



HAL
open science

Acylation enzymatique de lysine par la lipase B de *Candida antarctica* en solvant CO₂ supercritique et en réacteur à lit fixe : essais préliminaires

Matthieu Bianco

► To cite this version:

Matthieu Bianco. Acylation enzymatique de lysine par la lipase B de *Candida antarctica* en solvant CO₂ supercritique et en réacteur à lit fixe : essais préliminaires. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01931968

HAL Id: hal-01931968

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931968>

Submitted on 23 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2017

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement
Le 1^{er} Septembre 2017

Sur un sujet dédié à :

**ACYLATION ENZYMATIQUE DE LYSINE PAR LA LIPASE B DE CANDIDA
ANTARCTICA EN SOLVANT CO₂ SUPERCRITIQUE ET EN REACTEUR A LIT
FIXE : ESSAIS PRELIMINAIRES.**

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Matthieu Bianco

Né le 11 Février 1991 à Metz

Membres du Jury

Président : Dr Michel Boisbrun, Maître de conférences, Université de Lorraine.

Directeur : Mr Yann Guiavarc'h, Maître de conférences, Université de Lorraine.

Juges : Dr Ariane Boudier, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie, Nancy.

Mme Isabelle Chevalot, Professeur des Universités, ENSAIA, Nancy.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2015-2016

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Béatrice FAIVRE

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable de la filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Responsable Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Raphaël DUVAL

Responsable de la Communication

Marie-Paule SAUDER

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Béatrice FAIVRE

Responsables des échanges internationaux

Bertrand RIHN

Responsable ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Françoise HINZELIN
Francine KEDZIEREWICZ
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDIAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique

Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
-----------------	----	---------------------------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP). Je tiens à remercier M. Laurent Falk, directeur du LRGP de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr Michel Boisbrun pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et votre rigueur qui m'ont permis de prendre du recul sur ce travail.

Un immense merci à M. Yann Guiavarc'h pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse à ses côtés. Nos nombreuses discussions sur le déroulement des travaux et sur les problèmes rencontrés ont été passionnantes et enrichissantes.

Je veux remercier également le professeur Isabelle Chevalot et le Docteur Ariane Boudier pour avoir accepté de juger ce travail en tant que membre de ce jury de thèse.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire BioProMo avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer ainsi qu'à tous les doctorants pour leur bonne humeur et leurs précieux conseils.

Mes remerciements vont également à Mr. Cédric Paris, ingénieur de recherche au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules pour sa disponibilité et sa réactivité dans l'analyse des échantillons.

Une grande pensée pour mes camarades et amis Pharma, ingénieurs et PharmaPlus pour ces belles années à leur côté. J'en retiendrai les bons moments comme les plus durs !

Je tiens tout particulièrement à remercier Emilie, celle qui partage ma vie, pour sa patience et son soutien sans faille. Ce travail est en parti le fruit de tes efforts. Merci pour m'avoir bousculé lorsque j'en ai eu besoin et de m'avoir réconforté dans les moments les plus durs.

Enfin, toutes mes expressions de reconnaissance vont à ma sœur et à mes parents dont le soutien est une source de réconfort et d'énergie permanente, merci pour tout.

LISTE DES ABREVIATIONS

BPR : Back pressure regulator

CCM : Chromatographie sur couche mince

CO₂ : Dioxyde de carbone

\$: Dollars

LCMS : Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide

MeOH : Méthanol

MS : Spectrométrie de masse

MS2 : Double spectrométrie de masse

NH₂ : Fonction amine

scCO₂ : Dioxyde de carbone supercritique

LISTE DES UNITES

cm : Centimètre

cm³ : Centimètre cube

°C : Degrés Celsius

g : Gramme

J : Joule

kg : Kilogramme

L : Litre

m³ : Mètre cube

mg : Milligramme

mL : Millilitre

min : Minute

mol : Mole

µg : Microgramme

µL : Microlitre

µM : Micomolaire

MPa : Mégapascal

% : Pourcentage

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les enzymes	5
1.1. Historique	5
1.2. Rôles et constitution des enzymes	6
1.2.1. Les enzymes : catalyseurs biologiques	6
1.2.2. Structure	6
1.3. Classification	9
1.4. La catalyse enzymatique	10
1.4.1. Définition et principe	10
1.4.2. Energie d'activation et rôle des catalyseurs	12
1.4.3. Modèle de Michaelis et Menten	13
1.4.4. Paramètres influençant la catalyse	15
1.4.4.1. Influence de la concentration en substrat	15
1.4.4.2. Influence du pH	15
1.4.4.3. Influence de la température	17
1.4.4.4. Influence de la pression	18
2. Utilisation industrielle des enzymes	21
2.1. Production commerciale	21
2.1.1. Sources d'enzymes	21
2.1.2. Marché des enzymes	23
2.2. Optimisation des enzymes	25
2.2.1. Principe et intérêt	25

2.2.2. Les techniques utilisées	26
2.2.2.1. La mutagénèse dirigée	26
2.2.2.2. La mutagénèse aléatoire	26
2.2.2.3. L'évolution dirigée	26
2.2.3. Exemples d'optimisations.....	27
2.2.3.1. Stabilité thermique.....	27
2.2.3.2. Activité et spécificité du substrat.....	27
2.2.3.3. Stabilité et activité dans les milieux artificiels	28
2.3. Immobilisation des enzymes _____	28
2.3.1. Principe et intérêts de l'immobilisation.....	28
2.3.2. Les différentes méthodes d'immobilisation	31
2.3.2.1. Immobilisation par adsorption.....	31
2.3.2.2. Immobilisation par liaison covalente.....	33
2.3.2.3. Immobilisation par inclusion	34
2.3.2.4. Immobilisation par encapsulation.....	35
2.3.3. Comparaison des diverses méthodes d'immobilisation.....	35
3. Les lipases _____	37
3.1. Généralités _____	37
3.2. Structure des lipases _____	37
3.3. Origine des lipases _____	38
3.3.1. Les lipases végétales.....	38
3.3.2. Les lipases animales	39
3.3.3. Les lipases microbiennes	40
3.4. Réactions catalysées par les lipases _____	40
3.4.1. La réaction d'hydrolyse	40
3.4.2. La synthèse d'esters.....	41

3.5. Propriétés de sélectivité des lipases	42
3.5.1. Enantio-sélectivité	42
3.5.2. Régio-sélectivité	44
3.5.3. Chimio-sélectivité	44
3.6. Mécanismes réactionnels des lipases	45
3.6.1. Mécanisme bi-bi ordonné	45
3.6.2. Mécanisme bi-bi aléatoire	46
3.6.3. Mécanisme bi-bi iso-ordonné	46
3.6.4. Mécanisme bi-bi ping-pong	46
3.6.5. Exemples de modèles enzymatiques	47
4. La réaction d'acylation	48
4.1. L'acylation par voie chimique	48
4.2. L'acylation par voie enzymatique	48
4.3. Intérêt et application de l'acylation	50
4.3.1. Synthèse de biotensioactifs	50
4.3.2. Amélioration de l'activité et de la stabilité peptidique	52
5. Le dioxyde de carbone supercritique (scCO₂)	55
5.1. Généralités	55
5.2. Avantages d'utilisation	57
5.3. Influence du CO ₂ supercritique sur les réactions enzymatiques	58
5.3.1. Effet direct du CO ₂ supercritique	58
5.3.1.1. Formation d'acide carbonique et de carbamate	59
5.3.1.2. Influence du débit de CO ₂	60
5.3.2. Teneur en eau dans le système	63
6. Etat des lieux de la catalyse enzymatique en milieu supercritique	64

PARTIE II : MATERIEL & METHODES

1. Descriptif du biocatalyseur utilisé	68
2. Descriptif des réactifs utilisés et des produits obtenus	69
2.1. Lysine	69
2.2. Acide caprylique	70
2.3. Produit acylé	71
2.4. Dioxyde de carbone supercritique	71
2.4.1. Le modèle empirique de Chrastil.....	72
2.4.2. Le modèle empirique d'Adachi & Lu.....	73
3. Descriptif du réacteur utilisé	74
3.1. Modélisation de l'écoulement piston et bilan matière	76
3.2. Modélisation hydrodynamique du réacteur à lit fixe	77
4. Description de l'installation	78
5. Procédure expérimentale de synthèse	83
5.1. Préparation des réactifs	83
5.2. Préparation et conditionnement des pompes	83
5.3. Lancement de la manipulation	84
6. Méthodes d'analyse des produits de réaction	84
6.1. Analyse par chromatographie sur couche mince	84
6.2. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	85
6.2.1. La spectrométrie de masse.....	85
6.2.2. Le couplage chromatographique avec la spectrométrie de masse.....	87

PARTIE III : RESULTATS

1. Réflexion avant le début des expérimentations	89
2. Mise en œuvre de la première acylation : preuve de concept	90
3. Réalisation des expériences suivantes	94
3.1. Expérience N°2	96
3.2. Expérience N°3	97
3.3. Expérience N°4	99
3.4. Expérience N°5	100
3.5. Expérience N°6	102
3.5.1. Recherche de lysine mono-acylée	103
3.5.2. Recherche de lysine di-acylée	105
4. Acylation à l'aide de deux réacteurs à lit fixe en série	107
5. Essais à l'aide d'un co-solvant (eau/éthanol)	109
6. Réflexion sur la recirculation du CO₂ et estimation des pertes de charges	112

PARTIE IV : CONCLUSION & PERSPECTIVES

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure de base d'un acide aminé _____	7
Figure 2. Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine _____	7
Figure 3. Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine (Voet et Voet 2004). _____	8
Figure 4. Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine - Exemple de la glucose oxydase (Voet et Voet 2004). _____	8
Figure 5. Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine - Exemple de la glucose déshydrogénase (Voet et Voet 2004). _____	8
Figure 6. Principe schématisé d'une réaction enzymatique - (1) : Fixation du substrat au sein du site actif de l'enzyme, (2) Transformation, libération des produits de la réaction et régénération de l'enzyme. _____	11
Figure 7. Schéma représentant l'interaction d'une lipase avec un triglycéride - Le rail hydrophobe est représenté à gauche sur la figure A et les composants indiqués en vert, jaune et rouge sur la figure B sont des inhibiteurs utilisés pour étudier le mode de fixation du substrat à l'enzyme (Aloulou, et al. 2006). _____	11
Figure 8. Variation de l'énergie d'activation entre l'état initial (Ei) et l'état final (Ef) d'une réaction sans catalyseur (trait plein), en présence de catalyseur chimique (tirets) et en présence d'enzyme (pointillés). _____	12
Figure 9. Représentation du mécanisme réactionnel selon Michaelis et Menten – k_{+1} , k_{+2} , k_{-1} et k_{-2} sont les constantes de vitesse. _____	14
Figure 10. Relation hyperbolique entre la vitesse de la réaction enzymatique et la concentration initiale du substrat pour une concentration en enzyme donnée (Weil 2001). _____	14
Figure 11. Représentation de Lineweaver et Burk - K_M : constante de Michaelis ; $[S]_0$ la concentration initiale en substrat et V_{max} la vitesse maximale de la réaction (Foucaut, et al. 2011). _____	15
Figure 12. Variation de l'activité d'une enzyme en fonction du pH (Combes et Monsan 2009). _____	16
Figure 13. Influence de la température sur la vitesse d'une réaction enzymatique (Weil 2001). _____	17
Figure 14. Effet de la pression sur le taux d'activité résiduelle de l'enzyme après 4h d'incubation à 80°C (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009). _____	18

Figure 15. Effet de la pression sur la valeur de V_{max} à 40°C (●) et 80°C (■) d'une lipase immobilisée (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009).	19
Figure 16. Inactivation de la pectine méthylestérase de <i>Citrus paradisi</i> – La courbe en haut présente une constante d'inactivation enzymatique $k = 0.1 \text{ min}^{-1}$, celle du milieu $k = 0.05 \text{ min}^{-1}$ et celle du bas $k = 0.01 \text{ min}^{-1}$ (Guiavarc'h, et al. 2005).	19
Figure 17. Extraction des enzymes selon leur origine (Combes et Monsan 2009).	21
Figure 18. Evolution du marché des enzymes de 2002 à 2009 (Hasan, Ali Shah et Hameed 2006).	24
Figure 19. Répartition des ventes mondiales d'enzymes (d'après Chandel, et al. 2007).	25
Figure 20. Principales étapes d'une expérience d'évolution dirigée d'une enzyme (Poyot, et al. 2007).	27
Figure 21. Comparaison de l'activité catalytique de l'enzyme « sauvage » (wild type) et de l'enzyme modifiée (13M) en fonction de la concentration en diméthylformamide (You et Arnold 1994).	28
Figure 22. Différents cas de figure suite à l'immobilisation de l'enzyme – Les figures (a) et (b) montrent le cas de figure idéal où le site actif est prêt à recevoir le substrat. La figure (c) montre que l'enzyme peut être immobilisée de telle sorte que le site actif n'est plus accessible par le substrat. La figure (d) nous présente une distorsion du site actif ne permettant plus à l'enzyme de fixer son substrat (Chaplin et Bucke 1990).	29
Figure 23. Cinétique d'acétylation du phényl-1-éthanol catalysé suite à différentes immobilisations – L'activité enzymatique est matérialisée par le pourcentage de produit formé – (1) Célite, (2) Octyl-silice, (3) Eupergit C250L, (4) Amino-propyl-silice, (5) Silice de glutardialdéhyde activée (Ivanov et Schneider 1997).	30
Figure 24. Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité relative de l'enzyme libre ("Free CRL") et de l'enzyme immobilisée ("Immobilized CRL") (Cabrera-Padilla, et al. 2012).	30
Figure 25. Systèmes d'enzymes immobilisés – (a) Immobilisation par adsorption ; (b) Immobilisation par liaison covalente ; (c) Immobilisation par inclusion ; (d) Immobilisation par encapsulation (Chaplin et Bucke 1990).	31
Figure 26. Représentation schématique de l'effet de la concentration d'une enzyme soluble (Bulk enzyme concentration) sur l'activité de l'enzyme immobilisée (Bound enzyme activity) par adsorption sur une matrice – Le taux d'enzyme adsorbé dépend du temps d'incubation, du pH, de la force ionique, de la surface spécifique, de la porosité et des caractéristiques physiques de l'enzyme et du support (Chaplin et Bucke 1990).	33

Figure 27. Métabolisme des triglycérides par la lipase pancréatique. L'hydrolyse successive des triglycérides et diglycérides nécessite la présence d'eau et permettent la libération d'un acide gras (Berg, Tymoczko et Stryer 2012).	37
Figure 28. Structure moléculaire de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> - En bleu sont présentées les structures secondaires de type hélice α et en rouge les feuilletts β . Les trois résidus aminoacides figurant sur les structures représentent la triade catalytique (Uppenberg, et al. 1994).	38
Figure 29. La réaction d'hydrolyse d'un ester (Paques et Macedo 2006).	40
Figure 30. Hydrolyse de la triacétine par l'estérase du foie de cheval et par la lipase pancréatique de porc. Dépendance de la vitesse d'hydrolyse à l'égard de la concentration en substrat exprimée en multiple de saturation (Verger et De Haas 1976).	41
Figure 31. Réactions catalysées par les lipases (Paques et Macedo 2006).	42
Figure 32. Représentation structurale du substrat et du site actif d'une lipase catalysant une N-acylation énantio-sélective (Gedey, et al. 2002).	43
Figure 33. Groupements amine acylables du peptide lysine-phénylalanine (Marie-Claire, et al. 2014).	44
Figure 34. Schéma de synthèse des céphalosporines par voie enzymatique.	44
Figure 35. Représentation simplifiée d'une réaction enzymatique à deux substrats.	45
Figure 36. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi ordonné (Perrin 2012).	45
Figure 37. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi aléatoire (Perrin 2012).	46
Figure 38. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi iso-ordonné (Perrin 2012).	46
Figure 39. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi ping-pong (Perrin 2012).	46
Figure 40. Schéma général de la réaction d'acylation par voie chimique.	48
Figure 41. Schéma général d'une réaction d'acylation catalysée par une enzyme.	48
Figure 42. Réaction de trans-estérification catalysée par une lipase	49
Figure 43. Mécanisme réactionnel de l'acylation d'un alcool par la lipase de <i>Candida antarctica</i> (Cygler, et al. 1994).	49
Figure 44. Classification des tensioactifs selon la nature de la chaîne hydrophile (Borredon et Mouloungui 2006).	50

Figure 45. Orientation des parties hydrophiles et hydrophobes d'un tensioactif (Wertz 2012).	50
Figure 46. Profil de pourcentage d'activité résiduelle du peptide Phe-Gly et de ses dérivés acylés sur de la peau de rat. Les résultats sont exprimés sur une moyenne de trois expériences – Phe-Gly (●), C4-Phe-Gly (○), C6-Phe-Gly (Δ), C8-Phe-Gly (□) (Yamamoto, et al. 2003).	53
Figure 47. Liaison de la lactoferrine (●) et de la lactoferrine acylée (■) au lipide A en fonction de la concentration en lipide A (Majerle, Kidric et Jerala 2003).	54
Figure 48. Diagramme pression-température d'un corps pur (Perrut 1999).	55
Figure 49. Représentation de la zone de supercriticité d'un fluide (Benaissi 2013).	56
Figure 50. Evolution de la densité du CO ₂ supercritique en fonction de la pression et de la température.	56
Figure 51. Cellule d'observation permettant la visualisation du passage à l'état supercritique – a) Séparation des deux phases liquide et gazeuse, b) l'interface commence à entrer en ébullition suite à une élévation de la température, c) les deux phases ne sont pas distinguables ; l'état supercritique est atteint (Hobbs et Thomas 2007).	57
Figure 52. Mécanisme de formation d'acide carbonique à partir d'eau et de dioxyde de carbone (Budisa et Schulze-Makuch 2014).	59
Figure 53. Mécanisme de formation de l'acide carbamique.	60
Figure 54. Formation de carbamate à la surface de l'enzyme (Budisa et Schulze-Makuch 2014).	60
Figure 55. Influence des débits d'alimentation en dioxyde de carbone sur l'activité enzymatique à une température de 313 K et une pression de 11 MPa – 0,5 mL/min (■), 1 mL/min (◆) et 2 mL/min (▲) (Dijkstra, Merchant et Keurentjes 2007).	61
Figure 56. Mesure du taux de conversion de l'estérification du R-phényl-éthanol en présence d'acétate de vinyle après traitement par un flux de CO ₂ (Dijkstra, et al. 2006).	62
Figure 57. Mesure du taux de conversion l'estérification du R-phényl-éthanol en présence d'acétate de vinyle sous flux continu de CO ₂ (Dijkstra, et al. 2006).	62
Figure 58. (a) Particules de Novozyme 435 vues au microscope électronique à balayage – (b) Distribution de taille des particules (Denčić, et al. 2013).	69
Figure 59. Structure chimique de la (L)-lysine.	69
Figure 60. Structure chimique de l'acide caprylique (Boutonnier 2006).	70
Figure 61. Structure chimique des divers produits de réaction.	71

Figure 62. Evolution de la température et de la pression du scCO ₂ au sein de l'installation.	71
Figure 63. Représentation schématique d'un réacteur à lit fixe.	75
Figure 64. Représentation de l'écoulement piston et d'une tranche de réacteur – F : flux molaire des constituants, Q : débit volumique, X _A : taux de conversion, C : concentrations des constituants.	76
Figure 65. Evolution du taux de conversion en fonction de l'évolution axiale du réacteur piston.	77
Figure 66. Pompe à CO ₂ supercritique.	78
Figure 67. Représentation schématique de l'installation pilote	79
Figure 68. Pompes à réactifs (acide caprylique et lysine)	80
Figure 69. Mélangeur statique produit par la société Sulzer™.	80
Figure 70. Représentation schématique de notre réacteur catalytique.	80
Figure 71. Back-pressure regulator.	81
Figure 72. Schéma bloc de l'installation pilote – P1 : Pompe à scCO ₂ ; P2 et P3 : Pompes à réactifs ; MT1 et MT2 : Mélangeurs en « T » ; BT : Bain thermostaté ; MS : Mélangeur statique ; RCATA : Réacteur catalytique ; BPR : Back-pressure regulator ; La lettre S symbolise les courants de matière.	82
Figure 73. Mécanisme réactionnel entre la ninhydrine et un acide aminé (Bottom, Hanna et Siehr 1978).	85
Figure 74. Schéma de principe d'un spectromètre de masse (Bouchoux et Sablier 2005).	86
Figure 75. Représentation d'une spectrométrie de masse de type MS et MS2.	86
Figure 76. Photo du tube collecteur à l'issue de l'expérience N°1.	91
Figure 77. CCM de l'expérience N°1 – Le liquide a été déposé pur puis dilué de moitié dans du méthanol, le culot fut dilué dans un mélange méthanol/eau (20/80) et dans du méthanol pur, le tube en sortie arrière du BPR a également été analysé. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.	92
Figure 78. Chromatographie sur couche mince d'un dépôt témoin d'acide caprylique. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.	93
Figure 79. CCM de l'expérience N°2 – Le premier dépôt correspond à l'échantillon pur recueilli en sortie, les deux dépôts suivants à des dilutions au dixième et au centième de ce	

même échantillon. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.	96
Figure 80. Photo du tube collecteur suite à l'expérience N°3.	97
Figure 81. CCM de l'expérience N°3 – Le premier dépôt correspond au liquide recueilli en sortie ; les deux dépôts suivants à ce liquide dilué au 1/10 ^{ème} et au 1/100 ^{ème} ; le dépôt suivant correspond à la solubilisation des cristaux dans du méthanol ; le dernier dépôt est le témoin de lysine. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.	97
Figure 82. Chromatogramme de masse par suivi de la lysine mono-acylée – « Pur » correspond au liquide récupéré en sortie et « Dépôts » aux dépôts insolubles retrouvés dans le tube collecteur.	98
Figure 83. Chromatogramme de masse par suivi de la lysine di-acylée – « Pur » correspond au liquide récupéré en sortie et « Dépôts » aux dépôts insolubles retrouvés dans le tube collecteur.	99
Figure 84. Photo du tube collecteur et chromatographie sur couche mince de l'expérience N°4 – Les trois premiers dépôts correspondent à l'échantillon pur et dilué ; le quatrième dépôt correspond à un nettoyage des parois du tube de collecte.	100
Figure 85. Mécanisme bi-bi iso ordonné avec inhibition par excès de substrat.	100
Figure 86. Chromatographie sur couche mince de l'expérience N°6.	100
Figure 87. Mesure des écarts entre les débits théoriques et expérimentaux.	101
Figure 88. Photo du tube collecteur et chromatographie sur couche mince de l'expérience N°6.	103
Figure 89. Suivi des fragments de lysine mono-acylée par spectromètre UV et par suivi MS et MS2.	103
Figure 90. Spectres de masse du pic identifié lors de du suivi de la lysine mono-acylée dans le liquide de collecte – (a) Suivi du pic identifié suite à une analyse MS, (b) Suivi du pic identifié suite à une analyse MS2.	104
Figure 91. Spectre de masse du pic identifié lors du suivi de la lysine mono-acylée dans les dépôts.	105
Figure 92. Suivi des fragments de lysine di-acylée dans le liquide de collecte.	105
Figure 93. Spectre de masse du pic identifié lors de l'analyse par MS – Le pic vert correspond à de la lysine di-acylée.	106
Figure 94. Représentation schématique du procédé avec deux réacteurs en série.	107

Figure 95. Chromatographies sur couche mince des expériences N°7,8 et 9. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine. _____	108
Figure 96. Solubilité du lactose dissout dans un mélange eau/éthanol à 95:5 (V/V) dans le scCO ₂ à 333,2 K (a) et à 373,2 (b) – En présence de 6% en poids de mélange (●), 14% en poids (■) et 21% en poids (▲) (Montanes, et al. 2009). _____	109
Figure 97. Chromatographies sur couche mince des expériences 16 à 18. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine. _____	110
Figure 98. Schéma de principe illustrant la recirculation du scCO ₂ _____	112
Figure 99. Distribution de tailles des billes de Novozyme 435 mesurée par granulométrie laser (DLS) au LRGP. _____	113
Figure 100. Porosité des mélanges binaires en fonction de la composition du mélange (École des Mines d'Albi-Carmaux 2007). _____	113
Figure 101. Représentation graphique des pressions de sorties, P, calculées par l'équation d'Ergun pour différents débits d'entrée d'un CO ₂ supercritique à P ₀ =200 bars et 55°C au sein d'un réacteur de 32,5 cm de long et 0,46 cm de diamètre interne en considérant des particules sphériques et non poreuses de diamètre unique 500 μm, 300 μm ou 100μm. _	116
Figure 102. Evolution de la pression de sortie P du CO ₂ supercritique à 55°C et pression d'entrée P ₀ =200 bar en fonction du débit volumique dans des réacteurs tubulaires à lit fixe de volume constant 5,40cm ³ remplis par des particules sphériques non poreuses de 300 μm de diamètre. _____	117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Classification internationale des enzymes (Weil 2001).	9
Tableau II. Comparaison de la constante de vitesse de réaction (k), de l'activité spécifique du catalyseur (A) et de l'énergie d'activation (Ea) de deux réactions catalysées par voie chimique et enzymatique à une température de 20°C (Foucaut, et al. 2011).	13
Tableau III. Accélération des réactions par diverses activités enzymatiques (Horton, et al. 1994).	13
Tableau IV. Origines et applications industrielles (Chaplin et Bucke 1990).	22
Tableau V. Marché global des enzymes en millions de Dollars (Hasan, Ali Shah et Hameed 2006).	24
Tableau VII. Supports utilisés pour l'immobilisation par liaison covalente avec leurs groupes réactifs (Blecker, et al. 2008).	34
Tableau VIII. Comparaison généralisée des différentes techniques d'immobilisation (Chaplin et Bucke 1990).	36
Tableau IX. Classification des lipases végétales (Destain, Thonart et Fickers 2008).	39
Tableau X. Classification des lipases d'origine animale (Destain, Thonart et Fickers 2008).	39
Tableau XI. Exemples de N-acylation énantio-sélectives catalysées par des lipases – la sélectivité est représentée par un pourcentage d'énantio-enrichissement (ee) (Gill, Das et Patel 2007).	43
Tableau XII. Exemples d'études de modélisation des cinétiques enzymatiques d'acylation (Le Joubioux 2013)	47
Tableau XIII. Exemples de matières premières utilisées dans la synthèse de biotensioactifs (Borredon et Mouloungui 2006).	51
Tableau XIV. Marché européen des tensioactifs par grand secteur d'activité (Wertz 2012).	52
Tableau XV. Ordres de grandeur de la masse volumique, de la viscosité et du coefficient de diffusion pour les gaz, liquides et fluides supercritiques (Perrut 1999).	57
Tableau XVI. Etat des lieux de la catalyse enzymatique en milieu supercritique.	65
Tableau XVII. Résumé des propriétés de la préparation commerciale Novozyme 435®	68

Tableau XVIII. Propriétés chimiques, biochimiques et physique de la (L)-lysine. _____	69
Tableau XIX. Propriétés chimiques et physiques de l'acide caprylique. _____	70
Tableau XX. Paramètres constants intervenant dans le calcul de la densité du scCO ₂ par l'équation de Chrastil. _____	73
Tableau XXI. Paramètres constants intervenant dans l'équation d'Adachi & Lu (Sparks, et al. 2010). _____	74
Tableau XXII. Caractéristiques des différents éléments de l'installation pilote. _____	81
Tableau XXIII. Résumé des paramètres opératoire de l'expérience N°1. _____	91
Tableau XXIV. Comparaison entre les quantités théoriques et expérimentales - Expérience N°1. _____	92
Tableau XXV. Paramètres procédé des expériences suivantes. _____	95
Tableau XXVI. Valeurs théoriques et expérimentales des débits de lysine et d'acide caprylique pour les expériences 1 à 6 et calcul des écarts relatifs. _____	102
Tableau XXVII. Paramètres opératoires des réactions associant deux réacteurs en série. _____	107
Tableau XXVIII. Paramètres opératoires des expériences 16,17 et 18 utilisant de l'éthanol comme co-solvant. _____	110
Tableau XXIX. Distribution de tailles et porosités des billes de Novozyme 435 (Haigh, et al. 2013) - ^a d _{x0} est le diamètre correspondant au % du volume x0 sur la courbe de distribution de taille des particules. _____	112
Tableau XXX. Caractéristiques du réacteur pour l'estimation de la perte de charge. _____	114
Tableau XXXI. Caractéristiques du lit fixe pour l'estimation de la perte de charge. _____	114
Tableau XXXII. Caractéristiques de l'alimentation en scCO ₂ pour l'estimation de la perte de charge. _____	115
Tableau XXXIII. Calcul de la perte de charge par l'équation d'Ergun. _____	115
Tableau XXXIV. Pressions de sortie, P, calculées par l'équation d'Ergun pour différents débits d'entrée d'un CO ₂ supercritique à P ₀ =200 bars et 55°C au sein d'un réacteur de 32.5 cm de long et 0.46 cm de diamètre interne en considérant des particules sphériques de diamètre unique 500 μm, 300 μm ou 100μm. _____	115

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'acylation d'acides aminés ou de peptides leur permet de développer des propriétés biotensioactives utilisables en industrie cosmétique et pharmaceutique. Le marché des biosurfactants mondiaux est en pleine progression et devrait augmenter d'environ vingt-sept pourcent jusqu'à 2018 avec un accroissement de la concurrence des leaders mondiaux industriels. D'autre part, l'acylation de certains peptides bioactifs permet d'améliorer leur capacité à traverser les membranes biologiques tout en améliorant leur activité et leur stabilité.

Actuellement, la majorité des réactions d'acylation des acides aminés s'effectue via la réaction chimique de Schotten-Bauman. Elle consiste à greffer un acide gras sur une fonction amine ou alcool d'une autre molécule. Cette réaction en milieu aqueux s'avère performante mais présente néanmoins de multiples limitations pour les industriels. En effet, cette dernière nécessite l'utilisation de chlorures d'acides et de nombreux solvants organiques parfois toxiques et coûteux. La mise en œuvre de cette réaction requière également l'application d'un pH élevé et génère de grosses quantités de sels résiduels dans les effluents. Outre l'impact environnemental et économique relatif aux traitements de ces substances chimiques, cette réaction ne s'avère pas régiosélective et pourrait ainsi conduire à la formation de produits indésirables ou toxiques pour l'organisme.

Physiologiquement, en milieu aqueux, les lipases sont capables de catalyser des réactions d'hydrolyse. On sait depuis le début des années quatre-vingt-dix que ces enzymes sont également capables d'effectuer la réaction inverse (l'acylation) dans un milieu non aqueux. En effet, depuis quelques années, de plus en plus d'études s'intéressent à cette propriété des lipases dans des milieux non aqueux comme le dioxyde de carbone supercritique.

Une phase supercritique correspond à un état de la matière dans lequel la substance n'est ni liquide ni gazeuse. Cette dernière se manifeste lorsque le fluide est soumis à des conditions de pression et de température dépassant le point critique. Les propriétés physiques d'un tel fluide (densité, viscosité, diffusivité) sont intermédiaires entre celles des liquides et des gaz. Cet état de la matière a été découvert en 1822 par Charles Cagniard de Latour. Le dioxyde de carbone supercritique s'avère intéressant de par sa non-inflammabilité, sa non-toxicité, son faible coût de production et sa recyclabilité. Ces propriétés lui permettent de s'inscrire dans une dynamique de développement durable afin de mettre en œuvre des procédés dits de chimie verte.

En 2013, l'équipe BioProMo du LRGP¹ a réussi à démontrer que des peptides pouvaient être acylés par voie enzymatique sous dioxyde de carbone supercritique en utilisant une lipase comme biocatalyseur en réacteur fermé parfaitement agité. Cette première constatation est importante pour la mise en œuvre de cette étude puisque ceci nous démontre que la réaction d'acylation en milieu supercritique par des lipases est possible. Cependant, il serait intéressant d'étudier la mise en œuvre de cette réaction en réacteur continu et ce pour plusieurs raisons. En effet, le passage en continu permet de travailler avec de faibles concentrations en réactifs ce qui

¹ Equipe bioprocédés et biomolécules (BioProMo) du laboratoire réactions et génie des procédés (LRGP).

permet d'améliorer la sécurité et le rendement de la réaction. D'autre part, ce type de réacteur nous permet d'assurer une homogénéité des produits en sortie puisque ces derniers auront tous bénéficié du même de temps de contact avec l'enzyme.

L'objectif de ce travail est de réaliser une étude préliminaire de la mise en œuvre de l'acylation enzymatique de la lysine par la lipase B de *Candida antarctica* dans un mini-réacteur continu à dioxyde de carbone supercritique. L'enzyme préalablement adsorbé à la surface de monolithes de silice poreuse est introduite au sein de ce réacteur où le dioxyde de carbone supercritique véhicule une solution aqueuse de lysine ainsi qu'une solution d'acide caprylique (également connu sous le nom d'acide octanoïque). L'acide caprylique se fixe sur la lysine au sein du site actif de l'enzyme pour permettre la synthèse de lysine acylée. Il n'existe actuellement aucune donnée sur cette acylation en réacteur continu dans la littérature et ce travail a pour but de fournir une première estimation des paramètres à mettre en œuvre.

L'installation mise à disposition et établie par l'équipe BioProMo nous permet dans un premier temps d'établir une preuve de concept en montrant expérimentalement que cette réaction d'acylation est réalisable en réacteur continu. La suite des manipulations aura pour but de mieux comprendre l'influence des paramètres du procédé afin d'améliorer les conditions de réaction.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les enzymes

La catalyse enzymatique ou biocatalyse est vitale puisqu'elle assure les transformations chimiques dans les organismes vivants. Cette dernière a de nombreuses implications aussi bien en biologie, en pharmacie ou en chimie. D'un point de vue historique, la mise en évidence de la catalyse enzymatique s'est faite grâce à l'étude des fermentations. Au fil des années, le champ d'application des fermentations s'est peu à peu élargi au secteur alimentaire pour s'étendre à la production de médicaments et notamment celle des antibiotiques, des stéroïdes ou encore des insulines. L'analyse médicale a également largement bénéficié de la catalyse enzymatique et de nombreux dosages font aujourd'hui appel à ce type de réaction. Ainsi, l'enzymologie se doit de faire partie des connaissances indispensables au chimiste et l'emploi de ces molécules est à envisager dans la mise en œuvre de nombreuses réactions au même titre que toute autre méthode (Brown et Biellmann 1992, Chatterjea 2004, Nelson et Cox 2008, Combes et Monsan 2009, Spinnler 2013, CBDM.T 2008).

1.1. Historique

Il est très difficile de donner une date exacte à la découverte des enzymes. La catalyse biologique fut pour la première fois reconnue et décrite vers la fin des années 1700 au cours d'études sur la digestion de viande par les sucs gastriques des faucons. Les recherches continuèrent et c'est en 1833 que Payen et Persoz ont réussi à mettre en évidence l'existence d'enzymes grâce à l'étude de la conversion d'amidon en sucre par la salive et divers extraits de plantes. Ce n'est que plus tard, en 1897, que Buchner a découvert l'existence de substances pouvant promouvoir la réaction enzymatique et agissant hors de la cellule. Ces substances ont été par la suite appelées coenzymes (Nelson et Cox 2008, Cornish-Bowden 2011, Combes et Monsan 2009). Le mot enzyme (signifiant « dans la levure » en grec) n'est quant à lui apparu qu'en 1878 lorsque Kühne a souhaité distinguer les micro-organismes entiers et les substances sécrétées par ces derniers (Combes et Monsan 2009).

Les premiers mécanismes réactionnels n'ont été proposés qu'à partir de 1902. Ainsi, Henri a suggéré qu'un complexe enzyme-substrat était indispensable à la mise en œuvre de la réaction enzymatique. Les paramètres influençant cette catalyse ont été mis en évidence en 1909 par Sorensen et c'est en 1913 que Michaelis et Menten dévoilent leurs équations mathématiques régissant les équilibres enzymatiques (Michaelis et Menten 1913). La classification des enzymes en tant que protéines n'a été admise que vers la fin des années 1920 (Nelson et Cox 2008, Combes et Monsan 2009).

1.2. Rôles et constitution des enzymes

1.2.1. Les enzymes : catalyseurs biologiques

L'importance et le rôle biologique des enzymes ont été étudiés et élucidés depuis des années. Le Dr Howell fut un pionnier en matière de recherche sur les enzymes et a en 1946 prononcé cette phrase résumant le rôle essentiel de ces protéines : « *Les enzymes sont des substances qui font que la vie est possible. Elles sont indispensables à chacune des réactions chimiques qui se produisent dans l'organisme. Sans enzymes, il n'y aurait aucune activité. On peut dire qu'elles sont les forces de travail qui construisent votre corps tout comme les ouvriers du bâtiment sont celles qui construisent votre maison. Vous pouvez avoir tous les matériaux de construction possibles, pour bâtir une maison, il vous faut aussi des ouvriers qui représentent l'élément de vie essentiel* » (Le Bail 2011).

Ainsi, les enzymes sont indispensables pour assurer la digestion, nettoyer le sang et les tissus, guérir les plaies et peuvent participer à la lutte contre les germes pathogènes et les cellules cancéreuses. On peut distinguer trois catégories d'enzymes « physiologiques » :

- Les enzymes métaboliques ou systémiques sont indispensables au fonctionnement de chaque cellule composant les tissus de notre organisme.
- Les enzymes digestives sont sécrétées par l'ensemble du système digestif comme la bouche, le foie, l'intestin grêle ou encore le pancréas. Ces enzymes sont chargées de dégrader la nourriture en nutriments pour que ces derniers puissent rejoindre la circulation sanguine.
- Les enzymes alimentaires sont naturellement présentes dans de nombreux aliments et permettent d'apporter une source externe d'enzymes à l'organisme.

L'intérêt et les propriétés de ces enzymes biologiques permettent aujourd'hui de recenser plus de mille enzymes différentes utilisées dans des domaines de plus en plus variés. Cet intérêt croissant pour ces molécules peut facilement s'expliquer puisque elles permettent des gains en qualité, une amélioration des cinétiques des procédés et une diminution des coûts énergétiques pouvant parfois atteindre 50% (Spinnler 2013, Foucaut, et al. 2011).

1.2.2. Structure

Comme toutes les protéines, une enzyme est une macromolécule formée d'une ou de plusieurs chaînes d'acides aminés (ou aminoacides). Un acide aminé est une petite molécule constituée d'azote, de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Certains contiennent même du soufre et du phosphore. On dénombre vingt acides aminés constitutifs des protéines et chacun d'entre eux comporte une fonction amine (NH₂), une fonction acide carboxylique (COOH) ainsi qu'une

chaîne latérale attachée au carbone α comme le présente la Figure 1 (Weil 2001, Whitehurst et Van Oort 2010, Baud, Belloy et Dauchez 2009, Foucaut, et al. 2011).

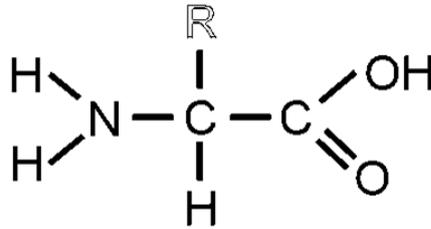


Figure 1. Structure de base d'un acide aminé - le carbone en position α est relié à la fonction acide carboxylique, amine et supporte également un groupement R variable selon les acides aminés (Weil 2001).

Parmi ces acides aminés, on distingue huit acides aminés essentiels ; cela signifie que ces derniers ne peuvent pas être synthétisés par notre organisme et doivent donc par conséquent, être apportés par l'alimentation (isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine). En outre, il en existe plus de deux-cent-cinquante qui ne sont pas constitutifs des protéines et participent au métabolisme. Nous pouvons citer à titre d'exemple l'acide γ -aminobutyrique (GABA) qui est le principal inhibiteur du système nerveux central ou encore le 5-hydroxytryptophane connu comme précurseur immédiat de la sérotonine (Weil 2001, Whitehurst et Van Oort 2010).

La structure des protéines peut être décrite en quatre étapes successives :

- Structure primaire : ordre d'enchaînement des acides aminés liés par une liaison peptidique. Cette structure est responsable des niveaux supérieurs d'organisation (structure secondaire, tertiaire et quaternaire) et de son activité (Figure 2).

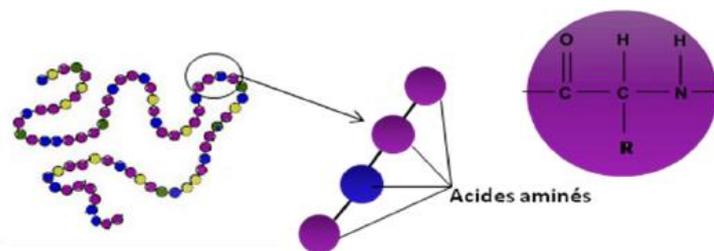


Figure 2. Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine (Voet et Voet 2004).

- Structure secondaire : elle résulte de l'établissement de liaisons hydrogène entre l'hydrogène d'un groupement aminé ($-NH$) et l'oxygène d'un groupement carboxylique ($-C = O$) du squelette peptidique. Les conformations que peut prendre la protéine sont limitées par le nombre de repliements énergétiques favorables. On distingue ainsi trois principales catégories de structure : l'hélice alpha, le feuillet bêta et les coudes (Figure 3).

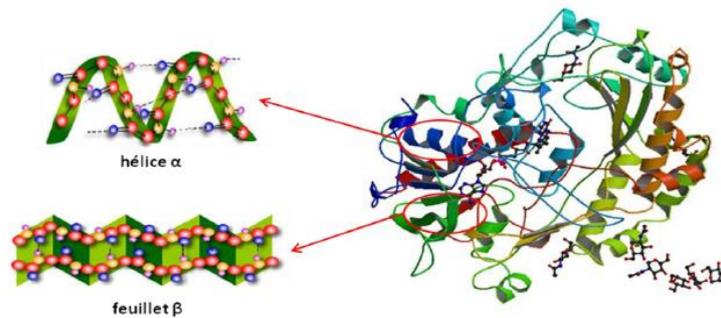


Figure 3. Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine (Voet et Voet 2004).

- Structure tertiaire : la chaîne polypeptidique déjà ordonnée peut se replier sur elle-même et ainsi former une structure 3D. Ce repliement assure une stabilité à l'aide de ponts disulfure, de liaisons hydrogène, ioniques et de liaisons hydrophobe (Figure 4).

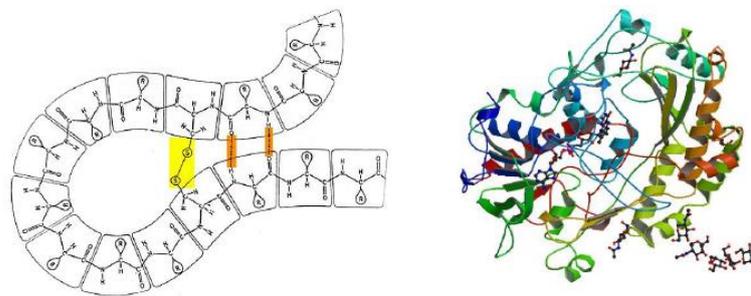


Figure 4. Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine - Exemple de la glucose oxydase (Voet et Voet 2004).

- Structure quaternaire : elle consiste en un regroupement de plusieurs sous unités qui correspondent à une chaîne de structure tertiaire. C'est cette association qui régit l'activité de la protéine (Figure 5).

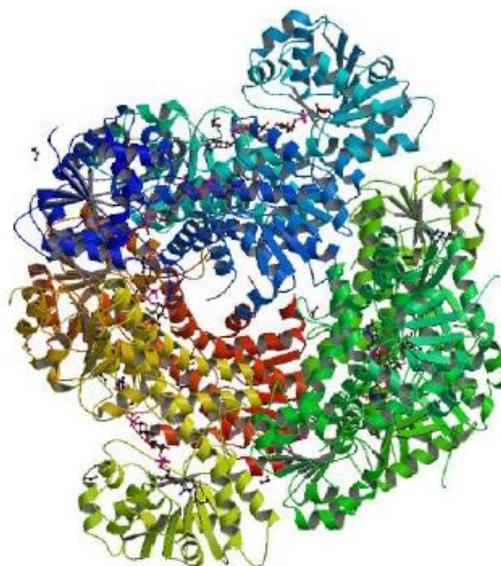


Figure 5. Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine - Exemple de la glucose déshydrogénase (Voet et Voet 2004).

1.3. Classification

De nombreuses enzymes possèdent des noms triviaux qui leur ont été donnés il y a des années lors de leur découverte. Dans de nombreux cas, un simple suffixe « ase » a été ajouté au substrat utilisé par l'enzyme pour la nommer. Ainsi, on rencontre encore aujourd'hui l'uréase qui catalyse l'hydrolyse de l'urée ou l'ADN-polymérase qui elle permet la polymérisation des nucléotides de l'acide désoxyribonucléique (Nelson et Cox 2008, Combes et Monsan 2009, Brown et Biellmann 1992, Chatterjea 2004).

Pour clarifier la situation, c'est en 1956 que la commission internationale sur les enzymes a décidé de proposer une classification (Tableau I). Cette nomenclature s'appuie sur le type de réaction catalysée et sur le substrat utilisé. Une classification numérique a également été mise en place et chaque enzyme est aujourd'hui désignée par son numéro « EC ». Ce numéro est constitué de quatre chiffres qui désignent la classe de l'enzyme, sa sous-classe, sa sous-sous classe et enfin un numéro propre à l'enzyme. (Combes et Monsan 2009, Nelson et Cox 2008, Spinnler 2013).

Tableau I. Classification internationale des enzymes (Weil 2001).

Numéro	Nom	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Réaction d'oxydo-réduction ²
E.C.2	Transférases	Transfert d'un groupe spécifique d'une molécule à une autre
E.C.3	Hydrolases	Coupure hydrolytique des liaisons C-O, C-N et C-C
E.C.4	Lyases	Coupure des liaisons C-C, C-O et C-N par élimination en formant des doubles liaisons ou des cycles
E.C.5	Isomérases	Changement géométriques ou structuraux dans une molécule
E.C.6	Ligases	Formation d'une liaison entre deux molécules couplée à l'hydrolyse d'une liaison phosphate de l'ATP

Enfin, des bases de données telles que BRENDA (créée en 1987 et régulièrement mise à jour), de la Technische Universität Braunschweig en Allemagne, permettent d'obtenir des informations très rapidement sur n'importe quelle enzyme connue : classification, réaction catalysée, séquence, structure 3D, organisme d'origine, point isoélectrique, pH et température optimum, gamme de pH et température dans lesquelles l'enzyme montre de l'activité, références bibliographiques associées, ... (Technische Universität Braunschweig 1987).

² Réaction d'oxydo-réduction : transfert d'électron(s) entre un réducteur et un oxydant.

1.4. La catalyse enzymatique

1.4.1. Définition et principe

Les enzymes sont des protéines douées d'une activité catalytique spécifique leur permettant d'intervenir en faveur de certaines réactions biochimiques. Elles permettent aux réactions chimiques nécessaires à la vie et à la multiplication cellulaire de s'effectuer à vitesse élevée et avec une spécificité qui élimine la formation de sous-produits. La spécificité de l'enzyme est due à la présence d'une région tridimensionnelle appelée site actif qui reconnaît et fixe le substrat (Weil 2001, Whitehurst et Van Oort 2010, Foucaut, et al. 2011, Combes et Monsan 2009).

Les acides aminés de la protéine possèdent une organisation précise qui détermine l'action de l'enzyme. Cependant, les différentes parties de la chaîne peptidique n'ont pas toutes le même rôle. Ainsi, l'enzyme assure un repliement 3D spécifique pour former son site actif et permettre au substrat ayant une forme convenable de venir s'y loger. Du fait de la complexité de ce repliement, les mécanismes sont encore aujourd'hui mal élucidés même si certains d'entre eux commencent à être totalement décrits. Cette région qui est le siège de la réaction catalytique, se doit d'être en accord avec la taille, la forme et la nature chimique du substrat. Ainsi, seule une faible fraction de l'enzyme est impliquée directement dans la réaction chimique. En effet, la masse molaire d'une enzyme étant élevée (de 10000 à plusieurs centaines de milliers de g/mole) contrairement à celle des substrats, seule une faible fraction de l'enzyme (environ douze acides aminés) constitue le site actif. Il s'avère même que seulement deux ou trois d'entre eux sont directement impliqués dans le processus catalytique (Combes et Monsan 2009, Brown et Biellmann 1992, Foucaut, et al. 2011).

La sélectivité de ces catalyseurs biologiques peut varier, ce qui constitue l'un des avantages majeur à leur utilisation en tant que catalyseur dans des procédés biologiques :

- Enantio-sélectivité : sélectivité vis-à-vis d'un ou plusieurs énantiomères (molécules images les unes des autres dans un miroir mais non superposables).
- Régio-sélectivité : sélectivité vis-à-vis d'un groupement chimique spécifique d'un substrat donné.
- Stereo-sélectivité : sélectivité vis-à-vis d'un ou plusieurs stéréoisomères (molécules possédant les mêmes formules brutes mais des formules semi-développées et des fonctions biologiques différentes).

Ces diverses capacités peuvent ainsi être utilisées afin d'orienter la réaction vers la formation d'un produit particulier. Plusieurs applications seront présentées plus loin lors de l'étude des lipases.

Les enzymes sont capables de se lier de manière sélective à un substrat pour former un intermédiaire réactionnel correspondant à une voie différente et plus rapide que la transformation sans catalyseur (Figure 6). Cet intermédiaire réagit seul ou avec un autre réactif pour former ; en une ou plusieurs étapes, les produits de la réaction. Une fois la réaction catalytique terminée, l'enzyme est régénérée et est en mesure d'assurer une nouvelle transformation. Cette catalyse permet ainsi de remplacer une ou plusieurs étapes difficiles dans la réaction en une succession d'étapes plus simples.

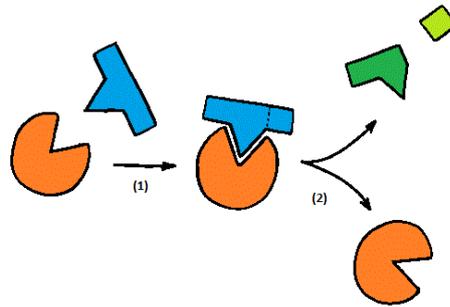


Figure 6. Principe schématisé d'une réaction enzymatique - (1) : Fixation du substrat au sein du site actif de l'enzyme, (2) Transformation, libération des produits de la réaction et régénération de l'enzyme.

Prenons l'exemple des lipases qui hydrolysent en milieux aqueux les triglycérides. Les recherches permettant d'élucider la structure tridimensionnelle de la protéine ont montré qu'il se forme, sur la partie externe de la protéine, une sorte de rail hydrophobe (en vert). Ce dernier s'avère essentiel dans l'accroche du substrat sur l'enzyme et permet de favoriser l'interaction des atomes de la fonction ester du triglycéride avec les acides aminés constitutifs du site actif. Cette interaction est représentée sur la Figure 7.

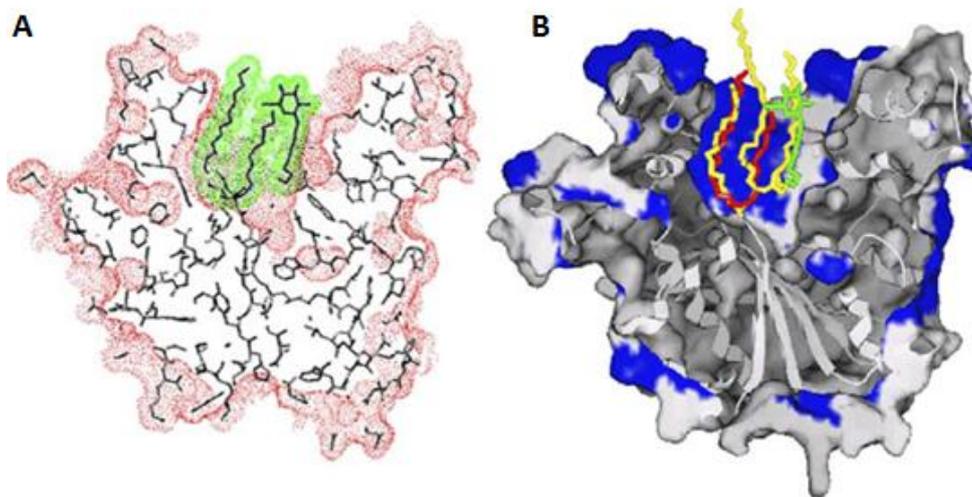


Figure 7. Schéma représentant l'interaction d'une lipase avec un triglycéride - Le rail hydrophobe est représenté à gauche sur la figure A et les composants indiqués en vert, jaune et rouge sur la figure B sont des inhibiteurs utilisés pour étudier le mode de fixation du substrat à l'enzyme (Aloulou, et al. 2006).

1.4.2. Energie d'activation et rôle des catalyseurs

Comme décrit précédemment, les enzymes peuvent être définies comme des catalyseurs biologiques. Un catalyseur est une substance augmentant notablement la vitesse d'une réaction chimique et n'étant pas transformée de façon définitive (transformation transitoire au cours de la réaction chimique). D'autre part, un catalyseur ne modifie pas l'enthalpie libre de la réaction et donc l'état de fin de réaction. Ceci implique que le catalyseur est également capable de réaliser la transformation inverse (Foucaut, et al. 2011, Weil 2001).

D'une manière générale, l'accélération de la vitesse d'une réaction chimique peut se faire selon deux processus : l'augmentation de la température ou la diminution de l'énergie d'activation. Ces deux phénomènes ont pour but d'augmenter le nombre de molécules à l'état activé permettant ainsi la mise en œuvre de la réaction. Sachant que les enzymes sont des protéines issues des cellules vivantes qui existent à température physiologique, il apparaît que la méthode d'accélération procurée par les enzymes consiste en une diminution de l'énergie d'activation. Cette dernière correspond au supplément d'énergie interne permettant aux molécules de passer à un état activé ou réactif leur permettant de donner naissance à d'autres molécules appelées produits de la réaction. (Combes et Monsan 2009, Weil 2001, Foucaut, et al. 2011)

Ainsi, plus l'énergie d'activation nécessaire à la mise en œuvre de la réaction est faible et plus le catalyseur est considéré comme efficace c'est-à-dire que l'état final de la réaction sera atteint plus rapidement (Figure 8). Une baisse de l'énergie d'activation permet donc de diminuer les temps de réaction et d'accélérer le processus catalytique (Weil 2001, Foucaut, et al. 2011, Combes et Monsan 2009).

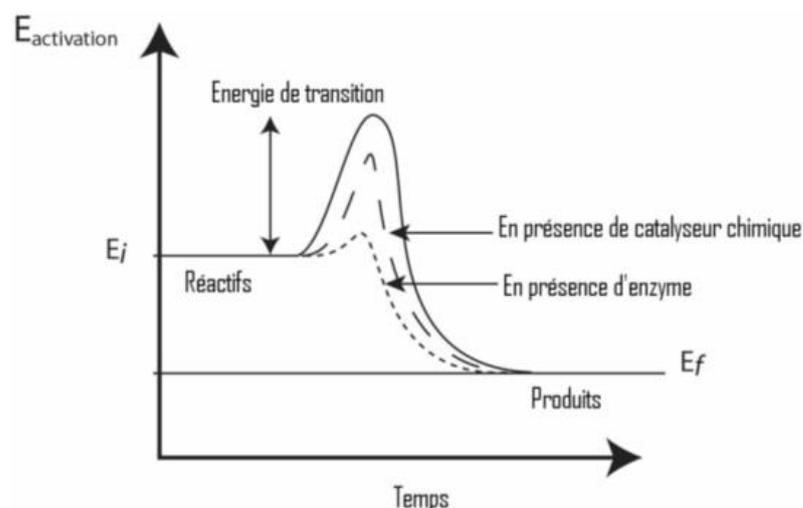


Figure 8. Variation de l'énergie d'activation entre l'état initial (E_i) et l'état final (E_f) d'une réaction sans catalyseur (trait plein), en présence de catalyseur chimique (tirets) et en présence d'enzyme (pointillés).

A titre d'exemple, le Tableau II présente les variations de l'énergie d'activation de deux réactions catalysées par voie chimique et par voie enzymatique.

Tableau II. Comparaison de la constante de vitesse de réaction (k), de l'activité spécifique du catalyseur (A) et de l'énergie d'activation (Ea) de deux réactions catalysées par voie chimique et enzymatique à une température de 20°C (Foucaut, et al. 2011).

Réaction	Catalyseur	k (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	A (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	Ea (kJ.mol ⁻¹)
Hydrolyse de l'urée	Chimique	1,8.10 ⁻⁸	2,0.10 ¹⁰	103
	Enzymatique	1,6.10 ⁸	1,6.10 ¹³	28,5
Décomposition de H ₂ O ₂	Chimique	72,0	2,0.10 ⁹	42,2
	Enzymatique	3,7.10 ⁷	6,5.10 ⁸	7,1

D'autre part, des études cinétiques ont permis de mesurer les différences de vitesses pouvant être observées entre ces deux types de catalyses (ces vitesses étant inversement proportionnelles à l'énergie d'activation nécessaire à la réaction). Il s'avère que la vitesse peut être multipliée jusqu'à plus de 10¹⁰ fois comme le présente le Tableau III.

Tableau III. Accélération des réactions par diverses activités enzymatiques (Horton, et al. 1994).

Enzyme	Vitesse non enzymatique (s ⁻¹)	Vitesse enzymatique (s ⁻¹)	Facteur d'accroissement
Chymotrypsine	4 × 10 ⁻⁹	4 × 10 ⁻²	10 ⁷
Lysozyme	3 × 10 ⁻⁹	4 × 10 ⁻¹	2 × 10 ⁸
Triose phosphate isomérase	6 × 10 ⁻⁷	2 × 10 ³	3 × 10 ⁹
Fumarase	2 × 10 ⁻⁸	2 × 10 ³	10 ¹¹
Uréase	4 × 10 ⁻¹⁰	3 × 10 ⁴	10 ¹⁴
Désaminase	10 ⁻¹²	10 ²	10 ¹⁴
Phosphatase	10 ⁻¹⁵	10 ²	10 ¹⁷

1.4.3. Modèle de Michaelis et Menten

Les premiers à avoir proposé et développé une théorie en catalyse enzymatique sont Michaelis et Menten en 1913. Ils proposèrent une équation reposant sur l'hypothèse qu'un équilibre rapide entre les concentrations en enzyme, en substrat ainsi qu'en complexe enzyme-substrat s'établit au cours de la réaction catalysée (Figure 9). Pour que cette hypothèse soit valable, il faut que la concentration totale de substrat [S]₀ soit très supérieure par rapport à celle de l'enzyme [E]₀ (Michaelis et Menten 1913).

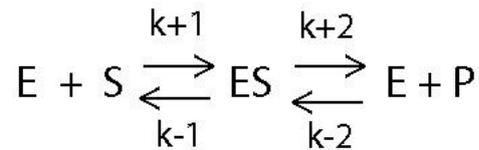


Figure 9. Représentation du mécanisme réactionnel selon Michaelis et Menten – k_{+1} , k_{+2} , k_{-1} et k_{-2} sont les constantes de vitesse.

Une expression de la constante de Michaelis et Menten (K_M) ainsi qu'une expression de la vitesse de la réaction catalytique (V) au cours du temps a également été proposée. Afin de déterminer les constantes de vitesse, des mesures de cinétique doivent être réalisées pour des concentrations de produit très faibles.

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad \text{avec} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

Ces équations font apparaître plusieurs constantes cinétiques :

- La vitesse maximale (V_{\max}) : elle correspond à l'asymptote de la branche hyperbolique dans le modèle de Michaelis-Menten. Cette branche hyperbolique est aussi appelée courbe de saturation de l'enzyme par le substrat (Figure 10).

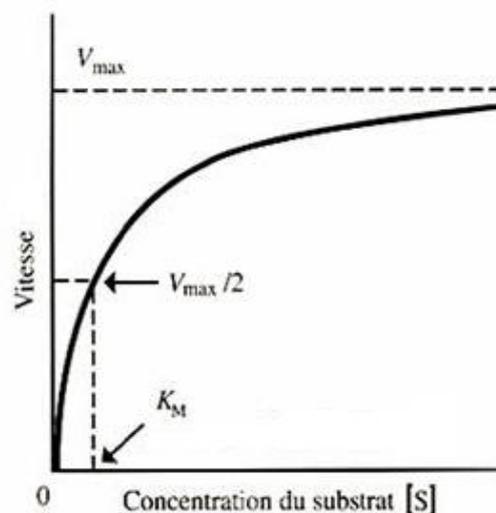


Figure 10. Relation hyperbolique entre la vitesse de la réaction enzymatique et la concentration initiale du substrat pour une concentration en enzyme donnée (Weil 2001).

- La constante de Michaelis et Menten (K_M) : elle est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour son substrat (l'affinité de l'enzyme diminue lorsque K_M augmente). Elle peut également être définie comme la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de réaction est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale (Figure 10).

Actuellement, le modèle de Michaelis et Menten est toujours utilisé pour déterminer les cinétiques de nombreuses réactions enzymatiques et notamment les cinétiques des réactions à deux substrats qui seront détaillées ultérieurement.

1.4.4. Paramètres influençant la catalyse

Les enzymes étant des molécules biologiques, ces dernières peuvent s'avérer sensibles et difficiles à manipuler. En effet, ces protéines sont habituées à exister à la température et au pH physiologique, une modification de ces conditions peut conduire à une modification de leur activité.

1.4.4.1. Influence de la concentration en substrat

La concentration en substrat n'a une influence sur la vitesse de réaction enzymatique qu'à des faibles concentrations en substrats. En effet, à partir d'une certaine concentration, la vitesse de réaction devient constante (Figure 10). Afin de déterminer les paramètres de l'équation de Michaelis-Menten (K_M et V_{max}), la connaissance de la concentration en substrat dans le milieu réactionnel est essentielle. Pour cela on utilise souvent la représentation linéarisée de Lineweaver et Burk (Figure 11).

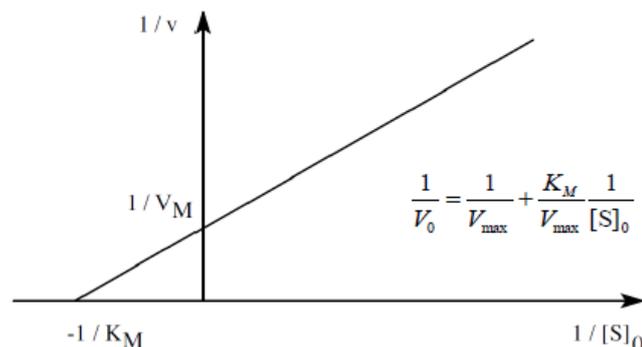


Figure 11. Représentation de Lineweaver et Burk - K_M : constante de Michaelis ; $[S]_0$ la concentration initiale en substrat et V_{max} la vitesse maximale de la réaction (Foucaut, et al. 2011).

1.4.4.2. Influence du pH

Comme pour de nombreux catalyseurs, il existe pour chaque enzyme une zone de pH optimale où la vitesse de réaction est plus grande. Du fait que le site actif de la protéine a généralement un caractère acido-basique, une modification de pH peut induire une modification du degré d'ionisation de certains groupements fonctionnels dont la charge positive ou négative est nécessaire à la formation du complexe enzyme-substrat. D'autre part, une valeur de pH trop élevée ou trop faible peut conduire à une dénaturation et/ou une inactivation irréversible de l'enzyme. Ainsi, des ruptures des liaisons non-covalentes (dénaturation) ou covalentes (dégradation) peuvent survenir. L'allure de l'activité de l'enzyme en fonction du pH est présentée sur la Figure 12 (Combes et Monsan 2009, Foucaut, et al. 2011, Weil 2001, Whitehurst et Van Oort 2010, Moussard 2006).

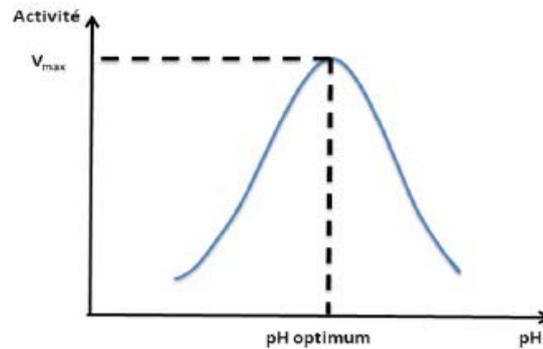


Figure 12. Variation de l'activité d'une enzyme en fonction du pH (Combes et Monsan 2009).

Par exemple, le site actif peut être formé de deux couples acide-base constitutifs des acides aminés : $R - NH_3^+ / R - NH_2$ et $R' - COOH / R' - COO^-$. La forme active de l'enzyme correspond à l'état intermédiaire dans lequel la fonction acide carboxylique est sous forme $R' - COOH / R' - COO^-$ et la fonction amine $R - NH_3^+$. Cette forme n'existe que dans un domaine de pH bien défini ; à un pH trop élevé ou trop faible les deux groupes sont soit sous forme acide soit sous forme basique. L'enzyme perd donc son activité (Foucaut, et al. 2011).

Il semble important de préciser que ce pH optimum varie en fonction du solvant dans lequel se trouve l'enzyme et peut être très différent selon l'enzyme en question (entre 1,5 et 2 pour la pepsine³ et entre 9,5 et 10 pour l'arginase⁴). Dans la plupart des cas, dès lors que le pH s'éloigne de deux unités de part et d'autre du pH optimum, la vitesse de réaction devient très faible. Cependant, dans le cas de la ribonucléase⁵ pancréatique, la vitesse devient déjà très faible à 0,5 unité de pH d'écart ce qui montre l'importance d'un milieu réactionnel bien tamponné pour l'étude des réactions enzymatique *in vitro* (Weil 2001, Moussard 2006).

Une modification de pH peut donc avoir un impact au niveau de l'enzyme elle-même mais également au niveau du substrat. En effet, une modification de pH peut entraîner une modification du degré d'ionisation du substrat ce qui peut empêcher la formation du complexe enzyme-substrat si ce dernier doit être sous une forme ionisée particulière pour pouvoir se fixer sur le site actif de l'enzyme (Combes et Monsan 2009, Weil 2001, Moussard 2006).

Pour résumer, le pH peut avoir deux effets bien distincts sur la réaction enzymatique :

- Aux valeurs extrêmes, il dénature ou dégrade la protéine entraînant son inactivation en modifiant le degré d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés.
- Aux valeurs intermédiaires, il influe directement sur l'activité enzymatique en modifiant l'état d'ionisation des acides aminés du site actif et celui du substrat.

³ Pepsine : Endoprotéase digestive du suc gastrique

⁴ Arginase : Hydrolase intervenant dans le cycle de l'urée

⁵ Ribonucléase ou ARNase : Nucléase qui catalyse la dégradation de l'ARN.

1.4.4.3. Influence de la température

Les enzymes sont habituées à fonctionner à température physiologique. En effet, plusieurs études ont pu montrer qu'au-delà de 40°C, la plupart d'entre elles deviennent instables. Ainsi, la température peut avoir deux effets bien distincts sur la réaction enzymatique (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009) :

- Elle peut l'accélérer (comme toute réaction chimique) en fournissant au système de l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation.
- Elle peut entraîner progressivement la dénaturation de l'enzyme et participer à son inactivation.

La résultante de ces deux phénomènes fait apparaître deux phases bien distinctes qui correspondent à deux phénomènes différents comme le montre la Figure 13 (Weil 2001, Moussard 2006).

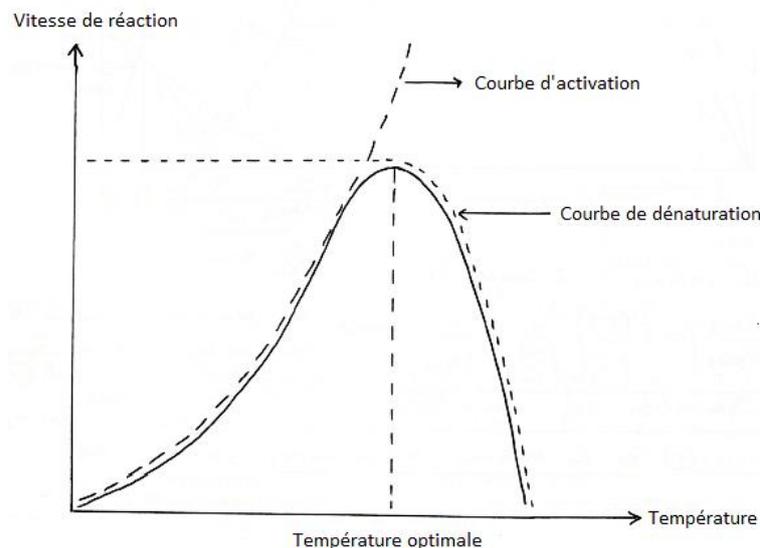


Figure 13. Influence de la température sur la vitesse d'une réaction enzymatique (Weil 2001).

Dans la zone de basses températures, la vitesse de la réaction augmente quand la température augmente. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'énergie cinétique des molécules de substrats et de solvant augmente, favorisant ainsi les collisions avec l'enzyme et, *in fine* la réaction. Puis, au-delà d'une certaine température qui varie selon les enzymes, nous assistons au phénomène de dénaturation de la protéine qui se caractérise par une chute brutale de la vitesse de réaction. La courbe en trait plein sur la Figure 13 représente la résultante des deux courbes en pointillés : la courbe d'activation et celle de dénaturation. La température optimale peut ainsi être déterminée à l'endroit où les deux phénomènes s'équilibrent. Cette température optimale est propre à l'enzyme mais dépend également de nombreux paramètres du procédé utilisé : le pH, la force ionique du milieu et le temps de réaction. (Weil 2001, Moussard 2006).

1.4.4.4. Influence de la pression

L'effet de la pression sur l'activité et la stabilité enzymatique fut investigué en 1932. Même si certaines expériences ont permis d'élucider une partie du phénomène, les mécanismes mis en jeu sont encore non connus à l'heure actuelle. Il a ainsi été démontré qu'une augmentation de la pression dans certaines conditions pouvait avoir un effet positif sur la stabilité de l'enzyme et notamment chez les lipases. Cependant, la nature de la phase en contact avec les enzymes doit être prise en compte et peut avoir un impact non négligeable sur les résultats observés. Il a également été montré qu'une augmentation trop importante de la pression conduisait à une modification de la structure enzymatique pouvant entraîner la dénaturation de cette dernière (Suzuki et Kitamura 1963, Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009, Habulin et Knez 2001, Knez 2009).

- Influence de la pression sur la stabilité enzymatique

Pour étudier l'influence de la pression sur la stabilité enzymatique (mesurée à l'aide du taux d'activité résiduelle), Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera ont incubé pendant quatre heures une lipase de *Candida antarctica* à 80°C pour des pressions allant de 10 à 700 MPa. L'enzyme utilisée a préalablement été immobilisée sur une résine d'acrylique macroporeuse et mise en contact avec de l'hexane. Nous verrons que l'immobilisation des enzymes permet d'augmenter leur stabilité pour les rendre plus résistantes. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 14 (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009).

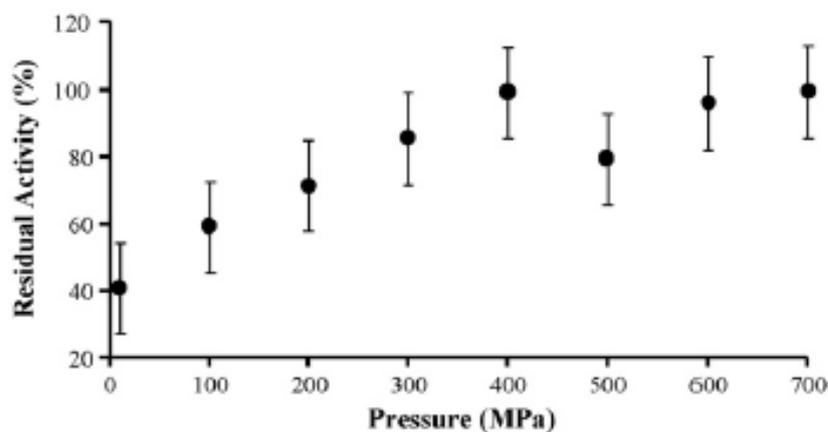


Figure 14. Effet de la pression sur le taux d'activité résiduelle de l'enzyme après 4h d'incubation à 80°C (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009).

Ces expériences ont permis de mettre en évidence que dans ce cas précis, l'activité résiduelle et donc la stabilité enzymatique à 400, 600 et 700 MPa était significativement plus élevée qu'à 100 MPa. Des expériences similaires ont été menées sur une lipase de *Rhizomucor miehei* en solution aqueuse ainsi que sur une invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Des résultats semblables ont pu être observés (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009).

- Influence de la pression sur l'activité catalytique de l'enzyme

L'influence de la pression sur l'activité enzymatique a également été étudiée. L'activité catalytique de la lipase a été mesurée à 40°C et à 80°C pour des pressions variant de 0 à 600 MPa. Les résultats de ces expérimentations sont présentés sur la Figure 15 ; l'activité enzymatique est ici matérialisée par la vitesse maximale V_{MAX} .

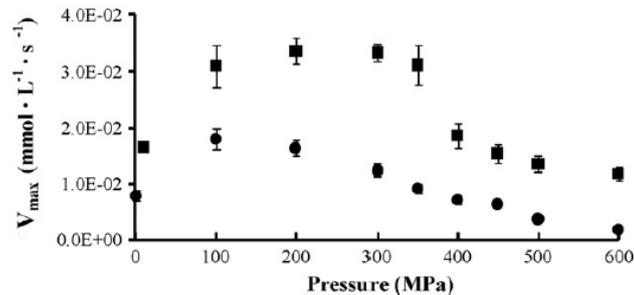


Figure 15. Effet de la pression sur la valeur de V_{max} à 40°C (●) et 80°C (■) d'une lipase immobilisée (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009).

Nous remarquons tout d'abord que l'activité enzymatique est plus élevée pour une température de 80°C quelle que soit la pression appliquée. Cependant, pour une température de 80°C, une augmentation de l'activité est observée pour des pressions allant de 0,1 à 200 MPa puis est suivie d'une diminution de l'activité pour des pressions plus élevées (350 à 600 MPa). Le même phénomène est observé pour une température de 40°C mais avec un point d'inflexion situé plus tôt vers 100 MPa. Ceci nous permet de mettre en évidence une relation entre pression et température.

La pression et la température sont généralement connues comme pouvant avoir des effets antagonistes d'un point de vue moléculaire (une augmentation de la pression à une température donnée conduit à un changement conformationnel de l'enzyme ou à une diminution de l'entropie du système). Cet effet antagoniste peut être matérialisé à l'aide d'une ellipse comme le présente la Figure 16 (Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009, Guiavarc'h, et al. 2005).

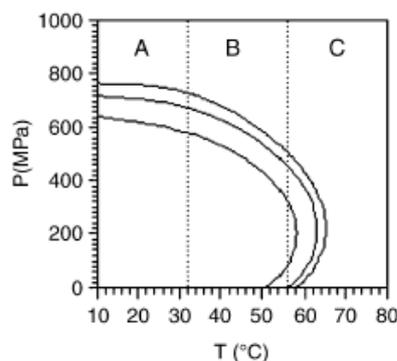


Figure 16. Inactivation de la pectine méthylestérase de *Citrus paradisi* – La courbe en haut présente une constante d'inactivation enzymatique $k = 0.1 \text{ min}^{-1}$, celle du milieu $k = 0.05 \text{ min}^{-1}$ et celle du bas $k = 0.01 \text{ min}^{-1}$ (Guiavarc'h, et al. 2005).

Cette figure fournit une indication sur l'évolution de l'inactivation enzymatique (plus la valeur de la constante d'inactivation k est importante et plus l'inactivation sera importante) :

- Zone A : au sein de cette zone, une augmentation de la température n'a pas d'effet sur l'inactivation enzymatique mais une augmentation de pression entre 600 et 800 MPa induit un accroissement de l'inactivation. Ainsi, à des faibles températures, seule la pression aura un impact sur l'activité enzymatique.
- Zone B : sur cette partie de la courbe, une augmentation de température ou de pression induit une augmentation de la vitesse d'inactivation de l'enzyme. Ainsi, à des températures intermédiaires, l'activité enzymatique est régie par l'interaction entre la température et la pression.
- Zone C : une augmentation de température à une pression constante donnée aura un impact sur la vitesse d'inactivation enzymatique. En revanche, en regardant les courbes d'isovitesse d'inactivation, on observe que lorsque la pression augmente entre 200 et environ 300 MPa, la vitesse d'inactivation peut rester constante même en augmentant la température (ce n'est plus vrai au-delà de 200 Mpa). Vu différemment, on observe que la vitesse d'inactivation à une température donnée peut même diminuer lorsque la pression augmente entre 0 et 200 MPa. Ceci reflète un effet antagoniste fort de la pression (entre 0 et 200 MPa) sur l'effet inactivant de la température.

Aux vues de ces conclusions, la pression est donc un paramètre important à prendre en compte dans la mise en œuvre d'une réaction enzymatique au même titre que la concentration en substrat, le pH et la température. De plus, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence une interaction entre ces divers facteurs qui doit être prise en compte pour déterminer les conditions opératoires optimales à utiliser. Enfin, il semble important de rappeler que les conditions opératoires dépendent fortement de l'enzyme, du substrat ainsi que du milieu au sein duquel a lieu la biocatalyse.

2. Utilisation industrielle des enzymes

2.1. Production commerciale

2.1.1. Sources d'enzymes

Les sources des enzymes utilisées en industrie pour diverses applications sont multiples. En effet, les enzymes peuvent être extraites de n'importe quel organisme vivant : bactéries, champignons, plantes ou encore animaux. Parmi l'ensemble des enzymes utilisées, la moitié proviennent de champignons ou de levures, environ 30% des bactéries et ce qui reste se divise entre les sources animales (8%) et les sources végétales (4%). Il paraît important de préciser que selon le type de source, l'extraction et le traitement des enzymes seront différents. Les divers modes d'extraction sont présentés sur la Figure 17 (Chaplin et Bucke 1990, Combes et Monsan 2009).

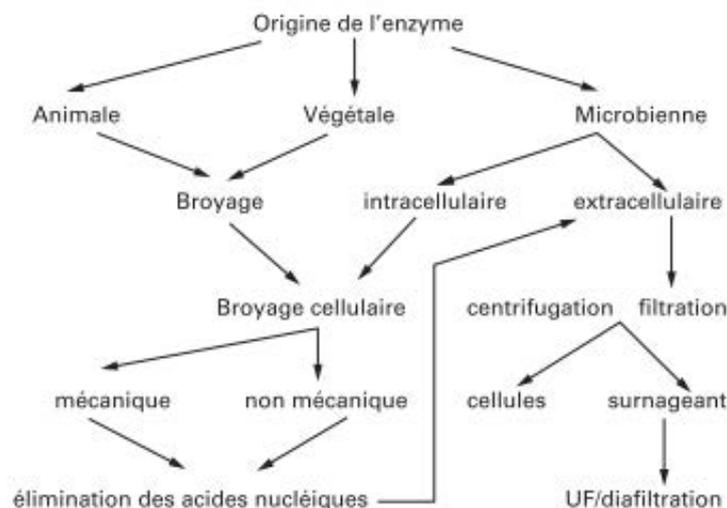


Figure 17. Extraction des enzymes selon leur origine (Combes et Monsan 2009).

La très grande majorité des enzymes utilisées dans l'industrie proviennent donc de la culture de micro-organismes et cela pour plusieurs raisons :

- Faible coût de production.
- Teneur en enzyme mieux contrôlable.
- Composition des extraits connue et constante.
- Peu ou pas de molécules dangereuses ou gênantes (composés phénoliques, inhibiteurs d'enzyme) contrairement aux tissus végétaux ou animaux.

Dans la pratique, la grande majorité des enzymes microbiennes sont extraites à partir d'un nombre limité d'espèces parmi lesquelles on retrouve la famille des *Aspergillus*, des *Bacillus* ou encore des *Kluyveromyces* ou *Saccharomyces*. Les origines de quelques enzymes industrielles sont présentées au travers du Tableau IV (Chaplin et Bucke 1990, Combes et Monsan 2009).

Tableau IV. Origines et applications industrielles (Chaplin et Bucke 1990).

Enzyme	N°EC	Origine	Utilisation industrielle
ENZYMES ANIMALES			
Catalase	1.11.1.6	Foie	Alimentaire
Chymiotrypsine	3.4.21.1	Pancréas	Traitement du cuir
Lipase	3.1.1.3	Pancréas	Alimentaire
Présure	3.4.23.4	Abomasum ⁶	Fromagerie
Trypsine	3.4.21.4	Pancréas	Traitement du cuir
ENZYMES VEGETALES			
α -amylase	3.2.1.1	Orge	Brasserie
β -amylase	3.2.1.2	Orge	Brasserie
Bromélaïne	3.4.22.4	Ananas	Brasserie
β -glucanase	3.2.1.6	Orge	Brasserie
Ficine	3.4.22.3	Figue	Alimentaire
Lipoxygénase	1.13.11.12	Soja	Alimentaire
Papaïne	3.4.22.2	Papaye	Industrie de la viande
ENZYMES BACTERIENNES			
α -amylase	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	Industrie de l'amidon
β -amylase	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	Industrie de l'amidon
Asparaginase	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	Domaine de la santé
Glucose isomérase	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	Sirop de fructose
Pénicilline amidase	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	Pharmaceutique
Protéase	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	Détergent
Pullulanase	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	Industrie de l'amidon
ENZYMES FONGIQUES			
α -amylase	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	Panification ⁷
Aminoacylase	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	Pharmaceutique
Glucoamylase	3.2.1.3	<i>Aspergillus</i>	Industrie de l'amidon
Catalase	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	Alimentaire
Cellulase	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	Traitement des déchets

⁶ Abomasum ou caillette : estomac des ruminants

⁷ Panification : fabrication du pain

Dextranase	3.2.1.11	<i>Penicillium</i>	Alimentaire
Glucose oxydase	1.1.3.4	<i>Apergillus</i>	Alimentaire
Lactase	3.2.1.23	<i>Aspergillus</i>	Produits laitiers
Lipase	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	Alimentaire
Présure	3.4.23.6	<i>Mucor miehei</i>	Industrie fromagère
Pectinase	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	Industrie des boissons
Pectine lyase	4.2.2.10	<i>Aspergillus</i>	Industrie des boissons
Protéase	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	Panification
Raffinase	3.2.1.22	<i>Mortieralla</i>	Alimentaire
ENZYMES DE LEVURE			
Invertase	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	Confiserie
Lactase	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	Produits laitiers
Lipase	3.1.1.3	<i>Candida</i>	Alimentaire
Raffinase	3.2.1.22	<i>Saccharomyces</i>	Alimentaire

Le développement de telles enzymes commerciales demande un savoir-faire certain et les producteurs ou fournisseurs ne s'avèrent pas très nombreux. En effet, cette activité requière de nombreuses compétences techniques et spécifiques (Chaplin et Bucke 1990) :

- Recherche de nouvelles enzymes d'intérêt.
- Fermentation pour la production d'enzymes.
- Purification enzymatique à grande échelle.
- Formulation des préparations enzymatiques.
- Produire en conformité avec les autorités réglementaires.

2.1.2. Marché des enzymes

De nombreux biochimistes et microbiologistes ont longtemps considéré la biocatalyse comme une alternative intéressante à la catalyse purement chimique. Cependant, les applications industrielles ont eu du mal à se développer. Pourtant, les enzymes permettent d'obtenir des composés dont la synthèse chimique peut s'avérer contraignante et difficile voire impossible tout en générant moins de produits secondaires et moins de déchets toxiques. Par conséquent, les produits obtenus par synthèse enzymatique sont de meilleure qualité et contiennent moins d'impuretés, ce qui permet de limiter ou même d'éliminer les étapes de purification (Schmid, et al. 2001, Schmid, et al. 2002).

Le marché des enzymes s'est développé à partir des années 1970. A titre d'exemple, ce marché a généré, en 2008, environ neuf-cent millions d'euros pour des applications alimentaires et 4,3

millions pour la production d'insuline uniquement. Le marché industriel des enzymes comprend trois principaux types d'utilisation : les enzymes pour applications technologiques, les enzymes de consommation humaine et les enzymes de consommation animale comme le présente le Tableau V (Spinnler 2013, CBDM.T 2008, Hasan, Ali Shah et Hameed 2006).

Tableau V. Marché global des enzymes en millions de Dollars (Hasan, Ali Shah et Hameed 2006).

	2002	2003	2004	2009	2002 → 2009
Applications technologiques	978,2	1009,2	1040,0	1222,0	3,3%
Alimentation humaine	701,0	720,0	740,0	863,0	3,1%
Alimentation animale	210,8	215,6	220,0	267,0	3,9%
Total	1890,0	1945,0	2000,0	2352,0	3,3%

Ainsi, on remarque que ce marché a connu une croissance constante au cours des années 2000 et cela peut s'expliquer par une diminution des prix due à une arrivée sur le marché de nouveaux fournisseurs. Cette croissance est matérialisée sur la Figure 18. Même si de nombreux secteurs industriels s'intéressent de plus en plus à ces protéines, le marché est globalement réparti entre cinq principaux secteurs comme le présente la Figure 19.

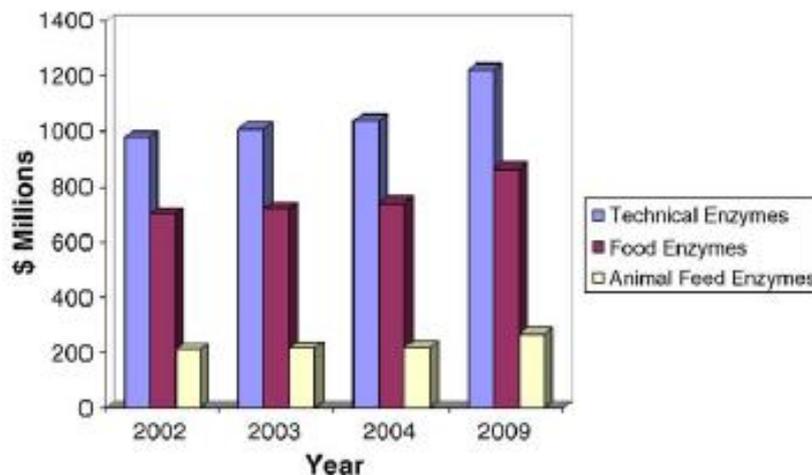


Figure 18. Evolution du marché des enzymes de 2002 à 2009 (Hasan, Ali Shah et Hameed 2006).

A l'aide de nombreux progrès scientifiques obtenus notamment en biotechnologie et en ingénierie des protéines, l'essor des enzymes industrielles a pu se mettre en place. Ainsi, l'ensemble de ces progrès a permis la création d'enzymes commerciales adaptées aux besoins industriels en termes de thermo-stabilité et de spécificité. Plusieurs sociétés chimiques et pharmaceutiques telles que DSM, BASF, LONZA, NOVARTIS ou ROCHE ont opté pour l'utilisation d'enzymes dans leurs procédés (Fox et Huisman 2008, Schmid, et al. 2001, Schmid, et al. 2002).

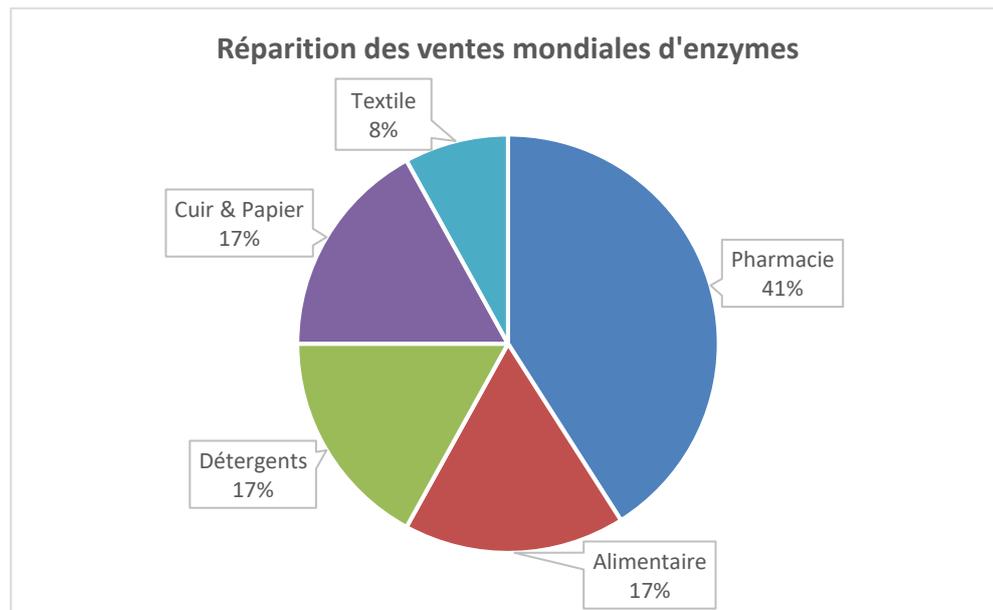


Figure 19. Répartition des ventes mondiales d'enzymes (d'après Chandel, et al. 2007).

2.2. Optimisation des enzymes

2.2.1. Principe et intérêt

Depuis plusieurs années, l'ingénierie enzymatique constitue une discipline où des progrès majeurs ont été effectués. L'utilisation des enzymes est en effet grandissante dans les industries chimiques, pharmaceutiques ou alimentaires. Cet essor s'est accompagné d'une nécessité d'optimiser les enzymes dans le but d'obtenir des protéines de meilleure qualité (stabilité, spécificité, solubilité) (Poyot, et al. 2007, Roodveldt, Aharoni et Tawfik 2005, Fox et Huisman 2008, Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009).

Même si de nombreux progrès en matière d'extraction et de purification enzymatiques ont été réalisés ces dernières années, il apparaît que les enzymes naturelles ne sont que très rarement adaptées aux exigences des procédés industriels. Leur utilisation à l'état naturel ou « sauvage » est en effet souvent compromise par :

- Une stabilité limitée dans les conditions du procédé.
- Une solubilité restreinte de certains substrats dans un milieu donné.
- Une inhibition par des produits de la réaction.
- Une spécificité trop faible pour un substrat donné.
- L'existence de réactions parasites ou compétitrices.

Ces limitations peuvent facilement s'expliquer par le fait qu'au cours de l'évolution, les enzymes se sont adaptées à des réactions biologiques spécifiques se déroulant dans des milieux physiologiques particuliers. Ces conditions sont malheureusement très différentes des conditions auxquelles les enzymes seront confrontées dans les procédés industriels. La modification des

propriétés enzymatiques en vue de les adapter à ces conditions opératoires constitue donc un enjeu majeur pour les industriels. Ainsi, l'ingénierie protéique a pour but de modifier la structure de ces protéines afin d'optimiser leurs propriétés fonctionnelles (Poyot, et al. 2007, Kuchner et Frances H. 1997).

2.2.2. Les techniques utilisées

Au cours de ces dernières années plusieurs techniques ont pu être expérimentées. On dénombre ainsi trois principales techniques d'optimisation de ces enzymes : la mutagenèse dirigée, la mutagenèse aléatoire et l'évolution dirigée. Ces différentes techniques consistent en une modification structurale d'enzymes naturelles dans le but de les rendre plus performantes voire même de générer de nouvelles activités enzymatiques (Combes et Monsan 2009, Poyot, et al. 2007).

2.2.2.1. La mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée consiste en une substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la protéine par un ou plusieurs autres acides aminés. Cette technique nécessite une parfaite connaissance de la structure 3D de la protéine et surtout du rôle précis de chaque acide aminé. Cette méthode peut s'avérer longue à mettre en œuvre et la modification d'un ou plusieurs acides aminés peut rapidement conduire à un repliement différent de la protéine initiale et conduire à une perturbation de l'activité catalytique. Les résultats s'avèrent ainsi difficilement prévisibles et parfois décevants (Poyot, et al. 2007, Chaplin et Bucke 1990, Combes et Monsan 2009).

2.2.2.2. La mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire est en tout point identique à la mutagenèse dirigée à l'exception que la substitution d'acides aminés se fait aléatoirement au sein de la protéine. Les substitutions aléatoires génèrent une multitude de mutants qui seront par la suite analysés et pouvant potentiellement produire l'effet escompté. Dans le meilleur des cas, seulement un mutant sur mille à dix-mille se révèle intéressant (Poyot, et al. 2007).

2.2.2.3. L'évolution dirigée

L'évolution dirigée est une méthode qui vise à reproduire, au laboratoire et en un temps limité, les mécanismes aléatoires de l'évolution. L'unique différence avec l'évolution que l'on pourrait qualifier de « naturelle » vient du fait que l'objectif final est clairement établi tout comme les moyens d'y parvenir. Ces derniers sont directement contrôlés par l'expérimentateur (Poyot, et al. 2007, Kuchner et Frances H. 1997).

Schématiquement une expérience d'évolution dirigée se décline en six étapes comme le présente la Figure 20. La première d'entre elle consiste à modifier aléatoirement *in vitro* le gène codant pour la protéine que l'on souhaite optimiser. Les étapes suivantes (étapes 2 à 4) consistent en une expression de ce gène désormais muté dans une cellule hôte pour obtenir une banque de

variants. Les étapes 5 et 6 permettent de trier et de sélectionner la protéine qui a acquis la ou les caractéristiques souhaitées au sein de cette banque de variants. Il est souvent recommandé d'enchaîner à plusieurs reprises ce cycle de six étapes afin d'accumuler les mutations avantageuses (Poyot, et al. 2007, Kuchner et Frances H. 1997, Roodveldt, Aharoni et Tawfik 2005).

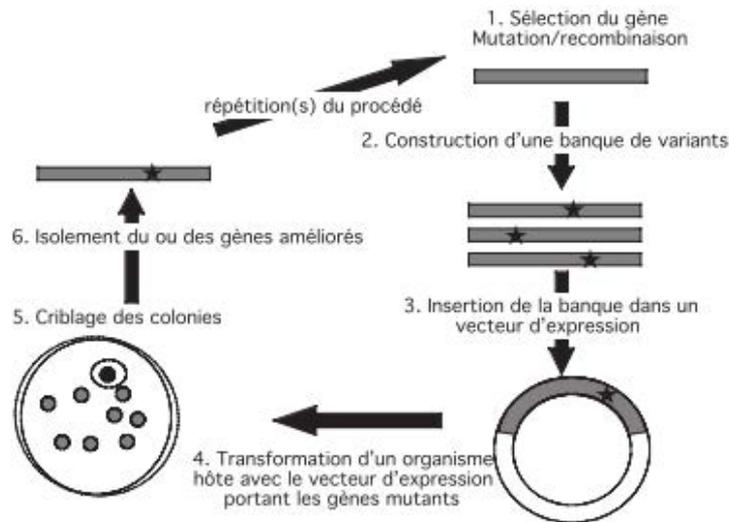


Figure 20. Principales étapes d'une expérience d'évolution dirigée d'une enzyme (Poyot, et al. 2007).

2.2.3. Exemples d'optimisations

2.2.3.1. Stabilité thermique

La température constitue pour les enzymes un facteur physique primordial. Dans de nombreux procédés industriels, une augmentation de température peut avoir des conséquences intéressantes comme une augmentation de la solubilité des substrats, une diminution de la viscosité ou encore une augmentation de la vitesse de réaction. Ainsi, il semble intéressant de pouvoir modifier l'enzyme pour lui permettre de rester fonctionnelle à des températures plus élevées que ce qu'elle ne peut naturellement supporter (Poyot, et al. 2007, Kuchner et Frances H. 1997).

Il a été démontré que la modification d'un seul acide aminé permet dans la plupart des cas d'augmenter la température d'inactivation de l'enzyme de l'ordre de 1 à 2°C. Même si cette augmentation paraît faible, il est également connu que plusieurs mutations combinées peuvent conduire à une stabilité thermique beaucoup plus grande. Par exemple, deux mutations seulement ont permis d'augmenter la température de d'inactivation de la kanamycine-nucléotidyltransférase de 15°C (Liao, McKenzie et Hageman 1986, Declerck, et al. 2003, Stemmer 1994).

2.2.3.2. Activité et spécificité du substrat

Un autre critère revêtant une importance particulière pour une application industrielle concerne l'activité et la spécificité du substrat. Ces deux paramètres sont dans la plupart des cas

dus aux acides aminés formant le site actif. Ainsi, l'objectif est de modifier les résidus constituant le site de liaison entre le substrat et l'enzyme. De très nombreux exemples peuvent illustrer l'efficacité de l'évolution dirigée pour augmenter l'activité catalytique. A titre d'exemple, les travaux de Suen et al. ont pu démontrer qu'une modification de la lipase de *Candida antarctica* a permis d'augmenter son activité de seize fois vis-à-vis de son substrat (Suen, et al. 2004, Poyot, et al. 2007, Roodveldt, Aharoni et Tawfik 2005).

2.2.3.3. Stabilité et activité dans les milieux artificiels

Pour faciliter la solubilisation des substrats et pour permettre à certaines réactions enzymatiques d'avoir lieu, l'utilisation de solvants organiques est souvent rencontrée. Cependant, il se peut que l'enzyme perde son activité dans ce genre de milieu sans que sa conformation ne soit pour autant compromise. Par exemple, la Figure 21 nous montre que l'optimisation de la subtilisine E⁸ a permis de conduire à une activité amplifiée d'un facteur cent à mille dans le di-méthyl-formamide (You et Arnold 1994, Poyot, et al. 2007).

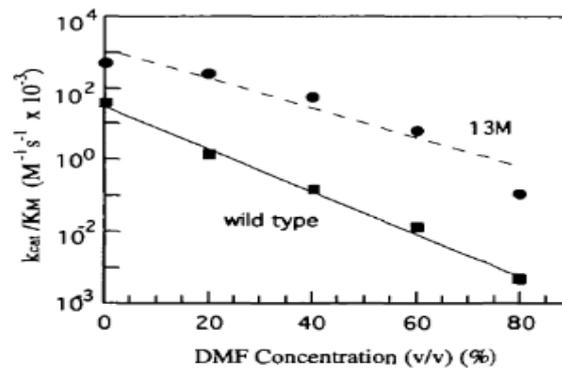


Figure 21. Comparaison de l'activité catalytique de l'enzyme « sauvage » (wild type) et de l'enzyme modifiée (13M) en fonction de la concentration en diméthylformamide (You et Arnold 1994).

2.3. Immobilisation des enzymes

2.3.1. Principe et intérêts de l'immobilisation

Dès 1916, Nelson et Griffith ont mis en évidence que l'invertase qui catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose conservait son activité lorsqu'elle était adsorbée sur du charbon actif ou de l'hydroxyde d'aluminium. Les travaux concernant l'immobilisation des enzymes ne se sont en réalité développés qu'à partir des années soixante lorsque ces dernières sont devenues disponibles (Combes et Monsan 2009, Brown et Biellmann 1992, Blecker, et al. 2008, Ivanov et Schneider 1997, Datta, Christena et Rajaram 2013).

⁸ Subtilisine E : protéase qui catalyse l'hydrolyse des protéines.

Pour qu'une réaction enzymatique ait lieu dans les meilleures conditions possibles, il faut que cette dernière soit stable. Ainsi, au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques. Une des approches permettant d'augmenter la stabilité de ces enzymes est l'immobilisation sur une matrice appropriée en raison de la préservation de la structure tridimensionnelle active. Plusieurs cas de figure peuvent se présenter comme le montre la Figure 22 et le processus d'immobilisation se doit d'être maîtrisé pour permettre une activité optimale de l'enzyme (Brown et Biellmann 1992, Combes et Monsan 2009, Blecker, et al. 2008, Chaplin et Bucke 1990).

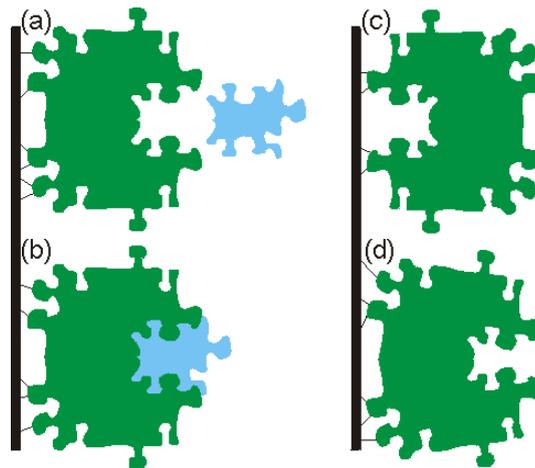


Figure 22. Différents cas de figure suite à l'immobilisation de l'enzyme – Les figures (a) et (b) montrent le cas de figure idéal où le site actif est prêt à recevoir le substrat. La figure (c) montre que l'enzyme peut être immobilisée de telle sorte que le site actif n'est plus accessible par le substrat. La figure (d) nous présente une distorsion du site actif ne permettant plus à l'enzyme de fixer son substrat (Chaplin et Bucke 1990).

D'un point de vue industriel, il a été observé que les biocatalyseurs immobilisés présentaient une meilleure stabilité et dans certains cas pouvait induire des changements au niveau l'activité enzymatique, du pH optimum et de l'affinité vis-à-vis du substrat. Ces observations ont également permis de mettre en évidence une activité différente en fonction du type de support et de la méthode d'immobilisation utilisée. D'autre part, l'immobilisation de l'enzyme permet soit de l'utiliser en réacteur continu ; soit de pouvoir la récupérer et la réutiliser (ces deux aspects peuvent également être combinés). Il est ainsi très simple d'augmenter de manière significative l'économie d'un procédé enzymatique et ceci d'autant plus que le coût de l'enzyme est élevé (Blecker, et al. 2008, Ivanov et Schneider 1997, Datta, Christena et Rajaram 2013, Cabrera-Padilla, et al. 2012, Eisenmenger et Reyes-De-Corcuera 2009, Dijkstra, Merchant et Keurentjes 2007).

Il est également important de rappeler que dans les systèmes vivants ou dans la nature, les enzymes n'agissent pratiquement qu'à l'état immobilisé comme par exemple à la surface des structures membranaires d'une cellule ou d'un organelle cellulaire. L'immobilisation d'une enzyme permet donc de mieux contrôler et déterminer l'effet du microenvironnement sur son activité catalytique (Combes et Monsan 2009, Chaplin et Bucke 1990).

Ainsi, Ivanov et Schneider ont permis de mettre en évidence ce phénomène en mesurant l'activité enzymatique de la lipase issue de *Pseudomonas fluorescens* lorsque cette dernière était immobilisée sur différents supports (Figure 23 (Balcao, Paiva et Malcata 1996, Ivanov et Schneider 1997)).

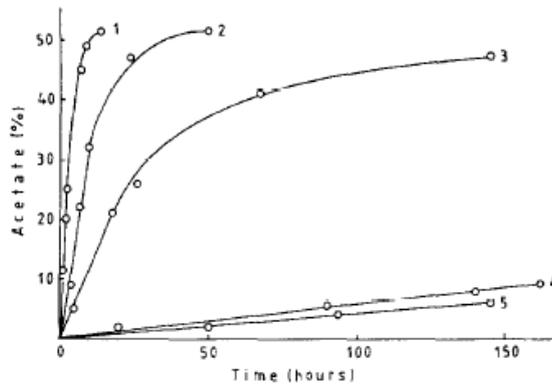


Figure 23. Cinétique d'acétylation du phényl-1-éthanol catalysé suite à différentes immobilisations – L'activité enzymatique est matérialisée par le pourcentage de produit formé – (1) Célite, (2) Octyl-silice, (3) Eupergit C250L, (4) Amino-propyl-silice, (5) Silice de glutardialdéhyde activée (Ivanov et Schneider 1997).

On remarque aisément que le type de support choisi influe énormément sur l'activité catalytique de l'enzyme. Ces résultats ont également permis de calculer les taux initiaux d'estérification (reliés directement à la vitesse initiale enzymatique) selon le type de support utilisé. Ces derniers ont ainsi pu mettre en évidence que ce taux pouvait être multiplié par un facteur vingt-cinq en fonction du type de support (Ivanov et Schneider 1997).

D'autre part, Cabrera-Pasdilla et al. ont réalisé des tests sur l'immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* dans le but de déterminer les conditions de pH et de température optimales de l'enzyme immobilisée. A l'aide de leurs expériences, ces derniers ont mis en évidence que le pH ainsi que la température optimale des enzymes libres et des enzymes immobilisées sont différents comme le présente la Figure 24 (Cabrera-Padilla, et al. 2012).

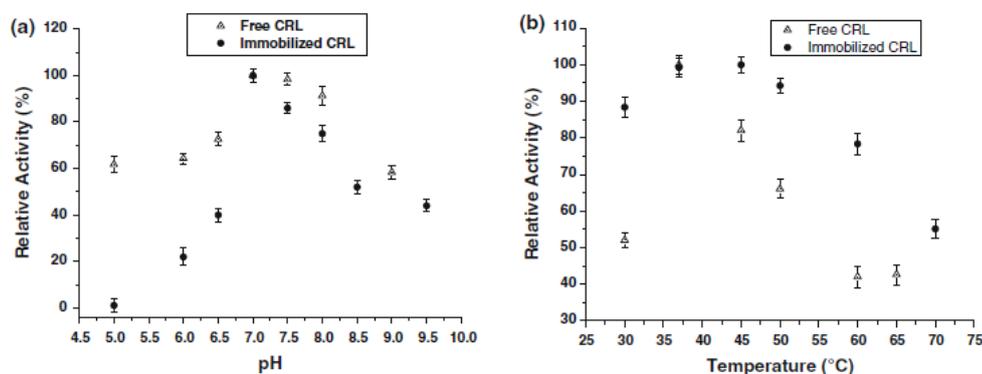


Figure 24. Effet du pH (a) et de la température (b) sur l'activité relative de l'enzyme libre ("Free CRL") et de l'enzyme immobilisée ("Immobilized CRL") (Cabrera-Padilla, et al. 2012).

L'immobilisation des enzymes se révèle indispensable à la mise en œuvre de réactions catalytiques à l'échelle industrielle et les différents processus se doivent d'être maîtrisés par les industriels.

2.3.2. Les différentes méthodes d'immobilisation

Il existe quatre principales méthodes d'immobilisation faisant appel à des processus physiques et chimiques différents comme le présente la Figure 25 :

- Immobilisation par adsorption (Figure a).
- Immobilisation par liaison covalente (Figure b).
- Immobilisation par inclusion (Figure c).
- Immobilisation par encapsulation (Figure d).

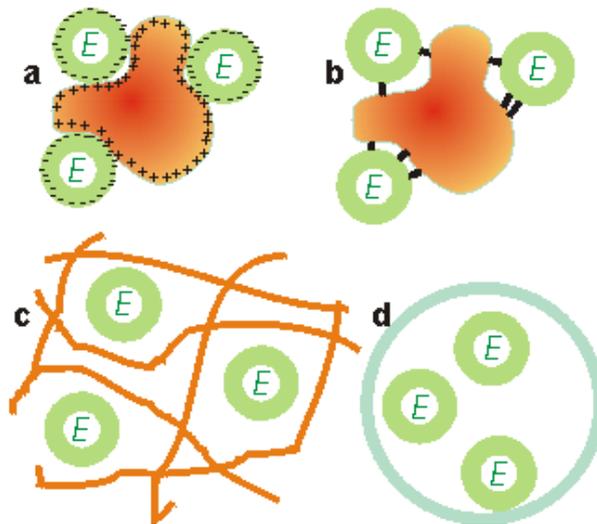


Figure 25. Systèmes d'enzymes immobilisés – (a) Immobilisation par adsorption ; (b) Immobilisation par liaison covalente ; (c) Immobilisation par inclusion ; (d) Immobilisation par encapsulation (Chaplin et Bucke 1990).

2.3.2.1. Immobilisation par adsorption

Parmi l'ensemble des techniques d'immobilisation, l'adsorption demeure la méthode la plus simple et la plus rentable économiquement car la chimie impliquée est moins complexe et coûteuse. Cette méthode repose sur l'établissement d'interactions de type liaisons faibles au niveau des groupes fonctionnels situés à la surface de la molécule d'enzyme et ceux du support insoluble. Les liaisons mises en jeu sont donc des liaisons de type Van der Waals, ionique, hydrogène, hydrophobe ou de transferts de charges par exemple (Brown et Biellmann 1992, Combes et Monsan 2009, Blecker, et al. 2008, Chaplin et Bucke 1990).

Les supports adsorbants utilisés sont très variés tant du point de vue de leur structure chimique que de celui de leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité). Ces derniers peuvent être classés en deux catégories (Brown et Biellmann 1992, Combes et Monsan 2009) :

- Supports minéraux : aluminosilicates, silice, verre poreux, oxydes métalliques, charbon actif.
- Supports organiques : ils peuvent être naturels (collagène, cellulose, amidon, agarose, dextrane) ou synthétiques (polymères acryliques, méthacryliques, polystyrène, copolymères).

Les quantités d'enzymes immobilisées par adsorption sont extrêmement variables et sont évidemment dépendantes de la nature du support utilisé. Même si ce procédé reste simple tant au niveau technologique qu'au niveau de sa mise en œuvre, plusieurs paramètres influencent l'efficacité de l'adsorption (Combes et Monsan 2009, Chaplin et Bucke 1990, Ivanov et Schneider 1997).

- Concentration en enzyme : un palier de saturation du support est observé à partir d'une masse d'enzyme donnée variant de quelques dizaines à quelques centaines de mg/g de support (Figure 26).
- L'aire spécifique disponible par unité de masse de support : elle dépend de la taille des particules et de leur porosité ainsi que de la taille de l'enzyme à immobiliser.
- Le temps de contact : le phénomène d'adsorption est généralement rapide et ceci d'autant plus que la granulométrie du support est faible et que la diffusivité de l'enzyme est élevée.
- Le milieu : de nombreux paramètres comme le pH et la force ionique du milieu réactionnel sont importants lors du processus d'adsorption. En effet, l'ajout d'additifs diminuant la solubilité de l'enzyme tels que des sels et des solvants favoriseront l'adsorption. De même, cette dernière sera d'autant plus importante que l'on se rapprochera du point isoélectrique⁹ de l'enzyme, qui correspond à une solubilité maximale (en milieu non aqueux).

⁹ Point isoélectrique : pH auquel l'enzyme aura une charge nette nulle.

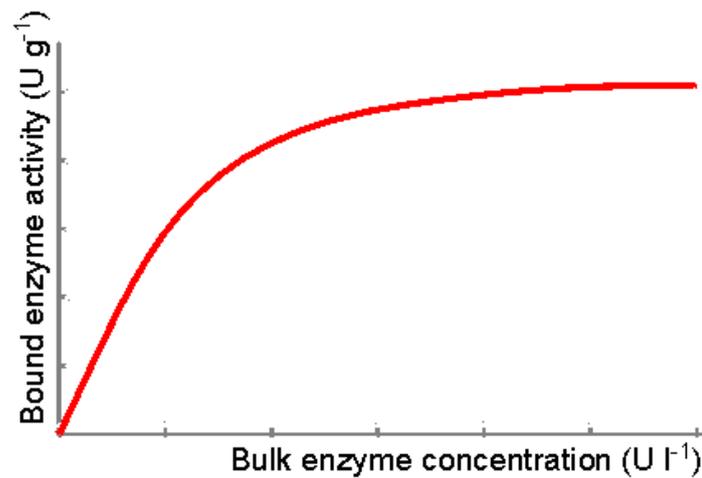


Figure 26. Représentation schématique de l'effet de la concentration d'une enzyme soluble (*Bulk enzyme concentration*) sur l'activité de l'enzyme immobilisée (*Bound enzyme activity*) par adsorption sur une matrice – Le taux d'enzyme adsorbé dépend du temps d'incubation, du pH, de la force ionique, de la surface spécifique, de la porosité et des caractéristiques physiques de l'enzyme et du support (Chaplin et Bucke 1990).

2.3.2.2. Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le but d'obtenir des liaisons très solides entre enzymes et support. C'est ainsi le meilleur moyen d'éviter tout risque de libération des molécules d'enzymes dans le milieu. Pour la réalisation d'une immobilisation par liaison covalente, il est nécessaire d'activer au préalable le support de fixation ou l'enzyme elle-même. Il faut pour cela impliquer les groupes fonctionnels présents à la surface de la molécule d'enzyme dont la réactivité chimique est très limitée. La liaison covalente doit s'établir dans des conditions douces afin d'éviter toute dénaturation de l'enzyme et empêcher qu'un groupement fonctionnel ne soit altéré.

On peut ainsi distinguer deux groupes de méthodes d'immobilisation par liaison covalente : sur un support insoluble ou par réticulation (Brown et Biellmann 1992, Blecker, et al. 2008, Combes et Monsan 2009).

- Immobilisation par réticulation : le principe est de ponter les molécules d'enzymes entre elles ou entre elles et d'autres protéines à l'aide d'un agent de réticulation comme le glutaraldéhyde afin d'obtenir des macrostructures insolubles.
- Immobilisation sur support : mise en contact de l'enzyme avec un support activé portant des groupes suffisamment réactifs pour réagir avec ceux de l'enzyme dans des conditions compatibles avec la préservation de l'activité catalytique. Les supports utilisés pour l'immobilisation par liaison covalente sont présentés dans le Tableau VI.

Tableau VI. Supports utilisés pour l'immobilisation par liaison covalente avec leurs groupes réactifs (Blecker, et al. 2008).

Substances organiques		Groupes réactifs
Polyosides	Cellulose	OH
	Carboxyméthylcellulose (CMC)	COOH
	Diéthylaminocellulose (DEAE)	OH
	Para-aminobenzylcellulose	NH ₂
	Dérivés de la cellulose	NH ₂ , OH, CHO
	Dextrans et aragose	OH
	Amidon dialdéhyde	CHO
	Anthranilates	OH, COOH
Protéines	Collagène	NH ₂ , COOH
Polymères synthétiques	Polyaminoacides	φ-NH ₂ , COOH
	Ethylène anhydride maléique	Anhydride
	Polyacrylamides	NH ₂
	Copolymères d'acrylamides	Variable
	Polyacrylates	COOH
	Copolymères d'acide méthacryliques	COOH
	Polystyrène et dérivés	φ-X
	Polyamides	NH ₂
Substances minérales	Verre poreux	OH
	Oxydes métalliques	OH
Supports mixtes	Supports magnétiques	Variables
	Supports organo-minéraux	Variables

2.3.2.3. Immobilisation par inclusion

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière dans la matrice d'un polymère ou dans une microcapsule. Plusieurs polymères sont fréquemment rencontrés comme l'alginate, le chitosane¹⁰, le gel de polyacrylamide ou encore le gel d'amidon. Pour ce faire, l'enzyme est dissoute dans une solution aqueuse de monomères contenant également un agent réticulant. La polymérisation des co-monomères est ensuite effectuée à basse température et on obtient de cette façon un réseau tridimensionnel dans les mailles duquel l'enzyme se retrouve retenue. La

¹⁰ Chitosan : Polysaccharide composé de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine. Il est obtenu par désacétylation de la chitine présent dans les carapaces de crustacés.

réalisation de cette immobilisation doit bien entendu pouvoir laisser le site actif libre et accessible au substrat (Brown et Biellmann 1992, Combes et Monsan 2009, Blecker, et al. 2008).

2.3.2.4. Immobilisation par encapsulation

Cette technique consiste à emprisonner les enzymes dans un matériau perméable et flexible qui les isole partiellement du milieu extérieur et les protège. Le catalyseur peut être confiné dans un gel de polymère ou à l'intérieur d'une capsule (Datta, Christena et Rajaram 2013).

L'immobilisation se fait ici de manière physique et non par voie chimique contrairement à l'immobilisation par liaison covalente par exemple. La matrice doit permettre la diffusion des petites molécules seulement (notamment les substrats et les produits de la réaction) mais ne doit en aucun cas permettre la diffusion des plus grosses molécules dont les enzymes. Ces matrices peuvent être inorganiques (gels de silice), organique (nafion¹¹), polymères (polyacrylamide, polyuréthanes) ou encore composite (pâte de carbone).

Cette méthode d'immobilisation présente de nombreux avantages : elle s'avère économique, facile à mettre en œuvre et peut s'appliquer à un grand nombre d'enzymes (Gill et Ballesteros 2000, Mazur, et al. 2009, Zhang, et al. 2008).

2.3.3. Comparaison des diverses méthodes d'immobilisation

A l'heure actuelle, la majeure partie des procédés d'immobilisation utilisés à l'échelle industrielle implique un mécanisme d'adsorption des enzymes sur un support insoluble. Cette technique est d'une part la plus simple à mettre en œuvre et s'impose comme la méthode la plus rentable économiquement. En effet, les divers supports utilisés sont disponibles en quantité et à prix relativement bas. D'autre part, les supports ne s'usant pas ou très peu, ces derniers peuvent être réutilisés lorsque l'enzyme présente à sa surface ne s'avère plus performante. Il suffit, bien que ceci ne soit pas si simple, de réaliser une désorption des molécules enzymatiques pour par la suite en ré-adsorber de nouvelles et régénérer un support actif (Combes et Monsan 2009, Datta, Christena et Rajaram 2013). Une comparaison généralisée des diverses méthodes d'immobilisation explicitées ci-dessus est présentée sur le Tableau VII.

¹¹ Nafion : Polymère fluoré (Tétrafluoroéthylène sulfoné)

Tableau VII. Comparaison généralisée des différentes techniques d'immobilisation (Chaplin et Bucke 1990).

Caractéristiques	Adsorption	Liaison covalente	Inclusion	Micro-encapsulation
Préparation	Simple	Difficile	Difficile	Simple
Coût	Faible	Elevé	Modéré	Elevé
Force de liaison	Variable	Forte	Faible	Forte
Perte d'enzyme	Oui	Non	Oui	Non
Applicabilité	Large	Sélective	Large	Très large
Problèmes de mise en œuvre	Elevés	Faibles	Elevés	Elevés
Effet de la matrice	Oui	Oui	Oui	Non
Barrière diffusionnelle	Non	Non	Oui	Oui
Protection microbiologique	Non	Non	Oui	Oui

3. Les lipases

3.1. Généralités

Les lipases ont été mises en évidence dès 1901 chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens* (dénommées maintenant *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus fluorescens*). Cependant, ce n'est qu'à partir des années 1950 que l'étude de ces enzymes a connu un essor notamment grâce aux diverses études réalisées sur la lipase pancréatique de porc. Elles appartiennent à la famille des hydrolases d'ester carboxyliques appelées également triacylglycérols acyl hydrolases (E.C.3.1.1.3) ou couramment dénommées triglycérides lipases, tributyrases ou plus simplement lipases (Destain, Thonart et Fickers 2008, Eijkmann 1901).

Le rôle physiologique des lipases consiste en une hydrolyse des triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol (Figure 27). Ces enzymes présentes chez tous les organismes vivants interviennent à différents niveaux dans la biochimie des lipides et possèdent une activité particulièrement élevée envers les lipides riches en triglycérides (huile d'olive, beurre, graisses animales et végétales) (Destain, Thonart et Fickers 2008, Blecker, et al. 2008, Weil 2001).

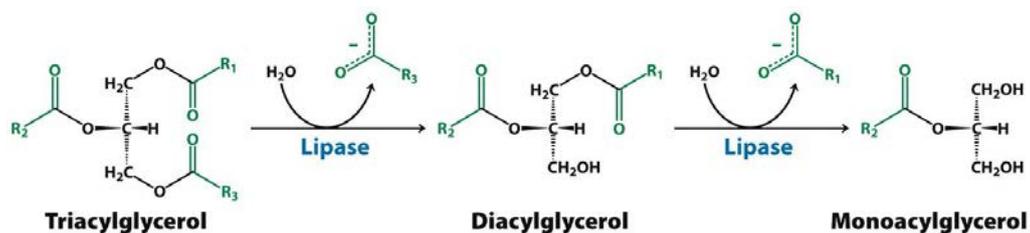


Figure 27. Métabolisme des triglycérides par la lipase pancréatique. L'hydrolyse successive des triglycérides et diglycérides nécessite la présence d'eau et permettent la libération d'un acide gras (Berg, Tymoczko et Stryer 2012).

Ainsi, les lipases se retrouvent impliquées dans de nombreux domaines industriels tels que l'agro-alimentaire, la pharmacie, la chimie fine, la production de biodiesel ou encore l'industrie des détergents. La part des lipases dans le marché des enzymes a significativement grandi et représente aujourd'hui entre 25 et 40% des ventes industrielles d'enzymes (Barros, Fleuri et Macedo 2010, Hasan, Ali Shah et Hameed 2006).

3.2. Structure des lipases

Toutes les lipases connues à ce jour présentent une structure commune composée d'un feuillet β central formé de brins principalement parallèles reliés entre eux par des hélices α . Ces enzymes ont été qualifiées d'hydrolases de type α/β . Les acides aminés du site actif impliqués dans la réaction catalytique sont au nombre de trois. La triade catalytique est formée par la sérine, l'histidine et la glutamine ou l'asparagine selon les espèces (Kim, et al. 2003, Uppenberg, et al. 1994)

Par exemple, la structure de la lipase B de *Candida antarctica* (CAL B) a été élucidée en 1994 par Uppenberg et al. Cette enzyme d'un poids moléculaire de 33 kDa est formée de trois-cent-dix-sept résidus aminoacides. Sa structure est composée d'un repliement α/β ainsi que de la triade catalytique sérine, acide aspartique et histidine comme le présente la Figure 28 (Uppenberg, et al. 1994, Mtibaa, et al. 2002).

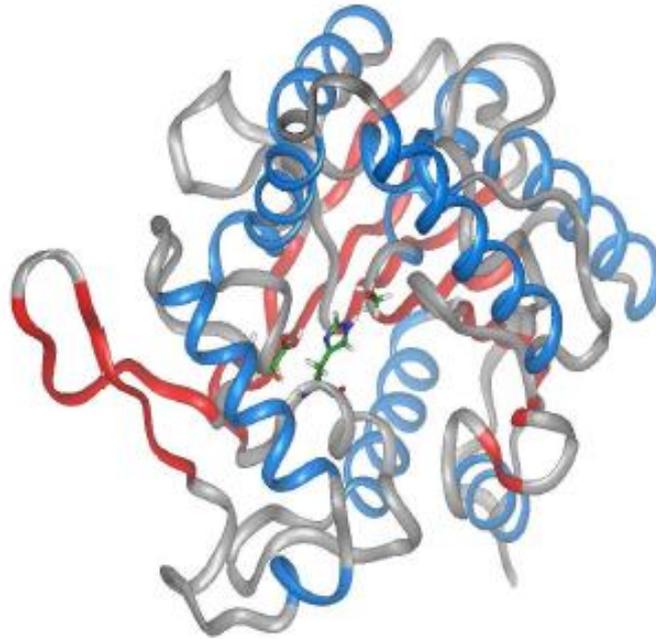


Figure 28. Structure moléculaire de la lipase B de *Candida antarctica* - En bleu sont présentées les structures secondaires de type hélice α et en rouge les feuillets β . Les trois résidus aminoacides figurant sur les structures représentent la triade catalytique (Uppenberg, et al. 1994).

3.3. Origine des lipases

Ces enzymes se retrouvent au sein du règne animal, végétal mais également chez de nombreux microorganismes comme les bactéries, les levures ou encore les champignons filamenteux. De nombreux scientifiques s'accordent sur le fait que selon l'origine de l'enzyme, ses propriétés catalytiques seront différentes. À ce jour, de nombreuses lipases de microorganismes ont été purifiées et caractérisées permettant ainsi leur utilisation industrielle (Barros, Fleuri et Macedo 2010, Destain, Thonart et Fickers 2008, Mtibaa, et al. 2002).

3.3.1. Les lipases végétales

Les lipases végétales sont largement rependues au sein des divers organes de la plante mais se retrouvent majoritairement au sein des graines où sont stockés les triglycérides. Sous l'action de ces enzymes, les triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle majeur est de fournir l'énergie nécessaire à la germination des graines et au développement de la jeune plante. Les lipases végétales peuvent être classées en trois groupes distincts comme le présente le Tableau VIII (Destain, Thonart et Fickers 2008).

Tableau VIII. Classification des lipases végétales (Destain, Thonart et Fickers 2008).

Groupe	Lieu	Fonction
Triacylglycérol hydrolases	Graines	Altération des graines
Acylhydrolases (Phospholipases A et B)	Divers tissus	Réaction de transestérification
Phospholipases C et D	Divers tissus	Hydrolyse

Les lipases végétales interviennent également pour assurer d'autres fonctions essentielles à la vie végétale :

- Métabolisme de la chlorophylle.
- Réarrangement et dégradation de la chlorophylle.
- Processus de mûrissement des fruits.
- Biosynthèse de transducteurs (défense, mécanismes de régulation).

Enfin, certaines protéines dotées d'une activité lipolytique peuvent présenter un effet cytotoxique pour les cellules animales. Par exemple, la ricine qui est une glycoprotéine isolée de la graine de *Ricinus communis* induit le blocage de la synthèse des protéines par l'inactivation de l'activité ribosomique. Une étude plus poussée a permis son utilisation en temps qu'immunotoxine dans le traitement de certains cancers (Girbés, et al. 2004, Morlon-Guyot, et al. 2003).

3.3.2. Les lipases animales

Chez les mammifères, les lipases interviennent dans le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses. La dégradation des lipides permet de fournir une source d'énergie essentielle et nécessaire à la vie. Ces dernières peuvent être classées en trois groupes en fonction de leur localisation comme le présente le Tableau IX (Destain, Thonart et Fickers 2008).

Tableau IX. Classification des lipases d'origine animale (Destain, Thonart et Fickers 2008).

Groupe	Localisation
Lipases associées à la digestion	Salive, pharynx, estomac, et pancréas
Lipases des tissus périphériques	Cerveau, muscles, artères, rein, rate, foie et tissus adipeux
Lipases des glandes galactogènes	Glandes mammaires

Les deux principales lipases constitutives de tout organisme vivant sont les lipases gastrique et pancréatique. La lipase gastrique qui est sécrétée par la muqueuse gastrique hydrolyse les lipides alimentaires de l'estomac et conserve sa stabilité pour des pH proche de un. La lipase pancréatique, quant à elle, est la principale enzyme responsable de la digestion des lipides alimentaires. Elle agit principalement sur les lipides diglycérides qui sont le produit de l'hydrolyse préalable par la lipase gastrique. La lipase pancréatique est sécrétée dans le duodénum et fonctionne contrairement à la lipase gastrique à des pH légèrement alcalins (Destain, Thonart et Fickers 2008).

3.3.3. Les lipases microbiennes

La famille des lipases microbiennes regroupe les lipases retrouvées chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Leur intérêt n'a cessé de croître ces dernières années principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent. En effet, ces dernières peuvent être produites via des procédés relativement simples comparés aux autres lipases citées précédemment et possèdent également une plus grande stabilité thermique vis-à-vis des détergents et des enzymes protéolytiques (Destain, Thonart et Fickers 2008).

3.4. Réactions catalysées par les lipases

Les réactions catalysées par les lipases sont de différentes natures et sont dépendantes du milieu réactionnel. En effet, en milieu aqueux, ces enzymes sont capables de catalyser des réactions d'hydrolyse alors qu'en milieu non conventionnel (solvant organique) ces dernières sont capables de réaliser des synthèses d'esters.

3.4.1. La réaction d'hydrolyse

L'hydrolyse des triglycérides en acides gras et en glycérol constitue une réaction importante dans les processus industriels des huiles naturelles, des graisses mais également de la matière grasse du lait. L'hydrolyse permet la production d'acides gras pouvant être convertis en alcool gras ou employés dans des réactions d'estérification ou de transestérification (Figure 29).



Figure 29. La réaction d'hydrolyse d'un ester (Paques et Macedo 2006).

L'hydrolyse des liaisons ester des substrats lipidiques insolubles dans l'eau se produit à l'interface lipide/eau. Si l'on se place en dessous de la concentration micellaire critique¹² du substrat, les vitesses d'hydrolyse sont faibles. En revanche, lorsque l'on se place à des concentrations plus élevées en substrat, les molécules prennent la forme de micelles aboutissant à la formation d'une interface lipide/eau. La formation de cette interface a pour conséquence d'augmenter de manière brutale la vitesse de la lipolyse (Figure 30). Ce phénomène d'activation interfaciale est une particularité des lipases (Aloulou, et al. 2006, Verger et De Haas 1976, Destain, Thonart et Fickers 2008, Barros, Fleuri et Macedo 2010).

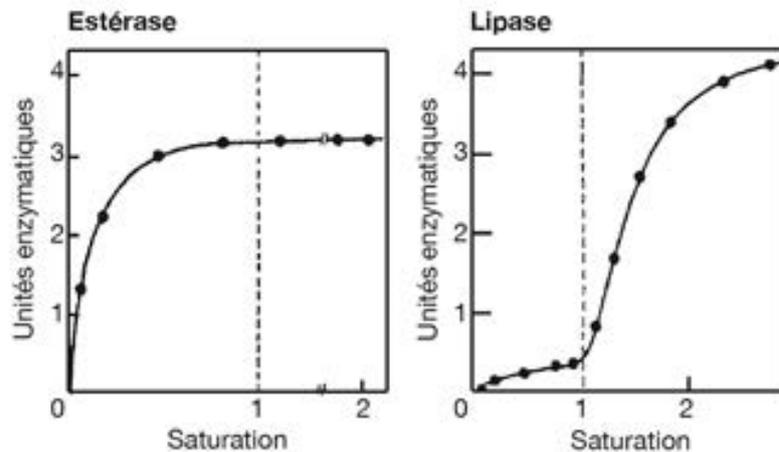


Figure 30. Hydrolyse de la triacétine par l'estérase du foie de cheval et par la lipase pancréatique de porc. Dépendance de la vitesse d'hydrolyse à l'égard de la concentration en substrat exprimée en multiple de saturation (Verger et De Haas 1976).

3.4.2. La synthèse d'esters

Dans les milieux pauvres en eau, les lipases catalysent la réaction inverse c'est-à-dire la synthèse de liaisons esters. Cette dernière trouve de nombreuses applications dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et cosmétique notamment. La synthèse d'une liaison ester peut se faire selon quatre schémas réactionnels (

Figure 31) :

- La réaction d'estérification directe entre un acide et un alcool.
- La réaction d'inter-estérification $\text{ester} + \text{ester}' \rightarrow \text{ester}'' + \text{ester}'''$
- La réaction de trans-estérification :
 - La réaction d'alcoololyse : $\text{ester} + \text{alcool} \rightarrow \text{ester}' + \text{alcool}'$
 - La réaction d'acidolyse : $\text{ester} + \text{acide} \rightarrow \text{ester}' + \text{acide}'$

¹² Concentration micellaire critique : concentration au-dessus de laquelle des micelles se forment spontanément.

- La réaction d'acylation qui consiste en l'établissement d'une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile telle qu'une amine ou un alcool.

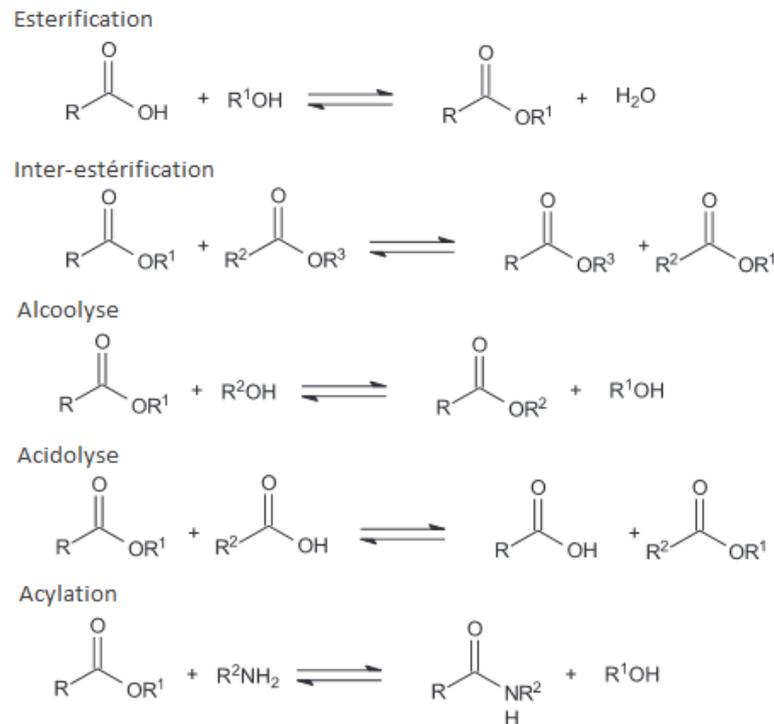


Figure 31. Réactions catalysées par les lipases (Paques et Macedo 2006).

3.5. Propriétés de sélectivité des lipases

Pour produire des dérivés de peptides provenant de l'acylation de molécules polyfonctionnelles, il est bien souvent nécessaire que le procédé de synthèse soit énantio-sélectif, régio-sélectif ou encore chimio-sélectif.

3.5.1. Enantio-sélectivité

Comme explicité précédemment, l'enantio-sélectivité se définit comme la spécificité d'une enzyme pour un substrat en fonction de sa stéréochimie. Les lipases ont ainsi la capacité de distinguer les énantiomères dans un mélange racémique et d'hydrolyser spécifiquement l'un d'entre eux (Barros, Fleuri et Macedo 2010).

De nombreuses études illustrent parfaitement la capacité des lipases à catalyser la N-acylation énantio-sélective des molécules aminées à centres chiraux. Ces propriétés seraient dues à une conformation tridimensionnelle particulière des résidus aminés catalytiques de leur site actif (Figure 32). Les diverses études s'accordent sur le fait qu'il existe un site préférentiel pour réaliser la catalyse. L'enzyme se fixerait donc préférentiellement sur les petits groupements ce qui induit une réaction stéréospécifique (Gedey, et al. 2002, Gill, Das et Patel 2007).

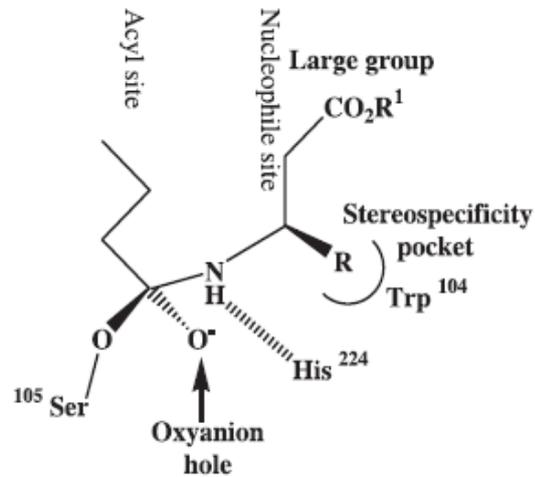


Figure 32. Représentation structurale du substrat et du site actif d'une lipase catalysant une N-acylation énatio-sélective (Gedey, et al. 2002).

Le Tableau X illustre l'aptitude des lipases à catalyser la N-acylation du 1-(3'-bromophenyl) éthylamine en maintenant dans certains cas une énatio-sélectivité en faveur du composé de configuration R proche de 100% à l'aide d'enzymes immobilisées.

Tableau X. Exemples de N-acylation énatio-sélectives catalysées par des lipases – la sélectivité est représentée par un pourcentage d'énatio-enrichissement (ee) (Gill, Das et Patel 2007).

Lipase biocatalyst	[Biocatalyst] (mg/mL)	Conversion (% , HPLC)	Amide product	ee (amide) (% , HPLC)
Amano Lipase-A	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-AK	25	40	(R)-2	92
Amano Lipase-AP12	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-AY30	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-D	25	1	(R)-2	>99.8
Amano Lipase-F	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-FAP15	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-G	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-GC20	25	0	(R)-2	0
Amano Lipase-M	25	1	(R)-2	>99.8
Amano Lipase-MAP10	25	1	(R)-2	>99.8
Amano Lipase-N	25	1	(R)-2	>99.8
Amano Lipase-PS	25	5	(R)-2	>99.8
Amano Lipase-PS30	25	9	(R)-2	>99.8
Amano Lipase-R	25	0	(R)-2	0
Biocatalysts Lipase-ANL	25	0	(R)-2	0
Biocatalysts Lipase-CCL	25	1	(R)-2	>99.8
Meito Sangyo Lipase-UL	25	2	(R)-2	>99.8
Sigma Lipase-CRL	25	1	(R)-2	>99.8
Sigma Lipase-PPL	25	3	(R)-2	45
Sepracor Lipase-OF	25	2	(R)-2	>99.8
Biocatalysts Lipomod-200	100	2	(R)-2	>99.8
Boehringer Chirazyme-L2-c2	100	49	(R)-2	>99.8
Boehringer Chirazyme-L5	100	11	(S)-2	-23
Amano Lipase PS30 on Accurel	100	41	(R)-2	96
Novo Lipolase-30T	100	7	(R)-2	40
Novo Lipozym-IM60	100	6	(R)-2	77
Novo Novozym-435	100	50	(R)-2	>99.8

Cette sélectivité est d'autant plus importante puisque les molécules d'intérêt thérapeutique peuvent présenter des différences d'activité et de propriétés thérapeutiques en fonction de leur configuration.

3.5.2. Régio-sélectivité

La régio-sélectivité qualifie la préférence d'une enzyme à interagir avec l'un des groupes fonctionnels identiques d'une molécule de substrat. Les molécules de type peptides induisent généralement une problématique de régio-sélectivité enzymatique lors de la réaction d'acylation puisque plusieurs groupements sont disponibles.

A titre d'exemple, nous pouvons citer le dipeptide lysine-phénylalanine qui présente deux fonctions amine primaire acylables en position ϵ de la lysine et en position α de la lysine (Figure 33). Il paraît également important de préciser que dans certaines conditions, les lipases peuvent réaliser également une double acylation du peptide sur les deux groupements disponibles.

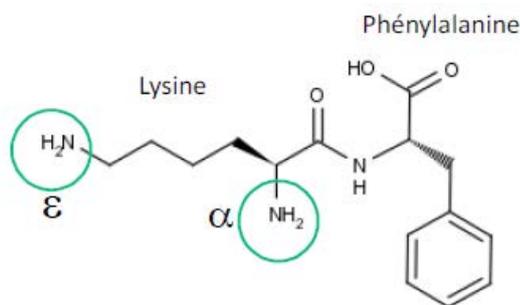


Figure 33. Groupements amine acylables du peptide lysine-phénylalanine (Marie-Claire, et al. 2014).

Ainsi, diverses études sur ce dipeptide en solvant organique ont pu mettre en évidence que plusieurs lipases présentaient une régio-sélectivité marquée en faveur de la fonction amine en position ϵ de la lysine plutôt que la fonction amine en position α de la lysine (Gardossi, Bianchi et Klibanov 1991).

3.5.3. Chimio-sélectivité

La chimio-sélectivité est la capacité d'une enzyme à interagir préférentiellement avec un groupe fonctionnel donné. Prenons l'exemple de la synthèse enzymatique des céphalosporines (Figure 34). Cette synthèse nous permet de mettre en évidence le pouvoir chimio-sélectif des enzymes puisque la réaction enzymatique permet la transformation sélective d'un groupe caractéristique.

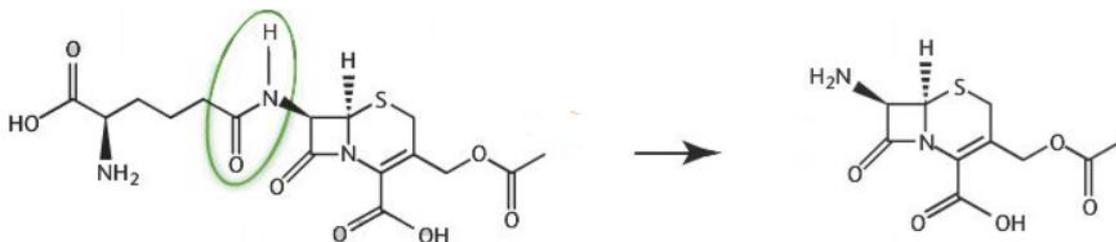


Figure 34. Schéma de synthèse des céphalosporines par voie enzymatique.

3.6. Mécanismes réactionnels des lipases

Dans le but de synthétiser des liaisons ester, les lipases ont recours à deux substrats : un donneur et un receveur d'acyle comme le présente la Figure 35. A et B correspondent respectivement au donneur et au receveur de groupement acyle, P correspond à une molécule d'eau si le donneur d'acyle est un acide gras libre ou un alcool dans le cas d'un ester et Q correspond au dérivé acylé synthétisé.



Figure 35. Représentation simplifiée d'une réaction enzymatique à deux substrats.

Typiquement les lipases sont des enzymes fonctionnant selon un mécanisme bi-bi ping-pong avec parfois une inhibition par excès d'un substrat ou voire même des deux. Cependant, dans certains cas, d'autres mécanismes réactionnels ont été identifiés : mécanismes de type bi-bi ordonné, aléatoire ou bi-bi iso-ordonné (Yadav et Devi 2004, Chulalaksananukul, Condoret et Combes 1993, Pilarek et Szewczyk 2007).

Les modèles explicités ci-dessous ont permis de modéliser de nombreux procédés enzymatiques de trans-esterification et d'acylation enzymatique. D'autre part, le modèle Michaelien décrit plus haut pourra être appliqué dans ces différents cas de figure. En effet, il s'avère que si l'on ne garde qu'un seul substrat et un seul produit comme variable (en fixant les autres substrats en concentration connue et constante dans le milieu réactionnel), les équations de Michaelis et Menten pourront s'appliquer pour déterminer les paramètres cinétiques (Perrin 2012).

3.6.1. Mécanisme bi-bi ordonné

Dans ce mécanisme réactionnel (Figure 36), l'ordre de fixation des deux substrats est essentiel. En effet, le substrat A doit se fixer à l'enzyme libre E avant le substrat B. Cette fixation entraîne la formation d'un premier complexe enzyme-substrat (EA) qui pourra ensuite fixer le substrat B pour former le complexe ternaire EAB. La réaction catalytique a ensuite lieu et l'enzyme libère les produits de la réaction (P et Q) avant de revenir à son état d'enzyme libre.

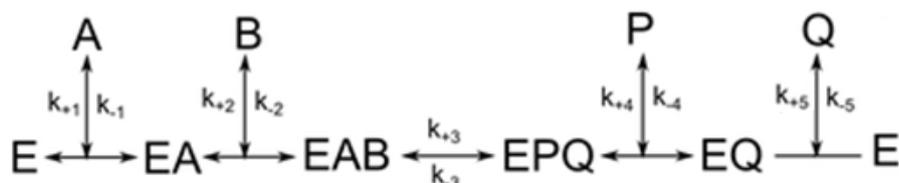


Figure 36. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi ordonné (Perrin 2012).

3.6.2. Mécanisme bi-bi aléatoire

Ce mécanisme (Figure 37) est identique au précédent à l'exception près que la fixation des substrats A et B se fait de manière aléatoire sur l'enzyme libre. Ainsi, la réaction peut passer par un intermédiaire enzyme-substrat A ou enzyme-substrat B mais passera dans tous les cas par la formation d'un complexe ternaire.

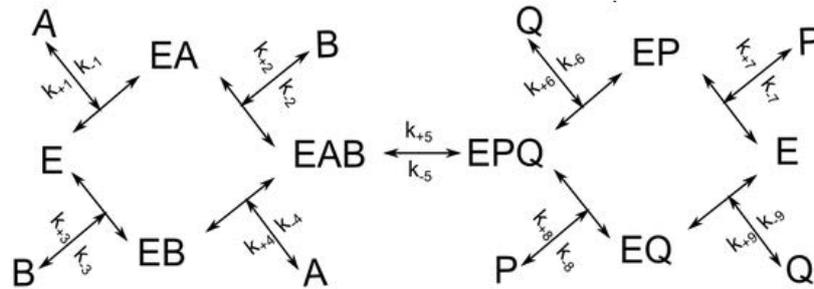


Figure 37. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi aléatoire (Perrin 2012).

3.6.3. Mécanisme bi-bi iso-ordonné

Ce mécanisme (Figure 38) est très semblable au mécanisme bi-bi ordonné à l'exception près qu'au cours de la réaction, l'enzyme subit une isomérisation (F). Dans une étape finale, elle reprend sa conformation initiale active.

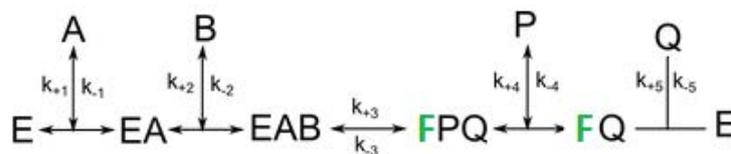


Figure 38. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi iso-ordonné (Perrin 2012).

3.6.4. Mécanisme bi-bi ping-pong

La réaction bi-bi ping-pong (Figure 39) réalise le transfert ordonné d'un groupement chimique (y) entre les deux substrats (X et Z). Dans le cas d'une réaction d'acylation, l'enzyme se charge de transférer le groupement acyle. Ainsi, l'enzyme oscille entre deux états : l'enzyme libre (E) et l'acyle-enzyme (Ey) caractérisée par la formation d'une liaison covalente entre le donneur d'acyle et l'acide aminé catalytique.

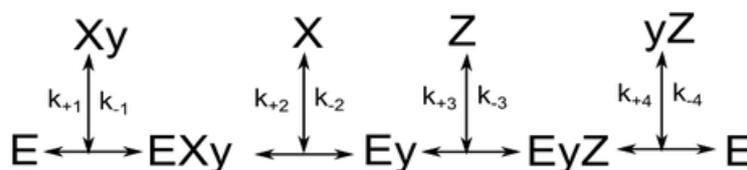


Figure 39. Schéma réactionnel d'une réaction enzymatique suivant un mécanisme bi-bi ping-pong (Perrin 2012).

3.6.5. Exemples de modèles enzymatiques

Dans la littérature nous retrouvons ainsi de nombreux modèles décrivant les mécanismes des lipases, lorsque ces dernières catalysent des réactions d'acylation. Le Tableau XI présente une synthèse des résultats de quelques travaux de modélisation de cinétique d'acylation réalisés pour la lipase B de *Candida antarctica*.

Tableau XI. Exemples d'études de modélisation des cinétiques enzymatiques d'acylation (Le Joubioux 2013)

Type de réaction	Solvant	Modèles	Références
O-acylation	Sans solvant	Ordonné bi-bi avec inhibition compétitive	<i>Garcia et al., 1999</i>
O-acylation	Sans solvant	Ordonné bi-bi avec inhibition par les deux substrats	<i>Garcia et al., 2000</i>
Trans-estérification	2-méthylbutan-2-ol	Hybride ping-pong ordonné	<i>Maugard et al., 2000</i>
Trans-estérification	Système solide/gaz	Bi-bi ping-pong avec inhibition par l'alcool	<i>Graber et al., 2003</i>
N-acylation	2-méthylbutan-2-ol	Bi-bi ping-pong avec inhibition par l'amine	<i>Slotema et al., 2003</i>
Trans-estérification	Heptane	Bi-bi ping-pong avec inhibition par le n-butanol	<i>Yadav et Lathi, 2003</i>
Trans-estérification	Heptane	Ordonné bi-bi avec inhibition par le n-octanol	<i>Yadav et Trivedi, 2003</i>
Trans-estérification	Heptane	Bi-bi ping-pong avec inhibition par les substrats et les produits	<i>Yadav et Devi, 2004</i>
O-acylation	Milieu Fondu	Bi-bi ping-pong	<i>Pilarek et al., 2007</i>
Trans-estérification	Hexane	Bi-bi ping-pong	<i>Romero et al., 2007</i>
O-acylation	Milieu fondu, système hétérogène	Bi-bi ping-pong	<i>Foresti et al., 2008</i>
O-acylation	Toluène	Ordonné bi-bi avec inhibition par le donneur d'acyle	<i>Yadav et Dhoot, 2009</i>

4. La réaction d'acylation

La réaction d'acylation peut être définie comme l'établissement d'une liaison covalente entre un groupe acyle et une fonction nucléophile telle qu'une amine ou un alcool. Le soufre, lui aussi, peut être acylé pour former une liaison thio-ester mais est peu présent dans les molécules de type acide aminé. Il existe à l'heure actuelle deux voies d'acylation possible : la voie chimique et la voie enzymatique.

4.1. L'acylation par voie chimique

L'acylation d'acides aminés et de peptides par voie chimique (Figure 40) est aujourd'hui bien connue et fait appel à la réaction de Schotten-Baumann. Cette réaction permet de former un groupement amide à partir d'un groupement amine et d'un chlorure d'acyle.

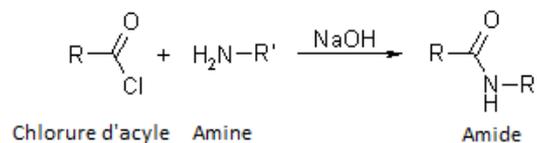


Figure 40. Schéma général de la réaction d'acylation par voie chimique.

Cette réaction demeure performante mais présente néanmoins de multiples limitations pour les industriels : elle nécessite l'usage de chlorures d'acides, un pH élevé, l'ajout de solvants organiques plus ou moins toxiques et coûteux (toluène, hexane, acide acétique), génère de grandes quantités de sels résiduels (neutralisation par ajout d'acide chlorhydrique) dans les effluents difficiles à recycler et n'est pas régio-sélective.

Enfin, il paraît important de préciser qu'il existe d'autres méthodes d'acylation d'acide aminé. Cependant, ces réactions ne sont pas actuellement transposables en milieu industriel et ne seront pas détaillées ici.

4.2. L'acylation par voie enzymatique

Le principe de l'acylation enzymatique, et notamment de l'acylation par les lipases, consiste à mettre en contact un donneur et un receveur d'acyle dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, la réaction inverse de l'hydrolyse est favorisée et permet l'attachement du groupe acyle sur une fonction nucléophile (Figure 41).

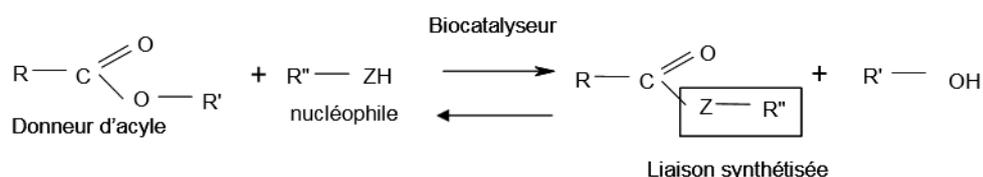


Figure 41. Schéma général d'une réaction d'acylation catalysée par une enzyme.

Pour mieux comprendre ce mécanisme, prenons l'exemple d'une trans-estérification catalysée par une lipase (Figure 42). Le mécanisme mis en jeu ici est un mécanisme de type bi-bi ping-pong (Figure 39).



Figure 42. Réaction de trans-estérification catalysée par une lipase

La première étape de la réaction (Figure 43) consiste en l'attaque nucléophile de la sérine, qui est l'un des trois acides aminés impliqués dans la triade catalytique (Figure 28), sur le donneur d'acyle (Etape 1). Cette attaque entraîne la formation du premier intermédiaire tétraédrique puis, par départ d'alcool, l'acyle-enzyme se forme (Etape 2). Enfin, l'attaque nucléophile du second substrat sur l'acyle-enzyme provoque la formation du second intermédiaire tétraédrique (Etape 3). Ce second intermédiaire est stabilisé par des liaisons hydrogène. Le produit de la réaction est ensuite libéré du site actif et l'enzyme retrouve sa forme native (Cygler, et al. 1994).

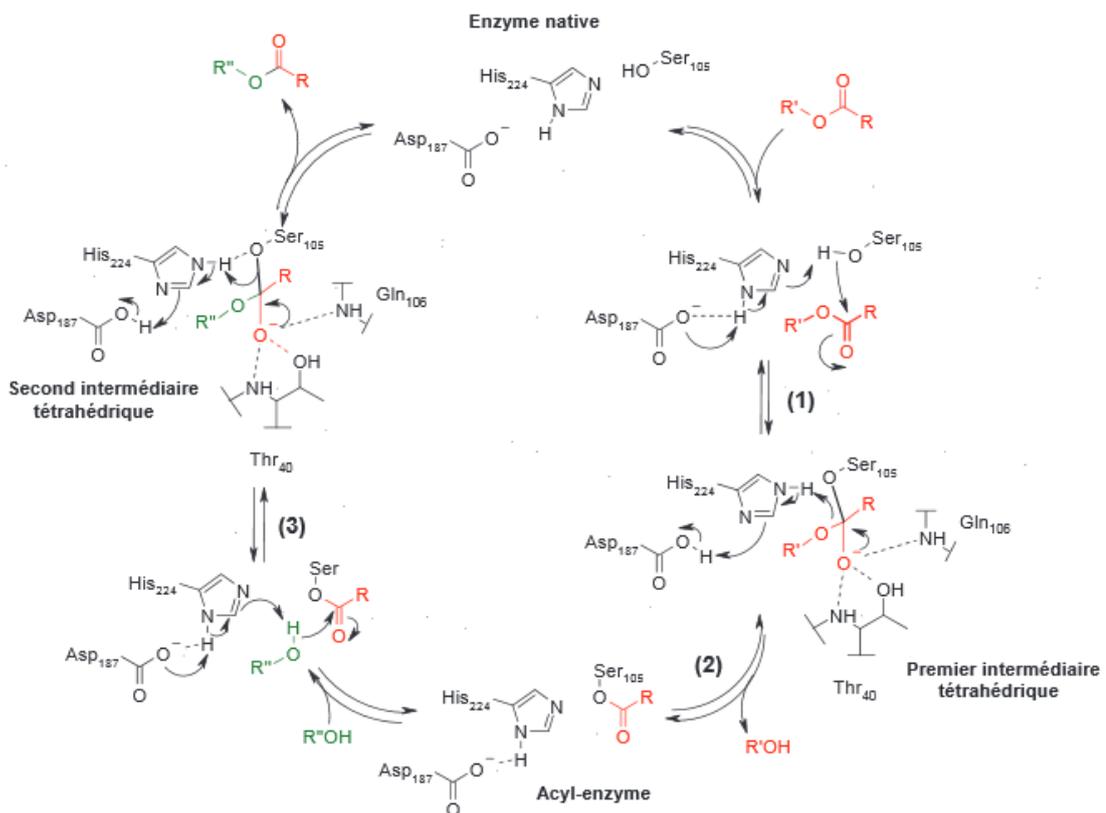


Figure 43. Mécanisme réactionnel de l'acylation d'un alcool par la lipase de *Candida antarctica* (Cygler, et al. 1994).

L'acylation d'acides aminés ou de peptides par voie enzymatique peut s'avérer intéressante de par les propriétés sélectives et cinétiques de la catalyse. D'autre part, la mise en œuvre de cette réaction ne nécessite l'emploi d'aucun solvant organique et fait intervenir dans la plupart des cas des enzymes immobilisées qui pourront être réutilisées par la suite.

4.3. Intérêt et application de l'acylation

4.3.1. Synthèse de biotensioactifs

Les tensioactifs ou surfactants sont des composés qui modifient la tension superficielle entre deux surfaces. Dans la plupart des cas, ce sont des composés organiques amphiphiles ; c'est-à-dire qu'ils comportent à la fois des groupes hydrophobes (apolaires) et des groupes hydrophiles (polaires). Ainsi, chaque molécule de tensioactif contient une partie soluble dans l'eau et une partie soluble dans l'huile. La nature de la partie hydrophobe permet de distinguer différents types de tensioactifs comme le présente la Figure 44 (Wertz 2012, Borredon et Mouloungui 2006) :

- Les tensioactifs non-ioniques pouvant être obtenus suite à la formation d'une liaison ester, éther ou amide.
- Les tensioactifs cationiques libérant un cation en solution.
- Les tensioactifs anioniques libérant un anion en solution.
- Les tensioactifs amphotères contenant un groupement acide et basique libérant un anion ou un cation selon la valeur du pH.

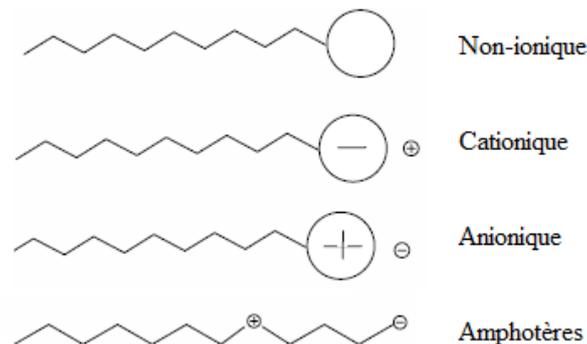


Figure 44. Classification des tensioactifs selon la nature de la chaîne hydrophile (Borredon et Mouloungui 2006).

Cette propriété leur permet de solubiliser deux phases non miscibles. Les molécules de tensioactif ont ainsi la capacité de diffuser dans l'eau pour aller s'adsorber à l'interface entre l'huile et l'eau. Le groupe hydrophobe insoluble (également appelé « queue ») demeure en dehors de la phase aqueuse alors que le groupe hydrophile (également appelé « tête ») demeure lui au sein de la phase aqueuse (Figure 45).

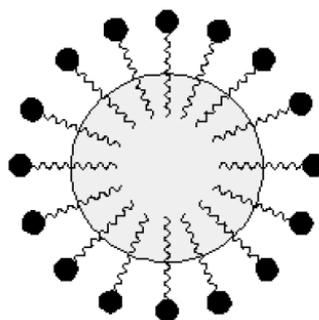


Figure 45. Orientation des parties hydrophiles et hydrophobes d'un tensioactif (Wertz 2012).

Un biotensioactif ou biosurfactant est en tout point identique à un tensioactif à l'exception près que sa synthèse se réalise par voie biotechnologique et fait intervenir des matières premières d'origine biologique. Ainsi, la partie hydrophile d'un biotensioactif peut être constituée de trois groupements distincts :

- Les carbohydrates tels que le glucose, le saccharose ou le lactose.
- Les polyols tels que l'amidon de maïs ou de blé.
- Les acides aminés et les petits peptides.

La partie hydrophobe est quant à elle est principalement issue d'huiles végétales telle que l'huile de palme par exemple. Le Tableau XII présente les différentes matières premières pouvant être utilisées pour réaliser la synthèse de biotensioactif (Wertz 2012, Borredon et Mouloungui 2006).

Tableau XII. Exemples de matières premières utilisées dans la synthèse de biotensioactifs (Borredon et Mouloungui 2006).

Partie hydrophile	Partie hydrophobe
Glucose Saccharose Lactose Xylose Glycérol Acides aminés Peptides Nucléotides	Acides gras Alcools gras Esters d'acides gras Amines grasses

De nombreux travaux sont consacrés actuellement à l'utilisation d'acides aminés dans la fabrication de biosurfactants. En effet, l'association d'un acide aminé et d'un composé à longue chaîne apolaire permet l'obtention de molécules ayant une activité de surface élevée. Leurs propriétés permettent d'envisager notamment leur utilisation dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques. En effet, l'utilisation des tensioactifs se retrouve dans de nombreux secteurs d'activité et c'est ainsi qu'environ 12,9 millions de tonnes sont produits chaque année. Ces derniers peuvent être classés selon la fonction qu'ils remplissent :

- Les détergents : tensioactifs capables d'enlever des salissures sur un support solide.
- Les agents de solubilisation : à très faible concentration ces tensioactifs sont capables de former une solution vraie¹³ au sein d'une phase aqueuse.

¹³ Solution vraie : solution au sein de laquelle le ou les soluté(s) sont à l'état de division moléculaire dans le solvant (par opposition à une solution colloïdale).

- Les agents moussants : tensioactifs capables de s'adsorber à l'interface entre l'air et l'eau permettant la dispersion d'un volume important de gaz dans un faible volume de liquide.
- Les agents mouillants : tensioactifs capables de diminuer la tension superficielle entre un solide et un liquide permettant le mouillage du solide par le liquide correspondant.
- Les agents dispersants : tensioactifs capables de créer une dispersion en prévenant la floculation¹⁴ des particules.
- Les agents émulsifiants : tensioactifs capables de former une émulsion entre deux liquides non miscibles.

Sur le continent européen, le marché s'élève à environ 2,5 millions de tonnes par an. Le Tableau XIII montre la segmentation de ce marché par grand secteur d'application (Wertz 2012, Borredon et Mouloungui 2006).

Tableau XIII. Marché européen des tensioactifs par grand secteur d'activité (Wertz 2012).

Secteur	Quantité (kilotonnes)	Pourcentage
Détergents ménagers	1035	41%
Détergents hospitaliers, des collectivités	146	5,8%
Cosmétiques	247	9,8%
Produits industriels et agricoles	80	3,2%
Autres	1016	40,3%
Total	2524	100%

4.3.2. Amélioration de l'activité et de la stabilité peptidique

Une des stratégies d'amélioration de l'activité biologique des peptides est basée sur l'acylation des extrémités C et N terminales des peptides. Le but de cette modification consiste d'une part à augmenter la capacité des peptides à traverser les membranes physiologiques et d'autre part à limiter les dégradations peptidiques. Il paraît important de préciser que ces modifications ne sont intéressantes que dans le cas où les peptides s'avèrent bioactifs. En effet, de par leur grande taille et leur caractère hydrophile, la diffusivité des peptides se voit limitée. De nombreuses études ont permis d'évaluer les conséquences d'une acylation sur la perméabilité cutanée, intestinale ou

¹⁴ Floculation : processus physico-chimique au cours duquel des matières en suspension dans un liquide s'agglomèrent pour former des particules plus grosses.

hémato-encéphalique des peptides (Yamamoto, et al. 2003, Majerle, Kidric et Jerala 2003, Witt, et al. 2001).

Pour étudier la stabilité peptidique, prenons comme exemple les études menées par Yamamoto et al. Ces derniers ont pu montrer l'intérêt de l'acylation du peptide phénylalanine-glycine (Phe-Gly) en termes de stabilité. Pour cela, trois types de dérivés acylés ont été obtenus par l'ajout d'acide butyrique (C4-Phe-Gly), d'acide caproïque (C6-Phe-Gly) et d'acide octanoïque (C8-Phe-Lys). L'effet de l'acylation sur la stabilité peptidique dans la peau a été évalué grâce à des études *in vivo* sur le rat (Yamamoto, et al. 2003) (Figure 46).

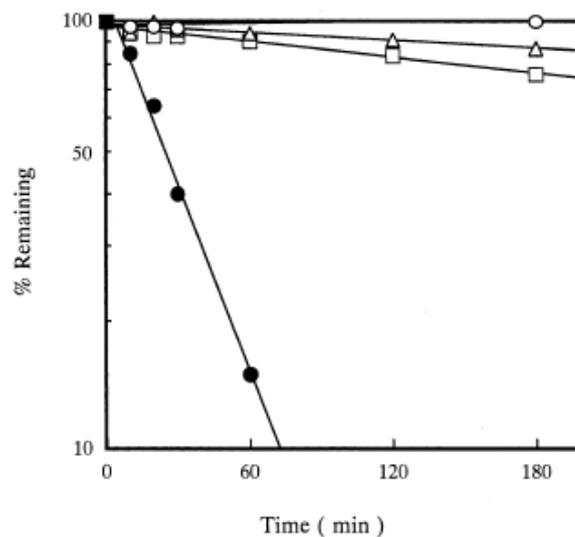


Figure 46. Profil de pourcentage d'activité résiduelle du peptide Phe-Gly et de ses dérivés acylés sur de la peau de rat. Les résultats sont exprimés sur une moyenne de trois expériences – Phe-Gly (●), C4-Phe-Gly (○), C6-Phe-Gly (Δ), C8-Phe-Gly (□) (Yamamoto, et al. 2003).

A l'aide de cette figure qui représente le pourcentage d'activité résiduelle en fonction du temps, on remarque aisément que la dégradation du peptide est limitée lorsqu'une chaîne d'acide gras est fixée à son extrémité. Cependant, aucune corrélation n'a pas été mise en évidence selon la longueur de la chaîne d'acide gras fixée.

L'acylation de peptide peut également permettre l'accroissement de l'activité thérapeutique de certains peptides. Ainsi, les travaux de Majerle et al. (2003) ont permis de démontrer que l'acylation de la lactoferrine humaine¹⁵ permettait d'augmenter considérablement son activité antimicrobienne. Ces derniers ont étudié l'acylation de cette glycoprotéine par des chaînes carbonées de longueur différentes (C6 à C18). Ceci permettrait en effet d'augmenter la liaison entre la lactoferrine et le lipide A (Figure 47). Le lipide A est une structure constitutive du lipopolysaccharide bactérien ayant des propriétés endotoxiques. Ainsi, lors de la liaison de la

¹⁵ Lactoferrine : glycoprotéine ayant une activité bactériostatique et bactéricide.

lactoferrine avec le lipide A, la paroi des bactéries à gram négative libère du lipopolysaccharide induisant ainsi une activité endotoxique (Majerle, Kidric et Jerala 2003).

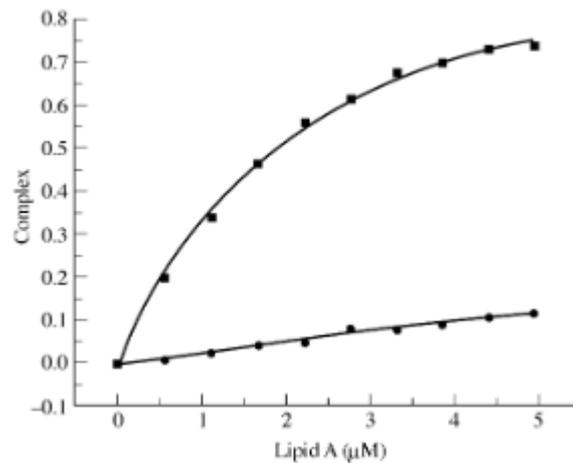


Figure 47. Liaison de la lactoferrine (●) et de la lactoferrine acylée (■) au lipide A en fonction de la concentration en lipide A (Majerle, Kidric et Jerala 2003).

A l'aide de cette figure, il apparaît que l'acylation de cette glycoprotéine permet d'augmenter son taux de fixation au lipide A, entraînant ainsi une augmentation de son activité antimicrobienne. Ainsi, l'acylation de peptides peut permettre d'augmenter de manière non négligeable ses capacités de transport transmembranaire par augmentation de son caractère lipophile mais peut également diminuer ses capacités de liaison avec les divers récepteurs.

Toutefois, il faut garder à l'esprit que l'ensemble de ces études ont été réalisées *in vitro* ce qui ne permet pas de prévoir totalement le comportement du peptide modifié *in vivo*.

5. Le dioxyde de carbone supercritique (scCO₂)

Le comportement de la matière au sein d'une phase supercritique a été observé pour la première fois par le Baron Charles Cagniard De La Tour en 1822. Les fluides supercritiques et notamment le dioxyde de carbone supercritique (scCO₂) font l'objet depuis plusieurs années d'un intérêt croissant de par leurs propriétés physico-chimiques particulières permettant d'envisager leur application dans de nombreux domaines. On pourra citer à titre d'exemple l'extraction à partir de produits solides, la chromatographie avec éluant supercritique ou encore la mise en œuvre de réactions chimiques en solvant supercritique (Innovation Fluides Supercritiques 2006, Benaissi 2013, Perrut 1999).

La première mise à l'échelle industrielle date des années 1970 dans le but d'extraire la caféine du café. La première application en catalyse enzymatique a été réalisée en 1985 par Hammond et al. On estime qu'environ mille-cinq-cent chercheurs dans le monde travaillent actuellement sur ce sujet. On dénombrait en 2006 au moins trois-cent-cinquante unités industrielles qui exploitaient les fluides supercritiques (Innovation Fluides Supercritiques 2006, Hammond, et al. 1985).

5.1. Généralités

Les corps purs¹⁶ peuvent se trouver sous trois états distincts : liquide, gazeux ou solide (Figure 48). Ces états sont représentés sur un diagramme pression-température où les régions correspondant à chaque état sont séparées par des courbes de changement d'état :

- Courbe de vaporisation : l'interface liquide-gaz.
- Courbe de sublimation : interface solide-gaz.
- Courbe de fusion : interface solide-liquide.

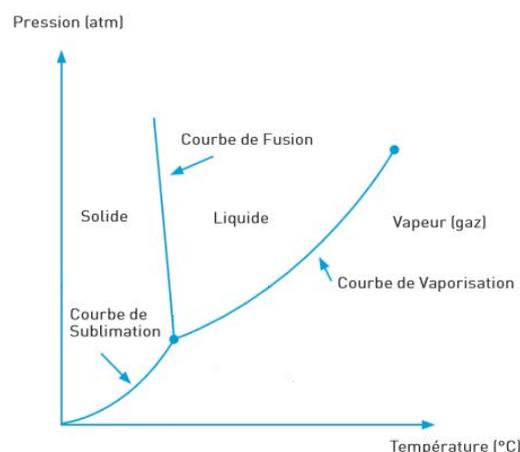


Figure 48. Diagramme pression-température d'un corps pur (Perrut 1999).

¹⁶ Corps pur : substance constituée de molécules identiques.

L'ensemble de ces trois courbes se rejoignent au point triple ou les trois états coexistent. D'autre part, il se trouve que la courbe de vaporisation présente un point d'arrêt en un point particulier que l'on appelle le point critique. Ce point est caractérisé par une pression critique (P_c) et une température critique (T_c). Au-delà de ce point critique ($P > P_c$ et $T > T_c$), un seul état existe : c'est l'état supercritique (Figure 49).

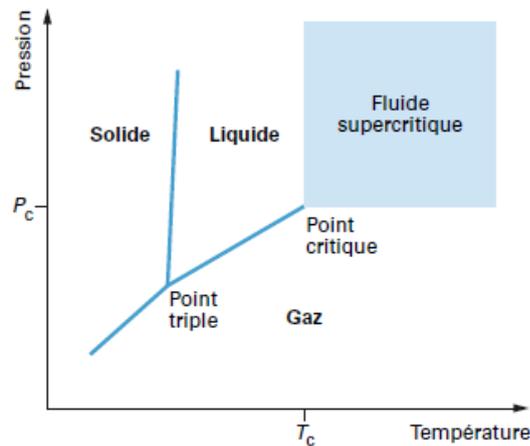


Figure 49. Représentation de la zone de supercriticité d'un fluide (Benaissi 2013).

Dans cet état, le fluide possède une masse volumique proche de celle des liquides, une viscosité à peine supérieure à celle des gaz et une diffusivité comprise entre celle des liquides et des gaz (Tableau XIV). De plus, il est possible de faire varier très fortement sa masse volumique et son pouvoir solvant par simple action sur le couple pression-température. En général, une augmentation de densité s'accompagnera d'une augmentation de pouvoir solvant. Mais ceci n'est pas toujours vrai. En effet, on peut obtenir la même densité pour une infinité de couples pression-température. La Figure 50 représente l'évolution de la densité du CO_2 en fonction de l'évolution de la pression et de la température (Benaissi 2013, Perrut 1999, Dijkstra, Merchant et Keurentjes 2007).

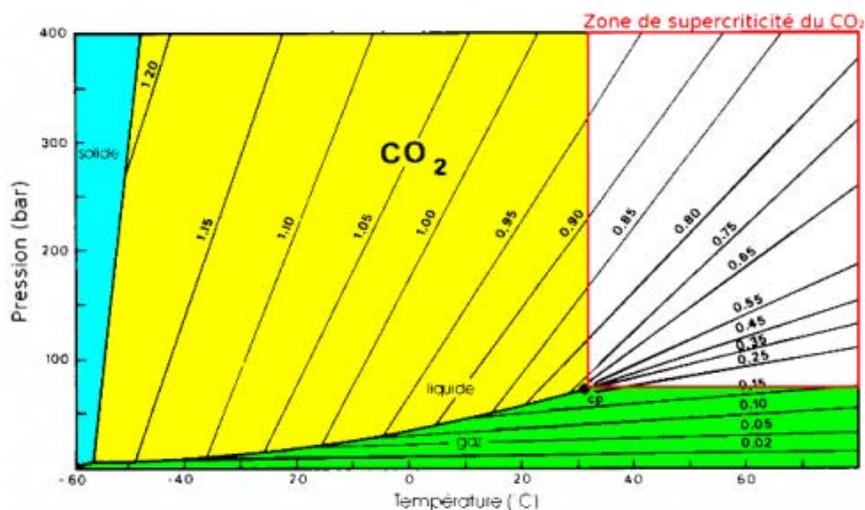


Figure 50. Evolution de la densité du CO_2 supercritique en fonction de la pression et de la température.

Tableau XIV. Ordres de grandeur de la masse volumique, de la viscosité et du coefficient de diffusion pour les gaz, liquides et fluides supercritiques (Perrut 1999).

	Masse volumique (kg.m ⁻³)	Viscosité (cP)	Diffusivité (cm ² .s ⁻¹)
<u>Gaz</u> 1 atm, 15 à 30°C	0,6 à 2	1.10 ⁻² à 3.10 ⁻²	0,1 à 0,4
<u>Fluide supercritique</u> T _C , P _C T _C , 4P _C	200 à 500 400 à 900	1.10 ⁻² à 3.10 ⁻² 3.10 ⁻² à 9.10 ⁻²	0,7.10 ⁻³ 0,2. 10 ⁻³
<u>Liquide</u> 1 atm, 15 à 30 °C	600 à 1600	0,2 à 3	0,2.10 ⁻⁵ à 2. 10 ⁻⁵

Les paramètres définissant les conditions supercritiques pour le dioxyde de carbone sont une température critique de 31,1°C et une pression critique de 7,38 MPa (73.8 bars). Ainsi, pour des valeurs supérieures, le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre un liquide et un gaz comme l'illustre la Figure 51.

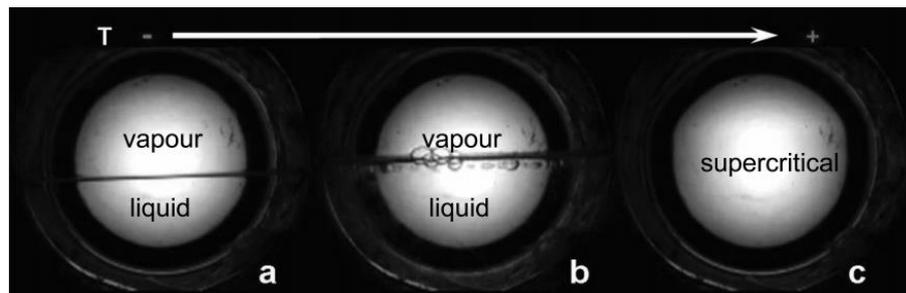


Figure 51. Cellule d'observation permettant la visualisation du passage à l'état supercritique – a) Séparation des deux phases liquide et gazeuse, b) l'interface commence à entrer en ébullition suite à une élévation de la température, c) les deux phases ne sont pas distinguables ; l'état supercritique est atteint (Hobbs et Thomas 2007).

5.2. Avantages d'utilisation

La biocatalyse en milieu supercritique suscite depuis plusieurs années l'intérêt des professionnels de l'industrie chimique qui aspirent à rendre leurs procédés plus performants et plus durables. L'association de la catalyse enzymatique avec les fluides supercritiques est une idée ambitieuse puisqu'elle permettrait d'adoucir les conditions opératoires tout en permettant d'éviter d'avoir recours aux solvants organiques dans les réactions favorisées par l'absence d'eau.

L'une des principales différences entre le scCO₂ et les solvants organiques réside dans le fait que les fluides supercritiques peuvent être considérés comme des solvants à « géométrie variable ». Comme évoqué plus haut, cela signifie qu'une simple variation de pression ou de température permet de modifier de manière significative leur masse volumique et donc leur

densité. Ainsi, le pouvoir solvant du scCO₂ peut être régulé en fonction de la masse de substrat à dissoudre (Benaissi 2013, Knez 2009, Habulin et Knez 2001, Rezaei, Temelli et Jenab 2007, Perrut 1999).

Les avantages liés à l'usage de CO₂ comme fluide supercritique sont les suivants (Habulin et Knez 2001, Knez 2009, Rezaei, Temelli et Jenab 2007, Budisa et Schulze-Makuch 2014) :

- Absence de solvant résiduel.
- Inertie chimique.
- Non-toxicité.
- Insipide et inodore.
- Non inflammable.
- Haute pureté.
- Utilisation à basse température.
- Recyclabilité.
- Faible coût.
- Facilement éliminable.
- Solubilisation d'espèces insolubles dans l'eau.

5.3. Influence du CO₂ supercritique sur les réactions enzymatiques

Avant de s'intéresser spécifiquement à l'influence du scCO₂ sur les réactions enzymatiques, il paraît important de rappeler que l'ensemble des paramètres influençant la catalyse enzymatique sont à prendre en compte lors de la mise en œuvre d'une réaction en milieu supercritique. Il faudra alors s'assurer que la température du microenvironnement de l'enzyme, ainsi que la pression appliquée au système n'entraînent pas de dénaturation de l'enzyme. La stabilité et l'activité enzymatiques en scCO₂ dépendent de l'enzyme, de son mode d'immobilisation, de la teneur en eau dans le milieu réactionnel (en général très faible car le scCO₂ ne peut solubiliser que très peu d'eau), du débit de CO₂ dans le cas des procédés continus, du mode d'agitation dans les procédés batch, du ratio entre les substrats, enfin bien sûr de la pression et de la température du milieu réactionnel.

5.3.1. Effet direct du CO₂ supercritique

Le dioxyde de carbone sous sa forme supercritique présente de nombreux avantages qui ont pu être mis en évidence précédemment. C'est pourquoi ce solvant est de plus en plus utilisé dans la mise en œuvre de réactions enzymatiques. Malgré de bons résultats et de nombreux succès, plusieurs chercheurs ont dû préalablement se pencher sur l'étude de l'influence de ce solvant particulier sur la stabilité et l'activité des diverses enzymes.

De manière générale, le scCO₂ offre une alternative intéressante aux solvants non conventionnels qui sont généralement de nature organique. En effet, les milieux supercritiques

sont un moyen d'améliorer l'activité de l'enzyme dans les milieux anhydres même si un certain taux d'eau dans le milieu est requis pour permettre à l'enzyme d'être active. Ainsi, de nombreuses études ont pu démontrer que l'utilisation d'enzymes au sein d'une phase supercritique permettait de catalyser les mêmes réactions qu'en solvant organique (Knez 2009, Budisa et Schulze-Makuch 2014).

Il n'est pas évident de prédire la stabilité et l'activité des enzymes au sein d'un tel milieu puisque les paramètres appliqués (température, pression, teneur en eau, ...) sont éloignés des valeurs physiologiques ou traditionnellement utilisées en catalyse enzymatique. Cependant, la plupart des enzymes utilisées dans ce genre de milieu s'avèrent posséder une bonne stabilité tout en conservant leurs propriétés sélectives. Ainsi, cette stabilité serait due selon plusieurs études à l'environnement pressurisé qu'offre ce type de solvant. D'autre part, une augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme a également pu être observée dans certaines conditions. En effet, en se plaçant dans des conditions raisonnables de pression et de température et en imposant une faible proportion de scCO_2 , une augmentation de la vitesse de réaction a pu être observée dans plusieurs cas. D'autre part, diverses lipases se sont également révélées actives à des températures habituellement trop élevées pour assurer une activité enzymatique. Cette augmentation d'activité catalytique pourrait s'expliquer par un transfert de matière plus performant ainsi qu'une amplification de la sélectivité de l'enzyme supprimant ainsi toute réaction indésirable (Knez 2009, Budisa et Schulze-Makuch 2014, Overmeyer, et al. 1999, Hlavsova, et al. 2008).

5.3.1.1. Formation d'acide carbonique et de carbamate

Même si la plupart des enzymes s'avèrent stables sous dioxyde de carbone supercritique, il est important de préciser que l'interaction entre les éléments constitutifs du milieu réactionnel et le dioxyde de carbone peut avoir des effets néfastes. Dans l'ensemble des réactions enzymatiques réalisées en milieu supercritique, la catalyse nécessite la présence d'enzyme, d'eau et du substrat pour avoir lieu dans les meilleures conditions possibles. Ainsi, l'interaction entre le scCO_2 et ces divers constituants peut induire la formation de produits secondaires néfastes au bon déroulement de la réaction.

Dans un premier temps, une réaction entre le dioxyde de carbone et l'eau peut avoir lieu et conduire à la formation d'acide carbonique. Cette formation, bien que réversible et très peu favorisée, peut induire une acidification du milieu et ainsi modifier l'état structural des espèces présentes en solution. En effet, l'acide carbonique formé est un diacide capable de libérer successivement deux protons induisant une baisse significative de pH au sein du milieu réactionnel (Figure 52) (Budisa et Schulze-Makuch 2014, Knez 2009).

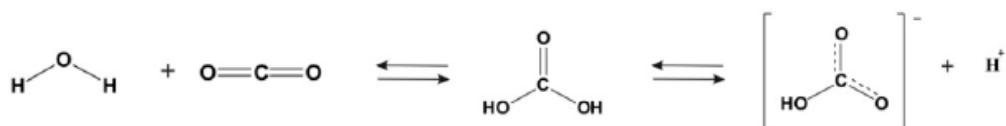


Figure 52. Mécanisme de formation d'acide carbonique à partir d'eau et de dioxyde de carbone (Budisa et Schulze-Makuch 2014).

Dans un second temps, le dioxyde de carbone peut également réagir avec les groupements amines primaires (présents naturellement dans la structure des acides aminés) non chargés. Ainsi, la réaction entre les résidus amine et le dioxyde de carbone entraîne la formation d'acide carbamique par ajout d'un groupement carboxyle et libération d'un proton (Figure 53). Ces groupements carbamates se forment à basse température où ils sont stables et peuvent ainsi être éliminés à haute température pour reformer les produits de départ (Budisa et Schulze-Makuch 2014, Mase, et al. 2003, Knez 2009).

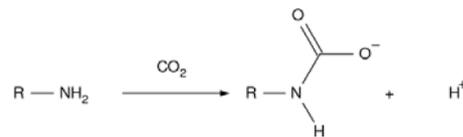


Figure 53. Mécanisme de formation de l'acide carbamique.

Par ailleurs, au sein des réactions enzymatiques en scCO_2 , des carbamates peuvent se former soit au contact des enzymes possédant un groupement amine libre ou soit au contact des substrats de la réaction tels que les acides aminés. Si la carbamatation a lieu au niveau de l'enzyme, cette dernière entraînera incontestablement des changements d'activité. En effet, cette réaction peut induire un changement conformationnel pouvant conduire à son inactivation ou induire des changements dans son activité catalytique pouvant être bénéfiques ou néfastes à la catalyse enzymatique (Figure 54). Par exemple, Mase et al. (2003) ont réussi à mettre en évidence qu'un changement conformationnel de la CAL B dû à une carbamatation avait pour effet d'augmenter le pouvoir énantio-sélectif de l'enzyme (Budisa et Schulze-Makuch 2014, Mase, et al. 2003, Knez 2009).

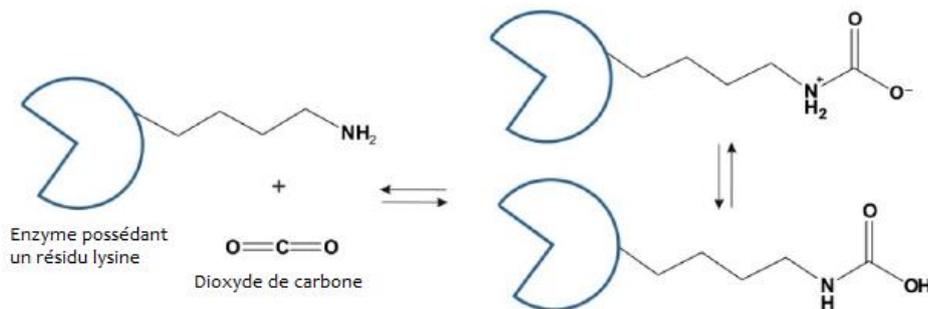


Figure 54. Formation de carbamate à la surface de l'enzyme (Budisa et Schulze-Makuch 2014).

5.3.1.2. Influence du débit de CO_2

Lorsque la catalyse enzymatique s'effectue en mode continu, le dioxyde de carbone est apporté à l'aide d'une pompe et son débit peut être ajusté. Ce dernier sert de solvant à la réaction et peut éventuellement être recyclé suite à son utilisation. L'influence du débit d'alimentation en

dioxyde de carbone influence d'une part le temps de séjour¹⁷ au sein du réacteur mais peut également avoir une influence directe sur la réaction en enzymatique.

Afin d'étudier l'influence du débit de CO₂ sur l'activité enzymatique, Dijkstra et al. ont mené diverses expérimentations en flux continu en faisant varier le flux de dioxyde de carbone injecté dans le système. Cette variation de débit de solvant a une influence directe sur le temps de séjour des réactifs dans le réacteur (plus le débit sera important et plus les temps de séjour seront faibles). Ainsi, la conversion des réactifs en produits en fonction du temps de résidence est directement reliée au débit d'alimentation en CO₂. Les résultats sont présentés sur la Figure 55 (Dijkstra, Merchant et Keurentjes 2007).

Pour des temps de séjour variables ; correspondant à des débits d'alimentation en dioxyde de carbone de 1 mL/min et 0,5 mL/min, il s'avère que la conversion en produit et donc l'activité enzymatique reste constante. Cependant, pour un débit plus élevé de l'ordre de 2 mL/min, une décroissance de l'activité enzymatique est observée.

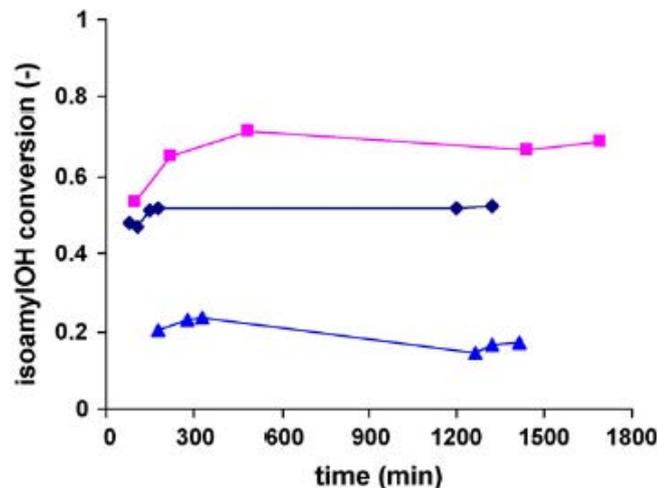


Figure 55. Influence des débits d'alimentation en dioxyde de carbone sur l'activité enzymatique à une température de 313 K et une pression de 11 MPa – 0,5 mL/min (■), 1 mL/min (◆) et 2 mL/min (▲) (Dijkstra, Merchant et Keurentjes 2007).

Cette baisse d'activité de l'enzyme peut s'expliquer à l'aide d'un phénomène connu depuis quelques années. En effet, il a été montré qu'un flux continu de CO₂ avait pour effet d'extraire l'eau présente autour de l'enzyme induisant ainsi une baisse de l'activité. Pour mettre en évidence ce phénomène, une catalyse enzymatique en flux continu fut réalisée au cours d'une période de deux heures (cycle 1). Suite à cette réaction, le réacteur contenant l'enzyme fut purgé par un flux de dioxyde de carbone pendant soixante minutes à un débit de 20 mL/min. Puis, une seconde réaction de deux heures fut opérée (cycle 2) avant de purger de nouveau le réacteur pour procéder

¹⁷ Temps de séjour : En génie chimique et en flux continu, il correspond au temps moyen nécessaire à une molécule pour traverser le réacteur depuis le lieu d'introduction des réactif jusqu'à la sortie.

à un troisième cycle. La conversion du réactif traduisant l'activité enzymatique a été mesurée à l'issue de chaque cycle de catalyse (Figure 56) (Dijkstra, Merchant et Keurentjes 2007).

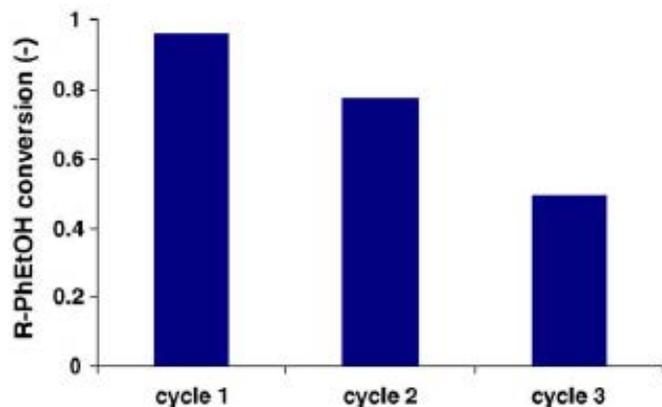


Figure 56. Mesure du taux de conversion de l'estérification du R-phényl-éthanol en présence d'acétate de vinyle après traitement par un flux de CO₂ (Dijkstra, et al. 2006).

Il est mis en évidence ici que sous certaines conditions et pour de forts débits de dioxyde de carbone, l'activité enzymatique se voit fortement diminuée. En effet, entre le premier et le troisième cycle, une diminution d'environ 50% est observée. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que cette diminution d'activité viendrait d'une extraction de l'eau nécessaire à l'activité enzymatique par le flux de dioxyde de carbone.

Afin de valider cette hypothèse et sachant que cette inactivation enzymatique par extraction d'eau est réversible, une réhydratation de l'enzyme a été réalisée. Ce phénomène est présenté sur la Figure 57 où une catalyse enzymatique en flux continu sous dioxyde de carbone a été mise en œuvre pendant soixante-dix jours. Des mesures d'activité ont été réalisées au cours de cette réaction à des temps réguliers. Afin d'étudier ce phénomène d'inactivation par extraction d'eau, une injection d'eau a été réalisée aux jours 10, 40 et 60. Il est ainsi aisé de réaliser qu'une alimentation d'eau au niveau du réacteur permet à l'enzyme de retrouver son activité catalytique avant d'observer une nouvelle décroissance quelques jours plus tard (Dijkstra, Merchant et Keurentjes 2007, Dijkstra, et al. 2006).

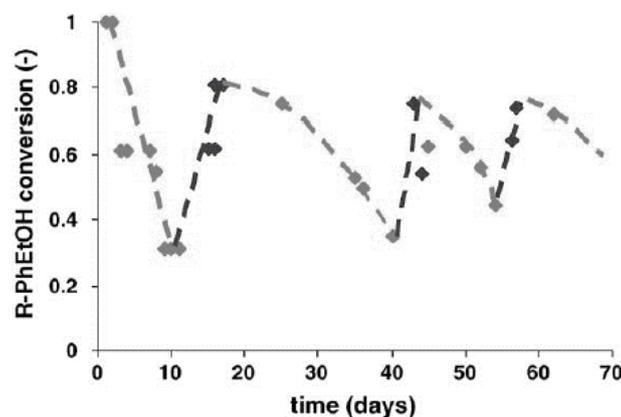


Figure 57. Mesure du taux de conversion l'estérification du R-phényl-éthanol en présence d'acétate de vinyle sous flux continu de CO₂ (Dijkstra, et al. 2006).

A l'aide de ces expérimentations, il est mis en évidence que sous certaines conditions, le dioxyde de carbone induit une diminution de l'activité enzymatique. Cependant, ceci est à nuancer puisque cette diminution brutale d'activité ne s'observe que lors d'utilisation d'un débit d'alimentation en CO₂ important et lors de réalisation des réactions en milieu totalement anhydre. Il a ainsi pu être démontré qu'un apport constant mais faible d'eau permet à l'enzyme de conserver l'ensemble de son activité lors de la mise en œuvre de réactions en scCO₂.

5.3.2. Teneur en eau dans le système

Comme nous venons de le voir, il est aujourd'hui connu que toutes les enzymes (qu'elles soient au contact d'une phase aqueuse, anhydre organique ou non-organique) ont besoin d'un minimum d'eau pour être actives. En effet, même si certaines enzymes ont la capacité de catalyser des réactions différentes en présence d'eau ou non, il s'avère qu'un minimum d'eau est requis pour que les réactions en milieu non conventionnel aient lieu. A titre d'exemple, pour réaliser une réaction d'estérification dans de bonnes conditions, la lipase de *Rhizomucor miehei* n'a besoin que de 0,5% en volume d'eau (Budisa et Schulze-Makuch 2014, Knez 2009).

L'eau agit comme un lubrifiant et les parties essentielles de la molécule se doivent d'être hydratées afin d'être flexibles et ainsi permettre à la réaction enzymatique d'avoir lieu. Aussi, la quantité d'eau injectée dans le milieu réactionnel doit être extrêmement bien maîtrisée tout en s'assurant que le dioxyde de carbone reste sous forme supercritique en dissolvant l'eau. Cependant, un léger excès d'eau peut persister dans le système (sans perturber la catalyse) et se retrouvera ainsi dispersée sous forme de microgouttelettes dans le solvant. Il convient de trouver le bon équilibre de telle sorte à injecter de l'eau ni en trop faible ni en trop forte quantité afin d'éviter l'hydrolyse dans le cas de procédés destinés à estérifier/acycler. Enfin, comme nous avons pu le constater précédemment, le débit de CO₂ injecté aura également une influence directe sur la teneur globale en eau dans le système (Budisa et Schulze-Makuch 2014, Knez 2009).

En absence d'eau, les enzymes deviennent rigides affectant la structure tridimensionnelle et conduisant à une perte d'activité. Des changements au niveau du site actif ainsi que des perturbations d'accès du substrat et de désorption des produits peuvent se produire. Ces changements induisent inévitablement une diminution de l'activité catalytique de l'enzyme pouvant même entraîner une inactivation totale de l'enzyme (Budisa et Schulze-Makuch 2014).

Dans le cas contraire, une trop forte teneur en eau peut induire des changements conformationnels ainsi qu'une hydrolyse du réactif. D'autre part, l'eau peut parfois agir comme inhibiteur compétitif et peut également entraîner l'agglomération des enzymes bloquant ainsi leurs sites actifs. Enfin, une trop forte teneur en eau jouera de manière négative sur le transport de matière et notamment des substrats jusqu'à leur site actif (Budisa et Schulze-Makuch 2014, Knez 2009).

6. Etat des lieux de la catalyse enzymatique en milieu supercritique

Depuis quelques années et notamment depuis les avancées sur la compréhension des phénomènes enzymatiques en milieu supercritique, de nombreux chercheurs se sont penchés sur l'étude de cette biocatalyse dans le dioxyde de carbone supercritique. Le Tableau XV présente de manière synthétique divers travaux réalisés à ce sujet.

L'ensemble des publications citées ci-dessous impliquent l'utilisation d'une lipase comme biocatalyseur qui est utilisée de manière libre ou immobilisée selon les cas. De la même manière, la plupart des études se sont déroulées en réacteur fermé mais certaines d'entre elles ont proposé l'étude en réacteur continu.

Tableau XV. Etat des lieux de la catalyse enzymatique en milieu supercritique.

Année	Nom commercial	Origine	Origine commerciale	Enzyme immobilisée	Support d'immobilisation	Réaction catalysée	Substrats	Produits de réaction	Ratios molaires donneur / receveur d'acyle	Pression (MPa)	Température de réaction (°C)	Mode batch ou continu	Volume du réacteur	Temps de réaction ou de passage	Taux de conversion	Masse de biocatalyseur	Procédé de séparation	Stabilité de l'enzyme	Modèle cinétique	Auteur	Lieu
2007	Amano PS	Pseudomonas cepacia	Amano int. Enzyme co.	Non	-	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride palmitique	Palmitoyl vanillylamide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	NA	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
	Amano G	Penicillium Camembertii	Amano int. Enzyme co.	Non	-	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride palmitique	Palmitoyl vanillylamide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	NA	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
	Novozym 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride palmitique	Palmitoyl vanillylamide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	NA	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
	Lipozyme IM	Mucor miehei	Novozymes A/S	Oui	Résine d'acrylique macroporeuse	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride palmitique	Palmitoyl vanillylamide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	NA	200 mg	Non	100% (batch 1) 40% (batch 2) 15% (batch 3)	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
	Candida cylindracea	Candida cylindracea type VII	Sigma Chemical	Non	-	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride palmitique	Palmitoyl vanillylamide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	NA	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
2008	Novozym 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse	Esterification	β -citronellol Acide laurique	Laurate de citronellol	1/1	0,1	60	Batch 500 RMP	100 mL	300 s	78%	12% en masse du milieu réactionnel	Non	Non étudiée	Non	Habulin	Maribor (Slovenia)
	SP 382	Lipase B+(A)Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine d'acrylique macroporeuse	Esterification	β -citronellol Acide laurique	Laurate de citronellol	1/1	0,1	60	Batch 500 RPM	100 mL	300h	75%	12% en masse du milieu réactionnel	Non	Non étudiée	Non	Habulin	Maribor (Slovenia)
	Lipozyme IM	Mucor miehei	Novozymes A/S	Oui	Résine d'acrylique macroporeuse	Esterification	β -citronellol Acide laurique	Laurate de citronellol	1/1	0,1	60	Batch 500 RPM	100 mL	300h	75%	12% en masse du milieu réactionnel	Non	Non étudiée	Non	Habulin	Maribor (Slovenia)
	Novozym 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse	Esterification	β -citronellol Acide laurique	Laurate de citronellol	1/1	10	60	Batch 500 RMP	120 mL	300h	69%	12% en masse du milieu réactionnel	Non	Non étudiée	Non	Habulin	Maribor (Slovenia)
	SP 382	Lipase B+(A) Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine d'acrylique macroporeuse	Esterification	β -citronellol Acide laurique	Laurate de citronellol	1/1	10	60	Batch 500 RMP	120 mL	300h	87%	12% en masse du milieu réactionnel	Non	Non étudiée	Non	Habulin	Maribor (Slovenia)
2009	Amano PS	Pseudomonas cepacia	Amano int. Enzyme co.	Non	-	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride nonanoïque	N-Vanillynonan amide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23s	7%	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
	Amano G	Penicillium Camembertii	Amano int. Enzyme co.	Non	-	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride nonanoïque	N-Vanillynonan amide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	2,10%	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
	Novozym 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride nonanoïque	N-Vanillynonan amide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	0,70%	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
	Lipozyme IM	Mucor miehei	Novozymes A/S	Oui	Résine d'acrylique macroporeuse	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride nonanoïque	N-Vanillynonan amide	5/3	17 (10 et 24)	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	75%	200 mg	Non	100% (batch 1) 75% (batch 2) 50% (batch 3) 25% (batch 4)	Non	Liu	Penghu (Taïwan)
	Candida cylindracea	Candida cylindracea type VII	Sigma Chemical	Non	-	Amidation	Chlorhydrate de vanillylamide Anhydride nonanoïque	N-Vanillynonan amide	5/3	17	50	Batch 250 RPM	40 mL	23h	0,20%	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liu	Penghu (Taïwan)

2010	Amano PS	Pseudomonas cepacia	Amano int. Enzyme co.	Non	-	Esterification	a-terpineol Acide acétique	Acétate de terpinyl	1/2	10	35-45	Batch 250 RPM	40 mL	1 à 7h	0,50%	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liaw & Liu	U sci. Tech. Taiwan
	Amano AP-6	Aspergillus niger	Amano int. Enzyme co.	Non	-	Esterification	a-terpineol Acide acétique	Acétate de terpinyl	1/2	10	35-45	Batch 250 RPM	40 mL	1 à 7h	17%	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liaw & Liu	U sci. Tech. Taiwan
	Amano G	Penicillium Camembertii	Amano int. Enzyme co.	Non	-	Esterification	a-terpineol Acide acétique	Acétate de terpinyl	1/2	10	35-45	Batch 250 RPM	40 mL	1 à 7h	1%	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liaw & Liu	U sci. Tech. Taiwan
	Lipozyme RM IM	Rhizomucor Miehei	Novozymes A/S	Oui	Résine d'acrylique macroporeuse	Esterification	a-terpineol Acide acétique	Acétate de terpinyl	1/2	10	35-45	Batch 250 RPM	40 mL	1 à 7h	31,80%	200 mg	Non	Non étudiée	Non	Liaw & Liu	U sci. Tech. Taiwan
	Candida rugosa type VII	Candida rugosa	Sigma Chemical	Non	-	Esterification	a-terpineol Acide acétique	Acétate de terpinyl	1/2	10	35-45	Batch 250 RPM	40 mL	1 à 7h	0,40%	200 mg	Non	32% après 8 batch de 1h30	Non	Liaw & Liu	U sci. Tech. Taiwan
	Novozym 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse	Trans-esterification	Géranol Méthy-, éthyl- ou butyl- butyrate	Butyrate de geranyl	1/1	100 à 301	50	Batch Sans agitation	7,0 mL	27h	45 à 50%	10 mg	Non	Non étudiée	Oui	Varma	Bengalore (India)
2011	Lipozyme TL IM	Thermomyces lanuginosus	Novozymes A/S	Oui	Résine d'acrylique	Trans-esterification	Huile de tournesol (+ huile de cuisson) Methanol	Biodiesel	1/29 (huile de tournesol) 1/24 (huile de cuisson)	20	40	Continu 7-15 mL/min	4,3 mL	20s	> 98% (huile de tournesol) > 89% (huile de cuisson)	0,7 mg/mL	Oui	100% après réaction	Non	Rodrigues	Lisboa
	Novozym 435 Lipozyme TL IM (1:2 mass ratio)	Lipase B Candida antarctica Thermomyces lanuginosus	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse Résine d'acrylique	Trans-esterification	Huile de cuisson Methanol	Biodiesel	1/24	20	40	Continu 7-15 mL/min	4,3 mL	20s	> 96%	0,7 mg/mL	Oui	100% après 5 heures	Non	Rodrigues	Lisboa
	Novozym 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse	Esterification	Géranol Acide acétique	Acétate de geranyl	1/1	10	40	Batch	14,0 mL	32h	77%	2.2 mg/mL	Oui	100% après plusieurs run	Oui	Couto	Lisboa (Portugal)
	Novozym 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse	Esterification	Géranol Acide acétique	Acétate de geranyl	1/1	10	35	Continu 0,25 à 1 mL/min	0,19 mL	45s	88%	300 mg	Oui	100% après plusieurs run	Oui	Couto	Lisboa (Portugal)
2012	Novozyme 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine anionique macroporeuse	Esterification	n-butanol Acide lactique	Ester de lactate	1/3	7,5 à 40	33 à 35	Batch 700 RPM	60,0 mL	26h	99%	50 mg	Non	Non étudiée	Non	Knez	Maribor (Slovenia)
2013	Novozyme 435	Lipase B Candida antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine acrylique macroporeuse	Esterification	Huile de maïs Ethanol	Ester méthylique d'acide gras	0,875	19,4	63	Continu 720 mL/min		2j	95%	2 g	Non	Non étudiée	Non	Ozan	Edmonton (Canada)
2014	Lipozyme RM IM Lipozyme TL IM	Mucor miehei	Novozymes A/S	Oui	Duolite	Inter-esterification	Huile de Canola Huile de Canola hydrogénatée	-	1/2	17,5	65	Batch Sans agitation	10,0 mL	7,5h	23%	0,4g	Non	Non étudiée	Non	Jenab	Alberta (Canada)
2015		Burkholderia cepacia		Oui	Matrice PVA/CHI	Esterification	Citronellol Vinyl-laurate	Laurate de citronellol	1/2	8,81	46,02	Batch Sans agitation	50 mL	4h	94%	175,6 mg	Non	100%	Oui	Kirtikumar	Mumbai
	Lipozyme 435	Lipase B Candida Antarctica	Novozymes A/S	Oui	Résine macroporeuse	Esterification	Acide oléique Méthanol	Ester méthylique d'acide gras	3/1	10 à 20	40	Batch 600 RPM	-	6h	71 à 75%	160 mg	Non	Non étudiée	Oui	Dos Santos	Campinas (Brésil)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Descriptif du biocatalyseur utilisé

L'enzyme permettant de réaliser la réaction enzymatique est une lipase immobilisée produite par le groupe Novozyme Corporation et distribuée par Sigma. Cette préparation commercialisée sous le nom Novozyme 435® résulte d'une immobilisation par adsorption de la lipase B de *Candida antarctica* sur une résine acrylique macroporeuse. L'activité de cette préparation est garantie à 7000 PLU.g⁻¹ (Propyl Laurate Synthesis) où une unité PLU correspond à la quantité d'enzyme permettant la transformation d'une micromole d'acide laurique en laurate de propyle par minute dans des conditions standards et équimolaires. Sa teneur en eau est quant à elle fixée entre 1 et 2 % en poids et sa teneur en protéine enzymatique est comprise entre 1 et 10%.

L'utilisation de cette préparation dont les propriétés sont résumées dans le Tableau XVI permet d'en tirer certains avantages comme le fournisseur le décrit :

- Conditions de réaction douces et sélectivité accrue envers divers substrats.
- Enzyme active en milieu aqueux et en présence de solvant organique.
- Bon fonctionnement en milieu anhydre.
- Enzyme active pour des températures allant de 20 à 100°C.
- Utilisation possible en réacteur fermé ou continu.
- Enzyme recyclable cinq à dix fois sans perte d'activité (dépend des conditions de réaction).
- Utilisable à grande échelle de production.

Tableau XVI. Résumé des propriétés de la préparation commerciale Novozyme 435®

Propriétés de Novozyme 435®	
Activité	7 000 PLU/g
pH optimal	5 à 9
Température optimale	30 à 60°C
Diamètre moyen	0,3 à 0,7 mm
Teneur en eau	1 à 2% en poids
Teneur enzymatique	1 à 10%

La préparation commerciale se présente sous forme de granules blanches de diamètre compris entre 0,3 et 0,7 mm. Il est alors possible de représenter la distribution granulométrique à l'aide d'un microscope électronique à balayage comme le présente la Figure 58 (Denčić, et al. 2013).

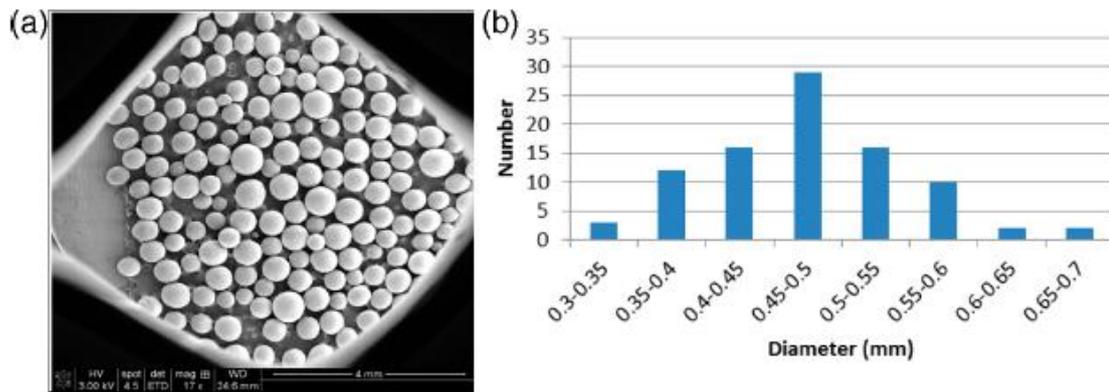


Figure 58. (a) Particules de Novozyme 435 vues au microscope électronique à balayage – (b) Distribution de taille des particules (Denčić, et al. 2013).

2. Descriptif des réactifs utilisés et des produits obtenus

2.1. Lysine

La (L)-lysine ou l'acide (S)-2,6-diaminohexanoïque est un acide aminé essentiel de formule brute $C_6H_{14}O_2N_2$ (Figure 59). Elle possède deux fonctions amine primaire ; une en position alpha et une en position epsilon. Après l'abandon des procédés d'extraction de la lysine à partir des protéines et des procédés enzymatiques, les deux sources de lysine sont aujourd'hui les tourteaux de soja et la fermentation (Simon 1995).

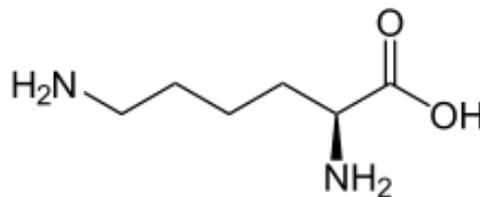


Figure 59. Structure chimique de la (L)-lysine.

La lysine possède une chaîne latérale hydrophile basique et peut être acylée à deux reprises puisqu'elle possède deux groupements NH_2 libres. Ses propriétés chimiques et physiques sont résumées dans le Tableau XVII (Weil 2001) :

Tableau XVII. Propriétés chimiques, biochimiques et physique de la (L)-lysine.

Propriétés chimiques et biochimiques	
Abréviation usuelle	Lys
Masse molaire	146,16 g/mol
pKa COOH	2,2
pKa NH_2	9,0
pKa chaîne latérale	10,0
pHi	7,26

Propriétés physiques	
Température de fusion	224 °C
Solubilité dans l'eau à 20°C	642 g/L
Solubilité dans l'eau à 30°C	780 g/L

2.2. Acide caprylique

L'acide caprylique ou acide octanoïque est un acide organique mono-carboxylique à chaîne hydrocarbonée à huit atomes de carbone et appartenant à la famille des acides gras saturés. Cette molécule est formée d'une chaîne hydrophobe et d'un groupement acide carboxylique hydrophile comme le présente la Figure 60.

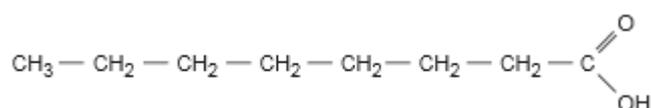


Figure 60. Structure chimique de l'acide caprylique (Boutonnier 2006).

Cette molécule découverte dans le lait de chèvre est connue pour ses propriétés antifongiques. Cette dernière est également présente dans le lait maternel, la noix de coco ou encore l'huile de palme. Ses propriétés chimiques et physiques sont présentées dans le Tableau XVIII (Weil 2001).

Tableau XVIII. Propriétés chimiques et physiques de l'acide caprylique.

Propriétés chimiques	
Formule brute	C ₈ H ₁₆ O ₂
Masse molaire	144,21 g/mol
pKa	4,85
Propriétés physiques	
Température de fusion	16°C
Température d'ébullition	237°C
Masse volumique à 25°C	0,9073 g.cm ⁻³
Viscosité dynamique à 25°C	5,105 mPa.s
Solubilité dans l'eau à 20°C	0,68 g/L

2.3. Produit acylé

Notre receveur d'acyle possédant deux fonctions amine primaire, il est possible de générer trois produits de réaction différents (Figure 61).

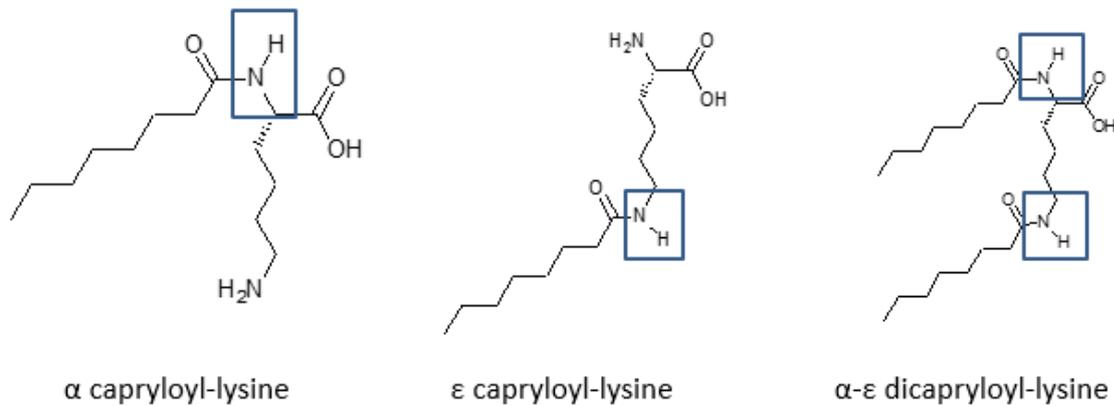


Figure 61. Structure chimique des divers produits de réaction.

2.4. Dioxyde de carbone supercritique

Le dioxyde de carbone provient d'une bouteille où le CO₂ pressurisé y est stocké sous forme gazeuse. Son passage à l'état supercritique est assuré à l'aide d'un changement de pression et de température. Comme le présente la Figure 62, le CO₂ est dans un premier temps pompé de la pression bouteille qui est d'environ 5 bar (point 1) jusqu'à une pression d'environ 150 bar. La compression d'un gaz entraînant une augmentation de sa température, ce dernier est rapidement refroidi à la température de 2°C (point 2). Puis, ce CO₂ à l'état liquide est réchauffé de manière isobare à une température pouvant aller de 45°C à 60°C selon les expériences afin de passer à l'état supercritique.

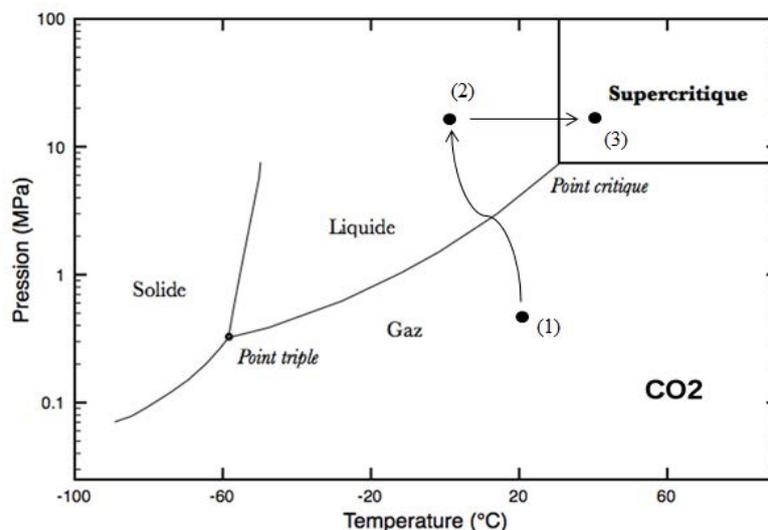


Figure 62. Evolution de la température et de la pression du scCO₂ au sein de l'installation.

Il est important de prendre en compte le pouvoir solvant du scCO₂ qui dépend directement de sa pression et de sa température comme le présente la Figure 50. En fonction de sa densité, ce solvant pourra être capable de solubiliser une certaine quantité de matière. Dans le cas où le solvant est l'eau, cette quantité peut être prédite à l'aide du modèle empirique de Chrastil (1984). Si le solvant est un acide gras, il faudra utiliser le modèle empirique d'Adachi & Lu qui est une équation directement dérivée du modèle de Chrastil.

2.4.1. Le modèle empirique de Chrastil

Afin de prédire la quantité de lysine que nous pouvons solubiliser dans notre scCO₂, nous utilisons ce modèle qui est décrit par l'équation suivante :

$$C = d^k \times \exp\left(\frac{a}{T} + b\right)$$

Dans cette équation, C est la concentration en soluté solubilisable dans le scCO₂ (en kg/m³), T la température du scCO₂ (en K), d la densité du scCO₂ et k, a et b des constantes propres à l'eau qui est le solvant au sein duquel est dissous la lysine (Tableau XIX). Afin de déterminer la densité de notre scCO₂, nous devons utiliser une équation d'état qui permet de relier plusieurs paramètres physiques appelés variables d'état. L'équation utilisée ici est l'équation de Peng-Robinson (Stryjek et Vera 1986) :

$$P = \frac{RT}{v - b} - \frac{a}{v^2 + 2vb - b^2}$$

Dans cette équation, P est la pression du scCO₂ (en Pa), T sa température (en K), v son volume molaire (en m³/mol), R la constante des gaz parfaits et a et b des constantes de l'équation de Peng-Robinson différentes de celles de l'équation de Chrastil :

$$\begin{cases} a = \left(0,457235 \times R^2 \times \frac{T_c^2}{P_c}\right) \times \alpha \\ b = 0,077796 \times \frac{RT_c}{P_c} \end{cases}$$

On notera l'apparition des paramètres critiques du CO₂ à savoir sa pression et sa température critique (P_c et T_c) dont les données sont disponibles dans la littérature. Le calcul du paramètre α peut quant à lui être déterminé à l'aide des équations suivantes (Stryjek et Vera 1986):

$$\alpha = \left(1 + \kappa \times (1 - T_r^{0,5})\right)^2$$

$$\kappa = \kappa_0 + \kappa_1 \times (1 + T_r^{0,5})(0,7 - T_r)$$

$$\kappa_0 = 0,378893 + 1,4897153\omega - 0,17131848\omega^2$$

A leur tour, ces équations font apparaître le facteur acentrique¹⁸ ainsi que les paramètres réduits du dioxyde de carbone calculables selon :

$$P_r = \frac{P}{P_c} \quad T_r = \frac{T}{T_c}$$

En remontant les équations et en résolvant la première, nous pouvons ainsi déterminer la valeur du volume molaire du scCO₂. Le calcul de la masse volumique se fait à l'aide de la relation suivante et il est alors aisé de remonter à la densité du scCO₂.

$$\rho_{scCO_2} = \frac{1}{v}$$

Tableau XIX. Paramètres constants intervenant dans le calcul de la densité du scCO₂ par l'équation de Chrastil.

a	- 2826,4
b	- 0,81
k	1,549
R	8,314411 J/mol/K
T _c	304,21 K
P _c	7382,43 kPa
κ ₁	0,04285
ω	0,04285

La connaissance de cette valeur limite de concentration en lysine solubilisable dans le scCO₂ nous permet de prédire la quantité de lysine qui sera dissoute dans la phase supercritique. On se placera toujours en concentration de lysine supérieure à celle solubilisable afin de s'assurer qu'un maximum d'acide aminé sera entraîné par la phase supercritique.

2.4.2. Le modèle empirique d'Adachi & Lu

Afin de prédire la quantité d'acide caprylique que nous pouvons solubiliser dans notre scCO₂, nous utilisons ce modèle qui est une modification directe de l'équation de Chrastil et applicable pour les acides gras à courte chaîne (Sparks, et al. 2010).

$$C^* = \rho_r^{(a+b\rho_r+c\rho_r^2)} \times \exp\left(\alpha + \frac{\beta}{T_r}\right)$$

¹⁸ Facteur acentrique : Facteur traduisant la non sphéricité des molécules.

On retrouve dans cette équation les paramètres réduits du CO₂ à savoir la température, la masse volumique ainsi que des constantes propres à l'acide caprylique (a, b, α et β). Le calcul de la masse volumique réduite est déterminé à l'aide de l'équation de Peng-Robinson précédemment détaillée.

$$T_r = \frac{T}{T_c} \quad \rho_r = \frac{\rho}{\rho_c}$$

Le calcul de la concentration absolue C peut ainsi être calculée en ayant connaissance de la concentration normalisée C* dans le scCO₂.

$$C^* = \frac{C}{\rho_c}$$

Tableau XX. Paramètres constants intervenant dans l'équation d'Adachi & Lu (Sparks, et al. 2010).

a	48,69
b	- 41,62
c	10,50
α	13,77
β	- 21,18
ρ _c	467,6 kg/m ³
T _c	304,2 K

La connaissance de cette valeur limite de concentration en acide caprylique soluble dans le scCO₂ nous permet de nous assurer que le débit appliqué sera intégralement dissous dans la phase supercritique.

3. Descriptif du réacteur utilisé

Les réactions enzymatiques sont généralement conduites dans des réacteurs dont le choix du design et de la configuration est déterminé en prenant en compte divers paramètres tels que le type de réaction mis en œuvre, la nature de la molécule d'intérêt, la quantité à produire, la forme de l'enzyme utilisée (libre ou immobilisée) ainsi que son coût.

Dans un réacteur continu, les réactifs sont introduits de manière continue en imposant un débit d'alimentation. De la même manière, les produits sont extraits du réacteur en continu. On peut ainsi observer après un certain temps (correspondant à cinq fois le temps de passage¹⁹) la mise à

¹⁹ Temps de passage : Temps théorique que passe les réactifs ou les produits dans le réacteur ; il est calculé à l'aide du rapport du débit en fonction du volume du réacteur.

l'équilibre du système. Cela signifie que l'on est en régime permanent et que tous les paramètres du procédé sont stationnaires ; la variable temps disparaît.

On peut ainsi distinguer plusieurs avantages à l'utilisation d'un réacteur continu vis-à-vis d'un réacteur fermé même si la mise en œuvre peut s'avérer plus complexe :

- Temps de séjour dans le réacteur identique des réactifs et des produits.
- Extraction en continu des produits.
- Paramètres ajustables en cours de réaction.
- Meilleur contrôle des quantités introduites.
- Traitement de fortes capacités.

Il existe plusieurs types de réacteurs enzymatiques qui fonctionnent en continu. On peut distinguer les réacteurs à lit fixe, à lit fixe fluidisé et les réacteurs membranaires. Dans le cadre de ce travail, seul le réacteur à lit fixe sera détaillé puisque c'est avec ce type de réacteur qu'est mise en œuvre la réaction d'acylation.

Le réacteur à lit fixe est constitué de billes d'enzymes immobilisées opposant une certaine résistance à l'écoulement. Le scCO_2 ayant au préalable solubilisé la lysine et l'acide caprylique arrive par la gauche du réacteur. Le passage au sein du lit fixe permet aux réactifs d'entrer en contact avec l'enzyme immobilisée afin de générer les produits de la réaction. Ce type de réacteur peut être représenté de manière schématique comme le montre la Figure 63.

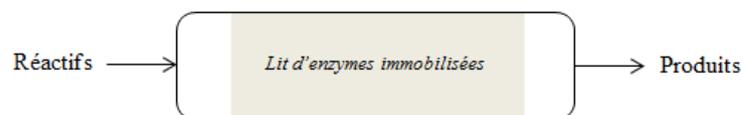


Figure 63. Représentation schématique d'un réacteur à lit fixe.

Les dispositifs à lit fixe ne comportent pas de pièces mobiles et ne nécessitent pas la mise en œuvre d'opérations de séparation fluide-solide. Cependant, les inconvénients majeurs sont liés d'une part à la difficulté d'évacuation (ou d'apport) de la chaleur et d'autre part à la perte de charge linéique²⁰ qu'ils peuvent engendrer et demandant ainsi d'ajuster le débit de fluide entrant (Rode 2015). L'avantage essentiel de la disposition en lit fixe est lié à l'écoulement de type piston de la phase fluide (ici supercritique) qui est généralement avantageux pour l'efficacité de la réaction. Ce type d'écoulement permet également de développer une grande aire interfaciale fluide-solide permettant ainsi d'augmenter la surface de contact entre l'enzyme et les réactifs.

²⁰ Perte de charge linéique : Elle correspond à la dissipation d'énergie du fluide lors de son écoulement. Elle est due à la résistance à l'écoulement issue de la viscosité du fluide et aux frottements entre le fluide et la paroi.

3.1. Modélisation de l'écoulement piston et bilan matière

L'écoulement de type piston correspond à un écoulement par progression en tranches parallèles qui n'échangent pas de matière entre elles (Figure 64). On peut considérer que toutes les particules ont le même temps de séjour et que la concentration en réactif dans une tranche du réacteur est uniforme.

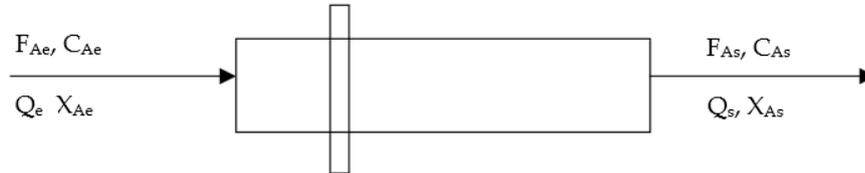


Figure 64. Représentation de l'écoulement piston et d'une tranche de réacteur – F : flux molaire des constituants, Q : débit volumique, X_A : taux de conversion, C : concentrations des constituants.

Au cours de l'avancée du réactif dans le réacteur, sa concentration va diminuer au profit de la formation de produit. On observe une évolution caractéristique du taux de conversion en fonction de l'évolution axiale du réacteur. L'expression de la courbe présentée sur la Figure 65 peut être retrouvée à l'aide d'un bilan de matière sur une tranche de réacteur piston :

Entrée + Production = Sortie + Accumulation

$$F_A - kC_A dV = F_A + dF_A$$

Les termes de ce bilan de matière, écrit pour une réaction de premier ordre, font intervenir le flux molaire de réactif A entrant (F_A) et sortant ($F_A + dF_A$), la constante cinétique de réaction (k), la concentration molaire en réactif A (C_A) ainsi que le volume de la tranche de réacteur piston (dV). Le terme d'accumulation n'apparaît pas dans ce bilan puisque que l'on est en régime permanent. On peut ainsi introduire le temps de passage (τ) ainsi que le taux de conversion X_A :

$$\begin{cases} \tau = \frac{V}{Q} \Leftrightarrow d\tau = \frac{dV}{Q} \\ F_A = F_{A_0} \times (1 - X_A) \end{cases}$$

La combinaison de ces équations nous permet d'exprimer le taux de conversion en fonction du temps de passage et donc de l'évolution axiale du réacteur puisque le volume augmente avec la longueur.

$$-k \times \frac{F_{A_0}}{Q} \times (1 - X_A) \times dV = d(F_{A_0} \times (1 - X_A))$$

$$k \times (1 - X_A) \times d\tau = dX_A$$

$$d\tau = \frac{dX_A}{k \times (1 - X_A)}$$

Pour aboutir à l'expression finale, il suffit d'intégrer cette équation entre l'entrée et la sortie ce qui correspond à prendre le temps de passage ainsi que le taux de conversion entre zéro et leur valeur finale.

$$\int_0^\tau d\tau = \int_0^{X_A} \frac{dX_A}{k \times (1 - X_A)}$$

$$X_A = 1 - e^{-k\tau}$$

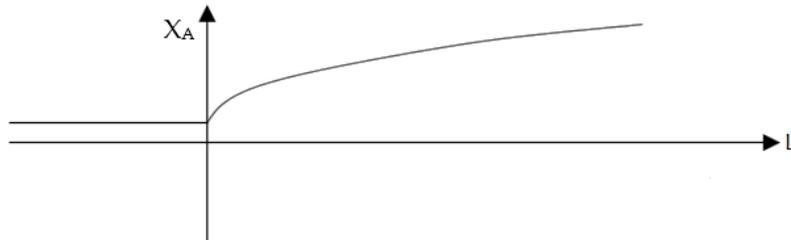


Figure 65. Evolution du taux de conversion en fonction de l'évolution axiale du réacteur piston.

3.2. Modélisation hydrodynamique du réacteur à lit fixe

Le milieu poreux composé de billes d'enzymes immobilisées peut être décrit comme un réseau de capillaires au travers duquel s'écoule le fluide. Le solide agit ainsi comme une paroi dans un écoulement confiné et impose, vu l'absence de glissement à l'interface fluide-solide, l'établissement d'un gradient de vitesse local. Ce gradient conduit à une dissipation énergétique au sein du fluide. On distingue deux mécanismes de dissipation énergétique : la dissipation d'origine visqueuse est décrite par et la relation de Kozeny-Carman et la dissipation d'origine inertielle décrite par l'équation de Burke-Plummer (Rode 2015).

L'équation d'Ergun établie en 1952 est la relation la plus utilisée de nos jours pour prédire les pertes énergétiques des écoulements en lit fixe. Dans cette équation, la perte de charge linéique dans un milieu poreux est estimée par simple addition des relations de Kozeny-Carman et de Burke-Pulmmer.

$$\frac{\Delta P_f}{Z} = h_k \times \frac{36}{(\psi_s \bar{d}_p)^2} \times \frac{(1 - \varepsilon)^2}{\varepsilon^3} \times \mu_F \dot{v}_F + h_B \times \frac{6 \times (1 - \varepsilon)}{\psi_s \bar{d}_p \varepsilon^3} \times \rho_F \dot{v}_F^2$$

Avec $\Delta P_f/Z$ la perte de charge linéique, ψ_s le facteur de sphéricité de la particule, \bar{d}_p le diamètre adimensionnel de la particule, ε la porosité du lit, μ_F la viscosité du fluide et \dot{v}_F la densité de flux volumique du fluide.

L'équation d'Ergun fait intervenir deux constantes h_k et h_B dont la valeur dépend de la géométrie du solide et qui sont généralement déterminées expérimentalement. De nombreux auteurs ont depuis proposé des valeurs de ces deux paramètres légèrement différentes de celle décrite à l'époque par Ergun.

4. Description de l'installation

La réalisation des réactions enzymatiques en milieu supercritique et en réacteur continu requiert un matériel précis et adapté de par les faibles débits appliqués. La réaction ayant lieu en présence de trois phases distinctes (la phase supercritique et les deux phases liquides réactives), il convient de s'assurer que l'ensemble est bien homogénéisé afin de permettre à la réaction d'avoir lieu. Une représentation schématique de l'installation pilote est présentée en Figure 67.

On peut ainsi distinguer différents éléments :

- Bouteille de CO₂ : placée en début d'installation, cette bouteille contient du dioxyde de carbone pressurisé sous forme gazeuse qui sera par la suite pompé et amené sous conditions supercritiques (Figure 62).
- Pompe à CO₂ supercritique : cette pompe permet de pomper le débit de dioxyde de carbone souhaité (pouvant varier entre 1 et 10 mL/min) et de l'amener à une pression de consigne donnée (pouvant aller jusqu'à 350 bar). De plus, cette pompe possède un système de refroidissement par effet Peltier (Figure 66).



Figure 66. Pompe à CO₂ supercritique.

- Cryostat maintenu à 2°C : on place en sortie de cette pompe un bain froid maintenu à 2°C afin de s'assurer que le dioxyde de carbone récolté en sortie de pompe soit liquide.
- Bain marie thermostaté : ce bain marie est réglé à la température de consigne à laquelle la réaction est effectuée. Le passage du CO₂ pressurisé sous forme liquide au sein de ce bain marie lui permet de passer à l'état supercritique.

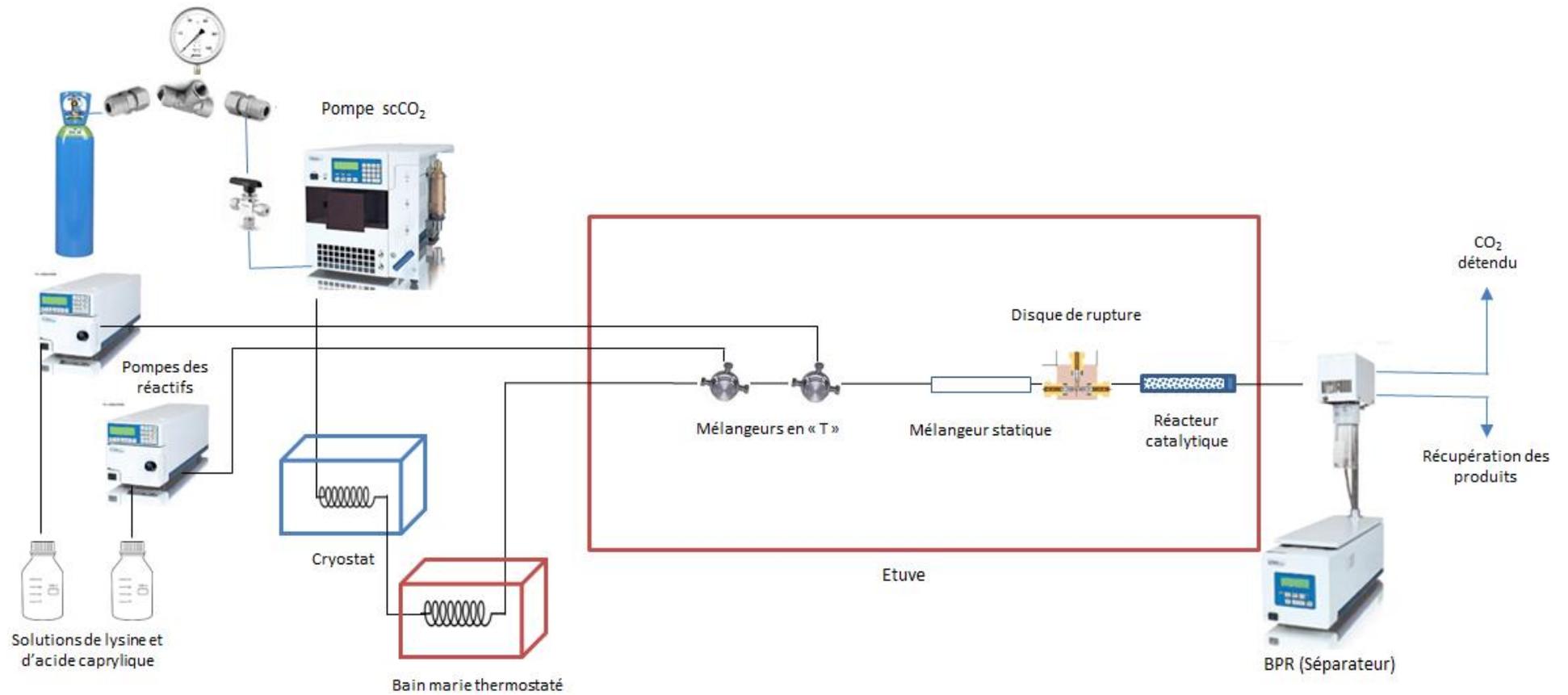


Figure 67. Représentation schématique de l'installation pilote

- Pompes à réactifs : ces deux pompes permettent de pomper avec un débit donné les réactifs de synthèse à savoir l'acide caprylique et la lysine en solution (Figure 68).



Figure 68. Pompes à réactifs (acide caprylique et lysine)

- Mélangeur en « T » : ces deux mélangeurs permettent de mélanger dans un premier temps le scCO_2 avec la solution aqueuse de lysine et dans un second temps cette solution avec celle d'acide caprylique.
- Mélangeur statique : ce mélangeur statique permet de mélanger les fluides préalablement réunis au sein du mélangeur en « T » alors que le débit traversant est laminaire. Ceci est assuré par un enchevêtrement particulier permettant une bonne homogénéisation (Figure 69).



Figure 69. Mélangeur statique produit par la société Sulzer™.

- Disque de rupture : un disque de rupture est un dispositif de sécurité servant à protéger l'installation contre les risques de variations de pression. Son fonctionnement repose sur une membrane étanche qui se rompt lorsque la pression de rupture est atteinte. L'usage d'un tel dispositif est unique car il se détruit après son fonctionnement.
- Réacteur catalytique : c'est le siège de la réaction d'acylation. Ce dernier est préalablement chargé avec la préparation de Novozyme 435® et est maintenu à l'aide de deux écrous ; un en entrée et un en sortie (Figure 70).



Figure 70. Représentation schématique de notre réacteur catalytique.

- Étuve : l'ensemble de ces éléments (à l'exception des pompes) est intégré au sein d'une étuve dont la température est maintenue à la température de réaction.
- Back-pressure regulator : permet la séparation entre le CO_2 et les produits de réaction qui peuvent être à l'état liquide ou solide. Le CO_2 gazeux dans les conditions de

pression et de température ambiante est éjecté par l'arrière de l'appareil et les produits de réaction sont collectés dans un tube de collecte (Figure 71).



Figure 71. Back-pressure regulator.

Ces divers équipements sont reliés à l'aide de tubes en inox de diamètre 1/16'' (équivalent à 0,05 mm). Les caractéristiques techniques des différents appareils sont présentées dans le Tableau XXI.

Tableau XXI. Caractéristiques des différents éléments de l'installation pilote.

Équipement	Référence commerciale	Caractéristiques
Pompe à scCO ₂	JASCO™ PU-2080 CO ₂ Plus	Débit : 1 à 10 mL/min Pression : 350 bar maximum Système de refroidissement par effet Peltier
Pompes à réactifs	JASCO™ PU-2085	Débit : 0,01 à 3 mL/min Pression : 500 bar maximum
Mélangeur statique	Réalisé spécifiquement par Sulzer™	
Disque de rupture	Top Industrie (220.13.00)	Rupture à 2000 bar
Réacteur catalytique	Swagelok™	Volume : 1 mL
Étuve	Heraeus Instruments Function Line	Température maximale : 250°C 230 V ; 10,1 A ; 2,32 kW
Cryostat	RM6 LAUDRA	-20°C à 100°C
Séparateur	Jasco™ back-pressure regulator	Pression : 350 bar maximum Système de refroidissement par effet Peltier.

Nous pouvons également représenter l'ensemble de cette installation sous forme de schéma PFD (Process Flow Diagram) classiquement rencontré en industrie comme le présente la Figure 72.

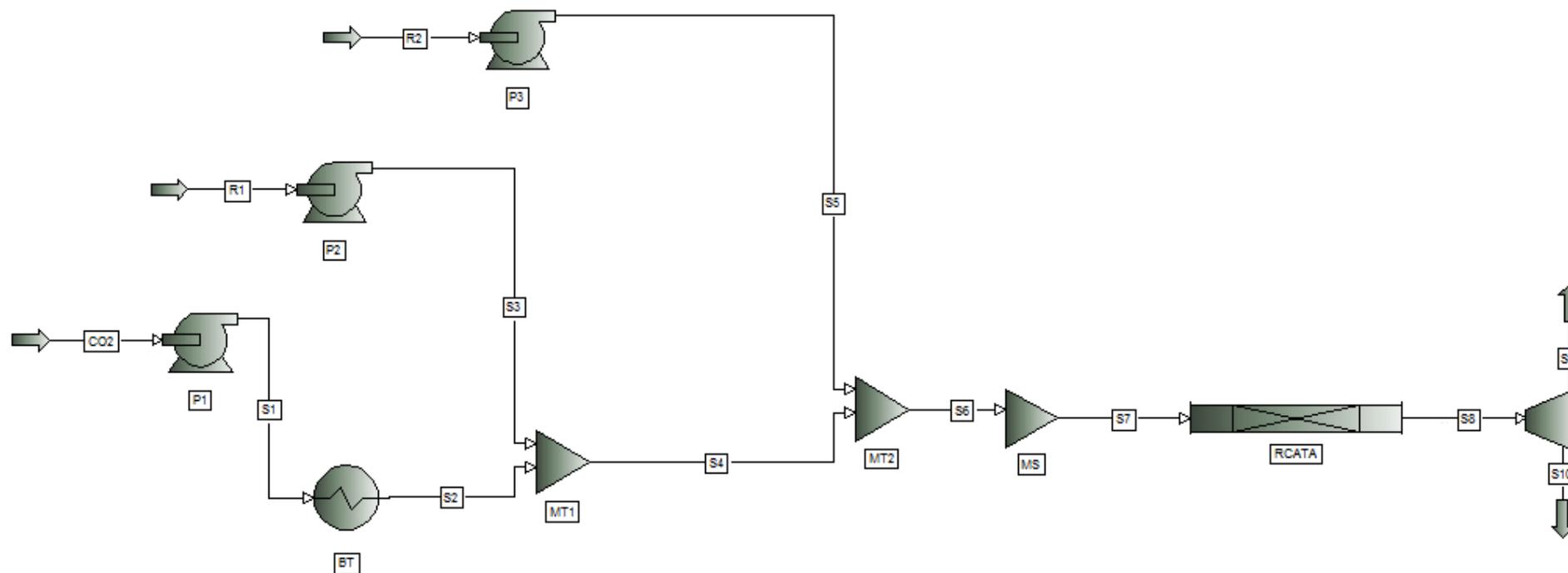


Figure 72. Schéma bloc de l'installation pilote – P1 : Pompe à scCO₂ ; P2 et P3 : Pompes à réactifs ; MT1 et MT2 : Mélangeurs en « T » ; BT : Bain thermostaté ; MS : Mélangeur statique ; RCATA : Réacteur catalytique ; BPR : Back-pressure regulator ; La lettre S symbolise les courants de matière.

5. Procédure expérimentale de synthèse

Avant de débiter la réaction proprement dite, plusieurs opérations de préparation des réactifs et de l'installation sont nécessaires. Le logiciel CHROMNAV® assure la régulation des pompes ; ce dernier fixe le débit d'alimentation en scCO_2 , en lysine et en acide caprylique. Le temps de réaction est entré directement dans le logiciel. La température sera quant à elle réglée manuellement à l'aide du bain marie et de l'étuve.

5.1. Préparation des réactifs

Avant de pouvoir démarrer la réaction, il convient de préparer les solutions de lysine en phase aqueuse et d'acide caprylique. L'acide caprylique étant utilisée pur ; aucune opération de préparation ne s'avère nécessaire. La solution aqueuse de lysine est préparée en dissolvant la quantité de lysine nécessaire afin d'obtenir la concentration désirée. La lysine étant très soluble en milieu aqueux, une simple agitation suffit à dissoudre l'ensemble de la poudre.

Afin de déterminer les quantités de réactifs introduites dans le système au cours de la manipulation, une mesure de volume de chaque réactif est effectuée avant et après la mise œuvre de la réaction. Il faudra cependant s'assurer que le volume préparé soit suffisant afin de permettre un pompage aisé des solutions.

Les granules d'enzymes sont introduites directement au sein du réacteur qui aura au préalable été lavé à l'eau et à l'acétone puis séché. Le réacteur est rempli à environ 80% de sa capacité, ce qui permet de laisser un volume mort assurant une bonne circulation du fluide. La quantité d'enzyme est pesée après son introduction au sein du réacteur et correspond à une masse moyenne d'enzyme immobilisée de 300 mg.

5.2. Préparation et conditionnement des pompes

Avant chaque manipulation, l'ensemble des tuyauteries reliées aux pompes à réactifs est purgé à l'aide d'eau distillée. Pour cela, l'arrivée au niveau du mélangeur en « T » est ouverte pour permettre d'évacuer l'eau distillée. Il est important de s'assurer qu'aucune bulle de gaz n'est présente dans les tubulures de la pompe ce qui pourrait engendrer son désamorçage. De la même manière, chaque pompe est ensuite conditionnée à l'aide de son réactif. Il faudra alors s'assurer que toute l'eau a bien été évacuée en laissant un temps de pompage suffisant. Une fois cette opération terminée, il convient de revisser l'arrivée au mélangeur.

Les pompes devant délivrer un débit très faible de l'ordre du microlitre par minute, une mesure du débit par empotage²¹ pourra être réalisée avant de lancer la manipulation. Cette mesure nous permet de nous assurer que le débit de consigne est bien respecté.

5.3. Lancement de la manipulation

La première étape consiste à monter le réacteur contenant l'enzyme au sein de l'étuve. Une fois cette opération réalisée, l'étuve est mise sous tension afin d'atteindre la température de consigne. La température du cryostat et du bain marie est réglée afin de permettre au dioxyde de carbone d'entrer dans l'étuve en milieu supercritique.

Avant de démarrer la manipulation, un contrôle est effectué en injectant dans le système du scCO₂ seul en laissant les pompes à réactifs éteintes. Cette étape permet de vérifier qu'aucune fuite n'est présente au niveau du réacteur qui a été au préalable serré manuellement. La détection d'une fuite peut se faire de deux manières distinctes ; soit audiblement, soit en remarquant une chute de température au niveau de l'entrée et/ou la sortie du réacteur. En effet, si une fuite de scCO₂ a lieu, par effet détente, les extrémités du réacteur deviendraient froides. Il suffira alors de resserrer l'extrémité où la fuite a lieu. Une fois l'ensemble de ces vérifications effectuées, la manipulation peut être lancée après avoir placé le tube de collecte en sortie d'installation.

Au cours de la manipulation, il faut s'assurer que la pression de consigne est bien régulée et que les pompes ne se désamorcent pas. Cette vérification est complexe puisque qu'aucune donnée sur le débit appliqué en cours de réaction n'est disponible. Il convient alors de vérifier le volume de solution restant dans les tubes de pompe régulièrement en cours de réaction.

6. Méthodes d'analyse des produits de réaction

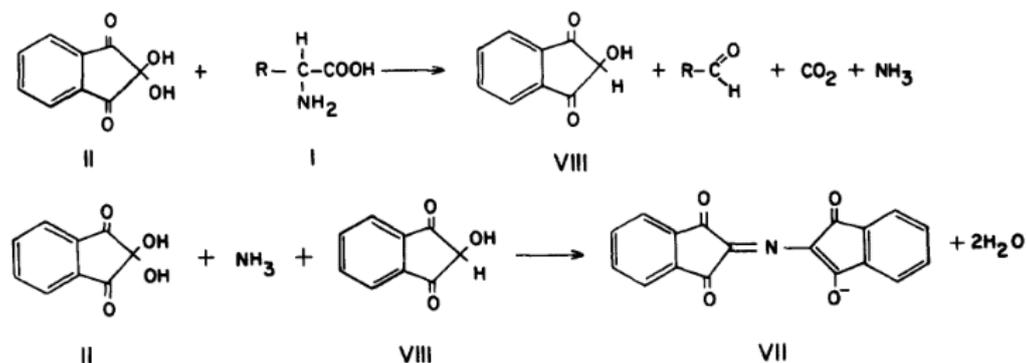
6.1. Analyse par chromatographie sur couche mince

Tous les échantillons ont dans un premier temps pu être analysés de manière qualitative à l'aide d'une technique de chromatographie sur couche mince (CCM). Cette technique est basée sur la migration différentielle des constituants des échantillons en fonction de leur polarité. La migration s'effectue sur un gel de silice déposé sur une plaque d'aluminium. Les échantillons déposés en bas de plaque sont entraînés en fonction de leur polarité par un éluant apolaire.

Des dépôts de 5 µL d'échantillons sont réalisés sur une plaque de silice (Silica gel 60, Merck). Ces dépôts sont séchés puis la plaque est placée dans une enceinte fermée hermétiquement et contenant l'éluant (n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%). Après une migration

²¹ Cette technique consiste à récolter un volume de liquide pendant un temps donné et de procéder à une pesée de ce liquide qui nous permet à l'aide de la connaissance de sa masse volumique de déterminer le volume recueilli pendant la période de temps. Il est ainsi aisé de calculer le débit de la pompe.

contrôlée d'environ une heure, la plaque est retirée de l'enceinte et séchée. Cette dernière est ensuite pulvérisée à l'aide d'une solution de ninhydrine (1g de ninhydrine dans 475 mL de butanol et 25 mL d'acide acétique). Cette substance permet de former des complexes colorés avec les groupements amine primaire libres (Figure 73). Pour observer le développement de la coloration, la plaque est placée dans une étuve à 110°C pendant environ cinq minutes.



6.2. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

6.2.1. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique qui permet d'identifier une substance ou un élément chimique. Elle permet également d'apporter des informations sur la composition, la structure et la masse moléculaire de l'échantillon. Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. Cette technique nécessite la formation préalable d'ions à l'état gazeux. Il existe de nombreuses techniques permettant d'ioniser des échantillons minéraux, organiques ou bio-organiques quel que soit leur état physique (gazeux, liquide ou solide) (Bouchoux et Sablier 2005).

Un spectromètre se compose de cinq éléments comme le présente la Figure 74. Certains de ces éléments peuvent être individualisés alors que d'autres sont indissociables. Le pilotage de l'appareil et le traitement des données sont réalisés à l'aide d'un micro-ordinateur (Bouchoux et Sablier 2005).

- Le système d'introduction de l'échantillon permet d'introduire la substance à analyser. Son fonctionnement dépend de la nature de l'échantillon et de la technique d'ionisation choisie.
- La source d'ions permet de produire des ions à l'état gazeux et de les extraire afin de les acheminer vers la partie analyseur de l'instrument.

- L'analyseur permet de trier les ions en fonction de leur rapport masse/charge. Ce tri est réalisé à l'aide d'un champ magnétique ou électrique.
- Le détecteur permet de recueillir les ions séparés par l'analyseur afin de les caractériser. Il est constitué d'un collecteur et d'un ensemble électronique de mesure et d'amplification du signal.

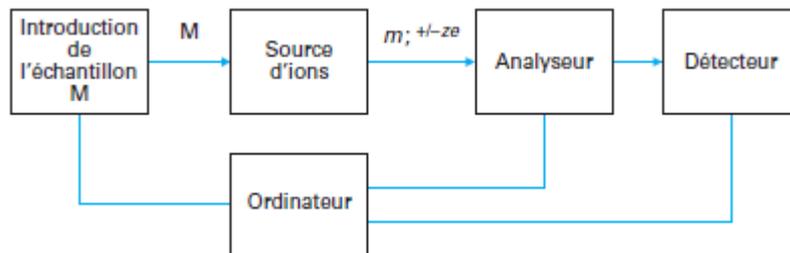


Figure 74. Schéma de principe d'un spectromètre de masse (Bouchoux et Sablier 2005).

Parmi l'ensemble des ions présents, seuls les ions d'intérêt sont alors sélectionnés grâce à leur rapport masse/charge (m/z) et analysés. A l'issue de leur passage dans le spectromètre, les ions analysés permettent de réaliser une analyse MS. Dans un deuxième temps, ces mêmes ions peuvent être fragmentés dans une chambre de collision afin de former de nouveaux ions qui sont à leur tour analysés par mesure de leur rapport m/z . On parle cette fois-ci d'analyse MS-MS ou MS2. Ces deux techniques d'analyse sont présentées sur la Figure 75.

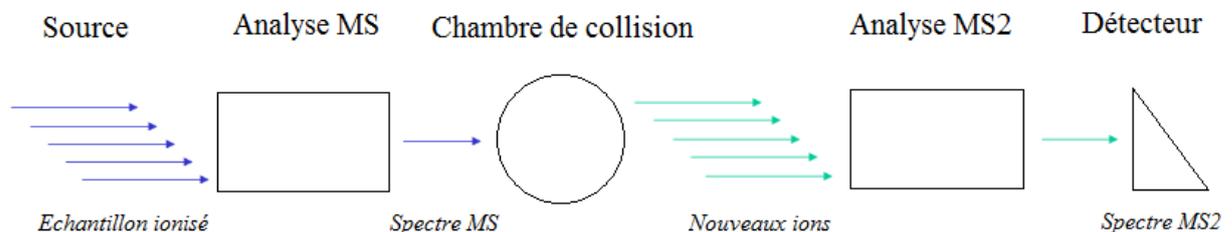


Figure 75. Représentation d'une spectrométrie de masse de type MS et MS2.

Caractéristiques du spectromètre utilisé :

- Fournisseur : ThermoFisher Scientific, San Jose, USA
- Source d'ionisation : Source ESI montée sur une interface à pression atmosphérique. Alimentation à polarité positive équipée de la technologie electrospray.
- Analyseur de masse : Trappe ionique linéaire (LTQ)
- Détecteur : Type PDA (à batterie d'iodes)

6.2.2. Le couplage chromatographique avec la spectrométrie de masse

Le principe de la chromatographie liquide consiste à séparer les constituants d'un mélange à analyser mais ne permet pas de tirer des conclusions quant à la structure des molécules isolées. L'idée de coupler une autre méthode physique après séparation chromatographique a été évoquée dans les années 1960 avec le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse. Le couplage entre la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse (LC-MS) n'a été étudié qu'à partir de 1974 (Arpino 2009).

Le couplage LC-MS est actuellement l'un des outils d'analyse les plus puissants, il permet de s'attaquer avec succès aux problèmes analytiques les plus complexes. L'échantillon à analyser est injecté au sein d'une colonne chromatographique où une séparation a lieu. Puis, au cours de leur élution, les composants sont envoyés vers la source du spectromètre de masse où ils seront ionisés puis analysés.

Equipement utilisé :

- Fournisseur : Grace/Alltech Darmstadt, Allemagne
- Phase stationnaire : Colonne C18
 - Dimensions : 150 mm x 2,1 mm
 - Porosité : 5 µm
- Phase mobile : Méthanol/eau/TFA (80 :20 :0,1, v/v/v)
 - Elution : Gradient linéaire (0% à 100%)
 - Débit : 0,2 mL/min

L'ensemble des analyses ont été effectuées par Cédric Paris, ingénieur de recherche au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (EA 4367) hébergée à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (E.N.S.A.I.A.). Ce laboratoire est membre de la fédération de recherche « Ecosystèmes Forestiers, Agro-ressources, Bioprocédés et Alimentation » (E.F.A.B.A.) et du pôle scientifique de l'Université de Lorraine « Agronomie-Agroalimentaire-Forêt » (A2F).

RÉSULTATS

1. Réflexion avant le début des expérimentations

Comme évoqué précédemment dans la description de ce travail, aucune expérience n'a jusqu'à présent été menée sur la N-acylation enzymatique en scCO₂ en réacteur continu. N'ayant ainsi aucun repère et aucune donnée accessible dans la littérature, il nous a fallu dans un premier temps réaliser un travail de recherche des conditions réalisables de réaction. En effet, nous avons connaissance que ce type de réaction était possible au sein d'un réacteur fermé. Le choix des premières conditions de travail s'est donc basé sur celles qui permettaient à la réaction d'avoir lieu dans un réacteur de type batch. Cependant, nous étions conscients que ces conditions ne seraient pas forcément optimales et adaptées à notre réacteur continu. D'autre part, de nouveaux paramètres comme le débit de scCO₂ et des solutions de réactifs faisaient leur apparition. Il nous a également fallu déterminer la quantité d'enzyme à introduire dans le réacteur afin de permettre à la réaction d'avoir lieu.

Le choix des conditions de pression et de température s'est dans un premier temps fait sur les résultats obtenus au cours des expériences précédemment réalisées en mode batch. Nous avons ainsi une idée des gammes de température et de pression dans lesquelles l'enzyme pouvait être active. Nous nous sommes également assurés que le scCO₂ soit suffisamment dense à ce couple de pression-température pour permettre une bonne solubilisation des réactifs.

Ainsi, d'après les relations présentées précédemment, nous avons pu déterminer la quantité maximale de lysine solubilisable dans le scCO₂. Une fois cette quantité déterminée, nous avons pu procéder au calcul de la quantité d'acide caprylique à introduire dans le système. Une fois de plus, les résultats d'expérimentations précédentes en mode batch préconisaient un ratio molaire de donneur d'acyle sur receveur d'acyle de l'ordre de deux. Nous nous sommes placés dans les conditions décrites en introduisant deux fois plus d'acide caprylique que de lysine en proportions molaires.

Concernant le débit de dioxyde de carbone supercritique et le temps de réaction, nous n'avons pu nous baser que sur notre propre jugement puisque qu'aucune donnée ne nous était accessible. Arbitrairement, nous avons décidé de démarrer à un débit de 3 mL/min assurant un temps de passage qui ne nous paraissait ni trop lent ni trop élevé permettant ainsi à la réaction d'avoir lieu. La première réaction s'est déroulée sur un temps de quatre-vingt-dix minutes choisi également de manière arbitraire mais permettant tout de même d'observer des produits de réaction. La détermination de ce temps de réaction et la connaissance des quantités de réactifs à injecter nous a permis de remonter aux débits à appliquer.

Le choix des conditions expérimentales des manipulations suivantes s'est fait à l'aide des résultats des expériences précédentes. En effet, au fur et à mesure que les expériences étaient réalisées, nous pouvions tirer des enseignements et formuler des hypothèses quant aux conditions expérimentales employées. Le retour d'expérience ainsi que les connaissances sur ce type de réaction en milieu supercritique nous permettait de tester ou d'ajuster les conditions opératoires dans le but d'affiner les paramètres et de trouver les conditions optimales de réaction. La multiplication des expériences nous a permis de déterminer les paramètres critiques du procédé

en identifiant d'une part les paramètres influents et d'autre part les problèmes pouvant être liés au procédé.

2. Mise en œuvre de la première acylation : preuve de concept

Comme explicité ci-dessus, les conditions opératoires de cette première expérience ont été pour la plupart extrapolées des résultats observés dans la littérature pour ce même type de réaction mais en réacteur fermé. L'ensemble de ces travaux sont présentés dans le Tableau XV. Etat des lieux de la catalyse enzymatique en milieu supercritique..

Une fois les conditions propres au scCO_2 choisies (pression, température et débit), nous avons pu déterminer sa densité à l'aide de l'équation de Peng-Robinson. Puis, à l'aide du modèle de Chrastil nous avons calculé la quantité de lysine solubilisable dans le scCO_2 . Enfin, en respectant le ratio préconisé, nous avons été en mesure de déterminer la quantité d'acide caprylique à injecter dans le système.

La réalisation de l'ensemble de ces calculs nous fournit une quantité de solution aqueuse de lysine solubilisable dans le scCO_2 de 1,66 g/L. Sachant que l'on travaille à un débit de 3 mL/min, nous pouvons solubiliser 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ de cette solution dans le scCO_2 . En connaissant la concentration de notre solution de lysine ainsi que sa masse volumique, nous pouvons remonter à la quantité injectée et ainsi déterminer celle d'acide caprylique à introduire pour respecter le ratio de deux. En ce qui concerne la quantité d'enzyme immobilisée à introduire dans le réacteur, nous avons rempli le réacteur à 80% de sa capacité.

Les pompes devant délivrer un débit très faible de réactifs et étant soumis aux forces de pression exercées par le scCO_2 , il est certain que l'ensemble du débit imposé ne sera pas transmis jusqu'à l'extrémité du réacteur. De plus, nous assistons à un effet absorbant du lit fixe d'enzyme qui retiendra en début de réaction un certain volume de solution. Dans un premier temps et de manière arbitraire, nous avons dû proposer un facteur correctif pour nous assurer que le débit délivré corresponde réellement au débit appliqué. Dans le cas de cette première expérience, nous avons imposé un débit de consigne deux fois plus élevé que le débit réellement souhaité afin d'essayer de s'affranchir de ces contraintes de forces pressantes. Une mesure du volume résiduel en fin de réaction nous permettra de déterminer le véritable débit afin de l'ajuster par la suite.

Il paraît également important de préciser que cette première expérience n'a pu s'effectuer au sein de l'installation décrite précédemment. En effet, avant de pouvoir s'équiper d'une étuve, le réacteur était placé au sein d'un four afin de réguler la température de réaction. D'autre part, le mélange de réactif n'était pas préalablement mélangé à l'aide du mélangeur statique mais simplement à l'aide des mélangeurs en « T ». L'ensemble des paramètres opératoires de cette première réaction sont présentés dans le Tableau XXII.

Tableau XXII. Résumé des paramètres opératoire de l'expérience N°1.

Paramètres opératoires – Expérience N°1	
Température (°C)	65
Pression (bar)	150
Densité du scCO ₂ (kg/m ³)	517
Débit de scCO ₂ (mL/min)	3
Quantité d'enzyme (mg)	115,26
Temps de réaction (min)	90,0
Débit de lysine souhaité (µL/min)	5,0
Débit de lysine appliqué (µL/min)	10,0
Concentration de lysine (g/L)	639,0
Quantité de lysine introduite (mg/min)	6,39
Quantité de lysine introduite (mol/min)	$4,37 \cdot 10^{-5}$
Débit d'acide caprylique souhaité (µL/min)	6,92
Débit d'acide caprylique appliqué (µL/min)	13,9
Quantité d'acide caprylique introduite (mg/min)	12,61
Quantité d'acide caprylique introduite (mol/min)	$8,74 \cdot 10^{-5}$

Au bout d'une heure et demie de réaction, nous récoltons en sortie un liquide légèrement visqueux et de coloration jaunâtre rappelant l'acide caprylique ainsi que des cristaux blanchâtres non solubilisés dans le fond du tube comme le présente la Figure 76.

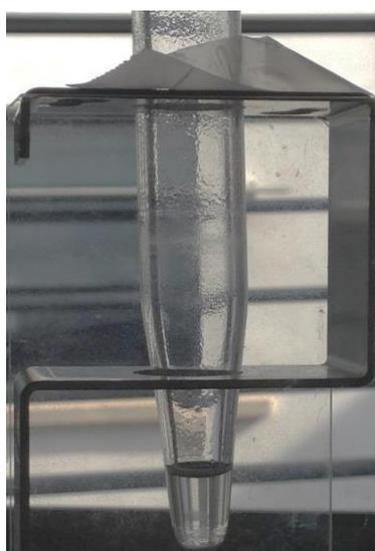


Figure 76. Photo du tube collecteur à l'issue de l'expérience N°1.

En fin de réaction, une mesure du volume résiduel est réalisée afin de déterminer (en ayant connaissance du volume présent en début de réaction) le volume réellement injecté dans le système. Ainsi, nous pouvons déterminer le débit appliqué au cours de la réaction afin de vérifier si le ratio souhaité a été respecté (Tableau XXIII).

Tableau XXIII. Comparaison entre les quantités théoriques et expérimentales - Expérience N°1.

	THEORIQUE	EXPERIMENTAL
Débit de lysine ($\mu\text{L}/\text{min}$)	10,00	8,11
Quantité de lysine introduite (mg/min)	6,39	5,18
Quantité de lysine introduite (mol/min)	$4,37 \cdot 10^{-5}$	$3,55 \cdot 10^{-5}$
Débit d'acide caprylique ($\mu\text{L}/\text{min}$)	13,90	10,11
Quantité d'acide caprylique introduite (mg/min)	12,61	9,17
Quantité d'acide caprylique introduite (mol/min)	$8,74 \cdot 10^{-5}$	$6,36 \cdot 10^{-5}$
Ratio molaire	2,00	1,79

D'après les données présentées ci-dessus, nous pouvons aisément remarquer que les pompes n'ont pas fourni les débits de consigne imposés ce qui montre bien qu'il existe un effet non négligeable du gaz compressible sur le liquide non compressible. Cependant, nous constatons que les débits souhaités sont quant à eux surestimés avec ce facteur correctif de deux. Le liquide récupéré en sortie ainsi que les dépôts insolubles ont été analysés par CCM et les résultats sont présentés sur la Figure 77.

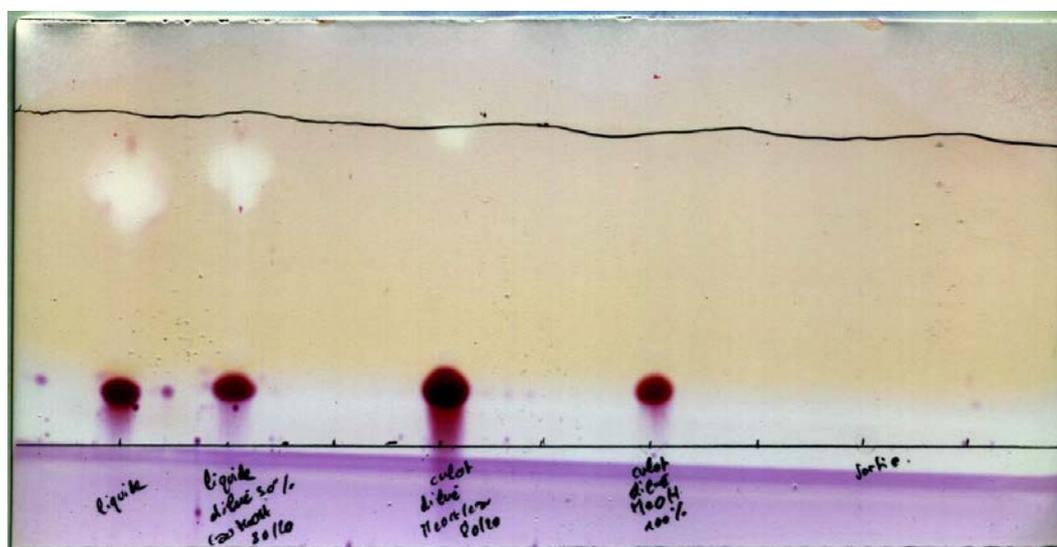


Figure 77. CCM de l'expérience N°1 – Le liquide a été déposé pur puis dilué de moitié dans du méthanol, le culot fut dilué dans un mélange méthanol/eau (20/80) et dans du méthanol pur, le tube en sortie arrière du BPR a également été analysé.

Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.

Sur cette première CCM un témoin de lysine n'a pas pu être déposé puisque nous n'en avons plus à disposition au moment de la réalisation de cette chromatographie sur couche mince. Cependant, nous pouvons supposer que l'ensemble des tâches présentes sur le bas de plaque se

révèlent être de la lysine n'ayant pas réagi. Cette hypothèse sera validée par la suite lors de la réalisation des CCM suivantes incluant un témoin de lysine ($R_f^{22} = 0,067$). Ceci peut se comprendre par le fait que la quantité de lysine réellement introduite n'a pas pu être entièrement dissoute dans le $scCO_2$. Il est également probable que le taux de conversion de la lysine ne soit pas de 100% et que de la lysine résiduelle n'ayant pas réagi se retrouve en sortie de réacteur.

En remontant le long de la plaque, nous pouvons apercevoir des taches blanches plutôt imposantes qui peuvent à première vue nous faire penser à de l'acide caprylique n'ayant pas réagi. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse une CCM témoin comprenant un dépôt d'acide caprylique a été réalisée (Figure 78). Même si la numérisation de la plaque ne laisse pas clairement apparaître la tâche, le rapport frontal a été calculé et comparé à celui de la tâche de l'expérience N°1. Ces deux R_f sont identiques et valent 0,75.

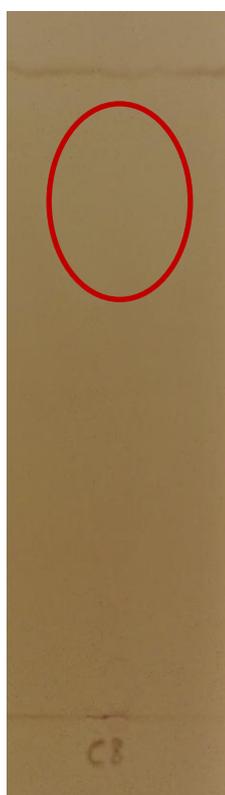


Figure 78. Chromatographie sur couche mince d'un dépôt témoin d'acide caprylique. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.

La tache présente tout en haut de la CCM s'avère donc être de l'acide caprylique résiduel. Encore une fois ce résultat n'est pas surprenant à la vue de l'aspect du liquide récupéré en sortie qui avait l'aspect et l'odeur de l'acide caprylique.

²² R_f : Rapport frontal – Rapport mathématique entre la distance parcourue par le soluté (observation de la tache) et la distance parcourue par le solvant (front de migration)

Enfin, nous observons tout en haut de plaque près du front de migration l'apparition de deux légères taches violettes concernant les deux premiers dépôts (liquide de sortie pur et liquide de sortie diluée au demi). Ayant connaissance des réactifs introduits dans l'installation et du mode de révélation utilisé, nous pouvons supposer que ces dépôts correspondent à de la lysine acylée. En effet, les produits ayant ce type de propriété seront moins retenus par la silice et ainsi migreront plus haut.

Si nos hypothèses s'avèrent correctes, cette première expérience nous a permis de mettre en évidence que la réaction d'acylation de la lysine en $scCO_2$ en mode continu à l'aide d'un réacteur à lit fixe était possible. Cependant, n'ayant à disposition aucun témoin et aucune manière certaine de confirmer ce résultat, une série d'expérience a été initiée afin d'aboutir à cette preuve de concept.

3. Réalisation des expériences suivantes

Pour les expériences suivantes, l'installation décrite précédemment a pu cette fois-ci être utilisée permettant ainsi de mieux contrôler les paramètres du procédé et de s'assurer de l'homogénéité du mélange avant passage dans le réacteur. Le choix des paramètres du procédé a été effectué de manière à comprendre l'influence de chacun et ainsi déterminer quel réglage pourrait permettre d'obtenir un rendement acceptable. L'ensemble des paramètres utilisés pour les expériences suivantes sont résumés dans le Tableau XXIV.

Cette démarche fut intéressante puisqu'il nous a fallu comprendre de manière globale le procédé afin d'essayer d'en prédire l'évolution et déterminer les paramètres vraiment importants. Nous avons ainsi pu tester l'influence de la densité du $scCO_2$, de la concentration en lysine injectée, du débit de $scCO_2$ régissant le temps de passage dans le réacteur ainsi que le temps de la réaction.

Tableau XXIV. Paramètres procédé des expériences suivantes.

	Expérience N°2	Expérience N°3	Expérience N°4	Expérience N°5	Expérience N°6
Température (°C)	65	45	45	45	45
Pression (bar)	150	150	150	150	150
Densité du scCO ₂ (kg/m ³)	517	704	704	704	704
Débit de scCO ₂ (mL/min)	2	2	2	2	3
Quantité d'enzyme (mg)	300,25	298,05	298,23	320,21	306,18
Temps de réaction (min)	90,0	180,0	180,0	180,0	180,0
Débit de lysine appliqué (µL/min)	20,0	15,0	15,0	15,0	10,0
Concentration de lysine (g/L)	63,9	63,9	321,0	63,9	63,9
Quantité de lysine introduite (mg/min)	1,28	0,96	4,82	0,96	0,64
Quantité de lysine introduite (mol/min)	$8,74 \cdot 10^{-6}$	$6,56 \cdot 10^{-6}$	$3,29 \cdot 10^{-5}$	$6,56 \cdot 10^{-6}$	$4,37 \cdot 10^{-6}$
Quantité d'acide caprylique introduite (mol/min)	$1,12 \cdot 10^{-4}$	$1,14 \cdot 10^{-4}$	$9,51 \cdot 10^{-5}$	$9,46 \cdot 10^{-5}$	$1,08 \cdot 10^{-4}$
Quantité d'acide caprylique introduite (mg/min)	16,13	16,43	13,72	13,65	15,56
Débit d'acide caprylique appliqué (µL/min)	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Ratio molaire expérimental	22,14	29,27	3,16	14,08	19,88

3.1. Expérience N°2

Suite aux résultats observés à l'aide de la première expérience, il nous a paru judicieux d'essayer de diminuer le débit de scCO_2 afin de permettre aux réactifs d'être plus longtemps au contact de l'enzyme. Cette augmentation du temps de passage et donc du temps disponible à la réaction pourrait permettre de favoriser l'acylation. D'autre part, afin d'essayer de s'affranchir du problème des pompes, nous avons décidé de diluer dix fois la solution initiale de lysine et d'augmenter le débit d'entrée de la solution. En effet, plus les débits sont importants et plus le risque de désamorçage de la pompe est faible.

Suite à la réaction, la CCM (Figure 79) nous indique que la seule molécule retrouvée en sortie correspond à de la lysine résiduelle n'ayant pas réagi (rapports frontaux identiques à ceux de la lysine témoin). Bien entendu, cette technique d'analyse ne nous permet pas de savoir si cette lysine a d'autre part subi d'autres transformations. Afin d'observer la formation d'une tache colorée, la ninhydrine a besoin de réagir avec une fonction NH_2 libre. Il est alors possible que notre lysine ne dispose d'aucune fonction NH_2 libre (ce qui est le cas lors d'une diacylation).

D'autre part, cette CCM ne nous permet pas de mettre en évidence la formation de produit de réaction. Cette absence peut alors s'expliquer par plusieurs points :

- Le temps de réaction de quatre-vingt-dix minutes n'est peut-être pas suffisant pour l'accomplissement de la réaction.
- Le dioxyde de carbone supercritique n'a peut-être pas été capable de solubiliser l'ensemble des réactifs.
- La quantité de lysine injectée était beaucoup trop importante.

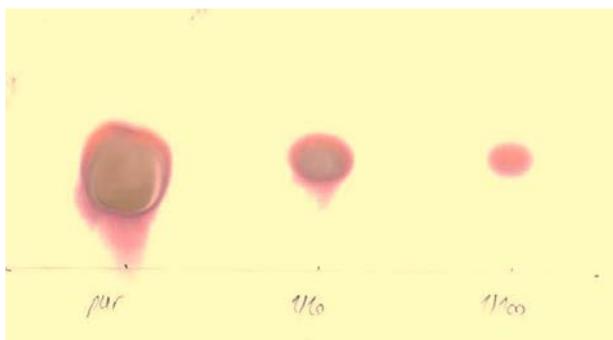


Figure 79. CCM de l'expérience N°2 – Le premier dépôt correspond à l'échantillon pur recueilli en sortie, les deux dépôts suivants à des dilutions au dixième et au centième de ce même échantillon. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.

Il paraît également important de préciser que les pompes n'ont pas été capables de fournir les débits fixés. En effet, suite à des mesures de volumes résiduels, nous constatons que le débit de lysine appliqué a été légèrement inférieur au débit de consigne alors que le débit d'acide caprylique a été légèrement supérieur au débit attendu.

3.2. Expérience N°3

Afin de prendre en compte les conclusions tirées de l'expérience précédente, plusieurs paramètres ont été ajustés. Ainsi, nous avons diminué le débit de lysine et augmenté la densité du scCO₂ par diminution de la température. La modification de ces deux paramètres nous permet de nous assurer que l'ensemble de la lysine injectée dans le système pourra être solubilisée dans le dioxyde de carbone. En effet, en reprenant les calculs, nous pouvons trouver que dans ces conditions de pression et de température, le scCO₂ est capable de solubiliser 3,18 mg/min de lysine. Avec la concentration de lysine et le débit appliqué, seulement 0,96 mg/min de lysine sera injectée dans le système permettant ainsi sa solubilisation totale. Enfin, le temps de réaction a été doublé passant de quatre-vingt-dix à cent-quatre-vingt minutes.

Suite à la mise en œuvre de la réaction, le tube collecteur en sortie présente un aspect intéressant. En effet, nous observons la présence d'un liquide légèrement jaunâtre ainsi que de nombreux cristaux blancs dans le fond du tube comme le montre la Figure 80.



Figure 80. Photo du tube collecteur suite à l'expérience N°3.

La réalisation consécutive de la CCM (Figure 81) nous permet de remarquer que ce liquide en sortie ainsi que les cristaux ne contiennent plus de lysine résiduelle mais un composé plus apolaire que la lysine puisque ce dernier migre plus haut sur la plaque de silice. Seule une analyse par spectrométrie de masse nous permettra d'identifier cette molécule. Ainsi, des analyses MS et MS2 ont été réalisées permettant de déterminer si de la lysine mono- ou di-acylée a été synthétisée.

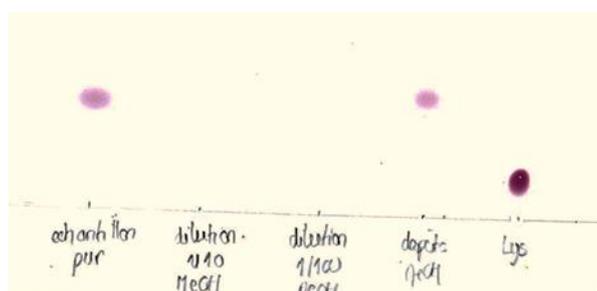


Figure 81. CCM de l'expérience N°3 – Le premier dépôt correspond au liquide recueilli en sortie ; les deux dépôts suivants à ce liquide dilué au 1/10^{ème} et au 1/100^{ème} ; le dépôt suivant correspond à la solubilisation des cristaux dans du méthanol ; le dernier dépôt est le témoin de lysine. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.

Dans un premier temps, des molécules mono-acylées ont été recherchées. Pour cela, un suivi par LC-MS est réalisé en se focalisant sur la recherche de fragments ayant une masse moléculaire comprise entre 273,00 et 274,00 g/mol. La formation de lysine mono-acylée correspond à la condensation d'une molécule de lysine (146,16 g/mol) avec une molécule d'acide caprylique (144,21 g/mol) avec départ d'une molécule d'eau (18,00 g/mol). Les molécules étant ionisées au cours de cette technique d'analyse, il ne faut pas oublier d'ajouter un atome d'hydrogène (1,00 g/mol) afin de connaître la masse recherchée. En réalisant le calcul, une molécule mono-acylée correspond donc à une masse moléculaire de $146,16 + 144,21 - 18,00 + 1,00$ soit 273,37 g/mol.

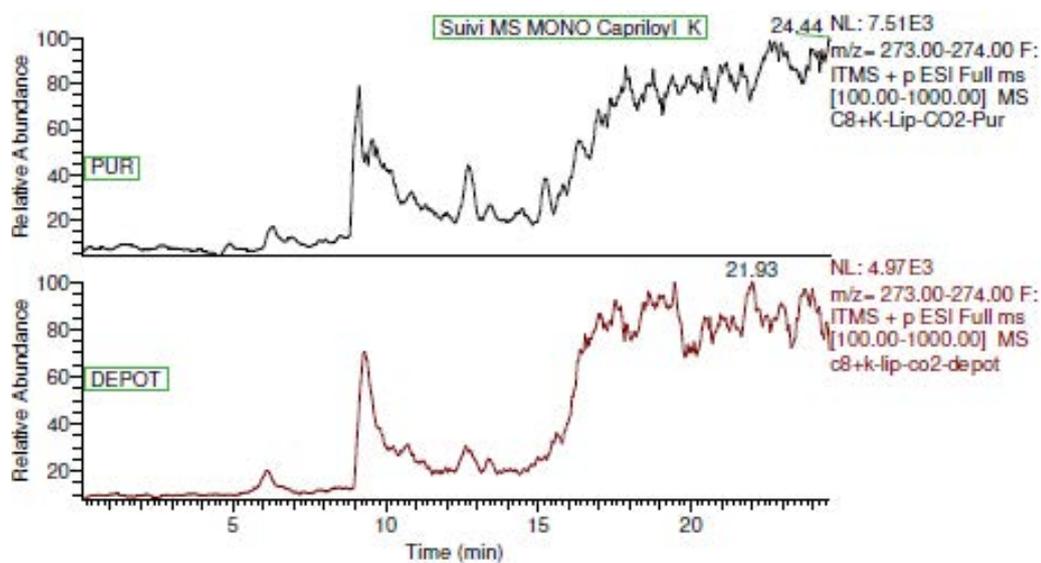


Figure 82. Chromatogramme de masse par suivi de la lysine mono-acylée – « Pur » correspond au liquide récupéré en sortie et « Dépôts » aux dépôts insolubles retrouvés dans le tube collecteur.

En observant les résultats présentés sur la Figure 82, nous constatons que les fragments recherchés au sein du liquide recueilli en sortie sortent dans les deux cas après 9,5 minutes d'éluion. Ainsi, nous pouvons conclure quant à la présence de lysine mono-acylée. Cependant, cette technique ne nous permet pas de savoir en quelle quantité le produit est retrouvé.

De la même manière les fragments de tailles 400,58 g/mol correspondant à de la lysine di-acylée ont été recherchés sur ces deux échantillons. Nous remarquons que ces derniers sortent de manière majoritaire à environ 10,70 minutes dans les deux cas (Figure 83). Ceci paraît cohérent avec ce qui a pu être observé précédemment puisque ces fragments sont plus apolaires et donc plus retenus par la phase stationnaire de la colonne.

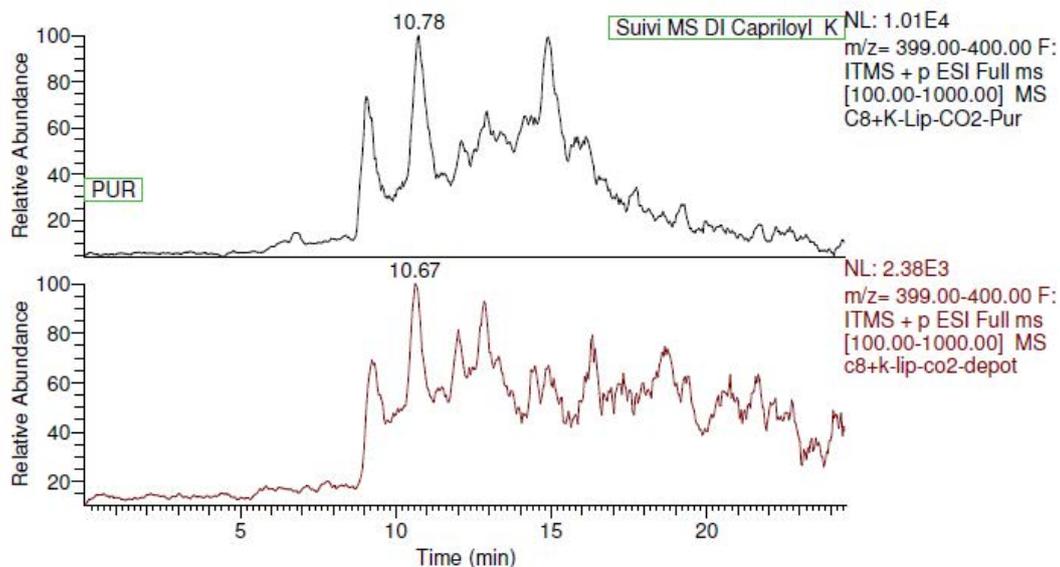


Figure 83. Chromatogramme de masse par suivi de la lysine di-acylée – « Pur » correspond au liquide récupéré en sortie et « Dépôts » aux dépôts insolubles retrouvés dans le tube collecteur.

A l'aide de ces analyses, nous pouvons constater que du produit de réaction (lysine mono- et di-acylée) a été généré au cours de la réaction. Nous ne pouvons cependant pas conclure quant à la quantité de produit présent. D'autre part, il est important de rappeler que des produits secondaires (lysine carbamatée) peuvent également avoir été générés lors de cette réaction. Ce problème de carbamatation était bien entendu à redouter ayant connaissance des réactifs introduits dans le système. Même si ce phénomène peut à première vue induire seulement la formation de produits indésirables, ce dernier est en réalité plus handicapant. En effet, si la lysine réagit avec une molécule de dioxyde de carbone pour former une molécule de lysine carbamatée, cette dernière ne sera pas en mesure de s'insérer dans le site actif de la lipase pour amorcer la réaction.

3.3. Expérience N°4

Au cours de cette quatrième expérience, nous avons voulu essayer d'intensifier la réaction en augmentant la quantité de lysine acylée. Pour cela, nous avons concentré la solution de lysine par un facteur cinq permettant ainsi d'injecter une solution à 321 g/L. Ceci nous permettrait d'observer directement sur la CCM les produits de réaction et de récolter plus de produit.

La Figure 84 présente l'aspect du tube en fin de réaction ainsi que la CCM réalisée. On remarque qu'en fin de réaction, le tube est tapissé de dépôts blanchâtres qui ne se solubilisent pas dans le liquide récolté (solubilisation lors du réchauffement du tube). Après analyse, nous observons le même phénomène que lors de l'expérience N°2 : il n'y a que de la lysine résiduelle en sortie. L'absence totale de produit de réaction dans des conditions expérimentales qui devraient en produire nous laisse supposer qu'une inhibition par excès de substrat peut avoir lieu.

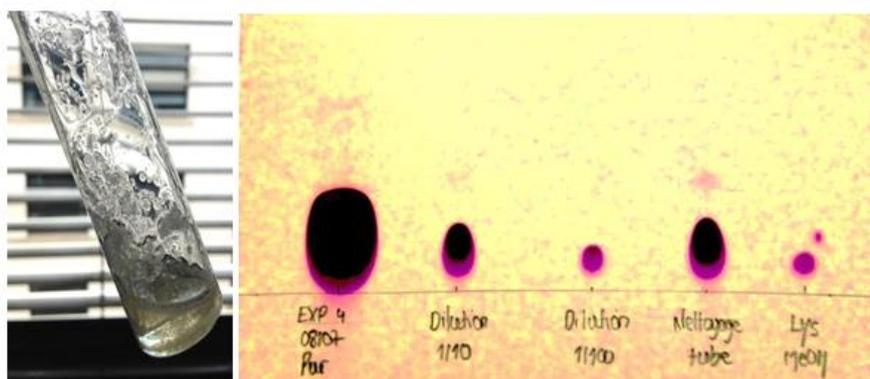


Figure 84. Photo du tube collecteur et chromatographie sur couche mince de l'expérience N°4 – Les trois premiers dépôts correspondent à l'échantillon pur et dilué ; le quatrième dépôt correspond à un nettoyage des parois du tube de collecte.

De nombreuses études se sont intéressées à ce phénomène d'inhibition par excès de substrat. La Figure 85 représente ce phénomène dans le cas d'un mécanisme enzymatique bi-bi iso ordonné. Nous constatons ainsi qu'un excès en substrat A peut conduire à la formation d'un complexe enzymatique EA qui devient inactif et qui ne pourra plus revenir à son état initial tout au long de la réaction.

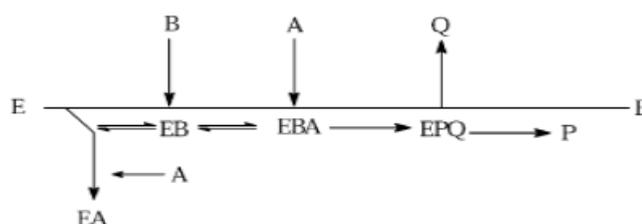


Figure 85. Mécanisme bi-bi iso ordonné avec inhibition par excès de substrat.

3.4. Expérience N°5

Pour cette expérience, nous avons tenté de reproduire les conditions de l'expérience N°3 (Tableau XXIV) afin d'être en mesure de se prononcer sur la possible reproductibilité de la réaction. Même si les conditions expérimentales étaient similaires dans les deux cas, nous observons une grande différence sur les résultats observés sur CCM (Figure 86).

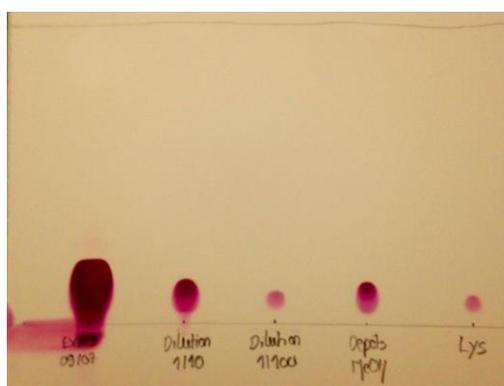


Figure 86. Chromatographie sur couche mince de l'expérience N°6.

Il s'avère que les pompes ont délivré des débits différents des débits demandés si bien que l'on se retrouve avec une quantité de solution aqueuse de lysine injectée plus élevée que celle d'acide caprylique. Ainsi, le système contient plus de receveur que de donneur d'acyle ce qui est en contradiction avec ce qui a été explicité précédemment. Il est alors possible de faire le rapprochement avec le schéma réactionnel qui nous montre que la première étape de la réaction passe par une réaction avec le donneur d'acyle. Il paraît donc évident que l'acide caprylique (donneur d'acyle) doit être majoritaire dans le milieu par rapport à la lysine (receveur d'acyle) pour permettre à un maximum d'enzyme d'être sous forme d'acyle-enzyme afin d'initier la réaction d'acylation.

Cette expérience nous a également permis de nous rendre compte que cet effet de forces pressente du scCO_2 sur les débits liquides était en réalité un phénomène aléatoire et ne pouvait de manière générale pas être prédit (entraînant un désamorçage des pompes). Les écarts observés entre ces deux débits (débit de lysine et d'acide caprylique confondu) pour les expériences 1 à 6 sont présentés sur la Figure 87.

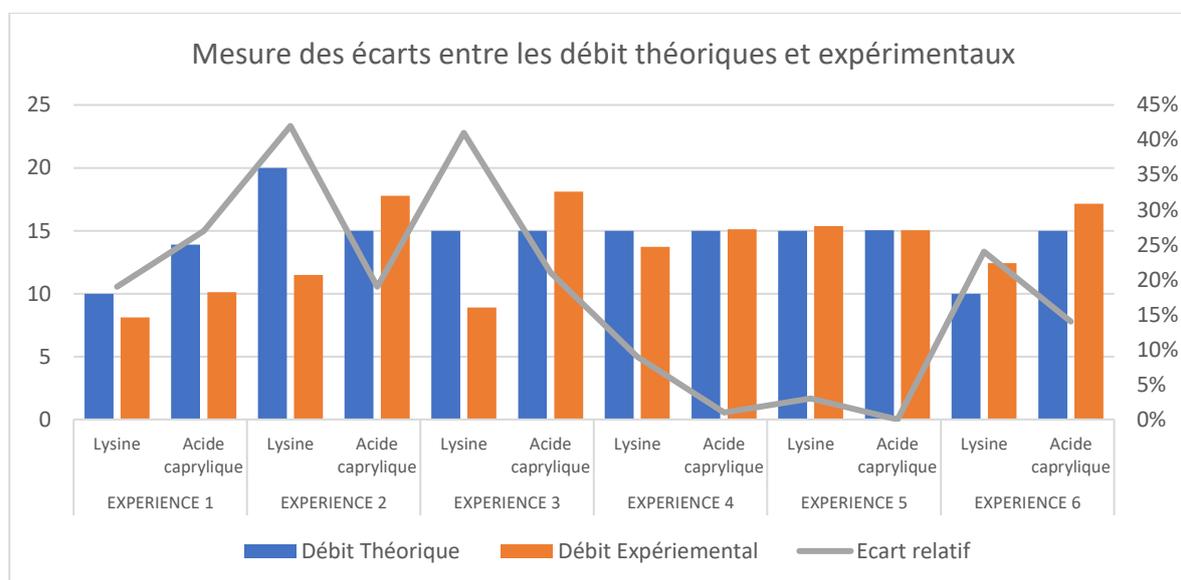


Figure 87. Mesure des écarts entre les débits théoriques et expérimentaux.

Nous remarquons ainsi que les débits réellement appliqués peuvent varier de manière non négligeable et que nous ne pouvons malheureusement pas espérer un contrôle fin de ces paramètres. Les valeurs théoriques et expérimentales des débits ainsi que le calcul des écarts relatifs sont présentés dans le Tableau XXV. Sur l'ensemble des expérimentations, nous observons un écart entre les débits théoriques et expérimentaux de l'ordre de 18%.

Tableau XXV. Valeurs théoriques et expérimentales des débits de lysine et d'acide caprylique pour les expériences 1 à 6 et calcul des écarts relatifs.

		Débit théorique	Débit expérimental	Ecart relatif
Expérience N°1	Lysine	10,00	8,11	19%
	Acide caprylique	13,90	10,11	27%
Expérience N°2	Lysine	20,00	11,55	42%
	Acide caprylique	15,00	17,78	19%
Expérience N°3	Lysine	15,00	8,91	41%
	Acide caprylique	15,00	18,11	21%
Expérience N°4	Lysine	15,00	13,71	9%
	Acide caprylique	15,00	15,12	1%
Expérience N°5	Lysine	15,00	15,38	3%
	Acide caprylique	15,04	15,04	0%
Expérience N°6	Lysine	10,00	12,42	24%
	Acide caprylique	15,00	17,15	14%
			Ecart relatif moyen	18%

3.5. Expérience N°6

De nombreux essais nous ont montré qu'il était nécessaire d'injecter plus de donneur d'acyle que de receveur tout en introduisant une quantité suffisante de lysine. En effet, si l'on introduit trop de lysine, nous nous retrouvons confrontés à un problème d'inhibition de l'enzyme et s'il y en a trop peu, l'enzyme ne sera pas capable de réaliser la réaction.

D'autre part, nous sommes conscients d'être confronté à un problème de carbamatation au cours de la réaction. Cette carbamatation est due à la grande réactivité du groupement amine vis-à-vis du dioxyde de carbone. Afin de contenir ce phénomène, il nous a paru judicieux d'augmenter le débit de scCO_2 afin de limiter le temps de contact entre le dioxyde de carbone et la lysine, diminuant ainsi la formation de carbamates. Même si cette idée pourrait paraître cohérente, il est important de rappeler que le scCO_2 est le solvant de la réaction et que l'augmentation du débit ne permet pas de diminuer significativement le contact entre la lysine et le sCO_2 .

La Figure 88 présente les résultats observés en fin de réaction. Nous pouvons dans un premier temps noter que l'aspect de la CCM est complètement différent de celles obtenues jusqu'ici. En effet, même si nous reconnaissons la première tache tout en bas traduisant la présence de lysine, nous constatons l'apparition de nombreuses autres taches le long de la plaque. Ces dernières pourraient nous faire penser à des produits de réaction différents : α -capryloyl-lysine, ε -capryloyl-lysine et/ou α, ε -dicapryloyl-lysine (à forte température durant la révélation, quelques

liaisons amide peuvent se rompre en alpha et/ou en epsilon, permettant ainsi une réaction avec la ninhydrine)

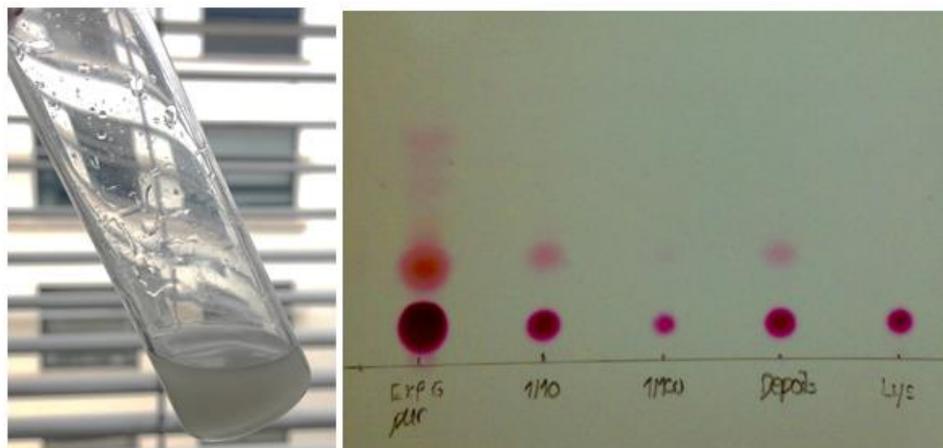


Figure 88. Photo du tube collecteur et chromatographie sur couche mince de l'expérience N°6.

Une analyse par MS et MS2 a été réalisée afin déterminer si les taches observées correspondent bien à de la lysine mono-acylée et si les conditions opératoires favorisaient également la formation de lysine di-acylée.

3.5.1. Recherche de lysine mono-acylée

Dans un premier temps, une recherche des fragments correspondant à de la lysine mono-acylée a été effectuée directement au sein du liquide recueilli. A l'aide de l'analyse par MS et MS2, nous constatons que ces fragments se situent majoritairement dans le pic sortant aux environs de 2,5 minutes (Figure 89). Dans le cas d'une analyse par MS2 qui consiste en une nouvelle fragmentation des molécules recherchées, la lysine mono-acylée peut être identifiée suite à la fragmentation en lysine (147,00 g/mol) et en radical acyle (129.00 g/mol).

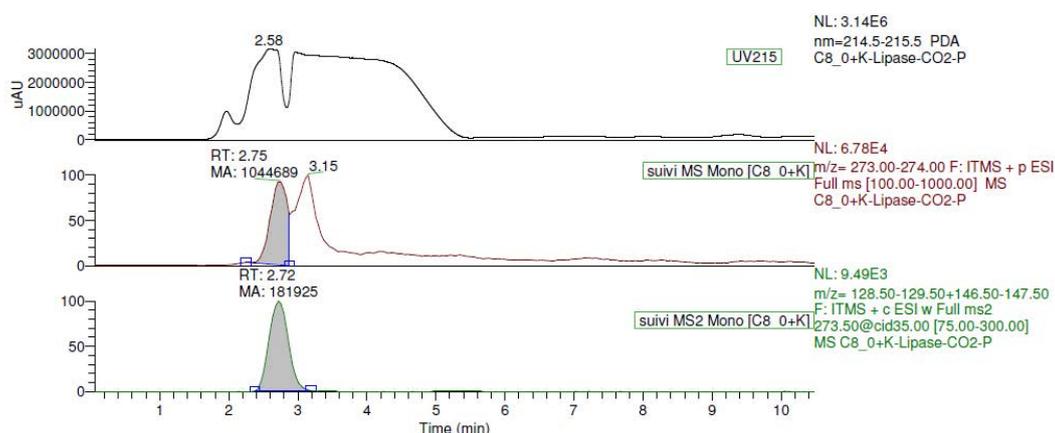


Figure 89. Suivi des fragments de lysine mono-acylée par spectromètre UV et par suivi MS et MS2.

Une extraction du spectre nous permet de mettre en évidence la présence de lysine mono-acylée et de manière majoritaire au sein de ce pic (Figure 90).

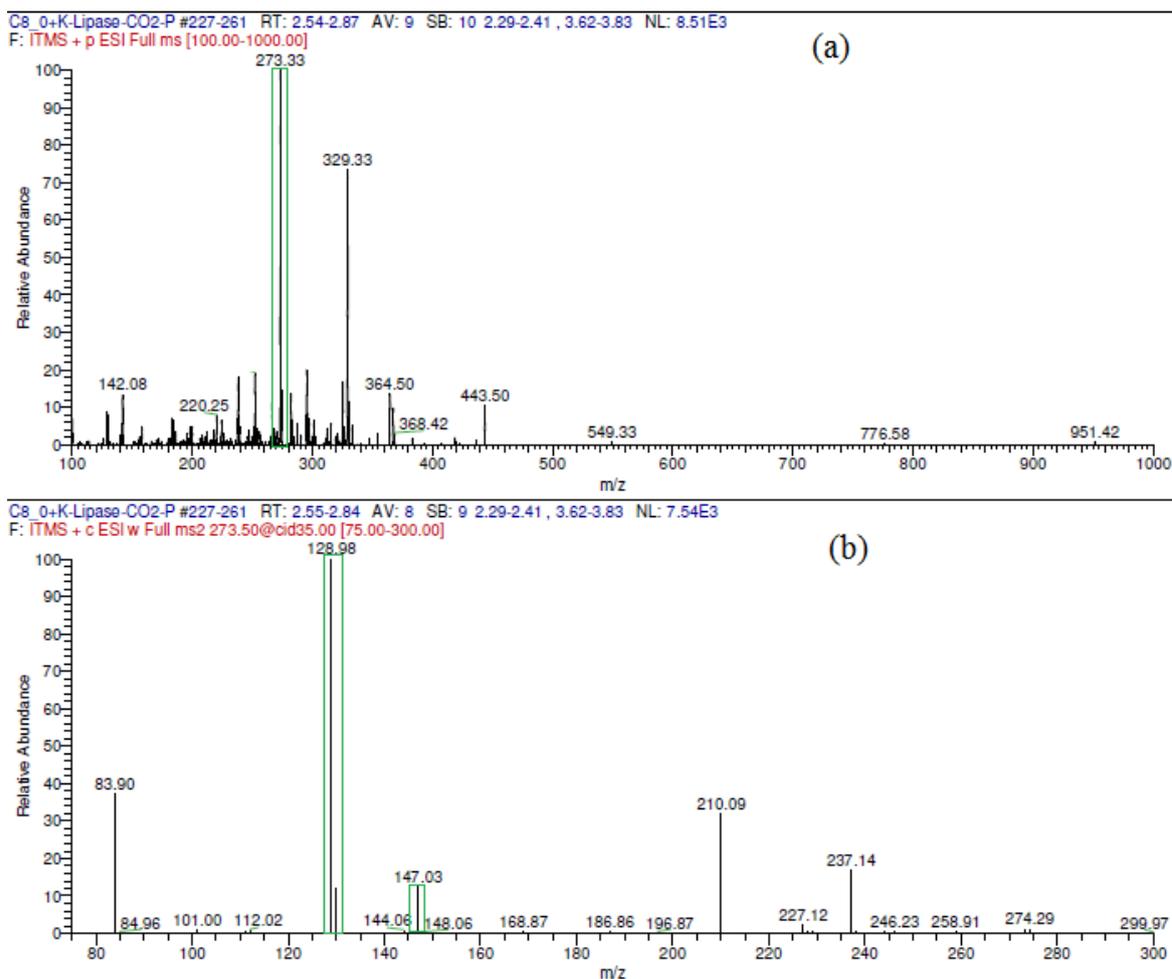


Figure 90. Spectres de masse du pic identifié lors de du suivi de la lysine mono-acylée dans le liquide de collecte – (a) Suivi du pic identifié suite à une analyse MS, (b) Suivi du pic identifié suite à une analyse MS2.

Spectre (a) : suivi du pic identifié suite à l'analyse MS. Le pic majoritaire à 273,33 g/mol correspond à de la lysine mono-acylée.

Spectre (b) : suivi du pic identifié suite à l'analyse MS2. Les pics à 128,98 g/mol et 147,03 g/mol traduisent la présence de lysine mono-acylée (fragmentation de la molécule).

D'autre part, une analyse similaire sur la partie insoluble retrouvée dans le tube collecteur, identifie les mêmes fragments et nous permet ainsi de prouver que de la lysine mono-acylée est également présente de manière non solubilisée en fin de réaction (Figure 91).

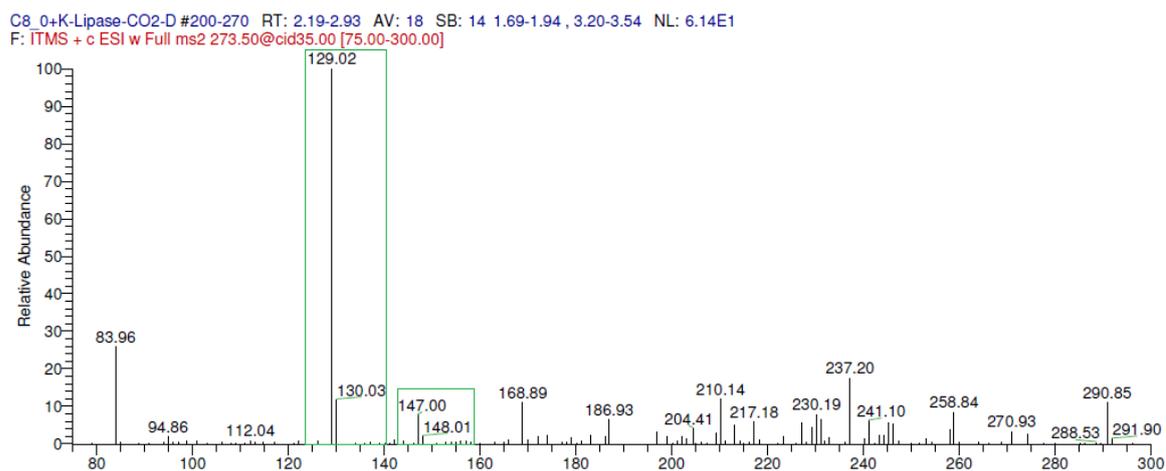


Figure 91. Spectre de masse du pic identifié lors du suivi de la lysine mono-acylée dans les dépôts.

3.5.2. Recherche de lysine di-acylée

De la même manière, un suivi des fragments correspondant à la lysine di-acylée a été effectué dans le liquide recueilli (Figure 92). En ce qui concerne le suivi MS, les fragments de taille 400,58 g/mol correspondant à de la lysine di-acylée sortent de manière majoritaire à environ 3,5 minutes. D'autre part, les fragments recherchés par suivi MS2 correspondant à la fragmentation de lysine di-acylée (147 g/mol pour la lysine, 129 g/mol pour le radical acyle et 273 g/mol pour la lysine mono-acylée) sortent également de manière majoritaire aux alentours des 3,5 minutes.

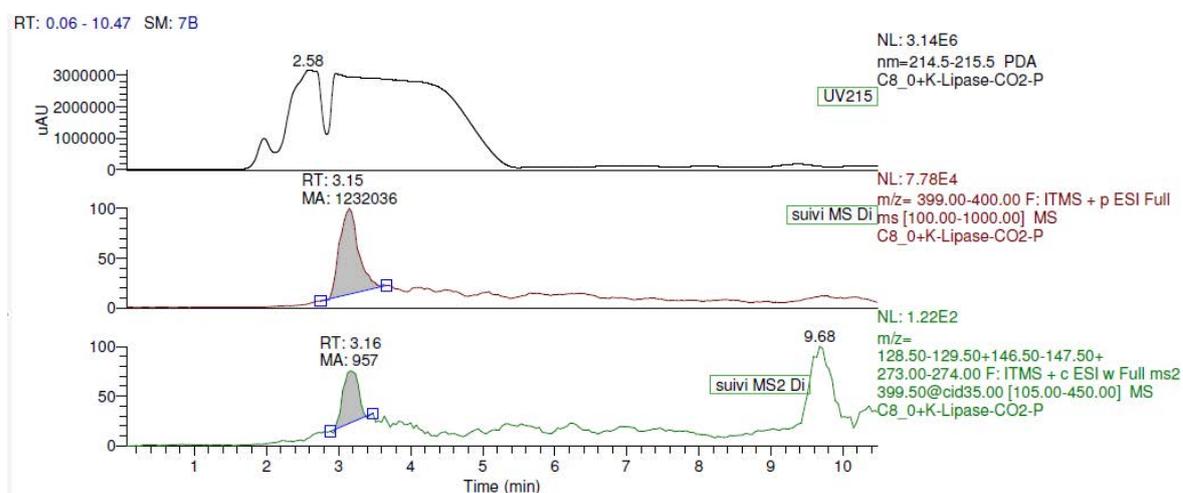


Figure 92. Suivi des fragments de lysine di-acylée dans le liquide de collecte.

Une extraction du spectre (Figure 93) nous permet de mettre en évidence la présence de lysine di-acylée (fragments d'environ 400,00 g/mol).

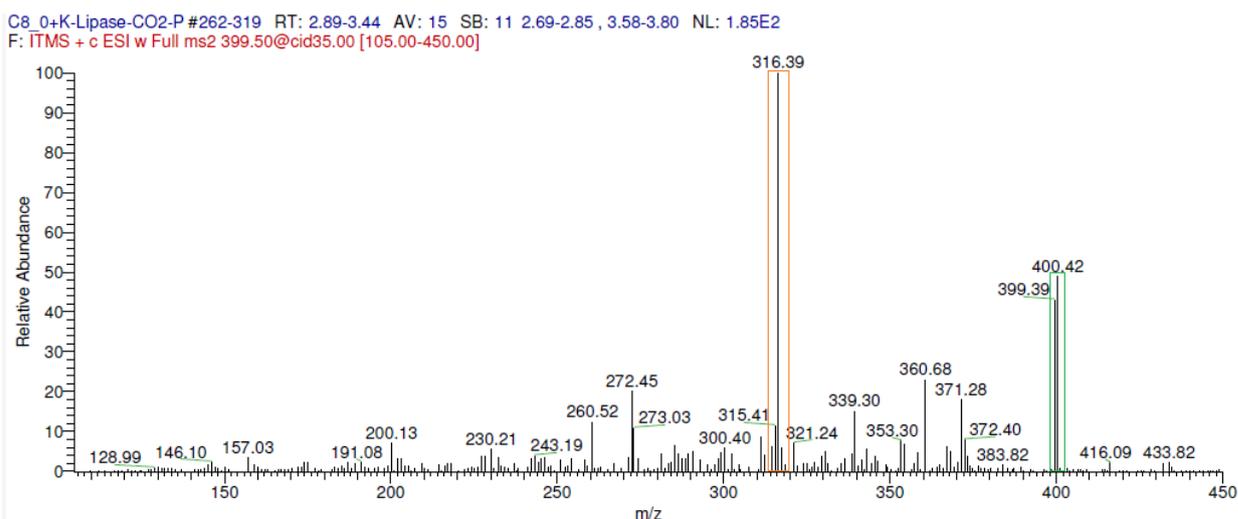


Figure 93. Spectre de masse du pic identifié lors de l'analyse par MS – Le pic vert correspond à de la lysine di-acylée.

Même si cette analyse MS ne nous permet pour le moment pas de quantifier la quantité de produit formé, elle nous permet néanmoins de le mettre en évidence. D'autre part, ces analyses nous permettent de constater que la lysine peut subir les deux réactions au sein de notre installation (mono- et di-acylation).

Ainsi, nous pouvons en déduire que la réaction a en réalité besoin de se dérouler dans des conditions d'excès en acide caprylique par rapport à la lysine. Le ratio molaire initialement expérimenté de deux passe ici à environ vingt soit dix fois plus que lors de la première expérience.

Dans le but de produire plus de produit de réaction, il semble judicieux de trouver un moyen d'augmenter le temps de contact entre les réactifs et les produits sans pour autant injecter plus de dioxyde de carbone. C'est ainsi que nous avons décidé de placer deux réacteurs en série au sein de l'étuve afin d'augmenter par deux la surface d'échange entre les réactifs et l'enzyme sans pour autant augmenter la quantité de scCO_2 injectée dans le système.

4. Acylation à l'aide de deux réacteurs à lit fixe en série

Une série de trois expériences en plaçant deux réacteurs en série a été effectuée afin de déterminer si ceci pourrait permettre d'améliorer les rendements de production. Le nouveau schéma de procédé est présenté sur la Figure 94.

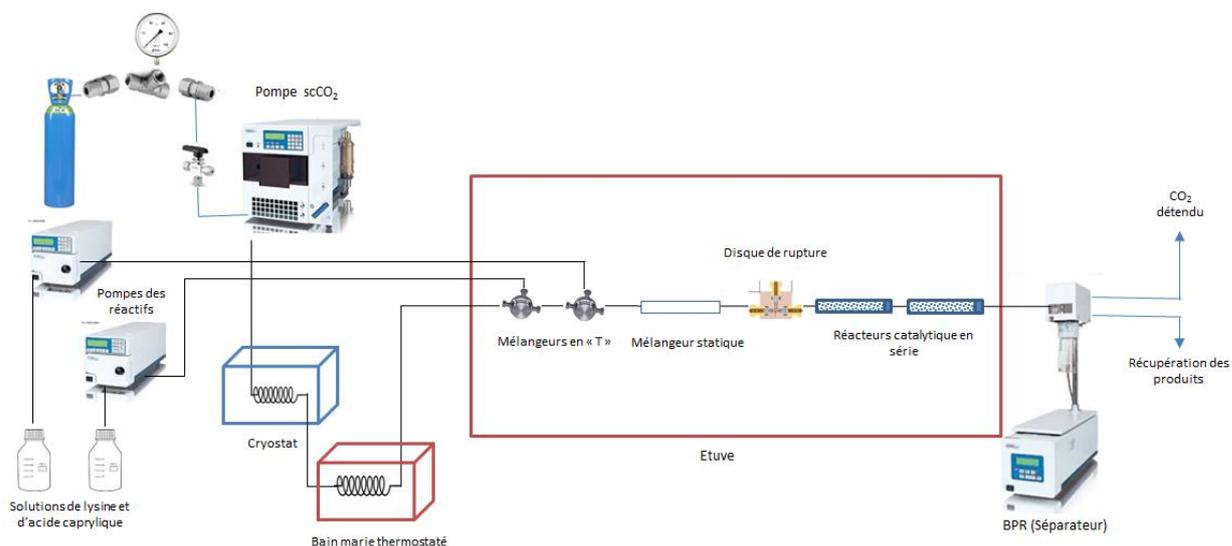


Figure 94. Représentation schématique du procédé avec deux réacteurs en série.

Une série de trois expériences a été réalisée et dont les conditions sont répertoriées dans le Tableau XXVI.

Tableau XXVI. Paramètres opératoires des réactions associant deux réacteurs en série.

	Expérience N°7	Expérience N°8	Expérience N°9
Débit de scCO ₂ (mL/min)	3,0	2,0	6,0
Température (°C)	45,0	45,0	45,0
Pression (bar)	150,0	150,0	150,0
Temps (min)	180,0	90,0	120,0
Concentration en lysine (g/L)	63,9	63,9	63,9
Débit théorique de lysine (μL/min)	10,0	5,0	3,0
Débit théorique d'acide caprylique (μL/min)	15,0	20,0	15,0
Ratio molaire théorique	21,6	57,6	71,9

Les résultats des chromatographies sur couche mince sont présentés sur la Figure 95. A l'aide de ces résultats, nous remarquons que seule l'expérience N°8 ne s'avère pas concluante. En effet, en ce qui concerne les deux autres, quatre taches peuvent être nettement identifiées. Celle située sur le bas de la plaque correspond à de la lysine résiduelle n'ayant pas réagi (après comparaison des rapports frontaux). Les autres taches situées plus haut semblent correspondre à des produits

de réaction (rapports frontaux comparables à ceux observés sur les expériences précédentes et notamment l'expérience N°3 et N°6). On pourrait ainsi penser que ces deux taches s'avèrent être de la lysine acylée sur une des deux fonctions amine. En effet, les équilibres acido-basiques sur la silice peuvent expliquer la multiplication des taches. Nous noterons également la présence de ces deux dépôts blancs en haut de CCM avec un R_f de 0,75 et traduisant la présence d'acide caprylique résiduel en grande quantité sur lequel la ninhydrine n'arrive pas à se fixer.

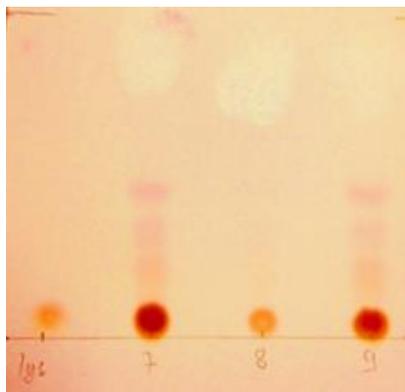


Figure 95. Chromatographies sur couche mince des expériences N°7,8 et 9. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.

Nous pouvons noter dans un premier temps que le fait d'installer deux réacteurs en série nous permet d'observer la présence de produit de la réaction. L'expérience N°8 ne nous permet pas de mettre en évidence des produits de réaction ce qui peut au premier abord sembler étrange puisque les conditions sont semblables aux deux autres essais. Il s'avère que la pompe à CO_2 s'est désamorcée au cours de l'expérience et qu'elle n'a donc pas pu délivrer de dioxyde de carbone pendant un certain temps. D'autre part, cet essai ne s'est déroulé que sur une période de quatre-vingt-dix minutes qui s'est avérée être trop courte pour pouvoir observer la formation de produit de réaction.

L'utilisation de deux réacteurs en série nous a donc permis d'intensifier la réaction pour nous permettre de visualiser en direct les produits de la réaction. Cependant, le fait de placer deux réacteurs en série induit la consommation de deux fois plus d'enzyme et induit un doublement des pertes de charge dans le système. Il se pourrait également que les produits formés au sein du premier réacteur induisent une inhibition de l'enzyme contenue dans le second réacteur. Afin d'obtenir des réponses à ces questions qui relèvent de la cinétique, il conviendrait de réaliser des études cinétiques plus poussées sur ces deux réacteurs.

Cependant, malgré l'utilisation de deux réacteurs en série, nous nous retrouvons systématiquement en sortie avec de la lysine résiduelle. Nous avons déjà remarqué qu'il était nécessaire d'injecter une quantité suffisante de lysine mais cela implique également l'introduction d'eau dans le système. Une petite quantité d'eau est nécessaire afin de permettre à l'enzyme d'être active mais une trop grande quantité pourrait être néfaste à la réaction et pourrait même entraîner une hydrolyse de nos réactifs. Afin d'augmenter la solubilité de la lysine dans le scCO_2 , il peut être possible d'utiliser un co-solvant.

5. Essais à l'aide d'un co-solvant (eau/éthanol)

Une série de trois nouvelles expériences a été menée afin de déterminer l'effet du mélange eau-éthanol sur la réaction d'acylation à l'aide d'un seul réacteur catalytique. D'un point de vue théorique, il a été démontré que l'éthanol présentait une miscibilité accrue dans le scCO₂ par rapport à l'eau (Penchev 2010). Ainsi, le fait de réaliser un mélange binaire au sein duquel la lysine sera dissoute permettra de solubiliser plus de lysine dans le scCO₂ du fait de la plus grande solubilité de l'éthanol dans le scCO₂.

Prenons l'exemple d'une étude menée par Montanés et son équipe dans laquelle ils se sont intéressés à la solubilité du lactose dans le scCO₂ en présence ou non d'éthanol. D'après la Figure 96, nous pouvons remarquer que plus la quantité d'éthanol présente dans le milieu augmente et plus la solubilité du lactose dans le scCO₂ augmente. Nous pouvons ainsi remarquer que l'ajout d'un co-solvant comme l'éthanol permet d'augmenter la solubilité de composés comme le lactose ou la lysine par exemple (Montanes, et al. 2009).

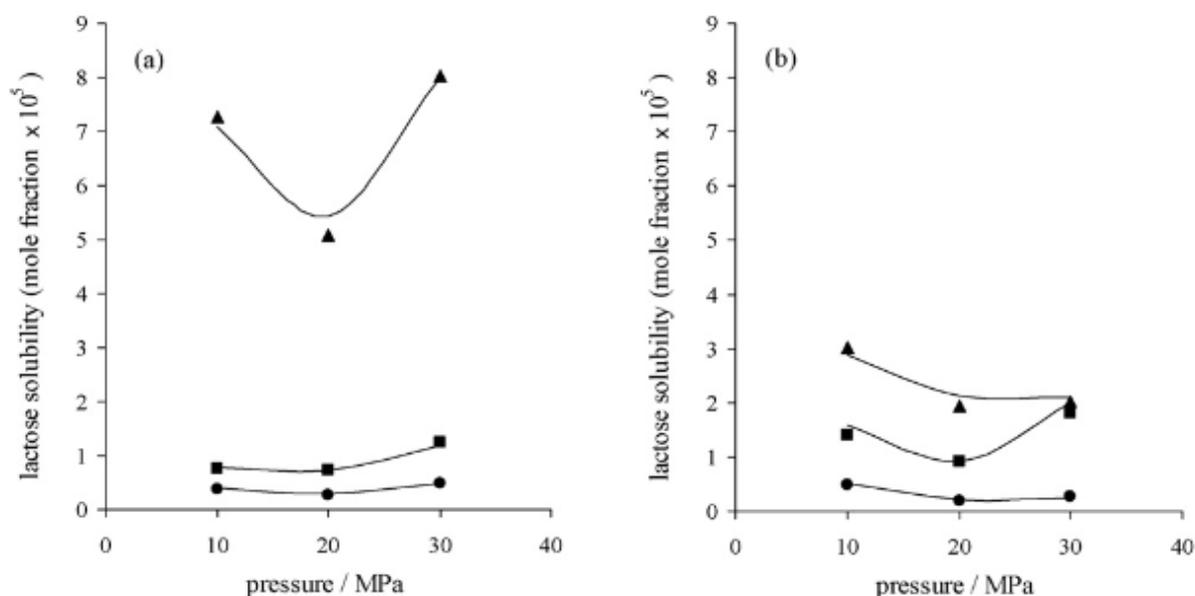


Figure 96. Solubilité du lactose dissout dans un mélange eau/éthanol à 95:5 (V/V) dans le scCO₂ à 333,2 K (a) et à 373,2 K (b) – En présence de 6% en poids de mélange (●), 14% en poids (■) et 21% en poids (▲) (Montanes, et al. 2009).

Pour ce faire, nous avons réalisé un mélange contenant 80% d'eau et 20% d'éthanol en volume et plusieurs débits de lysine et d'acide caprylique ont été étudiés. Les paramètres opératoires des expériences 16 à 18 sont présentés dans le Tableau XXVII.

Tableau XXVII. Paramètres opératoires des expériences 16,17 et 18 utilisant de l'éthanol comme co-solvant.

	Expérience N°16	Expérience N°17	Expérience N°18
Débit de scCO ₂ (mL/min)	3,0	3,0	3,0
Température (°C)	45,0	45,0	45,0
Pression (bar)	150,0	150,0	150,0
Temps (min)	180,0	180,0	180,0
Concentration en lysine (g/L)	51,12	51,12	51,12
Débit théorique de lysine (μL/min)	10,0	5,0	8,0
Débit théorique d'acide caprylique (μL/min)	10,0	5,0	8,0
Ratio molaire théorique	17,9	17,9	17,9

A l'aide de ces trois essais, nous pouvons comparer l'impact des débits en réactifs sur le déroulement de la réaction puisque tous les autres paramètres sont conservés constants. Ainsi, en analysant les CCM (Figure 97), nous pouvons distinguer des disparités selon les résultats obtenus.

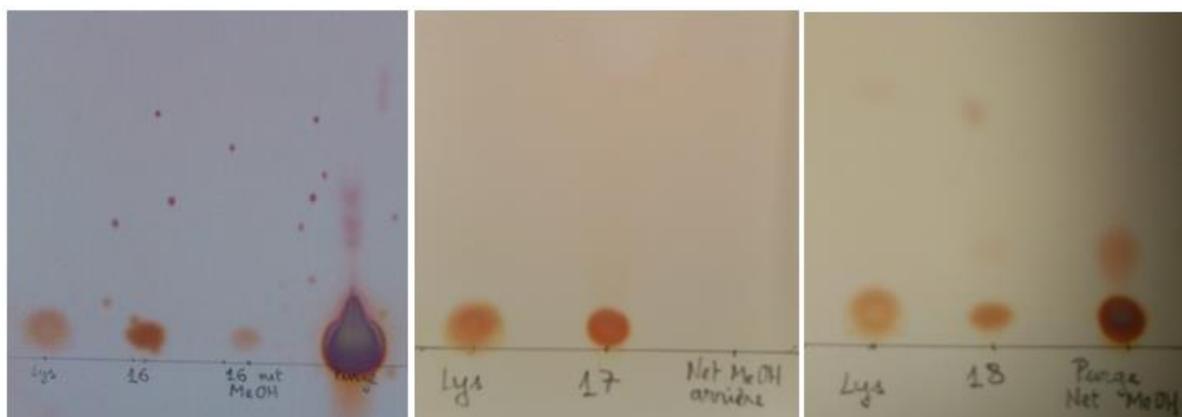


Figure 97. Chromatographies sur couche mince des expériences 16 à 18. Eluant : n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%. Révélation par pulvérisation de ninhydrine.

Pour des débits en réactifs élevés de l'ordre de 10 μL/min (expérience N°16), nous n'observons pas de formation de produits de réaction sur la CCM. D'autre part, après une purge du système (récolte du liquide présent dans le système par dépressurisation), nous constatons l'apparition de taches traduisant la présence de produits de réaction. Ceci nous montre que du produit a stagné dans l'installation et n'a pas pu être véhiculé par le scCO₂. Il existe donc des endroits de rétention à l'intérieur de notre installation qui peuvent se situer soit au niveau des mélangeurs en « T » soit au niveau du mélangeur statique. Il faut donc être vigilant à la quantité de liquide introduite dans le système. En effet, pour des débits de 10 μL/min en réactifs, la plupart des produits de réaction ont stagné dans le système et n'ont pas pu être récupérés. Cela signifie également qu'une grande quantité de réactifs et de produits n'a pas pu être solubilisé dans le dioxyde de carbone et donc transportés jusqu'au séparateur.

De la même manière, pour des débits faibles en réactifs de l'ordre de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (expérience N°17), l'analyse par CCM ne nous permet pas de mettre en évidence la présence de produits de réaction. Cela ne signifie en aucun cas que la réaction n'a pas eu lieu mais nous prouve que les quantités en produit potentiellement formés ne sont pas suffisantes pour être révélées par CCM.

Pour un débit en réactif intermédiaire de l'ordre de 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ (expérience N°18), l'allure de la CCM nous laisse supposer qu'il y a bien eu formation de produits de réaction. En effet, on observe la probable formation de lysine mono-acylée mais également d'un autre produit qui a migré beaucoup plus haut sur la plaque. La nature de ce produit ne peut pas être déterminée via cette technique d'analyse mais nous laisse supposer qu'une réaction d'acylation a eu lieu puisque ce dernier est nettement plus apolaire que la lysine ou la lysine mono-carbamate.

Ainsi, l'utilisation de l'éthanol comme co-solvant permet de corriger le problème de solubilité de la lysine dans le scCO_2 sous certaines conditions bien précises. En effet, il est important d'être vigilant quant à la quantité de co-solvant introduite dans le système (plus les débits de lysine sont importants et plus la quantité d'éthanol introduite est importante) puisqu'à des quantités trop faibles (expérience N°17) ou trop importantes (expérience N°16), il ne nous est pas permis de visualiser les produits de réaction.

6. Réflexion sur la recirculation du CO₂ et estimation des pertes de charges

Dans une logique d'intensification du procédé d'acylation, et surtout dans notre cas, l'augmentation du temps de séjour au sein du réacteur apparaît comme un élément important à considérer. On peut bien sûr jouer sur le débit de la pompe mais en dessous de 1 mL/min de CO₂, cette dernière perd en précision. Pour une dimension de réacteur donnée, et donc une quantité de lipase donnée, le seul moyen de lutter contre la faible solubilité de la lysine dans le scCO₂ seul et même en présence de co-solvant (eau ou mélange eau/ethanol) est de jouer sur une recirculation du milieu réactionnel au sein du réacteur selon la Figure 98 sur laquelle une pompe centrifuge haute pression est envisagée.

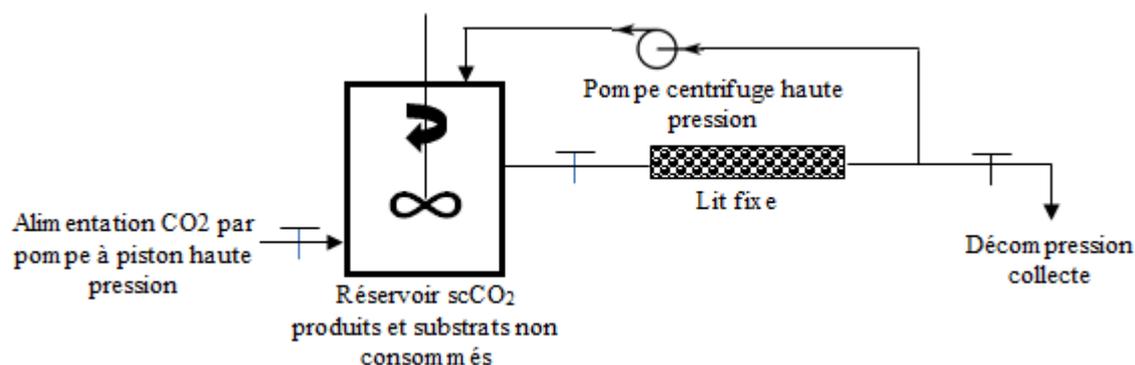


Figure 98. Schéma de principe illustrant la recirculation du scCO₂

La problématique de la perte de charge se pose alors afin de pouvoir conserver un CO₂ supercritique à pression constante dans l'installation (maintien de la température dans tout le circuit grâce à la présence d'une double enveloppe et d'un four), sans risque de désamorçage de la pompe de recirculation haute pression. Notre lit fixe est en effet constitué de billes de méthacrylate réticulées macroporeuses, parfaitement sphériques et de diamètre variable allant de 100 μm à 1000 μm avec une moyenne à 500 μm environ, comme indiqué dans le Tableau XXVIII et confirmé par une mesure de granulométrie effectuée au LRGP par granulométrie laser. La distribution de taille résultante de cette mesure est visible sur la Figure 99.

Tableau XXVIII. Distribution de tailles et porosités des billes de Novozyme 435 (Haigh, et al. 2013) - ^a d_{x0} est le diamètre correspondant au % du volume x0 sur la courbe de distribution de taille des particules.

	Immobilized Enzyme Novozyme 435
Nature of Catalyst	<i>Candida Antarctica</i> lipase B (CALB) immobilised on acrylic resin
Physical appearance	White spherical beads
Particle size distribution ^a	
d ₁₀ (μm)	252
d ₅₀ (μm)	472
d ₉₀ (μm)	687
BET surface area(m ² /g)	81.6
Total Pore Volume (cm ³ /g)	0.45
Average pore diameter (nm)	17.7
True Density (g/cm ³)	1.19
Porosity (-)	0.349

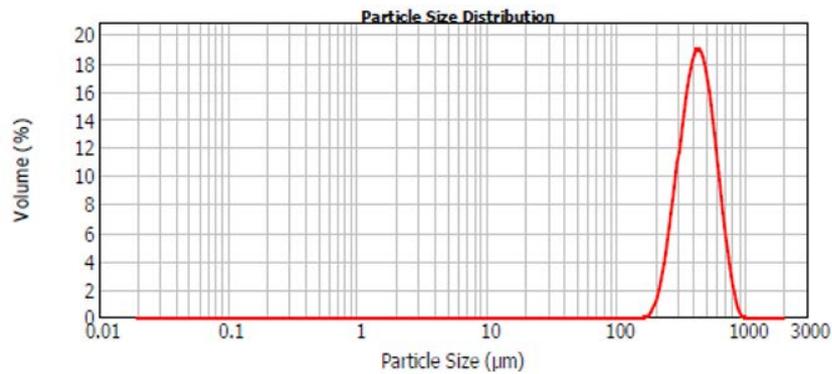


Figure 99. Distribution de tailles des billes de Novozyme 435 mesurée par granulométrie laser (DLS) au LRGP.

D'ordinaire, le volume mort d'un réacteur à lit fixe constitué de particules de diamètre fixe et non poreuses est considéré comme correspondant à 36 % du volume interne total du réacteur. L'équation d'Ergun, qui est une combinaison des équations de Kozeny-Carman (contribution laminaire au flux) et de Burke-plummer (contribution turbulente au flux) est tout à fait adaptée à la prévision des pertes de charges ou pression de sortie du lit fixe. Cette équation fût auparavant détaillée au cours de la partie « Modélisation hydrodynamique du réacteur à lit fixe » (Partie II - Chapitre 3.2).

Prévoir les pertes de charges d'un fluide au sein d'un lit fixe constitué de particules de diamètre hétérogène et qui de plus sont poreuses, est extrêmement difficile. En effet, dans ce cas, les petites sphères se positionnent entre les grosses sphères conduisant à une porosité inter-sphères pouvant être significativement moindre que 0,36 comme le montre la Figure 100. Cette dernière représente la porosité inter-billes d'un mélange de deux populations de billes de diamètres différents (les grandes et les petites) selon leur fraction volumique dans le mélange.

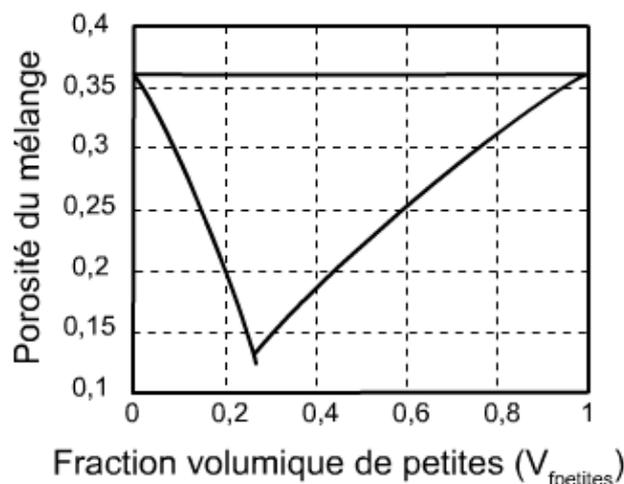


Figure 100. Porosité des mélanges binaires en fonction de la composition du mélange (École des Mines d'Albi-Carmaux 2007).

Nous constatons ici que la porosité (espace inter-billes) ε du mélange peut atteindre 0,13 au lieu de 0,36 dans le cas d'un ratio volumique de 0,27 de petites et 0,73 de grandes. L'équation permettant de prévoir la porosité inter-billes ε du mélange binaire est donnée par :

$$\varepsilon_{\text{mélange}} = \varepsilon_{\text{grosses}} - \frac{(1 - \varepsilon_{\text{grosses}}) \times V_{f_{\text{petites}}}}{1 - V_{f_{\text{petites}}}}$$

Cependant, la prévision de la porosité dans un mélange de billes constituées de très nombreux diamètres différents devient encore plus compliquée. Aussi, dans cette étude, et par pragmatisme, nous nous sommes restreints à l'étude de la perte de charge sur la base de l'équation d'Ergun, en considérant des particules parfaitement sphériques et de diamètre constant égal au diamètre moyen de nos particules soit 500 μm . D'autre part, nous avons étudié le cas des diamètres nettement inférieurs (300 μm) voire égaux aux plus petits diamètres mesurés (100 μm) afin de nous placer dans des conditions bien plus défavorables permettant de nous approcher de ce qui serait à priori obtenu avec la distribution de diamètres effectivement observée expérimentalement.

Notre réacteur d'étude des prévisions des pertes de charge est un réacteur à lit fixe de 32,5 cm de long et 0,46 cm de large récemment conçu dans le cadre du projet d'installation avec recirculation. Le scCO_2 considéré est un CO_2 à 55°C et 200 bars (donnant une densité de 0,755) très souvent utilisé en biocatalyse lipasique et donc très classique. Il faut également rappeler ici que, quelle que soit la densité du CO_2 supercritique, sa viscosité reste toujours très faible et comparable à celle d'un gaz.

Les Tableau XXIX à Tableau XXXII ci-dessous reprennent les calculs effectués afin d'estimer la perte de charge au sein du réacteur à lit fixe dans le cas de sphères non poreuses et compactées de diamètre homogène.

Tableau XXIX. Caractéristiques du réacteur pour l'estimation de la perte de charge.

Caractéristique du réacteur	Valeur	Unité
Diamètre interne	1,50	cm
Longueur	32,50	cm
Volume du réacteur	57,43	cm ³
Fraction poreuse	0,36	-
Volume poreux du lit	20,68	cm ³

Tableau XXX. Caractéristiques du lit fixe pour l'estimation de la perte de charge.

Caractéristique du lit fixe	Valeur	Unité
Fraction poreuse	0,36	-
Diamètre de particule	0,03	cm
Diamètre interne	1,5	cm
Longueur	3,06	cm
Température	55	°C
Constante des gaz parfaits	8,314	m ³ .Pa/(mol.K)
Surface spécifique (Ac)	0,000176714	m ²

Tableau XXXI. Caractéristiques de l'alimentation en scCO₂ pour l'estimation de la perte de charge.

Alimentation en scCO ₂	Valeur	Unité
Pression	200	bar
Température	55	°C
Densité du scCO ₂	755,1	kg/m ³
Masse molaire	44	g/mol
Débit volumique	800	mL/min
Débit massique	0,010	kg/s
Débit molaire	0,23	mol/s
Viscosité du scCO ₂	6,43.10 ⁻⁵	kg/(m.s)

Tableau XXXII. Calcul de la perte de charge par l'équation d'Ergun.

Calcul par l'équation d'Ergun	Valeur	Unité
P*(dP/dz)	-1,94.10 ¹³	Pa ² /m
P*(dP/dz)	-1992,80	bar/m
p ²	39878,18	bar
P	199,70	bar
Perte de charge	0,305	bar

En faisant varier le diamètre des billes de 500 µm à 300 µm ou même 100 µm en mono-diamètre et en considérant une pression d'entrée de 200 bar pour un CO₂ supercritique à 55°C, nous avons pu obtenir les pressions prévues en sortie de réacteur pour différents débits volumiques cible en entrée (Tableau XXXIII).

Tableau XXXIII. Pressions de sortie, P, calculées par l'équation d'Ergun pour différents débits d'entrée d'un CO₂ supercritique à P₀=200 bars et 55°C au sein d'un réacteur de 32.5 cm de long et 0.46 cm de diamètre interne en considérant des particules sphériques de diamètre unique 500 µm, 300 µm ou 100µm.

Particules de 500 µm de diamètre		Particules de 300 µm de diamètre		Particules de 100 µm de diamètre	
Débit volumique (mL/min)	Pression (bar)	Débit volumique (mL/min)	Pression (bar)	Débit volumique (mL/min)	Pression (bar)
3	199.99	3	199.97	3	199.78
10	199.94	10	199.87	10	199.19
50	199.15	50	198.44	50	193.01
100	196.86	100	194.44	100	177.92
200	187.71	200	178.39	200	109.24
300	171.57	300	148.47	242	16.05
400	146.69	400	92.03		
500	104.95	451	9.38		
550	70.62				
588	5.06				

Ces pressions en sortie diminuent bien sûr avec le débit d'entrée car plus le débit d'entrée est fort et plus le caractère turbulent du flux devient conséquent, même si le CO₂ supercritique est très peu visqueux. La

Figure 101 permet de mieux visualiser l'impact des débits et des diamètres sur les pressions de sortie (et donc sur les pertes de charge).

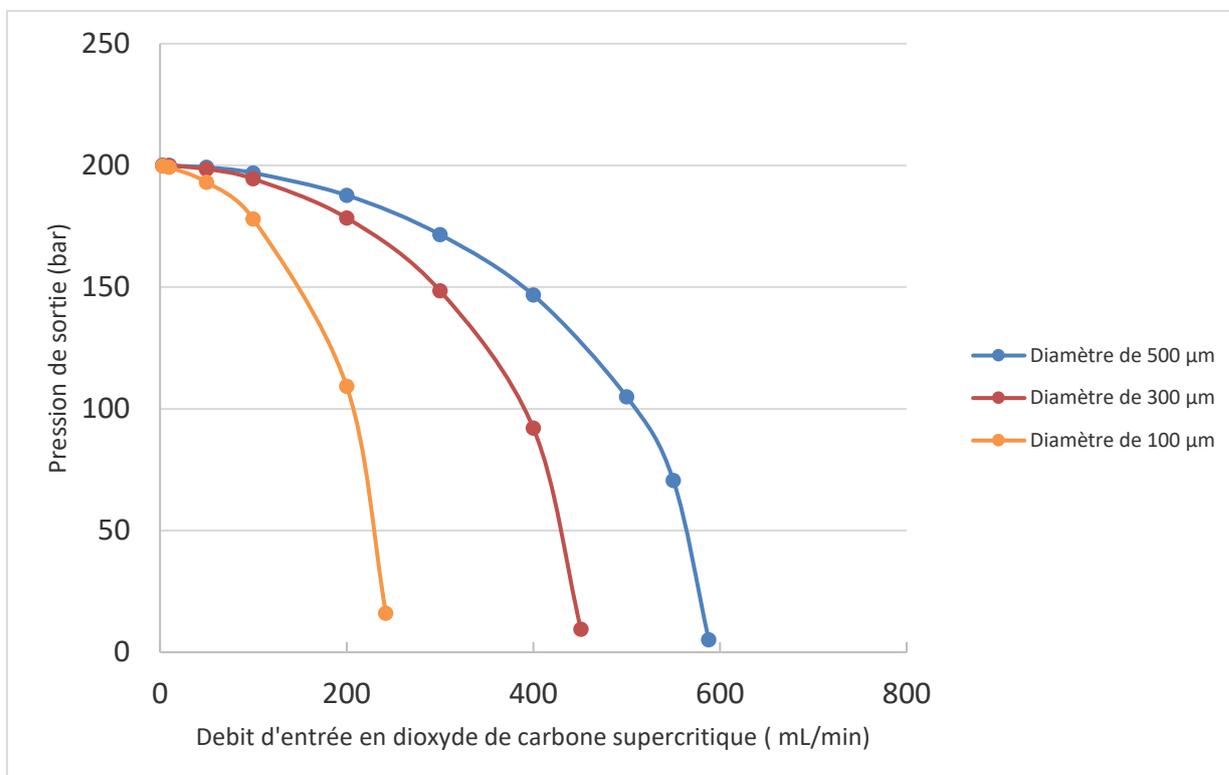


Figure 101. Représentation graphique des pressions de sorties, P, calculées par l'équation d'Ergun pour différents débits d'entrée d'un CO₂ supercritique à P₀=200 bars et 55°C au sein d'un réacteur de 32,5 cm de long et 0,46 cm de diamètre interne en considérant des particules sphériques et non poreuses de diamètre unique 500 µm, 300 µm ou 100 µm.

Ces résultats montrent que, pour notre réacteur, l'usage d'une pompe de recirculation centrifuge haute pression permettant d'assurer des débits de plus de 100 mL/min ne serait pas approprié puisque les pertes de charges deviennent alors significatives s'accompagnant de risques de désamorçage et de non-respect des débits de consigne élevés. Ceci est particulièrement vrai avec le scénario très pessimiste d'une population mono diamètre de 100 µm de diamètre.

Les pompes haute pression centrifuge, rares sur le marché pour de petites installations, sont proposées pour des débits variant entre 10 et 100 mL/min. Dans la perspective de la construction d'une installation expérimentale avec recirculation, il apparaît donc judicieux de jouer sur les dimensions du réacteur à lit fixe de telle sorte que les pertes de charges soient négligeables entre 0 et 100 mL/min plutôt que de faire développer une pompe centrifuge pouvant assurer des variations fines de débit entre 0 et 50 mL/min par exemple (solution beaucoup plus coûteuse).

Nous nous sommes donc posé la question de savoir dans quelles mesures, à volume de réacteur constant équivalent à celui de notre réacteur actuellement utilisé (0,46 cm * 32,5 cm), il serait possible de réduire les pertes de charges en utilisant différents couples longueur-diamètre interne.

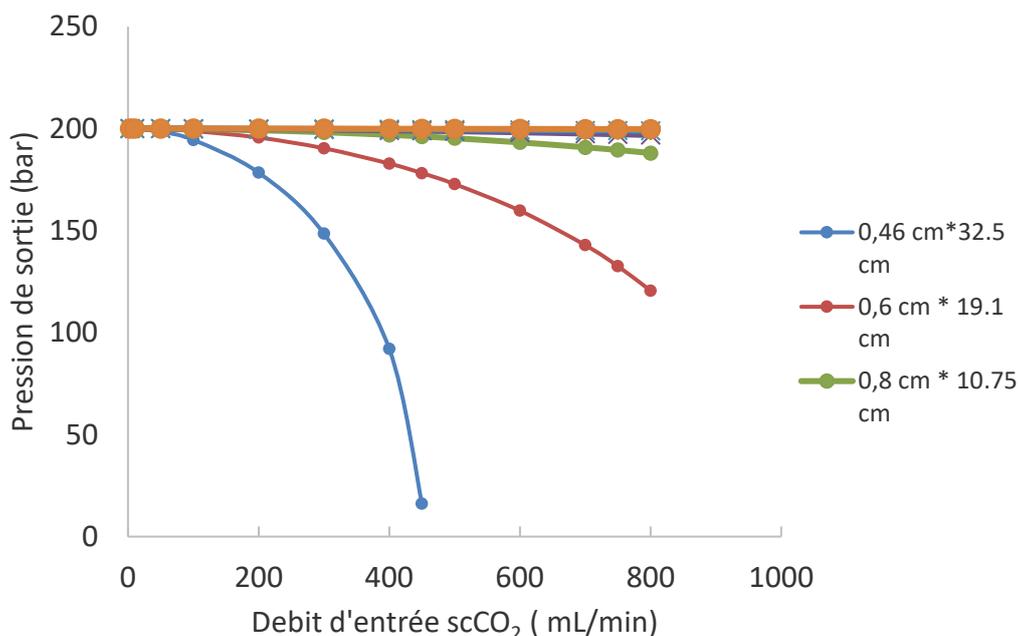


Figure 102. Evolution de la pression de sortie P du CO_2 supercritique à 55°C et pression d'entrée $P_0=200$ bar en fonction du débit volumique dans des réacteurs tubulaires à lit fixe de volume constant $5,4\text{cm}^3$ remplis par des particules sphériques non poreuses de $300\ \mu\text{m}$ de diamètre.

La Figure 102 synthétise les résultats obtenus et montre qu'il sera à priori aisé, en jouant un peu sur les dimensions du réacteur (à volume constant), de réduire les pertes de charges au sein du lit fixe et donc de pouvoir nous adapter aux performances de la pompe de recirculation (10 à 100 mL/min).

En conclusion, cette étude complémentaire sur les pertes de charges du scCO_2 en sortie de réacteur montre que :

- Des débits élevés, bien supérieurs à 100 mL /min de scCO_2 , peuvent être à priori envisagés dans un lit fixe déjà assez conséquent de l'ordre de $5,4\ \text{cm}^3$
- Il est possible d'adapter facilement les dimensions d'un réacteur à lit fixe à la pompe de recirculation plutôt que l'inverse.

Cependant, il est important de rappeler que cette étude ne tient pas compte de la porosité des billes et ne prend que partiellement en compte l'hétérogénéité des diamètres réels en considérant une population monodiamètre très inférieure au diamètre moyen réel des particules. L'ensemble de ces informations sont importantes dans la perspective d'une intensification de procédé d'acylation d'acide aminé de type batch avec recirculation en présence de faible quantité de co-solvant.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Dans une société où la pression écologique se fait de plus en plus forte, les industriels se doivent de proposer des méthodes permettant de diminuer l'impact environnemental de leurs procédés de synthèse. L'avènement des bio-tensioactifs en est un exemple concret et permet aux industries chimiques, pharmaceutiques et cosmétiques de disposer de nouvelles voies de synthèse répondant à ces exigences.

La mise en œuvre de procédés utilisant des enzymes comme biocatalyseurs commence à se développer en dépit des contraintes relatives à ce type de bioprocédé contrairement à la catalyse par voie chimique. Nous avons pu constater au cours de ce travail que ces biocatalyseurs requièrent des conditions de réaction particulières et s'avèrent tout de même sensibles aux contraintes de leur environnement. En effet, l'activité et la stabilité enzymatique sont régies par la pression, la température et la quantité de substrat utilisée au cours de la réaction. De la même manière, l'utilisation du dioxyde de carbone comme solvant majoritaire de réaction présente de nombreux avantages écologiques et économiques permettant ainsi aux procédés de devenir plus performants et durables. Dans le but de rendre ce procédé encore plus économique, il serait envisageable de placer une boucle de recyclage de $scCO_2$ au sein de cette installation afin de ne pas rejeter du dioxyde de carbone dans l'atmosphère.

Ce travail constitue une première approche de l'étude d'un procédé en mini-réacteur à lit fixe, adapté à la biocatalyse en dioxyde de carbone supercritique pour l'acylation de lysine à l'aide d'acide caprylique. L'étude s'efforce de comprendre et d'expliquer l'influence de divers paramètres du procédé sur la faisabilité de l'acylation en présence de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur des billes de silice.

L'ensemble de ce travail a permis dans un premier temps de démontrer que la réaction d'acylation pouvait avoir lieu au sein d'un réacteur continu en phase supercritique. Cette preuve de concept totalement inédite nous permet ainsi d'ouvrir des perspectives sur de futures applications possibles. En effet, travailler en réacteur continu présente de nombreux avantages et permet de mieux contrôler les paramètres réactionnels. La multiplication des expériences ont par la suite permis de mieux appréhender l'effet de ces paramètres dans le but de comprendre toute la complexité de ce type de réaction en solvant supercritique.

Nous pouvons ainsi tirer des conclusions quant aux conditions de réaction optimales d'acylation en présence de dioxyde de carbone supercritique. En effet, il semble que la densité du $scCO_2$ soit un des paramètres clé permettant à la réaction de se dérouler dans des conditions optimales. Il conviendrait de réaliser des études de stabilité de notre enzyme afin d'être en mesure de déterminer le couple pression/température optimal qui permettrait d'une part à l'enzyme d'être active et d'autre part au dioxyde de carbone de présenter une solubilité accrue. Le second paramètre critique ayant trait au dioxyde de carbone réside dans le débit appliqué dans le système. En effet, il apparaît qu'un débit trop faible induisant un long temps de passage dans le réacteur soit au final plus néfaste qu'un temps de passage plus court. Lors de l'application de faibles débits, il s'avère que la formation de produits secondaires comme les carbamates est majoritaire. Le fait d'être en mesure de quantifier (par chromatographie liquide haute performance) nos produits de réaction (qu'ils soient désirés ou non) nous permettrait de mieux comprendre ce

phénomène pour ainsi déterminer un temps de passage optimal. Enfin, les quantités de réactifs introduites sont également à investiguer afin de déterminer un ratio molaire entre le donneur et le receveur d'acyle adapté qui permettrait optimisant ainsi le rendement de la réaction. Il est alors possible de proposer des axes d'amélioration quant au traitement de ces deux problèmes majoritaires que sont le débit délivré par les pompes et la formation de carbamates.

Le premier problème que nous avons rencontré concernait la formation de carbamate par interaction entre la lysine et le dioxyde de carbone. Cette constatation s'est fait très tôt dans l'établissement de ces recherches et il nous a fallu en comprendre les raisons afin d'essayer de limiter cette réaction parasite. En analysant les résultats de plus près, il apparaît que cette formation de carbamates intervient lorsque notre milieu réactionnel contient de l'eau liquide non dissoute dans le scCO₂. Cette constatation qui est directement corrélée à la stagnation d'eau dans le système, nous permet d'envisager deux axes d'optimisation. Dans un premier temps, il serait judicieux de procéder à une purge complète du système en fin de réaction afin de s'assurer que plus aucune trace d'eau liquide ne se trouve dans les tuyauteries. Dans un second temps, il serait intéressant d'essayer d'améliorer la solubilité de l'eau dans le scCO₂ en augmentant la température de réaction. En effet, en passant à une température de 55°C (et en appliquant une pression de 200 bar afin de conserver un dioxyde de carbone suffisamment dense), il apparaît que l'eau introduite dans le système se retrouverait partiellement vaporisée et pourrait ainsi mieux se solubiliser dans le scCO₂. Il faudra cependant s'assurer que l'enzyme immobilisée puisse être active à cette température.

Le deuxième point qui nous a posé problème lors de la mise en œuvre de ce travail concerne le débit délivré par les pompes. En effet, nous avons constaté tout au long des expériences que ces dernières n'étaient pas en mesure de fournir le débit demandé. Cependant, après avoir compris que de l'eau stagnait dans le système, il paraît important de rediscuter de la robustesse des pompes à réactifs. En effet, il s'est avéré que l'acide caprylique ne se retrouvait jamais stagnant dans le système puisque le scCO₂ parvenait à le solubiliser totalement. En revanche, nous retrouvons systématiquement une quantité non négligeable d'eau dans le système lors de la réalisation d'une purge. Ainsi, les pompes seraient capables d'assurer un débit proche du débit de consigne même si ce dernier ne sera pas totalement délivré. Il serait intéressant de changer la technologie de pompage en utilisant des pompes à seringues qui s'avèrent plus précises.

Enfin, l'équipe du laboratoire a commandé des échantillons de lysine mono- et di-acylée dans le but de réaliser des quantifications ce qui permettra par la suite le calcul de rendement de réaction pour réellement opérer une intensification du procédé.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer la faisabilité de la réaction d'acylation de la lysine par l'acide caprylique en présence de lipase B de *Candida antarctica* dans un mini-réacteur continu à dioxyde de carbone supercritique. Les technologies en réacteur continu et en phase supercritique peuvent ainsi s'inscrire parmi les voies de recherche possibles dans le but de synthétiser des produits par voie biologique tout en limitant les impacts écologiques.

BIBLIOGRAPHIE

Aloulou Ahmed, Rodriguez Jorge A, Fernandez Sylvie, Van Oosterhout Dirk, Puccinelli Delphine, et Carrière Frédéric. «Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies.» *Biochimica et Biochimica Acta*, 2006: 1761: 995-1013.

Arpino Patrick. «Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse III.» *Techniques de l'ingénieur*, 2009: 1492: 1-24.

Balcao Victor, Paiva Ana, et Malcata François Xavier. «Bioreactors with immobilized lipases: State of the art.» *Enzyme and Microbial Technology*, 1996: 18: 392-416.

Barros M, Fleuri L.F, et Macedo A. «Seed lipases: sources, applications and properties - A review.» *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2010: 27: 15-29.

Baud Stéphanie, Belloy Nicolas, et Dauchez Manuel. «Etude In Silico d'ELPs : mise en évidence de la relation structure/activation de l'EBP.» *Slide Player*. 25/06/2009. <http://slideplayer.fr/slide/517524/> (accès le 12/03/2015).

Benaissi Karima. «Le CO₂ supercritique appliqué à l'extraction végétale.» *Techniques de l'ingénieur*, 2013: 4015-4031.

Berg Jeremy, Tymoczko John, et Stryer Lubert. *Biochemistry*. Houndmills : Freeman, & Co LTD, 2012.

Blecker, Christophe, et al. «Les lipases immobilisées et leurs application.» *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2008: 12: 57-68.

Borredon Marie-Elisabeth, et Mouloungui Zephirin. «Chimie pour le développement durable - Les biotensioactifs.» INRS, Présenté le 02/10/2006.

Bottom Corey, Samir Hanna, et Siehr Donald. «Mechanism of the ninhydrin reaction.» *Biochemical education*, 1978: 6: 4-5.

Bouchoux Guy, et Sablier Michel. «Spectromètre de masse - Principe et appareillage.» *Techniques de l'ingénieur*, 2005: 2645: 1-32.

Boutonnier Jean-Luc. «Matière grasse laitière - Composition, organisation et propriétés.» *Technique de l'ingénieur*, 2006: F6320 : 1-15.

Brown Eric, et Biellmann Jean-François. «Catalyse enzymatique.» *Techniques de l'ingénieur*, 1992: 240 : 1-11.

Budisa Nediljko, et Schulze-Makuch Dirk. «Supercritical Carbon Dioxide and Its Potential as a Life-Sustaining Solvent in a Planetary Environment.» *Life*, 2014: 4 : 331-340.

Cabrera-Padilla, Rebeca Y., et al. «Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support.» *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* , 2012: 39 : 289-298.

CBDM.T. «The enzyme market survey-executive summary.» CBDM.T. 10/07/2008. <http://cbdmt.com/fr/index.php/publication> (accès le 11/05/2015).

Chaplin MF., et Bucke C. *Enzyme Technology*. Cambridge : Cambridge University Press, 1990.

Chatterjea NN. « *Textbook of Biochemistry for Dental / Nursing / Pharmacy Students* ». 2nd Edition. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2004.

Chulalaksananukul Warawut, Condoret Jean-Stéphane, et Combes Didier. «Geranyl acetate synthesis by lipase catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide.» *Enzyme Microbial Technology*, 1993: 15: 691-698.

Combes Didier, et Monsan Pierre. «Biocatalyse ou catalyse enzymatique.» *Techniques de l'ingénieur*, 11 2009: Bio590:1-18.

Cornish-Bowden Athel. «History of Enzyme Chemistry.» Marseille : eLS, 2011.

Cygler Mirosław, et al. «A structural basis for the chiral preferences of lipases.» *Journal of the American Chemical Society*, 1994: 116: 3180-3186.

Datta Sumitra, Christena Rene, et Yamuna Rani Sriramulu Rajaram. «Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials.» *Biotech*, 2013: 3: 1-9.

Declerck Nathalie, Machius Mischa, Joyet Philippe, Wiegand Georg, Huber Robert, et Gaillardin Claude. «Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase and modulation of its stability over 50°C temperature range.» *Protein Engineering*, 2003: 4: 287-293.

Denčić Ivana, De Vaan Simone, Noël Timothy, Meuldijk Jan, De Croon Mart, et Hessel Volker. «Lipase-Based Biocatalytic Flow Process in a Packed-Bed Microreactor.» *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013:52: 10951 - 10960.

Destain Jacqueline, Thonart Philippe, et Fickers Patrick. «Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications.» *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2008 : 12 : 119-130.

Dijkstra Z, Merchant R, et Keurentjes J.T.F. «Stability and activity of enzyme aggregates of Calb in supercritical CO₂.» *Journal of Supercritical Fluids*, 2007: 41: 102-108.

Dijkstra Z, Weyten H, Willems L, et Keurentjes J.T.F. «The effect of water concentration on the activity and stability of CLECs in supercritical CO₂ in continuous operation.» *Journal of Molecular Catalysis*, 2006: 39: 112-116.

École des Mines d'Albi-Carmaux, R.A.P.S.O.D.E.E., UMR CNRS 2392. Science et technologie des poudres. 21/10/2007. http://nte.mines-albi.fr/STP/co/C3_Contentu_03-02c.html (accès le 16/05/2016).

Eijkmann Christiaan. «Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen.» *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Unfektionskrankheiten*, 1901: 29: 841-848.

Eisenmenger Michael, et Reyes-De-Corcuera José. «High hydrostatic pressure increased stability and activity of immobilized lipase in hexane.» *Enzyme and Microbial Technology*, 2009: 45: 118-125.

Foucaut Jean-François, Zahraa Orfan, Fouret René, Bouchy Michel, et Scacchi Gérard. *Cinétique et catalyse*. Nancy: Tec & Doc Lavoisier, 2011.

Fox Richard, et Huisman Gjalte. «Enzyme optimization: moving from blind evolution to statistical exploration of sequence-function space.» *Trends in Biotechnology*, 2008: 26: 132-138.

Gardossi Lucia, Bianchi Daniele, et Klibanov Alexander. «Selective acylation of peptides catalyzed by lipases in organic solvents.» *Journal of the American Chemical Society*, 1991: 16: 6328–6329.

Gedey Szilvia, Liljeblad Arto, Lázár László, Fülöp Ferenc, et Kanerva Liisa. «Structural effects on chemo- and enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B - Resolution of b-amino esters.» *Canadian Journal of Chemistry*, 2002: 80: 565-570.

Gill Iqbal, Das Jagbandhu, et Patel Ramesh. «Enantioselective enzymatic acylation of 1-(30-bromophenyl)ethylamine.» *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007: 18: 1330-1337.

Gill Iqbal, et Ballesteros Antonio. «Bioencapsulation within synthetic polymers (Part1): sol–gel encapsulated biologicals.» *Tibtech*, 2000: 18: 282-296.

Girbés Tomas, Ferreras José Miguel, Arias Francisco Javier, et Stirpe Fiorenzo. «Description, Distribution, Activity and Phylogenetic Relationship of Ribosome-Inactivating Proteins in Plants, Fungi and Bacteria.» *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004: 4: 467-482.

Guiavarc'h, Yann, Segovia Olga, Hendrickx Marc, et Van Loey Ann. «Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of a pectin methylesterase from white grapefruit (*Citrus paradisi*).» *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2005: 6: 363-371.

Habulin Maja, et Knez Zeljko. «Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane.» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2001: 76: 1260-1266.

Haigh Kathleen, Abidin Sumaiya, Vladislavjevic Goran, et Saha Dasudeb. «Comparison of Novozyme 435 and Purolite D5081 as heterogeneous catalysts for the pretreatment of used cooking oil for biodiesel production.» *Fuel*, 2013: 111: 186-193.

Hammond D, Karel M, Klibanov M, et Krukonis V.J. «Enzymatic Reactions in Supercritical Gases.» *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1985: 11: 393-400.

Hasan Fariha, Ali Shah Aamer, et Hameed Abdul. «Industrial applications of microbial lipases.» *Enzyme and microbial technology*, 2006: 39: 235-251.

Hlavsova Klara, Wimmer Zdenek, Xanthakis Epameinondas, Bernasek Prokop, Sovova Helena, et Zarevucka Marie. «Lipase activity enhancement by SC-CO₂ treatment.» *Zeitschrift Fuer Naturforschung*, 2008: 63: 779-784.

Hobbs Helen, et Thomas Neil. «Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and under Solvent-Free Conditions.» *American Chemical Society*, 2007: 107: 2786-2820.

Horton Robert, Moran Laurence, Ochs R, Rawn J, et Scrimgeour H. *Principes de la Biochimie*. De Boeck Services, 1994.

Innovation Fluides Supercritiques. Le portail des fluides supercritiques. 06/2006. <http://www.portail-fluides-supercritiques.com> (accès le 07/02/2015).

Ivanov Alexander, et Schneider Manfred. «Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis.» *Journal of Molecular Catalysis*, 1997: 3: 303-309.

Kim Mahn-Joo, Choi Min Young, Lee Jae Kwan, et Ahn Yangsoo. «Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhances reactivity and regioselectivity.» *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2003: 26: 115-118.

Knez Zeljko. «Enzymatic reactions in dense gases.» *The Journal of Supercritical Fluids*, 2009: 47: 357-372.

Kuchner Olga, et Frances Arnold «Directed evolution of enzyme catalysts.» *Trends in Biotechnology*, 1997: 12: 523-530.

Le Bail Dider. «Les Enzymes - Arrêtons de les maltraiter et de les gaspiller : elles sont l'énergie de la vie.» *BS*, 12/2011: 20-22.

Le Joubioux Florian. «Etude de l'acylation sélective de composés multifonctionnels par voie enzymatique : Application à la synthèse de pseudo-céramides.» Thèse d'Université, La Rochelle, 2013.

Liao Hans, McKenzie Tim, et Hageman Robert. «Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986: 3: 576-580.

Majerle Andreja, Kidric Jurka, et Jerala Roman. «Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain.» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003: 5: 1159-1165.

Marie-Claire Vanessa, et al. «Regioselectivity of peptides acylation by *Candida antarctica* lipase B (CAL B) in supercritical carbon dioxide.» Marseille, 18-21 05/2014.

Mase Nobuyuki, Sako Takeshi, Horikawa Yoshiteru, et Takabe Kunihiko. «Novel strategic lipase-catalyzed asymmetrization of 1,3-propanediacetate in supercritical carbon dioxide.» *Tetrahedron Letters*, 2003: 44: 5175–5178.

Mazur Maciej, Krywko-Cendrowska Agata, Krysinski Paweł, et Rogalski Jerzy. «Encapsulation of laccase in a conducting polymer matrix: A simple route.» *Synthetic Metals*, 2009: 159: 1731-1738.

Michaelis Leonor, et Menten Maud. «The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper» *Biochemistry*, 2011: 39: 333-369.

Montanes Fernando, Fornari Tiziana, Stateva Roumiana, Olano Agustín, et Ibáñez Elena. «Solubility of carbohydrates in supercritical carbon dioxide with (ethanol + water) cosolvent.» *Journal of supercritical fluids*, 2009: 49: 16-22.

Morlon-Guyot Juliette, Helmy Mohamed, Lombard-Frasca Sophie, Pignol David, Piéron Gérard, et Beaumelle Bruno. «Identification of the Ricin Lipase Site and Implication in Cytotoxicity.» *The Journal of Biological Chemistry*, 2003: 19: 17006-17011.

Moussard Christian. *Biochimie structurale et métabolique*. Bruxelles : De Boeck, 2006.

Mtibaa Hounaida, Fendri Ahmed, Sayari Adel, Ben Salah Abderraouf, Mejdoub Hafedh, et Gargouri Youssef. «La lipase de *Candida rugosa* : caractérisation biochimique.» *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, 2002: 9: 43-47.

Nelson David et Cox Michael. *Principles of Biochemistry*. 5th Edition. New York: W.H. Freeman and Compagny, 2008.

Overmeyer André, Schrader-Lippelt Sandra, Kasche Volker, et Brunner Gerd. «Lipase catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40°C to 160°C in supercritical CO₂.» *Biotechnology Letters*, 1999: 21: 65-69.

Pâques Wiermann Fernanda, et Alves Macedo Gabriela. «Lipases de látex végétaux: propriétés et applications industrielles.» *Química Nova*, 2006: 29: 93-99.

Penchev Petko Ivanov. «Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions.» Thèse d'université, Université de Toulouse, Soutenue publiquement le 10/07/2010.

Perrin Jean-François. *Biotechnologies et Bioanalyses*. 01/2012. <http://www.perrin33.com> (accès le 30/06/2015).

Perrut Michel. «Extraction par fluide supercritique.» *Techniques de l'ingénieur*, 1999: 771 - 782.

Pilarek Maciej, et Szewczyk Krzysztof «Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases.» *Journal of Biotechnology*, 2007: 127: 736-744.

Poyot T, Nachon F, Rochu D, Fournier D, et Masson P. «Optimiser les enzymes, mutagenèse et évolution dirigées.» *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2007:65: 119-125.

Rezaei K, Temelli F, et Jenab E. «Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids.» *Biotechnology Advances*, 2007: 25: 272-280.

Rode Sabine. *Contacteurs et opérations unitaires polyphasiques*. Nancy, 2015.

Roodveldt Cintia, Aharoni Amir, et Tawfik Dan S. «Directed evolution of proteins for heterologous expression.» *Current Opinion in Structural Biology*, 2005: 15: 50-56.

Schmid A, Dordick J.S, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, et Witholt B. «Industrial biocatalysis today and tomorrow.» *Nature*, 2001: 409: 258-268.

Schmid Andreas, Hollmann Frank, Byung Park Jin, et Bühler Bruno. «The use of enzymes in the chemical industry in Europe.» *Current opinion in Biotechnology*, 2002: 13: 359-366.

Simon Jean-Luc. «Lysine.» *Techniques de l'ingénieur*, 1995: J6390.1 - J6390.7.

Sparks Darrell, Estévez Antonio, Hernandez Rafael, McEwen Jason, et French Todd. «Solubility of Small-Chain Carboxylic Acids in Supercritical Carbon Dioxide.» *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2010: 55: 4922 – 4927.

Spinnler Eric. «Enzymes d'intérêt pour la fabrication d'aliments.» *Technique de l'ingénieur*, 2013: 650-1 - 650-17.

Stemmer WP. «Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling.» *Nature*, 1994: 370: 389-391.

Stryjek R, et Vera J.H. «PRSV: An Improved Peng- Robinson Equation of State for Pure Compounds and Mixtures.» *The Canadian Journal of Chemical Engineering* , 1986: 67: 323 - 333.

Suen Wen-Chen, Zhang Ningyan, Xiao Li, Madison Vincent, et Zaks Aleksey. «Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling.» *Protein Engineering, Design & Selection*, 2004: 17: 133-140.

Suzuki Keizo, et Kitamura Kiyoshi. «Inactivation of Enzyme under High Pressure.» *The Journal of Biochemistry*, 1963: 13: 214-219.

Technische Universität Braunschweig. BRENDA : The Comprehensive Enzyme Information System. 1987. <http://www.brenda-enzymes.org/> (accès le 14/10/2015).

Uppenberg Jonas, Patkar Shamkant, Bergfors Terese, et Jones Alwyn. «Crystallization and preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*.» *Journal of Molecular Biology*, 1994: 235: 790-792.

Verger Robert, et De Haas Gérard. «Interfacial Enzyme Kinetics of Lipolysis.» *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1976:5: 77-117.

Voet Donald, et Voet Judith. *Biochimie*. Bruxelles: De Boeck, 2004.

Weil Jacques-Henry. *Biochimie générale*. Paris: Dunod, 2001.

Wertz Jean-Luc. «Aperçu sur les biotensioactifs et les biosolvants.» Note de synthèse, ValBiom Gembloux Agro Bio Tech, Bruxelles, 03/10/2012.

Whitehurst Robert, et Van Oort Maarten. *Enzyme in food technology*. Wiley-Blackwell, 2010.

Witt Ken, Gillespie Terrence, Huber Jason, Egleton Richard, et Davis Thomas. «Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability.» *Peptides*, 2001: 22: 2329-2343.

Yadav Ganapati, et Devi Manjula. «Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling.» *Chemical Engineering Science*, 2004: 10: 373-383.

Yamamoto Akira, et al. «Enhanced transdermal delivery of phenylalanyl-glycine by chemical modification with various fatty acids.» *International Journal of Pharmaceutics*, 2003: 250: 119-128.

You L, et Arnold FH. «Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide.» *Protein Engineering*, 1994: 9: 77-83.

Zhang Lei, Jiang Yanjun, Shi Jiafu, Sun Xiaohui, Li Jian, et Jiang Zhongyi. «Biomimetic polymer-inorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation.» *Reactive & Functional Polymers*, 2008: 68: 1507-151.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 1^{er} Septembre 2017

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par : Matthieu BIANCO

**Sujet : ACYLATION ENZYMATIQUE DE LYSINE PAR
LA LIPASE B DE CANDIDA ANTARCTICA EN
SOLVANT CO₂ SUPERCRITIQUE ET EN REACTEUR
A LIT FIXE : ESSAIS PRELIMINAIRES.**

Jury :

Président : M. Michel BOISBRUN, Maître de conférences
 Directeur : M. Yann GUIAVARC'H, Maître de conférences
 Juges : Mme Isabelle CHEVALOT, Professeur des
 universités
 Mme Ariane BOUDIER, Maître de conférences

Vu,

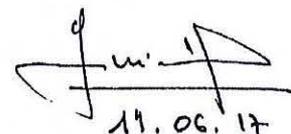
Nancy, le 14 JUN 2017

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

M. MICHEL BOISBRUN

M. YANN GUIAVARC'H

14.06.17

Vu et approuvé,

Nancy, le 6.07.2017

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,



Vu,

Nancy, le 13 JUL 2017

Le Président de l'Université de Lorraine,



N° d'enregistrement : 9922

N° d'identification :

TITRE

ACYLATION ENZYMATIQUE DE LYSINE PAR LA LIPASE B DE CANDIDA ANTARCTICA EN SOLVANT CO₂ SUPERCRITIQUE ET EN REACTEUR A LIT FIXE : ESSAIS PRELIMINAIRES.

Thèse soutenue le 1^{er} Septembre 2017

Par Matthieu Bianco

RESUME :

La synthèse d'acides aminés ou peptides acylés présentant des propriétés biotensioactives utilisables en industrie cosmétique et pharmaceutique est en pleine progression. Cette réaction d'acylation qui consiste à greffer un acide gras sur une fonction amine ou alcool d'une autre molécule s'effectue dans la grande majorité des cas à l'aide de la réaction chimique de Schotten-Bauman. Cette réaction chimique s'avère performante mais présente de multiples limitations économiques et environnementales pour les industriels. On sait depuis les années 90 que les lipases qui sont physiologiquement des hydrolases en milieu aqueux, peuvent effectuer des réactions d'acylation sur de nombreuses molécules dans un solvant non aqueux tel que le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique. Ce solvant possède des propriétés intéressantes pour les industriels de par sa non-inflammabilité, sa non toxicité, son faible coût et sa recyclabilité.

Le premier objectif de cette étude est de développer un procédé en mini-réacteur continu à lit fixe adapté à la biocatalyse en solvant CO₂ supercritique. Cette installation sera dans un second temps utilisée pour effectuer l'acylation de lysine par la lipase B de *Candida antarctica* (CAL B). Une fois cette preuve de concept établie, il conviendra de trouver les paramètres optimaux de la réaction.

Le procédé élaboré au cours de cette étude a permis réaliser l'acylation de lysine par la CAL B en réacteur continu sous CO₂ supercritique. Les technologies en réacteur continu et en phase supercritique peuvent ainsi s'inscrire parmi les voies de recherche possibles dans le but de synthétiser des produits par voie biologique tout en limitant les impacts écologiques. Cependant, il reste encore de nombreux points à éclaircir afin de disposer d'une connaissance plus approfondie de ce procédé avant de pouvoir passer à l'échelle industrielle.

MOTS CLES : Acylation, solvant CO₂ supercritique, réacteur à lit fixe, lipase B de *Candida antarctica*, biocatalyse, biotensioactif, lysine, catalyseur enzymatique

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mr Yann Guiavarc'h	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle