Tris-HCl 50 mM, imidazole 250 mM, pH 7.5) was introduced to elute the proteins. The presence of proteins in different fraction was confirmed by Bradford (yield of purification = 98%). The fractions containing the protein were dialysed in 3 L Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), then lyophilised and conserved at 4°C without any loss of activity for at least one month. Starting from 1 L of culture of PK_{Gstea} expressing cells (28800 U), 135 mg of pure protein were obtained with a specific activity of 210 U/mg at 30°C.

Activity measurement

- FSA_{A129S}: One unit (U) of FSA_{A129S} is defined as the amount of enzyme that catalyses the cleavage of 1 μmol of D-F6P to afford D-glyceraldehyde-3-phosphate (D-G3P) and DHA per minute at pH 8.5 (glycylglycine 50 mM buffer) and 25 °C. The assay was run at 25°C following NADH absorbance at 340 nm in a reaction mixture of 1 mL containing glycylglycine (50 mM, pH 8), 50 µmol

D-F6P, 0.2 µmol NADH, 2 U glycerol dehydrogenase and 10 µL of an appropriately diluted enzyme solution.

- DHAK: The DHAK activity was measured spectrophotometrically by enzymatic quantification of the DHAP formed in the phosphorylation reaction[276]. This assay was run at 25°C following NADH absorbance at 340 nm for 15 minutes in a reaction mixture of 1 mL containing Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), NADH (0.2 µmol), ATP (5 µmol), $MgSO_4$ (3.75 µmol), glycerophosphate dehydrogenase (2 U), DHAK (2.5-5.0 µg), and DHA (2.5 µmol).

- PK_{Gstea}: The PK_{Gstea} activity was spectrophotometrically measured by enzymatic quantification of the pyruvate formed[298]. This assay was run at 25°C following NADH absorbance at 340 nm in a reaction mixture of 1 mL containing imidazole-HCl (50 mM, pH 7.2), 50 µmol KCl, 7 µmol $MgCl_2$, 2 µmol PEP, 4 µmol ADP, 0.2 µmol NADH and 5 U of lactic acid dehydrogenase. The reaction was initiated by the addition of 10 µL of an appropriately diluted enzyme solution.

However, the specific activity of this enzyme is measured at 30°C in the literature so it was assayed using this method at 30°C (210 U/mg).

-TPI: The TPI activity was spectrophotometrically measured[308] by enzymatic quantification of the DHAP formed by isomerisation of D-glyceraldehyde-3-phosphate (G3P). The assay was run at 25°C following NADH absorbance at 340 nm in a reaction mixture of 1 mL containing Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), NADH (0.2 µmol), glycerophosphate dehydrogenase (2 U) and TPI (2 ng).

Immobilisation of enzymes

- Immobilisation of DHAK in MgZnAl-LDH was realised as follow; Typically, 1.89 mL of a magnesium, zinc and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma [Mg^{2+}+Zn^{2+}+Al^{3+}] = 0.1M$, Mg/Zn/Al: 1/1/1) was added into a reactor containing 20 mg of DHAK (20 U) dissolved in 3 mL of tris buffer (50 mM, pH 9.0), under stirring and nitrogen atmosphere, the pH was maintained at 9.0 during the immobilisation which was completed in 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles in deionised water. 35 mg of the biohybrid were obtained with 0.3 U/mg of biohybrid. The yield of the coprecipitation was 88% (35 mg of biohybrid/ 40 mg of biohybrid). The encapsulation efficiency was 100% and the retained activity was 50%.
- Immobilisation of PK_{Gstea} in MgZnAl-LDH was realised as follow; Typically, 1.89 mL of a magnesium, zinc and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma [Mg^{2+}+Zn^{2+}+Al^{3+}] = 0.1M$, Mg/Zn/Al: 1/1/1) was added into a reactor containing 2.8 mg of PK_{Gstea} (360 U) dissolved in 3 mL of tris buffer (50 mM, pH 9.0), under stirring and nitrogen atmosphere, the pH was maintained at 9.0 during the immobilisation which was left for 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles in deionised water. 14 mg of the biohybrid were obtained with 13.8 U/mg of biohybrid. The yield of the coprecipitation was 61%. The encapsulation efficiency was 100% and the retained activity was 54%.

- Immobilisation of FSA_{A129S} in MgZnAl-LDH was realised as follow; Typically, 1.89 mL of a magnesium, zinc and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma [Mg^{2+}+Zn^{2+}+Al^{3+}] = 0.1M$, Mg/Zn/Al: 1/1/1) was added into a reactor containing 20 mg of FSA_{A129S} (123 U) dissolved in 3 mL of tris buffer (50 mM, pH 9.0), under stirring and nitrogen atmosphere, the pH was maintained at 9.0 during the immobilisation which was completed in 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles in deionised water. 34 mg of the biohybrid were obtained with 3.2 U/mg of biohybrid. The yield of the coprecipitation was 83%. The encapsulation efficiency was 100% and the retained activity was 88%.
- Immobilisation of TPI in MgZnAl-LDH was realised as follow; Typically, 1.89 mL of a magnesium, zinc and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma [Mg^{2+}+Zn^{2+}+Al^{3+}] = 0.1M$, Mg/Zn/Al: 1/1/1) was added into a reactor containing 0.1 mg of TPI (1480U) dissolved in 3 mL of tris buffer (50 mM, pH 9.0), under stirring and nitrogen atmosphere, the pH was maintained at 9.0 during the immobilisation which was left for 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles in deionised water. 12 mg of the biohybrid were obtained with 107 U/mg of biohybrid. The yield of the coprecipitation was 60%. The encapsulation efficiency was 100% and the retained activity was 87%.
- For the immobilisation of the enzymes in Mg_2Al-LDH and Zn_2Al-LDH, the same procedure was used except of in the case of Zn_2Al-LDH, 1.68 mL of a zinc and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma [Zn^{2+}+Al^{3+}] = 0.1M$, Zn/Al: 2/1) was added and in the case of Mg_2Al-LDH, 2.18 mL of a magnesium and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma [Mg^{2+}+Al^{3+}] = 0.1M$, Mg/Al: 2/1) was added.

Synthesis of DHAP

- Co-immobilisation of DHAK and PK_{Gstea} was realised as follow; Typically, 10.7 mL of a magnesium and aluminium nitrate salts solution ($\Sigma [Mg^{2+}+Al^{3+}] = 0.1M$, Mg/Al: 2/1) was added into a reactor containing 90 mg of DHAK (325 U) and 2.8 mg of PK_{Gstea} (295 U) dissolved in 15 mL of tris buffer (50 mM, pH 9.0), under stirring and nitrogen atmosphere, the pH was maintained at 9.0 during the immobilisation which was completed in 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles in deionised water. 160 mg of the biohybrid were obtained with 0.97 U of DHAK per mg of biohybrid and 0.93 U of PK_{Gstea} /mg of biohybrid. The yield of the coprecipitation was 80%. The encapsulation efficiency was 100% and the retained activities were of 50% for the DHAK and 48% for the PK_{Gstea}.
- The synthesis of DHAP was realised as described previously.[166] DHA (0.4 mmol), PEP (0.32 mmol), ATP (52 µmol), $MgCl_2$ (10 mM) were mixed. The free or immobilised enzymes were added (20 U DHAK, 20 U PK_{Gstea}; 20.8 mg of biohybrid). The final volume was 12 mL. The

reactions were followed by spectrophotometric assay of pyruvate, PEP and DHAP and were completed within 45 minutes. The analytical yield of DHAP was 100%.

- The recyclability of the biohybrid was investigated. The biohybrid was separated from the medium by centrifugation, washed twice then resuspended. The enzymes were assayed and added to an identical reaction mixture.

Synthesis of D-F6P

- Co-immobilisation of FSA_{A129S}, DHAK, PK_{Gstea} and TPI was done as follow: 4.7 mL of a magnesium, zinc and aluminium nitrate salts solution (Σ [Mg^{2+}+Zn^{2+}+ Al^{3+}]= 0.1M, Mg/Zn/Al: 1/1/1) was added into a reactor containing 45 mg of DHAK (182 U), 1 mg of PK_{Gstea} (92 U), 0.1 mg of TPI (1638 U) and 2.5 mg of FSA_{A129S} (13 U) dissolved in 15 mL of tris buffer (50 mM, pH 9.0), under stirring and nitrogen atmosphere, the pH was 9.0 during the immobilisation which was completed in 200 min. The precipitate was washed by three dispersion/centrifugation cycles in deionised water. 85 mg of the biohybrid were obtained with the following activities per mg of biohybrid: 0.14 U of FSA_{A129S}, 1.1 U of DHAK, 0.66 U of PK_{Gstea} and 18 U of TPI. The yield of the coprecipitation was 85%. The encapsulation efficiency was 100% and the retained activities were 50%, 50%, 90% and 92% for DHAK, PK_{Gstea}, TPI and FSA_{A129S} respectively.

- The D-F6P was prepared by a one-pot cascade reaction[166] using free or immobilised enzymes. Mixtures of the reagents were prepared: DHA (0.8 mmol, 2eq), PEP (0.32 mmol), ATP (36 µmol), $MgCl_2$ (10 mM). The free or immobilised enzymes were added (20 U DHAK, 11 U PK_{Gstea}, 288 U TPI and 3 U FSA_{A129S}; 16 mg of biohybrid). The final volume was 12 mL. The reactions were followed by spectrophotometric assay of pyruvate, PEP and D-F6P. The yield of the reaction with immobilised enzymes was 90%.
- The recyclability of the biohybrid was investigated. The biohybrid was separated from the medium by centrifugation, washed twice then resuspended. The enzymes were assayed and added in an identical reaction mixture.

Synthesis of D-xylulose-1-phosphate, L-xylulose-1-phosphate, D-sorbose-1-phosphate, D-fructose-1-phosphate

The one-pot cascade reactions were carried in Tris-HCl buffer (20 mL, 50 mM, pH 7.5) containing DHA (0.8 mmol), phosphoenolpyruvate (0.64 mmol), $MgSO_4$ (10 mM), ATP (52 µmol) and DHAK-PK_{Gstea}@Mg_2Al-LDH (20 mg of biohybrid; 20 U PK_{Gstea} and 20 U DHAK).

- 2.4 mmol of GoA (3 eq) and 6 U of RhuA or 15 U of RAMA were added to the mixture to prepare L-xylulose-1-phosphate and D-xylulose-1-phosphate respectively.
- 2.4 mmol of D-glyceraldehyde and 6 U of RhuA or 15 U of RAMA were added to the mixture to prepare D-sorbose-1-phosphate, D-fructose-1-phosphate respectively.

In each case, the concentrations of PEP, pyruvate and DHAP were measured by spectrophotometric assay to follow the reaction. The obtained yields were 75%, 80%, 79% and 78% for L-xylulose-1-phosphate, D-fructose-1-phosphate, D-sorbose-1-phosphate and D-xylulose-1-phosphate respectively.

Assay of pyruvate, PEP, DHAP and D-F6P

- **Pyruvate & PEP**: Samples (5 µL) were taken over time from the vessel of the one-pot reactions and added to the assay medium (1 mL) containing NADH (20 µL, 12 $mg.mL^{-1}$), LDH (5 U) and glycylglycine buffer (970 µL, 50 mM, pH 8.0). Consumption of NADH was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25 °C. One µmol of oxidized NADH was equivalent to 1 µmol of pyruvate formed. In the same cuvette, when no more NADH was consumed, were added ADP (50 microL, 50 mM), $MgCl_2$ (10 microL, 0.5 M) and PK_{Gstea} (5 U). The consumption of NADH was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25 °C. One µmol of oxidized NADH was equivalent to one µmol of pyruvate formed from remaining PEP i.e. equivalent to 1 µmol of PEP disappeared during the cascade reactions.
- **DHAP**: Samples (50 µL) taken from a reaction vessel were acidified to disable the enzymatic activity (free enzymes) or centrifuged to remove the biohybrid (immobilised enzymes). Then 5 µL were assayed in 1 mL composed of GPDH (10 U mL^{-1}) and NADH (20 µL, 10 $mg.mL^{-1}$) in Tris-HCl buffer (960 µL, 40 mM, pH 7.5). The consumption of NADH was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25 °C. One µmol of oxidized NADH was equivalent to 1 µmol of DHAP formed.
- **D-F6P:** Samples (50 µL) taken from a reaction vessel were acidified to disable the enzymatic activity (free enzymes) or centrifuged to remove the biohybrid (immobilised enzymes). Then 5

µL were assayed in 1 mL composed of PGI (2U), G6PDH (1U) and NADP (0.5 mmol) in Tris-HCl buffer (980 microL).

General protocol for the purification of the products as their barium salts

The reaction was stopped by centrifugation to remove the biohybrid. When RAMA or RhuA were used, the pH was dropped to 3.0 to precipitate the enzymes. The solution was then centrifuged (10 min at 10 000 rpm at 4°C) and the pH adjusted to 6.5. 2 eq of $BaCl_2$, $2H_2O$ were then added. The solution was centrifuged again and the precipitate was discarded. 5 volumes of ethanol were added and the solution allowed to cool overnight at 4°C. The suspension was then centrifuged. The organic barium salts were obtained as a white powder after two washings with a 1/3 H_2O/ethanol solution followed by a last washing with acetone. For NMR spectrum, the barium salt was dissolved in water containing 5-8 µL of concentrated HCl.

5- Product characterisation

D-F6P (1): analytical data are identical as those already published[166]

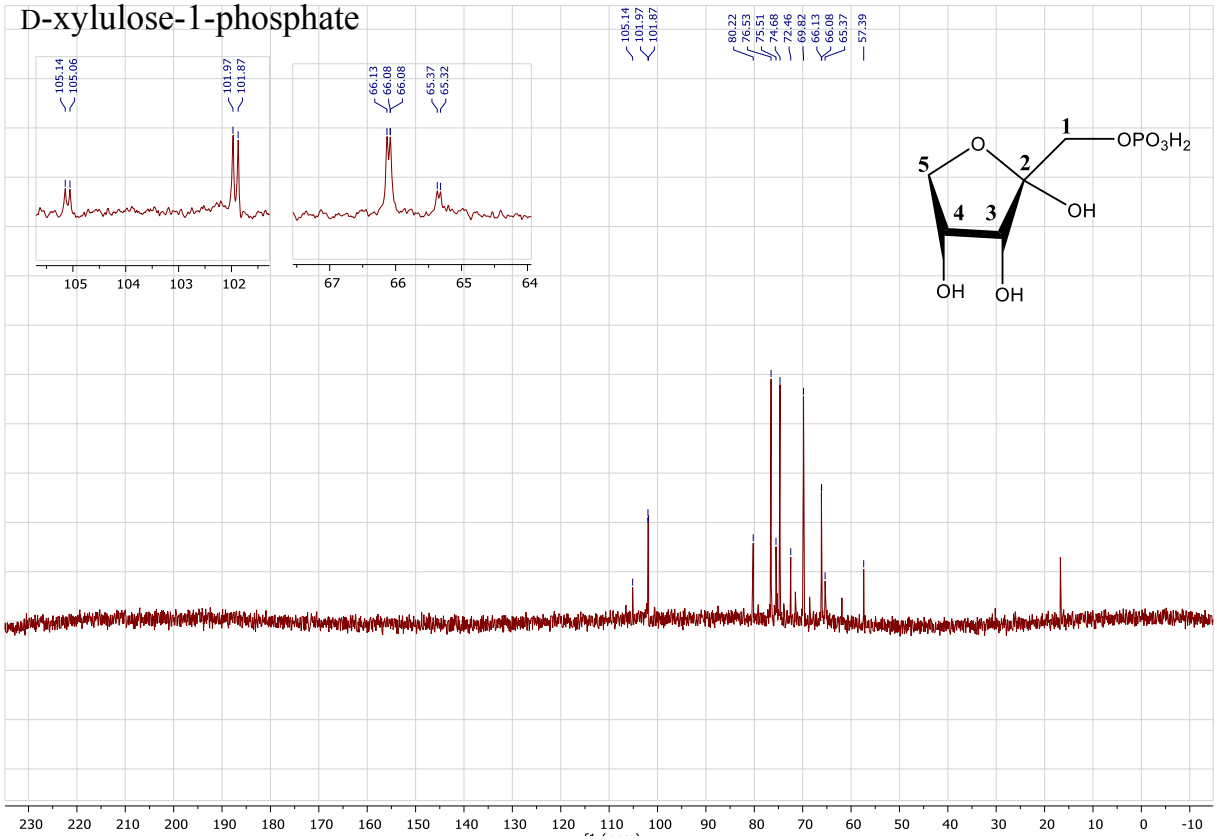
D-xylulose-1-phosphate: ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.26 (m, 1H, HA), 4.08 (m, 1H, HB), 3.98 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.82 – 3.70 (m, 2H), 3.63 – 3.46 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 101.90 (C2, d, *J* = 9.9 Hz), 76.50 (C3), 74.67 (C4), 69.82 (C5), 66.10 (C1, d, *J* = 4.7 Hz).

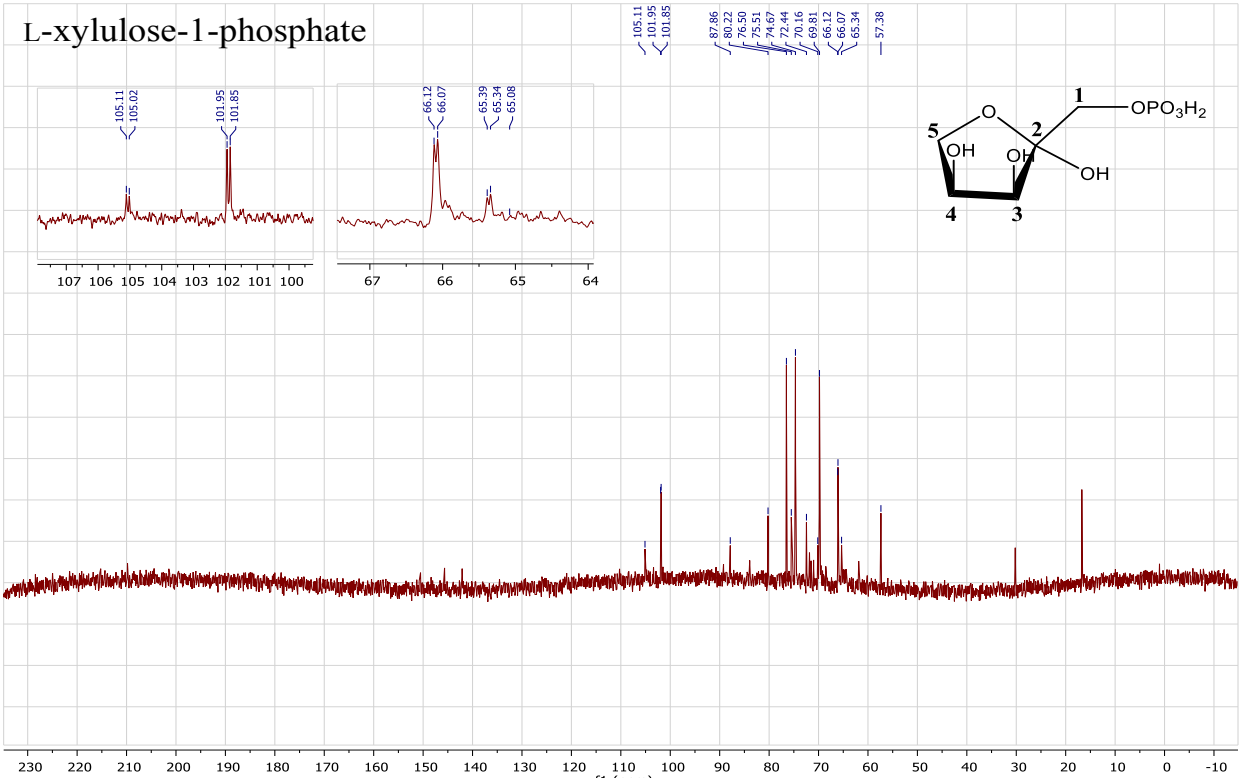
L-xylulose-1-phosphate: ^{1}H NMR (400 MHz D_2O) δ 4.36 – 3.45 (m, 5H), 3.39 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 101.92 (C2, d, *J* = 10.0 Hz), 76.53 (C3), 74.68 (C4), 69.82 (C5), 66.11 (C1, d, *J* = 5.1 Hz).

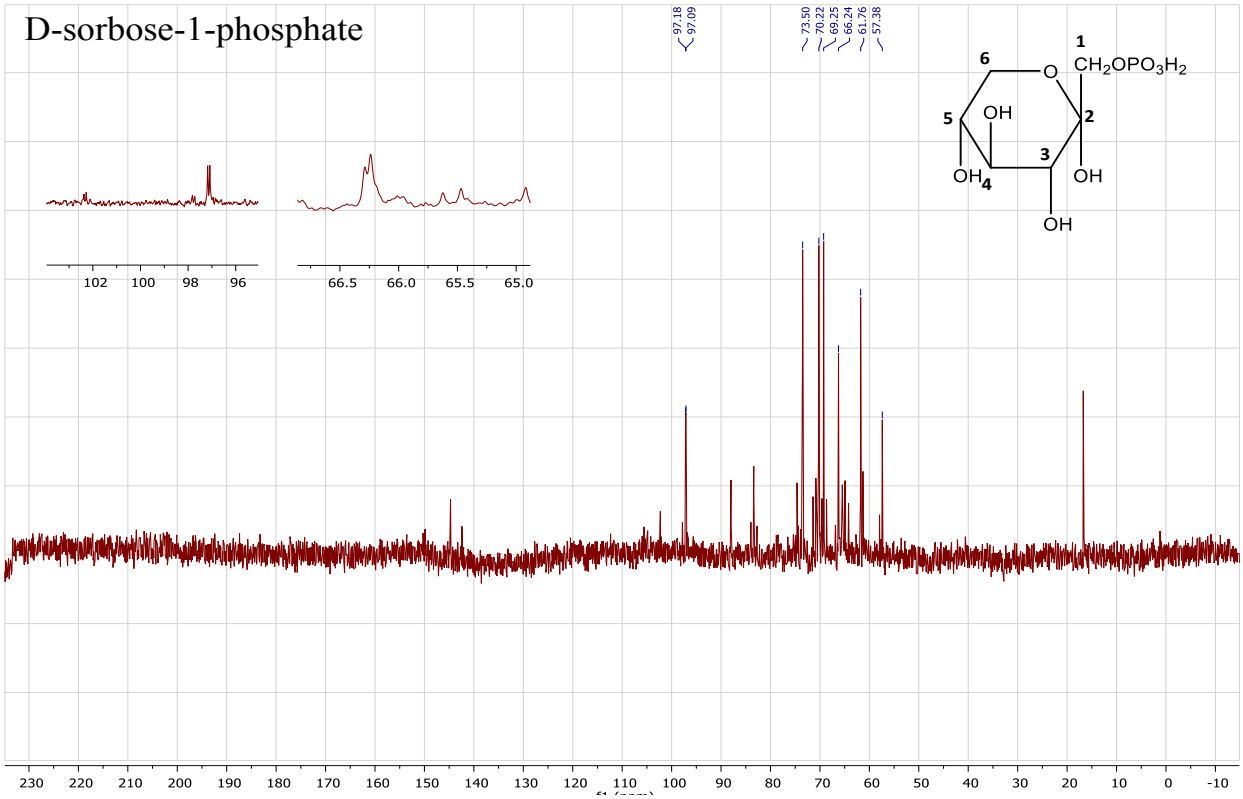
D-sorbose-1-phosphate: ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ 3.93 (m, 1H), 3.87 – 3.80 (m, 1H), 3.72 – 3.56 (m, 4H), 3.50 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 97.13 (C2, d, *J* = 9.4 Hz), 73.50 (C3), 70.22 (C4), 69.25 (C5), 66.26 (C1, d, *J* = 4.9 Hz), 61.76 (C6).

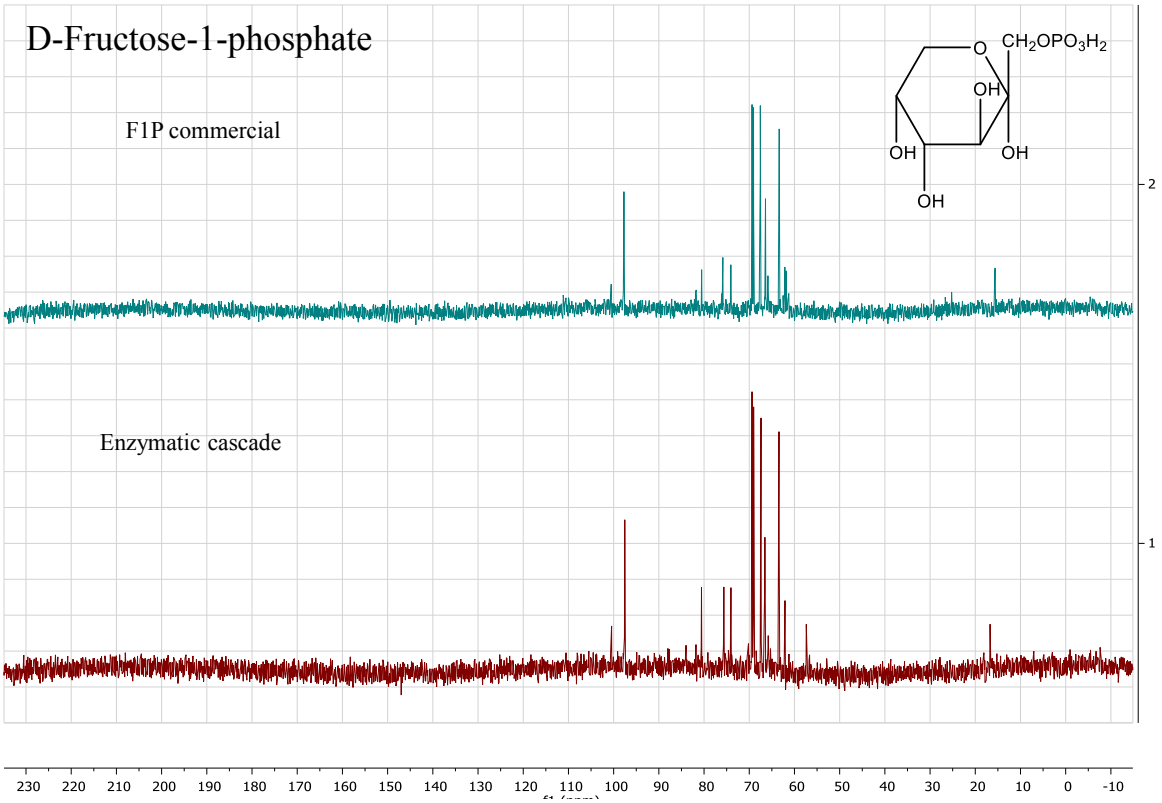
D-fructose-1-phosphate: ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.1-3.5 (m, 7H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 97.49 (C2, d, *J* = 9.3 Hz), 69.39 (C3), 69.03 (C4), 67.40 (C5), 66.56 (C1, d, *J* = 4.6 Hz), 63.42 (C6).

6- ^{13}C NMR spectra




L-xylulose-1-phosphate
105.11
101.95
101.85
87.86
80.22
76.50
75.51
74.67
72.44
70.16
69.81
66.12
66.07
65.34
57.38
OPO3H2
OH
OH
OH
O
1
2
3
4
5
230 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10


D-sorbose-1-phosphate
97.18
97.09
73.50
70.22
69.25
66.24
61.76
57.38
CH2OPO3H2
OH
OH
OH
OH
O
1
2
3
4
5
6
230 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10


D-Fructose-1-phosphate
F1P commercial
Enzymatic cascade
O
CH2OPO3H2
OH
OH
OH
OH
2
1
230 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10

IV.3. Synthèse des sucres phosphorylés de série L via une réaction en cascade enzymatique

IV.3.1. Introduction

Dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous décrivons la conception d'une cascade multienzymatique pour la synthèse de sucres de série L phosphorylés en position terminale à partir de substrats simples et achiraux. Les sucres L sont des composés rares dans la nature. Certains d'entre eux ont été identifiés comme par exemple le L-sorbose-1-phosphate ou le L-sorbose-6-phosphate, mais leurs rôles dans le métabolisme ne sont pas encore élucidés[319]. Le plus simple d'entre eux est le L-glycéraldéhyde-3-phosphate (L-G3P) qui possède une activité bactéricide.[320] Cependant, peu de méthodes de synthèse de ce composé sont décrites dans la littérature. De plus, le L-G3P est instable à pH neutre ou alcalin où il forme le méthylglyoxal ou l'acide lactique, respectivement. Il n'existe pas à ce jour de synthèse par voie chimique du L-G3P. Cependant dans un travail récent mené par R. Wohlgemuth, il a pu être synthétisé par phosphorylation du L-glycéraldéhyde par la glycérokinase (GK) de *Cellulomonas sp*. (Schéma IV.2).[321] Cette kinase utilise l'ATP et donc comme dans les autres cas, son usage en synthèse nécessite un système de régénération (PK/PEP). Pour la conception de cascades, elle présente l'avantage d'être très spécifique du L-glycéraldéhyde. Une conversion de 90% a été obtenue en optimisant les conditions de cette réaction[321]. Cependant, le L-glycéraldéhyde est un composé cher, ce qui représente l'inconvénient majeure de cette méthode de synthèse, d'où l'intérêt de trouver une méthode plus économique pour accéder à ce composé rare.

L'idée ici est d'utiliser de nouveau la FSA_{wt} (ou FSA_{A129S} avec la DHA comme donneur) pour générer *in situ* le L-glycéraldéhyde. En effet, l'enzyme est connue pour être strictement stéréosélective et ne conduit qu'à l'isomère *S* à partir du glycol aldéhyde comme donneur et du formaldéhyde comme accepteur.[158] La réaction est équilibrée et par ailleurs il est difficile de limiter l'autoaddition du glycol aldéhyde sur lui-même, le D-thréose est formé comme produit secondaire. On compte alors sur la spécificité de substrat de la GK pour tirer l'équilibre vers la formation de L-G3P. De façon similaire aux travaux décrits dans l'article précédent, il peut être envisagé une seconde réaction d'aldolisation catalysée par la FSA, en présence de l'un des 4 donneurs. Ceci est particulièrement attractif car jusqu'à présent, aucune méthode efficace pour préparer des sucres L phosphorylés en position terminale n'a été décrite.

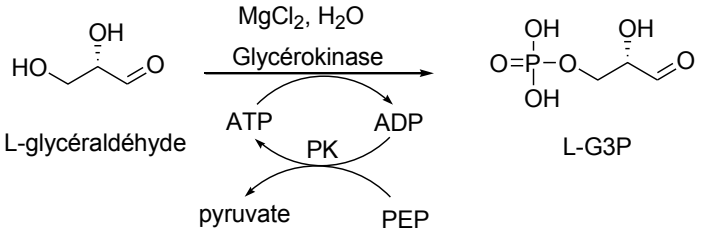


Schéma IV.2: Synthèse du L-G3P par phosphorylation enzymatique du L-glycéraldéhyde[321]

Par ailleurs, le L-G3P n'a jamais été démontré comme un substrat accepteur de la FSA. Seul le mélange racémique D,L-G3P a été utilisé pour doser l'activité de cette enzyme en suivant la formation du D-F6P par des enzymes auxiliaires. Comme cité et décrit précédemment, le D-G3P est le meilleur substrat accepteur de la FSA.[165,166] Nous ne savons pas ce qu'il en est pour le L-G3P. Ainsi, pour évaluer la capacité de l'aldolase à accepter ce substrat, ce travail est aussi l'occasion de mettre en place un dosage du L-G3P. Pour cela nous avons choisi une alcool déshydrogénase spécifique de ce substrat et récemment décrite dans la littérature, la L-G3P réductase.[322] Cette enzyme interviendrait dans un mécanisme de détoxification chez E. coli, car le L-G3P est un inhibiteur puissant de certaines voies métaboliques.[323] Elle n'est pas commerciale et dans le cadre d'une collaboration avec V. de Berardinis du Génoscope d'Evry, un plasmide a été construit pour la surexprimer histaggée dans *E. coli*.

La GK

La GK (E.C. 2.7.1.30) est une enzyme Mg^{2+} dépendante qui catalyse la réaction de phosphorylation du glycérol, en utilisant de l'ATP comme donneur de phosphate (Schéma IV.3). Elle est formée d'un dimère de 128 kDa (Figure IV.4). Cette enzyme a été également utilisée pour phosphoryler la DHA et le glycéraldéhyde[324].

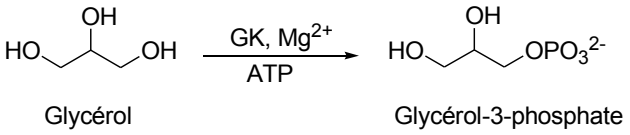


Schéma IV.3: Phosphorylation du glycérol catalysée par la GK

Dans notre étude, nous allons utiliser la GK de *Cellulomonas sp*. qui a servi à phosphoryler le L-glycéraldéhyde[321]. Son point isoélectrique est de 4.2. Son pH optimal est de 7.5. Cette enzyme n'est pas encore bien décrite dans la littérature, notamment en termes de données cinétiques.

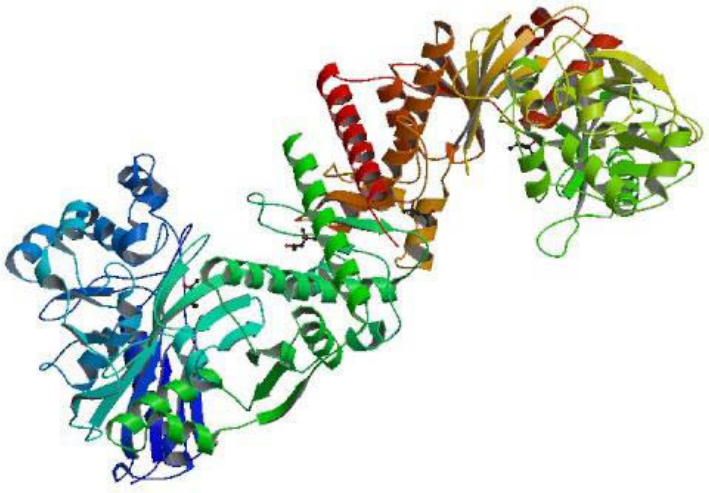


Figure IV.4 : Structure de la GK de *Cellulomonas sp*. (Source PDB 24DW)

Les objectifs de ce travail sont :

- Générer le L-G3P par une méthode efficace et économique.
- Étudier le comportement de la FSA vis-à-vis du L-G3P.
- Concevoir une cascade enzymatique pour la synthèse de sucres L phosphorylés en position terminale.
- Mettre en place la cascade en phase hétérogène par co-immobilisation de l'ensemble des enzymes impliquées dans un HDL.

IV.3.2. Résultats

IV.3.2.1. Introduction

Les résultats de cette partie sont présentés sous la forme d'une publication dont le titre est «Straightforward Synthesis of L-Terminally Phosphorylated Sugars via Multienzymatic Cascade Reactions » paru en 2015 dans la revue ‗Advanced synthesis & catalysis' volume 357, issue 8, pp 1703-1708. Il s'agit d'un numéro spécial édité dans le cadre du congrès international Biotrans qui a lieu tous les 2 ans.

Dans cette partie, j'ai participé à la synthèse et la purification des sucres phosphorylés pour les caractériser de façon approfondie.

Les résultats ont aussi été présentés sous la forme d'une communication orale à la conférence Biotrans 2015 qui s'est tenue à Vienne (Autriche) en juillet, sous le titre « Synthesis of terminally phosphorylated L-sugars via multienzymatic cascade reactions » (Orateur : Virgil Hélaine).

IV.3.2.2. 'Straightforward Synthesis of L-Terminally Phosphorylated Sugars via Multienzymatic Cascade Reactions' parue dans Advanced Synthesis & Catalysis

COMMUNICATIONS

Advanced Synthesis & Catalysis

DOI: 10.1002/adsc.201500190

Straightforward Synthesis of Terminally Phosphorylated L-Sugars *via* Multienzymatic Cascade Reactions

Virgil Hélaine,[a,b] Rima Mahdi,[a,b] G. V. Sudhir Babu,[a,b] Véronique de Berardinis,[d,e,f] Roland Wohlgemuth,[c] Marielle Lemaire,[a,b] and Christine Guérard-Hélaine[a,b,*]

[a] Clermont Université, Université Blaise Pascal, ICCF, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
Fax: (+33)-4-7340-7717; e-mail: christine.helaine@univ-bpclermont.fr
[b] CNRS, UMR 6296, ICCF, BP 80026, F-63171 Aubière, France
[c] Sigma–Aldrich, Industriestrasse 25, CH-9470 Buchs, Switzerland
[d] CEA, DSV, IG, Genoscope, BP, 91057 Evry, France
[e] CNRS, UMR 8030, 91057 Evry, France
[f] Université d'Evry Val d'Essonne, BP, 91057 Evry, France

Received: February 23, 2015; Revised: March 24, 2015; Published online: April 29, 2015

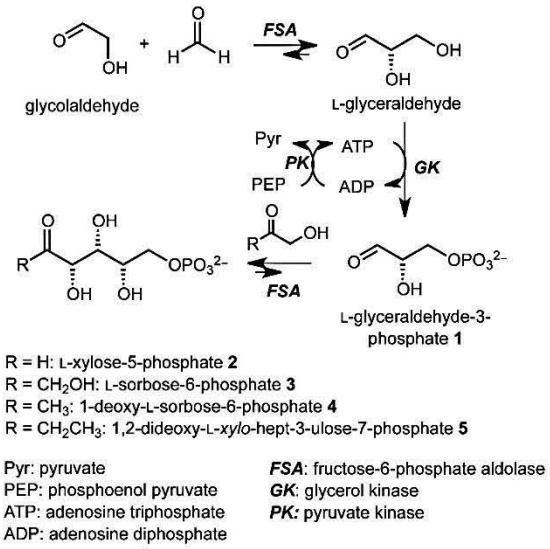
Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201500190.

Abstract: Two kinases and the key fructose-6-phosphate aldolase (FSA) were involved in a one-pot multienzymatic procedure to obtain rare L-sugars. Starting from simple achiral substrates such as glycolaldehyde and formaldehyde, L-glyceraldehyde-3-phosphate (L-G3P) was generated. When this latter compound was used as an FSA acceptor substrate along with four different donor compounds, four terminally phosphorylated L-monosaccharides from C_5 to C_7 chain lengths were prepared in good isolated yields.

Keywords: aldolases; cascade reactions; kinases; multienzymatic systems; L-sorbose-6-phosphate; L-sugar phosphates; L-xylose-5-phosphate

Phosphorylated sugars are of key importance as central metabolites in various biochemical pathways such as glycolytic, mevalonate, non-mevalonate and photosynthetic pathways or the non-oxidative pentose phosphate branch. Although much less abundant in nature, L-sugars also play important roles as key constituents in antibiotics,[1] oligosaccharides[2] and clinically useful nucleosides.[3] Despite the prominence of metabolic pathways and terminally phosphorylated sugar metabolites derived from D-sugars, terminally phosphorylated sugar metabolites based on the opposite L-configuration are highly relevant in various key domains of life, for example, the opposite handedness of the *sn*-glycerol-1-phosphate in the phospholipid headgroups of archaea compared to the *sn*-glycerol-3-phosphate in the phospholipid headgroups of bacteria, metabolic pathways starting from L-arabinose, L-fucose, L-rhamnose, L-quinovose or L-altrose and biosynthetic pathways of lipopolysaccharides. For those reasons numerous synthetic routes have been reported so far.[4] Among this family phosphorylated L-sugars are very rare compounds in nature. Few of them have been found as exemplified by L-sorbose-1-phosphate or L-sorbose-6-phosphate, but their roles in the metabolism remain unclear.[5] The simplest of them namely L-glyceraldehyde-3-phosphate (L-G3P) was found to be a bactericidal agent because of its inhibitory effects on various enzymes such as L-glyceraldehyde 3-phosphate acyltransferase, phosphatidylglycerol phosphate synthase and aldolase.[6] More recently an L-G3P reductase was discovered as a metabolic bypass of the triose phosphate isomerase catalysed reaction[7] revealing the existence of an *in vivo* mechanism for L-G3P detoxification in *E. coli*.[8] Since L-G3P has not been demonstrated as a natural metabolite its role remains an open question. Therefore, there is a real need to develop powerful methods for preparing such phosphorylated sugars. A recent L-G3P synthesis has been reported where the authors demonstrated the competitiveness of their method compared to existing ones mainly suffering from lengthy approaches or low yields.[9] Preparation of 1-phosphorylated L-sugars as synthons to build complex glycoconjuges has been implemented *via* chemical[10] or enzymatic[11] routes. To the best of our knowledge no efficient and general methods to prepare their terminally phosphorylated counterparts have been described. Enzymatic methods are thus promising since they ensure mild conditions compatible with those unstable compounds avoiding protection/deprotection steps as well.[12] The modular process design is

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



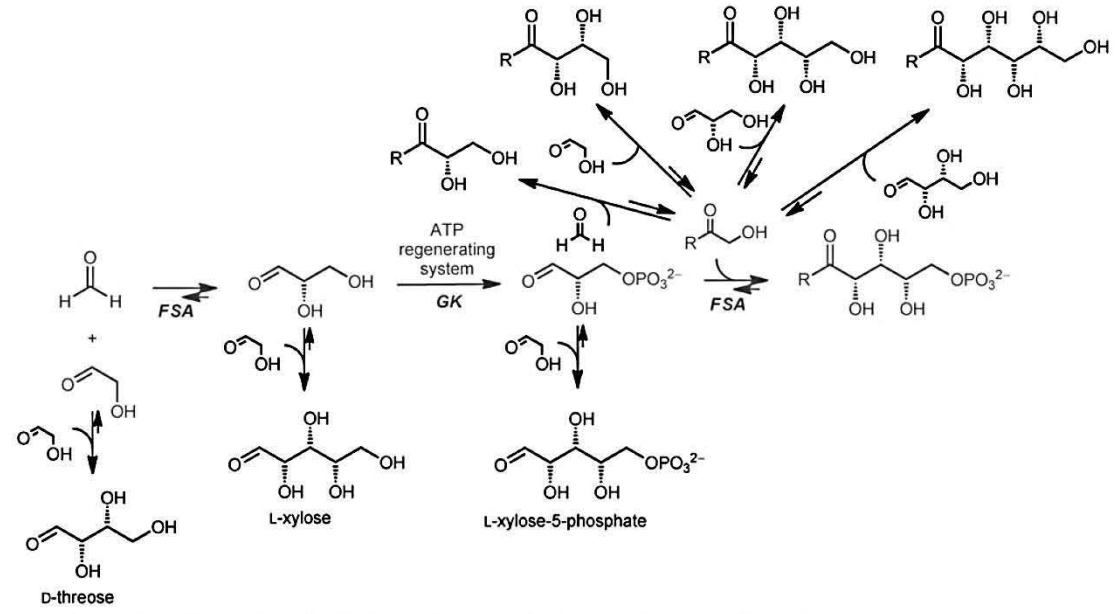
Scheme 1. Cascade reactions leading to various L-phosphorylated sugars from simple and achiral compounds.

a useful and flexible tool for the biocatalytic synthesis of other valuable terminally phosphorylated sugars.[13–16]

We recently achieved the successful preparation of various phosphorylated D-sugars using only two key enzymes: an aldolase to elongate the carbon chain from simple substrates and a kinase to introduce the phosphate moiety.[13] The former enzyme was fructose-6-phosphate aldolase (FSA)[17] or its A129S variant[18] appearing in the last decade as a good alternative to the commonly used fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) that uses the expensive dihydroxyacetone phosphate (DHAP) as the only donor substrate for preparing phosphorylated compounds with the (3*S*,4*R*) configuration. Indeed FSA is able to use various donors enabling the synthesis of products with structural diversity.

We report herein an elegant multienzymatic cascade reaction starting from simple achiral reagents in order to prepare L-xylose-5-phosphate **2**, L-sorbose-6-phosphate **3**, L-deoxy-L-sorbose-6-phosphate **4** and 1,2-dideoxy-L-*xylo*-hept-3-ulose-7-phosphate **5** *via* the key intermediate compound L-G3P **1**. The methodology described in this paper also enabled the preparation and isolation of this latter compound. Those one-pot domino reactions involved one biocatalytic step using a kinase (glycerokinase coupled with an ATP regenerating system) flanked by two other steps catalysed by FSA (Scheme 1).

Since the system involved several aldehydes that could play the role of either donor or acceptor substrates in the same pot several side reactions catalysed by FSA were expected (Scheme 2). Consequently a careful study was conducted to circumvent them as much as possible although the irreversible phosphorylation was expected to shift the various equilibria in the right direction. We will first present a preliminary



Scheme 2. Putative side reactions (in black) to circumvent in the cascade process (in grey).

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 1. Biocatalytic synthesis of four terminally phosphorylated L-monosaccharides in a one-step or a cascade process.

Donor[a]	L-Sugar phosphate	One-step yield [mg (%)[b]]	Cascade yield [mg (%)[b]]	α/β/linear ratio[c]
GoA	**2**	62 (77)	152 (79)[d]	45/55/0
DHA	**3**	72 (79)	82 (80)[e]	10/90/0
HA	**4**	74 (87)	85 (86)[e]	15/35/50
HB	**5**	80 (89)	87 (85)[e]	0/40/60

[a] GoA = glycolaldehyde, DHA = dihydroxyacetone, HA = hydroxyacetone, HB = hydroxybutan-2-one.
[b] Isolated yields.
[c] Determined by ^{1}H NMR spectroscopy on the acidic form.
[d] *Via* a one-pot, one-step procedure.
[e] *Via* a one-pot, two-step procedure.

study showing that L-G3P is a new FSA acceptor substrate and then its application in the preparative scale synthesis of compounds **2–5** starting from a stock of L-G3P prepared as described.[9] Finally the cascade process implementation consisting of L-G3P *in situ* synthesis followed by the aldolisation reaction will be discussed.

Study of FSA behaviour towards L-G3P: To the best of our knowledge L-G3P was never used as FSA acceptor substrate for synthetic purpose before. In the literature[17] the racemic mixture of G3P was employed for assaying spectrophotometrically this enzyme following D-G3P consumption. D-G3P was then described to be its best acceptor substrate and was successfully used for the preparation of various D-monosaccharides phosphate.[13,14] However, FSA behaviour towards L-G3P alone has never been considered.

First to easily quantify L-G3P in solution we used the previously described L-G3P reductase.[7,8] For this purpose we cloned the corresponding gene *gpr* from *Escherichia coli* (see Experimental Section). Monitoring NADPH consumption the reductase enabled to determine L-G3P concentration in a racemic mixture.[7] Interestingly L-glyceraldehyde was also found to be a substrate and therefore could be quantified following the same methodology.

To evaluate the FSA behaviour towards the L-G3P acceptor substrate, this aldehyde was prepared following a recently reported procedure.[9] We used a commercial glycerokinase from *Cellulomonas* sp. for direct phosphorylation of L-glyceraldehyde and phosphoenol pyruvate (PEP) along with pyruvate kinase for ATP regeneration. This procedure enabled the preparation of a 100 M L-G3P solution (pH 2.5, 80% yield estimated by L-G3P reductase assay) which could be stored in the freezer.

Evaluation of FSA kinetic constants for L-G3P was not possible since there was no specific enzyme able to directly assay the different L-monosaccharide phosphate products. An indirect assay could be implemented, however, it is known to be less accurate than a direct one. In this context determination of the enantioselectivity ratio (E value) of FSA towards D- and L-G3P was an interesting alternative. Indeed the racemic D,L-G3P was commercially available and each enantiomer could be separately quantified using the coupled triosephosphate isomerase/glycerol-3-phosphate dehydrogenase assay for D-G3P and the L-G3P reductase assay for L-G3P. Concentration measurements at specific times enabled us to determine the enantiomeric excess (*ee*) and the substrate conversion (c) required to calculate the E value according to the formula: $E = [\ln(1-c)(1-ee)]/[\ln(1-c)(1+ee)]$. Thus a reaction was performed by mixing dihydroxyacetone (DHA) and D,L-G3P in the presence of FSA revealing an enantiopreference towards D-G3P with a E value of 15. Nevertheless L-G3P also appeared to be a very good acceptor substrate for FSA with a k_{cat}/K_m value of 23 $s^{-1}mM^{-1}$ ($k_{cat}/K_m = 348\ s^{-1}mM^{-1}$ for D-G3P).[13]

At a preparative scale synthesis level, we checked whether L-G3P could be converted by FSA in the presence of the four known donor substrates to provide the rare L-series of monosaccharide phosphates. Accordingly four reactions were conducted with glycolaldehyde (GoA), DHA, hydroxyacetone (HA) or hydroxybutan-2-one (HB) as FSA donor substrates. These donors were added in excess in the reaction mixture to shift the equilibrium as previously described with D-G3P.[13] Reaction progress was monitored spectrophotometrically by following L-G3P disappearance with the L-G3P reductase assay. Thus aliquots were taken from the reaction mixture over time, acidified with perchloric acid to inactivate and precipitate FSA, and centrifuged before the assay. This procedure was necessary because otherwise active FSA is able to cleave the product restoring L-G3P and thus resulting in no apparent L-G3P consumption. When the reaction was complete, the phosphorylated sugars were isolated after direct purification of the reaction medium by anionic exchange chromatography (HCO_3^- form) using NH_4HCO_3 solutions for gradient elution. As depicted in Table 1 column 3, each donor was converted into the corre-

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

sponding phosphorylated L-sugar in good yield. Encouraged by these results we investigated a new method to generate L-G3P.

FSA biocatalysed L-G3P synthesis: As mentioned above, L-G3P could be obtained by enzymatic phosphorylation of L-glyceraldehyde. Although commercially available, this latter compound was quite expensive for use at a preparative scale. We decided therefore to focus on L-glyceraldehyde synthesis catalysed by FSA from very simple achiral precursors. GoA and formaldehyde[19] were chosen as starting point of the cascade process involving the subsequent phosphorylation step to L-G3P.

It is known that FSA is able to catalyse the self-addition of GoA to give D-threose. Attempts at the direct phosphorylation of these alcohols by glycerokinase revealed that these alcohols were not substrates. The formation of a mixture of phosphorylated short-chain products, which are difficult to separate, was thus avoided. Nevertheless to minimise D-threose formation, formaldehyde was used in excess (2.2 equiv.) to shift the equilibrium towards L-glyceraldehyde.[19]

At an analytical level it was not possible to directly assay L-G3P formation with the reductase because L-glyceraldehyde was also a substrate of this enzyme as mentioned above. Thus the reaction progress was monitored by assaying pyruvate appearance during the ATP recycling system using lactate dehydrogenase (LDH). A 16 mM concentration of GoA was found to be a good compromise between a fair reaction rate (glycolaldehyde with formaldehyde) avoiding side reactions and maintaining FSA activity. In addition, higher GoA concentration would involve too large quantities of FSA donor substrate to shift the aldolisation equilibrium during the next step of the cascade reactions.[13] By this way L-G3P could be obtained in 72% isolated yield as its barium salt in a reasonable reaction time (4 h).

Study of the one-pot cascade leading to L-terminally phosphorylated sugars: After L-G3P synthesis optimisation, the complete one-pot cascade was investigated. Different important points were considered: (i) velocity of the process allowing reasonable reaction times to prevent decomposition of phosphorylated sugars,[20] (ii) limitation of FSA deactivation and (iii) by-products appearance.

First, we initially used HA as a model donor substrate for FSA and studied the velocity of the one-pot, one-step process by varying HA and formaldehyde amounts (1 to 3 equiv. each calculated from PEP). Without HA pyruvate formation was faster showing a putative consumption of the reagents by cross-aldolisation (HA on formaldehyde or glycolaldehyde, Scheme 2). Specifically the best conditions (3 equiv. and 2 equiv. of HA and formaldehyde, respectively) resulted in a 63% PEP consumption after 3 h and 66% after 5 h. To overcome those limitations we finally considered a one-pot, two-step cascade allowing L-G3P accumulation in the reaction medium before addition of the donor. Indeed without HA PEP was totally consumed after around 4 h.

Second, due to the known instabilities of phosphorylated compounds,[20] the reaction time should not exceed 4 h for the whole cascade. Therefore we investigated the optimum relative quantities of FSA versus one of the kinases, the ratio between both kinases being already optimised by Wohlgemuth et al.[9] This has led us to consider which reaction was kinetically decisive: aldolisation or phosphorylation. The amount of one enzyme was individually doubled keeping the two others at the same level as determined for L-G3P synthesis. Pyruvate appearance was monitored over 180 min using the LDH assay. Among the three enzymes the reaction catalysed by pyruvate kinase (PK) was found as the rate-limiting step. For the complete one-pot, two-step cascade we decided therefore to double PK and GK amounts (same ratio of PK/GK conserved as described[9]) in order to keep the same reaction time, i.e., about 3–4 h for a total conversion level. Although FSA was found to catalyse a non-limiting step, attempts to decrease its amount were not satisfying since an incomplete PEP consumption was reached (around 10% remained). Under such conditions the reaction pursued by the addition of HA as donor has led to the detection of L-xylose-5-phosphate **2** (as shown by ^{1}H NMR spectroscopy) as by-product. Compound **2** was logically formed *via* the aldol reaction between L-G3P and remaining GoA. Finally a total consumption of PEP was reached with the use of a relatively high FSA amount preventing at the same time the formation of undesired compound **2**.

The process could therefore be carried out at a preparative scale as follows. FSA, GK and PK were first mixed together with GoA and formaldehyde to afford L-G3P. When PEP was totally consumed the donor (HA, HB or DHA) was added portionwise in a large excess. After total conversion of L-G3P the reaction mixture was acidified and the product isolated as its barium salt. Under those conditions the three terminally phosphorylated L-monosaccharides were obtained in good isolated yields (see Table 1 column 4). Very interestingly the synthesis of L-xylose-5-phosphate **2** was successfully carried out in a one-pot, one-step reaction process using an excess of glycolaldehyde. This sugar was also isolated as described above. As summarised in Table 1, for each L-phosphorylated sugar synthesised, the cascade process gave comparable yields to those obtained starting from a stock of L-G3P prepared previously. These results have demonstrated the powerfulness of the domino reactions methodology. Concerning the ratio of the various linear or cyclised forms obtained, the same trend was observed when compared with the corresponding D-

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

monosaccharides prepared from D-G3P.[13] Indeed the more the anomeric carbon was hindered (ethyl or hydroxymethyl groups) the less did the α-form predominate.

To summarise five rare phosphorylated L-sugars including the key intermediate L-G3P were prepared in good yields starting from very simple achiral compounds such as formaldehyde and glycolaldehyde. All the stereocentres were built by only one aldolase. A multienzymatic cascade reactions methodology was implemented following green chemistry principles such as reducing unnecessary derivatisation by avoiding or minimising the use of protective groups. The glycerokinase has played a central role to control the irreversible conversion of *in situ* formed L-glyceraldehyde. Several drawbacks like equilibrium shifts and enzyme deactivation were circumvented by a careful study and design of the process. This methodology also opens the field to the preparation of stable isotope-labelled metabolites since formaldehyde and glycolaldehyde are commercially available as labelled forms. Labelled compounds are useful for the elucidation of new metabolic pathways where L-phosphorylated sugars could be involved.

Experimental Section

General Procedure for the One-Pot, One-Step or Two-Step Process

This process was achieved in water (20 mL, pH 7.5) containing GoA (0.33 mmol, 20 mg), formaldehyde (0.74 mmol, 60 μL of a 37% commercial solution), phosphoenol pyruvate (0.26 mmol, 0.8 equiv.), $MgCl_2$ (10 mM) and ATP (0.01 mmol). The reaction was initiated upon addition of GK (90 U), PK (200 U) and FSA (150 U wt or 150 U FSA A129S with DHA as donor). At this step PEP was totally consumed within 3 h. 3 equiv. of the donor studied were then added and the reaction was allowed to proceed under gentle stirring (100–200 rpm) at room temperature for one hour. Every 25 min 3 equiv. of the donor substrate were added (HA: a total of 9 equiv., 55 min reaction time; HB: a total of 12 equiv, one and a half hour reaction time; DHA a total of 6 equiv., 30 min). Concerning L-xylose-5-phosphate synthesis the process was slightly scaled up by mixing GoA (1.7 mmol, 100 mg), formaldehyde (1.72 mmol, 140 μL of a 37% commercial formaldehyde solution) phosphoenol pyruvate (0.53 mmol), $MgCl_2$ (10 mM) and ATP (0.02 mmol) in water (40 mL, pH 7.5) and by adding GK (180 U), PK (400 U) and FSA (300 U wt). When PEP was totally consumed (within 3 h), 3 equiv. of additional donor were added and 3 equiv. more after 30 min. Then each terminally phosphorylated L-sugar was purified following the general procedure depicted in the Supplorting Information.

Acknowledgements

COST Action CM1303 "Systems Biocatalysis" is acknowledged. We also thank Polytech'Clermont (France) for a generous gift of PEP.

References

[1] S. Umezawa, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1974**, *30*, 111–182.
[2] B. Mulloy, M. J. Forster, *Glycobiology* **2000**, *10*, 1147–1156.
[3] G. W. Ashley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9731–9736.
[4] For recent articles, see: a) A. Fan, S. Jaenicke, G.-K. Chuah, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7720–7726; b) A. C. Weymouth-Wilson, R. A. Clarkson, N. A. Jones, D. Best, F. X. Wilson, M. S. Pino-Gonzalez, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6307–6310; c) R. I. Hollingsworth, X. Z. Song, *Synlett* **2007**, 1247–1250; d) H. Takahashi, T. Shida, Y. Hitomi, Y. Iwai, N. Miyama, K. Nishiyama, D. Sawada, S. Ikegami, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 5866–5877; e) M. Yun, H. R. Moon, H. O. Kim, W. J. Choi, Y.-C. Kim, C.-S. Park, L. S. Jeong, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5903–5905; f) F. P. Boulineau, A. Wei, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2281–2283; g) S. Fong, T. D. Machajewski, C. C. Mak, C.-H. Wong, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 873–883.
[5] K. M. Mann, H. A. Lardy, *J. Biol. Chem.* **1950**, *187*, 339–348.
[6] C.-T. Tang, R. Engel, B. E. Tropp, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 147–153.
[7] K. K. Desai, B. G. Miller, *Biochemistry* **2008**, *47*, 7983–7985.
[8] M. K. Kalyananda, R. Engel, B. E. Tropp, *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 2488–2493.
[9] D. Gauss, B. Schoenenberger, R. Wohlgemuth, *Carb. Res.* **2014**, *389*, 18–24.
[10] Q. Sun, X. J. Li, J. Sun, S. S. Gong, G. Liu, G. D. Liu, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 294–300.
[11] a) D. Hoffmeister, J. Yang, L. Liu, J. S. Thorson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13184–13189; b) Z. Li, L. Cai, M. Wei, P. G. Wang, *Carbohydr. Res.* **2012**, *357*, 143–146.
[12] P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, **1998**, p 30.
[13] I. Sánchez-Moreno, V. Hélaine, N. Poupard, F. Charmantray, B. Légeret, L. Hecquet, E. García-Junceda, R. Wohlgemuth, C. Guérard-Hélaine, M. Lemaire, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1725–1730.
[14] W.-D. Fessner, D. Heyl, M. Rale, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1596–1601.
[15] R. Wohlgemuth, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1253–1265.
[16] C. Guérard-Hélaine, M. Debacker, P. Clapés, A. Szekrenyi, V. Hélaine, M. Lemaire, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1109–1133.
[17] M. Schürmann, G. A. Sprenger, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11055–11061.
[18] J. A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, M. Gutiérrez, X. Garrabou, M. Sancelme, M. Schürmann, T. Inoue, V. Hélaine, F. Charmantray, T. Gefflaut, L. Hecquet, J.

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Joglar, P. Clapès, G. A. Sprenger, M. Lemaire, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1039–1046.

[19] X. Garrabou, J. A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, T. Parella, J. Joglar, M. Lemaire, P. Clapés, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5629–5633; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5521–5525.

[20] D. Gauss, B. Schönenberger, G. S. Molla, B. M. Kinfu, J. Chow, A. Liese, W. Streit, R. Wohlgemuth, in: *Applied Biocatalysis – From Fundamental Science to Industrial Applications* (Eds.: A.Liese, L.Hilterhaus), Wiley-VCH, Weinheim, **2015**, in press.

 © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Supporting information

1- Materials

Dihydroxyacetone (DHA), glycolaldehyde (GoA), formaldehyde (37% solution in water) and hydroxybutan-2-one (HB) were purchased from Sigma-Aldrich. Hydroxyacetone (HA) was purchased from Fluka (purity 90%) and purified by silica gel chromatography. D-fructose-6-phosphate dipotassium salt, L-glyceraldehyde, D,L-glyceraldehyde-3-phosphate diethyl acetal barium salt, β-nicotinamide adenine dinucleotide reduced dipotassium salt (NADH), β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced tetra(cyclohexylammonium) salt (NADPH) were purchased from Sigma-Aldrich; α-glycerophosphate dehydrogenase (GPDH) from rabbit muscle, triosephosphate isomerase (TPI) from rabbit muscle, pyruvate kinase (PK) from rabbit muscle, lactic acid dehydrogenase (LDH) from rabbit muscle and glycerokinase (GK) from *Cellulomonas sp*. were also purchased from Sigma-Aldrich.

Fructose-6-phosphate aldolase (FSA)[1] and glycerol dehydrogenase (GDH) (obtained as described by A.K. Samland[2]) were produced as previously reported. Concerning FSA a desalting step (dialysis) was necessary to remove glycylglycine (glygly) buffer. Oligonucleotides were purchased from Sigma-Genosys. *E. coli* BL21 (DE3) plysE strains were purchased from Invitrogen.

2- Methods

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were measured in deuterated solvents (D_2O) on a Bruker AC-400 spectrometer, operating at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C J-modulation. Residual solvent signals were used as internal reference. Chemical shifts (δ) are reported in ppm, coupling constant values (*J*) are given in hertz. Optical rotations were measured on a Jasco DIP-370 polarimeter, using a 10 cm quartz cell. Values for $[\alpha]^T_D$ were obtained with the D-ray of sodium at the indicated temperature T, using solutions of concentration (*c*) in units of g/100 mL. Electrospray ionization mass spectra (ESI-MS) were recorded on a micro q-tof Micromass (3000 V) and high resolution mass spectra (HR-MS) were recorded on the same instrument with an internal lock mass (H_3PO_4) and an external lock mass (Leu-enkephalin).

Kinetic measurements: In kinetic assays, one unit (U) of FSA is defined as the amount of enzyme able to cleave 1 μmol of D-fructose-6-phosphate (D-F6P) to afford D-glyceraldehyde-3-phosphate (D-G3P) and dihydroxyacetone (DHA) per minute at pH 8.5 (glycylglycine (glygly) buffer 50 mM) and 25°C.

One unit (U) of L-G3P reductase is defined as the amount of enzyme able to reduce 1 μmol of L-G3P per minute at pH 8.5 (glygly buffer 50 mM) and 25°C. The conditions for this assay were: L-G3P reductase (0.05 U), NADPH (20µL, 12 $mg.mL^{-1}$) and D,L-G3P (10µL, 100mM) in a 1 mL cuvet.

3- Protocols

Cloning and protein purifications

Gene corresponding to L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase from *E. coli* K12 (Q46851) was amplified by PCR using the following primers: Q46851_5HIS AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATGTCTGGTTAGCGAATCCC and Q46851_3PRIM GTGTAATGGATAGTGATCTTATTTATCGGAAGACGCC. Specific extensions were added to the primers for cloning into our plasmid pET22b(+) (Novagen) modified for ligation independent cloning.[3] The above primers introduced a hexahistidine sequence in the proteins after the initial methionine for purification purposes. Plasmid was then introduced into *E. coli* BL21 (DE3) plysE strains for overexpression. Cell cultures, Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction for protein production and cell extracts were then conducted as previously reported.[4] Lysates were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to check for recombinant protein production. Since imidazole was reported to be a protein stabilizing agent, the enzyme was used directly after IMAC chromatography without any additional treatment. From 0.4 L of culture (2.5 g of wet cells) of L-G3P reductase expressing cells a total activity of 550 U was obtained. 320 U were recovered after purification leading to a 58 % purification yield.

E value assessment

4 mM of D- and 4 mM of L-G3P (80 µL of a 85 mM D,L-G3P stock solution) were added to 8 mg of DHA (110 mM) and FSA (0,0015 U, purified by heat treatment) in 800 µL final volume glygly buffer 50 mM pH 8.5. Concentration of D- and L-G3P were determined using their respective assay (see below) at t = 0 and t = 50 min. This enabled to determine the following values: ee = 86% (in favor of the D-enantiomer) and c = 55% corresponding to E = 15. To note it is known that triose phosphate isomerase (TPI) can be present as contaminant enzyme in various purified enzymes such as FSA converting D-G3P into dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and thus lowering D-G3P concentration in the reaction medium. DHAP was thus assayed in the samples using GPDH. Finally we determined that when FSA was purified by heat treatment no DHAP appearance was observed over 50 min of reaction time.

D and L-G3P disappearance assays for the E value study

D-G3P: samples (30 µL) were taken from the above reaction vessel and were dissolved in a solution (1 mL) containing GPDH (1 U), TPI (1 U), and NADH (20 µL, 10 $mg.mL^{-1}$) in glygly buffer

(958 µL, 50 mM, pH 8.5). Consumption of NADH was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25°C. One mmol of oxidized NADH was equivalent to one mmol of D-G3P.

L-G3P: Samples (30 µL) taken from the above reaction vessel were dissolved in a solution (1 mL) containing L-G3P reductase (1.5 U) and NADPH (20 µL, 12 $mg.mL^{-1}$) in glygly buffer (958 µL, 50 mM, pH 8.5). The consumption of NADPH was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25 °C. One mmol of oxidized NADPH was equivalent to one mmol of L-G3P.

General protocol for FSA biocatalysed reaction between L-G3P and various donors

L-G3P was obtained as previously reported.[5] When PEP was totally consumed, pH was adjusted to 2.5 and the reaction mixture was centrifuged. The L-G3P solution was then kept at -20°C. Its concentration was assayed with L-G3P reductase and was found to be 100 mM at this stage. In a solution containing water (55 mL, pH=7.5), L-G3P (100 mM stock solution, 3.5 mL, 0.35 mmol) and 3 eq of one of the four donors studied (GoA, HA, DHA, HB) was added FSA (50 U wild type (wt) or 50 U FSA A129S when DHA substrate was used). The reaction proceeded at room temperature under gentle stirring (100-200 rpm) for at least around one hour. Every 25 min, 3 eq of additional donor were added (HA: a total of 9 eq, 55 min reaction time; HB: a total of 12 eq, one hour and a half reaction time; DHA a total of 6 eq, 30 min and GA: a total of 9 eq, 70 min reaction time).

The synthesized L-phosphorylated sugars were purified by ion exchange chromatography (DOWEX 1x8, 200-400 mesh, $HCO3^-$ form) using NH_4HCO_3 as the eluent. Elution was carried out with a nonlinear gradient using various NH_4HCO_3 concentrations: 0.012 M, 0.03 M, 0.048 M, 0.06 M and then 0.6 M (2 volumes of column each) and the fractions concentrated under vacuum. A minimum quantity of water was added and again concentrated. This was repeated twice and the concentrate was then treated with an acidic resin (Dowex 50WX8) , filtrated and lyophilized to give the final L-phosphorylated sugar.

General protocol for the cascade reactions

The one-pot two-steps procedure was achieved in water (20 mL, pH 7.5) containing GoA (0.33 mmol, 20 mg), formaldehyde (0.74 mmol, 60 µL of a 37% commercial solution), PEP (0.26 mmol, 0.8 eq), $MgCl_2$ (10 mM) and ATP (0.01 mmol). The reaction was initiated upon GK addition (90 U), PK (200 U) and FSA (150 U wt or 150 U FSA A129S when DHA used as donor). At this step, PEP was totally consumed after around 3 hours. Then 3 eq of the donor studied were then added and the reaction was allowed to gentle stir (100-200 rpm) at room temperature for one hour. Every 25 min 3 eq of the donor substrate were added (HA: a total of 9 eq, 55 min reaction time; HB: a total of 12 eq, one hour and a half reaction time; DHA a total of 6 eq, 30 minutes).

Concerning L-xylose-5-phosphate synthesis the process was slightly scaled up by mixing GoA (1.7 mmol, 100 mg), formaldehyde (1.72 mmol, 140 µL of a 37% commercial formaldehyde solution) phosphoenol pyruvate (0.53 mmol), $MgCl_2$ (10 mM) and ATP (0.02 mmol) in water (40 mL, pH 7.5) and by adding GK (180 U), PK (400 U) and FSA (150 U wt). When PEP was totally consumed (after around 3 hours), 3 eq of additional GoA were added and 3 eq more after 30 min.

L-G3P was prepared as follows. In water (20 mL, pH 7.5) was added GoA (0.33 mmol, 20 mg), formaldehyde (0.74 mmol, 60 µL of a 37% commercial solution), phosphoenol pyruvate (0.33 mmol), $MgCl_2$ (10 mM) and ATP (0.01 mmol). The reaction was initiated upon addition of GK (90 U), PK (200 U) and FSA (150 U wt). PEP has totally disappeared after around 3 hours.

General protocol for the purification of the products as their barium salts

The reaction was stopped by dropping the pH to 3.0 resulting in partial precipitation of the enzymes. The solution was then centrifuged (10 min at 10,000 rpm at 4°C) and the pH adjusted to 6.5. 2 eq of $BaCl_2$, $2H_2O$ were then added. The solution was centrifuged again and the precipitate was discarded. After partial concentration in vacuo, 5 volumes of ethanol were added and the solution allowed to cool overnight at 4°C. The suspension was then centrifuged. The organic barium salts were obtained as a white powder after two washings with a H_2O/ethanol: 1/3 solution followed by a last washing with acetone. For NMR spectrum and optical rotation measurements, the barium salt was first dissolved in water (or deuterated water) containing an acidic resin (Dowex 50WX8) and then filtrated to remove the resin.

Assay for pyruvate appearance and PEP consumption in the cascade reactions

Samples (10 µL) were taken over time from the vessel of the one-pot two-steps reactions and dissolved in a solution (1 mL) containing NADH (20 µL, 12 $mg.mL^{-1}$), LDH (5 U) and glygly buffer (970 µL, 50 mM, pH 8.5). Consumption of NADH was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25 °C. One mmol of oxidized NADH was equivalent to 1 mmol of pyruvate formed. In the same cuvet, when no more NADH was consumed, were added ADP (0.05 mL, 50 mM), $MgCl_2$ (0.025 mL, 100 mM) and PK (5 U). The consumption of NADH was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25 °C. One mmol of oxidized NADH was equivalent to one mmol of pyruvate formed from remaining PEP ie equivalent to 1 mmol of PEP disappeared during the cascade reactions.

Assay for monosaccharide formation by following L-G3P disappearance

Samples (20 µL) were taken over time from the vessel of the one-pot two-steps reactions and 2 µL of perchloric acid were then added. The suspension obtained was centrifuged and the precipitate discarded. 10 µL were then added to a solution (1 mL) containing NADPH (20 µL, 12 mg.mL^{-1}) and L-G3P reductase (2 U) in glygly buffer (940 µL, 50 mM, pH 8.5). NADPH consumption was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25°C. One mmol of oxidized NADPH was equivalent to one mmol of L-G3P disappearance in the reaction mixture. In the same cuvet, when no more NADPH was consumed, was added FSA (5 U) and NADPH disappearance was monitored spectrophotometrically at 340 nm and 25 °C. One mmol of oxidized NADPH was equivalent to one mmol of L-G3P produced from retroaldolisation of the phosphorylated-L-sugar synthesized.

4- Products characterisations

α and β cyclic forms as well as linear form were respectively noted as α, β and l.

L-glyceraldehyde-3-phosphate (1): analytical data are identical as those already published[5].

L-xylose-5-phosphate (2): one step (acidic form: 62 mg, 77 %); cascade reactions (barium salt: 152 mg, 79 %).

^{1}H NMR (400 MHz, DCl) δ 5.41 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 4.42-3.81 (m, 10H, H2α, H2β, H3α, H3β, H4α, H4β, 2H5α, 2H5β); ^{13}C NMR (100 MHz, DCl) δ 101.7 (1α), 95.7 (1β), 80.4 (d, *J* = 8.0 Hz, 4α), 80.1 (2α), 77.2 (d, *J* = 8.0 Hz, 4β), 75,6 (2β), 74.7 (3β), 74.6 (3α), 64.6 (d, *J* = 4.4 Hz, 5α), 64.0 (d, *J* = 4.5 Hz, 5β). $[\alpha]_D^{20}$ = -14 (c = 2, HCl 1N). HRMS ESI-, m/z calcd. for [$C_5H_{11}O_8P$-H] = 229.0113; found 229.0098.

L-sorbose-6-phosphate (3): one step (acidic form: 72 mg, 79 %); cascade reactions (barium salt: 82 mg, 80 %).

^{1}H NMR (400 MHz, DCl) δ 4.40-4.30 (m, 2H, H4β, H5β), 4.08 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz, H3β), 3.9-4.1 (m, 2H, H6β), 3.56 (broad s, 1H, H1β), 3.54 (broad s, 1H, H1α); ^{13}C NMR (100 MHz, DCl) δ 105.6 (2α), 101.8 (2β), 76.3 (d, *J* = 7.4 Hz, 5β), 75,4 (3β), 74.9 (4β), 64.8 (d, *J* = 5.0 Hz, 6β), 63.0 (1β). $[\alpha]_D^{20}$ = -41 (c = 0.9, HCl 1N). HRMS ESI-, m/z calcd. for [$C_6H_{13}O_9P$-H] = 259.0219; found 259.0224.

1-deoxy-L-sorbose-6-phosphate (4): one step (acidic form: 74 mg, 87 %); cascade reactions (barium salt: 85 mg, 86 %).

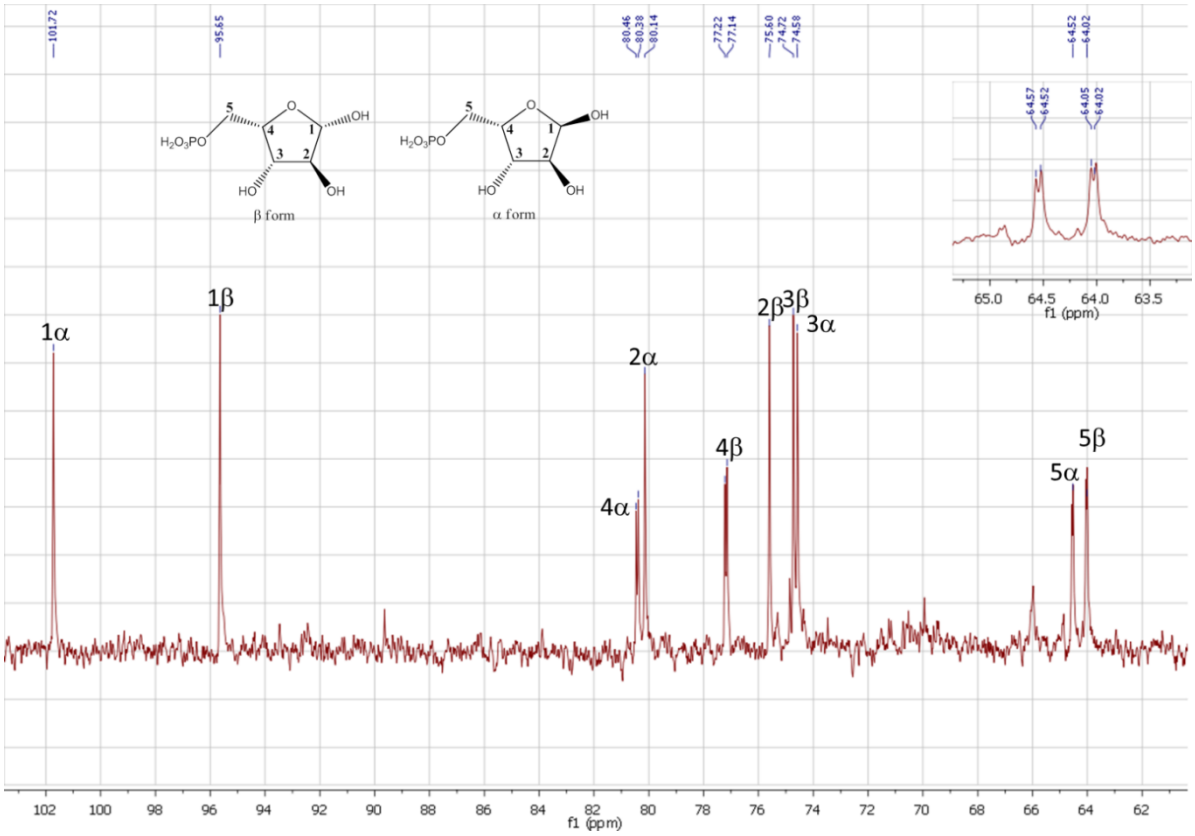
^{1}H NMR (400 MHz, DCl) δ 4.43 (d, 1H, *J* = 1 Hz, H3l), 4.35-3.87 (m, 14H, H3α, H3β H4l, H4α, H4β, H5l, H5α, H5β, 2H6l, 2H6α, 2H6β), 2.25 (s, 3H, H1l), 1.45 (s, 3H, H1β), 1.39 (s, 3H, H1α); ^{13}C NMR (100 MHz, DCl) 212.5 (2l), 106.1 (2α), 101.3 (2β), 79.7 (3β), 77.3 (3l),75.8 (d, *J* = 7.6 Hz, 5β), 74.8 (4β), 71.0 (4l), 70.8 (d, *J* = 7.6 Hz, 5l), 66.4 (d, *J* = 4.9 Hz, 6l), 64.7 (d, *J* = 4.2 Hz, 6β), 25.7 (1l), 23.7 (1 β). $[\alpha]_D^{20}$ = +9 (c = 0.8, HCl 1N). HRMS ESI-, :m/z calcd. for [$C_6H_{13}O_8P$-H] = 243.0270; found 243.0268.

1,2-dideoxy-L-*xylo*-hept-3-ulose-7-phosphate (5): one step (acidic form: 80 mg, 89 %); cascade reactions (barium salt: 87 mg, 85 %).

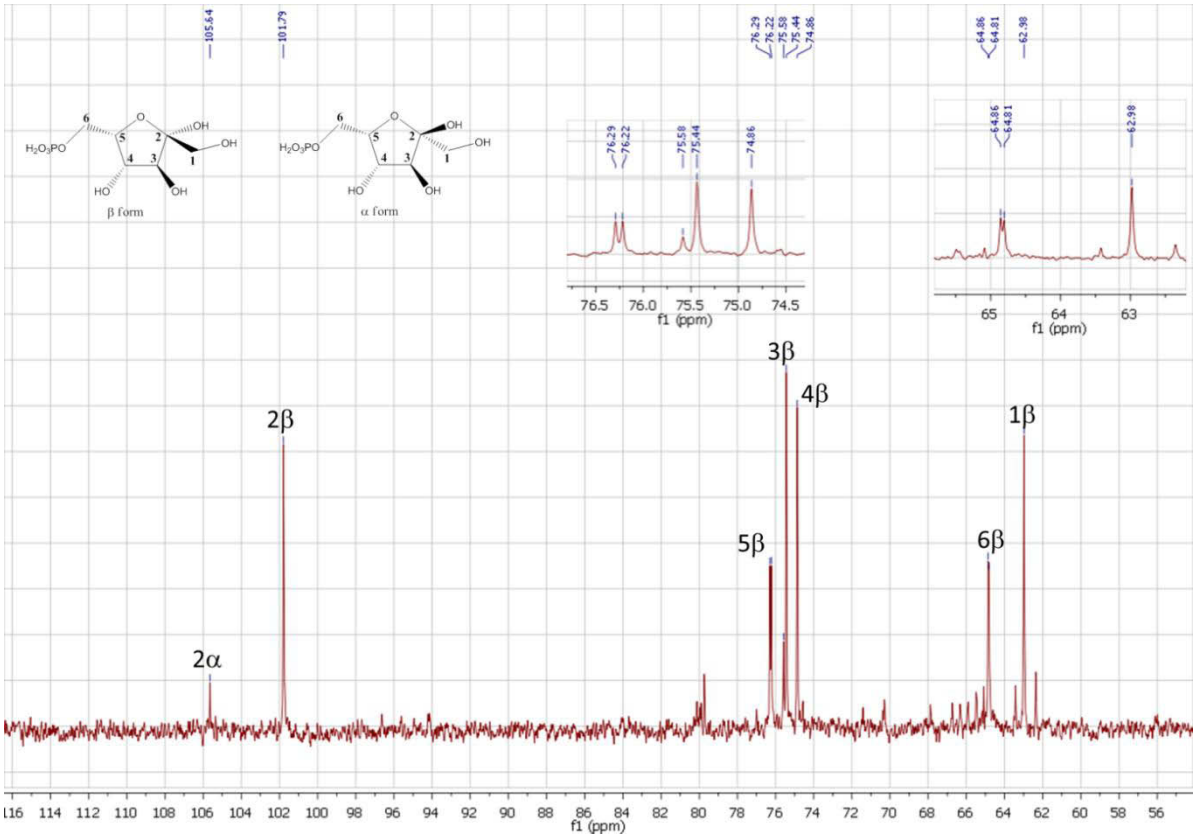
^{1}H NMR (400 MHz, DCl) δ 4.43 (d, 1H, *J* = 1 Hz, H4l), 4,37-4.31 (m, 2H, H5β,H6β), 4.10 (dd, 1H, *J* = 1, 6.4 Hz, H5l), 4.05-3.91 (m, 6H, 4β, 6l, 2H7l, 2H7β), 2.61 (m, 2H, H2l), 1.73 (m, 2H, H2β), 0.99 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, H3l), 0.91 (m, 3H, H3β); ^{13}C NMR (100 MHz, DCl) δ 215.2 (3l), 103.2 (3β),77.5 (4β),76.8 (4l), 75.6 (d, *J* = 8.0 Hz ,6β), 75.0 (5β), 71.3 (5l), 70.8 (d, *J* = 7.9 Hz, 6l), 66.4 (d, *J* = 4.4 Hz, 7l), 64.7 (d, *J* = 4.2 Hz, 7β), 31.9 (2l), 30.0 (2β), 7.0 (1β), 6.7 (1l). $[\alpha]_D^{20}$ = +7 (c = 0.9, HCl 1N). HRMS ESI-, m/z calcd. for [$C_7H_{15}O_8P$-H] = 257.0426; found 257.0421.

5- NMR spectra

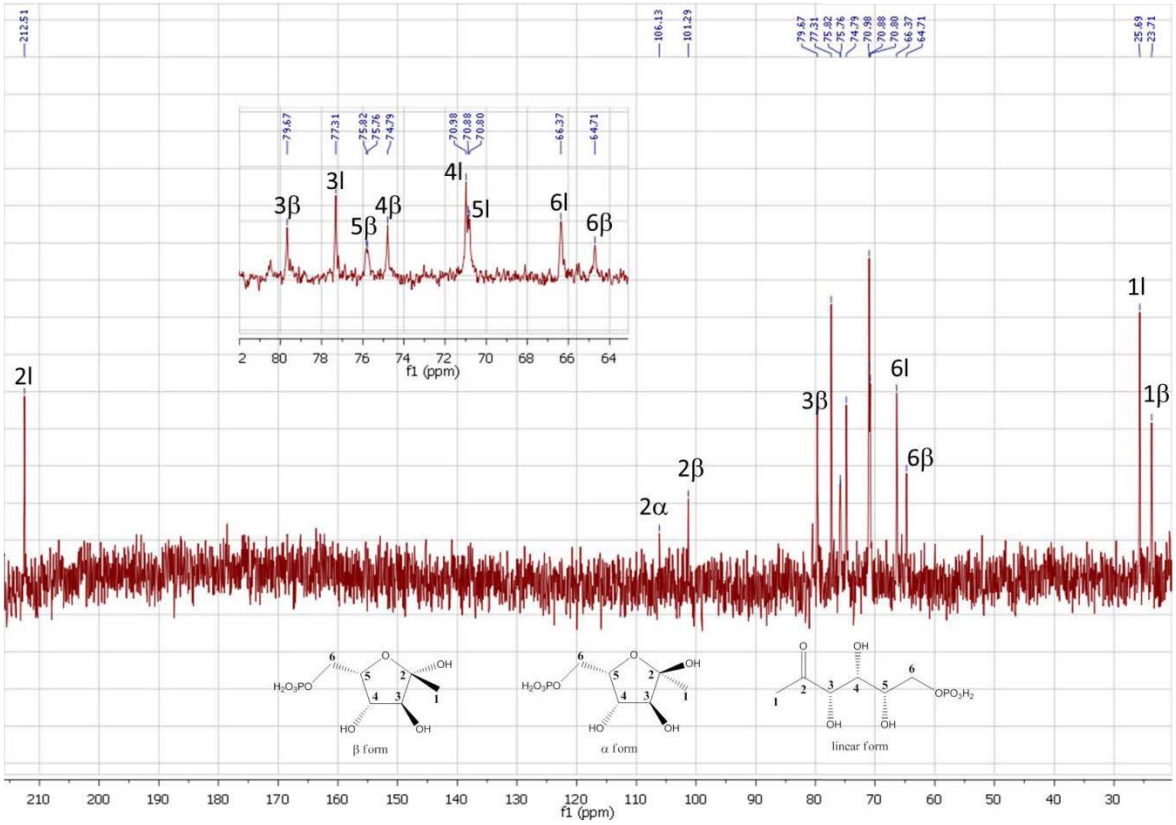
^{13}C-NMR spectrum of compound **2:**



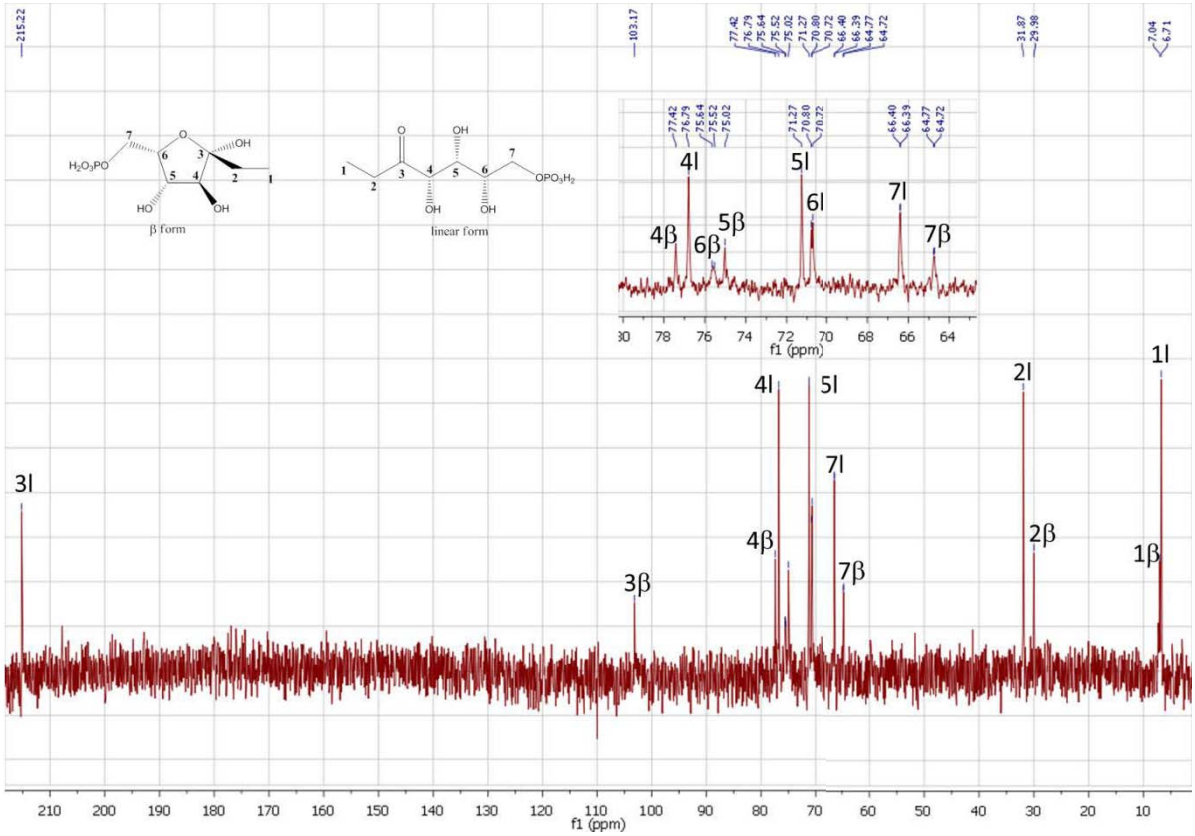
^{13}C-NMR spectrum of compound **3:**



^{13}C-NMR spectrum of compound **4:**



^{13}C-NMR spectrum of compound **5**



IV.3.2.3. Réalisation de la cascade en phase hétérogène

Les cascades conçues pour la synthèse des sucres L implique trois enzymes qui sont la PK, la GK et la FSA. Comme dans la première partie de ce chapitre, nous avions immobilisé avec succès la FSA et la PK dans les HDL, il ne restait qu'à étudier l'encapsulation de la GK de *Cellulomonas sp.*. Les trois matrices utilisées dans l'étude précédente (Mg_2Al-HDL, Zn_2Al-HDL et MgZnAl-HDL) ont été testées en co-précipitation. En partant d'un rapport HDL/enzyme de 20/1 permettant la correspondance avec la phase homogène, nous avons pu immobiliser 100% de la protéine dans chacune des trois matrices. Malheureusement, l'activité retenue ne représente que 5 à 10% de l'activité initiale dans les trois matrices, ce résultat est illustratif d'une désactivation ou instabilité très importante de la GK. L'activité de la GK dans le matériau n'était pas suffisante pour réaliser cette cascade en phase hétérogène. Par manque du temps, l'étude nécessaire pour résoudre ce problème n'a pas pu être mise en place. Les alternatives seraient par exemple d'essayer une GK thermostable d'un organisme thermophile (par exemple *Geobacillus stearothermophilus*), d'essayer d'adsorber l'enzyme sur les HDL ou de changer la matrice.

IV.4. Conclusion

Nous avons réussi à réaliser une cascade enzymatique pour la synthèse de métabolites naturels en immobilisant plusieurs enzymes dans les HDL. Un premier bionanoréacteur bi-enzymatique PK_{Gstea}-DHAK@Mg_2Al a été préparé afin de produire le DHAP à partir de la DHA. Le pourcentage d'encapsulation et l'activité retenue ont atteint 100% et 50% respectivement pour les deux enzymes. Ce bionanoréacteur a catalysé à la même vitesse la formation du DHAP par comparaison avec le système en phase aqueuse homogène. Il a pu être recyclé trois fois. Son utilité en biocatalyse a été démontrée en synthétisant quatre sucres phosphorylés en position 1 avec des bons rendements. Les synthèses de ces sucre phosphorylés ont été faites en une seule étape à partir de la DHA, en ajoutant une aldolase DHAP-dépendante et un aldéhyde accepteur au milieu réactionnel. Il faudra noter que les deux kinases ont été immobilisées pour la première fois dans une matrice inorganique. Encouragés par ces bons résultats, nous avons poursuivi avec la préparation d'un second bionanoréacteur tétra-enzymatique PK_{Gstea}-DHAK-TPI-FSA_{A129S}@MgZnAl. Ce système complexe a permis de produire directement le D-F6P à partir de la DHA avec un rendement de 90%. Le pourcentage d'encapsulation des protéines était de 100% dans tous les cas, les activités retenues étaient de 50% pour la DHAK, 50% pour la PK_{Gstea} et 90% pour la TPI et la FSA_{A129S}. Le bionanoréacteur a été recyclable, gardant 22% de l'activité de la DHAK et 85% des activités des autres enzymes après le troisième cycle. La

stabilité au cours du temps a été améliorée pour la PK_{Gstea}, la FSA_{A129S} et la TPI, par contre elle est moins bonne pour la DHAK en comparaison avec l'enzyme libre en solution. La performance de ce système étant handicapée par la stabilité de la DHAK, nous étudions actuellement la possibilité de la remplacer par une autre qui n'aurait pas ou moins ce défaut. Pour cela, nous avons commencé par une autre construction du histag, en C-terminal ou en N-terminal de la même protéine. Si les résultats sont toujours négatifs, nous pourrons alors chercher une DHAK issue d'un organisme thermophile. Ces travaux sont en cours et ne peuvent pas être présentés dans ce manuscrit.

Nous avons réussi également à concevoir de nouvelles cascades enzymatiques pour la synthèse de sucres phosphorylés de série L à partir de substrats achiraux selon une démarche respectant pleinement les principes de la chimie verte. L'enzyme clé de ces cascades, la FSA, a démontré une fois de plus son efficacité pour la synthèse de composés polyfonctionnels optiquement purs. La gestion des équilibres en jeu dans ces systèmes a été menée en ajustant finement les proportions d'enzymes, leurs quantités en unité et les quantités de substrats. D'une part, le L-G3P a été préparé en un seul pot avec un rendement de 72% par combinaison de réactions en cascades linéaire et orthogonale à partir du glycolaldéhyde, du formaldéhyde et du PEP comme source de phosphate. Un excès de formaldéhyde a permis de minimiser la formation du D-thréose comme produit secondaire. D'autre part, grâce à un procédé un seul pot et deux étapes, 3 sucres phosphorylés rares ont été préparés à partir du L-G3P généré in situ et les 3 cétones donneurs de la FSA. De plus, dans le cas du donneur glycolaldéhyde, toute la cascade a pu fonctionner en un seul pot et une seule étape. Ces sucres ont été isolés avec des rendements compris entre 79 et 85 %. La prolongation de ce travail était d'encapsuler dans des HDL, les enzymes catalysant ces cascades. Malheureusement l'immobilisation de la GK a abouti à la perte de la quasi-totalité de l'activité ce qui n'a pas permis de finaliser cette étude.

Conclusion et perspectives

1. Conclusion

Le premier objectif de ce projet était d'étudier de façon plus exhaustive l'immobilisation de la FSA dans les HDL. Le variant FSA_{A129S} a été sélectionné pour compléter un travail mené en 2011. L'immobilisation de cette enzyme dans les HDL a été réalisée selon deux méthodes : par la formation de la structure d'HDL en présence de l'enzyme par coprécipitation et par adsorption sur des HDL préparés au préalable.

Pour la première méthode, nous avons fait varier la composition des feuillets en testant différents métaux ainsi que le rapport enzyme/HDL pour en déterminer les effets sur les taux d'encapsulation, les activités retenues, la structure et la morphologie des biohybrides. En partant d'un rapport enzyme/HDL de 1/1 (en masse), des taux d'encapsulation de 0.9 -1 mg de protéines par mg d'HDL ont été obtenus dans les matrices Mg_2Al-HDL, Mg_4Al-HDL et MgZnAl-HDL et de 0.5 mg/mg dans la matrice Zn_2Al-HDL. Les pourcentages d'activité retenue sont compris entre 72 et 92% pour ces matrices. En faisant varier le rapport enzyme/HDL de 0,25/1 à 4/1 dans Mg_2Al-HDL, le meilleur taux d'encapsulation a atteint 1,6 mg prot/mg HDL (pour le rapport 4/1) correspondant à un biohybride d'activité spécifique de 7,7 U/mg de gel. Ces résultats illustrent la capacité exceptionnelle des différentes matrices d'HDL à confiner efficacement des enzymes tout en préservant leur conformation et leur activité. Par ailleurs, la stabilité de la FSA en présence du co-solvant (DMF), le plus utilisé pour dissoudre certains aldéhydes accepteurs, est améliorée de 20% lorsque cette enzyme est immobilisée. Sur le plan structural, en faisant varier le rapport enzyme/HDL de 0,25/1 à 4/1 dans Mg_2Al-HDL, une exfoliation progressive de la structure lamellaire a été observée, ce qui se traduit par la diminution de l'intensité et l'élargissement des raies du diffractogramme de RX. La présence de l'enzyme durant la formation des feuillets d'HDL induit un changement de la morphologie et de la taille des particules.

Pour la deuxième méthode, l'adsorption de l'enzyme a été réalisée (pH = 8) sur des HDL de différentes compositions (Mg_2Al-CO_3, Mg_2Al-NO_3, Mg_2Al-DDS, Mg_4Al-NO_3). Des fortes interactions entre l'enzyme et l'HDL ont été mise en évidence : L'enzyme s'adsorbe fortement jusqu'à la saturation des sites du support. Le taux d'adsorption maximal a été obtenu avec la matrice Mg_2Al-NO_3 (0.7 mg d'enzymes/mg d'HDL) à pH = 8. L'HDL Mg_2Al possède une surface spécifique plus grande que celui Mg_4Al, son précurseur nitrate est révélé comme meilleur choix pour l'adsorption. L'augmentation de la valeur du pH améliore ce taux : 0.9 mg d'enzymes/mg d'HDL sont adsorbés à pH = 9, ceci corrèle avec le p.i.e. élevé (7.1) de cette enzyme. La structure de l'HDL est conservée après adsorption/échange anionique de l'enzyme : une légère exfoliation de la structure est mise en évidence puisque les deux phénomènes impliquent des interactions avec la surface de l'HDL.

En conclusion, la coprécipitation et l'adsorption sont deux stratégies bien adaptées à l'immobilisation des enzymes dans et sur les HDL grâce aux conditions douces compatibles avec la

préservation de l'activité enzymatique. En phase avec d'autres études d'immobilisation par le groupe HDL de l'ICCF, la coprécipitation s'avère la méthode de choix car le taux d'encapsulation est nettement meilleur que celui obtenu par adsorption.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'immobilisation de la FSA dans une matrice hybride HDL/polysaccharide. Il s'agissait ici d'obtenir une macrostructuration des biohybrides enzyme@HDL sous forme de billes pour faciliter leur manipulation. Pour cela, nous avons d'abord criblé différents polysaccharides pour sélectionner le plus adapté. Parmi tous les polysaccharides testés, trois ont été retenus (alginate, cellulose oxydée et ι-carraghénane) en prenant en compte la faisabilité de préparation des billes dans des conditions compatibles avec l'enzyme, notamment le pH. Une étude de stabilité de la FSA dans les solutions de ces polysaccharides avant gélification a montré que l'enzyme conserve la totalité de son activité. Le meilleur taux d'encapsulation étant obtenu avec un carraghénane de type iota, ce polysaccharide a été sélectionné pour une étude plus approfondie de l'encapsulation. En faisant varier la quantité d'enzyme à encapsuler dans les billes, la saturation est atteinte : nous avons pu immobiliser 2.5 mg d'enzymes/g de gel, ce qui correspond à 2.4 U/g de gel. Une perte d'enzymes durant l'étape de la gélification est décelée. Egalement, des problèmes d'accessibilité des sites actifs et de diffusion moléculaire des substrats ont causé la perte d'activité encapsulée.

En faisant varier les masses du biohybride FSA@Mg_2Al-HDL à encapsuler dans les billes d'ι-carraghénane, la saturation est atteinte pour une valeur d'activité encapsulée qui est 3 fois plus grand que celle pour l'enzyme libre. La meilleure activité encapsulée était de 6.8 U/g de gel. Ceci est attribué aux interactions ioniques favorables entre l'HDL qui est chargé positivement et le polymère chargé négativement.

Afin d'apporter une preuve de concept du potentiel catalytique de ces billes (FSA@Mg_2Al-HDL/ι-carr), une réaction d'aldolisation à petite échelle a été mise en œuvre. Le produit attendu a été obtenu avec un rendement de 80%. Les billes obtenues sont réutilisables pour 4 cycles dans du KCl (1M) sans une perte significative d'activité. Le travail en solution saline a été nécessaire pour préserver l'intégrité physique du gel polysaccharide.

Dans cette partie, nous avons exploré une nouvelle matrice hybride pour l'immobilisation de la FSA. Nous avons trouvé que l'utilisation des HDL permet d'augmenter le taux d'encapsulation de l'enzyme. Celui-ci reste cependant modeste et cette approche n'a pas été poursuivie dans ce travail de thèse.

Le troisième objectif de ce travail concerne les cascades enzymatiques pour la synthèse des sucres phosphorylés de série D et L.

Dans la première partie, notre but était de concevoir des nanoréacteurs encapsulant un système cascade multienzymatique pour la synthèse de sucres phosphorylés de série D en phase hétérogène.

L'idée ici est d'associer directement plusieurs enzymes dans la même matrice HDL, ce qui n'avait encore jamais été exploré. Les cascades multienzymatiques avaient déjà été mises au point en phase aqueuse homogène lors d'un travail antérieur à cette thèse. Un premier bionanoréacteur a été préparé par coprécipitation de l'HDL en présence de deux enzymes, la PK_{Gstea} et la DHAK. Associées, ces deux enzymes permettent la formation du DHAP à partir de la DHA à l'échelle semi-préparative. La matrice Mg_2Al-HDL choisie a permis d'encapsuler 100% des enzymes avec une rétention de 50% de l'activité pour chacune des enzymes. Il est à noter que l'immobilisation des ces deux enzymes n'avait encore jamais été exploré. Le biohybride a été utilisé pour synthétiser le DHAP avec un rendement analytique de 100%. Il a catalysé la réaction de phosphorylation avec la même vitesse que celle obtenue avec les enzymes libres et a été réutilisable pour 3 cycles. Par ailleurs, nous l'avons mis en œuvre pour réaliser la synthèse de quatre sucres phosphorylés en position 1 en ajoutant au milieu une aldolase DHAP-dépendante et un aldéhyde accepteur. Ces sucres ont été isolés avec d'excellents rendements et une bonne pureté, démontrant l'efficacité du système en biocatalyse. Encouragés par ces bons résultats, un deuxième bionanoréacteur a été préparé par coprécipitation de quatre enzymes : la PK_{Gstea}, la DHAK, la TPI et la FSA_{A129S}. C'est la matrice MgZnAl-HDL qui est la plus appropriée, sélectionnée suite à un criblage de trois matrices d'HDL, les enzymes étudiées séparément. Le pourcentage d'encapsulation a atteint 100% dans quasiment tous les cas. Les activités retenues étaient de 50%, 50%, 90% et 92% pour la PK_{Gstea}, la DHAK, la TPI et la FSA_{A129S} respectivement. Ce bionanoréacteur tetraenzymatique a été utilisé pour réaliser la synthèse du D-F6P en partant uniquement de la DHA et du PEP pour l'apport du phosphate. La réaction a avancé avec la même vitesse que celle en utilisant les enzymes libres. Le D-F6P a été isolé pur avec un rendement de 90%. Ce système s'est révélé recyclable trois fois. Cependant après ce troisième cycle, si les activités retenues étaient de 86%, 85% et 84% pour la PK_{Gstea}, la TPI et la FSA_{A129S} respectivement, celle de la DHAK a chuté de façon beaucoup plus forte (22%). Ainsi ce dernier résultat révèle que la performance du bionanoréacteur est limitée par la stabilité de la DHAK.

La deuxième partie a été consacrée à l'élaboration de cascades multienzymatiques dédiées à la synthèse de sucres phosphorylés rares de série L en utilisant le L-G3P comme substrat accepteur de la FSA. La première étape de ce travail était de d'abord mettre au point le système en phase aqueuse homogène pour ensuite l'encapsuler comme décrit ci-dessus dans la deuxième étape. Après avoir démontré que la FSA accepte bien le L-G3P comme substrat accepteur, une stratégie économique de production de L-G3P in situ en partant des substrats simples et achiraux (formaldéhyde et GA) a été entreprise. En utilisant la GK, PK et la FSA et ses quatre donneurs, quatre nouveaux sucres phosphorylés de série L (L-xylose-5-phosphate, L-sorbose-6-phosphate, L-désoxy-L-sorbose-6-phosphate et 1,2-didésoxy-L-*xylo*-hept-3-ulose-7-phosphate) ont été synthétisés avec des bons rendements (79-86%). Les verrous à lever dans cette étude ont été le déplacement d'équilibre en faveur du produit souhaité et la limitation de la formation de produits secondaires. Ainsi ces cascades

ont été réalisées en une seule étape avec le GA comme donneur et en deux étapes pour les autres donneurs (HA, HB, DHA), en laissant le L-G3P s'accumuler initialement.

Des essais préliminaires d'encapsulation de la GK n'ont pas conduit à des résultats positifs, seulement 5-10% de l'activité initiale a été retenue. Dans ces conditions et par manque de temps, il n'a pas été possible d'immobiliser le trio enzymatique.

2. Perspectives

Un des objectifs de cette thèse a été consacré à l'élaboration de bionanoréacteurs mono-enzymatiques basé sur l'immobilisation de la FSA_{wt} dans une matrice hybride HDL/polysaccharide. Les résultats obtenus sont modestes et ne nous ont pas encouragés à poursuivre dans cette voie. Cependant, il est possible d'envisager de remplacer la matrice polysaccharide par une matrice polymérique connue pour être plus efficace comme l'alcool polyvinylique développé dans la technologie LentiKats®. La conception de bionanoréacteurs FSA/HDL/ LentiKats® pourrait avoir des résultats intéressants en termes de pourcentage d'encapsulation, de rétention d'activité, de stabilité et d'amélioration des propriétés catalytiques de l'enzyme. Les systèmes enzyme/LentiKats® souffrent généralement d'un problème de relargage d'enzyme, relargage qui pourrait être limité grâce à la présence de l'HDL apporté par le biohybride enzyme@HDL.

Nous nous sommes ensuite penchés sur la conception de cascades enzymatiques en phase homogène et hétérogène. Pour améliorer les biohybrides conçus pour la synthèse des composés d'intérêt (DHAP, D-F6P) en phase hétérogène, il faut travailler sur l'enzyme DHAK qui s'est révélée la plus fragile. La solution serait de chercher une autre DHAK plus stable dans la biodiversité ou de concevoir une autre construction du tag (C-terminal et N-terminal) afin d'augmenter le temps de vie du bionanoréacteur ainsi que sa recyclabilité. À terme, sur un plan plus général, il serait également intéressant de contrôler l'agencement des enzymes dans le matériau pour s'approcher des systèmes biologiques en réseau dans lesquels on observe une cinétique améliorée.

La cascade multienzymatique pour la synthèse des sucres phosphorylés de série L a été réalisée avec un franc succès. Cependant, nous n'avons pas pu construire cette cascade en phase hétérogène puisque la GK a perdu quasiment la totalité de son activité après immobilisation. Il faudra donc rechercher une GK provenant d'une autre source microbienne, plus résistante à l'immobilisation, comme par exemple celle du thermophile *Geobacillus stearothermophilus*.

Ce travail de thèse nous a permis d'explorer différentes stratégies pour la conception de bionanoréacteurs mono- et multi-enzymatiques. Le développement de tels bionanoréacteurs pourrait permettre de répondre à des applications potentielles dans le domaine industriel.

Annexes

I. Purification des enzymes

1- Purification de la FSA_{wt} et de la FSA_{A129S}

Le culot congelé (5 g, 1 litre de culture) est resuspendu dans 40 mL de tampon de lyse (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH = 8). Les cellules mises dans un bain de glace, sont lysées par sonication pendant 40 minutes, avec des intervalles de 10 secondes de pulsations suivies de 15 secondes de repos, avec 50 % d'amplitude. La suspension est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 12000 rpm, à 4°C. Le surnageant ainsi récupéré constitue l'extrait cellulaire brut noté aussi lysat.

Cet extrait contenant la FSA (*wt* ou A129S) recombinante d'intérêt, exprimée avec une étiquette 6-His, est introduit dans une colonne contenant la résine NTA chargée en Nickel (14 mL) préalablement bien lavée avec de l'eau déionisée. La résine alors chargée en protéines est lavée avec du tampon de lavage (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH = 8) jusqu'à l'absence de protéines en sortie de colonne (vérification par le test de Bradford : 200 µL de réactif de bradford + 10 µL de la solution). La FSA est ensuite éluée avec un tampon d'élution (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH = 8), jusqu'à l'absence de protéines en sortie de colonne.

Les fractions contenant la FSA sont rassemblées puis dialysées afin d'éliminer l'imidazole et de le remplacer par le tampon glycylglycine. La solution obtenue est donc introduite dans un « boudin de dialyse » qui est mis sous agitation durant une nuit à 4°C dans environ 3 L du tampon glycylglycine (50 mM, pH 7,5). Le mélange enzyme/glycylglycine est ensuite lyophilisé et l'enzyme sera stockée sous forme de poudre (40-50% de glycylglycine).

A partir de 5 g de culot, on obtient environ 130 mg de FSA d'activité spécifique 1.6 U/mg pour la FSA_{wt} et 5.5 U/mg pour la FSA_{A129S} (dosage à 25°C).

2- Purification de la DHAK

Le culot congelé (3.9 g, 1 litre de culture) est resuspendu dans 35 mL de tampon de lyse (50 mM NaH_2PO_4, pH = 7.5). Les cellules mises dans un bain de glace, sont lysées par sonication pendant 40 minutes, avec des intervalles de 8 secondes de pulsations suivies de 15 secondes de repos, avec 50 % d'amplitude. La suspension est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 12000 rpm, à 4°C. Le surnageant est alors introduit dans une colonne contenant la résine NTA chargée en Nickel (15 mL) préalablement équilibré avec un tampon Na_2HPO_4 (50 mM, pH = 7.5). La résine est ensuite lavée avec du Na_2HPO_4 (50 mM, pH = 7.5) jusqu'à l'absence de protéines en sortie de colonne (vérification par le test de Bradford : 200 µL de réactif de bradford + 10 µL de la solution). La DHAK est ensuite

décrochée de la résine avec un tampon d'élution (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH = 7.5), jusqu'à l'absence de protéines en sortie de colonne.

Les fractions contenant la DHAK sont introduites dans un « boudin de dialyse » qui est mis sous agitation durant une nuit à 4°C dans environ 3 L de l'eau déionisé (pH 7,5). L'enzyme est ensuite lyophilisée et stockée sous forme de poudre.

A partir de 3.9 g de culot, on obtient 105 mg de DHAK d'activité spécifique 1.1 U/mg (dosage à 25°C).

3- Purification de la PK_{Gstea}

Le culot congelé (4 g, 1 litre de culture) est resuspendu dans 35 mL de tampon Tris (50 mM, pH = 7.5). Les cellules mises dans un bain de glace, sont lysées par sonication pendant 40 minutes, avec des intervalles de 10 secondes de pulsations suivies de 15 secondes de repos, avec 50 % d'amplitude. La suspension est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 12000 rpm, à 4°C. Le surnageant est introduit dans une colonne contenant la résine NTA chargée en Nickel (15 mL) préalablement équilibré avec un le tampon Tris (50 mM, pH = 7.5). La résine est ensuite lavée avec un tampon (50 mM Tris, 20 mM imidazole, pH = 7.5) jusqu'à l'absence de protéines en sortie de colonne (vérification par le test de Bradford : 200 µL de réactif de bradford + 10 µL de la solution). La PK est ensuite décrochée de la résine avec un tampon d'élution (50 mM Tris, 250 mM imidazole, pH = 7.5), jusqu'à l'absence de protéines en sortie de colonne.

Les fractions contenant la PK sont introduites dans un « boudin de dialyse » qui est mis sous agitation durant une nuit à 4°C dans environ 3 L du tampon Tris (50 mM, pH 7,5). L'enzyme est ensuite lyophilisée et stockée sous forme de poudre.

A partir de 4 g de culot, on obtient 135 mg de PK d'activité spécifique 210 U/mg pour le dosage à 30°C, et 130 U/mg si le dosage est fait à 25°C.

II. Dosage de l'activité des enzymes

L'activité enzymatique est un paramètre utilisé pour mesurer quantitativement les effets que l'enzyme provoque et qui s'exprime en unité enzymatique. Cette unité enzymatique correspond à la transformation d'une micromole de substrat par minute dans les conditions utilisées. Sur le plan général, l'activité enzymatique dépend de plusieurs facteurs : la nature du substrat puisque la vitesse de la réaction enzymatique diffère selon la nature du substrat, les cofacteurs et coenzymes dont la présence est indispensable pour l'activité de certaines enzymes, la nature du solvant, le pH du milieu et la température.

L'activité spécifique d'une enzyme correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par unité de temps et par mg d'enzyme (micromol.min^{-1}.mg^{-1} = U.mg^{-1})[325]. L'activité spécifique d'une enzyme peut facilement être déterminée par spectrophotométrie UV. Souvent les dosages envisagés utilisent le NADH qui absorbe à 340nm. Grâce à la loi de Beer-Lambert, ce type de dosage donne accès à l'activité spécifique:

$$DO\ (340\ nm) = \varepsilon.l.C \text{ et } \frac{\Delta DO}{\Delta t} = \frac{\varepsilon l \Delta c}{\Delta t} \text{ donc, } \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta DO}{\Delta t \varepsilon l}$$

Avec l = 1 cm et $\varepsilon_{(NADH)}$ = 6220 M^{-1}.cm^{-1}
C = concentration de la solution (mol^{-1}.L^{-1})

L'activité est alors obtenue en divisant la pente ($\frac{\Delta DO}{\Delta t}$) par ε.l

$$Activité = \frac{pente}{\varepsilon.l}$$

L'activité est alors obtenue en mol.L^{-1}.min^{-1}, cependant on cherche à l'obtenir en µmol.vcuve^{-1}.min^{-1} :

$$Activité = \frac{pente}{\varepsilon.l} \times 10^6 \times vcuve = \frac{pente}{\varepsilon.l} \times 10^3 \text{ si vcuve= 1 mL}$$

On obtient alors l'activité présente dans la cuve de dosage (en U), il faudra ensuite la rapporter en U/mg en divisant la valeur obtenue par le nombre de mg d'enzymes présent dans la cuve.

1- Dosage de l'activité de la FSA

Il existe deux méthodes pour mesurer l'activité spécifique de la FSA. Elles ont été introduites par Sprenger et al.[156] La première implique le dosage du D-F6P formé au cours du temps par deux enzymes auxiliaires : la phosphoglucose isomerase et la glucose-6-phosphate dehydrogenase. La consommation de NADPH est suivie par spectrophotométrie à 340 nm. La deuxième méthode suit la réaction de rétro-aldolisation du D-F6P (Schéma 1). On peut alors doser soit la conversion du DHA par la glycérol déshydrogenase (GDH) ou bien, doser la conversion du G3P en glycérol phosphate en utilisant la triose phosphate isomérase (TPI) et la glycérophosphate déshydrogénase (GPDH). Nous n'avons mis en œuvre que la deuxième méthode (voie 1 et 2) utilisant la réaction de rétroaldolisation. Dans ce cas, une unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme qui coupe 1 µmol de D-F6P ; ce qui est équivalent à la consommation de 1 µmol de NADH.

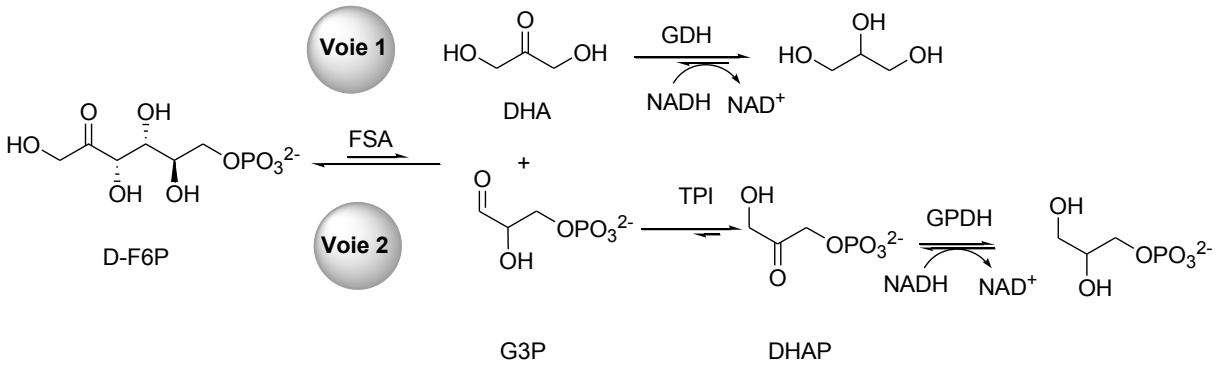


Schéma 1 : **Principe de dosage de l'activité spécifique de la FSA**

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 930 µl de glycylglycine (50 mM, pH = 8)
- 20 µL de NADH (sel disodique, 10 mg/mL)
- 30 µL de D-F6P (sel disodique, 430 mg/mL)
- 3 U de GPDH, 30 U de TPI (ou bien 2 U de GDH)
- 10 µl d'une solution diluée de FSA (2.0-4.0 µg)

Le dosage est fait à 25°C. La réaction est initiée par l'ajout de la FSA. La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm pendant 8 minutes.

2- Dosage de l'activité de la DHAK

La DHAK catalyse la réaction de formation du DHAP à partir du DHA. La formation du DHAP peut être dosée par la GPDH qui est NADH dépendante[276]. La réaction de dosage de l'activité de DHAK est représentée dans le Schéma 2. Dans ce cas, une unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol de DHA ; ce qui est équivalent à la consommation de 1 µmol de NADH.

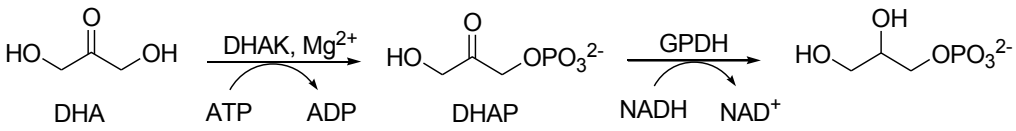


Schéma 2 : Réaction de dosage de l'activité de la DHAK

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 880 µL du Tris (50 mM, pH = 7.5)
- 20 µL de NADH (sel disodique, 10 mg/mL)

- 75 µL d'ATP (sel disodique, 28 mg/mL)
- 10 µL de $MgCl_2.6H_2O$ (100 mg/mL)
- 2 U de GPDH
- 10 µL d'une solution diluée de DHAK (2.5-5.0 µg)
- 2.5 µL de DHA (90 mg/mL)

Le dosage est fait à 25°C. La réaction est initiée par l'ajout du DHA. La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm pendant 8 minutes.

3- Dosage de l'activité de la PK_{Gstea}

L'activité de la PK_{Gstea} est mesurée en quantifiant le pyruvate produit par la déphosphorylation du PEP[298] (Schéma 3). Dans ce cas, une unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol de PEP ; ce qui est équivalent à la consommation de 1 µmol de NADH.

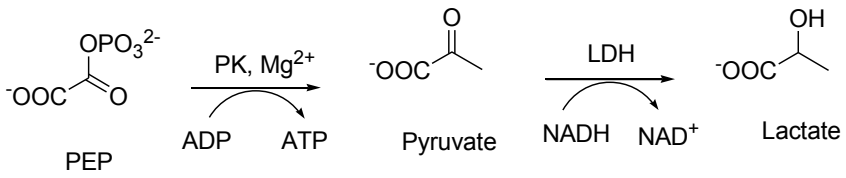


Schéma 3 : Dosage de l'activité de la PK_{Gstea}

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 860 µL d'imidazole-HCl (50 mM, pH = 7.2)
- 13 µL de KCl (300 mg/mL)
- 14 µL de $MgCl_2.6H_2O$ (100 mg/mL)
- 5 µL de PEP (68 mg/mL, 0.4 M, solution préalablement dosée)
- 80 µL d'ADP (sel sodique, 22 mg/mL)
- 20 µL de NADH (sel disodique, 10 mg/mL)
- 5 U LDH
- 10 µL d'une solution diluée de PK_{Gstea} (0.02-0.04 µg)

Le dosage est fait à 25°C. La réaction est initiée par l'ajout de la PK_{Gstea}. La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm pendant 8 minutes.

4- Dosage de l'activité de la TPI

L'activité de la TPI est mesurée en quantifiant le DHAP formé par l'isomérisation du G3P[308] (Schéma 4). Dans ce cas, une unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol de G3P ; ce qui est équivalent à la consommation de 1 µmol de NADH.

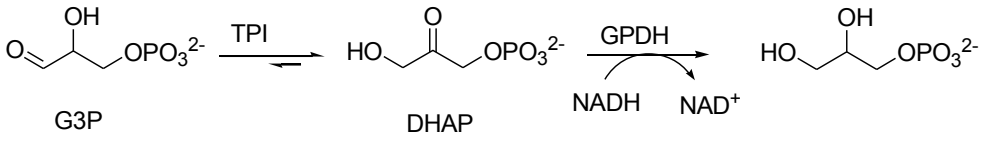


Schéma 4 : Dosage de l'activité de la TPI

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 900 µL de Tris (50 mM, pH = 8)
- 20 µL de NADH (sel disodique, 10 mg/mL)
- 40 µL de D, L-G3P (120 mM, pH = 7, solution préalablement dosée)
- 2 U de GPDH
- 10 µL d'une solution diluée de TPI (2 ng)

Le dosage est fait à 25°C. La réaction est initiée par l'ajout de la TPI. La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm pendant 8 minutes.

III. Synthèse du PEP[326]

Nous avons préparé le PEP à partir de l'acide bromopyruvique en deux étapes, comme le montre le Schéma 5.

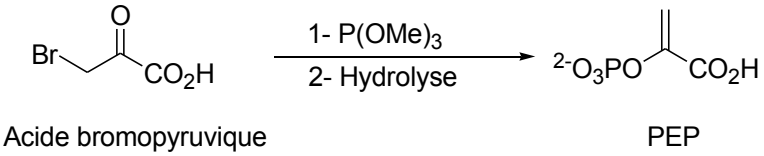


Schéma 5 : Synthèse du PEP

Dans un ballon de 250 mL préalablement séché à l'étuve, on place 8 mL de triméthylphosphite dans 60 mL de THF anhydre. En utilisant une ampoule de coulée, on ajoute ensuite une solution d'acide bromopyruvique (10 g dans 15 mL de THF anhydre), goutte à goutte. Le milieu

réactionnel est agité et chauffé à reflux pendant 12h. Ensuite, le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. La masse du produit intermédiaire est de 11.94 g (60.9 mmol). Le rendement de cette étape est de 102%.

40 mL d'eau sont ensuite ajoutés afin d'hydrolyser le produit obtenu sous agitation. Des contrôles CCM ont été réalisés pour pouvoir suivre la réaction à t = 30 min, 1h 30, 4h, 6h et 12h, dans un mélange isopropanol/eau (7 :3). Le produit non hydrolysé apparait encore en CCM à t = 6h, la réaction est finie à t=12h.

Une solution de potasse (3 M, 100 mL) est ensuite ajoutée jusqu'à pH 2.8 (sachant que le pH initial était de 1). Le mélange est concentré à l'évaporateur rotatif. 40 mL d'éthanol sont ensuite ajoutés afin de faire cristalliser le produit dans un bain de glace. Le solide est ensuite filtré et séché. La masse du PEP obtenu est de 6.9 g ce qui représente un rendement de 56% pour cette étape. Le dosage enzymatique du PEP montre une pureté de 100%.

IV. Dosage des substrats

Plusieurs substrats ont été dosés en suivant leur consommation en ajoutant des enzymes qui les transforment. Une des enzymes utilisés doit être NADH-dépendante pour pouvoir quantifier la consommation du substrat à 340 nm. La concentration du substrat est calculée à partir de la différence entre l'absorbance initiale et l'absorbance finale. En général, pour doser un substrat il faut introduire 1.10^{-7}- 2.10^{-7} mol de ce substrat dans la cuve.

D'après la loi de Beer-Lambert :

$DO\ (340\ nm) = \varepsilon.l.C$ donc, $C_0 = \frac{\Delta DO}{\varepsilon.l}$

Avec l = 1 cm et $\varepsilon_{(NADH)} = 6220\ M^{-1}.cm^{-1}$

C_0 *= concentration de la solution* $(mol^{-1}.L^{-1})$

La concentration (C_0) est alors obtenue en $mol.L^{-1}$ du milieu du dosage. Il faudra prendre en compte le volume de la cuve (1 mL). C_1 est obtenu alors en mol par mL, c'est la quantité du substrat dans la cuve.

$$C_1 = \frac{C_0}{1000}$$

Il faudra ensuite ramener la valeur obtenue à la solution initiale à doser en divisant C_1 par le volume prélevée de cette solution (en mL).

$$C_2 = \frac{C_1}{V(mL)}$$

C_2 est alors la concentration de la solution initiale en $mol.mL^{-1}$.

Dosage du PEP/Pyruvate :

Afin de déterminer la pureté du PEP synthétisé, il est nécessaire de le doser. Ce dosage utilise le même principe que celui présenté pour le dosage de l'activité de la PK_{Gstea} (Schéma 6).

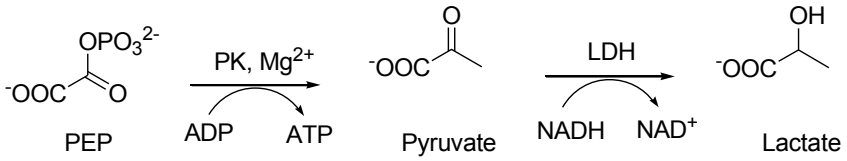


Schéma 6 : Dosage du PEP/pyruvate

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 970 µL de glycylglycine (50 mM, pH = 8)
- 20 µL de NADH (sel disodique, 10 mg/mL)
- 5 U de LDH
- 50 µL d'ADP (sel sodique, 22 mg/mL)
- 10 µL de $MgCl_2.6H_2O$ (100 mg/mL)
- 5 U de PK_{Gstea}
- 5 µL de l'échantillon à doser (il faudra l'ajouter après noter l'absorbance initiale)

La consommation du NADH est suivie à 340°C et à 25°C. 1 µmol de NADH consommé correspond à 1 µmol de pyruvate consommé et donc à 1 µmol de PEP. La différence entre l'absorbance initiale et finale nous donne la concentration en PEP.

Remarque : ce dosage est également utilisé pour doser le pyruvate lorsque l'on veut suivre son apparition à partir du PEP par exemple. Pour ce faire, la PK, l'ADP et le Mg ne sont pas additionnés dans la cuve. Ils peuvent l'être en fin de dosage pour contrôler la quantité restante de PEP.

Dosage du D, L-G3P

Le D, L-G3P peut être quantifié en utilisant la même réaction de dosage de l'activité de la TPI. Les solutions préparées ou conservées doivent être dosées avant leur utilisation. C'est le D-G3P qui est suivi au cours du dosage.

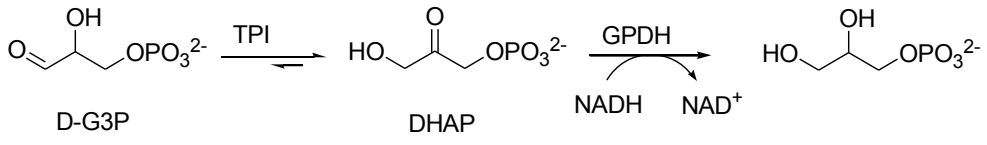


Schéma 7 : Dosage du D-G3P

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 970 µL de glycylglycine (50 mM, pH = 8)

- 20 µL de NADH (sel disodique, 10 mg/mL)
- 4 U GPDH
- 8 U TPI
- 10 µL d'une solution diluée de D, L-G3P

L'absorbance initiale est noté avant l'initiation de la réaction qui se fait par l'ajout du D, L-G3P. 1 µmol de NADH consommée correspond à 1 µmol de D-G3P présente, puisque seulement le D est dosé par cette méthode. La concentration calculé est ensuite multipliée par deux afin d'obtenir la concentration en D, L-G3P.

Dosage du DHAP

Le DHAP est dosé en suivant sa consommation par la GPDH comme le montre le Schéma 8.

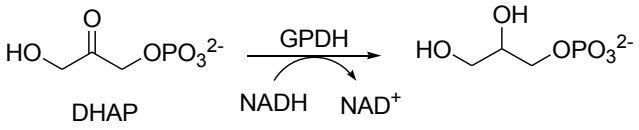


Schéma 8 : Dosage du DHAP

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 970 µL de Tris (50 mM, pH = 8)
- 20 µL de NADH (sel disodique, 10 mg/mL)
- 4 U de GPDH
- 10 µL d'une solution diluée de DHAP

L'absorbance initiale est notée avant l'initiation de la réaction qui se fait par l'ajout du DHAP. 1 µmol de NADH consommée correspond à 1 µmol de DHAP. La différence entre l'absorbance initiale et finale nous donne la concentration en DHAP.

Dosage du HA

Le HA est dosé en suivant sa consommation par la GDH comme le montre le Schéma 9.

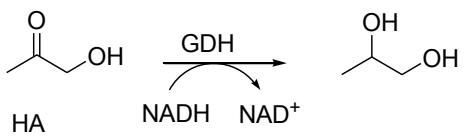


Schéma 9 : Dosage du HA

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 970 µL de glycylglycine (50 mM, pH = 8)
- 20 µL de NADH (sel disodique, 10 mg/mL)
- 4 U de GDH
- 10 µL d'une solution diluée de HA

L'absorbance initiale est notée avant l'initiation de la réaction qui se fait par l'ajout du HA. 1 µmol de NADH consommée correspond à 1 µmol de HA. La différence entre l'absorbance initiale et finale nous donne la concentration en HA.

Dosage du D-F6P

Le D-F6P a été dosé en utilisant deux enzymes auxiliaires : la phosphoglucose isomérase (PGI) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) comme le montre le Schéma 10.

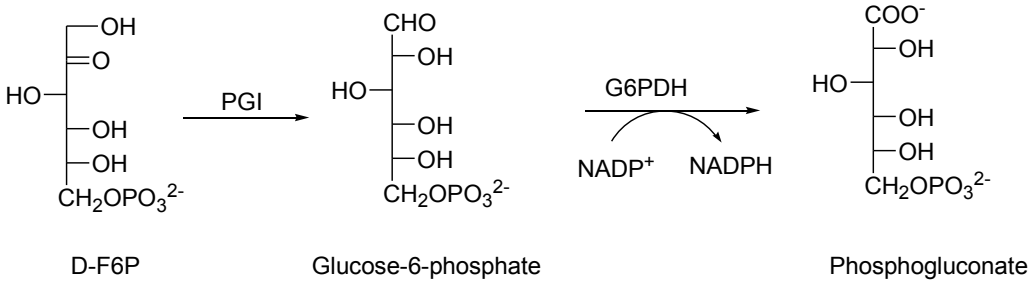


Schéma 10 : Dosage du D-F6P

Dans une cuve spectrophotométrique (Vcuve = 1 mL), sont introduits :

- 970 µL de Tris (50 mM, pH = 8)
- 10 µL de $NADP^+$ (sel disodique, 50 mM)
- 1 U de G6PDH
- 2 U de PGI
- 5 µL de la solution à doser

L'absorbance initiale est notée avant l'initiation de la réaction qui se fait par l'ajout du D-F6P. 1 µmol de NADPH formé correspond à 1 µmol de D-F6P consommée. La différence entre l'absorbance initiale et finale nous donne la concentration en D-F6P.

V. Dosage des protéines

Les protéines ont été quantifiées par le test de Bradford[327]. Le bleu de Coomasie G250 (coloration brune) qui est présent dans la solution de Bradford, se colore en bleu en formant des

complexes avec les protéines. La BSA (bovine serum albumine) est considérée comme protéine de référence. Une droite de calibration est tracée pour différentes concentrations de BSA (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 mg/mL) en mélangeant 1 mL de bradford et 20 µL de chacune des solutions. Une cuve est aussi réalisée avec 20 µL d'eau comme cuve de référence. Parallèlement, dans une dernière cuve, 1 mL de bradford est ajouté à 20 µL de la solution de concentration inconnue. Les cuves sont ensuite incubées pendant 10 minutes à l'abri de la lumière. Ensuite, leurs absorbances sont mesurés à 595 nm.

VI. Immobilisation des enzymes sur les HDL

1- Préparation de l'HDL

Les HDL utilisés dans cette thèse sont préparés par coprécipitation. Cette méthode consiste à ajouter les solutions de sels (solution de sels contenant les métaux divalents et trivalents dans des proportions adéquates) et de base simultanément à une vitesse constante dans un réacteur contenant de l'eau (ou le composé à intercaler dans l'eau, par exemple l'enzyme) à un pH constant et sous azote si on ne veut pas intercaler des ions carbonates. En effet, l'ion carbonate possède une plus grande affinité avec les hydroxydes doubles lamellaires. Le pH doit rester constant au cours de l'ajout si on veut obtenir un composé homogène. Lorsque l'addition est terminée, le produit obtenu est centrifugé puis lavé plusieurs fois et stocké sous forme d'une suspension dans l'eau. La Figure 1 représente le protocole expérimental de la coprécipitation.

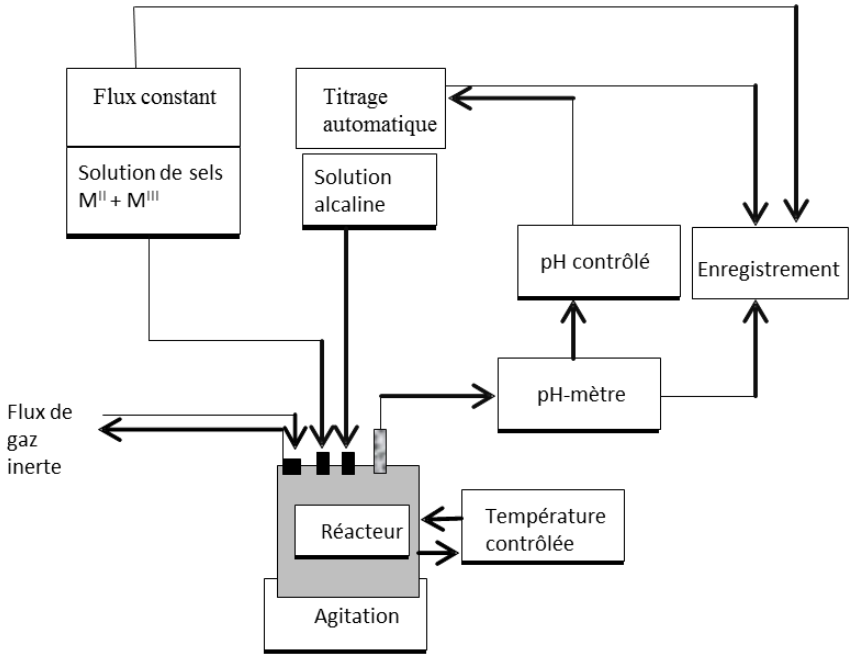


Figure 1 : coprécipitation à pH constant[76]

2- Immobilisation des enzymes dans les HDL

Le même protocole expérimental expliqué dans la partie précédente est utilisé pour immobiliser des enzymes. L'enzyme est mise dans le réacteur avant de commencer l'ajout des solutions de sels et de la base. Les protocoles détaillés pour l'immobilisation des enzymes sont décrits dans les parties expérimentales de chacun des articles. Les biohybrides obtenus sont dosés en ajoutant à la cuve de dosage 10 µL d'une solution diluée du biohybride enzyme@HDL. Le dosage peut se faire sans agitation, puisque la décantation des particules enzymes@HDL est lente. Un blanc est fait avec un HDL sans enzyme, nous avons observé que durant 8 minutes (durée du dosage), il n'y avait aucun changement d'absorbance.

Références bibliographiques

(1) Clark, J. H. Green Chemistry: Challenges and Opportunities. *Green Chem.* **1999**, *1*, 1–8.
(2) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. Engineering the Third Wave of Biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
(3) Ran, N.; Zhao, L.; Chen, Z.; Tao, J. Recent Applications of Biocatalysis in Developing Green Chemistry for Chemical Synthesis at the Industrial Scale. *Green Chem.* **2008**, *10*, 361–372.
(4) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. Enzymes for Chemical Synthesis. *Nature* **2001**, *409*, 232–240.
(5) Gijsen, H. J. M.; Qiao, L.; Fitz, W.; Wong, C.-H. Recent Advances in the Chemoenzymatic Synthesis of Carbohydrates and Carbohydrate Mimetics. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 443–474.
(6) Tao, J.; Xu, J.-H. Enzymes and Their Synthetic Applications: An Overview. In *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry*; Tao, J. (Alex); Lin, G.-Q.; Liese, A., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd, 2009; pp. 1–19.
(7) Kazlauskas, R. J.; Bornscheuer, U. T. Finding Better Protein Engineering Strategies. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 526–529.
(8) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow. *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
(9) Leung, A.; Shankar, P. M.; Mutharasan, R. A Review of Fiber-Optic Biosensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2007**, *125*, 688–703.
(10) Giordano, R. C.; Ribeiro, M. P. A.; Giordano, R. L. C. Kinetics of β-Lactam Antibiotics Synthesis by Penicillin G Acylase (PGA) from the Viewpoint of the Industrial Enzymatic Reactor Optimization. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 27–41.
(11) Wang, A.; Wang, M.; Wang, Q.; Chen, F.; Zhang, F.; Li, H.; Zeng, Z.; Xie, T. Stable and Efficient Immobilization Technique of Aldolase under Consecutive Microwave Irradiation at Low Temperature. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 469–474.
(12) Asuri, P.; Karajanagi, S. S.; Yang, H.; Yim, T.-J.; Kane, R. S.; Dordick, J. S. Increasing Protein Stability through Control of the Nanoscale Environment. *Langmuir* **2006**, *22*, 5833–5836.
(13) Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J. H. Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2239–2262.
(14) Findrik, Z.; Vasić-Rački, Đ. Overview on Reactions with Multi-Enzyme Systems. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2009**, *23*, 545–553.
(15) Brady, D.; Jordaan, J. Advances in Enzyme Immobilisation. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639–1650.
(16) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
(17) Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Modulation of Mucor Miehei Lipase Properties via Directed Immobilization on Different Hetero-Functional Epoxy Resins. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *21*, 201–210.
(18) Palomo, J. M.; Filice, M.; Fernandez-Lafuente, R.; Terreni, M.; Guisan, J. M. Regioselective Hydrolysis of Different Peracetylated β-Monosaccharides by Immobilized Lipases from Different Sources. Key Role of The Immobilization. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1969–1976.
(19) Rocchietti, S.; Urrutia, A. S. V.; Pregnolato, M.; Tagliani, A.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Terreni, M. Influence of the Enzyme Derivative Preparation and Substrate Structure on the Enantioselectivity of Penicillin G Acylase. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 88–93.
(20) Volpato, G.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3855–3873.
(21) Pessela, B. C. C.; Dellamora-Ortiz, G.; Betancor, L.; Fuentes, M.; Guisán, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Modulation of the Catalytic Properties of Multimeric β-Galactosidase from E. Coli by Using Different Immobilization Protocols. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 310–315.

(22) Pessela, B. C. C.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Vian, A.; Garc a, J. L.; Carrascosa, A. V.; Guis n, J. M.; Fernández-Lafuente, R. The Immobilization of a Thermophilic β-Galactosidase on Sepabeads Supports Decreases Product Inhibition. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 199–205.

(23) Cowan, D. A.; Daniel, R. M.; Morgan, H. W. Some Observations on the Inhibition and Activation of a Thermophilic Protease. *Int. J. Biochem.* **1987**, *19*, 483–486.

(24) Chiyanzu, I.; Cowan, D. A.; Burton, S. G. Immobilization of Geobacillus Pallidus RAPc8 Nitrile Hydratase (NHase) Reduces Substrate Inhibition and Enhances Thermostability. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *63*, 109–115.

(25) Hernandez, K.; Fernandez-Lafuente, R. Lipase B from Candida Antarctica Immobilized on Octadecyl Sepabeads: A Very Stable Biocatalyst in the Presence of Hydrogen Peroxide. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 873–878.

(26) Romero, O.; Vergara, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Illanes, A.; Wilson, L. Simple Strategy of Reactivation of a Partially Inactivated Penicillin G Acylase Biocatalyst in Organic Solvent and Its Impact on the Synthesis of β-Lactam Antibiotics. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 472–479.

(27) Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2216–2238.

(28) Bolivar, J. M.; Wilson, L.; Ferrarotti, S. A.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Mateo, C. Improvement of the Stability of Alcohol Dehydrogenase by Covalent Immobilization on Glyoxyl-Agarose. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 85–94.

(29) Bolivar, J. M.; Wilson, L.; Ferrarotti, S. A.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Mateo, C. Stabilization of a Formate Dehydrogenase by Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose Supports. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 669–673.

(30) Ruiz-Hitzky, E.; Darder, M.; Aranda, P.; Ariga, K. Advances in Biomimetic and Nanostructured Biohybrid Materials. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 323–336.

(31) Lee, S. Y.; Lee, J.; Chang, J. H.; Lee, J. H. Inorganic Nanomaterial-Based Biocatalysts. *BMB Rep.* **2011**, *44*, 77–86.

(32) Betancor, L.; Luckarift, H. R. Bioinspired Enzyme Encapsulation for Biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 566–572.

(33) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review. *Adsorption* **2014**, *20*, 801–821.

(34) Skujiņš, J.; Puķite, A.; McLaren, A. D. Adsorption and Activity of Chitinase on Kaolinite. *Soil Biol. Biochem.* **1974**, *6*, 179–182.

(35) Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Interfacial Adsorption of Lipases on Very Hydrophobic Support (octadecyl–Sepabeads): Immobilization, Hyperactivation and Stabilization of the Open Form of Lipases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19–20*, 279–286.

(36) Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P. Nanostructures for Enzyme Stabilization. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1017–1026.

(37) Hartmann, M.; Jung, D. Biocatalysis with Enzymes Immobilized on Mesoporous Hosts: The Status Quo and Future Trends. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 844–857.

(38) Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. Understanding Enzyme Immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453–468.

(39) Richards, F. M.; Knowles, J. R. Glutaraldehyde as a Protein Cross-Linking Reagent. *J. Mol. Biol.* **1968**, *37*, 231–233.

(40) Sheldon, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *15*, 213–223.

(41) St. Clair, N. L.; Navia, M. A. Cross-Linked Enzyme Crystals as Robust Biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7314–7316.

(42) Cao, L.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361–1364.

(43) Yu, C.-Y.; Li, X.-F.; Lou, W.-Y.; Zong, M.-H. Cross-Linked Enzyme Aggregates of Mung Bean Epoxide Hydrolases: A Highly Active, Stable and Recyclable Biocatalyst for Asymmetric Hydrolysis of Epoxides. *J. Biotechnol.* **2013**, *166*, 12–19.

(44) Górecka, E.; Jastrzębska, M. Immobilization Techniques and Biopolymer Carriers. *Biotechnol. Food Sci.* **2011**, *75*, 65–86.

(45) Betigeri, S. S.; Neau, S. H. Immobilization of Lipase Using Hydrophilic Polymers in the Form of Hydrogel Beads. *Biomaterials* **2002**, *23*, 3627–3636.

(46) Desai, P. D.; Dave, A. M.; Devi, S. Chemoselective Hydrolysis of Methyl 2-Acetoxybenzoate Using Free and Entrapped Esterase in κ-Carrageenan Beads. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *108*, 2617–2622.

(47) Yang, C.-H.; Yen, C.-C.; Jheng, J.-J.; Wang, C.-Y.; Chen, S.-S.; Huang, P.-Y.; Huang, K.-S.; Shaw, J.-F. Immobilization of Brassica Oleracea Chlorophyllase 1 (BoCLH1) and Candida Rugosa Lipase (CRL) in Magnetic Alginate Beads: An Enzymatic Evaluation in the Corresponding Proteins. *Mol. Basel Switz.* **2014**, *19*, 11800–11815.

(48) Desai, P. D.; Dave, A. M.; Devi, S. Entrapment of Lipase into K-Carrageenan Beads and Its Use in Hydrolysis of Olive Oil in Biphasic System. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2004**, *31*, 143–150.

(49) Jegannathan, K. R.; Chan, E.-S.; Ravindra, P. Physical and Stability Characteristics of Burkholderia Cepacia Lipase Encapsulated in κ-Carrageenan. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *58*, 78–83.

(50) Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials. *3 Biotech* **2013**, *3*, 1–9.

(51) Fang, Y.; Huang, X.-J.; Chen, P.-C.; Xu, Z.-K. Polymer Materials for Enzyme Immobilization and Their Application in Bioreactors. *BMB Rep.* **2011**, *44*, 87–95.

(52) Jia, H.; Zhu, G.; Vugrinovich, B.; Kataphinan, W.; Reneker, D. H.; Wang, P. Enzyme-Carrying Polymeric Nanofibers Prepared via Electrospinning for Use as Unique Biocatalysts. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1027–1032.

(53) Ye, P.; Xu, Z.-K.; Wu, J.; Innocent, C.; Seta, P. Nanofibrous Membranes Containing Reactive Groups: Electrospinning from Poly(acrylonitrile-Co-Maleic Acid) for Lipase Immobilization. *Macromolecules* **2006**, *39*, 1041–1045.

(54) Li, S.-F.; Chen, J.-P.; Wu, W.-T. Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibrous Membranes for Lipase Immobilization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2007**, *47*, 117–124.

(55) Nair, S.; Kim, J.; Crawford, B.; Kim, S. H. Improving Biocatalytic Activity of Enzyme-Loaded Nanofibers by Dispersing Entangled Nanofiber Structure. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1266–1270.

(56) Chen, B.; Miller, E. M.; Miller, L.; Maikner, J. J.; Gross, R. A. Effects of Macroporous Resin Size on Candida Antarctica Lipase B Adsorption, Fraction of Active Molecules, and Catalytic Activity for Polyester Synthesis. *Langmuir* **2007**, *23*, 1381–1387.

(57) Deng, H.-T.; Xu, Z.-K.; Liu, Z.-M.; Wu, J.; Ye, P. Adsorption Immobilization of Candida Rugosa Lipases on Polypropylene Hollow Fiber Microfiltration Membranes Modified by Hydrophobic Polypeptides. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 437–443.

(58) Ye, P.; Xu, Z.-K.; Wang, Z.-G.; Wu, J.; Deng, H.-T.; Seta, P. Comparison of Hydrolytic Activities in Aqueous and Organic Media for Lipases Immobilized on Poly(acrylonitrile-Co-Maleic Acid) Ultrafiltration Hollow Fiber Membrane. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2005**, *32*, 115–121.

(59) Gonçalves, A. P. V.; Lopes, J. M.; Lemos, F.; Ramôa Ribeiro, F.; Prazeres, D. M. F.; Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R. Zeolites as Supports for Enzymatic Hydrolysis Reactions. Comparative Study of Several Zeolites. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1996**, *1*, 53–60.

(60) Gilles, F.; Blin, J.-L.; Helge, T.; Bao-Lian, S. Location and Transport Properties of Ammonia Molecules in a Series of Faujasite Zeolite Structures as Studied by FT-IR and 2H-NMR Spectroscopies. *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2002**, *142*, 1687–1694.

(61) Brinkmann, U.; Ettlinger, M.; Kerner, D.; Schmoll, R. Synthetic Amorphous Silica. In *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*; Bergna, H. E.; Roberts, W. O., Eds.; CRC Press, 2005; p. 576.

(62) Lambe, T. W.; Whitman, R. V. Normal Stress Between Soil Particles. In *Soil Mechanics*; John Wiley & Sons, 1969; pp. 52–54.
(63) Lin, R.; Ding, Y. A Review on the Synthesis and Applications of Mesostructured Transition Metal Phosphates. *Materials* **2013**, *6*, 217–243.
(64) Castillejois, E.; Serp, P. Carbon Nanotubes for Catalytic Applications. In *Carbon Nanotubes and Related Structures: Synthesis, Characterization, Functionalization, and Applications*; John Wiley & Sons, 2010; pp. 327–328.
(65) Forano, C.; Costantino, U.; Prévot, V.; Taviot-Gueho, C. Layered Double Hydroxides (LDH). In *Handbook of Clay Science*; F. Bergaya; G. Lagaly, Eds.; Elsevier Amsterdam, The Netherlands, 2013; Vol. 5, pp. 745–782.
(66) Soleimani, M.; Khani, A.; Najafzadeh, K. α-Amylase Immobilization on the Silica Nanoparticles for Cleaning Performance towards Starch Soils in Laundry Detergents. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *74*, 1–5.
(67) Bergaya, F.; Theng, B. K. G.; Lagaly, G. *Handbook of Clay Science*; Elsevier: Amsterdam, 2006; Vol. 1.
(68) Safari Sinegani, A. A.; Emtiazi, G.; Shariatmadari, H. Sorption and Immobilization of Cellulase on Silicate Clay Minerals. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *290*, 39–44.
(69) Shan, D.; Mousty, C.; Cosnier, S.; Mu, S. A New Polyphenol Oxidase Biosensor Mediated by Azure B in Laponite Clay Matrix. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1506–1512.
(70) Cengiz, S.; Çavaş, L.; Yurdakoç, K. Bentonite and Sepiolite as Supporting Media: Immobilization of Catalase. *Appl. Clay Sci.* **2012**, *65–66*, 114–120.
(71) Sanjay, G.; Sugunan, S. Glucoamylase Immobilized on Montmorillonite: Influence of Nature of Binding on Surface Properties of Clay-Support and Activity of Enzyme. *J. Porous Mater.* **2007**, *14*, 127–136.
(72) Alkan, S.; Ceylan, H.; Arslan, O. Bentonite-Supported Catalase. *J. Serbian Chem. Soc.* **2005**, *70*, 721–726.
(73) de Melo, J. V.; Cosnier, S.; Mousty, C.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N. Urea Biosensors Based on Immobilization of Urease into Two Oppositely Charged Clays (Laponite and Zn−Al Layered Double Hydroxides). *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4037–4043.
(74) Sołoducho, J.; Cabaj, J. Electrochemical Nanosized Biosensors: Perspectives and Future of Biocatalysts. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2013**, *S7*.
(75) Das, D.; Das, P. K. Superior Activity of Structurally Deprived Enzyme−Carbon Nanotube Hybrids in Cationic Reverse Micelles. *Langmuir* **2009**, *25*, 4421–4428.
(76) de Roy, A.; Forano, C.; Besse, J. P. In *Layered double hydroxides : present and future*; Vicente, R., Ed.; Nova Publishers, 2001; pp. 1–39.
(77) Benício, L. P. F.; Silva, R. A.; Lopes, J. A.; Eulálio, D.; Santos, R. M. M. dos; Aquino, L. A. de; Vergütz, L.; Novais, R. F.; Costa, L. M. da; Pinto, F. G.; *et al.* Layered Double Hydroxides : Nanomaterials For Applications In Agriculture. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* **2015**, *39*, 1–13.
(78) Xiong, P.; Ji, X.; Zhao, X.; Lv, W.; Liu, T.; Lu, W. Materials Design and Control Synthesis of the Layered Double Hydroxide with the Desired Basal Spacing. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *144*, 11–16.
(79) Leroux, F.; Besse, J.-P. Layered Double Hydroxide/polymer Nanocomposite. In *Clay Surfaces: Fundamentals and Applications*; Wypych, F., Ed.; Academic Press, 2004; pp. 459–495.
(80) Miyata, S. Anion-Exchange Properties of Hydrotalcite-like Compounds. *Clays Clay Miner.* **1983**, *31*, 305–311.
(81) Xu, Z. P.; Jin, Y.; Liu, S.; Hao, Z. P.; Lu, G. Q. (Max). Surface Charging of Layered Double Hydroxides during Dynamic Interactions of Anions at the Interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *326*, 522–529.
(82) Prevot, V.; Mousty, C.; Forano, C. State of the Art in Biomolecule and Layered Double Hydroxides. In *Advances in chemistry research*; Taylor, J. C., Ed.; Nova Publishers, 2012; Vol. 17, pp. 35–84.

(83) Leggat, R. B.; Taylor, S. A.; Taylor, S. R. Adhesion of Epoxy to Hydrotalcite Conversion Coatings: I. Correlation with Wettability and Electrokinetic Measurements. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, *210*, 69–81.

(84) Jiao, Y.-N.; Hou, W.-G. Effects of Structural Charges on Points of Zero Charge and Intrinsic Surface Reaction Equilibrium Constants of Zn–Al and Zn–Al–Fe Hydrotalcite-like Compounds. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *296*, 62–66.

(85) Hou, W.-G.; Jiang, P.; Han, S.-H.; Hu, J.-F.; Li, D.-Q. Studies on Zero Point of Charge and Intrinsic Ionization Constant of Zn−Mg−Al Hydrotalcite-like Compounds. *Colloid Polym. Sci.* **2003**, *281*, 738–744.

(86) Pavan, P. C.; Crepaldi, E. L.; de A. Gomes, G.; Valim, J. B. Adsorption of Sodium Dodecylsulfate on a Hydrotalcite-like Compound. Effect of Temperature, pH and Ionic Strength. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *154*, 399–410.

(87) Boclair, J. W.; Braterman, P. S. Layered Double Hydroxide Stability. 1. Relative Stabilities of Layered Double Hydroxides and Their Simple Counterparts. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 298–302.

(88) Allada, R. kumar; Navrotsky, A.; Berbeco, H. T.; Casey, W. H. Thermochemistry and Aqueous Solubilities of Hydrotalcite-Like Solids. *Science* **2002**, *296*, 721–723.

(89) Pesic, L.; Salipurovic, S.; Markovic, V.; Vucelic, D.; Kagunya, W.; Jones, W. Thermal Characteristics of a Synthetic Hydrotalcite-like Material. *J. Mater. Chem.* **1992**, *2*, 1069–1073.

(90) Di Cosimo, J. I.; D ez, V. K.; Xu, M.; Iglesia, E.; Apestegu a, C. R. Structure and Surface and Catalytic Properties of Mg-Al Basic Oxides. *J. Catal.* **1998**, *178*, 499–510.

(91) Hussein, M. Z. B.; Zainal, Z.; Choong, E. M. Structure and Surface Transformations of Humic-Adsorbed Synthetic Hydrotalcite-Like Materials. *J. Porous Mater.* **2001**, *8*, 219–226.

(92) Inacio, J.; Taviot-Guého, C.; Forano, C.; Besse, J. P. Adsorption of MCPA Pesticide by MgAl-Layered Double Hydroxides. *Appl. Clay Sci.* **2001**, *18*, 255–264.

(93) Prince, J.; Montoya, A.; Ferrat, G.; Valente, J. S. Proposed General Sol−Gel Method to Prepare Multimetallic Layered Double Hydroxides: Synthesis, Characterization, and Envisaged Application. *Chem. Mater.* **2009**, *21*.

(94) Géraud, E.; Prévot, V.; Ghanbaja, J.; Leroux, F. Macroscopically Ordered Hydrotalcite-Type Materials Using Self-Assembled Colloidal Crystal Template. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 238–240.

(95) Reichle, W. T. Synthesis of Anionic Clay Minerals (mixed Metal Hydroxides, Hydrotalcite). *Solid State Ion.* **1986**, *22*, 135–141.

(96) Clause, O.; Rebours, B.; Merlen, E.; Trifiró, F.; Vaccari, A. Preparation and Characterization of Nickel-Aluminum Mixed Oxides Obtained by Thermal Decomposition of Hydrotalcite-Type Precursors. *J. Catal.* **1992**, *133*, 231–246.

(97) Fudala Á, Á.; Pálinkó, I.; Kiricsi, I. Preparation and Characterization of Hybrid Organic-Inorganic Composite Materials Using the Amphoteric Property of Amino Acids: Amino Acid Intercalated Layered Double Hydroxide and Montmorillonite. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 4653–4658.

(98) Wei, M.; Guo, J.; Shi, Z.; Yuan, Q.; Pu, M.; Rao, G.; Duan, X. Preparation and Characterization of L-Cystine and L-Cysteine Intercalated Layered Double Hydroxides. *J. Mater. Sci.* **2007**, *42*, 2684–2689.

(99) Aisawa, S.; Kudo, H.; Hoshi, T.; Takahashi, S.; Hirahara, H.; Umetsu, Y.; Narita, E. Intercalation Behavior of Amino Acids into Zn–Al-Layered Double Hydroxide by Calcination–rehydration Reaction. *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 3987–3994.

(100) Vaz, P. D.; Nunes, C. D. A New Role for Layered Double Hydroxides Hybrid Materials—uptake and Delivery of Small Molecules into the Gas Phase. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 541–546.

(101) Nakayama, H.; Wada, N.; Tsuhako, M. Intercalation of Amino Acids and Peptides into Mg-Al Layered Double Hydroxide by Reconstruction Method. *Int. J. Pharm.* **2004**, *269*, 469–478.

(102) An, Z.; Lu, S.; He, J.; Wang, Y. Colloidal Assembly of Proteins with Delaminated Lamellas of Layered Metal Hydroxide. *Langmuir* **2009**, *25*, 10704–10710.

(103) Bellezza, F.; Alberani, A.; Posati, T.; Tarpani, L.; Latterini, L.; Cipiciani, A. Protein Interactions with Nanosized Hydrotalcites of Different Composition. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106*, 134–142.

(104) Choy, J.-H.; Kwak, S.-Y.; Park, J.-S.; Jeong, Y.-J.; Portier, J. Intercalative Nanohybrids of Nucleoside Monophosphates and DNA in Layered Metal Hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1399–1400.

(105) Yin, H.; Zhou, Y.; Liu, T.; Cui, L.; Ai, S.; Qiu, Y.; Zhu, L. Amperometric Nitrite Biosensor Based on a Gold Electrode Modified with Cytochrome c on Nafion and Cu-Mg-Al Layered Double Hydroxides. *Microchim. Acta* **2010**, *171*, 385–392.

(106) Desigaux, L.; Belkacem, M. B.; Richard, P.; Cellier, J.; Léone, P.; Cario, L.; Leroux, F.; Taviot-Guého, C.; Pitard, B. Self-Assembly and Characterization of Layered Double hydroxide/DNA Hybrids. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 199–204.

(107) Zhu, J.; Huang, Q.; Pigna, M.; Violante, A. Immobilization of Acid Phosphatase on Uncalcined and Calcined Mg/Al-CO3 Layered Double Hydroxides. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *77*, 166–173.

(108) Mousty, C. Biosensing Applications of Clay-Modified Electrodes: A Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 315–325.

(109) Vial, S.; Forano, C.; Shan, D.; Mousty, C.; Barhoumi, H.; Martelet, C.; Jaffrezic, N. Nanohybrid-Layered Double Hydroxides/urease Materials: Synthesis and Application to Urea Biosensors. *Mater. Sci. Eng. C* **2006**, *26*, 387–393.

(110) Mousty, C.; Vieille, L.; Cosnier, S. Laccase Immobilization in Redox Active Layered Double Hydroxides: A Reagentless Amperometric Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1733–1738.

(111) Shan, D.; Cosnier, S.; Mousty, C. HRP/[Zn-Cr-ABTS] Redox Clay-Based Biosensor: Design and Optimization for Cyanide Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 390–396.

(112) Cosnier, S.; Mousty, C.; Cui, X.; Yang, X.; Dong, S. Specific Determination of As(V) by an Acid Phosphatase-Polyphenol Oxidase Biosensor. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4985–4989.

(113) Besse-Hoggan, P.; Alekseeva, T.; Sancelme, M.; Delort, A.-M.; Forano, C. Atrazine Biodegradation Modulated by Clays and Clay/humic Acid Complexes. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 2837–2844.

(114) Alekseeva, T.; Prevot, V.; Sancelme, M.; Forano, C.; Besse-Hoggan, P. Enhancing Atrazine Biodegradation by Pseudomonas Sp. Strain ADP Adsorption to Layered Double Hydroxide Bionanocomposites. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *191*, 126–135.

(115) Mansouri, H.; Forano, C.; Prévot, V.; Jaffrezic-Renault, N.; Ben Haj Amara, A. Layered Double Hydroxides/Trypsin Based Conductometric Biosensors. *Sens. Lett.* **2009**, *7*, 888–895.

(116) Abdul Rahman, M. B.; Zaidan, U. H.; Basri, M.; Hussein, M. Z.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Salleh, A. B. Enzymatic Synthesis of Methyl Adipate Ester Using Lipase from Candida Rugosa Immobilised on Mg, Zn and Ni of Layered Double Hydroxides (LDHs). *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2008**, *50*, 33–39.

(117) Mousty, C.; Kaftan, O.; Prevot, V.; Forano, C. Alkaline Phosphatase Biosensors Based on Layered Double Hydroxides Matrices : Role of LDH Composition. *Sens. Actuators B Chem.* **2008**, *133*, 442–448.

(118) Vial, S.; Prevot, V.; Leroux, F.; Forano, C. Immobilization of Urease in ZnAl Layered Double Hydroxides by Soft Chemistry Routes. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *107*, 190–201.

(119) Rahman, M. B. A.; Basri, M.; Hussein, M. Z.; Idris, M. N. H.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Salleh, A. B. Immobilisation of Lipase from Candida Rugosa on Layered Double Hydroxides of Mg/Al and Its Nanocomposite as Biocatalyst for the Synthesis of Ester. *Catal. Today* **2004**, *93–95*, 405–410.

(120) Rahman, M. B. A.; Basri, M.; Hussein, M. Z.; Rahman, R. N. Z. A.; Zainol, D. H.; Salleh, A. B. Immobilization of Lipase from Candida Rugosa on Layered Double Hydroxides for Esterification Reaction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *118*, 313–320.

(121) Benaissi, K.; Hélaine, V.; Prévot, V.; Forano, C.; Hecquet, L. Efficient Immobilization of Yeast Transketolase on Layered Double Hydroxides and Application for Ketose Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1497–1509.

(122) Frey, S. T.; Guilmet, S. L.; Egan III, R. G.; Bennett, A.; Soltau, S. R.; Holz, R. C. Immobilization of the Aminopeptidase from Aeromonas Proteolytica on Mg2+/Al3+ Layered Double Hydroxide Particles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 2828–2832.

(123) Córdova, C.; Isidoro, D.; Morales Borges, R.; Arizaga, G. G. C.; Wypych, F.; Krieger, N. Immobilization of Laccase on Hybrid Layered Double Hydroxide. *Quím. Nova* **2009**, *32*, 1495–1499.

(124) Anifantaki, E.; Touloupakis, E.; Ghanotakis, D. F. Alliinase Immobilization in Calcium Alginate Beads and Layered Double Hydroxides Matrices. *J. Food Biochem.* **2012**, *36*, 12–20.

(125) Dong, L.; Ge, C.; Qin, P.; Chen, Y.; Xu, Q. Immobilization and Catalytic Properties of Candida Lipolytic Lipase on Surface of Organic Intercalated and Modified MgAl-LDHs. *Solid State Sci.* **2014**, *31*, 8–15.

(126) Borges, R. M.; Arizaga, G. G. C.; Wypych, F. Immobilization of Enzymatic Extract from Penicillium Camemberti with Lipoxygenase Activity onto a Hybrid Layered Double Hydroxide. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *48*, 93–98.

(127) Barhoumi, H.; Maaref, A.; Rammah, M.; Martelet, C.; Jaffrezic, N.; Mousty, C.; Vial, S.; Forano, C. Urea Biosensor Based on Zn3Al–Urease Layered Double Hydroxides Nanohybrid Coated on Insulated Silicon Structures. *Mater. Sci. Eng. C* **2006**, *26*, 328–333.

(128) Chen, X.; Fu, C.; Wang, Y.; Yang, W.; Evans, D. G. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis Based on a Film of Horseradish Peroxidase Intercalated into Ni-Al Layered Double Hydroxide Nanosheets. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 356–361.

(129) Wang, M.; Huang, S.-W.; Xu, D.; Bao, W.-J.; Xia, X.-H. Ultrahigh Enzyme Activity Assembled in Layered Double Hydroxides via Mg2+-Allosteric Effector. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5831–5836.

(130) Ren, L.; He, J.; Zhang, S.; Evans, D. G.; Duan, X. Immobilization of Penicillin G Acylase in Layered Double Hydroxides Pillared by Glutamate Ions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *18*, 3–11.

(131) Ren, L.; He, J.; Evans, D. G.; Duan, X.; Ma, R. Some Factors Affecting the Immobilization of Penicillin G Acylase on Calcined Layered Double Hydroxides. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *16*, 65–71.

(132) Zeng, H.; Liao, K.; Deng, X.; Jiang, H.; Zhang, F. Characterization of the Lipase Immobilized on Mg–Al Hydrotalcite for Biodiesel. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 791–798.

(133) Geraud, E.; Prevot, V.; Forano, C.; Mousty, C. Spongy Gel-like Layered Double Hydroxide-Alkaline Phosphatase Nanohybrid as a Biosensing Material. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2008**, 1554–1556.

(134) Guérard-Hélaine, C.; Légeret, B.; Fernandes, C.; Prévot, V.; Forano, C.; Lemaire, M. Efficient Immobilization of Fructose-6-Phosphate Aldolase in Layered Double Hydroxide: Improved Stereoselective Synthesis of Sugar Analogues. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 776–779.

(135) Mignani, A.; Scavetta, E.; Tonelli, D. Electrodeposited Glucose Oxidase/anionic Clay for Glucose Biosensors Design. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *577*, 98–106.

(136) Foo, K. Y.; Hameed, B. H. Insights into the Modeling of Adsorption Isotherm Systems. *Chem. Eng. J.* **2010**, *156*, 2–10.

(137) Giles, C. H.; Smith, D.; Huitson, A. A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm. I. Theoretical. *J. Colloid Interface Sci.* **1974**, *47*, 755–765.

(138) Yagiz, F.; Kazan, D.; Akin, A. N. Biodiesel Production from Waste Oils by Using Lipase Immobilized on Hydrotalcite and Zeolites. *Chem. Eng. J.* **2007**, *134*, 262–267.

(139) An, Z.; He, J.; Lu, S.; Yang, L. Electrostatic-Induced Interfacial Assembly of Enzymes with Nanosheets: Controlled Orientation and Optimized Activity. *AIChE J.* **2010**, *56*, 2677–2686.

(140) Machajewski, T. D.; Wong, C.-H. The Catalytic Asymmetric Aldol Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1352–1375.

(141) Córdova, A.; Zou, W.; Dziedzic, P.; Ibrahem, I.; Reyes, E.; Xu, Y. Direct Asymmetric Intermolecular Aldol Reactions Catalyzed by Amino Acids and Small Peptides. *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12*, 5383–5397.

(142) Evans, D. A.; Bartroli, J.; Shih, T. L. Enantioselective Aldol Condensations. 2. Erythro-Selective Chiral Aldol Condensations via Boron Enolates. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2127–2129.

(143) Dean, S. M.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H. Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1308–1320.
(144) Brovetto, M.; Gamenara, D.; Saenz Méndez, P.; Seoane, G. A. C−C Bond-Forming Lyases in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346–4403.
(145) Clapés, P.; Garrabou, X. Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2263–2283.
(146) Bednarski, M. D.; Simon, E. S.; Bischofberger, N.; Fessner, W. D.; Kim, M. J.; Lees, W.; Saito, T.; Waldmann, H.; Whitesides, G. M. Rabbit Muscle Aldolase as a Catalyst in Organic Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 627–635.
(147) Goldberg, R. N.; Tewari, Y. B. Thermodynamics of Enzyme-Catalyzed Reactions: Part 4. Lyases. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24*, 1669–1698.
(148) Toone, E. J.; Simon, E. S.; Bednarski, M. D.; Whitesides, G. M. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Carbohydrates. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5365–5422.
(149) Lin, C. H.; Sugai, T.; Halcomb, R. L.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H. Unusual Stereoselectivity in Sialic Acid Aldolase-Catalyzed Aldol Condensations: Synthesis of Both Enantiomers of High-Carbon Monosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10138–10145.
(150) McGeown, M. G.; Malpress, F. H. Synthesis of Deoxyribose in Animal Tissues. *Nature* **1952**, *170*, 575–576.
(151) Hoffee, P. A. 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase of Salmonella Typhimurium: Purification and Properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 795–802.
(152) Shibata, K.; Shingu, K.; Vassiley, V. P.; Nishide, K.; Fujita, T.; Node, M.; Kajimoto, T.; Wong, C.-H. Kinetic and Thermodynamic Control of L-Threonine Aldolase Catalyzed Reaction and Its Application to the Synthesis of Mycestericin D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2791–2794.
(153) Vassilev, V. P.; Uchiyama, T.; Kajimoto, T.; Wong, C.-H. L-Threonine Aldolase in Organic Synthesis: Preparation of Novel β-Hydroxy-α-Amino Acids. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4081–4084.
(154) Kimura, T.; Vassilev, V. P.; Shen, G.-J.; Wong, C.-H. Enzymatic Synthesis of β-Hydroxy-α-Amino Acids Based on Recombinant D- and L-Threonine Aldolases. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11734–11742.
(155) Schürmann, M.; Schürmann, M.; Sprenger, G. A. Fructose 6-Phosphate Aldolase and 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase from Escherichia Coli as Tools in Enzymatic Synthesis of 1-Deoxysugars. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19–20*, 247–252.
(156) Schürmann, M.; Sprenger, G. A. Fructose-6-Phosphate Aldolase Is a Novel Class I Aldolase from Escherichia Coli and Is Related to a Novel Group of Bacterial Transaldolases. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11055–11061.
(157) Sugiyama, M.; Hong, Z.; Liang, P.-H.; Dean, S. M.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H. D-Fructose-6-Phosphate Aldolase-Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14811–14817.
(158) Garrabou, X.; Castillo, J. A.; Guérard-Hélaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Clapés, P. Asymmetric Self- and Cross-Aldol Reactions of Glycolaldehyde Catalyzed by D-Fructose-6-Phosphate Aldolase. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48*, 5521–5525.
(159) Guérard-Hélaine, C.; de Berardinis, V.; Besnard-Gonnet, M.; Darii, E.; Debacker, M.; Debard, A.; Fernandes, C.; Hélaine, V.; Mariage, A.; Pellouin, V.; *et al.* Genome Mining for Innovative Biocatalysts: New Dihydroxyacetone Aldolases for the Chemist‘s Toolbox. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1871–1879.
(160) Thorell, S.; Schürmann, M.; Sprenger, G. A.; Schneider, G. Crystal Structure of Decameric Fructose-6-Phosphate Aldolase from Escherichia Coli Reveals Inter-Subunit Helix Swapping as a Structural Basis for Assembly Differences in the Transaldolase Family. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 161–171.
(161) Sautner, V.; Friedrich, M. M.; Lehwess-Litzmann, A.; Tittmann, K. Converting Transaldolase into Aldolase through Swapping of the Multifunctional Acid-Base Catalyst: Common and Divergent Catalytic Principles in F6P Aldolase and Transaldolase. *Biochemistry (Mosc.)* **2015**, *54*, 4475–4486.

(162) Castillo, J. A.; Guérard-Hélaine, C.; Gutiérrez, M.; Garrabou, X.; Sancelme, M.; Schürmann, M.; Inoue, T.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Gefflaut, T.; *et al.* A Mutant D-Fructose-6-Phosphate Aldolase (Ala129Ser) with Improved Affinity towards Dihydroxyacetone for the Synthesis of Polyhydroxylated Compounds. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1039–1046.

(163) Sudar, M.; Findrik, Z.; Vasić-Rački, Đ.; Clapés, P.; Lozano, C. Aldol Addition of Dihydroxyacetone to N-Cbz-3-Aminopropanal Catalyzed by Two Aldolases Variants in Microreactors. *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *53*, 38–45.

(164) Jensen, R. A. Enzyme Recruitment in Evolution of New Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409–425.

(165) Fessner, W.-D.; Heyl, D.; Rale, M. Multi-Enzymatic Cascade Synthesis of D-Fructose 6-Phosphate and Deoxy Analogs as Substrates for High-Throughput Aldolase Screening. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1596–1601.

(166) Sánchez-Moreno, I.; Hélaine, V.; Poupard, N.; Charmantray, F.; Légeret, B.; Hecquet, L.; García-Junceda, E.; Wohlgemuth, R.; Guérard-Hélaine, C.; Lemaire, M. One-Pot Cascade Reactions Using Fructose-6-Phosphate Aldolase: Efficient Synthesis of D-Arabinose 5-Phosphate, D-Fructose 6-Phosphate and Analogues. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1725–1730.

(167) Castillo, J. A.; Calveras, J.; Casas, J.; Mitjans, M.; Vinardell, M. P.; Parella, T.; Inoue, T.; Sprenger, G. A.; Joglar, J.; Clapés, P. Fructose-6-Phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Preparation of D-Fagomine, N-Alkylated Derivatives, and Preliminary Biological Assays. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6067–6070.

(168) Camps Bres, F.; Guérard-Hélaine, C.; Fernandes, C.; Castillo, J. A.; Lemaire, M. Fructose-6-Phosphate Aldolases as Versatile Biocatalysts for Nitrocyclitol Syntheses. *Tetrahedron Asymmetry* **2013**, *24*, 1075–1081.

(169) Szekrenyi, A.; Soler, A.; Garrabou, X.; Guérard-Hélaine, C.; Parella, T.; Joglar, J.; Lemaire, M.; Bujons, J.; Clapés, P. Engineering the Donor Selectivity of D-Fructose-6-Phosphate Aldolase for Biocatalytic Asymmetric Cross-Aldol Additions of Glycolaldehyde. *Chemistry* **2014**, *20*, 12572–12583.

(170) Szekrenyi, A.; Garrabou, X.; Parella, T.; Joglar, J.; Bujons, J.; Clapés, P. Asymmetric Assembly of Aldose Carbohydrates from Formaldehyde and Glycolaldehyde by Tandem Biocatalytic Aldol Reactions. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 724–729.

(171) Gutierrez, M.; Parella, T.; Joglar, J.; Bujons, J.; Clapés, P. Structure-Guided Redesign of D-Fructose-6-Phosphate Aldolase from E. Coli: Remarkable Activity and Selectivity towards Acceptor Substrates by Two-Point Mutation. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5762–5764.

(172) Guérard-Hélaine, C.; Debacker, M.; Clapés, P.; Szekrenyi, A.; Hélaine, V.; Lemaire, M. Efficient Biocatalytic Processes for Highly Valuable Terminally Phosphorylated C5 to C9 D-Ketoses. *Green Chem.* **2014**, *16*, 1109–1113.

(173) Ardao, I.; Benaiges, M. D.; Caminal, G.; Álvaro, G. One Step Purification–immobilization of Fuculose-1-Phosphate Aldolase, a Class II DHAP Dependent Aldolase, by Using Metal-Chelate Supports. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 22–27.

(174) Ruiz, J.; Pinsach, J.; Álvaro, G.; González, G.; de Mas, C.; Resina, D.; López-Santín, J. Alternative Production Process Strategies in E. Coli Improving Protein Quality and Downstream Yields. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 1039–1045.

(175) Ardao, I.; Alvaro, G.; Dolors Benaiges, M. Reversible Immobilization of Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase for Biocatalysis: Enzyme Loading Optimization and Aldol Addition Kinetic Modeling. *Biochem. Eng. J.* **2011**, *56*, 190–197.

(176) Lamble, H. J.; Royer, S. F.; Hough, D. W.; Danson, M. J.; Taylor, G. L.; Bull, S. D. A Thermostable Aldolase for the Synthesis of 3-Deoxy-2-Ulosonic Acids. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 817–821.

(177) Suau, T.; Calveras, J.; Clapés, P.; Dolors Benaiges, M.; Álvaro, G. Immobilization of Fuculose-1-Phosphate Aldolase from E. Coli to Glyoxal-Agarose Gels by Multipoint Covalent Attachment. *Biocatal. Biotransformation* **2005**, *23*, 241–250.

(178) Suau, T.; Álvaro, G.; Benaiges, M. D.; López-Santín, J. Performance of an Immobilized Fuculose-1-Phosphate Aldolase for Stereoselective Synthesis. *Biocatal. Biotransformation* **2009**, *27*, 136–142.

(179) Horvath L; L, H.; Horvath L. Immobilization of Pig Muscle Aldolase on a Silica-Based Support. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1989**, *22*, 223.
(180) Magdolna Ábrahám, Z. P. Effects of Carbodiimides as Coupling Agents on the Stability of Immobilized Aldolases. **1992**, *33*, 25–32.
(181) Fu, H.; Dencic, I.; Tibhe, J.; Sanchez Pedraza, C. A.; Wang, Q.; Noel, T.; Meuldijk, J.; de Croon, M.; Hessel, V.; Weizenmann, N.; *et al.* Threonine Aldolase Immobilization on Different Supports for Engineering of Productive, Cost-Efficient Enzymatic Microreactors. *Chem. Eng. J.* **2012**, *207–208*, 564–576.
(182) Tibhe, J. D.; Fu, H.; Noël, T.; Wang, Q.; Meuldijk, J.; Hessel, V. Flow Synthesis of Phenylserine Using Threonine Aldolase Immobilized on Eupergit Support. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2168–2179.
(183) Fei, H.; Xu, G.; Wu, J.-P.; Yang, L.-R. Improvement of the Thermal Stability and Aldehyde Tolerance of Deoxyriboaldolase via Immobilization on Nano-Magnet Material. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *101*, 87–91.
(184) D'Souza, S. E.; Altekar, W.; D'Souza, S. F. Immobilization of Haloferax Mediterranei Aldolase by Cross-Linking in a Proteinic Matrix: Stability and Halophilic Characteristics. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *13*, 561–564.
(185) García García, M. I.; Sola Carvajal, A.; García Carmona, F.; Sánchez Ferrer, Á. Improved Production of 2-Keto-3-Deoxy-D-Glycero-Galactononulosonic Acid (KDN) Using FastPrep-CLEAs. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 90–94.
(186) Ardao, I.; Comenge, J.; Benaiges, M. D.; Álvaro, G.; Puntes, V. F. Rational Nanoconjugation Improves Biocatalytic Performance of Enzymes: Aldol Addition Catalyzed by Immobilized Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2012**, *28*, 6461–6467.
(187) Subrizi, F.; Crucianelli, M.; Grossi, V.; Passacantando, M.; Botta, G.; Antiochia, R.; Saladino, R. Versatile and Efficient Immobilization of 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase (DERA) on Multiwalled Carbon Nanotubes. *ACS Catal.* **2014**, *4*, 3059–3068.
(188) Gill, I.; Ballesteros, A. Novel Sol-Gel Matrices for the Immobilization of Enzymesa. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *799*, 697–700.
(189) Kurjatschij, S.; Katzberg, M.; Bertau, M. Production and Properties of Threonine Aldolase Immobilisates. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *103*, 3–9.
(190) Girigowda, K.; Mulimani, V. H. Hydrolysis of Galacto-Oligosaccharides in Soymilk by κ-Carrageenan-Entrapped α-Galactosidase from Aspergillus Oryzae. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 437–442.
(191) Noyori, R. Synthesizing Our Future. *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 5–6.
(192) Bruggink, A.; Schoevaart, R.; Kieboom, T. Concepts of Nature in Organic Synthesis: Cascade Catalysis and Multistep Conversions in Concert. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 622–640.
(193) García-Junceda, E.; Lavandera, I.; Rother, D.; Schrittwieser, J. H. (Chemo)enzymatic cascades—Nature's Synthetic Strategy Transferred to the Laboratory. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *114*, 1–6.
(194) Hosta-Rigau, L.; York-Duran, M. J.; Zhang, Y.; Goldie, K. N.; Städler, B. Confined Multiple Enzymatic (cascade) Reactions within Poly(dopamine)-Based Capsosomes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 12771–12779.
(195) Kameda, A.; Shiba, T.; Kawazoe, Y.; Satoh, Y.; Ihara, Y.; Munekata, M.; Ishige, K.; Noguchi, T. A Novel ATP Regeneration System Using Polyphosphate-AMP Phosphotransferase and Polyphosphate Kinase. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 557–563.
(196) Liu, W.; Wang, P. Cofactor Regeneration for Sustainable Enzymatic Biosynthesis. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 369–384.
(197) Turner, N. J. Deracemisation Methods. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115–121.
(198) Goldberg, K.; Edegger, K.; Kroutil, W.; Liese, A. Overcoming the Thermodynamic Limitation in Asymmetric Hydrogen Transfer Reactions Catalyzed by Whole Cells. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 192–198.
(199) Steinreiber, J.; Schürmann, M.; Wolberg, M.; van Assema, F.; Reisinger, C.; Fesko, K.; Mink, D.; Griengl, H. Overcoming Thermodynamic and Kinetic Limitations of Aldolase-Catalyzed

Reactions by Applying Multienzymatic Dynamic Kinetic Asymmetric Transformations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1624–1626.

(200) Steinreiber, J.; Fesko, K.; Reisinger, C.; Schürmann, M.; van Assema, F.; Wolberg, M.; Mink, D.; Griengl, H. Threonine Aldolases—an Emerging Tool for Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 918–926.

(201) Fessner, W.-D.; Badía, J.; Eyrisch, O.; Schneider, A.; Sinerius, G. Enzymatic Syntheses of Rare Ketose 1-Phosphates. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5231–5234.

(202) Liese, A. Enzymic Resolution of 1-Phenyl-1,2-Ethanediol by Enantioselective Oxidation: Overcoming Product Inhibition by Continuous Extraction. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *51*, 544.

(203) Hailes, H. C.; Dalby, P. A.; Woodley, J. M. Integration of Biocatalytic Conversions into Chemical Syntheses. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 1063–1066.

(204) Durrwachter, J. R.; Wong, C. H. Fructose 1,6-Diphosphate Aldolase-Catalyzed Stereoselective Synthesis of C-Alkyl and N-Containing Sugars: Thermodynamically Controlled C-C Bond Formations. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4175–4181.

(205) Bednarski, M. D.; Waldmann, H. J.; Whitesides, G. M. Aldolase-Catalyzed Synthesis of Complex C8 and C9 Monosaccharides. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5807–5810.

(206) Fessner, W.-D.; Eyrisch, O. One-Pot Synthesis of Tagatose 1,6-Bisphosphate by Diastereoselective Enzymatic Aldol Addition. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 56–58.

(207) Eyrisch, O.; Sinerius, G.; Fessner, W. D. Facile Enzymic de Novo Synthesis and NMR Spectroscopic Characterization of D-Tagatose 1,6-Bisphosphate. *Carbohydr. Res.* **1993**, *238*, 287–306.

(208) Wong, C. H.; Whitesides, G. M. Synthesis of Sugars by Aldolase-Catalyzed Condensation Reactions. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3199–3205.

(209) Crans, D. C.; Whitesides, G. M. Glycerol Kinase: Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate, Sn-Glycerol-3-Phosphate, and Chiral Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7019–7027.

(210) Sánchez-Moreno, I.; García-García, J. F.; Bastida, A.; García-Junceda, E. Multienzyme System for Dihydroxyacetone Phosphate-Dependent Aldolase Catalyzed C–C Bond Formation from Dihydroxyacetone. *Chem. Commun.* **2004**, 1634–1635.

(211) Sánchez-Moreno, I.; Iturrate, L.; Doyagüez, E. G.; Martínez, J. A.; Fernández-Mayoralas, A.; García-Junceda, E. Activated α,β-Unsaturated Aldehydes as Substrate of Dihydroxyacetone Phosphate (DHAP)-Dependent Aldolases in the Context of a Multienzyme System. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2967–2975.

(212) Schoevaart, R.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. A Four-Step Enzymatic Cascade for the One-Pot Synthesis of Non-Natural Carbohydrates from Glycerol. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6940–6943.

(213) Fessner, W.-D.; Sinerius, G. Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate (and Isosteric Analogues) by Enzymatic Oxidation; Sugars from Glycerol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 209–212.

(214) Hettwer, J.; Oldenburg, H.; Flaschel, E. Enzymic Routes to Dihydroxyacetone Phosphate or Immediate Precursors. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19–20*, 215–222.

(215) Fessner, W.-D.; Walter, C. ―Artificial Metabolisms" for the Asymmetric One-Pot Synthesis of Branched-Chain Saccharides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 614–616.

(216) Zimmermann, F. T.; Schneider, A.; Schörken, U.; Sprenger, G. A.; Fessner, W.-D. Efficient Multi-Enzymatic Synthesis of D-Xylulose 5-Phosphate. *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 1643–1646.

(217) Schoffelen, S.; van Hest, J. C. M. Chemical Approaches for the Construction of Multi-Enzyme Reaction Systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 613–621.

(218) Bäumler, H.; Georgieva, R. Coupled Enzyme Reactions in Multicompartment Microparticles. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1480–1487.

(219) Camarero, J. A. Recent Developments in the Site-Specific Immobilization of Proteins onto Solid Supports. *Biopolymers* **2008**, *90*, 450–458.

(220) Schoffelen, S.; van Hest, J. C. M. Multi-Enzyme Systems: Bringing Enzymes Together in Vitro. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1736–1746.

(221) Wu, M.; He, Q.; Shao, Q.; Zuo, Y.; Wang, F.; Ni, H. Preparation and Characterization of Monodispersed Microfloccules of TiO2 Nanoparticles with Immobilized Multienzymes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 3300–3307.

(222) Zhang, Y.; Gao, F.; Zhang, S.-P.; Su, Z.-G.; Ma, G.-H.; Wang, P. Simultaneous Production of 1,3-Dihydroxyacetone and Xylitol from Glycerol and Xylose Using a Nanoparticle-Supported Multi-Enzyme System with in Situ Cofactor Regeneration. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 1837–1843.

(223) Betancor, L.; Berne, C.; Luckarift, H. R.; Spain, J. C. Coimmobilization of a Redox Enzyme and a Cofactor Regeneration System. *Chem. Commun.* **2006**, 3640–3642.

(224) Mosbach, K.; Mattiasson, B. Matrix-Bound Enzymes. Part II: Studies on a Matrix-Bound Two-Enzyme-System. *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 2093–2100.

(225) Myung, S.; You, C.; Zhang, Y.-H. P. Recyclable Cellulose-Containing Magnetic Nanoparticles: Immobilization of Cellulose-Binding Module-Tagged Proteins and a Synthetic Metabolon Featuring Substrate Channeling. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4419–4427.

(226) Jia, F.; Narasimhan, B.; Mallapragada, S. K. Biomimetic Multienzyme Complexes Based on Nanoscale Platforms. *AIChE J.* **2013**, *59*, 355–360.

(227) Kang, W.; Liu, J.; Wang, J.; Nie, Y.; Guo, Z.; Xia, J. Cascade Biocatalysis by Multienzyme–Nanoparticle Assemblies. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1387–1394.

(228) Babich, L.; Hartog, A. F.; van Hemert, L. J. C.; Rutjes, F. P. J. T.; Wever, R. Synthesis of Carbohydrates in a Continuous Flow Reactor by Immobilized Phosphatase and Aldolase. *ChemSusChem* **2012**, *5*, 2348–2353.

(229) Ge, Y.; Wang, Y.; Zhou, H.; Wang, S.; Tong, Y.; Li, W. Coimmobilization of Glucoamylase and Glucose Isomerase by Molecular Deposition Technique for One-Step Conversion of Dextrin to Fructose. *J. Biotechnol.* **1999**, *67*, 33–40.

(230) Fu, J.; Liu, M.; Liu, Y.; Woodbury, N. W.; Yan, H. Interenzyme Substrate Diffusion for an Enzyme Cascade Organized on Spatially Addressable DNA Nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5516–5519.

(231) Fu, Y.; Zeng, D.; Chao, J.; Jin, Y.; Zhang, Z.; Liu, H.; Li, D.; Ma, H.; Huang, Q.; Gothelf, K. V.; *et al.* Single-Step Rapid Assembly of DNA Origami Nanostructures for Addressable Nanoscale Bioreactors. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 696–702.

(232) Marouf, Abderrazak; Tremblin, Gérard. Glucides. In *Abrégé de biochimie appliquée*; Grenoble Sciences; EDP Sciences, 2009; p. 19.

(233) Smidsrød, O.; Whittington, S. G. Monte Carlo Investigation of Chemical Inhomogeneity in Polymers. *Macromolecules* **1969**, *2*, 42–44.

(234) Haug, A.; Smidsrød, O. Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions. **1970**, *24*, 843–854.

(235) Grant, G. T.; Morris, E. R.; Rees, D. A.; Smith, P. J. C.; Thom, D. Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model. *FEBS Lett.* **1973**, *32*, 195–198.

(236) Morana, A.; Mangione, A.; Maurelli, L.; Fiume, I.; Paris, O.; Cannio, R.; Rossi, M. Immobilization and Characterization of a Thermostable β-Xylosidase to Generate a Reusable Biocatalyst. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1205–1213.

(237) Busto, M. D.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. Studies of Microbial β-D-Glucosidase Immobilized in Alginate Gel Beads. *Process Biochem.* **1995**, *30*, 421–426.

(238) Dashevsky, A. Protein Loss by the Microencapsulation of an Enzyme (lactase) in Alginate Beads. *Int. J. Pharm.* **1998**, *161*, 1–5.

(239) Wood, D. A.; Whateley, T. L. A Study of Enzyme and Protein Microencapsulation--Some Factors Affecting the Low Apparent Enzymic Activity Yields. *J. Pharm. Pharmacol.* **1982**, *34*, 552–557.

(240) Patil, R. T.; Speaker, T. J. Retention of Trypsin Activity in Spermine Alginate Microcapsules. *J. Microencapsul.* **1997**, *14*, 469–474.

(241) Pommersheim, R.; Schrezenmeir, J.; Vogt, W. Immobilization of Enzymes by Multilayer Microcapsules. *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 1557–1567.

(242) Arruda, L. M. O.; Vitolo, M. Characterization of Invertase Entrapped into Calcium Alginate Beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *81*, 23–33.

(243) Busto, M. D.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. Characterization of Microbial Endo-β-Glucanase Immobilized in Alginate Beads. *Acta Biotechnol.* **1998**, *18*, 189–200.
(244) Barbeyron, T.; Michel, G.; Potin, P.; Henrissat, B.; Kloareg, B. ι-Carrageenases Constitute a Novel Family of Glycoside Hydrolases, Unrelated to That of κ-Carrageenanes. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35499–35505.
(245) Tosa, T.; Sato, T.; Mori, T.; Yamamoto, K.; Takata, I.; Nishida, Y.; Chibata, I. Immobilization of Enzymes and Microbial Cells Using Carrageenan as Matrix. *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, *21*, 1697–1709.
(246) Anderson, N. S.; Campbell, J. W.; Harding, M. M.; Rees, D. A.; Samuel, J. W. B. X-Ray Diffraction Studies of Polysaccharide Sulphates: Double Helix Models for κ- and ι-Carrageenans. *J. Mol. Biol.* **1969**, *45*, 85–97.
(247) Viebke, C.; Piculell, L.; Nilsson, S. On the Mechanism of Gelation of Helix-Forming Biopolymers. *Macromolecules* **1994**, *27*, 4160–4166.
(248) Morris, E. R.; Rees, D. A.; Robinson, G. Cation-Specific Aggregation of Carrageenan Helices: Domain Model of Polymer Gel Structure. *J. Mol. Biol.* **1980**, *138*, 349–362.
(249) Bongaerts, K.; Reynaers, H. Equilibrium and Nonequilibrium Association Processes of κ-Carrageenan in Aqueous Salt Solutions. *Macromolecules* **1999**, *32*, 683–689.
(250) Cuppo, F.; Reynaers, H. Association of Kappa-Carrageenan Induced by Cs Ions in Iodide Aqueous Solution: A Light Scattering Study. *Macromolecules* **2002**, *35*, 539–547.
(251) Paoletti, S.; Smidsrod, O.; Grasdalen, H. Thermodynamic Stability of the Ordered Conformations of Carrageenan Polyelectrolytes. *Biopolymers* **1984**, *23*, 1771–1794.
(252) Rochas, C.; Rinaudo, M. Mechanism of Gel Formation in κ-Carrageenan. *Biopolymers* **1984**, *23*, 735–745.
(253) Smidsrød, O. Some Physical Properties of Carrageenan in Solution and Gel State. *Carbohydr. Polym.* **1982**, *2*, 270–272.
(254) Les carraghénanes http://tpegelification.e-monsite.com/pages/les-carraghenanes.html (accessed Aug 20, 2015).
(255) Desai, P.D.; Dave, A.M.; Devi, S. Chemoselective Hydrolysis of Methyl 2-Acetoxybenzoate Using Free and Entrapped Esterase in K-Carrageenan Beads. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *108*, 2617–2622.
(256) Jegannathan, K. R.; Jun-Yee, L.; Chan, E.-S.; Ravindra, P. Production of Biodiesel from Palm Oil Using Liquid Core Lipase Encapsulated in κ-Carrageenan. *Fuel* **2010**, *89*, 2272–2277.
(257) Patil, R. T.; Speaker, T. J. Water-Based Microsphere Delivery System for Proteins. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 9–15.
(258) Mandal, S.; Mayadevi, S. Cellulose Supported Layered Double Hydroxides for the Adsorption of Fluoride from Aqueous Solution. *Chemosphere* **2008**, *72*, 995–998.
(259) Mandal, S.; Patil, V. S.; Mayadevi, S. Alginate and Hydrotalcite-like Anionic Clay Composite Systems: Synthesis, Characterization and Application Studies. *Microporous Mesoporous Mater.* **2012**, *158*, 241–246.
(260) Darder, M.; López-Blanco, M.; Aranda, P.; Leroux, F.; Ruiz-Hitzky, E. Bio-Nanocomposites Based on Layered Double Hydroxides. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1969–1977.
(261) Leroux, F.; Gachon, J.; Besse, J.-P. Biopolymer Immobilization during the Crystalline Growth of Layered Double Hydroxide. *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 245–250.
(262) Alcântara, A. C. S.; Aranda, P.; Darder, M.; Ruiz-Hitzky, E. Bionanocomposites Based on Alginate–zein/layered Double Hydroxide Materials as Drug Delivery Systems. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 9495–9504.
(263) Han, Y.-U.; Lee, W.-S.; Lee, C.-G.; Park, S.-J.; Kim, K.-W.; Kim, S.-B. Entrapment of Mg-Al Layered Double Hydroxide in Calcium Alginate Beads for Phosphate Removal from Aqueous Solution. *Desalination Water Treat.* **2011**, *36*, 178–186.
(264) Delattre, C.; Michaud, P.; Elboutachfaiti, R.; Courtois, B.; Courtois, J. Production of Oligocellouronates by Biodegradation of Oxidized Cellulose. *Cellulose* **2006**, *13*, 63–71.
(265) Svagan, A. Bio-Inspired Cellulose Nanocomposites and Foams Based on Starch Matrix. **2008**.
(266) Yang, Q. Z.; Sun, D. J.; Zhang, C. G.; Wang, X. J.; Zhao, W. A. Synthesis and Characterization of Polyoxyethylene Sulfate Intercalated Mg−Al−Nitrate Layered Double Hydroxide. *Langmuir* **2003**, *19*, 5570–5574.

(267) Bajan, N.; Popa, M.; Popa, M. I. Carboxymethyl Cellulose-Based Hydrogels for Drug Encapsulation. *Stud. Si Cercet. Stiintifice* **2004**, *5*, 65–74.
(268) Garrett, R. H.; Grisham, C. M. *Biochimie*; De Boeck Supérieur, 2000.
(269) Shaeri, J.; Wright, I.; Rathbone, E. B.; Wohlgemuth, R.; Woodley, J. M. Characterization of Enzymatic D-Xylulose 5-Phosphate Synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 761–767.
(270) Weymouth-Wilson, A. C.; Clarkson, R. A.; Jones, N. A.; Best, D.; Wilson, F. X.; Pino-González, M.-S.; Fleet, G. W. J. Large Scale Synthesis of the Acetonides of L-Glucuronolactone and of L-Glucose: Easy Access to L-Sugar Chirons. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6307–6310.
(271) Yun, M.; Moon, H. R.; Kim, H. O.; Choi, W. J.; Kim, Y.-C.; Park, C.-S.; Jeong, L. S. A Highly Efficient Synthesis of Unnatural L-Sugars from D-Ribose. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5903–5905.
(272) Fessner, W.-D.; Sinerius, G.; Schneider, A.; Dreyer, M.; Schulz, G. E.; Badia, J.; Aguilar, J. Diastereoselective Enzymatic Aldol Additions: L-Rhamnulose and L-Fuculose 1-Phosphate Aldolases from E. Coli. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 555–558.
(273) Fessner, W.-D.; Schneider, A.; Held, H.; Sinerius, G.; Walter, C.; Hixon, M.; Schloss, J. V. The Mechanism of Class II, Metal-Dependent Aldolases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2219–2221.
(274) Schümperli, M.; Pellaux, R.; Panke, S. Chemical and Enzymatic Routes to Dihydroxyacetone Phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 33–45.
(275) Sánchez-Moreno, I.; García-García, J. F.; Bastida, A.; García-Junceda, E. Multienzyme System for Dihydroxyacetone Phosphate-Dependent Aldolase Catalyzed C–C Bond Formation from Dihydroxyacetone. *Chem. Commun.* **2004**, 1634–1635.
(276) Sánchez-Moreno, I.; Iturrate, L.; Martín-Hoyos, R.; Jimeno, M. L.; Mena, M.; Bastida, A.; García-Junceda, E. From Kinase to Cyclase: An Unusual Example of Catalytic Promiscuity Modulated by Metal Switching. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2009**, *10*, 225–229.
(277) Erni, B.; Siebold, C.; Christen, S.; Srinivas, A.; Oberholzer, A.; Baumann, U. Small Substrate, Big Surprise: Fold, Function and Phylogeny of Dihydroxyacetone Kinases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2006**, *63*, 890–900.
(278) Beutler, R.; Kämpfer, U.; Schaller, J.; Erni, B. Heterodimeric Dihydroxyacetone Kinase from a ptsI Mutant of Escherichia Coli. *Microbiology* **2001**, *147*, 249–250.
(279) Johnson, E. A.; Burke, S. K.; Forage, R. G.; Lin, E. C. Purification and Properties of Dihydroxyacetone Kinase from Klebsiella Pneumoniae. *J. Bacteriol.* **1984**, *160*, 55–60.
(280) Daniel, R.; Stuertz, K.; Gottschalk, G. Biochemical and Molecular Characterization of the Oxidative Branch of Glycerol Utilization by Citrobacter Freundii. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 4392–4401.
(281) Siebold, C.; Arnold, I.; Garcia-Alles, L. F.; Baumann, U.; Erni, B. Crystal Structure of the Citrobacter Freundii Dihydroxyacetone Kinase Reveals an Eight-Stranded α-Helical Barrel ATP-Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48236–48244.
(282) Garcia-Alles, L. F.; Siebold, C.; Nyffeler, T. L.; Flükiger-Brühwiler, K.; Schneider, P.; Bürgi, H.-B.; Baumann, U.; Erni, B. Phosphoenolpyruvate- and ATP-Dependent Dihydroxyacetone Kinases: Covalent Substrate-Binding and Kinetic Mechanism. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *43*, 13037–13045.
(283) Yanase, H.; Okuda, M.; Kita, K.; Sato, Y.; Shibata, K.; Sakai, Y.; Kato, N. Enzymatic Preparation of [1, 3-13C]dihydroxyacetone Phosphate from [13C]methanol and Hydroxypyruvate Using the Methanol-Assimilating System of Methylotrophic Yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 228–234.
(284) Itoh, N.; Tujibata, Y.; Liu, J. Q. Cloning and Overexpression in Escherichia Coli of the Gene Encoding Dihydroxyacetone Kinase Isoenzyme I from Schizosaccharomyces Pombe, and Its Application to Dihydroxyacetone Phosphate Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 193–200.
(285) Yoshihara, K.; Shimada, Y.; Karita, S.; Kimura, T.; Sakka, K.; Ohmiya, K. Purification and Characterization of Two Dihydroxyacetone Kinases from Schizosaccharomyces Pombe IFO 0354. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 4663–4665.
(286) Protein Calculator http://protcalc.sourceforge.net/ (accessed Oct 18, 2015).

(287) Kayne, F. J. Pyruvate Kinase. In *The Enzymes*; Paul D. Boyer, Ed.; Group Transfer Part A: Nucleotidyl Transfer Nucleosidyl Transfer Acyl Transfer Phosphoryl Transfer; Academic Press, 1973; Vol. 8, pp. 353–382.
(288) G Valentini, L. C. The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 18145–18152.
(289) Enriqueta Muñoz, M.; Ponce, E. Pyruvate Kinase: Current Status of Regulatory and Functional Properties. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *135*, 197–218.
(290) Melamud, E.; Mildvan, A. S. Magnetic Resonance Studies of the Interaction of Co2+ and Phosphoenolpyruvate with Pyruvate Kinase. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 8193–8201.
(291) Mildvan, A. S.; Cohn, M. Kinetic and Magnetic Resonance Studies of the Pyruvate Kinase Reaction I. Divalent Metal Complexes Of Pyruvate Kinase. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 238–246.
(292) Mildvan, A. S.; Cohn, M. Kinetic and Magnetic Resonance Studies of the Pyruvate Kinase Reaction II. Complexes Of Enzyme, Metal, And Substrates. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1178–1193.
(293) Bygrave, F. L. Studies on the Interaction of Metal Ions with Puruvate Kinase from Ehrlich Ascites-Tumour Cells and from Rabbit Muscle. *Biochem. J.* **1966**, *101*, 488–494.
(294) Oria-Hernández, J.; Cabrera, N.; Pérez-Montfort, R.; Ramírez-Silva, L. Pyruvate Kinase Revisited: The Activating Effect of K+. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37924–37929.
(295) Cottam, G. L.; Hollenberg, P. F.; Coon, M. J. Subunit Structure of Rabbit Muscle Pyruvate Kinase. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1481–1486.
(296) Bücher, T.; Pfleiderer, G. Pyruvate Kinase from Muscle: Pyruvate Phosphokinase, Pyruvic Phosphoferase, Phosphopyruvate Transphosphorylase, Phosphate—transferring Enzyme II, Etc. Phosphoenolpyruvate + ADP ⇌ Pyruvate + ATP. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1955; Vol. 1, pp. 435–440.
(297) Kayne, F. J. Pyruvate Kinase Catalyzed Phosphorylation of Glycolate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *59*, 8–13.
(298) Sakai, H.; Suzuki, K.; Imahori, K. Purification and Properties of Pyruvate Kinase from Bacillus Stearothermophilus. *J. Biochem. (Tokyo)* **1986**, *99*, 1157–1167.
(299) Suzuki, K.; Ito, S.; Shimizu-Ibuka, A.; Sakai, H. Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Pyruvate Kinase from Bacillus Stearothermophilus. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2005**, *61*, 759–761.
(300) Sakai, H. Possible Structure and Function of the Extra C-Terminal Sequence of Pyruvate Kinase from Bacillus Stearothermophilus. *J. Biochem. (Tokyo)* **2004**, *136*, 471–476.
(301) Boyer, P.D.; Lardy, H.; Myrbaeck, K. Pyruvate Kinase. In *Pyruvate kinase*; 1962; Vol. 6, pp. 95–113.
(302) Ramírez-Silva, L.; Guerrero-Mendiola, C.; Cabrera, N. The Importance of Polarity in the Evolution of the K+ Binding Site of Pyruvate Kinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 22214–22226.
(303) Morgan, H. P.; Zhong, W.; McNae, I. W.; Michels, P. A. M.; Fothergill-Gilmore, L. A.; Walkinshaw, M. D. Structures of Pyruvate Kinases Display Evolutionarily Divergent Allosteric Strategies. *R. Soc. Open Sci.* **2014**, *1*, 140120.
(304) Sakai, H. Mutagenesis of the Active Site Lysine 221 of the Pyruvate Kinase from Bacillus Stearothermophilus. *J. Biochem. (Tokyo)* **2005**, *137*, 141–145.
(305) Simon, L. M.; Kotormán, M.; Szajáni, B.; Boross, L. Comparative Studies on Soluble and Immobilized Rabbit Muscle Pyruvate Kinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, *11*, 195–205.
(306) Nájera, H.; Costas, M.; Fernández-Velasco, D. A. Thermodynamic Characterization of Yeast Triosephosphate Isomerase Refolding: Insights into the Interplay between Function and Stability as Reasons for the Oligomeric Nature of the Enzyme. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 785–792.
(307) Krietsch, W. K. G. [93] Triosephosphate Isomerase from Rabbit Liver. In *Methods in Enzymology*; W.A. Wood, Ed.; Carbohydrate Metabolism, Part B; Academic Press, 1975; Vol. 41, pp. 438–442.

(308) Gao, X.-G.; Garza-Ramos, G.; Saavedra-Lira, E.; Cabrera, N.; De Gomez-Puyou, M. T.; Perez-Montfort, R.; Gomez-Puyou, A. Reactivation of Triosephosphate Isomerase from Three Trypanosomatids and Human: Effect of Suramin. *Biochem. J.* **1998**, *332*, 91–96.

(309) Ationu, A.; Humphries, A.; Lalloz, M. R.; Arya, R.; Wild, B.; Warrilow, J.; Morgan, J.; Bellingham, A. J.; Layton, D. M. Reversal of Metabolic Block in Glycolysis by Enzyme Replacement in Triosephosphate Isomerase-Deficient Cells. *Blood* **1999**, *94*, 3193–3198.

(310) Knowles, J. R.; Albery, W. J. Perfection in Enzyme Catalysis: The Energetics of Triosephosphate Isomerase. *Acc. Chem. Res.* **1977**, *10*, 105–111.

(311) Fell, D. A.; Branford White, C. J. Evidence for the Activity of Immobilised Monomers of Triose Phosphate Isomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 1013–1018.

(312) Abrahám, M.; Alexin, A.; Szajáni, B. Immobilized Triosephosphate Isomerases. A Comparative Study. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, *36*, 1–12.

(313) Piattoni, C. V.; Figueroa, C. M.; Asención Diez, M. D.; Parcerisa, I. L.; Antuña, S.; Comelli, R. A.; Guerrero, S. A.; Beccaria, A. J.; Iglesias, A. Á. Production and Characterization of Escherichia Coli Glycerol Dehydrogenase as a Tool for Glycerol Recycling. *Process Biochem.* **2013**, *48*, 406–412.

(314) Schneider, S.; Gutiérrez, M.; Sandalova, T.; Schneider, G.; Clapés, P.; Sprenger, G. A.; Samland, A. K. Redesigning the Active Site of Transaldolase TalB from Escherichia Coli: New Variants with Improved Affinity towards Nonphosphorylated Substrates. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2010**, *11*, 681–690.

(315) Camps Bres, F.; Guérard-Hélaine, C.; Hélaine, V.; Fernandes, C.; Sánchez-Moreno, I.; Traïkia, M.; García-Junceda, E.; Lemaire, M. L-Rhamnulose-1-Phosphate and L-Fuculose-1-Phosphate Aldolase Mediated Multi-Enzyme Cascade Systems for Nitrocyclitol Synthesis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *114*, 50–57.

(316) Sakai, H.; Ohta, T. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene for Pyruvate Kinase of Bacillus Stearothermophilus and the Production of the Enzyme in Escherichia Coli. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *211*, 851–859.

(317) Aslanidis, C.; Jong, P. J. de. Ligation-Independent Cloning of PCR Products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6069–6074.

(318) Kreimeyer, A.; Perret, A.; Lechaplais, C.; Vallenet, D.; Médigue, C.; Salanoubat, M.; Weissenbach, J. Identification of the Last Unknown Genes in the Fermentation Pathway of Lysine. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 7191–7197.

(319) Mann, K. M.; Lardy, H. A. Phosphoric Esters of Biological Importance V. The Synthesis of L-Sorbose-1-Phosphate and L-Sorbose-6-Phosphate. *J. Biol. Chem.* **1950**, *187*, 339–348.

(320) Tang, C.-T.; Engel, R.; Tropp, B. E. L-Glyceraldehyde 3-Phosphate, a Bactericidal Agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 147–153.

(321) Gauss, D.; Schoenenberger, B.; Wohlgemuth, R. Chemical and Enzymatic Methodologies for the Synthesis of Enantiomerically Pure Glyceraldehyde 3-Phosphates. *Carbohydr. Res.* **2014**, *389*, 18–24.

(322) Desai, K. K.; Miller, B. G. L-Glyceraldehyde 3-Phosphate Reductase from Escherichia Coli Is a Heme Binding Protein. *Bioorganic Chem.* **2010**, *38*, 37–41.

(323) Kalyananda, M. K.; Engel, R.; Tropp, B. E. Metabolism of L-Glyceraldehyde 3-Phosphate in Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 2488–2493.

(324) Clapés, P. Biocatalysis in Organic Synthesis. In *Science of synthesis*; Faber, K.; Fessner, W. D.; Turner, N. J., Eds.; Georg Thiem, Verlag Stuttgart, 2015; Vol. 2, pp. 31–92.

(325) Jean Pelmont. L'activité Enzymatique. In *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*; Presses universitaires de Grenoble: Grenoble, 1995; pp. 292–296.

(326) Shchepin, R. V.; Pham, W.; Chekmenev, E. Y. Dephosphorylation and Biodistribution of 1-^{13}C-Phospholactate in Vivo. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57*, 517–524.

(327) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

Résumé

Ces travaux de thèse pluridisciplinaires à l'interface entre biocatalyse et nanomatériaux visent la conception de matériaux biohybrides innovants par assemblage dans des conditions douces de matériaux inorganiques de type hydroxydes doubles lamellaires (HDL) avec des enzymes. La première partie de ce mémoire est consacrée à la caractérisation des interactions physico-chimiques entre les HDL et la fructose-6-phosphate aldolase (FSA) catalysant la formation stéréosélective de liaisons C-C pour conduire à des polyols chiraux. Les structures lamellaires HDL permettent un confinement efficace de systèmes enzymatiques grâce à leur structure bidimensionnelle poreuse, leurs propriétés physico-chimiques favorables à l'échange ionique et leur biocompatibilité. Différentes stratégies d'immobilisation de la FSA dans des matrices d'HDL ont été explorées, le taux d'immobilisation et l'activité biocatalytique étant fortement dépendant de la méthode d'assemblage et de la nature des phases HDL. Le taux d'immobilisation de l'enzyme obtenu par coprécipitaton est supérieur à celui obtenu par adsorption.

Dans une deuxième partie, un bioréacteur a été élaboré par un assemblage hiérarchisé constitué de la FSA, de nanoplaquettes d'HDL et de billes de polysaccharide, ce dernier jouant le rôle de matrice macrostructurante. De façon notable, le taux d'encapsulation de l'enzyme dans la matrice macroscopique est amélioré lorsque le biocatalyseur est pré-encapsulé dans les nanoplaquettes d'HDL. Ceci est attribué aux interactions électrostatiques favorables entre les chaînes de polysaccharide et les HDL, facilitant une charge de matière plus importante. L'efficacité catalytique du bioréacteur obtenu et sa recyclabilité ont été démontrés.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous décrivons pour la première fois la conception de bionanoréacteurs enzymes@HDL par co-immobilisation de systèmes bi- ou tétra-enzymatiques dans les HDL permettant de réaliser des cascades multienzymatiques biomimétiques. L'immobilisation des différentes enzymes prises séparément a d'abord été optimisée afin de déterminer les conditions de co-immobilisation et de réaliser les cascades biocatalytiques en phase hétérogène. Ces bionanoréacteurs, dont nous avons démontré la recyclabilité, ont été appliqués pour la synthèse de sucres phosphorylés de série D. Enfin, une cascade multienzymatique a été conçue de novo en solution aqueuse et optimisée pour synthétiser différents sucres phosphorylés rares de série L.

Mots clés : biocatalyse, Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL), fructose-6-phosphate aldolase, matériaux biohybrides, cascade enzymatique, bionanoréacteur, immobilisation d'enzymes.

Abstract

This multidisciplinary thesis at the biocatalysis/nanomaterial interface perfectly aims at designing innovative biohybrid materials by the assembly of inorganic materials the Layered Double Hydroxides (LDH) with enzymes under mild conditions. The first part of this thesis is devoted to the characterization of physico-chemical interactions between the LDH and the fructose-6-phosphate aldolase (FSA) catalyzing the stereoselective C-C bond formation to provide chiral polyols. LDH structures allow the effective confinement of enzymatic systems thanks to their opened two-dimensional structure as well as their chemical surface properties at the nanoscale and their biocompatibility. The FSA immobilization in different LDH matrices by different methods was studied. Biocatalytic activity is highly dependent on the method of assembling, modulating the final amount of FSA. The retaining activity rate of co-precipitated material was higher than that obtained for the adsorbed enzyme.

In a second part, a bionanoreactor was developed based on a hierarchized assembly of FSA, LDH nanoplatelets and polysaccharide beads acting as a macrostructuring matrices. Significantly, the encapsulated enzyme rate in the beads was improved when the biocatalyst was pre-encapsulated in LDH nanoplatelets. This is attributed to favorable electrostatic interactions between the polysaccharide chains and LDH, facilitating a higher catalyst loading. The catalytic efficiency of the prepared bioreactor and its recyclability were demonstrated.

In the third part of this thesis, we describe for the first time the design of bionanoreactors ~~–e~~nzymes@LDH" by co-immobilisation of two and four enzymes in LDH allowing biomimetic multienzymatic cascades. We first studied the immobilization of the different enzymes taken separately. Then we worked on the optimization of the biocatalytic cascades in heterogeneous phase. These bionanoreactors, for which we have shown the recyclability, have been applied to the synthesis of D-series phosphorylated sugars. Finally, a multienzymatic cascade was *de novo* designed in aqueous homogeneous solution. It was optimized for the synthesis of rare L-phosphorylated sugars.

Keywords: biocatalysis, Layered Double Hydroxides (LDH), fructose-6-phosphate aldolase, biohybrid materials, enzymatic cascade, bionanoreactor, enzyme immobilization.