

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Sétif-1  
Faculté de Technologie  
Département de Génie des Procédés

## **MEMOIRE DE MASTER**

**DOMAINE:** Sciences et Techniques

**FILIÈRE:** Génie des procédés

**OPTION :** Génie des procédés pharmaceutiques

### **THÈME**

**Etude de la réaction enzymatique d'isomérisation du  
glucose dans un bio-réacteur**

**Présenté par**

**Brahim Salem Meriem**

**Encadré Par**

**Dr. : L. CHIBANE**

**Date de soutenance : 26/06/2014**

#### **Jury de Soutenance:**

<b>Président:</b>	<b>M. ELKOLLI</b>	<b>Prof.</b>	<b>UFA Sétif 1</b>
<b>Encadreur :</b>	<b>L. CHIBANE</b>	<b>MCA</b>	<b>UFA Sétif 1</b>
<b>Examineur</b>	<b>Y. BENGUERBA</b>	<b>MCB</b>	<b>UFA Sétif 1</b>

**Promotion : 2013/2014**

## II.1. Introduction

Les sources naturelles de fructose sont les fruits, les légumes et le miel. Le fructose est souvent concentré davantage de ces sources. Les sources alimentaires les plus élevées de fructose, en plus pur fructose cristallin, sont des aliments contenant du sucre de table (saccharose), sirop de maïs à haute teneur en fructose, sirop d'agave, miel, mélasse, le sirop d'érable, de fruits et de jus de fruits, car ils ont les plus élevées de fructose (y compris le fructose en saccharose) par portion par rapport à d'autres aliments et ingrédients communs. Le fructose existe dans les aliments soit comme un libre monosaccharide ou liés au glucose comme le saccharose, un disaccharide. Le fructose, le glucose, le saccharose et peuvent être présents dans un aliment, cependant, différents aliments auront des niveaux variable de chacune de ces trois sucres [14].

Sirop de fructose agit également comme édulcorant pour certains types de drogues. Le fructose peut être trouvé dans des antitussifs, des décongestionnants et des gouttes liquides pour les enfants et les adultes, ainsi que les médicaments utilisée pour la toux nocturne et froide. La fabrication des sirops à haute teneur en fructose par la technique d'immobilisation des enzymes a connu sa réussite. Ces sirops sont obtenus à partir des sirops de glucose à D.E élevé, par action de la glucose-isomérase (EC.5.3.15) qui transforme une partie du glucose en fructose. Les sirops de première génération, appelés isoglucose 42% de fructose, 52% de glucose et 6% d'oligosaccharides, ce qui correspond à l'équilibre réactionnelle (teneurs exprimés en % de la matière sèche). Leur pouvoir sucrant est du même ordre que celui de revient est environ 30% plus faible. Les glucoses isomérase convient bien à une utilisation sous forme immobilisée. Elle est intracellulaire, stable à des températures suffisantes pour empêche les développements bactériennes et sont substrat est petit taille, ce qui limite les problèmes diffusionnels [15].

## II.2. Généralités

Composée naturels, ils constituent l'infrastructure des végétaux. Ils jouent un rôle dans le stockage de l'énergie. Ils sont un élément fondamental de l'alimentation

Ce sont des composé polyfonctionnels qui ont pour formule globale  $C_n(H_2O)_n$ , d'où le nom d'hydrates de carbones. Ils sont détaillés en plusieurs classes.

Les sucres, ou monosaccharides, ou oses. Ce sont des molécules de petites tailles, élément des glucides de grandes tailles. Les osides, sont décomposables par hydrolyses en donnant des oses.

En Holosides composés d'oses uniquement et en Hétérosides composés d'oses et de molécules relevant d'autres fonctions chimiques selon leur taille les holosides sont classés en :

- Oligoholosides** ou oligosaccharides comportant un nombre d'oses restreint  $< 10$ .
- polyholosides** ou polysaccharides comportant un grand nombre d'oses jusqu' à 3000.

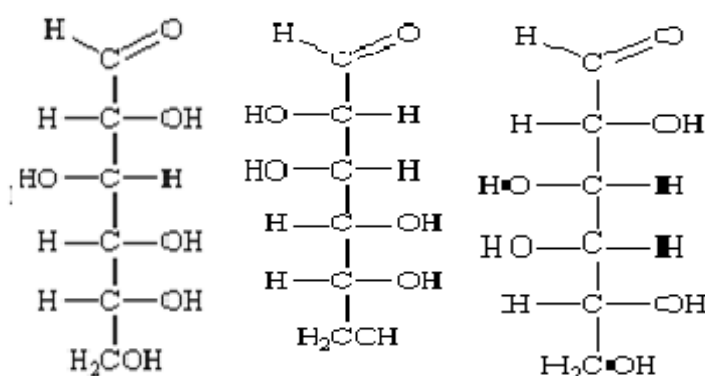
La représentation de ces molécules suppose assimilée les représentations tridimensionnelles des molécules organiques notamment celles de Fischer et de Haworth

### II.3. Le Glucose

C'est un aldohexose de formule globale  $C_6H_{12}O_6$ .

Soit  $O=CH-CHOH-CHOH-CHOH-CHOH-CH_2OH$ .

Sa configuration est 2R, 3S, 4R, 5R. Selon Fischer il est de la série D et possède un pouvoir rotatoire positif (+). C'est un sucre naturelle composant le sucre des fruits, du miel



**Fig.3: Structure développée des: glucose, mannose, galactose**

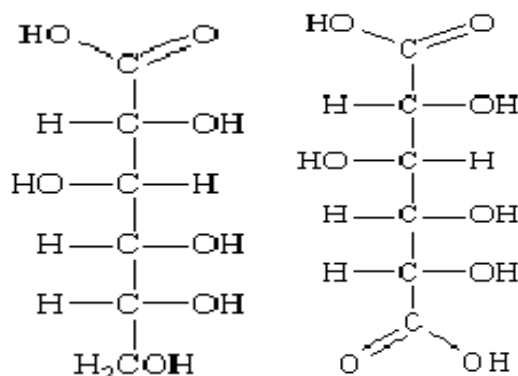
Il existe 4 carbones asymétriques, donc 16 stéréoisomères du glucose. Seuls deux d'entre eux sont des composés naturels le (+)-(D)-galactose et le (+)-(D)-mannose. Les autres isomères D et leur énantiomère L ont tous été synthétisés.

#### II.3.1. Réactivité

**II.3.1.1. Oxydoréduction:** il a été vu que les aldéhydes étaient oxydés en acide carboxyliques, par le tartrate cuivrique ou liqueur de Fehling et le nitrate d'argent ammoniacal ou réactif de Tollens. Ils conduisent à des acides aldoniques ou seule la fonction aldéhyde est modifiée en fonction acide carboxylique, mais leur intérêt est surtout analytique.

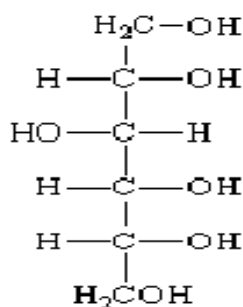
L'oxydation par le Brome du glucose n'oxyde que la fonction aldéhyde en donnant un acide aldonique, l'acide gluconique.

L'oxydation par l'acide nitrique oxyde aussi l'alcool primaire et donne un diacide, l'acide glucarique.



**Fig.4: Structure développée des:ac.gluconiqueet ac.glucarique**

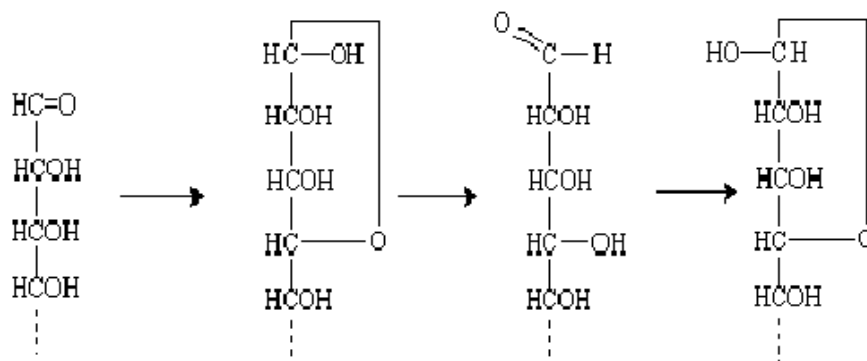
La réduction est réalisable par les réactifs habituels des aldéhydes,  $H_2$ /méta;  $H^-$ , qui donnent le sorbitol avec deux fonctions alcool. Primaires. On nomme alditols ces dérivés des aldoses ou des cétooses ne portant que fonction alcool. Le sorbitol est l'alditol du glucose. (Entre autres, mais aussi du sorbose et gulitol).



**Fig.5: Structure développée du sorbitol**

### II.3.1.2. Formes cycliques (l'équilibre anomérique)

Les sucres présentent sur une même chaîne un aldéhyde et fonction alcools. Or on a vu que en milieu acide les aldéhydes réagissent avec les alcools pour donner un héli-acétal.



**Fig.6: Structure de forme cyclique**

Dans le cas Présent la même réaction est possible au sein de la molécule. Cette réaction intramoléculaire est d'importance dans la chimie de cette famille.

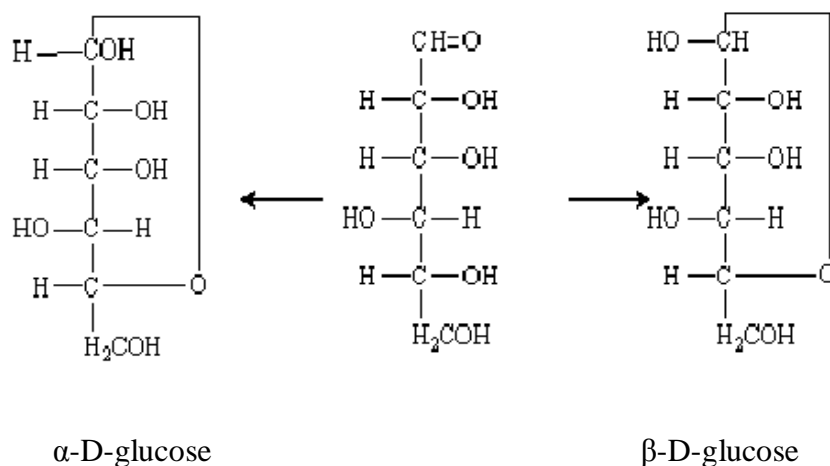
Pour le glucose par exemple deux éléments sont à prendre en compte, d'une part sur quelle fonction alcool l'aldéhyde va réagir, d'autre part sur quelle face de l'aldéhyde l'alcool va se condenser.

L'expérience montre que les possibilités sont toutes réalisées.

Condensation C1/C5 et condensation C1/C4 (isomérisation de position).

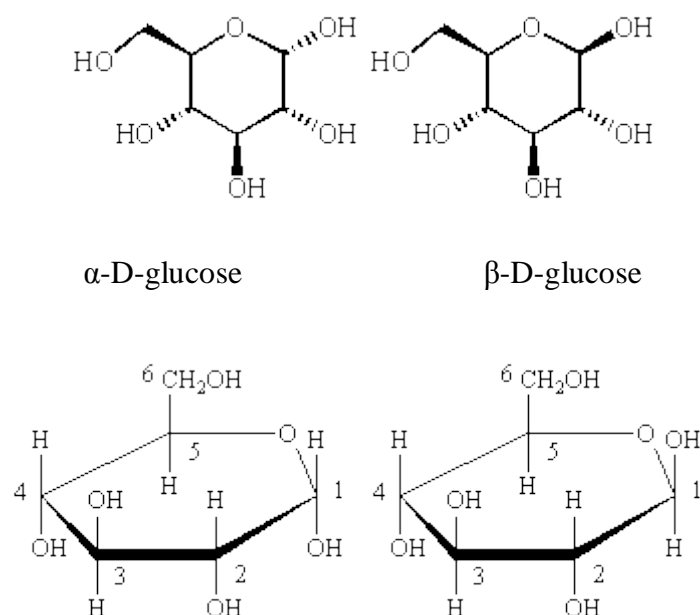
Condensation sur les deux faces de l'aldéhyde. (Diastéréoisomérisation).

La condensation C1/C4 donne un cycle à 6 éléments (5Cet1O) sous deux formes différenciées par la configuration du carbone 1.



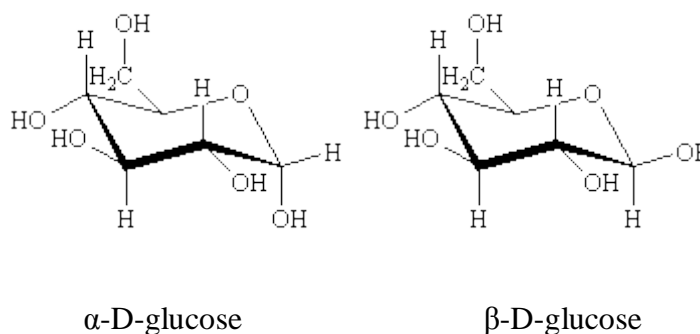
**Fig.7: Structure des:  $\alpha$ -D-glucose et  $\beta$ -D-glucose**

Cette représentation selon Fischer est précise, mais pas très évocatrice voici les mêmes structures sous diverses formes. Le cycle rappelle le pyrane, ces formes sont dites "pyranose".



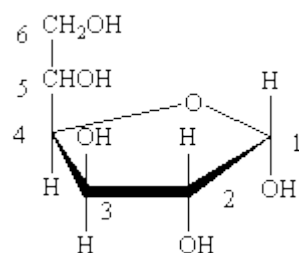
**Fig.8: Forme de Haworth. La forme linéaire selon Fischer**

En fait la molécule "réelle" est beaucoup plus proche des formes chaises du cyclohexane. En plaçant le groupe  $\text{CH}_2\text{OH}$  en position équatoriale la représentation est la suivante.



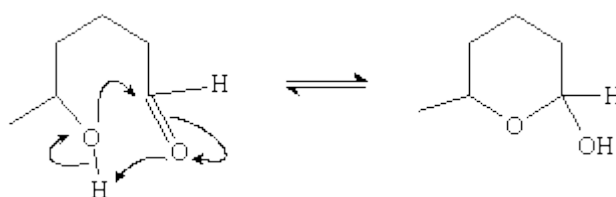
La condensation se fait aussi en C1/C4, elle conduit à un cycle à 5 éléments, dont l'oxygène, dans une forme qui rappelle dite "furanose". Là encore deux diastéréoisomères  $\alpha$  et  $\beta$  sont possible, la différence portant sur la configuration du carbone 1.

Voici selon Haworth l' $\alpha$ -D-glucofuranose:



**Fig.9: forme Haworth l' $\alpha$ -D-glucofuranose**

L'ensemble de ces formes en équilibre, qui est une tautomérie car la formule globale est invariante, seul un hydrogène se trouve déplacé.

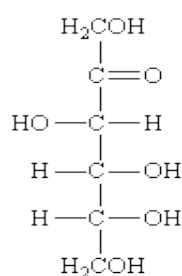


**Fig.10: les formes  $\alpha$  et  $\beta$  du anomères**

Les formes  $\alpha$  et  $\beta$  sont dites anomères. Le carbone n°1 dont la configuration est différente entre ces deux formes est dit "carbone anomérique".

#### II.4. Le Fructose

C'est un cétohexose, c'est à dire que le carbonyle se trouve sur le carbone 2. Il est donc isomère du glucose.



**Fig.11(-)-(D)-Fructose**

Le fructose ou sucre de fruits, est un moyen simple monosaccharide trouve dans de nombreuses plantes, ou il est souvent lié au glucose pour former le disaccharide, le saccharose. Il est l'un des trois monosaccharides diététique, ainsi que du glucose et du galactose, qui sont absorbé directement dans la circulation sanguine au cours de la digestion.

Fructose pur et sec est très doux, blanc, inodore solide cristallin et est plus de tous les sucres soluble dans l'eau. De source végétale, le fructose se trouve dans le miel, des arbres et de la vigne fruits, fleurs, baies, et la plupart des légumes racines [16].

#### **II.4.1. Réactions**

##### **II.4.1.1. Fructose et la fermentation**

Le fructose en anaérobiose peut être fermenté par la levure ou les bactéries. Enzymes de levures transforment le sucre (glucose, fructose ou de l'éthanol et du dioxyde de carbone. Le dioxyde de carbone libéré lors fermentation reste dissous dans l'eau, ou elle atteindra l'équilibre avec de l'acide carbonique, moins que la chambre de fermentation est laissée ouverte à l'air. Le dioxyde de carbone dissous et produisent de l'acide carbonique dans la bouteille carbonatation des boissons fermentées [17].

##### **II.4.1.2. Fructose et la réaction de Maillard**

Le fructose est soumis à la réaction de Maillard, le brunissement non enzymatique, avec des acides aminés. Étant donné que le fructose existe une plus grande mesure dans la forme à chaîne ouverte que ne le fait le glucose, les étapes initiales de la réaction de Maillard se produit plus rapidement que le glucose. Par conséquent, le fructose a un potentiel de contribuer aux changements de la nourriture sapidité, ainsi que d'autres effets nutritionnels, tels que le brunissement excessif, le volume et la réduction de la sensibilité au cours de la préparation du gâteau, et la formation de mutagènes composés [18].

##### **II.4.1.3. La déshydratation**

Le fructose se déshydrate facilement pour donner hydroxyméthylfurfural. Ce processus, à l'avenir, peut faire partie d'un système neutre en carbone à faible coût de production de remplacement pour l'essence et le diesel à partir de plantes.

#### **II.5. Position du problème**

Le glucose isomérase, immobilisée sur support solide, est utilisé industriellement pour produire des sirops de glucose riche en fructose. La réaction d'isomérisation du glucose en fructose est équilibrée, la constante d'équilibre est voisine de 1 (varie peu avec la température). On propose une isomérisation de 45% du glucose d'un sirop de glucose de concentration 2800 mole/m<sup>3</sup>. La valeur de conversion souhaitée est de 90%. La production souhaitée est de 20 m<sup>3</sup>/h.



Notre travail consiste à étudier le modèle mono-dimensionnel, cependant la résolution de notre problème nécessite l'application de certaines hypothèses simplification suivantes:

- le système est en régime permanent et isotherme.
- la dispersion axiale est négligeable.
- le débit molaire et la composition du mélange réactionnel sont constants.
- les résistances dues aux transferts de matière sont négligeable [19].

## II.6. Schéma du bioréacteur

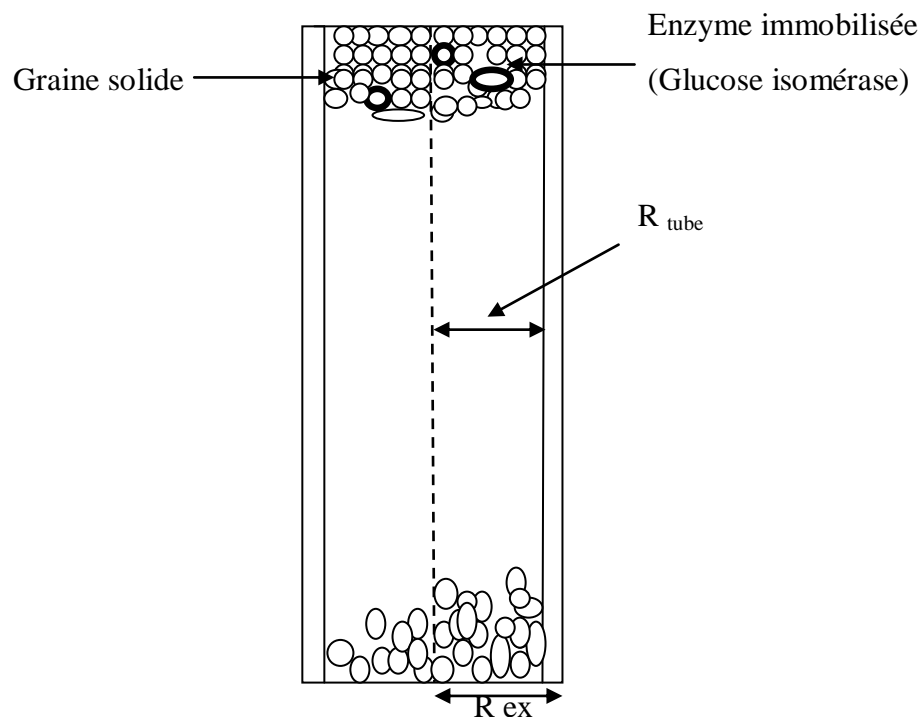
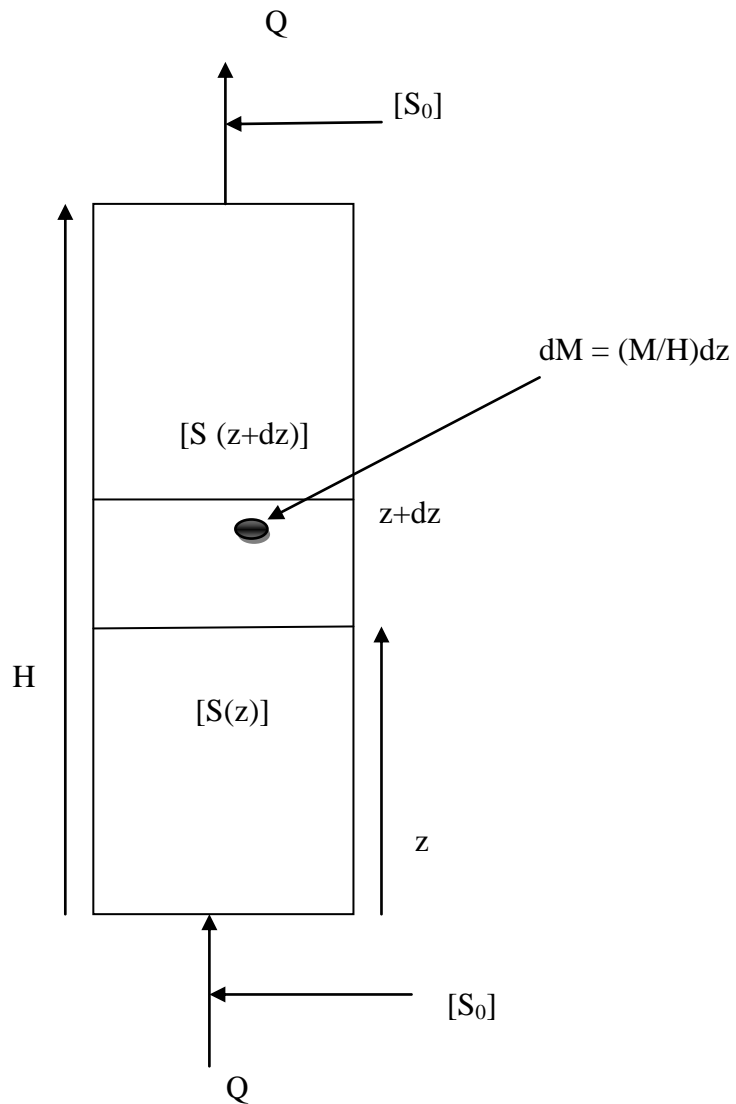


Fig.12: Schéma du bioréacteur

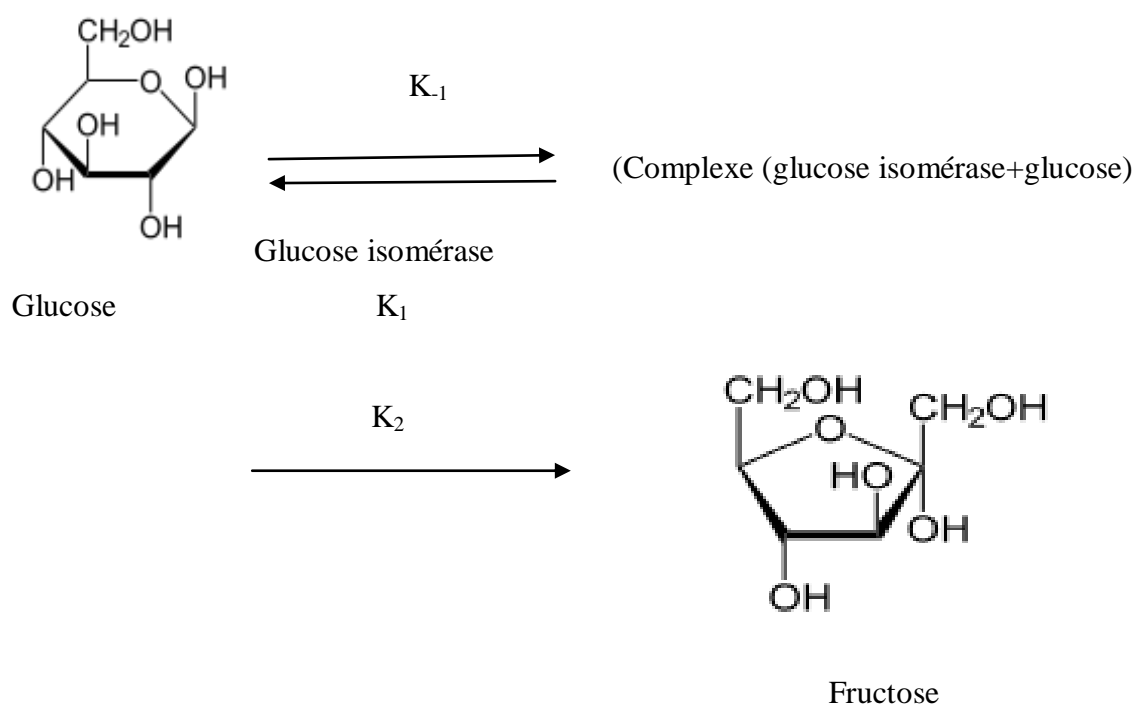


**Fig.13: Schéma d'un réacteur à enzyme immobilisée à lit fixe**

### II.7. Cinétique de la réaction

La réaction considérée dans notre modèle est celle d'isomérisation du glucose qui a lieu sur le biocatalyseur glucose – isomérase [19].

L'isomérisation du glucose englobe la réaction suivante :



L'expression de la vitesse de la réaction suit la loi de Michaelis Menten suivant:

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{II.1})$$

Où la constante de Michaelis Menten est donnée par:

$$K_m = (K_{-1} + K_2) / K_1 \quad (\text{II.2})$$

$V_m = K_2 [E_t]$ : la vitesse maximale atteinte lorsque toute l'enzyme est sous forme [ES].

$[G.\text{Iso totale}] = [G.\text{Iso}] + [\text{complexe}.G.\text{Iso}.G.]$ .

Les paramètres cinétiques et thermodynamiques de la réaction sont résumés dans le tableau 3:

constantes	Valeurs	Unités
$K_m$	7815	Mole .m <sup>-3</sup>
$V_m$	17,52.10 <sup>-3</sup>	Mole .S <sup>-1</sup> .Kg <sup>-1</sup>
T	333	Kelvin

**Tableau 3 : paramètres cinétiques et thermodynamiques de la réaction**

## II.8. Mise en équation

### II.8.1. Le modèle monodimensionnel d'un bioréacteur à lit fixe

Dans un fluide où les concentrations ne sont pas uniformes, les flux de masse obéissent à des équations de bilan exprimant la concentration dans un élément de fluide;

Le bilan de matière dans un volume élémentaire du bioréacteur (Fig.14) pour ce modèle en régime stationnaire s'écrit:

$$\text{ENTRÉE} + \text{PRODUCTION} = \text{SORTIE}$$

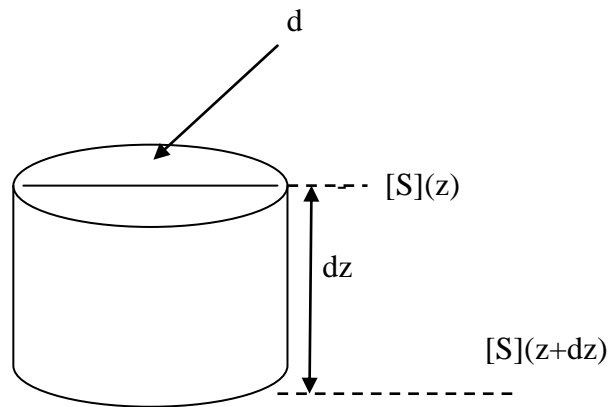


Fig.14: Volume élémentaire du bioréacteur

$$QS(z) - V dv_s p_s = QS(z+dz), dv_s p_s = dM = \frac{M}{H} dz \quad (\text{II.3})$$

$$Q = [S(z) - S(z+dz)] - [V_m S(z) / (K_m + S(z))] \cdot (M/H) \cdot dz \quad (\text{II.4})$$

$$Q \cdot [S(z) - S(z+dz)] / dz - [V_m S(z) / (K_m + S(z))] \cdot (M/H) = 0 \quad (\text{II.5})$$

Après arrangement cette équation devient:

$$dS(z)/dz = [(-M \cdot V_m) / (Q \cdot H)] \cdot [S(z) / (K_m + S(z))] \quad (\text{II.6})$$

**-la formule adimensionnelle:** pour obtenir la solution des équations différentielles sous la forme compacte, il faut transformer l'équation en forme adimensionnelle.

$$\text{Posons} \quad \bar{Z} = \frac{Z}{H} \quad \Psi = \frac{S}{S_0} \quad \bar{K} = \frac{K_m}{K_s} \quad (\text{II.7})$$

$\bar{Z}$ ,  $\Psi$ ,  $\bar{K}$  sont des nombres adimensionnels.

On trouve:

$$\frac{d\Psi}{d\bar{z}} = \frac{-M.V_m}{Q.S_0} \frac{\Psi}{\bar{K} + \Psi} \quad (\text{II.8})$$

### II.9. Intégration Numérique

Après la mise en équation des phénomènes intervenant de notre système réactionnel, l'équation principale gérant ce système est l'équation donnée par: le modèle monodimensionnel (équation II.8)

L'équation (II.8) est une équation différentielle linéaire du 1<sup>ème</sup> ordre, sa résolution se fait par intégration simple (directe).

L'intégration de l'équation différentielle entre l'entrée ( $\bar{z}=0$ ) et la sortie du réacteur ( $\bar{z}=1$ ) aboutit à la relation:

$$\frac{M.V_m}{Q.S_0} = -(\bar{K} \ln(\Psi_s) + \Psi_s - 1) \quad (\text{II.9})$$

Où  $\Psi_s$  est la concentration adimensionnelle en substrat S à la sortie du bioréacteur.

A l'entrée du bioréacteur:  $[G_0] = 2800 \text{ mol/m}^2$ .

A l'équilibre, on a  $K_e \longrightarrow 1$  donc  $[G_e] = 1400 \text{ mol / m}^3$

$[G_0] - [G_e] = [S_0] = 1400 \text{ mol/m}^3$ .

$$\text{Donc : } \bar{K} = \frac{K_m}{S_0} = \frac{7815}{1400} = 5,58$$

Pour la masse de catalyseur  $M = 6103 \text{ Kg}$ .

$V_z = 0,0042 \text{ m/s}$

$$\text{Donc : } Q = v_z \text{ sections} = V_z \cdot \pi \left( \frac{d^2}{4} \right) = 0,0042 \pi ((1,3)^2/4) = 5,5719 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}.$$

Alors : la concentration à la sortie du bioréacteur,  $\Psi = 0,1$

## II. 10. Résultats et Discussions

Dans ce travail, on a utilisé le modèle monodimensionnel pour le bioréacteur à lit fixe pour l'isomérisation du glucose avec l'intervention d'enzymes immobilisées <GLUCOSE ISOMMERASE> sans tenir compte de la dispersion axiale.

Le principal résultat pour le modèle monodimensionnel montre que la concentration adimensionnelle à la sortie du bio-réacteur est de l'ordre de 0.1 ( $\psi=0.1$ ) sous les conditions opératoire utilisées dans le cadre de ce travail (Tableau 3).

Afin de voir l'influence de certains paramètres sur les performances du bioréacteur, nous avons entrepris une analyse de sensibilité paramétrique dans laquelle nous avons détaillés plusieurs effets entre autres : l'effet de la concentration initiale du substrat ( $S_0$ ) (glucose), l'effet de la vitesse maximale ( $V_m$ ), l'effet de masse du biocatalyseur  $M$  et enfin l'effet du débit volumique ( $Q$ ).

### 1. Effet de la concentration initiale en glucose

La figure 16 illustre l'effet de la charge initiale du glucose à l'entrée sur la variation de la concentration du glucose à la sortie, en fonction de la hauteur du bio-réacteur.

D'après les courbes obtenues, on peut dire que la production du glucose est favorisée par la diminution de la charge (concentration) initiale. Donc d'après ces résultats, la conversion optimale est obtenue pour  $S_0=1400 \text{ mol/m}^3$  ( $1400 \text{ mol/m}^3$  pour un taux de conversion de 90% mieux que  $100 \text{ mol/m}^3$  pour un taux de conversion de 90%).

Le dépassement d'une charge initiale de  $1400 \text{ mol/m}^3$  conduit à l'apparition d'une pression osmotique ce qui influe négativement sur le rendement cinétique.

### 2. Effet de la vitesse maximale sur la concentration du glucose

La figure 17 illustre l'effet de la vitesse  $V_m$  sur la concentration du glucose en fonction de différentes positions dans le bioréacteur. Les courbes obtenues ont une forme décroissante. On remarque que, pour des valeurs élevées de  $V_m$ , il y a une diminution de la concentration du glucose à la sortie du bioréacteur de fait de la relation existante entre  $K_m$  et  $V_m$ .

Si  $V_m$  augmente ceci implique une diminution de la concentration du complexe ES, alors une diminution de production en fructose.

### 3. Effet de la masse de biocatalyseur

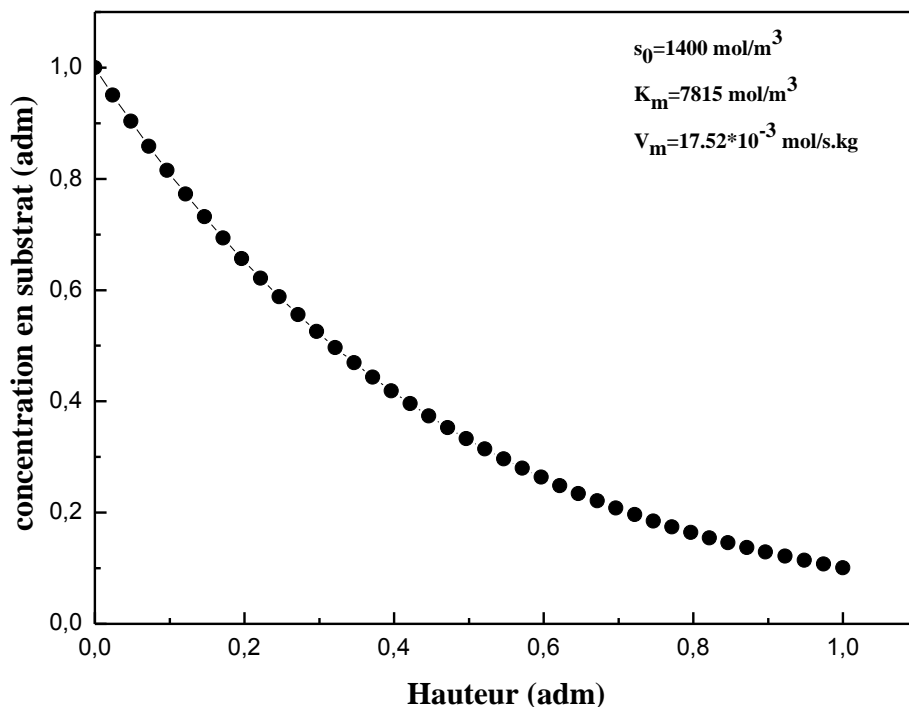
La figure 18 montre l'effet de la masse du biocatalyseur  $M$  sur la concentration du glucose selon la hauteur du bio-réacteur, l'effet de ce dernier est observé et on remarque que si la masse du biocatalyseur  $M$  augmente, la concentration en glucose augmente, ce qui conduit à une faible production de fructose.

### 4. Effet de $Q$ sur la concentration en glucose la hauteur du réacteur

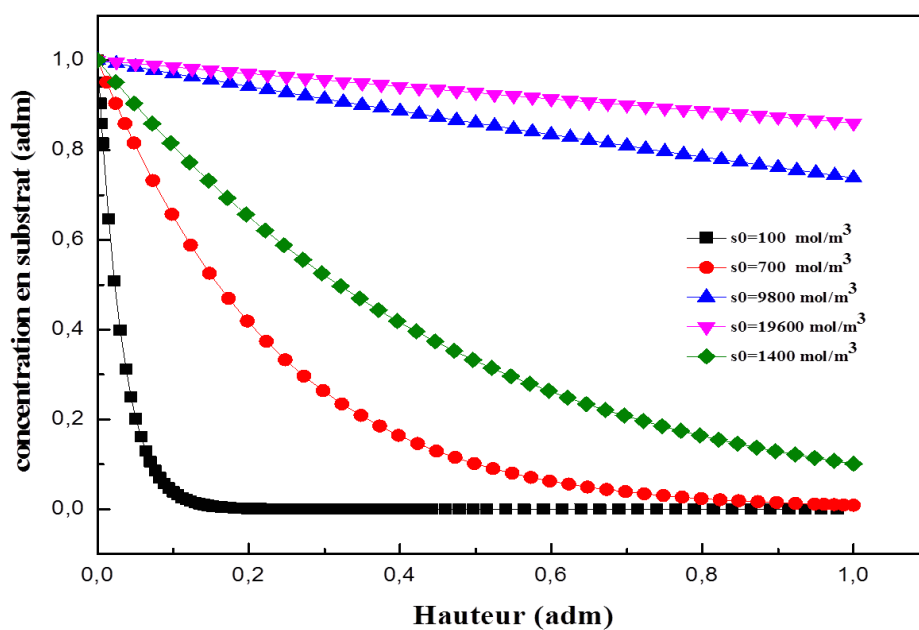
La figure 19 illustre l'effet du débit volumique sur la concentration du glucose en fonction de différente position dans le bio-réacteur. Les courbes obtenues ont une forme décroissante.

-Si la quantité  $Q$  augmente, implique que la concentration de (ES) diminue, donc une diminution de la production du fructose, la grande affinité d'enzyme au glucose minimise la production du fructose.

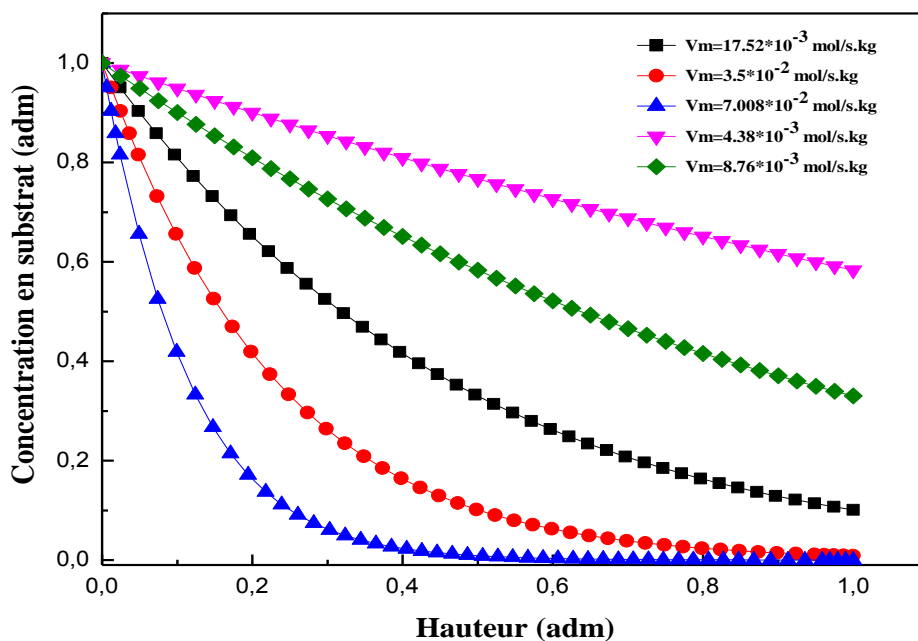
-Si  $Q$  diminue, implique une augmentation de la concentration de (ES), donc une augmentation de la production du fructose, alors la faible affinité d'enzyme au glucose maximise la production du fructose.



**Fig.15 : Variation de la concentration selon la hauteur du bioréacteur**

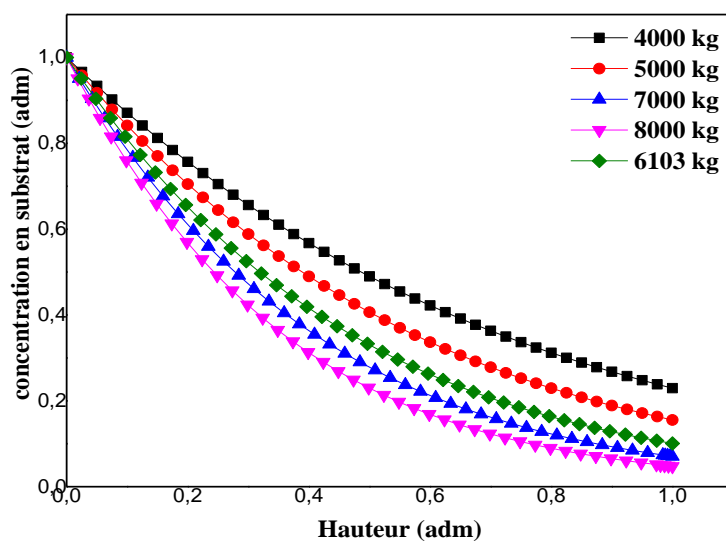


**Fig.16: Effet de la concentration initiale du glucose sur la variation de la concentration**

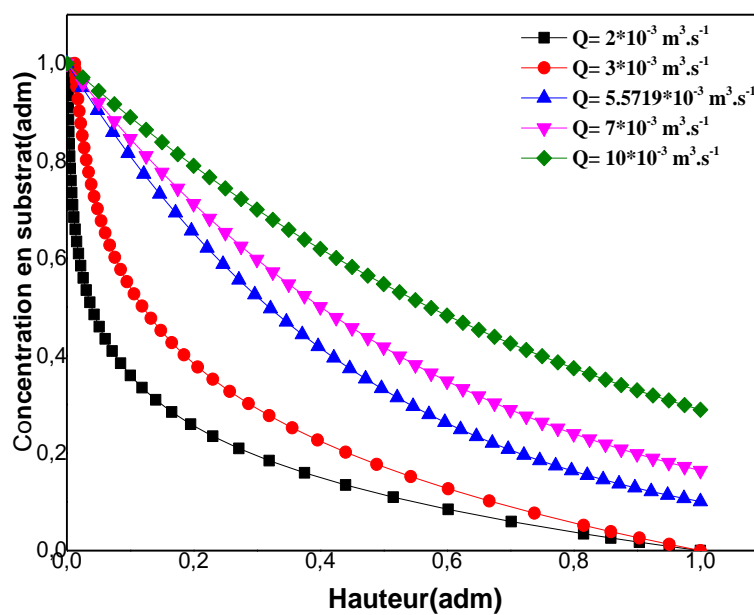


**Fig.17: Effet de  $v_m$  sur la concentration en glucose selon la hauteur du bioréacteur**





**Fig.18 : Effet de M sur la concentration en glucose en fonction de la hauteur du bioréacteur**



**Fig.19: Effet de Q sur la concentration en glucose**

**I.1. Introduction**

L'étude des fonctions des enzymes s'est développée pendant des décennies sur des ensembles de molécules isolées en solutions aqueuse diluée. Dans une cellule vivante, toutefois, les enzymes ne sont ni physiquement indépendants les uns des autres, ni dans un état de grand dilution ces macromolécules sont le plus souvent associées à d'autres molécules ou à des structures cellulaires comme les membranes ou les parois, il résulte de cette situations que les propriétés apparentes des enzymes sont altérées. Les raisons physiques de ces altérations sont multiples. Les plus connues son un ralentissement de la vitesse de processus de diffusions des molécules dans la cellules ainsi que l'existence d'interactions électrostatiques conduisant à l'attractions, ou la répulsions, d'ions mobiles par des charges fixes des polyélectrolytes naturels de cette cellules.

L'homme sait maintenant imiter et utiliser, à des fins technologiques, ce que la nature réalise. On sait en effet fixer sur des supports solides des enzymes, ou des séquences d'enzymes, et les utilise comme un outil d'une nouvelle biotechnologie [1].

Ce sont elles qui dans le génie micro biologique, catalysent les réactions métaboliques mise en jeu et assurent leur régulation. Elles sont également conduites le génie génétique à réaliser des modifications de l'équipement enzymatique de certains de micro-organismes en vue de les rendre aptes à la biosynthèse de métabolites intéressants.

Dans la connaissance des enzymes de leurs propriétés, les méthodes d'immobilisation ainsi que la cinétique des réactions qu'elles catalysent est fondamentale en biotechnologie [2].

**I.2. Définition**

Une enzyme est une macromolécule d'origine protéique (la plupart du temps, c'est une protéine, sauf dans le cas des ribozymes) qui joue un rôle de catalyseur biologique (ou biocatalyseur), c'est-à-dire de composé qui facilite une réaction biochimique sans en modifier les produits. Elle est capable d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme, sans pour autant modifier l'équilibre formé. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction

Une enzyme, comme toute protéine, est synthétisée par les cellules vivantes à partir des formations codées dans l'ADN ou dans l'ARN dans le cas de certains virus [1].

**I.3. Découverte**

Les premières enzymes isolées furent d'abord nommées ferments solubles diastase zymases

La première enzyme fut découverte par Anselme Payen et Jean-François en 1833. après avoir traité un extrait aqueux de malt à l'éthanol, ils ont précipité une substance sensible à la chaleur. Cette substance était capable d'hydrolyse l'amidon; ils l'ont nommée diastase, car elle séparait le sucre soluble de l'amidon (diastasis signifiant séparation en grec ancien). On appelle aussi amylase- $\alpha$  [3].

**I.4. Propriété**

Propriétés d'une enzyme:

- inchangée en fin de réaction;
- agit à concentration très faible.
- incapable de créer une réaction nouvelle: seulement accélération d'une réaction possible.
- spécifique:
- soit d'une seule réaction : ex: maltose  $\rightarrow$  2 glucose avec le maltose.
- soit d'un type de réaction : ex protéine phosphoryle +  $H_2O \rightarrow$  protéine + acide phosphorique avec la phosphatase.

**I.5. Les constitutions des enzymes**

Il existe deux grandes catégories d'enzymes:

- les enzymes purs purement protéiques : elles ne sont constituées que d'acides aminés. Ce sont les holoenzymes.
- les enzymes en deux parties : une partie protéique appelée apoenzyme et une partie non protéique appelée cofacteur. L'association des 2 parties forme l'hétéro enzyme.

**I.6. Les cofacteurs enzymatiques**

Un cofacteur est une substance chimique non protéique, mais, qui est liée à une protéine, et qui est nécessaire à l'activité biologique de cette protéine.

Ces protéines sont souvent des enzymes, et les cofacteurs peuvent être considérés comme des "molécule d'assistance" aidant aux transformations biochimiques.

Les cofacteurs peuvent être classés selon leur mode de liaison aux enzymes :

Des cofacteurs faiblement liés à l'enzyme (liaison hydrogène ou ionique) seront appelés coenzymes, et des cofacteurs fortement liés à l'enzyme (liaison covalente) seront appelés groupements prosthétiques.

**I.7. Les ions métalliques**

Ions minéraux ("cofacteurs minéraux"). Ce sont des oligoéléments tels que  $\text{Ca}^{++}$ ;  $\text{Mg}^{++}$ ;  $\text{Mn}^{++}$ ;  $\text{Zn}^{++}$ ; etc....

L'ion associé à la partie protéique forme ainsi le Métallo-enzyme.

**I.8. Nature des enzymes**

Ce sont toutes des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires certains sont des holoprotéines constituées uniquement d'un enchainement d'acide aminés, d'autres sont des hétéroprotéines possédant.

-une partie non protéique.

-le cofacteur, nécessaire à l'activité catalytique et lié plus ou moins à fortement à la protéine.

**I.9. Les coenzymes**

1-Les réactions auxquelles participent les coenzymes sont des réactions de transfert (d'électrons, de protons, de groupement phosphate etc.). Ils servent d'accepteur temporaire. On distingue:

-les coenzymes activateurs ou groupements prosthétiques ou prothétique.

-les groupements prosthétiques sont fortement liés à l'apoenzyme par des liaisons covalentes. Ils ne se détachent pas de l'apoenzyme au cours de la réaction (exemple : FAD). L'enzyme elle même les remet en état initial. les groupements prosthétiques appartiennent à plusieurs catégories moléculaires, le plus connu-l'hème-intervient dans la plupart des réactions où l'oxygène intervient (hémoglobine, hémocyanine) ou plus généralement dans la réaction d'oxydoréduction (cytochrome, chlorophylle). mais, il en existe bien d'autres, beaucoup appartenant à la famille des vitamines [1].

2: Les coenzymes transporteurs

Les coenzymes transporteurs ou Co substrats: ils se dissocient facilement de l'apoenzyme.

Le coenzyme ne retrouve son état initial que lors d'une seconde réaction faisant intervenir une deuxième enzyme (exemple: NAD, ATP).

Quand l'enzyme est inactive, le coenzyme n'est pas fixé à l'enzyme. [1]

**I.10. Les catalyseurs enzymatiques**

Le catalyseur biologique s'appelle une enzyme. Les catalyseurs accélèrent de façon considérable les réactions.

Exemple d'efficacité:

**Tab.1 : l'efficacité de quelques catalyseurs biologiques**

	Constante de vitesse( $s^{-1}$ ) K non catalysés	Constante de vitesse( $s^{-1}$ ) K catalysés	K cat/k non catalysés
Chymotrypsine	$4 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-2}$	$10^7$
Lysozyme	$3 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^8$
Phosphatase alcaline	$10^{-15}$	$10^2$	$10^{17}$

La spécificité pour le substrat est en général très grande. Par exemple une enzyme telle qu'une cellulase hydrolysera une liaison  $\beta$ -1>4 entre deux résidus glycolyse (dans la cellulose) et sera sans action sur les liaisons  $\alpha$ -1>4 entre deux résidus (de l'amidon).

La spécificité pour la réaction est également importante. Il ne se forme pas de sous-produits inutiles. Les rendements sont proches de 100%. Ceci à pour résultat une consommation minimale d'énergie. Cette spécificité de réaction est liée au fait, qu'au cours de l'évolution, la sélection n'a retenu que les processus les plus efficaces.

La plupart des réactions catalysée par les enzymes sont réversible. En modifiant les concentrations des réactifs. Ou des produits, on peut faire marcher la réaction dans un sens ou dans l'autre. Cette propriété est souvent utilisée dans les dosages enzymatiques.

Exemple : enzyme : alcool déshydrogénase



Pour doses totalement l'alcool en utilisant cette réaction, il faut déplacer l'équilibre vers la droite. Ceci est réalisé en complexant l'acétaldéhyde à l'aide d'un réactif chimique approprié.

### **I.11. Spécificité de la catalyse enzymatique**

#### **La notion de site actif**

La réaction se produit dans une cavité en général profondément ancrée dans la structure de la molécule. Cette cavité s'appelle le site active(ou site catalytique) de l'enzyme.

Le site actif est de petite dimension, il occupe moins de 5% de la surface de la protéine.

Le site actif un des caractères les plus importants de la catalyse enzymatique résidé dans sa spécificité beaucoup plus marquée que celle de la catalyse chimique [4].

Cette spécificité présente un double aspect:

#### **a) spécificité réactionnelle**

Une enzyme ne peut catalyser qu'un type de réaction donné, cette spécificité sert de base à la classification de ces catalyseurs biochimiques.

#### **b) spécificité quant au substrat**

Toute réaction enzymatique implique la fixation du substrat en des points bien précis de la protéine enzymatique. Cette fixation se fait par établissement de liaisons de type hydrogène, hydrophobes ou Vander-waals. La conformation de la protéine enzymatique est telle qu'elle ne reconnaît qu'un type de substrat. Certains enzymes présentent une spécificité stricte et sont capables de se lier à un substrat. D'autres enzymes, au contraire, peuvent fixer des substrats différents, mais de même type de réaction chimique [2].

### **I.12. Classifications des enzymes**

Les enzymes sont classées et nommées en fonction de la nature des réactions chimiques qu'elles catalysent. Il ya six classes principales de réactions catalysées par les enzymes, ainsi qu'un certain nombre de sous classe et de sous-sous-classes a l'intérieur de chaque classe. Chaque enzymes se voit assignée noms et une classification a quatre chiffres (Donald Voet et Judith G. Voet, 1988) [3]

#### **I.12.1. Enzymes Commission**

La nomenclature EC (EC est sigle d'enzyme commission nombres), la commission des enzymes est la classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. En tant que système de nomenclature des enzymes, chaque numéro EC est associé à un nom recommandé pour l'enzyme correspondante.

Chaque code d'enzyme consiste en les lettres majuscules <<EC>> suivies de quatre nombres séparé par des points. Ces nombres représentent chacun une étape dans la précision de la classification de l'enzyme. Par exemple l'enzyme tri peptide amino peptide a la code EC 3.4.11.4 qui est construit comme suite: 3 signifie une hydrolase (enzyme qui utilisent l'eau pour détruire une autre molécule), 3.4 signifie hydrolase agissant sur des liens peptidiques,

3.4.11. implique celles qui détachent un acide aminé amino-terminal d'un polypeptide et  
 3.4.11.4 implique celles qui détachent cet acide aminé amino-terminal d'un tripeptide.

Les quatre nombre de la nomenclature EC des enzymes désignent chacun une caractéristique de l'enzyme qui permet de l'identifier. Le premier nombre de la nomenclature EC indiqué le type de réaction catalysé, le seconde le substrat générale impliqué lors de la réaction, le troisième le substrat spécifique implique et le quatrième le numéro de série de l'enzyme [3].

**Tab 2: Classification des enzymes par l'enzyme commission "EC"**

<b>1- OXYDO-REDUCTASES</b>  (oxydases, déshydrogénases)  Glucose oxydase GOD  -L-lactate déshydrogénase LDH	E.C.1.1.3.4       E.C.1.1.27
<b>2-TRANSFERASES</b>  (Méthyle, carbonyle, acyle, amine, glycosyl, phosphoryle)	E.C.2.4.1.1
<b>4-LYASES</b>  Carboxylases:  Oxalate décarboxylase ammonia-lyases  -aspartateammonia- lyase	E.C.4.1.1.3      E.C.4.3.1.1
<b>5-ISOMERASES</b>  Race mases, epimérase:  -Alanine racé mase  -lactate racé mase	E.C.5.1.1.1    E.C.5.1.2.1  E.C.5.3.1.18

6-LIGASES	E.C.6.1.1.1
-Tyrosine –Trana ligase	E.C.6.3.1.
Glutamate-ammonia ligase	

Chaque enzyme est classé des 6 catégories et numéroté: le glucose oxydase E.C.1.1.3.4

Un excellent index permet de trouver l'enzyme recherche, la réaction catalysée et quelques références faciles à trouver [1].

### I. 12.2.Types de réactions catalysés par les diverses classes d'enzyme

**1- Oxydoréductases:** elles catalysent les réactions d'oxydoréduction: transfert d'H<sub>2</sub> ou d'électrons d'un donneur: qui oxydé vers un accepteur qui est réduit.

**2-les transférases:** elles catalysent des réactions de transfert de radicaux ou de groupement (méthyle, hydrox méthyle, carboxyle, acyle glycolyse, amine,etc.).

**3-Les hydrolases:** elles provoquent l'hydrolyse de divers types de liaisons: ester, acétal (osidique), amide (peptidique).....etc.

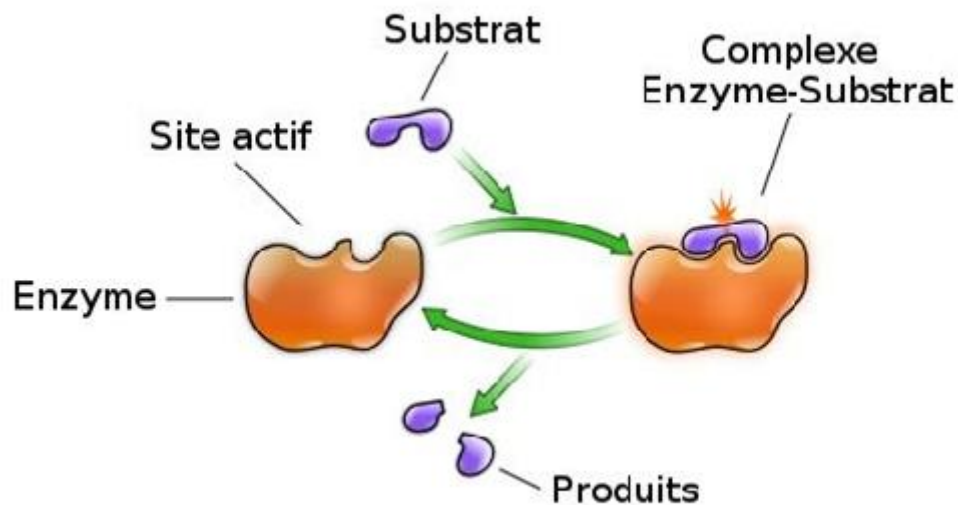
**4- les lyases:** ce sont des enzymes qui rompent les liaisons (C-C, C-O)

Ou autres par des moyens différents de l'hydrolyse ou de l'oxydation, avec création d'une double liaison sur l'un des fragments. Quand elles agissent en sens inverses- condensation de deux molécules avec disparition d'une double liaison on les désigne sous le nom de 'SYNTHETASES'.

**5- Les isomérases:** Elles catalysent les réactions d'isomérisations: racémisation, épimérisation, isomérisations (cis-trans), ou également modifications intermoléculaires telles que transfert de groupement ou oxydation.

**6- Les ligases:** ce sont des enzymes catalysent la réaction d'union de deux molécules couplées avec la rupture, sans intervention d'eau, d'une liaison pyrophosphorique dans l'ATP ou éventuellement dans un nucléotide tri-phosphorique du même type [2].





**Fig. 1 : Le site actif d'une enzyme est le lieu de réaction enzymatique [5].**

### **I.12.3. Structure des enzymes**

Les enzymes sont le plus souvent des protéines, et sont donc constituées de chaînes d'acides aminés. Parfois, les activités enzymatiques sont portées par des ARN, et sont dans ce cas appelées des ribozymes.

La partie importante de l'enzyme est constituée du site actif. C'est dans ce site, qui prend souvent la forme d'une cavité, que se fixe le substrat qui pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de transformer en produit.

Chaque enzyme protéique possède une structure adaptée à sa fonction, et peut être sous forme monomérique, alors que certains à contrario sont actifs sous forme dimériques, voire plus. Ils peuvent alors s'associer à plusieurs chaînes protéiques codées par le même gène (homo dimère) ou codées par des gènes différents (hétéro dimère).

### **I.13. Cinétique Enzymatique**

L'étude de la cinétique enzymatique regroupe un ensemble de méthodes qui donnent les premiers outils dans la compréhension du fonctionnement des enzymes. L'analyse cinétique fournit peu de renseignements sur les mécanismes catalytiques mais permet de mettre en évidence les paramètres fondamentaux de la spécificité des enzymes, de l'affinité pour les substrats et des inhibiteurs. Elle se propose d'établir des relations entre la vitesse de la réaction et

concentration des substrats ou inhibiteurs ainsi que de quantifier l'influence de certains paramètres tels que PH, température et effecteurs [4].

### **I.13 .1. La mesure de l'activité enzymatique**

Elle est mesurée à partir de la quantité de produit constitué ou de réactif disparu par unité de temps. L'affinité de l'enzyme pour son substrat est donnée par la constante de Michaelis

Elle est exprimée en UI (Unités internationales), sachant qu' 1U.I=1 mole de substrat consommée par unité des temps.

### **I.13. 2. Facteurs influençant l'activité enzymatique**

#### **I.13.2.1. Température**

Pour des températures comprises entre 10 et 60°C environ, une réaction enzymatique (comme toute réaction chimique) voit sa vitesse de réaction augmenter.

Les enzymes étant des protéines, elles sont dénaturées à partir d'une certaine température (autour de 60°C).

La perte de la structure tridimensionnelle entraîne une perte fonction et donc une chute de l'activité enzymatique.

Chaque enzyme est caractérisée par une température optimale pour laquelle son activité enzymatique est maximale.

#### **I.13.2.2. pH**

Exemple des enzymes digestives.

Les enzymes de la digestion des protéines ont des pH optimums différents pour s'adapter aux conditions de pH qui régent dans la lumière aux différent étages du tube digestif

Ainsi l'activité de la pepsine est maximale pour un milieu très acide comme celui de l'estomac ou elle est sécrétée.

Au contraire les enzymes pancréatiques comme l'amylase et la trypsine, ont un pH optimum d'action plus alcalin car dans le duodénum ou elles exercent leur activité le pH est normalement proche de pH 8.

#### **I.13.2.3. Concentration en substrat et en enzymes**

#### **I.13.2.4. Présence de cofacteurs**

#### **I.13.2.5. Effecteurs: présence d'activateurs ou d'inhibiteurs**

Un effecteur est une substance chimique qui modifié l'activité enzymatique (c'est-à-dire la cinétique d'une réaction enzymatique).

Les effecteurs ont :

- soit un effet réversible : l'effet ne se manifeste qu'en présence de l'effecteur et disparaît avec l'élimination de l'effecteur;
- soit un effet irréversible : l'effet peut augmenter avec le temps de contact entre l'enzyme et l'effecteur et persister plus ou moins longtemps après élimination de ce dernier (inactivation).

On distingue deux types d'effecteurs:

- un activateur est un effecteur qui augmente l'activité enzymatique. Ce sont des molécules ou des ions qui s'associent à l'enzyme ou complexe ES pour augmenter la vitesse des réaction enzymatiques.

On considère différents types:

- les activateurs vrais qui sont en général des ions métalliques;
- des ions anti-inhibiteurs (cas de l'ion  $CN^-$  qui lève l'inhibition exercée sur l'enzyme par les sels de cuivre);
- des activateurs de pro enzymes (zymogènes);
- un inhibiteur est effecteur qui diminue l'activité enzymatique.

Deux types d'inhibiteurs agissent au niveau de la réaction enzymatique:

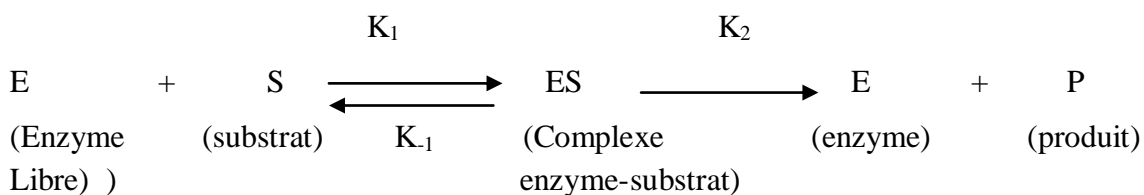
- des inhibiteurs irréversibles (covalents).l'inhibiteur ne peut plus se dissocier de l'enzyme.

Exemple : blocage d'une fonction  $-OH$  du site actif

- des inhibiteurs réversibles également appelés effecteurs Michaélis.

### I.13.3. l'activité enzymatique et la loi de vitesse: l'équation de Michaélis-Menten

L'hypothèse de Michaélis-Menten(1913) est que l'enzyme forme un complexe intermédiaire avec le substrat. Le complexe est instable et se décompose pour donner le produit. Cette hypothèse traduite par le mécanisme réactionnel le plus simple:



La réaction est considérée au début, c'est-à-dire quand peu produit (P) s'est accumulé. De façon à ce que la réaction en retour soit négligeable. De plus, on admet que l'on a atteint

l'état stationnaire. Soit (E), (S), (ES), (P) les concentrations des différentes espèces au temps t. si l'on admet que la concentration en enzyme est beaucoup plus petite que celle de substrat et que le taux d'avancement de la réaction est faible de façon à pouvoir négliger la variation de la concentration en substrat; la vitesse de la réaction.

$$V = \frac{d[p]}{dt} = K_2 [ES] \quad (I.1)$$

L'état stationnaire implique que la concentration de ES reste constante pendant la mesure de la vitesse. Donc:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - k_2 [ES] - k_{-1} [ES] = 0 \quad (I.2)$$

$$[E] = \frac{k_{-1} + k_2}{K_1} \frac{[ES]}{[S]} \quad (I.3)$$

Or la quantité totale d'enzyme  $[E]_0$  ne varie pas. Donc:

$$[E]_0 = [E] + [ES] = [ES] \left[ 1 + \left( \frac{k_{-1} + k_2}{K_1} \right) \frac{1}{[S]} \right] \quad (I.4)$$

Et la vitesse devient :

$$V = \frac{K_2 [E]_0}{1 + \left( \frac{k_{-1} + k_2}{K_1} \right) \frac{1}{[S]}} \quad (I.5)$$

Ainsi l'étude de la vitesse en fonction de  $[E]_0$  et de  $[S]$  permet de déterminer  $k_2$  et

$(k_{-1} + K_2)$  Mais pas  $k_1$  et  $k_{-1}$ . Le coefficient  $(k_{-1} + K_2)$  est appelé **constante de Michaelis** ( $k_m$ ) et l'expression de la vitesse devient:

$$V = \frac{K_2 [E]_0}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (I.6)$$

Si la formation et la dissociation du complexe (ES) sont rapides par rapport à la transformation décrite par  $K_2$ , la constante de Michaelis est voisine de la constante de dissociation du complexe (Enzyme-Substrat) (ES) :  $K_s = \frac{k_{-1}}{K_1}$ .

L'étude de l'influence de la concentration du substrat sur la vitesse montre qu'à concentration élevée ( $S$ ) par rapport à ( $K_m$ ) (condition saturante), la vitesse est constante. En effet, si  $[S]$  est très grand par rapport à ( $k_m$ ), la vitesse devient:

$$V = k_2 [E]_0 = V_{\max} \quad (I.7)$$

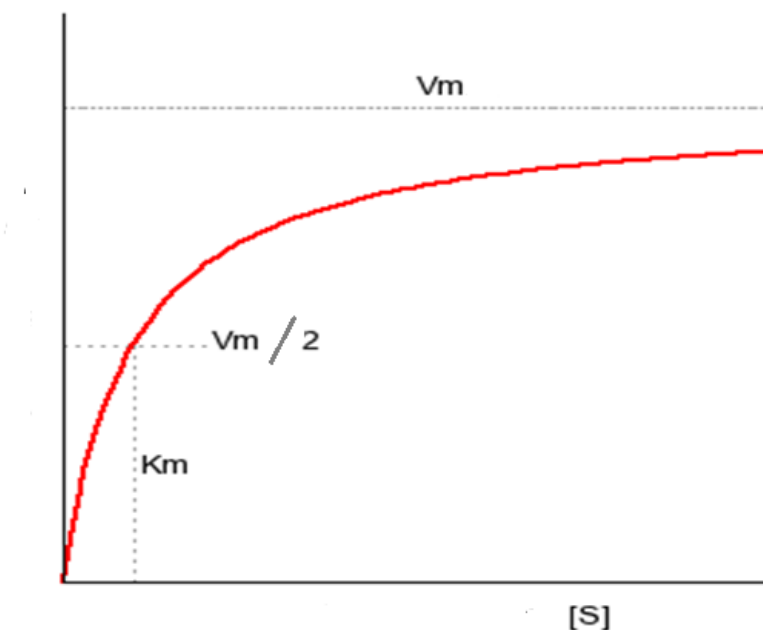
La moitié de cette vitesse maximale est atteinte quand  $[S]$  est égal à  $k_m$  (fig.2). l'équation (6) alors l'équation de MICHAELIS-MENTEN:

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{V_{\max}}{[S]}} \quad (I.8)$$

#### I.13.4. Discussion du modèle de Michaélis-Menten

Si le substrat est en faible concentration, c'est-à-dire si la concentration en substrat est très largement inférieure à  $k_m$  ( $[S] \ll k_m$ ), alors la vitesse est:

$$V = \frac{V[S]}{K_m} \quad (I.9)$$



**Fig.2: Représentation de l'équation de Michaélis-Menten**

Dans ce cas, la vitesse est fonction de la concentration en substrat.

Si le substrat est en forte concentration, c'est-à-dire si la concentration en substrat est très largement supérieure à  $k_m$  ( $[S] \gg k_m$ ), alors la vitesse de la réaction est égale à la vitesse maximale donc  $V=V_m$ .

Dans ce cas, la vitesse ne dépend plus de la concentration en substrat.

L'étude des équations précédentes montre que  $k_m$  peut être relié à la vitesse maximale  $V_m$  mais aussi à l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Si  $[S] = k_m$  en utilisation l'équation (II.8), alors  $V=V_m/2$ . Cela signifie donc que  $k_m$  représente la concentration en substrat pour la laquelle la vitesse de la réaction atteint la moitié de sa valeur maximale.

### **$K_m$ est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat**

Sachant que  $\frac{K_1}{K_{-1}} = k_{AFF}$  l'équation de  $k_m$  devient:

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} = \frac{1}{K_{AFF}} + \frac{K_2}{K_1} \quad (I.10)$$

L'étude des réactions enzymatiques montre que généralement la vitesse de catalyse est lente par rapport à celle de formation du complexe Enzyme-substrat. Ainsi la constante catalytique  $K_2$  est très inférieure à la constante d'association  $K_1$ . Le deuxième terme de l'équation précédente peut alors être considéré comme très faible d'être négligé. On peut alors assimiler  $K_m$  à  $1/K_{AFF}$ .  $K_m$  représente donc l'inverse de la constante d'affinité d'une enzyme pour son substrat.

La valeur de  $K_m$  se situe entre  $10^{-1}M$  et de  $10^{-7}M$  en général et dépend de facteurs comme la  $T^\circ C$ , la force ionique. Nous évoquerons plus loin l'importance physiologique dans le métabolisme de la valeur du  $K_m$  selon le contexte cellulaire. L'approximation de l'état stationnaire permet de dire que pour des valeurs données de la concentration en enzymes  $[E]$  et de la concentration en substrat  $[S]$ , la concentration en complexe enzyme-substrat  $[ES]$  est constante.

Ainsi:

$$V = V_1 + V_2 \quad (I.11)$$

Soit:

$$K [E] [S] = (K_{-1} + K_2) [ES] \quad (I.12)$$

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_2} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (I.13)$$

Nous avons vu que  $k_{-1}/K_1 = k_s$ , constant de dissociation du complexe ES. On peut écrire alors:

$$K_m = \frac{K_s + K_2}{K_2} \quad (I.14)$$

On lorsque  $k_s$  diminue, l'affinité de l'enzyme pour son substrat augmente.  $K_m$  permet donc de mesurer l'affinité de l'enzyme pour son substrat à condition que  $K_2/K_1$  soit faible par rapport à  $k_s$  c'est-à-dire que  $k_2$  soit faible par rapport à  $k_1$ .

Si  $k_m$  est faible, alors  $[ES]$  est élevée donc l'affinité est forte vice versa.

Si  $k_{-1}$  est très largement supérieur à  $k_2$  cela signifie que la dissociation ES est plus rapide que la formation de E+P. dans ce cas,  $k_m = k_{-1}/K_1$ . la constante de dissociation de ES est:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_{-1}}{K_1} = k_m \quad (II.15)$$

Dans ce cas,  $K_m$  est une mesure de la stabilité du complexe ES.

Au contraire, si  $k_{-1}$  est faible par rapport à  $k_2$ , c'est-à-dire que la transformation du complexe ES est plus rapide que sa dissociation, alors c'est  $k_1$  qui limite la vitesse globale de la réaction. Ainsi la vitesse maximale de la catalyse est limitée par la vitesse avec laquelle les molécules d'enzymes et les molécules de substrat se rencontrent dans le milieu. C'est pour cela qu'il existe des complexes enzymatiques, groupement d'enzymes organisé de telle sorte que le produit d'une enzyme  $E_1$  soit rapidement rencontré par l'enzyme  $E_2$  suivantes.

## I.14. Enzymes Immobilisées

### I.14.1. But et principe de l'immobilisation

Les enzymes étant solubles dans l'eau et très fragiles, leur purification après usage ne peut généralement être envisagée favorablement, surtout à l'échelle industrielle. Pour différentes raisons, y compris la valeur commerciale élevée des enzymes, on s'est efforcé de mettre au point des méthodes permettant leur réutilisation, une fois la réaction enzymatique achevée.

**I.14.2. Principales méthodes d'immobilisation**

Il existe cinq méthodes générales d'immobilisation des enzymes. Ce sont l'adsorption, la micro encapsulation, l'inclusion, la réticulation et la fixation chimique sur un support insoluble [6].

**1) Adsorption:** l'adsorption physique d'un enzyme sur solide est probablement le moyen simple pour préparer des enzymes immobilisées la méthode met en jeu un grand nombre de force d'interaction de faible énergie, entre le support et la protéine: interaction de van der waals, liaisons hydrogène ou liaisons hydrophobes. Dans le cas de supports non poreux sur lesquels le biocatalyseur se fixe en surface, il se forme au voisinage des particules liées. Lorsque le matériau est poreux, les macromolécules protéiques pénètrent dans les pores.

Si le support est porteur de charges électriques, les liaisons ioniques qui peuvent s'établir en plus force. Physique d'adsorption, confèrent au complexe une stabilité plus grande, il est également possible d'accroître la charge de la protéine par fixation de groupes fortement dissociés, ce qui a pour résultat de renforcer le nombre et la solidité des liaisons enzyme-support.

La préparation des complexes actifs s'effectue par simple mise en contact du support et de l'enzyme. Suivie d'un lavage pour éliminer les macromolécules les plus faiblement retenues.

Différents paramètres influent sur la quantité d'enzyme fixée et sur la solidité des liaisons créées:

➤ **Concentration en protéine enzymatique**

D'une manière générale, la masse liée au support augmente avec la concentration de l'espace adsorbée, jusqu'à un palier de saturation. Mais l'allure de la courbe dépend. A la fois de la nature de l'enzyme et de celle du support.

➤ **pH:** Du pH du milieu dépendent et la nature des charges portées par le support et par les groupements fonctionnels ionisables des résidus d'acides aminés de la protéine. Ses modifications vont donc fortement influencer la quantité d'enzymes fixée par liaisons ioniques.

De brusques variations du pH entraînent une désorption importante de l'enzyme.

➤ **Force ionique du milieu:** les sels en faible concentration augmentent la solubilité des protéines et exercent, de ce fait, une action défavorable sur la fixation. En revanche, lorsque le support est électriquement chargé, l'accumulation au voisinage



immédiat du support d'ions salins de signe appposé, peut entrainer une précipitation locale de la protéine dans la microenvironnement crée.

- **Température:** sous l'effet d'une élévation de température, il se produit un début de déploiement de la structure tridimensionnelle de la protéine, avec démasquage d'un certain nombre de site d'interaction potentiels, et la probabilité de création de liaison avec le support augmente. On est toutefois limité par le risque de perte d'activité de l'enzyme.
- **Taille des particules et nature du support:** la masse d'enzyme adsorbée croit avec l'air spécifique et donc avec la finesse des particules du support, mais en de ça d'une certaine taille, les risques de colmatage dans les réacteurs deviennent importants. On observe que les supports riches en sites hydrophile sont plus adsorbants que les supports hydrophobes et donnent des complexes plus stable. à cause de la couronne polaire formée par les groupements hydrophiles des acides aminée, à la surface des macromolécules protéiques [2].

## 2) Immobilisation par micro-encapsulation

L'enzyme en solution aqueuse est enfermé dans des microcapsules sphériques, dont la paroi est une membrane semi-perméable qui peut être liquide ou solide. Cette membrane retient l'enzyme, mais laisse passer le substrat(S) et le produit(P). Les microcapsules, dont le diamètre moyen est de 50µm, peuvent être réalisées par polymérisation inter faciale. Une extension de la méthode d'immobilisation par micro encapsulation consiste à enfermer une solution aqueuse d'enzyme dans les cavités d'une fibre de tri acétate de cellulose par exemple [7].

## 3) Immobilisation par inclusion

L'enzyme est dissous dans une solution aqueuse d'un monomère acrylique (l'acrylamide, le plus souvent) et d'un agent réticulant (la N, N-méthylène-bis-acrylamide). La polymérisation des comonomères est ensuite effectuée à basse température et de cette façon, on obtient un réseau macromoléculaire tridimensionnel dans les mailles du quel l'enzyme se trouve retenu de façon plus ou moins efficace.

La méthode d'immobilisation par inclusion présente les avantages d'être simple et économique et de s'appliquer à des enzymes extrêmement divers (glucose oxydase, invertase, aminocacylase, amylase). Mais cette méthode présente de sérieux inconvénients: une fraction

négligeable de l'enzyme emprisonné à tendance à passer en solution ou cours de l'utilisation, et par ailleurs, cette méthode n'est utilisable que pour des substrats de petite taille (masse moléculaire <5000).

De plus on observe souvent une dénaturation importante de l'enzyme, qui serait due à une réaction de l'acrylamide avec ceux des groupements fonctionnels de l'enzyme qui sont responsable de l'activité catalytique, les groupements thiols [8].

#### **4) Immobilisation par réticulation**

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

Cette méthode a l'avantage de fournir des dérivés insolubles constitués presque exclusivement d'enzyme. Malheureusement, les produits sont gélatineux et difficiles à filtrer, et leur propriétés mécaniques sont médiocres. En outre, une très importante perte d'activité enzymatique accompagne la réticulation [7].

#### **I.14. Principaux domaines d'utilisations des enzymes dans l'industrie**

- L'industrie des détergents (exemple d'application potentielle: des détergents qui contiendraient des enzymes fonctionnelles à 100°C°)
- L'industrie de l'amidon
- L'agroalimentaire (alimentation humaine et animale)
- La chimie fine
- Le secteur de la santé
- Les domaines de l'analyse et des capteurs [9].

##### **I.14.1. Les nouveaux domaines en "omique" et l'ingénierie métabolique**

- les avancées des techniques pour contrôler l'expression des gènes (exemple expression de gènes hétérologues, "gènes knockouts")
- les avancées des techniques pour contrôler la synthèse de protéines (exemple l'interférence ARN).
- les données issues de la génomique, de la transcriptomique, de la protéomique, de la **métabolomique**.

Les connaissances issues des modèles élaborés de systèmes biologiques (reconstruction métabolique à l'échelle d'un génome) ont contribué au développement de l'ingénierie

métabolique afin de transformer des composés organiques industriels pour produire ou transformer des composés organiques industriels. [8]

### **I.15. Exemple de précurseurs de produits industriels ou pharmaceutiques synthétisés par des micro-organismes modifiés**

Introduction de fragments d'ADN de 36.000 paires de bases codant pour 20 enzymes et/ou protéines impliquées dans le catabolisme d'alginate pour la production de biocarburant à partir d'algues.

-dérivés d'intérêt pharmaceutique:

1-l'antioxydant naringenine (produite par *Escherichia coli*)

2-anti-cholestérol lovastatine, précurseur de la simvastatine (produit par *Aspergillus terreus*)

3-production par *Saccharomyces cerevisiae* de l'acide artemisinique (terpénoïde), précurseur de l'artémisinine utilisée contre la malaria.

-synthèse de butane diols.

-le 1,3-propane diol est naturellement produit par certaines bactéries lors de la fermentation du glycérol. Il est utilisé pour la synthèse de poly-méthylène téréphtalate (vendu sous le nom déposé "Sorona" par Dupont).

-la diamine putrescine, utilisée pour la synthèse du nylon 4,6, a été produite par *Escherichia coli* après délétion d'un gène codant un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress.

-synthèse des « monomères 3-hydroxypropionate et 3-hydroxybutyrate et leurs polymères et respectifs.

-synthèse des polymères bactériens poly- hydroxy-alkanoates.

### **I.16. Classification des Réacteurs**

On peut les classer selon

-La nature des phases en présence, dont on trouve les systèmes monophasiques (système gazeux, système liquide,...) Les systèmes polyphasiques (ou hétérogènes) (mélange liquide-liquide, système liquide-gaz, système gaz-solide et système gaz-solide-liquide).

-le mode de fonctionnement, dont on parle des réacteurs qui fonctionnent en discontinu: on les qualifie parfois ces appareils de système fermés et continu, qualifiés de système ouverts.

-le type d'écoulement: on est amené à définir deux modèles d'écoulement bien caractéristiques, l'écoulement de type piston et l'écoulement à travers un récipient parfaitement mélangé [10].

Selon cette classification on distingue les réacteurs suivants :

**I.16.1. Réacteurs monophasique:** qui sont regroupé en:

**-Autoclaves:** C'est l'appareillage le plus simple que l'on puisse envisager pour réaliser une transformation chimique. Il consiste en un récipient dans lequel les réactifs sont introduits au début de l'opération; après mise en condition de température et de pression.

**-Réacteur parfaitement agités:** dans la pratique industrielle, les réacteurs parfaitement agités sont de simples récipients cylindriques munis d'un dispositif d'agitation interne efficace ainsi que d'une tubulure d'alimentation et d'une tubulure de soutirage.

**-Réacteur tubulaires:** très répandus à l'échelle industrielle. Ces réacteurs sont exploités pour les réactions en phase gazeuse homogène nécessitant une température élevée, des conditions d'écoulement piston (temps de séjour compris entre une demi-seconde et une heure) et un important débit d'échange thermique [11].

**I.16.2. Réacteur à deux phases:** parmi les plus répandus dans cette catégorie, on trouve les réacteurs à deux phases fluides et les réacteur catalytique.

**-Réacteur à deux phases fluides:** il s'agit habituellement des réacteurs dans lesquels sont présentes soit une phase gazeuse et une phase liquide, soit deux phases liquides non miscible. Les réacteurs gaz-liquides les plus courants sont: les colonnes à bulles, à plateaux et à garnissage

**-Réacteur catalytiques:** ce sont les plus répandus, ils se distinguent à la fois par le mode de chauffage, le mode de travail (continu, périodique, cyclique) ; la nature de catalyseur (solide, liquide), le mode de récupération ou de régénération du catalyseur.

On distingue trois types principaux de réacteur catalytiques: à lit fixe, à lit mobile et à lit fluidisé.

Les principaux appareils utilisés des bioréacteurs sont les cuves mécaniquement agitées, aérées ou non, les colonnes à billes à bulles et air lifts et enfin, les réacteurs à lit fixe ou fluidisé [11].

**a) Cuve mécanique agitée**

La cuve mécanique agitée est le réacteur choisi lorsque tous les acteurs de la bio-réaction (substrat, enzymes, micro-organismes) sont dans une phase liquide unique. Sous

réserve d'une agitation suffisante pour que la phase liquide soit parfaitement mélangée. Le seul phénomène à prendre en compte dans le dimensionnement et la conduite du bioréacteur est la vitesse du bioréacteur. La cuve agitée est employée pour effectuer des réactions enzymatiques avec des enzymes en solution ou encore des fermentations anaérobies [11].

#### **b) Cuve mécaniquement agitée aérée**

La cuve mécaniquement agitée aérée est utilisée pour la production de micro-organisme en aérobiose. L'oxydation qui est très peu soluble dans les milieux de fermentation (8 mg/l à 25°C dans l'eau est alors le substrat limitant).

La vitesse globale de formation des micro-organismes est la résultante du couplage entre leur vitesse propre de croissance et la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gaz dispersée vers milieu de fermentation [11].

#### **c) Colonne à bulles et réacteur air lift**

La colonne à bulles est un réacteur également utilisé pour la production de micro-organisme en aérobiose. Les bulles d'air injectées à la base de la colonne apportent l'oxygène aux micro-organismes et mélangent la phase liquide au cours de leur mouvement ascendant. Comme pour la cuve mécaniquement agitée aérée, la vitesse globale de formation des micro-organismes est la résultante du couplage entre leur vitesse propre croissance et la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gaz dispersée de fermentation [11].

#### **d) Réacteur à couche fixe et couche fluidisé**

L'usage d'enzymes en solution entraîne leur perte après réaction, puisqu'il est impossible de les extraire du milieu réactionnel. L'immobilisation d'enzyme à la surface ou à l'intérieur d'un support solide est une technique permettant de les séparer facilement du milieu réactionnel liquide et donc de les réutiliser.

Les réacteurs à enzymes immobilisés sont exclusivement des colonnes percolées par le liquide, à couche fixe ou couche fluidisée de particules solides. En effet, le recours à une cuve mécaniquement agitée est à proscrire, car on peut difficilement dépasser un taux de solide de 10% dans un tel appareil, alors que ce taux est l'ordre de 60% dans une colonne garnie de particules solides sphériques. D'autre part, dans une cuve agitée, les chocs de particules solides sur le mobile d'agitation peuvent entraîner leur destruction.

La vitesse globale de la réaction enzymatique est ici la résultante du couplage entre la vitesse de transfert du substrat du cœur de la phase liquide à l'interface des particules, la vitesse de diffusion du substrat à l'intérieur des particules et la vitesse intrinsèque de la bio-réaction. Ces trois vitesses sont heureusement rarement toutes les trois du même ordre de grandeur [11].

### **I.17. Les application des transformations enzymatiques**

Au cours des vingt dernières années, de nouvelles technologies mettant en œuvre l'immobilisation d'enzymes de cellules vivantes ont été développées dans les différents secteurs des bios industries. Ce sont d'abord des enzymes qui sont immobilisées dans des supports pour transformer des bio-molécules. Ensuite plusieurs procédés de fermentation et de bioconversion sont maintenant effectués dans des réacteurs à micro-organismes fixés. C'est enfin le secteur des cultures de cellules animales, qui ont souvent besoin d'un support pour leur croissance, qui connaît de nombreuses innovations en matière de bioréacteurs

Tous les domaines d'application des biotechnologies sont concernés. Parmi les opérations de synthèse, on peut citer la production de métabolite tels que les agents de saveurs, exhausteurs de goût, des acides aminés de forme L surtout, l'utilisation des enzymes à bouleversé la production des matières sucrantes.

En technologie alimentaires, elles sont employées dans tous les secteurs industriels (laiterie, fromagerie, industries des boissons, des céréales, de la viande,...etc.) en agroalimentaire, avec comme principale application l'isomérisation du glucose

#### **I.17.1.Application dans les réactions de synthèse**

L'utilisation d'enzymes en technologie alimentaire, pour la transformation de la matière première, n'est une nouveauté technologique: la fabrication de pain, de boissons ou de fromages faisant depuis longtemps appel à de tels procédés. Cependant, depuis quelques années, le développement de nouveau produit alimentaires d'une part, leurs exigences technologiques et nutritionnelles de l'autre, ont créé de nouveaux besoins et un nouveau marché, celui des produits de synthèse utilisés dans les industries de seconde transformation: acide organique, composés responsables des arômes et saveur, édulcorants, corps gras, corps gras à valeur nutritionnelle déterminée. Ce produit obtenu d'abord par extraction, fermentation ou synthèse organique, à l'heure actuelle de plus en plus par synthèse enzymatiques [12].

**a) Synthèse de composés responsable de la flaveur et des arômes**

Les micro-organismes utilisés traditionnellement dans la fabrication des produits alimentaires produisent, par l'intermédiaire de leurs enzymes, des métabolites (acides, alcools lactones, ester, aldéhydes, cétones,...etc.) responsables majeurs de la flaveurs. C'est d'ailleurs l'accumulation de ces composée qui caractérise le goute final du produit. Les micro-organismes et les enzymes constituent donc une excellente source de production de ce type d'ingrédients. L'approche enzymatique est plus intéressante pour la synthèse de certaines substances responsable d'une flaveur particulière, citons pour mémoire la synthèse de composé carbonyles de faible poids molécules comme le di acétyle par décarboxylation de l'acide  $\alpha$  acétolactique ou l'acétaldéhyde par oxydation de l'éthanol déshydrogénase (Raymand 1984). Signalons enfin la synthèse du composé responsable de l'arome de moutarde: le goute piquet du moutard, du cresson ou du radis noir est du à la formation des huiles de moutarde ou isothiocyanates à partir des précurseurs (glucosinolates) sous l'action de la myrosinase utilisant la myrosinase fixée [12].

**b) Synthèse de composés exhausteurs de gout**

- **Synthèse de 5' mono nucléotides:** deux nucléotides exhausteurs de gout, l'inosine 5' monophosphate (5' IMP) et le guano sine 5' mono phosphate (5'GMP), sont actuellement produit par hydrolyse des acides nucléiques suivie d'une désamination. Ainsi l'utilisation d'une 5' phosphodiesterase bactérienne permet-elle de libérer les nucléotides (5' AMP, 5' GMP, 5'UMP); une 5'AMP désaminase libérera dans le milieu 5'IMP [11].

- **Le glutamate mono sodique:** le glutamate de sodium est un des composés exhausteurs de gout produit en très grandes quantités (plusieurs milliers de tonnes produites et utilisées) dans le monde la quasi totalité est synthétisée pour l'heure par fermentation microbienne avec d'autant plus d'intérêt que seul l'isomère L est produit et excrété dans le milieu de culture. Signalons, cependant que les techniques utilisant des hydrolases fixées permettent de fabriquer l'acide L. glutamique par hydrolyse du DL propionate 5'hydantoine [12].

**c) Produit d'acide organique et acide aminés**

La percée du génie enzymatique dans ce secteur d'activité est faible à cause de la concurrence des procédés chimiques et micro biologiques. Néanmoins, nous pensons qu'il s'agit plus d'une déficience en investissements intellectuel et économique que d'une réalité scientifique, ce secteur d'activité étant un de ceux qui à terme est porteur des plus belles promesses.

**d) Synthèse d'édulcorants**

- **synthèse d'aspartame:** l'aspartame est un dipeptide constitué d'acide L-aspartique et de L-phénylalanine méthylène.

En réalité, trois voies sont à l'heure actuelle utilisées pour sa synthèse. La synthèse chimique, la synthèse enzymatique et la voie directe issue de génie génétique et utilisant la méthode de « L'ADN » recombinant. En ce qui concerne les procédés enzymatiques, plusieurs techniques ont été décrites. Isowa et al (1979) ont été les premiers à utiliser une métalloprotéinase, la thermolysine pour former une liaison peptidique entre le N-benzoyloxycarbonyl L-aspartate (Z-L Asp) et la L-phénylalanine méthyle terminale (Z-L PheOMe) selon l'équation ci-dessous:



-**Synthèse de stéviolside:** le stéviolside est un glucoside édulcorant extrait normalement de *Stevia rebaudiana*. Sa structure chimique naturelle fait qu'il présente normalement un goût amer. Par action d'une  $\alpha$ -glucosidase le goût amer est supprimé et le produit obtenu présente un pouvoir sucrant environ 2000 fois supérieur à celui du saccharose.

-**Synthèse de cyclodextrines:** les cyclodextrines sont comme l'indique leur nom, des dextrines cyclisées, c'est-à-dire des polymères de six, sept huit (ou plus) molécules de glucose unies par des liaisons 1-4; selon le degré de polymérisation on obtient des  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\delta$ -cyclodextrine; elles sont synthétisées à partir de dextrines ou d'amidon par une enzyme, la cyclodextrine-glycosyl transférase d'origine microbienne ( *Bacillus macerans*, entre autres) (Mercier 1985). leur pouvoir séquestrant vis-à-vis des arômes volatils ( Vincent, 1989) et des huiles essentielles les fait utiliser dans les techniques d'encapsulation moléculaire (extrait d'oignon, fenouil, estragon, ...etc.). À terme, ces mêmes propriétés permettant d'envisager leur utilisation dans la réalisation de catalyseurs enzymatiques artificiels (Maury et Roque, 1986) [12].

**I.17.2 Biosynthèse des polysaccharides**

Divers micro-organismes (et leur mutants déréprimés) synthétisent des polysaccharides d'importance industrielle.

-les dextranes sont produits par des bactéries: *Acetobacter*, streptococcies, *Leuconostoc*. Il s'agit de polysaccharides de degré de polymérisation élevé formés de résidus glucose liés en  $\alpha$  (1-6) avec des branchements en  $\alpha$  (1-4) ou  $\alpha$  (1-3). Les dextranes sont synthétisés à partir du



saccharose par une réaction de transglucosylation, réaction classique de la synthèse des polysaccharides:



Ils sont utilisés dans la fabrication de résines et dans la préparation de plasma et sang artificiels.

-les levanes sont produit également par des bactéries comme les *Bacillus*. Il s'agit de polyfructoses de haut poids moléculaires ( $10^8$ ) formés de résidus fructose liés en  $\beta$  (2-6), avec des branchements en  $\beta$  (1-2). Leur biosynthèse se fait par transfructosylation à partir du saccharose. Ils sont utilisés dans la fabrication de polymères.

-les gammes «xanthanes» sont produit par les *Xanthomonas*. Il s'agit de polymères complexes contenant glucose, Mannose, acide glucuronique et des substituant acétate et pyruvate. Elles sont utilisées comme agent émulsifiants et lubrifiants dans l'industrie chimique, comme agent de récupération dans l'industrie pétrolière ainsi que comme additifs dans de nombreux produit alimentaires.

- Les alginates, polymères d'acides mannuronique et galacturonique, sont habituellement produit par des algues mais ils peuvent également être obtenus à partir de bactéries: *Azotobacter vinelandii* et certains *Pseudomonas*. Il s'agit de polymères d'acides uroniques.

Ils sont utilisés comme gélifiants dans l'industrie alimentaire et l'industrie pharmaceutique mais aussi dans l'industrie textile et du papier.

D'autres polymères sont également intéressants:

-cellulose (*Acetobacter*) utilisée comme épaississant alimentaire;

-Pullulanes, polymères de maltotriose  $\alpha$  (1-4) et de tétraose  $\alpha$  (1-4) liés en  $\alpha$  (1-6), issus d'*aureobasidiumpullulans*, utilisables pour la synthèses de flocculants et de films alimentaires;

-curdlanes, polymères de  $\beta$  (1-3) glucose, issus d'*Alcaligenesfaecalis*, utilisables dans l'alimentation et l'industrie pétrolière;

-scléroglycans, polymères de  $\beta$  (1-3) glucose avec ramification en  $\beta$  (1-6) issus de *sclerotium*, utilisables dans l'industrie pétrolière;

-Exo polysaccharides d'*Erwinia* utilisé dans l'industrie des peintures;

-Mélanges issus d'*Arthrobacter*, *Beijerinckia*, *Erwinia*, *Pseudomonas*

On peut aussi citer les polyesters (*Pseudomonas oleovorans*) utilisables dans l'industrie des plastiques [13].

## **CONCLUSION GENERALE**

Le présent travail consiste à faire une analyse bibliographique sur l'application des bioréacteurs utilisés dans la production du fructose. La modélisation d'un tel type de réacteur nécessite l'utilisation d'un modèle mathématique adéquat. La catalyse enzymatique, et spécialement grâce à la biologie moléculaire, ouvre de nombreuses perspectives d'applications pour la synthèse. Comme toutes les méthodes, elle a des contraintes limitées qui découlent de la nature enzyme. Mais grâce à une meilleure connaissance de la biologie, et par l'exploitation des résultats, ces contraintes peuvent être modifiées de façon à adapter les enzymes aux besoins industriels.

Les principaux résultats trouvés sont les suivants :

La production du glucose est favorisée par une faible charge initiale ce qui conduit à une conversion optimale de 90%. Le dépassement d'une charge initiale de  $1400 \text{ mol/m}^3$  peut conduire l'apparition d'une pression osmotique ce qui influe négativement sur le rendement cinétique.

La vitesse réactionnelle joue un rôle primordiale sur le rendement du bioréacteur en termes de conversion de glucose. D'une manière générale, une vitesse de réaction plus élevée provoque une diminution de la concentration du complexe, alors une diminution de production en fructose. La concentration en glucose augmente, ce qui conduit à une faible production de fructose lorsque on emploie une quantité importante du biocatalyseur. L'étude de l'effet du débit volumique montre que, il est indispensable d'opérer le bioréacteur avec des faibles débits volumiques afin d'améliorer la production en fructose

A l'heure actuelle, les enzymes ont encore contre elles leurs exigences très particulières et leur fragilité. C'est pourquoi leur avenir industriel dépend de solutions qui seront trouvées pour renforcer leur stabilité et les rendre moins sensibles aux facteurs de l'environnement dans lequel elles travaillent. En perspective, il est intéressant et très pratique de compléter ce travail en faisant le travail expérimental afin de balayer un champ plus vaste de données et de pouvoir les confronter avec les résultats du modèle. Ceci dans le but d'améliorer le modèle mathématique pour le rendre plus complet pour ainsi pouvoir l'appliquer dans différentes situations.

## INTRODUCTION GENERALE

On appelle réacteur (ou bioréacteur) tout appareillage permettant de réaliser une réaction chimique ou biochimique, c'est-à-dire de transformer des espèces moléculaires en d'autres espèces moléculaires. Néanmoins, cette appellation est limitée aux cas où la transformation (ou conversion) est effectuée dans le but de produire une ou plusieurs espèces chimiques déterminées ou d'éliminer d'un mélange un ou plusieurs composés.

La connaissance des enzymes, de leur nature, de leur structure et de leur propriétés ainsi que la cinétique des réactions catalysée est fondamentale en biotechnologie mais aussi dans les industries chimiques, agroalimentaires et pour l'agriculture, c'est en effet la connaissance et la maîtrise scientifique des fermentations qui a progressivement fait concevoir l'intérêt d'utiliser non plus le micro-organisme entier mais seulement son principe actif pour réaliser une bioconversion définie d'une substrat biochimique. Les bioconversions sont réalisées soit au moyen d'enzymes libres ou fixées. L'immobilisation des enzymes permet la réutilisation des catalyseurs où le micro-organisme joue le rôle d'un complexe enzymatique. Il y a de nombreuses méthodes pour immobiliser les enzymes. L'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et on trouve des perspectives étonnantes: nombre de procédés classés, reposent sur une exploitation des propriétés particulières de ces mécanismes réactionnels (cinétique de Michaelis-Menten par exemple). Ces procédés sont de plus utilisés dans de nombreux secteurs d'activité, comme les industries pharmaceutiques, alimentaires, et agroalimentaires.....etc.), par exemple le bioréacteur à lit fixe (couche fixe) est utilisé pour la bioconversion des sucres. Dans ces bioréacteurs l'enzyme et par sa grande spécificité d'action et dans les conditions très douces dans lesquelles elle opère joue le rôle de la biocatalyse.

C'est dans ce contexte que nous avons abordé à étudier un bioréacteur utilisé pour la conversion du glucose. Le mémoire est essentiellement structuré en deux principaux chapitres. Le premier chapitre expose une revue bibliographique de différentes méthodes d'immobilisation des enzymes, les propriétés des enzymes ainsi que la cinétique des réactions catalysées par ces dernières, et à la fin un aperçu général sur les bioréacteurs et les différentes applications des transformations enzymatiques. Le deuxième chapitre consiste à une étude numérique de la réaction d'isomérisation de glucose pour la production du fructose. Pour cela, un modèle monodimensionnel, est développé décrivant le comportement d'un bioréacteur mettant en jeu la réaction d'isomérisation. Les principaux résultats et leur interprétation obtenus sont aussi présentés et en fin une conclusion générale.

## LISTE DES FIGURES

Figure n <sup>o</sup>	Intitulé	Page
<b>1</b>	Le site actif d'une enzyme est le lieu de réaction enzymatique	10
<b>2</b>	Représentation de l'équation de Michailis-Menten	15
<b>3</b>	Structure développée des: glucose, mannose, galactose.	29
<b>4</b>	Structure développée des: ac.gluconique et ac .glucarique	30
<b>5</b>	Structure développée du sorbitol	30
<b>6</b>	Structure de forme cyclique	31
<b>7</b>	Structure des: $\alpha$ -D-glucose et $\beta$ -D-glucose	31
<b>8</b>	Forme de Haworth. Les sont ceux de la forme linéaire selon Fischer	32
<b>9</b>	forme Haworth de l' $\alpha$ -D-glucofuranose	32
<b>10</b>	les formes $\alpha$ et $\beta$ du anomères	32
<b>11</b>	(-)-(D)-Fructose	33
<b>12</b>	Schéma du bioréacteur	35
<b>13</b>	Schéma d'un réacteur à enzyme immobilisée à lit fixe	36
<b>14</b>	Volume élémentaire du bioréacteur	38
<b>15</b>	Variation de la concentration selon la hauteur	41
<b>16</b>	Effet de la concentration initiale sur la variation de la concentration en glucose	42
<b>17</b>	Effet de $v_m$ sur la concentration en glucose la hauteur du réacteur	43
<b>18</b>	Effet de M sur la concentration en glucose la hauteur du réacteur	44
<b>19</b>	Effet de Q sur la concentration en glucose la hauteur du réacteur	45

## Liste des tableaux

<b>Tableau n<sup>0</sup></b>	<b>intitulé</b>	<b>page</b>
<b>1</b>	l'efficacité d'un quelque catalyseur biologique	<b>6</b>
<b>2</b>	Les enzyme commission "EC"	<b>8</b>
<b>3</b>	Les paramètres cinétiques et thermodynamique de la réaction	<b>37</b>

## Nomenclature

Symbole	Définition	Unité
S	concentration en substrat	$(\text{mol}/\text{m}^3 \text{ ou } \text{Kg}/\text{m}^3)$
V	vitesse de réaction enzymatique par unité De masse de phase solide	$(\text{mol. Kg}^{-1}.\text{s}^{-1})$
$V_m$	vitesse maximal de réaction enzymatique Par unité de masse de phase solide	$(\text{mol. Kg}^{-1}.\text{s}^{-1})$
H	Hauteur	(m)
$K_m$	constante de Michaelis-Menten	$(\text{mol}/\text{m}^3)$
M	Masse de biocatalyseur	(Kg)
$K_s$	constante de dissociation du complexe	(adm)
[E]	Concentration en enzyme	$(\text{mol}/\text{m}^3)$
[ES]	Concentration en complexe	$(\text{mol}/\text{m}^3)$
[P]	Concentration en produit	$(\text{mol}/\text{m}^3)$
$\Psi$	Concentration adimensionnel	(adm)
Q	Débit volumique	$(\text{m}^3/\text{s})$

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]: Claude Bursteine; biotechnologie enzymatique; édition économique ,2000.
- [2]: Arnaud Alain, Berna Max, Berset Claudette, Bocquet Joëlle, Bouix Marielle, Bouvier Miel, Vandecasteele Jean-Paul; Biotechnologie, 3<sup>ème</sup> édition ,1988.
- [3]: Donald Voet et Judith G .Voet, 1998.
- [4]: Alain Arnaud, Daniel Ballerini, Marielle bouix, Pascal Briand, Claude Mawas, Dominique vandergheynst, Biotechnologie, 5<sup>ème</sup> édition TEC et DOC;1999.
- [5] : réaction enzymatique. Yassine Mrabet, Wikime, CC by-sa 2.5.
- [6: Bernard Augère, les enzymes biocatalyseur protéique, édition Ellipses Marketing SA, P73-90, 2001.
- [7] cowlick. (S.p) et kaplan (N.O) –Methods in enzymology. Vol 44: immobilized enzymes, p 999 bibl 1976 academicpress.
- [8]: Eric Brown et jean François; thechnique ingénieure; j1240.
- [9]: source curran et alper 2012.
- [10]: Emilian koller, génie chimique, aide-mémoire, édition DUNOD 2001.
- [11]: RIBA; Technique de l'ingénieur; F3600, P.4.
- [12]: Sicard (P.J) ; De l'utilisation des enzymes comme aide technologiques dans les industries Agroalimentaires, biofutur, 35, P.61, 1985.
- Dugo (P); utilisation industrielle des enzymes. Industrie alimentaires et agricole,6, P, 401-416, 1985.
- [13]: Alain Arnaud, daniel Ballerini, Marielle bouix, Pascal Briand, Claude Mawas, Dominique vandergheynst; Biotechnologie, 5<sup>ème</sup> édition, édition TEC et DOC, 1999.
- [14: Park, KY; Yetley AE (1993). "Apports et sources alimentaires de fructose dans les Etats-Unis.
- [15] : Alain Arnaud, Jaques Martal, Evelyne téoulé, Pascal Briand, hervé steenbrugge, dominique vandergheynst; Biotechnologie 4<sup>ème</sup> édition, édition TEC et DOC, 1993.

[16]: Dubrunfaut (1847)"Sur la Propriété analytique des fermentations alcoolique et lactique, et sur demande à Leur L'Etude des sucres"(Sur une propriété analytique des fermentations alcooliques et lactiques, et sur leur application à l'étude de sucres), Annales de Chimie et de Physique ,21: 169-178.

[17] Keusch, P «levure et le sucre-la chimie doit être droit».

[18]: Dills, WL (1993).«Les protéines fructosylation: fructose et la réaction de Maillard».Journal of Clinical Nutrition58: 779-787.

[19]: Eric Brown, Jean-François Biemann; technique ingénieur; F3600.



## SOMMAIRE

Sommaire.....	I
Remerciements.....	VI
Dédicace.....	VII
Liste des figures.....	VIII
Liste des tableaux.....	IX
Nomenclature.....	X

Introduction General.....	1
---------------------------	---

### CHAPITRE I: IMMOBILISATION& CINETIQUE ENZYMATIQUE

I.1. Introduction.....	2
I.2.Définition.....	2
I.3. Découverte.....	3
I.4.Propriété .....	3
I.5. Les constitutions des enzymes.....	3
I.6. Les cofacteurs enzymatiques.....	3
I.7. Les ions métalliques.....	4
I.8.Nature des enzymes .....	4
I.9. Les coenzymes.....	4
I.10.Les catalyseurs enzymatiques.....	4
I.11.Spécificité de la catalyse enzymatique.....	5
-La notion de site actif.....	5
a) spécificité réactionnelle.....	6

b) spécificité quant au substrat.....	6
I.12.Classifications des enzymes.....	6
I.12.1.Enzymes Commission.....	6
I. 12.2.Types de réactions catalysés par les diverses classes d'enzyme .....	8
1- Oxydoréductases.....	8
2-les transférases.....	8
3-Les hydrolases.....	8
4- les lyases.....	8
5- Les isomérases.....	8
6- Les ligases.....	9
I.12.3.Structure des enzymes.....	9
I.13. Cinétique Enzymatique.....	9
I.13 .1.La mesure de l'activité enzymatique.....	10
I.13. 2. Facteurs influençant l'activité enzymatique.....	10
I.13.2.1.Température.....	10
I.13.2.2. PH.....	10
I.13.2.3. Concentration en substrat et en enzymes.....	11
I.13.2.4. Présence de cofacteurs.....	11
I.13.2.5. Effecteurs: présence d'activateurs ou d'inhibiteurs.....	11
I.13.3. l'activité enzymatique et la loi de vitesse: l'équation de Michaelis-Menten.....	11
I.13.4.Discussion du modèle de Michailis-Menten.....	13
I.14. Enzymes Immobilises.....	15

## II

I.14.1. But et principe de l'immobilisation.....	15
I.14.2. Principales méthodes d'immobilisation.....	16
1) Adsorption.....	16
➤ Concentration en protéine enzymatique.....	16
➤ PH.....	16
➤ Force ionique du milieu.....	16
➤ Température.....	17
➤ Taille des particules et nature du support.....	17
2) Immobilisation par micro-encapsulation.....	17
3) Immobilisation par inclusion.....	17
4) Immobilisation par réticulation.....	18
I.14.Principaux domaine d'utilisations des enzymes dans l'industrie.....	18
I.14.1.Les nouveaux domaines en "omique" et l'ingénier métabolique.....	18
I.15.Exemple de précurseurs de produits industriels ou pharmaceutique synthétisés par des micro-organismes modifiés.....	19
I.16. Classification Des Réacteurs.....	19
I.16.1.Réacteurs monophasique.....	20
-Autoclaves.....	20
-Réacteur parfaitement agités.....	20
-Réacteur tubulaires.....	20
I.16.2. Réacteur à deux phases.....	20
-Réacteur à deux phases fluides.....	20
-Réacteur catalytiques.....	20
a)cuve mécanique agitée.....	20

b) cuve mécaniquement agitée aérée.....	21
c) colonne à bulles et réacteur air lift.....	21
d) Réacteur à couche fixe et couche fluidisé.....	21
I.17. Les Application Des Transformation Enzymatiques.....	22
I.17.1.Application dans les réactions de synthèse.....	22
a) synthèse de composés responsable de la flaveur et des aromes.....	23
b) synthèse de composés exhausteurs de gout.....	23
-Synthèse de 5 ' mono nucléotides.....	23
-le glutamate mono sodique.....	23
c) Produit d'acide organique et acide aminés.....	23
d) Synthèse d'édulcorants.....	24
- synthèse d'aspartame.....	24
-Synthèse de stéviolside.....	24
-Synthèse de cyclodextrines.....	24
I.17.2 Biosynthèse des polysaccharides.....	24

## **CHAPITRE II: MODELISATION & SIMULATION**

II.1.Introduction.....	26
II.2. Généralité.....	26
II.3. Le Glucose.....	27
II.3.1.Réactivité.....	27
II.3.1.1.Oxydoréduction.....	27
II.3.1.2. Formes cycliques (l'équilibre anomérique).....	28
II.4. Le Fructose.....	31

II.4.1. Réactions.....	32
II.4.1.1.Fructose et la fermentation.....	32
II.4.1.2.Fructose et de la réaction de Maillard.....	32
II.4.1.3.La déshydratation.....	32
II.5. Position Du Problème.....	32
II.6. Schéma Du Bioréacteurs.....	33
II.7.Cinétique De La réaction.....	34
II.8. Mise En Équation.....	36
II.8.1. Le modèle monodimensionnel d'un bioréacteur à lit fixe.....	36
II.9.Intégration Numérique.....	37
II.10.Résultats et Discussions.....	38
1/ Effet de la concentration initiale en glucose.....	38
2/ Effet de la vitesse maximale sur la concentration du glucose.....	38
3/ Effet de la masse de biocatalyseur.....	39
4/Effet de Q sur la concentration en glucose la hauteur du réacteur.....	39
Conclusion Générales.....	42
Références Bibliographiques	