

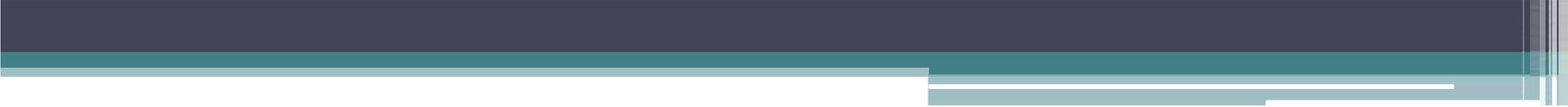
BIOTECHNOLOGIE

COURS 2:
BIOCATALYSEURS

BIOCATALYSEURS

SOMMAIRE

1. Généralités
2. Enzymes,
3. Immobilisation des enzymes
4. Applications industrielles



1. Généralités

Catalyse et catalyseurs

- Une ***catalyse*** est un processus chimique qui consiste en l'accélération cinétique d'une réaction chimique grâce à une substance appelée **catalyseur**, qui ne subit pas de transformation et qui agit très rapidement et à concentration très faible.
- Un **catalyseur** est une espèce, qui en petite quantité, augmente la vitesse d'une réaction sans figurer dans l'équation de la réaction et sans modifier la composition du système à l'état final.
- Une substance qui inactive la catalyse est un inhibiteur.

- Un catalyseur est une espèce qui accélère une réaction et que l'on retrouve non transformée chimiquement en fin de réaction.
- il ne figure pas dans l'équation de la réaction qu'il catalyse.
- il peut être recyclé.
- il agit en quantité très faible.
- il ne modifie pas les conditions thermodynamiques mais seulement cinétiques.
- il abaisse l'énergie d'activation : rôle du catalyseur
- sous l'effet d'un catalyseur, la constante de vitesse k augmente.

Loi d'Arrhenius $\ln k = \ln A - E_a/RT$

- on peut travailler à une température plus faible.
- il est en général sélectif : il accélère sélectivement une réaction quand plusieurs réactions sont possibles.

Biocatalyse et biocatalyseurs

- La **biocatalyse** ou **catalyse enzymatique** est le processus par lequel des réactions chimiques sont catalysées dans les systèmes vivants par essentiellement des protéines spécialisées ou des ARN appelés enzymes.
- La catalyse enzymatique est indispensable aux organismes vivants pour l'accélération spécifique des réactions nécessaires à leur métabolisme et à la biosynthèse de l'ensemble des biomolécules qui les composent.
- Un **biocatalyseur** désigne une macromolécule naturelle qui accélère une réaction biochimique.
- Les catalyseurs biologiques naturels sont: les **enzymes**, les ribozymes, les abzymes, les vitamines, les hormones, les oligoéléments ...

Les enzymes:

Substance organique produite par des cellules vivantes, qui agit comme catalyseur dans les changements chimiques.

Les enzymes favorisent les réactions chimiques de la digestion

Les rybozimes:

Molécule d'ARN capable d'assembler des morceaux d'ARN selon les processus habituels aux enzymes.

Les abzymes:

anticorps ayant des propriétés catalytiques

Les vitamines:

Substances organiques, sans valeur énergétique, mais indispensables à l'organisme, apportée en petite quantité par l'alimentation.

Vitamine A (de croissance), C (antiscorbutique), D (antirachitique), E (de reproduction).

Les hormones:

Substances chimiques élaborées par un groupe de cellules ou une glande endocrine et qui exercent une action spécifique sur le fonctionnement d'un organe.

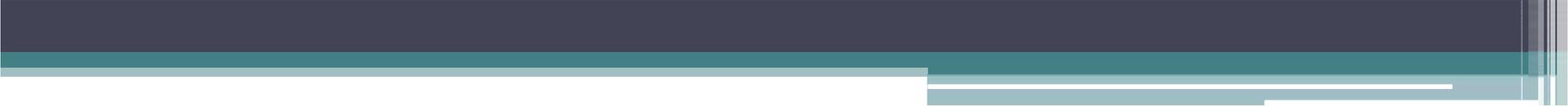
Hormones de croissance.

Les oligoéléments

Éléments chimiques présents en très faible quantité dans l'organisme, indispensables au métabolisme (ex. le fer, le magnésium).



2. Les enzymes

- 
- Les **enzymes** sont des protéines, cad des polymères d'acides aminés formant de longues chaînes repliées dans l'espace.
 - La majorité des enzymes sont des protéines ou des glycoprotéines
 - On distingue:
 - ✓ **hétéroenzymes** (ou hétéroprotéines) qui comportent des éléments non protéiques
 - ✓ **holoenzymes** (ou holoprotéines) qui n'utilisent pas ces éléments non protéiques,

▪ Ces éléments non protéiques sont des **cofacteurs**, il en existe deux groupes :

➤-des **ions métalliques** (le plus souvent bivalents) : Mg^{2+} , Zn^{2+} , etc.

ces cofacteurs jouent un rôle dans la stabilisation de la structure de l'enzyme ou dans la fixation du substrat.

➤-des **coenzymes** : ce sont des molécules organiques non protéiques bien plus petites que les monomères protéiques. Ils comportent généralement dans leur structure des hétérocycles (cycle mixtes à base de carbone et d'azote)

Les complexes multienzymatiques

Certaines enzymes peuvent s'associer entres-elles pour former des complexes multienzymatiques

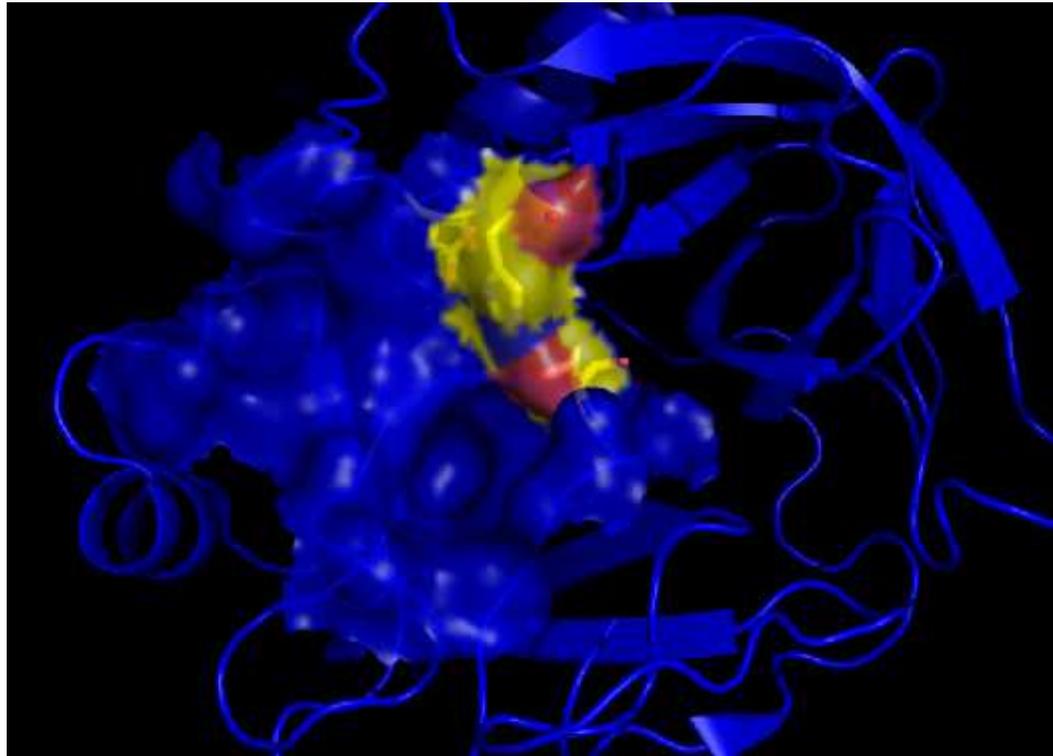
- Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1000 kDa.
- L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la **structure primaire** des enzymes
- Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des **arrangements secondaires** en hélices α et en feuilletts β ; cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes.
- L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une **structure tertiaire** qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures.

Une **structure quaternaire** peut être décrite pour les très grosses enzymes. Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier via une région distincte de l'enzyme, appelée le **site actif**.

Nature du site actif

- Le «**site actif**» d'une enzyme est la région tridimensionnelle qui se lie au substrat.
- Les sites actifs sont des cavités de caractère non polaire et dans lesquelles les substrats s'insèrent.
- Le site actif consiste d'au moins deux parties fonctionnelles, qui peuvent ou non être voisines sur la chaîne polypeptidique (si non, la structure tertiaire les amène près l'une de l'autre):
 - *le site de reconnaissance du substrat* est constitué de certains acides aminés qui sont associés avec l'orientation du substrat, et donc, avec la spécificité de l'enzyme
 - *le site catalytique* est constitué des résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liens chimiques.

Ces résidus sont souvent localisés dans le fond de la cavité, et dans la majorité des cas, possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives.



Site actif de la trypsine

La surface de la cavité du site actif est montrée, avec en jaune, les résidus catalytiques. Une poche profonde est visible au centre, c'est elle qui permet la reconnaissance de l'acide aminé du substrat, en aval duquel se produit la coupure catalysée par l'enzyme

- les enzymes présentent une double spécificité :

- ***spécificité d'action***

- ***spécificité de substrat.***

- Les modalités de leur action reposent sur la formation du complexe enzyme-substrat.

- Les propriétés des enzymes dépendent de leur structure spatiale.

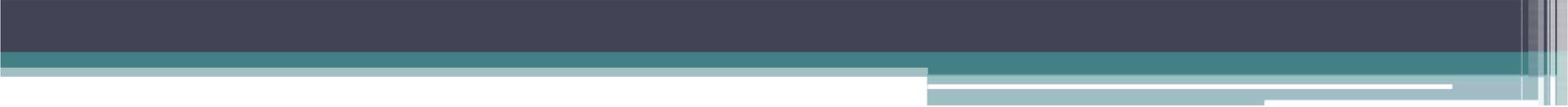
Des modifications de cette structure, déterminées:

- ✓ soit par des changements de la séquence des acides aminés,

- ✓ soit par des conditions du milieu (pH, température, ions...),

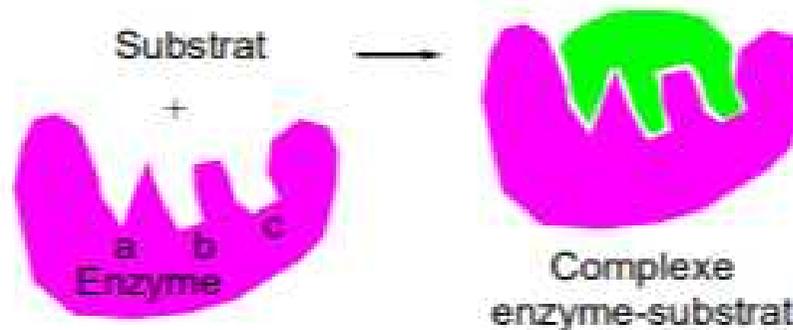
modifient leur activité.

- L'activité des enzymes contribue à la réalisation du phénotype.

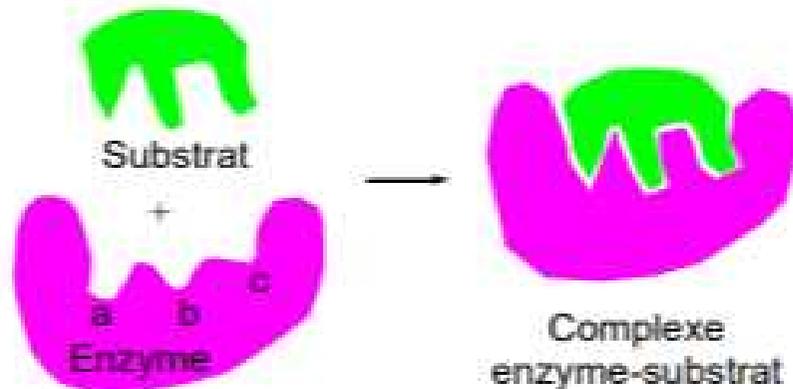
- 
- Certains enzymes sont extrêmement spécifiques et ne fonctionneront que sur un seul et unique réactif (substrat); d'autres ont un large spectre et fonctionnent sur une structure partagée par de nombreuses molécules qui peuvent toutes lui servir de substrat

- ❖ Deux modèles pour expliquer la spécificité des enzymes:

Clé-serrure: la forme du site actif est complémentaire à celle du substrat



Forme induite: l'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat.



Nature des interactions substrat-enzyme

- Les substrats sont liés aux enzymes par des interactions faibles:
 - constantes d'association de 10^{-2} à 10^{-8} M
 - l'enthalpie libre, ΔG d'interaction entre -3 et -12 kcal/mol (vs. -50 à -110 kcal/mol pour des liens covalents).
 - La liaison du substrat au site actif implique souvent de nombreuses liaisons non-covalentes de types :
 - ✓ van der Waals
 - ✓ électrostatiques
 - ✓ ponts hydrogènes

Ces 3 types de liaisons diffèrent dans leurs contraintes géométrique, force et spécificité. De plus, elles sont profondément affectées (de manière différente) par la présence d'eau.

Classification des enzymes

- Les enzymes sont classées en fonction de leur activité catalytique.
- Une nomenclature a été proposée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie divisant les enzymes en 6 classes.

- **Tableau 1: Différentes classes des enzymes**

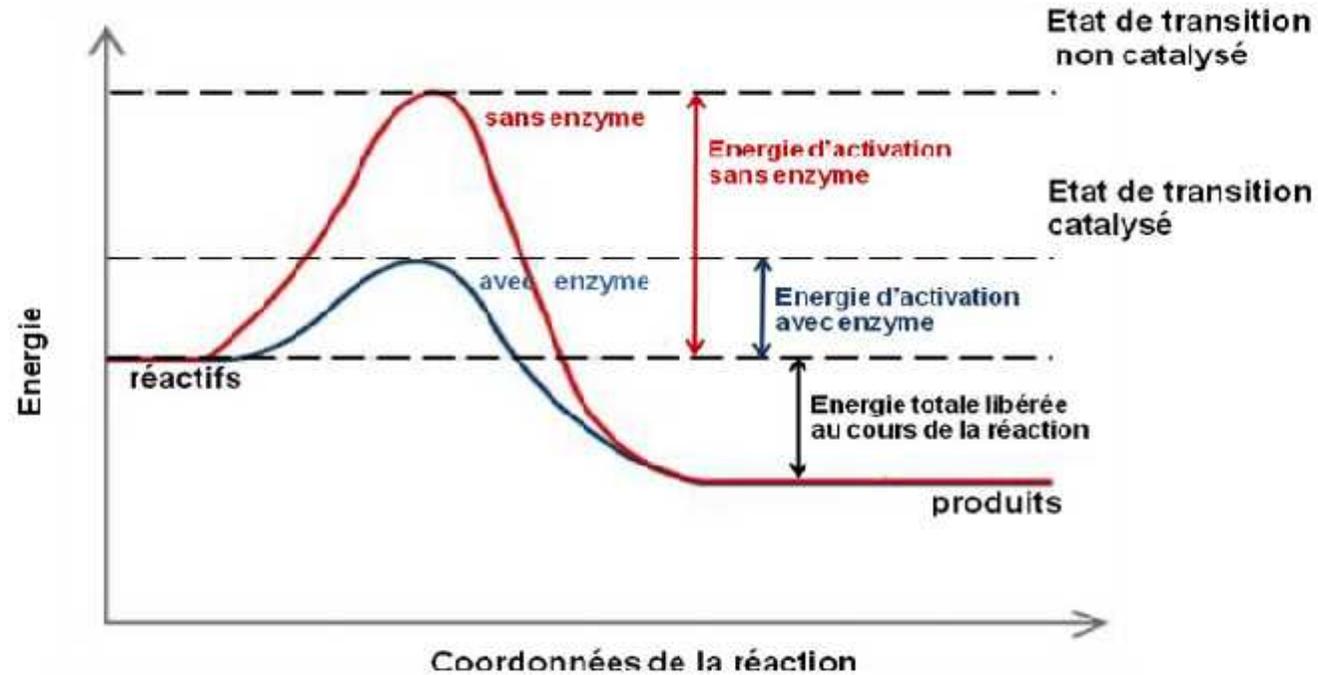
E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isoméras	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

Selon les réactions catalysées, les enzymes peuvent être classées dans six (6) grandes catégories:

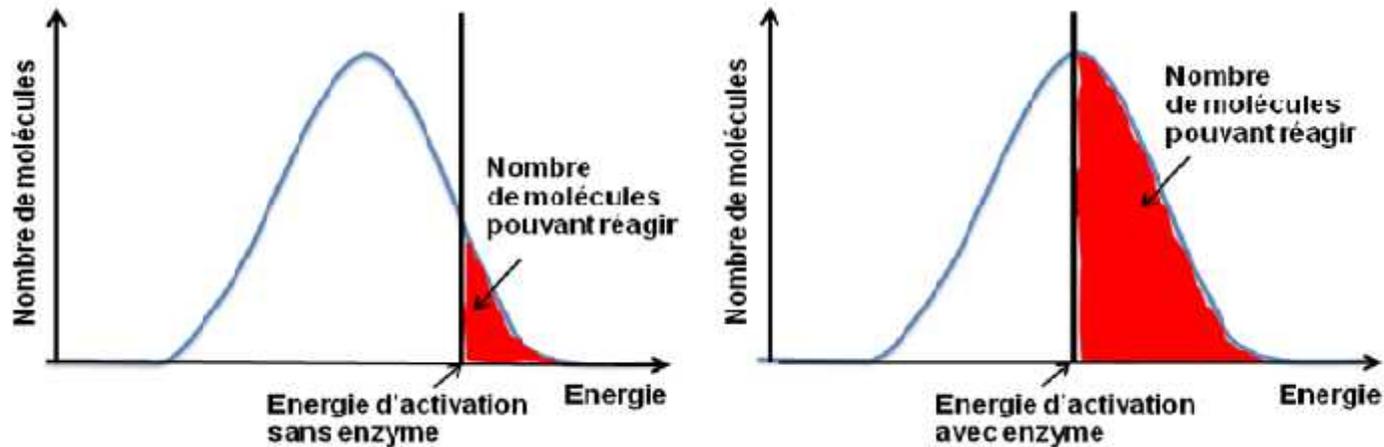
1. **Oxydoréductases**- qui catalysent des transferts d'électrons et de protons d'un donneur à un accepteur
2. **Transférases**- qui catalysent les transferts de groupements
3. **Hydrolases**- qui catalysent des réactions d'hydrolyse (coupure des liens C-C, C-O, C-N et autres par de l'eau)
4. **Lyases**- qui catalysent l'addition de groupes à des liens doubles ou l'inverse
5. **Isomérases**- qui catalysent le transfert de groupes dans une même molécule pour produire des formes isomères (ex. conversion d'un acide aminé L en acide aminé D)
6. **Ligases**- qui forment des liens C-C, C-S, C-O et C-N lors de réactions de condensation couplées à l'utilisation d'ATP

- Chaque **classe** est divisée en **sous-classe** et chaque sous-classe en **sous-sous-classe**.
- Un "numéro" de classification est associé à chaque enzyme et est appelé « **EC number** ». Il se présente de la manière suivante:
- EC [numéro de la classe].[numéro de la sous-classe].[numéro de la sous-sous-classe].[numéro individuel de série dans la sous-sous classe].
- **Exemple** de la glucose oxydase: EC 1.1.3.4.
- Ce chiffre est explicité ci-dessous:
- **EC 1**: Oxydoréductase
- **EC 1.1**: Agissant sur le groupe CH-OH du donneur
- **EC 1.1.3**: Avec l'oxygène comme accepteur
- **4** Le dernier chiffre est le numéro individuel de l'enzyme

Mécanisme de La catalyse enzymatique



(a)



(b)

Définition de l'activité enzymatique

- l'activité enzymatique est défini en terme de vitesse de réaction.
- L'unité international (I.U.) est la quantité d'enzyme requis pour convertir 1 μmol de substrat en produit dans 1 min à une température et pH spécifiés et sous des conditions de saturation du substrat:
$$\text{I.U.} = 1 \mu\text{mol substrat consommé/min}$$
- L'activité spécifique d'une enzyme est l'activité catalytique par unité de masse de protéine (I.U./mg d'enzyme solide)
- Le taux de roulement « turnover number » exprime l'activité catalytique en terme d'unités par mole d'enzyme pure (au lieu de mg de protéine).

Principaux avantages des biocatalyseurs

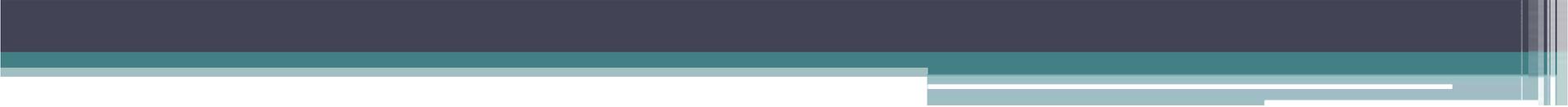
- Les enzymes présentent plusieurs groupements fonctionnels variés qui leur confèrent des propriétés de régio-, chimio- et stéréo-sélectivité.
- De plus, elles ont un facteur d'accroissement de la vitesse de réaction jusqu'à 10^{17} fois plus rapide, et catalysent jusqu'à 10^5 évènements/s

Tableau 2: Facteur d'accroissement de la vitesse de réaction pour quelques enzymes

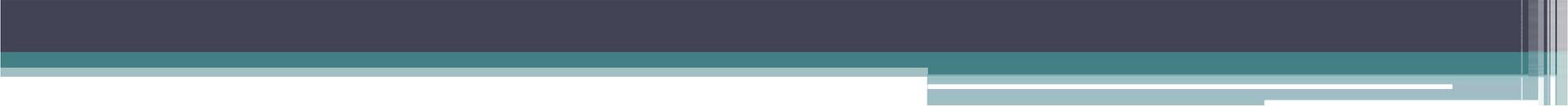
Enzymes	Facteur d'accroissement de la vitesse de réaction	Réaction mise en jeu
Chymotrypsine	10^7	protéase digestive
Lysozyme	$2 \cdot 10^8$	hydrolase acide
Uréase	10^{14}	$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$

Principaux inconvénients des enzymes

- leur coût est très élevé
- leur solubilité est limitée dans les solvants organiques.
- elles présentent une dépendance vis-à-vis d'un cofacteur ou coenzyme
- leur grande spécificité limite leur champ d'application.
- Ils montrent une instabilité importante même dans des conditions dites douces (dénaturation notamment vis-à-vis de la température, hydrolyse en présence d'acides, bases ou protéases)



3. Immobilisation des enzymes

- 
- Dans la pratique, les applications industrielles des enzymes en solution se trouvent parfois considérablement limitées
 - ✓ par leur prix de revient
 - ✓ leur relative instabilité du fait de leur nature protéique
 - ✓ sa récupération après utilisation nécessite un processus long et coûteux de purification.
 - L'enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physicochimiques en surface ou à l'intérieur du support solide afin d'augmenter sa stabilité dans le temps.
 - L'immobilisation des enzymes sur des supports solides, augmente leur stabilité opérationnelle et permet l'utilisation de réacteurs en flux continu.

Principe général de l'immobilisation

- **L'ultrafiltration**

- C'est une des méthodes qui permet la réutilisation des enzymes, mais il semble que celle qui a donné naissance aux plus grands développements consiste à rendre l'enzyme insoluble par un traitement physique ou chimique convenable afin d'éviter une perte d'activité biologique importante.

La combinaison des 2 méthodes assure une meilleure fixation de l'enzyme.

- **La rétention physique**

- ✓ Exploite la grande différence de taille entre l'enzyme et le substrat
- ✓ Peut être un **réseau**, une **capsule** ou une **membrane**

- **Le traitement chimique:** se réalise par

- ✓ Simple interaction ionique
- ✓ Création d'une vraie liaison covalente

Présente l'avantage de stabiliser l'enzyme et de permettre une utilisation prolongée

Propriétés des enzymes immobilisées

❑ Propriétés physicochimiques

- ✓ L'amélioration de la stabilité de l'enzyme dans le temps
- ✓ La résistance vis-à-vis de la dénaturation

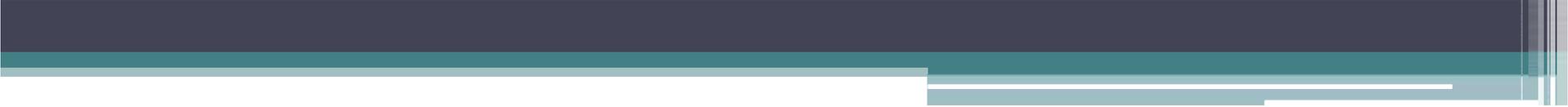
La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend du micro-environnement imposé par le support.

On distingue 3 types de stabilité pour une enzyme immobilisée

- Stabilité de stockage
- Stabilité opérationnelle
- Stabilité thermique

Propriétés cinétiques

- L'immobilisation des enzymes affecte considérablement leur propriétés
- L'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique
- les phénomènes de diffusion qui limitent l'accès du substrat au site actif



Intérêt de l'immobilisation

❑ **Stabilité**

- Liée à une diminution du degré de liberté de la macromolécule et donc à une diminution des variations conformationnelles de l'enzyme
- Due à une augmentation de la concentration de la l'enzyme locale

❑ **Fonctionnement catalytique continu**

- les applications préparatoires avec les réacteurs
- Les développements analytiques avec les biocapteurs

❑ **Localisation de catalyseur**

Il est simple de séparer le catalyseur et les réactants au cours ou en fin de processus

❑ **Modulation du microenvironnement des enzymes**

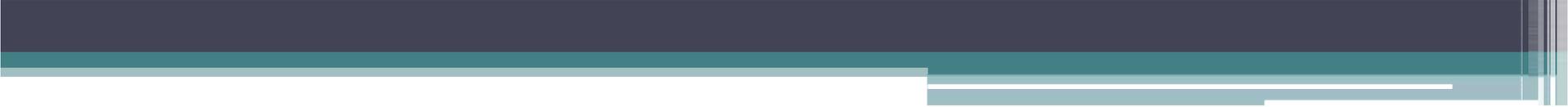
Charge, groupement hydrophobes, concentration locale des substrats et effecteurs.

❑ **Intérêt économique**

Conduit à un abaissement des coûts de revient de la production du produit recherché de façon considérable

❑ **Intérêt technologique**

Conduit à un meilleur suivi et contrôle de la réaction catalytique



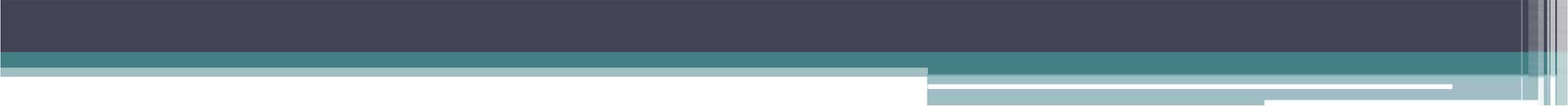
Choix de la technique

dépend de:

- ✓ type de l'enzyme,
- ✓ Transducteur et environnement du biocapteur,
- ✓ Stabilités mécaniques et chimiques de la matrice
- ✓ Coût de la matrice
- ✓ Application finale de l'enzyme

Enzymes immobilisées

Avantages	Inconvénients
Récupération et réutilisation des enzymes	Coût des supports
Adaptées aux opérations en continu	Problèmes de dénaturation
Produit final exempt d'enzymes	Réduction de l'activité (contraintes stériques, diffusionnelles)
Augmentation de la stabilité	



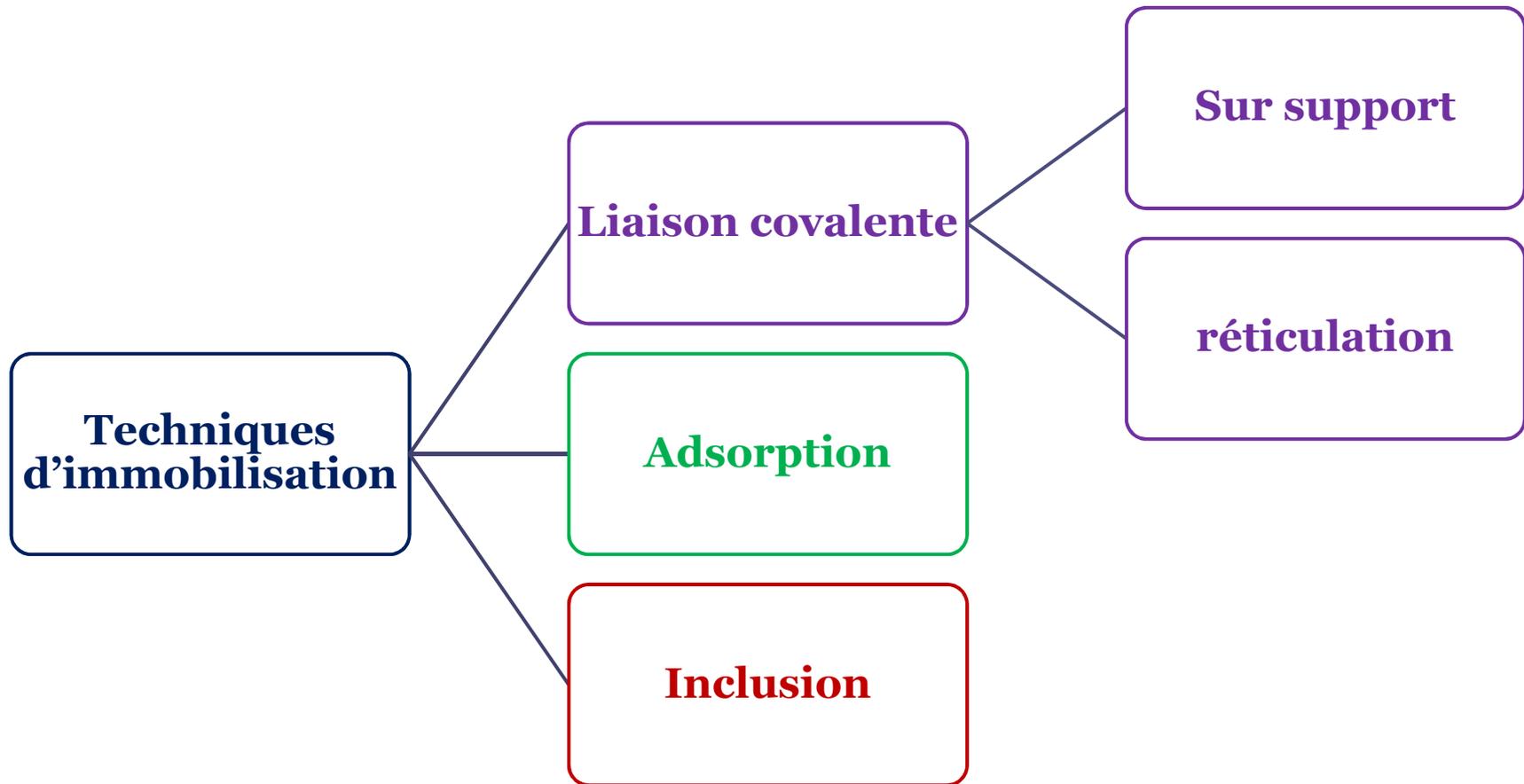
Principales techniques d'immobilisation

Il existe cinq méthodes générales d'immobilisation des enzymes.

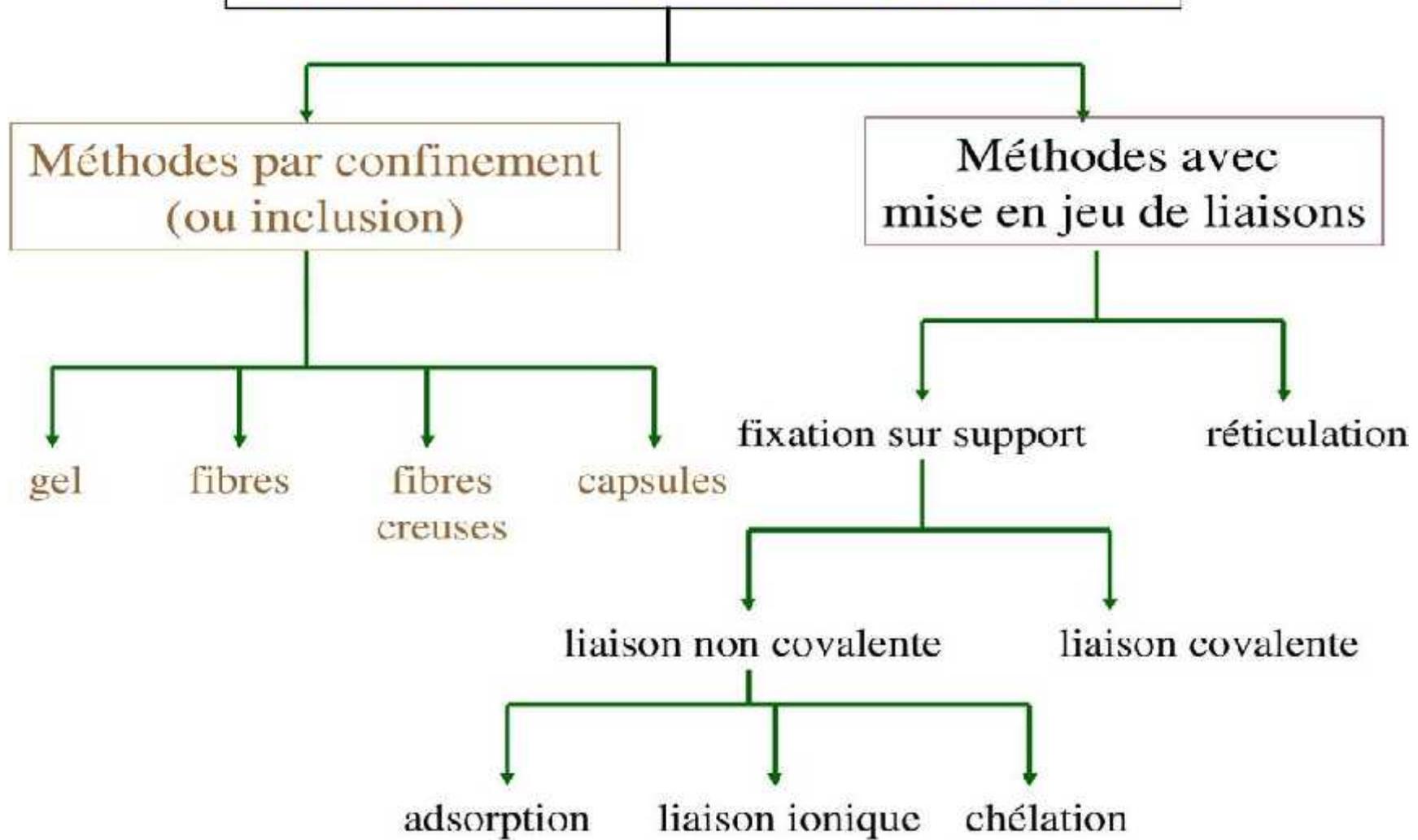
Principales techniques d'immobilisation

Ce sont l'**adsorption**, la **microencapsulation**, l'**inclusion**, la **réticulation** et la **fixation chimique sur un support insoluble**.

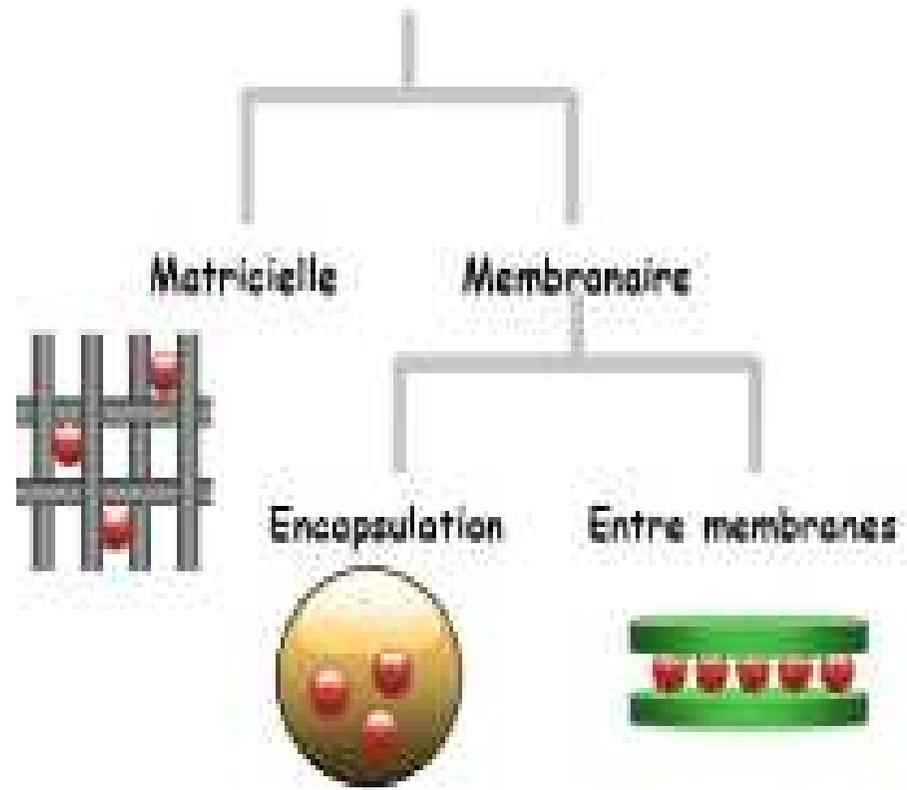
Toutes ces méthodes opèrent en milieu aqueux tamponné.



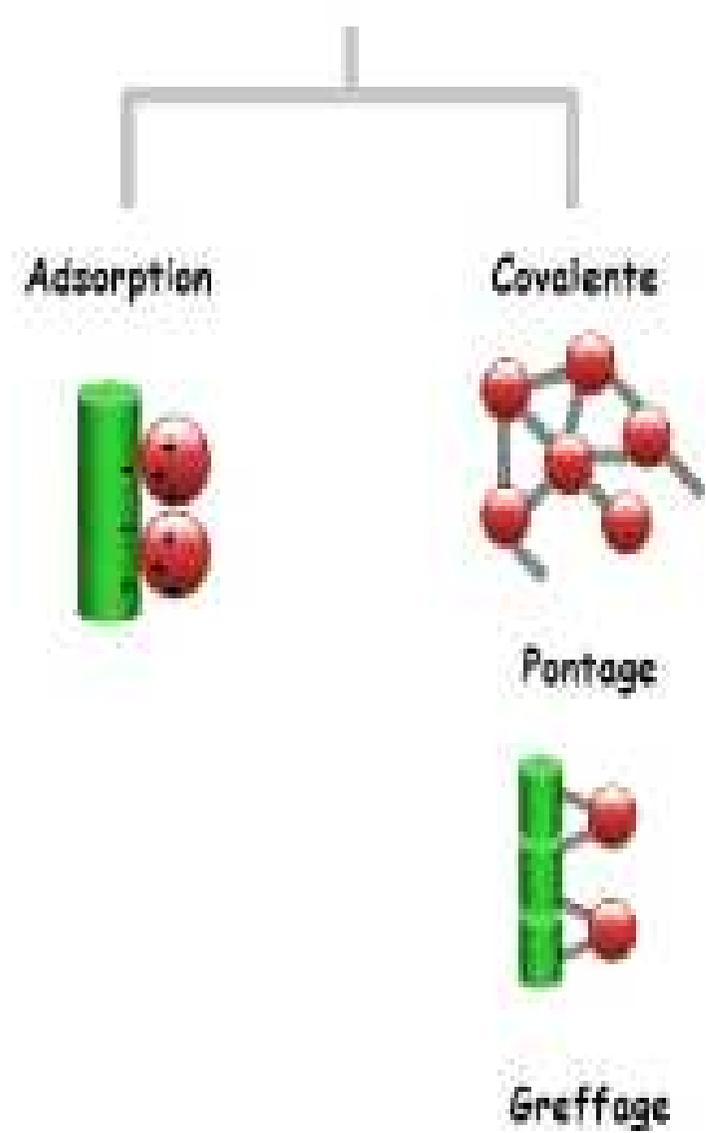
Méthodes d'immobilisation des enzymes

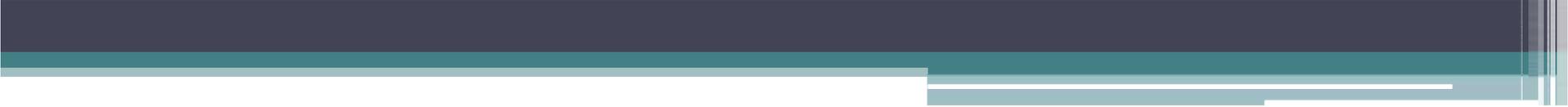


Inclusion

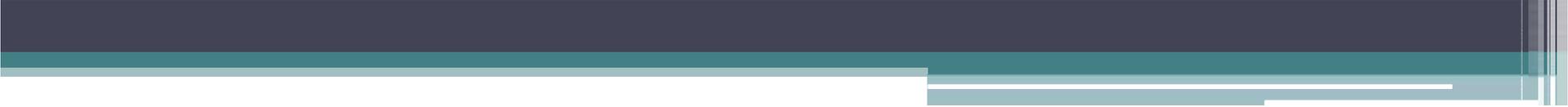


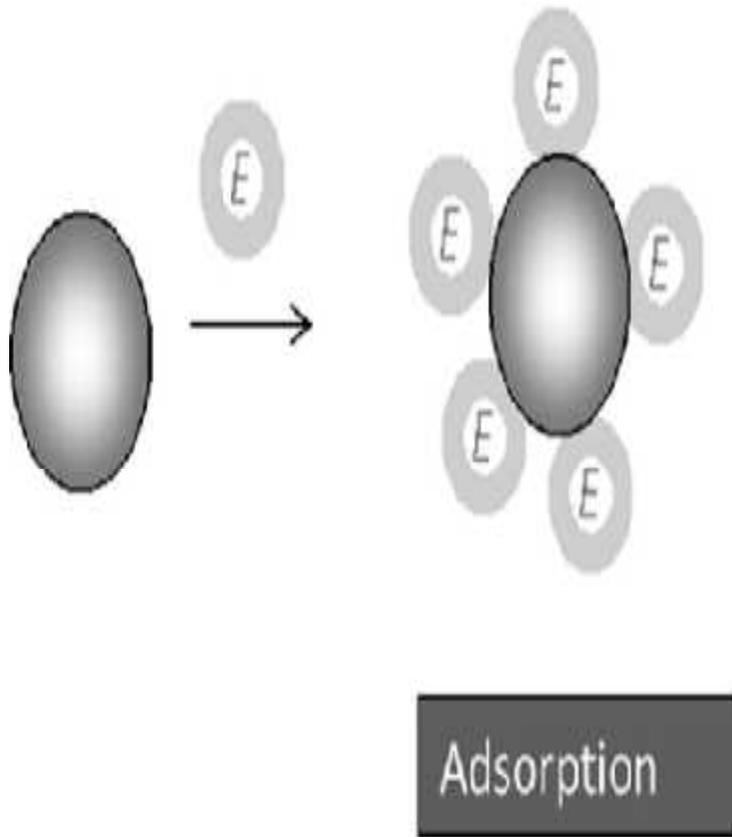
Fixation





3.1 Immobilisation par adsorption

- 
- la méthode la plus économique,
 - l'enzyme est retenu à la surface d'un corps adsorbant, minéral ou organique, grâce à des liaisons de type Van der Waals et des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles).
 - Les supports adsorbants utilisés sont très variés, selon
 - leur structure chimique
 - leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité, etc.).



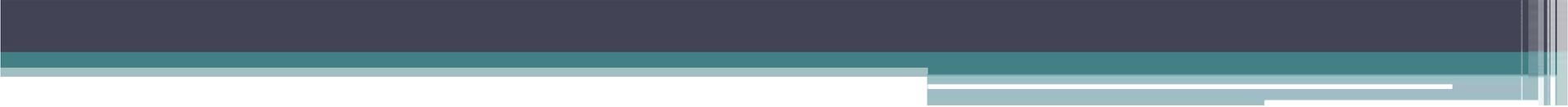
L'interaction enzyme-support pourra impliquer l'ensemble des liaisons non covalentes ou secondaires de bas niveau énergétique :

- les liaisons de Vander Waals, -
- les liaisons hydrogène,
- les liaisons ioniques et le transfert de charge.

Parmi les adsorbants:

- **Adsorbants organiques:**
- **polyosides** (acétate de cellulose et ses dérivées, nitrate de cellulose, dextrane, agarose, alginate, collagène)
- **polymères** (polystyrène, polyéthylène, résines échangeuses d'ions.)

- **Adsorbants inorganiques:**
- **argile**, la kaolinite,
- **verre poreux et silice poreuse**, le quartz,
- **oxydes et des sels minéraux**,

- 
- Les quantités d'enzyme immobilisées par adsorption sont extrêmement variables et sont fonction de la nature du support.
 - Les adsorbants inorganiques sont généralement plus stables, résistent à l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries mais la fixation covalente sur ces support est difficile à cause de leurs faible réactivité

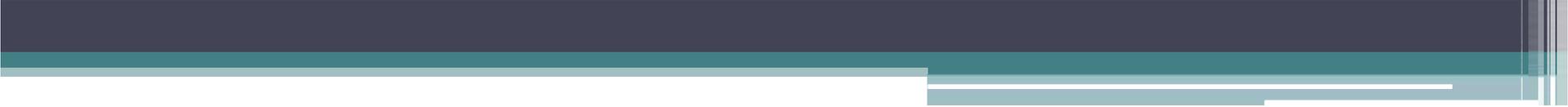
Avantages et inconvénients de l'immobilisation par adsorption

• **Avantages**

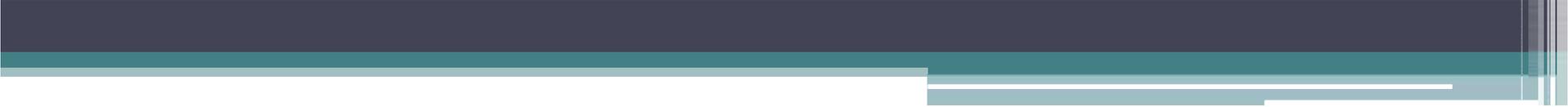
- Très grande facilité de mise en œuvre.
- Possibilité de régénérer les complexes enzyme-support (si l'enzyme perd son activité en cours de son fonctionnement, il est possible de la désorber et de la remplacer par une préparation active)
- Fixation rapide du support et immobilisation simple et non dénaturante.

▫ **inconvénients**

- Malgré sa simplicité de mise en œuvre, elle demeure peu utiliser pour la conception des bioréacteurs (risque de désorption)
- La fragilité de la fixation (les enzymes peuvent facilement se désorber sous l'action de variation de pH, température...)
- L'orientation de l'enzyme et mauvaise accessibilité au site actif.



3.2 Immobilisation par inclusion



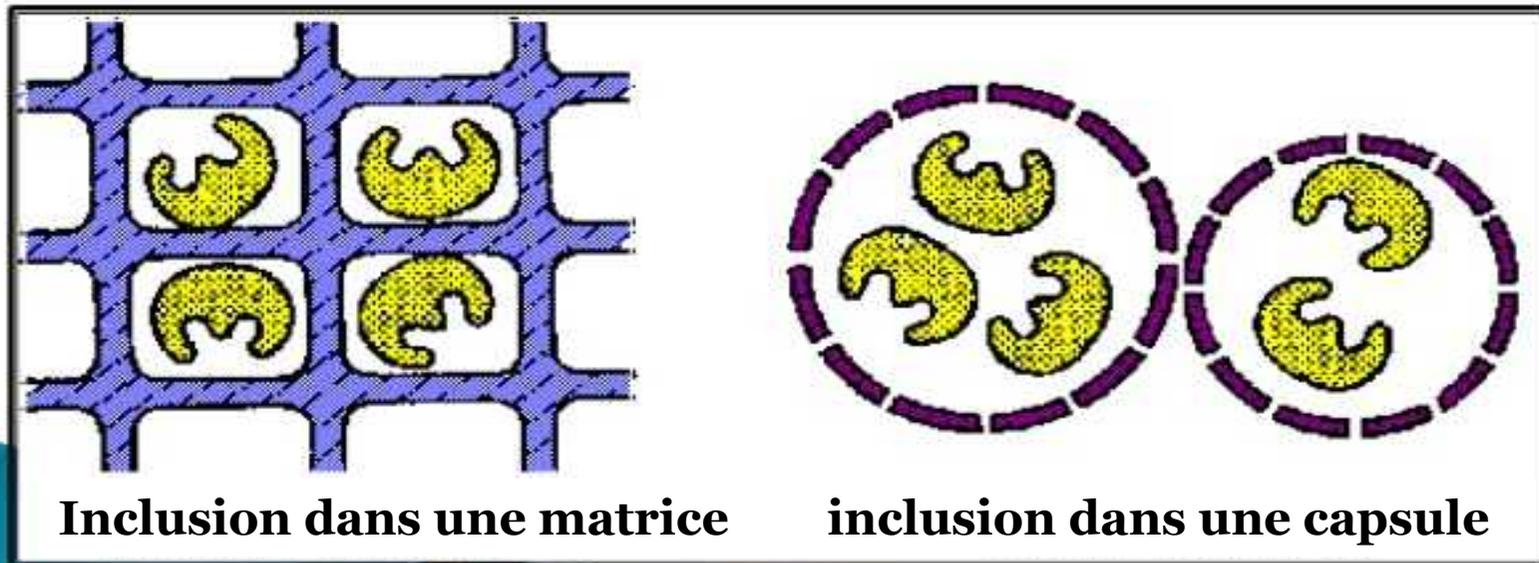
Les enzymes sont:

retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau « **réseau tridimensionnel d'une matrice** »,

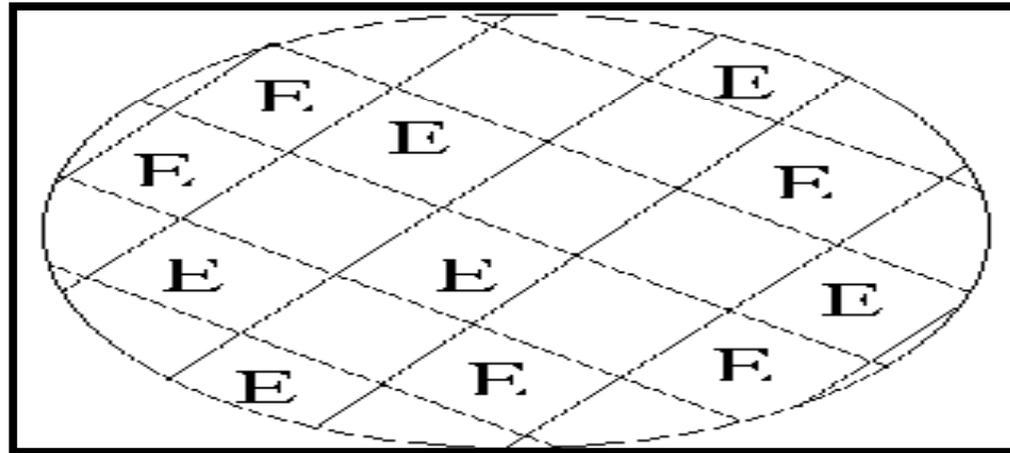
Ou

emprisonnées dans des **microcapsules** délimitées par une membrane semi perméable dont les pores sont suffisamment larges pour permettre le passage des molécules du substrat ou des produits de la réaction

- **Inclusion dans un gel:** gel polyacrylamide, gel polyvinyl, gel alcool
- **Inclusion dans les fibres:** cellulose, gel polyacrilamide
- **Inclusion dans des microcapsules:** polyamine, monomères acide chlorique polybasique



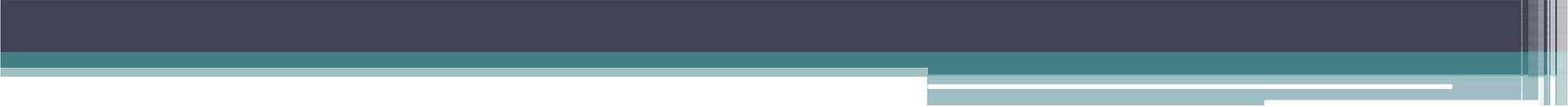
3.2.1 inclusion dans une matrice



Inclusion dans un réseau de polymère insoluble.

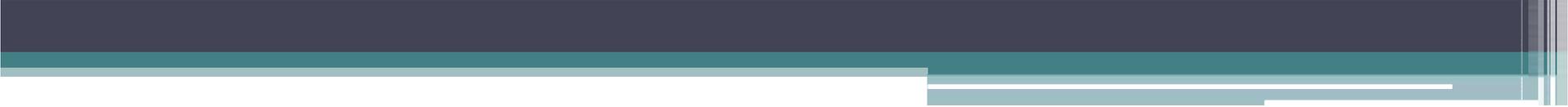
Principe

- **L'enzyme est dissoute** dans une solution aqueuse d'un **monomère acrylique** (l'acrylamide, le plus souvent) et d'un **agent réticulant** (la *N,N'*-méthylène-*bis*-acrylamide).
- La polymérisation des co-monomères est ensuite effectuée à basse température afin d'obtenir un **réseau macromoléculaire tridimensionnel** dans les mailles duquel l'enzyme se trouve retenu de façon plus ou moins efficace.



A- Inclusion dans un gel

- 
- L'enzyme est incorporée dans un gel insoluble.
 - Le gel peut être constitué d'une matrice organique (polymère) ou inorganique (argiles).
 - La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif grâce à une porosité du gel suffisante.



choix du type de polymères

- Le choix dépend de :
 - ✓ **Propriétés mécaniques du gel** : compression, forces de cisaillement
 - ✓ **Propriétés chimiques** : toxicité, condition de stabilité en fonction de pH ;
 - ✓ **Propriétés physiques** : perméabilité du gel.

Parmi les gels

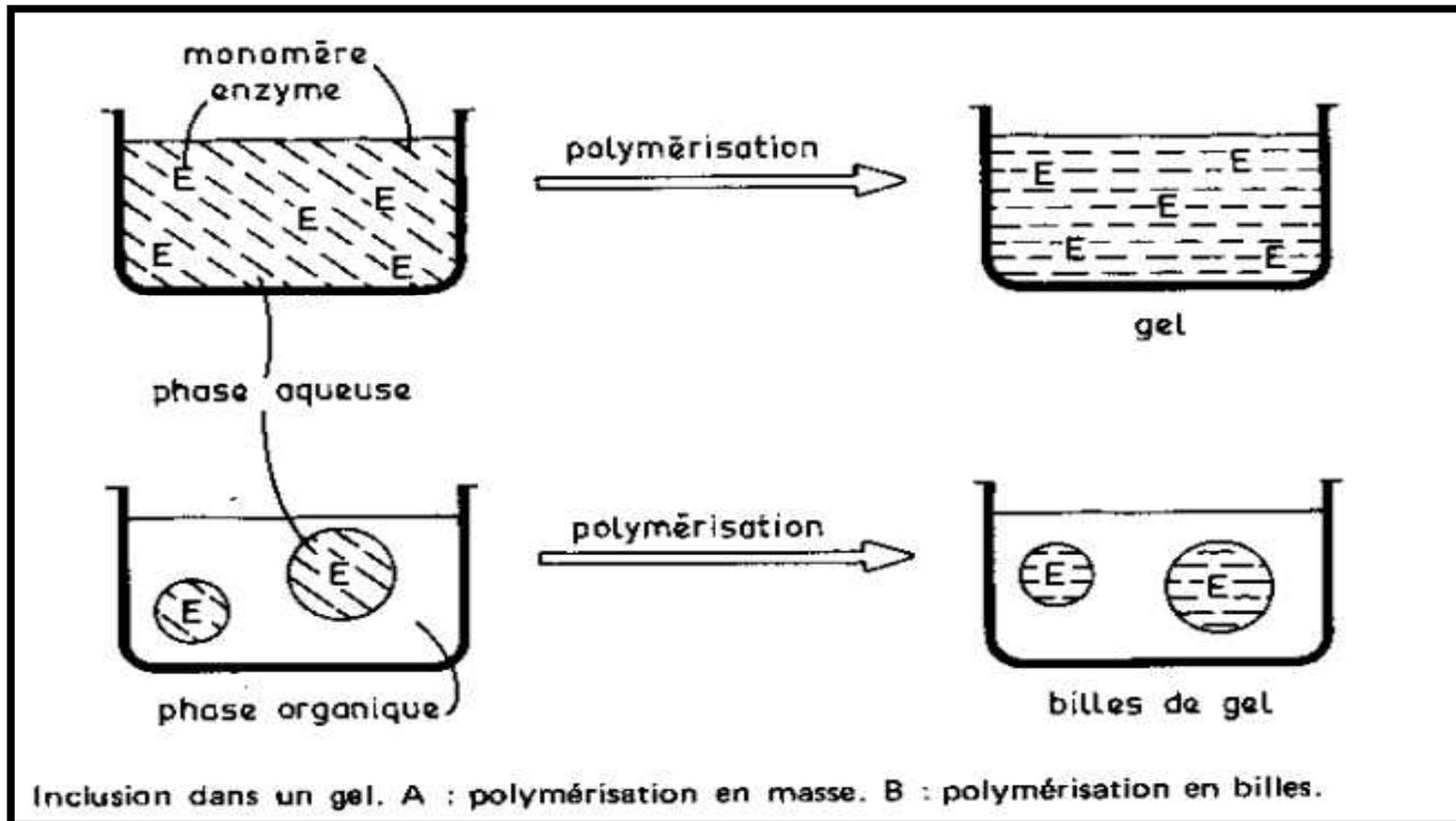
➤ Gel à partir des polymères naturels:

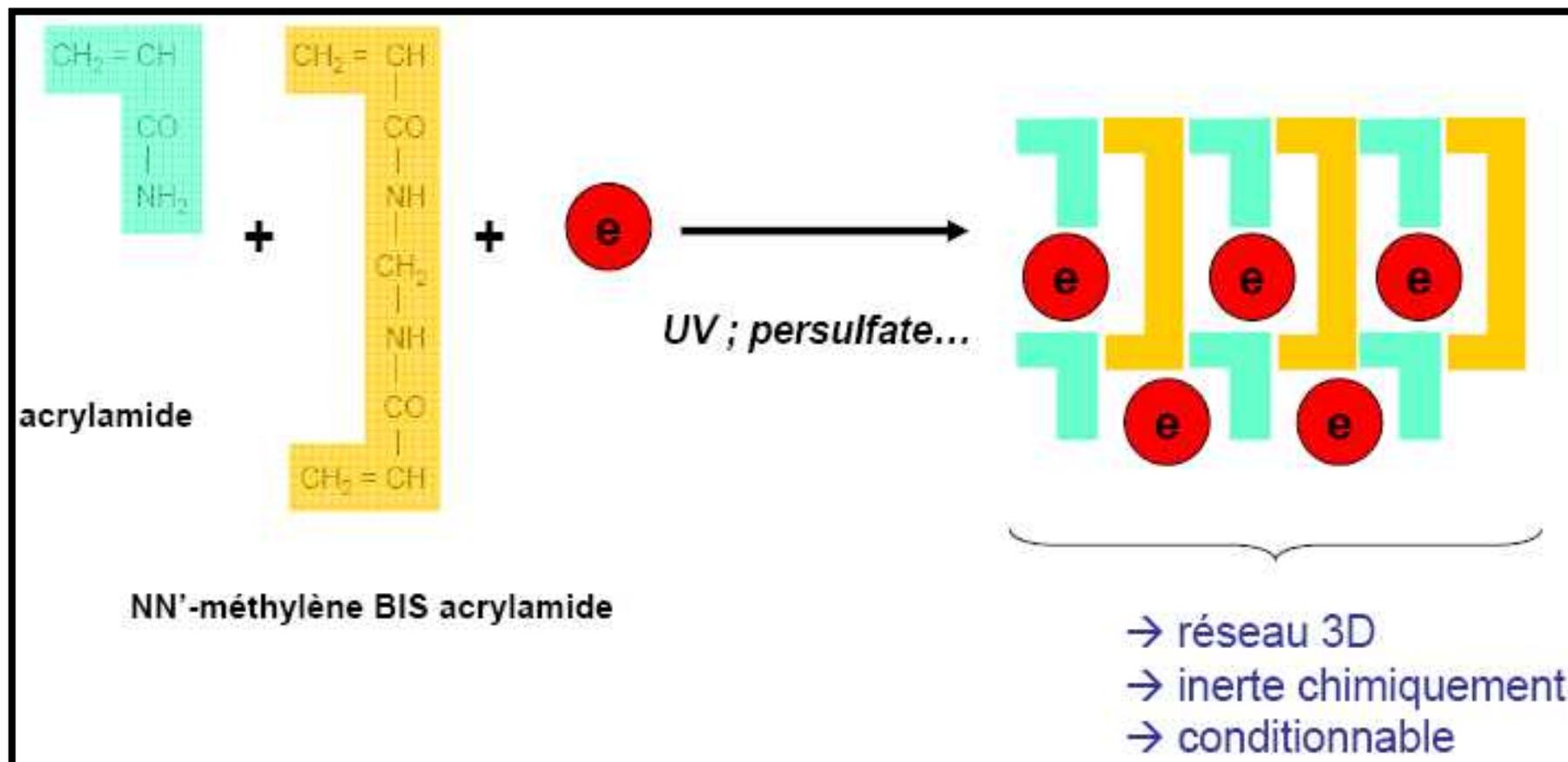
- ✓ l'alginate ,
- ✓ Carraghénane,
- ✓ Chitosane.....

➤ Gels à partir des polymères synthétiques:

- ✓ le gel de polyacrylamide.

Procédé d'inclusion dans le gel





inclusion dans le gel de polyacrilamide



B- Inclusion dans des fibres

□ inclusion dans des fibres de polyacétate de cellulose

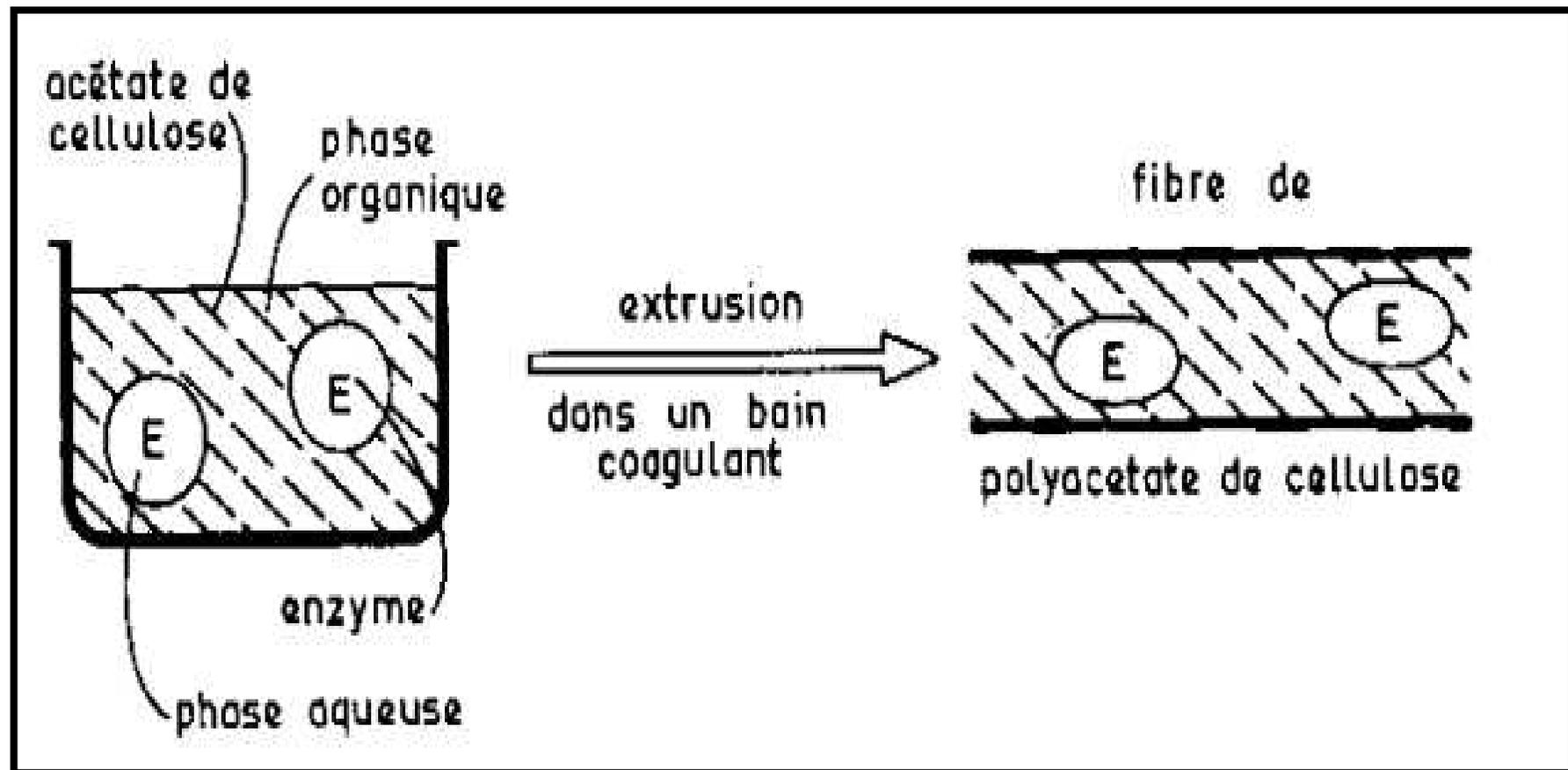
-On réalise une solution de triacétate de cellulose dans le chlorure de méthylène.

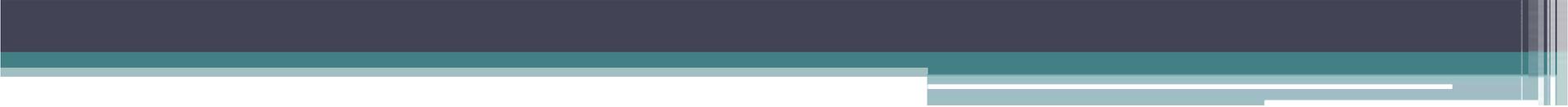
-on ajoute sous agitation une solution d'enzyme dans l'eau froide ou dans un tampon contenant de glycérol

-émulsion obtenue est ensuite extrudée sous pression d'azote dans un bain de coagulation contenant de toluène.

- la fibre obtenue est séchée sous vide pour éliminer les solvants et conserver à 5°C.

inclusion dans des fibres de polyacétate de cellulose



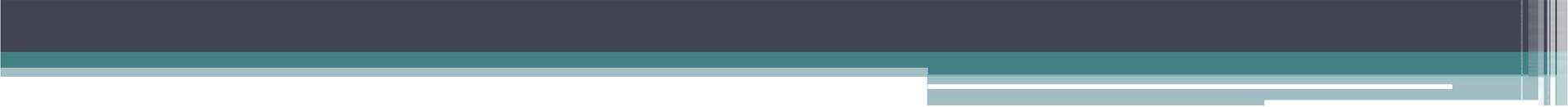


3.2.2 inclusion à l'aide d'une matrice

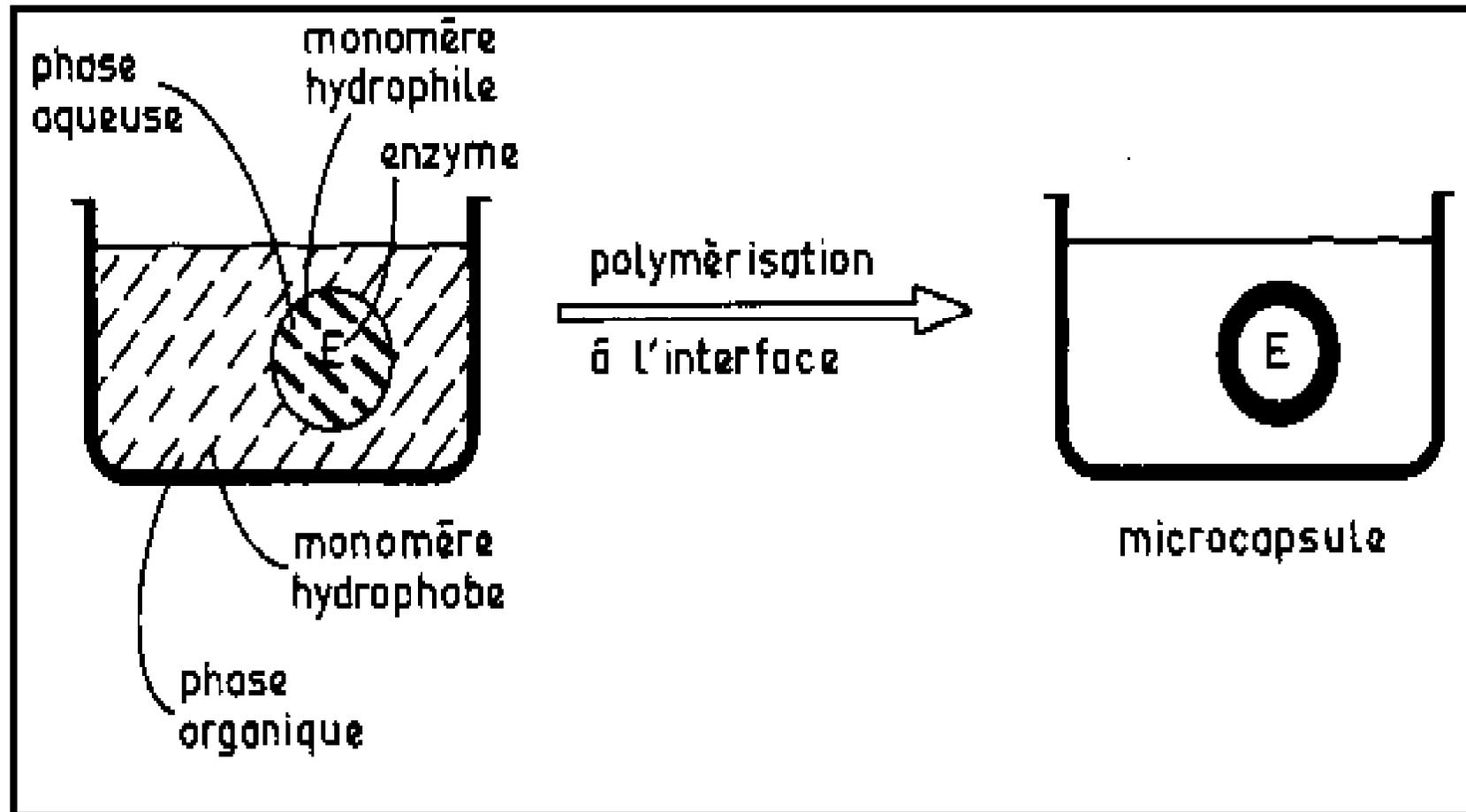


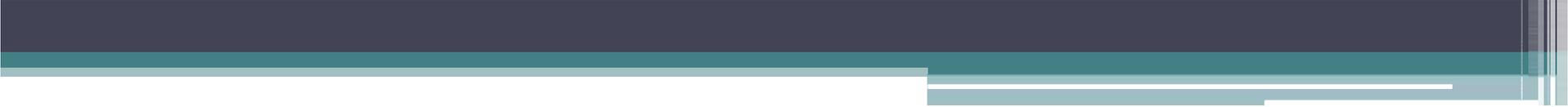
A- Inclusion dans des microcapsules

- 
- L'enzyme en solution aqueuse est enfermé dans des microcapsules sphériques, dont la paroi est une **membrane semi-perméable** qui peut être liquide ou solide.
 - Cette membrane retient l'**enzyme**, mais laisse passer le **substrat S** et le **produit P**.
 - Les microcapsules, dont le diamètre moyen est de 50 nm, peuvent être réalisées par polymérisation interfaciale.
 - Une extension de la méthode d'immobilisation par microencapsulation consiste à enfermer une solution aqueuse d'enzyme dans les cavités d'une fibre de triacétate de cellulose, par exemple.
 - Les microcapsules emprisonnant l'enzyme sont recueillies par centrifugation

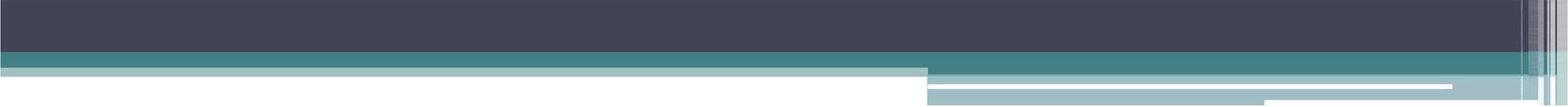
- 
- La méthode consiste à inclure l'enzyme à l'intérieur de la membrane semi-perméable obtenue en copolymérisant un monomère hydrophobe, dessous dans la phase organique, et un monomère hydrophile, dessous dans la phase aqueuse en émulsion dans la phase organique.

inclusion dans des microcapsules

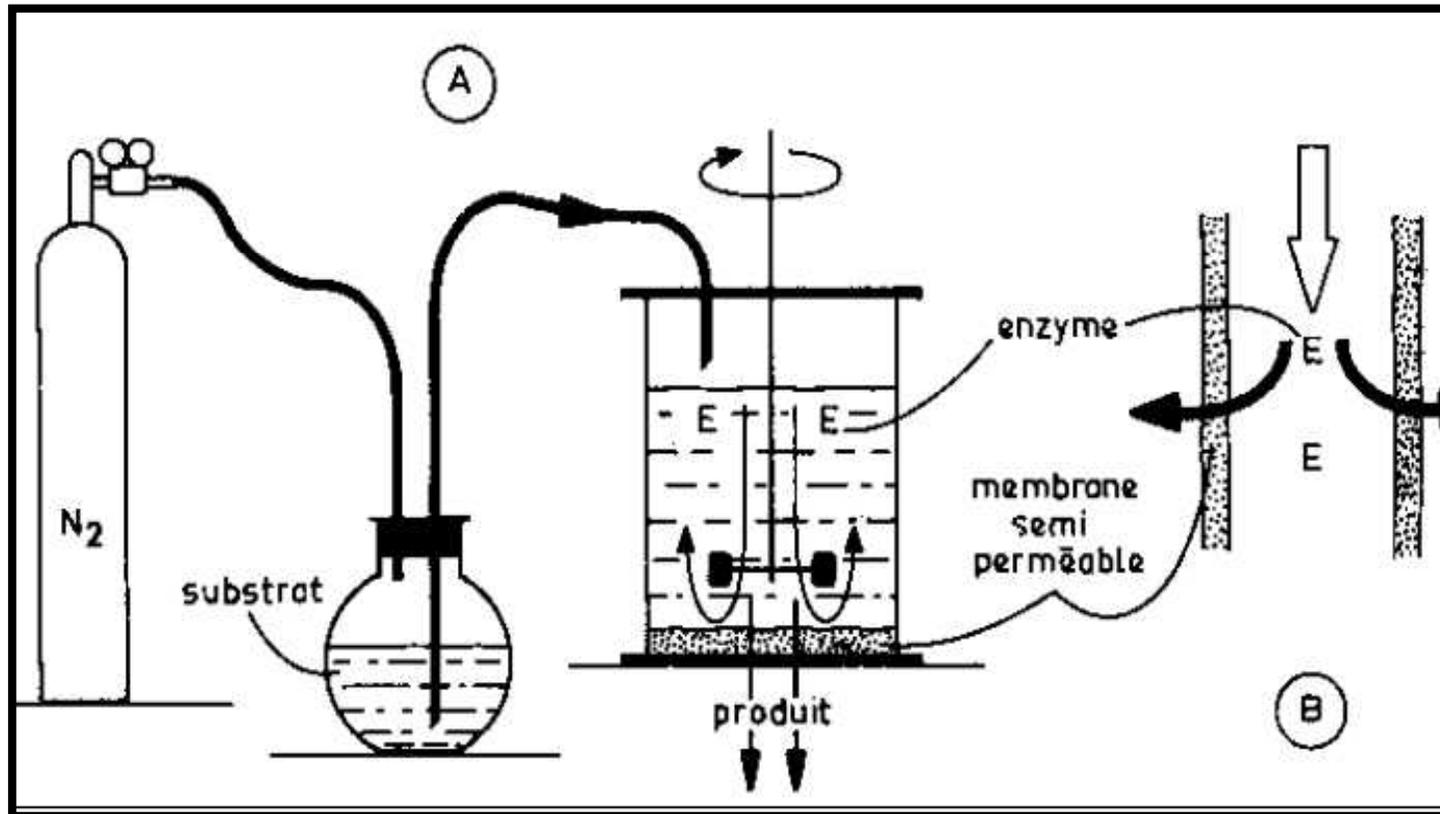




B- Inclusion dans une membrane semi- perméable

- 
- assure la rétention des molécule d'enzyme dans un volume déterminé en vue d'une utilisation continue (les hydrolase).
 - Sont utilisées dans la dégradation des macromolécules (amidon, protéine).
 - Les produits obtenus après l'hydrolyse peuvent franchir les membranes, ce que permet de les récupérer dans l'effluent

inclusion à l'aide de membrane semi-perméable
A: membranes planes, B: fibres creuses



Avantages et inconvénients de l'immobilisation par inclusion

Avantage

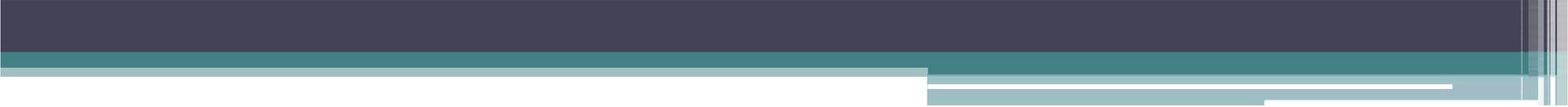
- simple et économique,
- s'appliquer à des enzymes extrêmement divers (glucose oxydase, invertase, amylase).
- Réaction de polymérisation et de gélification bien connues.
- Réaction chimiques avec l'enzyme limitée (inclusion dans des gels naturels).
- Application à toutes les enzymes (utilisation de mélanges).
- Obtention de supports de forma adaptables (films, billes, fibre...)
- Risque de fuite prévenue par réticulation du support après immobilisation

Inconvénients

- une fraction non négligeable de l'enzyme emprisonnée passe en solution (méthode est utilisable pour des substrats de petite taille (MM < 5 000).
- une dénaturation importante de l'enzyme, due à une réaction de l'acrylamide avec les groupements fonctionnels de l'enzyme.
- Certaines polymérisations font appel à des agents dénaturants ou à des radicaux.
- Problème de transfère de masse (inaccessibilité de certains substrats)
- Risque de fuite de l'enzyme (micropores)
- Propriétés mécaniques des gels insuffisantes



3.3 Immobilisation avec mise en jeu de liaisons



3.3.2 Immobilisation par liaisons covalentes



On peut diviser les méthodes d'immobilisation d'enzymes par liaison covalente en deux groupes :

A- Immobilisation par liaisons covalentes sur support

B- Immobilisation par réticulation (sans support)



3.3.1 Immobilisation par liaisons covalentes sur support

A- Immobilisation par liaisons covalentes sur support :

- Elle est réalisée par l'intermédiaire de **liaisons irréversibles et covalentes** entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support
- Ces groupes, en général insuffisamment réactif, nécessiteront une **activation préalable**. A priori, il faut **activer soit l'enzyme, soit le support**.
- l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme peut conduire à la dénaturation de l'enzyme.

L'activation du support se fait par :

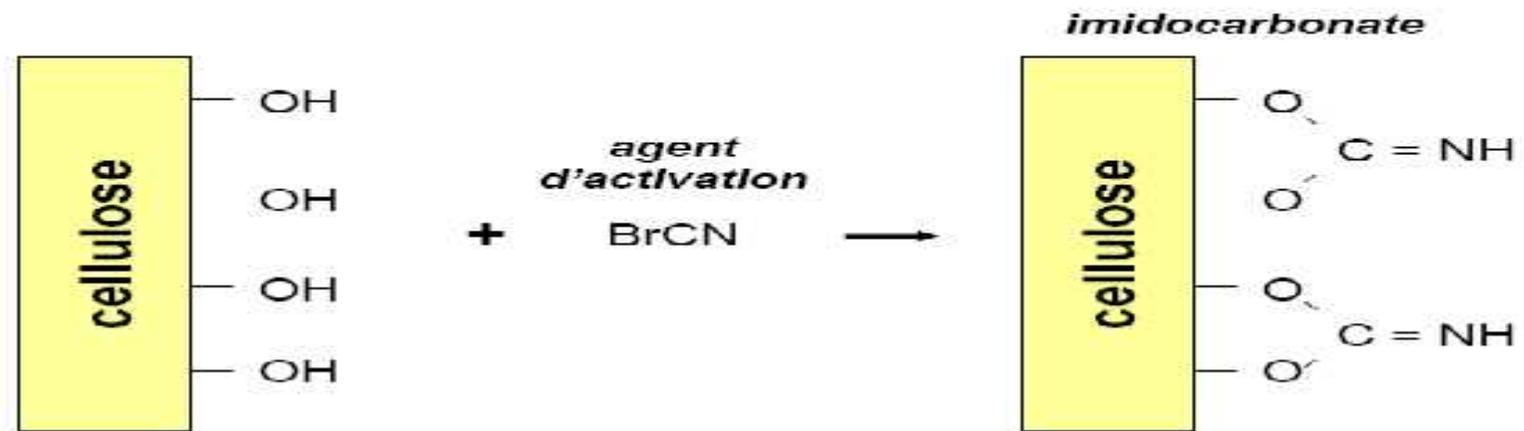
- Greffage de composé bifonctionnel (bras espaceur) qui comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions portées par l'enzymes

Ce composé permet de fixer l'enzyme à une certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat.

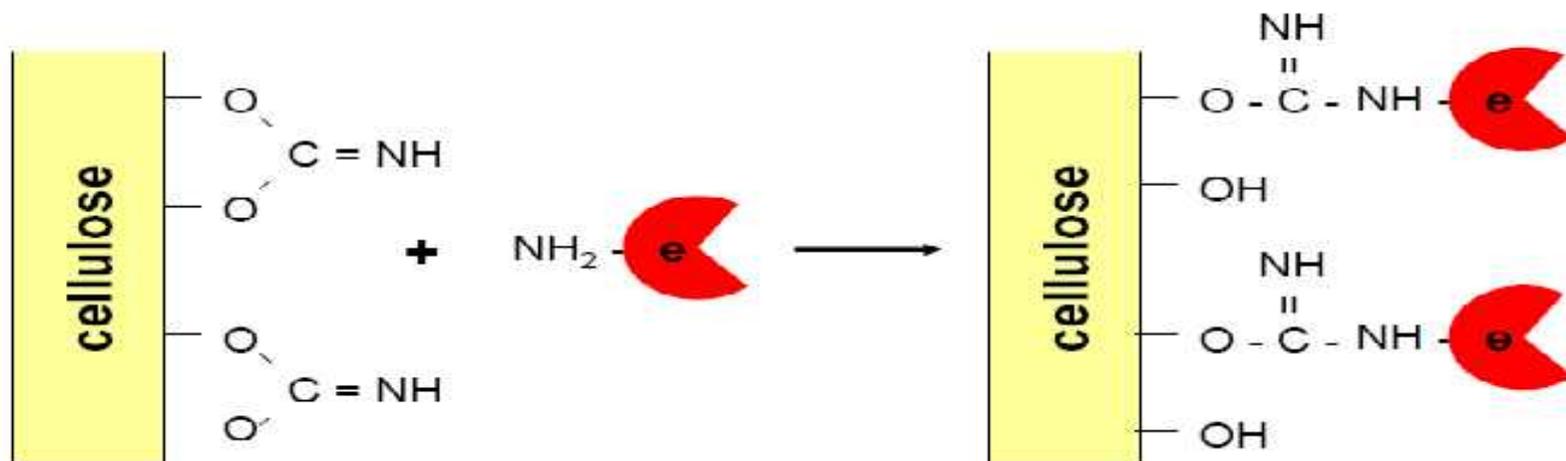
- L'apparition des fonctions chimiques réactives sur le support par réaction directe .ex: cellulose +BrCN .

exemple : immobilisation au bromure de cyanogène (BrCN)

- activation



- fixation



Immobilisation au bromure de cyanogène BrCN
étap1: activation du support , étape 2: fixation de l'enzyme

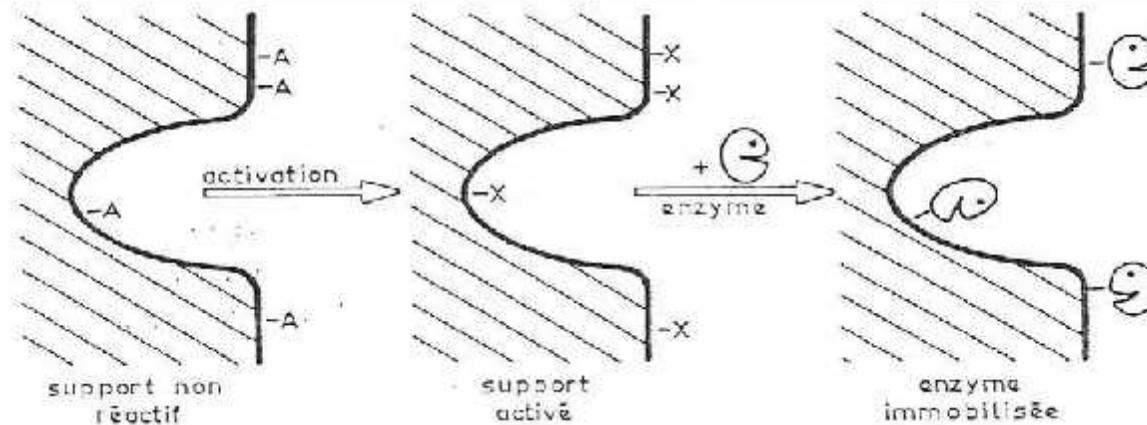
3.5 Immobilisation par fixation sur un polymère réactif au moyen de liaisons covalentes

- Elle consiste à effectuer une réaction chimique entre les groupements fonctionnels libres d'une enzyme et un groupement convenable situé aux extrémités des chaînes latérales d'un support insoluble.
- Les groupements réactifs portés par ces supports sont très variés : diazoïques, azotures et chlorures d'acyle, cyanates, isocyanates, isothiocyanates, iodures d'alkyle, aldéhydes, etc.
- Ces groupements réactifs sont mis en place sur le support grâce à un traitement chimique approprié, immédiatement avant la réaction d'immobilisation de l'enzyme.
- Il semble que l'on minimise la dénaturation de l'enzyme quand on cherche à le fixer sur son support par les groupements aminés libres en position de la lysine qu'il contient. Les groupements fonctionnels du support devront donc présenter (si possible)

Immobilisation par liaisons covalentes

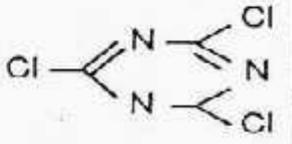
Fixation sur support

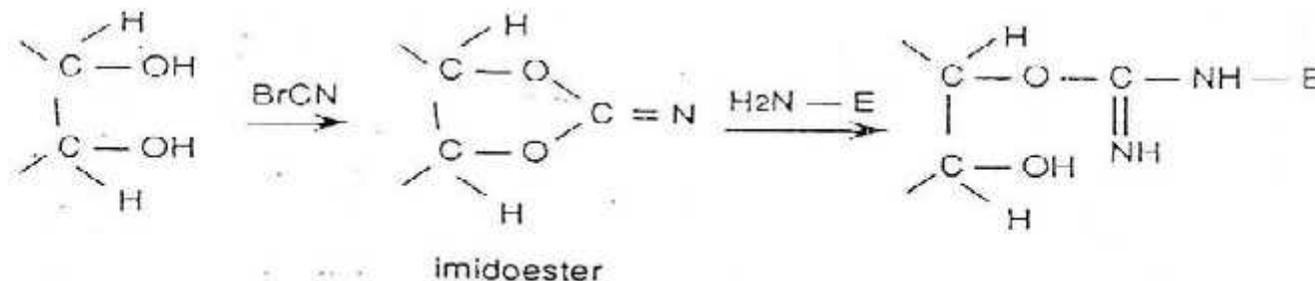
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">- solidité de la fixation- résistance accrue à la dénaturation- faible quantité immobilisée	<ul style="list-style-type: none">- procédés coûteux- risques de dénaturation, masquage- mise en œuvre délicate- supports organiques (mauvaises propriétés mécaniques)



Immobilisation par liaisons covalentes

Fixation sur support

groupement à activer (support)	activation		support ayant fixé l'enzyme
	réactifs	forme activée	
R — COOH	<ul style="list-style-type: none"> - méthanol - hydrazine - nitrite de sodium 	$R - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - N = N^+ = N^-$ azoture	$R - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - E$
R — COOH	$R_1 - N = C = N - R_2$ carbodilimide	$R - C - O - C \begin{matrix} \nearrow NH - R_1 \\ \searrow N^+H - R_2 \end{matrix}$ o. acyl iso urée	$R - \overset{\overset{O}{\parallel}}{C} - NH - E$
R — OH	 triazine	$R - O - \begin{matrix} \nearrow N - Cl \\ \searrow N - Cl \end{matrix}$ gpt triazinylyl	$R - O - \begin{matrix} \nearrow N - Cl \\ \searrow N - Cl \end{matrix} - NH - E$





- **Avantage:**

- fournit des dérivés insolubles constitués presque exclusivement d'enzymes.

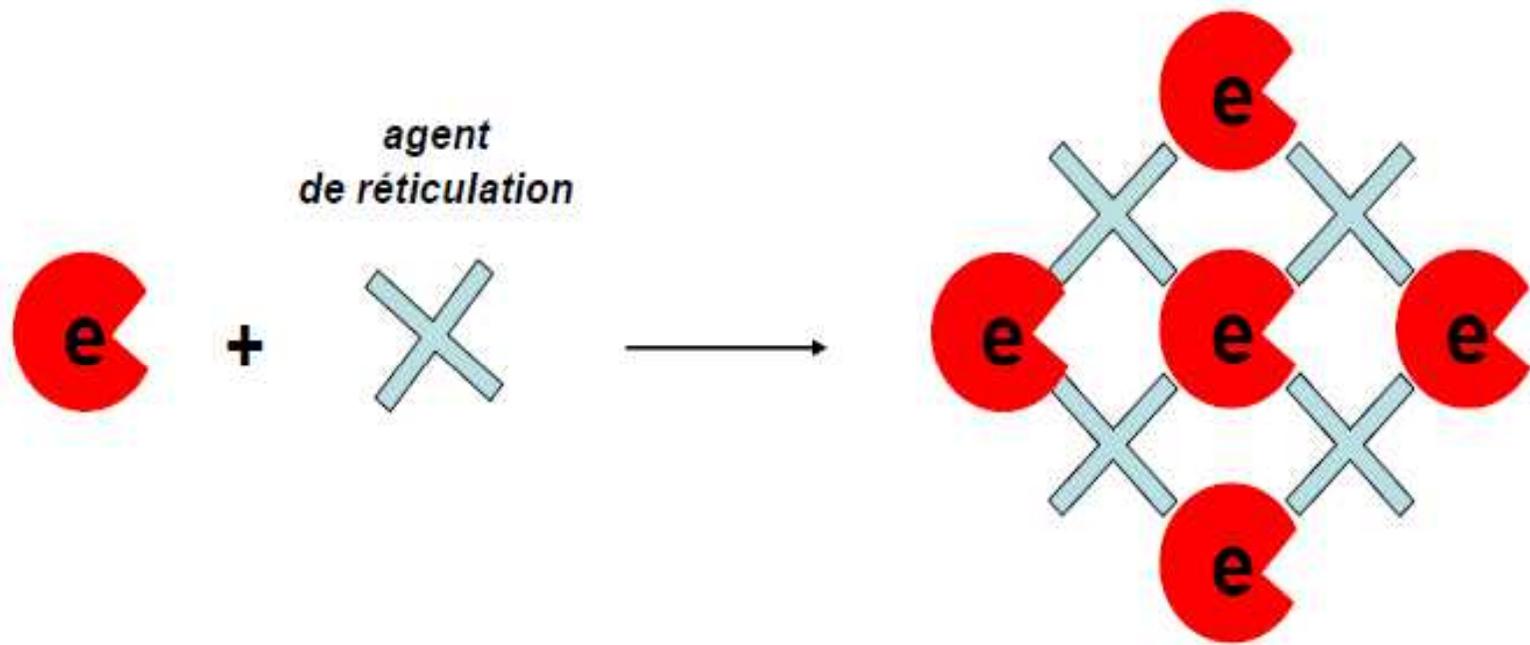
- **Inconvénients:**

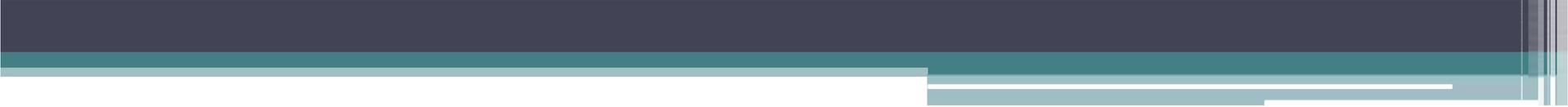
- produits gélatineux et difficiles à filtrer,
- propriétés mécaniques médiocres
- importante perte d'activité enzymatique



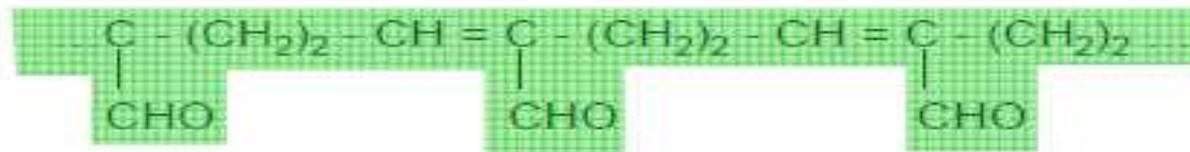
3.3.2 Immobilisation avec inclusion

- 
- c'est un procédé d'association des différentes unités biocatalytiques ou de protéines à l'aide d'un agent réticulant
 - En traitant l'enzyme par un agent chimique hydrosoluble bifonctionnel et susceptible de réagir sur les groupements fonctionnels libres de celui-ci, on obtient un réseau enzymatique tridimensionnel et insoluble.
 - Elle peut être effectuée après inclusion ou adsorption afin de stabiliser l'enzyme immobilisée et limiter les phénomènes de fuites ou de désorption.
 - Elle conduit à une masse molaire élevée

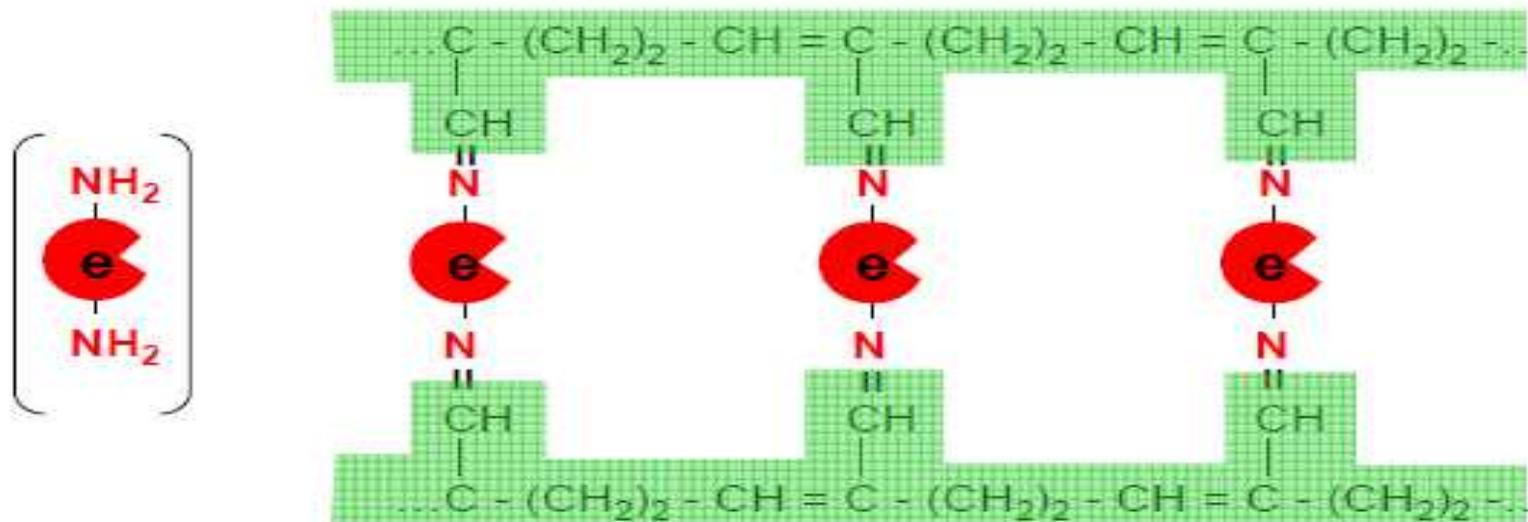


- 
- Le ***glutaraldéhyde*** est un agent de réticulation parmi les plus utilisés.

- 1ère étape : *polymérisation* (pH 7,5 - 8,5 ; 25°C)



- 2ème étape : *réticulation*



Réticulation à l'aide du glutaraldéhyde

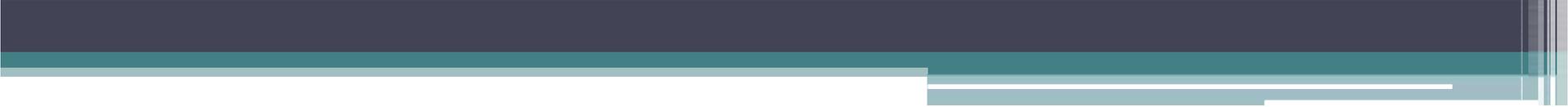
Avantages et inconvénients d'immobilisation par liaison covalente

Avantages

- Stabilité accrue à cause de la liaison covalente
- Grand choix de méthodes différentes
- Grande variété de support minéraux (verre, silice, céramique...) et organiques (cellulose, polymère synthétiques...)
- Possibilité d'effectuer l'immobilisation en présence de substrat pour éviter l'inactivation (protection du site actif).

Inconvénients

- Mise en œuvre de réactions chimiques souvent complexes
- Longueur des expériences (étape de l'activation du support)
- Rendements de fixation inférieurs à 100%
- Risques de modifications chimiques de l'enzyme (perte d'activité)
- Nécessite de purifier l'enzyme préalablement
- Investissement important



4. Applications des enzymes

Les enzymes immobilisées sont utilisés

➤ en **biochimie** et en analyse biologique (emploi d'électrodes à enzymes pour le dosage de l'urée et du glucose, par exemple),

➤ dans les **industries**

✓ **chimiques** (additifs dans les détergents)

✓ **pharmaceutiques** (préparation d'acides aminés optiquement actifs),

✓ **agroalimentaires** (clarification des boissons, fabrication des fromages).



actuellement, les principales applications industrielles
des enzymes sont les suivantes:



chimie bioanalytique



- **Détection et quantification des enzymes:**

- Des taux anormaux d'enzymes dans le plasma sanguin indiquent des problèmes métaboliques.
- Les essais enzymatiques sont des méthodes efficaces pour évaluer la qualité des aliments et pour vérifier l'efficacité des processus de stérilisation et de pasteurisation.

- **Applications analytiques:**

- essais immuno-enzymatiques,
- électrodes à enzymes,
- enzymes immobilisées

Les enzymes constituent des outils analytiques importants; elles offrent des méthodes sensibles et sélectives pour l'identification et quantification des biomolécules (substrats, activateurs, inhibiteurs), ainsi qu'une amplification catalytique de l'analyte.



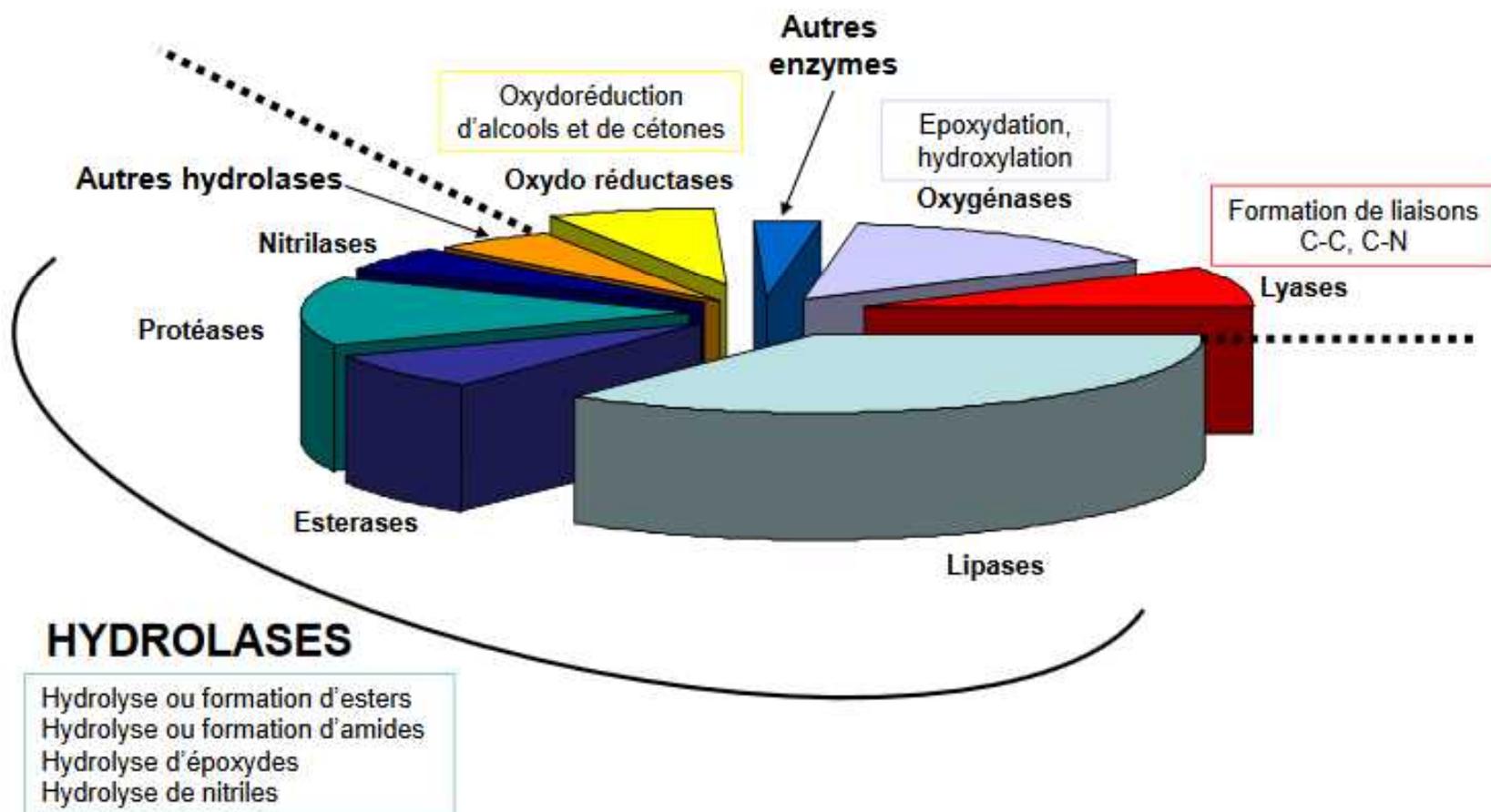
Synthèse organique

- **Production d'acides aminés de la série L** (alanine, phénylalanine, méthionine, tryptophane et valine) au moyen d'une aminocyclase, immobilisée par liaisons ioniques sur du diéthylaminoéthyl-Séphadex
- **Production d'acide 6-aminopénicillanique (6-APA)**, au moyen d'une pénicilline acylase immobilisée
- **Production de fructose** au moyen d'une glucose isomérase immobilisée.
- **Production de glucose et de galactose**, par hydrolyse du lactose au moyen de lactase immobilisée.
- **Désodorisation du lait UHT** au moyen de sulfhydryloxydase immobilisée sur verre poreux
- **Hydrolyse de l'amidon dégradé par** l'amyloglucosidase immobilisée sur noir animal
- **Production de cyclodextrines** au moyen de la cyclodextrine glycosyltransférase immobilisée
- **synthèse de nucléotides** au moyen de la ribonucléase immobilisée.

Biocatalyse en synthèse organique

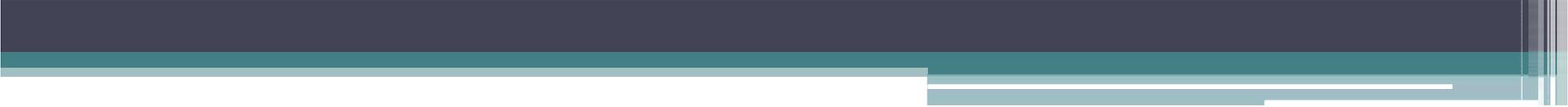


Enzymes plus particulièrement employées en biocatalyse



Exemple de composés produits à l'échelle industrielle par biocatalyse

Production	Tonnes/an
dihydroxyphénylalanine	250
acide malique	2 000
(R)-phényléthylamine	> 100
pénicillines hémisynthétiques	2 000
L-aminoacides	200
7-ADCA	300
aspartame	> 2 000
5-cyanovaléramide	10
fructose	> 250 000
acide 7 amino céphalosporanique	200
D- <i>p</i> -hydroxyphénylgyline	200
phénylacétylcarbinol	120
vitamine B3	3 000
acides aminés	> 10
acrylamide	> 30 000
acide malique	450
lysine	4 000
acide (S)-2-chloropropionique	2 000



5. Conclusion

- 
- La catalyse enzymatique, spécialement grâce à la biologie moléculaire, ouvre de nombreuses perspectives d'applications aussi bien pour l'analyse que pour la synthèse.
 - Comme toutes les méthodes, elle a des contraintes et des limites qui découlent de la nature des enzymes. Mais grâce à une meilleure connaissance de la biologie, ces contraintes peuvent être modifiées de façon à adapter les enzymes aux besoins industriels :
 - ✓ vitesse réactionnelle plus élevée,
 - ✓ stabilité plus grande,
 - ✓ absence d'inhibition par excès de substrat et par le produit
 - Notons encore qu'en principe les catalyseurs enzymatiques ont l'avantage d'être naturels et peuvent donc être considérés comme non polluants, contrairement aux catalyseurs classiques (chimiques) tels que le nickel et le mercure.