

Immobilisation des enzymes

1. Définition d'enzyme immobilisée:

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

2. Propriétés des enzymes immobilisées

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

2.1. Propriétés physico-chimiques:

Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support. Ainsi, les enzymes fixées par la liaison sulfonamide sont moins stables que celles fixées par liaison azo.

2.2. Propriétés cinétiques:

L'immobilisation des enzymes affecte leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de la réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion limitent l'accès du substrat au niveau du site actif. Ceci a pour conséquence une variation de la vitesse maximale V_M et de la constante de Michaelis K_M de l'enzyme ; cette dernière constante pouvant avoir une valeur 10 fois supérieure. De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons.

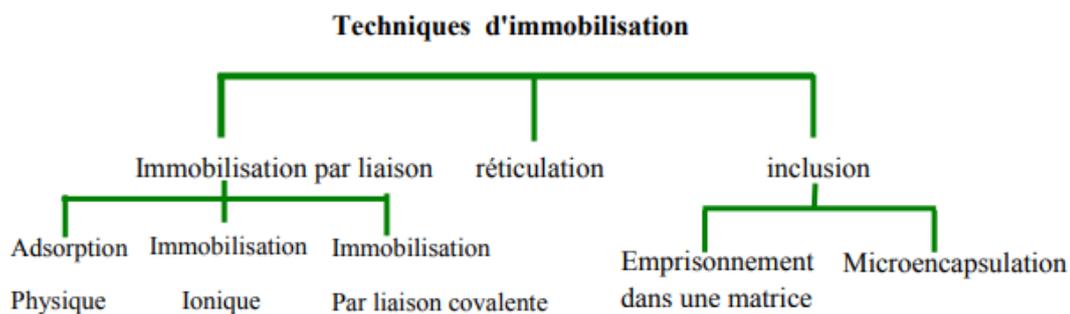
3. Techniques d'immobilisation

Les enzymes présentent un fort intérêt dans le domaine de la biocatalyse. Cependant, leur coût et leur stabilité limitée dans le temps sont des facteurs limitant leur utilisation industrielle. Afin de palier ces inconvénients, une stratégie fut proposée : l'immobilisation des enzymes qui permet de stabiliser celles-ci au cours de leur

utilisation, de pouvoir les réutiliser et de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique. En 1916, Nelson et Griffin seront les premiers à démontrer qu'une enzyme, en l'occurrence l'invertase, conserve son activité catalytique et ce même après avoir été immobilisée par adsorption sur du charbon actif. Cette technique connaîtra un véritable essor à partir des années 1950 avec les premières applications dans divers domaines. Il existe différentes techniques d'immobilisation pouvant être aussi bien chimiques que physiques.

- Immobilisation par liaison
- Inclusion
- Réticulation

Les différentes techniques d'immobilisation découlant des trois principales méthodes d'immobilisation sont résumées par le schéma suivant:



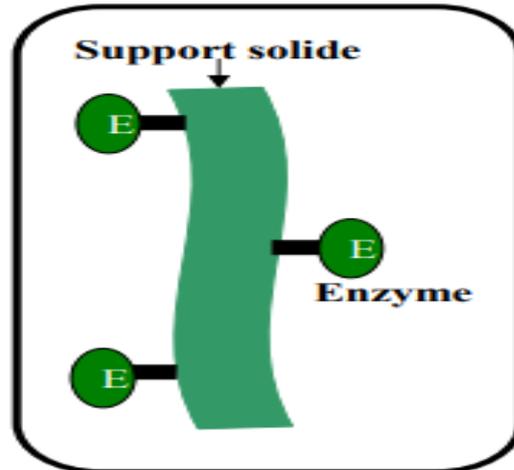
Les différentes techniques d'immobilisation

Techniques d'immobilisation:

3.1. Immobilisation par liaison:

Elle consiste en la rétention d'enzyme sur une phase insoluble dans l'eau par une liaison chimique ou physique. Dans cette méthode la quantité d'enzyme retenue et l'activité sont extrêmement variables et sont évidemment fonction de la nature de support. Selon le mode de couplage, ce procédé peut être classifié de trois manières :

- ✓ Immobilisation par adsorption physique.
- ✓ Immobilisation par liaison ionique.
- ✓ Immobilisation par liaison covalent.



Immobilisation par liaison

a) Adsorption physique :

L'adsorption physique demeure la méthode la plus simple et la plus rentable. Dans ce procédé, l'enzyme est retenue à la surface d'un corps adsorbant minérale ou organique grâce à différents types de liaison : interactions de Vander Wals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, transfert de charge, échange de ligands, chimisorption.

Différents supports ont été exploités pour l'immobilisation des enzymes (chitosane, kaolin, la celite, carbonate de calcium).

Cette technique est simple, réversible, mais la fixation n'est pas spécifique et les risques de désorption sont importants.

b) Immobilisation ionique:

Les enzymes portent, par leurs résidus d'acide aminé, des charges ioniques. Elles peuvent donc se prêter aux phénomènes d'échange d'ion. Ces interactions seront très dépendantes du pH du milieu en raison du caractère amphotère des résidus d'acide aminés. La différence principale entre l'immobilisation par adsorption et l'immobilisation ionique est que la force de liaison entre le support et l'enzyme est beaucoup plus forte pour cette dernière.

Différents polysaccharides et polymères synthétiques ayant des centres d'échange d'ion sont habituellement utilisés comme supports.

c) Immobilisation par liaison covalente

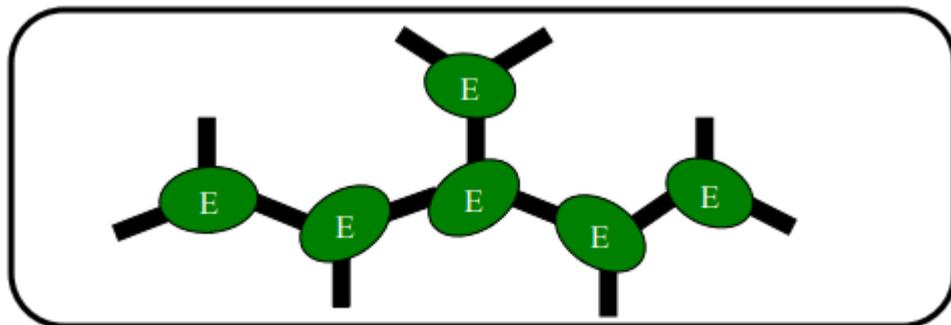
L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le souci d'obtenir des liaisons très solides entre enzyme et support. Pour la réalisation de la liaison covalente il faut une activation préalable soit du support, soit de l'enzyme, car les groupes fonctionnels de l'enzyme ne sont généralement pas suffisamment réactifs. Mais c'est surtout l'activation du support qui a fait l'objet des nombreuses études, car l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme est délicate et peut conduire à la dénaturation de l'enzyme.

Différents supports tels que la silice, résine adsorbante, carboxy-méthyl-cellulose ont été exploités pour cette technique.

3.2. La Réticulation:

En traitant un enzyme par un agent chimique hydrosoluble bi fonctionnel et susceptible de réagir sur les groupements fonctionnels libres de celui-ci, on obtient un réseau enzymatique tridimensionnel insoluble.

Le glutaraldehyde est un agent de réticulation parmi les plus utilisés.



Immobilisation par réticulation

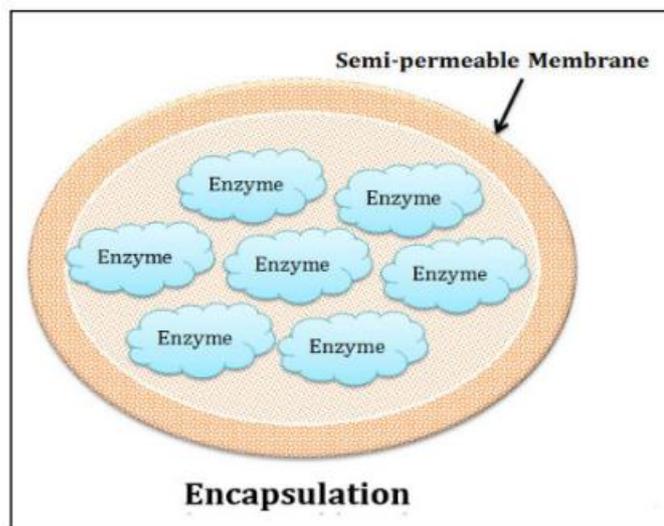
Cette méthode a l'avantage de fournir des dérivés insolubles constitués presque exclusivement d'enzyme. Malheureusement les produits sont gélatineux et difficile à filtrer et leurs propriétés mécaniques sont médiocres. En outre une très importante perte d'activité enzymatique accompagne la réticulation.

3.3. Inclusion:

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière dans la matrice d'un polymère ou dans une micro capsule. Plusieurs polymères, entre autre l'alginate, le chitosane, le gel de polyacrylamide et le gel d'amidon sont utilisés.

a) Immobilisation par encapsulation

L'enzyme en solution aqueuse est enfermée 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 et le produit.

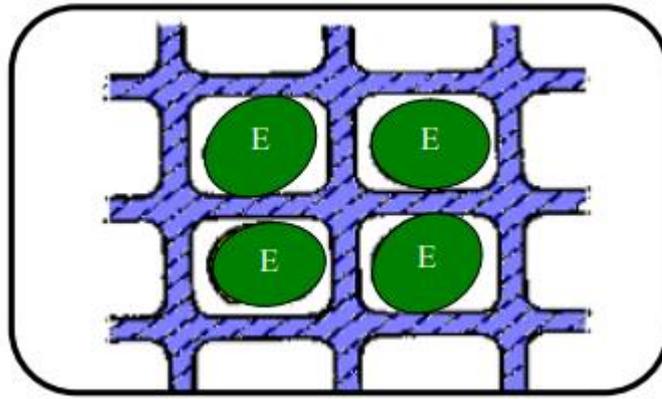


Immobilisation par Micro-encapsulation

b) Emprisonnement sur une matrice:

L'enzyme est dissoute dans une solution aqueuse d'un monomère et d'un réticulant .la polymérisation est ensuite effectuée à des conditions moins dénaturantes possibles, on obtient un réseau macromoléculaire tridimensionnel dans les mailles duquel l'enzyme se trouve retenu de façon plus ou moins efficace. Cette technique est simple et très utilisée pour diverses enzymes, mais les risques de fuite ne sont pas négligeables, si les mailles du réseau sont larges.

De plus on observe souvent une dénaturation importante de l'enzyme due à une réaction du polymère avec les groupes fonctionnels responsables de la protéine

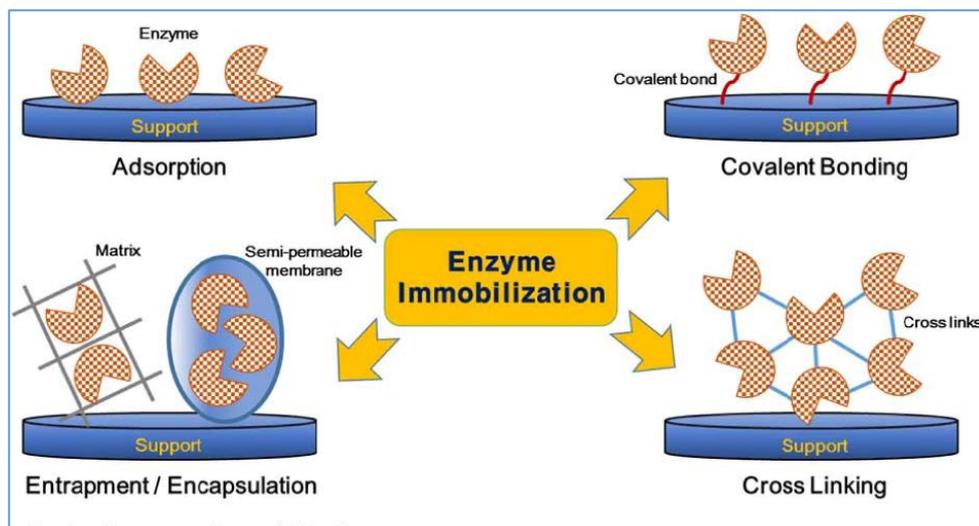


Emprisonnement dans une matrice

4. Les avantages et les inconvénients des méthodes d'immobilisation

méthode	avantages	inconvénients
Adsorption	<ol style="list-style-type: none"> 1. C'est une méthode très simple à mettre en œuvre nécessitant seulement de mettre en contact l'enzyme et le support dans des conditions de pH, température et de force ionique données. 2. Possibilité de régénérer les complexes enzyme-support (si l'enzyme perd son activité en cours de son fonctionnement, il est possible de la remplacer par une préparation active). 3. Méthode économique et ne requiert aucun réactif chimique pouvant dénaturer l'enzyme. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La fragilité de la fixation (les enzymes peuvent facilement se désorber sous l'action de variation de pH, température...) 2. L'orientation de l'enzyme et mauvaise accessibilité au site actif
Encapsulation	<ol style="list-style-type: none"> 1. Réaction de polymérisation et de gélification bien connues. 2. Réaction chimiques avec l'enzyme limitée (inclusion dans des gels naturels). 3. Application à toutes les enzymes (utilisation de mélanges). 4. Obtention de supports de forma adaptables (films, billes, fibre...) 5. Elle permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de l'enzyme 6. Elle ne présente aucun caractère de spécificité et est applicable à n'importe quelle enzyme. 7. Elle ne met pas en jeu les groupements actifs de l'enzyme. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La localisation de l'enzyme à l'intérieur du polymère pose des problèmes stériques (efficacité limitée par accès délicat du substrat vers l'enzyme et du produit en dehors du polymère). 2. Les conditions de polymérisation (ex: pH élevé) peuvent s'avérer dénaturantes pour l'enzyme. 3. Certaines polymérisations font appel à des agents dénaturants ou à des radicaux

Réticulation	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stabilité accrue à cause de la liaison covalente 2. Grand choix de méthodes différentes 3. Grande variété de support minéraux (verre, silice, céramique...) et organiques (cellulose, polymère synthétiques...) 4. Possibilité d'effectuer l'immobilisation en présence de substrat pour éviter l'inactivation (protection du site actif) 5. Solidité de la liaison enzyme-substrat. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mise en œuvre de réactions chimiques souvent complexes 2. Longueur des expériences (étape de l'activation du support) 3. Risques de modifications chimiques de l'enzyme (perte d'activité) 4. Nécessité de purifier l'enzyme préalablement 5. Immobilisation plus complexe à réaliser (choix des groupements à activer...).
---------------------	---	--



NB:

Les enzymes immobilisées sont des enzymes qui ont été **piégées** dans une matrice ou un matériau inerte (comme l'alginate de calcium) qui **les empêche de se déplacer** pendant le processus de réaction. Des cellules entières telles que des cellules de levure et des cellules bactériennes peuvent également être immobilisées pour permettre l'utilisation d'enzymes spécifiques contenues dans les cellules.

L'utilisation d'enzymes immobilisées présente un certain nombre **d'avantages**. L'un de ces avantages est **qu'elle facilite considérablement la récupération et la réutilisation** des enzymes. Cela est particulièrement avantageux lorsque l'enzyme peut être difficile (ou coûteuse) à produire. L'immobilisation offre une **plus grande stabilité de l'enzyme à des températures et à un pH variables ou extrêmes**. Cette stabilité accrue contribue à maintenir une plus grande efficacité du processus de réaction.

L'immobilisation garantit également que l'enzyme ne contamine pas le produit final de la réaction. La contamination est évitée car les enzymes sont physiquement piégées par la matrice.

L'immobilisation de cellules entières pour une utilisation dans des réactions est avantageuse car elle signifie que plusieurs enzymes au sein de la cellule peuvent fonctionner simultanément. L'utilisation simultanée des enzymes de cette manière réduit le nombre d'étapes et les coûts globaux du processus de réaction.