



**TECHNIQUES  
DE L'INGÉNIEUR**

Réf. : **BI0590 V1**

# Biocatalyse ou catalyse enzymatique

Date de publication :  
**10 novembre 2009**

Date de dernière validation :  
**10 octobre 2016**

Cet article est issu de : **Procédés chimie - bio - agro | Chimie verte**

par **Didier COMBES, Pierre MONSAN**

**Résumé** Les enzymes savent compenser leur manque de généricité par leur extraordinaire sélectivité, voire énantiosélectivité et régiosélectivité. Ces propriétés en font des outils de choix pour réaliser des réactions de synthèse, dans des conditions particulièrement compatibles avec la préservation de l'environnement (milieux aqueux, pH non extrêmes, températures peu élevées). L'utilisation de plus en plus grande de matières premières renouvelables, donc d'origine biologique, pour favoriser des conditions de développement durable ne pourra qu'accroître les exemples de mise en oeuvre de biocatalyseurs. [...]

**Abstract** Enzymes are able to compensate their lack of genericity by their extraordinary selectivity and even enantioselectivity or regioselectivity. Due to these properties, they are valuable tools in order to carry out synthesis reactions under conditions which are particularly compatible with the preservation of the environment (aqueous medium, non-extreme pH, low temperatures). The increasing usage of renewable raw materials thus of biologic origin in order to foster sustainable development conditions will certainly increase the cases of implementation of biocatalysts. [...]

**Pour toute question :**  
Service Relation clientèle  
Techniques de l'Ingénieur  
Immeuble Pleyad 1  
39, boulevard Ornano  
93288 Saint-Denis Cedex

**Par mail :**  
infos.clients@teching.com  
**Par téléphone :**  
00 33 (0)1 53 35 20 20

Document téléchargé le : **04/04/2021**

Pour le compte : **7200048087 - ecole normale superieure de lyon // 140.77.246.13**

© Techniques de l'Ingénieur | tous droits réservés

# Biocatalyse ou catalyse enzymatique

par **Didier COMBES**

*Professeur à l'Institut national des sciences appliquées de Toulouse*

et **Pierre MONSAN**

*Professeur à l'Institut national des sciences appliquées de Toulouse*

*École nationale supérieure des mines de Paris*

*Institut universitaire de France*

<b>1. Enzymes : structure, origine, classification</b> .....	BIO 590 - 2
1.1 Structure – coenzymes .....	– 2
1.2 Sources d'enzyme .....	– 3
1.3 Classification des enzymes .....	– 4
<b>2. Cinétique homogène</b> .....	– 5
2.1 Équation de Michaelis-Menten .....	– 5
2.2 Inhibition/activation .....	– 6
2.3 Allostérie (modèle de Monod) .....	– 7
2.4 Effet du pH et de la température.....	– 8
<b>3. Cinétique hétérogène</b> .....	– 9
3.1 Méthodes d'immobilisation des enzymes .....	– 9
3.2 Influence des phénomènes de transfert de matière (diffusion, encombrement stérique, partage).....	– 11
3.3 Réacteurs (piston, mélangé) .....	– 12
<b>4. Applications industrielles des enzymes</b> .....	– 13
4.1 Détergents .....	– 13
4.2 Industrie de l'amidon.....	– 13
4.3 Domaine agroalimentaire (alimentation humaine et animale).....	– 14
4.4 Chimie fine et santé .....	– 15
4.5 Applications analytiques, diagnostic et capteurs.....	– 17
<b>Pour en savoir plus</b> .....	Doc. BIO 590

**L**es enzymes savent compenser leur manque de généralité par leur extraordinaire sélectivité, voire énantiosélectivité et régiosélectivité, qui en font des outils de choix pour réaliser des réactions de synthèse dans des conditions particulièrement compatibles avec la préservation de l'environnement (milieux aqueux, pH non extrêmes, températures peu élevées). L'utilisation de plus en plus grande de matières premières renouvelables, donc d'origine biologique, pour favoriser des conditions de développement durable ne pourra qu'accroître les exemples de mise en œuvre de biocatalyseurs. De plus, les outils de la biologie moléculaire, combinés à ceux de la biologie structurale et de la modélisation « in silico », permettent aujourd'hui non seulement de diversifier les sources de nouvelles enzymes et d'en améliorer extraordinairement l'efficacité et la stabilité, mais également de concevoir des biocatalyseurs totalement originaux, capables de réaliser de nouvelles réactions.

### Encadré 1 – Historique

Il est très difficile de donner une date exacte de la découverte des enzymes. Une activité hors d'une cellule vivante a été observée en 1783 lorsque Spallanzani nota que la viande était « liquéfiée » par le suc gastrique des faucons.

D'autres observations similaires ont été faites par la suite, mais la première découverte d'une enzyme est en général créditée à Payen et Persoz qui, en 1833 ont traité un extrait aqueux de malt avec de l'éthanol et ainsi précipité une substance labile à la chaleur, qui initie l'hydrolyse de l'amidon. Ils ont appelé cette fraction « diastase ». Aujourd'hui, on sait que la diastase était une préparation impure d'amylase.

Le mot enzyme, « dans la levure » en grec, apparaît en 1878 : Kühne le propose pour faire la distinction entre les « ferments organisés » (le micro-organisme entier) ou « inorganisés » (excrétés par les micro-organismes).

C'est en 1897 que Bertrand observa que quelques enzymes nécessitaient des facteurs dialysables pour avoir de l'activité catalytique : ces substances ont été appelées coenzymes.

À partir du début du 20<sup>e</sup> siècle, de nombreux essais sont faits pour purifier les enzymes et décrire leur activité catalytique en termes mathématiques précis.

En 1902, Henri a suggéré qu'un complexe enzyme-substrat était un intermédiaire obligatoire dans la réaction catalytique. Il donne également une équation mathématique qui prend en compte l'effet de la concentration du substrat sur la vitesse de réaction.

L'effet du pH sur l'activité enzymatique a été mis en évidence par Sorensen en 1909 et c'est en 1913 que Michaelis et Menten redécouvrent l'équation d'Henri. Cette équation est basée sur des principes simples d'équilibre chimique.

Le fait que les enzymes sont des protéines n'a été accepté que vers la fin des années 1920.

Enfin, c'est en 1965 que Monod, Wyman et Changeux présentent un modèle cinétique pour les enzymes allostériques (enzymes de régulation qui donnent des courbes de vitesses sigmoïdes et non hyperboliques).

– structure tertiaire : la chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire peut se replier sur elle-même pour former une molécule de configuration spatiale bien déterminée (en général, de forme globulaire dans le cas des enzymes). Les liaisons intramoléculaires (pont disulfure, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, liaisons hydrophobes) responsables de la stabilité de la structure tertiaire se forment à partir des chaînes latérales des acides aminés ;

– structure quaternaire : les protéines sont souvent constituées de plusieurs sous-unités qui correspondent chacune à une chaîne polypeptidique de structure tertiaire définie. L'association de ces sous-unités entre elles par le même type de liaisons que celles rencontrées au niveau de la structure tertiaire constitue la structure quaternaire de la protéine. C'est de cette association dont dépend l'activité de la protéine.

La réaction de production d'un produit à partir d'un substrat, catalysée par une enzyme passe par la formation d'un complexe enzyme-substrat. Cette notion de couple enzyme-substrat implique que l'enzyme possède une région complémentaire par sa taille, sa forme et la nature chimique du substrat : c'est le site actif de l'enzyme. Ainsi, une seule substance ou au plus un nombre limité de substances peuvent se lier à l'enzyme et agir en tant que substrat. C'est seulement lorsque le substrat est ancré dans le site actif que peuvent se produire les changements chimiques qui le convertissent en produit. On sait que le site actif n'a pas besoin d'être une cavité rigide ou une poche, mais plus simplement un arrangement spécifique dans l'espace de résidus d'acides aminés qui vont interagir avec les groupes complémentaires du substrat.

Les enzymes sont des protéines dont la masse molaire est au moins supérieure à 10 000. La plupart des substrats sont des substances de faible masse molaire (dans le cas des substrats polymériques : protéines, polysaccharides... c'est seulement une partie du polymère qui est reconnue et non le polymère entier). Ainsi, seule une faible fraction de l'enzyme est impliquée dans le site actif. Il n'y a pas plus d'une douzaine d'acides aminés autour du site actif et seuls deux ou trois d'entre eux sont directement impliqués.

Pourquoi les enzymes sont-elles des macromolécules alors qu'un peptide constitué d'une douzaine d'acides aminés devrait suffire ? La réponse est évidente lorsque l'on considère que les deux ou trois résidus d'acides aminés du site actif doivent avoir une conformation tridimensionnelle précise impossible à obtenir à partir d'un court peptide.

La combinaison de l'enzyme et du substrat peut être plus spécifique encore que ne le laissent penser les concepts du type clef-serrure. Une liaison tridimensionnelle du substrat et la flexibilité du site actif permettent d'expliquer le haut degré de spécificité d'une enzyme vis-à-vis, par exemple, de molécules analogues au substrat.

Les enzymes accélèrent d'une manière phénoménale les vitesses de réaction. Lorsqu'il est possible de comparer des vitesses de réaction non enzymatique et enzymatique, on observe que les enzymes accélèrent les vitesses de réaction d'un facteur supérieur à 10<sup>15</sup>.

Toutefois, la réaction « S est transformé en P » doit tout d'abord être possible d'un point de vue thermodynamique. Mais avant qu'une molécule de substrat soit transformée en produit, elle doit posséder un minimum d'énergie pour passer par un état de transition. Cet état activé représente une sorte de point médian où les liaisons du substrat sont suffisamment modifiées pour que la conversion en produit soit possible.

Il y a deux façons pour accélérer cette réaction. La première consiste à élever la température de telle manière qu'un nombre significatif de molécules atteignent l'état de transition. Une autre façon est de diminuer l'énergie d'activation.

Les cellules vivantes existent aux températures relativement faibles (entre 0 et 100 °C). À ces températures de la vie, pratiquement aucune des réactions du métabolisme intermédiaire ne peut se dérouler à une vitesse suffisante pour permettre la croissance ou la maintenance de la cellule. De plus, même si la cellule pouvait augmenter d'une manière significative sa température, il n'y aurait pas de réaction favorisée par rapport à une autre. Ce sont donc les

## 1. Enzymes : structure, origine, classification

### 1.1 Structure – coenzymes

Les enzymes sont des protéines et, à ce titre, leur structure peut être décrite en quatre étapes :

– structure primaire : c'est l'ordre d'enchaînement des acides aminés de série L, liés entre eux par une liaison de type amide, la liaison peptidique. Ce premier niveau de structure est responsable au moins indirectement des niveaux supérieurs d'organisation et ainsi de toutes les propriétés des protéines, en particulier des propriétés catalytiques des enzymes, mais aussi de la formation d'autres liaisons covalentes (modifications post-traductionnelles) ;

– structure secondaire : elle résulte de l'établissement de liaisons hydrogène entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (-CO) du squelette peptidique. L'existence de structures secondaires vient du fait que les repliements énergétiquement favorables de la chaîne peptidique sont limités et que seules certaines conformations sont possibles. Il existe trois principales catégories de structures secondaires selon le repliement des liaisons peptidiques : les hélices (de type alpha), les feuillettes (de type bêta) et les coudes ;

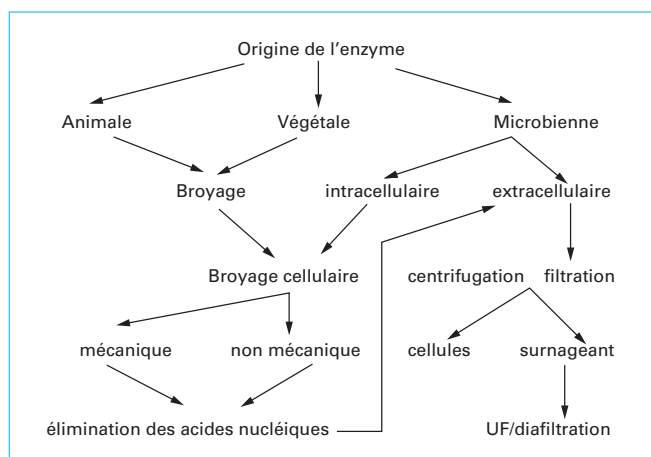


Figure 1 - Extraction des enzymes d'origine différente

enzymes que possèdent les cellules qui diminuent l'énergie d'activation. Ces enzymes diminuent sélectivement l'énergie d'activation d'une réaction donnée qui peut alors se dérouler à une température faible. Les enzymes sont donc des catalyseurs qui augmentent la vitesse de réactions chimiques sans être consommées. La constante d'équilibre de la réaction n'est pas modifiée, simplement la vitesse de la réaction est affectée par l'enzyme.

En disant que les enzymes augmentent la vitesse de réaction en diminuant l'énergie d'activation, on ne répond pas à la question : comment ? Plusieurs facteurs ont été suggérés et nous allons les analyser :

- la plupart des réactions enzymatiques se déroulent suivant un mécanisme de réactions organiques (acide-base, nucléophile, électrophile) pour lesquelles l'enzyme fournit les groupes catalytiques ;
- d'autre part, les facteurs de proximité et d'orientation sont certainement prépondérants. En solution, sans enzyme, les rencontres de deux molécules se font au hasard : ce n'est plus le cas ici ;
- enfin, l'idée que certaines liaisons du substrat soient tendues par l'enzyme a été proposée par certains auteurs. Il se produit alors un état de transition active. Au niveau du site actif, on a vu les différents concepts qui permettent d'expliquer la spécificité et l'efficacité d'une enzyme.

Un certain nombre d'enzymes nécessitent pour leur fonctionnement la présence d'un composé non protéique appelé cofacteur ou coenzyme. Les cofacteurs qui doivent être présents en quantité stœchiométrique et les coenzymes présents en quantité catalytique sont de plusieurs types. Dans le cas des ions métalliques, ces derniers sont, soit liés à la structure de l'enzyme (par exemple, la présence de zinc est indispensable à l'activité de la carboxypeptidase), soit liés au substrat (dans le cas des kinases). De même, la plupart des carboxylases nécessitent la présence de la biotine, liée de manière covalente à l'enzyme alors que les aminotransférases ont besoin de pyridoxal phosphate lors de la réaction d'interconversion.

## 1.2 Sources d'enzyme

Les enzymes peuvent être extraites de n'importe quel organisme vivant : des bactéries aux champignons, des plantes aux animaux. Parmi toutes les enzymes utilisées industriellement, plus de la moitié proviennent de champignons ou de levures, environ un tiers sont d'origine bactérienne et ce qui reste se divise entre les sources animales (8 %) ou végétales (4 %) (figure 1).

La très grande majorité des enzymes utilisées dans l'industrie (tableau 1) provient donc de la culture de micro-organismes pour diverses raisons : faible coût de production, teneur en enzyme mieux contrôlable, composition des extraits connue et constante,

Tableau 1 - Origine de quelques enzymes industrielles

Enzyme	N° EC	Origine	Utilisation industrielle
Origine animale			
catalase	1.11.1.6	foie	Industrie alimentaire
chymotrypsine	3.4.21.1	pancréas	Traitement du cuir
lipase	3.1.1.3	pancréas	Industrie alimentaire
présure	3.4.23.4	abomasum	Industrie fromagère
trypsine	3.4.21.4	pancréas	Traitement du cuir
Origine végétale			
α-amylase	3.2.1.1	orge	Brasserie
β-amylase	3.2.1.2	orge	Brasserie
Bromélaïne	3.4.22.4	ananas	Brasserie
β-glucanase	3.2.1.6	orge	Brasserie
Ficine	3.4.22.3	figue	Industrie alimentaire
Lipoxygénase	1.13.11.12	soja	Industrie alimentaire
Papaïne	3.4.22.2	papaye	Industrie de la viande
Enzymes bactériennes			
α-amylase	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	Industrie de l'amidon
β-amylase	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	Industrie de l'amidon
Asparaginase	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	Domaine de la santé
Glucose isomérase	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	Sirops de fructose
Pénicilline amidase	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	Industrie pharmaceutique
Protéase	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	Détergent
Pullulanase	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	Industrie de l'amidon
Enzymes fongiques			
α-amylase	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	Panification
Aminoacylase	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	Industrie pharmaceutique
Glucoamylase	3.2.1.3	<i>Aspergillus</i>	Industrie de l'amidon
Catalase	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	Industrie alimentaire
Cellulase	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	Traitement des déchets

**Tableau 1 – Origine de quelques enzymes industrielles (suite)**

Enzyme	N° EC	Origine	Utilisation industrielle
Dextranase	3.2.1.11	<i>Penicillium</i>	Industrie alimentaire
Glucose oxydase	1.1.3.4	<i>Aspergillus</i>	Industrie alimentaire
Lactase	3.2.1.23	<i>Aspergillus</i>	Produits laitiers
Lipase	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	Industrie alimentaire
Présure	3.4.23.6	<i>Mucor miehei</i>	Industrie fromagère
Pectinase	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	Industrie des boissons
Pectine lyase	4.2.2.10	<i>Aspergillus</i>	Industrie des boissons
Protéase	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	Panification
Raffinase	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	Industrie alimentaire
Enzymes de levure			
Invertase	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	Confiserie
Lactase	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	Produits laitiers
Lipase	3.1.1.3	<i>Candida</i>	Industrie alimentaire
Raffinase	3.2.1.22	<i>Saccharomyces</i>	Industrie alimentaire

enfin les tissus animaux ou végétaux contiennent des molécules plus dangereuses ou plus gênantes que celles rencontrées dans les micro-organismes (composés phénoliques ou inhibiteurs d'enzymes par exemple).

En pratique, la grande majorité des enzymes microbiennes vient d'un nombre limité d'espèces parmi lesquelles on trouve principalement les *Aspergillus*, *Bacillus* et *Kluyveromyces*. Le développement des enzymes commerciales demande un savoir faire certain dans les domaines suivants : recherche de nouvelles enzymes, fermentation, purification à grande échelle et formulation.

Le remodelage d'enzymes est également une voie pour produire des enzymes plus performantes que les enzymes naturelles ou bien même pour créer des activités nouvelles. La mutagenèse dirigée, technique la plus utilisée, permet de substituer un ou plusieurs acides aminés de la protéine. L'utilisation de banques de données (*data mining*) présentant des corrélations séquence-structure est une aide très efficace pour prédire les évolutions conformationnelles liées aux substitutions. Parmi les enzymes industrielles modifiées, la subtilisine, une protéase de *Bacillus amyloliquefaciens*, a vu son activité, dans les détergents, améliorée par une stabilisation vis-à-vis des températures élevées, de l'effet du pH et de l'oxydation.

## 1.3 Classification des enzymes

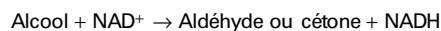
### 1.3.1 Nomenclature systématique

De nombreuses enzymes ont des noms triviaux qui leur ont été donnés, il y a des années, lorsqu'elles ont été découvertes. Dans de nombreux cas, on s'est contenté d'ajouter « ase » au nom du substrat de l'enzyme à l'instar de l'uréase pour l'urée.

Mais, le nom de l'enzyme peut être aussi lié à une propriété de cette enzyme. Par exemple, l'invertase hydrolyse le saccharose ( $[\alpha D] = +66,5^\circ$ , dextrogyre) en un mélange de D-glucose ( $[\alpha D] = +52^\circ$ ) et de D-fructose ( $[\alpha D] = -92^\circ$ ). Le mélange est lévogyre, il y a donc inversion du pouvoir rotatoire, d'où le nom donné à l'enzyme.

Pour clarifier tout cela, en 1956, une classification a été proposée par la Commission internationale sur les enzymes, avec différentes révisions en 1965 et en 1978. Cette nomenclature s'appuie sur le type de réaction catalysée, le substrat utilisé, ainsi que la présence d'éventuels cofacteurs. Le nom systématique qui en résulte est parfois complexe et les noms d'usage sont admis. Il est alors fortement conseillé de les associer à leur numéro « EC » qui provient de la classification numérique également mise en place. Ce numéro, constitué de quatre nombres désigne la classe de réaction catalysée par l'enzyme, une sous-classe, une sous sous-classe et un numéro propre à l'enzyme. Les classes d'enzymes ainsi constituées sont au nombre de six :

1 – **Oxydoréductases** : enzymes qui catalysent les réactions d'oxydo-réduction. Exemple : alcool déshydrogénase (E.C.1.1.1.1) :

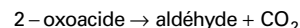


2 – **Transférases** : enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe spécifique d'une molécule à une autre. Exemple : hexokinase (E.C.2.7.1.1)



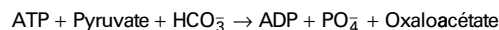
3 – **Hydrolases** : enzymes qui catalysent la coupure hydrolytique des liaisons C–O, C–N et C–C. Exemple : l' $\alpha$ -amylase (E.C.3.2.1.1) hydrolyse des liaisons 1,4- $\alpha$ -D-glucosidiques dans des polysaccharides contenant 3 ou plus D-glucose.

4 – **Lyases** : enzymes qui coupent les liaisons C–C, C–O et C–N par élimination, en formant des doubles liaisons ou des cycles. Exemple : pyruvate décarboxylase (E.C.4.1.1.1)



5 – **Isomérases** : enzymes qui catalysent des changements géométriques ou structuraux dans une molécule. Exemple : la glucose-isomérase (E.C.5.3.1.5) catalyse l'isomérisation du glucose en fructose.

6 – **Ligases** : enzymes qui catalysent la liaison entre deux molécules, couplée à l'hydrolyse d'une liaison phosphate de l'ATP (ou un autre tri-phosphate). Exemple : pyruvate carboxylase (E.C.6.4.1.1)



### 1.3.2 Classification CAZy (*Carbohydrate Active enZymes*)

Cette classification a pour originalité de ne pas reposer sur une spécificité réactionnelle des enzymes, comme la classification de la nomenclature enzymatique. Elle repose sur une analogie de structure des modules catalytiques et de reconnaissance de motifs glucidiques des enzymes qui catalysent la dégradation, la modification ou la création de liaisons osidiques. Elle a été établie par Bernard Henrissat et peut être consultée sur le site : <http://www.cazy.org/>.

Cette classification repose sur une étude de la séquence d'acides aminés d'une enzyme, séquence qui conditionne la structure secondaire et tridimensionnelle de la protéine enzymatique. Elle reflète donc les caractéristiques structurales de ces enzymes, beaucoup plus que leur simple spécificité de substrat. Elle permet, notamment, de révéler les relations au cours de l'évolution entre les enzymes d'une même famille, ainsi que de prédire des données concernant leur mécanisme catalytique. Ces familles peuvent

être groupées en « clans », lorsque des séquences semblables et des structures analogues sont trouvées pour des enzymes appartenant à des familles différentes. Elle ne s'applique toutefois qu'aux enzymes actives sur les hydrates de carbone. La classification CAZY est divisée en cinq parties :

### 1 – Glycoside Hydrolases (GH) :

Les Glycoside-Hydrolases (EC 3.2.1.-) constituent un vaste groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de liaisons osidiques associant un ose à un autre ose ou à une molécule non osidique. Le mécanisme de la réaction d'hydrolyse d'une liaison osidique fait généralement intervenir deux résidus d'acides aminés jouant un rôle catalytique, un acide (donneur de protons) et une base (nucléophile). Suivant la disposition spatiale de ces deux acides aminés, l'hydrolyse s'effectue avec rétention ou inversion de l'anométrie de la liaison osidique. Dans certains cas, le groupe nucléophile n'est pas porté par l'enzyme et est remplacé par un groupe acétamido en position C-2 du substrat. Enfin, certaines glycosidases utilisent le NAD<sup>+</sup> comme cofacteur ;

### 2 – Glycosyl Transférases (GT) :

La biosynthèse des liaisons glycosidiques implique des enzymes (EC 2.4.-) capables de catalyser le transfert spécifique d'un ose d'un intermédiaire activé (donneur : nucléotide-diphospho sucre, nucléotide monophospho sucre, sucre-phosphate) sur une autre molécule (accepteur). Ce transfert peut s'effectuer avec rétention ou inversion de la configuration anomérique initiale ;

### 3 – Polysaccharide Lyases (PL) :

La rupture des liaisons osidiques par un mécanisme de β-élimination est catalysée par les *Polysaccharide Lyases* (EC 4.2.2.-). Cette réaction s'accompagne de la formation d'une double liaison au niveau de la nouvelle extrémité non réductrice ainsi générée ;

### 4 – Carbohydrate estérases (CE) :

Ces estérases catalysent la O- ou la N-désacétylation des glucides. Deux groupes de substrats sont distingués, suivant que la partie acyle (cf. pectine méthyl esters) ou la partie alcool (cf. xylane acétylé) de l'ester provient du glucide. Le mécanisme réactionnel le plus courant fait intervenir une triade catalytique Sérine-Histidine-Acide aspartique, mais on rencontre également des enzymes à zinc (Zn<sup>2+</sup>) ;

### 5 – Carbohydrate-binding modules (CBM) :

Les « modules de liaison au glucide » sont des éléments de la structure d'enzymes capables de se lier spécifiquement à un glucide, sans présenter d'activité catalytique propre. On peut citer les domaines de liaison à la cellulose (*cellulose-binding domains*), par exemple. Ces modules sont classés au sein de treize familles, suivant leurs caractéristiques structurales.

## 2. Cinétique homogène

### 2.1 Équation de Michaelis-Menten

L'équation de Henri qui est à l'origine de l'équation de vitesse de Michaelis-Menten repose sur l'observation suivante : la vitesse initiale d'une réaction est directement proportionnelle à la concentration de la préparation enzymatique, mais augmente de manière non linéaire avec la concentration du substrat, jusqu'à une vitesse maximale limite. L'établissement de l'équation de Henri est fondé sur les hypothèses suivantes :

- l'enzyme est un catalyseur ;
- l'enzyme et le substrat réagissent rapidement pour former un complexe enzyme-substrat ;
- un seul substrat et un seul complexe enzyme-substrat sont impliqués et le complexe enzyme-substrat se brise pour donner directement l'enzyme libre et le produit ;

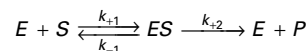
– l'enzyme, le substrat et le complexe enzyme-substrat sont en équilibre. De plus, la vitesse de dissociation de *ES* en *E + S* est beaucoup plus rapide que la vitesse de coupure de *ES* pour former *E + P* ;

– la concentration du substrat est beaucoup plus élevée que celle de l'enzyme ; ainsi, la formation du complexe *ES* n'altère pas la valeur de la concentration de *S* ;

– la vitesse globale de la réaction est limitée par la coupure du complexe *ES* pour former l'enzyme libre et le produit ;

– la vitesse est mesurée dans les premiers instants de la réaction de telle manière que la réaction inverse ne soit pas significative.

La réaction totale peut s'écrire :



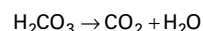
Il est alors possible d'établir l'équation de Michaelis et Menten :

$$V = \frac{V_M[S]}{K_M + [S]}$$

–  $V_M$  est la vitesse maximale de la réaction qui permet d'obtenir la constante cinétique de la réaction lorsque la concentration des sites actifs  $[E]_T$  est connue car  $V_M = k_{+2} [E]_T$ .

La constante cinétique  $k_{+2}$  est appelée *turnover*. Le *turnover* d'une enzyme est le nombre de molécules de substrat transformées en produit par unité de temps, lorsque l'enzyme est totalement saturée par le substrat.

Le plus grand *turnover* connu est celui de l'anhydrase carbonique : 10<sup>-6</sup> M d'enzyme catalyse la dégradation de 0,6 M d'H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> par seconde :



→  $k_{+2} = 600\,000 \text{ sec}^{-1}$  : chaque cycle de catalyse se produit en un temps égal à 1,7 μsec.

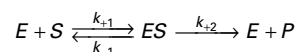
Les *turnover* de la plupart des enzymes pour leurs substrats se situent dans la fourchette 1 à 10<sup>4</sup>, soit 1 à 0,1 msec ou 100 μsec de temps de réaction.

–  $K_M$  est appelée constante de Michaelis. Pour la plupart des enzymes, la valeur de  $K_M$  dépend du substrat ainsi que des conditions expérimentales dans lesquelles s'effectue la réaction (température, force ionique et pH) et se situe entre 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-6</sup> M. Cette valeur de  $K_M$  a deux significations :

– elle correspond à la concentration en substrat pour laquelle la moitié des sites actifs sont occupés. Lorsque le  $K_M$  est connu, la fraction de sites occupés  $F$  à une concentration quelconque en substrat peut être calculée à partir de :

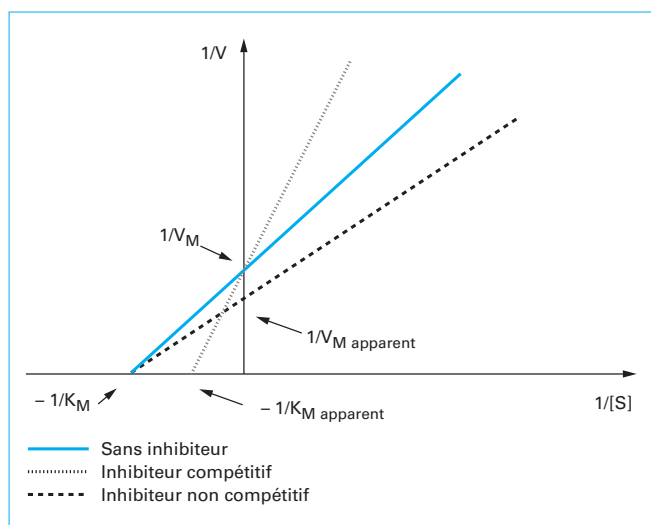
$$F = \frac{V}{V_M} = \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

– cette valeur est fonction des constantes de vitesse de chacune des étapes du schéma de catalyse :



$$\text{Soit : } K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

Si on considère un cas limite dans lequel  $k_{-1}$  est beaucoup plus grand que  $k_{+2}$  cela signifie que la dissociation de *ES* en *E* et *S* est beaucoup plus rapide que la formation de *E* et *P*. Dans ces conditions  $k_{-1} \gg k_{+2}$ .



**Figure 2 – Représentation graphique de la relation de Lineweaver et Burk (en absence et en présence d'un inhibiteur compétitif ou non-compétitif)**

La constante de dissociation du complexe  $ES$  est alors donnée par :

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

$K_M$  est donc égal à la constante de dissociation du complexe  $ES$  lorsque  $k_{+2}$  est beaucoup plus petit que  $k_{-1}$ . Si cette condition est satisfaite,  $K_M$  est une mesure de la stabilité du complexe  $ES$  : une valeur de  $K_M$  élevée indique une liaison faible du substrat avec l'enzyme alors qu'une valeur faible indiquera une liaison forte entre l'enzyme et son substrat.

Il faut insister sur le fait que  $K_M$  donne l'affinité du complexe enzyme-substrat seulement lorsque  $k_{-1}$  est beaucoup plus grand que  $k_{+2}$  : cela est le cas pour la plupart des enzymes.

La représentation de  $V$  en fonction de  $S$  étant une hyperbole, il est assez difficile de déterminer directement  $V_M$  et  $K_M$ . La linéarisation de l'équation permet une représentation plus précise :

$$\frac{V}{V_M} = \frac{[S]}{[S] + K_M} \Rightarrow \frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_M} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_M}$$

Si l'on trace la représentation de Lineweaver et Burk,  $1/V = f(1/[S])$ , on doit obtenir une droite de pente  $a = K_M/V_M$  dont l'intersection avec l'axe des ordonnées est égale à  $1/V_M$ . De plus, l'intersection avec l'axe des abscisses peut être déterminée lorsque  $1/V = 0$  et est égale à  $-1/K_M$  (figure 2).

## 2.2 Inhibition/activation

N'importe quelle substance qui réduit la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme peut être considérée comme un inhibiteur. L'inhibition de l'activité enzymatique est un des principaux moyens de régulation des cellules vivantes et une des procédures de diagnostic des enzymologistes. L'étude de l'inhibition d'une enzyme nous renseigne sur sa spécificité, sur l'architecture physique et/ou chimique de son site actif et sur le mécanisme cinétique de la réaction. Dans notre vie de tous les jours, on découvre des inhibiteurs d'enzymes dans les « drogues », les antibiotiques, les toxines, les poisons, les « conservateurs », etc. Dans ce chapitre nous allons étudier deux types simples d'inhibiteurs. Nous supposons qu'un seul substrat est impliqué dans la réaction et que seul un type d'inhibiteur est présent.

### 2.2.1 Inhibition compétitive

Un inhibiteur compétitif est une substance qui se combine avec l'enzyme libre d'une manière qui empêche la liaison du substrat. Ainsi, l'inhibiteur et le substrat s'excluent mutuellement, du même site, par une vraie compétition. La nature des inhibiteurs compétitifs est variable : il peuvent être des analogues non métabolisables du substrats, des dérivés du substrat, un autre substrat de l'enzyme ou un produit de la réaction.

Par exemple, la succinate deshydrogénase est l'enzyme qui catalyse l'oxydation de l'acide succinique en acide fumarique : l'acide malonique ressemble suffisamment à l'acide succinique pour se combiner avec le site actif de l'enzyme. Toutefois, comme l'acide malonique n'a qu'un seul groupe méthylène, la réaction d'oxydo-réduction n'a pas lieu. L'acide malonique est un inhibiteur compétitif de la succinate deshydrogénase.

Pour établir l'équation de vitesse de la réaction, on utilise le protocole d'écriture décrit pour établir l'équation de Michaelis :

$$V = \frac{V_M [S]}{K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

Cette équation de vitesse diffère de l'équation habituelle de Michaelis et Menten par le facteur multiplicatif  $(1 + [I]/K_i)$  qui s'applique à  $K_M$ . Le  $K_M$  apparent de l'enzyme augmente donc alors que la vitesse maximale de la réaction n'est pas modifiée. La détermination de  $K_i$  se fait à partir de la représentation de Lineweaver-Burk (figure 2) qui permet de déterminer la constante de Michaelis apparente ( $K'_M$ ) :

$$K'_M = K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \Rightarrow K'_M = \frac{K_M [I]}{K_i} + K_M$$

Puis en étudiant la variation de  $K'_M$  en fonction de la concentration en inhibiteur  $f([I])$ .

La présence d'un inhibiteur compétitif augmente simplement le  $K_M$  apparent de l'enzyme pour le substrat, la vitesse maximale de la réaction est inchangée.

### 2.2.2 Inhibition non compétitive

Un inhibiteur non compétitif classique n'a pas d'effet sur la liaison du substrat avec l'enzyme et *vice versa*. L'inhibiteur et le substrat se lient de manière réversible, au hasard et de manière indépendante sur différents sites de l'enzyme. Ainsi  $I$  peut se lier à  $E$  ou  $ES$  et  $S$  à  $E$  ou  $EI$ . La liaison d'un des deux n'a aucun effet sur la dissociation du complexe formé avec l'autre. Toutefois, le complexe  $ESI$  ou  $EIS$  est inactif.

L'équation de vitesse est la suivante :

$$V = \frac{V_M}{\left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \times \frac{[S]}{(K_M + [S])}$$

$$\text{avec } V_{Mapp} = \frac{V_M}{\left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

On voit donc que l'inhibiteur  $I$  affecte le  $V_M$  et laisse inchangé le  $K_M$ .  $V_M$  diminue au fur et à mesure que  $[I]$  augmente. La représentation de Lineweaver et Burk (figure 2) permet de déterminer  $V_M$  apparent :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_M} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_M} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Un inhibiteur non compétitif classique diminue donc  $V_M$  mais n'a pas d'effet sur  $K_M$ . La vitesse « inhibée » représente toujours une fraction constante de  $V$ , quelle que soit la concentration du substrat ou la valeur de  $K_M$ . L'effet global d'un inhibiteur non compétitif est équivalent à la présence de moins d'enzyme. Lorsque  $[I] = K_i$  on obtient 50 % d'inhibition.

### 2.2.3 Activation des enzymes

Les activateurs sont des composés qui augmentent la vitesse d'une réaction catalytique sans être eux-mêmes impliqués dans la réaction catalysée par l'enzyme. Il existe deux types de molécules activatrices : les activateurs non essentiels, c'est-à-dire que la réaction se produit même si l'activateur n'est pas présent, ce qui est le cas des ions inorganiques et les systèmes dans lesquels le vrai substrat est un complexe substrat-activateur. Dans ce cas, les activateurs (groupements prosthétiques ou cofacteurs) sont nécessaires à l'activité catalytique de l'enzyme. À l'exception des groupes prosthétiques ou cofacteurs, les activateurs ne sont pas spécifiques et plusieurs familles de molécules peuvent avoir le même effet d'activation sur une enzyme : par exemple, les amylases sont activées par une grande variété d'anions.

## 2.3 Allostérie (modèle de Monod)

Le modèle de Michaelis-Menten a fortement influencé le développement de la chimie des enzymes. Il est en effet simple et son domaine d'application est large. Cependant, ce modèle ne permet pas d'expliquer les propriétés cinétiques de nombreuses enzymes.

Si la liaison d'une molécule de substrat sur la protéine (qui possède plusieurs sites actifs) induit des changements de structures qui modifient l'affinité des sites vacants, la courbe de vitesse ne suivra plus la cinétique de Michaelis-Menten et l'enzyme sera classée en enzyme allostérique. En général, les enzymes allostériques ont des courbes de vitesse sigmoïdes. La liaison d'une molécule de substrat facilite la liaison de la suivante en augmentant l'affinité des sites de liaison vacants. Ce phénomène est appelé liaison coopérative, ou coopérativité positive, par rapport à la fixation du substrat. Les avantages potentiels d'une réponse sigmoïde (figure 3) lorsque la concentration de  $S$  varie sont les suivants : il suffit d'augmenter la concentration du substrat par un facteur de 2 ou 3 seulement pour que la vitesse de réaction passe de  $0,1 V_M$  à  $0,75 V_M$ . Pour obtenir la même variation de vitesse en présence d'une enzyme michaelienne, la concentration du substrat doit être multipliée par un facteur 27. Ainsi, la réponse sigmoïde est en un certain sens identique à un interrupteur marche/arrêt. On peut donc obtenir, pour des vitesses intermédiaires, un contrôle de la réaction très sensible en faisant varier la concentration de  $[S]$ . Deux types de modèles ont été proposés pour les enzymes allostériques : le **modèle séquentiel** et le **modèle concerté**. Le modèle séquentiel, comme son nom le suggère, suppose des changements séquentiels ou progressifs dans l'affinité des sites vacants, au fur et à mesure de l'occupation des sites. Le modèle concerté suppose que l'enzyme sous forme d'un mélange en équilibre d'un oligomère à forte affinité et un oligomère à faible affinité. Les ligands (substrat, activateur, inhibiteur) agissent en déplaçant l'équilibre en faveur d'un état ou de l'autre. Durant la transition, la conformation de toutes les sous-unités change en même temps et l'oligomère garde sa symétrie. Ce modèle, proposé par Monod et ses collaborateurs en 1965, repose sur les points suivants :

- les protéines allostériques sont polymériques et contiennent des unités minimales identiques (protomères) arrangées de manière symétrique ;

- chaque protomère possède un et un seul site actif de liaison pour n'importe quel ligand (substrat, inhibiteur ou activateur) ;

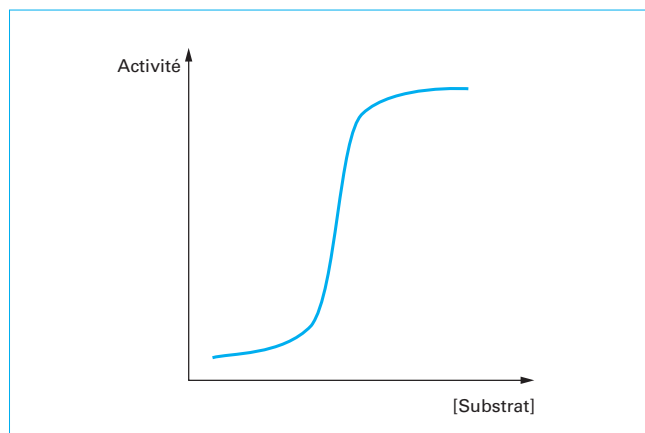


Figure 3 – Représentation graphique de l'influence de la concentration de substrat sur la vitesse de réaction d'une enzyme allostérique

- l'oligomère peut exister dans au moins deux conformations différentes qui sont en équilibre. Les différentes conformations peuvent provenir d'un réarrangement de la structure quaternaire ou d'un changement de la structure tertiaire des protomères. La transition entre une conformation ou l'autre est un événement tout ou rien. Ainsi, la symétrie de l'oligomère est conservée dans la transition ;

- l'affinité d'un site de liaison pour un ligand donné dépend de la conformation du protomère. La liaison d'un ligand sur une conformation particulière provoque un déplacement de l'équilibre entre les conformations de l'oligomère, vers la conformation qui possède la meilleure affinité pour ce ligand. Comme chaque oligomère possède plusieurs sites de liaison, et que le changement de conformation de la faible affinité vers la forte affinité se produit simultanément pour tous les sites, on obtient une courbe sigmoïde.

L'état T représente la conformation de l'enzyme qui a la plus faible affinité pour le substrat alors que l'état R représente celle qui a la plus forte affinité.

$L$  est la constante d'équilibre de la transition entre ces deux états de la protéine. Enfin, la constante intrinsèque de dissociation pour  $S$  sur le site de liaison sur un protomère dans l'état T est désigné par  $K_T$ , dans l'état R par  $K_R$ .

Pour une enzyme, dans des conditions d'équilibre rapide, la fraction des sites totaux occupés est équivalente au rapport  $V/V_M$ , ainsi :

$$\frac{V}{V_M} = \frac{Lc\alpha(1+c\alpha)^{n-1} + \alpha(1+\alpha)^{n-1}}{L(1+c\alpha)^n + (1+\alpha)^n}$$

avec  $\alpha = [S]/K_R$ ,  $c = K_R/K_T$ ,  $n$  = nombre de sites actifs de l'enzyme. Cette équation est donc valable quel que soit le nombre de sites de l'enzyme allostérique.

Différents modèles peuvent être obtenus en faisant des hypothèses à partir de cette équation :

- le plus simple :  $c$  très petit  $\Rightarrow$  l'état T n'a pas d'affinité pour le substrat ;

- système  $V$  : les états R et T ont la même affinité pour  $S$  mais une activité catalytique intrinsèque différente :  $k_{PR} > k_{PT} \Rightarrow$  le  $V_M$  des deux états est différent ;

- système  $K$  : les états R et T ont une affinité différente pour  $S$  mais la même activité catalytique intrinsèque  $k_{PR} = k_{PT}$  : le  $K_M$  apparent est différent alors que  $V_M$  n'est pas modifié.

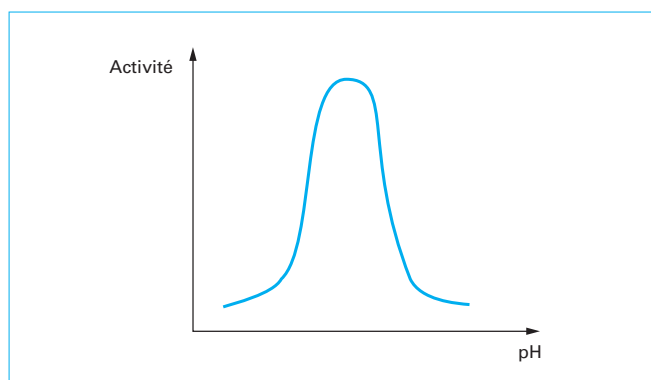


Figure 4 – Influence du pH sur l'activité d'une enzyme

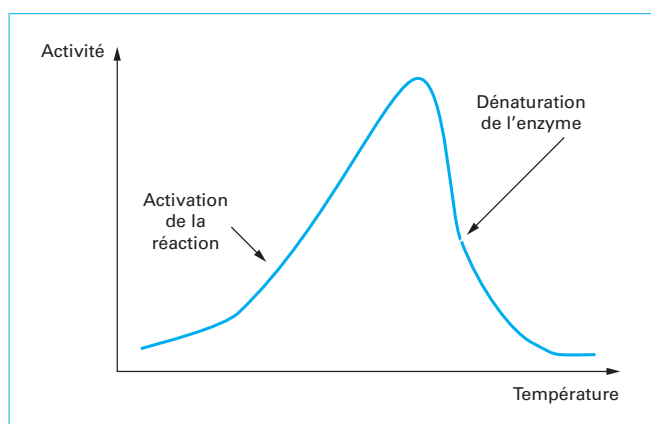


Figure 5 – Influence de la température sur l'activité d'une enzyme

## 2.4 Effet du pH et de la température

### 2.4.1 Effet du pH

L'activité enzymatique dépend fortement du pH et pour la plupart des enzymes. On distingue facilement une étroite zone dite de pH optimum où la vitesse de réaction est la plus grande, de part et d'autre de laquelle la vitesse décroît notablement. Cet effet peut être dû à trois actions indépendantes :

- un effet de dégradation irréversible des pH extrêmes sur l'enzyme, comportant, soit la dénaturation qui, par rupture de liaison non covalente, modifie la structure spatiale de l'enzyme, soit même la rupture de liaisons covalentes. Ce type est de peu d'intérêt pour les enzymologistes et il sera nécessaire de s'assurer de la stabilité de l'enzyme étudiée, dans les conditions de l'expérience ;
- un effet sur l'état d'ionisation du substrat s'il possède des groupes polaires que l'on peut éventuellement déduire du comportement d'analogues dépourvus de ces groupes ;
- enfin, un effet sur l'état d'ionisation de l'enzyme qui est le plus intéressant pour l'étude des enzymes.

La relation entre l'activité et le pH se traduit en général par une courbe en cloche (figure 4). Il est possible de distinguer un pH optimum, une branche ascendante acide et une branche descendante basique. Supposons, pour simplifier, que la variation d'activité ne dépende que de l'ionisation d'un nombre restreint de groupes dissociables : un groupe acide carboxylique ( $pK = 4,0$ ) et

un groupe aminé ( $pK = 8,0$ ). Suivant le pH, ceux-ci peuvent être sous deux formes d'ionisation  $COOH$   $COO^-$  (resp. H) et  $NH_3^+$   $NH_2$  (resp. H) dont les concentrations varient suivant la courbe en cloche. Si l'activité enzymatique exige la forme  $COO^-$ ,  $NH_3^+$ , on voit qu'elle n'aura lieu que dans la zone délimitée par la courbe en cloche. Selon les enzymes, il est aussi possible d'obtenir des courbes dissymétriques ou même aucun effet du pH sur l'activité.

L'étude de l'effet du pH sur l'activité d'une enzyme peut ne jamais donner d'arguments définitifs sur la nature des groupes ionisables impliqués dans l'activité. Cette étude ne permet pas non plus de déterminer la raison pour laquelle l'enzyme perd son activité lorsqu'un groupe change d'état de protonation : ce peut être parce qu'il s'agit d'un groupe catalytique, d'un groupe nécessaire à la fixation du substrat ou d'un groupe qui contribue à maintenir l'enzyme dans une conformation active. Dans tous les cas, un paramètre expérimental varie avec le pH et on peut déterminer le pK de ce phénomène. Le pK sera égal à la valeur du pH pour laquelle la concentration de la forme protonée du groupe qui s'ionise est égale à la concentration de la forme déprotonée. Ce pK correspond donc au pH pour lequel la variation du paramètre qu'on observe est égale à la moitié de la variation totale, quand on passe d'un état de protonation à un autre.

### 2.4.2 Effet de la température

Il faut tout d'abord distinguer deux phénomènes radicalement différents quant à leur origine : l'inactivation par dénaturation thermique et l'effet habituel de la température sur la vitesse de réaction (activation des molécules). Nous allons décrire séparément ces deux types de processus (figure 5).

#### ■ Activation de la réaction

La vitesse initiale d'une réaction enzymatique dans la zone de température utilisable pour du matériel biologique, de 0 à 50 °C environ, croît en général régulièrement et augmente en première approximation d'un facteur constant ( $Q_{10}$ ) de l'ordre de 2 à 3 par intervalle de 10 °C. Pour qu'une réaction entre deux molécules A et B ait lieu, il faut d'abord que les molécules viennent à se rencontrer. Cette approche est assurée exclusivement, et au hasard, par l'agitation moléculaire qui suit les lois de la cinétique des gaz. Le nombre des collisions croît avec la température, mais d'une façon très faible, qui ne peut en aucune façon expliquer l'augmentation de vitesse de réaction. L'énergie de ces collisions, par contre, croît d'une façon importante et est à l'origine de cette augmentation de vitesse.

#### ■ Dénaturation thermique

C'est une transformation, sous l'effet de la chaleur, de la forme active de l'enzyme en une ou des formes dénaturées. Au-delà d'une certaine température, l'agitation thermique des molécules de solvant du milieu provoque la rupture plus ou moins importante de l'organisation structurale de la protéine nécessaire à l'activité catalytique entraînant la perte de la structure tertiaire. Cette réaction sera du 1<sup>er</sup> ordre (mono moléculaire car les molécules de solvant ont une concentration très grande et constante au cours du processus). Cette dénaturation est suivie par la mesure du temps de demi-vie de l'enzyme qui correspond, pour une température donnée, au temps nécessaire pour réduire l'activité de l'enzyme par un facteur 2.

La plupart des enzymes montrent des vitesses d'inactivation thermique notables à partir de 30-35 °C. Toutefois certaines sont particulièrement résistantes : il faut atteindre des températures de 70-80 °C et même 110-120 °C pour des amylases provenant d'organismes thermophiles pour obtenir une dénaturation de la protéine.

## 3. Cinétique hétérogène

### 3.1 Méthodes d'immobilisation des enzymes

Dès 1916, Nelson et Griffith ont constaté que l'invertase, qui catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose, conservait son activité lorsqu'elle était adsorbée sur du charbon actif ou de l'hydroxyde d'aluminium. Les travaux concernant l'immobilisation d'enzymes ne se sont cependant réellement développés qu'à partir du moment où ces biocatalyseurs sont devenus effectivement disponibles à l'échelle industrielle. En effet, l'immobilisation d'une enzyme permet soit son utilisation dans un réacteur continu, soit sa récupération et sa réutilisation. Il est ainsi possible d'améliorer de manière très significative l'économie d'un procédé enzymatique, d'autant plus que le coût de l'enzyme est élevé. Ce bénéfice est très souvent augmenté par le fait que l'immobilisation se traduit par une augmentation très significative de la stabilité de l'enzyme, en raison de la préservation de la structure tridimensionnelle active. Cela est particulièrement le cas pour les protéases, car le phénomène de « cannibalisme » est évité. Il faut également rappeler que dans les systèmes vivants ou dans la nature, les enzymes n'agissent pratiquement qu'à l'état immobilisé, par exemple sur la surface des structures membranaires d'une cellule ou d'un organite cellulaire, ou adsorbées sur les composés argileux et humiques dans les sols. L'immobilisation d'une enzyme sur un support de nature connue permet alors de déterminer l'effet du micro-environnement sur son activité catalytique. Il est ainsi possible de mieux comprendre le fonctionnement *in vivo*, ce que ne permet pas une étude du comportement cinétique en solution homogène.

L'immobilisation d'enzymes, que de nombreuses personnes redécouvrent notamment grâce au développement des nanotechnologies, a fait l'objet, depuis la fin des années soixante, de très nombreux travaux. Des milliers de publications et de brevets sont disponibles dans ce domaine, et il est, de ce fait, impossible de prétendre être exhaustif. Peu de méthodes cependant sont suffisamment simples et peu coûteuses pour franchir la barrière du passage au stade industriel. La section « biocatalyse appliquée (ESAB) » de la Fédération européenne de biotechnologie a édité, sous la plume de Peter Halling, des recommandations pour la caractérisation des biocatalyseurs immobilisés.

Les méthodes d'immobilisation d'enzymes peuvent être regroupées en trois grandes catégories, dont nous allons donner quelques exemples.

#### 3.1.1 Adsorption

L'immobilisation par adsorption repose sur l'établissement d'interactions de type liaisons de faible niveau énergétique (van der Waals, ionique, hydrogène, transfert de charges, échange de ligands, hydrophobe, pont métallique...) entre les groupes fonctionnels situés à la surface de la molécule d'enzyme et ceux présents à la surface du support insoluble.

Les paramètres qui conditionnent l'efficacité de l'adsorption sont :

- la concentration d'enzyme : on peut décrire par des isothermes de type Freundlich ( $m = kc^k$ ) ou Langmuir ( $m = kk'c/(1 + k'c)$ ) la relation entre la masse  $m$  d'enzyme adsorbée et la concentration  $c$  de l'enzyme à l'équilibre,  $k$  et  $k'$  étant des constantes. On atteint un palier de saturation du support, correspondant à une masse d'enzyme variant de quelques dizaines à quelques centaines de mg/g de support ;

- l'aire spécifique disponible par unité de masse de support, qui dépend de la taille des particules et de la porosité du support, ainsi que de la taille de la molécule d'enzyme (et éventuellement, de celle du ou des substrats et du ou des produits). Ce paramètre a été récemment revisité par le développement de nombreux nano-

supports nanoporeux, dont le niveau de sophistication et le coût rendent difficile, cependant, toute possibilité de développement industriel ;

- le temps de contact : le phénomène d'adsorption est généralement rapide, d'autant plus que la granulométrie du support est faible et que la diffusivité de l'enzyme est élevée ;

- le milieu : l'adsorption repose sur un phénomène de partage des molécules d'enzyme entre la solution et le support. Les additifs diminuant la solubilité de l'enzyme favoriseront donc son adsorption (sels, solvants miscibles à l'eau...). De même, l'adsorption sera d'autant plus efficace que l'on se rapprochera du point isoélectrique de l'enzyme, qui correspond à une solubilité minimale. Plus généralement, le pH sera un paramètre essentiel, en particulier lorsque ce sont des liaisons ioniques qui sont impliquées de manière prépondérante. La connaissance de la valeur du point isoélectrique de l'enzyme est alors indispensable.

Les supports insolubles sont soit de nature minérale, soit de nature organique :

- supports minéraux : on peut citer, parmi les plus courants, les aluminosilicates (bentonite, montmorillonite...), la silice et le verre poreux, les oxydes métalliques (Ti, Al...), les charbons actifs d'hydrophobicité variable ;

- supports organiques : ils sont soit naturels (collagène, cellulose, amidon, agarose, dextrane, tannins...), soit synthétiques (polymères acryliques, métacryliques, polystyrène, copolymères styrène-divinylbenzène...), et peuvent être modifiés chimiquement pour les rendre hydrophobes (alkyl-agarose) ou ioniques (DEAE-cellulose, CM-cellulose...).

Il existe donc un parallèle très étroit entre les méthodes d'immobilisation d'enzymes par adsorption et les méthodes de séparation de protéines (précipitation sélective, chromatographie), en notant cependant que les préparations d'enzymes utilisées sont généralement peu purifiées.

Le principal avantage de l'immobilisation par adsorption est sa simplicité de mise en œuvre, puisqu'il suffit de mettre en contact la préparation d'enzyme avec le support. De plus, il est possible de procéder à la « régénération » du support en désorbant l'enzyme qui est devenue inactive, et en la remplaçant par une nouvelle préparation active. C'est ce principe qui a été appliqué dans la première application industrielle d'une enzyme immobilisée, au Japon par la société Tanabe Seiyaku : la production de L-méthionine à partir d'un mélange racémique de N-acétyl-D,L-méthionine à l'aide d'une acylase énantiosélective d'*Aspergillus oryzae* adsorbée sur DEAE-Sephadex. Le même support a pu être utilisé pendant plus de cinq ans, et le coût de production a été diminué de 40 % par rapport au procédé faisant intervenir l'enzyme sous forme native.

Le principal inconvénient est le risque de désorption, qui peut cependant être éventuellement prévenu par une réticulation covalente des molécules d'enzymes après adsorption (voir 3.1.3). Ce risque est très fortement limité lorsqu'on utilise une enzyme immobilisée dans un milieu non aqueux, du fait de l'absence totale de solubilité de l'enzyme. C'est le cas de la préparation de lipase la plus couramment utilisée, la lipase B de *Candida antarctica* (CalB), qui est commercialisée par Novozymes sous forme immobilisée par adsorption sur une résine acrylique macroporeuse (Novozym 435).

#### 3.1.2 Inclusion

La molécule d'enzyme est retenue physiquement soit à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère, soit à l'intérieur du volume défini par une membrane ou une microcapsule. Cette rétention peut éventuellement être accompagnée d'une réticulation covalente par un réactif plurifonctionnel, tel que le glutaraldéhyde (voir 3.1.3).

#### ■ Inclusion dans une matrice

L'un des polymères, les plus utilisés, est le polyacrylamide, obtenu à partir d'acrylamide en présence de N,N'-méthylène bis acrylamide comme agent de réticulation. La polymérisation peut

s'effectuer en masse, le gel étant ensuite divisé en particules, soit en émulsion dans un solvant non miscible à l'eau pour obtenir directement des billes de gel.

Dans le domaine des biocapteurs, des polymères photoréticulables, tels que le poly(vinyl alcool) porteur de groupements styrylpyridinium (PVA-SbQ), qui présente des propriétés mécaniques intéressantes, sont largement utilisés.

Les gels obtenus à partir de polysaccharides gélifiants d'origine marine (carraghénanes et, surtout, alginate) en présence de cations (potassium et calcium respectivement), du fait de leur porosité très élevée, ne peuvent être utilisés que pour les enzymes présentant un volume hydrodynamique élevé (dextrane-saccharase, par exemple) et sont plutôt réservés à l'inclusion de cellules entières ou de particules d'enzymes immobilisées. Ils présentent l'avantage du caractère alimentaire de ces polysaccharides, de leur disponibilité à l'échelle industrielle et de leur très faible coût.

Une inclusion efficace est obtenue en utilisant la silice sous forme de sol-gel (M.T. Reetz).

Les technologies de production de fibres de polyacétate de cellulose ont été adaptées par la société SNAM Progetti pour l'immobilisation de  $\beta$ -galactosidase, afin de produire des laits diététiques présentant une teneur diminuée en lactose. Les fibres obtenues peuvent être mises en œuvre directement ou après tissage. De nombreuses techniques de filage par coagulation ou précipitation sont utilisables à ce niveau.

### ■ Inclusion dans le volume défini par une matrice

Les méthodes de polymérisation interfaciale (réaction d'un monomère hydrophile dissous dans une phase aqueuse dispersée dans une phase organique non miscible contenant un monomère hydrophobe réactif) permettent d'obtenir des microcapsules dans lesquelles l'enzyme, initialement présente dans la phase aqueuse, est confinée. On peut utiliser, par exemple, la réaction de l'hexaméthylène diamine avec le chlorure de sébacoyl ou d'adipoyl, qui conduit à l'obtention d'une membrane polyamide.

Les techniques de préparation de membranes liquides ou de liposomes peuvent également être employées.

On peut aussi confiner les molécules d'enzyme dans le volume défini par une membrane semi-perméable, telles que celles qui sont utilisées en ultra- et nano-filtration (membranes planes ou fibres creuses). Cette géométrie est particulièrement adaptée à l'hydrolyse continue d'un substrat macromoléculaire, dont les produits sont éliminés par passage à travers la membrane. C'est, notamment, le cas de la production de peptides à usage nutritionnel par hydrolyse de protéines de lait à l'aide de protéases immobilisées. Le même type de réacteur à membrane semi-perméable a été mis en œuvre par Degussa dans le cas de la synthèse énantio-sélective d'acides aminés faisant intervenir des cofacteurs de type nicotinamide, la membrane permettant la rétention à la fois de la déshydrogénase catalysant la réaction, du cofacteur greffé sur un polymère et de l'enzyme de régénération du cofacteur.

### 3.1.3 Liaison covalente

Lorsque l'on désire éviter tout risque de libération des molécules d'enzymes dans le milieu, la solution de choix est l'établissement de liaisons covalentes. Il faut pour cela impliquer les groupes fonctionnels présents à la surface de la molécule d'enzyme, dont la réactivité chimique est très limitée :

- amine primaire : groupe N-terminal et lysine ;
- acide carboxylique : groupe C-terminal et acides aspartique et glutamique ;
- thiol : cystéine ;
- phénol : tyrosine ;
- imidazole : histidine ;
- hydroxyle : sérine et thréonine ;
- fraction glucidique des glyco-enzymes.

La liaison covalente doit s'établir dans des conditions relativement douces pour éviter toute dénaturation irréversible, et ne pas impliquer de groupe fonctionnel nécessaire à l'activité catalytique (site catalytique).

On peut distinguer deux groupes de méthodes d'immobilisation covalente : soit sur un support insoluble, soit par réticulation.

### ■ Immobilisation sur support

Il existe une littérature abondante sur ce point, mais dont l'intérêt demeure, dans la majorité des cas, purement d'ordre académique. Le principe le plus courant est de mettre en contact les molécules d'enzyme avec un support activé, portant des groupes suffisamment réactifs pour réagir avec ceux de l'enzyme dans des conditions compatibles avec la préservation de l'activité catalytique.

On peut citer, par exemple, la méthode développée par la société américaine Corning Glass pour immobiliser la glucose isomérase : on utilise des verres poreux aminés par greffage de  $\gamma$ -amino-propyl-triéthoxy-silane (APTES) activé par le glutaraldéhyde (OHC-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO). Ce réactif établit des ponts covalents (liaisons imines stabilisées) entre les groupes aminés du support et ceux de l'enzyme.

La société Rohm & Haas commercialise des supports porteurs de groupes époxyde réactifs (Eupergit® C, Amberzyme Oxirane®).

### ■ Immobilisation par réticulation

Le principe est ici de ponter les molécules d'enzymes entre elles, ou entre elles et d'autres protéines, à l'aide d'un réactif polyfonctionnel tel que le glutaraldéhyde, afin d'obtenir des macrostructures insolubles.

Les protéines enzymatiques peuvent être diluées par des protéines inertes, telles que l'albumine (niveau laboratoire) ou la gélatine (niveau industriel), pour améliorer le rendement de réticulation. Cette méthode est également utilisée pour immobiliser des cellules entières contenant une activité enzymatique, comme la glucose isomérase de Novozymes (Sweetzyme®).

Ce principe a également été appliqué à des cristaux d'enzymes par A. Margolin (Vertex Pharmaceuticals et Altus Biologics) pour développer des CLECs (*Cross-Linked Enzyme Crystals*) et à des précipités d'enzymes, obtenus par addition de sulfate d'ammonium ou d'alcool tertiobutyle à une solution d'enzymes, par R. A. Sheldon pour développer des CLEAs (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*), ce qui permet d'obtenir de dérivés présentant une activité catalytique élevée.

### 3.1.4 Commentaires

Un très grand nombre de méthodes d'immobilisation d'enzymes sont décrites dans la littérature scientifique et dans celle des brevets. Très peu de méthodes ont cependant franchi le stade du développement industriel. Cela est essentiellement dû au fait que l'extrapolation impose des méthodes simples, robustes et de coût très faible. De plus, aucune méthode d'immobilisation n'est générale. Il faut prendre en compte à la fois la nature et la pureté de la préparation d'enzyme mise en œuvre, le type de réaction (substrat, produit, milieu réactionnel, pH, température), les contraintes économiques spécifiques, pour choisir la méthode adéquate.

À l'heure actuelle, la majorité des procédés d'immobilisation utilisés à l'échelle industrielle impliquent l'adsorption des enzymes sur un support échangeur d'ions. Ces supports sont disponibles en quantité, à des prix raisonnables, et peuvent être réutilisés (désorption de l'enzyme inactive et adsorption d'enzyme active). Le charbon actif est également employé. Lorsque l'enzyme mise en œuvre est intracellulaire, les cellules entières, perméabilisées ou non, sont immobilisées dans un gel d'alginate ou réticulées au glutaraldéhyde. Le seul domaine qui peut accepter des coûts d'immobilisation plus importants est celui des biocapteurs.

À l'heure actuelle, les possibilités offertes par la biologie moléculaire permettent de remodeler la structure d'une enzyme afin de

permettre une immobilisation plus efficace, que ce soit par adsorption (introduction d'acides aminés chargés ou hydrophobes, fusion du gène codant l'enzyme avec un gène codant un domaine de liaison à la cellulose...) ou par liaison covalente (introduction d'acides aminés réactifs, en particulier dans des positions permettant de favoriser de manière optimale l'accès au site catalytique).

L'immobilisation d'une enzyme se traduit par un mode de fonctionnement totalement différent de celui de l'enzyme native : on passe d'un phénomène de catalyse homogène à un phénomène de catalyse hétérogène, se traduisant par l'obligation de prendre en compte, non pas des paramètres définis de manière intrinsèque, mais des paramètres statistiques comme cela sera développé dans le point suivant.

### 3.2 Influence des phénomènes de transfert de matière (diffusion, encombrement stérique, partage)

Dans le cas de la mise en œuvre d'une enzyme libre, on peut considérer que l'on se trouve dans une configuration de catalyse homogène : toutes les molécules d'enzymes sont identiques, elles sont réparties de manière uniforme dans le milieu réactionnel, dont la composition est identique en tout point (concentration du ou des substrat(s), concentration du ou des produit(s), pH, température, effecteurs...).

Par contre, dans le cas d'une enzyme immobilisée, toutes les molécules d'enzyme ne sont pas forcément identiques (possibilité de modes et de nombre de liaisons au support différents). Leur accessibilité est différente (par exemple, suivant leur présence à la surface ou à l'intérieur d'une matrice). Elles ne sont pas réparties de manière uniforme dans le milieu réactionnel, tant au niveau macroscopique (systèmes bi- ou polyphasiques) qu'au niveau moléculaire (densité d'enzyme variable entre la surface et l'intérieur d'une matrice). Les paramètres réactionnels peuvent être variables, du fait de l'établissement de gradients de concentration, de pH et/ou thermiques (phénomènes de partage et/ou diffusionnels). La notion de micro (nano ?) – environnement devient donc prépondérante : une enzyme immobilisée peut fonctionner dans des conditions effectives significativement très différentes de celles imposées au milieu réactionnel.

En conséquence, il ne sera pas possible d'avoir accès à des paramètres cinétiques caractéristiques du fonctionnement de chaque molécule d'enzyme, comme cela est le cas pour une enzyme libre, mais seulement à des paramètres statistiques, caractérisant une population d'enzymes fonctionnant dans des conditions données. Il faudra, notamment, être très rigoureux à ce niveau afin de déterminer des paramètres représentant bien les capacités catalytiques d'une préparation d'enzyme et non pas l'effet d'un gradient de pH ou de concentration.

#### 3.2.1 Phénomènes diffusionnels

Le fonctionnement d'une enzyme immobilisée est conditionné par son approvisionnement en substrat(s), qui repose sur des phénomènes de transport diffusionnel. Ces mêmes phénomènes concernent également la migration du ou des produit(s) du site catalytique à la masse de la solution. On distingue généralement deux types de transferts de matière :

- les transferts de matières externes, concernant le transport des molécules de la solution à la surface d'une particule et *vice versa*, par convection et diffusion moléculaire. C'est notamment le cas d'une enzyme adsorbée sur un support non poreux ;

- les transferts de matières internes, concernant le transport des molécules à l'intérieur d'une matrice (support poreux, gel, membrane...) par diffusion moléculaire.

#### ■ Transfert de matières externes

Suivant les valeurs respectives du flux maximal de transport diffusionnel  $J$  et du flux maximal de transformation enzymatique  $E$ , trois cas de figure pourront se présenter (sachant qu'à l'équilibre stationnaire, c'est le flux le plus faible qui contrôle l'efficacité du système).

Rappelons que le transport diffusionnel est défini par :

$$J = k_L a (S_{\text{sol}} - S_{\text{surf}})$$

avec  $k_L$  coefficient de transfert de matière externe,

$S$  concentration du substrat (dans la solution et à la surface de la particule).

La transformation enzymatique (cinétique Michaelienne) est définie par :

$$E = V'_{\text{max}} (S_{\text{surf}} / (K'_M + S_{\text{surf}}))$$

avec  $V'_{\text{max}}$  vitesse maximale apparente de la réaction enzymatique,

$K'_M$  constante de Michaelis apparente.

**Cas 1,  $J \gg E$  :** le flux de la réaction enzymatique est nettement plus faible que celui du transport diffusionnel. C'est donc lui qui est limitant. Pour améliorer l'efficacité du système, il faudra augmenter la densité de greffage d'enzyme.

Si on se place en cinétique enzymatique d'ordre 1, on peut introduire le critère adimensionnel de Damkoehler  $D_a$  :

$$D_a = k_E / k_L$$

avec  $k_E = V'_{\text{max}} / K'_M$ .

Dans ce cas,  $k_L \gg k_E$ , soit  $D_a \ll 1$  (régime de limitation cinétique : en général, lorsque  $D_a < 0,1$ ). La concentration du substrat à la surface de la particule  $S_{\text{surf}}$  est égale à sa concentration dans la solution  $S_{\text{sol}}$ .

**Cas 2,  $J \ll E$  :** le flux de la réaction enzymatique est nettement supérieur à celui du transport diffusionnel, qui est limitant. Il faut alors augmenter ce dernier pour améliorer l'efficacité du système (augmentation de l'agitation ou de la vitesse linéaire du fluide).

Dans ce cas,  $k_L \ll k_E$ , soit  $D_a \gg 1$  (régime de limitation diffusionnelle externe : en général, lorsque  $D_a > 10$ ). La concentration du substrat à la surface de la particule  $S_{\text{surf}}$  tend vers 0.

**Cas 3,  $J \approx E$  :** le flux de la réaction enzymatique est du même ordre de grandeur que celui du transport diffusionnel. La concentration du substrat à la surface de la particule  $S_{\text{surf}}$  est comprise entre la concentration du substrat dans la solution  $S_{\text{sol}}$  et 0. On est en régime de couplage diffusion externe-réaction. Un gradient de concentration s'établit entre la solution et la surface de la particule (notion de couche limite : distance de la surface à partir de laquelle s'établit ce gradient). Cela va se traduire, en particulier, par l'obtention d'une valeur de la constante de Michaelis  $K'_M$  supérieure à la valeur effective  $K_M$ . Dans le cas d'une inhibition par excès de substrat, ce phénomène pourra s'avérer bénéfique.

De même, un gradient de concentration de produit pourra s'établir entre la surface de la particule et la solution. Cela pourra être problématique dans le cas où le produit présente un caractère inhibiteur.

#### ■ Transfert de matières internes

Ces phénomènes sont directement couplés à ceux de transferts de matière externes. Là encore, suivant les flux respectifs, on pourra se trouver dans les trois mêmes cas que pour les transferts de matière externes :

**Cas 1 :** limitation par la cinétique enzymatique. Il faudra alors augmenter la quantité d'enzyme immobilisée par unité de volume de support.

**Cas 2 :** limitation par le transport diffusionnel interne. Il faudra diminuer la taille des particules de support ou l'épaisseur de la membrane.

**Cas 3 :** couplage diffusion interne-réaction.

Si l'on dispose des paramètres de diffusivité intraparticulaire des molécules impliquées, il est possible de calculer les gradients de concentration par intégration sur le volume concerné (sphère, parallélépipède...).

### 3.2.2 Encombrement stérique

L'accessibilité du site catalytique de l'enzyme immobilisée conditionne son efficacité. Cela est bien sûr d'autant plus marqué que l'enzyme est immobilisée non seulement à la surface, mais également à l'intérieur d'une matrice. De manière générale, l'efficacité augmente lorsque la taille du substrat diminue, à la fois pour des raisons stériques et diffusionnelles. Cela a clairement été montré pour des enzymes agissant sur des substrats macromoléculaires, tels que des acides nucléiques ou des protéines. C'est la raison pour laquelle l'activité des protéases immobilisées, par exemple, est généralement donnée, dans les catalogues de fournisseurs en utilisant des analogues de substrats de petite taille (dérivés d'acides aminés et non pas des protéines).

De même, l'inhibition d'une enzyme immobilisée est d'autant plus importante que la taille de son inhibiteur est faible, ce qui peut permettre de dresser une carte d'accessibilité.

L'orientation de la molécule d'enzyme sur la surface externe et interne d'une particule peut également conditionner son accessibilité. Il est possible, par remodelage moléculaire, d'introduire spécifiquement des sites de greffage permettant d'obtenir l'orientation optimale de l'enzyme sur la particule.

Les problèmes d'accessibilité rendent relativement illusoire toutes les tentatives d'hydrolyser des substrats macromoléculaires, voire insolubles, à l'aide d'enzymes immobilisées. Les activités mesurées à ce niveau sont le plus souvent attribuables à la libération d'enzymes à partir de la forme immobilisée.

### 3.2.3 Phénomènes de partage

L'interaction des molécules présentes dans un fluide avec la surface de particule par des liaisons de basse énergie se traduit par un phénomène de partage entre la phase fluide et la phase solide. Ce phénomène est mis à profit pour la séparation chromatographique, analytique ou préparative, de composés.

Ce phénomène a particulièrement été mis en évidence dans le cas d'espèces chargées, notamment de protons, du fait de la sensibilité des enzymes aux variations de pH. On constate qu'une enzyme immobilisée sur un support portant des charges négatives présente un pH optimal supérieur à celui de l'enzyme native. Une telle modification est le plus souvent purement apparente : elle résulte simplement de l'accumulation des protons dans le micro-environnement des charges négatives, par simple interaction coulombienne, qui se traduit, au niveau de la molécule d'enzyme immobilisée, par une valeur locale du pH significativement inférieure à celle de la solution. Il s'agit donc d'un simple décalage (pouvant atteindre plusieurs unités de pH), qui peut facilement être supprimé en augmentant la force ionique du milieu (effet d'écran : compétition entre les protons et les autres cations pour interagir avec les charges négatives du support). Inversement, une enzyme immobilisée sur un support porteur de charges positives pourra présenter un pH optimal significativement inférieur à celui de l'enzyme native.

Si l'on considère l'importance de la valeur du pH du milieu pour la mesure d'une activité enzymatique, il est essentiel de prendre en compte ce type de gradient (ainsi que pour toute autre molécule chargée : substrat, produit, effecteur) pour valider la mesure effectuée. Par exemple, en présence d'un support chargé négativement, la constante de Michaelis apparente sera diminuée si le substrat est chargé positivement (accumulation du substrat au

niveau de l'enzyme immobilisée), et augmentée si le substrat est chargé négativement (répulsion substrat/support).

Il est donc possible de faire fonctionner une enzyme efficacement dans un milieu dont le pH est différent de son pH optimal d'activité en contrôlant les charges électriques présentes dans son micro-environnement.

Les mêmes phénomènes de partage résultent de propriétés hydrophiles ou hydrophobes. Ainsi, par exemple, l'hydrolyse de triglycérides par une lipase immobilisée sur un support hydrophile se traduira par une accumulation de glycérol, hydrophile, dans le micro-environnement de l'enzyme.

### 3.2.4 Commentaires

La caractérisation cinétique d'une enzyme immobilisée demande la prise en compte de précautions importantes : l'activité correspond à des conditions locales de milieu réactionnel pouvant être très significativement différentes de celles de la masse de la solution. La mesure effectuée est en fait la résultante des caractéristiques catalytiques intrinsèques de l'enzyme, des phénomènes de transport diffusionnel externe et éventuellement interne, de l'encombrement stérique et des phénomènes de partage. Il est donc indispensable de s'assurer de la présence ou non de ces phénomènes pour valider les paramètres cinétiques obtenus. Cela est d'autant plus important lorsque ces paramètres sont utilisés pour le dimensionnement de réacteurs.

## 3.3 Réacteurs (piston, mélangé)

Les réacteurs utilisés pour la mise en œuvre d'enzymes immobilisées ne présentent pas de caractéristiques particulières par rapport à ceux que l'on rencontre dans le cas de réactions chimiques, en particulier en catalyse hétérogène.

Les trois principaux types de réacteurs sont :

- les réacteurs homogènes discontinus : du fait de l'agitation, ils sont réservés au cas où les particules d'enzyme immobilisées présentent de très bonnes propriétés mécaniques et de résistance à l'attrition. Le fait que l'enzyme soit immobilisée permet sa récupération en fin de réaction et sa réutilisation. L'apport de substrat peut être progressif (*fed batch*). La concentration de substrat diminue progressivement avec le temps de réaction, tandis que la concentration de produit augmente. C'est le type de réacteur généralement utilisé pour les enzymes libres ;

- les réacteurs homogènes continus : la remarque est la même que pour les réacteurs homogènes discontinus. Ce type de réacteur est recommandé lorsque le substrat présente un caractère inhibiteur, car sa concentration diminue rapidement dans le réacteur. Il est possible d'utiliser plusieurs réacteurs homogènes placés en cascade pour se rapprocher du fonctionnement d'un réacteur à écoulement piston. La concentration en produit augmente par paliers à la sortie des réacteurs successifs ;

- les réacteurs continus à écoulement piston : un gradient décroissant de concentration en substrat est observé entre l'entrée et la sortie, parallèlement à un gradient croissant en produit. Ce type de réacteur est donc particulièrement adapté dans le cas d'une inhibition par le produit. L'alimentation du lit fixe se fera de manière ascendante (le plus souvent) ou descendante, suivant les caractéristiques du support et de la solution d'alimentation, et selon la nécessité ou pas de procéder à un nettoyage ou une désinfection périodique. Les risques de colmatage peuvent être prévenus par la mise en œuvre en réacteur à lit fluidisé.

Si la réaction est sous contrôle cinétique, le réacteur homogène discontinu et le réacteur continu à écoulement piston sont décrits par les mêmes équations. Leur efficacité est supérieure à celle du réacteur homogène continu, sauf si le substrat est inhibiteur. Pour un même temps de séjour, le réacteur continu à écoulement piston est plus efficace que le réacteur homogène continu lorsque l'ordre de la réaction est égal à 1. Par contre, l'efficacité est la même si la réaction est d'ordre nul.

## 4. Applications industrielles des enzymes

Les domaines d'application d'un certain nombre d'enzymes industrielles ont été présentés dans le chapitre 1. Les principaux domaines d'utilisation sont l'industrie des détergents, de l'amidon, l'agroalimentaire (alimentation humaine et animale), la chimie fine et le secteur de la santé, ainsi que les domaines de l'analyse et des capteurs.

### 4.1 Détergents

L'utilisation des enzymes dans l'industrie des détergents représente l'application industrielle la plus importante à la fois en termes de valeur et de quantité.

Les enzymes les plus utilisées sont les protéases, mais beaucoup d'autres hydrolases peuvent également être ajoutées aux préparations pour aider à l'élimination de taches très diverses.

Les marques de lessive les plus performantes combinent protéases, amylases, lipases et cellulases pour augmenter l'efficacité du lavage. Chacune de ces enzymes est capable d'attaquer un type particulier de tache ou de salissure. Le fait d'inclure plusieurs types d'activité enzymatique dans le détergent permet ainsi d'éliminer des salissures contenant différentes substances. Par exemple, une tache alimentaire peut contenir des protéines, des lipides (gras) et de l'amidon, nécessitant pour son élimination totale l'action combinée d'une protéase, d'une lipase et d'une amylase.

Un autre avantage de l'utilisation des enzymes provient de leur très grande efficacité catalytique, permettant ainsi, même au cours d'un cycle de lavage court de nettoyer à fond un vêtement. De plus, il n'est plus nécessaire d'effectuer des lavages à haute température, la plupart des lessives aux enzymes étant très efficaces à basse ou moyenne température (30 °C).

Les enzymes dans les détergents doivent être efficaces et bien sûr sans danger. Or, les premières utilisations d'enzymes dans les lessives se sont traduites par des hypersensibilités chez certains consommateurs. Les enzymes ont alors été incorporées dans des granules enrobés de paraffine, par exemple, et contenant également des sels et des sucres comme agents protecteurs. Les enzymes ainsi conditionnées ne provoquent plus d'allergie et sont protégées des autres composants de la lessive.

Les enzymes sont utilisées en relativement faible quantité dans les lessives (tableau 2), environ 0,4 à 0,8 % de préparation enzymatique par rapport au poids, ce qui représente environ 1 % du coût total. Cela signifie que dans le choix des enzymes, leur activité dans un milieu « agressif » est un critère bien plus important que leur coût. En effet, elles doivent « fonctionner » en présence de détergents anioniques ou non ioniques, de savon, d'oxydant, d'agent de brillance, etc. tout cela entre pH 8,0 et 10,5, tout en étant stables jusqu'à 60 °C.

La tendance actuelle est de réduire la teneur en tripolyphosphate pour des raisons environnementales. Il est remplacé par du carbonate de sodium et un ajout de protéases.

La plupart des enzymes utilisées sont produites par voie microbienne : les protéases sont issues de *B. licheniformis* ou de *B. amyloliquefaciens*, ainsi que la principale  $\alpha$ -amylase (*B. licheniformis*).

Il convient de remarquer que toutes les protéases sont des endoprotéases à sérine, non spécifiques, clivant de préférence les liaisons peptidiques du côté de la fonction carboxylique des résidus d'acides aminés hydrophobes. Elles sont toutefois capables d'hydrolyser la plupart des liaisons peptidiques, produisant ainsi des petits peptides solubles et facilement éliminables.

La disponibilité de nouvelles lipases, actives dans ce type d'environnement, va augmenter de manière significative la quantité d'enzymes dans les lessives.

**Tableau 2 – Composition d'une lessive aux enzymes**

Constituants	Teneur (%)
Tripolyphosphate de sodium (adouccissant d'eau, détachant)	38,0
Sodium alcane sulfonate (tensioactif)	25,0
Perborate de sodium tétrahydraté (agent oxydant)	25,0
Sodium alcane carboxylates (savon)	3,0
Sulfate de sodium (adouccissant d'eau)	2,5
Carboxyméthyl cellulose de sodium (maintien en suspension les particules)	1,6
Métasilicate de sodium (détachant, agglomérant)	1,0
Protéase de Bacillus	0,8
Agent de brillance	0,3
Agent anti-mousse	traces
Parfum	traces
Eau	QSP 100 %

Un développement récent concerne l'introduction dans les détergents d'une cellulase d'origine fongique stable en milieu alcalin. Elle permet l'élimination de petites fibres de coton qui apparaissent à l'usage à la surface des vêtements modifiant ainsi le « toucher » ainsi que la couleur : les cellulases en enlevant ces fibres sans endommager les autres permettent de remettre à neuf les vêtements.

Les exemples récents de lessives de seconde génération montrent l'utilisation d'amylases à forte activité à basse température et pH alcalin, tout en conservant une très bonne stabilité.

Il en est de même pour des protéases actives à basses températures. Ces enzymes proviennent, soit d'organismes naturels, soit d'organismes génétiquement manipulés. Enfin, la dernière enzyme ajoutée dans les lessives est une mannanase qui permet d'améliorer l'élimination de taches de guar, un agent stabilisant et épaississant que l'on trouve dans certains plats préparés.

### 4.2 Industrie de l'amidon

L'amidon est l'une des principales matières premières renouvelable d'origine végétale. Ses utilisations industrielles sont, de manière à peu près équilibrée, à finalité alimentaire et non alimentaire. Les enzymes qui sont employées dans ce domaine permettent sa solubilisation (liquéfaction), puis son hydrolyse en monomères de D-glucose (saccharification).

Les  $\alpha$ -amylases thermostables de *Bacillus licheniformis* ou de *B. stearothermophilus* sont des endo-enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4 des chaînes d'amylose et d'amylpectine (5-10 min à 105 °C, puis 2 h à 95 °C), libérant ainsi des malto-dextrines.

Cette liquéfaction de l'amidon peut être suivie d'une hydrolyse par action d'une amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* (40-72 h à 60 °C), qui est une exo-enzyme catalysant l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4 à partir des extrémités non réductrices, ainsi que celle des liaisons  $\alpha$ -1,6 (branchements) mais plus lentement. Cette action de débranchement est soutenue par l'addition de pullulanase ou d'isoamylase. On obtient ainsi la saccharification de l'amidon en

D-glucose (« dextrose »). Le D-glucose peut être utilisé directement à des fins alimentaires. Il peut également être transformé en sorbitol (glucitol) par réduction chimique ou en vitamine C. Il est employé comme source carbonée pour la production par fermentation d'acides organiques (acides citrique, gluconique, succinique...), d'acides aminés et de bioéthanol, notamment. Il est également isomérisé par voie enzymatique en D-fructose (« lévulose »), dont le pouvoir édulcorant est double de celui du D-glucose, à l'aide de glucose isomérases de différentes origines microbiennes (*Acrobacter*, *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces*). Il faut noter que ces enzymes sont essentiellement utilisées sous forme immobilisée, ce qui constitue de loin, à l'heure actuelle, la première application de bioréacteurs enzymatiques, pour la production de 15 millions de tonnes de sirops à teneur élevée en fructose (mélanges à 42 % ou 55 % de D-fructose).

Le maltose (dimère de D-glucose) est produit par action sur les malto-dextrines d' $\alpha$ -amylase maltogène d'*Aspergillus oryzae* ou de  $\beta$ -amylase d'origine végétale ou microbienne. Cette production s'effectue naturellement au cours du processus de moutage.

Les cyclodextrines (structures cycliques à 6, 7 ou 8 unités D-glucose, présentant un volume intérieur hydrophobe et une surface externe hydrophile, utilisées pour l'inclusion de molécules thérapeutiques ou d'arômes hydrophobes) sont obtenues par action de cyclodextrine glucanotransférases (CGTases) sur les malto-dextrines.

Novozymes a récemment introduit une  $\alpha$ -amylase d'*Anoxybacillus contaminans* capable d'attaquer directement les granules insolubles d'amidon. Cette nouvelle enzyme permet d'éviter la liquéfaction préalable de l'amidon, et de réaliser en une seule étape, par action conjointe d'une amyloglucosidase, dans un même bioréacteur la production de D-glucose à partir d'amidon et sa fermentation en éthanol.

Les  $\alpha$ -amylases sont également utilisées dans l'industrie textile pour éliminer l'amidon servant d'apprêt pour augmenter la résistance mécanique des fibres, ainsi que dans l'industrie papetière pour préparer les hydrolysats d'amidon ajoutés à la pulpe cellulosique.

### 4.3 Domaine agroalimentaire (alimentation humaine et animale)

L'alimentation humaine et animale est le troisième grand domaine d'utilisation des enzymes. Les biocatalyseurs sont effectivement les outils de choix pour catalyser la transformation (hydrolyse principalement) des molécules végétales et animales : protéines, polysides, lipides.

#### 4.3.1 Alimentation humaine

##### ■ Enzymes employées dans l'industrie laitière

Enzymes de coagulation : la production du caillé à partir du lait provient de l'hydrolyse spécifique de la  $\kappa$ -caséine (environ 15 % des caséines laitières), par la présure, enzyme traditionnellement extraite de la caillette de veau et constituée d'un mélange de chymosine et de pepsine. Cette présure naturelle est en compétition, suivant les traditions fromagères, les conditions réglementaires et les coûts respectifs, avec deux autres sources d'enzymes :

- les substituts microbiens produits par des cultures fongiques (*Cryphonectria parasitica*, *Mucor pusillus* Lindt, *Rhizomucor miehei*) ;
- les préparations de chymosine recombinante obtenues par clonage et expression du gène correspondant chez différents hôtes (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli* et *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*).

La présure de veau est majoritairement utilisée en Europe, alors que ce sont les enzymes fongiques et recombinantes qui le sont aux États-Unis et dans le reste du monde.

Les protéases et les lipases sont utilisées pour la production d'arômes de fromage.

Des hydrolysats de protéines laitières sont préparés par action de protéases pour l'alimentation entérale et parentérale (protéines prédigérées), ainsi que pour la formulation de spécialités diététiques.

Le lysozyme, extrait de blanc d'œuf, a été employé comme antibactérien naturel pour éviter le développement de bactéries propioniques dans certains fromages.

La transglutaminase catalyse la réticulation de protéines laitières pour l'obtention de textures spécifiques.

La  $\beta$ -galactosidase (« lactase ») catalyse l'hydrolyse du lactose, principal glucide des laits maternels, en D-glucose et D-galactose. Il est ainsi possible de préparer des laits diététiques pour les personnes présentant des problèmes d'intolérance au lactose, et d'éviter les problèmes de cristallisation de ce produit dans les produits laitiers, notamment les glaces, dus à sa faible solubilité.

##### ■ Enzymes employées pour la panification

Les  $\alpha$ -amylases fongiques (moins thermostables que les  $\alpha$ -amylases bactériennes, donc plus facilement dénaturées au cours de la cuisson) sont utilisées pour accélérer la croissance des levures et la production de dioxyde de carbone (levée de la pâte) en complétant cette activité naturellement présente dans les farines. Leur action permet également d'augmenter la durée de vie du pain en limitant les phénomènes de rétrogradation de l'amidon.

L'hydrolyse des hémicelluloses présentes dans la farine par des xylanases spécifiques des arabinoxylanes insolubles se traduit par une amélioration des qualités de la pâte et des produits finaux (mie mieux structurée et de volume plus important).

L'action des oxydases (glucose, hexose, sulfhydryl oxydases et lipoxygénases) libère du peroxyde d'hydrogène, ce qui conforte la formation de ponts disulfure entre les molécules de gluten et améliore les qualités de la pâte et de la mie.

La phospholipase A2 d'*Aspergillus niger*, développée par DSM, améliore les propriétés émulsifiantes des lécithines en les transformant en lysolécithines, ce qui permet de diminuer les quantités de jaune d'œuf utilisées dans la préparation de spécialités.

La dextrane-saccharase d'une bactérie lactique isolée de levains, *Leuconostoc mesenteroides* LMGP-16878, est utilisée pour produire, à partir de saccharose, des glucanes (dextrane). Leur addition améliore le volume du pain et les qualités de la mie.

##### ■ Enzymes employées en brasserie

Le processus naturel de production d'enzymes lors de la germination de l'orge (maltage) peut être conforté par l'addition d'amylases, de protéases, d'hémicellulases et de glucanases, notamment de  $\beta$ -glucanases pour améliorer les propriétés de filtration du mout et éviter la formation de précipités.

Prévention de la formation de précipités résultant de l'association tannins-protéines au froid : ce problème peut être évité soit en piégeant les tannins sur des adsorbants (polyvinylpyrrolidone), soit en hydrolysant les protéines à l'aide d'une protéase d'origine végétale, la papaïne. Ces protéines étant riches en proline, DSM a développé une endo-protéase d'*Aspergillus niger* spécifique de l'hydrolyse des liaisons impliquant des résidus de proline. Cette enzyme n'hydrolyse pas les protéines impliquées dans la stabilité de la mousse, pauvres en proline, ce qui n'est pas le cas de la papaïne.

##### ■ Obtention de prébiotiques à l'aide d'enzymes

Les prébiotiques sont des oligosides non digestibles qui sont métabolisés sélectivement par certains micro-organismes du microbiote intestinal. Cela se traduit par des effets bénéfiques pour la santé (augmentation des défenses immunitaires, amélioration de la fixation du calcium, prévention du cancer du colon et du dia-

bète de type II...). En plus de l'extraction à partir de végétaux, ces oligosides sont obtenus par deux voies principales :

- hydrolyse de polyosides :
  - fructanes de chicorée (inuline) ou d'agave à l'aide d'endo-fructanases,
  - xylanes à l'aide d'endo-xylanases,
  - $\beta$ -glucanes à l'aide de  $\beta$ -glucanases ;
- synthèse enzymatique :
  - fructo-oligosaccharides (FOS) à l'aide de fructosyltransférase d'*Aspergillus niger* à partir de saccharose,
  - isomalto-oligosaccharides (IMO) à l'aide de transglucosidase fongique à partir d'hydrolysats d'amidon,
  - gluco-oligosaccharides (GOS) à l'aide de dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 à partir de saccharose,
  - alternane-oligosaccharides (AOS) à l'aide de l'alternane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 à partir de saccharose,
  - galacto-oligosaccharides (TOS) à l'aide de transgalactosidase d'*Aspergillus oryzae* à partir de lactose.

#### ■ Emploi des enzymes pour les fruits et légumes

L'utilisation conjointe de différentes enzymes catalysant l'hydrolyse de polyosides végétaux (pectinases, cellulases, hémicellulases) a permis de préparer des boissons à bases de fruits et de légumes non pressurables.

La viscosité des jus de pomme est diminuée par addition de pectinases, ce qui permet de faciliter leur filtration et leur concentration.

En vinification, l'ajout de glycosidases se traduit par une meilleure coloration des vins rouges, en facilitant l'extraction des pigments anthocyanes, et par une libération d'arômes spécifiques qui se trouvent sous forme de glyco-conjugués précurseurs (muscat, par exemple).

### 4.3.2 Alimentation animale

#### ■ Phytases

Les phytases catalysent la libération des groupes phosphates présents sur les phytates (inositol-phosphates). Cela permet de favoriser l'assimilation par les animaux et, surtout, de limiter la teneur en phosphates des déjections animales, notamment du lisier de porc, ce qui réduit les problèmes de pollution environnementale et les phénomènes d'eutrophisation.

#### ■ Glycosidases

La digestibilité et la valeur nutritionnelle des matières premières d'origine végétale utilisées en alimentation animale peuvent être fortement améliorées par l'addition d'enzymes catalysant l'hydrolyse des polyosides de structure, notamment les  $\beta$ -1,3-1,4-glucanes présents dans l'enveloppe et l'endosperme des céréales telles que l'orge, les arabinoxylanes largement répandus dans les céréales, et les mannanes, notamment les galactomannanes, présents dans les graines de légumineuses, le guar et le soja.

Ce type d'application concerne l'élevage des animaux monogastriques, volailles et porcs essentiellement. Les principales enzymes concernées sont :

- les endo- $\beta$ -1,4-xylanases, qui hydrolysent les arabinoxylanes ;
- les  $\beta$ -1,3-1,4-glucanases ;
- les  $\beta$ -D-mannanases.

La société Adisseo (Antony), par exemple, commercialise un mélange d'endo- $\beta$ -1,4-xylanases, endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanases, pectinases et mannanases particulièrement performant, produit par culture de *Penicillium funiculosum*, le Rovabio<sup>®</sup> Excel.

## 4.4 Chimie fine et santé

### 4.4.1 Chimie fine

Seuls quelques exemples significatifs seront donnés, des revues plus exhaustives étant disponibles dans les références bibliographiques fournies.

Dès 1969 s'est développée au Japon, dans la société Tanabe Seiyaku, la production énantiosélective de L-acides aminés, et, en particulier, de L-méthionine par action d'une amino acylase d'*Aspergillus oryzae*, immobilisée par adsorption sur DEAE-Sephadex, sur un mélange racémique de N-acétyl-D,L-méthionine. La N-acétyl-D-méthionine non hydrolysée est séparée par cristallisation fractionnée et racémisée par chauffage pour conduire à la transformation complète en L-méthionine. Le même principe a été appliqué à la production de différents acides aminés. La société allemande EVONIK a réalisé le même type de réaction en utilisant l'acido acylase immobilisée dans des réacteurs à membranes semi-perméables (fibres creuses).

DSM utilise l'action d'une amidase L-énantiosélective de *Pseudomonas putida* sur un mélange racémique d'amides de D,L-acides aminés pour produire, soit le L-acide aminé, après racémisation du D-amide, soit le D-acide aminé, après hydrolyse du D-amide et racémisation du L-acide aminé (figure 6).

La production d'antibiotiques semi-synthétiques de type  $\beta$ -lactames à partir de pénicillines naturelles produites par fermentation, telles que la Pénicilline G s'effectuait, avant 1980, par voie totalement chimique. L'instabilité du noyau  $\beta$ -lactame imposait d'opérer à  $-40^{\circ}\text{C}$  en milieu acide, pour hydrolyser la liaison amide de la chaîne latérale, avec un rendement de 40 % seulement. L'introduction, à cette date, de l'utilisation de pénicilline amidase, notamment d'*Escherichia coli*, a permis de développer un procédé nettement plus performant de production de l'acide amino-6 pénicillanique (6-APA), qui sert ensuite de précurseur pour la synthèse de l'ampicilline (figure 7). Cette seconde étape consiste à greffer une chaîne de D-phénylglycine, à partir de l'ester ou de l'amide correspondant par liaison amide sur le 6-APA. Cette réaction, réalisée initialement par voie chimique, est également, à l'heure actuelle, catalysée par la même enzyme, grâce à la maîtrise des conditions thermodynamiques de mise en œuvre. En effet, un catalyseur peut, par définition, catalyser aussi bien une réaction d'hydrolyse qu'une réaction de synthèse, la position d'équilibre ne dépendant que des paramètres thermodynamiques du milieu réactionnel.

La Pénicilline G peut être transformée chimiquement, par expansion du cycle pentagonal, en acide phénacétyl-amino-7-désacétoxycephalosporanique (phénacétyl-7-ADCA). Ce précurseur est également hydrolysé par une pénicilline amidase en 7-ADCA (figure 8). Le greffage enzymatique d'une chaîne D-phénylglycine sur ce composé conduit à un autre antibiotique très important, la céphalexine.

Les catalyseurs enzymatiques peuvent être utilisés non seulement en chimie fine, mais également en chimie de commodités : la société Nitto Chemicals a développé au Japon un procédé de production d'acrylamide à l'échelle de plusieurs dizaines de milliers de tonnes par an à partir d'acrylonitrile, à l'aide de la nitrile hydratase de *Pseudomonas chloraphis*. Ce procédé a remplacé l'ancien procédé chimique faisant intervenir des catalyseurs au cuivre à haute température. Il présente l'avantage de supprimer les rejets toxiques de catalyseurs et de produits secondaires, notamment d'acide cyanhydrique et de simplifier les opérations de purification du produit final.

### 4.4.2 Santé

Les enzymes sont également utilisées directement à des fins thérapeutiques, soit pour pallier des insuffisances ou des carences de production d'enzymes, résultant de causes génétiques ou médicamenteuses, soit pour apporter un effet biologique spécifique, production d'un composé bénéfique ou élimination d'un produit toxique.

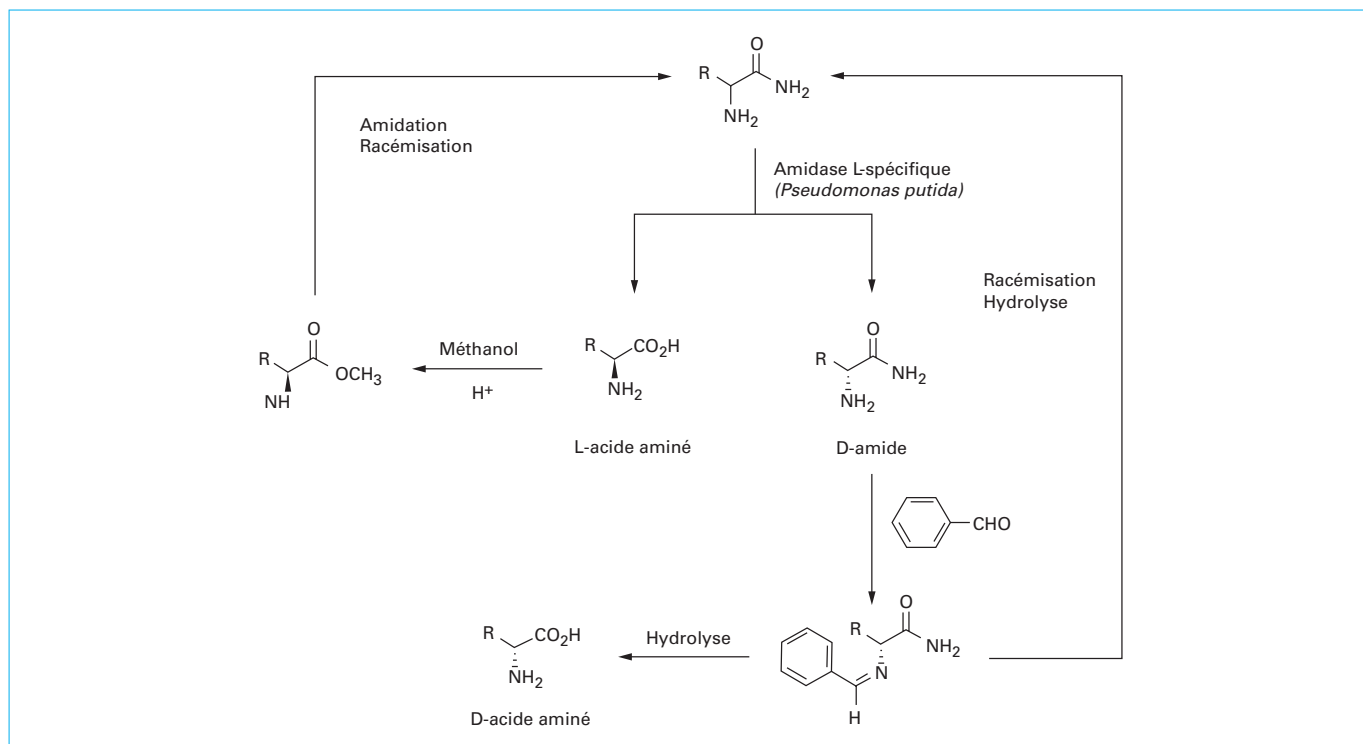


Figure 6 – Procédé DSM énantiosélectif de production d'acides aminés D ou L à l'aide de l'amidase L-spécifique de *Pseudomonas putida*

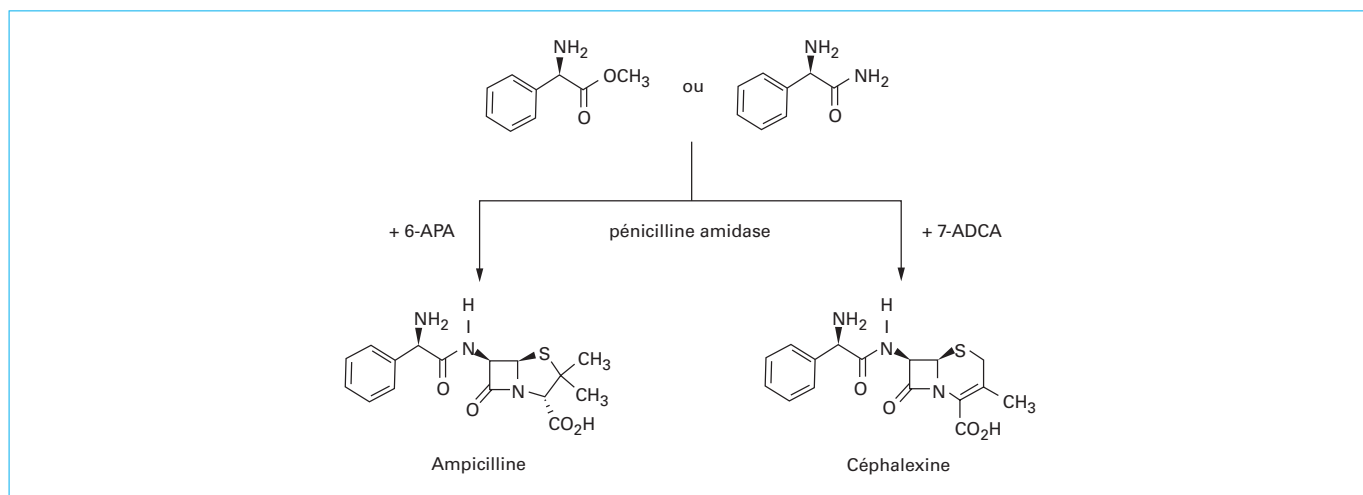


Figure 7 – Synthèse enzymatique d'ampicilline et de céphalexine à l'aide de pénicilline amidase

La biodisponibilité (accès au site d'action visé) et la stabilité (temps de demi-vie) de l'enzyme *in vivo* sont ici des critères primordiaux, ainsi que l'absence de réaction immunitaire.

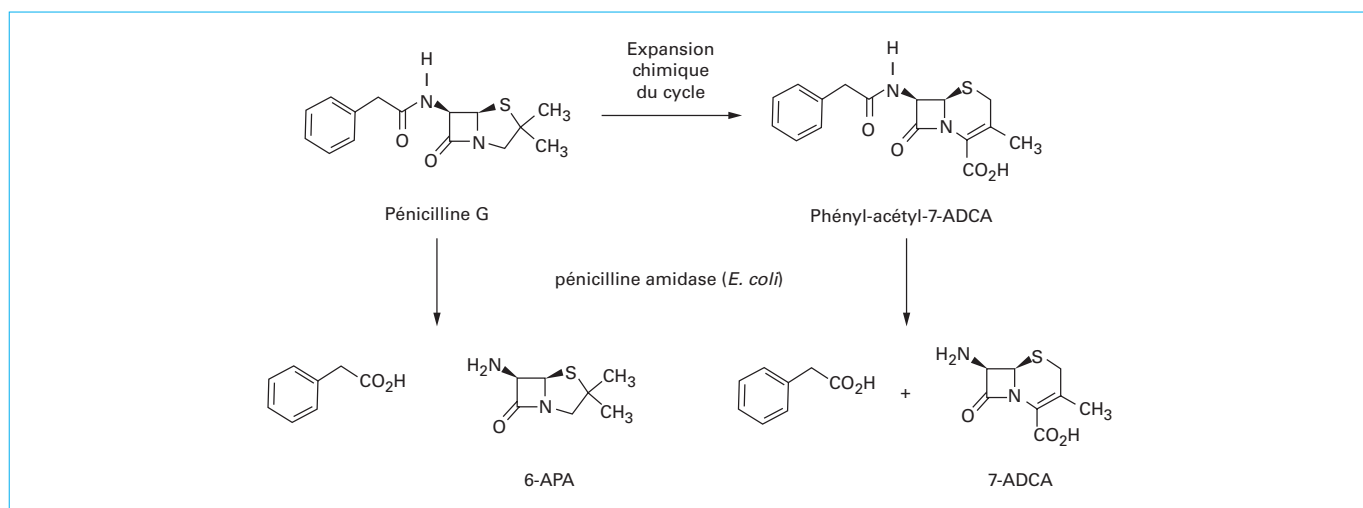
Quelques exemples d'enzymes à usage thérapeutique, dont un grand nombre sont de nature recombinante, sont donnés ici :

- l'urate oxydase pour l'élimination de l'acide urique (formation d'allantoïne plus soluble) et le traitement de l'hyperuricémie. L'enzyme est, soit extraite d'*Aspergillus flavus*, soit exprimée de manière recombinante chez *Saccharomyces cerevisiae* ;

- la superoxyde dismutase est employée notamment dans les syndromes d'arthrose inflammatoire, de polyarthrite, d'asthme. Elle provient de cellules du foie ou d'érythrocytes. Elle est également produite de manière recombinante chez *Escherichia coli* ;

- la lipase de *Rhizopus arrhizus*, les protéases animales ou fongiques, les amylases, les cellulases sont utilisées comme aides digestives ;

- la sphingomyéline phosphodiesterase 1 recombinante est utilisée dans le traitement de la maladie de Niemann-Pick de type B ;



**Figure 8 – Production enzymatique d’acide amino-6 pénicillanique (6-APA) et d’acide amino-7 désacétocéphalosporanique (7-ADCA) à l’aide de pénicilline amidase**

- la N-acétylgalactosamine-4-sulfatase recombinante est prescrite dans le syndrome de Maroteaux-Lang (mucopolysaccharidose de type VI) ;
- l’iduronate-2-sulfatase recombinante permet de traiter le syndrome de Hunter (mucopolysaccharidose de type II) ;
- la désoxyribonucléase recombinante est employée dans les cas d’obstruction pulmonaire chronique ;
- l’ $\alpha$ -galactosidase recombinante est utilisée dans la maladie de Fabry ;
- la  $\beta$ -galactosidase permet de limiter l’effet de l’intolérance au lactose ;
- la hyaluronidase de testicules bovins est employée dans certains cas d’attaque cardiaque ;
- la glucosylceramidase de placenta humain ou recombinante soigne la maladie de Gaucher ;
- les facteurs de coagulation VII, VIII et IX, qui sont des protéases intervenant dans la cascade réactionnelle du processus de coagulation, sont extraits de plasma humain ou produits de manière recombinante pour soigner les personnes atteintes d’hémophilie ;
- l’activateur du plasminogène tissulaire (Tpa) recombinant est une protéase que l’on injecte aux victimes d’infarctus aigu du myocarde. L’urokinase est également prescrite dans ce même syndrome ;
- l’asparaginase d’*Escherichia coli* est utilisée dans certains cas de leucémie lymphocytaire.

## 4.5 Applications analytiques, diagnostic et capteurs

De par leur spécificité, sélectivité et efficacité, les enzymes sont d’excellents réactifs analytiques. Elles sont très souvent utilisées pour déterminer la concentration de leur substrat par des mesures de vitesse initiale de réaction. Ce type d’analyse, courant dans les laboratoires permet, à partir d’un seul échantillon d’effectuer un grand nombre de dosages. Toutefois, le traitement d’un nombre important d’échantillons peut rapidement s’avérer coûteux en temps, en main d’œuvre spécialisée et bien sûr en enzyme ou coenzyme. L’utilisation de biocapteurs, utilisant des systèmes biologiques en association avec de la microélectronique devient alors particulièrement intéressante (tableau 3).

Un biocapteur est donc constitué d’un élément de reconnaissance moléculaire et d’un transducteur. L’élément de reconnais-

**Tableau 3 – Applications des biocapteurs**

Domaine	Applications
Santé	Marqueurs de maladies telles que l’infarctus du myocarde Diagnostic de maladies infectieuses Analyse du taux de glucose et de certaines hormones
Environnement	Analyse de l’eau et du sol Détection des pesticides et autres substances toxiques Contrôle des effluents industriels
Agriculture	Détection des pesticides Maladies des récoltes
Alimentation	Fraîcheur des aliments Détermination de la maturité des fruits par mesure du taux de glucose Quantification du taux de cholestérol dans le beurre Organismes pathogènes ( <i>Escherichia coli</i> )
Contrôle des procédés	Suivi des fermentations
Microbiologie	Analyse bactérienne et virale

sance moléculaire réagit spécifiquement avec l’échantillon biologique à analyser alors que le transducteur agit en tant que détecteur, convertissant l’évènement de reconnaissance moléculaire en un signal facilement mesurable. L’élément de reconnaissance moléculaire et le transducteur sont intégrés dans un seul dispositif permettant de doser directement la molécule d’intérêt sans l’ajout d’autres réactifs ou de prétraitement de l’échantillon. Outre les enzymes, les éléments de reconnaissance moléculaire peuvent être des anticorps, de l’ADN, des cellules entières ou des micro-organismes. Les enzymes immobilisées sur la surface du transducteur, sont spécifiques et ont une sensibilité élevée pour l’échantillon. Le transducteur détecte directement ou par le biais d’un médiateur chimique les changements physiques se produisant suite à la liaison de la molécule à analyser et les convertit en un signal de sortie qui peut être amplifié et affiché.

**Tableau 4 – Différents types de transducteurs**

Électrochimique Ampérométrie	Réactions de transfert d'électrons Détection d'un changement de courant à potentiel constant (exemple : $O_2/H_2O_2$ généré par une réaction enzymatique)
Conductimétrie	Détection d'un changement de conductivité entre deux électrodes (exemple : mesure du pH)
Potentiométrie	Détection d'un changement de potentiel à courant constant
Optique	Détection de spectre ou diffraction de lumière à l'aide de fibres optiques
Piézoélectrique	Un cristal de quartz change de fréquence de vibration en réponse à un faible changement à sa surface (exemple : liaison d'un anticorps sur un antigène)
Température	Réactions endothermiques ou exothermiques

Le mode de transduction dépend du type de reconnaissance moléculaire : spectrophotométrie, électrochimie, calorimétrie ou piézo-électricité (tableau 4).

Par exemple, le premier biocapteur (développé par Clark et Lyons en 1962 pour la détection du glucose) était constitué de la glucose oxydase piégée à la surface d'une électrode de platine par une membrane à dialyse, permettant la diffusion des substrats et des produits à/de la couche enzymatique. La conversion du D-glucose en gluconolactone et  $H_2O_2$  est détectée par électrochimie.

L'amplitude du courant mesuré dépend de la cinétique de transfert de masse qui détermine les vitesses auxquelles les substrats

peuvent être fournis et les produits enlevés de la couche enzymatique. Elle dépend de la cinétique enzymatique qui détermine la vitesse à laquelle le  $H_2O_2$  est généré à l'intérieure de la couche enzymatique et de la cinétique de la réaction électrochimique qui détermine la vitesse à laquelle le  $H_2O_2$  produit dans la réaction enzymatique est converti en  $O_2$ . Les réactions se produisent dans une mince couche à la surface du transducteur ; des concentrations stables des réactifs et des produits existent dans cette couche lorsqu'un signal constant est obtenu.

Un biocapteur efficace doit être hautement spécifique pour l'analyse considérée, doit être stable dans des conditions normales de stockage et doit permettre un grand nombre d'essais. La réaction sera indépendante des paramètres physiques tels que l'agitation. Le pH et la température auront peu d'influence. Cela implique que les échantillons subiront un prétraitement minimal. Si des cofacteurs ou coenzymes sont nécessaires, il est préférable de les co-immobiliser avec l'enzyme. La réponse doit être précise, reproductible et linéaire sur une gamme utile de dosage, sans dilution ou concentration. Le biocapteur doit être peu coûteux, petit, portable et utilisable par des opérateurs peu spécialisés.

La partie clé du biocapteur est le « transducteur » qui permet d'utiliser les changements physiques qui accompagnent la réaction tels :

- un dégagement ou une absorption de chaleur lors de la réaction (biocapteur calorimétrique) ;
- une modification de la distribution des charges produisant un potentiel électrique (biocapteur potentiométrique) ;
- un mouvement d'électrons produit lors d'une réaction d'oxydoréduction (biocapteur ampérométrique) ;
- une production de lumière lors de la réaction ou bien différence d'absorbance entre les réactants et les produits (biocapteur optique) ;
- des effets liés à la masse des réactants ou des produits (biocapteur piézo-électrique).

# Biocatalyse ou catalyse enzymatique

par **Didier COMBES**

Professeur à l'Institut national des sciences appliquées de Toulouse

et **Pierre MONSAN**

Professeur à l'Institut national des sciences appliquées de Toulouse  
École nationale supérieure des mines de Paris  
Institut universitaire de France

## À lire également dans nos bases

BROWN (E.) et BIELLMANN (J.F.). – *Catalyse enzymatique. Techniques de l'Ingénieur J 1 240* (1992) Archives Génie des procédés.

## Sources bibliographiques

PRICE (N.C.) et STEVENS (L.). – *Fundamentals of enzymology*. Oxford University Press, Oxford (1989).

SMITH (G.M.). – *The nature of enzymes, in Biotechnology, a Comprehensive Treatise*. 2<sup>e</sup> édn., sous la direction de REHM (H.-J.) et REED (G.), vol. 9, Springer-Verlag, Weinheim, Allemagne (1995).

HENRISSAT (B.). – *A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities*. *Biochem. J.*, 280, p. 309-316 (1991).

COUTINHO (P.M.) et HENRISSAT (B.). – *Carbohydrate-active enzymes : an integrated database approach*. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, GILBERT (H.J.), DAVIES (G.), HENRISSAT (B.) et SVENSSON (B.) eds., The Royal Society of Chemistry, p. 3-12, Cambridge (1999).

TERWISSCHA VAN SCHELTINGA (A.), ARMAND (S.), KALK (K.H.), ISOGAI (A.), HENRISSAT (B.) et DIJKSTRA (B.W.). – *Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and*

*x-ray structure of a complex with allosamidin. Evidence for substrate assisted catalysis*. *Biochemistry*, 34, p. 15619-15623 (1995).

RAJAN (S.S.), YANG (X.), COLLART (F.), YIP (V.L.), WITHERS (S.G.), VARRROT (A.), THOMPSON (J.), DAVIES (G.J.) et ANDERSON (W.F.). – *Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD<sup>+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent phospho-alpha-glucosidase from Bacillus subtilis*. *Structure*, 12, p. 1619-1629 (2004).

SEGEL (I.H.). – *Enzyme kinetics*. Wiley-Interscience, New-York (1975).

DIXON (M.) et WEBB (E.C.). – *Enzymes*. Academic Press, New-York (1979).

MESSING (R.A.). – *Immobilized enzymes for industrial reactors*. Academic Press (1975).

COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.). – *Methods in enzymology. Immobilized enzymes*. Academic Press, vol. 44 (1976).

COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.). – *Methods in enzymology. Immobilized enzymes and cells (part C)*. Academic Press, vol. 136 (1987).

DURAND (G.) et MONSAN (P.). – *Les enzymes. Production et utilisations industrielles*. Dunod, Paris (1983).

GODFREY (T.) et WEST (S.). – *Industrial enzymology*. 2<sup>e</sup> éd., MacMillan Press Ltd. (1996).

LARRETA-GARDE (V.). – *Enzymes en agroalimentaire*. Lavoisier Tec. & Doc., Paris (1997).

LIESE (A.), SEELBACH (K.) et WANDREY (C.). – *Industrial biotransformations*. Wiley-VCH, Weinheim (2000).

STRAATHOF (A.J.J.) et ADLERCREUTZ (P.). – *Applied biocatalysis*. 2<sup>e</sup> éd., Harwood Academic Publishers (2000).

AEHLE (W.). – *Enzymes in industry. Production and applications*. Wiley-VCH, Weinheim (2004).

GODFREY (T.) et REICHTER (J.). – *Industrial enzymology*. The Nature Press New York, 446 (1983).

## Sites Internet

Nomenclature des enzymes  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>

Classification CAZy (Carbohydrate Active enZymes)  
<http://www.cazy.org/>

Système d'information sur les enzymes  
<http://www.brenda-enzymes.org/index.php4>

## Réglementation

Les enzymes alimentaires  
<http://europa.eu/scadplus/leg/fr/lvb/l21036.htm>

## Constructeurs – Fournisseurs – Distributeurs

Association des producteurs et formulateurs d'enzymes : AMFEP  
<http://www.amfep.org/>

### Fournisseurs d'enzymes

NOVOZYMES A/S  
<http://www.novozymes.com/>

DANISCO-GENENCOR  
<http://www.genencor.com/>

DSM  
<http://www.dsm.com/>

BASF  
<http://www.corporate.basf.com/>

SAF ISIS  
<http://www.safisis.com/>

LYVEN  
<http://www.lyven.com/>

AMANO ENZYME Inc.  
<http://www.amano-enzyme.co.jp/>

NAGASE Co.  
<http://www.nagase.co.jp/>

MEITO SANGYO Co.  
[http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/kaseihin/index\\_e.html](http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/kaseihin/index_e.html)

BIO-CAT Inc.  
<http://www.bio-cat.com/>

AB ENZYMES  
<http://www.abenzymes.com/>

BIOCATALYSTS  
<http://www.biocatalysts.com/>

CODEXIS  
<http://www.codexis.com/>

BIOZYME  
<http://www.biozyme.com/>

ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION  
<http://www.enzymedevelopment.com/>

# GAGNEZ DU TEMPS ET SÉCURISEZ VOS PROJETS EN UTILISANT UNE SOURCE ACTUALISÉE ET FIABLE

Techniques de l'Ingénieur propose la plus importante collection documentaire technique et scientifique en français !

Grâce à vos droits d'accès, retrouvez l'ensemble des **articles et fiches pratiques de votre offre, leurs compléments et mises à jour,** et bénéficiez des **services inclus.**



RÉDIGÉE ET VALIDÉE  
PAR DES EXPERTS



MISE À JOUR  
PERMANENTE



100 % COMPATIBLE  
SUR TOUS SUPPORTS  
NUMÉRIQUES



SERVICES INCLUS  
DANS CHAQUE OFFRE

- **+ de 350 000 utilisateurs**
- **+ de 10 000 articles de référence**
- **+ de 80 offres**
- **15 domaines d'expertise**

- Automatique - Robotique
- Biomédical - Pharma
- Construction et travaux publics
- Électronique - Photonique
- Énergies
- Environnement - Sécurité
- Génie industriel
- Ingénierie des transports
- Innovation
- Matériaux
- Mécanique
- Mesures - Analyses
- Procédés chimie - Bio - Agro
- Sciences fondamentales
- Technologies de l'information

**Pour des offres toujours plus adaptées à votre métier,  
découvrez les offres dédiées à votre secteur d'activité**

Depuis plus de 70 ans, Techniques de l'Ingénieur est la source d'informations de référence des bureaux d'études, de la R&D et de l'innovation.

[www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)

**CONTACT :** Tél. : + 33 (0)1 53 35 20 20 - Fax : +33 (0)1 53 26 79 18 - E-mail : [infos.clients@teching.com](mailto:infos.clients@teching.com)

# LES AVANTAGES ET SERVICES compris dans les offres Techniques de l'Ingénieur

ACCÈS



### Accès illimité aux articles en HTML

Enrichis et mis à jour pendant toute la durée de la souscription



### Téléchargement des articles au format PDF

Pour un usage en toute liberté



### Consultation sur tous les supports numériques

Des contenus optimisés pour ordinateurs, tablettes et mobiles

SERVICES ET OUTILS PRATIQUES



### Questions aux experts\*

Les meilleurs experts techniques et scientifiques vous répondent



### Articles Découverte

La possibilité de consulter des articles en dehors de votre offre



### Dictionnaire technique multilingue

45 000 termes en français, anglais, espagnol et allemand



### Archives

Technologies anciennes et versions antérieures des articles



### Impression à la demande

Commandez les éditions papier de vos ressources documentaires



### Alertes actualisations

Recevez par email toutes les nouveautés de vos ressources documentaires

\*Questions aux experts est un service réservé aux entreprises, non proposé dans les offres écoles, universités ou pour tout autre organisme de formation.

## ILS NOUS FONT CONFIANCE



[www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)

**CONTACT :** Tél. : + 33 (0)1 53 35 20 20 - Fax : +33 (0)1 53 26 79 18 - E-mail : [infos.clients@teching.com](mailto:infos.clients@teching.com)