

3. Enzymes immobilisées

3.1. Généralités

L'utilisation des enzymes en solution pose des problèmes, surtout économiques, pour de nombreuses applications. Pour compenser les problèmes liés à l'instabilité des enzymes au cours d'extraction ou d'utilisation, il est nécessaire de les immobiliser artificiellement. Ainsi immobilisées, sur des supports solubles ou insolubles, ces catalyseurs offrent la possibilité d'une utilisation répétée dans des domaines très variés.

Un des buts majeurs de l'immobilisation enzymatique, particulièrement pour des applications analytiques, est un accroissement de la durée de vie de l'enzyme.

Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en **surface** ou à **l'intérieur** d'un support solide.

On cherche généralement à conserver son activité enzymatique, qui a tendance à diminuer après immobilisation du fait de possibles gênes stériques et de limitations dans l'accessibilité au site actif et à augmenter sa stabilité dans le temps.

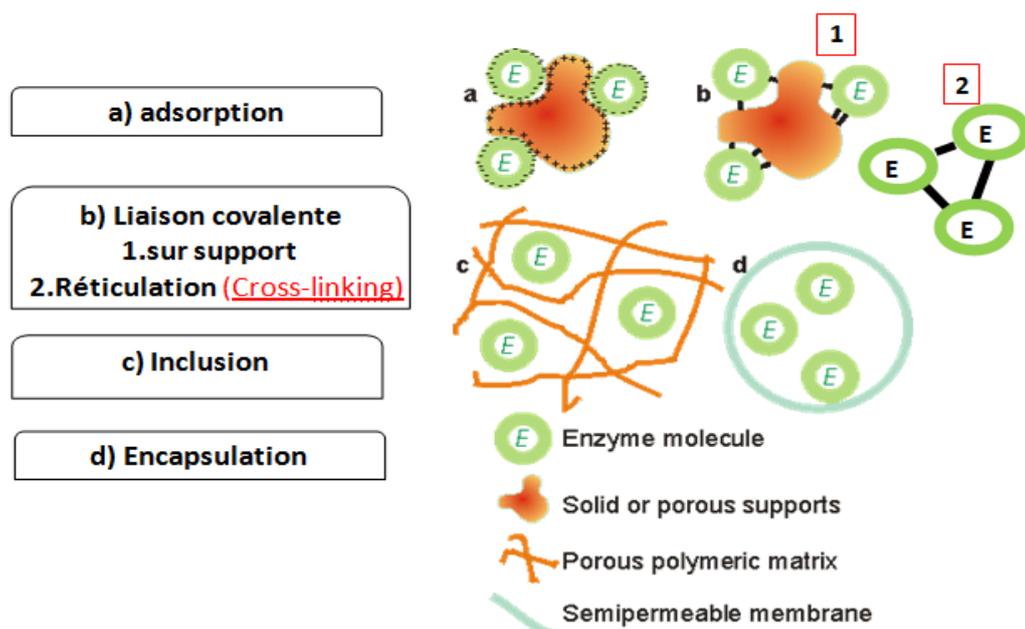
3.2. Méthodes d'immobilisation des enzymes

Principales méthodes d'immobilisation des enzymes sont:

- l'adsorption sur support inerte
- le piégeage physique dans des gels ou dans des microencapsulations
- la réticulation avec des réactifs bi ou multivalents
- la liaison covalente entre un porteur et des groupes fonctionnels de l'enzyme.

Le choix de la technique dépend :

- du type d'enzyme utilisée,
- du transducteur et de l'environnement dans lequel le biocapteur fonctionne.
- aussi des stabilités mécaniques et chimiques de la matrice et de son coût.
- de l'application finale donnée à l'enzyme



3.2.1. Immobilisation d'enzyme par inclusion

Les molécules d'enzyme 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.

On utilise comme matrice pour l'inclusion plusieurs polymères :

- **Gel à partir des polymères naturels:** l'alginate, carraghénane, chitosane, ...etc.
- **Gels à partir des polymères synthétiques:** le gel de polyacrylamide, fibres de polyacétate de cellulose.

La méthode d'immobilisation par inclusion présente les avantages d'être simple et économique, et de s'appliquer à des enzymes extrêmement divers (glucose oxydase, invertase, aminoacylase, amylase). Mais cette méthode présente de sérieux inconvénients : une fraction non négligeable de l'enzyme emprisonné a tendance à passer en solution au cours de l'utilisation et, par ailleurs, cette méthode n'est utilisable que pour des substrats de petite taille (masse moléculaire < 5 000).

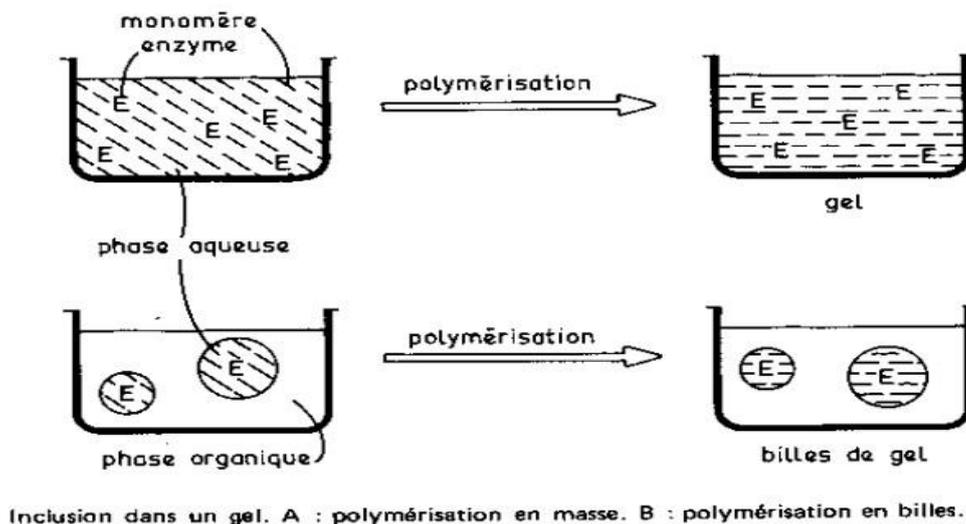


Figure : inclusion dans un gel

3.2.2. Immobilisation par adsorption

L'adsorption constitue la méthode la plus économique d'immobilisation des enzymes, c'est la plus simple et la plus rentable. Elle consiste à assurer la rétention de la molécule enzymatique à la surface d'un support insoluble, par interaction faible entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. L'interaction enzyme-support pourra impliquer l'ensemble des liaisons non covalentes ou secondaires de bas niveau énergétique tel que les liaisons de Vander Waals et des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles).

Les supports adsorbants utilisés sont très variés, tant du point de vue de leur structure chimique que du point de vue de leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité, etc.):

- **Les supports organiques :** comprennent les polysides comme l'acétate de cellulose, nitrate de cellulose, dextrane, agarose, alginate et les polymères comme le polystyrène, le polyéthylène...
- **Les supports inorganiques (support minéraux) :** comme la kaolinite, le verre poreux, des oxydes et des sels minéraux. Ce sont généralement plus stables, résistent l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries.

3.2.3. Immobilisation par liaison covalente

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

3.2.3.1. 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.

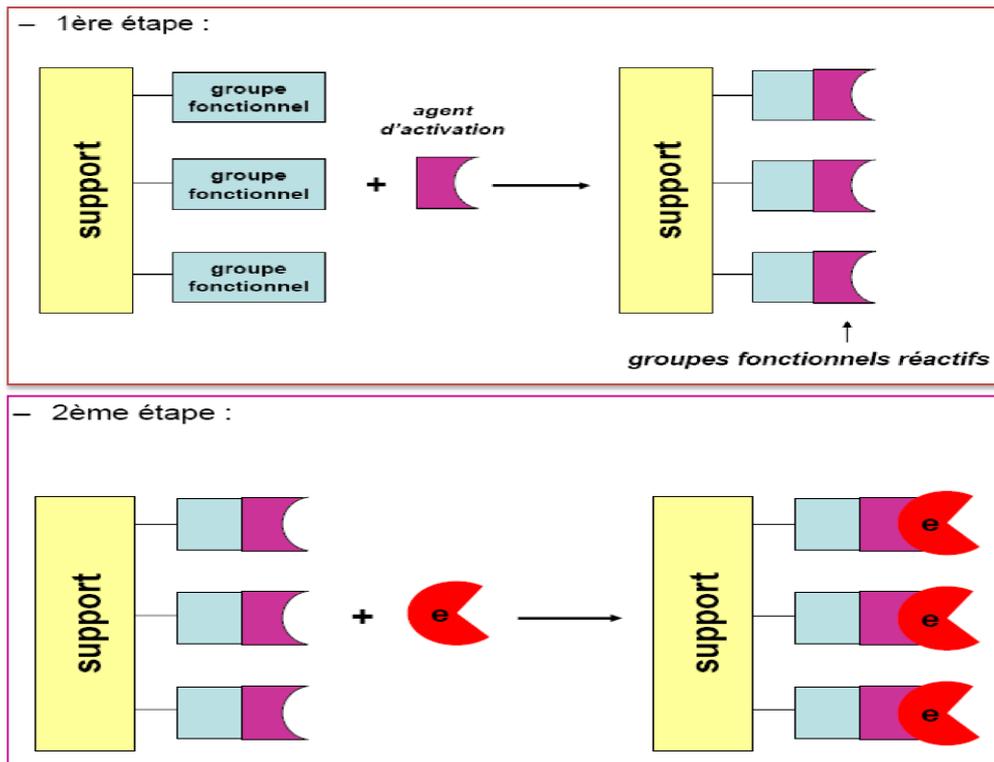


Figure : Immobilisation par liaison covalente

étap1: activation du support, étape 2: fixation de l'enzyme

3.2.3.2. Immobilisation par réticulation (sans support)

C'est un procédé d'association des différentes unités biocatalytiques ou de protéines à l'aide d'un agent réticulant. Elle peut être effectuée après inclusion ou adsorption afin de stabiliser l'enzyme immobilisée et limiter les phénomènes de fuites ou de désorption. Une très importante perte d'activité enzymatique accompagne la réticulation. L'agent réticulant le plus utilisé est le **glutaraldéhyde** ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$).

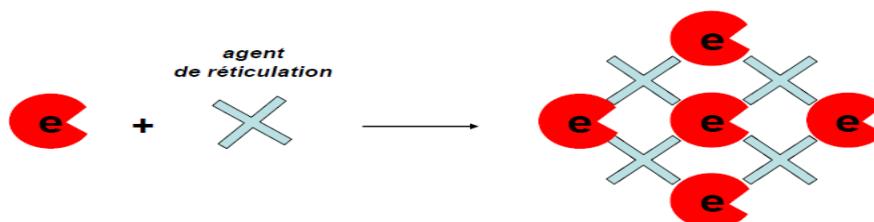


Figure : Immobilisation par réticulation (sans support)

3.3. Domaines d'applications des enzymes immobilisées

Les enzymes immobilisées sont susceptibles d'applications particulièrement nombreuses et diversifiées :

➤ L'agroalimentaire

- Production d'acides aminés de la série *L* à l'aide d'une amino-acide acylase immobilisée.
- Production de glucose et de galactose, par hydrolyse du lactose au moyen de lactase immobilisée.
- Production de fructose en utilisant glucose isomérase immobilisée.
- Amélioration des propriétés de boissons alimentaires : viscosité, clarification, digestibilité, goût, etc
- Amélioration de la production de produits lactés : désodorisation du lait UHT par la sulphydryloxydase sur verre poreux.

➤ La médecine

- Des papiers imprégnés de solutions enzymatiques sont utilisés dans certains tests cliniques (dosage du cholestérol, de l'acide urique, des hormones...).
- Les techniques ELISA utilisent également des enzymes fixées (liées à des anticorps eux-mêmes fixés par adsorption sur les parois de petites cuvettes en plastiques), destinées à des dosages cliniques.

➤ La chimie industrielle et pharmaceutique

- Production d'acides divers (lipase, pénicilline amidase).
- Modification de la structure d'antibiotique : production d'acide 6-aminopénicillanique (6-APA), au moyen d'une pénicilline acylase immobilisée.
- Synthèse de nucléotides par une ribonucléase immobilisée.

➤ Autres secteurs

- Textile, blanchissage, tannerie, etc.

3.4. Exemples d'utilisation des enzymes immobilisées

A. La synthèse d'antibiotiques est un exemple d'application des enzymes immobilisées dans l'industrie pharmaceutique. La penicillinase (β -lactamase-EC3.5.2.6) immobilisée est utilisée pour la conversion de la pénicilline-G ou V en acide 6-amino pénicillinique (6-APA). L'ampicilline est produite à partir du 6-APA avec la penicilline-G amidase (EC3.5.1.11) immobilisée (CLEA).

B. Les enzymes immobilisées sont aussi utilisées comme biosenseurs (mesure de la concentration de molécules dans les fluides corporels). Un biosenseur (aussi appelé biocapteur) est un dispositif analytique particulier constitué d'un élément sensible biologiquement actif (enzymes, cellules, anticorps...) et d'une partie électronique. Le principe de fonctionnement est simple : l'élément biologique interagit avec le substrat à analyser. Il est associé à un système de transduction (capteur) convertit la réponse biochimique en un signal électrique.

Les biocapteurs enzymatiques sont les plus utilisés et les plus commercialisés. Les enzymes utilisées sont les enzymes REDOX (réductases, oxydases, oxydo-réductases) et les enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, estérases).

- ✓ Un exemple commun d'un biocapteur est le glucomètre utilisé par les diabétiques pour mesurer la concentration de glucose dans le sang (glycémie). L'élément sensible de ce biocapteur est une enzyme, la glucose oxydase (GOD ou GOx) immobilisée, qui convertit le glucose en acide gluconique selon la réaction suivante: β D Glucose + O₂ => Acide gluconique + H₂O₂

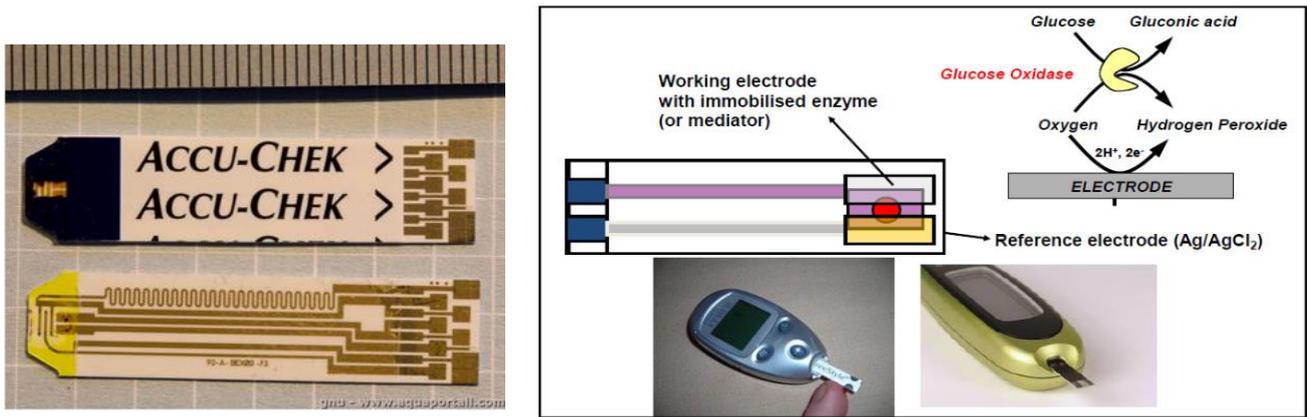


Image : Un biocapteur pour le glucose dans le sang (glucomètre).

- ✓ La concentration de pénicilline dans un bioréacteur, dans lequel des souches fongiques sont cultivées, peut être déterminée avec un biocapteur. Le composant biologique du capteur utilisé dans ce cas représente l'enzyme acylase. Cette enzyme clivant la pénicilline est placée sur une membrane qui repose sur une électrode de pH. Si la concentration de pénicilline dans le milieu augmente maintenant, l'enzyme clive des quantités de plus en plus grandes d'un acide, l'acide phénylacétique. En conséquence, le pH à l'électrode change. Il est donc maintenant possible de conclure du pH sur la concentration de pénicilline.