

Propriétés des enzymes immobilisées

D'après l'étude des méthodes d'immobilisation (chapitre précédent) on peut dire qu'afin d'arriver à une bonne performance dans le choix d'une méthode d'immobilisation, il faut connaître les propriétés de l'enzyme et ceux du support.

1. Paramètres caractéristiques des enzymes :

- *Propriétés biochimiques :*
 - ~ Poids moléculaire ;
 - ~ Les groupements fonctionnels sur la surface protéique ;
 - ~ Pureté (inactivation / protection contre les impuretés).

- *Paramètres cinétiques :*
 - ~ Activité spécifique ;
 - ~ Profile de pH et de température ;
 - ~ Paramètres cinétiques pour l'activité et l'inhibition ;
 - ~ Stabilité enzymatique envers le pH, température, solvants, contaminants, impuretés....

2. Propriétés du support :

- *Caractéristiques chimiques :*
 - ~ Composition et base chimique ;
 - ~ Groupements fonctionnels et comportement de gonflement ;
 - ~ La taille des pores et le volume accessible de la matrice ;
 - ~ La stabilité chimique du support.

- *Propriétés mécaniques :*
 - ~ Diamètres des particules ;
 - ~ Comportement de compression de chaque particule ;
 - ~ Résistance du flux ;
 - ~ Abrasion.

1. Propriétés des enzymes immobilisées :

Ainsi, l'immobilisation des enzymes conduit souvent à un changement de leurs propriétés physiques, chimiques et cinétiques :

Propriétés physicochimiques :

- Amélioration de la stabilité dans le temps ;
- La résistance vis-à-vis de la dénaturation.

Propriétés cinétiques :

- Le microenvironnement conditionne toute l'activité catalytique de l'enzyme ;
- Les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site enzymatique ; ce qui entraîne une variation de la vitesse maximale (V_m) et la constante de Michaelis (K_m) ;
- Le pH de l'enzyme peut être modifié lorsque la réaction met en jeu une libération ou une consommation de protons.

2. Notion de stabilité :

On distingue quatre types de stabilité pour une enzyme immobilisée :

- **Stabilité de stockage :**

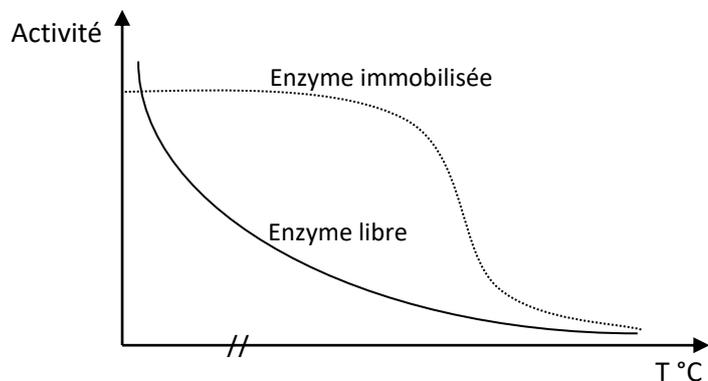
C'est l'évolution de l'activité enregistrée dans les conditions usuelles de conservation. Cette stabilité est attribuée à un accroissement de la rigidité de la molécule d'enzyme.

- **Stabilité opérationnelle :**

C'est l'évolution de l'activité enzymatique pendant des essais répétitifs. Certaines enzymes immobilisées sont plus stables au cours d'un fonctionnement continu et certaines d'autres au cours d'un fonctionnement discontinu.

- **Stabilité thermique :**

C'est la résistance à des températures plus élevées auxquelles l'enzyme est normalement dénaturée.



- **Stabilité vis-à-vis les variations du pH**

Généralement, l'état d'ionisation du support définit la zone de stabilité vis-à-vis les variations du pH :

- ✓ Les enzymes immobilisées sur des supports cationiques sont stables dans les zones de pH basique.
- ✓ Les enzymes immobilisées sur des supports anioniques sont stables dans les zones de pH acides.

En outre, certaines techniques confèrent aux enzymes une résistance à l'action de certaines substances telles que :

- **Les effecteurs et les composés dénaturants :**

La sensibilité des enzymes immobilisées aux inhibiteurs et aux activateurs peut différer notablement de celles des formes solubles. Cette différence est due à l'interaction de l'effecteur avec le support et non à son action directe.

3. Notion de partage et de diffusion :

L'immobilisation des enzymes crée deux environnements : macroenvironnement et microenvironnement ; d'où l'apparition de deux phénomènes physique dans le milieu ; partage et diffusion. Le premier résulte de l'interaction entre les réactants et le microenvironnement. Le deuxième est dû à la mobilité des réactants dans les deux environnements.

Partage :

C'est le comportement des particules (corps solide) en présence de deux liquides non miscibles. Ceci crée un gradient discontinu en concentrations des réactants.

Diffusion :

C'est le déplacement (transfert) d'une molécule ou d'une particule d'un compartiment où sa concentration est élevée vers un autre où elle est à faible concentration. La diffusion sera d'autant plus rapide que l'écart de concentration entre les deux compartiments est plus grand. Donc, il y a création d'un gradient continu en concentrations des réactants.

4. Cinétiques des réactions enzymatiques catalysées par des enzymes immobilisées :

4.1. Effets du transfert de masse sur la cinétique enzymatique :

La restriction de la mobilité des solutés se rapporte à des effets de transfert de masse qui peuvent être le premier à réduire la vitesse de la réaction et, par conséquent, diminuer l'efficacité de l'enzyme immobilisée comparée à celle libre.

On distingue généralement deux types de transfert de matière (transport diffusionnel) :

- **Les transferts de matières externes :**

C'est le transport des molécules de la solution à la surface d'une particule (supports non poreux).

- **Les transferts de matières internes :**

C'est le transport des molécules à l'intérieur d'une matrice (supports poreux, gel, membrane...).

4.2. Equation fondamentale de couplage :

Au voisinage de la surface du support, où les enzymes sont immobilisées, la concentration du substrat diminue et celle du produit augmente. Il s'établit un gradient de concentration.

La vitesse de diffusion du substrat ou du produit est généralement du même ordre de grandeur ou inférieure à celle de la réaction enzymatique.

A l'état stationnaire, le flux de substrat (J_s) est égal à la vitesse de la réaction : $J_s = v$

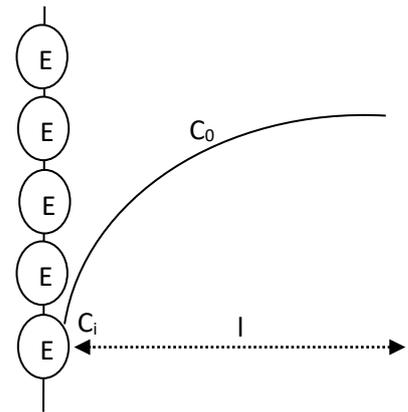
La figure ci-contre montre des molécules d'enzyme fixées à un support rigide :

La courbe indique le gradient de concentration de substrat.

Où :

C_0 : la concentration du soluté au voisinage de la surface

C_i : la concentration du soluté à une distance l



D'après les deux lois de FICK (de diffusion des particules de soluté dans une solution), on arrive à l'expression suivante du flux :

$$J_s = h_d(c_0 - c_i) \quad \text{en posant : } h_d = D/l$$

Où :

D : coefficient de diffusion

l : la distance courue par la particule de soluté qui diffuse

Considérons une enzyme fixée sur une surface imperméable, membrane ou support solide. Dans le cas le plus simple d'une enzyme michaelienne, l'équation de la vitesse est donnée par la relation : $V = V_m \cdot S_l / (K_m + S_l)$ (S_l est la concentration locale de substrat)

Le flux net de substrat qui atteint l'enzyme immobilisée est donné par la relation :

$$J_s = h_d(S_0 - S_l)$$

Où :

S_0 : la concentration de substrat dans la solution

S_l : la concentration de substrat localement

4.2. Simplification des calculs (cinétique des enzymes immobilisées) :

En posant V_m et K_m les paramètres cinétiques d'une enzyme native en solution et V_m' et K_m' ses paramètres modifiés par l'immobilisation, on peut faire des calculs généraux sur le comportement cinétique des enzymes immobilisées.

La vitesse moyenne observée par unité de volume de support est donnée par la relation :

$$V = 1/\text{vol} \cdot \int (V_m' \cdot [S] / (K_m' + [S])) \cdot d\text{vol}$$

Le module de **Thiele** permet de caractériser les contraintes diffusionnelles en comparant la vitesse de la réaction (V_m/K_m) et la vitesse de diffusion (D/R^2) :

$$\phi = R^2 \cdot V_m' / D \cdot K_m'$$

Où :

R : rayon du support

D : coefficient de diffusion du substrat dans le support

En fait, si $\phi > 1$, les contraintes diffusionnelles sont importantes.

L'importance de l'influence du transfert de masse est usuellement exprimée par le facteur d'efficacité ou **rendement (η)** :

$$\eta = V_{\text{imm}} / V_{\text{libre}}$$

Où V_{imm} et V_{libre} sont les vitesses de réaction catalysée par la même concentration d'enzyme (immobilisée et libre) et sous des conditions identiques.