

Les applications industrielles des enzymes

Références générales

- Application des enzymes :
 - *Nature* **2001**, 409, 225-268 (plusieurs articles)
 - *Methods in Enzymology* **2004**, 388, 238-256 (et le reste du volume)
 - *Industrial Biotransformations*, A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey. Wiley-VCH **2000**
- Survol de biosynthèse des protéines :
 - Voet et Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Chapitres 27-31.
 - Elliot et Elliot, *Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Chapitres 20-24.

Quelques chercheurs renommés

Frances Arnold, Caltech
 Romas Kazlauskas, U. Minnesota
 Alexander Klibanov, MIT
 Chi-Huey Wong, Scripps Research Institute
 James Wells, Genentech, Sunesis Pharmaceuticals
 Christopher Walsh, Harvard Medical School
 Chaitan Khosla, Stanford
 Manfred Reetz, Max Plank Institut
 Bernard Witholdt, ETH Zürich
 Groupe à TU Delft (R. Sheldon, A. Straathof, etc.)
 Groupe à Manchester (S. Flitsch, N. Turner, etc.)
 Groupe à Milan (G. Carrea, S. Riva, etc.)

L'utilisation des bioconversions à la production industrielle est souvent appelée biotechnologie blanche ("white biotechnology"). Les bioconversions enzymatiques représentent une partie de la biotechnologie blanche. Elles font aussi partie de ce que l'on appelle la chimie verte.

Les 2 applications commerciales les plus importantes des enzymes sont "peu nobles": lessive (protéases et lipases) et production de sirop de fructose à partir d'amidon de maïs (8.5×10^6 tonnes/an aux USA, amylases et glucose isomérase). Par contre, il existe de plus en plus d'applications en chimie fine.

Le travail de R&D se fait à l'intersection entre la chimie, la biochimie, et le génie chimique.

Avantages des enzymes

- Les enzymes sont des molécules chirales comprenant des groupements fonctionnels variés; donc le site actif peut être chimio-, régio- et stéréosélectif.
- Les taux réactionnels atteints sont souvent 10^{10} fois plus rapide que les réactions non-catalysées (jusqu'à 10^{23} fois plus rapide) et peuvent catalyser jusqu'à 10^5 événements par seconde (par exemple, l'anhydrase carbonique est limitée par la vitesse de diffusion des substrats).

Exemples de nombres de cycles catalytiques par site actif

Catalyseur	réaction	N (s ⁻¹)	T (°C)
Trypsine	hydrolyse de peptides	$3 \cdot 10^{-3}$	0
		10^2	37
anhydrase carbonique	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$	$8 \cdot 10^{-1}$	0
		$6 \cdot 10^5$	37
SiO ₂ -Al ₂ O ₃	craquage du cumène	$3 \cdot 10^{-8}$	25
		$2 \cdot 10^4$	420
V ₂ O ₃	déshydrogénation du cyclohexène	$7 \cdot 10^{-11}$	25
		10^2	350

Désavantages des enzymes

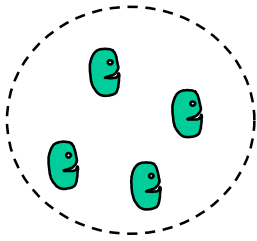
- coûts
- solubilité limitée dans les solvants organiques dans lesquels les substrats/produits sont solubles
- dépendance aux co-facteurs et co-enzymes
- spécificité trop élevée pour une application généralisée et facile
- instabilité (même en conditions réactionnelles relativement douces, par rapport aux conditions de catalyse chimique)
 - dénaturation (température)
 - oxydation de certains résidus (Met, Cys, Trp)
 - hydrolyse (acides, bases, protéases)
 - mauvais repliement (perte d'activité, insolubilité)

Immobilisation

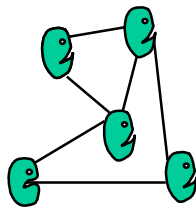
Pourquoi immobiliser des enzymes ?

- Théorique
 - Cellule ≠ solution
- Pratique
 - Récupération et réutilisation
 - Stabilisation
 - Microenvironnement
 - Liaisons avec le support
 - Parfois on purifie peu ou pas l'enzyme

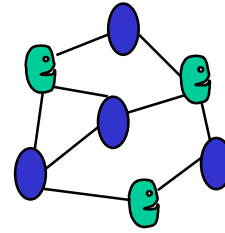
Types d'immobilisation



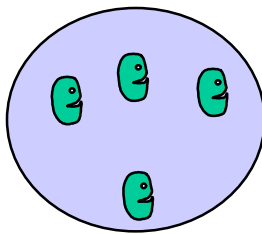
confinement
(e.g. microcapsules)



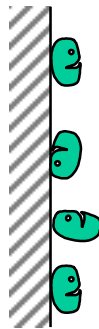
réticulation



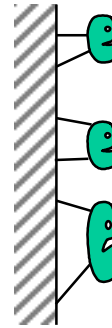
co-réticulation



inclusion



adsorption



liaisons covalentes

Les chimies d'immobilisation covalentes

Des centaines de méthodes d'immobilisation ont été développées

Types de supports

- minéraux (silice, oxydes métalliques)
- organiques
 - naturels (cellulose et ses dérivés)
 - synthétiques (polymères)
- fonctions de surface qu'il faut activer (les fonctions de surface (-OH) des supports ne sont pas assez réactives)

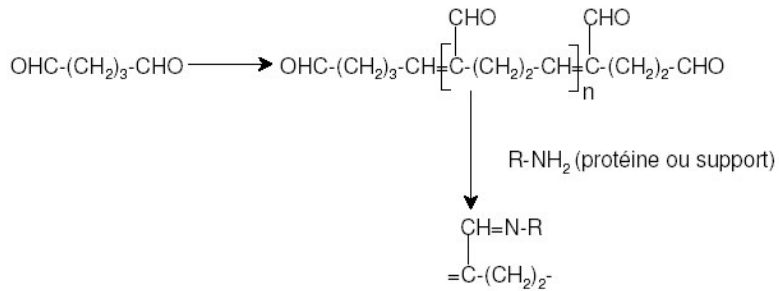
Groupes fonctionnels des protéines

- amines
- carboxylates
- thiols
- sucres des protéines glycosylées

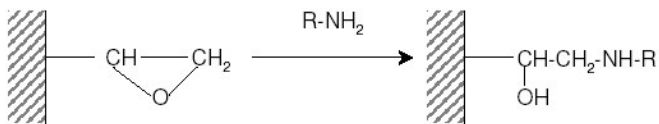
Méthodes les plus courantes :

- Amines N-terminal ou ϵ des lysines avec fonctions aldéhydes (base de Schiff) pour la (co)-réticulation ou la fixations sur divers supports;
- oxyde d'éthylène sur polymère (Amberzyme®).

Glutaraldéhyde

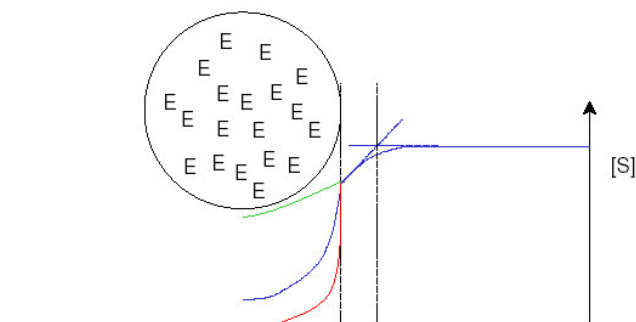
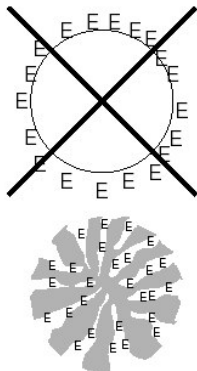


Oxyde d'éthylène (oxyrane)



Influence de l'immobilisation

- Sur l'enzyme
 - Inactivation
 - Déformation
 - Encombrement stérique
- Sur la cinétique apparente (globale)
 - Les substrat(s)/produit(s) doivent diffuser dans la particule



Profil de concentration du substrat dans la particule pour des contraintes diffusionnelles **élevées**, **moyennes**, et **faibles**.

Cas le plus simple : enzyme suivant la relation de Michaelis-Menten

Enzyme native en solution : V_{\max}, K_M

Enzyme immobilisée : V'_{\max}, K'_M paramètres modifiés par l'immobilisation pour lesquels il n'y a pas de mesure directe et facile.

V''_{\max}, K''_M paramètres apparents

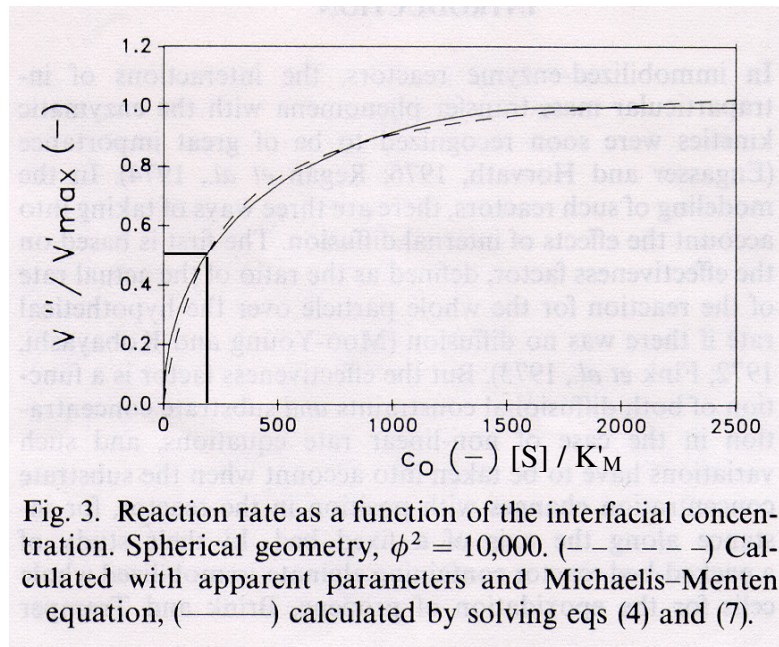
On peut faire des calculs généraux sur le comportement cinétique des enzymes immobilisées.

$$V'' = \frac{1}{Vol} \int_{Vol} \frac{V'_{\max} S}{K'_M + S} dVol = \text{Vitesse moyenne observée par unité de volume de support.}$$

$$D \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dS}{dr} \right) = \frac{V'_{\max} S}{K'_M + S} \quad \text{permet de déterminer le profil de concentration dans la particule.}$$

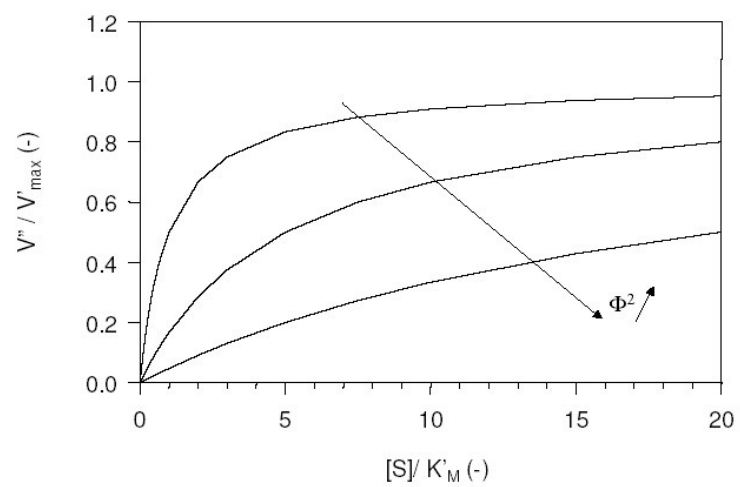
$$\frac{1}{x^2} \frac{d}{dx} \left(x^2 \frac{dc}{dx} \right) = \Phi^2 \frac{c}{1+c} \quad \text{est la forme adimensionnelle qui permet de généraliser les calculs (} x = r/R, c = S/K_M \text{).}$$

$\Phi^2 = \frac{R^2 V'_{\max}}{D K'_M}$ est le module de Thiele qui caractérise les contraintes diffusionnelles en comparant la vitesse de réaction (V'_{\max} / K'_M) la vitesse de diffusion (D / R^2). Si $\Phi^2 > 1$, les contraintes diffusionnelles sont importantes.



Les équations ont été résolues numériquement et le résultat (en trait plein) comparé avec ce que l'équation de Michaelis-Menten utilisant des paramètres apparents donnerait (pointillés).

On voit que lorsque les contraintes diffusionnelles augmentent, le K''_M augmente, tandis que $V''_{\max} \approx V'_{\max}$. Ici, $K''_M \approx 200 K'_M$.

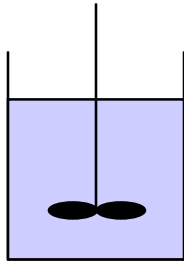


Les réacteurs enzymatiques

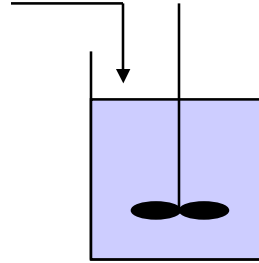
Les réacteurs discontinus ont une productivité plus faible (à cause des interruptions) mais doivent être utilisés lorsque le contrôle de qualité exige un numéro de lot (e.g. industrie pharmaceutique). Les réacteurs continus coûtent plus cher à concevoir et construire mais permettent une plus grande productivité.

Réacteurs discontinus

L'enzyme peut être en solution ou immobilisée.

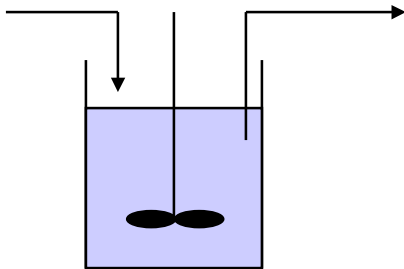


Cuvée (« batch »)



Cuvée alimentée (« fed batch »)

Réacteurs continus



Le CSTR (« continuous stirred tank reactor »)
Le débit d'entrée est égal au débit de sortie et les concentrations sont les mêmes dans le réacteur et la sortie. L'enzyme peut être immobilisée ou en solution.

Performance du CSTR

Pour calculer la concentration à la sortie, donc la conversion dans le réacteur, on pose l'équation :

À l'état stationnaire (système ouvert où rien ne varie avec le temps) :

le substrat qui entre – le substrat qui sort = ce qui est consommé par la réaction

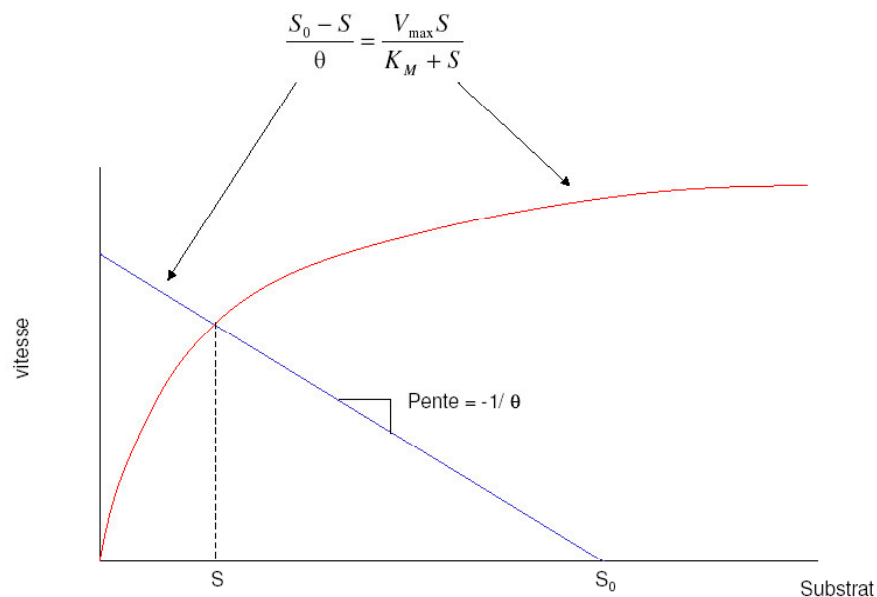
$$DS_0 - DS = Vol \frac{V_{\max} S}{K_M + S}$$

où D = débit (volume/temps) et S_0 = concentration dans l'entrée (mol/volume)

$$\frac{S_0 - S}{\theta} = \frac{V_{\max} S}{K_M + S}$$

où θ = Débit / Volume = temps de séjour.

On peut résoudre les équations graphiquement.



Pour avoir conversion $(S_0 - S) / S_0 \rightarrow 1$ cela implique $\theta \rightarrow \infty$ sauf si $S_0 \gg K_M$

Pour avoir une conversion élevée, il faut avoir une concentration en substrat sortant (donc dans le réacteur) faible, la vitesse de réaction va donc être faible, et l'enzyme ne travaille pas à V_{\max} . Mauvaise utilisation du "potentiel catalytique".

Pour qu'une partie de l'enzyme puisse travailler à V_{\max} on peut faire des cascades de CSTR.

Réacteur à lit fixe (« packed bed »)



Enzyme immobilisée.

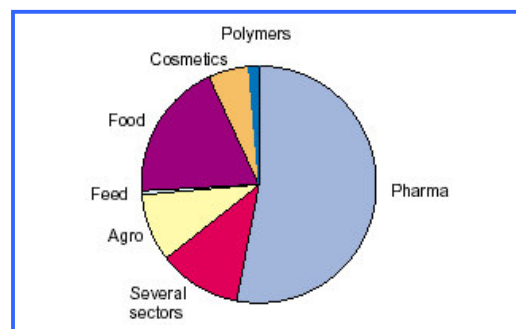
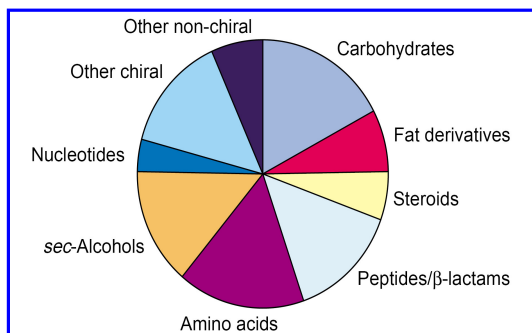
L'enzyme au début du réacteur est en présence de concentrations élevées en substrat et fonctionne donc à vitesse élevée. Vers la fin du réacteur, la concentration en substrat diminue et c'est seulement dans cette région que l'enzyme travaille à vitesse plus faible. On a donc une meilleure utilisation potentielle de l'enzyme.

Limitations:

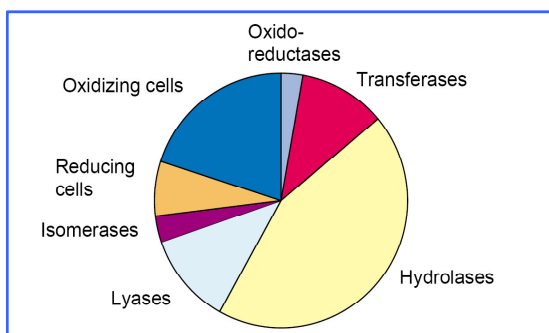
Substrats gazeux ou faiblement solubles

Inhibition par le substrat

Bioconversions industrielles



Straathof *et al* (*Current Opinion in Biotechnology*. **13**, 6(2002), 548-556.) ont recensé 134 bioconversions industrielles et on étudié leur répartition en terme de type de molécules impliquées, secteurs de l'industrie, et types d'enzymes.



Classification: la *Enzyme Commission* de IUB (*International Union of Biochemistry*) en collaboration avec IUPAC a établi un système de classification dans lequel on attribue un numéro du type E.C. x1.x2.x3.x4 aux enzymes.

x1 désigne le type de réaction catalysée :

- E.C.1 Oxydoréductases: catalysent les réactions d'oxydoréduction (transfert d'électrons). Ex. deshydrogénases, oxydases.
- E.C.2 Transférases: transfèrent des groupes fonctionnels (acyl ou phosphate).
- E.C.3 Hydrolases: catalysent l'hydrolyse de liaisons précises. Ex. estérases, protéases, glycosydases.
- E.C.4 Lyases: coupent différentes liaisons autrement que par hydrolyse ou oxydation ou synthétisent autrement que par condensation. Ex. hydratases, décarboxylases
- E.C.5 Isomérases: catalysent des réactions intra-moléculaires d'isomérisation en réarrangeant des groupes fonctionnels.

x2 désigne le type de substrat ou de liaison touchée. Par ex, E.C.1.1 oxydoréductase avec un alcool comme donneur d'électron.

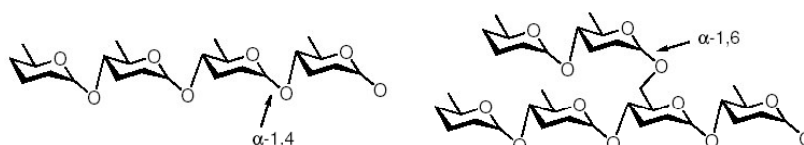
x3 et x4 donnent plus de détails par ex. E.C.1.1.1.6 : indique NAD^+ ou NADP^+ comme accepteur d'électron et le glycérol comme substrat. E.C. 3.1.1.3 : Triacyl glycérol lipase, ne donne aucune indication de la spécificité (position sur le glycérol ou la nature de l'acide gras coupé (saturation, longueur de chaîne)).

Le numéro E.C. ne dit rien de l'origine de l'enzyme, et en général rien de sa spécificité fine.

Exemples d'application

Glucoserie

Amidon de maïs : contient de l'amylose (25-30%) et de l'amylopectine (70-75%)

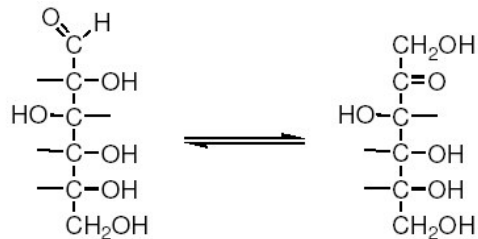


Amylose: polymère linéaire avec liaisons α -1,4, $\text{DP} \approx 10^3$

Amylopectine: branché par des liaisons α -1,6 glycosidiques, $\text{DP} \approx 10^4 - 10^5$, 20-25 unités entre les branchements. On utilise différentes enzymes pour produire du glucose.

Enzyme	Source	Action
α -amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Hydrolyse des liens α -1,4, au hasard à l'intérieur de la chaîne. Donne des α -dextrines, du maltose et des oligosaccharides (de G3 à G7, variable)
α -amylase saccharifiante	<i>Bacillus subtilis</i>	Comme précédente, sauf produit jusqu'à 50% de glucose
β -amylase	orge malté	Hydrolyse des liens α -1,4 à partir de l'extrémité non-réductrice. Libère du maltose et des dextrines limites (arrête aux liens 1,6)
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	Hydrolyse des liens α -1,4 et α -1,6, à partir de l'extrémité non-réductrice en libérant le β -glucose
Pullulanase	<i>Bacillus acidopullulolyticus</i>	Hydrolyse seulement les liens α -1,6 pour donner des maltodextrines linéaires.

Par la suite, le D-glucose est isomérisé en D-fructose par la glucose isomérase. (HFCS, High Fructose Corn Syrup)

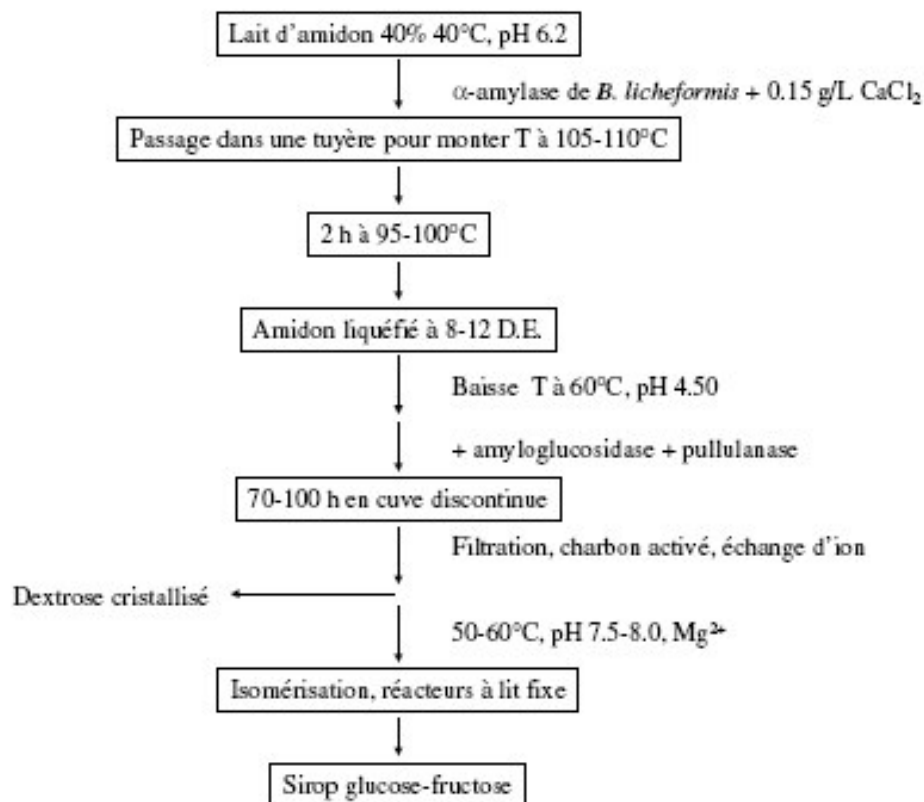


L'enzyme utilisée est une xylose isomérase (*Bacillus coagulans* et autres). Elle est difficile à purifier, on l'immobilise à partir de cellules entières, par exemple en faisant une réticulation ou co-réticulation.

La constante d'équilibre est légèrement inférieure à 1, on obtient un mélange à 42% de fructose. Par contre, en séparant le fructose par des méthodes chromatographiques, on peut monter à ~55% de fructose. Le pouvoir sucrant du glucose par rapport au saccharose est 0.7, et celui du fructose est 1.5. Le mélange à 42% de fructose a un pouvoir sucrant de ~1.

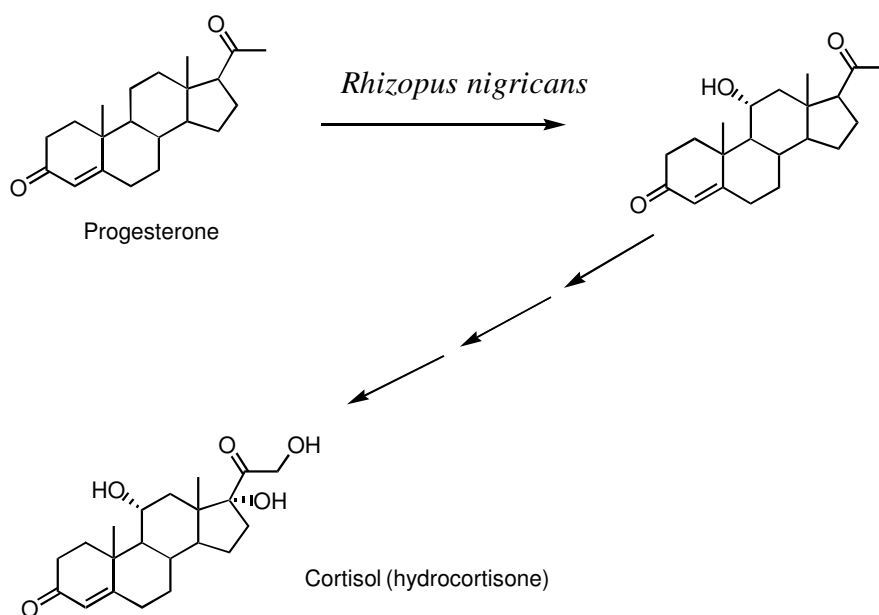
Les sirops de glucose-fructose sont utilisés dans les boissons gazeuses, la pâtisserie, la crème glacée, etc., au lieu du saccharose.

Exemple de procédé



Oxydations et réductions sélectives (Oxidizing cells) :

Hydroxylation sélective de la progestérone. Pour la synthèse de cortisol. Effectué avec des cellules entières, en présence de méthanol pour solubiliser les substrats et produits.

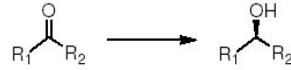


Résolution chirale:

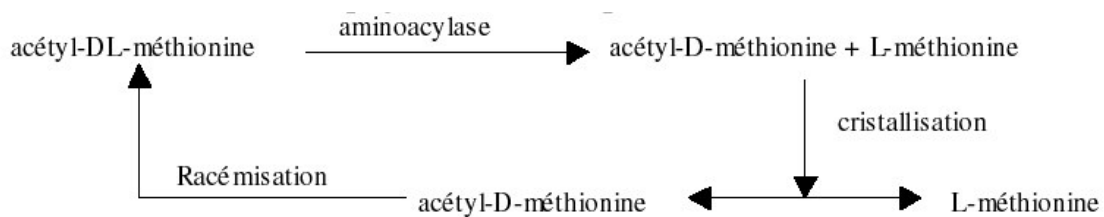
3 façons d'obtenir des molécules optiquement pures:

"Chiral pool" utiliser les molécules naturelles (sucres, acides aminés, etc.) comme blocs de construction

Synthèse asymétrique : par ex.

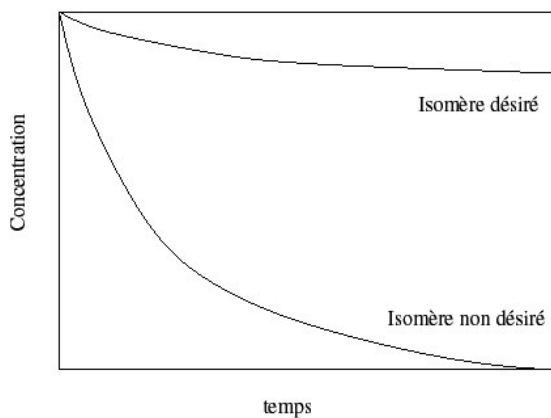


Résolution chirale : par ex.
34 des 134 procédés



Production d'acides aminés: Premier procédé industriel utilisant une enzyme immobilisée: l'aminoacylase de *Aspergillus oryzae*. (Compagnie Tanabe, Japon, 1970). La DL-méthionine produite chimiquement est acétylée et une aminoacylase hydrolyse spécifiquement l'acétyl-L-méthionine qui peut ensuite être séparée.

Maintenant les acides aminés L sont produits par fermentations, mais la résolution permet de produire les acides aminés D, avec une aminoacylase D-spécifique.



Exemple d'une résolution cinétique :

L'enzyme catalyse l'hydrolyse de l'énantiomère non désiré plus rapidement que celle de l'isomère voulu. A la fin on a perdu une partie de l'isomère désiré et la totalité de l'isomère non désiré. Cela entraîne un faible rendement global.

L'énantiosélectivité de l'enzyme est caractérisée par :

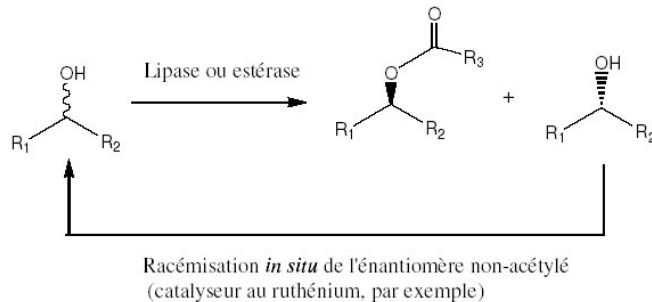
$$E = v_{\text{rapide}} / v_{\text{lent}}$$

$$E = (k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{rapide}} / (k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{lent}} \text{ (valable à toutes les concentrations)}$$

Mesure de la pureté énantiomérique (excès énantiomérique, *ee*)

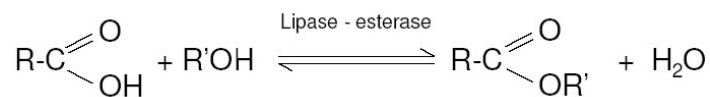
$$ee_{\text{substrat}} = \frac{|[S_S] - [S_R]|}{[S_S] + [S_R]} \quad ee_{\text{produit}} = \frac{|[P_S] - [P_R]|}{[P_S] + [P_R]}$$

Les résolutions dynamiques



Autres réactions catalysées par les hydrolases

Les enzymes sont des catalyseurs et n'ont pas d'influence sur la direction de la réaction, seulement son équilibre. Les hydrolases peuvent donc catalyser d'autres réactions que l'hydrolyse.



Un environnement faible en eau va déplacer l'équilibre loin de l'hydrolyse.

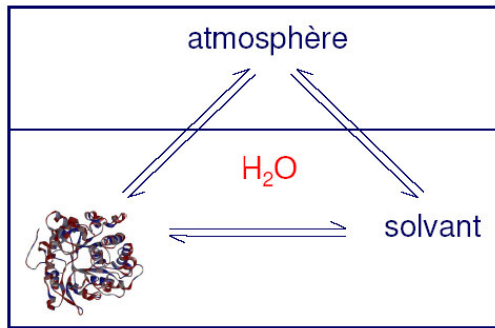
On peut:

- travailler en solvants organiques
- sans solvant (réactifs liquides purs)
- enlever l'eau produite

L'eau est importante:

- en tant que substrat/produit (inhibiteur possible)
- comme modulateur de la structure 3D des protéines.

Il faut donc établir un compromis entre les conditions thermodynamiques favorisant un bon rendement (peu d'eau) et les conditions qui permettent à l'enzyme de rester active (une certaine quantité d'eau, variable selon les enzymes).

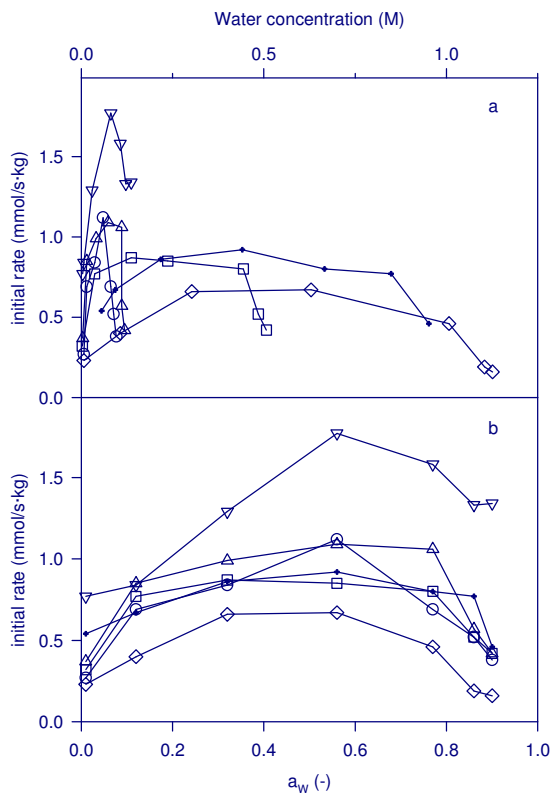


L'eau présente dans le système se répartit entre les phases présentes.

La meilleure façon de caractériser la quantité d'eau est l'activité thermodynamique de l'eau:

a_w = pression partielle de l'eau dans la phase vapeur / pression de vapeur de l'eau pure à la même température

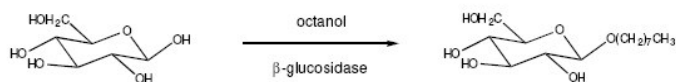
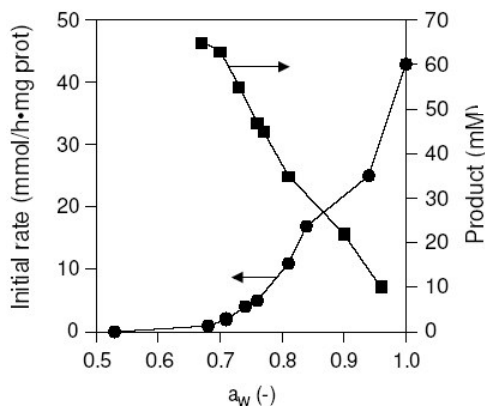
a_w = Humidité Relative / 100



Effet de l'eau sur la synthèse du décanoate de dodécyle par la lipase de *Rhizomucor miehei* dans différents solvants

Hexane ▲
Toluène ▼
Trichloroéthylène ●
Isopropyl ether ■
Pentane-3-one ◆
réactifs purs +

R.H. Valivety, P.J. Halling, et A.R. Macrae. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1119**, 218-222, (1992).

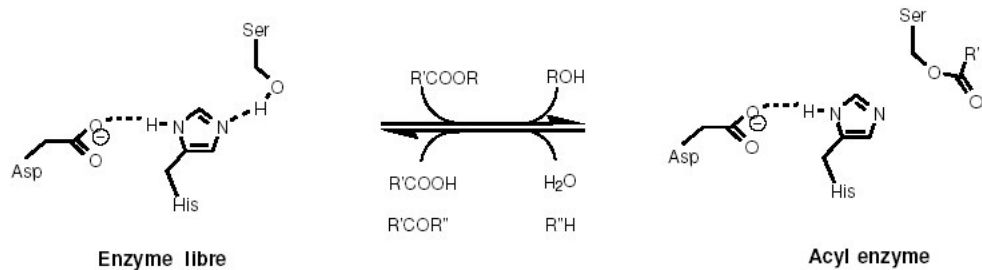


Effet de l'activité de l'eau sur la synthèse d'octyl-glucoside catalysée par la β -glucosidase d'amande dans l'octanol.

G. Ljunger, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Enzyme Microbial Technol.* **16**, 751-755, (1994)

Les lipases

Les lipases sont très utilisées dans l'industrie. Elles fonctionnent selon un mécanisme en plusieurs étapes où il y a formation d'un intermédiaire acyl-enzyme qui subit par la suite une attaque nucléophile. Dépendant de la nature du nucléophile, on peut avoir des réactions différentes. Elles sont souvent très tolérantes aux milieux non-aqueux.



ester + eau	→	acide + alcool	hydrolyse
acide + alcool	→	ester + eau	estérification (condensation)
ester-1 + alcool-1	→	ester-2 + alcool-2	alcoolse (transestérification)
ester-1 + acide-1	→	ester-2 + acide-2	acidolyse (transestérification)
ester-1 + ester-2	→	ester-3 + ester-4	interestérification
ester + amine	→	amide + alcool	aminolyse

Modification de matières grasses

Les propriétés physico-chimiques et organoleptiques des matières grasses dépendent de la nature des acides gras présents dans les triglycérides.

De façon générale, la présence d'acides gras saturés abaisse le point de fusion, et celle d'acides gras insaturés l'augmente.

Pour transformer des huiles végétales liquides en matière "tartinable" (margarine) il faut donc changer la nature des acides gras.

Façon simple: hydrogénation catalytique

2 problèmes: -les acides gras saturés favorisent la production de cholestérol sanguin, en particulier les LDL (Low Density Lipoproteins)
-comme la forme thermodynamiquement stable des doubles liaisons est la forme *trans*, une partie des doubles liaisons *cis* qui ne sont pas hydrogénées deviennent *trans*, ce qui est plus dommageable pour la santé que les acides gras saturés.

Façon moins simple: interestérification

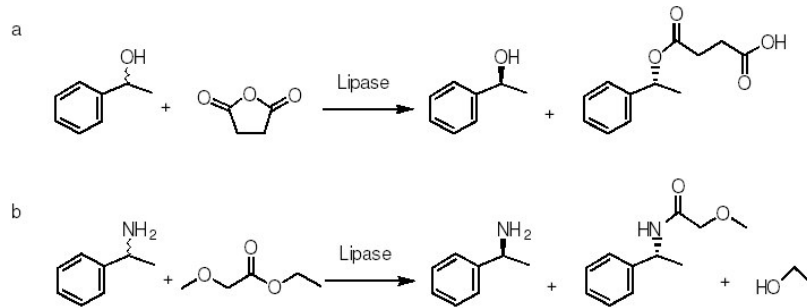
On fait un échange d'acides gras entre une huile riche en insaturés (mono- et poly-, par exemple canola) et une huile riche en saturés (par ex. huile de palme ou de palmiste).

La nouvelle matière grasse résultant de ce procédé aura des nouvelles propriétés. Cette interestérification peut se faire chimiquement par catalyse acide qui donne des sous-produits colorés qu'il faut ensuite enlever ou peut être catalysée par des lipases.

Le beurre de cacao contient surtout les acides stéarique (C18), palmitique (C16) et oléique (C18:1) et a un point de fusion à 34-38°C. Beaucoup de recherche a été effectuée dans les années 1980 pour produire enzymatiquement un "faux" beurre de cacao à partir d'huiles végétales bon marché.

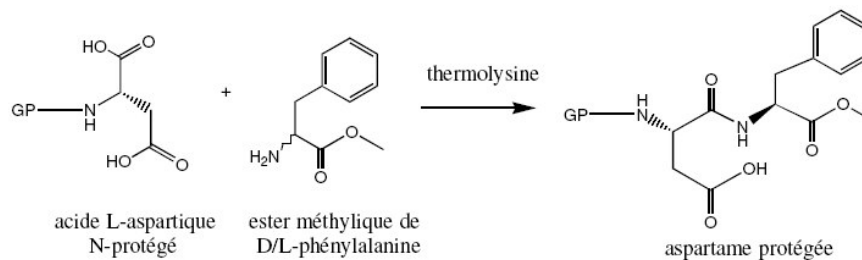
Réactions stéréosélectives

Différentes réactions misent au pont pas BASF :



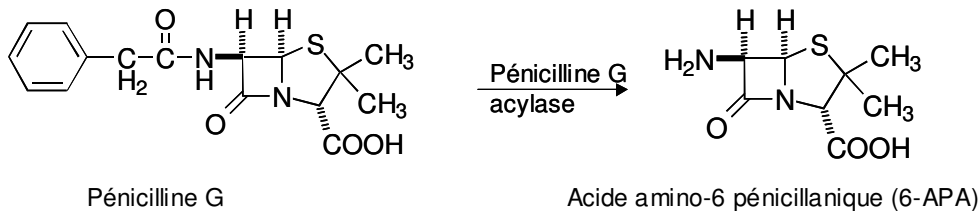
Peptidases/protéases

La compagnie DSM produit annuellement des kilotonnes d'aspartame par un procédé enzymatique: La thermolysine catalyse de façon très sélective ce couplage peptidique, réduisant les coûts de séparation des produits désirables et indésirables.



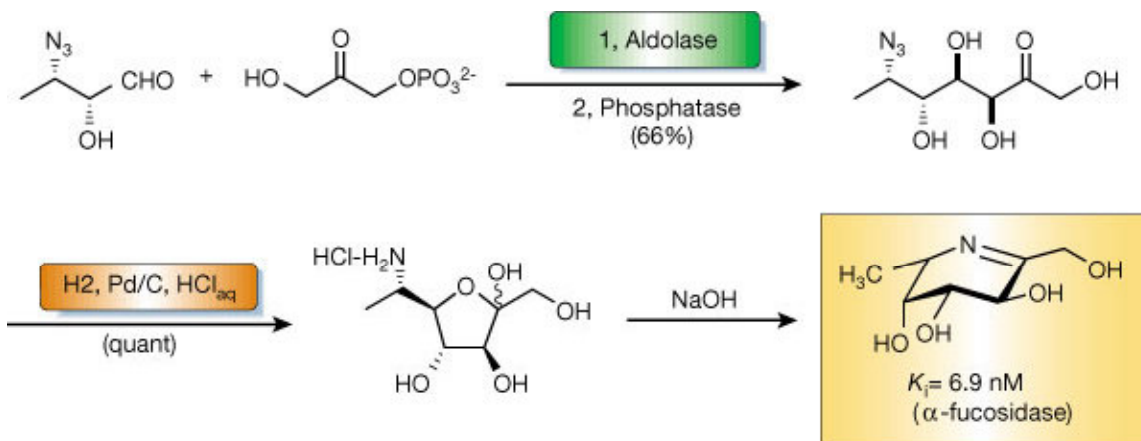
Autres enzymes très importantes industriellement:

Pénicilline acylase:



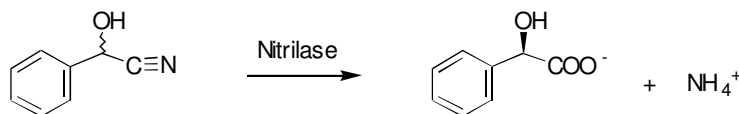
Le 6-APA (5000 t/an) sert à produire des pénicillines semi-synthétiques (e.g. ampicilline) à partir de la pénicilline G obtenue par fermentation. La synthèse peut se faire chimiquement ou enzymatiquement.

Formation enzymatique de liaisons C-C par une aldolase (lyase) :

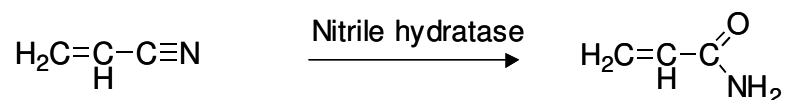


Les aldolases catalysent les additions de type aldol (condensation aldolique), typiquement entre un aldéhyde et une cétone. Il résulte de l'addition la formation de 2 centres stéréogènes dont la configuration sera contrôlée par l'enzyme. Les aldolases sont très spécifiques envers le substrat nucléophile donneur (le dihydroxyacétone phosphate ci-dessus) mais moins spécifiques envers le substrat électrophile accepteur (l'aldéhyde). L'exploitation d'aldolases permet la préparation de divers hydrates de carbone et d'analogues pouvant servir d'inhibiteurs d'intérêt pharmacologique (inflammation, cancer, etc).

Les nitrilases Catalysent l'hydrolyse d'un nitrile pour donner un acide carboxylique et une molécule d'ammoniaque. Le produit illustré est l'acide *R*-mandelique, un important précurseur synthétique (BASF).



Nitrile hydratase (arrête à l'amide) (Lyase):



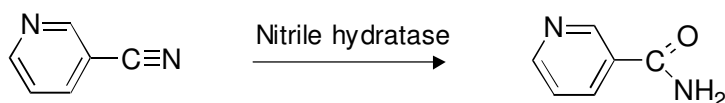
La compagnie Nitto (Japon, maintenant Mitsubishi Rayon Co) produit 30000 t/an d'acrylamide (total mondial 250000). Evite la production de sous-produits le rejet d'un catalyseur au cuivre.

Comparaison entre les procédés catalytique et enzymatique

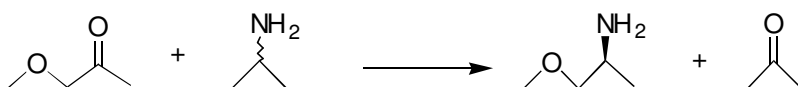
Procédé	Catalytique (1971 -)	Enzymatique (1985 -)
T	70°C	0-15°C
Rendement	70-80%	~100%
Concentration acrylamide	~30%	48-50%
Etape de concentration	oui	non

OCDE, The application of biotechnology to industrial sustainability, 2001.

La même enzyme est utilisée par Lonza pour produire le nicotinamide (vitamine B3, niacinamide) (3000 t/an)



Transaminase (aminotransférase)



Compagnie Cellgene. Aminotransférase de *E. coli*, cellules entières en suspension. Une mutation a permis de diminuer l'inhibition par le produit et passer de 0.16M à 0.45M.