

Les enzymes fixées en catalyse hétérogène

Les enzymes sont des catalyseurs organiques colloïdaux hydrosolubles, dont l'activité est souvent très spécifique, et qui sont présents dans les organismes vivants. Les enzymes sont le plus souvent des protéines, c'est-à-dire des biopolymères résultant de la polycondensation d' α -aminocides de la série L : le groupement carboxylique d'un aminoacide donné est engagé dans une liaison amide (-CONH-) avec le groupement aminé d'un autre aminoacide et ainsi de suite. En plus de leurs groupements carboxyliques et aminés, les α -aminoacides possèdent souvent un autre groupement fonctionnel (OH, NH₂, CO₂H, etc.), lequel se retrouve intact dans la macromolécule enzymatique. Les masses molaires des enzymes sont comprises entre 10 000 et 1 000 000 environ.

Certains replis de la macromolécule enzymatique forment une cavité appelée *site actif*. La substance transformée par l'enzyme, ou *substrat S*, présente une activité élective pour le site actif. C'est au niveau de celui-ci que le substrat S est transformé en *produit P*, comme l'indique la réaction (1).

De nombreuses enzymes, telles que les *hydrolases*, ne doivent leur activité catalytique qu'à leur seule structure protéique. Mais d'autres, par contre, ne peuvent fonctionner qu'en la présence d'un ion métallique ou d'un composé organique supplémentaire, de nature non protéique, appelé *coenzyme* ou *cofacteur*. Au cours de la réaction enzymatique, le cofacteur C est transformé en C', comme l'indique la réaction (2).

Le problème de la régénération du cofacteur C à partir de son produit de transformation C' est un sérieux obstacle à l'utilisation industrielle des enzymes à cofacteurs. Pour cette raison, dans ce qui suit, nous limiterons aux enzymes fonctionnant sans cofacteurs.

La cinétique de la réaction enzymatique (1) obéit à une loi simple, l'équation de Michaelis-Menten :

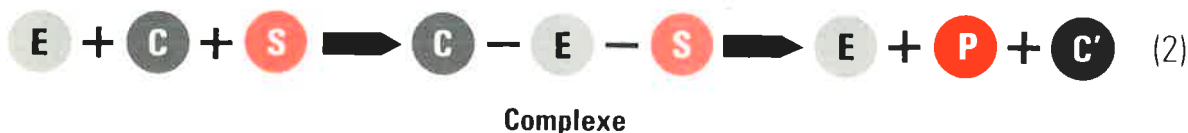
$$\frac{(E)(S)}{(E-S)} = K_m \quad \text{Constante de Michaelis}$$

$$V = \frac{d(P)}{dt} = V_{\max} \frac{(S)}{K_m + (S)} \quad \text{Equation de Michaelis-Menten}$$

En prenant l'inverse de l'équation précédente, on obtient la relation de Lineweaver-Burk qui montre que 1/V est une fonction linéaire de 1/(S) :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{Relation de Lineweaver-Burk}$$

L'*Unité d'activité enzymatique (UI)* correspond à la transformation d'une micromole de substrat par minute à 25 °C, dans des conditions de dosage bien précises. L'*activité spécifique* enzymatique se mesure en nombre d'UI par mg d'enzyme.



Les enzymes fixées

Les réactions enzymatiques sont presque toujours effectuées dans l'eau où les enzymes sont solubles. Ces dernières étant très fragiles, leur récupération, après usage, ne peut généralement pas être envisagée favorablement. Dans ces conditions, le prix souvent très élevé des enzymes constitue un obstacle majeur à toute utilisation industrielle à grande échelle. On voit, dès lors, tout l'intérêt qu'il y a à *immobiliser* l'enzyme sur un support insoluble par un moyen approprié, suffisamment doux et sélectif pour éviter une perte trop importante d'activité catalytique. L'enzyme ainsi fixée (ou immobilisée) est ensuite disposée dans un percolateur, par exemple, et peut catalyser en milieu hétérogène, mais cette fois en continu, les mêmes réactions qu'en phase liquide homogène.

Il existe cinq méthodes générales d'immobilisation des

enzymes : l'adsorption, l'inclusion, la microencapsulation, la réticulation et la fixation sur un support insoluble au moyen de liaisons covalentes. Si cette dernière méthode est la plus utilisée au niveau du laboratoire, par contre c'est la première (l'adsorption) qui semble la plus utilisée au plan industriel.

Des polyols naturels (tels que le dextrane, l'agarose et la cellulose), ou synthétiques (tels que les résines de Trisacryl vendues par IBF-Biotechnics) sont susceptibles d'immobiliser des enzymes de façon covalente, après activation préalable au moyen de bromure de cyanogène (figure 1). L'Eupergit C, de Röhm Pharma, est un copolymère acrylique qui comporte des groupements époxydes, susceptibles de réagir avec les groupements aminés libres des enzymes, en donnant des combinaisons covalentes.

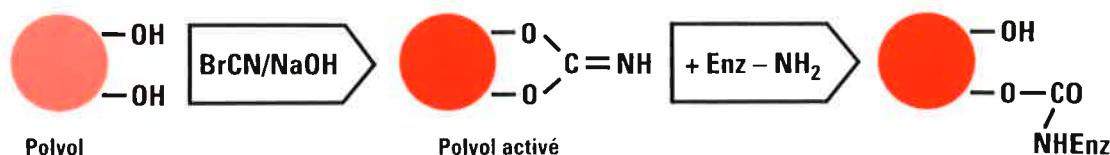
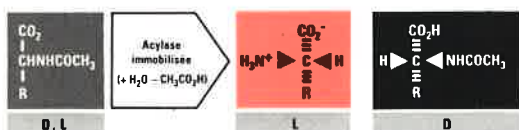


Figure 1 : Immobilisation d'un enzyme Enz-NH_2 sur un polyol préactivé au bromure de cyanogène
 Quelques exemples d'utilisations industrielles des enzymes fixées sont indiqués ci-après.

Résolution d'acides aminés racémiques

La L-aminoacide acylase EC 3.5.1.14 adsorbée sur une résine échangeuse d'ions, le diéthylaminoéthyl-Sephadex, hydrolyse les liaisons amide des N-acétyl aminoacides de la série L uniquement, comme l'indique la réaction ci-dessous.



La L-aminoacide libéré est facilement séparé de son antipode N-acétylé par cristallisation fractionnée. Ce dernier est alors racémisé, puis recyclé. Dès 1972, la société japonaise Tanabe était en mesure de préparer, selon ce procédé, 20 tonnes de méthionine par mois.

Production d'acide 6-aminopénicillanique

Intermédiaire clé dans les hémisynthèses des pénicillines (ampicilline, amoxicilline), l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) peut être obtenu par hydrolyse de la benzylpénicilline au moyen d'une pénicilline acylase fixée par liaisons covalentes sur un polysaccharide modifié, le Sephadex -G 200, préactivé au bromure de cyanogène. La production annuelle de 6-APA par ce procédé est d'environ 3 500 tonnes.

Production de fructose

Le glucose, en solution aqueuse concentrée, peut être isomérisé en fructose de manière continue, grâce à une glucose isomérase adsorbée sur de la diéthylaminoéthyl cellulose ou sur une résine anionique synthétique.

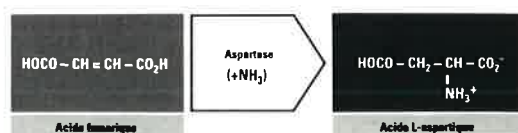
Autres applications industrielles

Unilever utilise des lipases immobilisées sur Cérite pour la transestérification de glycérides bon marché (huile d'olive) au moyen d'acides gras (acide stéarique), de façon à obtenir des corps gras susceptibles de remplacer le beurre de cacao dans l'alimentation. Ce procédé opère en milieu organique, tel que l'éther de pétrole saturé d'eau.

On peut également citer l'utilisation de sulfhydryl oxydase immobilisée sur verre poreux pour désodoriser le lait UHT (stérilisé à ultrahaute température), l'utilisation d'amyloglucosidase immobilisée sur noir animal pour achever l'hydrolyse de l'amidon dégradé, l'utilisation de cyclodextrine glycosyl-transférase immobilisée pour la fabrication de β -cyclodextrines et, enfin, l'utilisation de ribonucléase immobilisée pour la synthèse de nucléotides.

Microorganismes immobilisés

L'enzyme aspartase catalyse l'addition d'ammoniac sur l'acide fumarique, ce qui conduit à l'acide L-aspartique.



L'aspartase est une enzyme que l'on peut extraire du colibacille. Toutefois, il est plus avantageux et plus simple d'immobiliser des cellules entières de colibacilles, plutôt que d'en extraire l'aspartase et d'immobiliser ensuite cette dernière. L'immobilisation des cellules est réalisée par inclusion dans un gel de polyacrylamide.

Pour en savoir plus

• S.P. Colowick, N.O. Kaplan, *Methods in enzymology*, Vol. 44 : Immobilized enzymes, Academic Press, New York, 1976.

• R. Scriban, *Biotechnologie, Technique & Documentation Lavoisier*, Paris, 1982.

• E. Brown, J.F. Biellmann, *Catalyse enzymatique, Techniques de l'Ingénieur*, sous presse.

Cette fiche a été préparée avec le concours de M. Eric Brown.