



HAL
open science

Cinétique enzymatique d'une réaction exothermique en phase hétérogène et sous pression. Réacteur utilisant la catalyse immobilisée pour la décomposition de l'eau oxygénée

Viviane Bilhou-Bougnol

► **To cite this version:**

Viviane Bilhou-Bougnol. Cinétique enzymatique d'une réaction exothermique en phase hétérogène et sous pression. Réacteur utilisant la catalyse immobilisée pour la décomposition de l'eau oxygénée. Chimie inorganique. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1976. Français. NNT : . tel-01044816

HAL Id: tel-01044816

<https://theses.hal.science/tel-01044816>

Submitted on 24 Jul 2014

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

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

N° d'ordre : 6 C.I.

THESE

présentée par

Viviane BILHOU-BOUGNOL
Ingénieur E.S.C.I.L.

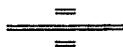
pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR
SPECIALITE CHIMIE-MINERALE PHYSIQUE



CINÉTIQUE ENZYMATIQUE D'UNE RÉACTION EXOTHERMIQUE
EN PHASE HÉTÉROGÈNE ET SOUS PRESSION.

RÉACTEUR UTILISANT LA CATALASE IMMOBILISÉE
POUR LA DÉCOMPOSITION DE L'EAU OXYGÉNÉE.



Soutenue à Saint-Etienne, le 13 octobre 1976, devant la Commission d'Examen

MM. M. SOUSTELLE

Président

L. BARBOUTEAU

F. LANCELÔT

M. PORTHAULT

E. SELEGNV

C. TRAN MINH

} *Examineurs*

N° d'ordre : 6 C.I.

THESE

présentée par

Viviane BILHOU-BOUGNOL
Ingénieur E.S.C.I.L.

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR
SPECIALITE CHIMIE-MINERALE PHYSIQUE



CINÉTIQUE ENZYMATIQUE D'UNE RÉACTION EXOTHERMIQUE
EN PHASE HÉTÉROGÈNE ET SOUS PRESSION,
RÉACTEUR UTILISANT LA CATALASE IMMOBILISÉE
POUR LA DÉCOMPOSITION DE L'EAU OXYGÉNÉE.



Soutenue à Saint-Etienne, le 13 octobre 1976, devant la Commission d'Examen

MM. M. SOUSTELLE

Président

L. BARBOUTEAU
F. LANCELOT
M. PORTHULT
E. SELEGNY
C. TRAN MINH

}
Examineurs



ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

Directeur : M. Lucien VIELLEDENT

Directeur des Etudes : M. Jacques BOISSÉ

PROFESSEURS DE 1ère CATEGORIE

MM. COINDE Alexandre	Gestion
FORMERY Philippe	Mathématiques Appliquées
GOUX Claude	Métallurgie
LEVY Jacques	Métallurgie
RIEU Jean	Mécanique-Résistance des Matériaux
SOUSTELLE Michel	Chimie

PROFESSEURS DE 2ème CATEGORIE

MM. GUIBOUD-RIBAUD Serge	Informatique
LOWYS Jean-Pierre	Physique
TOUCHARD Bernard	Physique Industrielle

PROFESSEURS ASSOCIES DE 2ème CATEGORIE

MM. FONTEILLES Michel	Géologie
SEROR Denis	Informatique

DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. LESBATS Pierre	Métallurgie
-------------------	-------------

MAITRES DE RECHERCHE

MM. BISCONDI Michel	Métallurgie
BOOS Jean-Yves	Métallurgie
Mlle FOURDEUX Angéline	Métallurgie
MM. LALAUZE René	Chimie
LANCELOT Francis	Chimie
LE COZE Jean	Métallurgie
THEVENOT François	Chimie
TRAN MINH Canh	Chimie

DIRECTEURS DE RECHERCHE (au sens des arrêtés du 16 Avril 1974)

MM. GUIRALDENQ Pierre	Métallurgie
KOBYLANSKI André	Métallurgie
GUILHOT Bernard	Chimie
THOMAS Gérard	Chimie
COUEIGNOUX Philippe	Informatique

A Jean-Louis,

A mes parents



Le travail exposé dans cette thèse a été effectué au Centre de Chimie-Physique de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

Je tiens à remercier vivement Monsieur le Professeur M. SOUSTELLE, Directeur du Centre de Chimie-Physique, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur C. TRAN-MINH, qui m'a permis de mener ces recherches à bonne fin, après avoir dirigé mon travail.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à Monsieur F. LANCELOT, qui a accepté de faire partie du jury après avoir suivi mes travaux avec intérêt.

Que Monsieur L. BARBOUTEAU, Ingénieur en Chef, groupe ELF-AQUITAINE, qui a bien voulu m'honorer de sa présence et juger ce travail, veuille bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Monsieur M. PORTHAULT, Maître de Conférence à l'Université CLAUDE BERNARD LYON I, s'est intéressé à mon travail de recherche après avoir suivi mes études à l'E.S.C.I.L. ; qu'il veuille bien accepter mes remerciements respectueux.

Que Monsieur E. SELEGNY, Professeur à la Faculté des Sciences de ROUEN, veuille bien trouver ici le témoignage de ma vive reconnaissance, pour l'intérêt porté à mon travail, et pour sa participation au jury.

Je remercie la D.R.M.E. pour l'aide matérielle qui m'a permis de réaliser en grande partie ce travail.

Merci à Madame E. CHARLES, Monsieur R. MASSARDIER et Madame M.C. MATHAIS pour leur collaboration à la présentation de cette thèse.

A toutes les personnes travaillant au Centre de Chimie-Physique vont toute ma reconnaissance et mon amitié, pour leur accueil et leur sympathie.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

Réaction de décomposition de H_2O_2 par la catalase :
Rappels - Généralités

I - RAPPEL DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1-1 - L'eau oxygénée, source d'oxygène :

1-1-1 - Quelques données thermodynamiques

1-1-2 - Stabilisation de l'eau oxygénée

1-1-3 - Dosage de l'eau oxygénée

1-1-4 - Stockage du peroxyde d'hydrogène

1-2 - La catalase, catalyseur biologique :

1-2-1 - Différents catalyseurs courants de la réaction de décomposition

1-2-2 - Oxydo-réductase de l'eau oxygénée : la catalase

1-2-2-1 - Origine

1-2-2-2 - Caractéristiques

II - ETUDE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PRESENCE DE H_2O_2 TRES DILUEE :

2-1 - Etude en phase homogène

2-1-1 - Equation de Michaelis-Menten

2-1-2 - Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique

2-1-2-1 - Influence de la température

2-1-2-2 - Influence du pH

2-1-3 - Utilisation de l'enzyme en solution

2-2 - Etude en phase hétérogène

2-2-1 - Les enzymes fixées

2-2-1-1 - Historique des enzymes fixées

- 2-2-1-2 - Techniques d'immobilisation des enzymes
- 2-2-1-3 - Utilisation des enzymes fixées
- 2-2-1-4 - Technique de fixation utilisée
- 2-2-1-5 - Conséquences de l'immobilisation
- 2-2-2 - Comparaison de l'activité de l'enzyme en solution et de l'enzyme fixée
 - 2-2-2-1 - Préparation de l'enzyme fixée sous forme de membrane
 - 2-2-2-2 - Conditions expérimentales
 - 2-2-2-3 - Définition de l'activité
 - 2-2-2-4 - Comparaison de l'activité de l'enzyme en solution et de l'enzyme fixée
- 2-2-3 - Vérification de la cinétique Michaelienne :
 - 2-2-3-1 - Utilisation de l'enzyme sous forme de membrane
 - 2-2-3-2 - Utilisation de l'enzyme sous forme de mousse

III - CINÉTIQUE DE LA RÉACTION DE DÉCOMPOSITION DE L'EAU OXYGÉNÉE PAR LA CATALASE EN PRÉSENCE DE H₂O₂ PLUS CONCENTRÉE :

- 3-1 - Premières mesures
- 3-2 - Essai de réaction en appareil de Kipp
- 3-3 - Mise en évidence de la dénaturation de la catalase
- 3-4 - Etude des divers paramètres
 - 3-4-1 - Épaisseur et surface de la membrane
 - 3-4-2 - Température
 - 3-4-3 - Pression
 - 3-4-4 - Concentration en eau oxygénée

IV - ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE AU COEUR DE LA COUCHE ENZYMATIQUE PAR L'EMPLOI DES THERMISTANCES :

- 4-1 - Utilisation d'une thermistance
- 4-2 - Réalisation expérimentale et résultats

V - EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE FIXEE EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION

VI - ANALYSE THEORIQUE

6-1 - Evolution de la concentration en eau oxygénée dans la membrane au cours du temps

6-2 - Evolution de la température dans la membrane au cours du temps

VII - CONCLUSION

DEUXIEME PARTIE

Etude d'un réacteur enzymatique utilisant la catalase fixée
pour la décomposition de l'eau oxygénée

I - PREMIER MODELE DE GENERATEUR D'OXYGENE A CATALASE FIXEE :

1-1 - Description du générateur d'oxygène

1-2 - Conduite de la réaction

1-3 - Résultats

II - AUTRE MODELE DE GENERATEUR D'OXYGENE A AILETTES FIXES : REACTEUR II :

2-1 - Conduite de la réaction

2-2 - Résultats

III - REALISATION PRATIQUE DE SYSTEMES DEMONTABLES : REACTEURS III, IV et V :

- 3-1 - Description du montage et préparation de la mousse d'enzyme
- 3-2 - Réacteur III, présentation et performance
 - 3-2-1 - Conditions expérimentales
 - 3-2-2 - Résultats
- 3-3 - Réacteurs IV et V, présentation et performance
 - 3-3-1 - Conditions expérimentales
 - 3-3-2 - Résultats

IV - CONCLUSION

TROISIEME PARTIE

Etude de la décomposition de l'eau oxygénée
par la catalase fixée sous pression

I - UTILISATION DE LA CATALASE FIXEE SOUS PRESSION DE 1,2 A 1,5 ATMOSPHERE :

- 1-1 - Conditions expérimentales
- 1-2 - Résultats
 - 1-2-1 - Production d'oxygène
 - 1-2-2 - Tracé des courbes d'équiconcentration sur les courbes
 $V_{O_2} = f(t)$
 - 1-2-3 - Résolution graphique de la vitesse de réaction
- 1-3 - Conclusion

II - ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA CATALASE FIXEE LORS DE LA DECOMPOSITION DE L'EAU OXYGENEE SOUS PRESSION DE 2 A 5 ATMOSPHERES :

2-1 - Montage

2-2 - Présentation de l'enzyme fixée

2-3 - Introduction aux études successives

2-4 - Influence de la pression sur la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase fixée

2-4-1 - Evolution de la production d'oxygène au cours du temps

2-4-1-1 - Production d'oxygène en phase gazeuse

2-4-1-2 - Production d'oxygène en phase dissoute

2-4-2 - Cinétique de la réaction

2-4-3 - Conclusion

2-5 - Décomposition de l'eau oxygénée par la catalase fixée sous deux atmosphères à diverses températures :

2-5-1 - Evolution de la production d'oxygène au cours du temps

2-5-2 - Cinétique de la réaction

2-5-2-1 - Calcul des vitesses de réaction

2-5-2-2 - Détermination de l'énergie d'activation de la réaction sous pression

2-5-3 - Conclusion

2-6 - Décomposition de l'eau oxygénée par la catalase fixée sous deux atmosphères à diverses concentrations en eau oxygénée

2-6-1 - Evolution de la production d'oxygène au cours du temps

2-6-2 - Cinétique de la réaction

2-6-2-1 - Calcul des vitesses de réaction

2-6-2-2 - Effet de la concentration en substrat sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique

2-7 - Conclusion

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ERRATA

INTRODUCTION

La connaissance des enzymes a été améliorée grâce aux progrès considérables des dernières années. Cependant, ces catalyseurs étant très actifs mais aussi très coûteux, on a essayé de les immobiliser pour pouvoir s'en servir plusieurs fois. C'est ainsi que, vers 1960, les enzymes immobilisées font leur apparition ; il est alors utile de connaître leur comportement cinétique en phase hétérogène (1).

Divers auteurs ont comparé les propriétés des enzymes fixées avec celles des enzymes en solution (2), (3), (4), (5), ils ont relevé notamment une plus grande résistance vis-à-vis de la dénaturation, une modification de la valeur du Km apparent, un déplacement éventuel du pH optimum. Ils ont étudié aussi l'effet de la température, mais seule la température extérieure à l'enzyme a été prise en considération. A notre connaissance, aucune étude sur l'exothermicité des réactions enzymatiques n'a été faite. Or l'exothermicité conduit à une élévation de température nuisible à l'enzyme et de ce fait diminue son activité catalytique.

En vue d'une meilleure compréhension de ce phénomène, notre travail porte sur une réaction exothermique : celle de la décomposition de l'eau oxygénée par la catalase. Bien que la cinétique enzymatique de cette réaction soit bien connue (9), (56), son aspect exothermique n'a pas été traité auparavant, parce que l'eau oxygénée était utilisée à des concentrations très faibles.

D'autre part, la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase immobilisée n'a pas été étudiée sous pression : nous montrerons qu'il est possible de faire fonctionner la catalase et de comparer son comportement dans ces conditions au comportement sous pression atmosphérique.

Parmi les auteurs ayant construit des réacteurs enzymatiques, citons ALTOMARE et collaborateurs (6) qui envisagent notamment de nombreuses utilisations dans l'industrie alimentaire.

Ce domaine étant déjà exploré, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de l'eau oxygénée comme source d'oxygène possible pour la respiration d'un individu.

C'est dans ce but que nous avons réalisé un modèle de générateur d'oxygène à catalase fixée capable de fournir de l'oxygène en continu.

Notre travail se compose de trois parties :

Dans la première partie, nous traiterons des rappels et des généralités concernant l'eau oxygénée, la catalase et la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase fixée.

L'étude de la catalase fixée pour la production d'oxygène nous amènera à décrire la réalisation pratique d'un générateur d'oxygène dans la deuxième partie.

Enfin, dans une tentative de rendre ce réacteur enzymatique opérationnel en plongée, nous approcherons ce problème en étudiant le comportement de l'enzyme fixée sous des pressions allant jusqu'à 5 atmosphères, dans la troisième partie.

PREMIERE PARTIE

Réaction de décomposition de H_2O_2 par la catalase :

Rappels - Généralités

I - RAPPEL DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES :

1-1 - L'eau oxygénée, source d'oxygène :

L'eau oxygénée, ou peroxyde d'hydrogène, est une source d'oxygène très intéressante puisque deux litres de peroxyde d'hydrogène pur libèrent presque 1m³ d'oxygène gazeux pris dans les conditions normales de température et de pression.

Le liquide pur titre 478 volumes (7), l'eau oxygénée pour analyses titre 110 volumes. Nous pouvons disposer ainsi d'une source d'oxygène peu encombrante et facilement transportable.

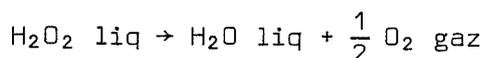
Les procédés industriels les plus courants pour obtenir de l'eau oxygénée sont la préparation à partir des peroxydes, par voie électrolytique et par oxydo-réduction des quinones (8).

1-1-1 - Quelques données thermodynamiques :

Température de fusion :	- 0,43°C
Température d'ébullition :	150,2°C
Chaleur spécifique du liquide de 0° à 27°C :	21,35 cal.mole ⁻¹ . degré ⁻¹
Enthalpie de décomposition du liquide pur en eau et oxygène à 25°C et sous 1 atm. :	- 23,44 kcal.mole ⁻¹
Enthalpie libre de formation du liquide à 25°C et sous 1 atm. :	- 28,73 kcal.mole ⁻¹
Potentiel standard des réactions :	
$H_2O_2 + 2H_2O \rightarrow O_2 + 2H_3O^+ + 2e^-$	- 0,693V en solution acide
$4H_2O \rightarrow H_2O_2 + 2H_3O^+ + 2e^-$	- 1,76V en solution acide

1-1-2 - Stabilisation de l'eau oxygénée

L'enthalpie de décomposition correspondant à la réaction suivante :



est de : $\Delta H^\circ_{298^\circ K} = - 23,44 \text{ kcal/mole d'eau oxygénée décomposée.}$

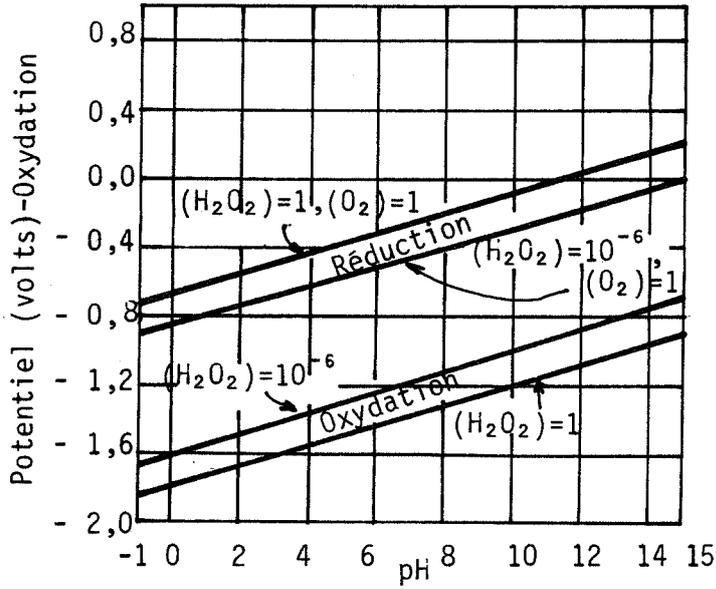


Figure 1 - RELATION POTENTIEL - pH POUR LES SOLUTIONS AQUEUSES DE PEROXYDE D'HYDROGENE - les activités sont en moles par litre et les pressions en atmosphères.

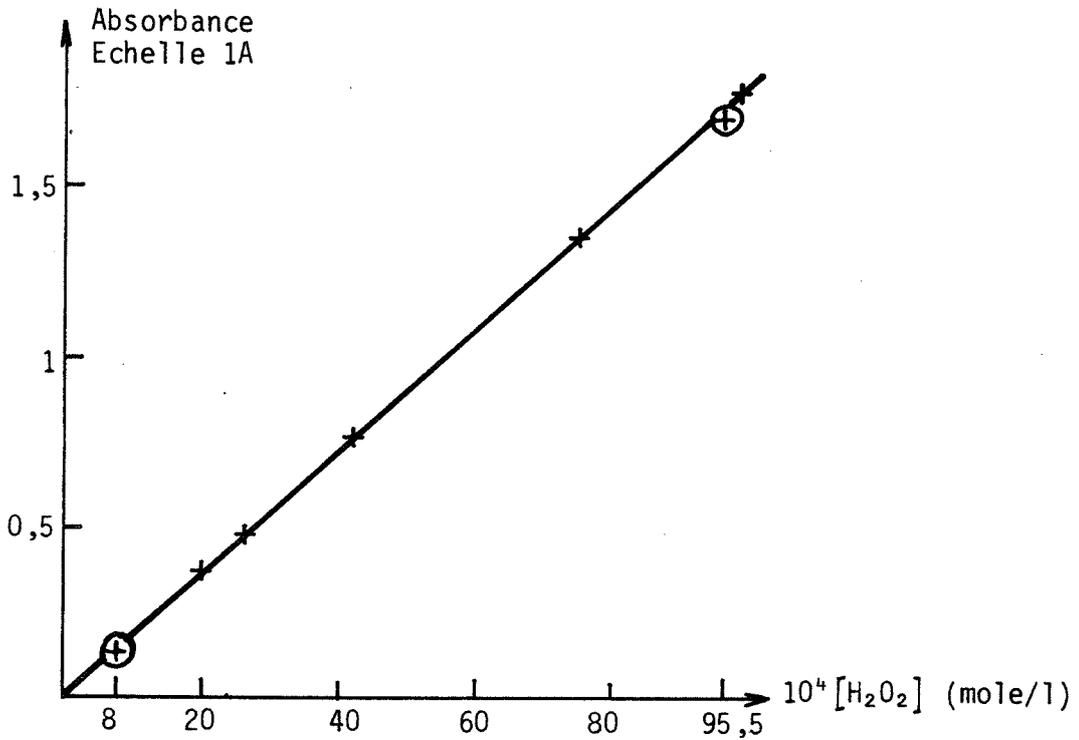
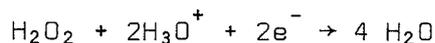


Figure 2 - DOSAGE DE L'EAU OXYGENEE PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION A 220 nm (+--+) ET PAR MANGANIMETRIE (⊕) -

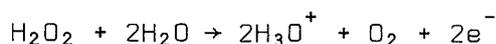
La thermodynamique de la réaction montre que l'eau oxygénée a tendance à se dismuter en libérant spontanément son oxygène. Il est recommandé de la tenir à l'abri de la lumière pour éviter la décomposition spontanée. Cette décomposition, en l'absence de toute catalyse, n'a pas encore été mesurée, le taux de décomposition le plus lent jamais rapporté, avec un échantillon pur, n'est que de 0,5 pour 100 par an à température ambiante.

L'eau oxygénée est instable par rapport à ses produits de décomposition en solution :

D'une part, le peroxyde d'hydrogène est l'un des oxydants les plus énergiques, d'autre part il peut agir comme réducteur faible avec des agents oxydants forts. La mesure quantitative du pouvoir oxydo-réducteur s'effectue par les potentiels électrochimiques. Ainsi le potentiel de la réaction d'oxydation :



est de 1,76V en solution acide (1 mole/l) et 0,87V en solution basique (1 mole/l). Le potentiel de la réaction de réduction :



est de - 0,693V en solution acide (1 mole/l) et - 0,084V en solution basique (1 mole/l). La somme de ces deux équations représente l'instabilité thermodynamique du peroxyde d'hydrogène par rapport à ses produits de décomposition en solution : $1,07\text{V} = 24,67 \text{ kcal.mole}^{-1}$. La variation des potentiels en fonction du pH de la solution et de la concentration de l'oxygène et du peroxyde a été représentée par les courbes de la figure 1.

La recherche pratique des meilleurs stabilisateurs semble se faire au hasard car aucune théorie ne paraît apte à expliquer leur mécanisme d'action. De nombreuses substances, minérales telles que l'étain et ses dérivés et organiques, telles que les dérivés carboxylés de la pyridine et les sulfonimides aliphatiques ou aromatiques mixtes ont été proposées comme stabilisateurs de l'eau oxygénée (8). Des tentatives d'explication ont été faites, mais elles n'englobent pas l'ensemble du phénomène : par exemple, on a attribué les propriétés stabilisantes des acides à leur affinité pour l'eau produite par la décomposition de l'eau oxygénée.

En général, l'eau oxygénée du commerce est stabilisée par H_2SO_4 dilué (pH \approx 4), mais à notre pH de travail (pH 6,8), l'acide sulfurique ayant perdu son pouvoir stabilisant, nous rajoutons de l'acide urique. Nous choisissons cet acide car il ne gêne pas la décomposition enzymatique de H_2O_2 par la catalase. La quantité d'acide urique correspond à la concentration de ce dernier dans le sang normal, ainsi qu'au taux de saturation de la solution, c'est-à-dire 50 mg par litre d'eau oxygénée.

1-1-3 - Dosage de l'eau oxygénée

Nous effectuons le dosage des solutions d'eau oxygénée très diluées par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet. Les courbes d'étalonnage à 220 nm montrent une bonne linéarité entre l'absorbance et les concentrations en eau oxygénée et la méthode de dosage manganométrique donne des résultats en accord avec celle de spectrophotométrie d'absorption choisie (figure 2).

1-1-4 - Stockage du peroxyde d'hydrogène (g) :

Le peroxyde d'hydrogène se décompose plus ou moins violemment au contact de beaucoup de métaux (les métaux de transition, éléments qui peuvent exister sous plus d'un état d'oxydation, sont parmi les catalyseurs les plus actifs).

A partir de la concentration 50 %, le peroxyde d'hydrogène peut provoquer l'inflammation spontanée et la combustion de matières organiques telles que le bois, le papier, les tissus ...

L'eau oxygénée très concentrée peut être stockée dans un récipient en aluminium (A5) poli et très propre, en acier inoxydable 18/8 et 18/10, en polyéthylène (haute pression), en polytétrafluoroéthylène, en verre pyrex.

1-2 - La catalase, catalyseur biologique :

1-2-1 - Différents catalyseurs courants de la réaction de décomposition:

L'eau oxygénée peut être décomposée en phase vapeur, en phase liquide et aussi en présence de radiations : parmi les catalyseurs courants de décomposition en phase liquide, citons l'argent, le cuivre, le platine, la catalase, les protéines, etc... (8).

Les enzymes sont différentes des autres catalyseurs, elles peuvent être :

- plus actives que les autres catalyseurs vis-à-vis des substances naturelles,
- plus sensibles à la dénaturation due à leur structure protéique macromoléculaire,
- beaucoup plus spécifiques.

Leur plus grande activité vient du fait que les enzymes abaissent davantage la barrière de potentiel que les catalyseurs chimiques. Par exemple, les énergies d'activation de la décomposition de H_2O_2 sont :

{	sans catalyseur :	E_O	= 18 kcal/mole	(9)
	avec l'argent :	E_{Ag}	= 14,7 kcal/mole	(9)
	avec le platine colloïdal:	E_{Pt}	= 11,7 kcal/mole	
	avec le bioxyde de manganèse sur alumine :	E_{Mn}	= 8,7 kcal/mole	(2)
	avec la catalase en solution :	E	= 5,5 kcal/mole	(10)
	avec la catalase fongique fixée :	E	= 4,7 kcal/mole	(2)

1-2-2 - Oxydo-réductase de l'eau oxygénée : la catalase :

1-2-2-1 - Origine :

On trouve la catalase dans le foie et les reins de l'homme, du boeuf, du cheval, dans les érythrocytes humains, dans le sang, les bactéries (*Micrococcus lysodeikticus*), les plantes (feuilles d'épinards). Dans le sang humain, les quantités de catalase sont de l'ordre de 170 mg par litre.

La catalase (de Sigma) que nous utilisons provient du foie de boeuf, c'est une enzyme facile à cristalliser (11).

1-2-2-2- Caractéristiques :

La masse moléculaire de la catalase est comprise entre 225000 g et 250000 g (12).

Outre les acides aminés, la catalase comporte des porphyrines de fer caractérisant la structure hématine de l'enzyme.

Activité spécifique :

La catalase est l'enzyme spécifique de la réaction suivante, dite "catalatique" (13), c'est-à-dire mettant en jeu la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau :



L'équation de vitesse de cette réaction a été donnée par Michaelis sous la forme (14) (voir § 2-1).

$$v = V \text{ max.} \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]}{K_m + [\text{H}_2\text{O}_2]}$$

avec K_m : constante de Michaelis

et $V \text{ max}$: vitesse maximum

Compte tenu de la structure hématine de la catalase, démontrée par ZEILE et HELLSTRÖM en 1930, plusieurs théories ont vu le jour pour expliquer son action (13) : les théories de formation de complexes enzyme-substrat, celles qui mettent en jeu des réactions chimiques produisant des composés peroxydes de fer ou des radicaux libres, et celles qui considèrent des cycles fer ferreux-fer ferrique.

Les théories qui ont prévalu sont celles qui mettent en jeu les complexes enzyme-substrat.

VON EULER et JOSEPHSON (15) ont pensé que la catalase formait avec l'eau oxygénée un complexe de Michaelis, avec $K_m = 0,025 \text{ M}$.

SUMNER et DOUNCE (16) écrivent le complexe enzyme-substrat sous la forme Fe OOH^{2+} en considérant le fer de la structure hématine de la catalase.

BONNISCHSEN et collaborateurs (17) ont montré que la constante de Michaelis supposée par EULER (0,025M) était un artefact dû à l'inhibition progressive de la catalase par des concentrations en H_2O_2 plus élevées ; la vitesse de la réaction est directement proportionnelle à la concentration en H_2O_2 jusqu'à 0,1M et au-dessus. Ils ont supposé qu'une valeur de K_m est obtenue seulement quand l'enzyme devient inhibée par un contact prolongé avec l'eau oxygénée.

GEORGE (18) a trouvé que la catalase montre deux phases d'activité catalytique, α et β ; dans la phase la plus tardive, β , l'enzyme existe dans une forme moins active.

CHANCE (19) a découvert le composé primaire Fe OOH^{2+} formé entre la catalase et l'eau oxygénée, il a aussi trouvé que deux autres composés intermédiaires peuvent se former, dans des conditions spéciales (13) : par exemple, un deuxième composé se forme à partir du composé primaire en présence de H_2O_2 généré lentement par la glucose-oxydase ; un troisième composé est produit en ajoutant de petites quantités d'eau oxygénée au deuxième composé formé dans la réaction entre la catalase et l'hydroperoxyde de méthyle. Dans la réaction simple entre la catalase et le peroxyde d'hydrogène, nous considérons uniquement la formation d'un complexe entre l'enzyme et le substrat.

II - ETUDE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'EAU OXYGENEE TRES DILUEE :

2-1 - Etude en phase homogène :

La première analyse mathématique satisfaisante du déroulement d'une réaction catalysée par une enzyme est due à MICHAELIS et MENTEN (20). Une généralisation a été faite plus tard par la méthode de l'état stationnaire effectuée par BRIGGS et HALDANE (21).

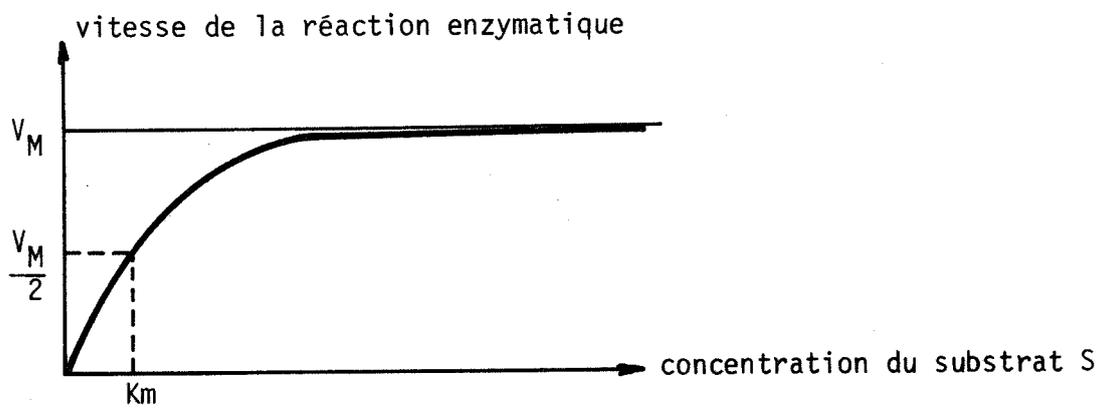
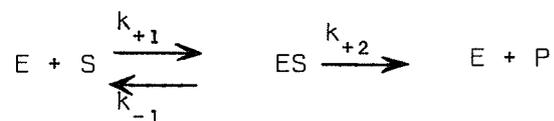


Figure 3 - REPRESENTATION DE L'EQUATION DE MICHAELIS DONNANT LA VITESSE ENZYMATIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT.

L'enzyme se combine avec son substrat pour former un complexe enzyme-substrat. Dans le cas général où l'enzyme transforme irréversiblement son substrat en produit, on peut écrire la réaction enzymatique suivante :



$$\left\{ \begin{array}{l} S : \text{ substrat} \\ ES : \text{ complexe enzyme-substrat} \\ E : \text{ enzyme} \\ P : \text{ produit} \\ [E_0] : \text{ concentration initiale en enzyme : } [E_0] = [ES] + [E] \end{array} \right. \quad (1)$$

Dans l'hypothèse de l'état stationnaire, on peut écrire : $\frac{d[ES]}{dt} = 0$,

$$\text{soit } k_{+1} [E] \cdot [S] - k_{-1} [ES] - k_{+2} [ES] = 0 \quad (2)$$

En tenant compte de (1), l'équation (2) s'écrit :

$$[ES] = \frac{k_{+1} [E_0] \cdot [S]}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1} [S]}$$

la vitesse de réaction $v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2} [ES]$, s'écrit :

$$v = \frac{k_{+1} \cdot k_{+2} \cdot [E_0] \cdot [S]}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1} \cdot [S]} = \frac{k_{+2} \cdot [E_0] \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + [S]}$$

Si nous posons $V_m = k_{+2} \cdot [E_0]$ et $K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$, constante de

Michaelis, l'expression de la vitesse devient : (14) :

$$v = V_m \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Pour un système enzymatique donné, la vitesse de réaction est fonction du rapport $\frac{[S]}{K_m}$:

$$v = V_m \cdot \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Si $\frac{[S]}{K_m} \ll 1, v \neq \frac{V_m}{K_m} \cdot [S]$: la cinétique est du premier ordre par rapport au substrat S.

Si $\frac{[S]}{K_m} \gg 1, v \neq V_m$: la cinétique est d'ordre zéro par rapport au substrat (figure 3).

La valeur de la constante de Michaelis pour la décomposition de l'eau oxygénée par la catalase en solution est de 1,1 mole par litre à 30°C et à pH 7 (12).

2-1-2 - Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique :

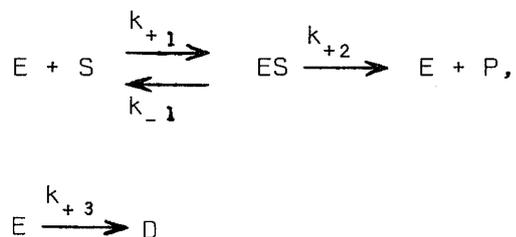
2-1-2-1 - Influence de la température :

Dans l'équation de la vitesse de Michaelis-Menten entre en jeu la constante K_m , fonction des trois constantes k_{+1} , k_{-1} et k_{+2} . Ces trois constantes sont affectées par la température selon la loi d'Arrhénius ; l'influence de la température sur la vitesse de réaction est donc une fonction complexe de la température dans le cas général. Toutefois des simplifications apparaissent si l'une de ces trois constantes est prédominante dans la cinétique, par rapport aux deux autres. Dans la plupart des cas, k_{+2} est considéré comme étant très petit devant k_{-1} (22) et gouverne donc l'étape la plus lente : $ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$. La vitesse globale de la réaction suit donc, dans un intervalle de température limité, les variations de k_{+2} en fonction de la température, selon la loi d'Arrhénius.

Mais une température plus élevée (températures de l'ordre de 50°C pour de nombreux enzymes, températures plus basses pour la catalase) provoque la dénaturation de l'enzyme.

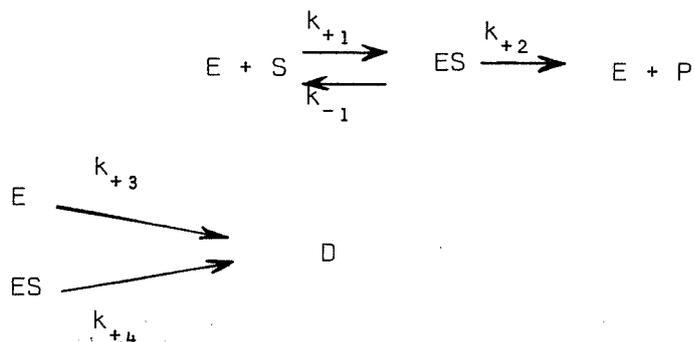
La dénaturation de l'enzyme pendant la réaction peut procéder de trois façons différentes :

Dans un premier cas, nous pouvons considérer que l'enzyme sous forme libre se dénature par une loi de premier ordre, alors que le substrat, dans le complexe enzyme-substrat, protège l'enzyme contre la dénaturation ; cette situation peut être représentée par le schéma suivant :

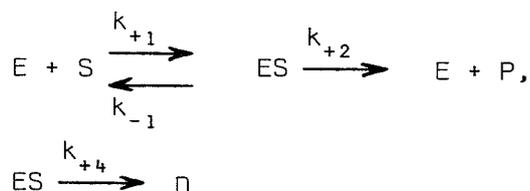


D désignant la forme inactive de l'enzyme.

Un autre cas est celui où le substrat n'a pas d'effet ; tout l'enzyme se dénature : celui sous forme libre et celui sous forme de complexe enzyme-substrat :



Un développement de ces deux cas est donné dans la littérature (22), mais d'après LAIDLER et BUNTING, la catalase n'obéirait à aucun de ces deux schémas ; elle serait moins stable en présence de son substrat, on aurait alors :



Le traitement de ce cas est difficile, car on ne peut pas appliquer l'état stationnaire au complexe enzyme-substrat dont la concentration diminue au cours de la réaction.

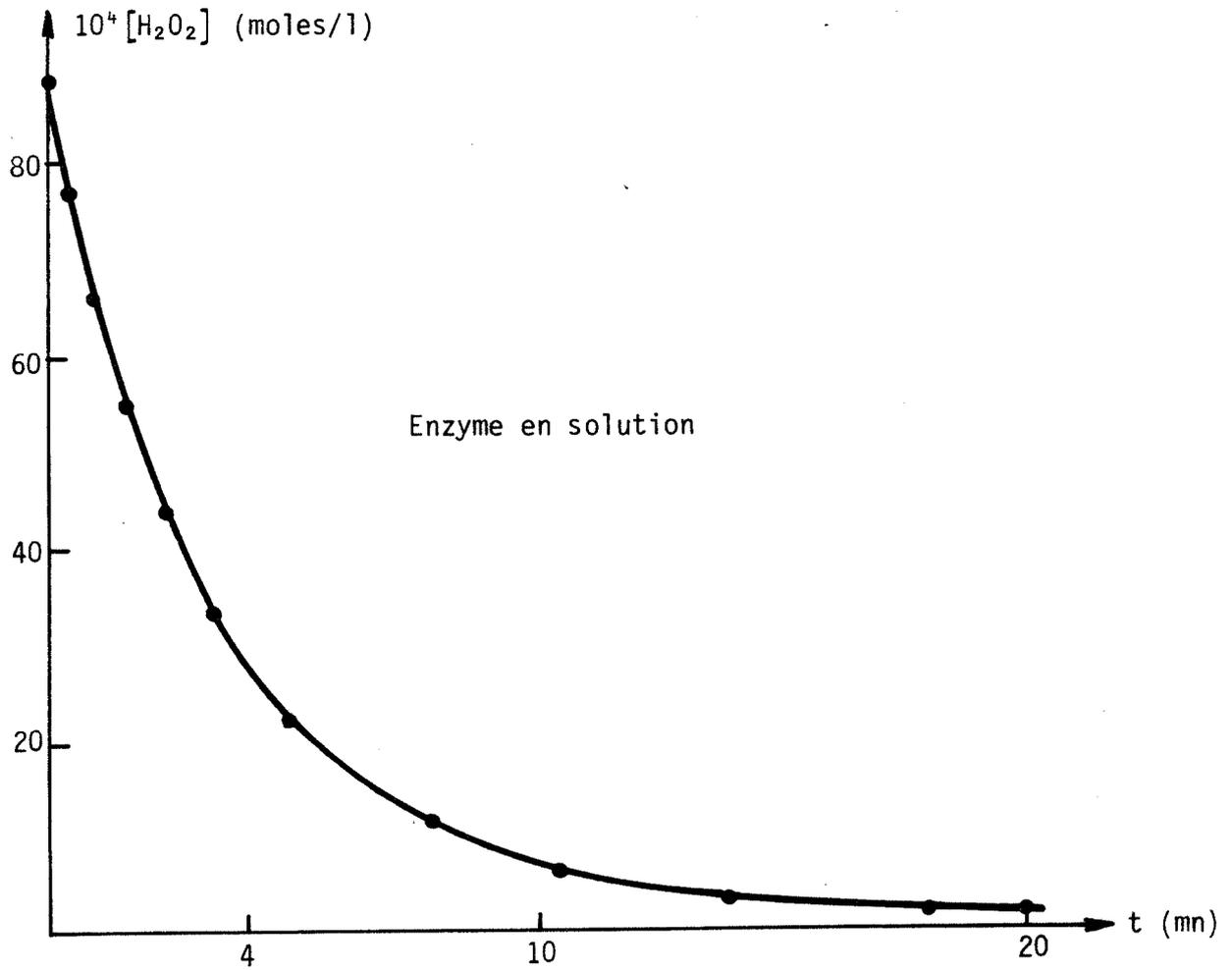


Figure 4 - UTILISATION DE LA CATALASE EN SOLUTION.

$[\text{H}_2\text{O}_2] = f(t)$. catalase : 1 mg/l.

Toutes ces hypothèses ont été développées dans le cas de l'enzyme en solution. Il n'est pas évident que les mêmes phénomènes aient lieu lorsque l'enzyme est fixée.

En effet le support peut avoir des effets spécifiques sur la stabilisation d'intermédiaires réactionnels, effets qui modifient leur tendance à la dénaturation. Nous n'avons donc pas abordé, au cours de notre travail, ce problème dans le détail. Cependant d'une manière générale, nous montrerons que les enzymes sous la forme fixée présentent une meilleure résistance face à la dénaturation (paragraphe 2-2-2-4).

2-1-2-2- Influence du pH

Le pH optimum varie selon l'enzyme. Pour notre part, nous avons trouvé que le pH pour lequel l'activité est maximale est égal à 6,8.

Cet effet de pH est lié à l'état d'ionisation d'un certain nombre de groupements dissociables participant à la formation et à l'activité du complexe ES. Dans le domaine de concentrations du travail de la catalase, la présence de l'eau oxygénée ne change pas le solvant qui est l'eau, et en particulier ne change pas son pH puisque la constante de dissociation de l'eau oxygénée en O_2H^- et H^+ est de l'ordre de 10^{-12} . Par conséquent, le pH est maintenu constant tout au long de la réaction.

2-1-3 - Utilisation de l'enzyme en solution

Dans une solution d'eau oxygénée à 0,01 mole par litre, nous versons de la catalase à la concentration de 1mg par litre. La catalase en solution décompose rapidement H_2O_2 , comme le montre la figure 4 sur laquelle est suivie l'évolution de la concentration de l'eau oxygénée en fonction du temps de réaction. Nous trouvons bien, à partir de la figure 4, un rapport du temps de demi-réaction au temps du quart de réaction égal à 2,4, qui est caractéristique d'une réaction d'ordre 1.

2-2 - Etude en phase hétérogène :

2-2-1 - Les enzymes fixées :

2-2-1-1 - Historique des enzymes fixées

L'idée d'attacher une enzyme pour la rendre insoluble est ancienne (23). Dès 1916, NELSON et GRIFFIN (24) adsorbaient de l'invertase sur du charbon actif ; en 1947 MICHEEL et EWERS (25) effectuent une fixation par liaison ionique sur cellulose. A partir de 1960, les équipes de KATCHALSKI (26) et MANECKE (27) s'intéressent vivement à la fixation des enzymes et depuis 1965, les études se multiplient. Pour un historique détaillé, on peut se reporter aux ouvrages et revues généraux de KATCHALSKI (26), STARK (28), SILMAN (29), KAY (30), ORTH (31), SELEGNY, BROUN et Collaborateurs (3), (4), (5).

Dans la cellule vivante, seules les enzymes exo-cellulaires agissent à l'état libre ; in vivo, les enzymes agissent à l'état fixé. L'étude d'enzymes fixées permet donc de mieux connaître les phénomènes enzymatiques in vivo.

2-2-1-2 - Techniques d'immobilisation des enzymes :

- piégeage dans un réseau :

L'enzyme est introduite dans un réseau tridimensionnel, elle est emprisonnée dans une cavité qui l'empêche de sortir, mais qui autorise l'entrée de molécules de substrat de poids moléculaire plus faible, donc de dimensions plus petites. Les gels les plus utilisés sont les gels de polyacrylamide (32) et de polysaccharides. Le procédé garantit une répartition statistique de l'enzyme dans le support mais l'activité du biocatalyseur peut être altérée par la polymérisation du gel. En 1972, DINELLI (33) piège une enzyme dans une fibre, type fibre textile d'acétate de cellulose. De nombreuses enzymes, invertase, β -galactosidase, glucose-oxydase ont ainsi été filées et se présentent sous forme de textiles tissés.

- microencapsulation :

Cette technique emprisonne le biocatalyseur au sein d'une capsule semi-perméable ; les échanges se font à travers cette membrane et n'autorisent que des réactions impliquant un substrat de petit poids moléculaire.

CHANG (34) (35) a préparé ainsi une uréase et une anhydrase carbonique dans des microcapsules de 5 μ de diamètre de nylon ou de collodion. KITASIMA (36) et son équipe ont immobilisé de l'uréase et de la catalase dans des microcapsules semi-perméables de polystyrène, d'éthylcellulose ou de silicone.

Ces deux premières techniques sont qualifiées d'immobilisation physique, alors que les suivantes impliquent des réactions chimiques de fixation.

- adsorption :

C'est la technique la plus ancienne et la plus simple ; on laisse en contact enzyme et support (minéral ou organique) dans des conditions physicochimiques déterminées. Certaines fonctions, telles les fonctions hydroxylées OH du verre permettent une liaison ionique [MESSING (37)]. Toutefois, cette technique d'adsorption simple n'offre pas de grande garantie ; la désorption de l'enzyme peut être très rapide, provoquée par une légère variation de la force ionique, du pH ou simplement par lessivage.

- liaison covalente :

C'est cette technique qui prédomine très nettement et les organiciens ont proposé un très grand nombre de réactions pour autoriser le couplage support-enzyme. Les groupes réactionnels des enzymes sont les groupes fonctionnels des acides aminés entrant dans la composition de la protéine enzymatique :

- les groupements aminés de la lysine, de l'arginine ;
- les groupements carboxyliques des acides aspartique et glutamique ;
- le groupe hydroxylé de la sérine et de la thréonine ;
- le groupe sulfhydrylé de la cystéine ;
- le groupe imidazol de l'histidine ;
- le noyau phénolique de la tyrosine.

L'immobilisation par liaison covalente est la technique la plus utilisée ; en effet, elle autorise une liaison stable permettant l'utilisation prolongée de l'enzyme, et elle contribue à augmenter la résistance du biocatalyseur immobilisé aux agents dénaturants. Cette technique regroupe deux modes

d'immobilisation :

- immobilisation sur un support activé ;
- immobilisation par l'intermédiaire d'un pontage.

Pour le premier mode, on substitue à un groupement peu réactif d'un support, un groupe plus réactif qui assure alors le couplage de l'enzyme. Ainsi le bromure de cyanogène active les groupes hydroxyles de polyholosides type Sephadex (38). L'emploi d'échangeurs d'ions de type cellulose modifiée est fréquent, il peut s'agir soit d'échangeur anionique, tel la diéthylaminoéthyl cellulose (39) ou d'échangeur cationique, tel la carboxyméthyl cellulose (40), (41). La liaison directe de l'enzyme sur le support insoluble présente quelques inconvénients, notamment pour des problèmes d'accès du substrat au centre catalytique.

Les techniques qui ont prévalu sont celles du deuxième mode (5) : elles mettent en jeu des molécules polyfonctionnelles qui permettent d'écarter le biocatalyseur par rapport au support. Ces molécules, appelées ligands, assurent un véritable pontage. Les ligands sont polyfonctionnels, au minimum bifonctionnels (comme le glutaraldéhyde $\text{CHO} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CHO}$), puisqu'ils doivent assurer simultanément la fixation sur le support solide et la liaison par l'autre extrémité avec la molécule d'enzyme.

2-2-1-3 - Utilisation des enzymes fixées :

Les enzymes fixées présentent un grand intérêt pour des applications analytiques (42), (43).

Dans le cadre des réacteurs, les enzymes fixées paraissent utilisables dans l'industrie alimentaire (23) :

En laiterie, on essaie d'utiliser la lactase fixée pour le traitement du lait avec formation de glucose et de galactose, afin de le rendre digestible par certains organismes humains déficients (44) (45) (46) ; l'avantage réside dans le fait que l'enzyme ne passe pas dans le lait.

La pepsine est également fixée sur un verre poreux (47) pour cailler le lait en continu. Dans l'industrie du glucose, de nombreux travaux ont été effectués pour l'hydrolyse de l'amidon en continu, à partir de glucamylase fixée (48) (49) (50) (51). De nombreuses études ont été faites sur l'invertase fixée (52), (53), (54), (55), (56), (57) avec l'application industrielle de la fabrication du sirop de sucre inverti. Enfin les jus de fruits peuvent être traités par

des pectinases ou des protéases fixées en vue de leur clarification (53), (54). D'autres utilisations seraient possibles pour la réalisation de prothèses extra-corporelles (rein artificiel, oxygénateur (58), ...).

Les enzymes utilisables actuellement en brasserie sont les suivantes (compte tenu de la législation actuelle de la France où seules sont autorisées les enzymes amylolytiques et les enzymes protéolytiques) : l' α -amylase, d'origine bactérienne, les amylases de l'extrait de malt, et la glucamylase, d'origine fongique (*Aspergillus Niger*).

2-2-1-4 - Technique de fixation utilisée :

Dans le cas précis de la catalase, il est plus utile pour nous d'utiliser la méthode de fixation par liaison covalente en profondeur que de fixer l'enzyme en surface : elle se détruirait vite du fait de sa dénaturation facile par l'eau oxygénée concentrée. D'autre part, les sites en profondeur sont protégés physiquement (diffusion) et chimiquement (décomposition) par les couches extérieures.

La catalase, après dissolution dans de l'albumine (humaine ou bovine) à 17,5 %, est ajoutée à du tempon phosphate (0,1M, pH 6,8), ensuite, le glutaraldéhyde est rajouté pour assurer la coréticulation de l'albumine et de l'enzyme (58).

Une solution de 2 ml de mélange enzymatique contient 2 mg de catalase, 0,5 ml d'albumine à 17,5 %, 0,9 ml de tempon phosphate et 0,6 ml de glutaraldéhyde à 2,5 %.

Un prélèvement de 0,5 ml de ce mélange permet, par exemple, la fabrication d'une membrane de 32 cm² de surface et 0,15 mm d'épaisseur ; la membrane est étirée sur une plaque de verre où elle se colle pour la réticulation, elle est décollée ensuite à l'eau distillée (59). On peut aussi placer ce mélange directement dans un récipient à une température inférieure à 0°C ; une fois rincée, la plaquette obtenue a la consistance d'une mousse ou d'une éponge. Cette méthode, relativement rapide, ne requiert que quelques heures de repos à basse température pour la fixation.

2-2-1-5 - Conséquences de l'immobilisation :

Généralement, au cours de l'immobilisation, l'enzyme perd une partie de son activité ; ceci est vrai pour la catalase (paragraphe 2-2-2-4 - 1ère partie).

Mais en contre partie, l'une des propriétés les plus intéressantes de l'immobilisation des enzymes est l'augmentation de leur durée de vie de fonctionnement :

la catalase fixée sur l'albumine à l'aide du glutaraldéhyde présente une stabilité plus grande et une meilleure résistance à l'attaque de l'eau oxygénée concentrée. Nous montrerons que la catalase fixée, conservée à une température inférieure à 0°C pendant 6 mois, conserve 74 % de son activité (paragraphe 2-2-2-4 1ère partie).

A l'inverse des enzymes solubles avec lesquelles on a un phénomène de catalyse homogène, dans le cas des enzymes fixées, il s'agit de catalyse hétérogène avec l'existence de phénomènes de diffusion [(1), (5), (60), ...] provenant du transfert des molécules de substrat de la solution au site actif de l'enzyme et, en retour, des molécules de produit jusqu'à la solution.

On rencontre d'abord un problème de transport diffusionnel à travers la couche limite, zone qui se crée à l'interface et dans laquelle existe un gradient de concentration en réactifs, et un problème de transport diffusionnel à travers une membrane. Il en résulte que la concentration en substrat ou en produit dans le microenvironnement d'une enzyme immobilisée est différente de ce qu'elle serait dans le cas de l'enzyme soluble, pour une même valeur macroscopique.

Si la réaction enzymatique est exothermique, il peut y avoir élévation de température à l'intérieur de la membrane (phénomène de surtempérature), ce qui peut avoir une influence non négligeable sur la dénaturation de l'enzyme.

Les mesures d'activité effectuées sur des enzymes insolubles ne permettent d'atteindre que des grandeurs macroscopiques qui sont la résultante d'un ensemble de phénomènes microscopiques. De ce fait, les paramètres cinétiques que l'on peut mesurer, en supposant que les étapes limitantes sont les réactions chimiques définies plus haut, ne sont pas des paramètres intrinsèques de l'enzyme, mais des valeurs moyennes. Ainsi, la constante de Michaelis est appelée alors Constante de Michaelis apparente de l'enzyme immobilisée.

2-2-2 - Comparaison de l'activité de l'enzyme en solution et de l'enzyme fixée :

2-2-2-1 - Préparation de l'enzyme fixée sous forme de membrane :

La membrane enzymatique est coulée sur tissu de nylon d'épaisseur 0,2 mm et préparée comme suit :

{	catalase Sigma	: 2 mg
	albumine à 17,5 %	: 0,5 cm ³
	tampon phosphate pH 6,8	: 0,9 cm ³
	glutaraldéhyde à 2,5 %	: 0,6 cm ³
		<u>2 cm³</u>

Avec 1 cm³ du mélange, nous confectionnons une membrane de 10 cm sur 5 cm.

2-2-2-2 - Conditions expérimentales :

La mesure de l'activité de la membrane est effectuée par le contrôle de la variation de la densité optique du mélange réactionnel au cours de la réaction. Celle-ci est lue sur un spectrophotomètre U.V. ; la courbe d'étalonnage donne la correspondance entre la densité optique et la concentration en H₂O₂.

La membrane utilisée, de 1,7 cm sur 1,8 cm, contenant 0,06 mg de catalase, est placée dans un mélange réactionnel comprenant 50 cm³ d'eau oxygénée à 1 mole/litre et 50 cm³ de tampon phosphate à pH 6,8. Nous ne rajoutons pas d'eau oxygénée, le liquide est soumis à une agitation constante et des prélèvements du mélange sont effectués régulièrement.

L'activité de l'enzyme fixée est comparée à l'activité de l'enzyme en solution dans des proportions identiques :

{	masse de catalase	: 1,2 mg
	volume de H ₂ O ₂ 1 mole/l	: 1000 cm ³
	v tampon phosphate pH 6,8	: 1000 cm ³

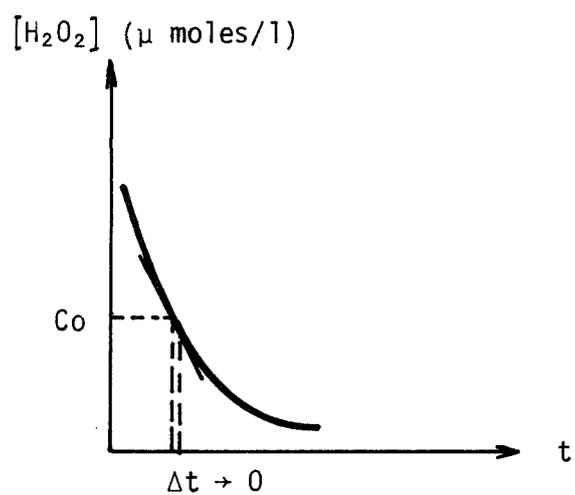


Figure 5 - DETERMINATION DE L'ACTIVITE D'UNE ENZYME PAR LA PENTE DE LA TANGENTE A LA COURBE $[H_2O_2] = f(t)$ au point Co .

2-2-2-3 - Définition de l'activité :

Nous définissons l'activité de la catalase comme : le nombre de molécules d'eau oxygénée qu'un mg de catalase décompose par minute :

$$A = \frac{\Delta n}{\Delta t \cdot m_E}$$

on peut écrire différemment cette expression, en faisant apparaître $\frac{\Delta C}{\Delta t}$:

$$A = \frac{\Delta C \cdot V}{\Delta t \cdot m_E}$$

$\left\{ \begin{array}{l} \Delta n \text{ étant la variation du nombre de micromoles de } H_2O_2 \text{ dans la solution.} \\ \Delta t \text{ un intervalle de temps petit, en mn.} \\ \Delta C \text{ la variation de concentration en } H_2O_2 \text{ en moles/l.} \\ m_E \text{ la masse d'enzyme utilisée pour la réaction.} \\ V \text{ le volume réactionnel.} \end{array} \right.$

1 unité : $1\mu M/mg/mn$

La cinétique de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase étant du 1er ordre si $[H_2O_2]$ est petit devant K_m , l'activité de l'enzyme doit être définie pour une concentration donnée C_0 (figure 5).

$$A_{C_0} = \left(\frac{dC}{dt} \right)_{C_0} \times \frac{V}{m_E} \quad (1)$$

$\left(\frac{dC}{dt} \right)_{C_0}$ désignant la pente de la tangente à la courbe donnant la concentration de H_2O_2 en fonction du temps, au point de concentration C_0 .

Lorsque l'enzyme est fixée sur un support insoluble, nous pouvons définir l'activité de la même manière ; mais nous ne mesurons que son activité apparente, cette activité correspondant principalement à l'enzyme fixée en surface.

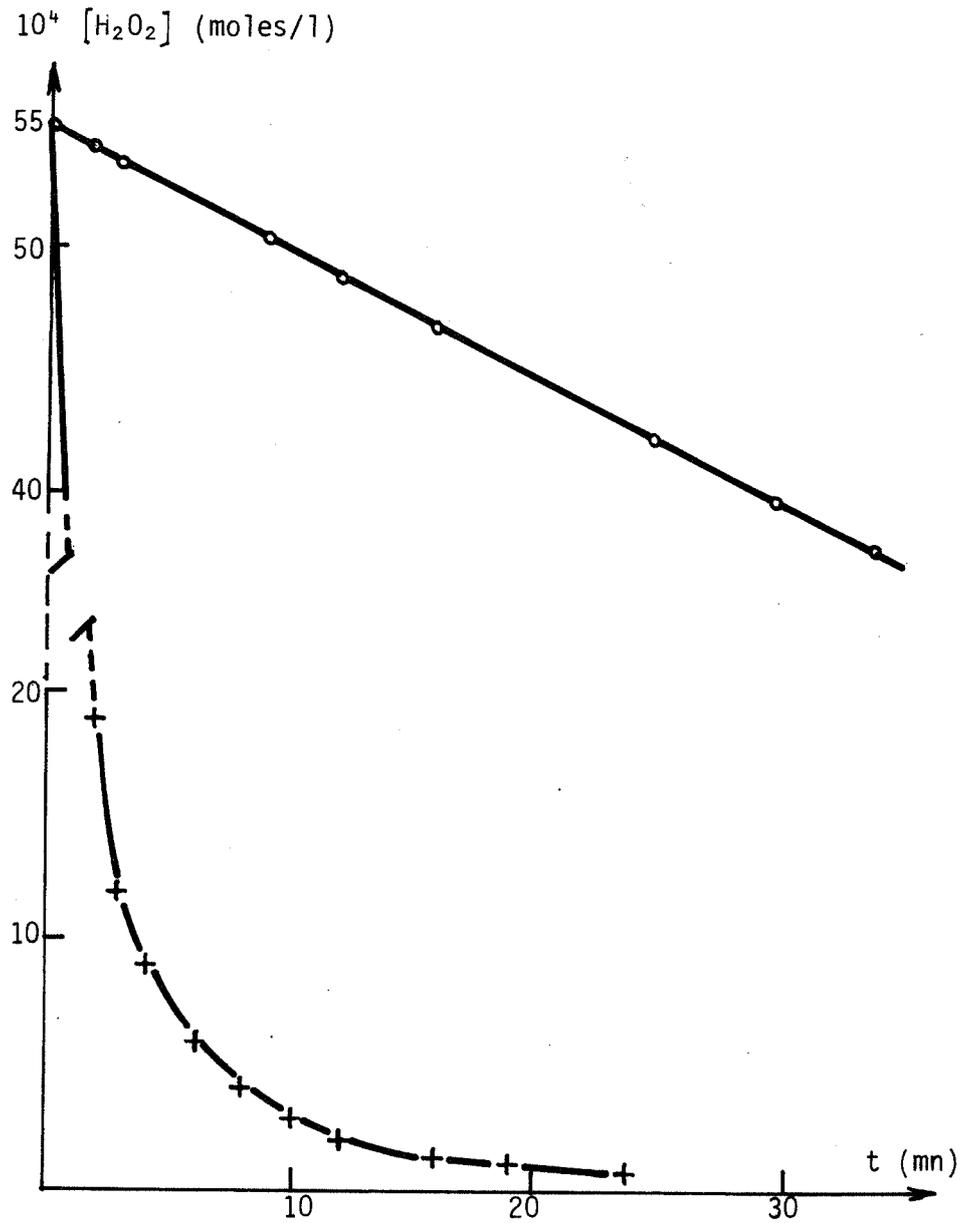


Figure 6 - COMPARAISON DU FONCTIONNEMENT DE LA CATALASE EN SOLUTION ET DE LA CATALASE FIXEE - [H₂O₂] = f(t)

$\lambda = 220 \text{ nm}$ - Echelle 0-2A

+—+—+ : catalase en solution

o—o—o : catalase fixée

2-2-2-4 - Comparaison de l'activité de la catalase en solution et de la catalase fixée :

L'activité de la catalase est déterminée à la concentration en eau oxygénée C_0 égale à $55 \cdot 10^{-4}$ mole/litre.

Nous déterminons l'activité de la catalase en solution à partir de la figure 6 qui donne les variations de la concentration en H_2O_2 (en $\mu\text{moles/l}$) en fonction du temps ; la tangente à l'origine, déterminée à la règle, étant :

$$\left(\frac{dC}{dt} \right)_{C_0 = 5500 \mu\text{moles/l}} = 2700 \mu\text{moles.l}^{-1}.\text{mn}^{-1}$$

Le calcul de l'activité de la catalase en solution par la relation (1) donne :

Activité de la catalase en solution : 4500 unités

Il en va de même pour l'activité de l'enzyme fixée, la pente à l'origine étant (figure 6) :

$$\left(\frac{dC}{dt} \right)_{C_0 = 5500 \mu\text{moles/l}} = 51,1 \mu\text{moles.l}^{-1}.\text{mn}^{-1}$$

Activité apparente de la catalase fixée : 85 unités

Ces résultats montrent que l'enzyme fixée est moins active que l'enzyme en solution. On peut citer deux causes à l'origine de ce phénomène : d'une part, seulement la fraction des molécules d'enzyme situées en surface est accessible au substrat, dont la concentration baisse très vite du fait de sa décomposition rapide ; et d'autre part, ces sites catalytiques possèdent, du fait de leur fixation, une activité intrinsèque moins grande que dans le cas de l'enzyme en solution.

De plus, pour calculer l'activité (relation (1)), nous divisons par la masse d'enzyme totale et non par la masse d'enzyme superficielle.

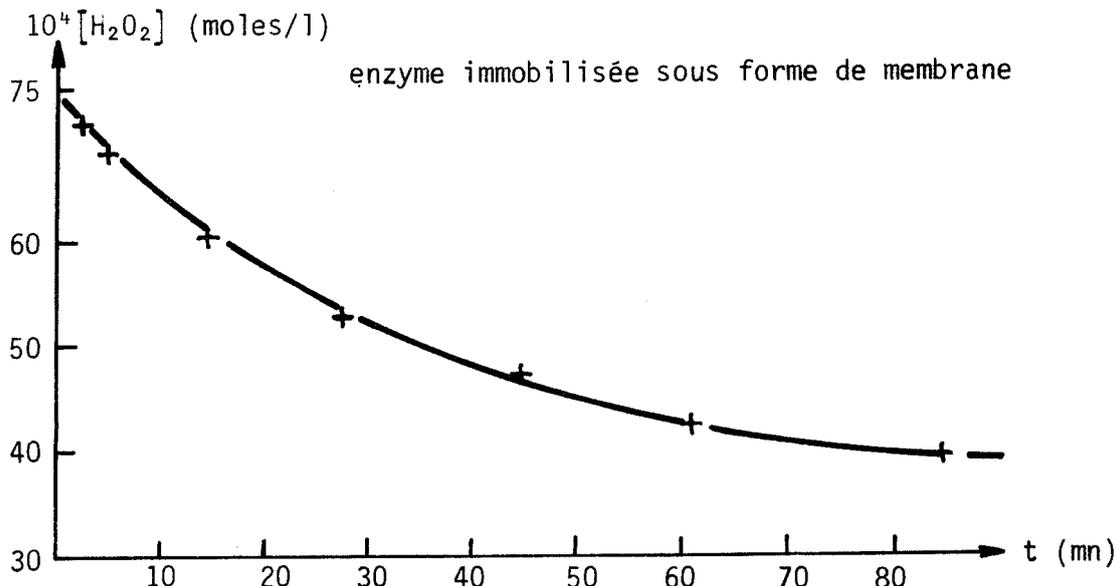


Figure 7 - UTILISATION DE LA CATALASE SOUS FORME DE MEMBRANE.

$[H_2O_2] = f(t)$. m catalase = 0,016 mg sur 1 cm^2 .

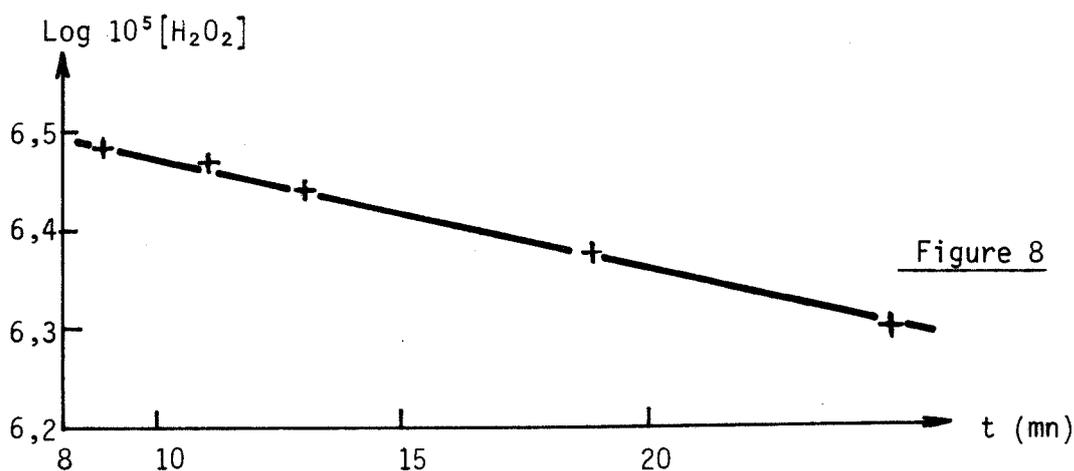
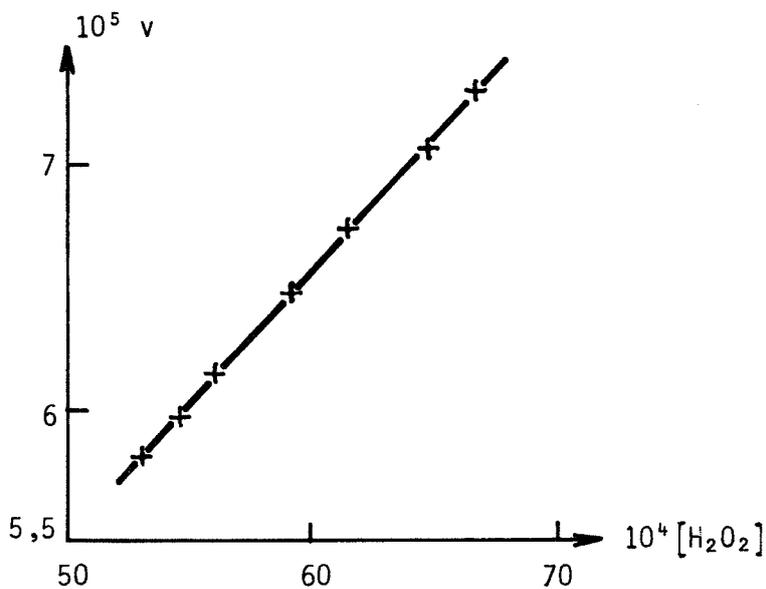


Figure 8



Figures 8 et 9 -

VERIFICATION DE LA
CINETIQUE D'ORDRE 1
POUR LA CATALASE FIXEE
SOUS FORME DE MEMBRANE
AUX FAIBLES CONCENTRATIONS
EN EAU OXYGENEE

$10^4 [H_2O_2]$ (moles/l) enzyme immobilisée sous forme de mousse

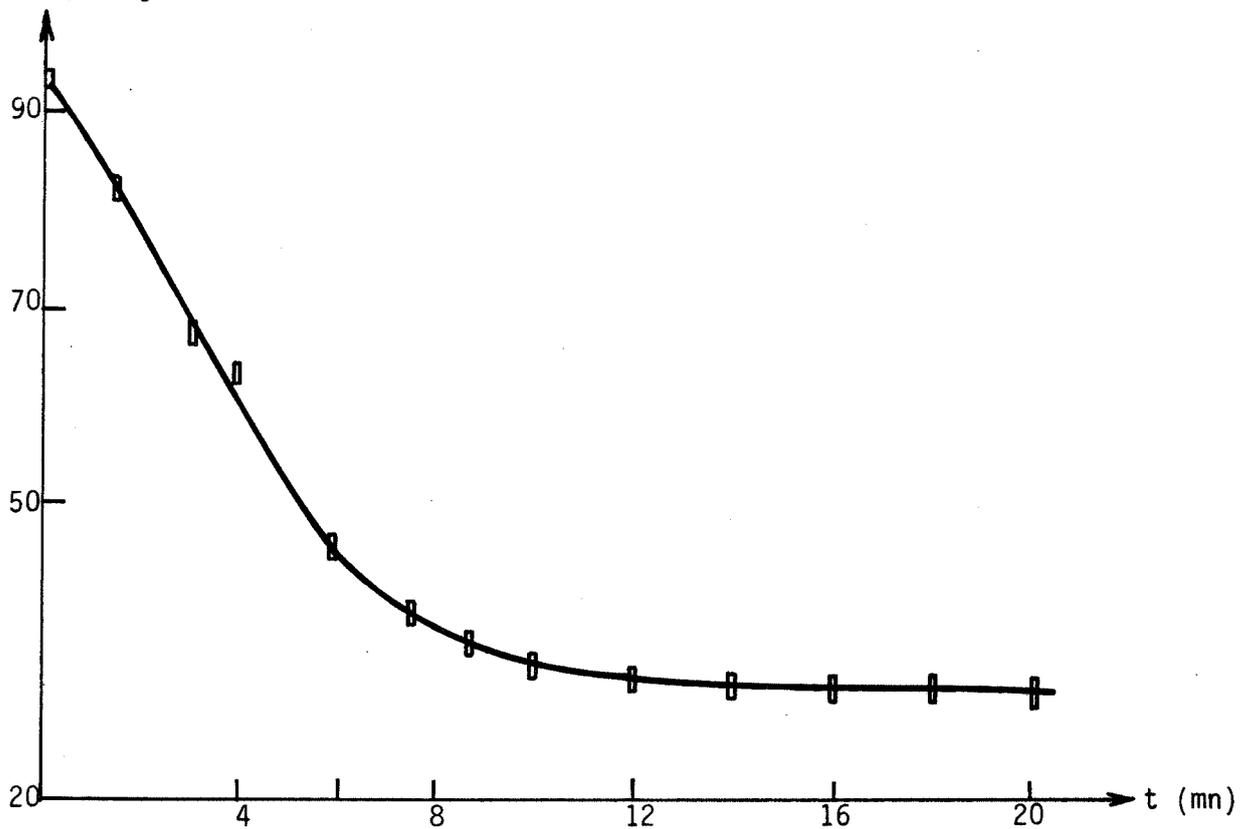


Figure 10 - UTILISATION DE LA CATALASE SOUS FORME DE MOUSSE

$$[H_2O_2] = f(t).$$

m catalase : 0,5 mg/50 cm³

La valeur donnée dans la littérature est trouvée pour une mole d'enzyme pure et pesant entre 225 000 g et 250 000 g ; cette valeur de l'activité de la catalase de foie de boeuf en solution est : $9 \cdot 10^4$ moles de H_2O_2 décomposée par mole d'enzyme et par seconde à pH 7, 20°C et $[H_2O_2] = 10^{-2}$ mole/l (12) , la valeur maximale de l'activité trouvée est de $3,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ (61).

Si on voulait trouver l'activité autre que superficielle, il faudrait broyer la membrane : ainsi on tendrait à obtenir une grande partie de l'activité de l'enzyme fixée.

Tout ceci explique que nous ne trouvons plus qu'une activité de 85 unités pour la catalase fixée au lieu de 4500 unités pour la catalase en solution.

2-2-3 - Vérification de la cinétique Michaelienne :

2-2-3-1 - Utilisation de l'enzyme sous forme de membrane :

Un essai de fonctionnement de la membrane enzymatique avec de l'eau oxygénée diluée ($0,75 \cdot 10^{-2}$ mole/l) (Figure 7) nous permet de retrouver que dans le domaine de concentrations considéré, l'ordre de la réaction est 1.

La courbe Log (concentration de H_2O_2) en fonction du temps, dans un intervalle de temps réduit (10 à 30 minutes), est une droite de pente $k = 1,83 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Figure 8). La vitesse de réaction s'écrit : $v = k [H_2O_2]$. Pour des concentrations étudiées de 0,005 mole/l à 0,007 mole/l, qui sont inférieures à 0,11 mole/l, c'est-à-dire à $K_m/10$, nous avons bien trouvé une expression linéaire de la vitesse (Figure 9) donc une réaction d'ordre 1.

2-2-3-2 - Utilisation de l'enzyme sous forme de mousse :

La mousse est préparée de la façon décrite précédemment (paragraphe 2-2-1-4) avec 0,5 mg de catalase, elle est placée dans 50 cm³ d'eau oxygénée de concentration 0,01 mole/litre. La figure 10 montre que la production d'oxygène s'arrête rapidement, sans doute du fait du non-refroidissement du mélange.

III - CINÉTIQUE DE LA RÉACTION DE DÉCOMPOSITION DE L'EAU OXYGÉNÉE PAR LA CATALASE EN PRÉSENCE DE H₂O₂ PLUS CONCENTRÉE (2 MOLES/L) :

Les expériences sont menées avec de petites quantités de catalase (de 1 à 5 mg) et de l'eau oxygénée 10 moles/l diluée 4 ou 5 fois. La production d'oxygène obtenue est de quelques litres au bout d'une heure.

3-1 - Premières mesures :

Primitivement, la mousse de catalase est maintenue sous un entonnoir renversé. Le volume d'oxygène recueilli est ensuite lu facilement sur un compteur à gaz :

Catalase	H ₂ O ₂	oxygène					
		t(mn)	5	10*	15	60	240
2 mg	2,5 moles/l						
	0,3 l	V _{O₂} (l)	0,5	0,75	1,1	2	3

Tableau 1 - Production d'oxygène au cours du temps.

* 50 cm³ de H₂O₂ 10 moles/l sont ajoutés à 10 et 20 mn.

(la concentration en H₂O₂ dans la solution n'a pas été suivie au spectrophotomètre U.V.).

3-2 - Essai de réaction en appareil de Kipp :

En vue d'une première idée de générateur d'oxygène nous utilisons l'appareil de Kipp (de production d'hydrogène) qui représente un modèle convenable simple de réacteur : cet appareil, facile d'utilisation, nous permet de produire de l'oxygène (Figure 11) et se prête à une régulation simple.

La mousse de catalase, prise dans des billes de verre pour l'alourdir, est placée dans la sphère intermédiaire de l'appareil de Kipp. L'eau oxygénée remplit la boule inférieure et la boule intermédiaire jusqu'au niveau de la mousse. Les quantités de 50 cm³ de H₂O₂ à 10 moles/l rajoutées toutes les dix minutes sont introduites par la boule supérieure.

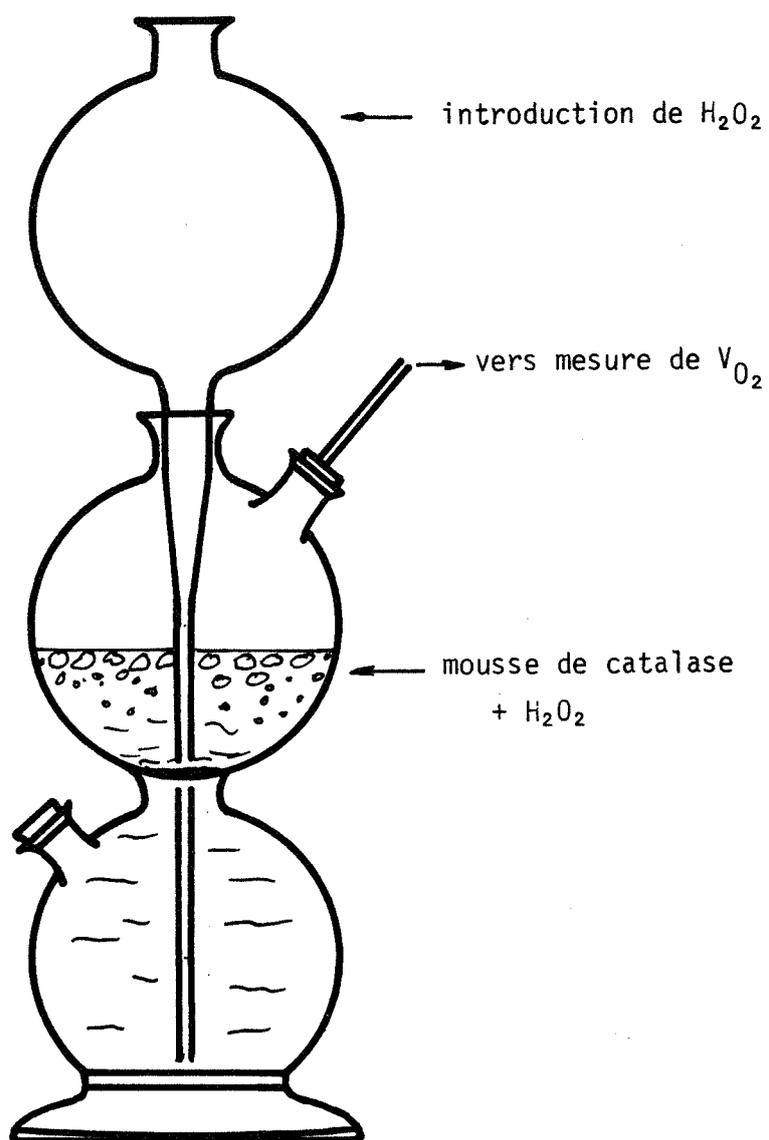


Figure 11 - DECOMPOSITION DE L'EAU OXYGENEE PAR LA CATALASE FIXEE EN APPAREIL DE KIPP.

Les mesures de V_{O_2} recueilli sur le compteur à gaz sont les suivantes :

catalase	H ₂ O ₂	oxygène							
		t (h)	1/12 *	5/12 *	1	3	18	24	168
5 mg	2 moles/l	V_{O_2} (l)	4	4,5	5	6,5	10	12	30
	1,2 l								

Tableau 2 - Production d'oxygène en fonction du temps en appareil de Kipp, avec la mousse de catalase.

* 50 cm³ de H₂O₂ 10 moles/l sont ajoutés toutes les dix minutes jusqu'à 45 minutes.

Les volumes sont exprimés à 21°C et sous la pression atmosphérique du laboratoire.

Nous constatons, après ces premières expériences que, bien que l'enzyme fixée subisse une diminution d'activité au cours du temps, elle conserve une réactivité appréciable au bout de plusieurs jours.

3-3 - Mise en évidence de la dénaturation de la catalase :

La diminution d'activité de la catalase est mise en évidence au cours des expériences suivantes :

- Deux membranes identiques sont coulées sur tissu de nylon et placées tour à tour verticalement dans la même solution, celle-ci étant contenue dans un flacon fermé relié au compteur à gaz. La première membrane est mise en fonctionnement du temps 0 au temps 30 mn, la deuxième du temps 30 mn au temps 60 mn. Les conditions expérimentales sont décrites sur la figure 12.

La courbe représentative du fonctionnement de la 2ème membrane part du point B et non du point A: il y a eu baisse d'activité de la première membrane. Cette diminution peut être attribuée d'une part à la diffusion, d'autre part à la dénaturation : dans le premier cas, la diffusion de l'eau oxygénée vers l'enzyme serait gênée par l'eau provenant de la réaction enzymatique, d'où abaissement de la vitesse de réaction ; dans le deuxième cas, c'est l'activité de l'enzyme qui diminue par suite de sa dénaturation.

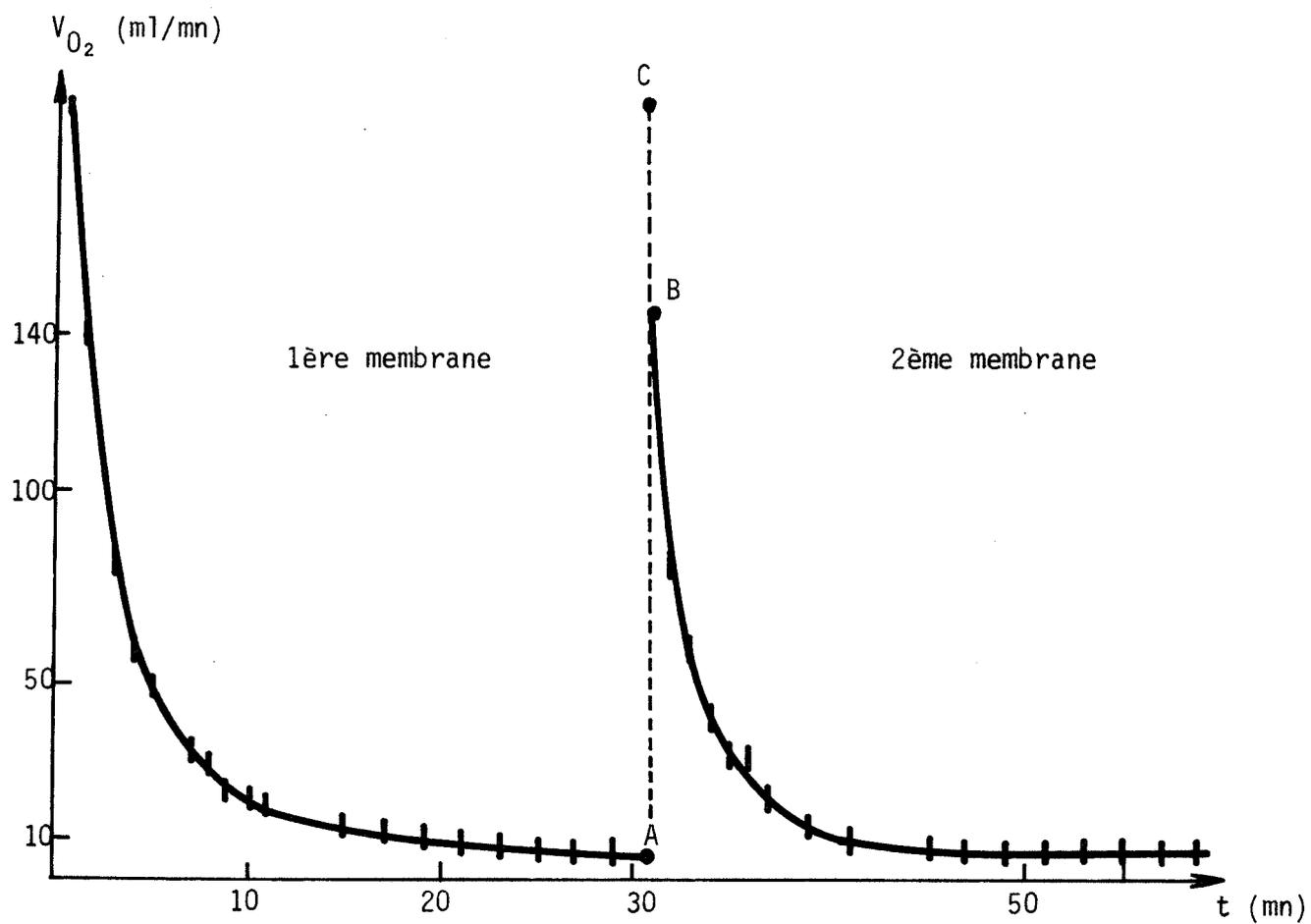


Figure 12 - EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE -
membrane de 30 cm² et de 0,2 mm d'épaisseur -
masse de catalase : 0,6 mg - H₂O₂ 1 mole/l : 140 cm³.

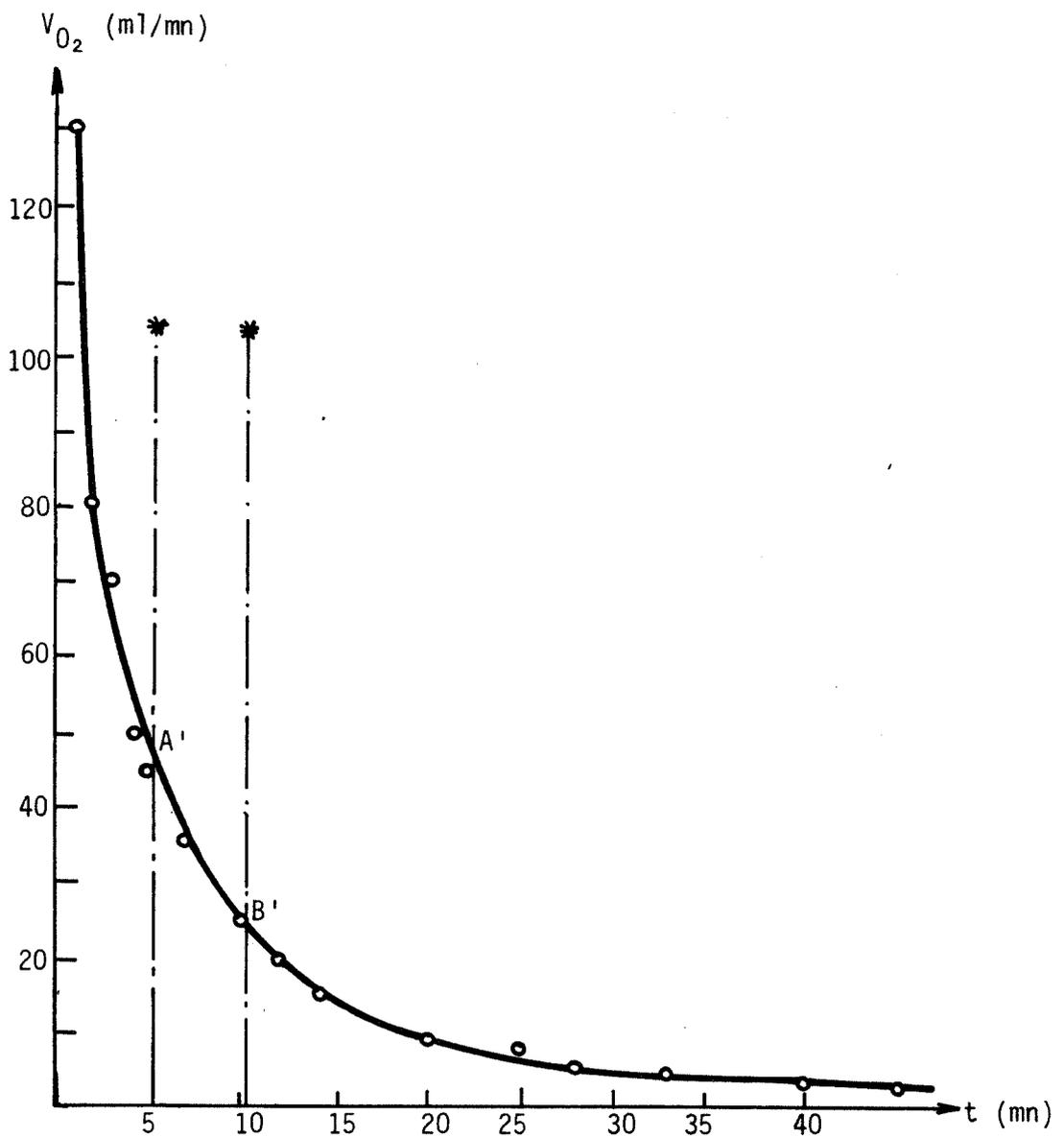


Figure 13 - MISE EN EVIDENCE DE LA DENATURATION DE LA CATALASE.

membrane de 30 cm^2 et $0,2 \text{ mm}$ d'épaisseur

masse de catalase : $0,9 \text{ mg}$

H_2O_2 1 mole/l : 120 cm^3

* repos de la membrane : 20 mn en A' et B'.

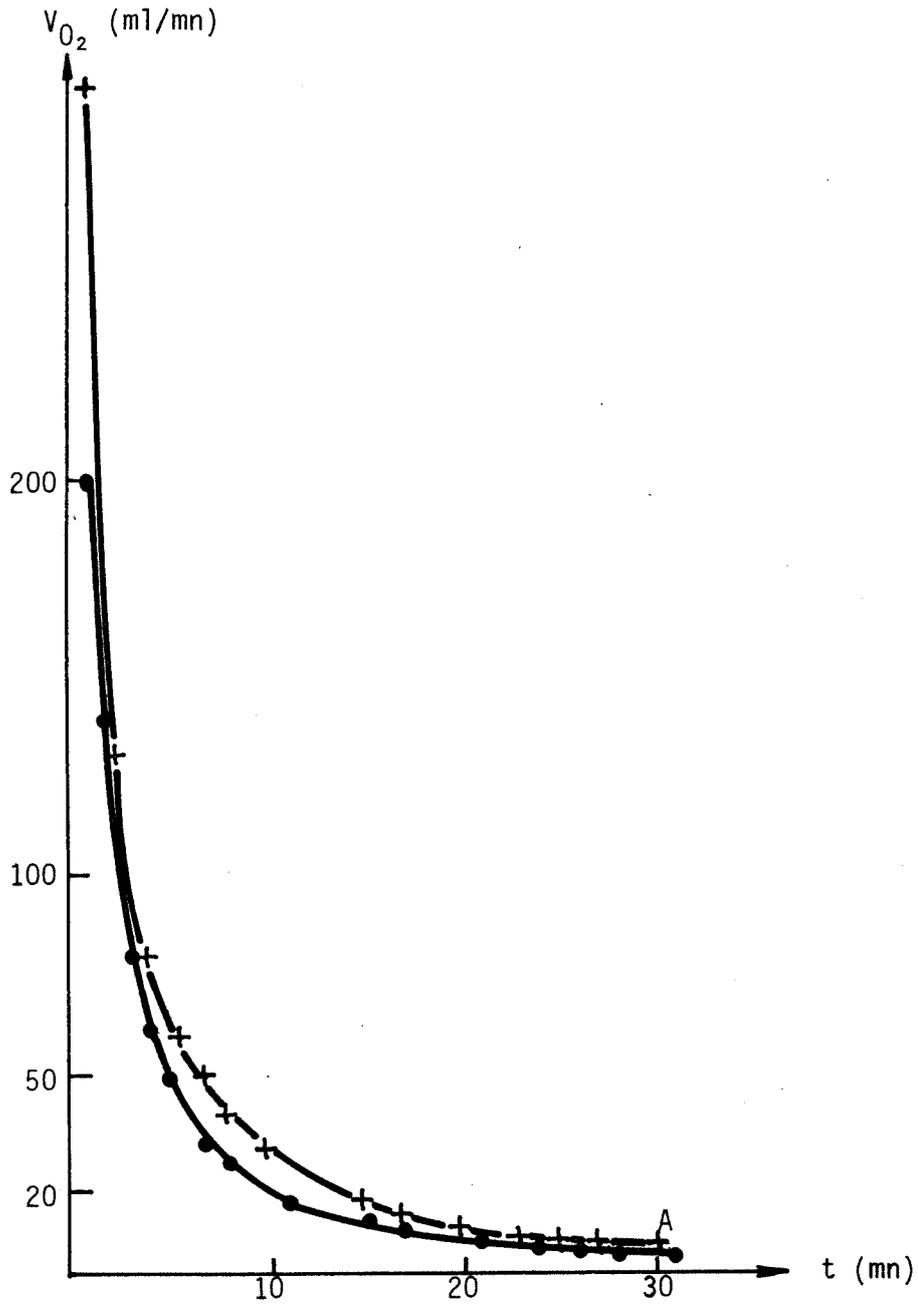


Figure 14 - INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR SUR L'ACTIVITÉ DE LA MEMBRANE ENZYMATIQUE.

$[H_2O_2]$: 1 mole/l

1ère membrane : ●—●—● e = 0,2 mm ; m catalase = 0,6 mg.

2ème membrane : +—+—+ e = 0,6 mm ; m catalase = 1,8 mg.

Pour éliminer le phénomène de gêne dans la diffusion de l'eau oxygénée, nous procédons à l'expérience suivante :

une membrane de catalase armée avec un tissu de nylon est placée verticalement dans une solution d'eau oxygénée à 1 mole/l, dans le même flacon fermé relié au compteur à gaz. La membrane, mise en fonctionnement pendant cinq minutes, est retirée du flacon et sèche pendant vingt minutes pour éliminer l'eau qui gênerait la diffusion de l'eau oxygénée. Lors de la remise en réaction, la courbe représentative du débit d'oxygène reprend au même point A' (figure 13) et montre bien qu'il y a eu dénaturation de l'enzyme.

D'autre part l'aspect de la membrane a changé : elle a un peu blanchi par suite de l'attaque de l'eau oxygénée. Lorsque nous réutilisons l'enzyme à une concentration plus faible, nous ne retrouvons plus l'activité qu'elle aurait si elle n'avait pas travaillé avec l'eau oxygénée plus concentrée.

Ces observations nous permettent de penser qu'il est plus probable que l'abaissement de l'activité de la catalase soit dû à une dénaturation de l'enzyme plutôt qu'à une inhibition par l'eau oxygénée en excès, comme le supposent BONNISCHSEN et collaborateurs (paragraphe 1-2-2-2).

3-4 - Etude des divers paramètres :

3-4-1 - Epaisseur et surface de la membrane :

Deux membranes sont coulées sur du tissu nylon de surface identique (30 cm²), mais l'épaisseur de l'une est triple de l'épaisseur de l'autre. Leurs caractéristiques respectives sont données sur la figure 14. Les conditions de l'expérience sont les mêmes que précédemment.

L'augmentation de l'épaisseur de la couche de mousse d'enzyme ne favorise pas la production d'oxygène : le débit, plus élevé dans les premières minutes, se place à la même valeur au bout de vingt minutes.

Seule est importante la surface de contact, et non l'épaisseur de la couche de mousse enzymatique.

3-4-2 - Température

Nous ferons dans le paragraphe suivant (paragraphe 4-2) la comparaison entre des expériences menées à 21°C et à 0°C, et nous en retiendrons l'avantage d'un refroidissement important, tant pour éliminer les calories que pour conserver à l'enzyme une activité plus régulière.

Une interprétation de la dénaturation par effet thermique de l'enzyme a été donnée (62) montrant qu'au-dessus d'une température critique, au lieu d'augmenter, la vitesse de la réaction diminue et, à des températures plus élevées, l'enzyme devient complètement inactive. La cinétique reflète alors l'inactivation de la molécule protéique (63).

3-4-3 - Pression :

Toutes les expériences ont été menées à la pression atmosphérique du laboratoire. Une étude à des pressions supérieures est faite par la suite (III^e partie).

3-4-4 - Concentration en eau oxygénée :

Nous serons amenés, après une première étude de générateur d'oxygène, à penser que nous avons intérêt à utiliser de l'eau oxygénée assez diluée. De fortes concentrations en eau oxygénée provoquent une augmentation de température si importante qu'elle nuit rapidement à l'activité enzymatique.

IV - ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA TEMPERATURE AU COEUR DE LA COUCHE ENZYMATIQUE PAR L'EMPLOI DES THERMISTANCES :

4-1 Utilisation d'une thermistance :

Les mesures ont été faites grâce à une thermistance sous forme de perle (de caractéristique $R_0 = 100.000 \Omega$), mesurée par un pont de Wheatstone.

La température doit être mesurée au coeur de la zone réactive : la perle de la thermistance est enrobée pour chaque expérience d'une pellicule d'enzyme fixée sur albumine suivant la méthode déjà décrite (paragraphe 2-2-1-4), elle est ensuite introduite dans des solutions d'eau oxygénée de concentrations différentes.

4-2 - Réalisation expérimentale et résultats :

Dès que la catalase est mise en contact avec l'eau oxygénée, la chaleur produite par la réaction élève la température de la membrane. Il en résulte un flux de chaleur vers le milieu extérieur. Une évacuation rapide de la chaleur produite permet alors de maintenir la membrane à une température plus faible et par suite d'éviter la dénaturation.

A la température ambiante, la température de la sonde traduisant la production d'oxygène décroît très vite du fait de la destruction des sites actifs de l'enzyme par la chaleur produite. La figure 15 montre des réactions de décomposition menées à 21°C à des concentrations en eau oxygénée égales respectivement à 1 mole/l, 2 moles/l, 5 moles/l, où l'on peut observer ce phénomène.

Pour ne pas atteindre la température critique, une amélioration consiste à maintenir le bain réactionnel aux environs de 0°C en plongeant le récipient dans de la glace fondante. La figure 16 représente la comparaison des résultats obtenus pour une réaction menée d'une part à 21°C, d'autre part à 0°C.

Le refroidissement produit un effet considérable puisque la température maximale atteinte n'est que d'environ 20°C au lieu de 32°C lors de l'expérience à 21°C ; de plus, l'enzyme présente dans ces conditions une activité plus régulière et plus durable.

Nous avons mesuré (figure 17) grâce à cette thermistance les températures maximales de la réaction de décomposition de l'eau oxygénée au cours de diverses expériences mettant en jeu des concentrations croissantes, connues d'eau oxygénée. Il est donc possible, grâce à une courbe d'étalonnage, d'effectuer un dosage de l'eau oxygénée par la mesure de la température maximale de la réaction (64).

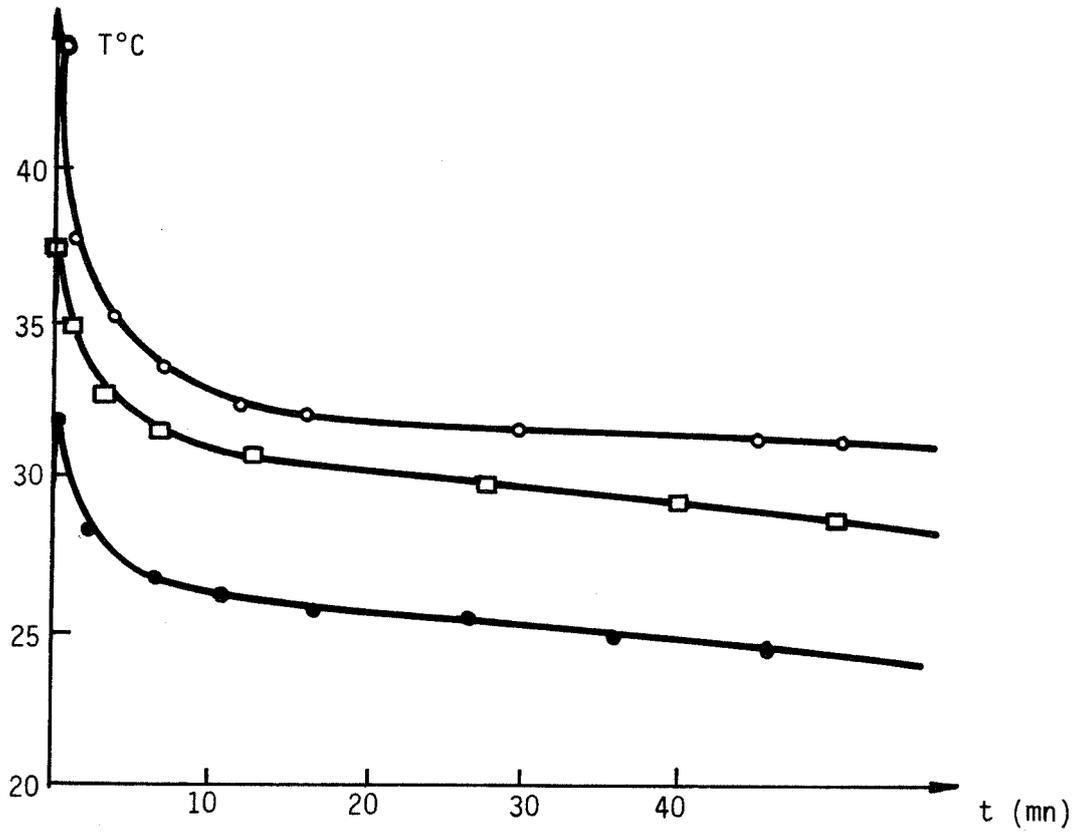


Figure 15 - EVOLUTION DE LA TEMPERATURE LORS DE LA REACTION ENZYMATIQUE A 21°C, MESUREE PAR LA THERMISTANCE-PERLE, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN H₂O₂.

- — ● — ● : [H₂O₂] = 1 mole/l
- — □ — □ : [H₂O₂] = 2 moles/l
- — ○ — ○ : [H₂O₂] = 5 moles/l

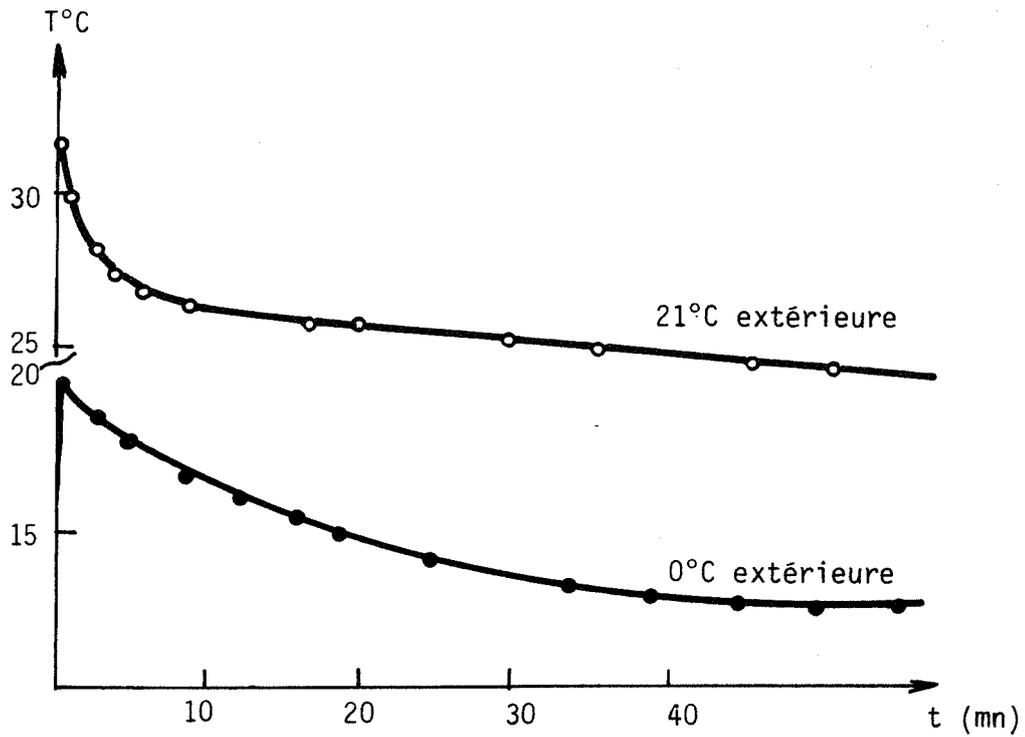


Figure 16 - EVOLUTION DE LA TEMPERATURE AU COURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE AVEC $[H_2O_2] = 1$ mole/l, à 21°C et à 0°C (extérieures).

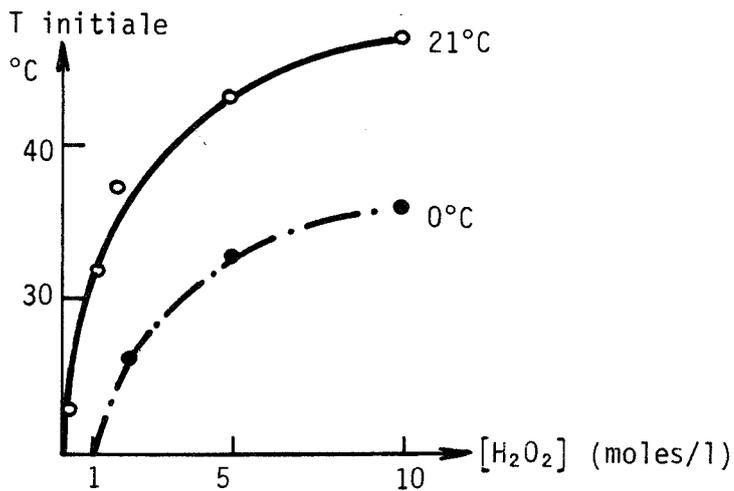


Figure 17 - EFFET DU REFROIDISSEMENT SUR LES TEMPERATURES INITIALES AU COEUR DE LA COUCHE ENZYMATIQUE - T initiale = $f[H_2O_2]$.

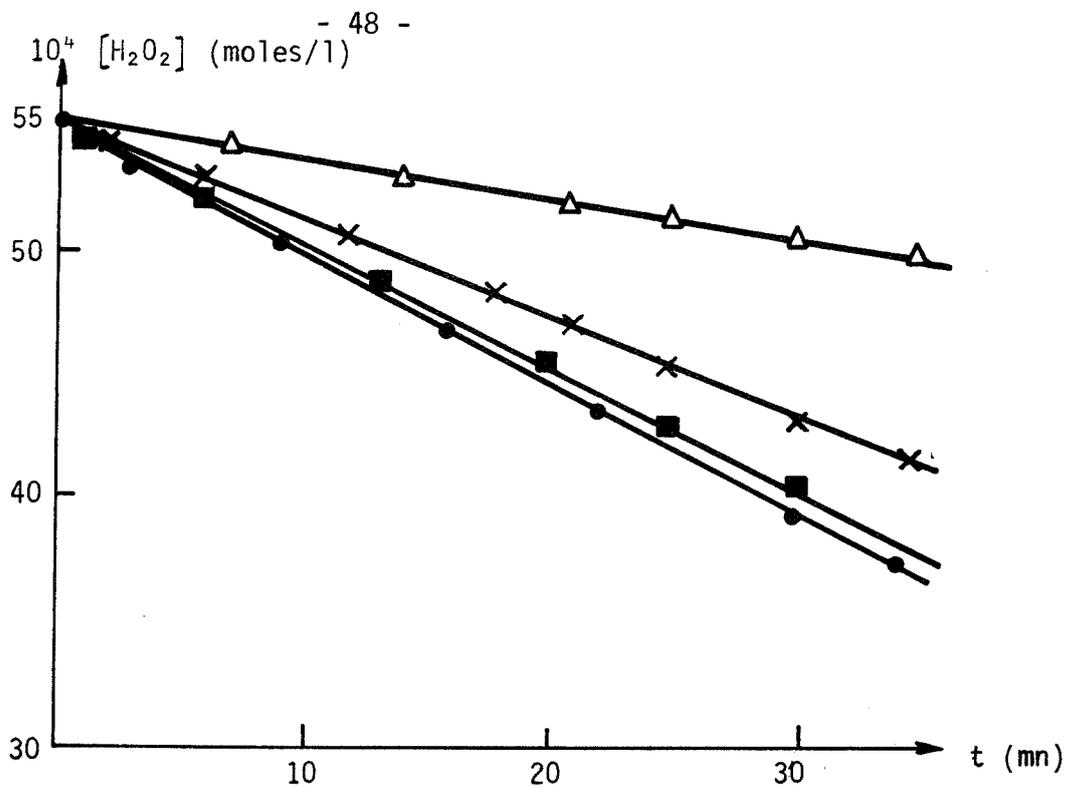


Figure 18 - EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE FIXEE CONSERVEE
A - 18°C ET A T AMBIANTE - $[H_2O_2] = f(t)$

- catalase fraîche
- catalase conservée 1 mois à - 18°C
- ×—×—× catalase conservée 6 mois à - 18°C
- △—△—△ catalase conservée 3 ou 6 mois à T ambiante

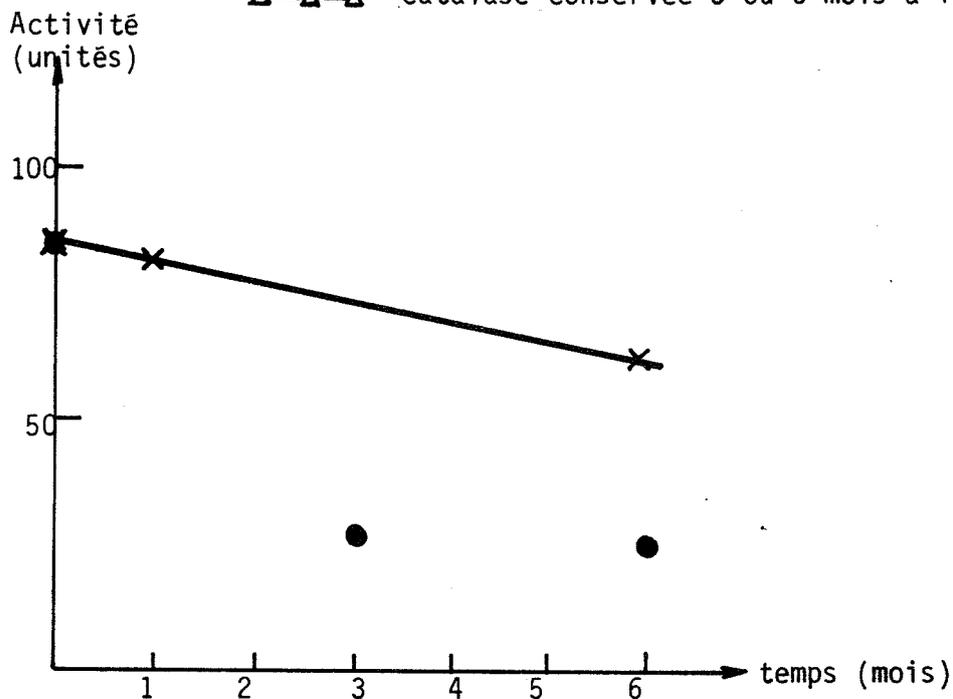


Figure 19 - VARIATION DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE FIXEE EN FONCTION
DU TEMPS DE CONSERVATION.

- ×—×—× catalase fixée conservée à - 18°C
- ● catalase fixée conservée à T ambiante

V - EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE FIXEE EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION :

L'enzyme fixée est soumise à des tests d'activité après un jour, un mois, trois et six mois de conservation à - 18°C et à température ambiante. Ces tests permettent d'avoir une première idée sur la façon dont l'activité de l'enzyme évolue au cours du temps.

Une membrane de 10 cm sur 5 cm est fabriquée avec 1 cm³ de la solution décrite plus haut (paragraphe 2-2-2-1) : on y découpe des membranes de 1,7 cm sur 1,8 cm contenant chacune 0,06 mg de catalase. Les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment (paragraphe 2-2-2-2).

Les résultats des tests sur les membranes sont les suivants :

	Pente à l'origine ($\mu\text{moles.l}^{-1}.\text{mn}^{-1}$)	V solution (l)	masse d'enzyme (en mg)	Activité (unités)
Enzyme fixée fraîche	51,1	0,1	0,06	85
Enzyme fixée conservée 1 mois à -18°C	48	0,1	0,06	80
Enzyme fixée conservée 6 mois à -18°C	37,5	0,1	0,06	62,5
Enzyme fixée conservée 3 ou 6 mois à T ambiante (même résultat)	15	0,1	0,06	25

Tableau 3 - Calcul de l'activité des membranes conservées au froid et à température ambiante.

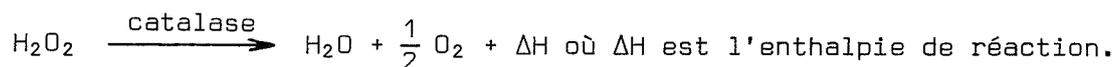
L'activité est calculée de la même façon que précédemment, à partir de la figure 18. L'enzyme fixée conservée à température ambiante perd plus des deux-tiers de son activité au bout de trois mois (Figure 19) alors que l'activité de la membrane conservée au froid reste pratiquement la même pendant un mois et ne diminue que légèrement en six mois.

La catalase fixée pourra donc être stockée pendant plusieurs mois, à condition d'être conservée au froid.

VI - ANALYSE THEORIQUE

Nous traitons du phénomène de diffusion à travers la membrane afin de rendre compte de l'évolution de la concentration en eau oxygénée et de la température à l'intérieur de celle-ci.

La décomposition de l'eau oxygénée par la catalase peut s'écrire comme suit :



6-1 - Evolution de la concentration en eau oxygénée dans la membrane au cours du temps :

Si on considère une membrane perméable en présence d'eau oxygénée, la diffusion de celle-ci dans la membrane est donnée par les deux lois de Fick (65). La première loi de Fick donne le flux de diffusion, J, de H_2O_2 à l'intérieur de la membrane :

$$J = -D_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{\partial [\text{H}_2\text{O}_2]}{\partial x} \quad \textcircled{1}$$

J étant la quantité de H_2O_2 qui traverse la membrane par unité de surface et par unité de temps, D est le coefficient de diffusion de H_2O_2 dans la couche active, considéré comme constant dans un domaine où les températures varient peu.

$\frac{\partial [\text{H}_2\text{O}_2]}{\partial x}$ est le gradient de concentration d'eau oxygénée, l'axe des x étant perpendiculaire à la membrane.

La deuxième loi de Fick donne la variation de la concentration en eau oxygénée au cours du temps :

$$\frac{\partial [\text{H}_2\text{O}_2]}{\partial t} = D_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot \frac{\partial^2 [\text{H}_2\text{O}_2]}{\partial x^2} \quad \textcircled{2}$$

En présence d'une réaction chimique, la concentration de H_2O_2 dépend du couplage entre la diffusion et la réaction ; sa variation est la somme de deux termes, le premier terme étant le terme de diffusion donné précédemment (2) et le deuxième terme étant le terme de réaction chimique donné par l'équation de Michaelis-Menten :

$$\left(\frac{\partial [H_2O_2]}{\partial t} \right) = - V_m \cdot \frac{[H_2O_2]}{K_m + [H_2O_2]}$$

réaction
chimique

où K_m est la constante de Michaelis de la catalase et V_m la vitesse de réaction maximum. La concentration d'eau oxygénée à l'intérieur de la membrane est déterminée par l'équation suivante, à température constante (59) :

$$\frac{\partial [H_2O_2]}{\partial t} - D_{H_2O_2} \cdot \frac{\partial^2 [H_2O_2]}{\partial x^2} + V_m \cdot \frac{[H_2O_2]}{K_m + [H_2O_2]} = 0 \quad (3)$$

6-2 - Evolution de la température dans la membrane au cours du temps :

Le flux de chaleur dans la membrane, c'est-à-dire la quantité de chaleur qui traverse la membrane par unité de surface et par unité de temps, peut s'écrire, en supposant qu'il n'y a pas de convection à l'intérieur de la membrane solide (66) :

$$J = - \lambda \frac{\partial \theta}{\partial x} \quad (4)$$

où θ désigne la température et λ est la conductivité thermique de la membrane.

La variation de température au cours du temps est donnée par :

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \frac{\lambda}{\rho \cdot c} \cdot \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} \quad (5)$$

où ρ est la masse volumique et c la capacité thermique de la membrane.

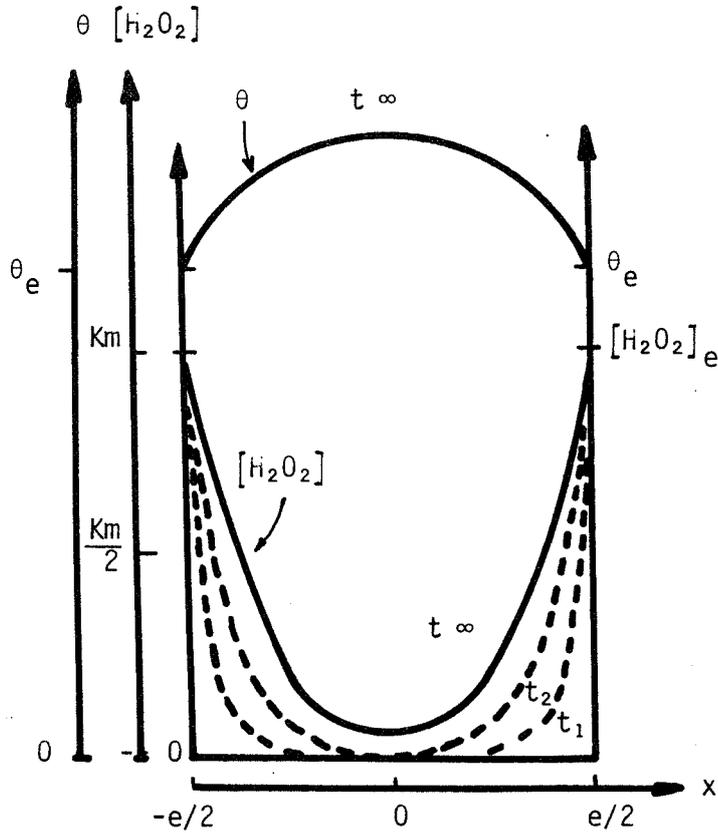


Figure 20 - PROFILS DE TEMPERATURE ET DE CONCENTRATION EN H_2O_2 A L'INTERIEUR DE LA COUCHE ENZYMATIQUE

calculés pour l'état stationnaire (—) et non stationnaire (----)

unité de température : $\frac{\Delta H_i \cdot D_{H_2O_2}}{\lambda} \cdot Km$ ($^{\circ}C$)

unité de temps : $\frac{e^2}{D_{H_2O_2}}$ (s)

e : épaisseur de la couche enzymatique

unité de concentration : Km

θ_e : température extérieure.

La réaction étant exothermique, la quantité de chaleur dégagée produit une élévation de température par unité de temps égale à :

$$\frac{\Delta H}{\rho c} \cdot V_m \frac{[H_2O_2]}{K_m + [H_2O_2]}$$

De la même façon que la concentration en eau oxygénée, la température θ dans la membrane dépend du couplage entre la diffusion et la réaction, sa variation est égale à la somme du terme de diffusion (5) et du terme de réaction chimique que nous venons d'écrire : (67).

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} - \frac{\lambda}{\rho c} \cdot \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} - \frac{\Delta H}{\rho c} \cdot V_m \frac{[H_2O_2]}{K_m + [H_2O_2]} = 0 \quad (6)$$

Les profils de température et de concentration en eau oxygénée à l'intérieur de la membrane enzymatique ont été calculés par analyse numérique et sont donnés sur la figure 20.

$$\text{A l'état stationnaire, nous avons : } \frac{\partial \theta}{\partial t} = 0, \frac{\partial [H_2O_2]}{\partial t} = 0$$

Les équations (3) et (6) peuvent être additionnées, après avoir multiplié (3) par $\frac{\Delta H}{\rho c}$: du fait de cette addition, le terme de réaction disparaît et nous avons :

$$\Delta H \cdot D_{H_2O_2} \cdot \frac{d^2 [H_2O_2]}{dx^2} + \lambda \frac{d^2 \theta}{dx^2} = 0 \quad (7)$$

cette équation donne, une fois intégrée :

$$-\frac{\lambda d\theta}{dx} = \Delta H \cdot D_{H_2O_2} \cdot \frac{d[H_2O_2]}{dx} + K \quad (8)$$

où K est la constante d'intégration et ΔH est l'enthalpie moyenne de réaction dans l'intervalle de températures considéré.

La symétrie de la membrane implique que, dans sa partie centrale, le flux de chaleur $\left(-\frac{\lambda d\theta}{dx}\right)$, aussi bien que le flux d'eau oxygénée $\left(-D_{H_2O_2} \cdot \frac{d[H_2O_2]}{dx}\right)$ sont égaux à zéro, par conséquent la constante d'intégration K est nulle aussi.

Ceci nous montre que, en régime stationnaire, la vitesse du transfert de chaleur est proportionnelle à la vitesse de diffusion de H_2O_2 à travers la surface unité. Après intégration de (8) et en tenant compte de la symétrie du système, nous trouvons que la température θ à l'intérieur de la membrane dépend de la concentration du substrat H_2O_2 par la relation suivante :

$$\theta - \theta_e = - \frac{\Delta H \cdot D_{H_2O_2}}{\lambda} \cdot \left\{ [H_2O_2] - [H_2O_2]_e \right\} \quad (9)$$

les conditions limites sont les suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{ll} [H_2O_2] = [H_2O_2]_e, & x = \pm \frac{e}{2}, t \geq 0 \\ \theta = \theta_e & , \quad x = \pm \frac{e}{2}, t \geq 0 \\ [H_2O_2] = 0 & , \quad -\frac{e}{2} < x < \frac{e}{2}, t = 0 \\ \theta = \theta_e & , \quad -\frac{e}{2} < x < \frac{e}{2}, t = 0 \end{array} \right.$$

θ_e désigne la température à l'interface de la couche enzymatique et de la solution de H_2O_2 et $[H_2O_2]_e$ est la concentration de H_2O_2 à la même interface.

Nous pouvons noter que cette interface est la même de part et d'autre de la membrane puisque le système considéré est symétrique.

La relation (9) nous montre que plus la concentration de H_2O_2 utilisée est grande, plus la température à l'intérieur de la membrane est grande.

Dans un domaine où les températures varient considérablement, il est impossible de considérer $D_{H_2O_2}$ comme constant, $D_{H_2O_2}$ varie avec la température suivant une loi exponentielle :

$$D_{H_2O_2} = D_{0H_2O_2} \cdot e^{-E/R\theta} \quad (68)$$

Il en va de même pour ΔH (loi de VANT'HOFF) et V_m (loi d'ARRHENIUS).

La deuxième loi de Fick donnant la variation de la concentration de l'eau oxygénée au cours du temps devient :

$$\frac{\partial [H_2O_2]}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_{H_2O_2} \cdot \frac{\partial [H_2O_2]}{\partial x} \right)$$

Le problème des paramètres variables (D, ΔH , V_m) n'a pas encore été traité ; il est en cours d'étude dans le cas de l'état stationnaire.

VII - CONCLUSION :

La catalase, catalyseur biologique spécifique de la réaction de décomposition de l'eau oxygénée, peut être utilisée en solution ou sous la forme fixée ; cette dernière lui permet d'être plus stable et plus résistante à l'attaque de l'eau oxygénée.

Un catalyseur biologique est, plus que tout autre, sensible à la chaleur : nous retiendrons des expériences décrites l'avantage à retirer d'un refroidissement conséquent, pour éliminer les calories produites par la réaction et par suite maintenir l'activité de l'enzyme.

Un capteur thermique à catalase peut être utilisé pour déterminer la concentration d'une solution d'eau oxygénée : la température maximale de la décomposition de l'eau oxygénée donnée par celui-ci étant directement reliée à la concentration cherchée.

La présentation de l'enzyme fixée choisie sera celle d'une mousse présentant le plus de surface possible au mélange réactionnel. Les plaques de mousse enzymatique peuvent être préparées à l'avance et conservées au froid pour garder la plus grande partie de leur activité.

L'étude d'un modèle théorique de la diffusion-réaction permet de voir que c'est au milieu de la membrane que la température est la plus élevée et qu'à l'état stationnaire, elle est proportionnelle à la concentration de l'eau oxygénée employée si nous travaillons dans un domaine où le coefficient de diffusion de l'eau oxygénée varie peu.

Dans le but de faire baisser la température dans la membrane, nous avons construit plusieurs réacteurs avec différents types de refroidissement ; ces réacteurs sont décrits dans la Deuxième Partie.

DEUXIEME PARTIE

Etude d'un réacteur enzymatique utilisant la catalase
fixée pour la décomposition de l'eau oxygénée

Dans ce chapitre, nous chercherons à mettre en pratique les résultats obtenus dans la partie précédente concernant la décomposition catalytique enzymatique de l'eau oxygénée en vue de la production, si possible en continu, de l'oxygène.

La catalase, immobilisée de la manière décrite précédemment, peut être utilisée pour la production d'oxygène à partir des solutions d'eau oxygénée. Aucun auteur n'a, à notre connaissance, parlé de l'effet thermique, c'est pourquoi nous essaierons de réaliser un réacteur où sera mis en évidence l'aspect exothermique de la réaction, ce phénomène se manifestant par une élévation progressive de la température du catalyseur.

Nous avons vu que la catalase fixée et gardée au froid conservait la plus grande partie de son activité. L'eau oxygénée, quant à elle, ne pose pas de problème de stockage. Nous disposons ainsi d'une source d'oxygène facile à utiliser.

Nous pouvons donc par exemple envisager son emploi pour la respiration d'une personne. Suivant les efforts, la consommation d'oxygène envisagée pour une personne se situe entre 0,4 litre par minute et 1,5 litre par minute, autrement dit entre 24 litres par heure et 90 litres par heure, ce qui correspond respectivement à : 1 mole et 4 moles d'oxygène par heure. Nous nous fixerons comme but de construire un générateur d'oxygène qui pourra fournir 30 litres d'oxygène en une heure.

L'enthalpie de décomposition de l'eau oxygénée pure est de - 23,44 kcal par mole d'eau oxygénée décomposée à 25°C et sous 1 atmosphère ; étant donné que la production d'une mole d'oxygène met en jeu deux moles d'eau oxygénée, la quantité de chaleur libérée par la réaction de décomposition du liquide pur sera située entre 47 kcal/heure et 188 kcal/heure.

Dans cette étude, nous porterons notre intérêt vers la production d'oxygène et la nécessité d'évacuer les calories, la cinétique de la réaction et les aspects plus théoriques ayant fait l'objet de la première partie du mémoire.

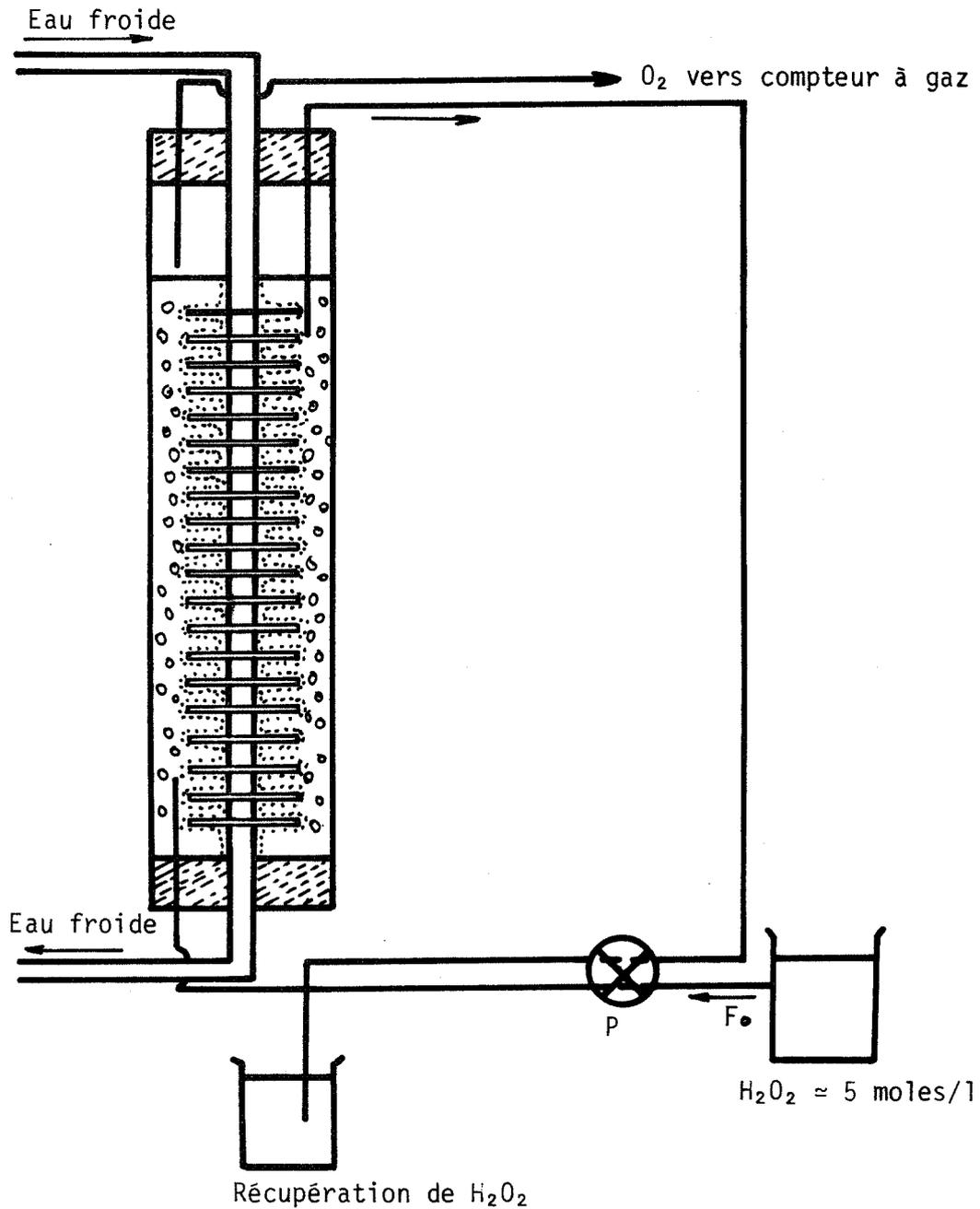


Figure 21 - REACTEUR I ENZYMATIQUE A AILETTES FIXES.

Schéma de montage.

diamètre réacteur : 45 mm ; hauteur réacteur : 390 mm

diamètre des ailettes : 18 mm.

débit de H₂O₂ : F_o = 1 litre/heure

hauteur totale des ailettes : 210 mm.

I - PREMIER MODELE DE GENERATEUR D'OXYGENE A CATALASE FIXEE :

1-1 - Description du générateur d'oxygène :

Ce réacteur est un système composé d'un tube inoxydable sur lequel sont soudées des ailettes inox de 18 mm de diamètre, écartées de 6 mm. Le cylindre à ailettes est recouvert d'une couche enzymatique insoluble réalisée suivant la méthode décrite dans la 1ère partie (paragraphe 2-2-1-4). Le refroidissement s'effectue par circulation d'eau froide à 18°C dans le tube intérieur avec un débit de 90 l/h, le montage est donné figure 21.

1-2 - Conduite de la réaction :

Dans le réacteur vide de liquide, contenant le cylindre à ailettes recouvert de mousse enzymatique reproduit sur la figure 21, sont placés d'abord 50 cm³ de tampon phosphate à pH 6,8. Un remplissage du réacteur s'effectue ensuite à l'aide d'eau oxygénée environ 5 moles par litre à raison de un litre par heure ; la production d'oxygène est alors mesurée en fonction du temps. La réaction s'effectue à débit d'eau oxygénée fixe $F_0 = 1$ litre par heure.

1-3 - Résultats :

La réaction démarre très vite et pendant dix minutes de marche, on constate un certain manque d'efficacité de la réfrigération par l'eau : au niveau supérieur du liquide dans le réacteur, la température augmente de 8 à 9°C environ.

La figure 22 donnant le débit d'oxygène en fonction du temps nous montre que nous n'avons pas obtenu un débit régulier (rapport 5/1 entre le début et la fin de l'expérience), mais par rapport aux premières expériences avec une membrane enzymatique où le débit initial et le débit final étaient dans le rapport 50/1 (figure 14), un progrès est réalisé dans la régularité du débit d'oxygène, ce qui démontre l'intérêt du principe du réacteur.

Des prélèvements de 0,2 cm³ sont effectués à intervalles réguliers à l'aide de micro-pipettes, et sont dilués 1000 fois pour l'analyse par spectrophotométrie U.V., afin d'assurer un contrôle de la concentration en eau oxygénée dans le réacteur.

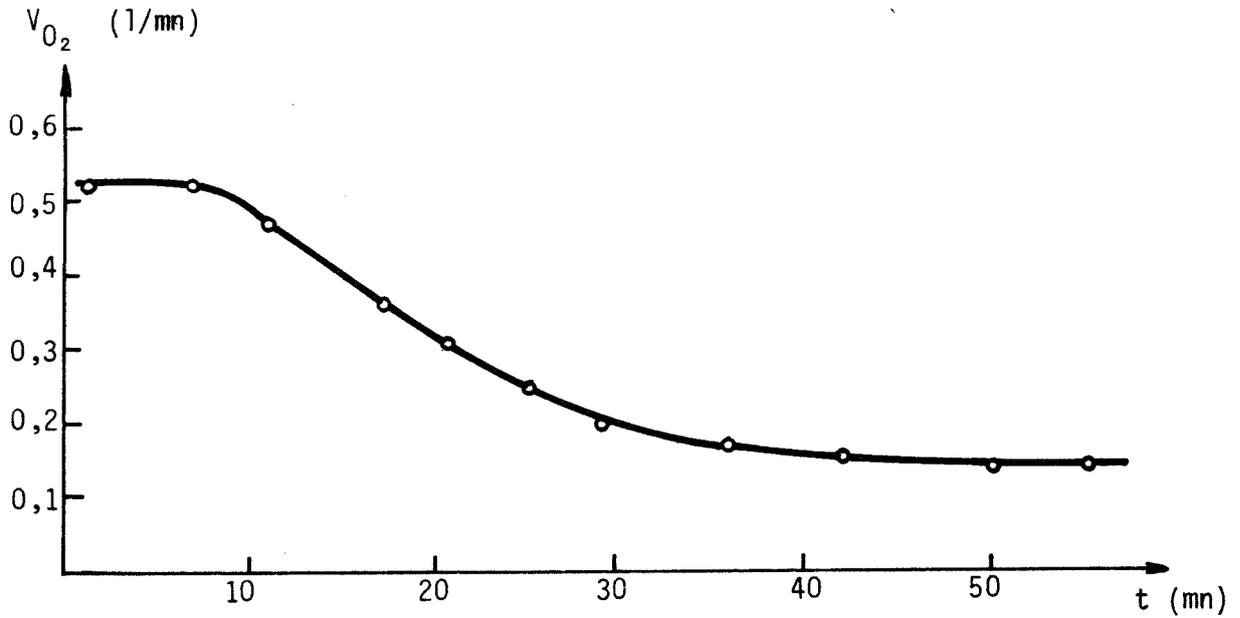


Figure 22 - EVOLUTION DU DEBIT D'OXYGENE AU COURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE - Réacteur I à ailettes fixes.

m catalase : 40 mg ; $[H_2O_2]$ initial = 4,4 moles/l
débit H_2O_2 : 1 l/h ; v tampon pH 6,8 = 50 cm³.

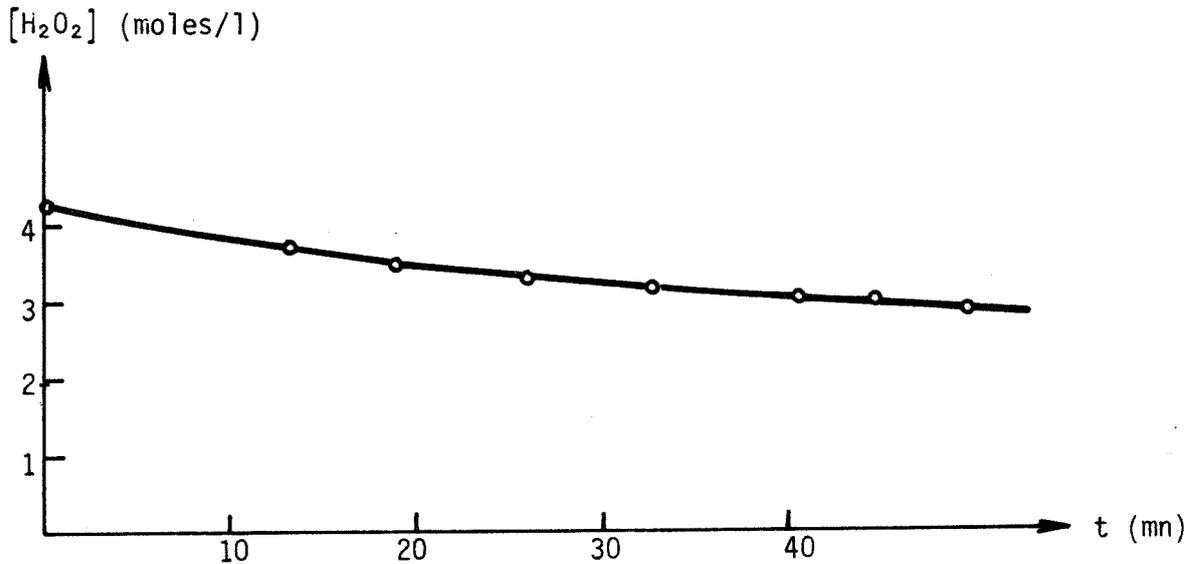


Figure 23 - EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN H_2O_2 AU COURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE.

Réacteur I à ailettes fixes.

La courbe représentative de l'évolution de la concentration, donnée par la figure 23 montre que la concentration moyenne en eau oxygénée est élevée (3,4 moles/l) dans le réacteur. Nous essaierons d'alimenter le réacteur en eau oxygénée avec un débit moins élevé.

La production d'oxygène envisagée étant d'environ 30 litres pour une heure, la production horaire de 16 litres obtenue par le dispositif à ailettes fixes en constitue une bonne approche. Nous devons apporter des améliorations à ces premiers résultats, en recherchant l'obtention d'une réaction plus douce au départ et celle d'un débit d'oxygène plus régulier. D'autre part, il n'y a pas de brassage permanent du liquide dans le réacteur, donc pas de convection forcée, et le transfert thermique ne se fait pas convenablement ; par conséquent nous ajouterons une pompe de recirculation au prochain montage.

II - AUTRE MODELE DE GENERATEUR D'OXYGENE A AISETTES FIXES : REACTEUR II :

Quelques ailettes supplémentaires sont soudées au cylindre ; la pompe de recirculation a un débit d'environ 60 litres à l'heure et la pompe péristaltique assure l'introduction régulière de l'eau oxygénée (figure 24).

2-1 - Conduite de la réaction :

Le réacteur contient initialement 300 cm³ de tampon phosphate de pH 6,8 dans lequel baigne le cylindre à ailettes recouvert d'enzyme. L'eau oxygénée de concentration environ 10 moles par litre, est introduite, au cours de trois expériences successives, aux vitesses correspondantes suivantes : 800 cm³/h, 450 cm³/h et 350 cm³/h.

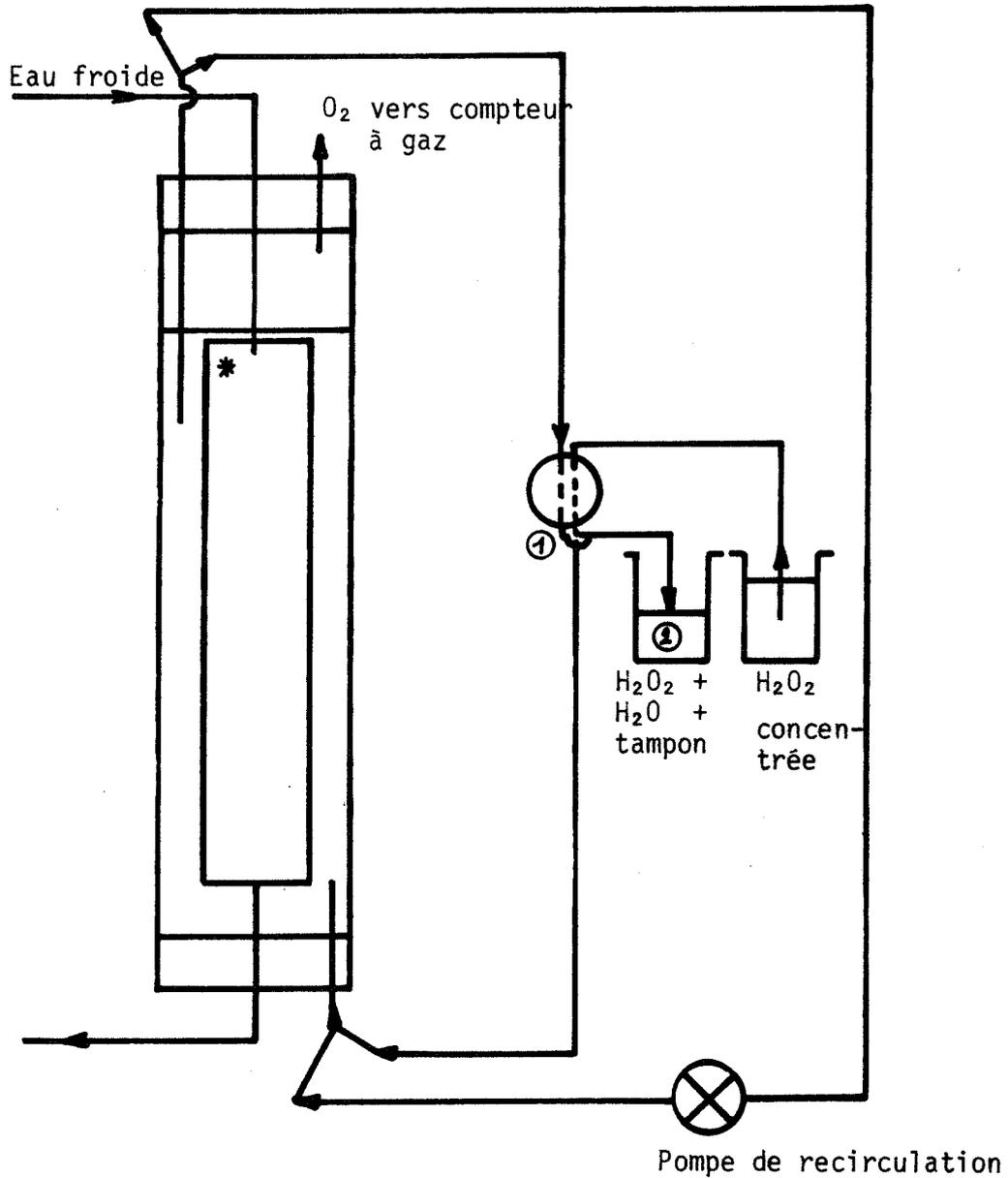


Figure 24 - REACTEUR II A AILETTES FIXES. MONTAGE.

hauteur totale du réacteur : 390 mm.

- * cylindre à ailettes recouvert d'enzyme de longueur 224 mm ;
- diamètre du réacteur : 45 mm ;
- hauteur maximum de liquide dans le réacteur : 330 mm ;
- surface d'échange apparente : 126 cm²

① pompe péristaltique

② prélèvements.

2-2 - Résultats :

Les résultats des expériences menées avec le Réacteur II sont donnés dans le tableau 4 :

<i>v initial de tampon (en cm³)</i>	<i>m catalase (en mg)</i>	<i>S échange apparente (cm²)</i>	<i>vitesse d'introduction de H₂O₂ (en cm³/h)</i>	<i>V_{O₂}</i> recueilli au bout d'1 h (en l)
300	50	126	800	15
300	50	126	450	21
300	50	126	350	22

Tableau 4 : Performances du Réacteur II pour des vitesses d'alimentation en H₂O₂ 10 moles/l différentes.

Les courbes 25 représentent la variation du débit d'oxygène en fonction du temps, pour les trois réactions de décomposition. La faible production de gaz lors de la première expérience est due à une addition trop importante d'eau oxygénée concentrée, ce qui provoque une dénaturation rapide de l'enzyme. Les meilleures conditions de déroulement de l'expérience sont celles où la vitesse d'alimentation en eau oxygénée est la plus faible, c'est-à-dire égale à 350 cm³ par heure, d'après la figure 26. La valeur moyenne de la concentration correspondant à cette vitesse d'introduction d'eau oxygénée n'est que de 1,7 mole/l, alors qu'elle est de 5 moles/l pour une vitesse d'alimentation en eau oxygénée concentrée de 800 cm³ par heure. Nous avons donc intérêt à utiliser dans le réacteur une concentration en eau oxygénée suffisamment faible.

Le système à ailettes fixes n'est pas très pratique, tant pour le nettoyage des ailettes que pour la répartition de mélange enzymatique.

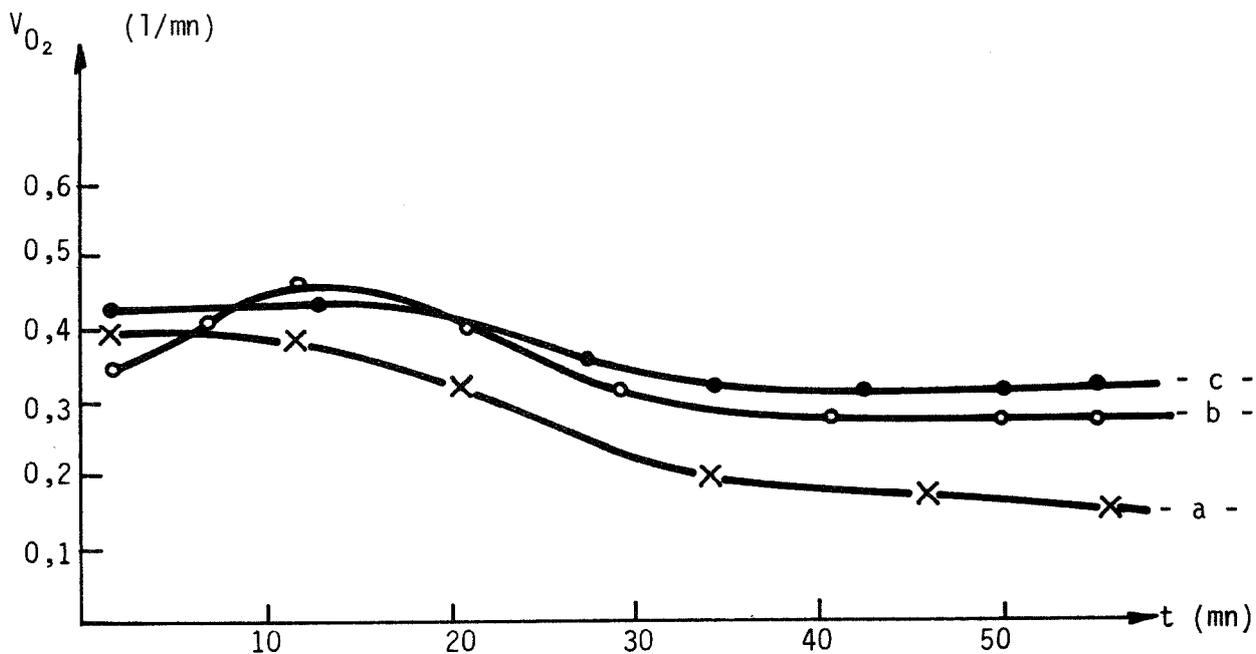


Figure 25 - EVOLUTION DU DEBIT D'OXYGENE AU COURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE POUR DES VITESSES D'ALIMENTATION DIFFERENTES. Réacteur II à ailettes fixes.
 m catalase : 50 mg ; v tampon pH 6,8 : 300 cm³ ;
 S échange : 126 cm²
 vitesses d'introduction de H₂O₂ : - a - 800 cm³/h,
 - b - 450 cm³/h ; - c - 350 cm³/h.

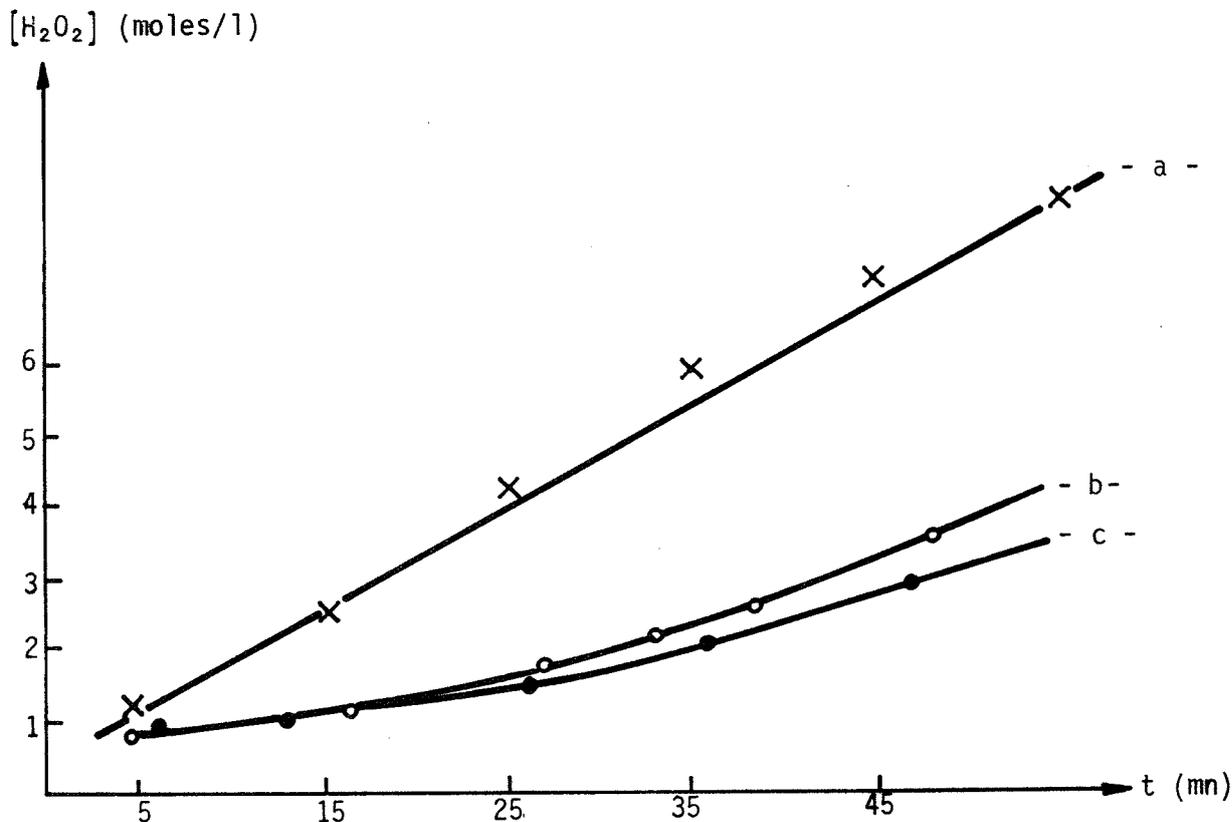


Figure 26 - EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN H₂O₂ AU COURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE POUR DES VITESSES D'INTRODUCTION DE H₂O₂ DIFFERENTES : - a - 800 cm³/h ; - b - 450 cm³/h ;
 - c - 350 cm³/h.

D'autre part, au cours des expériences menées avec ce type de réacteur, nous constatons que pendant une heure seulement de marche, la concentration moyenne de l'eau oxygénée est élevée, et par suite la température, plaçant ainsi l'enzyme dans des conditions de travail difficiles.

Nous construirons un nouveau modèle de réacteur moins compact, où chaque disque de mousse de catalase sera en contact sur toute sa surface, avec un disque de métal assurant une meilleure évacuation de la chaleur produite.

III - REALISATION PRATIQUE DE SYSTEMES DEMONTABLES : REACTEURS III, IV et V :

3-1 - Description du montage et préparation de la mousse d'enzyme :

Un réacteur plus grand, est monté de la même façon que précédemment (figure 27). Il est constitué d'un cylindre à ailettes démontables : ce sont des rondelles en acier inoxydable de 28 mm et 50 mm de diamètre. Les rondelles de métal, de 1 mm d'épaisseur, sont recouvertes de mousse enzymatique de la façon suivante : elles sont disposées dans un bac à petits bords dans lequel on verse le mélange enzymatique ; le mélange une fois "pris", les rondelles sont découpées à l'emporte-pièce (Réacteur III, figure 28). Ces disques peuvent être formés aussi sans le support du métal, en faisant attention de ne pas les briser (Réacteurs IV et V). La quantité de catalase est d'environ 2 mg sur une petite rondelle et 8 mg sur une grande.

Pour éviter une dénaturation trop rapide de la catalase par un contact direct avec l'eau oxygénée concentrée, le réacteur est rempli de tampon phosphate à pH 6,8, ce qui permet la dilution de l'eau oxygénée juste avant la réaction.

Le refroidissement par l'eau est toujours utilisé et le brassage du liquide est maintenu tout au long de la réaction de la façon déjà décrite. Etant donné que le débit de l'eau de refroidissement est relativement élevé (90 litres/heure), la température de l'eau à la sortie est pratiquement la même qu'à l'entrée (~~18~~ 18°C).

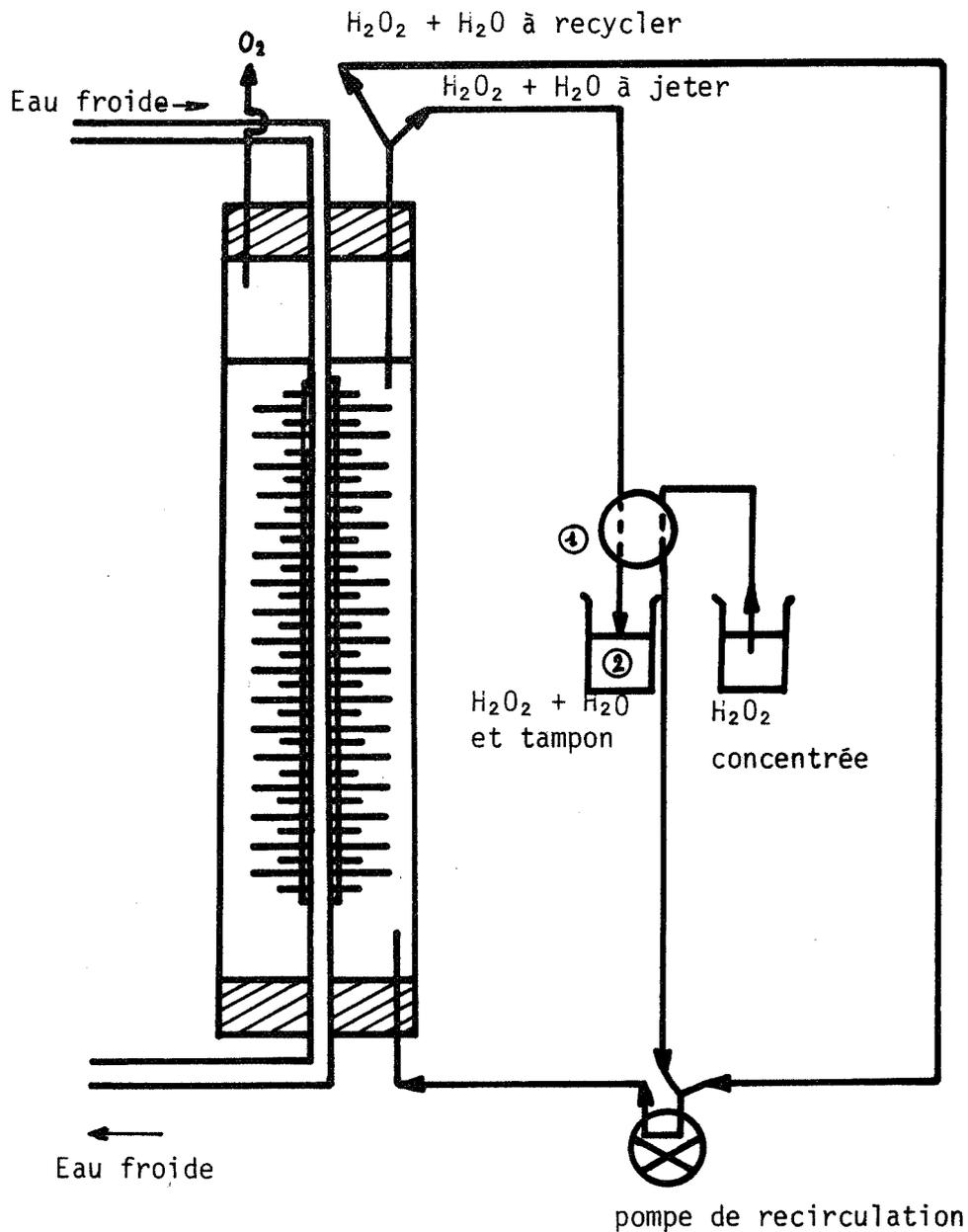


Figure 27 - REACTEUR A AILETTES DEMONTABLES, MONTAGE.

① pompe péristaltique

② prélèvements

diamètre du réacteur : 64 mm ; hauteur du réacteur : 380 mm

hauteur de l'empilement des plaquettes : 230 mm.

3-2 - Réacteur III, présentation et performance :

Il se compose d'un empilement de rondelles d'acier inoxydable grandes et petites alternées, soutenant les disques de mousse enzymatique (figure 28) ; chaque ensemble inox + enzyme est séparé du suivant par une entretoise de 5 mm de hauteur.

3-2-1 - Conditions expérimentales :

Elles sont les suivantes :

masse de catalase	: 180 mg
vitesse d'alimentation en eau oxygénée environ 10 moles/l	: 600 cm ³ /h
volume initial de tampon à pH 6,8	: 800 cm ³
surface réactive	: 420 cm ²

3-2-2 - Résultats :

Nous avons obtenu un volume d'oxygène de 43 litres au bout d'une heure. Le débit de gaz devient très important (1,1 litre à la minute) lorsque la totalité de l'enzyme est atteinte par l'eau oxygénée (figure 29).

La figure 30 donnant l'évolution de la concentration en eau oxygénée au cours du temps montre que celle-ci atteint presque 2 moles/l au bout d'une heure à peine de fonctionnement.

La forme de ces courbes est due au fait que les plaques de mousse enzymatique, n'étant pas maintenues, se décollent des rondelles d'inox. En se déformant, elles offrent une surface grande et inégale à l'attaque de l'eau oxygénée. Cette augmentation de surface n'est pas compensée par une meilleure évacuation des calories ; celle-ci, au contraire, n'est pas bonne, étant donné que les disques d'enzyme ne restent pas plaqués contre les disques de métal.

Nous avons essayé de perfectionner ce système en maintenant les plaques de mousse de catalase, pour une parfaite adhérence, contre les rondelles d'inox.

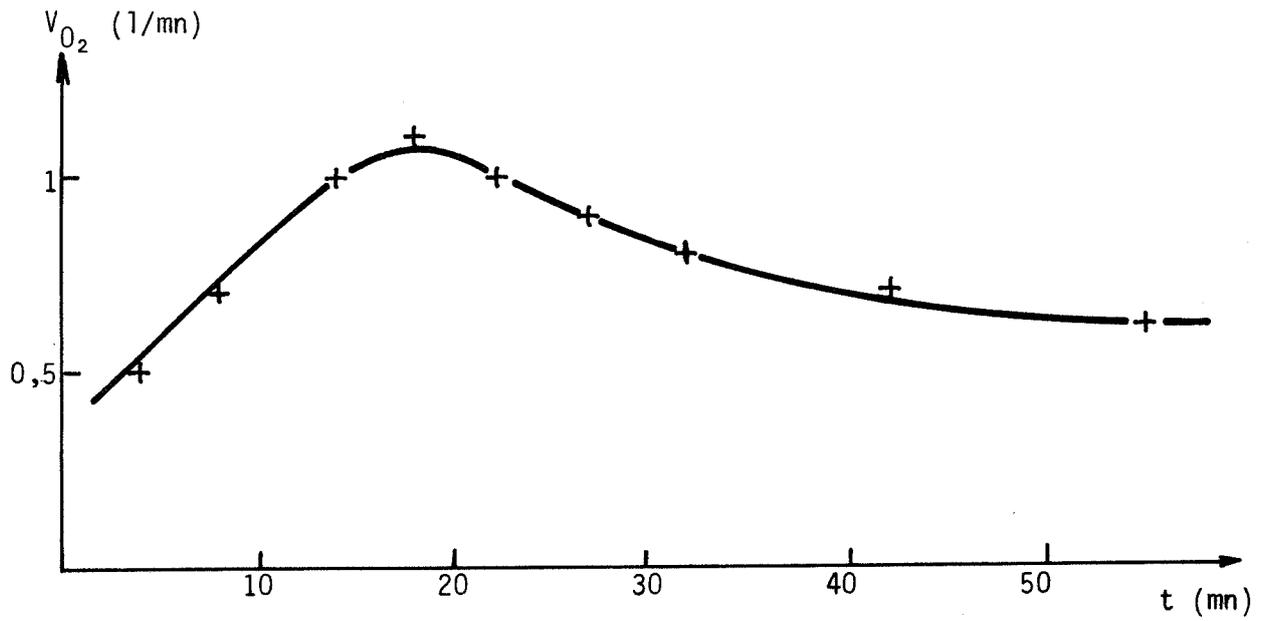


Figure 29 - EVOLUTION DU DEBIT D'OXYGENE AU COURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE - Réacteur III.

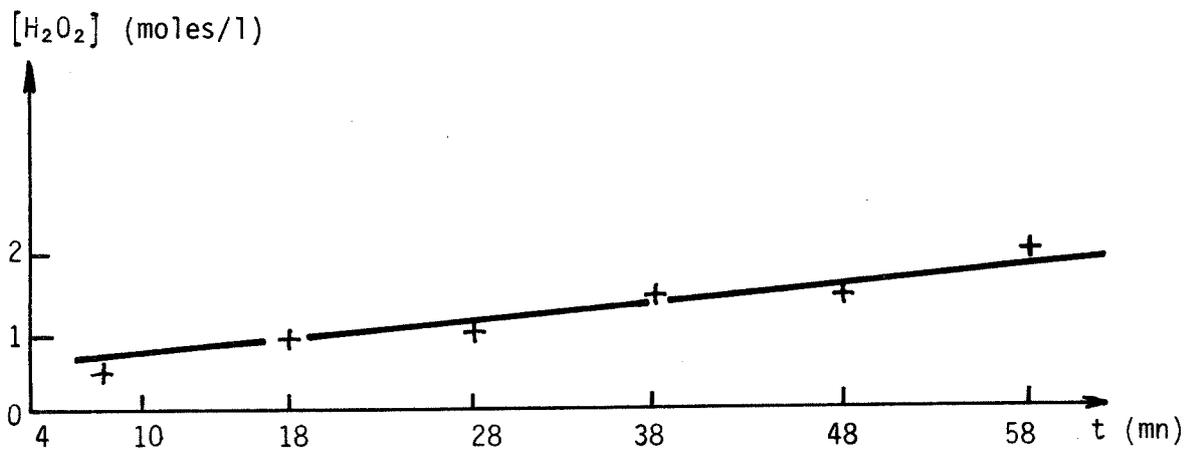


Figure 30 - EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE H_2O_2 AU COURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE - Réacteur III.

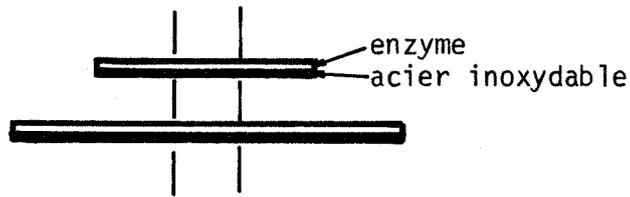


Figure 28 : REACTEUR III : les plaques de mousse enzymatique ne sont pas maintenues sur les plaques d'acier inoxydable.

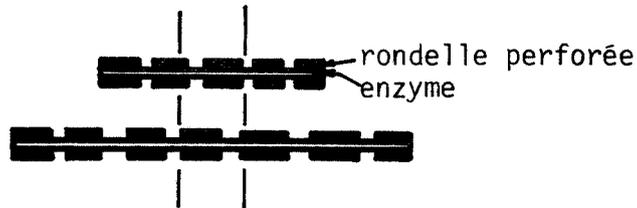


Figure 31 - REACTEUR IV : chaque plaque de mousse d'enzyme est comprise entre deux rondelles d'inox perforé.

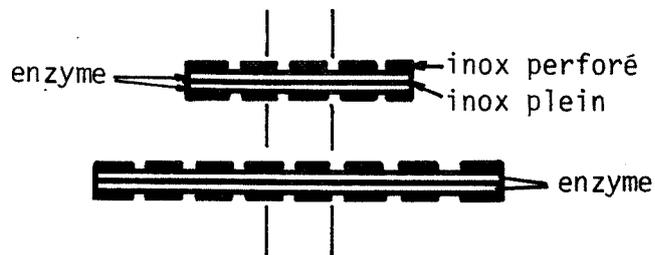


Figure 32 - REACTEUR V : position de la couche de mousse enzymatique et des différentes plaques d'inox.

3-3 - Réacteurs IV et V, présentation et performance :

Le réacteur à ailettes démontables est amélioré de deux façons :

- soit en maintenant immobiles les plaques d'enzyme entre deux rondelles d'acier inoxydable perforé ; la plaque perforée permet le départ des calories tout en rendant possible l'arrivée du substrat (Réacteur IV, figure 31).
- soit en plaçant chaque rondelle de mousse enzymatique entre un disque d'inox perforé pour la maintenir et un disque d'inox plein pour une meilleure évacuation de la chaleur produite (Réacteur V, figure 32).

Un calcul simple montre que l'adjonction de la rondelle d'inox perforé diminue de moitié la surface de contact de l'enzyme avec l'eau oxygénée : chaque ensemble représenté par la figure 28, 31 ou 32 présente donc la même surface de contact S au mélange réactionnel.

La plus grande épaisseur des présentations 31 et 32 ne permet pas d'utiliser dans les réacteurs IV et V un empilement aussi important que celui du réacteur III, ce qui limite la surface réactive dans ces modèles à 300 cm^2 (la surface d'échange était de 420 cm^2 pour le réacteur III).

3-3-1 - Conditions expérimentales :

Elles sont les suivantes :

	<u>Réacteur IV</u>	<u>Réacteur V</u>
masse de catalase	: 130 mg	260 mg
vitesse d'alimentation en H_2O_2 environ 10 moles/l	: $650 \text{ cm}^3/\text{h}$	$650 \text{ cm}^3/\text{h}$
volume initial de tampon à pH 6,8	: 900 cm^3	900 cm^3
surface réactive	: 300 cm^2	300 cm^2

3-3-2 - Résultats :

Dans le réacteur, les bulles d'oxygène se décollent bien de l'enzyme et les rondelles d'inox perforé assurent un maintien correct des plaques d'enzyme.

La figure 33 nous montre le volume d'oxygène obtenu avec les réacteurs au cours de la première heure de fonctionnement, la figure 34 nous donne la production d'oxygène totale obtenue au cours du temps d'utilisation. Les résultats du réacteur III sont rappelés pour comparaison.

	<i>Présentation</i>	<i>S réactive</i> (<i>cm</i> ²)	<i>V</i> _{O₂} (l) 1 h	<i>V</i> _{O₂} l/ <i>cm</i> ² 1 h	<i>V</i> _{O₂} (l) 3 h
Réacteur III	Figure 25	420	43	0,102	74
Réacteur IV	Figure 28	300	26	0,087	
Réacteur V	Figure 29	300	39	0,130	72

Tableau 5 : Performance des réacteurs à ailettes mobiles.

La version du réacteur retenue (figure 32, Réacteur V) a permis de fournir 39 litres d'oxygène en une heure. Le débit de gaz maximum instantané est de 0,9 litre par minute.

La figure 35 donnant l'évolution de la concentration dans le réacteur au cours du temps, nous montre que dans le Réacteur V, la concentration reste inférieure à 1 mole par litre pendant la première heure d'utilisation, alors que pendant le même temps, elle atteint 2 moles/l dans les Réacteurs III et IV. Le Réacteur V travaille à une concentration d'eau oxygénée moyenne faible de 0,5 mole/l au cours de la première heure de fonctionnement. Nous voyons sur la figure 36 qu'au cours d'un temps plus long (2 heures 15 mn) la concentration moyenne en eau oxygénée augmente : elle est de 1,3 mole/l dans le réacteur : le nombre de sites actifs diminuant, l'activité de l'enzyme fixée est plus faible et entraîne une décomposition moins importante de l'eau oxygénée.

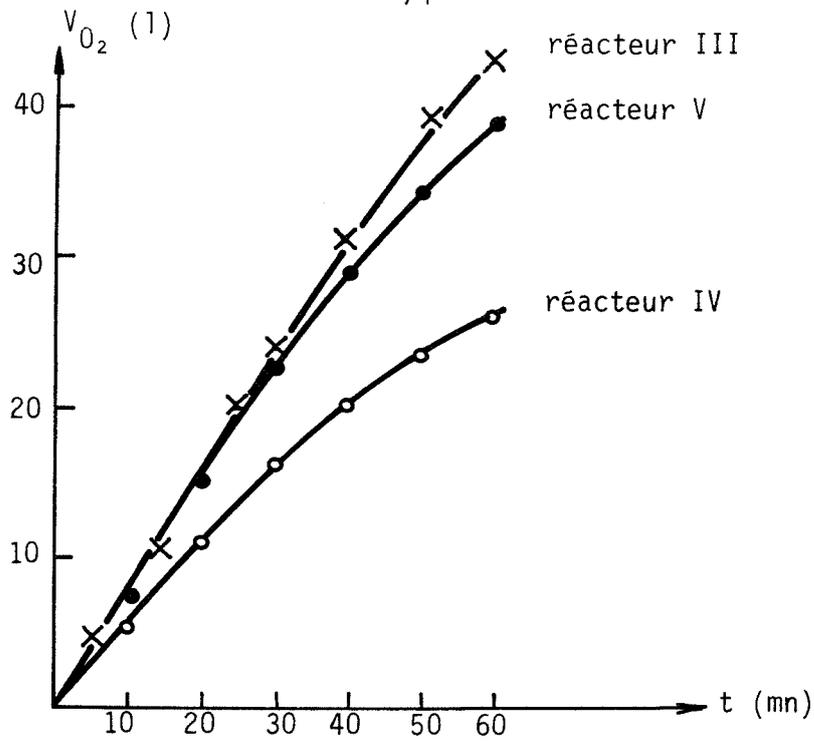


Figure 33 - PERFORMANCE DES REACTEURS III, IV, V DURANT LA PREMIERE HEURE D'UTILISATION.

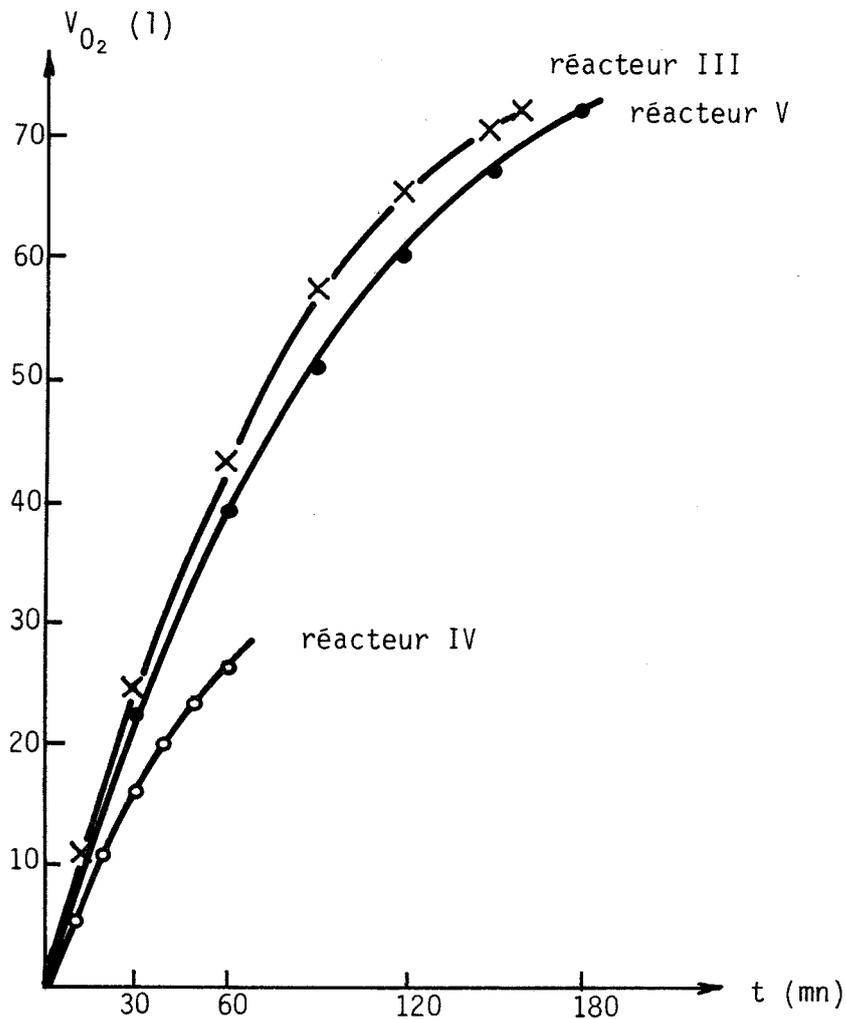


Figure 34 - PERFORMANCE DES REACTEURS A AILETTES MOBILES AU COURS DU TEMPS D'UTILISATION.

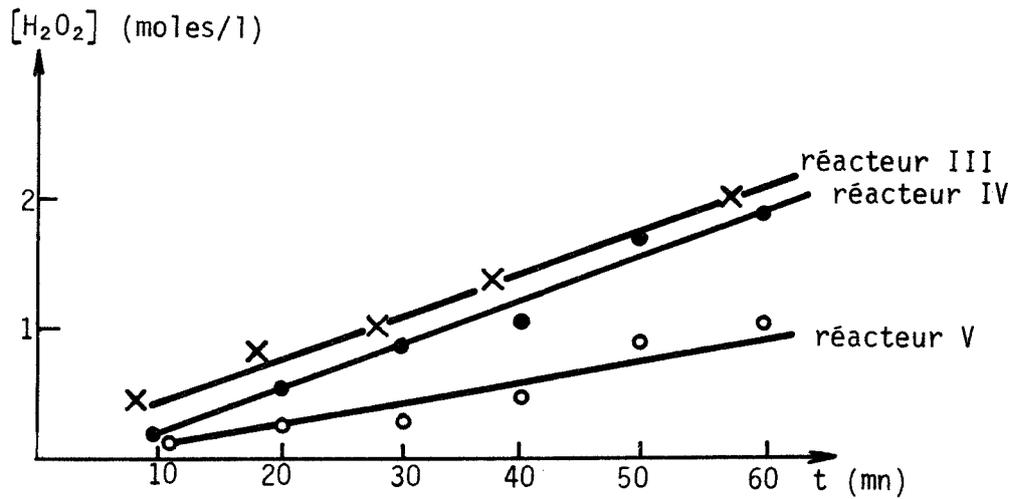


Figure 35 - EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE H_2O_2 PENDANT LA PREMIERE HEURE D'UTILISATION DES REACTEURS III, IV et V.

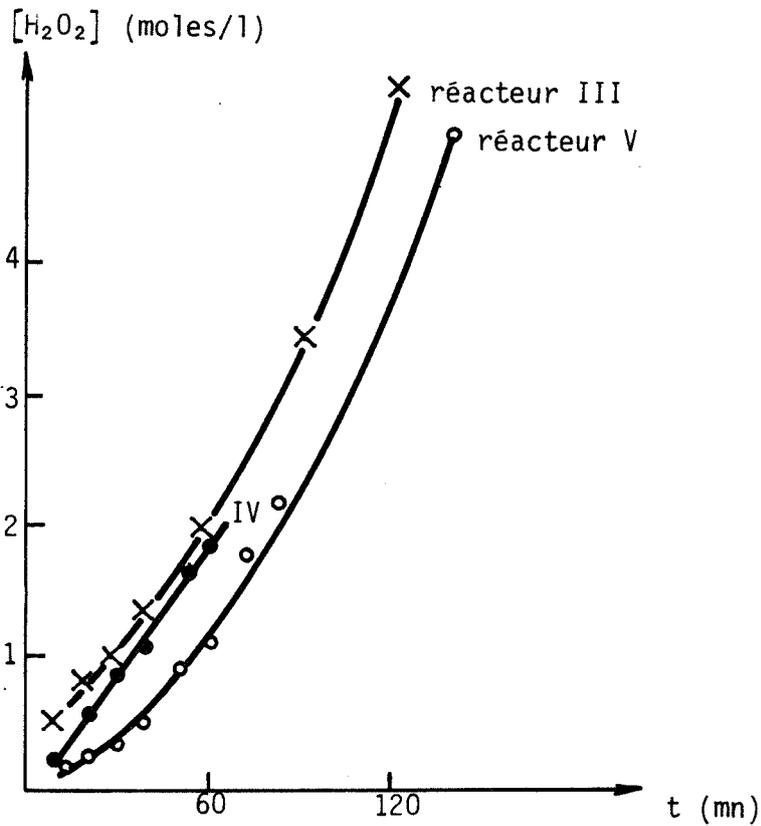


Figure 36 - EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE H_2O_2 AU COURS DU TEMPS D'UTILISATION DES REACTEURS III, IV et V.

IV - CONCLUSION :

Nous choisirons comme modèle de réacteur le Réacteur V qui présente les avantages suivants sur les précédents :

- les plaques d'enzymes sont bien maintenues immobiles par les rondelles d'inox perforé et l'évacuation des calories se fait convenablement.

- la production d'oxygène est beaucoup plus régulière et la dénaturation de l'enzyme plus lente. L'objectif de production que nous nous sommes fixé : 30 litres/heure, est satisfait pendant deux heures de travail, avec un réacteur de dimensions modestes.

L'étude de ce réacteur nous a montré que l'utilisation d'enzymes pour des réactions exothermiques est possible, un refroidissement important maintenant l'activité catalytique de l'enzyme (64).

Le caractère exothermique de la réaction nous a permis de voir l'influence de la température au cours de la réaction enzymatique. Ce paramètre ne joue pas seulement le rôle d'augmenter la vitesse de la réaction comme le prévoit la loi d'Arrhénius mais il produit aussi une désactivation de l'enzyme au fur et à mesure de son élévation. Aux basses températures c'est la loi d'Arrhénius qui gouverne la cinétique : la vitesse augmente avec la température, mais dès que la température devient trop importante, c'est la cinétique de dénaturation qui l'emporte. Ceci nous conduit à chercher quel effet peuvent avoir, à part la température, d'autres paramètres tels que la pression sur une réaction enzymatique de ce type, qui conduit à la production de gaz à partir d'une phase liquide.

TROISIEME PARTIE

Etude de la décomposition de l'eau oxygénée
par la catalase fixée sous pression

Nous ne connaissons pas d'étude faite sur le fonctionnement de la catalase fixée sous une pression supérieure à l'atmosphérique, c'est pourquoi nous nous sommes proposés d'observer son comportement lors de la décomposition de l'eau oxygénée sous des pressions allant jusqu'à 5 atmosphères. Nous n'avons pas étudié l'enzyme en solution sous pression, celle-ci ne présentant que peu d'intérêt pratique.

Dans la troisième partie, nous développerons l'étude de cette cinétique enzymatique autour des 3 variables pression, température et concentration en eau oxygénée : d'abord en fonction de la pression pour une température et une concentration en eau oxygénée constantes, ensuite en fonction de la température pour une pression supérieure à la pression atmosphérique et une concentration constante, et enfin en fonction de la concentration en eau oxygénée pour une pression supérieure à l'atmosphérique et une température constante.

Avant d'étudier la réaction de décomposition sous pression de 2 à 5 atmosphères, nous effectuerons une première série d'expériences sous des pressions plus faibles.

I - UTILISATION DE LA CATALASE FIXEE SOUS PRESSION DE 1,2 A 1,5 ATMOSPHERE :

L'appareil utilisé est en verre, le ballon de réaction, de 1 litre est relié par un tuyau en téflon à la colonne de mercure qui impose la pression ; le montage est décrit sur la figure 37.

La catalase utilisée a une activité de 4500 unités/mg, elle est présentée sous forme de mousse de dimensions : 4 cm x 2 cm x 0,5 cm préparée avec le mélange suivant :

{	masse de catalase	= 4 mg
	volume d'albumine humaine à 17,5 %	= 1 cm ³
	volume de tampon pH 6,8	= 1,8 cm ³
	volume de glutaraldéhyde 2,5 %	= 1,2 cm ³

La mousse d'enzyme est conservée pendant 15 heures à - 18°C avant d'être mise en réaction.

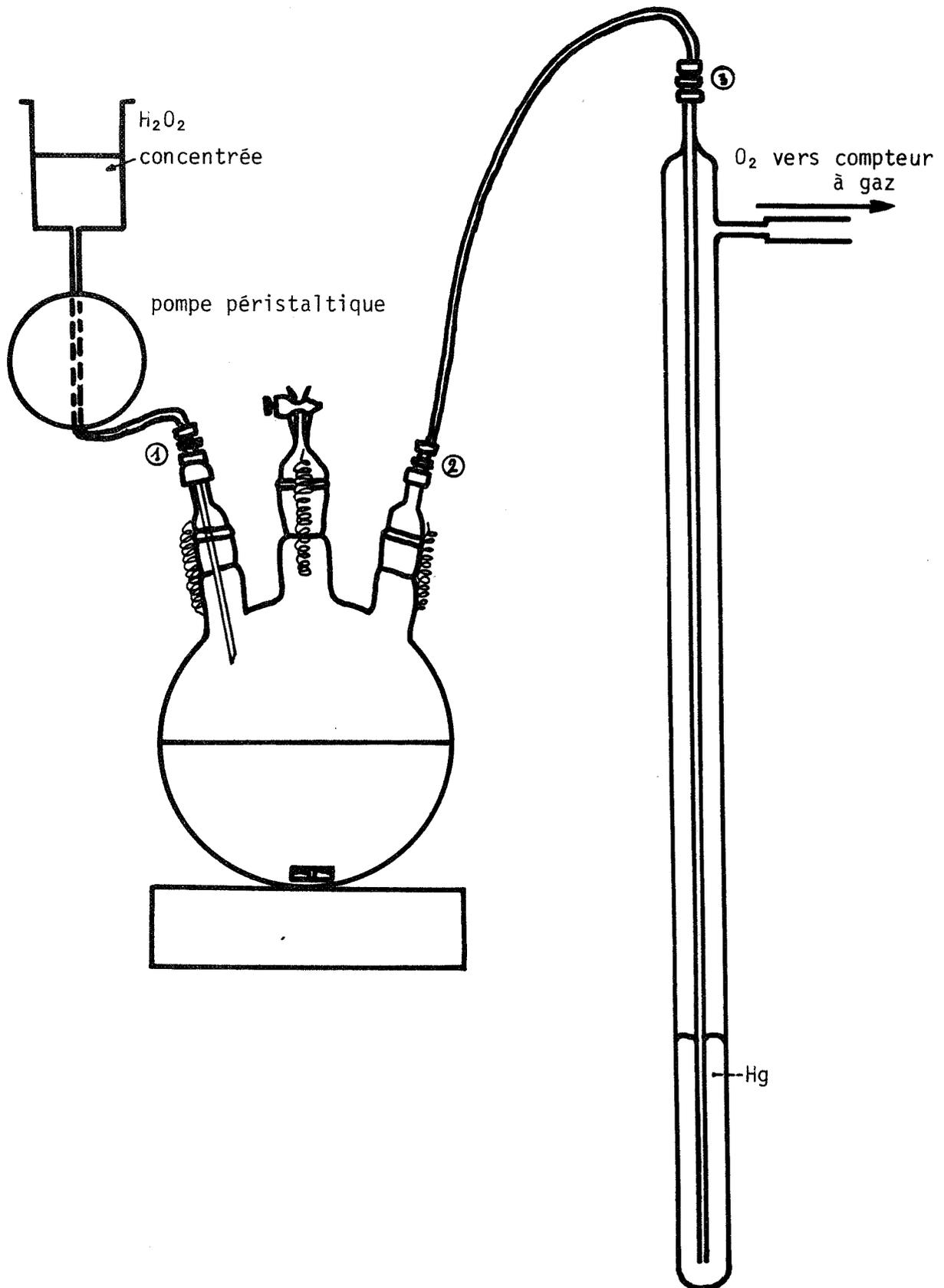


Figure 37 - APPAREILLAGE EN VERRE UTILISE POUR LE FONCTIONNEMENT DE LA CATALASE
FIXEE SOUS 1,2 ; 1,3 ; 1,4 et 1,5 ATMOSPHERE.

① , ② , ③ : raccords swagelocks

1-1 - Conditions expérimentales :

Elles sont les suivantes :

{	masse de catalase	: 4 mg
	vitesse d'introduction de H ₂ O ₂	: 110 cm ³ /h
	volume de tampon pH 6,8	: 400 cm ³

p est égale successivement à 1,2 ; 1,3 ; 1,4 et 1,5 atm.

L'eau oxygénée concentrée (environ 10 moles/l) est envoyée dans le ballon grâce à une pompe péristaltique avec un débit fixe. L'agitation est assez forte de manière à maintenir la mousse enzymatique continuellement en mouvement dans le mélange réactionnel. Le ballon est placé dans un bain de glace fondante.

La température, le débit d'eau oxygénée, la masse de catalase et la pression étant fixés, nous suivons la production d'oxygène au cours du temps $V_{O_2} = f(t)$.

Au cours de la production d'oxygène, l'atmosphère autour du site enzymatique est composée d'oxygène pur libéré par la réaction : cette pression est égale à la pression du gaz existant au-dessus du liquide, à la pression de la colonne d'eau près (cette dernière étant très faible, 2 mm de mercure en moyenne). S'il y a de l'air au-dessus du liquide, la pression considérée est égale à la pression de l'air (augmentée de la tension de vapeur d'eau, très faible à cette température) et non à la pression partielle d'oxygène. Nous pouvons donc utiliser n'importe quel gaz ou mélange de gaz pour assurer la pression au-dessus de la solution d'eau oxygénée.

Nous prendrons cependant de l'oxygène, dans le but de saturer en oxygène au préalable la solution d'eau oxygénée et d'éviter ainsi de prendre en compte la quantité de O₂ dissoute dans le calcul de la production d'oxygène (O₂ dissous est le même tout au long de l'expérience, la pression étant constante). De l'oxygène sous la pression désirée est envoyé dans le ballon au début de l'expérience.

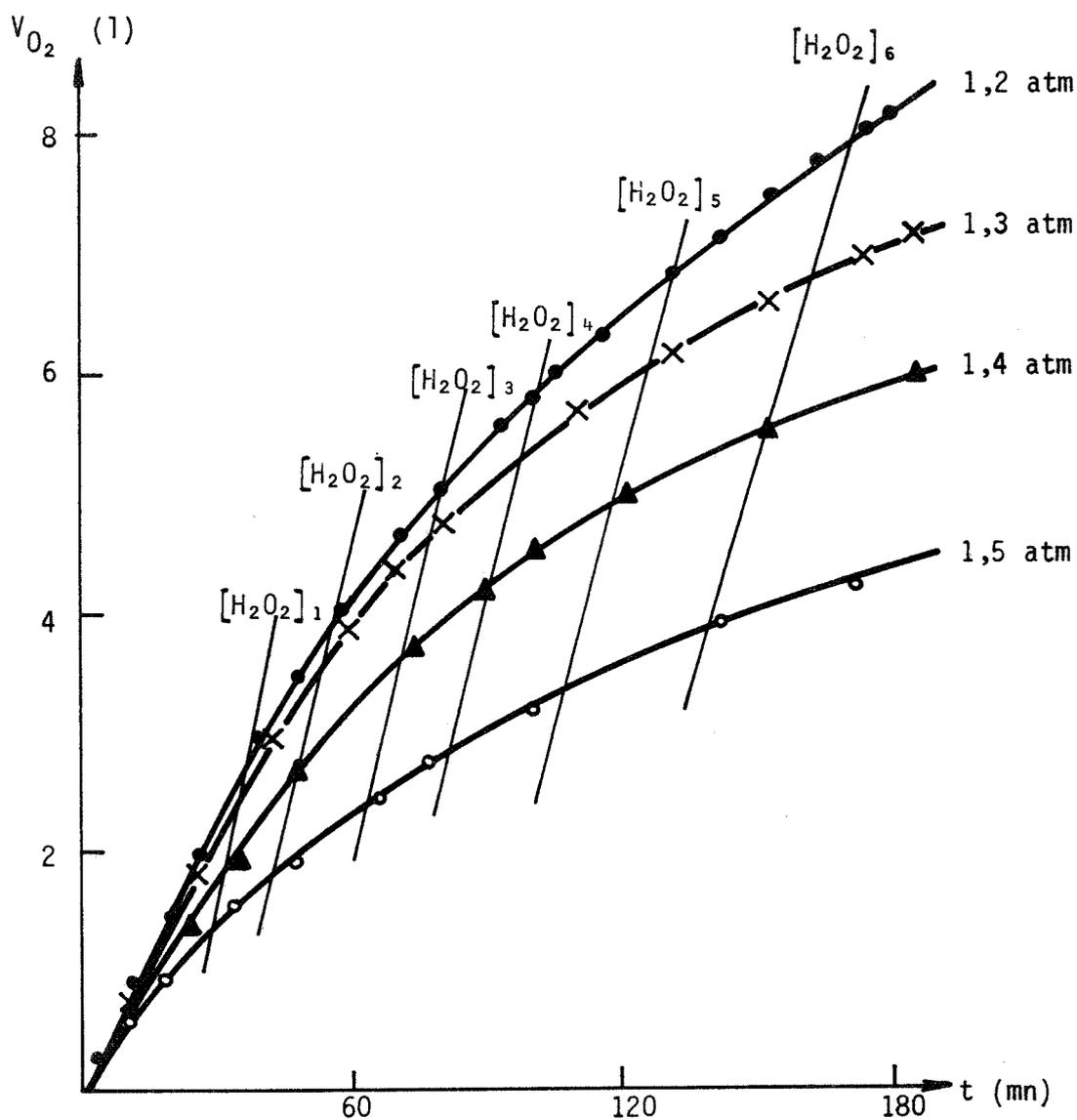


Figure 38 - PRODUCTION D'OXYGENE SOUS PRESSION PEU ELEVEE.

$[H_2O_2]_1 = 0,92$ mole/l

$[H_2O_2]_2 = 1,25$ mole/l

$[H_2O_2]_3 = 1,69$ mole/l

$[H_2O_2]_4 = 2,05$ moles/l

$[H_2O_2]_5 = 2,54$ moles/l

$[H_2O_2]_6 = 3,04$ moles/l

les volumes V_{O_2} sont ramenés à la pression atmosphérique.

1-2 - Résultats :

1-2-1 - Production d'oxygène

Le tableau 6 donne quelques valeurs typiques :

<i>P en atm</i>	1,2	1,3	1,4	1,5
V_{O_2} * dégagé au bout d'1 heure (en litres)	4,6	4,3	3,6	2,6
V_{O_2} dégagé au bout de 2 heures	6,8	6,1	5,2	3,8
V_{O_2} dégagé au bout de 3 heures	8,5	7,4	6,1	4,5

Tableau 6 - Production d'oxygène de la mousse de catalase sous pression peu élevée à 21°C

* les volumes sont ramenés à la pression atmosphérique

Les courbes $V_{O_2} = f(t)$ sont représentées sur la figure 38.

Une faible augmentation de pression diminue la vitesse du dégagement d'oxygène de la réaction.

Sur ces courbes $V_{O_2} = f(t)$, nous mettons en évidence les courbes d'équiconcentration en H_2O_2 présente dans la solution.

1-2-2 - Tracé des courbes d'équiconcentration sur les courbes

$$\underline{V_{O_2} = f(t):}$$

Nous calculons la concentration en H_2O_2 dans la solution à chaque instant, qui nous permettra de trouver les points d'équiconcentration.

$$[H_2O_2] \text{ dans la solution} = \frac{\text{quantité de } H_2O_2 \text{ introduite} - \text{quantité de } H_2O_2 \text{ décomposée}}{V}$$

L'évolution de la concentration de H_2O_2 en fonction du temps est donc donnée par la relation suivante :

$$[H_2O_2]_t = \frac{D.t. [H_2O_2]_0 - \frac{2 V_{O_2}}{\gamma}}{V} \quad (1)$$

- D : débit d'introduction de l'eau oxygénée
- t : temps en mn
- $[H_2O_2]_0$: concentration d'alimentation en H_2O_2
- V_{O_2} : volume d'oxygène dégagé dans les conditions de pression et de température d'utilisation
- γ : volume d'une mole d'oxygène dans les mêmes conditions
- V : volume réactionnel = $V_0 + D.t$
- V_0 : volume réactionnel initial.

Dans nos manipulations, nous utilisons un débit D de 0,11 l/h, une concentration d'alimentation en H_2O_2 9,2 moles/l et un volume réactionnel initial de 0,4 litre.

Grâce à l'expression précédente (1), nous pouvons calculer à chaque instant la concentration en eau oxygénée dans le ballon ; ce qui nous permet de tracer sur les courbes $V_{O_2} = f(t)$, les droites d'équiconcentration. Nous traçons 6 droites sur la figure 38 :

- $[H_2O_2]_1 = 0,92$ mole/l
- $[H_2O_2]_2 = 1,25$ mole/l
- $[H_2O_2]_3 = 1,69$ mole/l
- $[H_2O_2]_4 = 2,05$ moles/l
- $[H_2O_2]_5 = 2,54$ moles/l
- $[H_2O_2]_6 = 3,04$ moles/l

1-2-3 - Résolution graphique de la vitesse de réaction :

Nous évaluons la vitesse par la pente de la tangente aux points d'équiconcentration, au facteur $\frac{2}{\gamma \cdot V}$ près :

$$v = - \frac{d[H_2O_2]}{dt} = 2 \frac{d[O_2]}{dt} = \frac{2}{\gamma \cdot V} \cdot \frac{dV_{O_2}}{dt}$$

v est exprimée en moles $l^{-1} s^{-1}$.

Les figures 39, 40 et 41 nous donnent les projections sur les plans $(v, [H_2O_2])$, $([H_2O_2], t)$ et (v, t) de la surface obtenue dans l'espace tridimensionnel (temps, concentration, vitesse). Compte tenu de la figure 40 donnant une concentration de H_2O_2 assez élevée au cours de l'expérience, la figure 39 de l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration met en évidence la baisse d'activité de l'enzyme sous pression.

1-3 - Conclusion :

Cette première étude du fonctionnement de la catalase immobilisée sous pression peu élevée nous a conduits à trouver que la vitesse de réaction diminue quand la pression augmente. Etant donné que la réaction n'est pas réversible (8), nous pensons que la baisse de la vitesse est dûe à la dénaturation de l'enzyme, sous l'influence d'une température élevée. Il faudrait fournir un débit d'eau oxygénée plus faible pour que la concentration en H_2O_2 n'augmente pas aussi rapidement, entraînant l'élévation de la température au niveau du site enzymatique.

Cependant, la catalase fixée reste active sous pression, et nous allons étudier son comportement sous des pressions plus élevées au moyen d'un autre montage, l'appareillage en verre ne supportant plus ces conditions de travail.

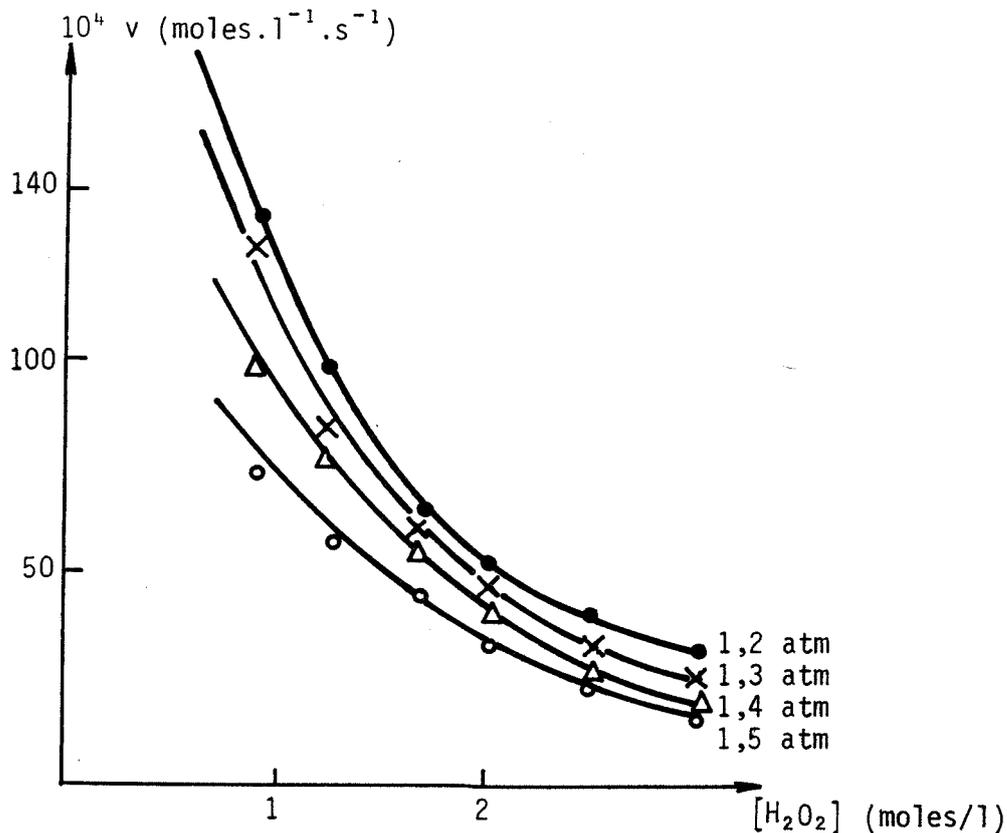


Figure 39 - EVOLUTION DE LA VITESSE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE H_2O_2 DANS LA SOLUTION.

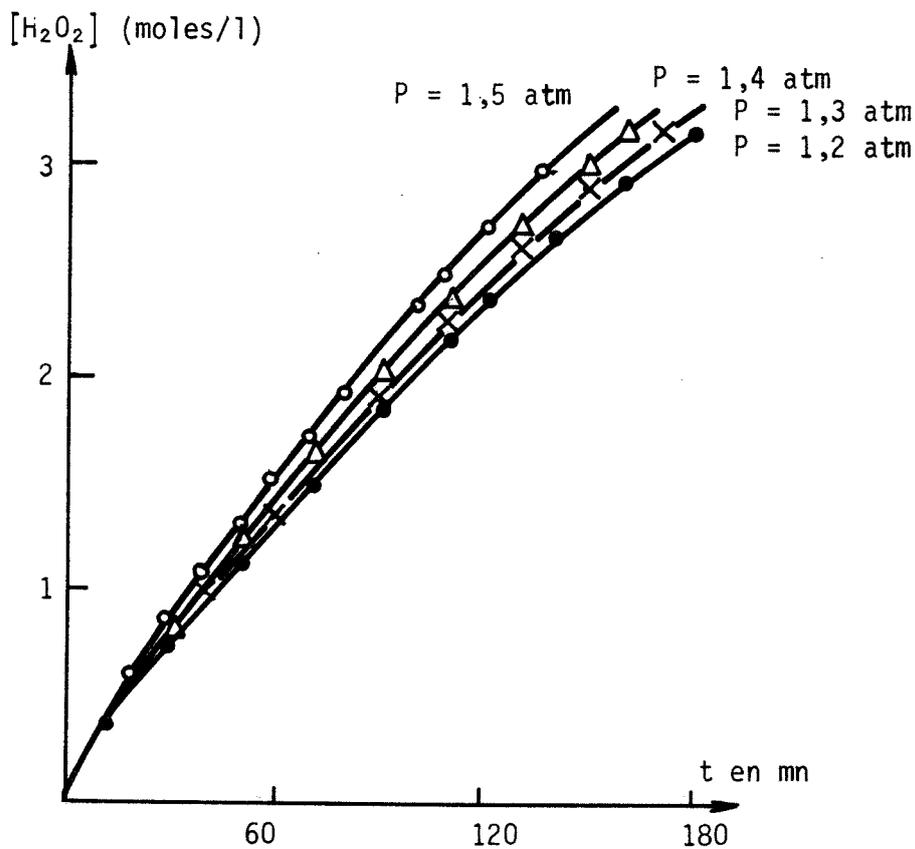


Figure 40 - VARIATION DE LA CONCENTRATION DE H_2O_2 DANS LA SOLUTION EN FONCTION DU TEMPS.

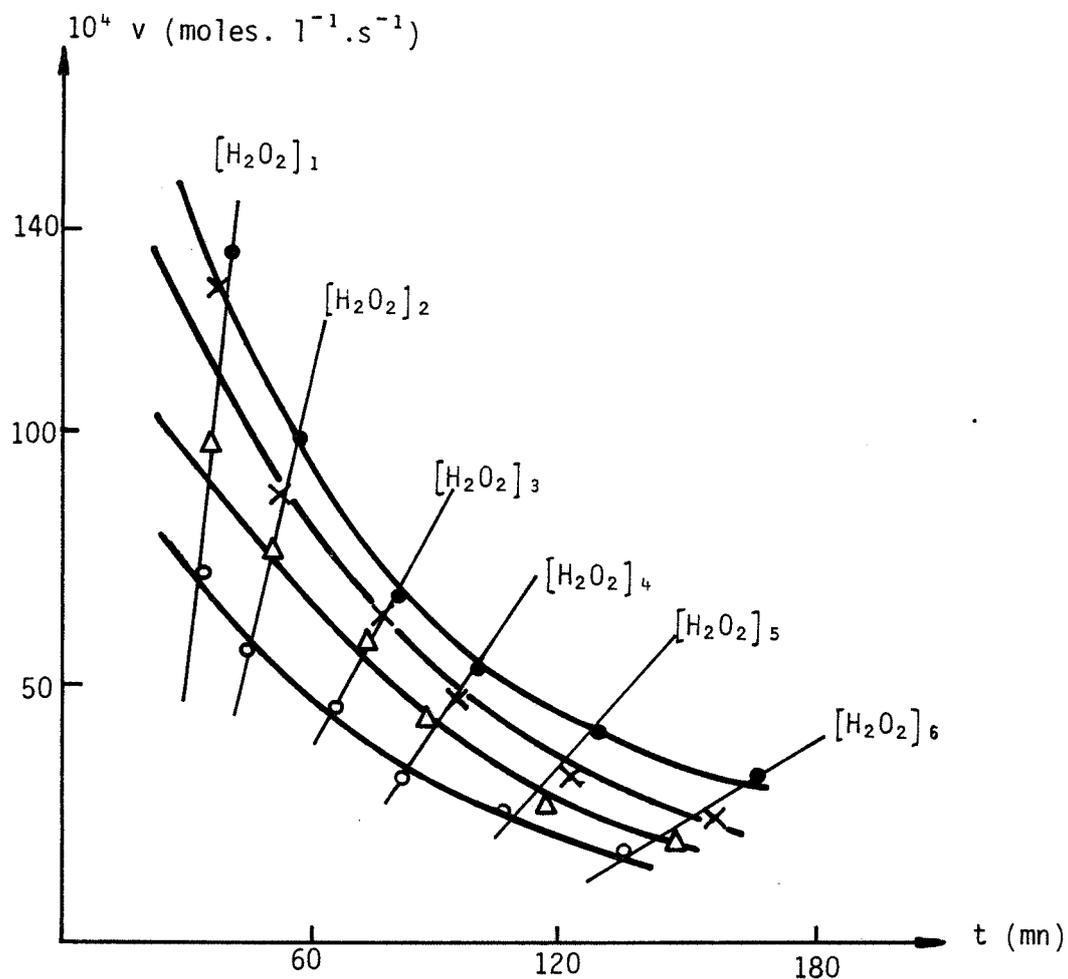


Figure 41 - EVOLUTION DE LA VITESSE EN FONCTION DU TEMPS SOUS DIFFERENTES PRESSIONS D'UTILISATION.

- $P = 1,2$ atm
- X—X—X—X $P = 1,3$ atm
- △—△—△—△ $P = 1,4$ atm
- $P = 1,5$ atm

$$[H_2O_2]_1 = 0,92 \text{ mole/l}$$

$$[H_2O_2]_2 = 1,25 \text{ mole/l}$$

$$[H_2O_2]_3 = 1,69 \text{ mole/l}$$

$$[H_2O_2]_4 = 2,05 \text{ moles/l}$$

$$[H_2O_2]_5 = 2,54 \text{ moles/l}$$

$$[H_2O_2]_6 = 3,04 \text{ moles/l}$$

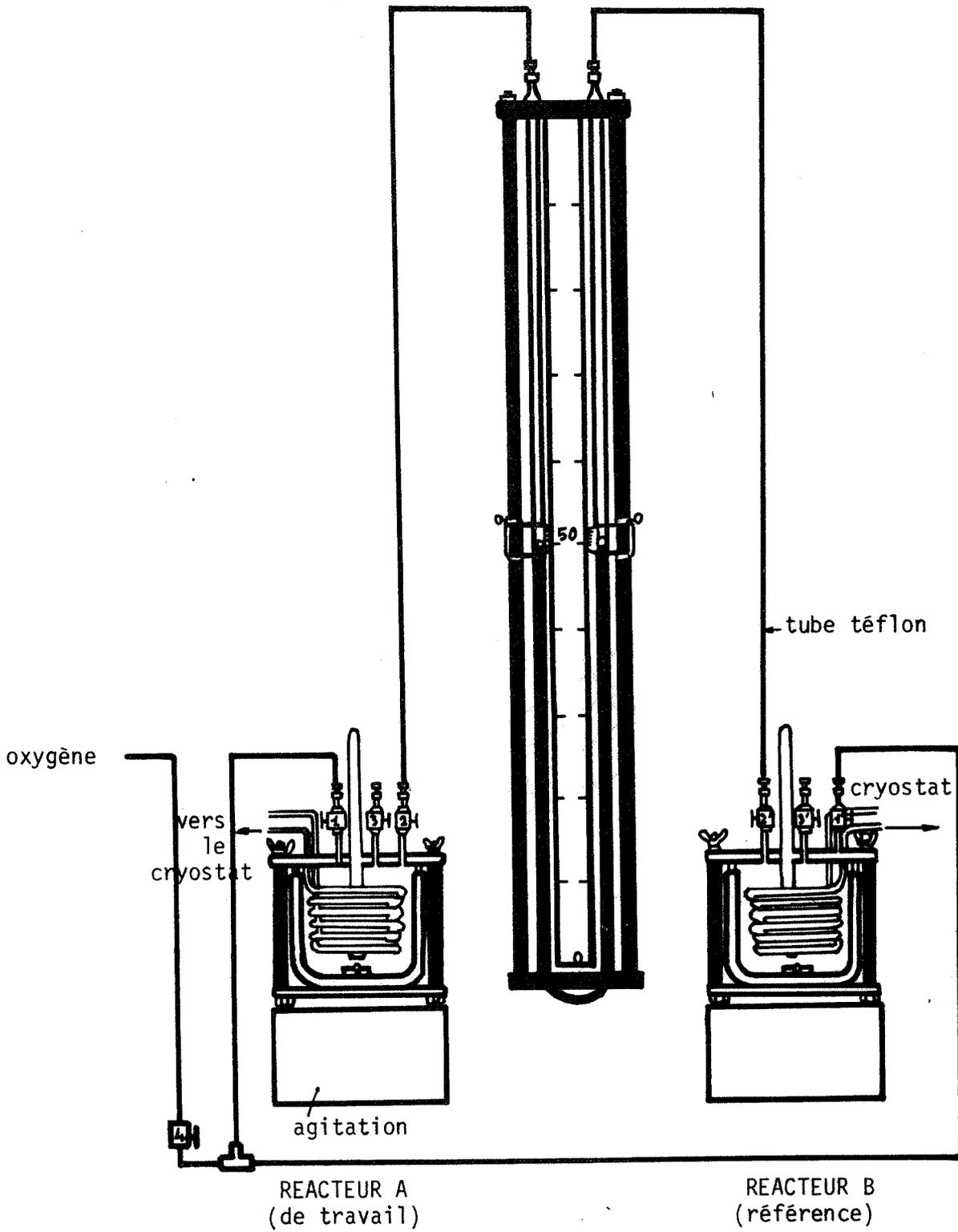


Figure 42 - DECOMPOSITION DE L'EAU OXYGENEE PAR LA CATALASE
SOUS PRESSION DE 2 à 5 ATMOSPHERES - MONTAGE.

II - ETUDE DU COMPORTEMENT DE LA CATALASE FIXEE LORS DE LA DECOMPOSITION
DE H₂O₂ SOUS PRESSION DE 2 A 5 ATMOSPHERES :

2-1 - Montage :

L'oxygène sous pression alimente deux "réacteurs" en parallèle dont le montage est représenté sur la figure 42. Nous nous servons de 2 récipients : l'un appelé réacteur de travail (Réacteur A) où s'effectue la réaction de décomposition, l'autre appelé réacteur de référence (Réacteur B) contenant l'eau oxygénée à la même concentration que celle du Réacteur A, mais sans enzyme, ceci pour soustraire l'effet d'une éventuelle décomposition spontanée de l'eau oxygénée qui se superposerait à celle due à l'enzyme. Le mélange réactionnel est composé de 100 cm³ d'eau oxygénée à la concentration choisie ajoutés à 100 cm³ de tampon phosphate de pH 6,8. Les deux réacteurs sont reliés par un manomètre à mercure sur lequel on lit la différence de pression due à la réaction. Les conditions expérimentales sont choisies telles que la différence de pression n'excède pas la hauteur disponible sur le manomètre pendant le temps de l'expérience. Dans les calculs, on tient compte de la pression réelle et non de la pression d'oxygène initiale.

La régulation de la température dans les deux réacteurs est assurée par un cryostat. L'agitation est la même dans les deux réacteurs.

2-2 - Présentation de l'enzyme fixée :

La masse de catalase utilisée est toujours la même : 1,5 mg. L'enzyme est présentée sous forme d'une mousse cylindrique, le mélange enzymatique s'effectuant toujours dans les proportions suivantes :

masse de catalase :	2 mg
volume d'albumine humaine à 17,5 % :	0,5 cm ³
volume de tampon phosphate à pH 6,8 :	0,9 cm ³
volume de glutaraldéhyde à 2,5 % :	0,6 cm ³

Le cylindre de mousse enzymatique est placé dans un petit cylindre d'acier inox de 8 mm de diamètre et de 15 mm de hauteur qui permet d'alourdir la mousse et de présenter au mélange réactionnel deux disques identiques de surface totale : 1 cm^2 . L'expérience nous a amenés à prendre un cylindre assez haut : la mousse d'enzyme est ainsi assez épaisse et ne se coince pas entre le serpentín de régulation de température et le réacteur et elle est assez lourde pour rester au fond du réacteur.

Le cylindre contenant la mousse enzymatique est posé sur une plaquette d'acier inox coincée entre deux tuyaux consécutifs du serpentín de régulation de température ; elle reste ainsi au-dessus du liquide jusqu'au temps $t = 0$ où elle sera basculée dans le mélange réactionnel.

2-3 - Introduction aux études successives :

La première étude concerne l'influence de la pression d'oxygène sur la vitesse de la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la mousse enzymatique. La réaction est suivie par les variations de pression Δp autour d'une pression donnée. La concentration en eau oxygénée et la température de travail étant fixées, nous effectuerons la réaction à des pressions allant de 2 à 5 atmosphères.

Dans un deuxième temps, la pression et la concentration en eau oxygénée étant fixées, nous étudierons la réaction à des températures allant de 5°C à 37°C .

Enfin, nous suivrons la réaction de décomposition à des concentrations successives en eau oxygénée allant de 0,05 à 2,5 moles par litre, la pression et la température de travail étant fixées.

Pour les expériences où sont étudiées l'influence de la pression et celle de la température, la concentration de l'eau oxygénée utilisée est de 0,5 mole par litre.

La pression de travail est choisie à 2 atmosphères pour les manipulations où la concentration en eau oxygénée et la température varient.

La température sera maintenue à 5°C pour les expériences où nous faisons varier la pression et la concentration de travail.

2-4 - Influence de la pression sur la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase fixée :

Ces expériences sont menées successivement à : 2, 3, 4 et 5 atmosphères. Les diagrammes de Δp en fonction du temps sont portés sur la figure 43. La variation de la pression d'oxygène au cours du temps est représentée par la figure 44.

2-4-1 - Evolution de la production d'oxygène au cours du temps :

Pour suivre la cinétique de la réaction, il faut tenir compte à la fois de la quantité d'oxygène libéré en phase gazeuse et de la quantité d'oxygène dissous dans la phase liquide.

2-4-1-1- Production d'oxygène en phase gazeuse :

Le volume de gaz dans le réacteur de travail (Réacteur A) à un instant t est égal à :

$$V(t) = V_0 + S \cdot \frac{\Delta p}{2}$$

{ V_0 étant le volume initial de la phase gazeuse
S la section du tube manométrique
 Δp la pression à l'instant t lue sur le manomètre à mercure, exprimée en mm de Hg.

Etant donné que la section du tube est de 6,5 mm² et la différence de pression maximum observée au cours de toutes les expériences 800 mm de Hg, nous avons :

$$S \cdot \frac{\Delta p_{\max}}{2} = 2600 \text{ mm}^3 = 2,6 \text{ cm}^3$$

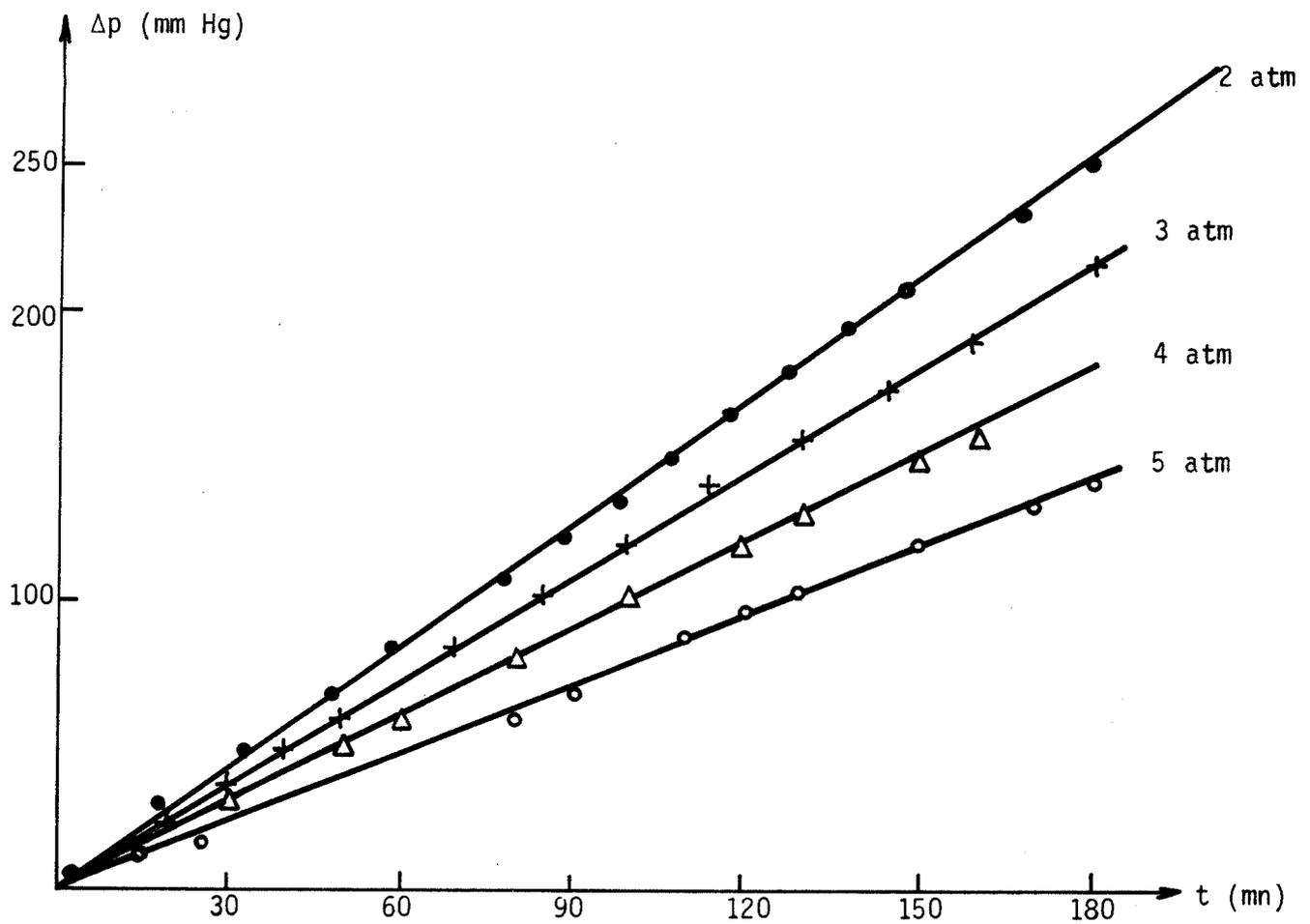


Figure 43 - DECOMPOSITION DE H_2O_2 PAR LA CATALASE SOUS PRESSION DE 2 A 5 atm. $\Delta p = f(t)$.
conditions expérimentales : $[H_2O_2] = 0,5 \text{ mole/l}$; $T = 5^\circ C$;
surface réactive $s = 1,2 \text{ cm}^2$.

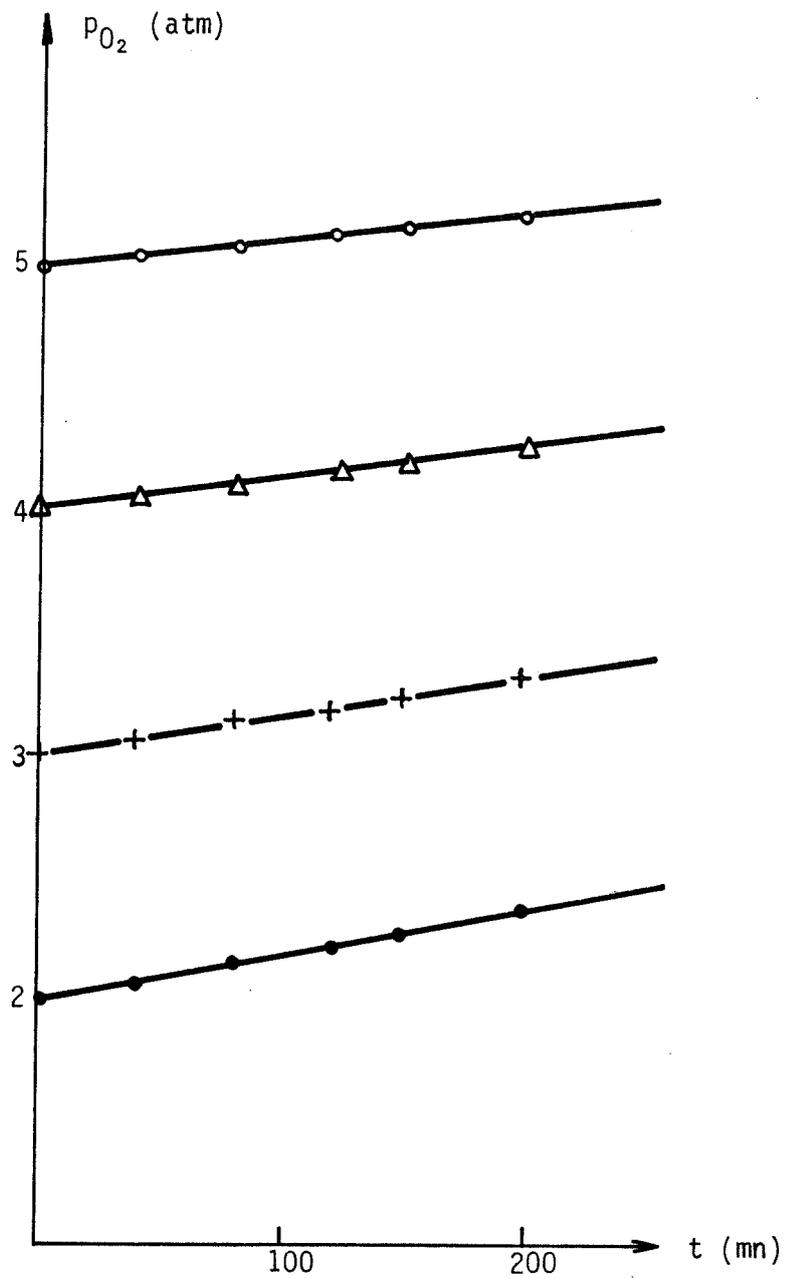


Figure 44 - EVOLUTION DE LA PRESSION AU COURS DU TEMPS
LORS DES EXPERIENCES SOUS PRESSION INITIALE
ALLANT DE 2 A 5 ATM.

D'autre part le volume V_0 utilisé est égal à 110 cm^3 (ce volume comprend le volume de gaz dans le Réacteur A, dans le tuyau raccord et dans le manomètre au temps initial), nous pouvons considérer qu'au cours de la manipulation la variation maximale de volume gazeux due à la production d'oxygène peut être négligée dans ces conditions expérimentales. L'erreur commise sera donc inférieure ou égale à 2,4 %.

Le volume gazeux dans le Réacteur A sera donc considéré comme constant et égal à 110 cm^3 .

La pression du gaz dans le réacteur de travail à un instant t s'écrit :

$$P(t) = p_0 + \Delta p + \delta p$$

p_0 étant la pression initiale régnant dans les deux réacteurs.

Δp la différence de pression due à la production d'oxygène dans le réacteur de travail.

δp étant la pression supplémentaire due à la compression du gaz du côté du réacteur de référence et qui s'ajouterait à la pression initiale p_0 .

L'évaluation de δp donne :

Le nombre de moles de gaz dans le réacteur de référence étant constant, l'augmentation de volume due à l'augmentation du nombre de moles d'oxygène dans le réacteur de travail provoque une compression du gaz dans le réacteur de référence.

Si nous considérons une valeur maximale de la différence de pression lue Δp d'environ 1 atmosphère, nous avons :

$$p_0 \cdot V_0 = (p_0 + \delta p) (V_0 - \delta V)$$

où δV maximum est égal à $2,6 \text{ cm}^3$ et où le terme $\delta p \cdot \delta V$ peut être négligé devant les autres termes. Ce cas le plus défavorable où Δp est maximum se produit lors de la manipulation où p_0 est de 2 atmosphères (et la concentration en eau oxygénée de 2,5 moles/l).

Dans l'expression précédente, il vient :

$$\left. \begin{array}{l} p_0 \cdot \delta V = 5,2 \text{ atm} \cdot \text{cm}^3 \\ \delta p \cdot V_0 = \delta p \cdot 110 \text{ cm}^3 \end{array} \right\} \Rightarrow$$

$$\delta p = \frac{5,2}{110} = 0,047 \text{ atm}$$

cette quantité, dans nos conditions expérimentales, peut être négligée devant la différence de pression lue et devant la pression initiale ; nous prendrons alors la pression du gaz dans le réacteur de travail égale à :

$$P = p_0 + \Delta p \text{ lue}$$

Le nombre de moles d'oxygène sous la forme gazeuse produites par la réaction se calcule par :

$$n_{O_2 \text{ gazeux}} = \frac{P_{O_2} \cdot V_{\text{gazeux}}}{R \cdot T}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{où } P_{O_2} \text{ est exprimée en atmosphères} \\ V_{\text{gazeux}} = 0,11 \text{ litre} \\ R = 0,082 \text{ l} \cdot \text{atm} \cdot \text{°K}^{-1} \\ T \text{ en } \text{°K} \end{array} \right.$$

2-4-1-2 - Production d'oxygène en phase dissoute :

Nous supposons que l'équilibre O_2 dissous $\rightleftharpoons O_2$ gazeux est réalisé à chaque instant (en effet, la vitesse de passage de la forme dissoute à la forme gazeuse est grande par rapport à la vitesse de la réaction) et donc soumis à la loi de Henry.

La loi de Henry donne la concentration en oxygène $[O_2]_{H_2O}$ dissous dans l'eau et dans une solution aqueuse d'eau oxygénée $[O_2]_{H_2O} + H_2O_2$:

$$[O_2]_{H_2O} = k \cdot P_{O_2} \quad \text{et} \quad [O_2]_{H_2O} + \epsilon H_2O_2 = k' \cdot P_{O_2}$$

et si nous supposons que $k = k'$ aux faibles teneurs en eau oxygénée :

$$[O_2]_{H_2O} = [O_2]_{H_2O} + \epsilon_{H_2O_2} = k \cdot p_{O_2}$$

La loi de Henry peut s'écrire (69) :

$$K = \frac{p_{O_2}}{X_{O_2}} \text{ ou } X_{O_2} = K_H \cdot p_{O_2} \text{ avec } K_H = \frac{1}{K}$$

p_{O_2} s'exprime en mm de Hg, X_{O_2} est la fraction molaire de O_2 dissous dans la solution.

t(°C)	0	5	10	12	20	37
$10^{-7} K$	1,91	2,17	2,48	2,57	2,95	3,99
$10^{-7} K_H$	0,52	0,46	0,40	0,39	0,34	0,25

Tableau 7 - Valeurs de la constante de Henry à diverses températures

K est exprimée en mm de Hg par fraction molaire de O_2 dissous dans la solution ; K_H est exprimée en fraction molaire de O_2 dissous dans la solution par mm de Hg.

La fraction molaire en O_2 s'écrit :

$$X_{O_2} = \frac{\text{nombre de moles de } O_2 \text{ dissous}}{n_{O_2} + n_{H_2O} + n_{H_2O_2}} = \frac{[O_2] \cdot V}{[O_2] \cdot V + [H_2O] \cdot V + [H_2O_2] \cdot V}$$

où V est le volume de la solution.

Comme la concentration de l'oxygène en phase dissoute et la concentration en eau oxygénée sont faibles devant la concentration de l'eau, nous pouvons écrire, après simplification de l'expression précédente :

$$\frac{[O_2] \text{ dissous}}{[H_2O]} = K_H \cdot p_{O_2}$$

Le nombre de moles d'oxygène sous la forme dissoute produites par la réaction se calcule par :

$$n_{O_2} \text{ dissous} = [O_2] \text{ dissous} \times V$$

avec les valeurs numériques suivantes :

$$\begin{cases} V = 0,2 \text{ litre} \\ [H_2O] = 55 \text{ moles/litre.} \end{cases}$$

La variation du nombre total de moles d'oxygène produites par la réaction en fonction du temps est donnée par la figure 45, le nombre de moles produites par la réaction sous deux atmosphères est supérieur à celui obtenu sous cinq atmosphères, nous allons chercher la répercussion de ce résultat sur la vitesse de la réaction.

2-4-2 - Cinétique de la réaction :

La vitesse de la réaction s'exprime par :

$$v = - \frac{d[H_2O_2]}{dt} = 2 \cdot \frac{d[O_2]}{dt}$$

elle peut s'écrire aussi, en fonction du nombre de moles d'eau oxygénée détruites par la réaction :

$$v = - \frac{dn_{H_2O_2}}{V \cdot dt}$$

où V est le volume de la solution

$$\text{or, } - \frac{dn_{H_2O_2}}{dt} = 2 \cdot \frac{dn_{O_2}}{dt}$$

d'où l'expression de la vitesse en fonction de la variation du nombre de moles d'oxygène produites au cours du temps :

$$v = \frac{2}{V} \cdot \frac{dn_{O_2}}{dt}$$

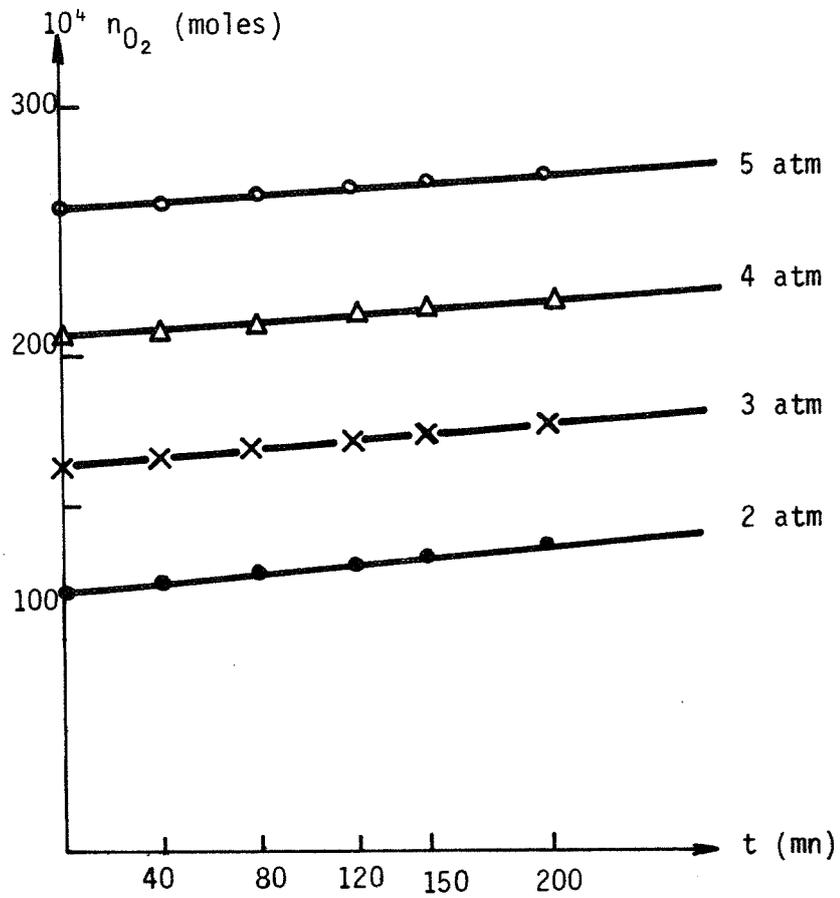


Figure 45 - VARIATION DU NOMBRE TOTAL DE MOLES D'OXYGENE PRODUITES PAR LA REACTION EN FONCTION DU TEMPS.

La variation du nombre de moles d'oxygène en fonction du temps étant donnée par la figure 45, les valeurs des vitesses seront obtenues, au facteur $\frac{2}{V}$ près, par les pentes de ces droites respectives.

Les valeurs de la vitesse sont données dans le tableau 8.

p en atm	vitesse initiale (moles.l ⁻¹ .s ⁻¹)
2	15,0 . 10 ⁻⁷
3	13,3 . 10 ⁻⁷
4	11,7 . 10 ⁻⁷
5	9,2 . 10 ⁻⁷

Tableau 8 - Valeurs de la vitesse initiale de réaction quand la pression augmente de 2 à 5 atm.

2-4-3 - Conclusion :

L'étude de la cinétique nous indique que la vitesse de la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase fixée diminue quand la pression augmente ; les résultats de cette série d'expériences sous pression de 2 à 5 atmosphères prolongent et confirment les résultats de celles menées sous pression de 1,2 à 1,5 atmosphère, c'est-à-dire que l'activité apparente de l'enzyme fixée diminue lorsque la pression augmente.

2-5 - Décomposition de l'eau oxygénée par la catalase sous deux atmosphères à diverses températures :

Les expériences sont faites successivement à 5°C, 12°C, 20°C et 37°C.

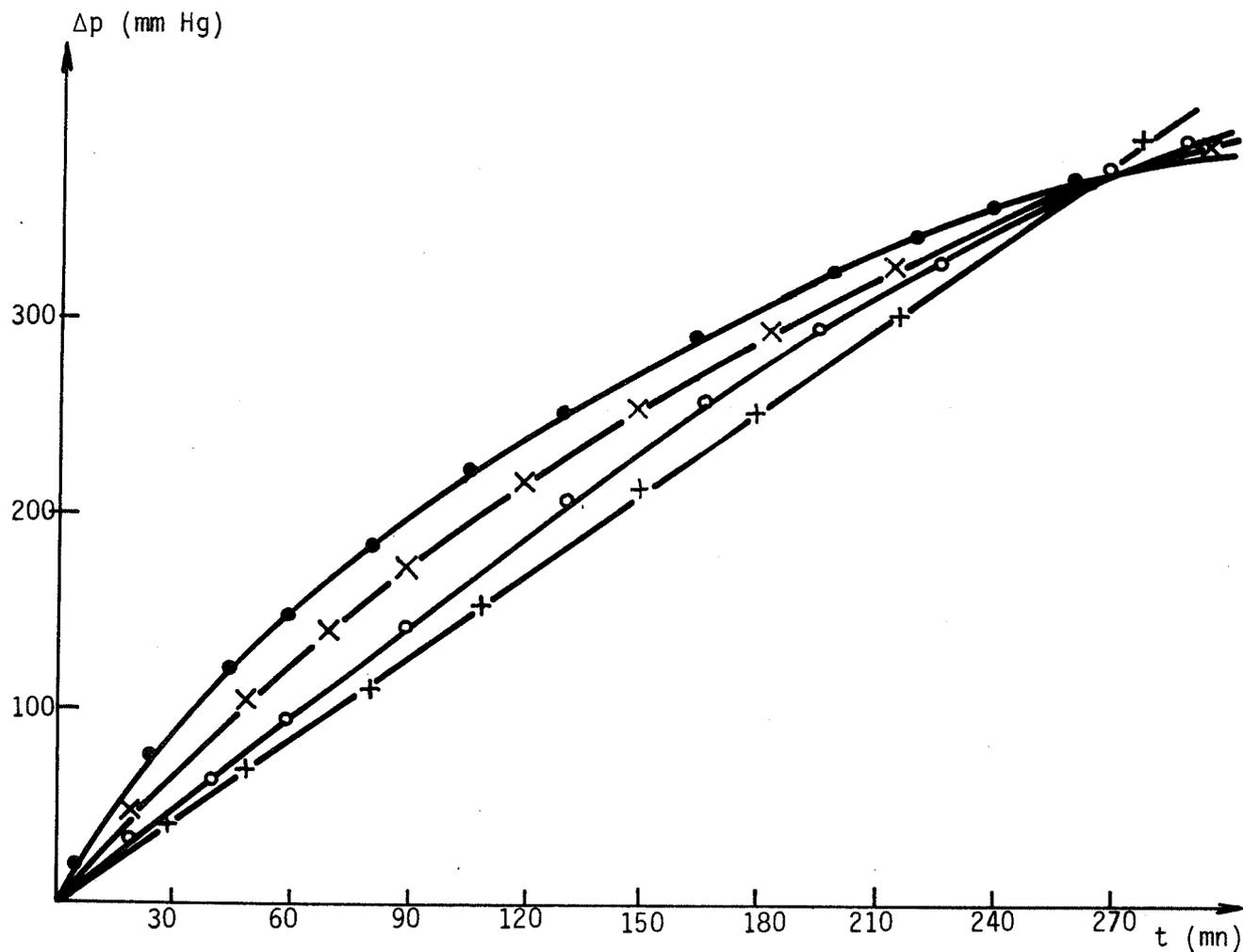


Figure 46 - DECOMPOSITION DE H_2O_2 PAR LA CATALASE SOUS 2 ATMOSPHERES A DIVERSES TEMPERATURES. $\Delta p = f(t)$.

- : T = 37°C
- X—X—X—: T = 20°C
- : T = 12°C
- +—+—+—: T = 5°C

2-5-1 - Evolution de la production d'oxygène au cours du temps :

Les variations de la différence de pression lue en fonction du temps sont représentées sur la figure 46. Comme précédemment, nous établissons les courbes $n_{O_2} \text{ total} = f(t)$ qui nous renseignent sur la production d'oxygène et nous permettent de calculer les vitesses de réaction en prenant les pentes des tangentes aux différents points de ces courbes.

La variation du nombre total de moles d'oxygène en fonction du temps est donnée par la figure 47. Le nombre de moles d'oxygène est plus élevé au départ à 5°C qu'à 37°C parce que la solubilité de l'oxygène diminue quand la température augmente.

Ces courbes nous montrent qu'une augmentation de la température de réaction modifie la production d'oxygène, la production d'oxygène la plus régulière ayant lieu à température basse.

2-5-2 - Cinétique de la réaction :

2-5-2-1 - Calcul des vitesses de réaction :

Le calcul des vitesses de réaction aux diverses températures est donné dans le tableau 9 :

T \ t(mn)	5°C	12°C	20°C	37°C
0	$15,0 \cdot 10^{-7}$	$19,2 \cdot 10^{-7}$	$22,2 \cdot 10^{-7}$	$23,9 \cdot 10^{-7}$
80	$15,0 \cdot 10^{-7}$	$17,5 \cdot 10^{-7}$	$17,7 \cdot 10^{-7}$	$18,7 \cdot 10^{-7}$
160	$15,0 \cdot 10^{-7}$	$15,1 \cdot 10^{-7}$	$13,6 \cdot 10^{-7}$	$12,2 \cdot 10^{-7}$
260	$15,0 \cdot 10^{-7}$	$12,1 \cdot 10^{-7}$	$6,3 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-7}$

Tableau 9 - Evolution des vitesses de réaction avec différentes températures (v est en $\text{moles.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$).

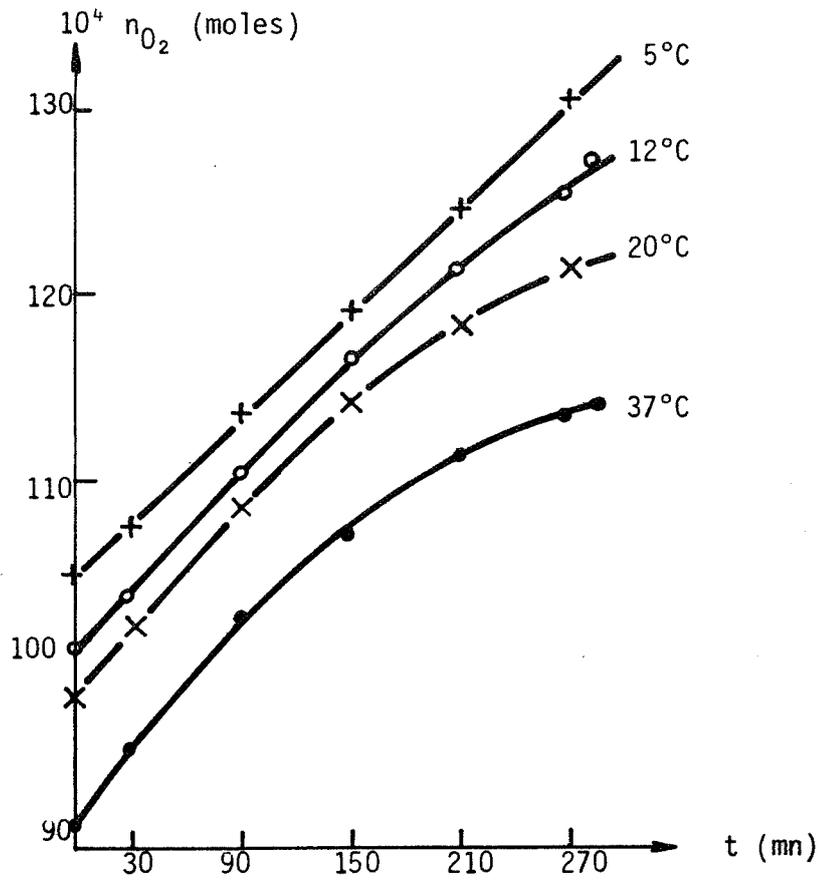


Figure 47 - PRODUCTION D'OXYGENE EN FONCTION DU TEMPS A DIVERSES TEMPERATURES. P = 2 atm.

- +---+---+--- T = 5°C
- o---o---o--- T = 12°C
- x---x---x--- T = 20°C
- T = 37°C

La figure 48 donne l'évolution des vitesses de réaction au cours du temps lors des expériences aux diverses températures. Nous constatons que la vitesse initiale croît avec la température, provoquant un démarrage plus rapide de la réaction : la pente de la courbe au temps initial augmente en effet quand la température est plus élevée. Mais la production d'oxygène n'est pas régulière (figure 47) et baisse au cours du temps d'autant plus rapidement que la température de travail est plus grande ; la variation de la pente sur chaque courbe au-dessus de 12°C traduit une dénaturation de l'enzyme par effet thermique.

2-5-2-2 - Détermination de l'énergie d'activation de la réaction sous pression

En considérant que la réaction reste approximativement d'ordre 1 sous faible pression jusqu'à 2 atmosphères et à la concentration utilisée, la vitesse s'écrit :

$$v = - \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = K \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]$$

Le calcul de la constante de vitesse K aux diverses températures est donné dans le tableau suivant (Tableau 10) :

T (°C)	v initiale (moles.l ⁻¹ .s ⁻¹)	K (s ⁻¹)
5	15,0 . 10 ⁻⁷	30,0 . 10 ⁻⁷
12	19,2 . 10 ⁻⁷	38,3 . 10 ⁻⁷
20	22,2 . 10 ⁻⁷	44,4 . 10 ⁻⁷
37	23,9 . 10 ⁻⁷	47,8 . 10 ⁻⁷

Tableau 10 - Valeurs des constantes de vitesse de la réaction à diverses températures.

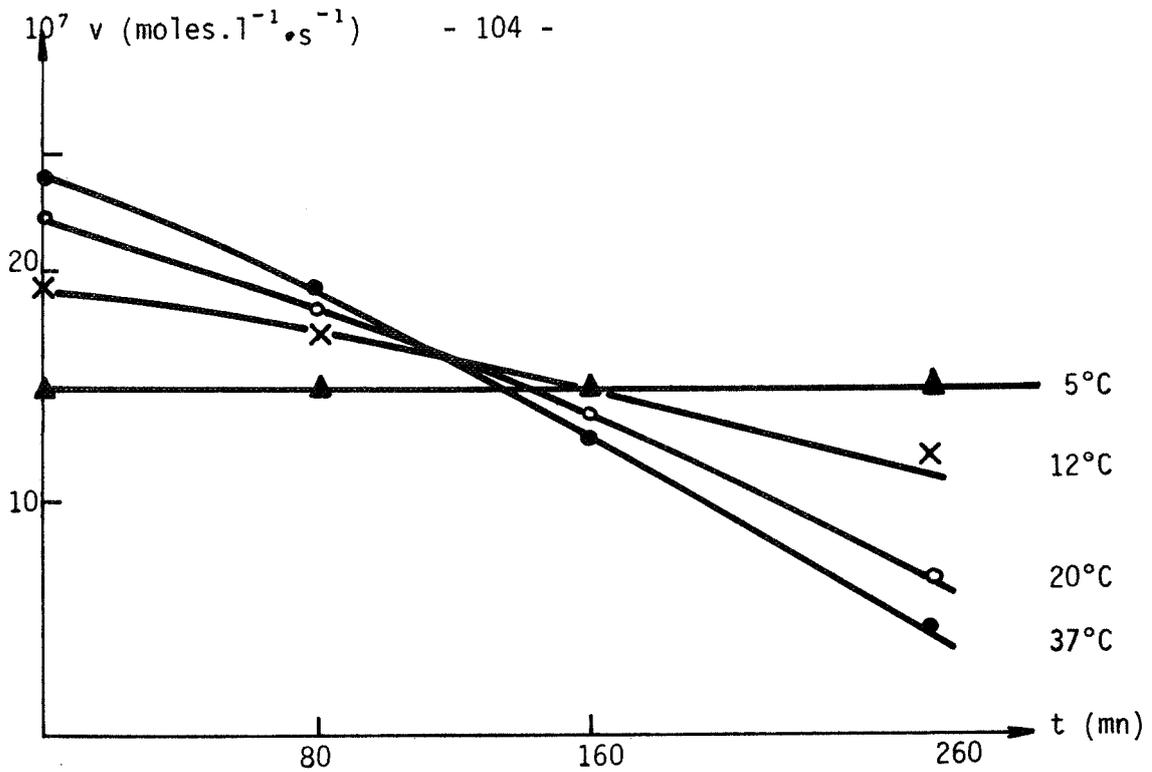


Figure 48 - EVOLUTION DES VITESSES DE REACTION AUX DIVERSES TEMPERATURES

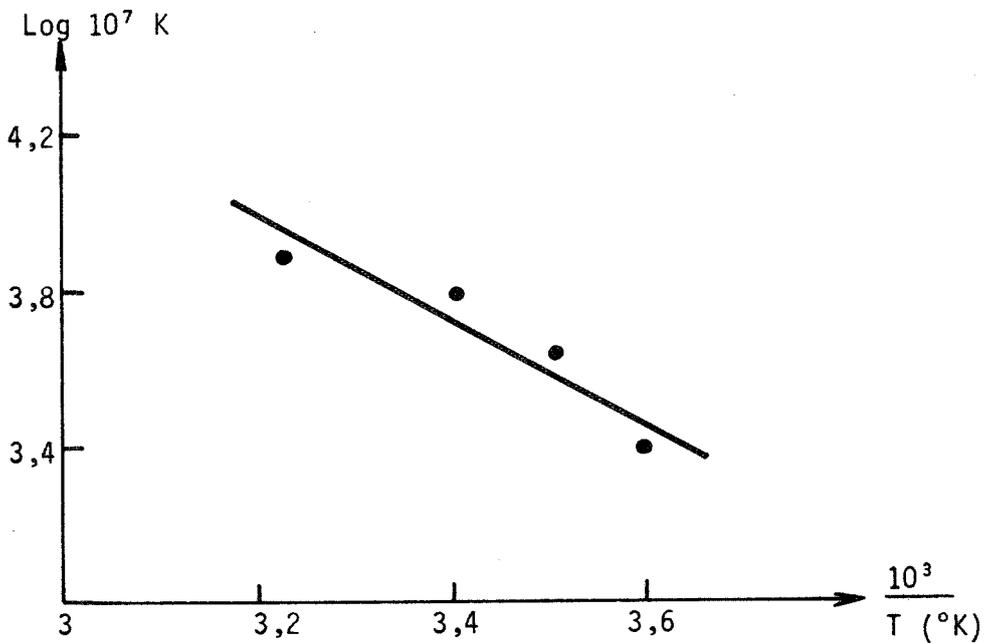


Figure 49 - DETERMINATION DE L'ENERGIE D'ACTIVATION DE LA REACTION ENZYMATIQUE A PARTIR DES VITESSES INITIALES

$$\text{Log } K = f\left(\frac{1}{T}\right)$$

La constante de vitesse varie avec la température selon la loi d'Arrhénius :

$$K = K_0 \cdot e^{-E/RT}$$

où R est égal à 2 cal. mole⁻¹ °K⁻¹

Si nous traçons (figure 49) la courbe représentative de Log K en fonction de $\frac{1}{T}$, nous obtenons approximativement une droite dont la pente indique la valeur du rapport $\frac{E}{R}$. La droite, ajustée par la méthode des moindres carrés nous donne :

$$E \approx 2,5 \text{ kcal. mole}^{-1}$$

La valeur que nous obtenons pour l'énergie d'activation de la réaction sous pression en présence de catalase fixée est faible comparée aux valeurs trouvées par divers auteurs pour la réaction sous pression atmosphérique, qui sont :

4,7 kcal. mole⁻¹ pour la catalase fongique fixée trouvée par KOHLER en 1975 (2),
5,5 kcal. mole⁻¹ pour la catalase en solution trouvée par BOULANGER en 1973 (10),
6,4 kcal. mole⁻¹ pour la catalase en solution donnée par WHITAKER en 1972 (70);

2-5-3 - Conclusion :

Dans notre cas, entre les deux expériences extrêmes de décomposition sous pression (5°C et 37°C), l'augmentation de température est importante : 32°C, et la vitesse initiale de la réaction n'est multipliée que par 1,6. De plus, lors de l'expérience menée à 5°C, la dénaturation de l'enzyme n'a pas été observée pendant le temps de l'expérience. Ceci souligne bien encore une fois que nous avons intérêt à travailler à faible température pour éviter la dénaturation de la catalase fixée par effet thermique.

2-6 - Décomposition de l'eau oxygénée par la catalase fixée sous deux atmosphères à diverses concentrations en eau oxygénée :

Nous effectuons cette série de manipulations à basse température et dans la moins difficile des conditions de pression (2 atmosphères).

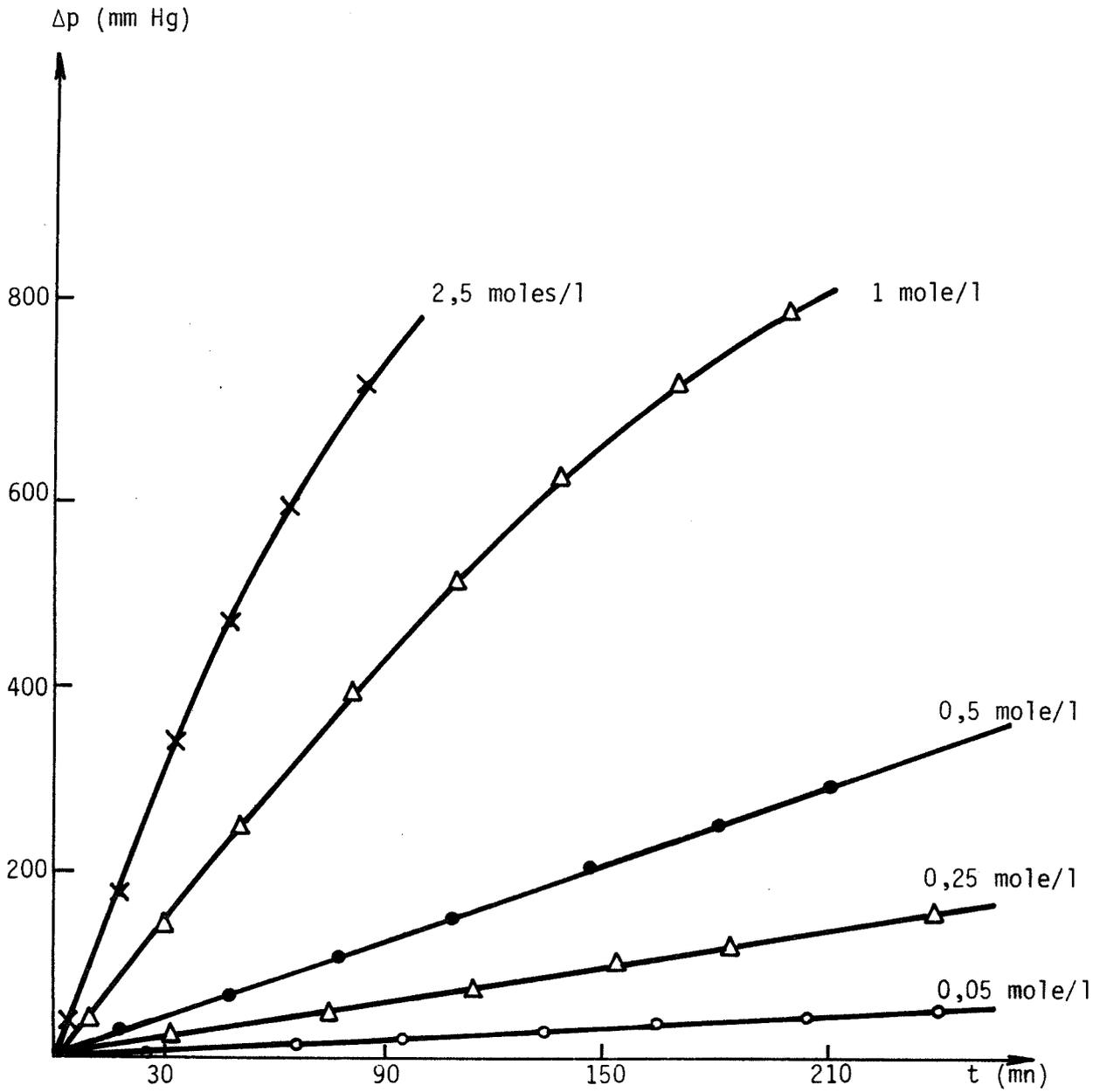


Figure 50 - DECOMPOSITION DE H_2O_2 PAR LA CATALASE SOUS 2 atm A DIVERSES CONCENTRATIONS EN H_2O_2 .

T = 5°C.

Les concentrations d'eau oxygénée utilisées sont les suivantes : 0,05 mole/l, 0,25 mole/l, 0,5 mole/l, 1 mole/l et 2,5 moles/l.

2-6-1 - Evolution de la production d'oxygène au cours du temps :

La variation de pression lue en fonction du temps est portée sur la figure 50. Pour deux concentrations (0,5 mole/l et 1 mole/l), la figure 51 représente la variation du nombre de moles d'oxygène produites sous forme gazeuse, celle du nombre de moles de gaz produites sous forme dissoute et la somme des deux, c'est-à-dire la variation du nombre total de moles d'oxygène produites par la réaction. Pour toutes les concentrations utilisées, la figure 52 traduit l'évolution de la production totale d'oxygène en fonction du temps. Ces courbes nous montrent que plus la concentration en eau oxygénée est élevée, plus la production d'oxygène est grande ; mais pour les grandes concentrations, la production de gaz, très importante au début, baisse vite, très probablement par suite de la dénaturation de la catalase. Par contre, pour des concentrations plus faibles, nous obtenons une production d'oxygène régulière et nous observons que l'enzyme ne s'est ni dénaturée, ni inhibée pendant le temps de réaction.

2-6-2 - Cinétique de la réaction

2-6-2-1 - Calcul des vitesses de réaction :

Les pentes des tangentes aux différents points des courbes n_{O_2} total = f(t) nous donnant les valeurs des vitesses aux diverses concentrations étudiées au facteur $\frac{2}{V}$ près, sont relevées sur la figure 52.

La vitesse initiale croît avec la concentration en eau oxygénée, mais au cours du temps, les vitesses baissent d'autant plus vite que la concentration utilisée est élevée (figure 53). Seules les réactions aux faibles concentrations en eau oxygénée : de 0,05 mole/l à 0,5 mole/l se déroulent à vitesse constante.

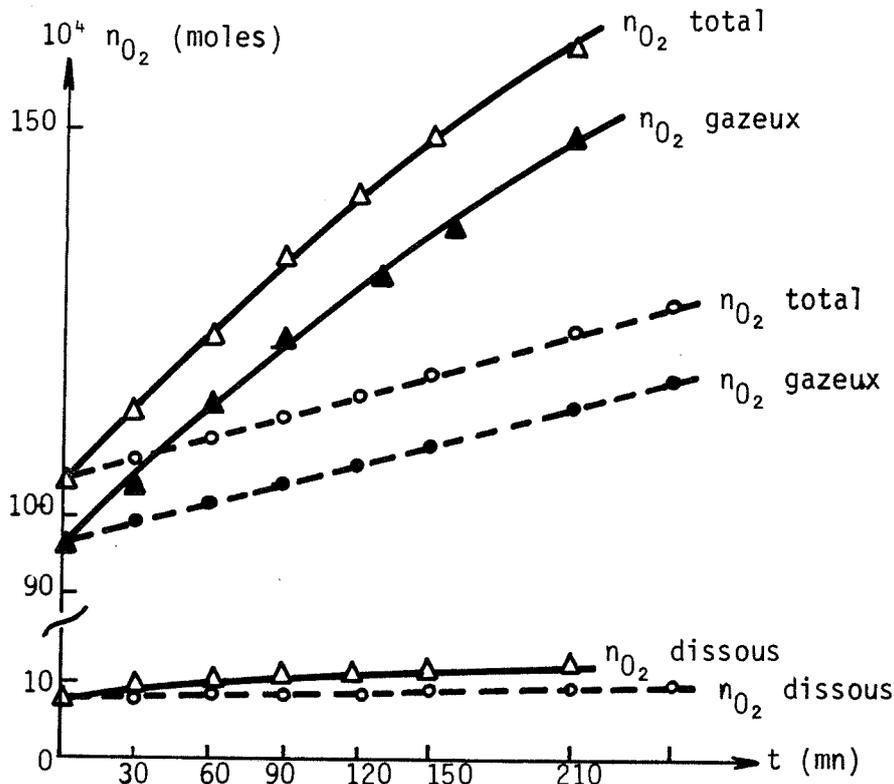


Figure 51 - EVOLUTION DU NOMBRE DE MOLES D'OXYGENE EN PHASE GAZEUSE, EN PHASE DISSOUE ET DU NOMBRE DE MOLES TOTAL POUR DEUX CONCENTRATIONS :
 ----- : $[H_2O_2] = 0,5$ mole/l ; ——— : $[H_2O_2] = 1$ mole/l

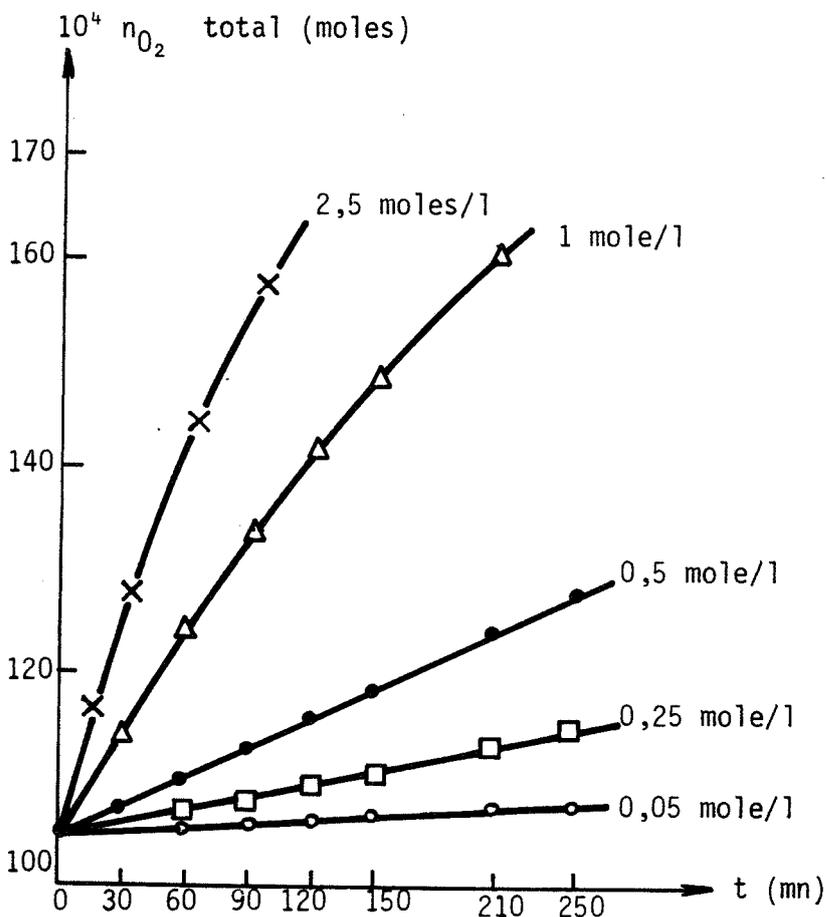


Figure 52 : VARIATION DU NOMBRE TOTAL DE MOLES D'OXYGENE PRODUITES AU COURS DU TEMPS, A DIVERSES CONCENTRATIONS EN H_2O_2
 P = 2 atm. T = 5°C

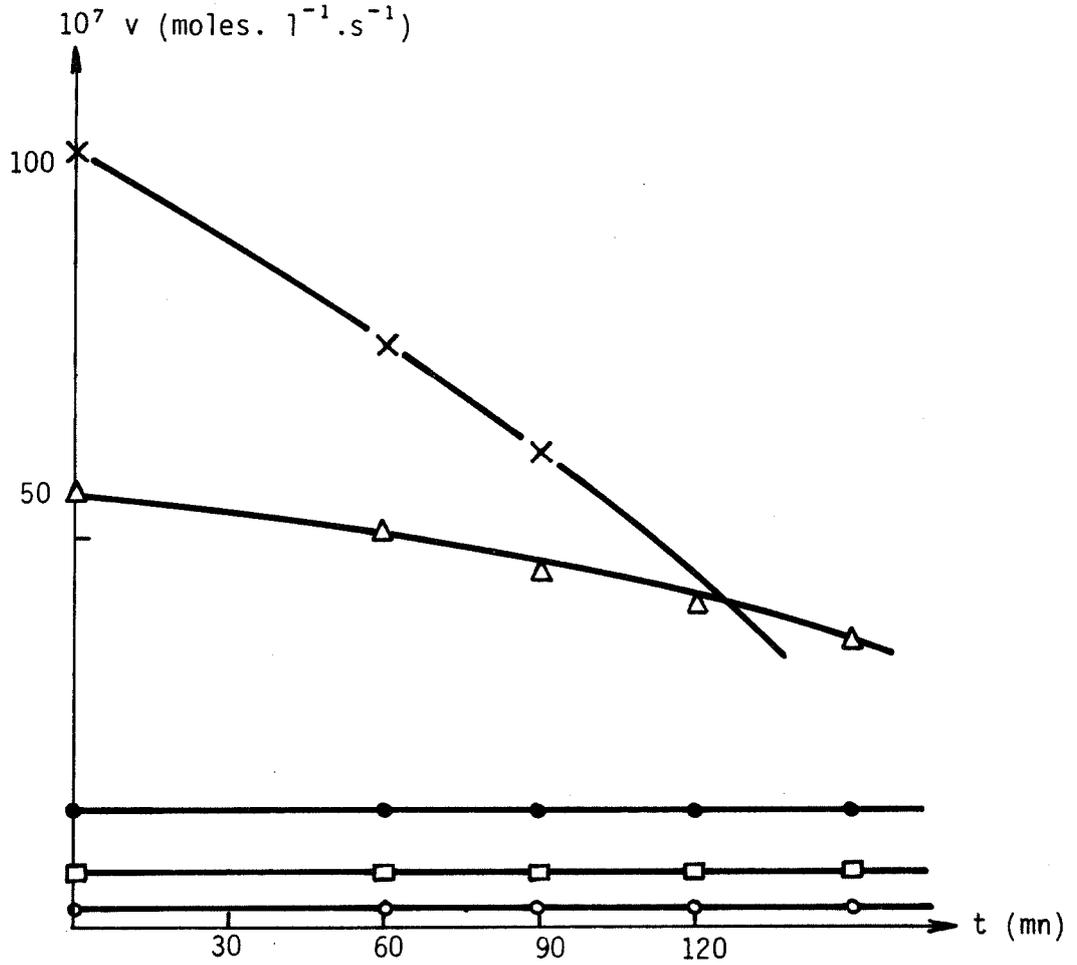


Figure 53 - EVOLUTION DES VITESSES DE REACTION AUX DIVERSES CONCENTRATIONS EN H₂O₂.

P = 2 atm T = 5°C

- x-x-x- : [H₂O₂] = 2,5 moles/l
- △-△-△- : [H₂O₂] = 1 mole/l
- : [H₂O₂] = 0,5 mole/l
- : [H₂O₂] = 0,25 mole/l
- : [H₂O₂] = 0,05 mole/l

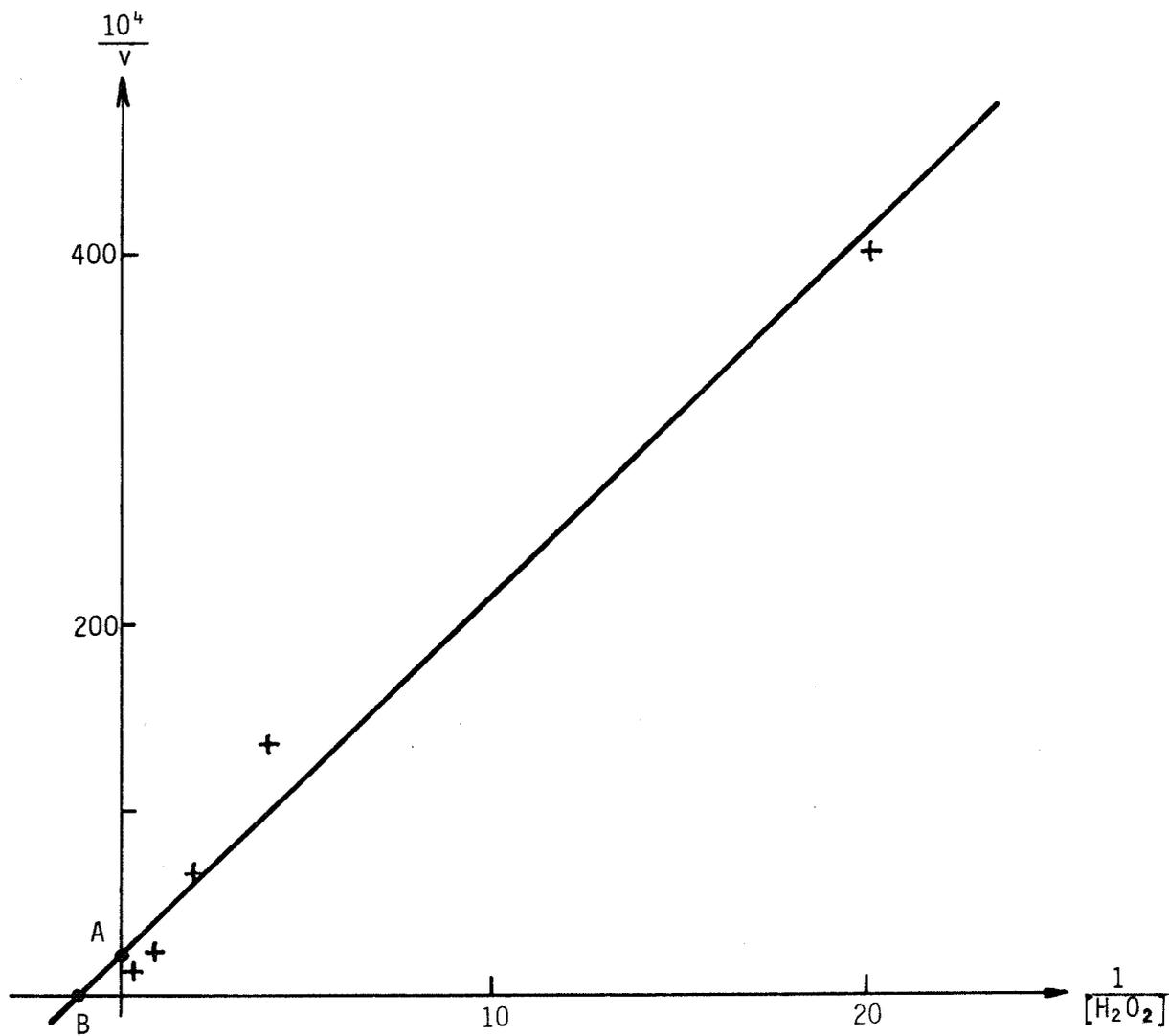


Figure 54 - METHODE DE LINEWEAVER-BURK POUR LA DETERMINATION DE V_m et K_m .

2-6-2-2 - Effet de la concentration en substrat sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique sous pression :

L'équation de Michaelis, de la forme :

$$v = V_m \frac{[H_2O_2]}{K_m + [H_2O_2]}$$

nous permet de déterminer V_m et K_m apparents à partir d'un ensemble de mesures de la vitesse initiale à diverses concentrations en eau oxygénée.

Nous choisirons la méthode connue sous le nom de Lineweaver et Burk (71).

Si nous traçons $\frac{1}{v}$ en fonction de $\frac{1}{[H_2O_2]}$ (figure 54), nous obtenons une droite, qui correspond à la forme réciproque de l'équation de Michaelis :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[H_2O_2]} + \frac{1}{V_m}$$

Cette droite coupe l'axe des $\frac{1}{[H_2O_2]}$ en un point qui donne $-\frac{1}{K_m}$ et l'axe des ordonnées $\frac{1}{v}$ en un point qui donne $\frac{1}{V_m}$; elle a pour pente $\frac{K_m}{V_m}$.

La droite obtenue, ajustée par la méthode des moindres carrés, nous donne :

$$V_m = 448 \text{ moles. l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$\text{et } K_m = 0,86 \text{ mole. l}^{-1}$$

La valeur de K_m peut aussi se trouver par l'abscisse du point B d'intersection de la droite avec l'axe des $\frac{1}{[H_2O_2]}$ qui donne $-\frac{1}{K_m}$. Cette valeur de 0,86 mole par litre trouvée pour K_m à 5°C, pH 6,8 sous 2 atmosphères est du même ordre de grandeur que celle donnée par la littérature (9), qui est de 1,1 mole par litre à 30°C, pH 7 sous 1 atmosphère pour la catalase en solution. La valeur que nous avons obtenue est une valeur apparente de K_m pour l'enzyme immobilisée. En général, cette valeur n'est pas la même que celle trouvée pour l'enzyme en solution à cause des phénomènes de diffusion. Nous devons faire remarquer que cette valeur de K_m plus faible indiquerait une affinité plus grande pour le substrat ; toutefois la précision sur K_m est assez médiocre (figure 54).

2-7 - Conclusion :

Au cours des expériences réalisées sous pression de 2 à 5 atmosphères, nous avons remarqué que plus la pression est élevée, plus la réaction de décomposition de l'eau oxygénée par la catalase est défavorisée, ceci exprime une baisse d'activité de l'enzyme fixée. Une augmentation de pression provoque un changement dans la forme du support catalytique qui se présente sous la forme d'une mousse : l'écrasement subi par la mousse lors de l'élévation de la pression diminue la surface active et empêche l'eau oxygénée d'accéder facilement aux sites actifs.

L'influence d'une élévation de température ou de la concentration en eau oxygénée sur la réaction de décomposition sous pression est comparable à celle qui est constatée sur la réaction à des conditions normales de pression : la vitesse initiale de la réaction augmente avec la température ou avec la concentration en eau oxygénée, mais en même temps, la catalase se dénature plus rapidement et la production d'oxygène baisse. Seules les réactions menées à basse température et en présence de concentrations en eau oxygénée faibles allant de 0,05 mole/litre à 0,5 mole/litre, ne nous ont pas permis de déceler de dénaturation sensible de l'enzyme fixée pendant le temps d'utilisation. Ceci provient du fait que, lors de ces réactions, la quantité de chaleur libérée est faible et ne provoque pas d'élévation de température, permettant ainsi à la catalase immobilisée de travailler dans de bonnes conditions.

CONCLUSION

L'étude de l'activité de la catalase immobilisée nous a permis de trouver là un catalyseur qui permet une décomposition rapide de l'eau oxygénée. On peut facilement préparer l'enzyme fixée et en assurer une bonne conservation au froid : son activité reste la même pendant un mois et ne diminue que très légèrement au bout de six mois.

Nous avons montré que l'activité de la catalase fixée diminue à partir d'un certain seuil de température. Pour maintenir cette activité, nous avons intérêt à travailler dans un domaine de faibles concentrations en eau oxygénée afin de ne pas trop élever la température ; ceci provient du fait que, la cinétique de la réaction étant approximativement d'ordre 1 dans ces conditions, la quantité de chaleur dégagée est proportionnelle à la concentration de l'eau oxygénée utilisée.

L'analyse théorique de la diffusion-réaction a permis de voir que la température de la membrane enzymatique est proportionnelle à la concentration en eau oxygénée utilisée ; elle atteint sa valeur maximale au milieu de la membrane. Ces conclusions ne sont valables que dans un domaine assez restreint de températures.

Dans le cas où il n'est pas possible de travailler à faible concentration, il est nécessaire de maintenir une température faible au niveau de l'enzyme par un refroidissement tel que nous l'avons décrit dans la deuxième partie. Nous pouvons penser que, soit par une dilution progressive soit par une membrane protectrice à gradient de H_2O_2 (59), nous pourrions concilier le stockage peu encombrant de l'eau oxygénée concentrée et son utilisation à l'état dilué nécessaire pour préserver l'activité enzymatique.

Une application directe de l'utilisation de la catalase fixée s'est matérialisée dans le réacteur enzymatique que nous avons construit. Le caractère exothermique de la réaction a pu être maîtrisé grâce à la conception et à la réalisation d'un réacteur qui permet de bien fixer et protéger la couche d'enzyme et d'évacuer les calories. On empêche aussi une baisse d'activité trop rapide de l'enzyme. Le réacteur, de dimensions modestes, peut fournir, à la pression atmosphérique, de l'oxygène à raison de 40 litres/heure, à partir de 260 mg de catalase et d'une surface géométrique de mousse enzymatique égale à 300 cm^2 . Le nettoyage du réacteur

est aisé du fait de l'utilisation des ailettes démontables.

Grâce à son pouvoir d'emmagasiner de l'oxygène sous un faible volume (jusqu'à 478 litres d'oxygène par litre d'eau oxygénée pure), l'eau oxygénée nous permet d'avoir rapidement à notre disposition de l'oxygène au moyen du réacteur à catalase fixée.

L'utilisation, pour l'alimentation en oxygène d'une personne, de ce réacteur sous la forme décrite ne semble pas poser de problèmes importants ; il pourrait être utile notamment pour des premiers secours.

Sous pression, nous avons vu que l'enzyme fixée donne lieu à une réaction comparable à celle sous pression atmosphérique.

A 5°C, l'utilisation de pressions de plus en plus élevées pour la réaction de décomposition de l'eau oxygénée à 0,5 mole par litre provoque une baisse de l'activité apparente de la catalase fixée.

Des températures de travail trop élevées provoquent, sous pression, une dénaturation rapide de l'enzyme fixée par effet thermique.

Les résultats de l'expérience de fonctionnement de la catalase immobilisée sous 2 atmosphères, à 5°C, en utilisant une concentration en eau oxygénée de 0,05 à 0,5 mole par litre, montrent qu'il n'y a pas dénaturation de l'enzyme dans ces conditions.

Si la cinétique de la réaction a pu ainsi être étudiée jusqu'à 5 atmosphères, l'utilisation du réacteur enzymatique en vue des plongées sous-marines de courte durée demande, quant à elle, une mise au point ultérieure plus approfondie.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. KATCHALSKI, I.H. SILMAN : Ann. Rev. Biochem. 35, 873-908, 1966.
- (2) J. KOHLER, R.E. ALTOMARE, J.R. KITTRELL : Research and Development, Vol. XIV n° 1, 1975.
- (3) E. SELEGNY : "Some systems coupling enzymic reactions and other phenomena" in POLYELECTROLYTES. E. SELEGNY, G. MANDEL, U.P. STRAUSS éditeurs, Reidel Publ. Co, Dordrecht, Holl., 1974.
- (4) G. BROUN, S. AVRAMEAS, E. SELEGNY et D. THOMAS : Biochem. Biophys. Acta, 185, 260, 1969.
- (5) G. BROUN, E. SELEGNY, C. TRAN-MINH et D. THOMAS : F.E.B.S. Letters, 7 (3) 223, 1970.
- (6) R.E. ALTOMARE, J. KOHLER, P.F. GREENFIELD, J.R. KITTRELL : Biotechnology and Bioengineering, Vol. XVI, pages 1659-1673, 1974 .
- (7) Peroxyde d'hydrogène "haute concentration" Air Liquide.
- (8) P. PASCAL : Nouveau Traité de Chimie Minérale, Tome XIII, 1er fasc, MASSON et Cie, PARIS, 1960.
- (9) J.P. VANTELON, M.L. BERNARD : Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique, Tome 70, n° 7-8, p. 1089, Juillet-Août 1973.
- (10) P. BOULANGER, J. POLONOVSKI, F. TAYEAU, P. MANDEL et G. BISERTE : Biochimie Médicale, 10è Edition, Fascicule II, Enzymes et Métabolismes, Masson et Cie, p. 6, 1973.
- (11) J.B. SUMNER, A.L. DOUNCE : Methods in Enzymology, II, p. 776, 1955.
- (12) T.E. BARMAN : Enzyme Handbook, Vol. 1, 11023, 1969.
- (13) P. NICHOLLS, G.R. SCHONBAUM : The Enzymes, 8, 147, 1963.
- (14) L. PENASSE : Les Enzymes, cinétique et mécanisme d'action, Masson et Cie, 1974.
- (15) H. VON EULER, K. JOSEPHSON, Ann. 455, 1, 1927 .
- (16) J.B. SUMNER, A.L. SOUNCE, O. FRAMPTON, JBC 136, 343, 1940 .
- (17) R.K. BONNISCHSEN, B. CHANCE, H. THEORELL, Acta. Chem. Scand. 1, 685, 1947 .
- (18) P. GEORGE, Nature 160, 41 (1947) - P. GEORGE, BJ 44, 197, 1949 .
- (19) B. CHANCE : "The Enzymes" 1st ed. Vol. II, Part 1, p. 428, 1951 .
- (20) L. MICHAELIS, M.L. MENTEN : Biochem. Z. 49, 333, 1913 .
- (21) G.E. BRIGGS, J.B.S. HALDANE : Biochem. *J*. 19, 338, 1925 .
- (22) K.J. LAIDLER, P.S. BUNTING : The Chemical Kinetics of Enzyme Action, 2nd Edition, Clarendon Press, Oxford, 1973.
- (23) J.P. HEBERT, R. SCRIBAN : Les Enzymes immobilisées, rôle possible en brasserie, Ecole Nationale Supérieure des Industries agricoles et alimentaires, extrait de BIOS N° 12, p. 574 à 590, octobre 1973.

- (24) V.M. NELSON, F.G. GRIFFIN : J. Amer. Chem. Soc. 38, 1109, 1916.
- (25) V.F. MICHEEL, J. EWERS : Makromol. Chem. 3, 200, 1949.
- (26) E. KATCHALSKI : Chem. Eng. News, 2, 86-87, 1971.
- (27) G. MANECKE : In Enzyme Engineering, Wiley Interscience, 185-187.
- (28) G.R. STARK : Biochemical Aspects of reactions on solid supports, Academic Press, 1971.
- (29) I.H. SILMAN, E. KATCHALSKI : Ann. Rev. Biochem. 35, 873-908, 1966.
- (30) G. KAY : Process Biochem. 3, 11, 36-39, 1968.
- (31) H. D. ORTH, W. BRUMMER, Augerw. Chem. Inst. Ed. Engl., 11, 249, 1972.
- (32) P. BERNFELD, L. WAN : Science, 142, 678-679, 1963.
P. BERNFELD, R.E. BIEBER, D.M. WATSON : Biochim. Biophys. Acta, 191, 570-574, 1969.
- (33) D. DINELLI : Process. Biochem., 5, 9, 9-13, 1972.
- (34) T.M.S. CHANG, F.C. Mc INTOSH, S.G. MASON : Can. J. Physiol. Pharmacol., 44, 115-128, 1966.
- (35) T.M. CHANG, M.J. POZNANSKI : Nature, 218, 243, 1968.
- (36) M. KITASIMA, S. MIYANO, A. KONDO : Chem. Abstract, 70, 26, 118067a, 1969.
- (37) R.A. MESSING : Enzymol., 39, 12-14, 1970.
- (38) R. AXEN, S. ERNBACK : Eur. J. Biochem., 18, 351-360, 1971.
- (39) A. TRAUB, E. KAUFMANN, Y. TEITZ : Anal. Biochem., 28, 469, 1969.
- (40) J. GRYSZKIEWICZ : Folia Biologica, 19, 119, 1971.
- (41) M.D. LILLY, W.E. HORNBY, E.M. CROOK : Biochem. J. 100, 718-723, 1966.
- (42) C. TRAN-MINH, G. BROUN : Analytical Chemistry , Vol. 47, page 1359, july 1975.
- (43) L.D. BOWERS, P.W. CARR : Analytical Chemistry, Vol. 48, n° 7, 545A, june 1976.
- (44) A.C. OLSON, W.L. STANLEY : J. Agr. Food. Chem. 21, 3, 440-445, 1973.
- (45) A. DAHLQUIST, B. MATTIASON, K. MOSBACH : Biotech. Bioeng., 15, 395-402, 1973.
- (46) W.L. STANLEY, R. PALTER : Biotech. Bioeng. 15, 597-602, 1973.
- (47) L.K. FERRIER, T. RICHARDSON, N.F. OLSON, C.L. HICKS : Jnl of Dairy Science, 55, 6, 726-734.

- (48) S. O'NEILL, P. DUNHILL, M.D. LILLY : Biotech. Bioeng. 13, p. 337, 1971.
- (49) R.J.H. WILSON, M.D. LILLY : Biotech. Bioeng. 11, 349-362, 1969.
- (50) D.R. MARSH, Y.Y. LEE, G.T. TSAO : Biotechn. Bioeng. 15, 483-492, 1973.
- (51) K.L. SMILEY : Biotechn. Bioeng. 13, 309-317, 1971.
- (52) J. BONDRANT, Cl. CHEFTEL : Biochimie, 55, 413-420, 1973.
- (53) G. DURAND : Communication personnelle Salon Inova, juin 1973.
- (54) P. MONSAN : Thèse Docteur Ingénieur Toulouse, n° 315, 1971.
- (55) R.D. MASON, H.H. WEETAL : Biotech. Bioeng. 15, 637-645, 1972.
- (56) H. MAEDA, H. SUZUKI : Biotechn. Bioeng. 15, 403-412, 1973.
- (57) K. VENKATASUBRAMANIAN, W.R. VIETH : Biotech. Bioeng. 15, 583-588, 1973.
- (58) G. BROUN, C. TRAN-MINH, D. THOMAS, D. DOMURADO, E. SELEGNY : Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs. 17, 341, 1971.
- (59) C. TRAN-MINH : Thèse, Transfert et génération des gaz par les membranes. Application aux oxygénateurs et aux capteurs, 1971.
- (60) G. DURAND, P. MONSAN, S. HERNANDO, C.D.I.U.P.A., Série Synthèses Bibliographiques n° 5, p. 165-170, décembre 1974.
- (61) Y. OGURA: ABB, 57, 288, 1955
- (62) M. FLORKIN and E. STOTZ : Comprehensive biochemistry, 12, ENZYMES, General considerations, p. 304, 1964.
- (63) J. YON : Structure et dynamique conformationnelle des protéines. Biologie moléculaire, Collection Méthodes, Chapitres VIII et IX, Hermann, Paris 1969.
- (64) B. MATTIASON, B. DANIELSSON, K. MOSBACH : Analytical Letters, 9 (3), 217-234, 1976.
- (65) J. CRANK : The mathematics of diffusion, 1st edition, Oxford University Press, London, 1956.
- (66) H.S. CARSLAW, J.C. JAEGER : Conduction of heat in solids. Second edition. Oxford University Press, London, 1959.
- (67) C. TRAN-MINH, V. BOUGNOL-BILHOU, F. LANCELOT : Enzymatic reactor using high activity immobilized enzyme during exothermic reaction. 4 th I.S.C.R.E. Heidelberg, April 1976.
- (68) TUWINER : Diffusion and membrane technology, Reinhold Publishing Corporation, London, p. 226, 1962.
- (69) C.D. HODGMAN, R.C. WEAST, S.M. SELBY : Handbook of Chemistry and Physics, 41st edition, Chemical rubber Publishing Co. Cleveland, 1960.
- (70) J.R. WHITAKER : "Principles of Enzymology for the Food Sciences", Marcel Dekker, New-York N-Y, 1972.
- (71) H. LINEWEAVER, D. BURK : *J.* Amer. Chem. Soc. 56, 658, 1934 .



ERRATA

- page 27 - paragraphe 2-2-1-4, 8^e ligne : lire tampon phosphate
12^e ligne : lire également tampon phosphate.
- page 31 - paragraphe 2-2-2-3, 2^e ligne : lire micromoles d'eau oxygénée.
- page 73 - Tableau 5 - Présentation des réacteurs : Réacteur III : lire Figure 28 ;
Réacteur IV : lire Figure 31 ;
Réacteur V : lire Figure 32.
- page 76 - Conclusion, 3^e ligne : lire les plaques d'enzyme.
- page 95 - 12^e ligne : lire p_{O_2}
- page 96 : 5^e ligne : lire également p_{O_2}

