



HAL
open science

Hydrolyse de la cellulose par enzymes immobilisées

Brigitte Roche

► **To cite this version:**

Brigitte Roche. Hydrolyse de la cellulose par enzymes immobilisées. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1984. Français. NNT: . tel-01066130

HAL Id: tel-01066130

<https://theses.hal.science/tel-01066130>

Submitted on 19 Sep 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.

THESE

présentée par

Brigitte ROCHE

Ingénieur C. U. S. T.

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

SPECIALITE GENIE CHIMIQUE

HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR ENZYMES IMMOBILISEES

Soutenue à Saint-Etienne, le 18 Décembre 1984,
devant la Commission d'Examen

MM.

F. PERCHERON

Président

J.P. LARPENT

D. LONCHAMP

C. TRAN MINH

A.J. VROEMEN

}
Examineurs

THESE

présentée par

Brigitte ROCHE

Ingénieur C. U. S. T.

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR
SPECIALITE GENIE CHIMIQUE

HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR ENZYMES IMMOBILISEES

Soutenue à Saint-Etienne, le 18 Décembre 1984,
devant la Commission d'Examen

MM.	F. PERCHERON	Président
	J.P. LARPENT	} Examineurs
	D. LONCHAMP	
	C. TRAN MINH	
	A.J. VROEMEN	

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT ETIENNE

Directeur : M. M. MERMET
Directeur des Etudes et de la formation : M. J. CHEVALIER
Secrétaire Général : Melle M. CLERGUE

PROFESSEURS DE 1ère CATEGORIE

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

PROFESSEURS DE 2ème CATEGORIE

MM. HABIB	Michel	Informatique
PERRIN	Michel	Géologie
VERCHERY	Georges	Matériaux
TOUCHARD	Bernard	Physique Industrielle

DIRECTEUR DE RECHERCHE

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

MAITRES DE RECHERCHE

MM. BISCONDI	Michel	Métallurgie
DAVOINE	Philippe	Géologie
Mlle FOURDEUX	Angeline	Métallurgie
MM. GUILHOT	Bernard	Chimie
KOBYLANSKI	André	Métallurgie
LALAUZE	René	Chimie
LANCELOT	Francis	Chimie
LE COZE	Jean	Métallurgie
PLA	Jean Marie	Mathématiques
THEVENOT	François	Chimie
TRAN MINH	Canh	Chimie

PERSONNALITES HABILITEES A DIRIGER LES TRAVAUX DE RECHERCHE

MM. CURNIL	Michel	Chimie
DRIVER	Julian	Métallurgie
MAGNIN	Thierry	Métallurgie
THOMAS	Gérard	Chimie

PROFESSEUR A L'U.E.R. DE SCIENCES DE SAINT ETIENNE

M. VERGNAUD	Jean Marie	Chimie des Matériaux
-------------	------------	----------------------

Ce travail a été effectué au Laboratoire "Biotechnologies-Enzymes" de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, sous la direction de Monsieur C. TRAN-MINH, que je tiens à remercier ici.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur F. PERCHERON, Doyen de l'Université René Descartes PARIS V, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Que Monsieur J.P. LARPENT, Professeur à l'Université de Clermont-Ferrand II, trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance pour l'attention qu'il a bien voulu porter à cette étude en acceptant de juger ce travail et pour les précieux conseils qu'il m'a donnés pour mener à bien mes travaux de recherche et d'enseignement.

Je suis très honorée par l'intérêt que le Docteur A.J. VROEMEN, Program Manager de la Société GIST BROCADES, a bien voulu porter à cette étude en acceptant de faire partie de mon jury.

Je tiens également à remercier Monsieur D. LONCHAMP, Ingénieur de l'Institut Français du Pétrole pour avoir accepté de juger ce travail.

Que Messieurs R. GUYONNET et D. VALLIN trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour leurs précieux conseils et le témoignage de ma profonde amitié.

Enfin, je ne saurais oublier tous mes amis de l'équipe et de l'Ecole, qui chacun à leur façon, m'ont facilité la tâche durant ces années de recherche.

Ce travail a pu être réalisé avec le concours de la DGRST.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1 - COMPOSITION ET CONSTITUANTS DU BOIS

1.1. La Cellulose

1.1.1. Structure

1.1.2. Solubilisation

1.2. Les Hémicelluloses

1.3. La Lignine

2 - PRETRAITEMENTS DES MATERIAUX LIGNOCELLULOSIQUES

3 - RAPPELS CINETIQUES DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE EN SOLUTION

4 - FACTEURS INFLUENCANT LA VITESSE D'UNE REACTION ENZYMATIQUE

4.1. Influence de la concentration de substrat

4.2. Influence de la quantité d'enzyme

4.3. Effet du pH

4.4. Effet de la température

5 - CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'INHIBITEURS

6 - LES ENZYMES IMMOBILISEES

7 - LA CELLULASE

7.1. Origine et composition

7.2. Mode d'action

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1 - IMMOBILISATION DE LA CELLULASE

2 - DETERMINATION DE LA CRISTALLINITE DU SUBSTRAT

3 - DOSAGE DU PHOSPHORE

4 - DOSAGE DU GLUCOSE

4.1. Détermination par voie enzymatique

4.2. Détermination par HPLC

5 - DOSAGE DU CELLOBIOSE

6 - DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS

7 - SCHEMA DE PRINCIPE

CHAPITRE 3 : RESULTATS

1 - SOLUBILISATION DE LA CELLULOSE PAR PHOSPHORYLATION

1.1. Phosphorylation par des sels d'orthophosphate
inorganiques

1.2. Traitement par l'acide orthophosphorique

2 - INFLUENCE DU PRETRAITEMENT SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

3 - VERIFICATION DU COMPORTEMENT MICHAELIEN DE LA CELLULASE
VIS-A-VIS DE LA CELLULOSE PHOSPHATEE

4 - COMPORTEMENT DE LA CELLULASE IMMOBILISEE

4.1. Influence de la concentration en glutaraldéhyde

4.2. Rendement de fixation

4.3. Evolution de l'activité en fonction du temps

4.4. Influence de la température

4.5. Influence du pH

4.6. Influence de la concentration en substrat

4.7. Influence de la quantité d'enzyme

4.8. Influence de l'épaisseur et de la surface de la membrane

4.8.1. Epaisseur

4.8.2. Surface

5 - HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR UNE MEMBRANE D'EXOCELLULASES IMMOBILISEES

6 - HYDROLYSE DE LA CELLULASE PAR UN SYSTEME CELLULASE - BGLUCOSIDASE CO-IMMOBILISEES

CONCLUSION

INTRODUCTION

La forêt, mal connue pour certains, est une extraordinaire source de matières premières et d'énergie. Autrefois, le bois était utilisé comme matériau de construction et comme combustible. La valorisation de sa structure fibreuse a permis d'étendre ensuite l'utilisation du bois à la fabrication des papiers et des fibres textiles.

Les progrès réalisés dans la compréhension de la structure microscopique et chimique du bois permettent actuellement une recherche de valorisations "douces", c'est-à-dire intermédiaires entre la conservation de la fibre et sa destruction par combustion. Les travaux s'orientent vers deux directions : les filières thermochimiques (ou voie sèche), et les filières chimiques, biochimiques et microbiologiques (ou voie humide).

Les filières thermochimiques font agir sur le bois des paramètres thermodynamiques (pression, température, temps de passage dans le réacteur...), ceci donnant des produits solides (charbon de bois, bois torréfié...), liquides (pyroligneux, mélange d'hydrocarbures...) et gazeux (mélange d'hydrogène et de monoxyde de carbone aboutissant au méthanol).

Les secondes filières utilisent séparément les constituants organiques du bois. En effet, le bois est un matériau "composite" formé de fibrilles de cellulose, de lignine et d'hémicelluloses. La lignine est essentiellement utilisée comme combustible, et les hémicelluloses peuvent conduire à la fabrication de furfural et à la fabrication d'édulcorants tels que le xylitol et le sorbitol. La cellulose était jusqu'alors utilisée dans l'industrie textile et chimique pour la fabrication de rayonne, acétates et nitrates de cellulose.

L'idée d'hydrolyser la cellulose en son motif monomère, le glucose a germé depuis le début du siècle. Le glucose est en effet un composé organique permettant d'arriver à la formation d'un très grand

nombre de substances par l'intermédiaire de sa fermentation. Celle-ci peut conduire à la synthèse de protéines d'organismes unicellulaires, d'antibiotiques d'enzymes, en passant par les grands intermédiaires de la chimie organique tels que les solvants (éthanol, acétone, butanol) et les acides organiques (acide acétique, lactique, propionique...)

Des procédés d'hydrolyse acide ont été mis au point industriellement et permettent l'obtention du glucose à partir de la cellulose. Cependant, le rendement de l'hydrolyse acide est considérablement affaibli par la formation de produits de dégradation de la cellulose qui s'effectuent dans diverses réactions pendant l'hydrolyse, du fait des conditions trop drastiques de la catalyse acide. Elle aboutit alors à un mélange de sucres et de dérivés de sucres en fin d'hydrolyse.

En 1950, des microbiologistes de l'"U.S. Army Natick" ont isolé un champignon, *Trichoderma viride*, qui était responsable de la dégradation du matériel en bois utilisé par l'armée. Ce champignon synthétise un complexe enzymatique, la cellulase, capable de catalyser de façon spécifique l'hydrolyse de la chaîne cellulosique en un seul produit de réaction, le glucose. Cette spécificité représente donc un grand avantage par rapport à l'hydrolyse acide, évitant les étapes de séparation des différents produits. Dans la pratique, d'importantes difficultés ont ralenti le développement de cette voie et de nombreuses étapes doivent être surmontées afin d'améliorer sa rentabilité. C'est dans cette optique que se situe notre travail :

Nous nous sommes intéressés, à la mise au point d'un réacteur d'hydrolyse enzymatique de la cellulose par enzymes fixées. Nous avons été amenés à étudier l'influence de prétraitements chimiques permettant l'obtention d'un substrat soluble, hydrolysable par les enzymes immobilisées. Une approche cinétique du comportement de la cellulase immobilisée vis à vis de son substrat nous a permis d'apporter certaines améliorations à ce système afin d'en augmenter le rendement.

Nous abordons l'étude par un rappel bibliographique sur le substrat (composition des constituants du bois et leurs prétraitements chimiques), sur le procédé (catalyse enzymatique) et sur l'outil (la cellulase).

Nous décrirons ensuite les techniques utilisées pour immobiliser la cellulase et solubiliser la cellulose et les différentes méthodes de suivi de la réaction d'hydrolyse. Nous aborderons ensuite le comportement de la cellulase en solution vis à vis de son substrat pré-traité, puis son comportement sur support, montrant qu'il est possible d'hydrolyser la cellulase par enzymes fixées. Cette étude devrait permettre de déterminer les conditions optimales de fonctionnement d'un tel système.

CHAPITRE 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

La cellulose est la plus abondante des ressources naturelles renouvelables disponibles pour l'homme. Mais dans aucune source naturelle, la cellulose ne se présente sous une forme pure. Même les fibres de coton, qui sont la forme la plus pure de la cellulose réellement disponible dans la nature, contiennent environ 6 %, en poids, de polysaccharides noncellulosiques, protéines et éléments minéraux. Dans la nature, la cellulose est toujours associée à d'autres molécules telles que les hémicelluloses, la pectine ou la lignine. Les hémicelluloses sont des hétéropolymères de galactose, mannose, xylose, arabinose et autres sucres et de leurs acides uroniques. Leur hydrolyse fournit une grande variété de sucres. La lignine est un polymère phénolique tridimensionnel qui, dans le bois, est intimement lié à la cellulose. Cet arrangement de la lignine avec la cellulose partiellement cristalline confère au bois son importante résistance biologique et chimique.

Parmi les nombreuses sources de cellulose (bois, coton, canne à sucre, paille, résidus agricoles et urbains), le bois est la source la plus importante, car la plus disponible dans le monde, et dont le renouvellement s'opère avec la meilleure productivité.

1 - COMPOSITION ET CONSTITUANTS DU BOIS

Le bois contient des matières organiques dont la composition élémentaire globale en carbone, oxygène, hydrogène, et azote est à peu près la suivante :

C : 50 %, O : 43 %, H : 6 %, A : 1 %.

Cette composition chimique varie légèrement selon les essences (Figure 1). Il contient également :

- de l'eau, libre à l'intérieur des fibres de cellulose, et dont la proportion peut atteindre jusqu'à 100 % du poids du bois sec.

- des cendres, de composition variable (silice, phosphate de potassium et de calcium) et qui représentent 0,1 à 3 % du poids du bois sec.

Le bois est constitué d'une variété de substances parmi lesquelles les polysaccharides et la lignine sont les constituants majeurs. Les cellules qui constituent le bois possèdent des parois cellulosiques plus ou moins combinées avec la lignine, les pectines et les hémicelluloses. A l'intérieur de ces cellules vivantes se trouvent les matières protéiques et les matières de réserve (amidon, sucres, hémicelluloses) assurant la croissance et la multiplication de ces cellules. L'écorce, constituée de cellules mortes contient quant à elle, des teneurs élevées en tanins et résines.

	SAPIN	PIN SYLVESTRE	PIN MARITIME	PEUPLIER	BOULEAU	HETRE	CHATAIGNIER	CHENE
CELLULOSE	48.2	46.8	47.1	51.1	48.8	44.8	40.0	44.0
HEMI-CELLULOSES								
PENTOSANES	10.2	11.5	12.3	21.4	30.4	37.2	16.0	19.0
MANNANES	9.3	10.5	9.9	0	2.6	1.0	—	—
GALACTANES	1.0	3.3	3.0	0	0	0	—	—
LIGNINE	26.9	24.2	25.6	22.7	18.4	22.5	22.0	20.0
SUBSTANCES PROTEIQUES	0.6	1.0	0.9	0.8	1.1	1.1	—	—
RESINES	—	2.5 — 4.8	2 — 4	1 — 2.7	1.1 — 3.6	0.3 — 0.9	—	0.7
EXTRAIT EAU CHAUDE (tanins gommés...)	3.7	1.7	1.3	2.4	1.5	2.8	15.0	13.5
CENDRES	0.66	0.33	0.30	0.40	0.30	0.83	0.20	0.40

Figure 1 : COMPOSITION CHIMIQUE DE DIFFERENTS BOIS (en % par rapport au bois anhydre)

1.1. LA CELLULOSE

1.1.1. Structure

La teneur du bois en cellulose est en moyenne de 40 à 50 %.

La cellulose (Figure 2) est un homopolymère dont la composition correspond à la formule globale $(C_6H_{10}O_5)_n$. Elle est constituée de macromolécules linéaires formées par l'enchaînement de motifs β -glucose ou plus précisément de motifs β -cellobiose, chaque motif glucose étant tourné de 180° par rapport au motif voisin.

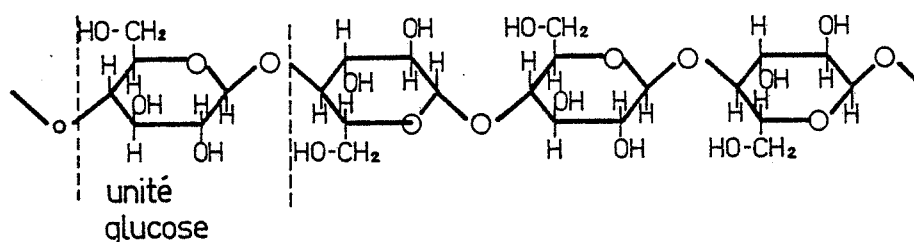


Figure 2 : Chaîne cellulosique

Le degré de polymérisation de la cellulose est de l'ordre de 10.000 dans les fibres naturelles. Après les traitements d'extraction et de blanchiment, ce degré de polymérisation tombe dans une fourchette de 200 à 1000. [1]

Ces chaînes polyglycosidiques forment des micro-fibrilles possédant un haut degré de cristallinité. La cellulose joue donc un rôle de soutien en formant une trame fibrillaire dans la paroi cellulaire végétale. L'arrangement tridimensionnel favorise la formation de liaisons intermoléculaires et de ponts hydrogène et par là, la constitution de fibres à partir de micro-fibrilles rend mieux compte de la grande résistance mécanique et de la résistance aux agents chimiques. [2]

1.1.2. Solubilisation de la cellulose

La cellulose est parmi les constituants du bois celle qui résiste à l'attaque des solutions alcalines à 10 %. Cette propriété est utilisée industriellement pour la fabrication des pâtes cellulosiques et du papier. Elle est également insoluble dans l'eau et les solvants organiques (alcool, benzène, éther éthylique, tétrachlorure de carbone). Cette insolubilité dans les solvants classiques est due à sa structure linéaire et rigide qui favorise l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires.

Pour dissoudre la cellulose, il faut donc un solvant capable de rompre ces liaisons. La cellulose, étant un polyalcool, peut réagir aussi bien avec des acides qu'avec des bases. Elle est soluble dans les acides minéraux concentrés tels que l'acide chlorhydrique à 42 %, l'acide bromhydrique à 66 %, l'acide nitrique à 68 % ou encore l'acide sulfurique à 70 % et l'acide phosphorique à 85 %.[3]. Cette dissolution est en général accompagnée d'une forte dégradation de la molécule de cellulose par hydrolyse. Parmi les acides organiques, seul l'acide trifluoroacétique semble avoir un pouvoir de solvatation suffisant pour dissoudre la cellulose. Quelques solutions aqueuses de sels métalliques comme le chlorure de zinc ou le chlorure de lithium sont également utilisés pour solvater la cellulose. La cellulose de faible degré de polymérisation peut être dissoute complètement dans des solutions aqueuses de bases minérales fortes comme l'hydroxyde de lithium et l'hydroxyde de sodium. [3], [4]. Enfin, certains solvants alcalins complexes présentent de bonnes propriétés de solvatation vis-à-vis de la cellulose. C'est le cas par exemple du "cadoxen" ou chlorure de zinc tri-éthylène diamine et du diméthylsulfoxyde. [5 - 9]

Des réactions de substitution sur les groupes hydroxyle peuvent conduire à des dérivés cellulosiques solubles en milieu aqueux. Cette solubilité étant toutefois dépendante du degré de substitution et pour certains dérivés, de la température. Par exemple, des méthylcelluloses ayant une teneur de 13 à 18 % en groupements méthoxyles, sont solubles dans l'eau à 20°C. [1]

L'estérification de la cellulose par de l'acide phosphorique peut également donner des dérivés cellulosiques solubles dans l'eau. [10] , [11]

Le choix d'une méthode de solubilisation sera surtout fonction de l'utilisation de la cellulose traitée. Pour notre part, ce traitement de la cellulose précède l'étape de l'hydrolyse enzymatique dont les conditions opératoires sont régies par les facteurs influençant la cinétique d'une réaction enzymatique.

1.2. LES HEMICELLULOSES

On regroupe sous ce nom un ensemble de polysaccharides qui sont associés à la cellulose dans la paroi des cellules végétales. Ils sont constitués principalement par un mélange d'hexosanes et de pentosanes. Les hexosanes, de même formule brute que la cellulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ libèrent au cours de leur hydrolyse d'autres sucres en C_6 autres que le glucose, en particulier du mannose. Les pentosanes conduisent, par contre, après hydrolyse à des sucres en C_5 ($C_5H_{10}O_5$) dont le plus abondant est le xylose. Dans le bois de résineux, les hémicelluloses représentent environ 10 % du poids et dans le bois de feuillus, 20 %. Leur teneur dans la paille atteint 30 % et davantage dans le son et le maïs. Les hémicelluloses sont en partie extractibles par l'eau. Elles sont solubilisées par des solutions alcalines.

1.3. LA LIGNINE

La fraction non glucidique la plus importante dans le bois est représentée par la lignine. Elle représente 18 à 30 % de la masse totale du bois, avec une teneur plus élevée dans les conifères (24 à 28 %) que dans les feuillus (18 à 23 %). Il s'agit d'un polymère tridimensionnel édifié à partir de noyaux phénylpropane diversement substitués, liés entre eux par des liaisons alkyl-alkyle, étherarylalkyle et diphenyle (Figure 3) . La lignine est très difficilement biodégra-

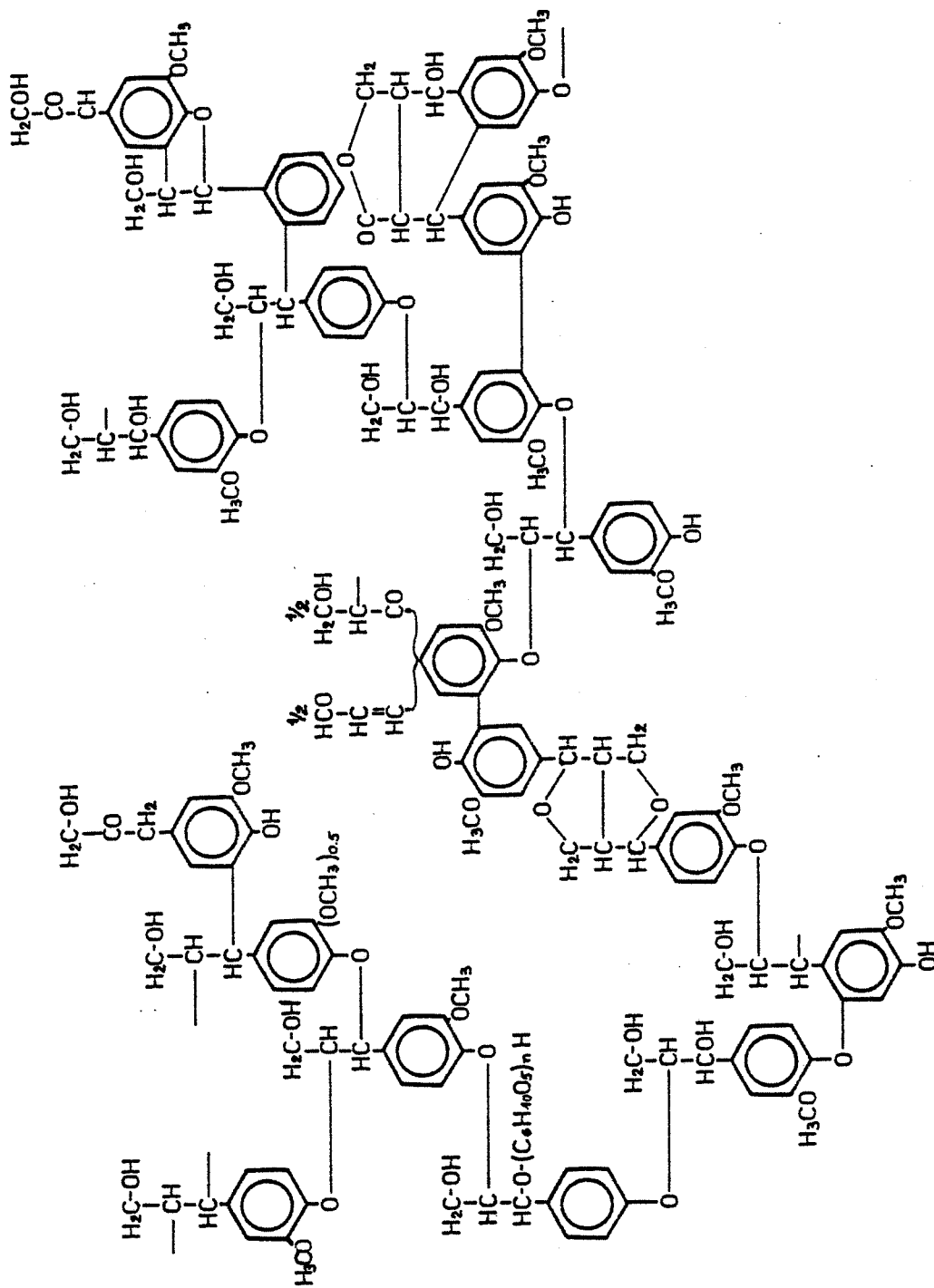


Figure 3 : Schéma constitutionnel de la lignine.

dable, c'est la raison pour laquelle on la retrouve en quantité importante dans la tourbe qui est le produit de dégradation des végétaux en milieu aqueux. Cette résistance à la dégradation enzymatique n'est pas encore complètement élucidée. L'existence de liaisons hydrogène dues au grand nombre de fonctions alcool, phénol et éther, ne permet pas d'expliquer à elle seule cette résistance. D'autres hypothèses sont avancées, telles que l'existence de complexes lignine-sucres liés par liaisons covalentes, et un facteur conformationnel, le réseau tridimensionnel de la lignine empêchant d'un point de vue stérique la pénétration de l'eau et des molécules protéiques.

2 - PRETRAITEMENTS DES MATERIAUX LIGNOCELLULOSIQUES

Pour dégrader la cellulose du bois, le matériau doit être partiellement délignifié de façon à accroître l'accessibilité de la cellulose. Plusieurs types de prétraitements physiques, chimiques et biologiques ont été étudiés [12], [13], [14]. Les plus efficaces sont les traitements physiques. Le broyage permet d'obtenir de très fines particules et a également pour conséquence de diminuer le taux de cristallinité de la cellulose. Il est actuellement très employé bien que ce soit un procédé très énergivore et coûteux. Les traitements qui divisent les parois cellulaires parallèlement à l'orientation des microfibrilles, requièrent moins d'énergie que ceux produisant des fractures perpendiculaires à l'axe des microfibrilles. Une très rapide dépressurisation, par exemple, engendre une explosion du bois avec rupture le long des fibres. L'irradiation du bois par un rayonnement gamma ou par un flux d'électrons à haute énergie est également utilisée pour délignifier le bois et réduire la cristallinité de la cellulose. Cependant, l'efficacité optimale n'est atteinte qu'avec un rayonnement de 10^8 rads. [15]

Les traitements chimiques utilisant des acides forts concentrés (acides sulfuriques, phosphoriques) ou des bases fortes (soude, ammoniac) ou même certains sels comme le chlorure de zinc permettant d'-

obtenir une cellulose gonflée qui permet une meilleure pénétration de l'eau à l'intérieur des mailles de la cellulose. L'index de cristallinité, par contre, est peu modifié par ces traitements. [15]

3 - RAPPELS CINÉTIQUES DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE EN SOLUTION

Les principes généraux de la cinétique chimique (ordre de réaction, énergie libre d'activation, effet des catalyseurs), s'appliquent également aux réactions catalysées par les enzymes. Cette cinétique est régie par le phénomène de saturation par le substrat. A une faible concentration de substrat, la vitesse de réaction est proportionnelle à cette concentration. La réaction est alors du premier ordre. Aux fortes concentrations de substrat, la vitesse devient constante, indépendante de cette concentration. La réaction est alors d'ordre zéro.

La Figure 4 retrace cet effet de la concentration initiale en substrat sur la vitesse d'une réaction enzymatique :

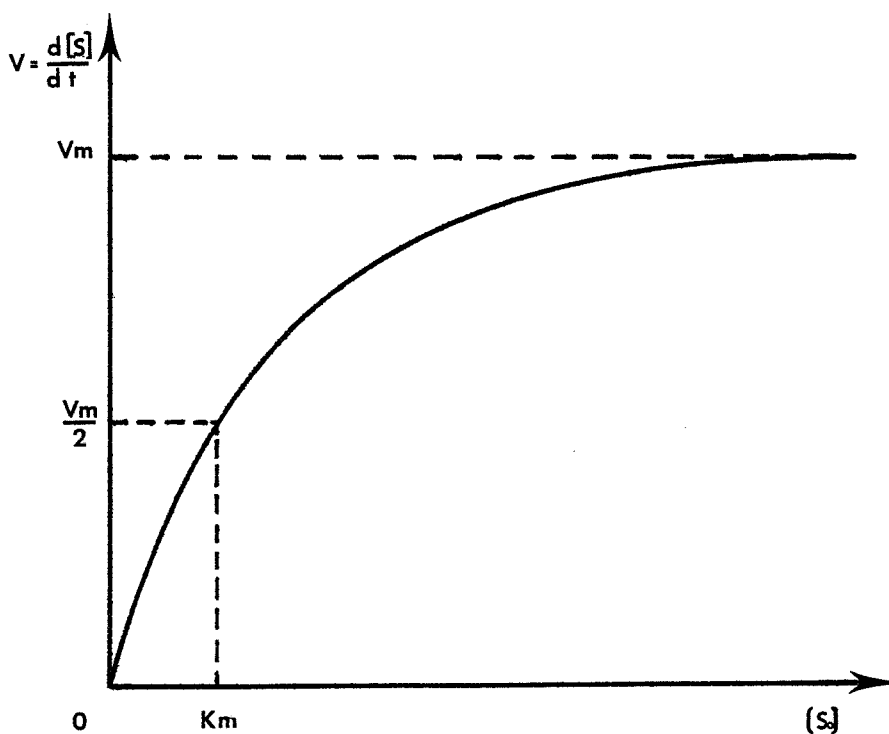
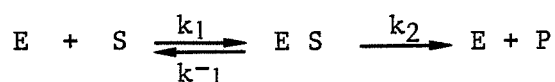


Figure 4 : Influence de la concentration initiale en substrat sur la vitesse enzymatique.

Toutes les enzymes présentent cet effet de saturation, la concentration saturante du substrat étant très variable d'une enzyme à l'autre. Cet effet de saturation par le substrat a conduit V. HENRI [16] à supposer que la formation réversible d'un complexe enzyme-substrat constituait une étape essentielle de la réaction. En 1913, L. MICHAELIS et M.L. MENTEN [17] ont établi une théorie générale du mécanisme d'action des enzymes et de la cinétique enzymatique. Cette théorie admet que l'enzyme E se combine dans une première étape avec le substrat S pour former un complexe enzyme-substrat ES qui se décompose dans une deuxième étape pour libérer le produit P en régénérant l'enzyme. Dans le cas général où l'enzyme transforme irréversiblement son substrat en produit, on peut écrire la réaction enzymatique suivante :



La vitesse initiale, égale à la vitesse de disparition du complexe ES peut être définie par l'équation du premier ordre :

$$V_0 = k_2 [ES]$$

Lorsque la concentration du substrat est suffisamment élevée pour que tout l'enzyme présent soit saturé, sous forme de complexe ES, la vitesse maximum est atteinte :

$$V_m = k_2 [E_0]$$

$$\text{A l'état stationnaire, } \frac{d[E]}{dt} = 0 \text{ et } \frac{d[ES]}{dt} = 0,$$

la concentration du complexe [ES] étant alors :

$$[ES] = \frac{E_0 [S]}{K_m + S}, \text{ avec } K_m = \frac{k^{-1} + k_2}{k_1}$$

(K_m constante de Michaelis-Menten)

et la vitesse initiale :

$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m [S]}{K_m + S} \quad (\text{Equation de Michaelis et Menten})$$

ou

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

4 - FACTEURS INFLUENCANT LA VITESSE D'UNE REACTION ENZYMATIQUE

Les principaux facteurs susceptibles de modifier la cinétique d'une réaction enzymatique sont :

- la concentration de substrat
- la quantité d'enzyme
- le pH
- la température
- la présence d'effecteurs enzymatiques.

4.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE SUBSTRAT

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

- si $[S] \ll K_m$, la vitesse de réaction devient :

$$V = \frac{V_m}{K_m} \cdot [S] \quad , \quad \text{réaction du premier ordre par rapport au substrat } .S.$$

- si $[S] \gg K_m$, $V \simeq V_m$, la vitesse est indépendante de la concentration en substrat. La réaction est d'ordre zéro.

- Pour des concentrations intermédiaires, l'ordre de réaction est mixte. La vitesse est alors donnée par l'équation de Michaelis et Menten.

4.2. INFLUENCE DE LA QUANTITE D'ENZYME

Lorsqu'une réaction enzymatique se fait en présence d'un excès de substrat, la vitesse de réaction est alors proportionnelle à la quantité d'enzyme dans le milieu.

$$V_m = k_2 [E_0]$$

4.3. EFFET DU pH

Les réactions enzymatiques sont très sensibles au pH du milieu réactionnel. Cela tient au fait que la structure de la protéine enzymatique est irréversiblement modifiée par les pH extrêmes. En outre le pH modifie l'état d'ionisation du substrat dans un grand nombre de cas. Il modifie également la dissociation des acides aminés de la protéine, et donc en particulier, ceux du site actif qui participent à la formation du complexe [E.S]. Le pH optimal permet d'atteindre une vitesse maximale de la réaction enzymatique correspondant à une affinité maximale de l'enzyme pour son substrat.

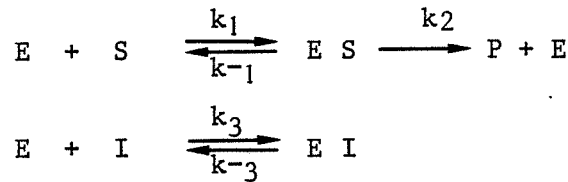
4.4. EFFET DE LA TEMPERATURE

L'élévation de la température provoque en général une augmentation rapide de la vitesse de réaction. Mais les enzymes étant des protéines sont dénaturées par des températures trop élevées. La température optimale doit donc être un compromis entre ces deux facteurs.

5 - CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'INHIBITEURS

Certains composés chimiques ont la propriété de modifier la vitesse de réaction enzymatique. Ce peut être des activateurs ou des inhibiteurs de cette réaction, les derniers étant les plus nombreux. Selon leur mécanisme d'action on distingue plusieurs types d'inhibiteurs enzymatiques .

- Les inhibiteurs compétitifs dont la structure est analogue à celle du substrat. Ils forment un complexe avec l'enzyme et prennent la place du substrat. Il se produit alors deux réactions simultanées :



ce qui donne une équation générale de la vitesse :

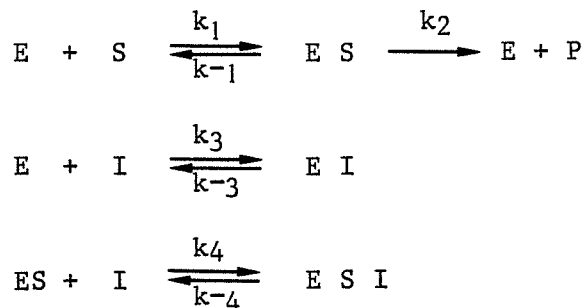
$$v = \frac{d(P)}{dt} = \frac{V_m [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad \text{avec } K_I = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

et $K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

l'affinité du substrat pour l'enzyme semble donc diminuée.

- Les inhibiteurs non compétitifs se fixent réversiblement sur le complexe enzyme-substrat et sur l'enzyme libre, non pas sur le site actif, mais sur un site "inhibiteur", ce qui provoque une modification de la conformation de la protéine de sorte qu'une partie de l'enzyme se trouve inactivée. La vitesse de réaction et la vitesse maximale sont diminuées, alors que l'affinité de l'enzyme représentée par K_m reste inchangée.

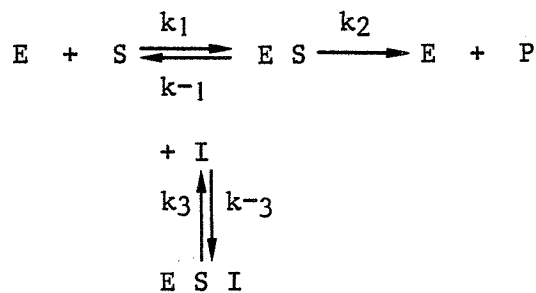
Le schéma de la réaction s'écrit alors :



et la vitesse de réaction enzymatique devient :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m [S]}{(K_m + S) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{avec } v'_m = \frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

- Les inhibiteurs incompétitifs se fixent sur le complexe enzyme-substrat en bloquant l'évolution vers l'élaboration du produit. Le schéma de la réaction est alors le suivant :



La vitesse de la réaction et l'affinité de l'enzyme pour son substrat s'en trouvent alors modifiées. L'équation se trouve alors sous la forme :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{\frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \cdot [S]}{\frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}} + [S]}$$

Les composés directement impliqués dans la réaction sous forme de produit ou de substrat peuvent être, pour certains des inhibiteurs de la réaction. C'est le cas du cellobiose, par exemple vis-à-vis d'un composant de la cellulase comme nous le verrons par la suite.

6 - LES ENZYMES IMMOBILISEES

La grande spécificité d'action des enzymes et les conditions de pH de température auxquelles elles travaillent accroissent l'intérêt porté à la catalyse enzymatique au détriment de la catalyse chimique. Mais le coût élevé des procédés d'extraction et de purification des enzymes, ainsi que leur instabilité en solution et les coûts engendrés par leur séparation du milieu réactionnel, sont un obstacle à la généralisation de leur utilisation.

L'observation de la cellule vivante montre que seules les enzymes exocellulaires agissent à l'état libre. Par contre les enzymes intracellulaires sont fixées sur la membrane de la cellule ou sur les membranes des organelles. L'emploi d'enzymes fixées permet donc de mieux se rapprocher des conditions naturelles d'utilisation des enzymes et de mieux comprendre leur fonctionnement.

Cette idée de fixer les enzymes pour les rendre insolubles est ancienne. V. HENRI [16] , en 1916, NELSON et GRIFFIN [18] adsorbèrent l'invertase sur du charbon actif. En 1947, MICHEEL et EWERS [19] utilisent la cellulose comme support en créant une liaison ionique entre la cellulose et l'enzyme. EN 1960, les équipes de KATCHALSKI [20] et MANECKE [21] développent de nouvelles études sur la fixation des enzymes. De nouvelles recherches se sont multipliées et des méthodes variées d'immobilisation ont été mises au point et décrites depuis lors. STARK [22] SILMAN [23] KAY [24] ORTH [25] SELEGNY, BROUN et Coll.[26] [27] [28].

En milieu industriel, l'utilisation des enzymes en solution nécessite l'emploi d'un système discontinu avec renouvellement de l'enzyme en début de chaque cycle de production. L'immobilisation sur support insoluble permet l'emploi de réacteurs en continu, fonctionnant sur une longue période sans renouvellement de l'enzyme. De plus l'immobilisation s'accompagne généralement d'une stabilité accrue du catalyseur biologique. Elle engendre donc un gain de temps et de productivité. Le fonctionnement d'un réacteur en continu offre également l'avantage d'un suivi et d'un contrôle de la production en temps réel et facilite l'automatisation du système.

Les enzymes fixées présentent un grand intérêt pour les applications analytiques, C. TRAN MINH, G. BROUN [29], L.D. BOWERS, P.W. CARR [30]. Mais sans nul doute, l'industrie alimentaire, et en particulier l'industrie laitière, est le principal employeur des enzymes immobilisées, MONSAN [31], HIROHARA et Coll. [32], DOHAN et Coll. [33].

Quelques exemples d'applications actuelles et potentielles sont résumés dans les Tableaux (I.1) et (I.2.) extraits du compte-rendu des premières rencontres Internationales des Bioindustries. NANCY 28-29 Septembre 1982. [34]

7 - LA CELLULASE

7.1. ORIGINE ET COMPOSITION

La cellulase est un complexe enzymatique qui catalyse l'hydrolyse de la cellulose native. Ce catalyseur est une enzyme exocellulaire produite par plusieurs espèces de champignons. En effet, la cellulase active a été extraite de cultures de *Trichoderma viride* (ou *Trichoderma reesei*) [35], [36], [37], qui sont actuellement les souches fongiques les plus utilisées pour l'obtention de cellulase commerciale. Mais l'enzyme est également produite par *Trichoderma koningii* [38] *Fusarium solari* [39] *Penicilium funiculosum* [40] *Sporotrichum pulvelulentum* [41] et *Polyporus helipiferoe* [42]. Les cellulases de ces diverses souches se distinguent essentiellement par leur aptitude à dégrader plus ou moins complètement la chaîne cellulosique. Cette différence d'activité est due à la variation de la nature et de la composition du complexe enzymatique comme le montrent les opérations de fractionnement de différents complexes cellulases réalisées par les équipes de WOOD et Mc CRAE [43], [44], ERIKSSON [45] BERGHEM et PETTERSSON [46], [47] SHOEMAKER, GUM et BROUN [48], [49], GONG, LADISCH, TSAO [50], KANDA et Coll. [51], HALLIWELL et GRIFFEN [52], PERCHERON [53].

TABLEAU 1.1 : PRINCIPALES UTILISATIONS INDUSTRIELLES
DES ENZYMES IMMOBILISEES

PRODUITS	ENZYME / ORIGINE	METHODES D'IMMOBILISATIONS / SUPPORT	SOCIETES
Sirops à haute teneur en fructose	Glucose Isomérase B.coagulants	Réticulation au glutaraldéhyde des cellules lysées	NOVO
	Actinoplanes-Missouriensis	Inclusion dans la gélatine et réticulation au glutaraldéhyde	GHIST BROCADES
	Streptomyces spe	Adsorption sur DEAE cellulose ou sur Amberlite	CLINTON
	Streptomyces spe	Adsorption sur Alumine	C.P.C. CORNING
Lait dé lactosé	β .Galactosidase S. lactis	Inclusion dans du triacétate de cellulose	SNAM PROGETTI
Lactolysés	β .Galactosidase A.niger A.orizae	Liaison covalente sur silice alkylaminée	CORNING
Sucre Inverti	Invertase S.cerevisiae	Liaison covalente sur rafle de maïs	BEGHIN SAY
Saccharose	Galactosidase Mortierella vinaca	Mycelium aggloméré	HOKKAIDO SUGAR
6APA	Penicilline Amidase E.coli	Diverses : .Liaison covalente/DEAE cellulose .Adsorption/Bentonite	Divers groupes pharmaceutiques
L-méthionine L-phényl.alamine	Amino acylase A.orizae	Adsorption/DEAE Sephadex	TANABE SEIYAKU
Ac. L-aspartique	Aspartase E.coli	Inclusion.gel de carraghenate	TANABE SEIYAKU
Ac.L-malique	Fumarase Brevibacterium ammoniagenes	Inclusion/gel de carraghenate	TANABE SEIYAKU

TABLEAU I.2 : ENZYMES IMMOBILISEES : APPLICATIONS POTENTIELLES
EN INDUSTRIE LAITIERE

ENZYME ORIGINE	METHODE D'IMMOBILISATION / SUPPORT	APPLICATION	REFERENCES
Pepsine porc	Liaison covalente / CPG (Glutaraldéhyde - Verre alkylaminé)	Coagulation du lait	M.J. TAYLOR N. FOLSON al. 1979
Pepsine	Liaison covalente / TiO ₂	" "	
Pepsine	Adsorption / Alumine	" "	
Protéase Alcaline (B.Subtilis)	Réticulation (glutaraldéhyde) résine anionique Dowex MWA.1	" "	K. OHMIYA & al 1979
Présure	" "	" "	"
Chymosine	Agarose	Etudes fondamentales	GREEN and CRUTCHFIELD 1969
Pepsine	Liaison covalente / Dextran	Etudes fondamentales	"
Trypsine	Liaison covalente / CPG	Stabilisation du lait à l'oxydation	SHIPE & al 1972
Pepsine	Liaison covalente / CPG (BSA/ZrO ₂ - CPG)	Coagulation du lait	M. CHERYAN 1976
Sulphydryl- oxidase (lactosérum)	Liaison covalente / SiO ₂	Traitement des laits UHT	H.E.SWAISGOOD 1980
Catalase	Inclusion / triacétate de cellulose	Elimination du peroxyde d'hydrogène	F. BARTOLI & al 1978

CPG : Verre à porosité contrôlée

Le système cellulasique est composé de 3 types principaux d'enzymes :

- les endoglucanases [1,4 β -D glucanglucanohydrolase (EC 3.2.1.3.)]
- les exoglucanases [1,4 β -D glucancellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) et l'exo 1-4 β D.glucosidase (EC 3.2.1.74)]
- la β -glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21)

7.2. MODE D'ACTION

Le mode d'action des cellulases sur la cellulose pure fait l'objet de nombreuses hypothèses. Le premier postulat concernant la nature du mécanisme de l'hydrolyse enzymatique a été avancé par REESE en 1950 [54]. Il envisagea un système de dégradation en deux étapes : un facteur C₁ modifiait la cellulose et initiait l'hydrolyse par cette désagrégation des chaînes de cellulose, ce qui produisait, pensait-il des cello-oligosaccharides solubles, puis un second composant C_x était responsable de la dépolymérisation de ces cello-oligosaccharides formés en coupant au hasard leurs chaînes, d'où le nom de C_x. Plus tard, en 1975, il caractérise un autre composant de la cellulase, la cellobiohydrolase. Cette enzyme enlève successivement des unités cellobiose à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne de cellulose [54], (Figure 5)

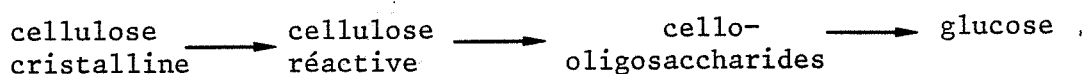


Figure 5 : Hypothèse d'origine

Des travaux plus récents ont montré que le composant C_x serait en fait une endoglucanase, c'est-à-dire une enzyme catalysant l'hydrolyse des liaisons glucosiques à l'intérieur de la chaîne de cellulose sur les parties amorphes. Son action entraîne donc la formation de molécules de cello-oligosaccharides. (Figure 6).

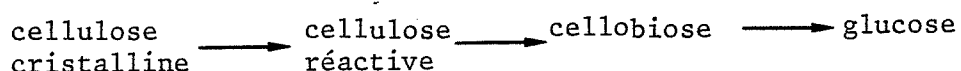


Figure 6 : Hypothèse d'une action séquentielle

Le composant C_1 serait en fait une exoglucanase (β -1-4 glucancellobiohydrolase) qui hydrolyse l'extrémité des chaînes de cello-oligosaccharides formées par l'action des endoglucanases Cx. [38], [44] [56],[57].

Ce système d'action bi-phasique, proposant que dans un premier temps, les régions amorphes de la cellulose soient dégradées avant que ne commence l'hydrolyse des régions cristallines, est progressivement abandonné au profit d'un système de dégradation monophasique faisant état d'une cinétique de premier ordre, par rapport au substrat [58 - 61].

Des travaux plus récents de WOOD [62] et KLESOV [63], en 1980, ont montré que l'hydrolyse de la cellulose était catalysée par le complexe cellulasique constitué, en fait, de 3 types d'enzymes agissant à la fois successivement et parallèlement sur la cellulose.

Les travaux de PETERSSON [64], NISIZAWA [65] et STREAMER [66], ont permis d'observer que l'action des exoglucanases produisaient plus de produits de dégradation lorsque la cellulose avait été au préalable prétraitée par des endoglucanases. Toutes ces observations appuient la théorie selon laquelle les endoglucanases (Cx selon REESE) agissent au hasard sur la chaîne de cellulase permettant une action ultérieure des exoglucanases (C_1) plus importante sur l'extrémité des nouvelles chaînes formées.

Bien que le mécanisme exact des cellulases fongiques soit encore discuté, il semble acquis qu'il existe un phénomène de synergie entre les exocellulases (C_1) et les endocellulases (Cx) au cours de l'attaque des régions cristallines de la cellulase. EMERT [61], BISARIA [67], NISIZAWA [68], GONG [50], WOOD [44], et OKAZAKI [69] ont en effet montré que l'activité du complexe exoglucanase-endoglucanase sur la cellulose cristalline était supérieure à la somme des activités des deux composantes prises isolément.

Actuellement, l'ensemble des études s'accorde sur le mécanisme suivant : (voir Figure 7).

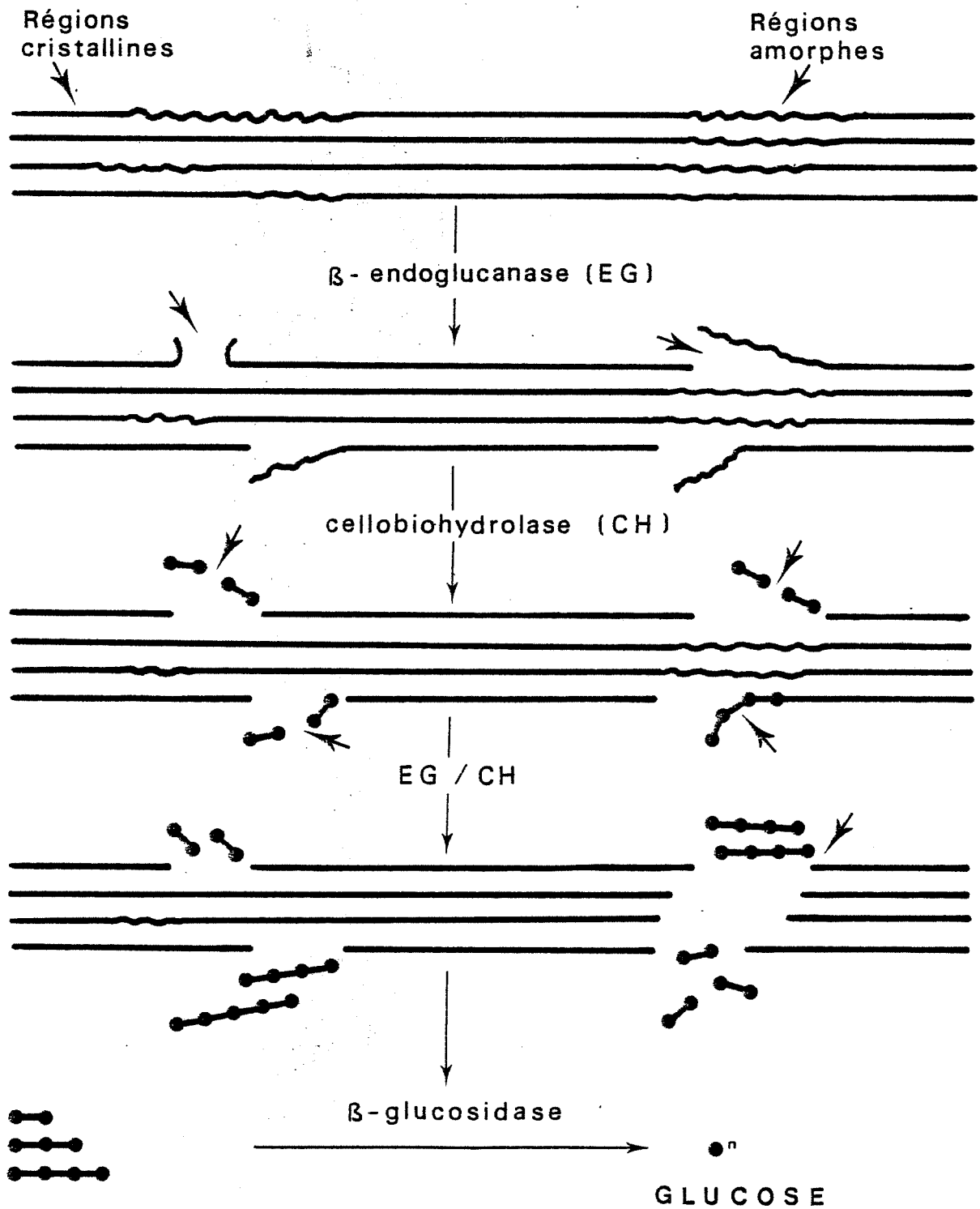


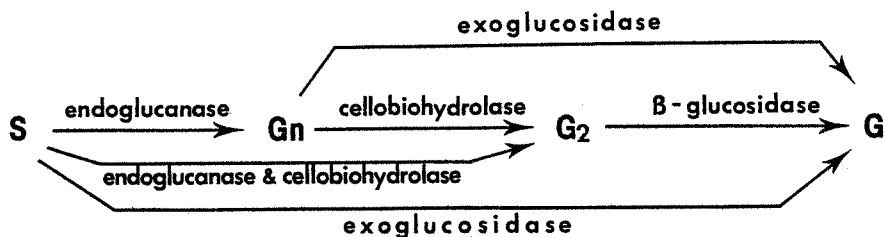
Figure 7 : SYSTEME CELLULASE / CELLULOSE
(schéma de principe)

Les endoglucanases coupent "au hasard" la chaîne de cellulose en produisant des oligosaccharides, du glucose, et du cellobiose.

Les exoglucanases attaquent successivement l'extrémité non réductrice des chaînes de cellulose et produisent du cellobiose et du glucose.

La β -glucosidase, enfin hydrolyse le cellobiose en glucose.

Ces trois types d'enzymes agissent à la fois successivement et parallèlement sur la cellulose, ce qui a amené KLESOV [62], [70] à proposer le schéma suivant :



S représente la cellulose native, Gn les oligosaccharides produits par l'activité hydrolytique des endoglucanases, G₂ est la cellobiose et G le glucose.

Les produits solubles, cellobiose et glucose sont des inhibiteurs du complexe cellulastique [71], [72], et des composants individuels de la cellulase [46], [52], [73 - 77]. De plus, la β -glucosidase peut être aussi inhibée par son substrat, le cellobiose [78],[79]. Ainsi, la cinétique du complexe cellulastique est-elle complexe puisque l'activité et l'inhibition des diverses composantes de la cellulase envers de multiples substrats doivent être envisagées.

Bien que la littérature concernant le mécanisme d'action de la cellulase soit abondante, elle n'aboutit pas pour autant à un schéma de réaction accepté par l'ensemble des chercheurs. Cet état de fait semble dû à 3 facteurs principaux :

- La littérature ne comprend qu'un faible nombre de publications portant sur l'étude de la cinétique d'hydrolyse de la cellulose, et dans la plupart des cas, la cellulase est abordée, pour plus de simplicité, comme une enzyme simple. [71], [80 - 82]

- Les études sont réalisées sur des complexes cellulasesiques provenant d'origines très variées. Or l'utilisation de complexes enzymatiques différents par leur composition qualitative et les taux de chacun de leurs composants entraîne le fait que les étapes déterminant le taux et la cinétique de l'hydrolyse varient dans les différents cas. La variété des celluloses utilisées en tant que substrat, selon leur origine et les traitements qu'elles ont subi, contribue également à l'obtention de cinétiques différentes. Il n'y a donc pas une cellulase et une cellulose.

- Un dernier facteur, semble-t-il, est la non-homogénéité dans la détermination des activités enzymatiques. En effet, les unités internationales côtoient les unités filtre-papier (F.P.A.), les unités Avicelases, CMcellulases, unités employées selon le type de cellulose utilisé comme substrat.

Pour notre part, nous pensons que les unités internationales sont celles qui permettent le mieux d'étudier la cinétique enzymatique. Nous les emploierons tout au cours de cette étude, les vitesses d'hydrolyse étant exprimées en micromoles de produit formé par unité de temps.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

1 - IMMOBILISATION DE LA CELLULASE

L'intérêt suscité par les propriétés des enzymes immobilisées a conduit de nombreuses équipes à mettre au point des méthodes variées d'immobilisation. [83], [84]

- L'adsorption, par l'intermédiaire de liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène ou liaisons hydrophobes, interaction de Van de Waals) sur un support inerte ou échangeur d'ions. [85], [86].

- L'inclusion dans le réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère [87], [88] et l'inclusion dans une fibre ou une microcapsule [89], [90].

- La formation d'une liaison covalente, soit directement entre un groupe chimique de l'enzyme, et un groupe réactionnel d'un support, soit par réticulation avec un agent polyfonctionnel tel que le glutaraldéhyde. [91], [92].

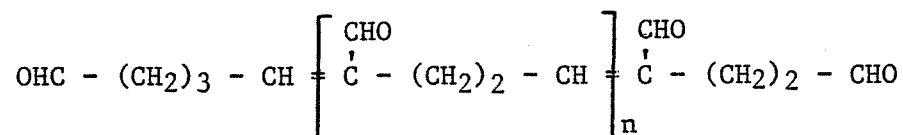
C'est cette dernière technique qui a retenu tout particulièrement notre attention. En effet, bien que l'immobilisation par liaison covalente fasse appel à des techniques généralement plus élaborées que l'adsorption ou l'inclusion, elle présente une solidité de la liaison enzyme-support supérieure à celle obtenue par l'intermédiaire des deux autres méthodes.

Une telle immobilisation avec le glutaraldéhyde comme réactif polyfonctionnel et en utilisant une protéine de charge, l'albumine par exemple, permet d'obtenir des membranes ayant une bonne résistance mécanique et dont l'épaisseur est parfaitement contrôlable. Cette résistance mécanique est un facteur d'autant plus important que la membrane est immergée dans une solution visqueuse de cellulose.

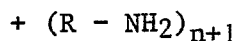
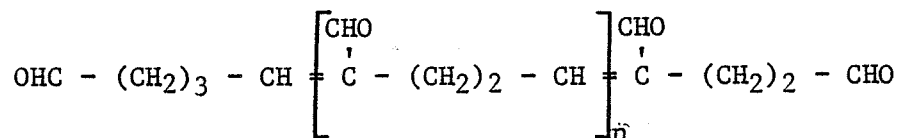
L'immobilisation de la cellulase est réalisée en dissolvant de 30 à 500 mg de cellulase de *Trichoderme viride* "Maxazyme" commercialisée par GIST-BROCADES, dans 2 ml d'une solution d'albumine humaine à 17,5 %, et 1,90 à 1,97 ml de tampon phosphate, pH 7. La co-réticulation de l'enzyme et de l'albumine est assurée en ajoutant une solution tamponnée à pH neutre, de glutaraldéhyde à 17,5 %, (100 µl à 32 µl respectivement) pour obtenir une concentration finale de 2,5 % à 0,8 % de glutaraldéhyde. Ce mélange après homogénéisation, est alors coulé sur une membrane de nylon sur une plaque de verre. Après un temps de réticulation de 20 à 30 minutes, la membrane est rincée à l'eau pour éliminer le glutaraldéhyde qui n'a pas réagi et conservée à 4°C dans un tampon à pH neutre.

Le mécanisme d'immobilisation par covalence a été étudié par KOCH-SCHMIDT en 1967 [93], plus récemment par MONSAN en 1977 [91].

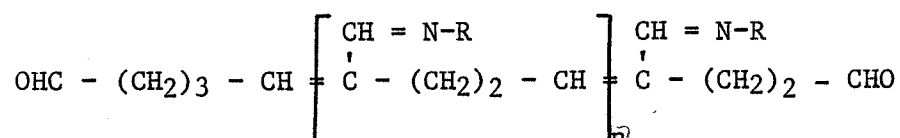
La réticulation de l'enzyme et du glutaraldéhyde provient d'une réaction entre les groupements amine des acides aminés de la protéine et des groupements aldéhyde du glutaraldéhyde. Le glutaraldéhyde dont les solutions commerciales sont à un pH très acide, voisin de pH 3,1, est dilué dans une solution tampon à pH neutre afin de ne pas détruire en partie l'activité enzymatique. Il forme alors un produit de condensation aldolique de forme :



Il réagit avec les fonctions amines primaires de l'enzyme pour former des liaisons imines.



R : protéine et/ou support aminé



La stabilité de ces dérivés est due au fait que les liaisons imines formées sont stabilisées par résonnance avec les liaisons éthyléniques. Ainsi les fonctions réactives du polyglutalaldéhyde permettent d'établir simultanément plusieurs liaisons entre un support aminé tel qu'une protéine, et une enzyme. La délocalisation des électrons π des liaisons imines et éthyléniques explique la résistance de ces liaisons enzyme-support.

Au cours de l'immobilisation, l'enzyme perd une partie de son activité. Ceci est vrai dans la majorité des cas. L'une des explications est qu'en fait, on ne mesure souvent qu'une activité de surface au niveau de la membrane, l'ensemble de toutes les molécules enzymatiques fixées dans la membrane n'étant pas accessibles au substrat.

2 - DETERMINATION DE LA CRISTALLINITE DU SUBSTRAT

L'index de cristallinité est déterminé par une méthode de diffraction X utilisant un diffractomètre Philipps PW 1310 muni d'une source de Cobalt.

Le substrat est séché afin d'éliminer toute humidité et l'échantillon est examiné en faisant varier l'angle de diffraction 2σ de 10° à 68° .

L'index de cristallinité est calculé par la formule proposée par SEGAL [94].

$$\text{CrI} = \frac{I_{22} - I_{am}}{I_{22}} \times 100$$

où I_{22} est l'intensité du pic à $2\sigma = 22^\circ$ et I_{am} est l'intensité à $2\sigma = 18^\circ$ (voir Figure 8).

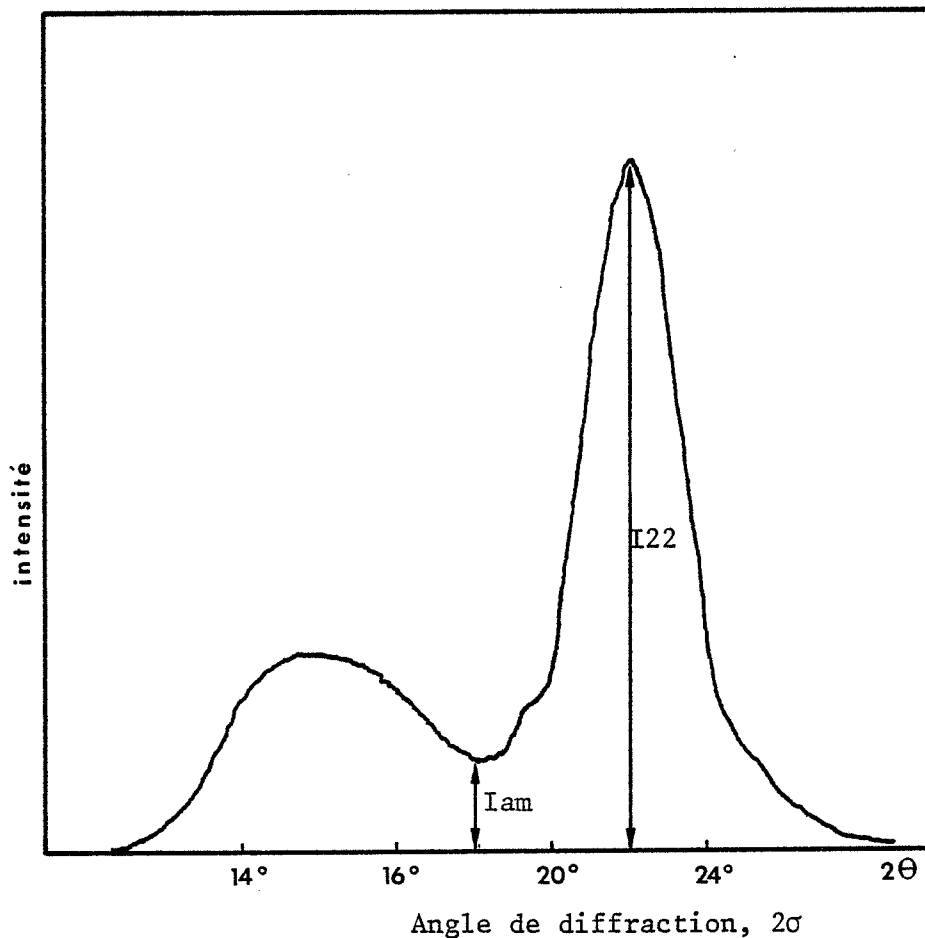


Figure 8 : Détermination de l'indice de cristallinité

Pour notre part, avec la source de Cobalt, nous avons trouvé les pics à $2\sigma = 27^\circ$ pour l'indice de diffraction de la cellulose cristalline et $2\sigma = 23^\circ$ pour la cellulose amorphe, l'indice de cristallinité sera alors :

$$\text{CrI} = \frac{I_{27} - I_{23}}{I_{27}} \times 100$$

3 - DOSAGE DU PHOSPHORE

La détermination du phosphore fixé sur la cellulose est obtenue par dosage pondéral réalisé au laboratoire de microanalyse du CNRS à Solaize. Pour certains échantillons, nous avons également utilisé une méthode spectrophotométrique décrite par KENNEDY et WEETMAN [95], dont le principe est l'obtention de phosphomolybdate dont le noyau chromophore a un spectre d'absorption présentant un maximum à 362 nm.

- Réactifs utilisés :
 - . solution de cellulose-phosphate : 400 μ l
 - . acide nitrique 2.5 M 50 μ l
 - . solution de molybdate d'ammonium : 50 μ l
[(NH₄)₆ Mo₇O₂₄,4H₂O] à 10 %

.- Spectrophotomètre BECKMAN DB-T

La courbe étalon (Figure 9) est établie en prenant des solutions connues de disodium-hydrogénophosphate (Na₂HPO₄,7H₂O). Le taux de phosphore est déterminé par rapport à l'extrait sec des solutions de cellulose-phosphate.

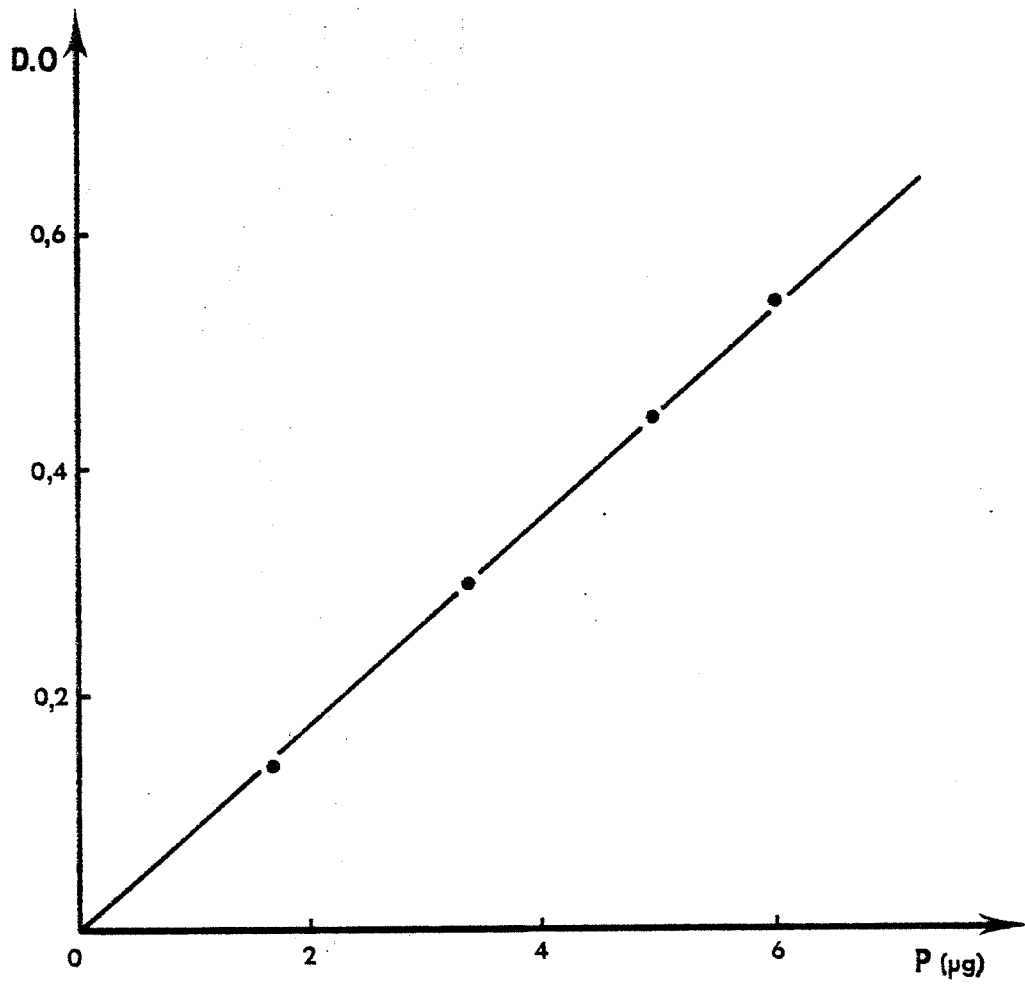


Figure 9 : Dosage du Phosphore - Courbe Etalon

4 - DOSAGE DU GLUCOSE

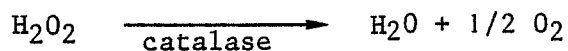
Le glucose est dosé soit par voie enzymatique, la réaction étant suivie par pHstat, soit chromatographie liquide haute pression.

4.1. DETERMINATION PAR VOIE ENZYMATIQUE

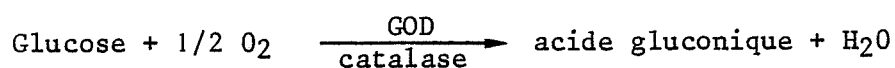
Une oxydo-réductase, la glucose-oxidase (GOD) catalyse la transformation du glucose en présence d'oxygène en acide gluconique, selon la réaction suivante :



L'oxydation d'une mole de glucose consomme une mole d'oxygène et libère une mole d'eau oxygénée. L'eau oxygénée dont l'accumulation pourrait dénaturer la glucose oxydase est hydrolysée par une seconde enzyme la catalase.



La réaction globale peut s'écrire :



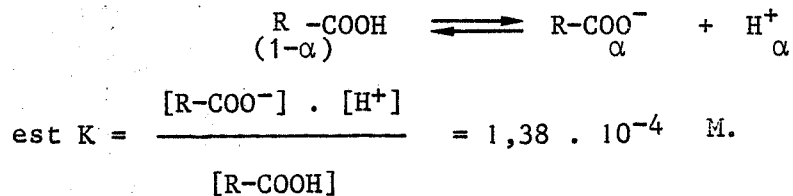
L'acide gluconique libéré dans la solution est alors dosé en maintenant le pH constant par adjonction de soude.

La réaction du dosage de l'acide gluconique par la soude étant stoechiométrique, le nombre de molécules de soude rajoutées correspond donc directement au nombre de molécules d'acide gluconique produites.

Ce suivi est réalisé dans des conditions de pH et de température identiques à celles utilisées au cours de l'hydrolyse de la cellulose. Cependant, à pH 5,1, l'acide gluconique ne se trouve pas

entièrement sous sa forme dissociée.

La constante d'équilibre K de la réaction



ce qui donne un pK de 3,86.

De cette équation, nous pouvons en déduire la proportion d'acide gluconique qui reste sous forme R-COOH à pH 5,1, et donc qui n'est pas dosée par la soude.

$$\text{pK} = \text{pH} - \log \frac{[\text{RCOO}^-]}{[\text{RCOOH}]}$$

$$\text{soit } \log \frac{\alpha}{1-\alpha} = 1,24 \text{ et } \alpha = 0,945$$

Par conséquent nous ne pouvons neutraliser à pH 5,1 que 94,5 % de l'acide gluconique formé.

Une courbe d'étalonnage du dosage du glucose (Figure 10) nous a permis de vérifier la validité de notre dosage. En pratique nous neutralisons 90 % de l'acide gluconique formé.

Une correction est donc à apporter afin de relier directement la quantité de soude ajoutée à la quantité de glucose formé.

Les mesures ont été réalisées soit par prélèvement, soit "en ligne" en dosant directement le glucose produit dans le réacteur d'hydrolyse. La comparaison des résultats obtenus nous a montré que

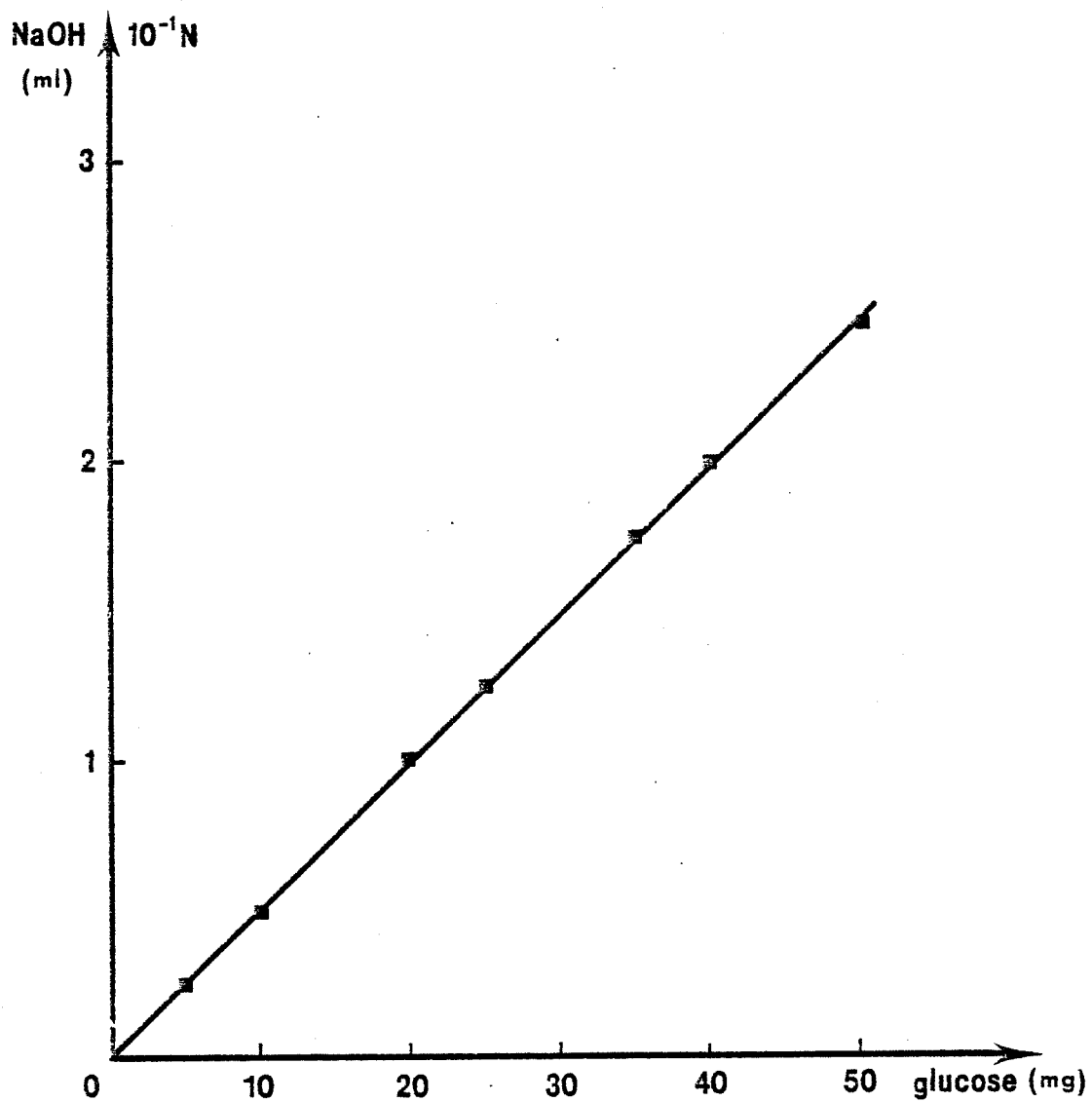


Figure 10 : Dosage du Glucose par pH-stat

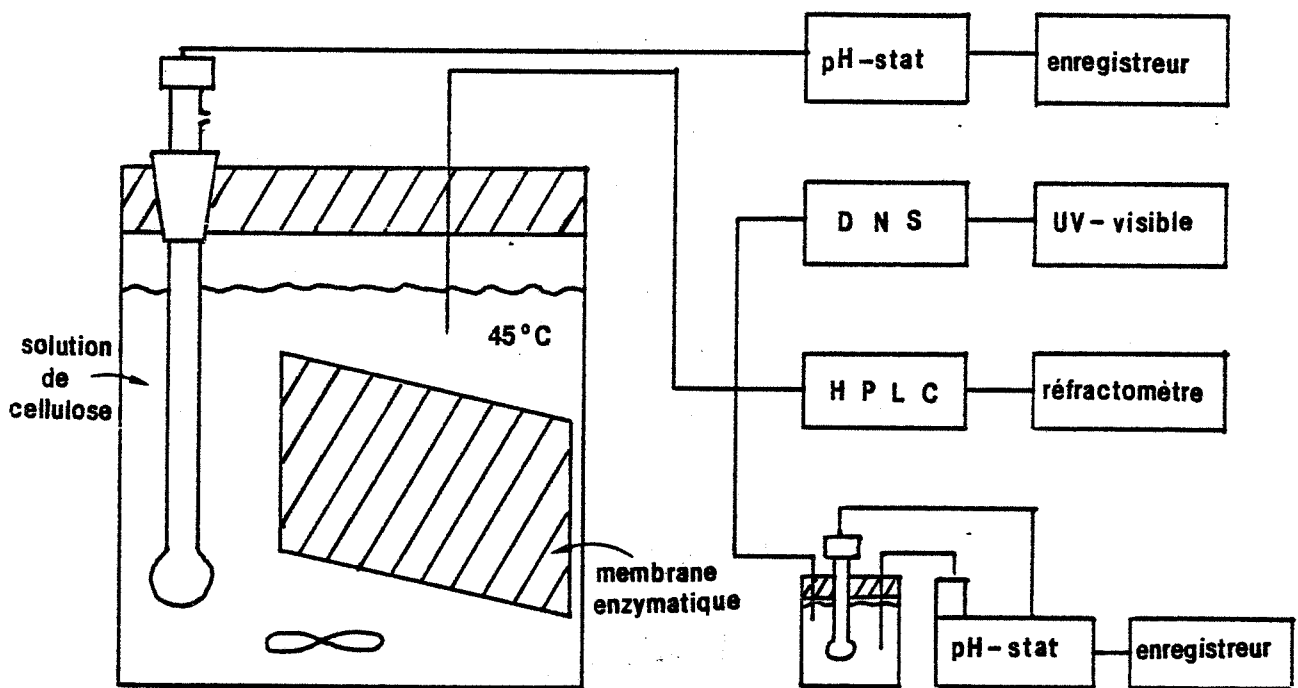


Figure 11 : Schéma de montage

dans les domaines de concentration de glucose où nous étions, le dosage en ligne du glucose par le glucose oxydase n'influencait pas la vitesse d'hydrolyse de la cellulose-phosphate. La figure 11 schématise le montage utilisé pour le suivi de l'hydrolyse.

Enzymes utilisées :

- . Glucose-Oxydase (EC 1.1.3.4.) : Boehringer - Grade II
- . Catalase (EC 1.11.16) : Sigma C.40

Matériel :

- Système de pHstat Radiometer :
- . pHmètre 64
 - . Titrator TTT 60
 - . Autoburette ABU 12
 - . Enregistreur REC 61 avec module REA 300.

4.2. DETERMINATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

La séparation des sucres obtenus au cours de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose est réalisée sur une colonne WATERS de type Dextro-Pak utilisant de l'eau comme solvant

En chromatographie liquide, les échantillons ne sont que très rarement analysés directement. Une filtration est indispensable pour éviter l'introduction de particules pouvant colmater les colonnes. Un échantillon de 0,5 ml est prélevé dans le réacteur d'hydrolyse et filtré sur filtre millipore de $0,45\mu$. 20 μ l de ce filtrat sont injectés sur la colonne Dextro-Pak. La phase mobile est l'eau et la vitesse d'élu-tion de 1 ml/mn. En sortie de colonne, la détection des sucres est réalisée en mesurant l'indice de réfraction de l'éluat au moyen d'un réfractomètre Optilab 5902. Le calcul des quantités de sucre est directement effectué utilisant un intégrateur de pics Hewlett Packard 3390 A pour le calcul des surfaces des pics. Courbe étalon, (Figure 12).

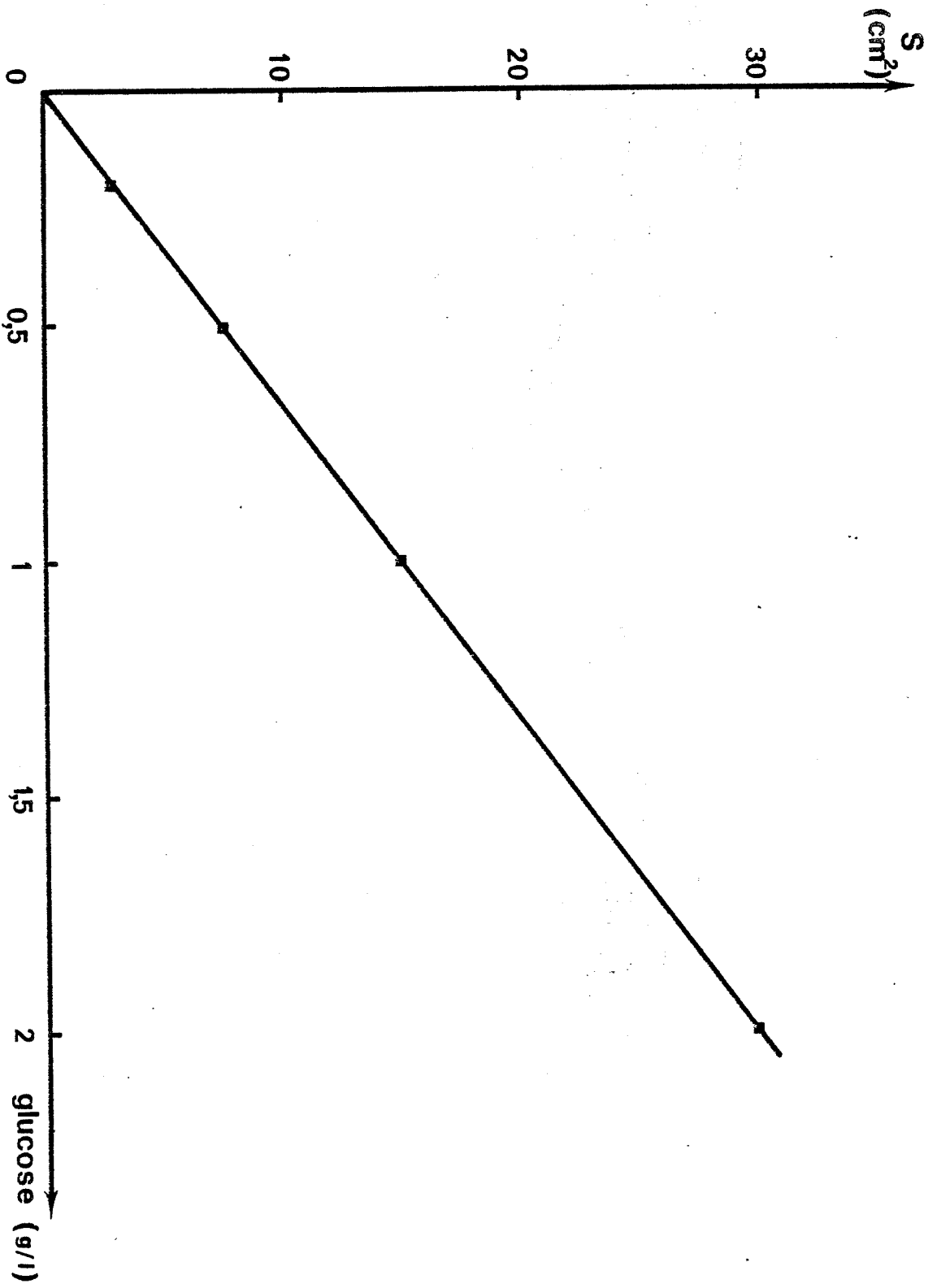


Figure 12 : Dosage du Glucose par HPLC courbe-étalon

5 - DOSAGE DU CELLOBIOSE

La détermination du cellobiose est réalisée par HPLC en même temps que le dosage du glucose. Courbe étalon, (Figure 13).

6 - DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS

Les sucres réducteurs sont dosés par colorimétrie en présence d'un réactif à base d'acide dinitrosalicylique (D.N.S.) dont la composition est donnée par MILLER [96], selon une technique utilisée par MANDELS [97]. Des échantillons de 1 ml sont prélevés dans le réacteur au cours du temps. 3 ml de réactif D.N.S. sont ajoutés pour stopper la réaction. Après 5 minutes à température d'ébullition, 16 ml d'eau sont ajoutés. La mesure de densité optique est réalisée à 550 nm sur un spectrophotomètre Beckman DB-T. Le réactif DNS mesure la totalité des sucres réducteurs. La courbe étalon (Figure 14) est établie en prenant des solutions standard de cellobiose.

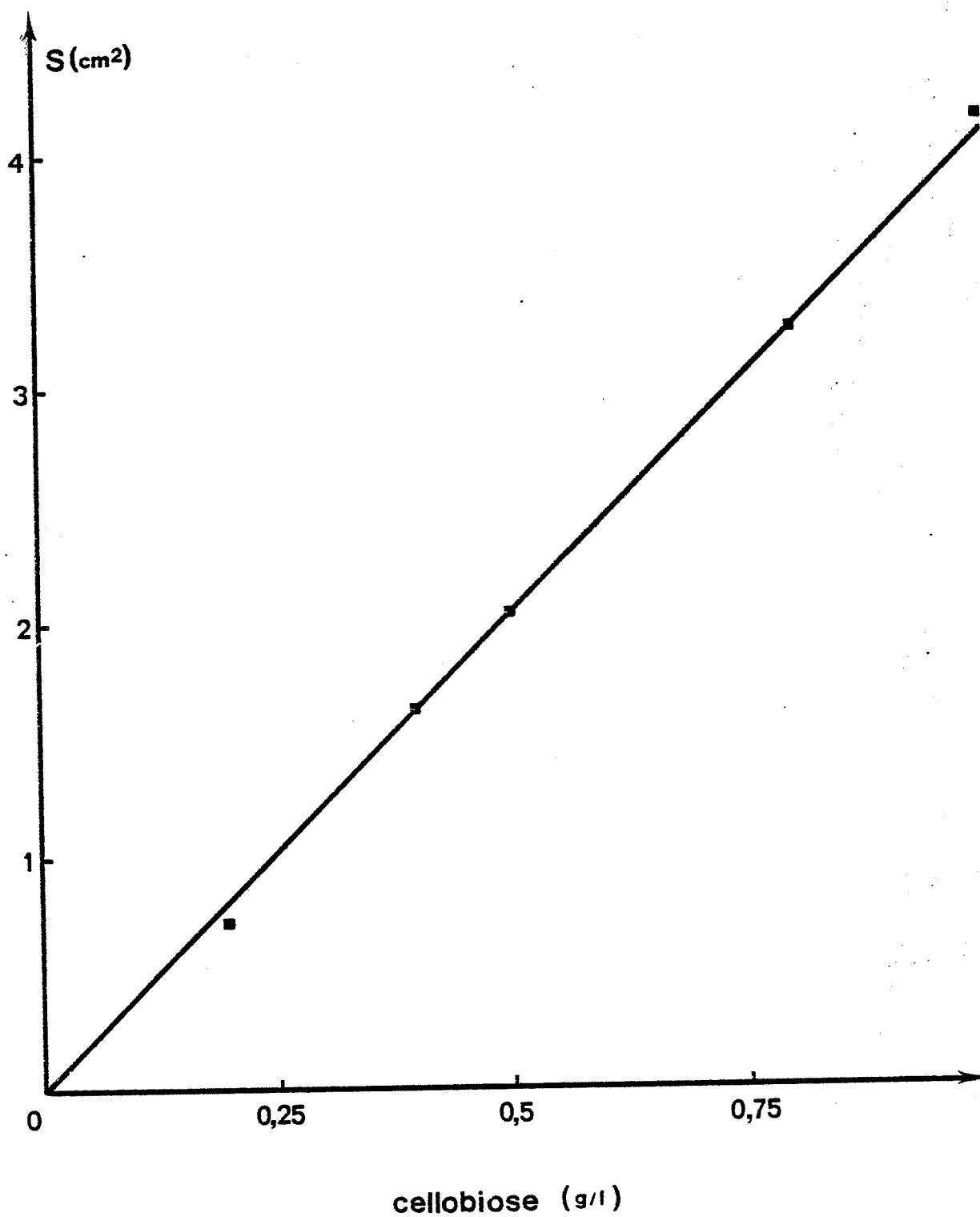


Figure 13 : Dosage du Cellobiose par HPLC courbe étalon

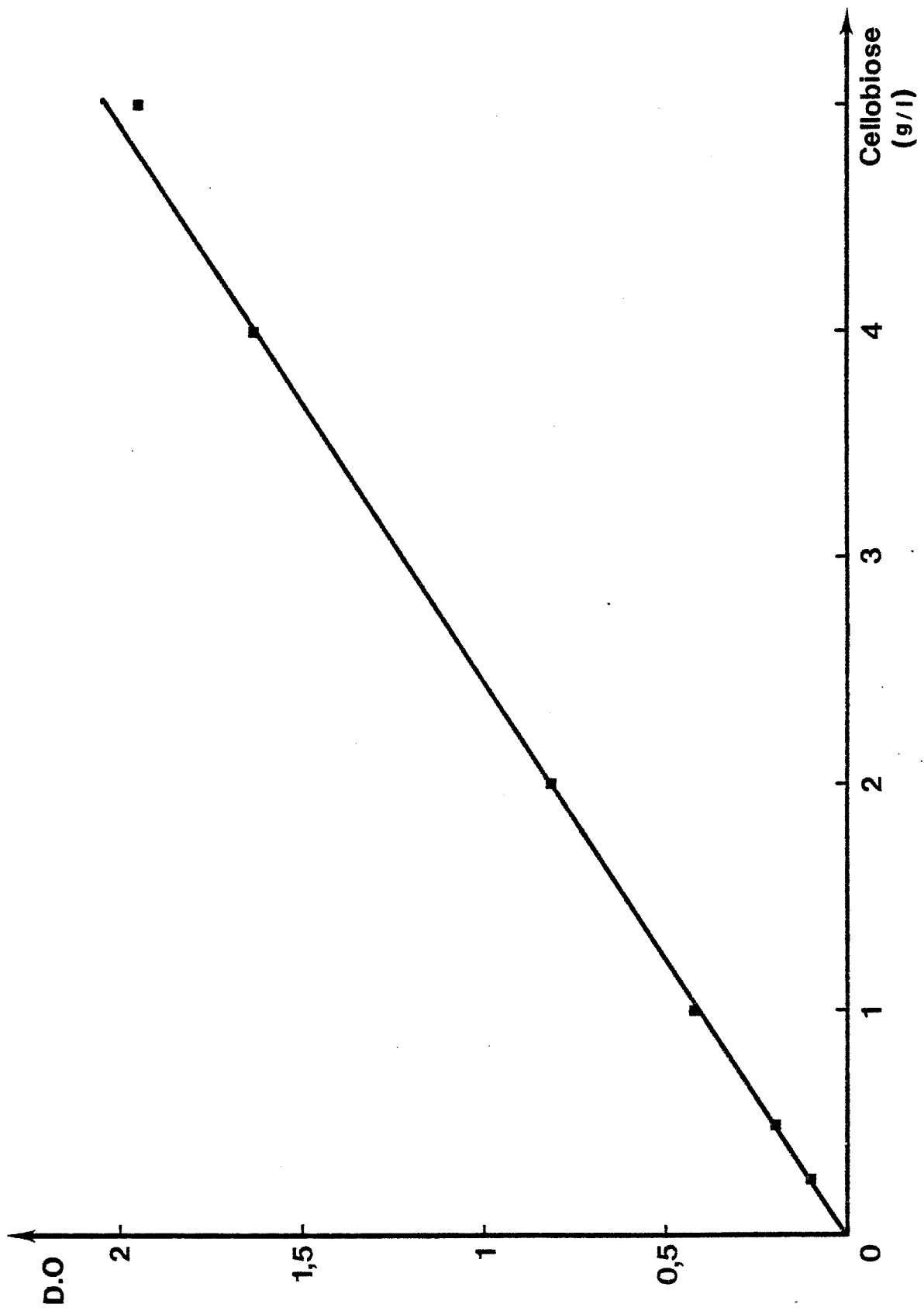


Figure 14 : Dosage des sucres réducteurs par réactif DNS

CHAPITRE 3

RESULTATS

1 - SOLUBILISATION DE LA CELLULOSE PAR PHOSPHORYLATION

Notre objectif est de rompre les liaisons hydrogène intermoléculaires assurant une parfaite rigidité aux structures celluloses et un degré de cristallinité élevé. Une phosphorylation de la cellulose nous a semblé intéressante. En effet, cette méthode peut permettre la rupture de liaisons hydrogène intermoléculaires. De plus elle permet d'obtenir une cellulose solubilisée dans une solution aqueuse en absence de métaux lourds qui, nous le rappelons, sont inhibiteurs des enzymes.

La préparation des phosphates de cellulose a essentiellement été étudiée pour l'ignifugation des textiles. Diverses méthodes d'estérification ont été appliquées :

- Estérification par l'acide phosphorique en présence d'urée [11], [98] , [99].

- Estérification par de l'oxychlorure de phosphore [100] , [101]

- Estérification par des sels d'acide phosphorique tels que le tripolyphosphate de sodium, le sodium dihydrogénophosphate ou le disodium hydrogénophosphate [102] , [103]

- Estérification par de l'acide orthophosphorique anhydre [10] .

Les divers esters celluloses obtenus par ces méthodes ont surtout fait l'objet d'étude pour leur propriété de tenue à la flamme. Seuls PASCHALL [103] et TOUEY [10] mentionnent les propriétés d'hydrosolubilité de leurs produits.

Pour notre part nous avons réalisé deux types de réactions d'estérification en faisant varier pour chacune d'elles le temps et les conditions opératoires (température, pH, concentration des sels d'acide phosphorique).

1.1. PHOSPHORYLATION PAR DES SELS D'ORTHOPHOSPHATE INORGANIQUES

Ces essais ont été réalisés en faisant agir du disodium hydrogénophosphate ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4, \text{H}_2\text{O}$) et du disodium di-hydrogénophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$) sur la cellulose cristalline. Ces réactions ont été conduites à des températures de 130 à 160 °C en milieu acide pendant des temps variables. Après précipitation et lavages successifs avec du méthanol aqueux et séchage nous avons déterminé les teneurs en phosphore et glucose des produits obtenus.

Il s'est avéré que les teneurs en phosphore étaient relativement faibles, inférieures à 1 % alors que les concentrations en glucose, de 20 à 30 % dénotaient une hydrolyse acide importante de la cellulose durant le processus de phosphorylation. Ces résultats nous ont amenés à essayer une estérification de la cellulose par de l'acide phosphorique anhydre.

1.2. TRAITEMENT PAR L'ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE

L'estérification de la cellulose cristalline est obtenue en faisant réagir une solution d'acide phosphorique en excès (dans le rapport 20/1, en poids) en présence de pentaoxyde de phosphore et de butanol utilisé comme solvant.

Après un temps de réaction, qui selon les essais a varié de 40 à 100 h, à une température de 35°C, la cellulose phosphatée est extraite par centrifugation à 5000 tours/minute pendant 10 minutes, après précipitation au méthanol, puis lavée plusieurs fois par une solution méthanol/eau (70/30 en poids) afin d'éliminer complètement l'agent estérifiant.

La cellulose-phosphate ainsi obtenue a une teneur en phosphore variant de 4 à 5,7 % selon les essais, (cf tableau III.1), et une concentration en glucose de 7,6 %. Sa solubilité en milieu aqueux nous permettra de l'utiliser comme substrat de la réaction enzymatique d'hydrolyse.

Références des Echantillons	Pourcentage des différents éléments			
	C	H	O	P
Cellulose cristalline Whatman	44,22	6,18	49,40	-
A (40 h)	35,51	5,51	52,95	4,09
B (60 h)	35,39	5,50	51,75	4,16
C (100 h)	32,79	5,87	52,86	5,69

Tableau III.1 : Analyse élémentaire de la cellulose phosphatée

Notre premier objectif étant d'étudier le comportement de la cellulase immobilisée sur support insoluble, il nous fallait obtenir un substrat soluble. Ceci étant réalisé, mais n'étant point cependant la finalité même de ce travail, nous n'avons pas recherché les critères d'optimisation de cette réaction de phosphorylation, ce qui pourrait faire l'objet d'une autre étude.

L'étude de l'indice de cristallinité effectuée sur la cellulose microcristalline Whatman et sur deux échantillons de cellulose-phosphate a été réalisée par diffraction X. Les spectres obtenus (Figure 15) montrent que l'indice de cristallinité CrI de la cellulose microcristalline de départ est de :

$$\text{CrI} = \frac{I_{27} - I_{23}}{I_{27}} \times 100 = 98 \%$$

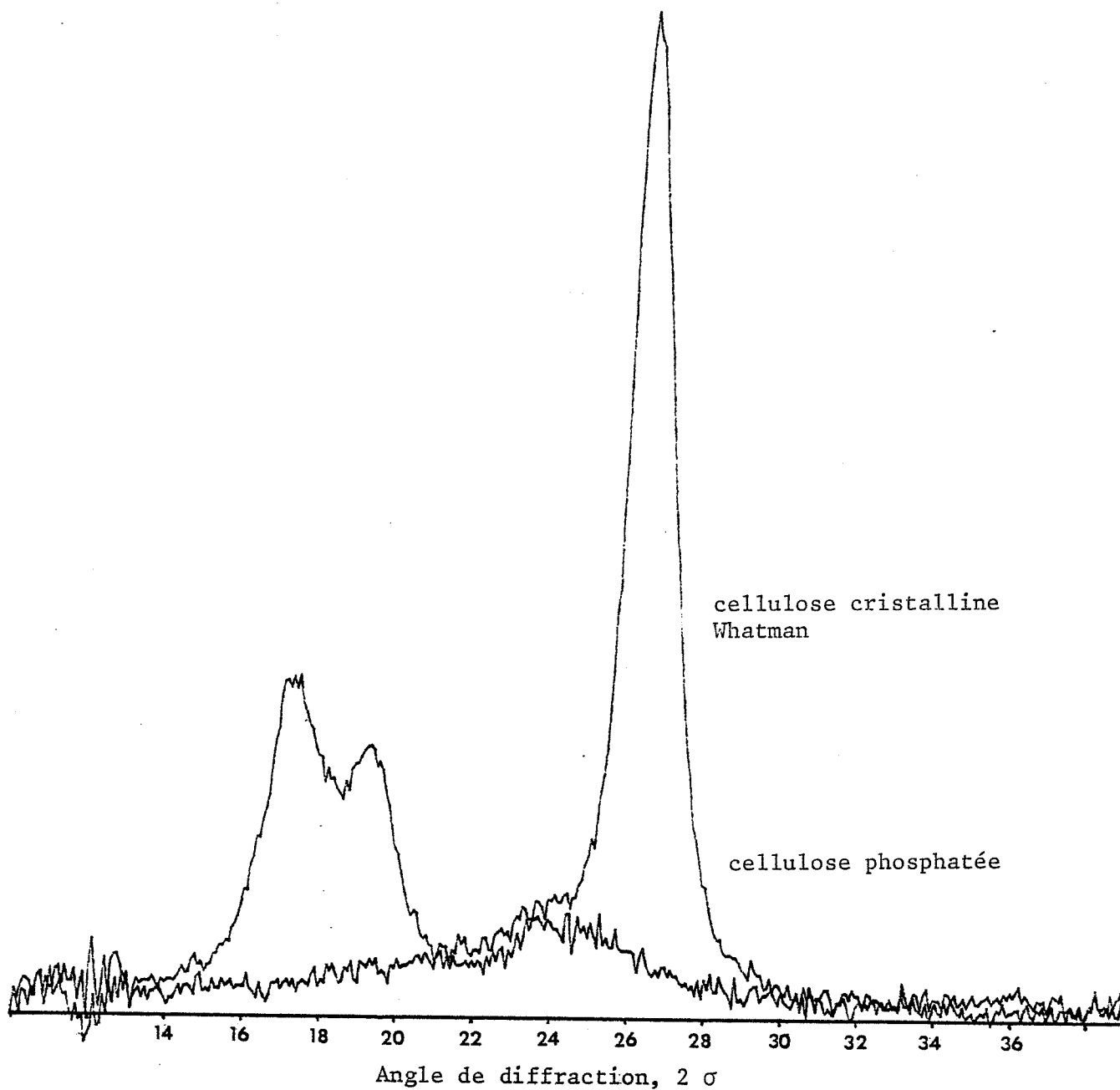


Figure 15 : Cristallogramme de la cellulose de départ et de la cellulose phosphatée (Spectre Rayons X)

Par contre les échantillons obtenus après phosphorylation présentent une structure amorphe comme nous l'avons mentionné au cours d'une étude précédente [104]. Le fait d'obtenir un produit totalement amorphe permet de s'affranchir des phénomènes de synergie existant entre les endo et les exo-cellulases pour l'hydrolyse des régions cristallines. En effet, ce phénomène de synergie qui est important dans la dégradation des celluloses hautement cristallines s'est avéré inexistant, selon plusieurs auteurs sur les dérivés solubles de la cellulose. [44], [66], [69].

2 - INFLUENCE DU PRETRAITEMENT SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Comme nous le montre la Figure 16 la vitesse d'hydrolyse enzymatique de la cellulose est dépendante du substrat utilisé. Les vitesses initiales d'hydrolyse, ($0,196 \mu\text{mole mn}^{-1}$ sur cellulose microcristalline, et $3,75 \mu\text{mole mn}^{-1}$ sur cellulose-phosphate) sont dans un rapport de 1 à 19, et des taux d'hydrolyse sont respectivement de 14,5 % et 58,3 % après 2 h30 d'hydrolyse. Cette amélioration du rendement d'hydrolyse semble due au fait que le substrat soit totalement amorphe, ce qui est en accord avec l'ensemble des études réalisées dans ce domaine [106-110].

3 - VERIFICATION DU COMPORTEMENT MICHAELIEN DE LA CELLULASE VIS A VIS DE LA CELLULOSE MODIFIEE

L'équation de MICHAELIS et MENTEN ne peut s'appliquer à l'hydrolyse de la cellulose-phosphate par la cellulase que si la cellulase présente un comportement michaelien vis-à-vis de celle-ci. Il est donc nécessaire de vérifier tout d'abord ce comportement.

Les études sont réalisées en faisant varier la concentration de substrat pour une concentration d'enzyme donnée. L'hydrolyse est réalisée à 45 °C, à pH 5,1 dans du tampon citrate $5 \cdot 10^{-3}$ M en présence de 10 mg de cellulase en solution. Elles nous ont permis de tracer la courbe des vitesses d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat, en présence d'enzyme

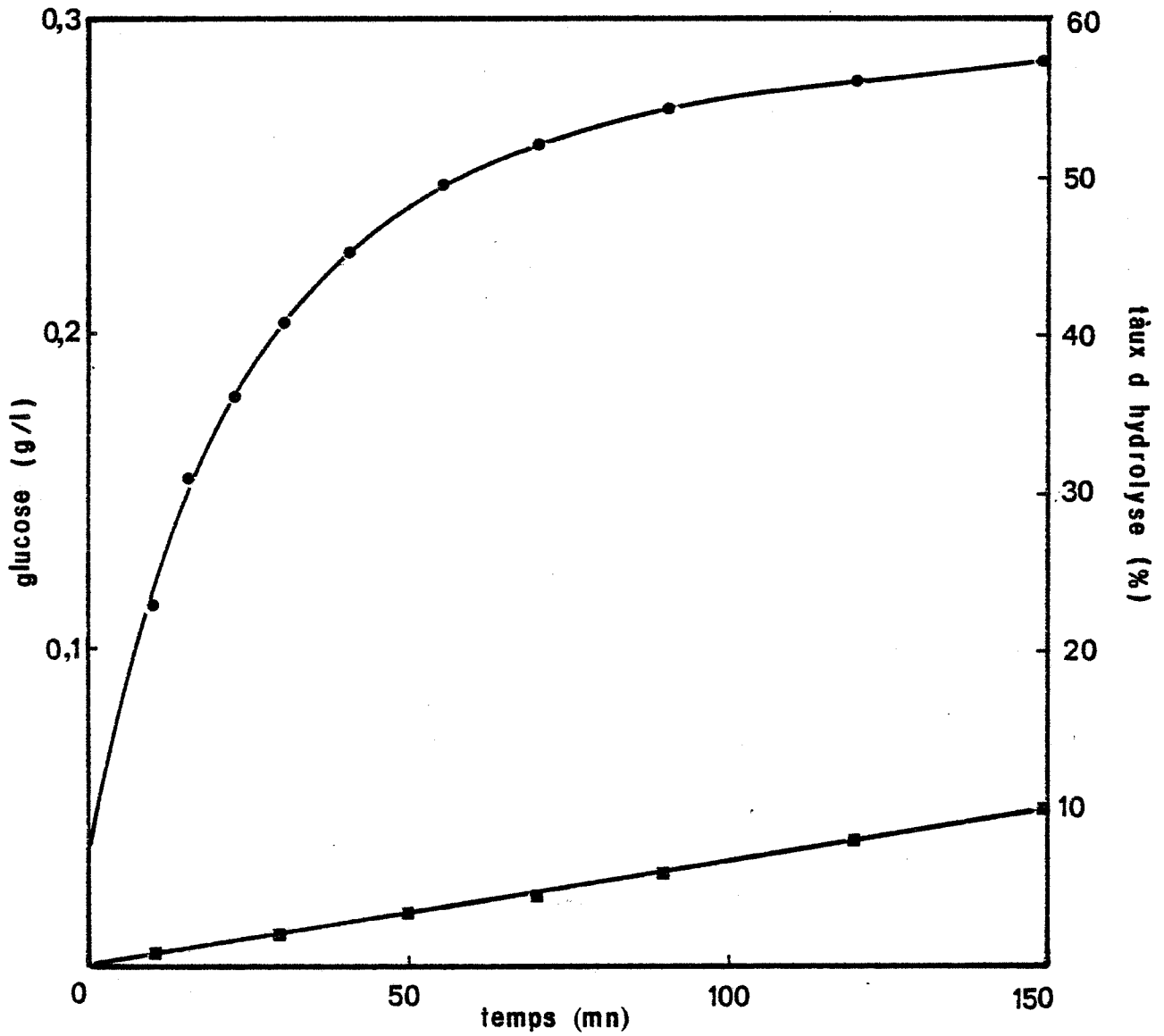


Figure 16 : Influence du prétraitement sur l'hydrolyse enzymatique

- Cellulose phosphatée
- Cellulose cristalline

libre. La courbe des vitesses en fonction de la concentration en substrat tracée selon la représentation de LINEWEAVER-BURK (Figure 17) est linéaire. La cellulase présente donc un comportement michaelien vis-à-vis du substrat utilisé.

Sur cette courbe, la concentration en substrat, [S], et par conséquent la constante de MICHAELIS K_m sont exprimées en grammes par litre et non en concentration molaire comme c'est le cas en général en cinétique enzymatique. Il nous paraît, en effet, plus représentatif d'exprimer la concentration d'un polymère tel que la cellulose en masse par unité de volume plutôt qu'en une concentration molaire de glucose équivalent.

La figure 17 nous permet de déterminer les constantes cinétiques suivantes :

$$K_m = 0,776 \text{ g.l}^{-1}$$

et

$$V_m = 4,7 \text{ } \mu\text{mole.mn}^{-1} \text{ de glucose, d'où une activité spécifique de } 0,47 \text{ UI par mg d'enzyme brute.}$$

4 - COMPORTEMENT DE LA CELLULASE IMMOBILISÉE

4.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN GLUTARALDEHYDE

Dans des conditions d'hydrolyse identiques (température, pH, concentrations en substrat et enzyme), nous avons obtenu des membranes enzymatiques dont l'activité apparente est influencée par la concentration du glutaraldéhyde utilisé comme agent pontant pour l'immobilisation de l'enzyme. Le tableau III.2 résume les rendements de fixation que nous avons obtenu (activité apparente/activité initiale), exprimés en pourcentage, en fonction du taux de glutaraldéhyde présent dans la membrane.

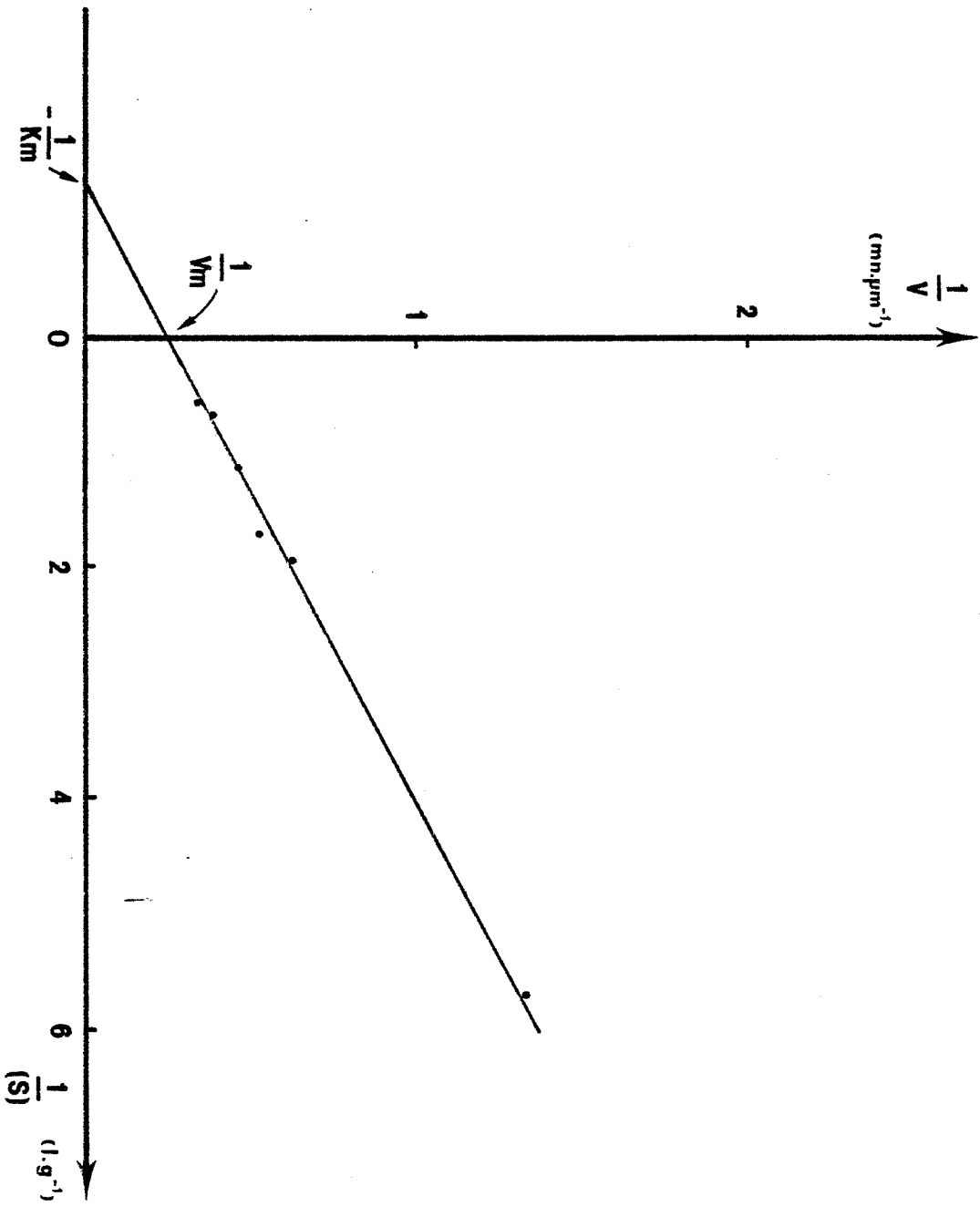


Figure 17 : Représentation de Lineweaver-Burk de l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat pour la cellulase en solution.

Glutaraldéhyde (concentration finale) %	0,8	1,75	2,5
activité enzymatique apparente %	17,1	12,2	2,4

Tableau III.2 : Influence de la concentration en glutaraldéhyde sur l'activité enzymatique de la membrane.

Ces résultats nous ont conduits à préparer par la suite des membranes enzymatiques ayant une concentration finale en glutaraldéhyde de 0,8 %. Il n'est guère possible de diminuer plus ce taux, les temps de réticulation devenant alors trop longs.

4.2. RENDEMENT DE FIXATION

L'activité de la cellulase est exprimée par l'évolution de la concentration de glucose formé par unité de temps, $\frac{d[G]}{dt}$. Pour une même quantité d'enzyme, les activités de la cellulase en solution et de la cellulase immobilisée sont mesurées dans des conditions d'hydrolyse identiques, à savoir :

- Concentration en substrat (cellulose-phosphate) : 5 g/l
- Quantité d'enzyme : 17 mg
- Température : 45 °C
- pH : 5,1
- Tampon citrate : 100 ml.

Les tangentes des courbes obtenues sur la Figure 18 nous donnent les variations de concentration de glucose, exprimé en gramme/litre, en fonction du temps.

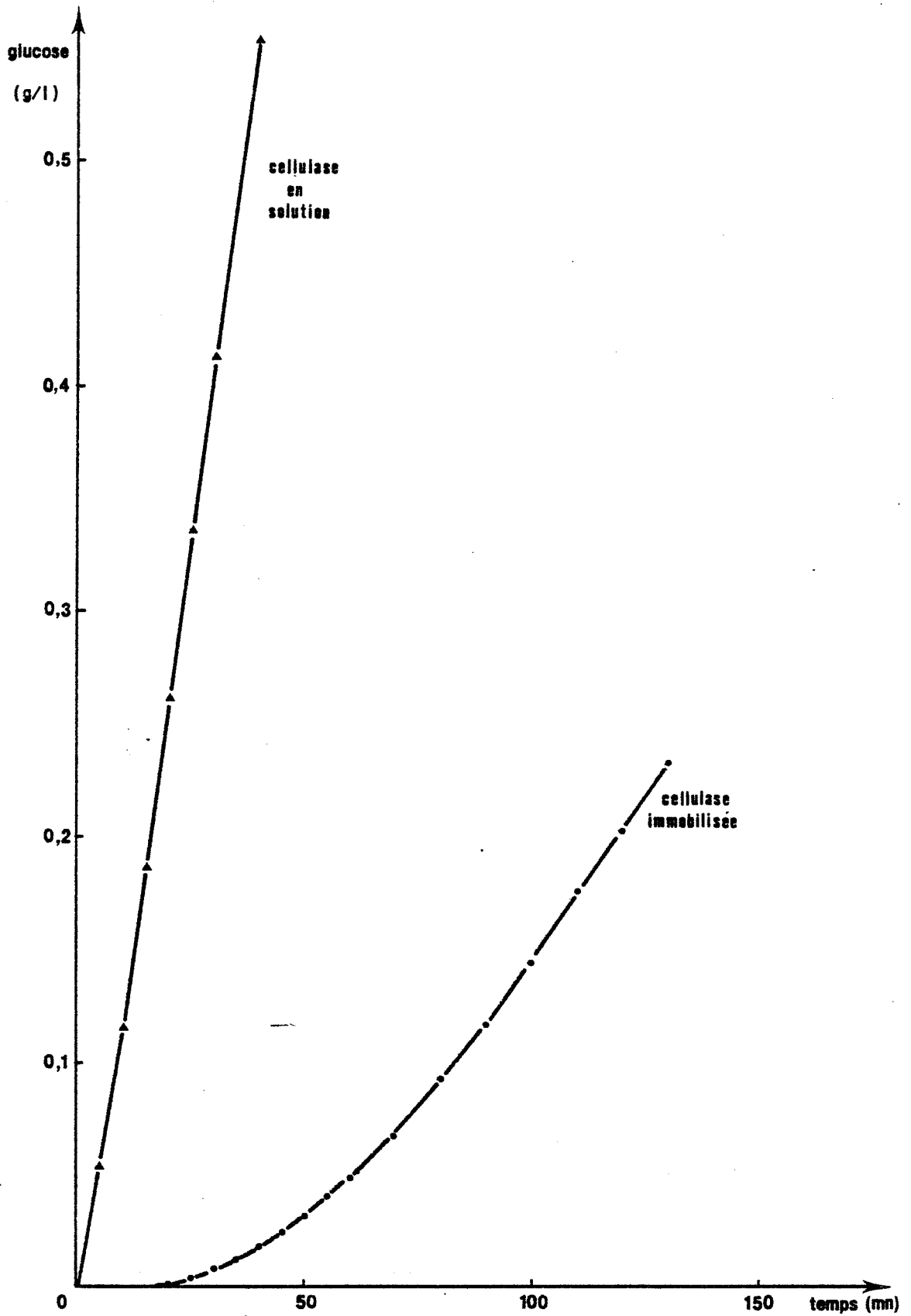


Figure 18 : Activités comparées de la cellulase en solution et de la cellulase immobilisée.

Pour la cellulase en solution :

$$\frac{d[G]}{dt} = 14,5 \text{ mg. l}^{-1} \cdot \text{mn}^{-1}$$

soit une activité de :

$$A_1 = \frac{d[G]}{dt} \cdot \frac{V}{M_G} = 8,04 \text{ } \mu\text{mole. mn}^{-1},$$

avec A_1 : activité de l'enzyme libre

V : volume réactionnel

M_G : masse molaire du glucose

Pour la cellulase fixée :

$$\frac{d[G]}{dt} = 2,93 \text{ mg. l}^{-1} \cdot \text{mn}^{-1}$$

soit une activité de l'enzyme fixée, A_f :

$$A_f = 1,63 \text{ } \mu\text{mole. mn}^{-1}$$

ce qui donne un rendement de fixation de :

$$R = \frac{A_f}{A_1} \times 100 = 20,25 \%$$

Ces résultats montrent que la cellulase immobilisée est moins active que la cellulase en solution sur un même substrat. Ce phénomène s'observe en général, pour la plupart des enzymes. Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette "perte" d'activité.

L'établissement de liaisons covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et ceux du support peut créer une distorsion de la structure tridimensionnelle de la molécule d'enzyme. Or, son activité est très étroitement liée à cette structure tridimensionnelle de la protéine.

Une autre cause de cette diminution de l'activité peut être l'intervention de phénomènes de gêne stérique limitant l'accessibilité du site catalytique au substrat. Une fraction seulement des molécules d'enzyme, celles fixées en surface de la membrane, est accessible au substrat.

De plus, pour calculer l'activité enzymatique, nous prenons en compte la quantité totale d'enzyme fixée et non pas la quantité d'enzyme fixée sur la membrane en surface.

4.3. EVOLUTION DE L'ACTIVITE EN FONCTION DU TEMPS

Une série de membranes enzymatiques contenant 40 mg de cellulase chacune, est conservée à une température de 4°C dans du tampon phosphate à pH 7 entre les différents essais. Ces essais sont réalisés dans des conditions d'hydrolyse identiques pour chacun :

- Concentration en substrat : 5 g/l
- Membrane enzymatique de 20 cm² contenant 40 mg de cellulase
- Température d'hydrolyse : 45°C
- pH : 5,1
- Tampon citrate : 100 ml
- Durée d'hydrolyse : 4 heures.

Les membranes initiales présentent en moyenne, une activité de 41,5 unités internationales. Cette activité est calculée à partir de mesures de vitesse de production de glucose à l'état stationnaire. Les mesures, résumées dans le tableau III.3, sont faites après 4, 10 et 15 jours de conservation.

	Vitesse d'hydrolyse $\mu\text{mole de glucose}$ mn^{-1}	Activité (U.I)	Activité Résiduelle (%)
Membrane initiale	1,66	41,5	100
Membrane de 4 jours	1,10	27,4	66
Membrane de 10 jours	0,66	16,6	40
Membrane de 15 jours	0,32	7,9	19

Tableau III.3. Activité en fonction du temps de conservation
des membranes enzymatiques

La cellulase immobilisée sur albumine perd un tiers de son activité après 4 jours de conservation, et après quinze jours, la membrane ne présente plus que le cinquième de son activité initiale.

Le cellulase étant en fait un complexe multienzymatique, la perte de cette activité peut être due soit à une perte d'activité de l'ensemble des unités enzymatiques qui composent la cellulase, soit, essentiellement, à la perte d'activité d'une seule unité plus labile.

Les résultats obtenus avec une membrane sur laquelle nous avons co-immobilisé 50 mg de cellulase et 20 mg de β -glucosidase, montrent que l'activité d'une telle membrane est beaucoup plus stable dans le temps (Figure 19).

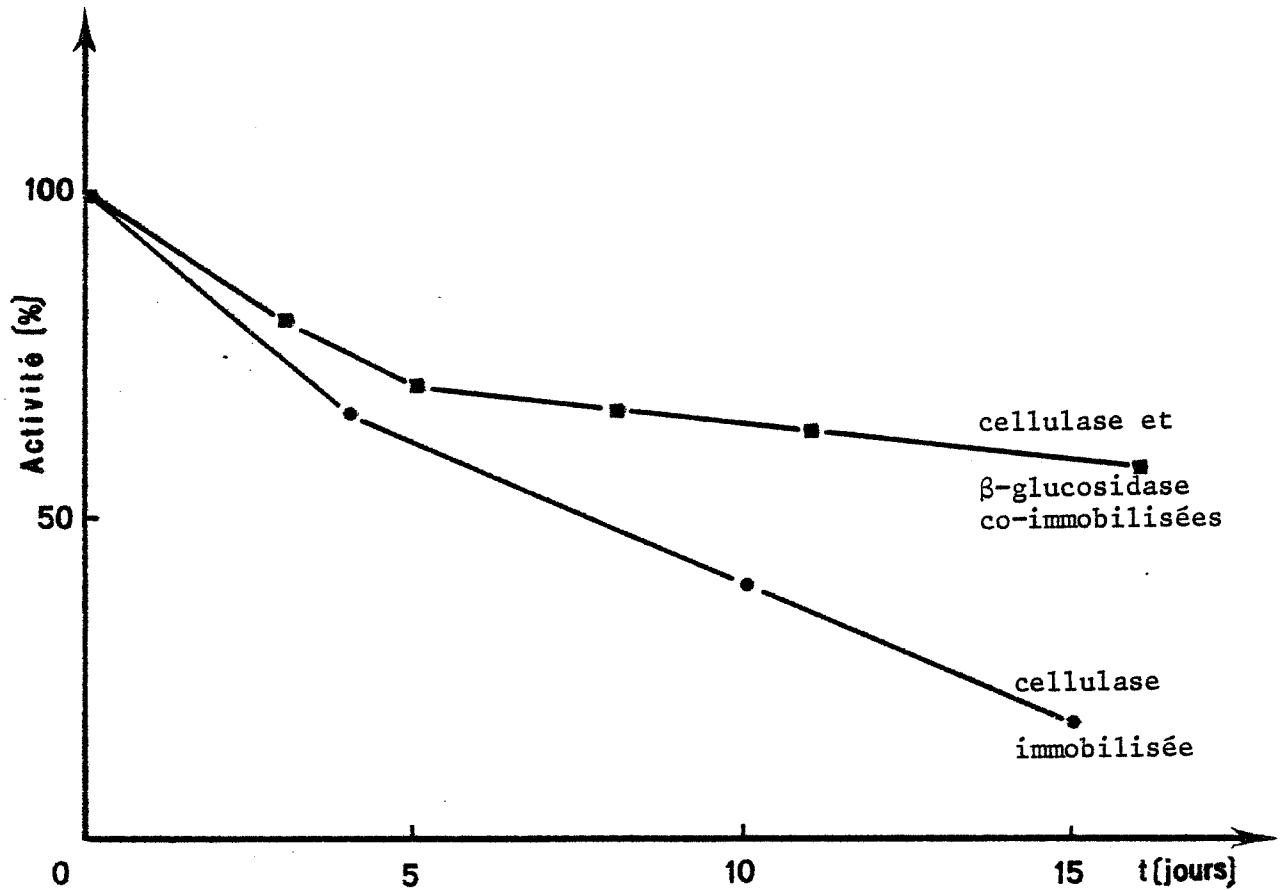


Figure 19 : Perte d'activité en fonction du temps

Après quinze jours d'immobilisation, la membrane présente encore 60 % environ de son activité initiale ce qui permet de penser que la β -glucosidase du complexe cellulosique de *Trichoderma viride* est beaucoup plus labile que les autres unités.

4.4. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Comme toutes les réactions chimiques, les réactions catalysées par les enzymes sont sensibles à des modifications de température.

La cellulase a une activité catalytique extrêmement faible à température ambiante, comme le montre la Figure 20. Par contre cette activité augmente rapidement avec l'accroissement de la température.

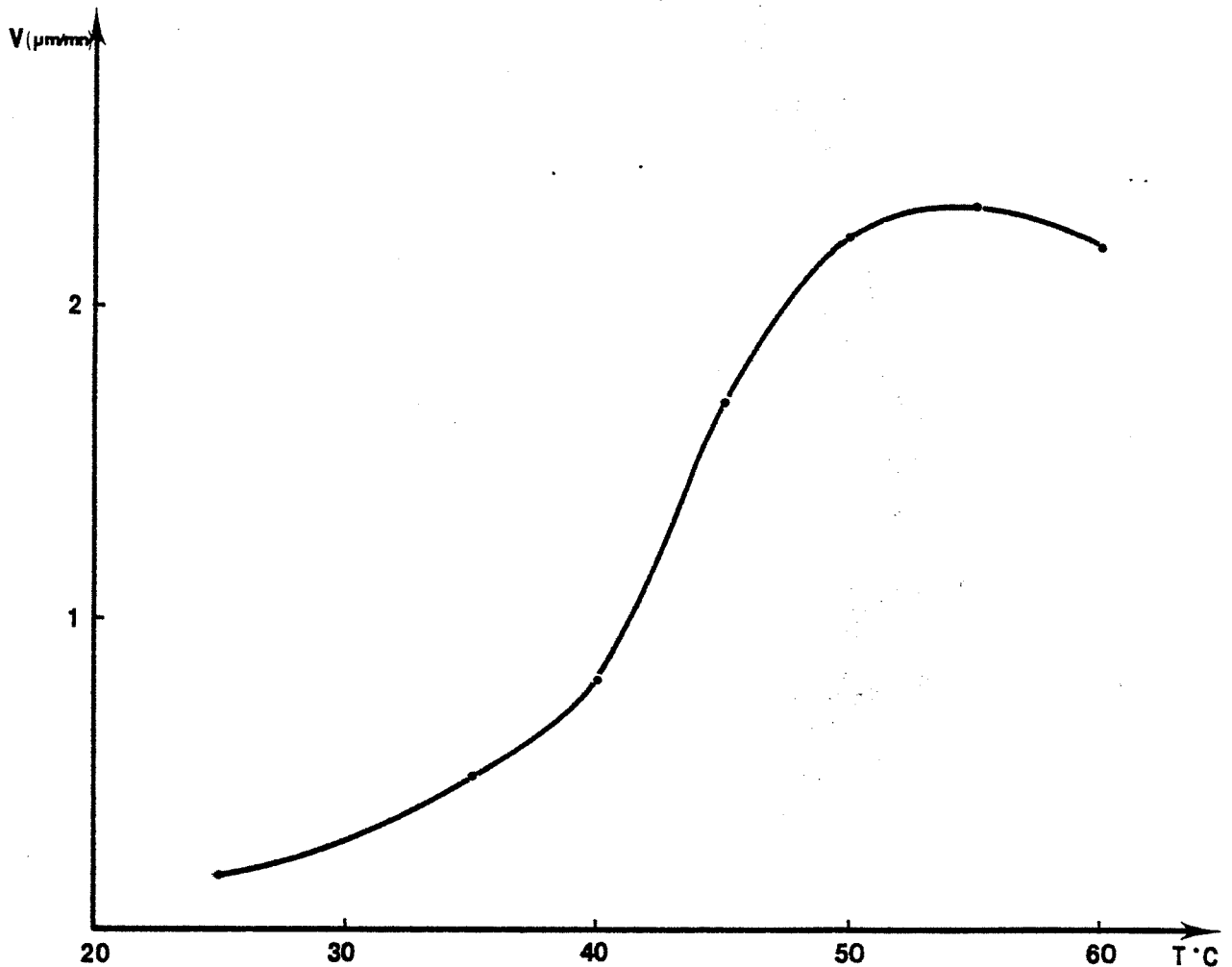


Figure 20 : Influence de la température sur la vitesse d'hydrolyse par l'enzyme immobilisée

Les résultats de la Figure 20 ont été obtenus avec une membrane de 20 cm² chargée de 40 mg de cellulase de *Trichoderma viride*. La vitesse d'hydrolyse obtenue à la température de 25°C et à un pH de 5,10 est de 0,18 μ mole de glucose par minute. A 45°C, cette activité est quasiment multipliée par un facteur 10, avec une valeur de 1,68 mole de glucose par minute.

A 55°C, la vitesse d'hydrolyse, de 2,26 micromole de glucose produit par minute est maximale. Au-delà, l'activité de l'enzyme décroît.

La plupart des études sur l'hydrolyse de la cellulose sont réalisées à 50°C, température vers laquelle l'enzyme semble la plus active [111], comme nous le voyons d'ailleurs sur la Figure 20. Cependant, de récentes études de DAVID et THIRY [112] ont montré (Figure 21) que pour une courte durée d'hydrolyse, (6 h) la température optimale se situait entre 50 et 55°C, mais pour des temps d'hydrolyse plus longs, de meilleurs rendements étaient obtenus à des températures plus faibles, de l'ordre de 45°C.

Une interprétation de la dénaturation par effet thermique de l'enzyme a été donnée par FLORKIN et STOTZ [113]. Elle montre qu'au-dessus d'une température critique, la vitesse de réaction diminue au lieu d'augmenter, et à des températures plus élevées, l'enzyme devient complètement inactive. Cette cinétique traduit alors la dénaturation thermique de sa protéine [114].

4.5. INFLUENCE DU pH

Le pH optimum varie selon l'enzyme. Cette influence du pH est liée à l'état d'ionisation des groupements dissociables participant à la formation du complexe enzyme-substrat. Pour la cellulase immobilisée (Figure 22) nous avons trouvé un pH optimal de 5,10 légèrement supérieur à celui obtenu avec la cellulase en solution (pH 4,75). Par conséquent le pH de la solution d'hydrolyse de la cellulose sera maintenu à cette valeur par l'emploi d'un tampon citrate $5 \cdot 10^{-3}M$. Cette variation du pH optimum de l'enzyme peut s'expliquer par deux phénomènes. D'une part, l'état

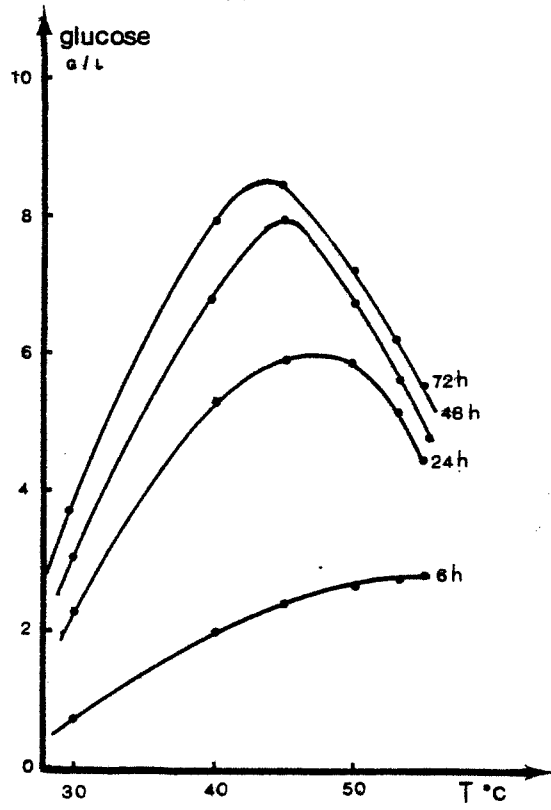


Figure 21 : Effet de la température sur le rendement d'hydrolyse de la cellulose après différents temps d'incubation.

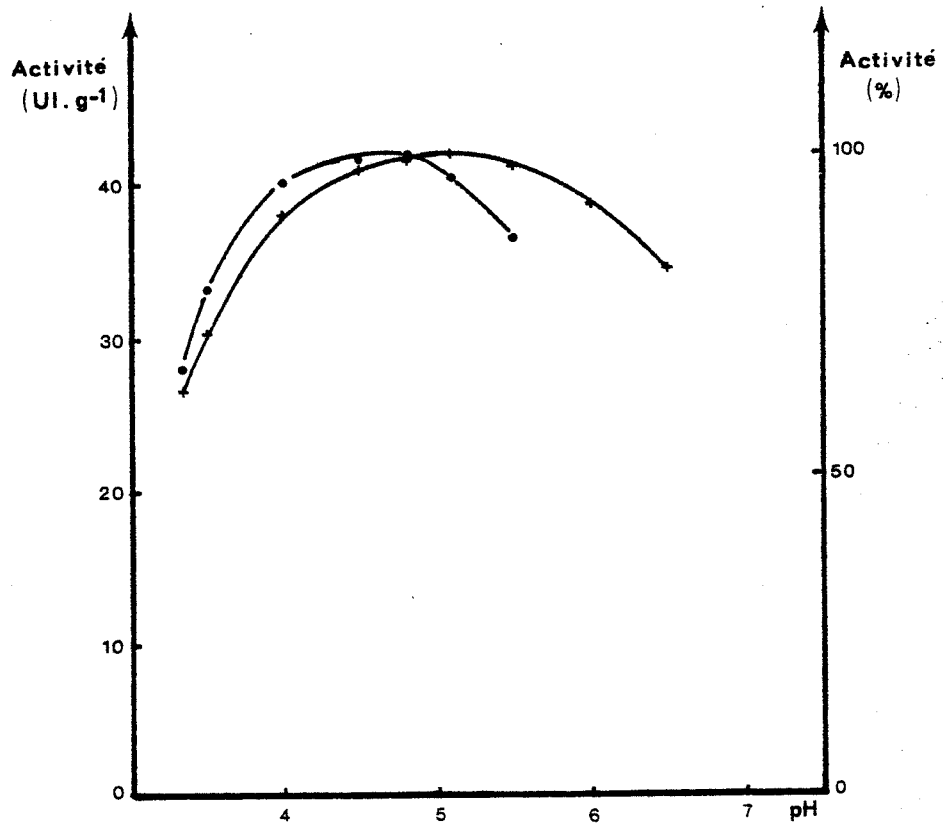


Figure 22 : Influence du pH.
• cellulase libre + cellulase immobilisée

d'ionisation de la protéine enzymatique fixée n'est pas identique à celui de la protéine en solution. D'autre part, le glucose étant dosé en ligne, l'acide gluconique formé abaisse localement le pH au niveau de la membrane, qui doit être légèrement inférieur au pH de la solution.

Des résultats similaires ont été obtenus par TANAKA [115] en 1980.

4.6. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

Cette étude est réalisée avec des membranes de 20 cm², contenant 40 mg de cellulase. L'hydrolyse de la cellulose est poursuivie à pH 5,1 et à une température de 45°C.

Les Figures 23 et 24 montrent que la vitesse d'hydrolyse de la cellulose n'est pas proportionnelle à la concentration en substrat. Elle augmente avec l'accroissement de la concentration en substrat, puis tend à devenir constante. Pour des concentrations voisines de 0,5 g/l la réaction est par conséquent d'ordre 1 par rapport au substrat. Dans le domaine des concentrations 10 fois supérieures la réaction s'approche de l'ordre zéro, la courbe tendant vers une asymptote, représentant la vitesse maximale d'hydrolyse dans les conditions opératoires données.

4.7. INFLUENCE DE LA QUANTITE D'ENZYME

Lorsqu'une réaction enzymatique s'opère en phase homogène, en présence d'un excès de substrat, la vitesse de réaction est proportionnelle à la quantité d'enzyme dans le milieu réactionnel.

La Figure 25 nous montre que l'hydrolyse enzymatique de la cellulose par la cellulase en solution suit cette règle. Dans l'intervalle de concentrations d'enzyme étudié, la vitesse d'hydrolyse de la cellulose est proportionnelle à la concentration d'enzyme.

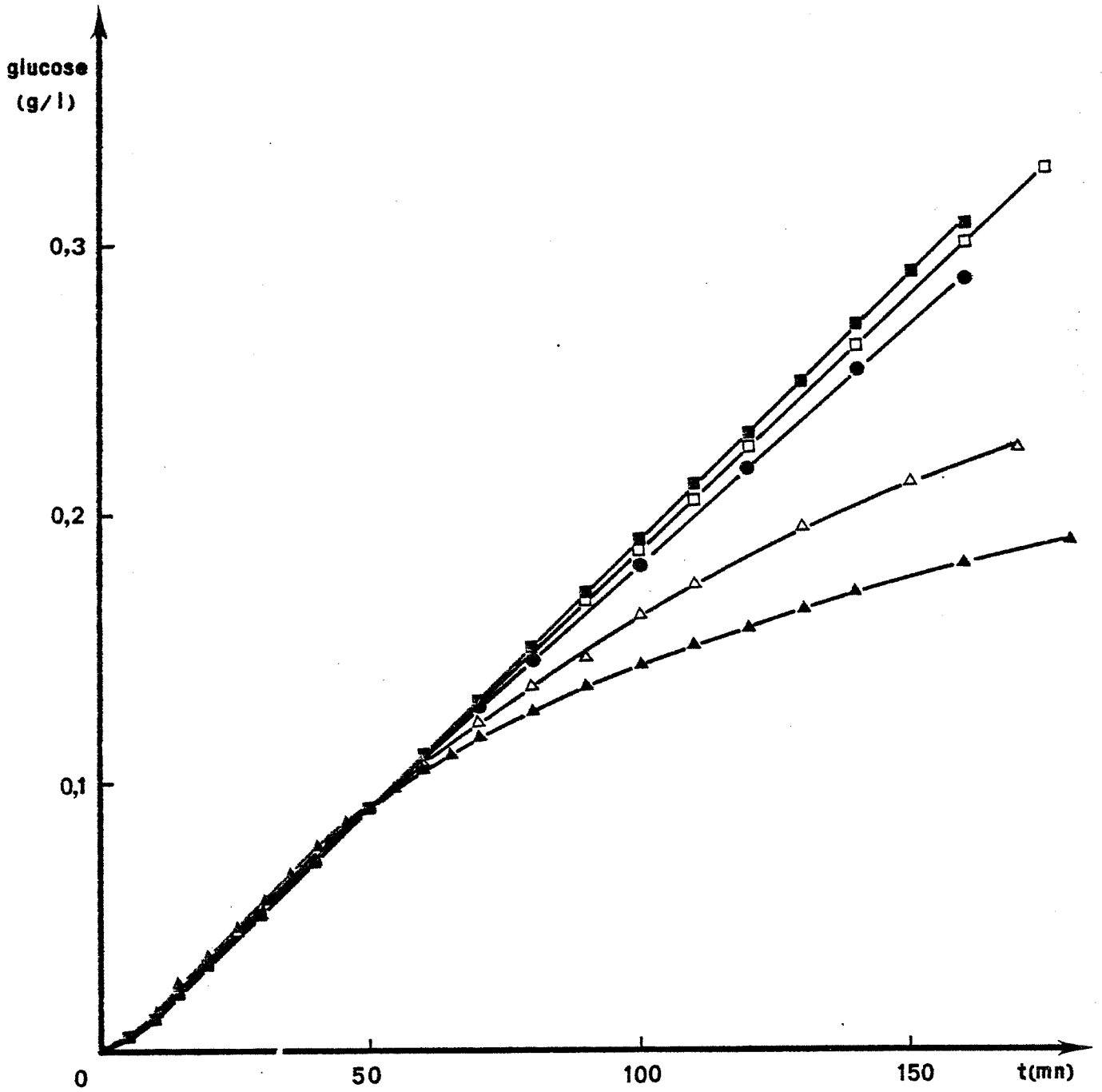


Figure 23 : Influence de la concentration en substrat sur la production de glucose.

- ▲ 0,5 g/l
- 3 g/l
- 5 g/l
- △ 1 g/l
- ◻ 4 g/l

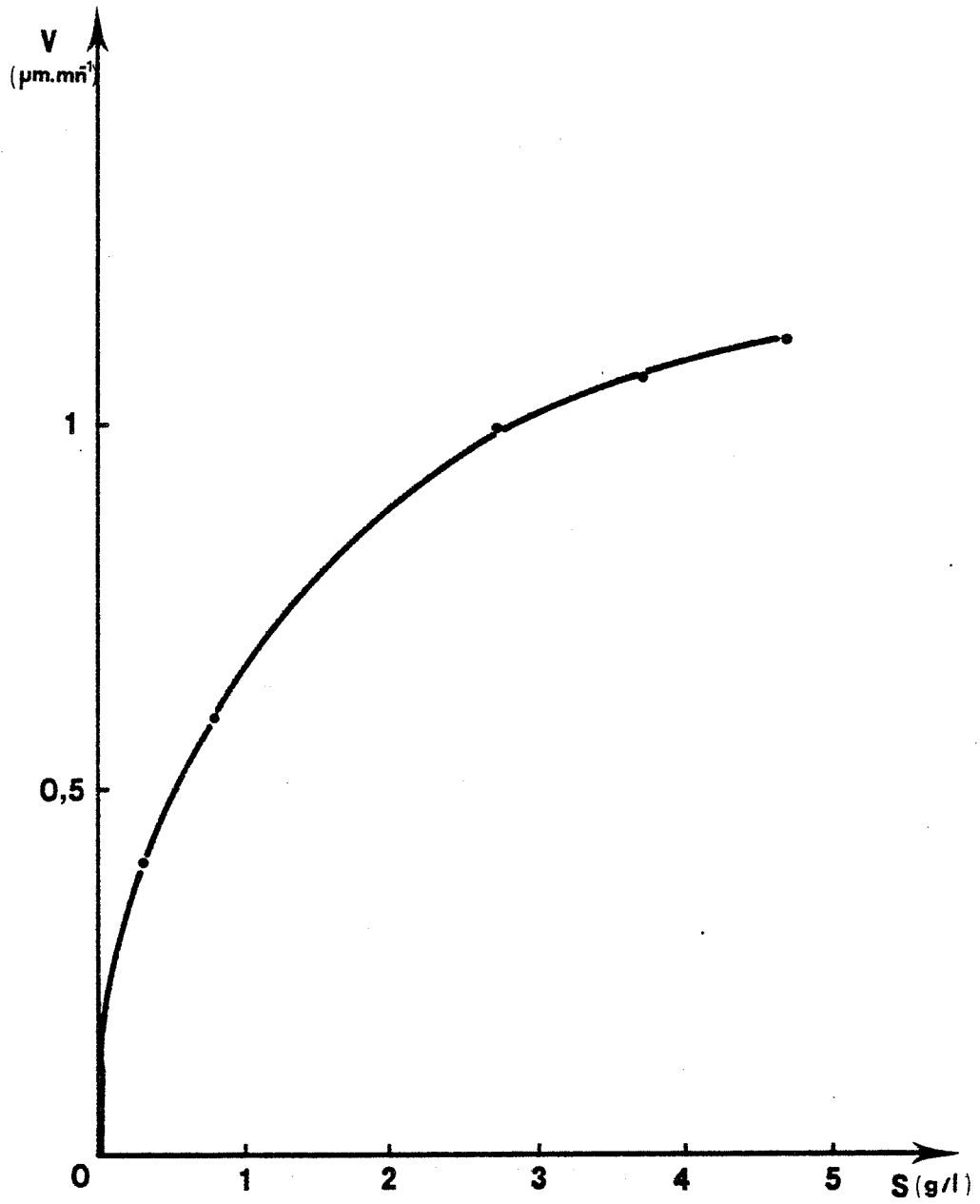


Figure 24 : Vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat.

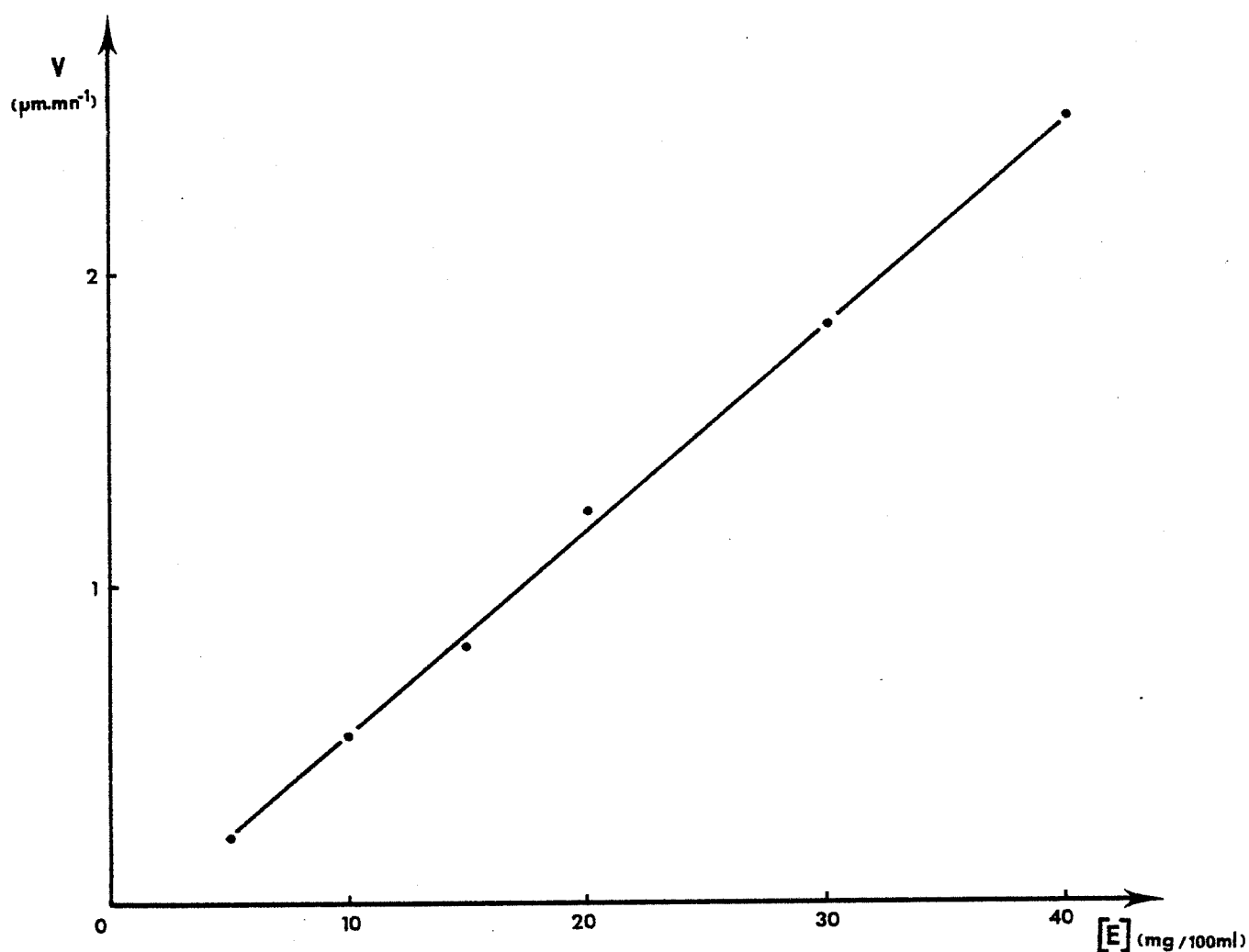


Figure 25 : Influence de la concentration en enzyme - Cellulase en solution.

En présence de cellulase immobilisée, la vitesse d'hydrolyse n'est plus proportionnelle à la quantité d'enzyme, en régime stationnaire, comme le montrent les Figures 26 et 27, ceci pour une même concentration en substrat, et pour des concentrations d'enzyme variant de 17 mg à 100 mg par cm^3 , les membranes utilisées ayant une surface de 20 cm^2 . A l'état stationnaire, les vitesses d'hydrolyse sont quasiment identiques variant de $1,68 \mu\text{mole}$ par minute à $1,72 \mu\text{mole}$ par minute, ce qui signifierait que tous les sites enzymatiques ne sont pas utilisés et donc qu'il se produit une limitation au phénomène d'hydrolyse.

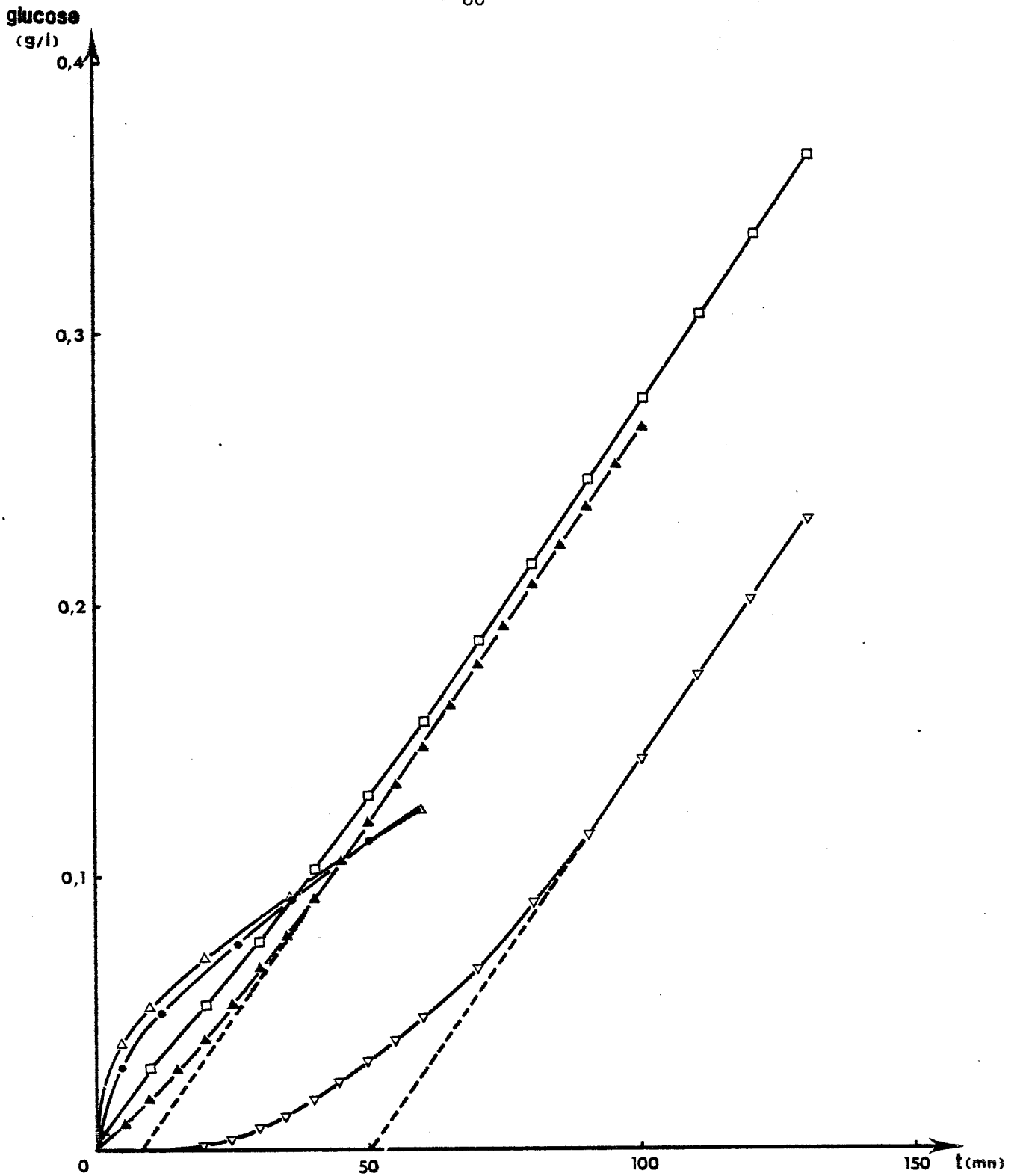


Figure 26 : Hydrolyse enzymatique en présence de membranes plus ou moins chargées en enzymes.

- | | |
|----------|----------|
| ▽ 17 mg | ▲ 40 mg |
| □ 100 mg | ● 200 mg |
| △ 500 mg | |

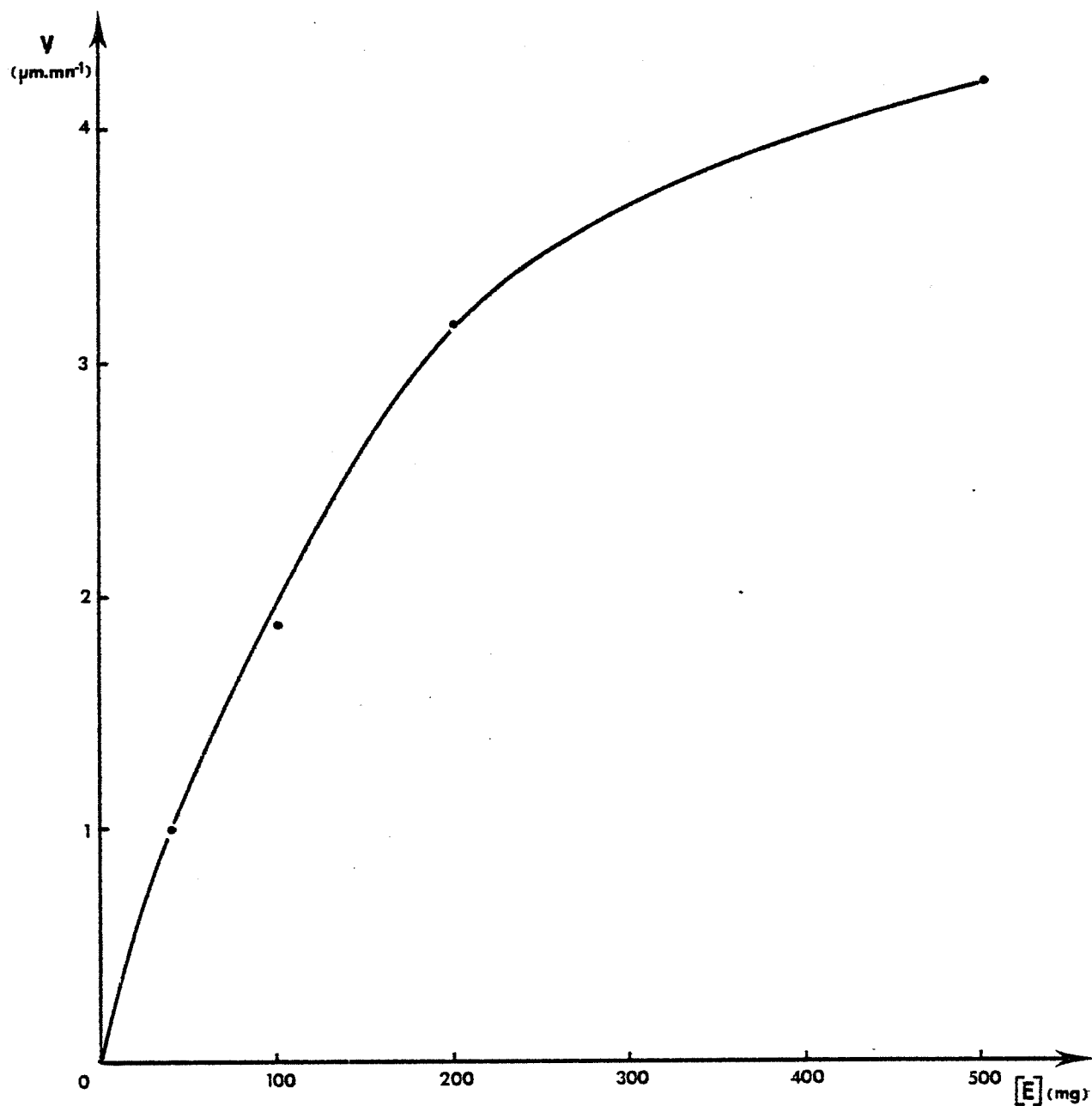
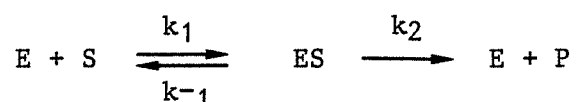


Figure 27 : Vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la concentration en enzyme - Cellulase immobilisée sur support.

Par contre, la charge enzymatique semble avoir une influence sur la période pré-stationnaire. Cette phase de transition, courte, de 9 minutes pour une faible concentration d'enzyme.

Pour une réaction enzymatique du type :



La concentration du complexe ES est constante en régime stationnaire, donc la variation de concentration $\frac{d[ES]}{dt}$ est nulle. La vitesse d'hydrolyse est alors constante.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES]$$

Au cours de la phase pré-stationnaire, la concentration du complexe ES augmente avec le temps, selon l'équation :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] [S] - (k_{-1} + k_2) \cdot [ES]$$

Cette phase pré-stationnaire est d'autant plus longue que la membrane est moins chargée en enzyme, pour la cellulase immobilisée. Or le fonctionnement catalytique d'une enzyme immobilisée est lié à son approvisionnement en substrat à partir de la solution dans laquelle il se trouve. Les molécules de substrat doivent donc migrer au niveau des sites catalytiques de la masse enzymatique, pour former le complexe enzyme-substrat, et le produit final, inversement, doit migrer du site catalytique à la solution. La catalyse est donc liée à ces phénomènes de transfert.

Ces phénomènes de transfert deviennent d'autant plus facilement des facteurs limitants par rapport à la vitesse enzymatique, que la masse molaire des molécules de substrat et de produit impliquées est plus élevée. Le coefficient de diffusion des molécules de polymère sera d'autant plus faible que la taille des polymères sera plus importante.

D'après la Figure 26, il semble que l'activité catalytique soit limitée par les phénomènes de transfert diffusif des macromolécules. La formation des oligosaccharides semble être due essentiellement à une activité catalytique en surface de la membrane. Les molécules d'oligosaccharides et de cellobiose ainsi formées peuvent diffuser plus facilement à l'intérieur de la membrane pour y être hydrolysées en glucose. En utilisant une membrane très peu chargée en enzyme, peu de molécules d'oligosaccharides et de cellobiose sont formées dans les premières minutes de la réaction, d'où une production de glucose quasiment nulle au départ. Au fur et à mesure de la réaction les molécules produites diffusent à l'intérieur de la membrane, vers de nouveaux sites catalytiques.

Cependant, pour confirmer cette hypothèse, des études portant sur l'influence de la surface et de l'épaisseur de la membrane et sur l'hydrolyse en présence d'exoglucosidases immobilisées, doivent être réalisées.

Pour des concentrations d'enzyme plus élevées de 200 mg et 500 mg par cm³ de membrane, on observe une vitesse initiale d'hydrolyse plus élevée (Figure 26). Mais cette vitesse diminue rapidement (Figure 28) mettant en évidence un phénomène de limitation. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

- une inhibition de l'enzyme par un produit d'hydrolyse

- une "carence" en β -glucosidase qui ne donnerait pas la possibilité d'hydrolyser en glucose la cellobiose au fur et à mesure de son apparition. Cependant, si seule une "carence" en cette enzyme existait, nous observerions vraisemblablement une vitesse de production de glucose limitée à une vitesse maximale donnée, tous les sites enzymatiques de la β -glucosidase étant saturés. Or la diminution nette de la vitesse de production de glucose semble indiquer une inhibition de la catalyse par un produit. Le manque de sites " β -glucosidase" pourrait provoquer une accumulation de cellobiose formé par les exocellulases, cette accumulation engendrant une inhibition du système cellulasique en amont de la chaîne de catalyse.

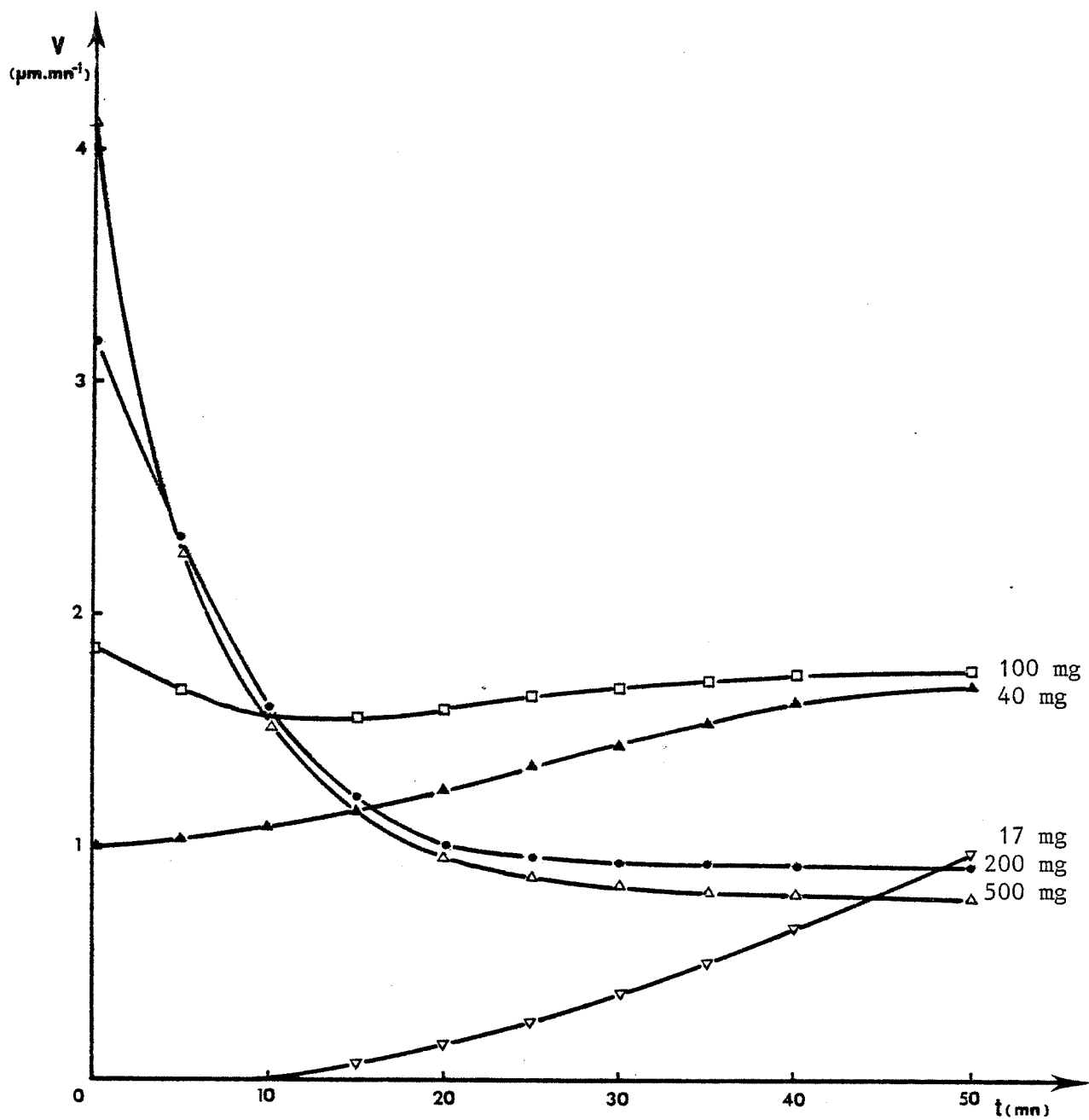


Figure 28 : Variations des vitesses d'hydrolyses en fonction de la charge enzymatique des membranes.

La levée de cette hypothèse ne pourra se faire qu'en étudiant le comportement de réacteurs à cellulase immobilisée et de réacteurs à cellulase et β -glucosidase co-immobilisées. Le suivi de ces réactions sera fait en dosant simultanément la cellobiose et le glucose formés par chromatographie haute pression. Le glucose étant également dosé en parallèle par pH-stat.

4.8. INFLUENCE DE L'ÉPAISSEUR ET DE LA SURFACE DE LA MEMBRANE.

4.8.1. Influence de l'épaisseur de la membrane

En cinétique homogène, la vitesse de réaction s'exprime selon l'expression :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Cette vitesse de réaction étant fonction du rapport $\frac{[S]}{K_m}$ pour un système enzymatique donné.

Dans le cas d'une membrane enzymatique d'épaisseur e , perméable au substrat, la variation de la concentration en substrat sera une composante entre sa variation liée au phénomène de catalyse et sa variation liée aux phénomènes de diffusion.

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[S]}{dt} \text{ (réaction enzymatique)} + \frac{d[S]}{dt} \text{ (diffusion)} \quad (2)$$

Le terme $\frac{d[S]}{dt}$ de la réaction enzymatique est donné par l'équation de MICHAELIS et MENTEN :

$$\frac{d[S]}{dt} = - \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

et le terme de diffusion est régi par la deuxième loi de FICK :

$$\frac{d[S]}{dt} = D_S \frac{d^2[S]}{dx^2} \quad (4)$$

où D_S est le coefficient de diffusion du substrat et où x représente la distance d'un point M , au plan médian de la membrane, comme schématisé sur la Figure 29 :

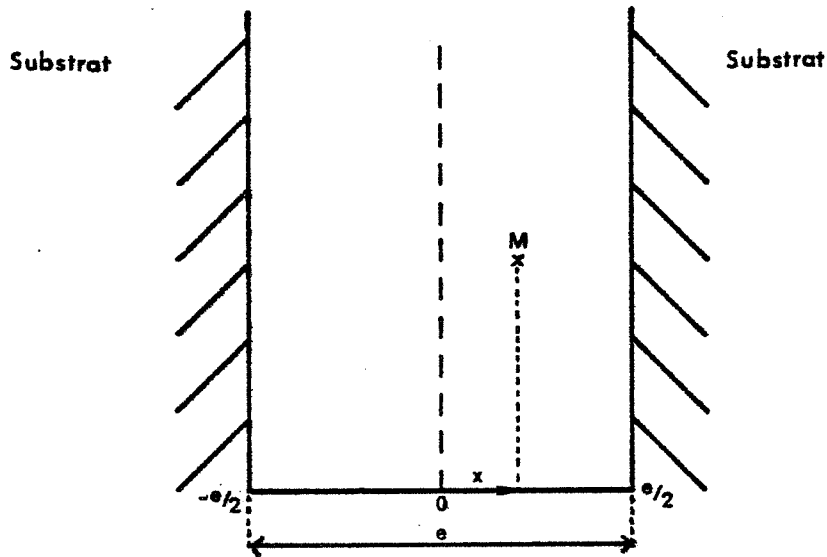


Figure 29 : Représentation schématique de la membrane.

Le système global est donc défini par l'équation :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[S]}{dt} = - \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} + D_S \frac{d^2[S]}{dx^2} \\ \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} + D_P \frac{d^2[P]}{dx^2} \end{array} \right.$$

avec D_P , coefficient de diffusion du produit dans la membrane.

La résolution de ce système d'équations permet de calculer les profils de concentration du substrat et du produit à l'intérieur du support. Ceci en supposant que la concentration du substrat à la surface de la membrane est identique à sa concentration dans la solution et que le rapport $\frac{d[S]}{dx} = 0$ à l'interface support/solution.

Lorsque le milieu est identique de part et d'autre de la membrane, définie par deux parallèles, le profil des concentrations internes est symétrique et peut se représenter selon le schéma donné par la Figure 30.

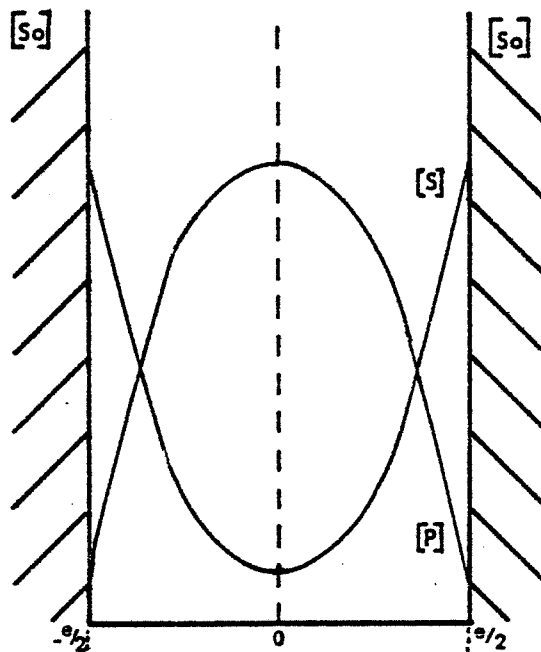


Figure 30 : Profil des concentrations en substrat et produit dans la membrane.

En pratique on ne connaît que les concentrations $[S_0]$ du substrat $[P]$ du produit à l'interface solution/membrane.

Il est possible de résoudre ce système d'équations en utilisant l'analyse de FOURIER, comme l'a montré F. CONRAD [116] .

Deux membranes enzymatiques sont réalisées sur du tissu nylon présentant une surface identique de 20 cm^2 et une même concentration d'enzyme par unité de volume.. L'une des membranes a une épaisseur égale à 2,5 fois l'épaisseur de la seconde membrane. (1 mn et 0,4 mn).

Les réactions d'hydrolyse sont effectuées à une température de 45°C et un pH de 5,10, avec une concentration de substrat de 5 g/l.

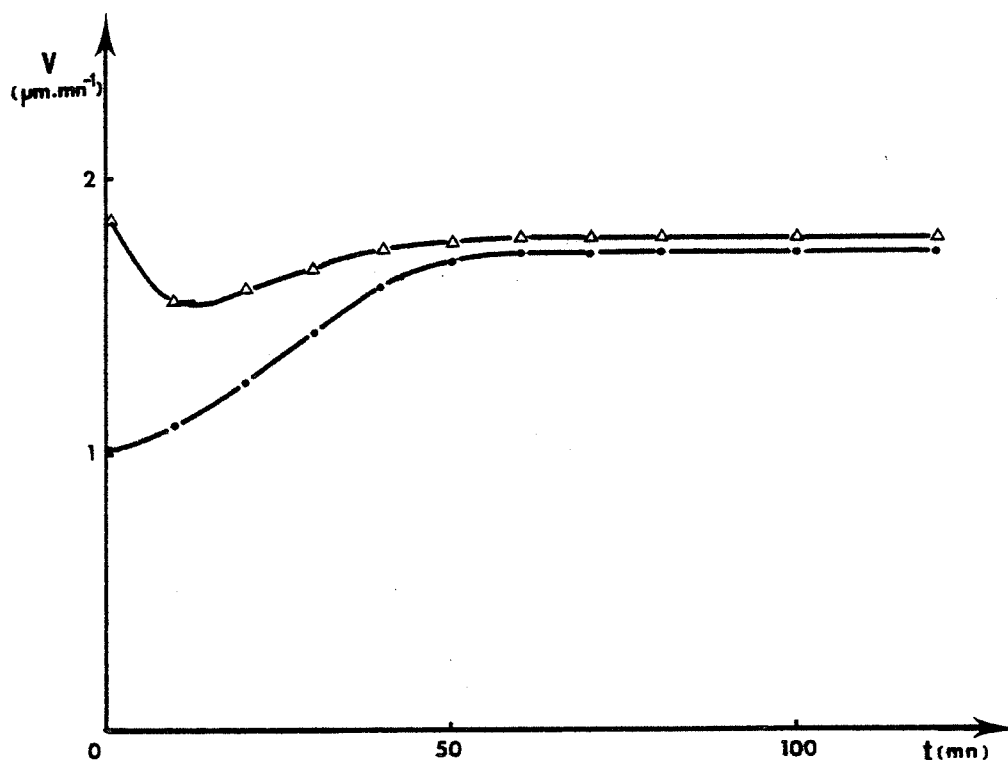
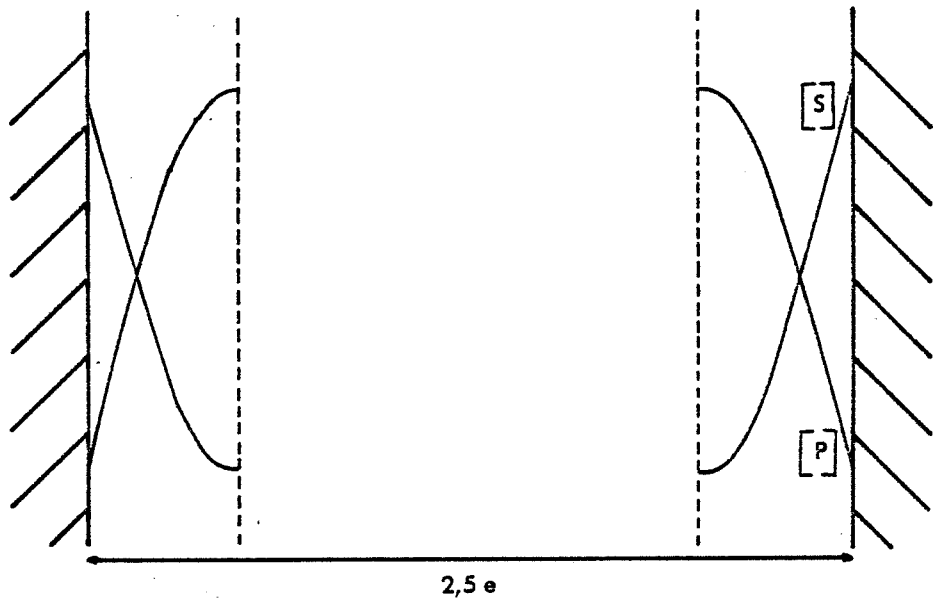
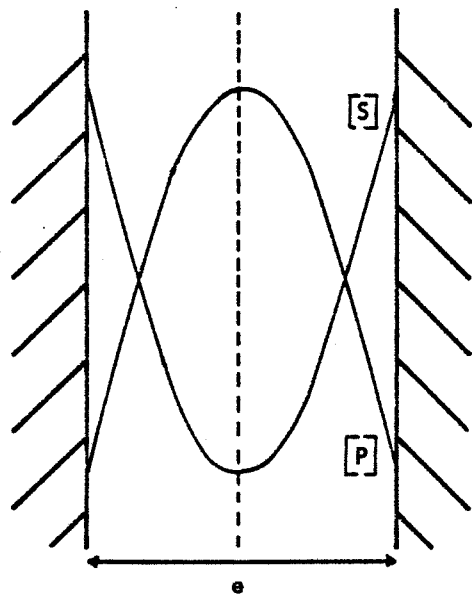


Figure 31 : Influence de l'épaisseur de la membrane.

$\bullet e=0,4\text{mm}$, $\Delta e=1\text{mm}$

Nous constatons sur la Figure 31 que l'augmentation de l'épaisseur de la membrane influence peu la vitesse de formation du glucose, à l'état stationnaire. Celle-ci, plus élevée pendant les cinquante premières minutes, se stabilise par la suite à une valeur proche de celle obtenue avec une membrane moins épaisse. Il existe donc une zone où la concentration en substrat semble devenir nulle à une certaine distance de l'interface support-solution, distance au delà de laquelle les molécules d'enzyme sont



Figures 32 et 33 : Comparaisons des profils des substrats et produits dans 2 membranes d'épaisseurs différentes :

Fig. 32 : $e = 0,4$ mm

Fig. 33 : $e = 1$ mm

totalelement inopérantes, formant en quelque sorte une zone "gelée" (Figures 32 et 33), le substrat est totalement transformé lorsqu'il arrive au niveau de cette zone.

Ceci met en évidence les phénomènes de limitation diffusionnelle. Ces phénomènes se traduisent par l'établissement d'un gradient de concentration pour les substrats et les produits de la réaction. Ainsi la vitesse de la réaction enzymatique sera donc variable en tout point de la membrane et sera fonction de la concentration en substrat en chaque point, au niveau de l'enzyme. De ce fait, en certains points de la membrane, l'enzyme agira à des concentrations en substrat très inférieures à la concentration de substrat dans la solution, ce qui se traduira par une augmentation artificielle de la constante de MICHAELIS pour l'enzyme immobilisée.

La représentation de l'équation de MICHAELIS et MENTEN par la transformée de LINEWEAVER-BURK, classique en catalyse enzymatique en phase homogène, ne peut donc être représentative d'une catalyse en phase hétérogène où la valeur de la constante de MICHAELIS, K_m , est modifiée par les phénomènes de diffusion. Cette méthode n'est plus valable car les hypothèses de base ne sont plus vérifiées, comme l'a confirmé G.K. LEE en 1981. [117].

4.8.2. Influence de la surface

Deux membranes enzymatiques de même concentration en enzyme sont coulées sur du tissu nylon présentant des surfaces différentes. La réaction d'hydrolyse est alors conduite dans les conditions opératoires décrites précédemment dans le paragraphe 3.8.1.

La Figure 34 montre que la vitesse d'apparition du glucose dépend de la surface de la membrane employée. Ces résultats obtenus en faisant varier l'épaisseur et la surface de la membrane tendent à mettre en évidence que l'activité catalytique en surface est importante dans le cas de l'hydrolyse de la cellulose par enzyme immobilisée. Il sera donc préférable de réaliser un réacteur muni de plusieurs membranes disposées

en parallèle, contenant une charge enzymatique totale E_0 que de réaliser un réacteur muni d'une seule membrane chargée de cette même quantité d'enzyme E_0 . Un essai d'hydrolyse dans un réacteur muni de 2 membranes nous a confirmé les résultats obtenus sur la Figure 34.

Des résultats similaires quant à l'influence de l'épaisseur et de la surface de la membrane ont été remarquées par V.BILHOU-BOUGNOL en 1976 [118], dans son étude sur la décomposition de l'eau oxygénée par la catalase immobilisée sur support.

5 - HYDROLYSE DE LA CELLULOSE PAR UNE MEMBRANE CONTENANT UNIQUEMENT DES EXOCELLULASES

Comme nous l'avons mentionné dans le premier chapitre, la cellulase est un complexe multi-enzymatique composé :

- d'endoglucanases ou (endo-cellulases) qui coupent "au hasard" les liaisons glycosidiques β -1-4 entre les résidus glucose, à l'intérieur de la chaîne cellulosique, formant ainsi des cello-oligosaccharides.

- d'exoglucanases qui coupent les molécules de cellulose et de cello-oligosaccharide à l'extrémité non réductrice des chaînes. Parmi elles, les β 1-4-glucohydrolases libèrent des résidus glucose, un par un, à partir des chaînes d'oligosaccharide fermées, les cellobiohydrolases libèrent, quant à elles, des résidus cellobiose.

- de β -glucosidase ou cellobiase, qui scinde la molécule de cellobiose en glucose.

Les exoglucanases et la β glucosidase forment les exo-cellulases *Trichoderma viride* (Maxazyme) commercialisée par GIST-BROCADES. La séparation de ces exoglucosidases a été effectuée au Laboratoire du Professeur PERCHERON, à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

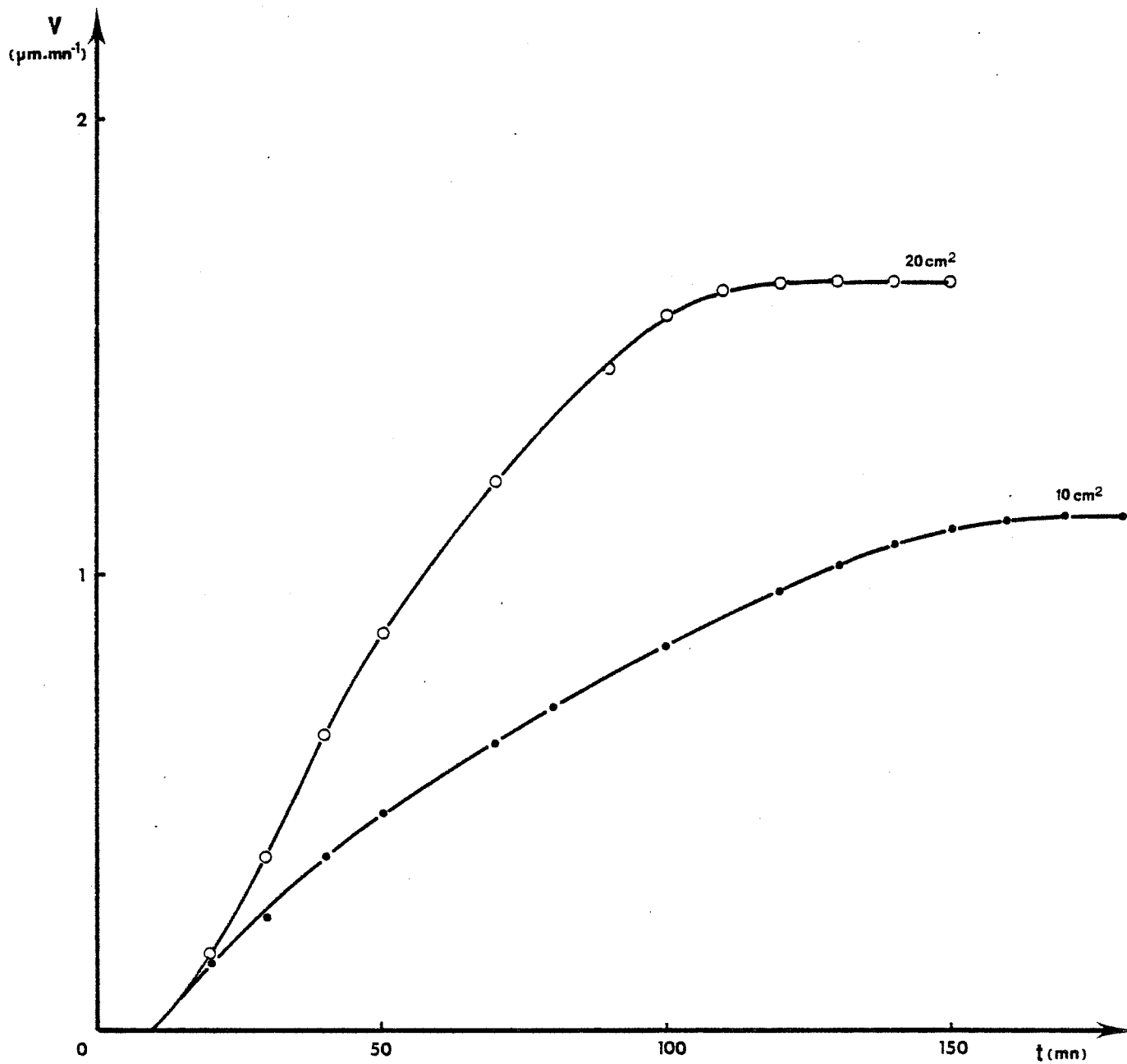
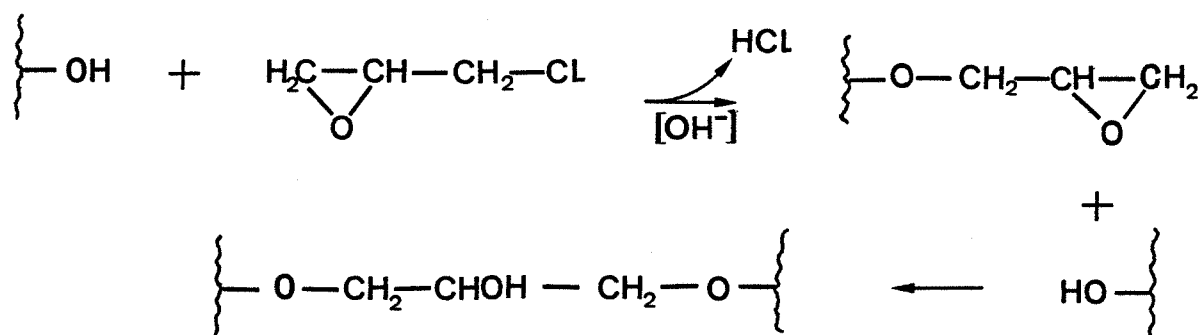


Figure 34 : Influence de la surface de la membrane.

de Paris VI. La méthode mise en œuvre a été décrite précédemment dans des compte-rendus d'étude publiés en 1977 et 1980 [119], [120]. Cette méthode consiste à isoler l'enzyme sur son propre substrat réticulé par de l'épichlorhydrine qui réalise la jonction entre les chaînes cellulosiques par des ponts tricarbonés, selon le schéma suivant :



Selon le principe de cette méthode de chromatographie, seules les endopolysaccharidases sont retenues par affinité sur le substrat réticulé alors que les exopolysaccharidases ne reconnaissent pas ce substrat modifié. Les exoglucanases et la β -glucosidase ne se fixent pas sur le support réticulé.

Les exocellulases ainsi obtenues sont fixées sur membrane nylon en présence d'albumine et de glutaraldéhyde, selon les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'immobilisation du complexe cellulosique. Les réactions d'hydrolyse sont également poursuivies dans des conditions identiques à celles décrites précédemment, mais avec une concentration de substrat de 0,5 g/l.

Durant ces réactions nous avons observé une légère réponse du pHstat. Au bout de 90 h de réaction, nous avons atteint une concentration maximale de glucose de 0,1 g/l soit un taux d'hydrolyse maximale de 20 %. Comparativement, pour des mêmes concentrations en substrat, nous avons atteint des taux d'hydrolyse variant de 72 % à 82,4 %, selon les essais en

5 heures d'hydrolyse, avec des membranes contenant le complexe cellulosique dans son intégralité. En utilisant la fraction exocellulosique en solution, ce taux d'hydrolyse a été atteint en 11 heures.

Il apparaît donc qu'en l'absence des endocellulases, la cellulose n'est que très partiellement attaquée et ceci d'autant plus lorsque les exocellulases sont immobilisées.

6 - HYDROLYSE DE LA CELLULOSE EN PRESENCE D'UN SYSTEME CELLULASE/ β -GLUCOSIDASE CO-IMMOBILISEES SUR UNE MEME MEMBRANE

Nous avons vu sur la Figure 26 (paragraphe 4.7) que pour un même type de membranes, l'augmentation de la concentration en enzyme n'entraînait pas une augmentation de la vitesse d'hydrolyse comme nous aurions pu le penser. Contrairement à cela, pour des membranes fortement chargées, la vitesse initiale décroît rapidement vers une vitesse nettement plus faible que celle existant pour des membranes peu chargées. Il semble donc se produire un phénomène d'inhibition.

Ces observations sur l'influence de la quantité d'enzyme par unité de volume membranaire corroborent les études réalisées sur un capteur enzymatique par J. BEAUX en 1983 [121]. Ces études mettaient en évidence la présence d'une "zone gelée" (Figures 35 et 36) sur l'interface capteur/membrane, zone dans laquelle l'enzyme ne travaille pas, la concentration en substrat étant devenue pratiquement nulle bien avant d'avoir atteint l'interface capteur/membrane.

Les études suivantes ont été conduites en utilisant des membranes fortement chargées en cellulase (25 mg/cm³). Deux lots de membranes ont été réalisés :

- des membranes contenant 500 mg de cellulase de *Trichoderma viride*.

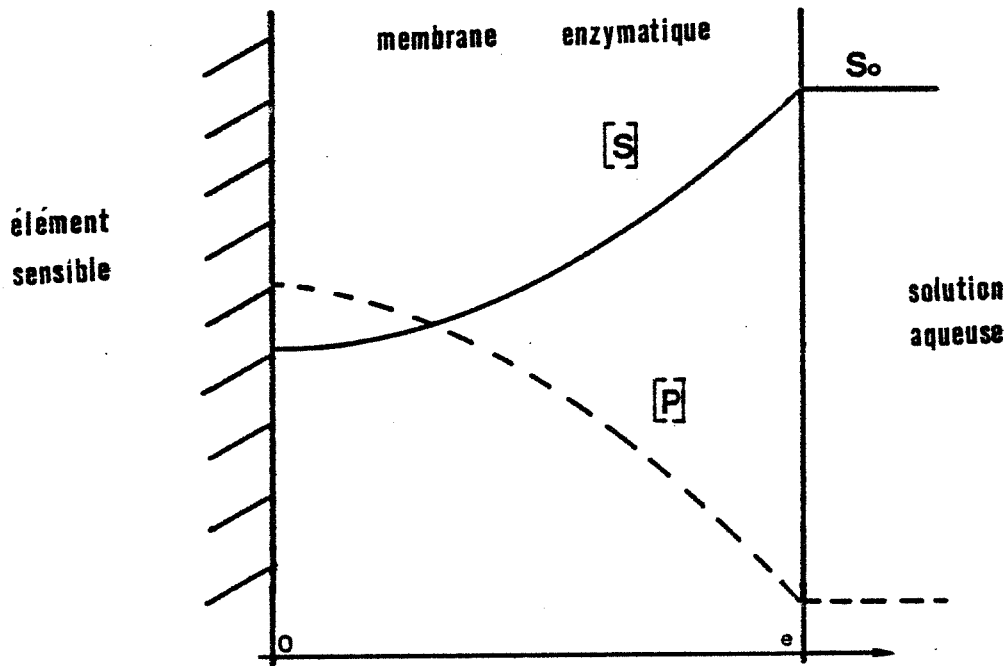


Figure 35 : Profils des concentrations des substrats et des produits à l'intérieur d'une membrane enzymatique de faible activité.

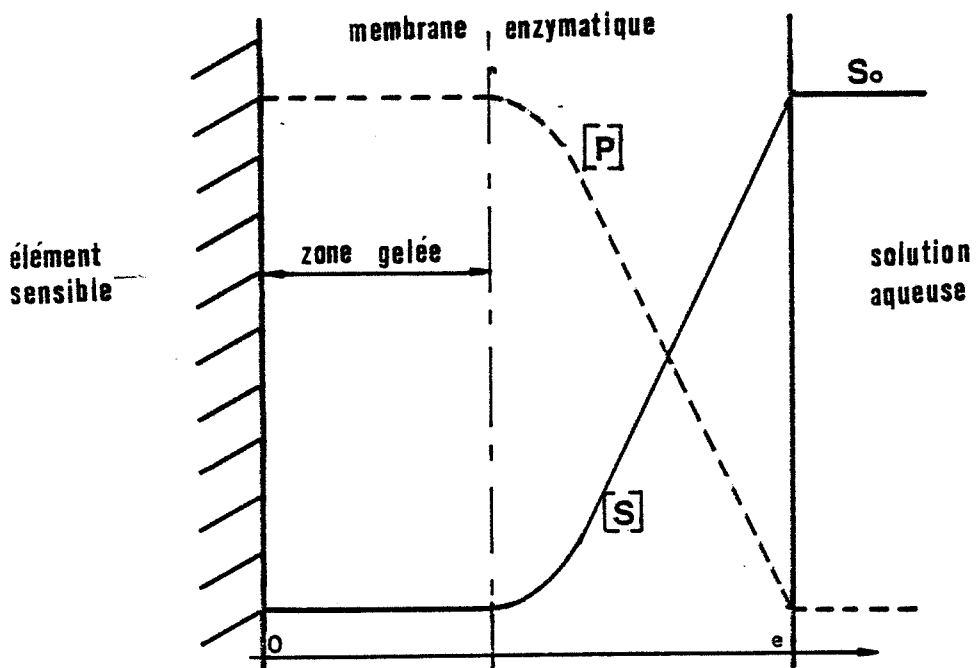


Figure 36 : Profils des concentrations des substrats et produits à l'intérieur d'une membrane enzymatique de forte activité.

- des membranes contenant 500 mg de cellulase de *Trichoderma viride* co-immobilisées avec 200 mg de β -glucosidase.

Les résultats d'hydrolyse sont rassemblés sur les Figures 37 et 38. Le glucose et le cellobiose sont dosés par HPLC et les sucres réducteurs (glucose, cellobiose, oligosaccharides) par le réactif dinitrosalicylique (DNS).

En absence de supplémentation en β -glucosidase, on observe une accumulation de cellobiose accompagnée d'une diminution de la vitesse de production en glucose dans le temps (Figures 37 et 38). La vitesse est inversement proportionnelle à la concentration en cellobiose $v = \frac{k}{[\text{cellobiose}]}$ comme on le voit sur le tableau III.4, ce qui montre l'effet inhibiteur du cellobiose.

!	!	!	!	!	!	!	!	!	!
!	cellobiose	!	!	!	!	!	!	!	!
!	g/l	!	0,18	!	0,24	!	0,30	!	0,35
!	!	!	!	!	!	!	!	!	!
!	!	!	!	!	!	!	!	!	!
!	V $\mu\text{mole mm}^{-1}$!	2,61	!	1,97	!	1,53	!	1,31
!	!	!	!	!	!	!	!	!	!
!	!	!	!	!	!	!	!	!	!
!	k. 10^7	!	4,70	!	4,74	!	4,60	!	4,59
!	!	!	!	!	!	!	!	!	!
!	!	!	!	!	!	!	!	!	!

Tableau III.4: Evolution de la vitesse de formation du glucose en fonction de la concentration en cellobiose.

Par contre, en présence des deux systèmes enzymatiques co-immobilisés, la concentration en cellobiose tend vers une valeur très faible voisine de 15 mg/l, alors que la production de glucose tend vers une vitesse constante de 4,50 μmole par minute. L'ajout de faibles quantités de cellobiose dans le milieu réactionnel, provoque une augmentation de la vitesse d'apparition du glucose. Cette vitesse maximale est donc fonction

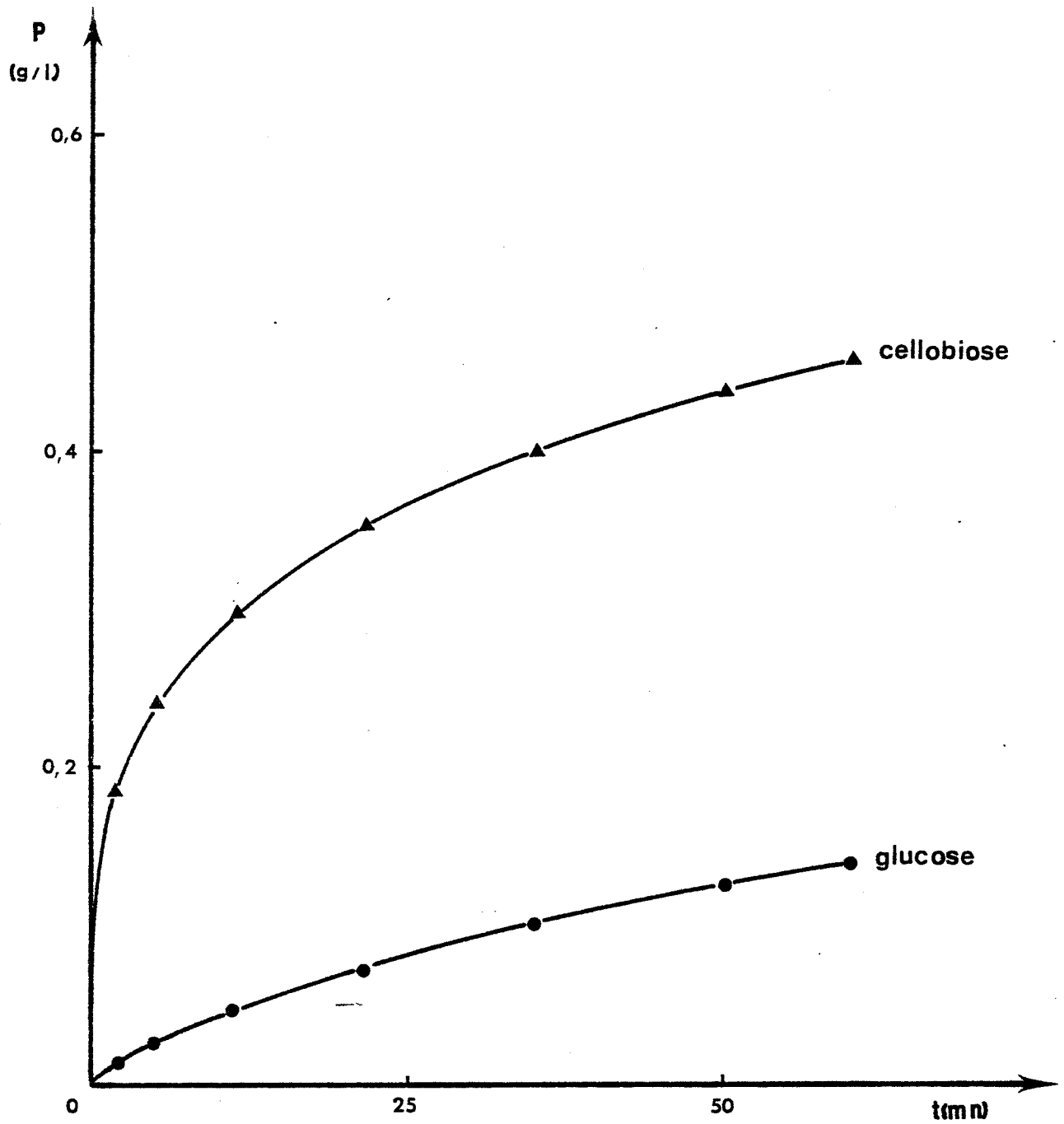


Figure 37 : Hydrolyse de la cellulose par la cellulase de *Trichoderma viride* immobilisée seule.

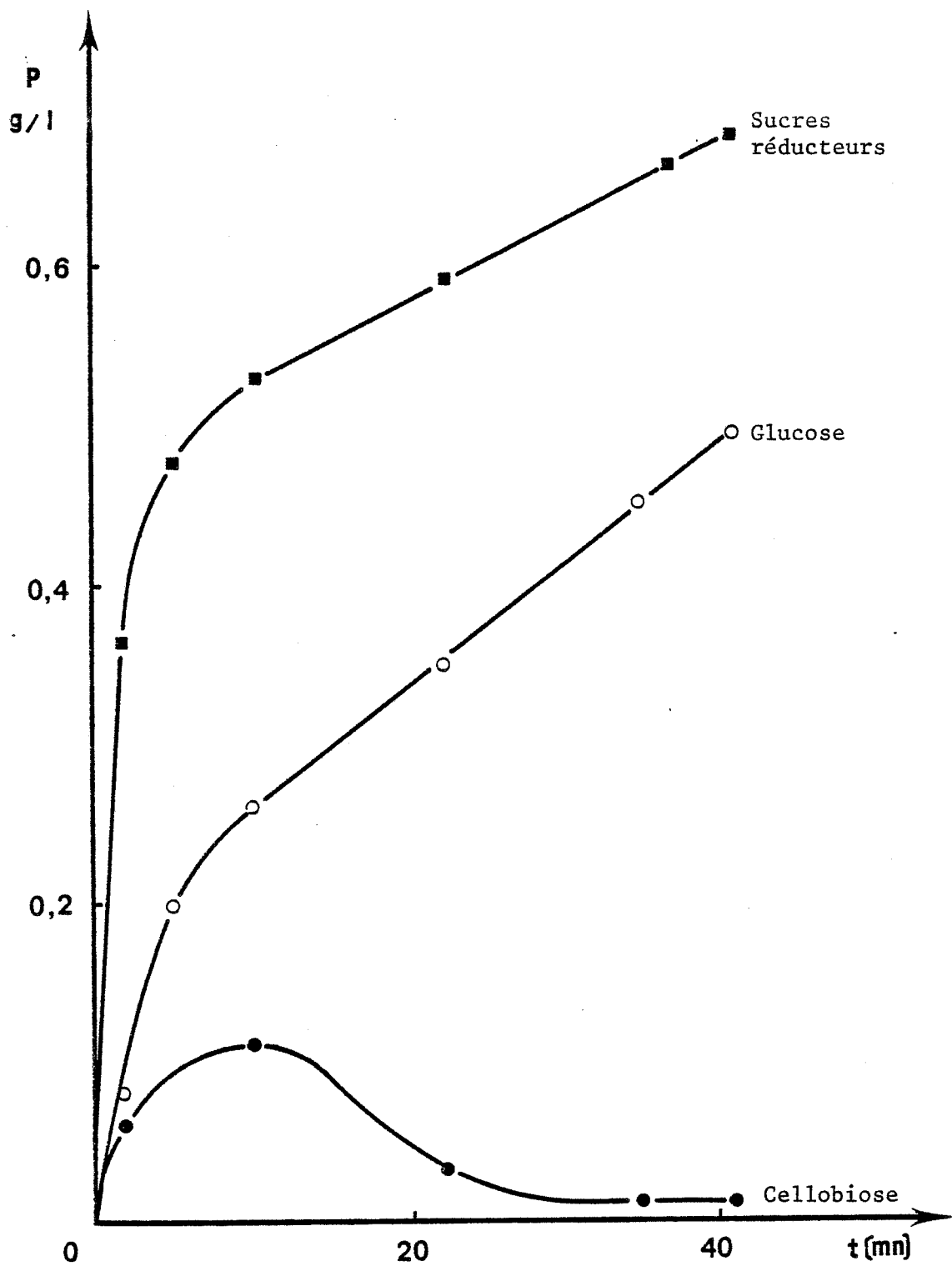


Figure 38 : Hydrolyse de la cellulose par cellulase et β glucosidases immobilisées

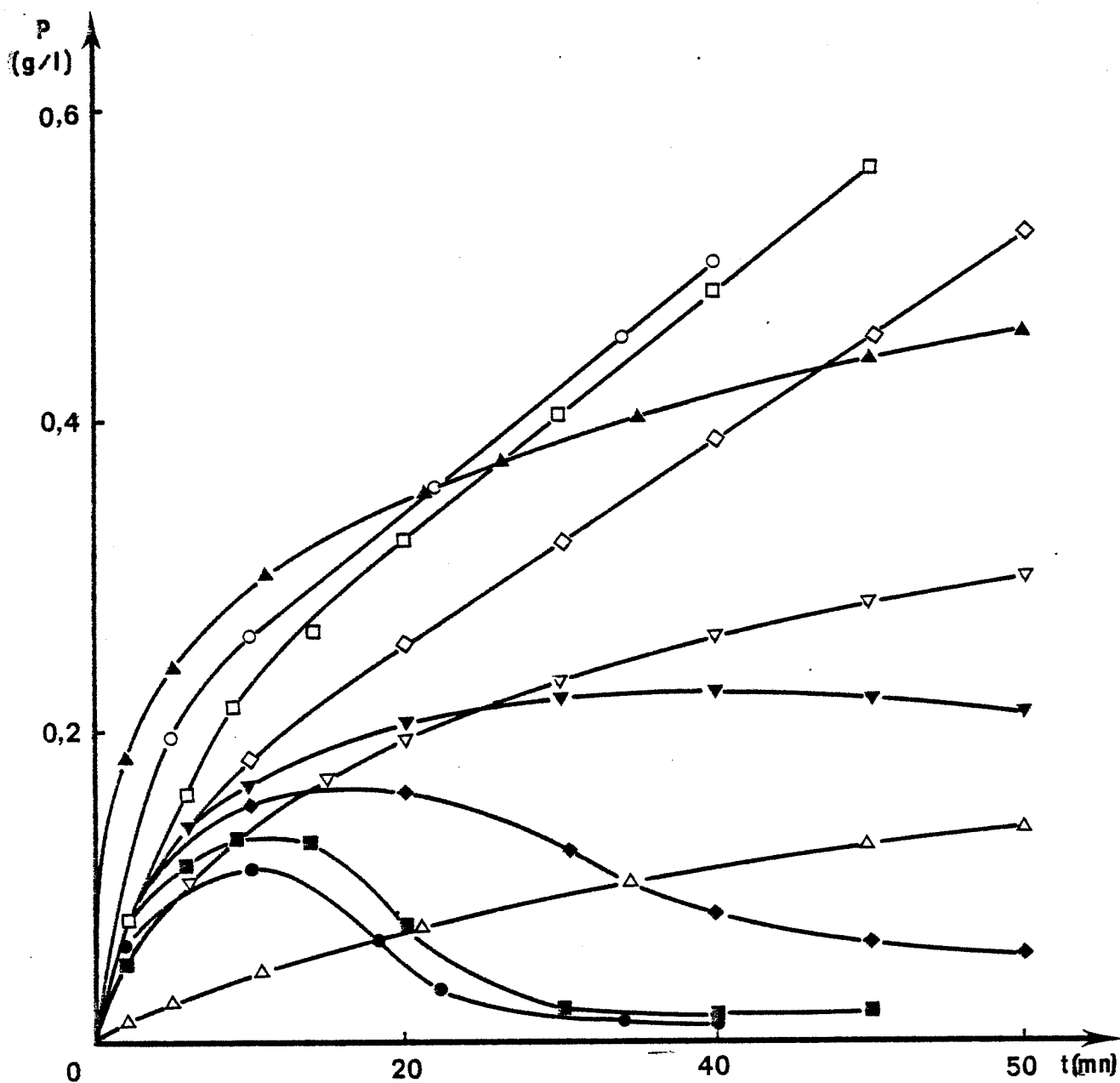


Figure 39 : Influence du rapport β -glucosidase/cellulase sur l'accumulation de glucose et de cellobiose au cours de l'hydrolyse.

cellulase seule :	\triangle glucose	\blacktriangle cellobiose
$E_1/E_2 = 0,02$	∇ glucose	\blacktriangledown cellobiose
$E_1/E_2 = 0,1$	\diamond glucose	\blacklozenge cellobiose
$E_1/E_2 = 0,2$	\square glucose	\blacksquare cellobiose
$E_1/E_2 = 0,4$	\circ glucose	\bullet cellobiose

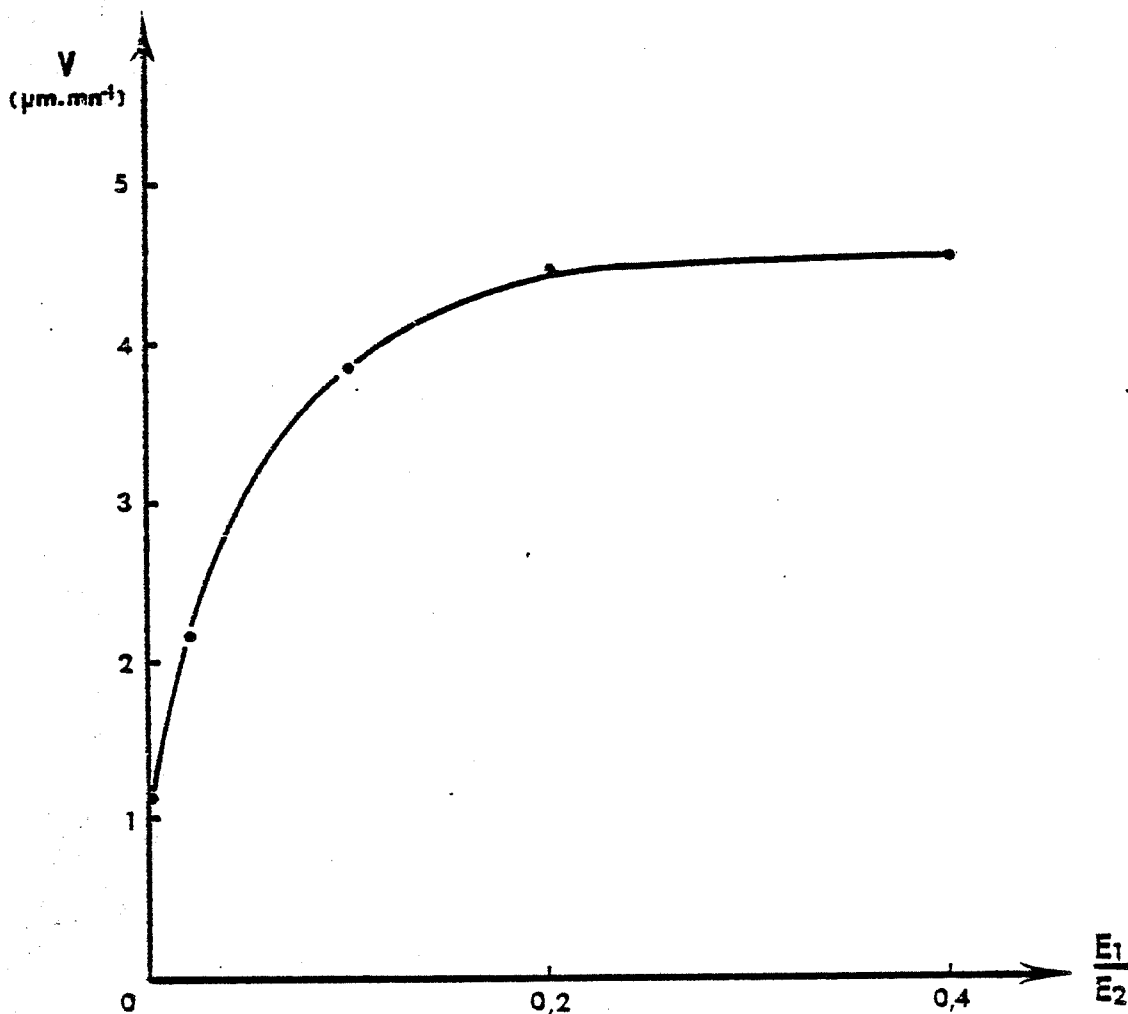


Figure 40 : Influence du rapport β -glucosidase/cellulase sur la vitesse de production de glucose

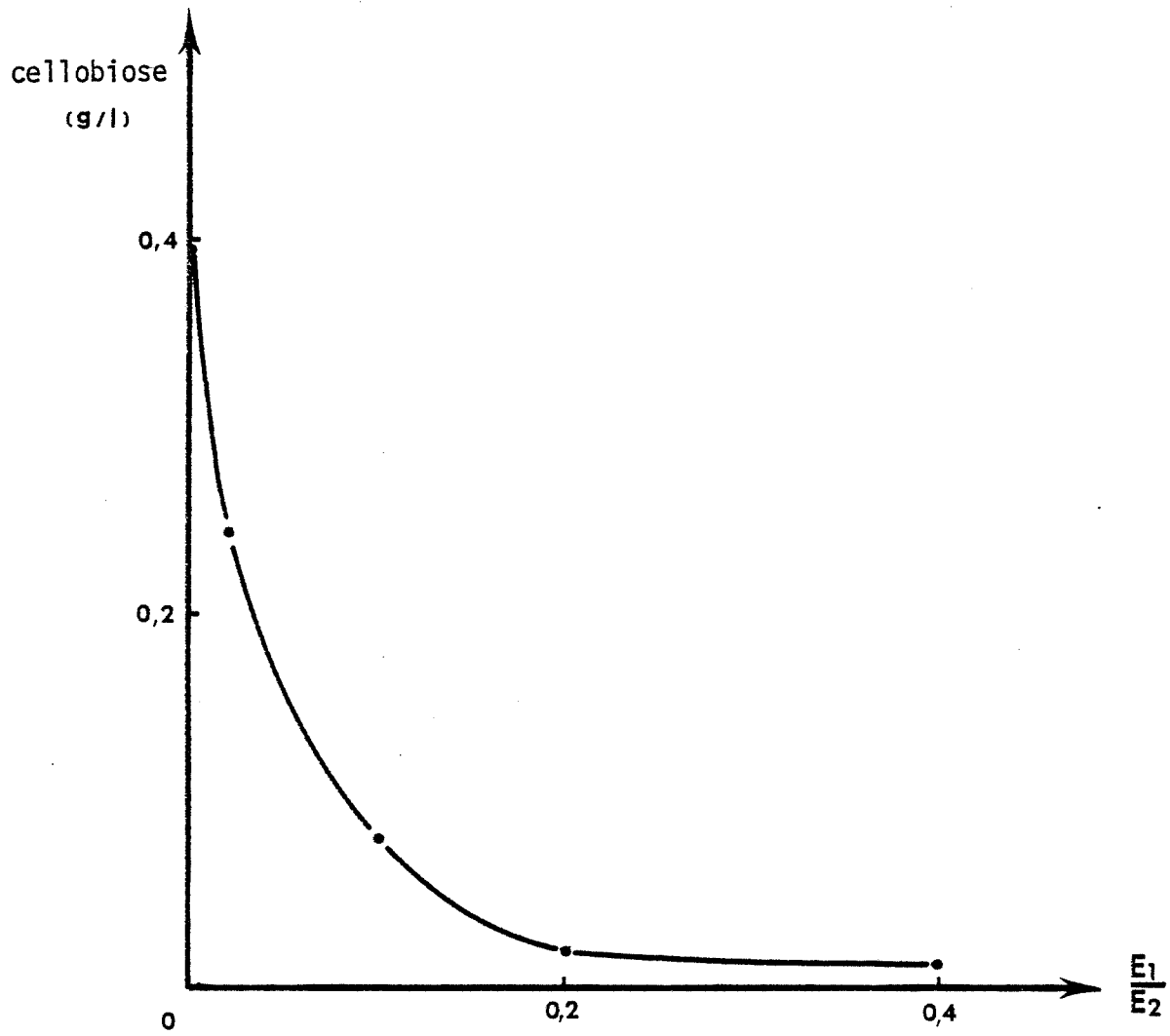


Figure 41 : Influence du rapport β -glucosidase/cellulase sur l'accumulation de cellobiose.

de l'alimentation en cellobiose, et par conséquent, limitée par la vitesse d'hydrolyse de la chaîne cellulosique par les endocellulases.

L'ajout de β -glucosidase sur la membrane permet donc de diminuer la concentration en cellobiose et par conséquent de lever l'inhibition de la cellulase due à cette accumulation en cellobiose.

Ceci étant, il reste cependant à déterminer le rapport optimal cellulase/ β -glucosidase permettant d'avoir une vitesse de production de glucose maximale. Pour cela nous avons réalisé plusieurs membranes contenant des rapports cellulase/ β -glucosidase croissants.

Les résultats obtenus sont résumés sur la Figure 39, où sont portées les concentrations en glucose et cellobiose en fonction du temps pour les différents essais. Les vitesses d'apparition du glucose semblent peu différentes pour les valeurs des rapports 2,5 et 5 des deux enzymes. Ces résultats sont plus nets sur la Figure 40 donnant la vitesse stationnaire d'apparition du glucose en fonction de ce rapport. L'optimisation d'une telle membrane semble être l'emploi d'une membrane cellulase/ β -glucosidase co-immobilisées dans les rapports 5/1 (Figures 40 et 41).

CONCLUSION

La cellulase, catalyseur biologique spécifique de la réaction d'hydrolyse des liaisons β -glucosidique, peut être utilisée en solution ou sous forme fixée.

Cependant, le rendement d'un réacteur à cellulase immobilisée peut être nettement amélioré, d'une part par l'augmentation de la surface des membranes enzymatiques et d'autre part par l'utilisation de membranes à cellulase et β -glucosidase co-immobilisées.

L'addition de la β -glucosidase dans la membrane enzymatique permet de transformer le cellobiose en glucose au fur et à mesure de sa formation, évitant ainsi l'accumulation de cellobiose au niveau des sites enzymatiques de la cellulase et par conséquent, supprimant l'effet inhibiteur du cellobiose. L'ajout de β -glucosidase dans la membrane dans un rapport de 1 à 5 avec la cellulase permet d'augmenter la vitesse d'hydrolyse d'un facteur de 4,5, et par conséquent, de diminuer le temps de séjour dans le réacteur, ce qui se traduit par une augmentation de la productivité.

La supplémentation en β -glucosidase a également un effet sur le maintien de l'activité de la membrane au cours du temps. Après quinze jours d'immobilisation, l'activité résiduelle d'une membrane cellulasique n'est que de 20 % environ de son activité initiale alors que l'activité résiduelle d'une même membrane supplémentée en β -glucosidase est de 60 % de son activité de départ.

CONCLUSION



Ce travail se veut être une contribution à l'étude des différentes possibilités de revalorisation des matériaux ligno-cellulosiques. Son objectif n'est pas de substituer entièrement l'hydrolyse de la cellulose par enzymes fixées à tout autre procédé de traitement de la cellulose, les méthodes variées actuellement à l'étude pouvant être complémentaires afin d'obtenir un produit final correspondant à la meilleure revalorisation du substrat initial.

L'étude de l'activité de la cellulase immobilisée sur support nous a permis de montrer que l'hydrolyse de la cellulose par enzymes fixées est envisageable.

L'obtention d'un substrat amorphe est une étape importante dans ce processus. Elle permet d'augmenter considérablement la vitesse de production de glucose, tout en permettant d'obtenir des taux d'hydrolyse avoisinant les 85 %. Le prétraitement chimique en présence d'acide phosphorique ne semble donc pas causer d'importantes réversions des sucres, contrairement aux résultats obtenus lors d'une hydrolyse acide. De plus, ce prétraitement évite l'utilisation de produits contenant des métaux lourds généralement utilisés pour la solvatisation de la cellulose, les métaux lourds étant souvent inhibiteurs des enzymes.

Ce prétraitement a été réalisé sur une cellulose contenant un pourcentage de cellulose cristalline très élevé. Une étude plus approfondie sur ce prétraitement pourrait sans doute permettre d'améliorer son efficacité et également de l'optimiser en fonction des substrats initiaux utilisés, substrats dont le degré de cristallinité peut être très variable d'une source à une autre.

L'étude du comportement de la cellulase immobilisée nous a permis de déterminer les paramètres d'optimisation d'un tel système. L'influence du taux de glutaraldéhyde dans la membrane et de la surface de contact entre l'enzyme et la solution sont deux éléments importants. Cependant, le facteur essentiel limitant l'activité enzymatique d'une telle membrane est la "déficience" en β -glucosidase du complexe de *Trichoderma viride*. De plus, les expériences sur la durée de vie de la membrane enzymatique nous ont montré que, malgré son immobilisation, la β -glucosidase du complexe cellulasique perd rapidement son activité.

La co-immobilisation de la cellulase avec la β -glucosidase nous a permis d'augmenter considérablement l'activité et la stabilité de la membrane enzymatique. L'étude des rapports des concentrations de ces deux enzymes dans la membrane nous a permis de définir les conditions permettant d'obtenir une membrane présentant une activité optimale.

L'utilisation d'un réacteur à cellulase immobilisée pour l'hydrolyse de la cellulose permet d'une part de pouvoir réutiliser l'enzyme après son fonctionnement, ceci en économisant l'étape de séparation enzyme/produits, obligatoire dans le cas d'un réacteur à enzymes libres. D'autre part, un tel réacteur peut permettre une production de glucose en continu, ce qui n'est pas le cas pour des réacteurs homogènes. Cependant, l'activité des cellulases actuellement disponibles sur le marché reste très faible. L'hydrolyse complète de la cellulase nécessite par conséquent un temps de séjour important dans le réacteur. Or l'optimisation de ce procédé passera nécessairement par la diminution de ce temps. Néanmoins, les progrès réalisés par les généticiens et les microbiologistes sur l'obtention de nouvelles souches hyper-productrices de cellulases et sur les enzymes elles-mêmes désensibilisées à l'action des inhibiteurs, (qui dans le cas de la cellulase, sont essentiellement les produits de la réaction) nous permettent d'envisager avec optimisme la possibilité d'un développement futur d'un réacteur à enzymes fixées pour l'hydrolyse de la cellulose.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - CHAMPETIER (G.), MONNERIE (L.) - 1969 - in *Introduction à la chimie macromoléculaire*, Ed. Masson.
- 2 - BRAUNS (F.E.), BRAUNS (D.A.) - 1960 - in *The Chemistry of Lignin*, *supplement vol.*, Ed. Acad. Press. N.Y.
- 3 - MANCIER (D.) - 1979 - *Thèse Grenoble n° 102*.
- 4 - DOREE (C.H.) - 1949 - in *Les Méthodes de la chimie de la cellulose*, Ed. Dunod.
- 5 - TSAO (G.T.) - 1978 - *J. of the Chinese Institute of Chem. Eng.*, 9, 1-8.
- 6 - HENLEY (D.) - 1961 - *Thèse Uppsala Stockholm*.
- 7 - OKAJIMA (K.) - 1979 - *Chem. Ser.*, 13, 4, 113-119.
- 8 - JOHNSON (D.C.), NICHOLSON (M.D.), HAIGH (F.C.) - 1976 - *J. of Applied Polym. Sci.*, 28, 931-943.
- 9 - THEIL (M.H.), CAVINESS (E.T.) - 1979 - *J. of Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, 17, 3, 497-513.
- 10 - TOUEY (G.P.) - 1956 - *U.S. Patent*, 2, 759, 924.
- 11 - INAGAKI (N.), NAKAMURA (S.), ASAI (H.), KATSUURA (K.) - 1976 - *J. of Applied Polym. Sci.*, 20, 2829-2836.
- 12 - MILLET (M.A.), BAKER (A.J.), SATTER (L.D.) - 1975 - *Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 5*, 193-219.
- 13 - COWLING (E.B.), KIRK (T.K.) - 1976 - *Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 6*, 95-123.
- 14 - GHARPURAY (M.M.), LEE (Y.H.), FAN (L.T.) - 1981 - *Proc. Annu. Biochem. Eng. Symp.*, 11, 1-10.

- 15 - MILLET (M.A.), BAKER (A.J.), SATTER (L.D.) - 1976 - *Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 6*, 125-153.
- 16 - HENRI (V.) - 1906 - *C.R. Acad. Sc.*, 142, 97-100.
- 17 - MICHAELIS (L.), MENTEN (M.L.) - 1913 - *Biochem. J.*, 49, 333-369.
- 18 - NELSON (J.M.), GRIFFIN (F.G.) - 1916 - *J. Amer. Chem. Soc.*, 38, 1109-1115.
- 19 - MICHEEL (V.F.), EWERS (J.) - 1949 - *Makromol. Chem.*, 3, 200.
- 20 - KATCHALSKI (E.) - 1971 - *Chem. Eng. New.*, 2, 86-87.
- 21 - MANECKE (G.) - 1972 - in *Enzyme Engineering*. Ed. Wingard L.B., Interscience Pub., 185-187.
- 22 - STARK (G.R.) - 1971 - in *Biochemical Aspects of reactions of solids supports*, Ed. Acad. Press.
- 23 - SILMAN (I.H.), KATCHALSKI (E.) - 1966 - *Annu. Rev. Biochem.*, 35, 873-908.
- 24 - KAY (G.) - 1968 - *Process Biochem.*, 3, 11, 36-39.
- 25 - ORTH (H.D.), BRÜMMER (W.) - 1972 - *Angew. Chem. Inst.*, Ed. eng., 11, 249,-261.
- 26 - SELEGNY (E.) - 1974 - in *Polyelectrolytes*, Ed. Riedel.
- 27 - BROUN (G.), AVRAMEAS (S.), SELEGNY (E.), THOMAS (D.) - 1969 - *Biochem. Biophys. Acta*, 185, 260-262.
- 28 - BROUN (G.), SELEGNY (E.), TRAN-MINH (C.), THOMAS (D.) - 1970 - *F.E.B.S. Letters*, 7, 3, 223-226.
- 29 - TRAN-MINH (C.), BROUN (G.) - 1975 - *Analytical Chem.*, 47, 1359-1364.
- 30 - BOWERS (L.D.), CARR (P.W.) - 1976 - *Analytical Chem.*, 48, 7, 544A-548A.
- 31 - DURAND (G.), MONSAN (P.) - 1982 - in *Les Enzymes Production et Utilisations industrielles*, Ed. Gauthier Villars.
- 32 - HIROHARA (H.), YAMAMOTO (N.), KAWANO (E.), NAGASE (T.) - 1980 - in *VI th. Enzyme Eng. Conf. Kashikojima Japan*.
- 33 - DOHAN (L.), BARET (J.L.), PAIN (S.), DELALANDE (P.) - 1979 - in *Vth. Enzyme Eng. Conf. Henniker*.

- 34 - BARET (J.L.) - 1982 - *C.R. des 1eres Rencontres, Internationales des Bio-industries - Nancy.*
- 35 - TOYAMA (N.), OGAWA (K.) - 1977 - *Proc. Bioconversion Symp. I.I.T., Delhi, 305-327.*
- 36 - TOYAMA (N.), OGAWA (K.) - 1977 - *Proc. Bioconversion Symp. I.I.T., Delhi, 373-386.*
- 37 - ANDREOTTI (R.E.), MANDELS (M.), ROCHE (C.) - 1977 - *Proc. Bioconversion Symp. I.I.T., Delhi, 249-267.*
- 38 - WOOD (T.M.), Mc CRAE (S.I.) - 1972 - *Biochem. J., 128, 1183-1192.*
- 39 - WOOD (T.M.) - 1971 - *Biochem. J., 121, 353-362.*
- 40 - WOOD (T.M.), PHILLIPS (D.R.) - 1969 - *Nature, 222, 986-987.*
- 41 - ERIKSSON (E.K.), RZEDOWSKI (W.) - 1969 - *Arch. Biochem. Biophys., 129, 683-688.*
- 42 - KANDA (T.), NAKAKUBO (S.), WAKABAYASHI (K.), NISIZAWA (K.) - 1978 - *J. Biochem., 84, 1217-1226.*
- 43 - WOOD (T.M.) - 1975 - *Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 5, 111-137.*
- 44 - WOOD (T.M.), Mc CRAE (S.I.) - 1982 - *J. of General Microbiol., 128, 2973-2982.*
- 45 - ERIKSSON (K.E.) - 1978 - *Biotechnol. Bioeng., 20, 317-332.*
- 46 - BERGHEM (L.E.R.), PETTERSSON (L.G.) - 1973 - *Eur. J. Biochem., 37, 21-30.*
- 47 - BERGHEM (L.E.R.), PETTERSSON (L.G.), AXIÖ-FREDRIKSSON (U.B.) - 1976 - *Eur. J. Biochem., 61, 621-630.*
- 48 - SHOEMAKER (S.P.), BROWN (R.D.) - 1978 - *J. Biochem. Biophys. Acta, 523, 133-146.*
- 49 - SHOEMAKER (S.P.), BROWN (R.D.) - 1978 - *J. Biochem. Biophys. Acta, 523, 147-161.*
- 50 - GONG (C.S.), LADISCH (M.R.), TSAO (G.T.) - 1978 - *Adv. Chem. Ser., 181, 261-288.*
- 51 - KANDA (T.), NAKAKUBO (S.), WAKABAYASHI (K.), NISIZAWA (K.) - 1978 - *Adv. Chem. Ser., 181, 211-236.*
- 52 - HALLIWELL (G.), GRIFFIN (M.) - 1973 - *Biochem. J., 135, 587-594.*

- 53 - WEBER (M.), FOGLIETTI (M.T.), PERCHERON (F.) - 1980 - *J. of Chromatogra. phy.*, 188, 377-382.
- 54 - REESE (E.T.), SIU (R.G.H.), LEVINSON (H.S.) - 1950 - *J. Bacteriol.*, 59, 485.
- 55 - REESE (E.T.) - 1976 - *Biotechnol. Bioeng. Symp. n°6*, 9-20.
- 56 - WOOD (T.M.), Mc CRAE (S.I.) - 1977 - *Carbohydrate Res*, 57, 117-133.
- 57 - PETERSSON (L.G.) - 1975 - in *Proc. Symp. Enz. Hydrol. Cellulose*, Ed. Bailey, Aulanko, Finland, 255-261.
- 58 - GHOSE (T.K.), DAS (K.) - 1971 - *Adv. Biochem. Eng.*, 1, 55-76.
- 59 - KLESOV (A.A.), RABINOVICH (M.L.), SINITSYN (A.P.), CHURULOVA (I.V.), GRIGORASH (S.Yu) - 1980 - *Bioorg. Khim.*, 6, 8, 1225-1242.
- 60 - SELBY (K.), MAITLAND (C.C.) - 1967 - *Biochem. J.*, 104, 716-724.
- 61 - EMERT (G.H.), GUM (E.K.), LANG (J.A.), LIU (T.H.), BROWN (R.D.) - 1974 - *Adv. Chem. Ser.*, 136, 79-100.
- 62 - WOOD (T.M.) - 1981 - *Conf. Ekman Days Int. Symp. Wood Pulping Chem.*, Pub. SPCI Stockholm, 3, 31-38.
- 63 - KLESOV (A.A.), RABINOVICH (M.L.) - 1980 - *Bioorg. Khim.*, 6, 9, 1377-1395.
- 64 - PETERSSON (L.G.), AXIÖ - FREDRIKSSON (U.B.), BERGHEM (L.E.R.) - 1972 - in *Proc. 4th int. Ferment. Symp.*, Ed. G. Terui, 727-729.
- 65 - NISIZAWA (K.), TOMITA (Y.) KANDA (T.), SUZUKI (H.) WAKABAYASHI (K.) - 1972 - in *Proc. 4th Int. Ferment. Symp.*, Ed. G. Terui.
- 66 - STREAMER (M.), ERIKSSON (K.E.), PETERSSON (B.) - 1975 - *Eur. J. Biochem.*, 59, 607-613.
- 67 - BISARIA (V.S.), GHOSE (T.K.) - 1981 - *Enzyme Microbiol. Technol.*, 3, 90-104.
- 68 - NISIZAWA (K.) - 1973 - *J. Ferment. Technol.*, 51, 267-304.
- 69 - OKAZAKI (M.), MIURA (Y.), MOO - YOUNG (M.) - 1982 - *Conf. Adv. in Biotechnol.*, 2, 3-8.
- 70 - KLYOSOV (A.A.), SINITSYN (A.P.) - 1980 - *Enzyme Eng.*, 5, 153-165.
- 71 - HOWELL (J.A.), STUCK (J.D.) - 1975 - *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 873-893.
- 72 - GHOSE (T.K.) - 1977 - *Adv. Biochem. Eng.*, 6, 39-76.

- 73 - LADISCH (M.R.), GONG (C.S.), TSAO (G.T.) - 1980 - *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1107-1126.
- 74 - HSU (T.A.), GONG (C.S.), TSAO (G.T.) - 1980 - *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2305-2320.
- 75 - GONG (C.S.), LADISCH (M.R.), TSAO (G.T.) - 1977 - *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 959-981.
- 76 - WOODWARD (J.), ARNOLD (S.L.) - 1981 - *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1553-1562.
- 77 - BUCHHOLZ (K.), GÖDELMANN (B.) - 1979 - *Dechema Report*, 0611-7564.
- 78 - BERGHEM (L.E.R.), PETTERSSON (L.G.) - 1974 - *Eur. J. Biochem.*, 46, 295-305.
- 79 - HONG (J.), LADISCH (M.R.), GONG (C.S.), WANKAT (P.C.), TSAO (G.T.) - 1981 - *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2779-2788.
- 80 - HUANG (A.A.) - 1975 - *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1421-1433.
- 81 - OKAZAKI (M.), MOO - YOUNG (M.) - 1978 - *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 637-663.
- 82 - HOWELL (J.A.), MANGAT (M.) - 1978 - *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 847-863.
- 83 - GUYONNET (R.) - 1978 - *Thèse Lyon n° 805*.
- 84 - DURAND (G.), MONSAN (P.) - 1974 - *C.D.I.U.P.A. Serie Synthèses bibliographiques n° 5*.
- 85 - JAMES (L.K.), AUGENSTEIN (L.G.) - 1966 - *Adv. Enzymol.*, 28, 1-40.
- 86 - Mc LAREN (A.D.), PACKER (L.) - 1970 - *Adv. Enzymol.*, 33, 245-308.
- 87 - MOSBACH (K.) - 1970 - *Acta Chem. Scand.*, 24, 2084-2092.
- 88 - HICKS (G.P.), UPDIKE (S.J.) - 1966 - *Anal. Chem.*, 38, 6, 726-730.
- 89 - CHANG (T.M.S.) - 1971 - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 1531-1537.
- 90 - CHIBATA (I.), TOSA (T.), MORI (T.) - 1972 - *Brevet Français n° 2.157.982*.
- 91 - MONSAN (P.) - 1977 - *Thèse Toulouse n° 315*.
- 92 - ZABORSKY (O.R.), OGLETREE (J.) - 1974 - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61, 210-216.

- 93 - KOCH - SCHMIDT (A.C.), MOSBACH (K.) - 1967 - *Biochemistry*, 16, 2105-2109.
- 94 - SEGAL (L.), CREELY (J.J.), MARTIN Jr (A.E.), CONRAD (C.M.) - 1959 - *Text. Res. J.*, 29, 786.
- 95 - KENNEDY (J.F.), WEETMAN (D.A.) - 1971 - *Anal. Chem. Acta*, 55, 448-449.
- 96 - MILLER (G.L.) - 1959 - *Analytical Chem.*, 31, 3, 426-428.
- 97 - MANDELS (M.), ANDREOTTI (R.), ROCHE (C.) - 1976 - *Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 6*, 21-23.
- 98 - NUESSELE (A.C.), FORD (F.M.), HALL (W.P.), LIPPERT (A.L.) - 1956 - *Text. Res. J.*, 26, 32-35.
- 99 - KATSUURA (K.), INAGAKI (N.) - 1966 - *J. Chem. Soc. Japan Ind. Chem. Sect.*, 69, 681.
- 100 - ZERONIAN (S.H.), ADAMS (S.), ALGER (K.), LIPSKA (A.E.) - 1980 - *J. of Applied Polym. Sc.*, 25, 519-528.
- 101 - VIGO (T.L.), WELCH (C.M.) - 1974 - *Carbohydrate Res.*, 32, 331-338.
- 102 - TOWLE (G.A.), WHISTLER (R.L.) - 1972 - *Methods in Carbohydrate Chem.*, 6, 408-410.
- 103 - PASCHALL (E.F.) - 1964 - *Methods in Carbohydrate Chem.*, 4, 294-296.
- 104 - ROCHE (B.), TRAN-MINH (C.) - 1983 - *C.R. Contrat DGRST n° 81.G.1038*.
- 105 - OOSHIMA (H.), SAKATA (M.), HARANO (Y.) - 1983 - *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 3103-3114.
- 106 - BEARDMORE (D.H.), LEE (Y.H.), FAN (L.T.) - 1978 - *Proc. Ann. Biochem. Eng. Symp.*, 8, 38-46.
- 107 - SASAKI (T.), TANAKA (T.), NANBU (N.), SATO (Y.) KAINUMA (K.) - 1979 - *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1031-1042.
- 108 - NYSTROM (J.) - 1975 - *Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 5*, 221-224.
- 109 - OHMINE (K.), OOSHIMA (H.), HARANO (Y.) - 1983 - *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2041-2053.
- 110 - FAN (L.T.), LEE (Y.H.), BEARDMORE (D.H.) - 1980 - *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 177-199.
- 111 - DAVID (C.), THIRY (P.) - 1981 - *Eur. Polym. J.*, 17, 357-360.

- 112 - DAVID (C.), THYRY (P.) - 1982 - *J. of Applied Polym. Sci.*, 27, 2395-2402.
- 113 - FLORKIN (M.), STOTZ (E.) - 1964 - in *Comprehensive biochemistry 12-Enzymes*.
- 114 - KRUH (J.) - 1983 - in *Biochimie*, Ed. Hermann.
- 115 - TANAKA (M.), MORITA (T.), TANIGUCHI (M.), MATSUNO (R.), KAMIKUBO (T.) - 1980- *J. Ferment. Technol.*, 58, 6, 517-524.
- 116 - CONRAD (F.) *Rapport interne 1982*.
- 117 - LEE (G.K.), LESCH (R.A.), REILLY (P.J.) - 1981 - *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 487-497.
- 118 - BILHOU - BOUGNOL (V.) - 1976 - *Thèse Saint-Etienne n° 6 C.I.*
- 119 - PERCHERON (F.), WEBER (M.) - 1977 - *C.R. de contrat DGRST n° 75-7-0538*.
- 120 - PERCHERON (F.), WEBER (M.) - 1980 - *C.R. de contrat DGRST n° 78-7-0858*.
- 121 - BEAUX (J.) - 1983 - *Thèse Grenoble*.

AUTORISATION DE SOUTENANCE

VU les dispositions de l'article 3 de l'arrêté du 16 avril 1974,

VU les rapports de présentation de MM. LARPENT et TRAN MINH

Mademoiselle Brigitte ROCHE

est autorisée à présenter une thèse en soutenance pour l'obtention
du diplôme de DOCTEUR-INGENIEUR, spécialité Génie chimique

Fait à Saint-Etienne, le 3 décembre 1984

Le Directeur de l'EMSE,



RESUME

Depuis longtemps, le bois est utilisé comme combustible, matériau de construction et dans la fabrication de pâtes à papier. Actuellement des procédés thermochimiques, biochimiques et microbiologiques permettent une valorisation du bois conduisant à l'obtention d'intermédiaires chimiques directement utilisables dans l'industrie.

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est l'une de ces méthodes. Elle conduit à l'obtention du glucose, point de départ de nombreuses synthèses chimiques dans l'industrie chimique. L'immobilisation de l'enzyme sur support insoluble permet une utilisation répétée de l'enzyme.

Cette étude met en évidence le comportement de la cellulase immobilisée vis-à-vis de son substrat. La cellulose est rendue amorphe et soluble par un traitement chimique préalable. Ensuite les différents paramètres influençant l'activité de l'enzyme immobilisée sont étudiés afin de déterminer les conditions optimales de fonctionnement d'un tel système.

MOTS-CLES

cellulose, hydrolyse, enzyme, immobilisation, cellulase, β -glucosidase.