L'importance de l'eau dans les nouveaux procédés de biocatalyse

Sylvain Lamare* *maître de conférences,* **Marie Dominique Legoy*** *professeur*

L'eau est le solvant par excellence des réactions biochimiques du monde vivant. Ainsi, depuis les débuts de l'étude des biocatalyseurs jusqu'à aujourd'hui encore, elle est le plus commun des solvants, que ces réactions se déroulent *in vivo* dans la cellule, ou *in vitro* dans les tubes à essais de l'enzymologiste.

Ce domaine de recherches en biochimie s'est vu aujourd'hui attribuer le qualificatif d'enzymologie classique en opposition à un nouveau volet de recherches étudiant la mise en œuvre d'enzymes en milieux dits non conventionnels c'est-à-dire soit dans des milieux au sein desquels la disponibilité en eau est restreinte, soit dans des milieux composés de solvants organiques anhydres.

L'enzymologie en milieux non conventionnels

L'enzymologie non conventionnelle présente de nombreux intérêts pour la compréhension du rôle de l'eau lors de la catalyse enzymatique

Pour l'enzymologiste classique, la concentration en eau est invariablement de l'ordre de 55,55 M alors que les concentrations en substrats et produits sont le plus souvent de l'ordre de la µM ou de la mM. L'utilisation de milieux à fortes concentrations en substrats ou la présence de solvants organiques modifient alors de manière importante ces données et font passer l'eau à un stade de composé minoritaire. Nombres de travaux ont ainsi pu mettre en évidence, lors de la dernière décennie, l'effet des modifications physico-chimiques de l'environnement de l'enzyme par l'utilisation de milieux organiques, et conséquemment l'importance de l'eau sur la catalyse enzymatique (Zaks et Klibanov 1984, Deetz et Rozzel 1988, Affleck et coll. 1992).

L'utilisation de solvants organiques ouvre certes de nouvelles voies pour la biocatalyse mais ne doit cependant pas apparaître comme une panacée en ce qui concerne la transformation de substrats apolaires, même si ses avantages apparaissent aujourd'hui nombreux (Zaks et Klibanov, 1985, Khmelnitsky et coll. 1988) tels que :

– l'augmentation de la solubilité de composés apolaires en milieux non aqueux,
– la possibilité d'obtenir de nouvelles réactions par modifications des contraintes thermodynamiques,
– l'augmentation de la thermostabilité d'un catalyseur en absence d'eau,
– la relative aisance de récupération des produits par simple évaporation du solvant,
– la ségrégation du catalyseur dans une phase distincte permettant une récupération facilitée et sa réutilisation,
– la minimisation du risque de contamination microbienne au sein des réacteurs.

L'utilisation de solvants organiques présente aussi de sérieux inconvénients. De par leur toxicité potentielle, vis-à-vis de l'utilisateur d'un produit ainsi obtenu d'une part, vis-à-vis de l'enzyme d'autre part (Halling, 1989).

L'enzymologie non conventionnelle ne se limite cependant pas à l'utilisation de solvants organiques dans des systèmes monophasiques. Au cours de la dernière décennie, on a pu assister à l'apparition et au développement de nouvelles technologies dans le domaine de la catalyse enzymatique avec l'utilisation de systèmes multiphasiques, de micro-émulsions ou des systèmes micellaires (Luisi P. et coll., 1988 ; Martinek et coll., 1987). D'autres systèmes comme l'utilisation de fluides supercritiques et la catalyse en phase gazeuse sont ensuite venus enrichir les procédés de catalyse non conventionnelle.

Toutes ces études présentent cependant un point commun à savoir : tenter d'expliquer le rôle de ce composé chimique si simple et si complexe à la fois, l'eau.

Structure et propriétés de l'eau

L'eau liquide constitue une phase très organisée

L'eau est à de nombreux titres une extraordinaire petite molécule du monde vivant. Si on la compare, par exemple, à d'autres composés de masse molaire voisine (*tableau I*), ses propriétés semblent anormales.

* Laboratoire de génie protéique et cellulaire, Université de La Rochelle, avenue Marillac, 17042 La Rochelle Cedex 1.
Tél. : 46.45.82.23. Fax : 46.45.82.65.

Tableau I - **Comparaison de différentes propriétés de l'eau avec des composés de masse molaire voisine. (d'après Mathews C. et van Hold K., 1990).**

Composé	Masse molaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Chaleur de vaporisation (kJ/mol)
CH_4	16,04	-182	-162	8,16
NH_3	17,03	-78	-33	23,26
H_2O	18,02	0	+100	40,71
H_2S	34,08	-86	-61	18,66

La molécule d'eau est, parmi les 4 molécules listées, la seule à être sous forme liquide dans la gamme de température du monde vivant (0 à +100 °C). Elle présente ainsi des points de fusion et d'ébullition anormalement hauts. Enfin, sa chaleur de vaporisation est très élevée. Toutes ces données rendent compte de la très grande organisation de l'eau et plus particulièrement de sa capacité à former 4 liaisons H avec d'autres molécules d'eau suivant un tétraèdre parfait comme le montre la *figure 1*.

En fait, sous sa forme liquide, l'eau n'a pas une structure aussi bien définie. Les liaisons H ne cessent de se modifier et la structure du milieu est en perpétuelle évolution sous forme d'amas de molécules interagissant entre elles, au milieu d'autres molécules dont les interactions sont plus faibles. C'est ce qu'on appelle les «clusters», dont la durée de vie dans l'eau liquide est de l'ordre de la picoseconde.

Ainsi, de par son moment dipolaire et les interactions que nous venons de décrire, l'eau possède-t-elle une constante diélectrique importante (78,5) et une tension de surface très élevée (72 dynes/cm) qui en font un solvant polaire exceptionnel.

Deux types d'interactions expliquent les phénomènes de solvatation par l'eau : les liaisons H et les interactions dipôle-dipôle

Il existe 2 grandes classes de molécules, appelées hydrophiles ou hydrophobes selon leur capacité de solvatation et de dissolution dans l'eau.

Les molécules hydrophiles, pouvant se dissoudre dans l'eau sont séparées en deux grands types : les molécules non chargées et les molécules chargées.

Les molécules non chargées hydrophiles sont caractérisées par la présence dans leur structure des groupements libres capables de former des liaisons H avec les molécules d'eau c'est-à-dire les hydroxyles, les fonctions amines, esters, cétones et sulfhydriles notamment. Sinon, c'est l'échange des liaisons H intramoléculaires (cas des nombreuses macromolécules) avec les molécules d'eau de l'environnement qui intervient alors.

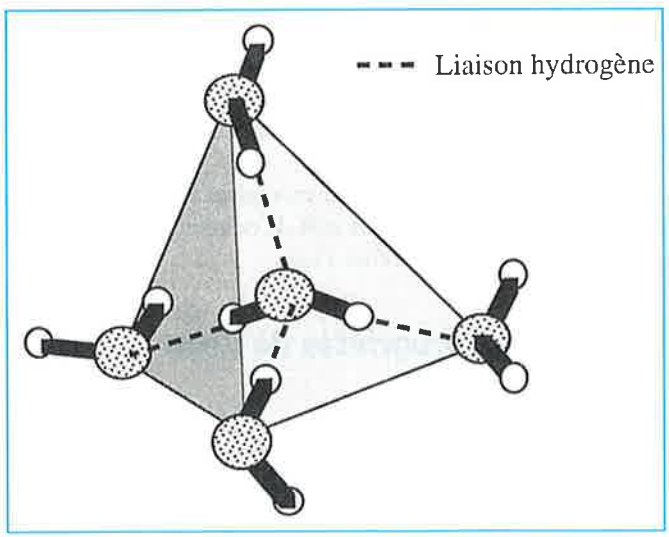

Figure 1 - **Organisation spatiale des molécules d'eau et liaisons hydrogène (cas de la glace).**

En ce qui concerne les molécules chargées, la capacité à former des liaisons H avec l'eau n'intervient pas dans le phénomène de solvatation. La présence d'interactions dipôle-dipôle constitue l'explication du phénomène d'hydratation. L'eau intervient aussi dans la définition des forces de très faible énergie, les forces de van der Walls dont l'importance est capitale pour l'organisation tridimensionnelle des macromolécules (Waks, 1986). Le jeu des interactions pouvant exister entre une macromolécule (protéine) et l'eau est donc tout aussi complexe que varié.

La notion de pH n'existe que grâce à l'eau

Une des propriétés de l'eau, tout aussi importante, est sa capacité à s'ioniser et à transférer un proton, c'est-à-dire permettre une très grande mobilité des protons en solution. Un proton n'existe jamais isolé en solution aqueuse. Il est toujours associé à de petits clusters d'eau sous la forme d'entités telles que H_3O^+, $H_5O_2^+$ ou $H_7O_3^+$. Le temps de demi-vie de ces espèces chimiques est de l'ordre de 10^{-15} s, ce qui explique la très grande mobilité des protons dans les solutions aqueuses. C'est donc parce que l'eau est capable de s'ioniser, qu'elle a une influence directe sur l'état d'ionisation des protéines. Toute protéine comporte des groupes ionisables importants pour sa structure (états de surface, charge globale, ponts salins...) et pour la catalyse (groupements carboxyliques et amines des sites de fixation ou des sites catalytiques par exemple).

Le rôle de l'eau vis-à-vis de l'hydratation des macromolécules telles que les enzymes apparaît donc très complexe de par la subtilité des interactions mises en jeu.

L'eau en tant que réactif

Toutes les réactions catalysées par des hydrolases font intervenir l'eau en tant que réactif. Si, par exemple, on considère la réaction d'hydrolyse :

$$A + H_2O \leftrightarrow B + C$$

Une solution aqueuse ayant une concentration en eau de 55,55 M soit une activité de l'eau quasi égale à 1, l'équilibre est déplacé de gauche à droite et la réaction a lieu dans le sens de production de B et C. La constante d'équilibre K_{eq} est alors équivalente à [B].[C]/[A] (Halling, 1984).

Si maintenant, on écrit cette même réaction mais pour un milieu où l'eau n'est plus en excès, l'équilibre est alors modifié de façon importante. On a alors :

$$A + H_2O \leftrightarrow B + C$$

On doit alors calculer la constante d'équilibre, en tenant compte de l'activité de chacun des composants du système :

$$K_{eq} = [B].[C] / [A].[H_2O]$$

ou plus précisément :

$$K_{eq} = a_B.a_C/a_A.a_w$$

On se rend alors compte qu'il est possible d'inverser la réaction d'hydrolyse en jouant simplement sur l'activité de l'eau et qu'on peut tout à fait observer dans certaines conditions la réaction suivante :

$$B + C \rightarrow A + H_2O$$

L'activité de l'eau a donc une importance capitale dans la catalyse en milieux faiblement hydratés puisque, d'un point de vue réactionnel, elle intervient alors au même niveau que les autres composants de la réaction considérée dans le calcul de la constante d'équilibre.

Les protéines en milieux peu hydratés

La question que pose l'utilisation d'enzymes en milieux peu hydratés est fort simple, à savoir : quelle est la quantité d'eau minimale requise pour qu'une protéine soit dans une conformation stable et pleinement catalytique ?

L'hydratation d'une protéine se fait par étapes successives

Les travaux effectués dans les années 70-80 sur l'hydratation des protéines ont apporté un certain nombre de réponses aux processus mis en jeu. Un des principaux résultats de Yang et Rupley (1979) a été de montrer que l'hydratation du lysozyme était un processus séquentiel et que la distribution des molécules d'eau sur le lysozyme était gouvernée par des règles bien précises.

Par une méthode microcalorimétrique, la variation de la capacité calorifique spécifique (C_p) d'une poudre de lysozyme à différents niveaux d'hydratation a été étudiée. Leurs résultats présentés sur la *figure 2* ont permis de déterminer 4 régions concernant la variation de C_p en fonction du niveau d'hydratation.

En distinguant du C_p global les C_p du lysozyme et de l'eau, les auteurs sont arrivés à l'analyse suivante de leur résultats :

• dans la région IV, le C_p de l'eau est très proche de celui de la glace, ce qui implique une forte organisation. Ils observent aussi l'existence de nombreux transferts de protons entre cette eau et les différents groupes ionisables de la protéine.

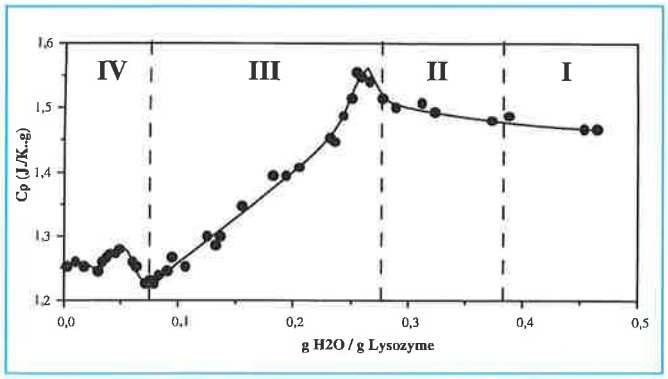

Figure 2 - **Variation de la chaleur spécifique du lysozyme en fonction de son état d'hydratation (d'après Yang P.-H. et Ruppley A., 1979).**

• la région III correspond à la fixation de molécules d'eau sur les amines et les groupements carboxyliques majoritairement. La brusque variation de C_p aux alentours de 0,25g H_2O/g protéine correspond au recouvrement complet des sites impliqués dans la formation de liaison H et à l'apparition concomitante de molécules d'eau beaucoup moins structurées.

• La phase II correspond à un état intermédiaire où des molécules d'eau continuent de recouvrir la protéine sans pour autant adopter une structure très précise.

• Enfin, la région I correspond à un état où la protéine est en solution aqueuse.

Des modifications structurales sont observées en fonction de l'état d'hydratation d'une protéine

Qu'il s'agisse des travaux de Poole et Finney (1983) sur le lysozyme, ou des travaux de Hartsough et Merz (1992, 1993) sur un polypeptide d'une soixantaine d'acides aminés, il semble comme le concluent Ryu et Dordick (1992) et Hartsough et Merz (1992, 1993), que les réarrangements structuraux d'une protéine placée dans un milieu faiblement hydraté soient relativement discrets et ne se limitent qu'à une modification de l'orientation des chaînes latérales de certains acides aminés de surface. Mais l'influence sur l'activité catalytique est importante : un degré d'hydratation faible semble entraîner une rigidification de la structure protéique en ralentissant considérablement les mouvements intramoléculaires et donc en perturbant le processus catalytique.

La disponibilité en eau influence de façon très importante la catalyse enzymatique

La disponibilité de l'eau dans le milieu influence la catalyse enzymatique selon deux modes d'action. Soit l'eau ne participe pas à la réaction, et il est possible d'observer directement son effet sur le catalyseur, soit elle est un des réactifs. Dans ce cas, les observations expérimentales rendent compte de l'addition de deux phénomènes : l'influence de l'eau sur l'enzyme et la modification des paramètres thermodynamiques du système réactionnel.

L'eau est nécessaire pour l'apparition d'une activité catalytique. Deetz et Rozzell (1988) soulignent que toute activité catalytique est inconcevable en absence totale d'eau dans un système biochimique.

Le développement des techniques cristallographiques sur les protéines a permis de mettre en évidence l'existence d'un «minimum vital» d'eau : les molécules d'eau associées à différents domaines de la matrice macromoléculaire ou l'eau séquestrée.

Sreenivasan et Axelsen (1992) soulignent les caractères structurels et fonctionnels de ces quelques molécules d'eau indispensables qu'ils retrouvent toujours positionnées aux mêmes endroits dans la matrice protéique (16 sites communs ont pu être déterminés) pour une classe d'enzymes homologues : les protéases à sérine. Ces molécules se positionnent :

- soit au niveau des sites actifs, participant aux interactions enzyme-substrat,
- soit à la jonction de différents domaines, participant ainsi au repliement et à la mobilité de la structure protéique.

Ainsi, l'eau, même très structurée joue-t-elle le rôle d'agent plastifiant pour une protéine, c'est-à-dire permet une souplesse de structure entraînant l'obtention de conformations spatiales différentes, plus ou moins actives (Finney et Poole, 1984). Il est cependant établi clairement qu'une très faible teneur en eau est compatible avec une activité catalytique importante. Les milieux organiques apolaires sont des milieux au sein desquels la fraction aqueuse représente un pourcentage en masse très faible (de l'ordre du pour cent). Ils constituent, de fait, des systèmes de choix pour l'étude de l'effet de l'eau sur la catalyse.

D'un point de vue cinétique, les effets de l'eau sur l'activité catalytique ne se traduisent pas par des effets similaires quelle que soit l'enzyme. Zaks et Klibanov (1985) mettent en évidence pour trois lipases catalysant une réaction de transestérification entre l'heptanol et la tributyrine trois comportements cinétiques différents en fonction du degré d'hydratation. Ainsi obtiennent-ils les courbes suivantes de l'effet de l'eau sur l'activité des lipases de pancréas de porc, de *Candida cylindracea* et de *Mucor sp.* pourtant toutes testées dans les mêmes conditions (*figure 3*).

La quantité d'eau minimale requise pour qu'un biocatalyseur soit pleinement actif semble donc difficile à prévoir. Il est, cependant, maintenant une certitude, à savoir : une monocouche d'eau recouvrant l'enzyme n'est pas nécessaire pour l'activité enzymatique. La chymotrypsine, placée dans de l'octane est active alors que seulement 50 molécules d'eau sont associées. C'est -à-dire environ 10 % du nombre de molécules d'eau nécessaires à la formation d'une monocouche d'hydratation complète (Klibanov, 1989).

A la base de la spécificité enzymatique, on retrouve la capacité des enzymes à reconnaître, puis à fixer leur substrat. Au cours de la reconnaissance et de l'étape de fixation, la molécule de substrat va devoir déplacer les molécules d'eau initialement présentes au niveau du site actif et plus particulièrement celles situées au sein des cavités hydrophobes. C'est la balance des différentes interactions entre l'eau, les acides aminés du site actif et le substrat qui vont alors permettre un positionnement correct du substrat et la définition de la spécificité. La modification de l'état d'hydratation du site actif, doit alors avoir une influence sur le processus de reconnaissance et de fixation et donc sur la spécificité voire la sélectivité. Ainsi, une modification de spécificité ou de sélectivité peut elle être due à l'absence de déplacement des molécules d'eau par le substrat au niveau des sites apolaires de fixation.

L'eau est responsable des phénomènes de thermodénaturation

La dénaturation thermique des protéines est le résultat de nombreuses combinaisons parmi lesquelles on peut citer :

– l'agrégation entre macromolécules par augmentation des interactions hydrophobes (Gaertner et Puigserver, 1990) et la création de nouvelles liaisons intermoléculaires (Liu, 1990),
– la modification de l'organisation des structures tertiaires voire secondaires (dépliement et repliement incorrect),
– la rupture des ponts disulfures,
– l'hydrolyse des liaisons peptidiques, particulièrement au voisinage de l'acide aspartique (Ahern et Klibanov, 1986 ; Gupta, 1991),
– les réactions de Maillard,
– les réactions de déamidation (Volkin et coll., 1990),
– la dissociation des groupements prosthétiques...

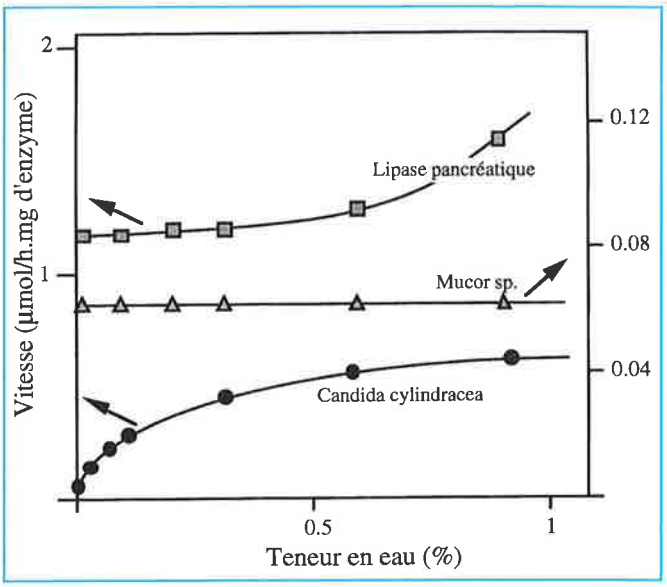

Figure 3 - **Variation de la vitesse de transestérification entre l'heptanol et la tributyrine en fonction de la teneur en eau du milieu pour les lipases de pancréas de porc, de *C. cylindracea* et de *Mucor sp.* (d'après Zaks et Klibanov, 1985).**

Au cours de tous ces phénomènes, l'eau a un rôle actif. Ainsi, la réduction de la disponibilité en eau modifie-t-elle considérablement ces processus et entraîne une thermostabilité accrue.

L'activité thermodynamique de l'eau comme paramètre d'étude des enzymes en milieux peu hydratés

Le problème concernant les études des milieux à disponibilité en eau réduite tient principalement à la définition d'un paramètre quantifiant de façon non équivoque la disponibilité de l'eau ainsi que sa répartition entre les différentes composantes d'un système.

L'activité de l'eau a_w est le paramètre thermodynamique d'équilibre permettant de définir l'état de l'eau dans des systèmes semblables. Halling (1994) illustre l'équilibre pouvant exister entre les différents états de l'eau et les différentes phases d'un milieu complexe par le schéma de la *figure 4*. Il est ainsi possible, par l'utilisation d'un seul paramètre de définir précisément l'état d'hydratation de toutes les composantes d'un système.

Une façon simple de définir l'activité de l'eau consiste à utiliser la pression de vapeur d'eau de la phase gazeuse en équilibre avec le système considéré. On peut alors écrire :

$$a_w = P/P_o$$

où P est la pression partielle de l'eau au-dessus du système et P_0 la pression partielle, dite de référence, mesurée à la même température au-dessus d'eau pure. L'a_w d'un système est donc tributaire de grandeurs physiques caractérisant un système telles que la pression absolue et la température.

Pour caractériser l'état d'hydratation des phases solides, une façon traditionnelle consiste à déterminer l'isotherme de sorption.

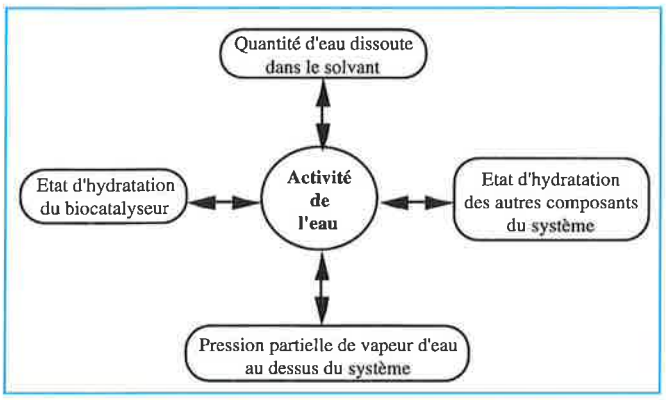

Figure 4 - **L'activité de l'eau définit l'équilibre entre les différentes phases et les différents états d'un système (d'après Halling, p. 1994).**

Une certaine masse d'échantillon est placée à a_w contrôlée et une fois l'équilibre atteint entre la phase gazeuse et la phase solide, la teneur en eau est déterminée. Différentes méthodes de dosages sont possibles parmi lesquelles peuvent être citées la méthode gravimétrique ou les méthodes iodométriques et coulométriques de Karl Fischer (Macleod, 1991 ; Bernetti et coll., 1984). Ces isothermes de sorption (*figure 5*) permettent de distinguer les différents états de l'eau d'une préparation (Drapron, 1985 ; Hahn-Hagerdäl, 1986). La courbe présente deux points caractéristiques (A et B) correspondant à deux états de l'eau.

Les molécules d'eau fixées sur l'échantillon correspondant à la partie située avant le point A sur la courbe sont les molécules très fortement liées. Elles sont positionnées majoritairement sur les sites polaires et les résidus ionisés. Ces molécules constituent la première «couche» d'hydratation. Par extrapolation, le point O correspond à la quantité d'eau très fortement liée à l'échantillon.

Entre les points A et B, la teneur en eau varie de façon linéaire avec l'a_w. C'est la formation d'une nouvelle couche d'hydratation, où la protéine va «dissoudre» des molécules d'eau pour former une solution solide. Ces molécules d'eau sont alors liées à la protéine par des liaisons de plus faible énergie.

Le point B correspond alors à l'apparition d'eau solvante et, une fois dépassée la valeur d'a_w lui correspondant, une phase aqueuse, distincte, prend naissance. Par extrapolation de la partie AB linéaire, on peut déterminer le point C correspondant à la quantité totale d'eau non solvante, structurée par l'échantillon.

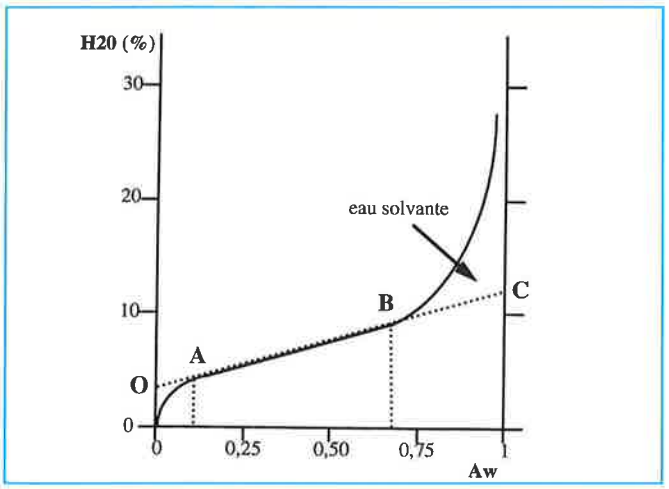

Figure 5 - **Représentation schématique d'un isotherme de sorption (d'après Drapron R., 1985).**

L'utilisation de l'a_w pour la caractérisation de l'état d'hydratation d'une enzyme semble donc tout à fait appropriée, et Valivety et coll. (1992a, 1992b) en font la démonstration. Ils étudient dans différents milieux l'effet de l'eau sur la réaction d'estérification entre l'acide décanoïque et le dodécanol par le Lipozyme (lipase de *R. miehei* immobilisée sur une résine échangeuse d'anions). Les résultats, exprimés en fonction de la teneur en eau des différents solvants (hexane, trichloroéthylène, éther isopropylique, pentan-3-one et les substrats purs) mettent en évidence des optimums différents pour chaque condition testée (de 0,05 M à 0,5 M d'eau). Ces mêmes résultats, exprimés en fonction de l'a_w du système présentent alors tous le même optimum à savoir $a_w = 0,5$.

Le paramètre a_w et la réalisation des isothermes de sorption des différentes composantes du système, et particulièrement du biocatalyseur, permettent donc de prédire de façon globale le comportement d'une enzyme en milieu non conventionnel. Mais son utilisation nécessite de toujours se placer dans des conditions où les différentes phases du système sont en équilibre.

Un modèle d'étude original : la biocatalyse solide/gaz

La nature offre très peu d'exemples de transformations enzymatiques mettant en jeu des substrats gazeux. L'exemple unique est l'hydrogénase, dont le substrat naturel est l'hydrogène gazeux. Cette enzyme qui réalise la conversion du p-H_2 en o-H_2 fut étudiée par Yagi T. et coll. en 1969.

Une quinzaine d'années plus tard, les premiers résultats traitant de biocatalyse par une enzyme (alcool déshydrogénase) composant la phase solide sur des substrats (butanol et acétaldéhyde) et des produits (butanal et éthanol) sous forme gazeuse apparurent (Pulvin et coll., 1986). Ils furent ensuite suivis d'autres travaux dans les toutes dernières années (Pulvin et coll., 1988 ; Barzana et coll., 1989 ; Parvaresh et coll., 1992 ; Robert et coll., 1992 ; Lamare et coll., 1993, 1995) portant sur l'utilisation d'alcool oxydase et d'enzymes lipolytiques. Parallèlement, certains systèmes mettant en œuvre des cellules entières ont été étudiées depuis les années 80.

L'originalité de ces travaux est double. Tout d'abord, ils démontrent que la catalyse en phase solide/gaz est possible en utilisant des biocatalyseurs (alcool oxydases, lipases, estérases) dont les substrats naturels ne sont pas gazeux. Enfin, l'utilisation de cette technique permet de s'affranchir de l'utilisation de solvants et de travailler avec uniquement les substrats et les produits de réaction dans l'environnement de l'enzyme. Enfin, comme dans le cas des études réalisées sur des systèmes liquides, l'influence de l'eau a été décrite comme un des paramètres essentiels et les résultats semblent aujourd'hui concordants.

La catalyse solide/gaz présente des avantages certains par rapport aux systèmes conventionnels du type solide/liquide. Ce type de catalyse devient donc intéressant pour plusieurs raisons :

– La phase solide étant composée par le biocatalyseur, les étapes de fixation ou d'immobilisation ne s'avèrent pas nécessaires au premier abord. La récupération du catalyseur est aussi relativement aisée qu'il s'agisse de réaction menée en «cuvée» ou en réacteur continu.
– Comparativement à un système solide/liquide, les transferts de masse sont très importants en raison de la diffusivité très importante et de la très faible viscosité des phases gazeuses.
– La phase gazeuse étant composée des substrats et produits purs et d'un gaz vecteur, l'utilisation de tout autre composé devient alors caduque (ex: solvant pour pallier d'éventuels problèmes de solubilité). Les traitements en aval du milieu réactionnel sont donc simplifiés lors de la récupération du produit et la quantité de sous-produits minimisée. De plus, l'utilisation des substrats purs évite tout risque de toxicité ou de contamination des produits par une tierce molécule.
– Enfin, l'utilisation de la catalyse solide/gaz est souvent synonyme de température plus importante d'où il résulte une diminution des risques de contamination microbienne des réacteurs.

Ce type de catalyse peut répondre à certaines demandes industrielles importantes telles que la production de molécules aromatiques (esters, aldéhydes à chaîne carbonée de longueur modérée...) dont une des caractéristiques importantes est leur volatilité, ou la dépollution d'effluents gazeux (développement de biofiltres). Deux grandes classes de catalyseurs sont utilisables : les cellules entières, et les enzymes isolées.

Les systèmes solide/gaz à cellules microbiennes

L'utilisation de micro-organismes entiers, comme «sac à enzymes» est guidée par deux impératifs majeurs :
– permettre plusieurs étapes pour une biotransformation par le même matériel biologique,
– utiliser la cellule pour permettre la régénération *in situ* des cofacteurs (toujours très onéreux) pouvant être impliqués lors de la catalyse.

La faisabilité technique de ces systèmes est aujourd'hui démontrée pour la production d'époxydes (de Bont et coll. 1983 ; Hou, 1984) ou pour la production d'aldéhydes (Duff et Murray, 1990). Mais, la mise en œuvre des cellules entières concerne majoritairement aujourd'hui le traitement d'effluents gazeux pollués. Le regain d'intérêt est particulièrement récent puisqu'il vient en réponse aux problèmes posés par la modification des règlements concernant les rejets industriels dans l'atmosphère. Outre les composés classiques tels que H_2S, SO_2 et autres NO_x, la chasse aux composés organiques volatils ou COV est maintenant ouverte. Il ne fait aucun doute que cette technique risque de trouver un écho très favorable dans un proche avenir au niveau des recherches, les industriels devant se conformer aux nouvelles réglementations avant fin 1998 (Ceccaldi, 1993). Le développement de la bio-épuration apparaît donc comme une nouvelle perspective de par ses caractères économiques et sa facilité de mise en œuvre. Le champ des molécules à éliminer est maintenant élargi aux aldéhydes, alcools, cétones, acides carboxyliques, crésols, phénols, soufrés, amines cycliques, alcanes ou esters. Nombre de systèmes peuvent être envisagés.

Cependant, comme le fait remarquer G. Martin (1993), la bio-épuration a ses propres contraintes puisque l'ensemble du procédé

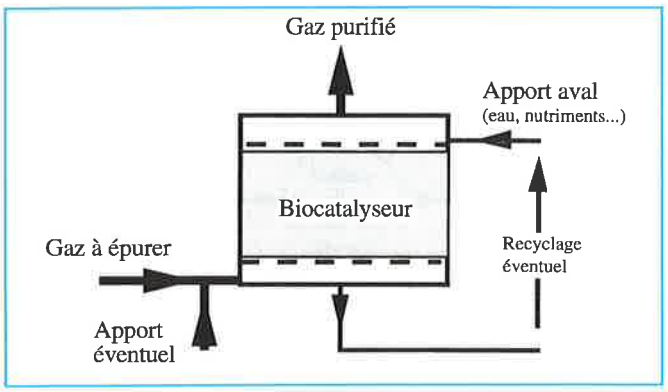

Figure 6 - **Descriptif d'un bio-filtre.**

doit tenir compte du réacteur, de son amont mais aussi de son aval qui peut devenir source de pollution (ex : augmentation des sulfates avec la croissance bactérienne dans un bio-filtre).

Actuellement, on peut citer en exemple la dégradation du trichloroéthylène par des cellules de *Methylocystis sp.* (Uchiyama et coll., 1992), la dégradation du pentane et de l'isobutane par des bactéries méthanotrophes (Davidson et Thompson, 1993) ou l'élimination des phénols par un bio-filtre utilisant *Pseudomonas putida* (Zilli et coll., 1992)(*figure 6*).

L'étude de la catalyse solide/gaz trouve donc ici tout son intérêt et son développement sur des systèmes utilisant des enzymes isolées doit aussi pouvoir venir en complément des systèmes utilisant des cellules entières. Cependant, l'hydratation du catalyseur est le paramètre limitant du système, puisque l'utilisation de cellules entières comme catalyseur implique souvent l'utilisation d'un niveau d'hydratation très élevée. Et comme nous l'avons vu, trop d'eau est souvent synonyme d'apparition d'une phase aqueuse liquide distincte, limitant ainsi de fait les transferts de matière de la phase gazeuse au biocatalyseur par la définition d'une nouvelle interface.

Les systèmes solide/gaz à enzymes isolées

Les systèmes à enzymes isolées représentent ainsi une simplification importante par rapport aux systèmes cellulaires. Tout leur potentiel n'a cependant pas encore été exploité. La littérature disponible reste relativement restreinte sur le sujet. Seules deux catégories d'enzymes ont été étudiées dans ces systèmes :
– les alcools oxydases et alcools déshydrogénases,
– les enzymes lipolytiques (lipases et cutinase).

Les travaux pionniers ont été effectués sur des alcools déshydrogénases (Pulvin et coll., 1986, 1988 ; Parvaresh et coll., 1990). La faisabilité portant sur l'utilisation continue du biocatalyseur et la régénération *in situ* du cofacteur a été démontrée par l'utilisation d'un alcool co-substrat. Les travaux postérieurs de Barzana et coll., 1987, 1989) sur l'oxydation d'alcools par l'alcool oxydase de *Pichia pastoris* en «batches» apportent quelques améliorations quant à l'augmentation de la stabilité en fonctionnement de cette classe d'enzyme.

Leurs expériences montrent que l'état d'hydratation de la préparation enzymatique a un effet antagoniste sur l'activité catalytique et la stabilité (Barzana et coll., 1987, 1989b). Un facteur 2 000 peut être gagné sur l'activité catalytique entre une

enzyme préalablement hydratée à $a_w = 0,1$ et une préparation hydratée à $a_w = 0,95$. Pour ces mêmes conditions d'hydratation, le temps de demi-vie chute alors d'un facteur 100 à 50 °C.

La stabilité du catalyseur peut être améliorée considérablement en considérant le schéma réactionnel de l'alcool oxydase :

$$\text{alcool} + O_2 \rightarrow \text{aldéhyde} + H_2O$$

L'addition de catalase ou de peroxydase à la préparation enzymatique permet d'accroître la stabilité en diminuant le risque d'oxydation (notamment des résidus cystéine) par des espèces chimiques telles H_2O_2 ou O_2^-.

De façon plus fondamentale, ces travaux permettent de mettre en évidence deux faits précis :

– Les problèmes d'hydratation du biocatalyseur dans ces systèmes sont similaires aux problèmes rencontrés dans des systèmes liquides non conventionnels. L'augmentation du niveau d'hydratation de la protéine fait diminuer l'énergie apparente d'activation de la réaction (favorise la bonne formation du complexe enzyme/substrat en améliorant la flexibilité de l'enzyme).

– L'interaction entre le substrat et l'enzyme se ferait effectivement avec les molécules sous forme gazeuse. Des tests réalisés avec la même enzyme supportée sur des supports ayant des capacités d'adsorption différentes pour l'éthanol présentent des comportements cinétiques identiques. De fait, l'intérêt de la catalyse solide/gaz concernant la diminution importante des transferts de masse est alors défini.

Un exemple concret, l'utilisation d'enzymes lipolytiques

L'attrait de ces enzymes réside dans la possibilité de catalyser différentes réactions en fonction de la disponibilité en eau du système. L'hydrolyse ou la réaction de synthèse peuvent être obtenues par une simple modification des paramètres thermodynamiques du système. Ainsi une baisse d'a_w permet-elle d'observer les différentes réactions dans l'ordre suivant :

Hydrolyse > alcoolyse > interestérification > estérification.

Ce panel de réactions disponibles suivant les conditions d'hydratation ouvre donc un champ d'application important quant à la production de molécules tels les arômes ou les fragrances notamment. La méthodologie d'utilisation dans un tel système est de surcroît relativement aisée. Un réacteur continu solide/gaz nécessite deux parties distinctes dans sa conception. La première est destinée à réaliser un mélange gazeux de composition définie, permettant de fixer de façon précise les activités thermodynamiques pour chaque constituant au sein du réacteur. Enfin, la deuxième partie représente le réacteur proprement dit. Un simple lit fixe percolé en continu peut être suffisant pour bon nombre d'applications.

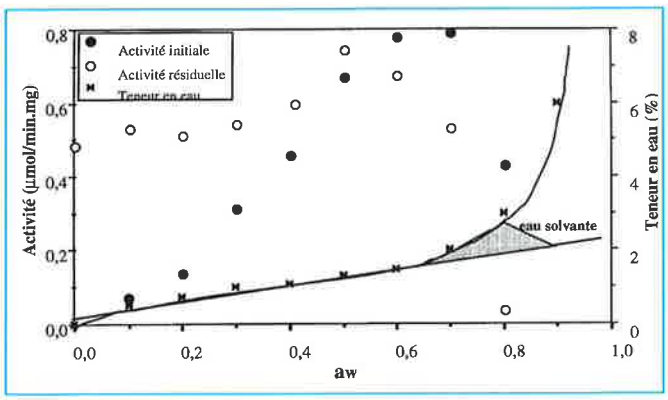

Figure 7 - **Effet de l'a_w sur l'activité et la stabilité de la lipase de *Candida cylindracea* adsorbée sur Chromosorb P testée en réaction de transestérification entre le propionate de méthyle et le n-propanol en réacteur continu (1 mg d'enzyme, $a_{ester} = a_{alcool} = 0,2$, T = 70 °C).**

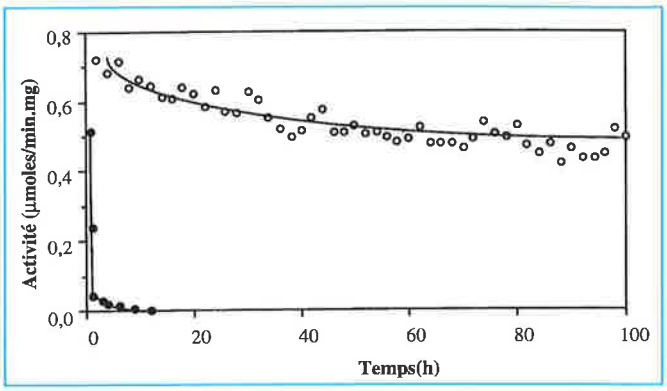

Figure 8 - **Effet de l'a_w sur la stabilité de la lipase de *Candida cylindracea* adsorbée sur Chromosorb P testée en réaction de transestérification dans un réacteur continu (1 mg d'enzyme, $a_{ester} = a_{alcool} = 0,2$, T = 70 °C, • $a_w = 0,8$, o $a_w = 0,7$).**

Les *figures 7* et *8*, relatives à l'utilisation d'une lipase fongique non thermostable (*Candida rugosa*) catalysant en continu une réaction de transestérification (alcoolyse), mettent clairement en évidence l'importance de l'eau et sur la catalyse, et sur la stabilité en fonctionnement.

Sur la *figure 7*, on voit clairement, en relation avec l'isotherme de sorption que l'optimum d'activité catalytique est obtenu pour une hydratation maximale du catalyseur, situé juste avant l'apparition d'une phase aqueuse distincte représentée par une brusque augmentation de la teneur en eau du catalyseur pour un niveau d'hydratation supérieur. Une fois cet optimum d'hydratation dépassé, la vitesse catalytique chute alors brutalement. Cette perte d'activité est irrémédiable et est le fruit de la thermodénaturation du catalyseur par l'action combinée de l'eau et de la température, comme le montre la courbe d'activité résiduelle, mesurée à l'optimum d'hydratation après 24 h d'utilisation continue aux différentes conditions d'hydratation initiales.

Il apparaît aussi sur la *figure 7* alors qu'un faible niveau d'hydratation n'a qu'un effet sur la vitesse catalytique et qu'après 24 h de fonctionnement, en replaçant le catalyseur, il est possible de recouvrer environ 60 à 70 % de l'activité maximale observable. Cette valeur correspond d'ailleurs à la perte d'activité observée à une hydratation optimale (*figure 8*). La *figure 8* souligne aussi clairement l'importante dénaturation thermique observable lorsque le niveau d'hydratation est trop important puisque le temps de demi-vie à une a_w de 0,8 est de l'ordre de 15 à 30 min, alors que l'enzyme correctement hydratée conserve plus de 60 % de son activité initiale après 100 h de fonctionnement.

Ainsi, l'attrait de la catalyse solide/gaz apparaît concernant la possibilité d'une hydratation précise en continu d'un biocatalyseur et l'acquisition d'un caractère thermostable pour une enzyme sensible à la température dans un système liquide où l'eau est disponible.

L'effet de l'eau ne se limite cependant pas aux seules modifications de stabilité et d'activité catalytique en terme de vitesse de réaction. La *figure 9* donne un exemple d'un comportement cinétique particulier avec des effets de seuils pour une réaction d'hydrolyse catalysée par une cutinase (estérase) en catalyse solide gaz. Ces résultats mettent en exergue l'importance de l'eau quant à la capacité d'une enzyme à reconnaître, fixer son substrat et catalyser la réaction. Ce comportement cinétique particulier peut d'ailleurs s'expliquer par une modification de la polarité du site actif en fonction des conditions d'hydratation/solvatation. En termes simples, lorsque le site catalytique est correctement hydraté (cas des niveaux d'hydratation les plus importants), le comportement cinétique est proche de celui d'une enzyme testée en solution aqueuse. Lorsque le niveau d'hydratation baisse, il existe alors une compétition entre le substrat et l'eau pour la solvatation du site actif, entraînant une modification des forces de faible énergie nécessaires au positionnement correct du substrat dans le site actif. La catalyse ne devient alors possible qu'en «forçant» le substrat dans le site actif, c'est-à-dire en augmentant l'activité thermodynamique du substrat. L'explication de ce phénomène n'a pu être réalisée qu'en étudiant, dans les mêmes conditions d'hydratation le comportement cinétique de la même enzyme pour une réaction de transestérification ne faisant pas intervenir l'eau dans le schéma réactionnel.

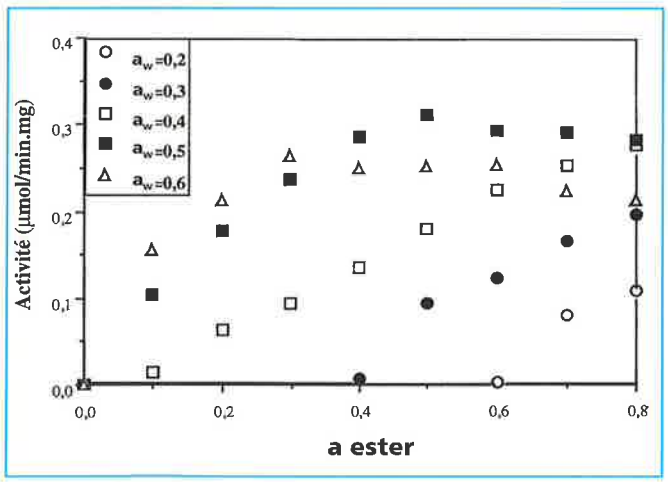

Figure 9 - **Évolution de l'activité catalytique pour la réaction d'hydrolyse du propionate de méthyle en fonction de a_{ester} pour différentes a_w par la cutinase de *Fusarium solani* en réacteur continu.**

La catalyse solide/gaz : une nanotechnologie ?

Comment doit-on considérer la catalyse solide/gaz aujourd'hui ? Ne s'agirait-il que d'une curiosité de laboratoire ? La réponse à cette dernière question est bien évidemment négative. Les réacteurs développés apparaîssent aujourd'hui comme des outils d'investigation puissants pour avancer dans la connaissance de l'influence du micro-environnement sur la catalyse enzymatique.

Tout d'abord, la compréhension du rôle de l'eau dans ses interactions avec les macromolécules nécessite une méthodologie stricte. Peut-on encore parler de niveau d'hydratation d'une protéine aujourd'hui en l'exprimant simplement par une teneur en eau ? La réponse est non et l'activité de l'eau doit maintenant s'imposer dans les mentalités pour pouvoir comprendre et expliquer de la façon la plus rationnelle possible l'importance de cette espèce chimique indispensable.

L'activité thermodynamique de chaque constituant permet de définir un état pour un système. Cette définition reste cependant globale et ne rend pas forcément compte de phénomènes beaucoup plus subtils. Une des questions les plus troublantes consiste à se demander ce que signifient les optimums d'hydratation observés dans les milieux dits non conventionnels, ou plus précisément, quelles sont les interactions réellement vitales entre l'eau et une enzyme pour que la structure et la capacité catalytique soient préservées ?

La catalyse solide/gaz est donc clairement une nanotechnologie et apparaît comme une technique puissante grâce à laquelle il devient possible de limiter le système d'étude à la macromolécule et son environnement immédiat.

Si on compare en effet ce système solide/gaz aux systèmes liquides par exemple, force est de constater qu'il n'existe pas d'espèce chimique prédominante, et ce précisément à cause de la différence des volumes molaires.

Concernant les résultats ayant trait à la lipase et à la cutinase présentés précédemment, un réacteur de 150 µl de volume utile au niveau laboratoire chargé avec 1 mg de cutinase, soit environ 5.10^{-8} mole, contient environ 6.10^{-6} mole de gaz. En travaillant avec des composés à des pressions partielles de l'ordre de 0,025 à 0,2 atm, les rapports entre le nombre de molécules d'enzymes et le nombre des molécules présentes dans la phase gazeuse constituant le milieu réactionnel ne diffèrent que d'un ou deux ordres de grandeur.

Nombre de recherches fondamentales s'engagent aujourd'hui sur la voie de la compréhension au niveau moléculaire des interactions entre une protéine et ses différents ligands. Un tel système d'étude peut peut-être alors se définir comme un outil performant dans cette optique.

La catalyse solide/gaz : une technologie industrielle ou analytique ?

La catalyse solide/gaz peut-elle prétendre à un développement industriel ? Ce procédé de catalyse présente des avantages non négligeables, tels que de pouvoir travailler de façon continue, avec des substrats purs et à activité de l'eau contrôlée.

Nombre d'applications peuvent être développées. La dépollution d'effluents gazeux est un domaine d'application potentielle. Les productions d'esters volatiles, d'aldéhydes ou de cétones à caractère aromatique peuvent aussi être envisagées, avec en arrière-plan la possibilité de prétendre plus facilement au label «naturel» sur le produit de par l'absence de solvant organique dans ce procédé

D'un point de vue technique, les performances de ce type de réacteur sont en effet très intéressantes. La synthèse d'acétate de butyle de façon continue à partir d'acide acétique glacial et de 1-butanol a été réalisée à l'échelle du laboratoire, avec un taux de transformation de 100% sur chacun des substrats, et une productivité de l'ordre de 15µmoles/min pour 100 mg d'une préparation enzymatique commerciale. Certains chiffres sont éloquents. Le temps de séjour était d'environ 0,15 s et l'activité catalytique était

toujours stable après 24 h de fonctionnement continu. Un rapide calcul indique une productivité sans optimisation de 9,15 t/an pour un réacteur d'un litre de volume utile.

Enfin, d'autres développements de cette technique à des fins analytiques sont envisageables de façon rationnelle. L'utilisation des seuls mécanismes de reconnaissance entre une enzyme et son substrat (ou un anticorps et son antigène) suffit pour développer le concept de chromatographie d'affinité en phase gazeuse par exemple. L'utilisation de l'activité catalytique pourrait tout aussi bien ouvrir la voie au développement de précolonnes de dérivatisation pour la chromatographie en phase gazeuse.

Bibliographie

Affleck R., Xu Z.F., Suzawa V., Focht K., Clark D., Dordick J., Enzymatic catalysis and dynamics in low water environments, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1992**, *89*, p. 1100-1104.

Ahern T., Klibanov A.,Why do enzymes irreversibly inactivate at high temperature ?, Protein Structure, Folding and Design, **1986**, p. 283-289.

Barzana E., Klibanov A., Karel M., Enzyme-catalysed gase-phase reactions, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1987**, *15*, p. 25-34.

Barzana E., Klibanov A., Karel M., Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase, *Biotechnol. Bioeng.*, **1989a**, *34*, p. 1178-1185.

Barzana E., Klibanov A., Karel M., A colorimetric method for the enzymatic analysis of gases : the determination of ethanol and formaldehyde vapors using solid alcohol oxydase, *Anal. Biochem.*, **1989 b**, *182*, p. 109-115.

Bernetti R., Kochan S., Pienkowski J.,Karl-Fischer determinations of water in oil and fats : International collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1984**, *67*, p. 299-301.

Ceccaldi P., La bioépuration de l'air promise à un bel avenir, *Biofutur*, septembre **1993**, p. 20-21.

Davison B., Thompson J., Sustained degradation of n-pentane and isobutane in a gas-phase bioreactorr, *Biotechnol. Lett.*, **1993**, *15*, p. 633-636.

de Bont J. et van Ginkel C., Ethylene oxyde production by immobilized *Mycobacterium* PY1 in a gas-solid bioreactor., *Enzyme. Microbiol. Technol.*, **1983**, *5*, p. 55-59.

Deetz J., Rozzel J., Enzyme-catalysed reactions in non-aqeous media, *Tibtech*, 1988, 6, p. 15-19.

Drapron R., Enzyme activity as a function of water activity, *in Properties of water in foods*, Simatos D. and Multon J. (Eds), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Pays Bas, **1985**, p. 171-182.

Duff S., Murray W., Extruded Pellets of Pichia pastoris : a practical biocatalyst for use in aqueous, organic and vapour phase oxydationss, *Process Biochemistry*, April **1990**, p. 40-42.

Finney J., Poole P., Protein hydration and enzyme activity : the role of hydration-induced conformation and dynamics changes in the activity of lysozyme, *Comments Mol. Cell. Biophys.*, **1984**, *2*, p.129-151.

Gaertner H., Puigserver A., Protein-protein interaction in low water organic media, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, *36*, p. 601-607.

Gupta M.,Thermostabilization of proteins, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1991**, *14*, p. 1-11.

Halling P., Effect of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems, *Enzyme. Microb. Technol.*, **1984**, *6*, p. 513-515.

Halling P., Organic liquids and biocatalysts : theory and practice, *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, *7*, p. 50-51.

Halling P.,Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventionnal media : theory, tests and recommendations for experimental design and analysis., *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, *16*, p. 178-206.

Hahn-Hagerdäl B.,Water activity : a possible external regulation in biological processes, *Enzyme Microb. Technol.*, **1986**, *8*, p. 322-327.

Hartsough D., Merz K., Protein flexibility in aqueous and nonaqueous solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, p. 10113-10116.

Hartsough D., Merz K., Protein Dynamics and solvation in aqueous and nonaqueous environments, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, p. 6529-6537.

Hou C., Propylene oxyde production from propylene by immobilized whole cells of *Methylosinus sp.* CRL31 in a gas-solid bioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1984**, *19*, p. 1-4.

Khmelnitski Y., Levashov A., Klyachko N., Martinek K., Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content, *Enzyme. Microb. Technol.*, **1988**, *10*, p. 710-724

Klibanov A., Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents, *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, *14*, p. 141-144.

Lamare S., Legoy M.D., Biocatalysis in the gas phase, *Trends in Biotechnol.*, **1993**, *11*, 10, (117), p. 413-418.

Lamare S., Legoy M.D.,Working at controlled water activity in a continuous process : the gas/solid system as a solution, *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, *45*, p. 387-397.

Lamare S., Legoy M.D., Solid Gas biocatalysis : How to fully define the system ?, *Biotechnol. Techniques.*, **1995**, *9*, p. 127-132.

Liu R., Langer R., Klibanov A., Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state, *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, *37*, p. 177-184.

Luisi P., Giomini M., Pileni M., Robinson M., Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules, *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**, *947*, p. 209-246.

Macleod S., Moisture determination using Karl-Fischer titrations, *Anal. Chem.*, **1993**, *63*, p. 557-566.

Martin G., Amosphère, atmosphère !, *Biofutur*, septembre **1993**, p. 22-28.

Martinek K., Levashov A., Klyachko N., Khmelnitski Y., Berezin I., Micellar enzymology, *Eur. J. Biochem.*, **1986**, *155*, p. 453-468.

Mathews C., van Hold K.,The role of water in biological processes, *in Biochemistry*. The Bejamin/Cummings publishing company (Eds), Redwwod City. USA., **1990**, p. 30-53.

Parvaresh F., Robert H., Thomas D., Legoy M.D.,Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolitic enzymes, *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *39*, p. 467-473.

Poole P., Finney J., Hydration-induced conformation and flexibility changes in lysozyme at low water content., *Int. J. Biol. Macrobiol.*, **1983**, *5*, p. 380-311.

Pulvin S., Legoy M.D., Lortie R., Pensa M., Thomas D., Enzyme technology and gas phase catalysis : alcohol dehydrogenase example, *Biotechnol. Lett.*, **1986**, *8*, 11, p. 783-784.

Pulvin S., Parvaresh F., Thomas D., Legoy M.D., Solid-Gas reactors. A comparison between horse liver and the thermostable *sulfolobus solfataricus* ADH, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1988**, *545*, p. 434-439.

Robert H., Lamare S., Parvaresh F., Legoy M.D. (1992), The role of water in gaseous biocatalysis, *Prog. Biotechnol.*, **1992**, *8*, p. 23-29.

Ryu K., Dordick S., How do organic solvents affect peroxydase structure and function ?, *Biochemistry*, **1992**, *31*, p. 2588-2598.

Sreenivasan U., Axelsen P., Buried water in homologous serine proteases, *Biochemistry*, **1992**, *31*, p. 12785-12791.

Uchiyama H., Oguri K., Yagi O., Kokufuta E.,Trichloroethylene degradation by immobilized resting-cells of *Methylocystis sp.* M in a gas-solid bioreactor, *Biotechnol. Lett.*, **1992**, *14*, p. 619-622.

Valivety R., Halling P., Macrae A., Effect of water activity on rate of lipase catalysed esterification, *Prog. Biotechnol.*, **1992b**, *8*, p. 549-555.

Valivety R., Halling P., Macrae A., Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependance on water activity in different organic solvents, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992b**, *1118*, p. 218-222.

Volkin D., Staubli A., Langer R., Klibanov A., Enzyme thermoinactivation in anhydrous rganic solvents, *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, *37*, p. 843-853.

Waks M., (non cité), Proteins and peptides in water-restricted environments, *Proteins, Structure, Function and genetics*, **1986**, *1*, p. 4-15.

Yagi T., Tsuda M., Mori Y., Inokuchi H., Hydrogenase Activity in the dry state, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, p 2801.

Yang P.-H., Rupley J., Proteins-water interactions. Heat capacity of the lysozyme-water system, *Biochemistry*, **1979**, *18*, p. 2654-2661.

Zaks A., Klibanov A., Enzymatic catalysis in organic media at 100°C, *Science*, **1984**, *224*, p. 1249-1251.

Zaks A., Klibanov A., Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, p. 3192-3196.

Zilli M., Converti A., Lodi A., Del Borghi M., Ferraiolo G., Phenol removal from wate gases with a biological filter by *Pseudomonas putida*, *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *41*, p. 693-699.