

**REACTION ENZYMATIQUE DANS UN MILIEU TRIPHASIQUE
LIQUIDE-LIQUIDE-SOLIDE CATALYTIQUE
APPLICATION A LA RESOLUTION OPTIQUE DE LA
PHENYLALANINE**

THESE No 917 (1991)

PRESENTÉE AU DEPARTEMENT DE CHIMIE

ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES TECHNIQUES

PAR

SIMON CRELIER

Ingénieur chimiste diplômé EPF
originaire de Bure (JU)

acceptée sur proposition du jury :

Prof. A. Renken, rapporteur
Prof. E. Flaschel, corapporteur
Prof. U. von Stockar, corapporteur

Lausanne, EPFL
1991



" To do is to be "

Socrate

" To be is to do "

W. Shakespeare

" Do be do be do "

F. Sinatra

" Et des scoubidous bi-dous ... ouaaah ! "

S. Distel

" Qu'est-ce qu'ils ont dit ? "

L. van Beethoven

Les professeurs Pierre Lerch et Urs von Stockar, qui ont aimablement accepté de subir ces deux cents pages et de siéger au sein du jury.

Le comité de relecture, impitoyable pourfendeur de fôtes d'ortographe, de ponctuation sauvage, d'approximations linguistiques et de phrases dépassant deux lignes, qui a transpiré si fort en déchiffrant mes élucubrations. Merci donc à Anne Barbier-Caron, cavalière joviale et émérite (c'est la reine du haras qui rit), et surtout à Antoine Margot, qui a eu en plus la gentillesse et la patience de m'initier aux finesses du traitement de texte sur ordinateur Apple (il a plus d'un tour dans son Mac).

Monsieur Gérard Magnin, orfèvre-mécanicien (lui c'est dans son atelier qu'il a plus d'un tour) qu'on ne saurait qualifier de perfectionniste sans verser dans le pléonasme, et dont l'assistance technique au montage de l'installation et l'acharnement à sauver ma voiture de la casse sont au plus haut point dignes d'éloge (comme dit ma concierge).

L'équipe des électroniciens Pierre-André Perroud, Philippe Chevalier et Gérard Ferini, qui savent si bien s'occuper des pannes de micro et éliminer ces parasites qui nous brouillent l'écoute.

Les diplômants, qui tous ont sacrifié deux mois de leur vie à la cause noble et généreuse du génie enzymatique. Qu'ils soient rassurés, leurs efforts n'ont pas été vains. Merci donc à J.-E. Juvet, Claire Allais (Lugrin à l'époque), J.-Y. de Riedmatten et Antoine Margot (encore lui), qui m'ont précédé ou assisté dans cette étude.

Je m'en voudrais d'oublier tous les gens de la volée avec qui j'ai partagé non seulement les heures de cours (et les frais de photocopieuse), mais aussi et surtout les sorties, les brochures au bord du lac, les week-ends à Delémont ou Saxon, les séances de répétition, les fous rires, les soupers de Noël au mois de janvier, les soirées au pressoir et les contrepétories. Merci donc à eux tous, sans qui la chimie aurait pu ne jamais devenir amusante.

Finalement et en vrac (qu'elles me pardonnent), toutes les personnes que j'ai côtoyées tout au long de ces cinq années à l'institut, avec qui j'ai (aussi) travaillé, et qui ont toujours été des amis bien plus que des collègues.

Ce travail de thèse a été réalisé de mars 1986 à janvier 1991 à l'Institut de Génie Chimique de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

AVERTISSEMENT AU LECTEUR

Au moment tant attendu de mettre un terme à ce travail de thèse, un vieux fond d'honnêteté me pousse à des aveux spontanés, certes, mais terriblement tardifs. Le monde doit donc enfin être mis au courant, ou tout au moins le(s) lecteur(s): en effet l'aboutissement (le succès ?) de cette recherche, concrétisé par la débauche de résultats expérimentaux, de graphiques, de mécanismes réactionnels, d'algorithmes et d'équations cinétiques présentés dans les pages qui suivent n'est pas à porter au seul crédit de l'auteur du présent rapport. De nombreuses personnes y ont contribué, que ce soit de très près, de vachement loin, de façon consciente ou totalement subliminale, volontairement ou contraintes par la force. Il lui semble donc juste et équitable (à lui, c'est à dire l'auteur, enfin moi, quoi ...) de leur exprimer à toutes (à elles, enfin à toutes ces personnes qui ont contribué, etc ...) par ces quelques lignes une reconnaissance qu'il serait très exagéré de qualifier d'éternelle vu l'espérance de vie du chimiste moyen, mais qui n'en est pas moins vive et sincère pour autant.

Craignant cependant que certaines des personnes les plus directement concernées ne se soient pas senties interpellées (à quelque niveau que ce soit) par les lignes qui précèdent, qu'il me soit permis de remercier nommément et du fond du coeur:

Le professeur Albert K. Renken, qui m'a accueilli dans son groupe en me proposant une recherche qu'il a constamment suivie, avec l'efficacité discrète et bonhomme que tous ses doctorants lui reconnaissent et apprécient. Son mérite est de plus pratiquement doublé par ses responsabilités de chef de département, qui l'ont obligé à me lire deux fois.

Le récemment nommé professeur Erwin Flaschel, qui a eu la lourde tâche de diriger ce travail "sur le terrain" pendant quatre ans, d'en corriger le rapport final et de juger le candidat en tant que membre du jury. Sa haute compétence toujours disponible, ses talents en programmation et son sens pratique m'ont énormément aidé tout au long de ce travail, et ses verrées de fin d'année resteront des souvenirs impérissables.

RESUME

L'hydrolyse stéréosélective d'un ester racémique de phénylalanine (Phe) par une enzyme comme l' α -chymotrypsine (α -CT) est une méthode simple pour l'obtention de l'acide aminé optiquement actif sous forme L. L'application du procédé en mode continu est cependant compliquée par des problèmes de solubilité limitée, d'autohydrolyse et de transeptisation du substrat au voisinage de pH 8. Aux valeurs inférieures, plus proches de l'optimum pour l'activité de l'enzyme (entre 5.5 et 6.5), c'est le pouvoir tampon du système qui est très faible et entraîne une chute de pH importante due aux protons libérés lors de l'hydrolyse, avec pour conséquence une désactivation totale de l'enzyme. L'adjonction d'une phase organique immiscible avec l'eau permet d'extraire en partie l'ester sous forme neutre et, par action sur l'équilibre acide-base, de déplacer le maximum du pouvoir tampon vers des valeurs de pH plus favorables à l'activité enzymatique et de procéder à l'hydrolyse sans régulation de pH. Comme de plus seuls les composés neutres subissent un partage biphasique, les espèces chargées comme l'enzyme et la phénylalanine restent confinées dans la phase aqueuse où a lieu la réaction, favorisant ainsi la séparation des produits et du D-ester non réagi.

Après une première phase de sélection, on a choisi l'isobutyl-méthyl-cétone (MIBK) pour phase organique et l'ester n-propylique de phénylalanine (PAPE) pour substrat à cause de sa résistance à l'autohydrolyse, de la facilité de sa synthèse et de son affinité pour la phase organique, exprimée par un coefficient de partage P_c dans le MIBK égal à 123. Pour le propanol (PrOH), on a mesuré une valeur de P_c égale à 1.26.

La cinétique en phase aqueuse à pH constant a été étudiée en réacteur fermé et décrite avantageusement à l'aide d'un modèle qui suppose la formation d'un complexe enzyme-acyle accompagnée par la libération du n-propanol, lequel entre alors en compétition avec l'eau en tant que nucléophile pour l'étape finale de désacylation. L'acylation est l'étape limitante du processus et si les constantes de vitesse pour les deux réactions de transestérification et d'hydrolyse sont dans un rapport $k_{trans}/k_{hydr.} \approx 205$, l'hydrolyse reste quand même très largement favorisée à cause de la forte concentration d'eau dans la solution aqueuse. Les bilans de matière appliqués au partage biphasique du substrat ont permis au modèle de décrire avec succès l'influence de la fraction volumique de phase organique v_{or} .

Des hydrolyses réalisées sans régulation de pH (pH flottant) et avec l'enzyme soluble ont permis de démontrer la validité du principe de la réaction en système biphasique. Un pH initial de 6.0 et un v_{or} de 10 % seulement permettent d'obtenir une conversion totale presque aussi rapidement qu'à pH constant. Les chutes de pH enregistrées sont cependant plus importantes que celles prévues par le modèle qu'on a développé. Ceci est certainement dû à une limitation par le transfert du PAPE neutre à travers l'interface MIBK / H₂O.

Un programme de simulation tenant compte du profil d'activité de l'enzyme en fonction du pH, mais supposant l'équilibre permanent des concentrations a été développé pour les réactions à pH flottant. Il est également applicable aux hydrolyses avec l'enzyme fixée, dont l'activité montre exactement le même comportement vis-à-vis du pH.

Les résultats précédents ont mené à la mise en oeuvre d'un réacteur continu à 3 phases MIBK / H₂O / lit fixe d' α -CT immobilisée, dans lequel les conversions mesurées étaient plus faibles que celles obtenues en système fermé à pH flottant pour des temps de réaction identiques. Des essais complémentaires ont permis d'écartier l'hypothèse d'une limitation par le transfert des réactifs de la phase aqueuse vers la surface du catalyseur, et de confirmer l'hypothèse d'un transfert sévèrement limitant du PAPE neutre entre la phase organique et le milieu aqueux.

Pour des vitesses de réaction plus faibles (i.e. à des concentrations d'enzyme moins importantes), on a pu constater la validité du modèle décrivant à l'équilibre l'évolution du pH en fonction du taux de conversion.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION GENERALE.....	1
1.1 ACIDES AMINES ET PROTEINES.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Structure des protéines.....	3
1.1.3 Les acides aminés: dénomination et structure.....	4
1.1.4 Propriétés acide-base des acides aminés.....	6
1.1.5 Propriétés physiques et spectroscopiques des ac. aminés.....	10
1.1.6 Utilisation des acides aminés.....	11
1.1.7 Techniques de production.....	13
1.1.8 Le cas de la phénylalanine.....	17
1.2 ENZYMES ET SOLVANTS ORGANIQUES.....	20
1.2.1 Introduction à la problématique du sujet.....	20
1.2.2 Classification des cas de figure envisageables.....	21
1.2.3 Phase aqueuse et solvant organique miscibles.....	22
1.2.4 Systèmes biphasiques eau / solvant organique.....	23
1.2.5 Systèmes microhétérogènes: micelles inverses.....	25
1.2.6 Solvants organiques sans phase aqueuse.....	25
1.2.7 Systèmes à deux phases aqueuses non-miscibles.....	26
1.2.8 Choix du système optimal.....	26
1.3 REACTION ETUDIEE.....	28
1.3.1 Position du problème.....	28
1.3.2 Solution proposée.....	31
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 1.1.....	35
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 1.2.....	37
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 1.3.....	40
2. SELECTION ET CARACTERISATION DU SYSTEME.....	43
2.1 MATERIEL ET METHODES.....	43
2.1.1 Réactifs et produits employés.....	43
2.1.2 Méthodes d'analyse.....	45

2.1.3 Appareillage	48
2.2 AUTOHYDROLYSE DES SUBSTRATS	52
2.3 PARTAGE BIPHASIQUE DES SUBSTRATS	55
2.3.1 Titration en milieu biphasique	55
2.3.2 Théorie du partage biphasique.....	55
2.3.3 Résultats.....	58
2.3.4 Amélioration de la méthode.....	62
2.3.5 Le concept du logP.....	65
2.3.6 Choix du substrat et de la phase organique optimaux.....	69
2.3.7 Mesures complémentaires.....	71
 BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 2.....	 81
3. CINETIQUE DE L'ENZYME SOLUBLE.....	83
3.1 HYDROLYSES EN MILIEU AQUEUX A pH CONSTANT	83
3.1.1 Partie expérimentale.....	83
3.1.2 Théorie.....	86
3.1.3 Influence de l'eau et des nucléophiles.....	88
3.1.4 Mesure de l'influence de Ca^{2+}	101
3.1.5 Identification de l'étape limitante	102
3.1.6 Hydrolyse du L-PAPE	106
3.1.7 Influence du D-PAPE	109
3.1.8 Influence du contre-ion.....	112
3.1.9 Influence de la L-phénylalanine, modèle global	116
3.2 HYDROLYSES EN SYSTEME BIPHASIQUE A pH CONSTANT	121
3.2.1 Partie expérimentale.....	121
3.2.2 Fraction titrable en système biphasique.....	121
3.2.3 Adaptation du modèle cinétique.....	123
3.2.4 Résultats.....	129
3.3 HYDROLYSES EN SYSTEME BIPHASIQUE A pH FLOTTANT	134
3.3.1 Partie expérimentale.....	134
3.3.2 Théorie.....	134
3.3.3 Cinétique de la réaction à pH flottant.....	143
3.3.4 Résultats.....	147

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 3.....	158
4. HYDROLYSE DU PAPE AVEC L'ENZYME FIXEE.....	161
4.1 PARTIE EXPERIMENTALE.....	161
4.2 CARACTERISATION DE L'ENZYME FIXEE.....	162
4.2.1 Taille des particules de catalyseur.....	162
4.2.2 Porosité du lit.....	163
4.2.3 Comparaison enzyme fixée / enzyme soluble.....	166
4.2.4 Hydrolyse du racémat à pH constant.....	170
4.2.5 Influence du transfert de matière interne.....	174
4.2.6 Influence du transfert de matière externe.....	177
4.2.7 Hydrolyse en système biphasique dans le réacteur fermé.....	180
4.3 REACTION EN CONTINU.....	183
4.3.1 Essais avec le lit fixe de 25 ml.....	183
4.3.2 Essais avec le lit fixe de 4.2 ml.....	187
4.3.3 Essais avec le lit de 4.2 ml et l'enzyme diluée.....	188
4.3.4 Comparaison des résultats.....	189
4.4 IDENTIFICATION DU TRANSFERT LIMITANT.....	192
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 4.....	201
5. CONCLUSIONS, PERSPECTIVES.....	203
5.1 SYSTEME REACTIONNEL.....	203
5.2 HYDROLYSE AVEC L'ENZYME SOLUBLE.....	203
5.3 HYDROLYSE AVEC L'ENZYME FIXEE.....	204
5.4 REACTIONS CATALYTIQUES EN SYSTEME TRIPHASIQUE.....	206
5.5 PERSPECTIVES.....	206
BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 5.....	208

LISTE DES SYMBOLES UTILISES

A	Forme acide conjugué de la phénylalanine	
A_c	Terme caractéristique des inhibiteurs anticompétitifs	[-]
A_p	Surface externe des particules de catalyseur	[m^2]
B	Forme base conjuguée de la phénylalanine	
C_c	Terme caractéristique des inhibiteurs compétitifs	[-]
C_i	Concentration de l'espèce i	[$mmol \cdot l^{-1}$]
D_p	Diamètre du grain de catalyseur	[μm]
D_S	Coefficient de diffusion du substrat	[$m^2 \cdot s^{-1}$]
EA	Complexe enzyme-acyle, concentration de ...	[$mmol \cdot l^{-1}$]
E	Enzyme libre, concentration de ...	[$mmol \cdot l^{-1}$], [$g \cdot l^{-1}$], [$ml \cdot l^{-1}$]
E_i	Concentration d'enzyme sur le support solide	[$g \cdot (ml \text{ de catalyseur})^{-1}$]
ES	Complexe enzyme-substrat, concentration de ...	[$mmol \cdot l^{-1}$]
$E_o \cdot \tau$	Temps de réaction normalisé dans le réacteur tubulaire	[$ml \cdot min \cdot l^{-1}$]
$E_o \cdot t$	Temps de réaction normalisé	[$ml \cdot min \cdot l^{-1}$], [$g \cdot min \cdot l^{-1}$]
e.r.	Ecart relatif entre les bilans justes et calculés pour le propanol	[%]
F	Phénylalanine, concentration de ...	[$mmol \cdot l^{-1}$]
f_t	Fraction titrable	[-]
f_i	= S_R/S_b	[-]
H^+	Proton, concentration de ...	[$mmol \cdot l^{-1}$]
ΔH_v	Enthalpie molaire de vaporisation	[$J \cdot mol^{-1}$]
I_a	Inhibiteur de type anticompétitif, concentration de ...	[$mmol \cdot l^{-1}$]
I_c	Inhibiteur de type compétitif, concentration de ...	[$mmol \cdot l^{-1}$]
K_a	Constante de dissociation de l'acide	[$mmol \cdot l^{-1}$]
k_{ah}	Constante de vitesse d'autohydrolyse	[min^{-1}]
$K_{a,i}$	Constante d'inhibition anticompétitive pour l'espèce I	[$mmol \cdot l^{-1}$]
$K_{c,i}$	Constante d'inhibition compétitive pour l'espèce I	[$mmol \cdot l^{-1}$]
K_m	Constante de Michaelis	[$mmol \cdot l^{-1}$]
K_m^{app}	Valeur apparente de la constante de Michaelis	[$mmol \cdot l^{-1}$]
$K_{n,i}$	Constante d'inhibition non-compétitive pour l'espèce I	[$mmol \cdot l^{-1}$]
K_s	Constante de dissociation du complexe ES	[$mmol \cdot l^{-1}$]
k	= $\frac{k_4}{k_3 \cdot [H_2O]}$	[$l \cdot mmol^{-1}$]
k_{+a}	Constante de vitesse de formation du complexe EI_a	[$l \cdot mmol^{-1} \cdot min^{-1}$]
k_a	Constante de vitesse de dissociation du complexe EI_a	[min^{-1}]
k_{+c}	Constante de vitesse de formation du complexe EI_c	[$l \cdot mmol^{-1} \cdot min^{-1}$]
k_c	Constante de vitesse de dissociation du complexe EI_c	[min^{-1}]
k_L	Coefficient de transfert de matière	[$m \cdot s^{-1}$]

k_{+1}	Constante de vitesse de formation du complexe ES	$[l \cdot mmol^{-1} \cdot min^{-1}]$
k_{-1}	Constante de vitesse de dissociation du complexe ES	$[min^{-1}]$
k_2	Constante de vitesse de formation du complexe EA	$[mmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}]$
k_2^{app}	Valeur apparente de la constante de vitesse d'acylation	$[mmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}]$
k_{3b}	$= k_3 \cdot [H_2O]$	$[min^{-1}]$
k_3	Constante de vitesse d'hydrolyse du complexe EA	$[l \cdot mmol^{-1} \cdot min^{-1}]$
k_4	Constante de vitesse de transestérification de EA	$[l \cdot mmol^{-1} \cdot min^{-1}]$
L_p	Productivité du système réactionnel	$[mmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}]$
$\log P$	$= \log(P_C)$ (système biphasique de référence H_2O/n -octanol)	$[-]$
M	Masse molaire	$[g \cdot mol^{-1}]$
m	masse	$[g], [mmol]$
N	Forme neutre de la phénylalanine	
$n(D_p)$	Nombre de particules de la distribution qui ont un diamètre D_p	$[-]$
$P_c(I)$	Coefficient de partage biphasique de l'espèce I	$[-]$
P	Propranolol, concentration de ...	$[mmol \cdot l^{-1}]$
pH	$= -\log(H^+)$	$[-]$
pK_a	$= -\log(K_a)$	$[-]$
Q	Débit	$[ml \cdot min^{-1}]$
R	Constante des gaz parfaits	$[J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}]$
R_F	Vitesse d'apparition de la phénylalanine'	$[mmol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}]$
R_p	Vitesse d'apparition du produit	$[mmol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}]$
$R_{p,n}$	Vitesse normalisée d'apparition du produit ($= R_p / E_0$)	$[mmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}]$
r_{eff}	Vitesse de réaction mesurée (effective)	$[mmol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}]$
S	Substrat, concentration de ...	$[mmol \cdot l^{-1}]$
S_b	Concentration de substrat dans le bulk	$[mmol \cdot l^{-1}]$
S_R	Concentration de substrat à la surface de la particule	$[mmol \cdot l^{-1}]$
T	Température	$[^{\circ}C], [K]$
t	temps	$[min]$
\bar{t}	Temps de séjour moyen	$[min]$
\bar{t}_{cc}	Temps de séjour moyen en court-circuitant la colonne	$[min]$
U	Signal	$[V]$
V	Volume	$[ml], [l]$
V_{max}^{app}	Vitesse maximale apparente de la réaction enzymatique	$[mmol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}]$
V_p	Volume des particules de catalyseur	$[ml]$
\dot{V}_R	Débit dans la boucle de recyclage	$[ml \cdot min^{-1}]$
v	volume molaire	$[ml \cdot mol^{-1}]$
X	Taux de conversion	$[-], [\%]$
x	Fraction massique	$[-]$

Z Forme zwitterionique de la phénylalanine

LETTRES GRECQUES

β	Pouvoir tampon	[mmol.l ⁻¹]
δ	Epaisseur du film stagnant	[μ m]
ϵ	Porosité du lit catalytique	[-]
Φ	Module de Thiele	[-]
η, η_x	Facteur d'efficacité de l'enzyme	[-]
κ	= K_M/S_D	[-]
ν_i	Fraction volumique de la phase i	[-]
ρ	Densité	[g.cm ⁻³]
τ	Temps de passage dans le réacteur tubulaire	[min]

INDICES

aq	Se rapporte à la phase aqueuse
B	Se rapporte à la base forte utilisée pour les titrations
D	Enantiomère D
F	Se rapporte à la phénylalanine
int	Se rapporte au volume interstitiel
L	Enantiomère L
lit	Se rapporte au lit fixe de catalyseur
max	Exprime la valeur maximale d'une grandeur
or	Se rapporte à la phase organique
o	Valeur initiale (au temps t = 0)
P	Se rapporte au propanol
rel	Exprime la valeur relative d'une grandeur
S	Se rapporte au substrat
tot	Exprime la valeur totale d'une grandeur

EXPOSANTS

acd, a	Espèce sous forme acide
app	Valeur apparente
bas, b	Espèce sous forme basique
c	Espèce porteuse d'une charge
n	Espèce neutre

o Valeur initiale (au temps 0)

ABBREVIATIONS. NOTATIONS

a.a.	Acide aminé
AcOBU	Acétate de n-butyle
Dodéc.	Dodécane
$\log(x)$	logarithme base 10 de x. $\log(x) \approx 2.302585 \cdot \ln(x)$
MIBK	Isobutyl-méthyl-cétone
mM	$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
MTBE	Méthyl-tertiobutyl éther
OctOH	n-octanol
PAAE	Ester n-amylique de phénylalanine
PABE	Ester n-butylique de phénylalanine
PAEE	Ester éthylique de phénylalanine
PAHE	Ester n-hexylique de phénylalanine
PAME	Ester méthylique de phénylalanine
PAPE	Ester n-propylique de phénylalanine
Phe	Phénylalanine
PrOH	n-propanol
α -CT	α -chymotrypsine
[I]	Concentration de l'espèce I
%	Pourcentage massique [%]
% v/v	Pourcentage volumique [%]
1,1,1-Tri.	1,1,1-trichloréthane

1. INTRODUCTION GENERALE

1.1 ACIDES AMINES ET PROTEINES

1.1.1 Généralités

On appelle acides α -aminés les molécules organiques comportant une fonction acide carboxylique et une fonction amine (primaire, secondaire ou tertiaire) supportées par le même carbone (carbone α). Cette classe de composés est d'une importance extrême dans le monde vivant, puisqu'on y trouve, parmi les innombrables structures envisageables, les 21 acides aminés qui sont les composants monomériques des protéines.

Ces molécules ont toutes la même structure, présentée à la figure 1.1, et se différencient selon la nature du groupe R.

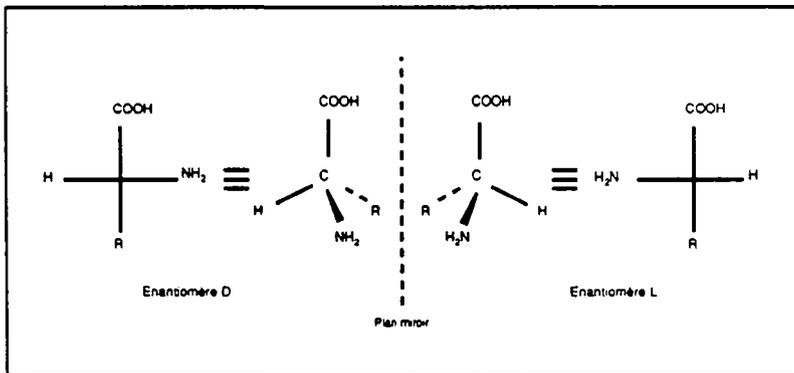


Figure 1.1: Structure générale des acides α -aminés

Une autre particularité et non des moindres de telles molécules réside dans le fait que le carbone α qui porte normalement quatre substituants différents est asymétrique, d'où l'existence de chaque acide aminé sous deux formes énantiomériques, D et L, comme le montre également la figure 1.1. Cet isomérisme est très important dans le sens où les organismes vivants ne sont capables d'utiliser qu'une seule des deux formes, l'énantiomère L.

Les causes de ce phénomène, ainsi que celles de l'existence d'une seule forme métabolisable également pour les acides nucléiques (la forme D cette fois), sont encore mal connues, mais depuis les premiers travaux de Pasteur, Kelvin, Le Bel et Van't Hoff, des chercheurs n'ont jamais cessé de se pencher sur le sujet. Il faut dire que les questions soulevées à ce propos sont d'ordre autant philosophique que scientifique (Toromanoff, 1986) et que, à défaut de pouvoir comparer avec le développement de la vie sur d'autres mondes, il est très difficile de trancher en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses (parfois loufoques) proposées. D'après Vennesland (1974), " *des études sur l'origine du code génétique sont en cours, et on pense même pouvoir expliquer pourquoi les acides aminés des protéines doivent avoir la configuration L si les pentoses des acides nucléiques ont la configuration D* " .

On le sait, seules les plantes sont capables de synthétiser tous les acides aminés dont elles ont besoin pour fabriquer leurs protéines, et ce à partir du CO₂ de l'air, de l'azote présent dans le sol, et de la lumière solaire (photosynthèse). L'organisme humain, comme celui des animaux, ne peut par contre en produire que quelques uns (douze dans le cas de l'homme). Le seul moyen qu'il a de se procurer les autres, c'est de manger une plante ou un animal qui les a déjà ingérés ou synthétisés pour lui. Les substances dont il est question sont appelées **acides aminés essentiels**, et justifient notre besoin d'une alimentation équilibrée, une carence de l'un d'entre eux pouvant être préjudiciable à notre santé.

On l'a dit, les protéines sont constituées d'acides aminés qui condensent en une séquence bien définie, le groupe acide carboxylique de l'un réagissant avec le groupe amino du suivant pour former une liaison amide (dite également peptidique), avec libération d'une molécule d'eau. Cette liaison est telle que les six atomes qui se trouvent dans son voisinage (C, O, N et H, ainsi que les deux carbones α les plus proches) sont tous dans le même plan, dessiné en traitillé à la figure 1.2.

La longueur des macromolécules ainsi formées est très variable et peut aller de quelques unités monomériques (ou résidus) à plus de 5'000. Les chaînes les plus courtes sont appelées oligo- ou polypeptides, jusqu'à une limite supérieure de masse molaire relativement floue de environ 10'000 g·mol⁻¹, correspondant à une séquence de 80 à 100 acides aminés.

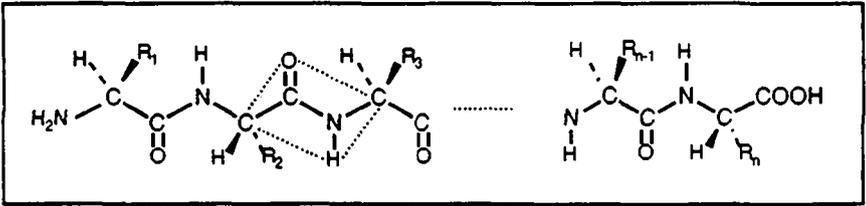


Figure 1.2: La liaison peptidique dans les protéines

Ces molécules ont une grande importance métabolique et beaucoup d'hormones comme l'insuline, l'hormone de croissance ou la somatostatine sont des exemples de polypeptides. Au-delà de la limite sus-mentionnée, on parle de protéines, dont la variété des propriétés et des fonctions est bien connue.

1.1.2 Structure des protéines

La caractérisation d'une telle molécule passe en premier lieu par l'identification de sa structure, celle-ci comportant trois niveaux dans le cas d'une protéine composée d'une seule chaîne et quatre dans le cas d'une protéine comprenant plusieurs chaînes protéiques imbriquées. Ces différents niveaux sont les suivants:

Structure primaire: séquence des acides aminés composant la protéine et reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Par convention, on commence la transcription de celle-ci par l'extrémité qui porte un groupe amino libre.

Structure secondaire: se réfère à la configuration structurale des résidus des acides aminés qui sont proches voisins le long de la séquence. Du fait de la rigidité de la liaison peptidique (elle a partiellement les caractéristiques d'une double liaison), il n'y a possibilité de rotation que toutes les deux ou trois liaisons le long du squelette. On distingue deux sortes principales de structures secondaires: Les hélices α (hélices à droite) et les feuilles (structures planes). Les principales interactions tendant à créer et stabiliser de telles dispositions sont principalement des ponts hydrogène et disulfure.

Structure tertiaire: caractérise la succession et l'arrangement de segments de la macromolécule de structures secondaires différentes.

Structure quaternaire: décrit l'arrangement spatial des protéines comportant plus d'une chaîne polypeptidique. Elle est définie et stabilisée par les mêmes interactions et les mêmes forces que la structure tertiaire.

Il est encore à préciser, avant de quitter provisoirement le sujet des protéines, que celles-ci ne sont pas forcément composées que d'acides aminés. Elles peuvent également comporter d'autres fragments, organiques ou non, que l'on appelle **groupes prosthétiques**. Dans de tels cas, on parlera de **protéines conjuguées**, par opposition aux protéines simples. Un des exemples les plus connus est l'hémoglobine, composée de quatre fragments qui sont des complexes organométalliques contenant du fer. Et ce domaine déjà extraordinairement varié ne s'arrête pas là si l'on considère qu'aujourd'hui, on connaît pas loin de 1000 acides α -aminés présents dans le monde vivant qui ne sont pas des constituants de protéines (Williams, 1989).

1.1.3 Les acides aminés: dénomination et structure

Le tableau 1.1 ci-dessous présente tout d'abord les structures des 21 acides aminés que l'on trouve dans les protéines. Si le groupe R comporte lui-même un groupement acide carboxylique ou amino, on a un acide aminé "acide" ou "basique" respectivement, les autres étant qualifiés de "neutres" par défaut. On trouve des R de type aliphatique, cyclique, ou aromatique, qui confèrent par exemple des propriétés hydrophiles ou hydrophobes aux acides aminés qui les portent.

Les remarques suivantes peuvent être faites:

- Chaque acide aminé de la série ci-dessous a un **nom usuel**, qui permet d'éviter l'usage de la nomenclature systématique (il est ici donné en anglais). Ce nom est assorti de deux abréviations, l'une de trois lettres, l'autre d'une seule, qui facilitent par exemple la transcription des séquences d'acides aminés dans les protéines (Exemple: asparagine = Asn = N).

- Une de ces molécules, la glycine, n'est pas chirale: elle est une exception triviale à l'asymétrie du carbone α ($R \equiv H$).

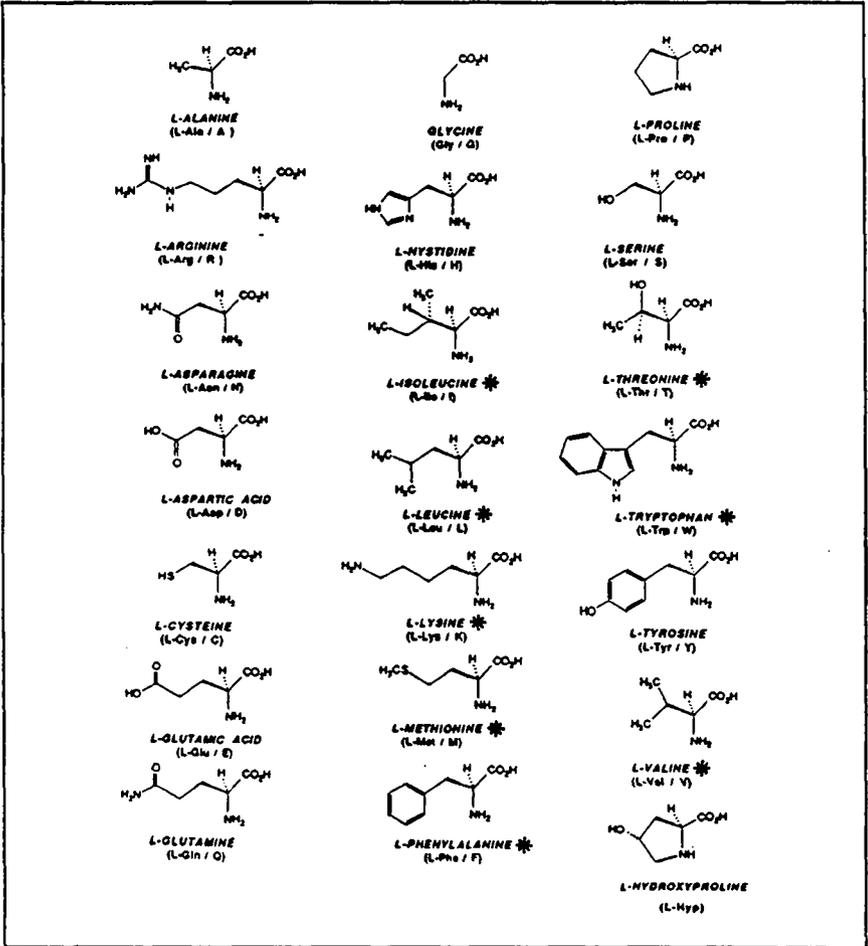


Tableau 1.1: Les acides aminés , noms usuels et structures (Williams, 1990)

- Le groupe amino est toujours primaire, sauf chez la proline et l'hydroxyproline où il est secondaire. L'hydroxyproline, que l'on ne trouve que dans le collagène, n'a pas d'abréviation d'une lettre.

- Les acides aminés essentiels pour l'homme ont une astérisque à droite de leur nom

- Deux a.a. (abréviation usuelle pour "acide aminé") contiennent des atomes de soufre, à savoir la méthionine et la cystéine. Cette dernière a la propriété d'être facilement convertie en cystine par une grande variété d'oxydants, le processus inverse de réduction étant lui aussi très aisé. La réaction est la suivante:

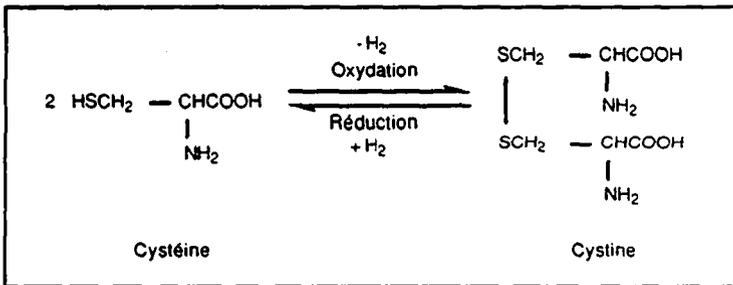


Figure 1.3: Création de ponts disulfure par oxydation de la cystéine

Ce processus est très important dans les phénomènes biochimiques accompagnant les protéines et les peptides qui contiennent de la cystéine car, comme on l'a vu précédemment, les ponts disulfure ainsi formés jouent un grand rôle dans l'établissement et la stabilisation de la structure tridimensionnelle de la macromolécule.

1.1.4 Propriétés acide-base des acides aminés

Le tableau 1.2 ci-dessous apporte quant à lui quelques informations supplémentaires quant aux propriétés des acides aminés, informations qui seront passées en revue un peu plus loin.

Deux remarques préliminaires cependant: les composés dont le nom dans la première colonne est accompagné d'un "*" sont les a.a. essentiels pour l'homme. D'autre part, un "d" à côté de la valeur du point de fusion signifie: décomposition.

Nom	pK _a (COOH) [-]	pK _a (NH ₂) [-]	pK _a (R) [-]	pl [-]	Solubilité [% p/p]	F [°C]	M.M. [g.mol ⁻¹]
Gly	2.34	9.60	-	5.97	22.5	292 d	75.07
Ala	2.35	9.69	-	6.02	15.8	297 d	89.10
Val *	2.32	9.62	-	5.97	6.8	315 d	117.15
Leu *	2.36	9.60	-	5.98	2.4	337 d	131.18
Ile *	2.36	9.68	-	6.02	2.1	285 d	131.18
Ser	2.21	9.15	-	5.68	4.3	228 d	105.10
Thr *	2.09	9.10	-	5.60	1.6	253 d	119.12
Cys	1.71	10.8	8.3	5.02	très sol.	-	121.16
Met *	2.28	9.21	-	5.06	3.0	283	149.21
Asp	2.09	9.82	3.86	2.98	0.4	269	133.11
Glu	2.19	9.67	4.25	3.22	0.7	247	147.13
Asn	2.02	8.8	-	5.41	2.4	236	132.13
Gln	2.17	9.13	-	5.70	3.6	184	146.15
Lys *	2.18	8.95	10.53	9.74	très sol.	224	146.19
Arg	2.17	9.04	12.48	10.76	très sol.	230-244 d	174.2
His	1.82	9.17	6.0	7.59	4.0	287	155.16
Phe *	1.83	9.13	-	5.48	2.7	283	165.19
Tyr	2.20	9.11	10.07	5.67	0.04	342	181.19
Trp *	2.38	9.39	-	5.88	1.1	283	204.23
Pro	1.99	10.60	-	6.30	154.5	220	115.13
Hyp	1.92	9.73	-	6.33	34.5	270	131.13

Tableau 1.2: Caractéristiques physico-chimiques des acides aminés
(Roberts et Caserio, 1977)

En solution aqueuse, un acide aminé existe sous plusieurs formes en équilibres acide-base rapides, formes dont les concentrations relatives vont dépendre du pH du milieu et des pK_a des groupes amino, acide carboxylique et éventuellement hydroxy ou thiol de la molécule (cf tableau 1.2). Dans le cas simple d'un acide aminé "neutre", comme la phénylalanine dont il va être question plus loin et plus en détail, ces équilibres sont représentés à la figure 1.4.

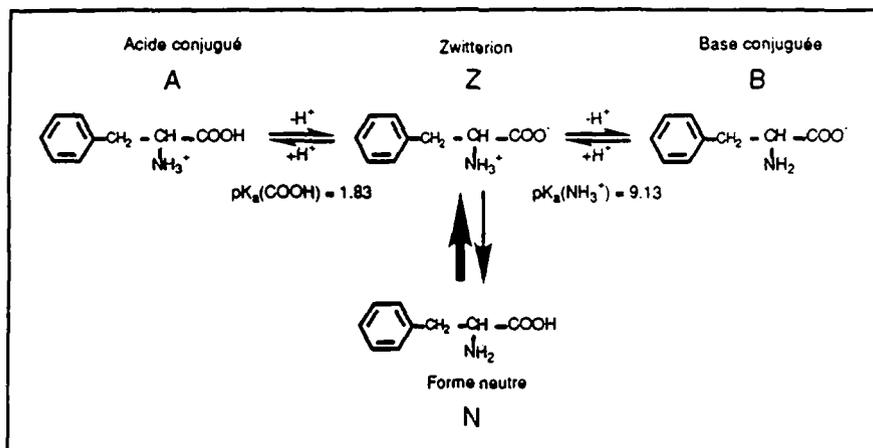


Figure 1.4: Equilibres acide-base de la phénylalanine en solution aqueuse

Des mesures spectroscopiques ont permis de montrer (Roberts et Caserio, 1977) que la molécule neutre N n'existe pratiquement pas. Quand l'a.a. ne porte pas de charge globale, c'est celle du ion dipolaire ou zwitterion qui prédomine à plus de 99%.

Les concentrations relatives à l'équilibre des différentes espèces peuvent être calculées à partir de la définition même du K_a :

$$K_a(\text{COOH}) = K_a^C = \frac{[\text{Z}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{A}]} \quad 1.1$$

$$K_a(\text{NH}_3^+) = K_a^A = \frac{[\text{B}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{Z}]} \quad 1.2$$

Si l'on néglige de plus la quantité de phénylalanine qui se trouve sous forme neutre, on peut encore écrire:

$$[\text{A}] + [\text{Z}] + [\text{B}] = [\text{Phe}]_{\text{tot}} \quad ([\text{N}] \approx 0) \quad 1.3$$

Sachant de plus que $\text{pH} = -\log([\text{H}^+])$ et que $\text{pK}_a = -\log([\text{K}_a])$ on trouve, par combinaison des équations 1.1 à 1.3:

$$[\text{A}] = \frac{[\text{Phe}]_{\text{tot}} 10^{(\text{pK}_a^{\text{C}} - \text{pH})}}{1 + 10^{(\text{pK}_a^{\text{C}} - \text{pH})} + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a^{\text{A}})}} \quad 1.4$$

$$[\text{Z}] = \frac{[\text{Phe}]_{\text{tot}}}{1 + 10^{(\text{pK}_a^{\text{C}} - \text{pH})} + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a^{\text{A}})}} \quad 1.5$$

$$[\text{B}] = \frac{[\text{Phe}]_{\text{tot}} 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a^{\text{A}})}}{1 + 10^{(\text{pK}_a^{\text{C}} - \text{pH})} + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a^{\text{A}})}} \quad 1.6$$

La figure 1.5 donne, toujours pour le cas de la phénylalanine et avec les valeurs de pK données dans le tableau 1.2, l'évolution en fonction du pH des concentrations des diverses espèces. La concentration totale $[\text{Phe}]_{\text{tot}}$ vaut 50 mmol.l^{-1} .

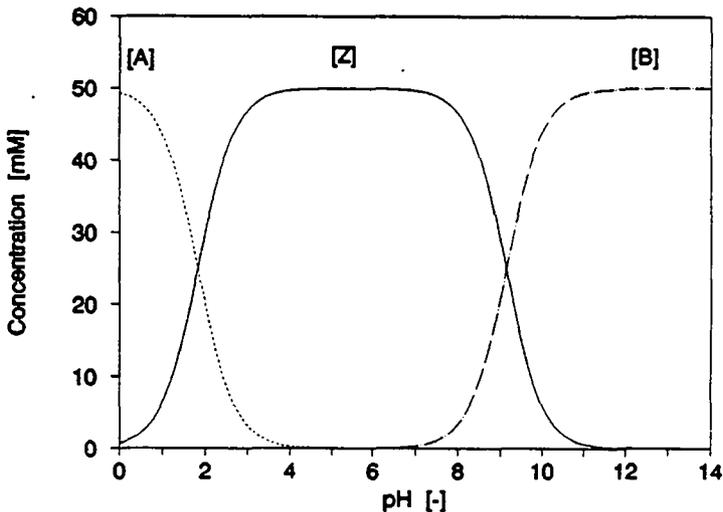


Figure 1.5: Concentrations des formes acide conjugué (A), zwitterion (Z) et base conjuguée (B) en fonction du pH pour la Phe

On remarquera que, entre pH 3 et pH 8, presque tout l'acide aminé se trouve sous forme zwitterionique. Au centre de ce domaine, là où $[\text{A}] = [\text{B}]$, on se trouve au

point isoélectrique pI de la substance, paramètre d'une grande importance pour l'isolation et la purification des acides aminés et des protéines. C'est à cette valeur du pH que le composé a une charge globale nulle et qu'il ne migre plus dans un champ électrophorétique. Il correspond également en général au minimum de la solubilité dans l'eau de l'acide aminé. Cette dernière est justement donnée, dans le tableau 1.2, pour une valeur du pH égale au pI , en grammes de l'isomère L par cent grammes, à la température de 20 °C. La précision est utile, le racémate étant généralement moins soluble que l'énantiomère L. Dans le cas d'un acide aminé neutre, le pI se calcule comme la moyenne arithmétique des deux pK_a (vérifiable mathématiquement d'après les équations ci-dessus).

Le cas des acides aminés ayant des fonctions acide ou base sur la chaîne latérale R est plus compliqué, les équilibres et le nombre des espèces y participant devenant vite beaucoup plus important.

1.1.5 Propriétés physiques et spectroscopiques des acides aminés

Les acides α -aminés cristallisent sous la forme dipolaire $H_3N^+-CHR-COO^-$. Les forces électriques intermoléculaires, importantes dans le cristal, sont responsables d'un point de fusion plus élevé que celui des amines et des acides carboxyliques simples, fusion souvent accompagnées d'une décomposition de la substance ("d" à côté de la température de fusion indiquée dans le tableau 1.2).

Du fait encore une fois de cette structure dipolaire, la solubilité dans les solvants organiques non polaires est fortement diminuée par rapport à celle des acides carboxyliques et des amines simples.

Le spectre infrarouge (à l'état solide ou en solution) de telles substances ne montre pas d'absorption du groupe carbonyle à 1720 cm^{-1} , typique d'un anion carboxylate. Le stretch N-H apparaît par contre sous forme d'une forte et large bande entre 3100 et 2600 cm^{-1} . La figure 1.6 ci-dessous montre d'ailleurs un tel spectre.

Le spectre UV des acides α -aminés n'est pas d'une grande utilité, à moins que ceux-ci ne possèdent des groupes aromatiques comme dans la phénylalanine, le tryptophane ou la tyrosine. Les caractéristiques d'absorption de ces groupes

sont cependant plus utiles pour suivre des changements chimiques et structuraux (conformationnels) dans les protéines.

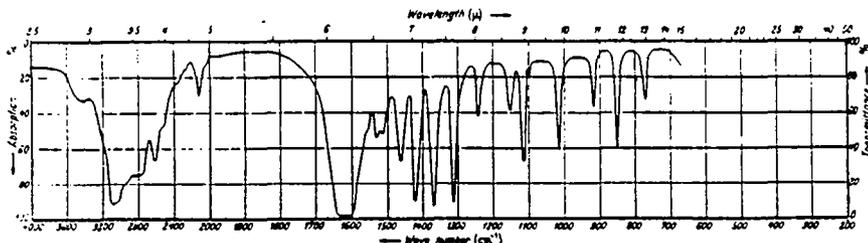


Figure 1.6: Spectre IR en phase solide de l'alanine (Documentation of molecular spectroscopy, 1959)

Bien que des techniques spéciales aient été développées pour les acides aminés et les peptides, il n'est pas facile d'obtenir des spectres de masse de telles substances, à cause de leur faible volatilité.

1.1.6 Utilisation des acides aminés

Pendant les trente dernières années, le champ d'application de ces substances s'est agrandi de façon spectaculaire, reflétant par là les progrès considérables effectués dans la compréhension de leur rôle métabolique et de leurs propriétés. On en citera quelques unes plus loin à titre d'exemple. Une des utilisations les plus connues est celle de l'acide glutamique (sous forme de glutamate de sodium) pour l'assaisonnement, à cause de ses propriétés d'exhausteur de saveurs. Ce composé est un des moins chers parmi les a.a. commerciaux (voir figures 1.7 et 1.8), et sa production dépassait en 1986 les 250 000 t.

Les deux figures en question permettent également de constater la baisse des prix sur le marché en 4-5 ans, baisse due principalement aux efforts fournis dans le développement de nouvelles techniques de fabrication. Cette diminution des coûts est parallèle à une augmentation du volume de production pour la plupart des a.a., caractéristique d'une demande toujours accrue. A des tonnages

beaucoup plus faibles que ceux du glutamate mais toujours dans l'alimentation, on trouve la L-alanine et la glycine, qui confèrent aux aliments une saveur fraîche et sucrée, caractéristique des crustacés et autres fruits de mer. Le marché alimentaire représentait au total en 1986 quelque 66 % de la production mondiale (Schmidt, 1987).

Un autre marché de gros tonnages (30 % environ du total) est représenté par les compléments à l'alimentation du bétail. La lysine, la thréonine et le tryptophane, entre autres, peuvent jouer le rôle de facteurs limitants s'ils sont fournis aux animaux en quantités insuffisantes, ce qui retarde la prise pondérale, allonge la durée de l'élevage et augmente les coûts de production de la viande.

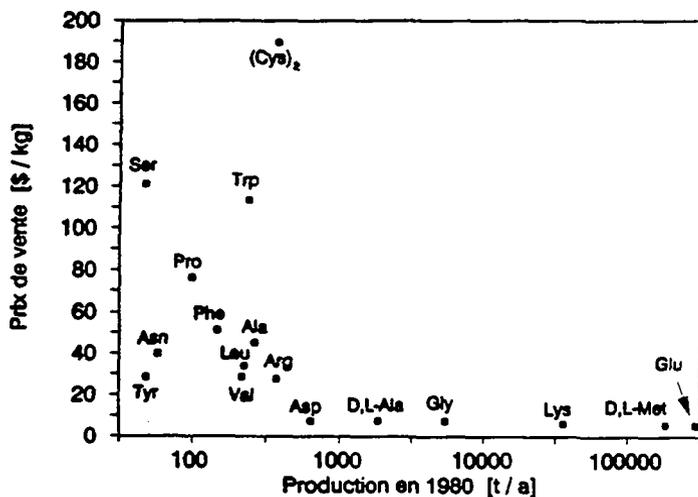


Figure 1.7: Prix de vente et tonnages des acides aminés en 1980 (Schmidt-Kastner et Egerer, 1984)

On ajoute donc ces composés aux aliments à base de maïs (déficients en Lys et Trp) ou de soja (déficients en Met). On notera au passage le cas particulier de la méthionine, dont les deux énantiomères ont la même valeur nutritive, et qui peut donc être utilisée sous forme de racémat.

d'environnement). De plus, les concentrations obtenues sont le plus souvent faibles, la production de ces substances dans les microorganismes étant sous la dépendance de réactions de rétrocontrôle.

L'utilisation de souches mutantes, qui soit ne synthétisent plus l'inhibiteur de rétrocontrôle (mutants auxotrophes) soit y deviennent "insensibles" (mutants de régulation), paraît cependant promise à un bel avenir, vu qu'elle offre la possibilité d'accumuler les produits dans le milieu. Dans le même ordre d'idée, on a reporté récemment (Berthier-Bayle, 1989) l'utilisation du génie génétique (et non plus la sélection de souches mutantes) pour effectuer une "multicopie" dans les chromosomes de la cellule de la même information génétique commandant la synthèse de la L-thréonine.

4. Les méthodes de synthèse enzymatique sont maintenant considérées avec de plus en plus d'intérêt, tant leur activité et leur spécificité sont grandes comparées aux microorganismes et aux procédés purement chimiques respectivement. Les milieux réactionnels sont en outre moins complexes et plus concentrés que les moûts de fermentation, facilitant la récupération des produits. Autre avantage, ces synthèses se font en général dans des conditions de pH, de pression et de température très douces, ce qui n'est pas négligeable du point de vue de l'appareillage et de la sécurité. En outre, la palette de réactions envisageables ne se limite plus depuis longtemps aux simples hydrolyses, et de nombreux exemples de processus de synthèse complexes sont donnés par la littérature (Ciba Foundation 1985, Schneider et al. 1984 et 1987, Wandrey 1986, Nakanishi et al. 1988).

Cependant, malgré l'élégance parfois surprenante de ces nouvelles voies, on est le plus souvent encore loin de l'application industrielle, le passage à une production en continu (ou tout au moins de gros tonnages) pouvant poser des problèmes. On pense ici notamment au coût élevé des catalyseurs enzymatiques et de leurs éventuels cofacteurs, qui rend indispensable la possibilité de les utiliser pendant un nombre élevé de cycles de production. C'est là que les divers procédés de confinement de l'enzyme dans l'enceinte réactionnelle trouvent un champ d'application de première importance. On pense ici à l'immobilisation sur un support solide (p.ex. Halwachs et al., 1977) ou dans une membrane liquide (Bratzler, 1987), ou encore à la rétention de l'enzyme soluble par une membrane d'ultrafiltration (Wandrey et Flaschel 1979, Flaschel et Wandrey 1983,

Leuchtenberger et Plöcker 1986). La compétitivité d'un procédé enzymatique, quelle que soit la technique employée, sera donc évaluée non seulement sur la base des coûts des précurseurs, mais également sur celle de la sélectivité, de l'activité et de la stabilité de l'enzyme.

On pourrait poursuivre encore longtemps la comparaison des différentes techniques, sans pour autant parvenir à trancher définitivement en faveur de l'une ou de l'autre. Il apparaît cependant très probable (Toromanoff, 1986) que l'avenir appartienne à des méthodes de production mixtes, susceptibles de tirer le meilleur parti de chacune d'entre elles. C'est ce qui a d'ailleurs été fait dans plusieurs cas, où on a par exemple une première étape de synthèse chimique d'un racémate, et une seconde de résolution optique par voie enzymatique. La figure 1.9 illustre un tel procédé, exploité à l'échelle industrielle depuis plusieurs années au Japon pour la fabrication de divers L-acides aminés (Chibata et al., 1976). C'est le racémate du dérivé N-acétyl de ces derniers qui est mis au contact d'une acylase immobilisée dans un réacteur lit fixe. Seule la forme L étant hydrolysée, on récupère le produit à la sortie du réacteur lors d'une simple étape de cristallisation.

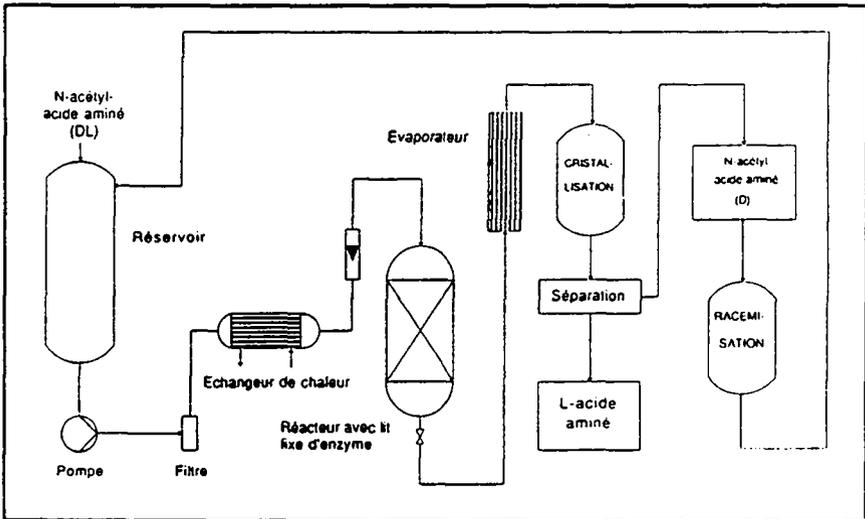


Figure 1.9: Production en continu de L-acides aminés (Chibata et al., 1976)

Cependant, on constate qu'un tel procédé laisse une quantité équimolaire de l'énantiomère D qui n'a pas réagi, et que l'on ne peut pas jeter pour des raisons économiques évidentes. C'est pourquoi il est avantageux de recycler celui-ci en tête de procédé, après l'avoir fait passer par une étape chimique de racémisation comme celle décrite par Yamada et al. (1983).

1.1.8 Le cas de la phénylalanine

L'intérêt pour cet acide aminé n'ayant pas cessé de croître au cours des dix dernières années, sa production au niveau industriel a suivi la même courbe ascendante. La phénylalanine est pratiquement devenue l'exemple de référence dans la littérature traitant de l'obtention d'un acide aminé optiquement actif, quel que soit le procédé concerné. Ce développement pour le moins spectaculaire est à mettre sur le compte de l'apparition sur le marché en 1981 de l'édulcorant de synthèse aspartame appelé également Nutrasweet[®], qui est un dipeptide formé par la condensation de l'acide L-aspartique et de l'ester méthylique de la phénylalanine (α -Asp-PheOMe). Le succès commercial de ce composé découvert par hasard en 1965 est impressionnant, et dû à ses grandes qualités gustatives.

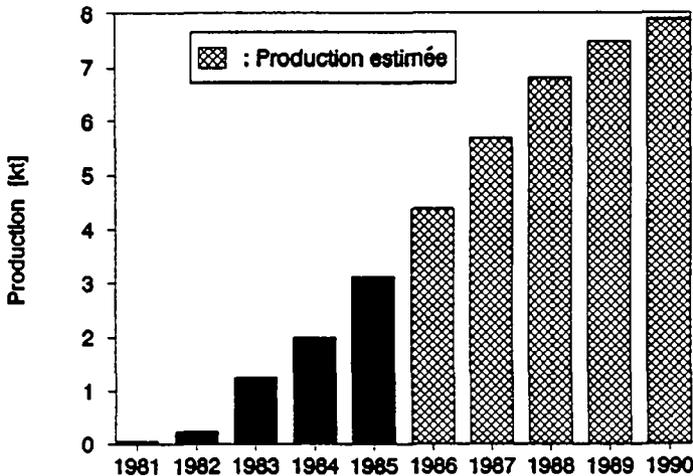


Figure 1.10: Production de L-phénylalanine pour la fabrication d'aspartame (Klausner, 1985)

La demande ne cesse d'ailleurs d'augmenter, comme le montre la figure 1.10, qui représente sur dix ans la production de phénylalanine (mesurée et prévue) destinée uniquement à la fabrication d'aspartame. Les brevets européens protégeant ce dernier ont expiré en 1987, les américains devant quant à eux tomber en 1992, après une prolongation de 5 ans. C'est cette perspective qui explique le volume toujours croissant de publications ayant trait à l'obtention de L-phénylalanine, à l'aide de l'une ou l'autre des méthodes citées plus haut (Schmidt-Kastner et Egerer 1984, Halwachs et al. 1977, Bratzler 1987, Klausner 1985, Schmidt 1987).

Les deux derniers auteurs cités ont passé en revue les procédés déjà mis en oeuvre à l'échelle industrielle. On peut se rendre compte à la figure 1.11 que tous utilisent la grande stéréospécificité des catalyseurs enzymatiques, que ceux-ci soient à l'état natif dans le réacteur ou tout simplement inclus dans les microorganismes responsables de la fermentation.

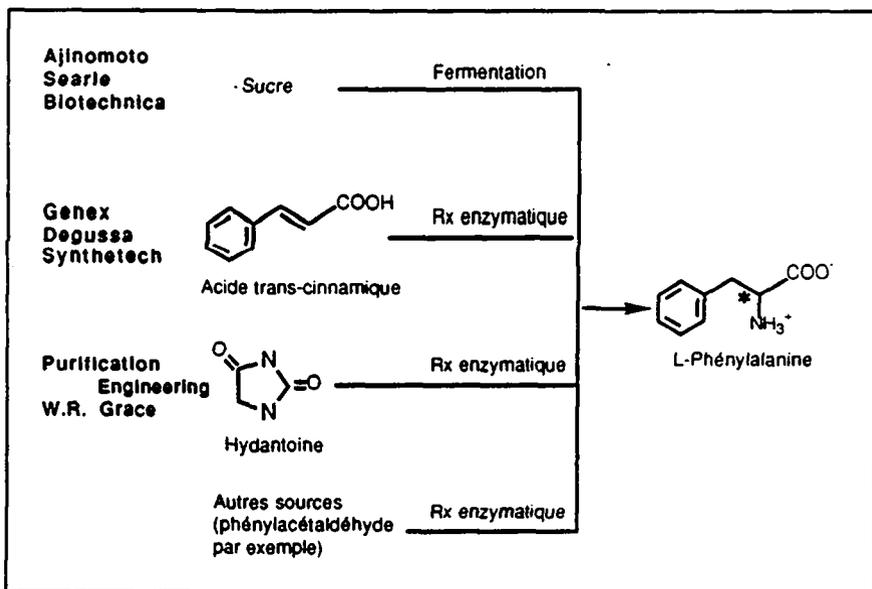


Figure 1.11: Procédés industriels de fabrication de L-Phe pour l'aspartame (d'après Klausner, 1985)

De plus, les divers précurseurs utilisés (acide trans-cinnamique, acide phénylpyruvique, acide N-acétylamidocinnamique) sont tous des composés non chiraux. On procède donc là à une synthèse donnant un produit optiquement actif mais sans passage par un racémate, ce qui permet d'éviter les étapes de racémisation et recyclage de l'énantiomère non réagi après celle de la résolution optique.

Toujours d'après Klausner (1985), bien que les fermentations soient actuellement les procédés les plus économiquement compétitifs à cause des coûts réduits des précurseurs et des microorganismes (Searle, Ajinomoto), la concurrence est rude. Les techniques s'affinent, et quelques nouveaux venus sur le marché commencent à faire la preuve de leur compétitivité (Grace, BioTechnica, Synthetec).

1.2 ENZYMES ET SOLVANTS ORGANIQUES

1.2.1 Introduction à la problématique du sujet

Lors de la mise au point de procédés en génie enzymatique ou en biotechnologie, on se trouve couramment confronté au problème de la faible solubilité des substrats et produits dans le milieu réactionnel. A la faible productivité que cela implique pour l'exploitation d'un réacteur viennent s'ajouter des coûts de séparation prohibitifs et le danger non négligeable d'une précipitation intempestive.

De plus, dans le cas de réactions équilibrées en milieu aqueux impliquant une ou plusieurs molécules d'eau, on se trouve le plus souvent réduit à ne récupérer que le produit résultant de l'hydrolyse, largement favorisé par la loi d'action des masses. Ceci limite donc singulièrement le nombre de produits accessibles, et d'autant plus si on prend encore en considération la fragilité de certaines molécules d'importance biologique en milieu polaire.

Les premières expériences de réactions enzymatiques en milieu partiellement non aqueux ont été réalisées dans des études mécanistiques fondamentales destinées justement à déterminer le rôle joué par l'eau dans certains processus. Par exemple, l'addition de dioxane a permis d'étudier l'étape de désacylation dans les réactions d'hydrolyse catalysées par la chymotrypsine (Tanizawa et Bender, 1974). On s'est alors peu à peu rendu compte qu'une enzyme n'était pas forcément dénaturée et donc désactivée dans de tels environnements.

De plus on s'est rendu compte, au fur et à mesure que progressaient les connaissances sur les relations entre le mode de fonctionnement des enzymes, leur structure et ce qui les influençait, que leur environnement métabolique (une membrane cellulaire par exemple) était le plus souvent loin d'être exclusivement aqueux.

Les perspectives ouvertes par ces constatations n'ont pas tardé à susciter un grand intérêt, et la masse de littérature publiée dans ce domaine n'a jamais cessé d'augmenter, si l'on se réfère à la figure 1.12 qui représente le nombre des revues publiées sur le sujet pendant les 25 dernières années.

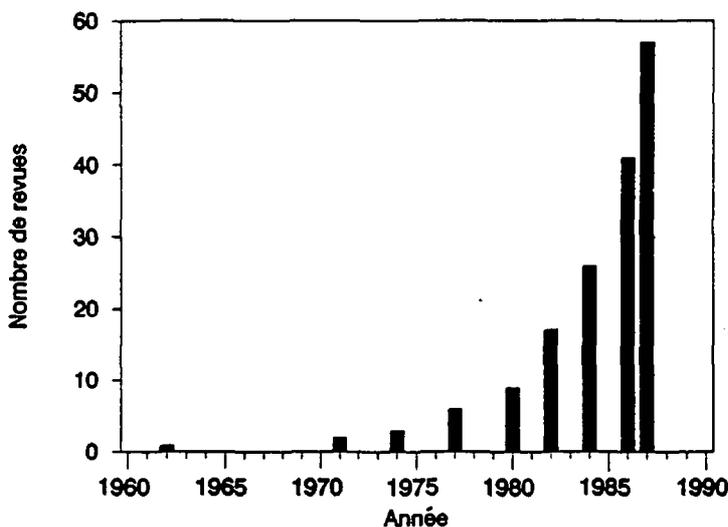


Figure 1.12: Revues publiées de 1962 à 1987 sur les enzymes et les solvants organiques (d'après Khmelnitsky et al., 1988)

C'est pourquoi, malgré la masse impressionnante d'articles à disposition sur le sujet, on se bornera dans le survol qui suit à citer quelques-unes de ces revues qui permettent de faire rapidement le tour du sujet, et d'approfondir par la suite tel ou tel aspect si le besoin s'en fait sentir.

1.2.2 Classification des cas de figure envisageables

La détermination de la structure du système réactionnel qui sera mis en oeuvre passe par celle des rôles réciproques du solvant organique et de l'eau dans celui-ci. Le rôle du solvant peut être de plusieurs types:

- Réduire le contenu en eau du système afin de favoriser la réaction inverse de synthèse au détriment de celle d'hydrolyse. Le solvant sera alors miscible à l'eau et inerte vis-à-vis du processus enzymatique; mais d'un autre côté, on peut aussi envisager qu'il y participe en tant que réactif présent en plus ou moins grand excès.

- Permettre l'étude de réactions enzymatiques à basse température en abaissant le point de congélation du milieu (cryoenzymologie). La réaction est alors suffisamment lente pour permettre l'observation et la caractérisation d'étapes intermédiaires (Douzou, 1971).
- Augmenter la solubilité du substrat et / ou des produits dans le milieu réactionnel.
- Diminuer la polarité du milieu, paramètre auquel sont sensibles bien des molécules organiques instables.
- Solubiliser préférentiellement tel ou tel partenaire de la réaction, afin de déplacer l'équilibre de celle-ci dans le sens désiré, ou de diminuer l'effet inhibiteur du réactant en question sur l'enzyme.

Le système eau / solvant appartiendra alors à l'une ou l'autre des cinq catégories présentées ci-après et accompagnées de quelques exemples.

1.2.3 Phase aqueuse et solvant organique miscibles

Comme décrit plus haut, un tel solvant peut être utilisé pour réduire l'activité de l'eau dans le système. La réaction inverse de l'hydrolyse est alors favorisée. Les exemples de telles réactions ne sont cependant pas nombreux, car l'enzyme est en général désactivée avant que l'activité de l'eau soit descendue notablement en dessous de 1. Monsan (1981) cite quand même l'exemple de la synthèse de N-acétyl-L-tyrosinate d'éthyle à partir de N-acétyl-L-tyrosine et d'éthanol. Celui-ci est ajouté au milieu sous forme d'un mélange de proportions volumiques 1/1 avec du glycérol. Un rendement optimal en produit de 30 % a été obtenu à l'équilibre pour une concentration de 50 % V/V en mélange.

D'après Khmelnitsky et al. (1988), la raison de cette désactivation réside dans le fait qu'un solvant miscible à l'eau, à partir d'une certaine concentration, perturbe la couche d'eau d'hydratation entourant l'enzyme, et donc le réseau complexe de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques ou hydrophobes qui maintiennent la molécule dans sa conformation active. Le solvant peut de plus interagir avec l'enzyme par adsorption (spécifique ou non) et la désactiver par ce

biais. La conservation de la couche d'hydratation est donc nécessaire, mais pas toujours suffisante au maintien de l'activité du catalyseur.

Plusieurs auteurs ont étudié l'influence du solvant et des propriétés physico-chimiques de l'environnement sur la dénaturation des protéines. **Asakura et al. (1978)** a observé qu'en faibles concentrations, le méthanol, l'éthanol, le propanol et le butanol ralentissaient la dénaturation par voie mécanique de l'hémoglobine, et que passé un certain seuil (entre 10 et 40 % V/V) ces alcools l'accéléraient fortement. **Brorson et al. (1985)** a quant à lui mesuré les valeurs de k_{cat} et K_m pour la carboxypeptidase A et l' α -chymotrypsine en présence de solutés censés perturber fortement la structure de l'eau (dioxane, t-butanol). Il n'a pas trouvé d'influence marquante de ceux-ci sur une plage allant de 0 à 10 % V/V. **Pliura et Jones (1980)** ont étudié l'effet de quelques solvants (méthanol, propanol-2, t-butanol, dioxane et DMSO) sur l'activité et la stabilité de l' α -chymotrypsine soluble et immobilisée. De façon générale, cette dernière était moins sensible que la forme native; le DMSO à 20 % V/V semblait de plus stabiliser fortement les deux formes, tout en leur conservant une large part de leur activité catalytique initiale.

Moresoli (1990) a étudié l'influence du DMSO (jusqu'à 50 % V/V) sur le rendement et la sélectivité (initiale et au rendement optimum) de la transestérification de l'ester propylique de phénylalanine (PAPE) avec le 1,4-butanediol. Aucun effet notable de ce solvant n'a pu être constaté sur les paramètres précités. La productivité du système diminuait par contre, à cause de l'augmentation du temps nécessaire à l'obtention du rendement optimum.

Il ressort de toutes ces études que l'effet d'un composé miscible sur une enzyme reste très difficile à évaluer a priori, et que le choix d'un solvant inerte qui conserve l'activité et la stabilité du catalyseur reste essentiellement une affaire d'empirisme.

1.2.4 Systèmes biphasiques eau / solvant organique

Un des moyens les plus simples d'éviter que le solvant organique ne perturbe trop la couche d'hydratation de l'enzyme, c'est d'empêcher dans la mesure du possible qu'ils entrent en contact, en utilisant par exemple un solvant organique immiscible à l'eau. Celui-ci est alors soit un des réactants, soit un milieu dans lequel un ou plusieurs des partenaires se solubilise préférentiellement. Cela

peut se révéler utile autant pour augmenter la charge en substrat dans le réacteur que pour extraire un produit au fur et à mesure de sa libération, la réaction n'ayant lieu qu'en phase aqueuse où l'enzyme reste confinée. Il arrive aussi que le produit et le substrat se retrouvent chacun dans une des deux phases, ce qui facilite d'autant leur séparation après réaction. On ne peut manquer de citer dans ce domaine les travaux de Kilbanov et al. (1977 et 1988 p.ex.) qui a étudié de nombreux aspects des réactions enzymatiques en présence de solvants organiques.

Comme les fractions volumiques respectives de chacune des phases peuvent varier dans une très large mesure (pratiquement entre 0 et 1), la mise en contact de ces dernières peut se faire de différentes façons. Elles peuvent soit être disposées en deux couches, l'une sur l'autre, soit être dispersées l'une dans l'autre avec formation d'une émulsion de type w / o ("water in oil", phase organique continue) ou o / w ("oil in water", phase aqueuse continue). Brink et Trampler (1986 a et b) ont par exemple utilisé un tel système avec succès pour l'époxydation du propène et du butène-1 par des microorganismes de type *Mycobacterium* immobilisés dans des billes d'alginate de calcium. Quelques auteurs ont discuté dans leurs modèles l'influence de paramètres comme le coefficient de partage des divers partenaires ou le rapport des volumes des phases sur la position de l'équilibre réactionnel (Eggers et al., 1989). Woodley et Lilly (1990), de leur côté, ont décrit l'effet du transfert du produit vers la phase organique lors de l'hydrolyse enzymatique de l'acétate de benzyle en alcool benzylique dans un système biphasique.

Le principe de la membrane liquide (double émulsion) a également été étudié (Scheper et al., 1984) dans le cas de l'hydrolyse stéréosélective d'un ester de phénylalanine: une solution aqueuse d'enzyme est dispersée sous forme d'une émulsion stable (par ajout de surfactants) dans une phase organique (kérosène, cyclohexane), qui sera elle-même mise en contact intime avec une phase aqueuse contenant le substrat. Celui-ci, qui a un caractère hydrophobe assez marqué diffusera à travers les deux interfaces vers l'enzyme. Une fois la réaction effectuée, le produit, porteur de charge, ne pourra suivre le chemin inverse qu'avec l'aide d'un sel quaternaire d'ammonium comme ceux utilisés en catalyse par transfert de phase (CTP). Cette méthode a pour but d'isoler l'enzyme de la solution de substrat et permet non seulement de récupérer le catalyseur après la

réaction, mais également d'exploiter le système en continu. La modélisation mathématique d'un tel système a été proposée récemment par Wu et al. (1990).

Dans le même but d'isoler le catalyseur des réactants, on le verra plus loin, il est également possible d'utiliser une enzyme immobilisée, d'autant plus que sous cette forme, elle montre bien souvent une meilleure résistance à l'influence du solvant organique, qui bien qu'immiscible n'en est le plus souvent pas moins légèrement soluble en phase aqueuse. Les effets dénaturants de la tension interfaciale peuvent également être diminués par ce biais. La situation est néanmoins compliquée par le fait qu'on se trouve confronté à un système à trois phases.

1.2.5 Systèmes microhétérogènes: micelles inverses

Dans de tels systèmes, le volume de la phase aqueuse où l'enzyme est dissoute est tellement faible qu'on ne la distingue plus de la phase organique qui est pratiquement continue, d'où le qualificatif de "microhétérogène" utilisé dans ces cas. Les minuscules gouttelettes de phase aqueuse sont séparées du solvant par des molécules de surfactant adsorbées à l'interface, qui stabilisent la microémulsion. Celles-ci comportent à une de leurs extrémités un groupe polaire qui s'oriente vers l'intérieur de la phase aqueuse, et à l'autre une longue chaîne à caractère lipophile marqué qui reste du côté organique de l'interface. Dans cette configuration, on peut travailler avec un solvant organique à presque 100 %v/v, mais la phase aqueuse sert alors uniquement de " site réactionnel " et ne peut pas accumuler l'un ou l'autre des partenaires du processus. Par contre, on peut tout à fait procéder à des analyses spectrophotométriques dans les milieux de ce type, qui sont transparents.

1.2.6 Solvants organiques sans phase aqueuse

On l'a vu précédemment, l'enzyme a besoin pour exercer son activité catalytique d'une quantité minimale d'eau d'hydratation qui garantit le maintien de sa conformation active. On a donc exploité des situations extrêmes où l'enzyme est immobilisée sur un support solide dont les pores contiennent l'eau nécessaire. Le tout est alors plongé dans la phase organique pure.

On est allé plus loin en évaporant presque toute l'eau d'une solution d'enzyme de pH ajusté à la valeur désirée. La poudre d'enzyme ainsi récupérée a alors été dispersée telle quelle, sous forme solide, dans le solvant. **Zaks et Klibanov (1985)** ont alors observé que non seulement l'enzyme était active, mais qu'en plus cette activité dépendait du pH de la solution à partir de laquelle on l'avait cristallisée, suivant le même profil que celui observé en solution aqueuse.

1.2.7 Systèmes à deux phases aqueuses non-miscibles

L'hétérogénéité de tels systèmes est due à l'incompatibilité entre solutions aqueuses de deux polymères différents (le dextrane et le PEG par exemple) ou d'un polymère et d'un sel (le PEG et certains phosphates). A la base, ils servent à l'extraction douce d'enzymes à partir de débris cellulaires ou d'un mélange d'autres protéines et acides nucléiques. Leurs caractéristiques principales sont une très faible tension interfaciale et un milieu hydrophile dans chaque phase, ce qui en fait des systèmes idéaux pour les enzymes dégradant des substrats solubles dans l'eau, car ils permettent la récupération du catalyseur.

1.2.8 Choix du système optimal

La classification utilisée dans les lignes précédentes n'est bien évidemment ni absolue ni la seule existant, et on trouvera toujours des systèmes qui n'entrent dans aucune des catégories évoquées ou qui en regroupent plusieurs. **Lilly et Woodley (1985)** proposent de leur côté une démarche de caractérisation du système étudié qui, selon la disposition des phases, la distribution des réactifs entre celles-ci et la forme du catalyseur, aide au choix du type de réacteur le plus approprié pour la mise en oeuvre du processus.

Lors de la sélection du solvant organique adéquat pour une réaction donnée, on doit bien évidemment tenir compte de ses propriétés vis-à-vis des réactants, mais aussi et surtout de ses effets dénaturants sur l'enzyme, qui ont déjà été évoqués à la fin du sous-chapitre 1.2.4. Là encore, le choix final laisse une large part à l'expérimentation. **Brink et Tramper (1985)** ont essayé de corréliser la rétention de l'activité des microorganismes qu'il a utilisés (*Mycobacterium*) avec des propriétés du solvant comme sa polarité (donnée par le paramètre de solubilité de Hildebrand δ) ou la taille de sa molécule (exprimée par le volume molaire ou la

masse molaire), mais sans résultat concluant malgré le nombre impressionnant de solvants étudiés.

Le paramètre δ correspond à la racine carrée de la densité d'énergie cohésive pour le solvant considéré, est utilisé pour caractériser les forces intermoléculaires qui règnent au sein de celui-ci, et peut également être corrélé avec sa solubilité. Il a pour expression:

$$\delta = \sqrt{\frac{\Delta H_v - R \cdot T}{v}} = \sqrt{\frac{\rho \cdot (\Delta H_v - R \cdot T)}{M}} \quad [\text{J} \cdot \text{cm}^{-3}]^{0.5} \quad 1.7$$

<u>Avec:</u>	ΔH_v	enthalpie molaire de vaporisation	$[\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}]$
	R	constante des gaz parfaits	$[\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}]$
	v	volume molaire	$[\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}]$
	ρ	densité	$[\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}]$
	T	température	[K]
	M	masse molaire	$[\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$

Laane et al. (1987), quant à lui, a corrélé les mêmes résultats, mais cette fois avec l'hydrophobicité du solvant considéré. Cette hydrophobicité est donnée par la valeur de $\log P = \log_{10}(P)$, P étant le coefficient de partage du solvant dans un système biphasique de référence eau / n-octanol. A l'équilibre, $P_{(\text{solvant})}$ est donné par:

$$P_{(\text{solvant})} = \frac{[\text{Solv.}]_{\text{octanol}}}{[\text{Solv.}]_{\text{eau}}} \quad 1.8$$

Il est ressorti de cette étude une tendance nette à la rétention de plus de 50 % de l'activité initiale du catalyseur pour des valeurs de $\log P$ supérieures à 4. L'auteur, dans son commentaire, imaginait la possibilité d'abaisser cette valeur minimale par fixation du catalyseur sur un support hydrophile qui, en retenant plus fortement la couche d'hydratation de l'enzyme, stabiliserait celle-ci.

Pour conclure, on trouvera dans les revues suivantes un tour d'horizon à peu près complet des sujets abordés dans ce chapitre: Butler (1979), Blanch et al. (1988), Dordick (1989), Kise et al. (1990).

1.3 REACTION ETUDIEE

1.3.1 Position du problème

La présente étude porte sur une étape de résolution optique de la phénylalanine par voie enzymatique. Celle-ci pourrait s'inscrire dans un procédé de fabrication global et suivre par exemple une étape de synthèse chimique produisant un racémate. La réaction-test choisie est l'hydrolyse stéréosélective d'un ester racémique de cet a.a. par l'action de l' α -chymotrypsine. Cette enzyme digestive appartient à la famille des sérine-protéases, ainsi nommées parce que le résidu sérine réactif qu'elles possèdent est désactivé de façon irréversible par des composés organophosphates. Elle est synthétisée dans le pancréas et promeut l'hydrolyse de liaisons ester, éther ou peptidiques, selon le mécanisme illustré à la figure 1.13 (Dixon et Webb, 1979).

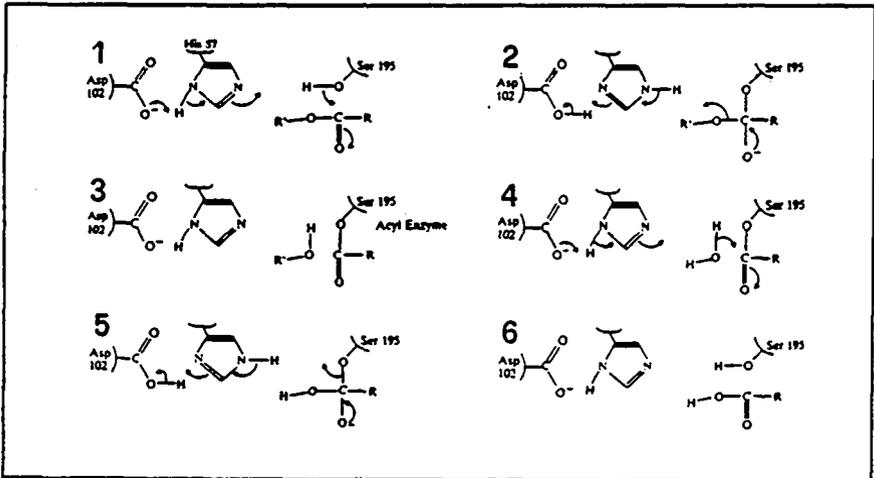


Figure 1.13: Mécanisme de scission des liaisons ester par l' α -chymotrypsine

Elle scinde ces liaisons dans les protéines, avec une préférence pour les résidus possédant un groupe aromatique ou lipophile. Cela est dû à la poche hydrophobe jouxtant le site actif, qui est représentée dans la partie droite de la figure 1.14. On distingue les résidus His-57 et Ser-195 de la "triade catalytique" en

haut à gauche, ainsi qu'un substrat adsorbé, le N-formyl-L-tryptophane dans le cas présent.

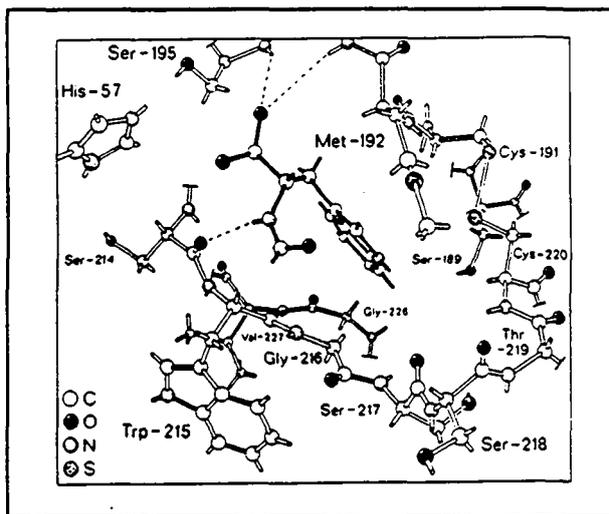


Figure 1.14: Poche hydrophobe de la chymotrypsine (Fersht, 1977)

Le schéma de principe de la réaction étudiée est montré à la figure 1.15. On libère la L-Phe et l'alcool correspondant au résidu R par hydrolyse de la forme L de l'ester, tout en laissant l'énantiomère D non réagi. Cette technique simple de dédoublement, connue depuis le début du siècle, a été appliquée aux acides aminés par Wrettlind (1950), qui avait traité un racémate de l'ester isopropylique de phénylalanine avec un extrait de pancréas de boeuf. Le procédé s'était déjà révélé efficace auparavant avec des dérivés de leucine, méthionine et tryptophane, et a fait depuis l'objet d'un brevet (Keller, 1986).

Dans le schéma ci-dessous on a désigné l'ester, c'est-à-dire le substrat, par la lettre S. A l'acide aminé produit, à savoir la phénylalanine, on a assigné son abréviation conventionnelle d'une lettre, F, l'alcool recevant quant à lui l'initiale P. L'enzyme est elle-même souvent abrégée en "α-CT", pour des raisons de commodité.

Si la réaction présentée se fait facilement et de façon parfaitement sélective vis-à-vis de la forme L du substrat, l'application du procédé ne va cependant pas sans poser quelques problèmes:

A pH élevé, les esters subissent une autohydrolyse qui est préjudiciable à la pureté optique du produit (formation de D-Phe).

Le substrat, qui est soumis à un équilibre acide-base (non représenté à la figure 1.15) et existe sous deux formes, l'une chargée et l'autre pas, voit la solubilité de sa forme neutre diminuer lorsque le pH augmente. Il condense alors en une deuxième phase huileuse qui adhère aux particules de catalyseur dans le cas d'un réacteur lit fixe, fait chuter l'activité de l'enzyme et provoque une augmentation dramatique de la perte de charge à travers le lit.

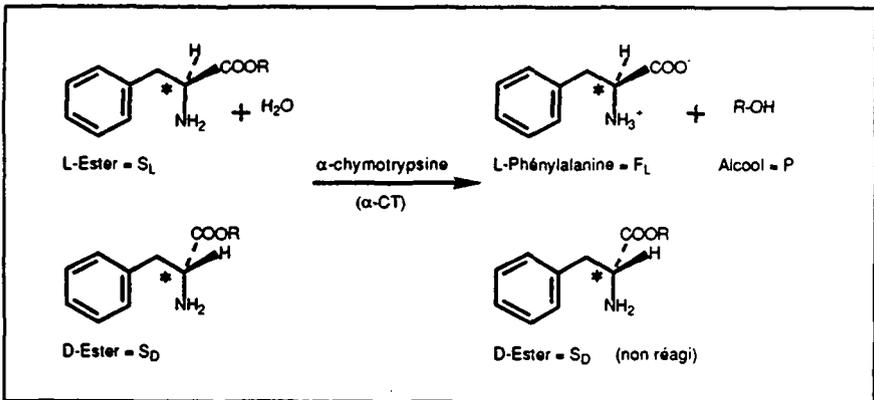


Figure 1.15: Réaction-test pour la résolution optique de la Phe

Aux concentrations de substrat élevées, une réaction secondaire conduit à la formation d'un ester de dipeptide insoluble dans l'eau, également susceptible d'endommager le catalyseur et de colmater le lit. Ce processus étant plus important à pH élevé, on est obligé de travailler à des valeurs relativement basses et éloignées de l'optimum d'activité pour l'enzyme, qui se situe aux environs de 6 pour ce genre de substrat et de réaction.

A ces valeurs-là le pouvoir tampon du système est malheureusement faible et à cause des protons libérés, le pH chute fortement durant l'hydrolyse. Ceci interdit encore une fois l'utilisation d'un réacteur continu muni d'un lit fixe de catalyseur, vu la nécessité de maintenir le pH dans un domaine acceptable pour l'enzyme, dont l'activité dépend fortement de ce paramètre.

Dans l'optique d'une application industrielle, il est difficilement envisageable de travailler avec un milieu fortement tamponné, voire d'ajouter de la base en continu dans le réacteur pour maintenir le pH à une valeur favorable. Ce sont certainement ces inconvénients qui ont fait négliger le procédé d'hydrolyse sélective des esters au bénéfice d'autres parfois plus complexes, mais plus rapidement accessibles à une exploitation en continu. Des moyens de remédier aux défauts évoqués existent pourtant, et ont fait l'objet du présent travail.

1.3.2 Solution proposée

On l'a vu, toutes les limitations du système sont liées au pH. Le problème de l'autohydrolyse peut cependant être circonvenu par la sélection d'un fragment R approprié pour l'ester, qui stabilisera le substrat. Pour le reste, si on veut travailler dans une plage de valeurs avantageuses vis-à-vis de la solubilité et de la polypeptisation, le problème crucial devient alors la chute de ce pH pendant l'hydrolyse. En effet, en dessous de 4 environ, la chymotrypsine est totalement désactivée et la réaction s'arrête.

Afin de mieux apprécier la situation, la figure 1.16 montre les différents équilibres et réactions impliqués dans le processus. On peut voir sur ce schéma que les réactions donnant lieu à la libération de protons sont les numéros (1), (4) et (5). Aux valeurs de pH acceptables pour l'enzyme, on peut cependant négliger l'influence de (4). Une solution consisterait donc à augmenter la fraction de substrat sous forme neutre dans le système sans avoir à augmenter le pH. La chose est réalisable en ajoutant au système un solvant organique immiscible à l'eau. En effet, le substrat non chargé a un caractère lipophile plus ou moins marqué, selon la nature du résidu R. Il va donc se solubiliser en grande partie dans cette seconde phase, d'où il sera réextrait au fur et à mesure de l'avancement de la réaction. Le groupement $-NH_2$ pourra alors jouer le rôle d'une base en titrant les protons libérés dans la phase aqueuse afin d'empêcher le milieu de devenir trop acide.

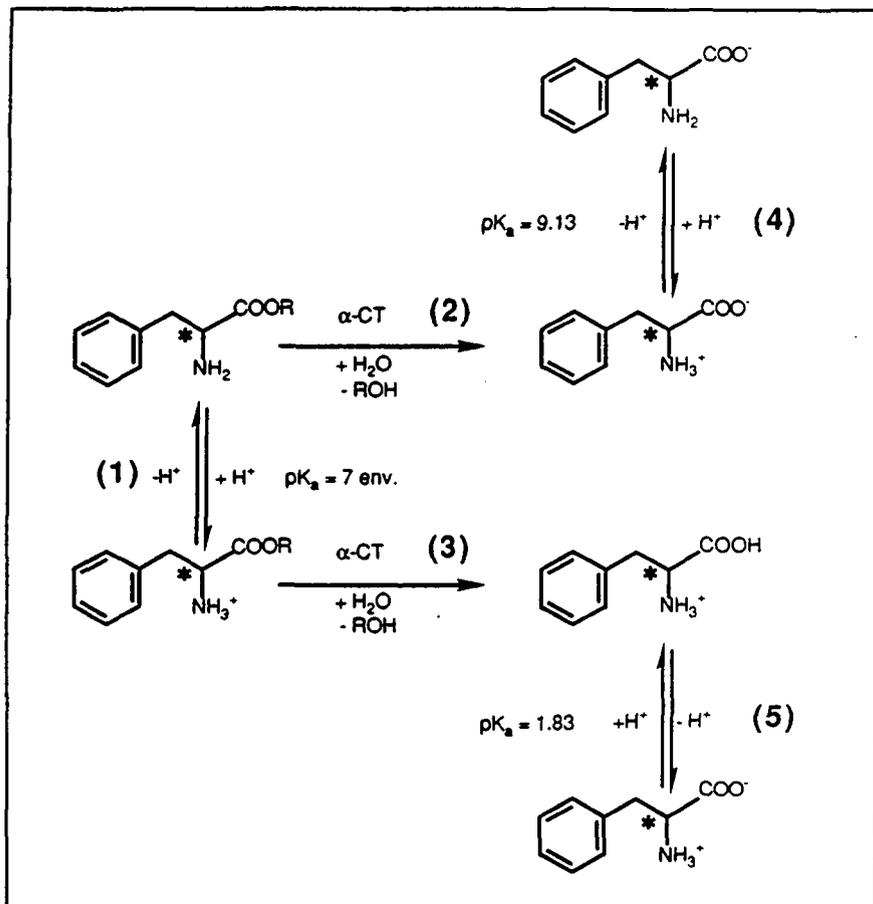


Figure 1.16: Equilibres acide-base et réactions

Un autre avantage de ce système est que seules les espèces neutres sont solubles dans la phase organique. Ceci implique que l'enzyme et la phénylalanine, presque toujours porteuses de charges dans les conditions d'exploitation du processus, resteront en phase aqueuse, où la réaction a lieu. L'alcool, par contre, se partagera entre les deux phases. Finalement, le fait de réduire, pour la même

charge du réacteur en substrat, la concentration de ce dernier en phase aqueuse devrait aussi diminuer l'effet des réactions de dimérisation et d'autohydrolyse.

Dans une telle application, la phase organique sert de réservoir pour le substrat, déplaçant ainsi l'équilibre acide-base dans la direction d'un pouvoir tampon du système plus élevé. C'est un cas de réaction enzymatique en système biphasique qui n'avait pas encore été évoqué au chapitre 1.2, dans le sens où on ne cherche pas ici à défavoriser l'hydrolyse.

La figure 1.17 présente la situation en présence de la phase organique, et pourra être utilement comparée avec les schémas 1.15 et 1.16.

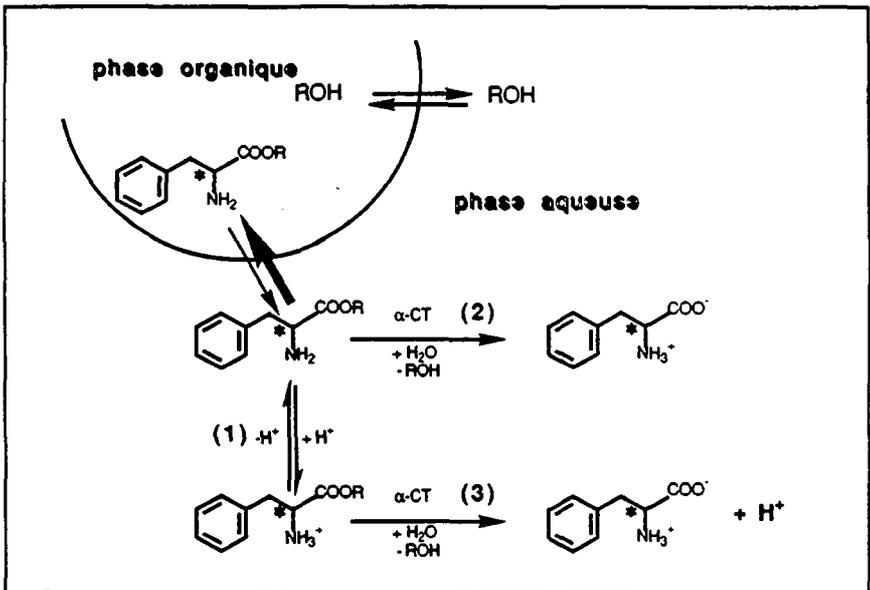


Figure 1.17: Réaction d'hydrolyse en système biphasique

Les processus ayant lieu dans la phase aqueuse ont été simplifiés par rapport à ceux présentés dans le schéma 1.16, vu que entre pH 4 et 6, on peut:

- a) négliger l'influence de l'équilibre de protonation du groupe amino de la phénylalanine.
- b) considérer le groupe acide carboxylique comme complètement dissocié.

La résolution optique en continu de la phénylalanine par hydrolyse enzymatique d'un racémat d'ester a déjà fait l'objet d'études expérimentales. Halwachs (1976) a travaillé avec l'ester méthylique dans un réacteur lit fluidisé à cinq étages séparés contenant l'enzyme immobilisée. Weiss (1978) a procédé à la réaction dans une cascade de deux cuves agitées continues équipées de membranes d'ultrafiltration destinées à retenir l'enzyme soluble dans le réacteur. Il avait testé diverses méthodes visant à augmenter la taille de celle-ci et donc son taux de rétention par la membrane poreuse. Tous deux ont relevé les problèmes de l'autohydrolyse et de la chute de pH en cours de réaction. Le premier a travaillé dans le lit fluidisé à des pH initiaux correspondant à un pouvoir tampon plus élevé, et le second a équipé les cuves d'une régulation de pH.

L'idée de déplacer le pouvoir tampon maximal vers des valeurs de pH plus basses à l'aide d'une phase organique a également été étudiée et brevetée par l'industrie (Dahod et Emple 1987, Emple 1986). Les auteurs ont utilisé l'ester éthylique de phénylalanine, l' α -chymotrypsine et le toluène comme phase organique. Dans une publication récente (Mirviss et al., 1990), ils proposent un procédé de synthèse complet en six étapes du L-PAME à partir d'hydantoïne et de benzaldéhyde: la DL-phénylalanine obtenue à la fin du troisième stade est stérilisée en présence de méthanol avant l'étape de résolution optique à l'aide de chymotrypsine dans un système biphasique eau / toluène, comme précédemment. Le D-ester restant est finalement racémisé et recyclé en tête de procédé.

Le présent travail, bien que visant le même but que ceux précédemment cités, s'articule davantage autour de l'étude cinétique de la réaction, et de l'influence du partage biphasique sur celle-ci. On tentera de définir les conditions les plus favorables à la mise en oeuvre d'un procédé en continu sans régulation de pH, qui minimise de plus les autres problèmes rencontrés comme l'autohydrolyse ou la peptisation du substrat. Le chapitre qui suit traitera de la sélection des partenaires du système et de la caractérisation de celui-ci, après avoir décrit les paramètres fondamentaux le régissant.

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 1.1

BERTHIER-BAYLE, Y. (1989): Une première dans le secteur des acides aminés: la production industrielle de L-thréonine par génie génétique
Biotfutur (85), 58-59

BRATZLER, R. L. (1987): New reactor systems for the large scale stereoselective synthesis and separation of optically active fine chemicals
"Biotransformations", The World Biotech Report Vol. 1, Part 5, Online Publications, London

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T.; MORI, T. (1976): Production of L-amino acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex
Methods in Enzymology, 44 (Immobilized enzymes), Acad. Press. Inc., New York, 746-759

CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM 111, (1985): Enzymes in organic synthesis
Pitman Ed., London

DOCUMENTATION OF MOLECULAR SPECTROSCOPY (1959)
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergst.

FLASCHEL, E.; WANDREY, C. (1983): Ultrafiltration for the separation of biocatalysts
Adv. in Biochem. Eng./Biotech., 26, 73-142

HALWACHS, W.; WANDREY, C.; SCHUEGERL, K. (1977): Application of immobilized chymotrypsin in a multistage fluidized-bed reactor
Biotechnol. Bioeng., 19, 1667-1677

KANEKO, T.; IZUMI, Y.; CHIBATA, I.; ITOH, T. (1974): Synthetic production and utilization of amino acids
Halsted Press Ed. (J. Wiley & Sons Inc.), New York

KLAUSNER, A. (1985): Building for success in phenylalanine
Biotechnology, 3 (4), 301-307

LEUCHTENBERGER, W.; PLOECKER, U. (1986): L-aminosäure Produktion in Enzym-Membran-Reaktor GBF
Monographien, Band 9: "Technische Membranen" in der Biotechnologie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 179-188

NAKANISHI, K.; KONDO, M.; MATSUNO, R. (1988): *Repeated batch and continuous synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-phenylalanine methyl ester with immobilized thermolysin*
Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 229-234

O'DONNELL, M.J.; BENNET, W.D.; WU, S. (1989): The stereoselective synthesis of α -amino acids by phase-transfer catalysis
J. Amer. Chem. Soc., 111, 2353-2355

ROBERTS, J.D.; CASERIO, M.C. (1977): Basic principles of organic chemistry
W.A. Benjamin Inc. Ed., 2nd ed.

SCHMIDT, E. (1987): Synthese von L-Phenylalanin mit Multi-enzym-systemen
Dissertation, Mathem.-Naturw. Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn

SCHMIDT-KASTNER, G.; EGERER, P. (1984): Amino acids and peptides
Biotechnology, Vol. 6a (Biotransformations), Chapter 10, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 387-419

SCHNEIDER, M.; ENGEL, N.; BOENSMANN, H. (1984): Enzymatische Synthesen chiraler Bausteine aus Racematen: Herstellung von (1R, 3R)-Chrysanthemum-, -Permethrin- und -Caronsäure aus racemischen Diastereomeregemischen
Angew. Chem., 96 (1), 52-56

SCHNEIDER, M.; REIMERDES, E. H. (1987): Enzyme als Katalysatoren in der organischen Synthese (II)
Forum Mikrobiologie, (9), 302-318

TOROMANOFF, E.; (1986): Substances naturelles: la compétition chimie-biotechnologies, le cas des acides aminés
Biofutur (49), 39-46

- VENNESLAND, B. (1974): Stereospecificity in biology
Topics in current chemistry, (48) , Springer Verlag Berlin, 39-65
- WANDREY, C.; FLASCHEL, E. (1979): Process development and economic aspects in enzyme engineering. Acylase L-methionine system
Adv. in Biochem. Eng., 12, 147-218
- WANDREY, C (1986): Synthesis of L-amino acids by isolated enzymes and microorganisms
"Enzymes as catalysts in organic synthesis", D. Reidel publishing Company, Dordrecht RFA, 263-284
- WILLIAMS, R.M. (1989): Synthesis of optically active α -amino acids, 1st ed.
Pergamon Press, Oxford
- YAMADA, S.; HONGO, C.; YOSHIOKA, R.; CHIBATA, I. (1983): Method for the racemization of optically active amino acids
J. Org. Chem., 48, 843-846

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 1.2

- ASAKURA, T.; ADACHI, K.; SCHWARTZ, E. (1978): Stabilizing effect of various organic solvents on proteins
J. Biol. Chem., 253 (18), 6423-6425
- BLANCH, H.W.; EGGERS, D.L.; RAMELMEIER, R.A.; CREAGH, L.; CLARK, D.S.; PRAUSNITZ, J.M (1988): Enzyme bioreactors employing reverse micelles and two-phase systems
Proceedings of the 8th International Biotechnology Symposium, Durand & Bobichon Ed., Paris, Vol. 1, 577-590
- BRINK, L.E.S.; TRAMPER, J. (1985): Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis
Biotechnol. Bioeng., 27, 1258-1269

BRINK, L.E.S.; TRAMPER, J. (1986) (a): Modelling the effects of mass transfer on kinetics of propene epoxidation of immobilized *Mycobacterium* cells: pseudo-one-substrate conditions and negligible product inhibition
Enzyme Microb. Technol., **8**, 281-288

BRINK, L.E.S.; TRAMPER, J. (1986) (b): Modelling the effects of mass transfer on kinetics of propene epoxidation of immobilized *Mycobacterium* cells: product inhibition
Enzyme Microb. Technol., **8**, 334-340

BRINK, L.E.S.; TRAMPER, J.; LUYBEN, K.C.A.M.; VAN'T RIET, K. (1988): Biocatalysis in organic media
Enzyme Microb. Technol., **10**, 736-743

BRORSON, J.R.; NOVAK, E.S.; MAKINEN, M.W. (1985): Solvent structure and enzyme activity
J. Biomol. Struct. Dyn., **3** (1), 197-204

BUTLER, L.G. (1979): Enzymes in non-aqueous solvents
Enzyme Microb. Technol., **1**, 253-259

DORDICK, J.S. (1989): Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents
Enzyme Microb. Technol., **11**, 194-211

DOUZOU, P. (1971): Aqueous-organic solutions of enzymes at sub-zero temperatures
Biochimie, **53**, 1135-1145

EGGERS, D.K.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, J.M. (1989): Extractive catalysis: solvent effects on equilibria of enzymatic reactions in two-phase systems
Enzyme Microb. Technol., **11**, 84-89

KHMELNITSKY, Y.L.; LEVASHOV, A.V.; KLYACHKO, N.L.; MARTINEK, K. (1988): Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content
Enzyme Microb. Technol., **10**, 710-724

KISE, H.; HAYAKAWA, A.; NORITOMI, H. (1990): Protease catalyzed synthetic reactions and immobilization-activation of the enzyme in hydrophilic organic solvents

J. Biotechnol., 14, 239-254

KLIBANOV, A.M. (1988): Enzymatic synthesis of biologically active compounds in organic solvents

Proceedings of the 8th International Biotechnology Symposium, Durand & Bobichon Ed., Paris, Vol. 1, 385

KLIBANOV, A.M.; SAMOKHIN, G.P.; MARTINEK, K.; BEREZIN, I.V. (1977): A new approach to preparative enzymatic synthesis

Biotechnol. Bioeng., 19, 1351-1361

LAANE, C.; BOEREN, S.; HILHORST, R.; VEEGER, C. (1987): Optimization of biocatalysis in organic media

Biocatalysis in organic media, Proc. of an international symposium, edited by C. Laane, J. Tramper and M.D. Lilly, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, 1987, 65-84

LILLY, M.D.; WOODLEY, J.M. (1985): Biocatalytic reactions involving water-insoluble organic compounds

"Biocatalysts in organic syntheses", Elsevier Ed., Amsterdam, 179-192

MONSAN, P. (1981): Utilisation des enzymes en présence de solvants organiques

Actual. Chim., 6, 27-31

MORESOLI, C. (1990): Etude de la transestérification d'un mélange racémique de l'ester propylique de la phénylalanine à l'aide de chymotrypsine

Thèse EPFL N^o835, CH-Lausanne

PLIURA, D.H.; JONES, B.J. (1980): Effects of organic solvents on immobilized enzyme catalyses. Chymotrypsin immobilized on Sephadex

Can. J. Chem., 58, 2633-2640

SCHEPER, T.; HALWACHS, W.; SCHUEGERL, K. (1984): Production of L-amino acid by continuous enzymatic hydrolysis of DL-amino acid methyl ester by the liquid membrane technique

Chem. Eng. J., 29, B31-B37

TANIZAWA, K.; BENDER, M.L.; (1974): The application of insolubilized α -chymotrypsin to kinetic studies on the effect of aprotic dipolar organic solvents

J. Biol. Chem., 249 (7), 2130-2134

WOODLEY, J.M.; LILLY, M.D. (1990): Extractive biocatalysis: the use of two-liquid phase biocatalytic reactors to assist product recovery

Chem. Eng. Sci., 45 (8), 2391-2396

WU, D.; BELFORT, G.; CRAMER, S.M. (1990): Enzymatic resolution with a multiphase membrane bioreactor: a theoretical analysis

Ind. Eng. Chem. Res., 29, 1612-1621

ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. (1985): Enzyme-catalyzed processes in organic solvents

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3192-3196

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 1.3

DAHOD, S.K.; EMPIE, M.W. (1987): L-phenylalanine production process utilizing enzymatic resolution in the presence of an organic solvent

Biocatalysis in organic media, Proc. of an international symposium, edited by C. Laane, J. Tramper and M.D. Lilly, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, 1987, 419-424

DIXON, M.; WEBB, E.C. (1979): Enzymes (3rd ed.)

Academic Press, New York, 305

EMPIE, M.W. (1986): Resolution of racemates of amino acids

E.P. 171 862 A2, 19.02.1986

FERSHT, A. (1977): Enzyme structure and mechanism (2nd ed.)

W.H. Freeman & Co, New York, 20

HALWACHS, W. (1976): Reaktionstechnische Untersuchungen mit trägergebundenen Chymotrypsin in Mehrphasenreaktoren
Dissertation, Technische Universität Hannover

KELLER, R. (1984): Verfahren zur Herstellung aromatisch substituierter L-aminosäuren
E.P. 178 553 A2, 18.10.1984

MIRVISS, S.B.; DAHOD, S.K.; EMPIE, M.W. (1990): Synthesis of L-phenylalanine methyl ester
Ind. Eng. Chem. Res., 29, 651-659

WEISS, R. (1978): Reaktionstechnische Untersuchungen mit nativem und derivatisiertem Chymotrypsin in Membranreaktoren
Dissertation, Technische Universität Hannover

WRETLIND, K.A.J. (1950): Resolution of racemic phenylalanine
J.Biol.Chem., 186, 221-224

2. SELECTION ET CARACTERISATION DU SYSTEME

On s'est attaché, dans cette première phase du travail, à choisir un substrat et une phase organique appropriés. Les critères de sélection de l'ester étaient une méthode de synthèse assez simple, une bonne résistance à l'autohydrolyse et un taux de solubilisation favorable dans la phase organique. Cette dernière devait quant à elle être aussi inerte que possible vis-à-vis de l'enzyme, se disperser aisément dans la phase aqueuse sans former d'émulsion trop stable, ne pas gêner l'analyse des réactants et solubiliser au mieux le substrat neutre ainsi que l'alcool.

2.1 MATERIEL ET METHODES

2.1.1 Réactifs et produits employés

L' α -chymotrypsine (EC 3.4.21.1) et la L-phénylalanine employées ont été obtenues chez Sigma (N^{os} de référence C-4129 et P-2126 respectivement). La maison Hoechst AG a fourni gracieusement l'ester méthylique de D,L-phénylalanine (sous forme d'hydrochlorure), l'ester n-propylique de D,L-phénylalanine (avec le sulfate de propyle ou HCl comme contre-ion), ainsi que la D,L-phénylalanine. La nomenclature de ces substrats, ainsi que celle des autres esters utilisés lors des essais préliminaires, a été simplifiée à l'aide des abréviations présentées dans le tableau 2.1 ci-dessous:

Ester méthylique de phénylalanine	: PAME
Ester éthylique de phénylalanine	: PAEE
Ester n-propylique de phénylalanine	: PAPE
Ester n-butylique de phénylalanine	: PABE
Ester n-amylque de phénylalanine	: PAAE
Ester n-hexylique de phénylalanine	: PAHE

Tableau 2.1: Abréviations pour les esters de phénylalanine

Les composés autres que le PAME et le PAPE déjà cités ont été synthétisés en laboratoire selon le mode opératoire exposé dans le tableau 2.2 qui suit:

On dissout partiellement 50 g (0.30 mol) de D,L-phénylalanine avec 50 ml de H_2SO_4 conc. dans un ballon de 500 ml surmonté d'un réfrigérant et chauffé à 50 °C sous agitation magnétique. On ajoute alors lentement un grand excès (2 à 3 mol env.) de l'alcool, et on chauffe 2 h à reflux à la température d'ébullition de celui-ci.

On distille ensuite l'excès d'alcool sur une petite colonne Vigreux en contrôlant soigneusement la température. (Pour les alcools de masses moléculaires plus élevées, on procédera à cette opération sous un vide plus ou moins poussé, afin de ne pas monter au dessus de 100 °C et d'éviter de décomposer le produit).

On verse alors le mélange réactionnel dans 200 ml d'eau refroidie à 0 °C à l'aide d'un bain de glace. On extrait ensuite la phase aqueuse par adjonction de 200 ml de MIBK (méthyl-4-pentanone-2) en montant le pH de la phase aqueuse à 8 avec une solution concentrée de NaOH. On extrait à nouveau la phase organique préalablement isolée avec 200 ml de phase aqueuse à pH 2, ajusté à l'aide de HCl concentré.

On sépare les phases, et on évapore la phase aqueuse à sec. Le résidu est alors dissout à chaud dans le toluène, et recristallisé à froid. Le solide est finalement filtré, puis séché à l'étuve à 50 °C sous vide.

Remarque: si on désire synthétiser l'une ou l'autre des formes énantiomériques de l'ester, il suffit d'utiliser au début la phénylalanine qui a la même configuration, cette dernière n'étant pas altérée par la réaction d'estérification.

Tableau 2.2: Synthèse des n-alkyl esters de phénylalanine

Les alcools employés pour la synthèse des esters, les phases organiques testées et les produits utilisés pour la préparation de l'éluant HPLC sont consignés dans le tableau 2.3 ci-après. Leurs numéros de référence sont tous précédés d'un "F" ou d'un "M", qui signifient "Fluka" (Fluka Chemie AG, Buchs (CH)) ou "Merck" (E. Merck, Darmstadt (D)) respectivement suivant la maison qui les a fournis. Le méthanol de l'éluant, à la dernière ligne du tableau, a quant à lui été commandé chez Romil Chemicals Ltd, Loughborough (GB).

Composé	N° de référence
Ethanol	F 02860
n-Propanol	M 997
n-Butanol	F 19420
n-Pentanol (alcool n-amylque)	F 76929
n-Hexanol	F 52840
Méthyl-isobutyl-cétone (MIBK)	M 820820
Hexane	F 52770
n-Octanol	F 74852
Méthyl-t-butyl-éther	F 20256
Acétate de n-butyle	F 45860
Dodécane	F 44020
Toluène	F 89681
1,1,1 Trichloréthane	F 91099
KH_2PO_4	F 60220
$(n\text{-C}_4\text{H}_9)_4\text{N}(\text{HSO}_4)$	F 86868
H_3PO_4 conc.	F 79620
CH_3OH	Romil H 410

Tableau 2.3: Références des produits utilisés

2.1.2 Méthodes d'analyse

Lors des expériences d'hydrolyse enzymatique et d'autohydrolyse effectuées en réacteur fermé à pH constant, on pouvait facilement suivre l'apparition de la phénylalanine en enregistrant au cours du temps le volume de NaOH injecté dans le système pour titrer les protons libérés par la réaction et maintenir le pH à sa valeur de consigne (l'installation est décrite au sous-chapitre 2.1.3 et les aspects théoriques sont développés plus loin).

Cette technique simple n'est cependant plus applicable aux essais conduits à pH flottant, voire à ceux où l'on souhaite analyser l'ester uniquement. Dans ces cas-là, les différents partenaires étaient séparés et dosés par HPLC. L'installation comprenait un réservoir d'éluant (dont la composition et le mode de préparation sont donnés dans le tableau 2.4), lequel traversait une unité de dégazage (Erma

Optical Works, Tokyo (J), mod. ERC 611) avant d'arriver à la pompe à deux têtes (LKB, Bromma (S), mod. 2150).

On dissout pour un litre d'eau distillée 10 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) et 1 g d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium ($(n-Bu_4)N(HSO_4)$). On abaisse ensuite le pH de la solution à 2.1 à l'aide d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) concentré, on ajoute 600 ml de méthanol et on dégaze pendant 20 min sous un léger vide (150-200 mm Hg).

Tableau 2.4: Composition et préparation de l'éluant HPLC

Le flux traversait ensuite une vanne d'injection à six voies, puis un filtre et enfin la colonne HPLC, d'un diamètre interne de 4.6 mm et de 250 mm de long. Elle contenait une phase stationnaire apolaire en " C_{18} " de type Nucleosil 7C8, analogue à celle décrite par Molnar (1977), qui a été un des premiers à décrire la séparation d'acides aminés et de peptides à l'aide de tels remplissages. A la sortie on trouvait un détecteur UV mesurant l'absorbance à 256 nm (Kratos Analytical Instruments, Ramsey NJ (USA), mod. Spectroflow 757).

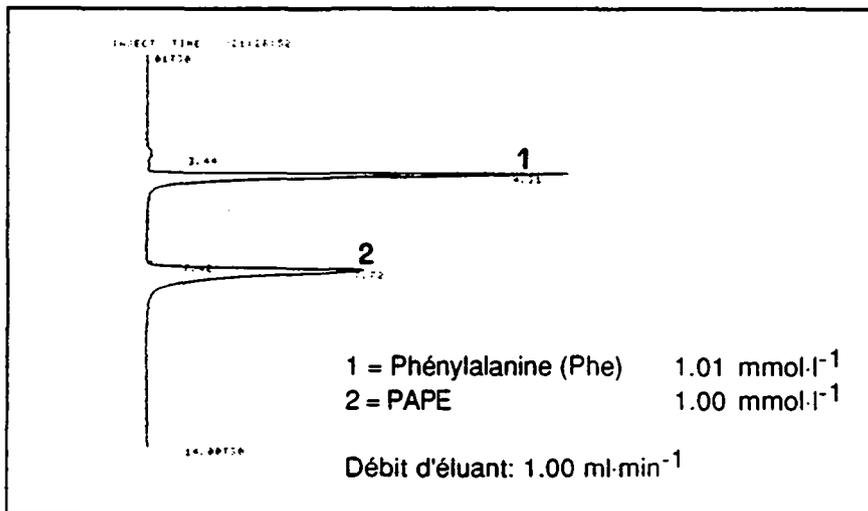


Figure 2.1: Chromatogramme d'un standard de phénylalanine et de PAPE

Un échantillonneur programmable (Kontron, Zürich (CH), mod. MSI 660) pompait le mélange à analyser à travers la boucle de la vanne d'injection (d'un volume de 10 μ l) avant de faire commuter cette dernière. Le signal à la sortie du détecteur était recueilli par un enregistreur-intégrateur (Spectra Physics, Santa Clara (USA), mod. SP 4100) piloté par l'échantillonneur à l'aide d'une interface.

Un exemple de chromatogramme est donné à la figure 2.1 qui précède, sur lequel on voit séparés la phénylalanine et le PAPE. On notera au passage qu'à 256 nm, les n-alcanols ne sont pas détectés. On a également observé qu'en augmentant le pourcentage de méthanol dans le mélange, on diminuait le temps d'éluion des substances. La composition choisie constitue donc un compromis (en partie économique) permettant d'obtenir une bonne séparation des pics dans un temps suffisamment court.

La méthode d'échantillonnage lors des essais en système biphasique à pH flottant a dû être optimisée: 1 ml de la dispersion des deux phases liquides était prélevé à l'aide d'une pipette automatique (Gilson SA, Villiers le Bel (F), mod. Pipetman P 1000) dont la pointe jetable avait été préalablement tronquée, afin d'éviter les problèmes liés à l'hydrophobicité du matériau. Le volume relativement élevé de l'échantillon permet aussi d'effectuer des prélèvements représentatifs des fractions volumiques dans le réacteur. La mise en contact avec un volume égal de HCl 1N permettait d'extraire vers la phase aqueuse tout le substrat restant en phase organique, et de stopper la réaction en désactivant l'enzyme (soluble ou immobilisée) prélevée avec le liquide.

Lugrin (1985), dans son travail de diplôme, séchait alors les échantillons sous vide (200 mbar, 50 °C) pour évaporer la phase organique, avant de les dissoudre dans l'éluant et de les analyser. On s'est aperçu ensuite que le solvant organique présent dans la phase aqueuse ne gênait pas la détection des pics du substrat et de l'a.a., et que son temps de rétention n'était que légèrement supérieur aux leurs. On s'est alors contenté de diluer 100 μ l de phase aqueuse (prélevés après contact avec HCl) avec l'éluant et de passer l'échantillon tel quel. Cette méthode avait le gros avantage de supprimer deux manipulations d'échantillons, et donc autant de sources d'erreur.

Pour la mesure de son coefficient de partage, on a dosé le propanol dans chacune des deux phases liquides à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Shimadzu modèle GC-3BF, Kyoto, (J)) équipé d'une colonne (acier inox

1/8 ") de 1m de long remplie de Porapak Q (Brechtbühler AG, Zürich, (CH)). Un détecteur FID et un enregistreur-intégrateur (Shimadzu modèle C-R1B, Kyoto, (J)) complétaient l'équipement de l'appareil.

2.1.3 Appareillage

Réacteur fermé (cuve agitée discontinue)

L'installation décrite ci-dessous est de nature polyvalente et a servi aussi bien aux titrations qu'aux tests d'autohydrolyse, aux mesures du coefficient de partage biphasique qu'aux études cinétiques en réacteur fermé (que ce soit en système aqueux, bi- ou triphasique, à pH constant ou flottant). Elle était constituée d'une cuve de titration de 40 ml (Metrohm AG, Herisau (CH), mod. 6.1418.220) à double manteau, maintenue à 30 °C grâce à un thermostat (Colora Messtechnik GmbH, Lorch (D), mod. K4). Une agitation vigoureuse, fournie par un barreau magnétique, assurait l'homogénéité du mélange dans la cuve.

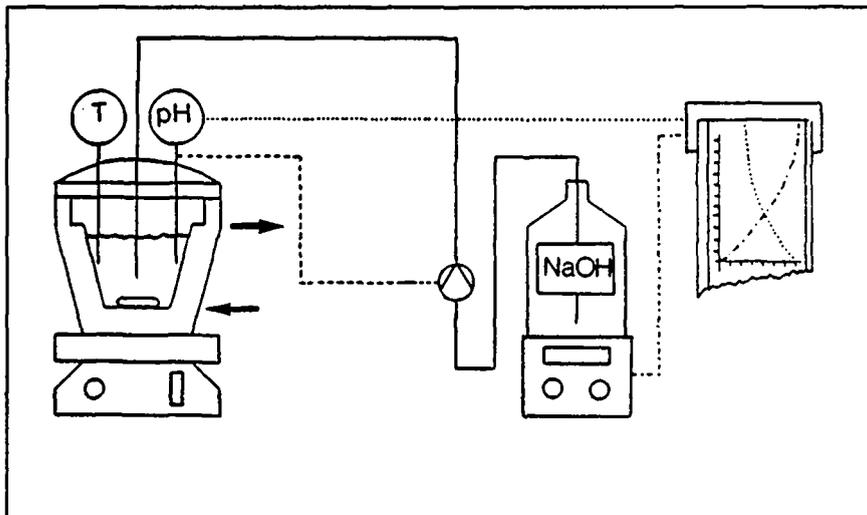


Figure 2.2: Installation pour les essais en système fermé

La mesure et le contrôle du pH étaient assurés par un pH-mètre (Metrohm AG, Herisau (CH), mod. 632) relié à un régulateur-titracteur (Metrohm, mod. 614).

lequel envoyait des impulsions à une burette automatique (Metrohm, mod. 665) injectant dans la cuve une solution de NaOH. Suivant l'application, on pouvait enregistrer en ligne le signal à la sortie de la burette, qui est proportionnel au volume de base consommé, et/ou celui à la sortie du pH-mètre. L'installation est décrite schématiquement à la figure 2.2 qui précède.

Réacteur tubulaire continu et installation

Pour les essais d'hydrolyse en continu avec l'enzyme immobilisée, on a dimensionné et construit l'installation présentée à la figure 2.4. Elle comprenait une cuve cylindrique en verre de 2 l (diam. int. = 141 mm, haut. = 150 mm) munie d'un double manteau en plexiglas permettant, grâce à un thermostat-cryostat (Haake Messtechnik GmbH, Karlsruhe (D), mod. F3-C), d'en contrôler la température. Elle était également équipée de quatre chicanes permettant d'améliorer l'agitation, celle-ci étant assurée par une turbine à 6 pales entraînée par un moteur électrique (Ika Werk GmbH, Staufen (CH), mod. RW 18).

Les dimensions relatives de cette partie du système sont définies précisément, pour garantir un volume sans zone morte. Elles sont données à la figure 2.3 et sont tirées d'un article de Calabrese et al. (1986).

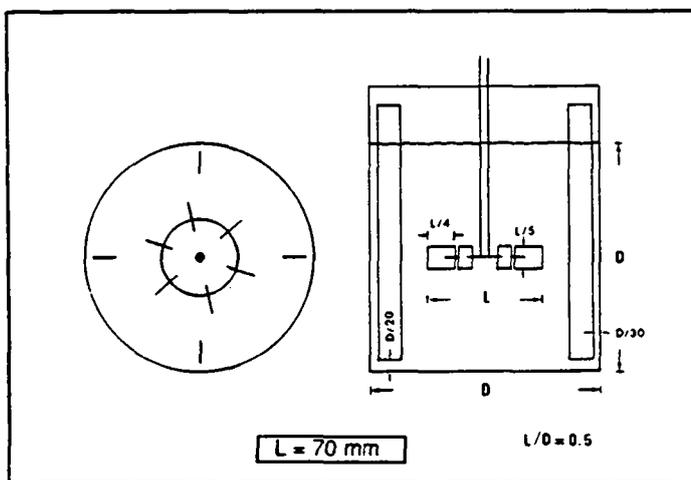


Figure 2.3: Dimensions relatives de la cuve et du dispositif d'agitation

Ces rapports de longueurs sont des valeurs optimisées et constituent une référence communément admise pour la conception des dispositifs destinés à l'étude et à la caractérisation des dispersions liquide-liquide.

C'est dans cette cuve qu'on dispersait les deux liquides immiscibles, qu'on les préchauffait et qu'on ajustait le pH de la phase aqueuse. Le mélange était alors pompé (pompe à piston MPL, London (GB), mod. E1, tête SS 5 C) à travers un échangeur de chaleur, avant d'atteindre le réacteur tubulaire constitué d'une colonne HPLC en acier inox (diam. int. = 4.6 mm, long. = 250 mm) remplie d'enzyme immobilisée et entourée d'un double manteau en plexiglas permettant l'ajustement de la température de réaction à l'aide d'un second thermostat (Colora Messtechnik GmbH, Lorch (D), mod. K4). Lors des premiers essais, on a également utilisé une colonne pour la chromatographie liquide avec double manteau (Pharmacia, Uppsala (S), mod. C10: diam. int. 10 mm, long. 400 mm) en guise de réacteur. Un manomètre (Wika Manometer AG, Hitzkirch (CH), mod. 232) mesurait la perte de charge à travers le lit catalytique, et deux sondes de température (Waldsee Electronic GmbH, Bad Waldsee (D), mod. 4.60 001.111) indiquaient la valeur de T dans la cuve et à l'entrée du réacteur.

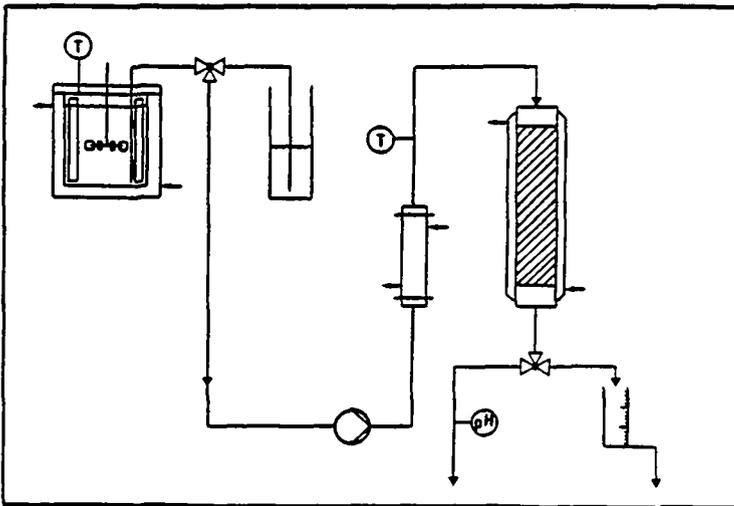


Figure 2.4: Installation pour les essais en continu (réacteur tubulaire)

Une vanne à trois voies à la sortie du réacteur orientait le flux de dispersion soit vers la prise d'échantillons (servant également aux mesures de débit), soit vers un dispositif de mesure en continu du pH constitué d'un petit récipient cylindrique de 10 ml environ, agité magnétiquement et dans lequel plongeait une électrode (Metrohm AG, Herisau (CH), mod. 6.0202.11) reliée à un pH-mètre (Metrohm, mod. 632). Un schéma de l'installation est donné à la figure 2.4:

Cuve agitée avec boucle de recirculation

Des essais complémentaires ont encore été réalisés dans une troisième installation: également à caractère polyvalent, elle comporte une cuve en verre de 250 ml à double manteau (Büchi AG, Uster (CH), mod. NW-80) chauffée à l'aide d'un thermostat (Colora Messtechnik GmbH, Lorch (D), mod. K4) et agitée magnétiquement. Une boucle de recirculation part de la cuve, passe par une pompe à engrenage (Ismatec SA, Zürich (CH), mod. MS-Z-141), traverse une colonne en verre pour la chromatographie liquide contenant un lit d'enzyme fixée, et retourne à la cuve. Une électrode (Metrohm AG, Herisau (CH), mod. 6.0202.111) plonge dans cette dernière et permet d'y mesurer le pH à tout instant. Cette disposition, illustrée par la figure 2.5, permet d'utiliser l'installation de trois façons différentes:

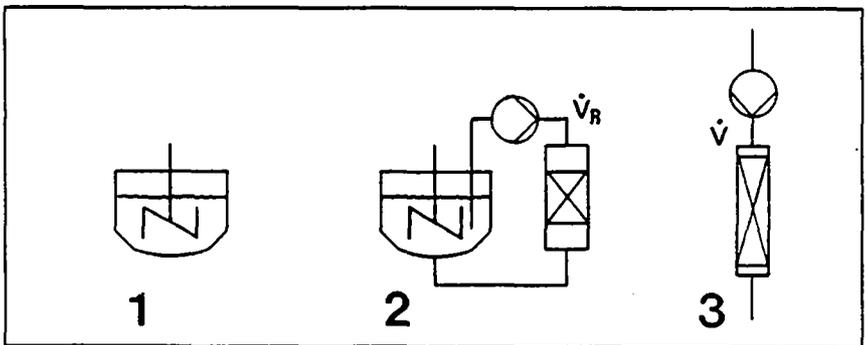


Figure 2.5: Modes d'utilisation possible du réacteur polyvalent

1) Comme une cuve agitée discontinue. La solution de substrat et l'enzyme y sont introduites, et la réaction a lieu sans que rien ne soit envoyé dans la boucle de recirculation.

2) Toujours en système fermé, avec la solution de substrat qui est mise en circulation dans la boucle, où elle entre en contact avec l'enzyme. En variant le débit \dot{V}_R (cf figure 2.5), on arrive à changer les conditions hydrodynamiques dans le lit sans que cela ait une influence sur le temps de contact avec le catalyseur.

3) Dans un cas extrême, en supprimant la recirculation, on retrouve la configuration décrite plus haut pour l'installation en continu. Elle n'a cependant pas été utilisée sous cette forme, vu la faible capacité de la cuve et l'existence de l'autre montage équivalent.

2.2 AUTOHYDROLYSE DES SUBSTRATS

Dans un premier temps, on a mesuré la vitesse d'autohydrolyse à pH constant des différents substrats potentiels déjà cités plus en avant, à savoir la série des 6 premiers n-alkyl esters de phénylalanine.

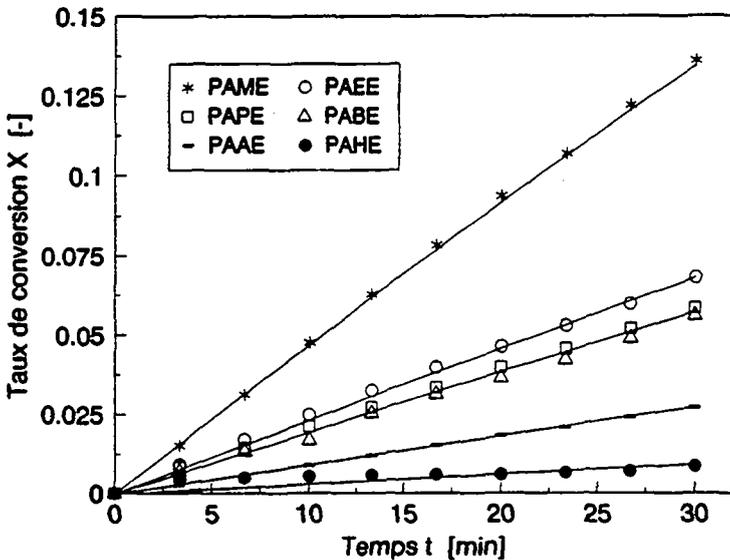


Figure 2.6: Taux d'autohydrolyse des esters de Phe à pH 10.0
 $T = 30\text{ °C}$, $[\text{ester}]_0 = S_0 = 25\text{ mmol.l}^{-1}$

25 ml d'une solution d'ester de concentration égale à 25 mmol.l⁻¹ étaient introduits dans la cuve agitée magnétiquement. Une fois la température de 30 °C atteinte et stable, on ajustait le pH manuellement à 10.0 (valeur de consigne), et on mettait le régulateur en fonction. On suivait ensuite la réaction par mesure du volume de base nécessaire au maintien du pH à la valeur fixée, ce volume étant proportionnel au nombre de protons libérés par l'hydrolyse. Les résultats obtenus sont reportés à la figure 2.6 ci-avant:

Il en ressort clairement que plus le reste alkyl R est long, plus l'ester se trouve stabilisé vis-à-vis de l'autohydrolyse. Ce genre de processus étant typiquement de premier ordre, on peut poser:

$$-\frac{dS}{dt} = k_{ah} \cdot S \quad 2.1$$

Ce qui donne, après séparation des variables et intégration:

$$S(t) = S_0 \cdot \exp(-k_{ah} \cdot t) \quad 2.2$$

$$\text{De plus, comme } S = S_0 \cdot (1-X) \quad 2.3$$

$$X(t) = 1 - \exp(-k_{ah} \cdot t) \quad 2.4$$

On peut linéariser l'équation 2.4 et obtenir k_{ah} à partir des valeurs mesurées de $X = f(t)$ qui sont reportées à la figure 2.6 ci-avant:

$$\ln(1 - X(t)) = -k_{ah} \cdot t \quad 2.5$$

Composé	pH [-]	k_{ah} [min ⁻¹]
PAME	10.0	$4.83 \cdot 10^{-3} \pm 6.9 \cdot 10^{-6}$
PAEE	10.0	$2.36 \cdot 10^{-3} \pm 5.9 \cdot 10^{-6}$
PAPE	10.0	$2.00 \cdot 10^{-3} \pm 5.2 \cdot 10^{-6}$
PABE	10.0	$1.98 \cdot 10^{-3} \pm 1.32 \cdot 10^{-5}$
PAAE	10.0	$0.93 \cdot 10^{-3} \pm 2.3 \cdot 10^{-6}$
PAHE	10.0	$0.32 \cdot 10^{-3} \pm 3.34 \cdot 10^{-5}$

Tableau 2.5: Valeurs de k_{ah} déterminées pour les ester de Phe

Les valeurs de k_{ah} pour les composés étudiés ont donc été déterminées par une régression linéaire de $\ln(1 - X(t))$ en fonction de t , suivant l'équation 2.5. Les courbes pleines de la figure 2.6 représentent pour chaque ester l'évolution du taux de conversion, recalculée à l'aide du k_{ah} obtenu et de l'équation 2.4.

On a mesuré dans une autre série d'essais le taux d'autohydrolyse du PAPE à différents pH. Les résultats sont reportés à la figure 2.7 en même temps que les courbes calculées, et les valeurs de k_{ah} dans le tableau 2.6. A noter qu'il n'a pas été possible de mesurer une autohydrolyse à pH 6.0.

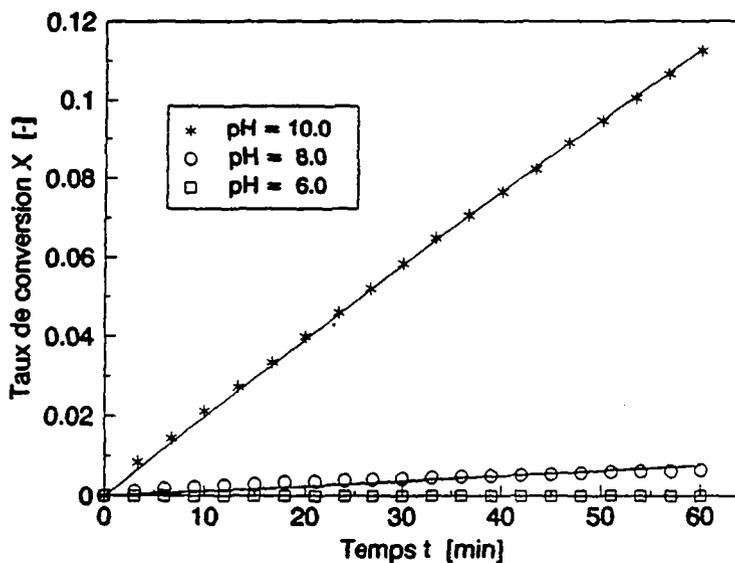


Figure 2.7: Taux d'autohydrolyse du PAPE à différents pH

Composé	pH [-]	k_{ah} [min^{-1}]
PAPE	10.0	$2.00 \cdot 10^{-3} \pm 5.2 \cdot 10^{-6}$
PAPE	8.0	$0.12 \cdot 10^{-3} \pm 5.6 \cdot 10^{-6}$
PAPE	6.0	-

Tableau 2.6: Valeurs de k_{ah} pour l'autohydrolyse du PAPE

2.3 PARTAGE BIPHASIQUE DES SUBSTRATS

2.3.1 Titration en milieu biphasique

Dans le but de quantifier la distribution du substrat entre les deux phases, on a mesuré l'influence de la phase organique sur les propriétés acide-base du système. Pour ce faire, on a procédé à la titration des substrats en présence de différents volumes d'une phase organique, l'isobutyl-méthyl-cétone (MIBK) dans le cas présent.

30 ml d'une solution 10 mM d'ester racémique étaient placés dans la cuve de titration et mis en contact avec la phase organique. Une fois la température de 30 °C atteinte, on procédait à la titration par injections régulières de faibles volumes de NaOH 1N à l'aide de la burette automatique. Les intervalles de temps les séparant devaient être suffisamment longs pour permettre à l'équilibre de partage de s'établir, et donc au pH de se stabiliser avant l'adjonction suivante; 5 secondes se sont révélées suffisantes pour toute la série d'essais. Les titrations en milieu 100% aqueux du PABE, du PAEE et du PAHE ont cependant dû être refaites avec une solution moitié moins concentrée (5 mM), à cause de la faible solubilité de ces esters qui entraînait une précipitation en cours d'expérience.

2.3.2 Théorie du partage biphasique

La description mathématique du phénomène de partage (présenté qualitativement au chapitre 1.3) dépend des trois caractéristiques suivantes:

Seul le substrat non chargé (sous forme neutre) étant soluble en phase organique, on devra tenir compte de l'équilibre acide-base auquel l'ester est soumis:

$$K_a(S) = \frac{S_{aq}^n \cdot H^+}{S_{aq}^c} \quad 2.6$$

Sachant que le pH et le pK_a valent respectivement -log(H⁺) et -log(K_a), on peut réarranger l'équation 2.6 pour lui donner la forme plus connue suivante:

$$pH = pK_a(S) + \log\left(\frac{S_{aq}^n}{S_{aq}^c}\right) = pK_a(S) + \log\left(\frac{S_{aq}^n \cdot V_{aq}}{S_{aq}^c \cdot V_{aq}}\right) = pK_a(S) + \log\left(\frac{m_{S,aq}^n}{m_{S,aq}^c}\right) \quad 2.7$$

qui est celle des courbes de titration.

Le coefficient de partage biphasique P_c est quant à lui l'expression du caractère lipophile du substrat neutre:

$$P_c(S) = \frac{S_{or}^n}{S_{aq}^n} \quad 2.8$$

Enfin, le bilan de matière global du substrat dans le système doit tenir compte des volumes respectifs de chacune des phases:

$$m_{S,tot} = (S_{aq}^n + S_{aq}^c) \cdot V_{aq} + S_{or}^n \cdot V_{or} \quad 2.9$$

Les phases aqueuses et organiques étant supposées totalement immiscibles, on peut poser que le volume total du système vaut:

$$V_{tot} = V_{aq} + V_{or} \quad 2.10$$

On peut alors définir la fraction volumique aqueuse comme:

$$v_{aq} = \frac{V_{aq}}{V_{tot}} = \frac{V_{aq}}{V_{aq} + V_{or}} \quad 2.11$$

De même, pour la phase organique:

$$v_{or} = \frac{V_{or}}{V_{tot}} = \frac{V_{or}}{V_{aq} + V_{or}} \quad 2.12$$

Avec la relation évidente:

$$v_{aq} + v_{or} = 1 \quad 2.13$$

En possession de ces éléments, on peut alors calculer l'évolution du pH lors de la titration en présence de MIBK. On suppose, pour un pH initial suffisamment bas (pH = 1-2 env.), que tout le substrat est sous forme acide (chargée), et que donc sa concentration en phase organique est nulle. Par conséquent, d'après 2.9:

$$m_{S,tot} = m_{S, aq}^{\xi} \quad 2.14$$

Lors de la titration, une masse m_B de base forte ajoutée transforme équimolairement la forme acide de l'ester en sa base conjuguée. D'où:

$$m_{S, aq}^{\pm} = m_{S, tot} - m_B \quad 2.15$$

L'ester non chargé ainsi formé va ensuite se distribuer entre les phases:

$$m_{S, aq}^0 = m_B - m_{S, or}^0 \quad 2.16$$

Si on combine 2.15 et 2.16 avec l'expression 2.7, on trouve:

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{m_B - m_{S, or}^0}{m_{S, tot} - m_B}\right) \quad 2.17$$

Les définitions du coefficient de partage (2.8) et des fractions volumiques (2.11, 2.12) permettent d'écrire:

$$P_c = \frac{S_{or}^0}{S_{aq}^0} = \frac{V_{aq}}{V_{or}} \cdot \frac{m_{S, or}^0}{m_{S, aq}^0} = \frac{v_{aq}}{1 - v_{aq}} \cdot \frac{m_{S, or}^0}{m_{S, aq}^0} \quad 2.18$$

Expression qui, par combinaison avec 2.16, amène à:

$$m_{S, or}^0 = \frac{P_c(S)}{P_c(S) + \frac{v_{aq}}{1 - v_{aq}}} \cdot m_B \quad 2.19$$

D'où, après introduction dans 2.17:

$$pH = pK_a + \log\left[\left(\frac{m_B}{m_{S, tot} - m_B}\right) \cdot \left(1 - \frac{P_c(S)}{P_c(S) + \frac{v_{aq}}{1 - v_{aq}}}\right)\right] \quad 2.20$$

Que l'on peut reformuler en:

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{1}{1 + \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}} \cdot P_c(S)}\right) + \log\left(\frac{m_B}{m_{S, tot} - m_B}\right) \quad 2.21$$

Ou encore:

$$\text{pH} = \text{pK}_a^{\text{app}} + \log\left(\frac{m_B}{m_{S,\text{tot}} - m_B}\right) \quad 2.22$$

Cette dernière équation a exactement la même forme que 2.7, à la seule différence que le premier terme du membre de droite définit une valeur apparente du pK_a , dont l'écart par rapport à celle observable en milieu aqueux vaut:

$$\Delta\text{pK}_a = \text{pK}_a - \text{pK}_a^{\text{app}} = \log\left(1 + \frac{1 - v_{\text{aq}}}{v_{\text{aq}}} \cdot P_c(S)\right) \quad 2.23$$

D'où l'on tire que:

$$10^{(\Delta\text{pK}_a)} - 1 = \frac{1 - v_{\text{aq}}}{v_{\text{aq}}} \cdot P_c(S) \quad 2.24$$

Il est donc possible de corréler les différences entre les pK_a obtenus aux différentes fractions volumiques avec la valeur du coefficient de partage du substrat. Celle-ci sera donnée par la valeur de la pente pour une régression linéaire de $(10^{(\Delta\text{pK}_a)} - 1)$ en fonction de $((1 - v_{\text{aq}})/v_{\text{aq}})$.

2.3.3 Résultats

Toutes les expériences décrites ici ont été réalisées, comme les précédents essais d'autohydrolyse, à une température constante de 30 °C. On a donc titré les 6 esters en présence de différentes quantités de phase organique. Les valeurs des pK_a "réels" et apparents sont reportées dans le tableau 2.7 ci-après avec les v_{aq} correspondants. Elles ont été obtenues par traitement des courbes mesurées à l'aide du programme FORTRAN d'estimation de paramètres MTIT3, dont le listage a été copié dans les annexes. On y trouvera également l'algorithme à la base de la méthode d'optimisation, qui a été développé par Marquardt (1963). Outre la valeur du pK_a (apparent ou non), MTIT3 évalue encore les masses de base forte initiale ($m_{B,i}$) et totale ($m_{B,\text{tot}}$) décrivant le mieux les expériences brutes $\text{pH} = f(m_B)$. La forme du modèle est donc la suivante:

$$\text{pH} = \text{pK}_a^{\text{(app)}} + \log\left(\frac{(m_B - m_{B,i})}{m_{B,\text{tot}} - (m_B - m_{B,i})}\right) \quad 2.25$$

Composé	v_{aq} [-]	pK_a^{app} [-]	$m_{B,i}$ [mmol]	$m_{B,tot}$ [mmol]
PAME	1.00	6.82 ± 0.005	$1.7 \cdot 10^{-3}$	0.481
	0.85	6.35 ± 0.005	$3.3 \cdot 10^{-3}$	0.480
	0.70	6.07 ± 0.007	$-7.2 \cdot 10^{-3}$	0.485
	0.50	5.80 ± 0.005	$-10.6 \cdot 10^{-3}$	0.485
PAEE	1.00	7.01 ± 0.007	$-20.8 \cdot 10^{-3}$	0.465
	0.85	6.08 ± 0.008	$-25.6 \cdot 10^{-3}$	0.460
	0.70	5.71 ± 0.006	$-27.8 \cdot 10^{-3}$	0.460
	0.50	5.45 ± 0.008	$-43.0 \cdot 10^{-3}$	0.436
PAPE	1.00	7.06 ± 0.004	$-0.5 \cdot 10^{-3}$	0.474
	0.85	5.77 ± 0.004	$-3.6 \cdot 10^{-3}$	0.468
	0.70	5.25 ± 0.014	$-20.0 \cdot 10^{-3}$	0.460
	0.50	4.87 ± 0.012	$-22.0 \cdot 10^{-3}$	0.456
PABE	1.00	7.03 ± 0.010	$-9.9 \cdot 10^{-3}$	0.231
	0.85	5.25 ± 0.008	$-12.0 \cdot 10^{-3}$	0.468
	0.70	4.73 ± 0.010	$-19.3 \cdot 10^{-3}$	0.460
	0.50	4.34 ± 0.014	$-9.8 \cdot 10^{-3}$	0.457
PAAE	1.00	6.90 ± 0.072	$-0.2 \cdot 10^{-3}$	0.255
	0.85	4.68 ± 0.008	$-3.4 \cdot 10^{-3}$	0.473
	0.70	4.12 ± 0.020	$5.9 \cdot 10^{-3}$	0.478
	0.50	3.78 ± 0.016	$8.5 \cdot 10^{-3}$	0.468
PAHE	1.00	6.48 ± 0.126	$36.8 \cdot 10^{-3}$	0.250
	0.90	4.18 ± 0.022	$5.6 \cdot 10^{-3}$	0.244
	0.85	3.87 ± 0.025	$27.8 \cdot 10^{-3}$	0.258

Tableau 2.7: Résultats des titrations en système biphasique

Composé	P_c [-]	r^2 [-]
PAME	9.7 ± 0.3	0.9935
PAEE	37.3 ± 1.7	0.9848
PAPE	152.5 ± 4.6	0.9946
PABE	477.1 ± 14.0	0.9949
PAAE	1297.9 ± 40.4	0.9941
PAHE	2132.3 ± 155.6	0.9738

Tableau 2.8: Valeurs de P_c dans le système $H_2O/MIBK$

La valeur de P_c pour chaque ester, donnée dans le tableau 2.8 ci-avant, a quant à elle été obtenue par la régression linéaire décrite dans les dernières lignes du sous-chapitre 2.3.2 (équation 2.24).

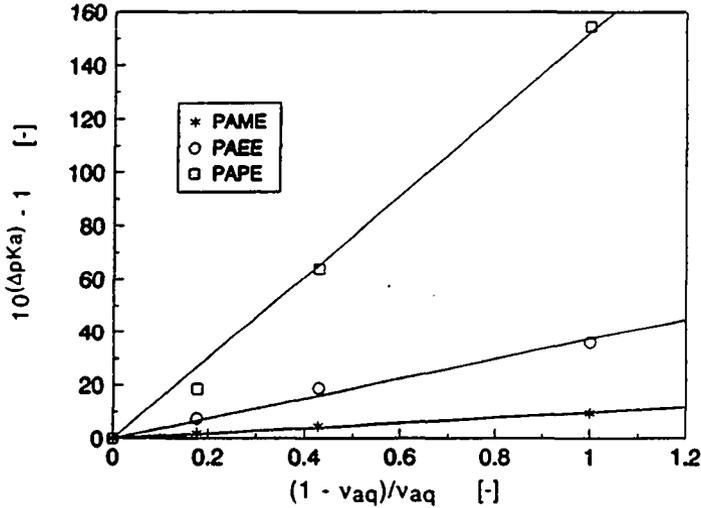


Figure 2.8: Détermination de P_c selon l'équation 2.24

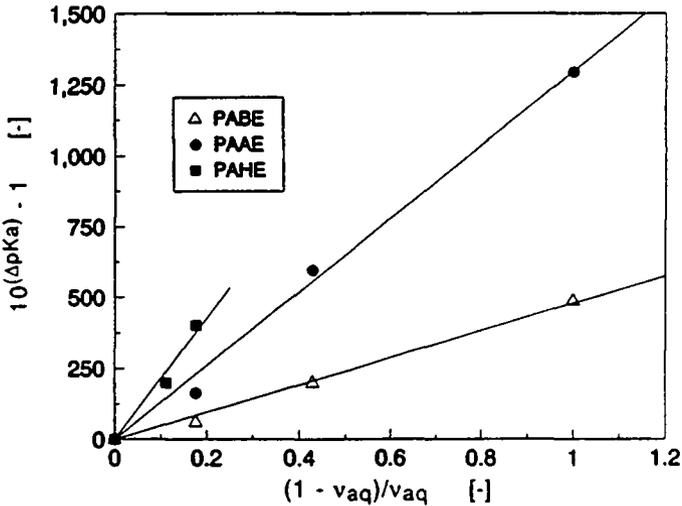


Figure 2.9: Détermination de P_c selon l'équation 2.24

Les droites de régression, qu'on a toutes fait passer par l'origine, ont été représentées dans les figure 2.8 et 2.9 qui précèdent.

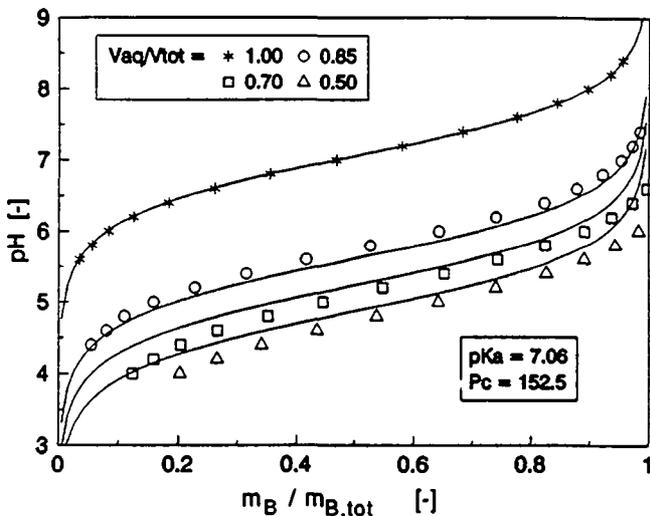


Figure 2.10: Courbes de titrations expérimentales et calculées pour le PAPE

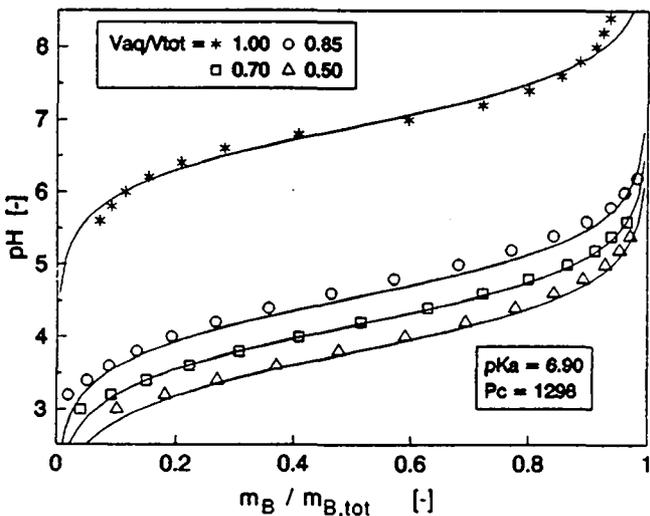


Figure 2.11: Courbes de titrations expérimentales et calculées pour le PAEE

Sur les graphes 2.10 et 2.11 qui précèdent, on peut comparer les courbes de titration expérimentales avec celles calculées à partir du pK_a et du coefficient de partage P_c estimé (équation 2.25), pour les esters n-propylique et n-amylque. A noter que l'axe des abscisses a été normalisé par rapport à la valeur $(m_{B,tot} - m_{B,i})$.

Comme le montrent clairement les résultats qui précèdent, le nombre de carbones du reste n-alkyl influence énormément la lipophilicité de l'ester, le coefficient de partage variant entre 10 et 2000 sur les six molécules étudiées. On a donc à disposition une palette de valeurs intéressante pour le choix du substrat le plus approprié.

2.3.4 Amélioration de la méthode

La technique utilisée dans les expériences qu'on vient de décrire nécessite la mesure d'une courbe de titration complète pour chaque valeur de v_{aq} . Il existe cependant un moyen de déterminer P_c de façon beaucoup plus fine en deux expériences. La première consiste à mesurer le pK_a de l'ester en milieu 100% aqueux comme auparavant, par titration avec une base forte. Lors de la seconde, on ajuste d'abord le pH de la solution à la valeur du pK_a . A ce moment, d'après l'équation 2.21 et vu que v_{aq} vaut 1, on a:

$$\log\left(\frac{m_B}{m_{S,tot} - m_B}\right) = 0 \quad 2.26$$

Ce qui implique que:

$$\frac{m_B}{m_{S,tot} - m_B} = 1 \Leftrightarrow m_B = \frac{m_{S,tot}}{2} \quad 2.27$$

A ce point-là de la titration, la moitié de l'ester se trouve sous forme neutre et l'autre sous forme acide, d'où l'annulation du terme de droite de 2.21. Si alors on ajoute au système un certain volume de phase organique, on va faire varier le terme du milieu dans 2.21 ($v_{aq} \neq 1$), mais le terme de droite restera nul. Autrement dit le pH va diminuer pour se stabiliser, une fois à l'équilibre, à la valeur de pK_a^{app} qui correspond à celle déterminée par v_{aq} . On a donc:

$$pH = pK_a - \log\left(1 + \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}} \cdot P_c(S)\right) = pK_a^{app}(v_a) \quad 2.28$$

La diminution enregistrée est alors due uniquement à l'effet de partage biphasique du substrat, qui déplace l'équilibre acide-base dans le sens d'une libération de protons. Par adjonctions successives de phase organique, on peut donc mesurer en un seul essai plusieurs couples (pK_a^{app}, ν_{aq}), qui seront ensuite traités selon l'équation 2.24 (linéarisation de $(10^{(\Delta pK_a)} - 1)$ en fonction de $(1 - \nu_{aq})/\nu_{aq}$).

Cette technique de "titration par la phase organique" a été utilisée par Margot (1987) pour la mesure du coefficient de partage du PAPE en présence de 8 phases organiques potentiellement utilisables. On avait choisi pour cela des solvants non miscibles avec l'eau et de différents types. La sélection comprend en effet deux alcanes (le n-hexane et le dodécane = Dodéc.), un alcool simple (le n-octanol = OctOH), un éther (le méthyl-tertiobutyl-éther = MTBE), une cétone (la méthyl-isobutyl-cétone = MIBK), un ester (l'acétate de n-butyle = AcOBu), un solvant chloré (le 1,1,1-trichloréthane = 1,1,1-Tri.), et un aromatique (le toluène). Leurs principales caractéristiques physico-chimiques (ainsi que celles de l'eau) sont présentées dans le tableau 2.9 ci-dessous.

Solvant	Eb ₇₆₀ [°C]	d (20 °C) [g·ml ⁻¹]	γ (20°C) [dyne·cm ⁻¹]	[Or]H ₂ O (20 °C) [%]	[H ₂ O] _{or} (20 °C) [%]	logP [-]
AcOBu	126.1	0.8810	25.09	0.4300	1.8400	1.71
Toluène	110.6	0.8670	28.53	0.0515	0.0334	2.54
MIBK	116.5	0.8008	23.64	1.7000	1.9000	1.32
OctOH	195.2	0.8256	26.06	0.0538	+++	2.86
Hexane	68.7	0.6594	18.69	0.0010	0.0111	3.48
Dodéc.	216.3	0.7487	25.35	+++	65 ppm	6.59
MTBE	55.2	0.7400	+++	+++	+++	1.36
1,1,1-Tri	74.0	1.3376	25.56	0.1320	0.0340	2.76
H ₂ O	100.0	0.9988	72.58	+++	+++	+++

Tableau 2.9: Caractéristiques des solvants étudiés (Riddick et Bunger, 1970)
Valeurs de logP calculées d'après Rekker et de Kort (1979)
+++ = données manquantes

Les expériences ont été réalisées aux mêmes conditions de concentration en PAPE et de température que celles décrites pour les titrations. Une fois le pH

initial de 7.06 atteint, la phase organique était ajoutée petit à petit à l'aide d'une burette graduée. Une fois le pH stabilisé et donc l'équilibre de partage atteint, on notait la valeur affichée et le volume total de solvant introduit, puis on procédait à une nouvelle adjonction. Les valeurs de P_c ainsi déterminées sont reportées dans le tableau 2.10; les points mesurés et les droites de régression ont été tracés dans les figures 2.12 et 2.13.

Solvant	$P_c(\text{PAPE})$ [-]	r^2 [-]
Acétate de butyle	150.7 ± 0.8	0.998
Toluène	143.4 ± 1.9	0.995
Isobutyl méthyl cétone	127.2 ± 1.3	0.991
Octanol	112.6 ± 0.7	0.997
Hexane	9.4 ± 0.06	0.997
Dodécane	7.2 ± 0.02	0.999
Méthyl t-butyl éther	64.0 ± 0.6	0.993
1,1,1 Trichloréthane	178.0 ± 0.8	0.998

Tableau 2.10: Valeurs de $P_c(\text{PAPE})$ pour les 8 solvants testés

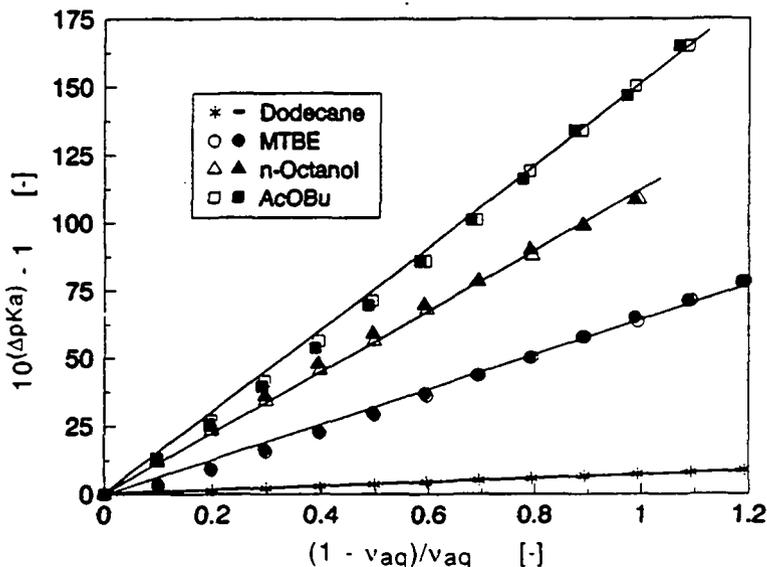


Figure 2.12: Détermination de $P_c(\text{PAPE})$ pour différents solvants

Comme le montre le tableau 2.10, les P_c mesurés se situent dans une fourchette assez large permettant le choix d'un partage "à la carte" du substrat.

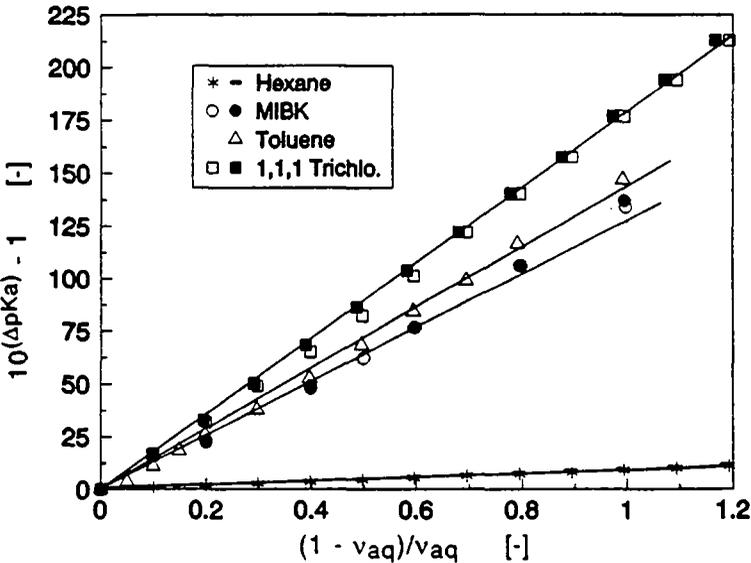


Figure 2.13: Détermination de P_c (PAPE) pour différents solvants

2.3.5 Le concept du logP

La mesure du coefficient de partage biphasique de divers composés ne se limite pas, et de loin, aux applications traitées ici. Outre son intérêt dans l'optique d'un procédé d'extraction, ce paramètre a été utilisé par plusieurs auteurs depuis le début du siècle, qui l'ont mis en relation avec par exemple l'effet narcotique des substances étudiées, leur vitesse de pénétration dans les cellules végétales ou plus récemment leur caractère lipophile (également appelé hydrophobicité). Ce n'est qu'aux environs de 1964 que sont apparues les théories visant à démontrer la nature additive de P_c vis-à-vis de la structure de la molécule, et c'est le système H_2O /octanol qui a été choisi comme référence pour ce genre d'études (Hansch et Leo, 1979).

On suppose à la base de cette théorie que le logarithme décimal du coefficient de partage (qu'on écrira dorénavant " $\log P$ " = $\log_{10}(P_c)$) est égal à une

somme d'incrémentes représentant chacun la contribution d'un fragment de la molécule à son hydrophobicité totale. On a alors proposé une méthode de calcul ab initio de cette grandeur:

La méthode "Π":

pour une molécule R-X, on suppose que:

$$\log P(R-X) = \log P(R-H) + \Pi(X) \quad 2.29$$

Où X est un substituant quelconque apportant une contribution $\Pi(X)$ au $\log P$ de la substance R-X. On substitue donc les hydrogènes d'une molécule de référence (RH) par des restes X. Mais en suivant le même raisonnement, on peut également supposer que:

$$\log P(R-X) = \log P(X-H) + \Pi(R) \quad 2.30$$

Ceci peut non seulement amener à quelques incohérences, mais aussi être gênant par sa lourdeur. En effet, pour une même molécule, on aura le choix entre plusieurs voies de calcul qui ne donneront pas forcément le même résultat suivant la substance prise comme référence. Davis (1973) avait de plus observé que l'influence de l'hydrogène substitué ne pouvait pas toujours être négligée. Faire un choix pourrait donc se révéler difficile.

Ces considérations ont abouti au développement d'une autre méthode de calcul, très similaire à la précédente:

La méthode des fragments:

Dans cette approche modifiée, le calcul se fait de la façon suivante:

$$\log P(R-X) = f(R) + f(X) \quad 2.31$$

Ou, si l'on prend comme auparavant une molécule de référence:

$$\log P(R-X) = \log P(R-Y) - f(Y) + f(X) \quad 2.32$$

On utilise donc ici une somme de fragments pour reconstituer la molécule tout en gardant la possibilité, si celle-ci est trop complexe, de partir d'une substance analogue de $\log P$ connu, d'y soustraire celle du substituant (pas forcément un hydrogène) que l'on remplace et d'y ajouter la contribution du substituant X.

Sur la base de chacun de ces deux modèles, les innombrables mesures de coefficients P_c existant dans la littérature peuvent être compilées et traitées par ordinateur, afin d'en extraire par régression multiple les valeurs des incréments pour les différents fragments.

Les deux méthodes ne sont cependant pas aussi simples que la description sommaire qui précède pourrait le laisser croire: en effet, de nombreuses corrections doivent être apportées à cause d'effets de voisinage dus aux autres substituants, ou encore selon le nombre et la position des liaisons multiples pouvant exister. Des compléments sont donc régulièrement apportés à ces théories qui ont chacune leurs avantages, et qui donnent toutes deux des résultats satisfaisants pour la plupart des substances simples les plus courantes. C'est le cas des solvants organiques étudiés plus haut, dont les valeurs de $\log P$ ont été calculées selon la méthode des fragments, et qui sont en excellent accord avec les valeurs expérimentales publiées (Rekker et de Kort, 1979). Il n'en va cependant pas de même lorsqu'on fait le calcul pour des composés comme le PAPE, dont le $\log P$ selon Rekker vaut 1.764 ($\Leftrightarrow P_c = 58.1$) et la valeur mesurée 2.052 ($\Leftrightarrow P_c = 112.6$), ce qui correspond à peu près au double. Il faut sans doute voir là un effet de la proximité des deux groupes $-NH_2$ et $-COOH$ et de l'équilibre de protonation qui s'établit entre les deux.

Le paramètre $\log P$ pour les solvants organiques est pourtant depuis quelques années d'un intérêt tout particulier dans les domaines de la biotechnologie et du génie enzymatique. En effet, depuis qu'on utilise des catalyseurs biologiques en présence de solvants organiques miscibles ou non avec l'eau (cf chapitre 1.2), on a cherché à quantifier a priori leurs effets sur l'activité du catalyseur, afin d'éviter des sélections empiriques longues et coûteuses. Les données publiées sur la rétention ou non de l'activité en présence de solvants ont ainsi été mises en rapport avec des paramètres comme la polarité du solvant, sa solubilité dans l'eau, la taille de ses molécules (caractérisée par sa masse moléculaire et/ou son volume molaire) ou sa constante diélectrique. Un exemple est donné par les travaux de Brink et Tramper (1985), qui ont testé un

grand nombre de phases organiques pour l'époxydation du propène et du 1-butène par des cellules immobilisées de *Mycobacter* en milieu biphasique. Aucune corrélation évidente n'a cependant pu être dégagée de l'ensemble des points mesurés, si ce n'est que l'activité la plus grande était généralement observée avec des solvants de faible polarité combinée avec une grande masse molaire.

Les résultats de Brink et Tramper (1985) ont été repris par d'autres auteurs, qui ont corrélié cette fois l'activité des microorganismes avec le $\log P$ du solvant dans le système eau-octanol (mesuré ou calculé comme ici selon Rekker et de Kort, 1979), obtenant alors une relation assez nette de forme sigmoïde, comme le montre la figure 2.14 ci-après, tirée de l'article de Laane et al., (1985). Une dépendance du même type a été observée pour d'autres systèmes réactionnels, confirmant l'hypothèse selon laquelle le $\log P$ pouvait constituer un critère fort utile de sélection sinon absolue, du moins préliminaire.

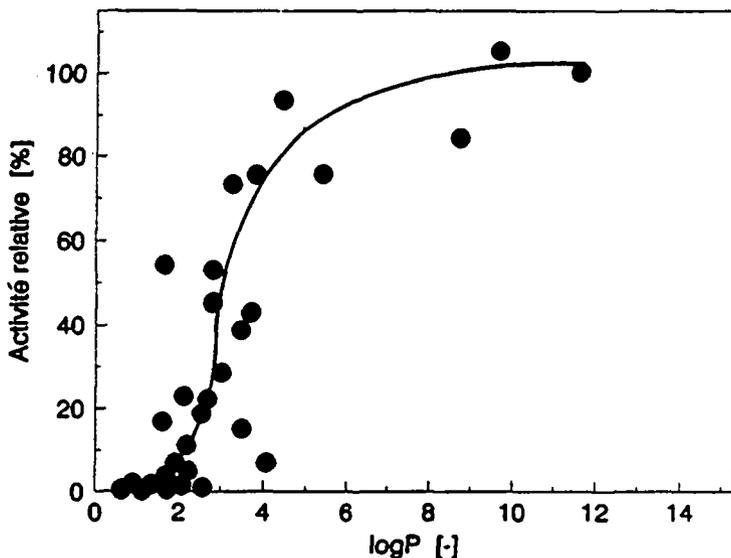


Figure 2.14: Activité relative en fonction de $\log P$ (d'après Laane, 1985)

Le grand avantage du $\log P$ en tant que caractéristique d'un solvant est qu'il tient compte de façon non explicite de tous les paramètres testés par Brink, le partage biphasique en étant lui aussi dépendant. La méthode a ensuite été affinée

afin de tenir compte dans un système donné non seulement du solvant, mais également du substrat, de la phase continue et de la nature de l'interface (Laane et al., 1987). Ces critères consistent à optimiser les différences entre les logP des constituants du système, suivant les caractéristiques de ce dernier et de la réaction (phase continue aqueuse ou organique, enzyme soluble ou immobilisée, inhibition par le produit ou le substrat). Sans entrer dans trop de détails, on s'en tiendra aux premières conclusions de Laane et al. (1985) qui ne concernent que les solvants, pour lesquels il définit trois domaines se référant à la figure 2.14:

$\log P < 2$: ces solvants sont les moins intéressants pour les applications en biocatalyse.

$2 \leq \log P < 4$: les phases organiques appartenant à ce domaine peuvent se révéler intéressantes pour certaines applications, mais on doit s'attendre à des effets négatifs sur l'activité du catalyseur.

$\log P \geq 4$: cette catégorie contient les solvants les mieux appropriés aux applications en biocatalyse

2.3.6 Choix du substrat et de la phase organique optimaux

Au vu des résultats qui précèdent, le choix du substrat s'est révélé assez facile. Il s'est en effet rapidement porté sur l'ester n-propylique (PAPE), pour les raisons suivantes:

* Sa stabilité vis-à-vis de l'autohydrolyse est très bonne au pH optimal pour l'activité enzymatique

* Sa synthèse est aisée car le propanol n'a pas un point d'ébullition trop élevé (reflux et distillation facilités) et il est miscible à l'eau en toutes proportions. Ce point a son importance pour les réactions en milieu aqueux, vu qu'on libère l'alcool dans le milieu lors de l'hydrolyse.

* Son coefficient de partage dans le système H₂O/MIBK constitue un bon compromis: il n'est pas trop bas, d'où une extraction conséquente de l'ester neutre même à de faibles valeurs de v_{or} , et il n'est pas non plus trop élevé, ce qui laisse une concentration de substrat en phase aqueuse favorable à une vitesse de réaction élevée.

* Sa solubilité en phase aqueuse est encore assez importante, facteur dont dépend la capacité du réacteur et par conséquent sa performance. De façon qualitative, la solubilité dans l'eau décroît régulièrement du méthyl- à l'hexyl-ester; elle diminue également avec l'augmentation du pH.

Le choix de la phase organique a été moins évident. Le **n-hexane** et le **n-dodécane** ont cependant été écartés les premiers, vu la faible affinité du PAPE pour ces solvants. Le **1,1,1-trichloréthane** a été éliminé à cause de sa densité trop élevée qui rendait difficile une bonne dispersion dans la phase aqueuse. **L'acétate de butyle**, en tant qu'ester, constituait un second substrat potentiel et aurait pu poser des problèmes si de l'acide acétique et du butanol avaient été libérés en cours de réaction. Dans le cas du **MTBE**, c'est son bas point d'ébullition (d'où une tension de vapeur élevée dans le système) ainsi que le manque d'informations à disposition qui ont conduit à son rejet.

On n'a pas encore évoqué dans le choix de la phase organique les critères de sélection de **Laane et al. (1985)**. En effet, pour les trois solvants restants, **Brink et Tramper (1985)** n'avaient pas observé de rétention satisfaisante de l'activité du biocatalyseur (entre 0 et 8 %), alors que les expériences de **Margot (1987)** n'ont pas montré d'effet aussi drastique sur la chymotrypsine lors de l'hydrolyse du PAPE en système biphasique. Les deux systèmes réactionnels étaient cependant très différents, les temps de contact entre l'enzyme et le solvant étant relativement limités et la quantité d'eau dans le système beaucoup plus importante chez **Margot (1987)**.

D'autres critères ont donc été considérés: l'**octanol** a été écarté par précaution à cause de la possibilité, faible il est vrai, de former par transestérification enzymatique du PAPE une certaine quantité de n-octylester, la chymotrypsine catalysant également ce genre de réaction. Finalement, c'est le **MIBK** qui a été préféré au **toluène**, et ce malgré l'assez grande solubilité de la cétone dans l'eau (1.7 %). La raison principale de ce choix réside dans le fait que **Lugrin (1985)** avait déjà réalisé des essais en système biphasique avec ce solvant lors de son travail de diplôme, avec des résultats tout à fait probants. Il était donc intéressant de continuer avec ce système, afin de compléter les mesures et de confirmer ou non les potentialités qu'elles avaient révélées.

2.3.7 Mesures complémentaires

Une fois le système réactionnel définitivement choisi, on a complété sa caractérisation. Le P_C (PAPE) a été mesuré à des concentrations plus proches de celles envisagées pour la mise en oeuvre du réacteur, ainsi que celui de l'alcool libéré lors de l'hydrolyse (le n-propanol). Finalement, on a encore étudié la solubilité de l'ester et celle de la phénylalanine en fonction du pH.

Une alternative à la détermination de P_C par l'étude des caractéristiques acide-base du système biphasique consiste à mesurer directement la concentration de substrat à l'équilibre dans chacune des phases, pour différentes valeurs de v_{aq} et du pH. C'est ce qui a été fait pour le PAPE dans le système H₂O/MIBK. Connaissant les volumes respectifs de chaque phase, la concentration de la solution aqueuse déterminée par HPLC donnait accès à la masse de substrat dans l'eau:

$$m_{S, aq} = (S_{aq}^n + S_{aq}^c) \cdot V_{aq} = S_{aq} \cdot V_{aq} \quad 2.33$$

Déduite de la masse totale de substrat dans le système, qui est connue, on obtient la masse en phase organique:

$$m_{S, or} = m_{S, tot} - m_{S, aq} \quad 2.34$$

On peut alors développer une expression pour la fraction massique du substrat se trouvant dans la phase aqueuse:

$$x_{S, aq} = \frac{m_{S, aq}}{m_{S, tot}} = \frac{m_{S, aq}}{m_{S, aq} + m_{S, or}} = \frac{(S_{aq}^n + S_{aq}^c) \cdot V_{aq}}{(S_{aq}^n + S_{aq}^c) \cdot V_{aq} + S_{or}^n \cdot V_{or}} \quad 2.35$$

Si on divise l'expression 2.35 en haut et en bas par $(S_{aq}^n + S_{aq}^c) \cdot V_{aq}$, on a:

$$x_{S, aq} = \frac{1}{1 + \frac{S_{or}^n}{(S_{aq}^n + S_{aq}^c)} \cdot \frac{V_{or}}{V_{aq}}} = \frac{1}{1 + \frac{S_{or}^n}{(S_{aq}^n + S_{aq}^c)} \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}} \quad 2.36$$

Or il est possible d'exprimer les concentrations des trois espèces en fonction d'une seule, à savoir S_{or}^n . En effet, on rappellera que:

$$S_{aq}^c = 10^{(pK_a - pH)} \cdot S_{aq}^n \quad 2.7$$

et aussi:

$$S_{or}^n = P_c(S) \cdot S_{aq}^n \quad 2.8$$

L'équation 2.36 peut donc être réécrite en:

$$x_{S, aq} = \frac{1}{1 + \frac{P_c(S) \cdot S_{aq}^n}{(S_{aq}^n + 10^{(pK_a - pH)} \cdot S_{aq}^n)} \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}} \quad 2.37$$

Qui se simplifie en:

$$x_{S, aq} = \frac{1}{1 + \frac{P_c(S)}{(1 + 10^{(pK_a - pH)})} \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}} \quad 2.38$$

Les valeurs de $x_{S, aq}$ mesurées lors des essais ont été reportées dans les tableaux 2.11 à 2.13, en même temps que celles de v_{aq} et du pH qui y correspondent.

v_{aq} [-]	pH [-]	$x_{S, aq}$ [-]
0.4	5.00	0.334
0.4	5.58	0.112
0.4	6.61	0.013
0.6	4.50	0.815
0.6	5.00	0.608
0.6	5.50	0.336
0.6	6.75	0.044
0.8	4.50	0.921
0.8	5.00	0.822
0.8	5.50	0.606
0.8	6.53	0.173

Tableau 2.11: $x_{S, aq}$ en fonction du pH et de v_{aq}
[PAPE] = 20 mM

V_{aq} [-]	pH [-]	$x_{S,aq}$ [-]
0.4	4.51	0.623
0.4	5.00	0.377
0.4	5.50	0.173
0.4	6.58	0.027
0.6	4.51	0.784
0.6	5.00	0.585
0.6	5.50	0.336
0.6	6.77	0.047
0.8	4.50	0.922
0.8	5.00	0.833
0.8	5.50	0.628
0.8	6.55	0.191

Tableau 2.12: $x_{S,aq}$ en fonction du pH et de v_{aq}
[PAPE] = 60 mM

V_{aq} [-]	pH [-]	$x_{S,aq}$ [-]
0.4	4.50	0.670
0.4	5.02	0.353
0.4	5.53	0.160
0.4	6.60	0.021
0.6	4.50	0.803
0.6	5.00	0.574
0.6	5.50	0.326
0.6	6.53	0.058
0.8	4.50	0.913
0.8	5.00	0.835
0.8	5.51	0.591
0.8	6.50	0.152

Tableau 2.13: $x_{S,aq}$ en fonction du pH et de v_{aq}
[PAPE] = 100 mM

Connaissant de surcroît le pK_a du PAPE, la valeur de $P_c(S)$ a été évaluée par optimisation pour cette série de mesures selon l'équation 2.38, et vaut:

[PAPE] = 20 mM	$P_c(\text{PAPE}) = 104.5 \pm 4.5$	[-]
[PAPE] = 60 mM	$P_c(\text{PAPE}) = 114.3 \pm 2.3$	[-]
[PAPE] = 100 mM	$P_c(\text{PAPE}) = 117.7 \pm 2.1$	[-]

On peut voir sur les figures 2.15 à 2.17 que ces valeurs décrivent les mesures de façon satisfaisante sur une plage de concentrations assez large, si on compare les courbes calculées (à partir de l'équation 2.38 et des valeurs de P_c ci-dessus) et les points expérimentaux.

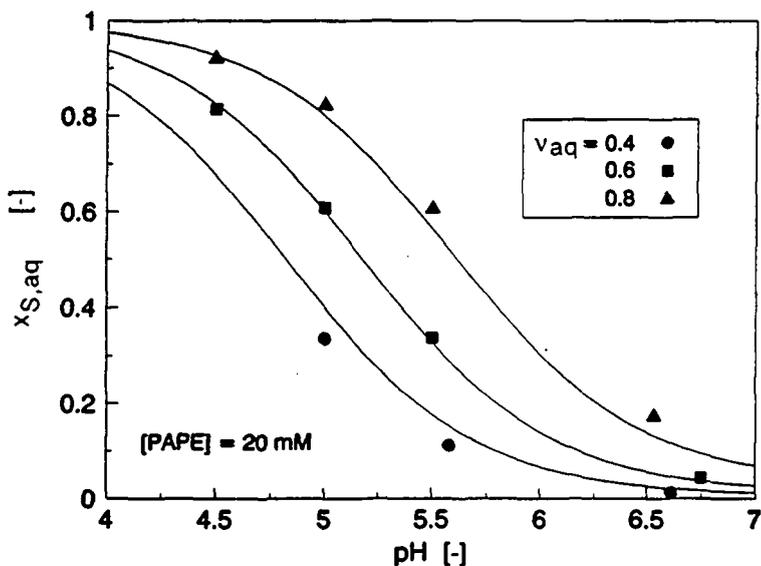


Figure 2.15: Détermination du coefficient de partage par HPLC ($P_c = 104.5$)

Si l'on compare l'ensemble des valeurs de $P_c(\text{PAPE})$ mesurées dans le système $\text{H}_2\text{O}/\text{MIBK}$, on arrive à une valeur moyenne de:

$$P_c(\text{PAPE}) = 123.2 \pm 3.0 \quad [-]$$

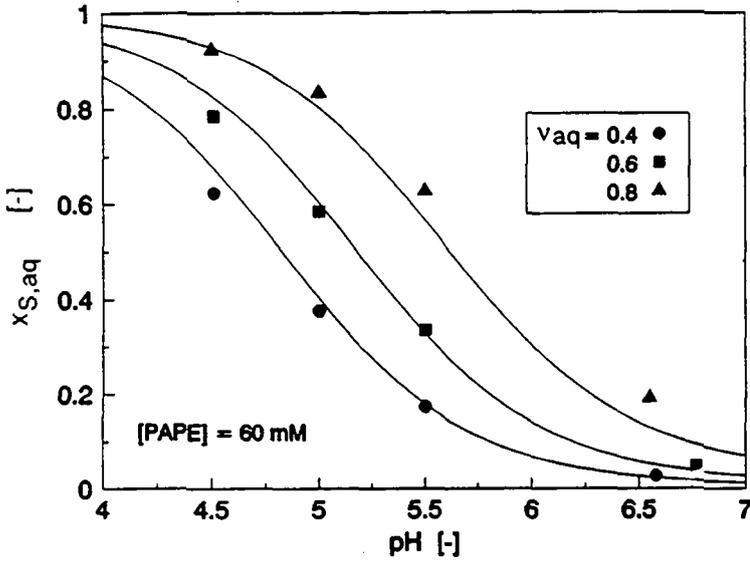


Figure 2.16: Détermination du coefficient de partage par HPLC ($P_c = 114.3$)

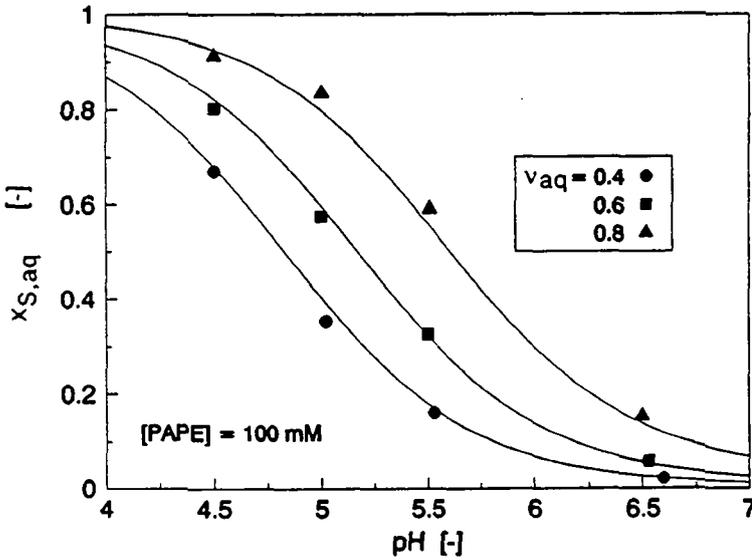


Figure 2.17: Détermination du coefficient de partage par HPLC ($P_c = 117.7$)

Le P_c ainsi déterminé est assez proche de la valeur déterminée par titration avec le solvant, qui vaut 127 (tableau 2.10), et de celle qu'avait trouvée **Lugrin (1985)**, à savoir 137. Elle aussi avait mesuré ce paramètre par titration simple à différents v_{aq} et par HPLC, mais avec une dispersion plus grande des résultats, due principalement au nombre de manipulations des échantillons dans le cas de la méthode chromatographique et à la relative imprécision déjà évoquée pour la régression linéaire dans le cas des titrations.

Pour notre valeur de P_c (123.2) et un pK_a de 7.06, on a calculé l'évolution de $x_{S,aq}$ en fonction du pH et de v_{aq} selon l'équation 2.38. La figure 2.18 en est une représentation tridimensionnelle.

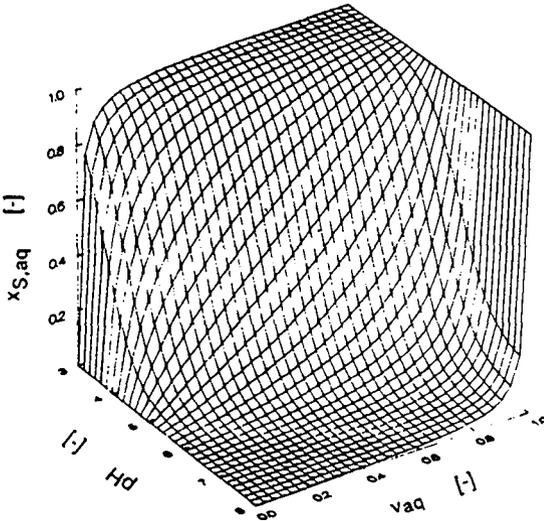


Figure 2.18: Distribution du substrat en système biphasique

On le verra plus tard, l'alcool libéré lors de la réaction intervient dans la réaction. La connaissance de sa concentration en phase aqueuse tout au long du processus est donc très importante. C'est pourquoi on a mesuré son coefficient de partage biphasique entre l'eau et le MIBK. Une solution aqueuse (pH = 5.5) de propanol de concentration et volume connus était mise en contact avec la phase

organique. On permettait à l'équilibre de s'établir en laissant le mélange sous agitation vigoureuse, puis on prélevait un échantillon de chacune des phases pour les analyser par GC (après s'être assuré que la phase organique et l'eau ne gênaient pas la résolution du pic du propanol). Comme le propanol n'est pas sujet à un équilibre de protonation dans les conditions expérimentales envisagées, la situation est beaucoup plus simple que dans le cas du PAPE, d'autant plus que l'analyse donne un accès direct à la concentration dans chacune des phases. Le coefficient de partage s'écrit alors comme:

$$P_c(P) = \frac{P_{or}}{P_{aq}} \quad 2.39$$

Le tableau 2.14 donne les résultats obtenus lors de ces essais. La connaissance de la concentration initiale de la solution aqueuse (P_o) ainsi que de celles mesurées dans l'eau (P_{aq}) et le MIBK (P_{or}) après établissement de l'équilibre permet de faire un bilan sur l'alcool, bilan dont les résultats sont donnés en écarts relatifs (e.r.), positifs ou négatifs, par rapport aux 100 % théoriques.

$$e.r. = \left(\frac{(P_{aq} \cdot V_{aq} + P_{or} \cdot V_{or}) - P_o \cdot V_{aq}}{P_o \cdot V_{aq}} \right) \cdot 100 = \left(\frac{P_{aq} + P_{or} \cdot \frac{1 - V_{aq}}{V_{aq}}}{P_o} - 1 \right) \cdot 100 \quad 2.40$$

P_o [mmol·l ⁻¹]	v_{aq} [-]	P_{aq} [mmol·l ⁻¹]	P_{or} [mmol·l ⁻¹]	$P_c(P)$ [-]	Bilan (e.r.) [%]
53.8	0.50	26.2	30.1	1.15	+ 4.6
53.8	0.67	32.9	40.9	1.24	- 0.9
106.1	0.50	45.8	60.3	1.32	0.0
106.1	0.67	57.9	79.0	1.36	- 8.2
201.6	0.50	88.1	107.0	1.22	- 3.2
304.1	0.50	140.4	180.9	1.29	+ 5.6

Tableau 2.14: Mesure de $P_c(P)$ par GC

On le voit, les bilans sont justes, au pire à 8 % près, et les coefficients de partage mesurés ont pour valeur moyenne:

$$P_c(P) = 1.26 \pm 0.03 \quad [-]$$

La connaissance de la solubilité des réactants est également très importante dans le système étudié, ceci afin de prévenir tout risque de précipitation. La solubilité de la phénylalanine en fonction du pH a déjà été décrite dans la littérature, Notamment par Nass (1988), dont les résultats sont illustrés à la figure 2.19. Ceux-ci sont toutefois donnés pour une température de 50 °C !

On a mesuré la solubilité du PAPE en phase aqueuse à 30 °C en fonction du pH. Pour cela, on a préparé des solutions d'ester de concentration connue, et on les a chauffées à 30 °C dans la cuve de titration sous agitation constante. On a ensuite augmenté lentement le pH à l'aide de NaOH 5N (afin de ne pas trop diluer le milieu), jusqu'à ce que la solution se trouble, à cause de la précipitation de l'ester sous forme de gouttelettes huileuses. La valeur du pH à ce moment était alors notée en face de la concentration de PAPE correspondante. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 2.15 et illustrés par la figure 2.20.

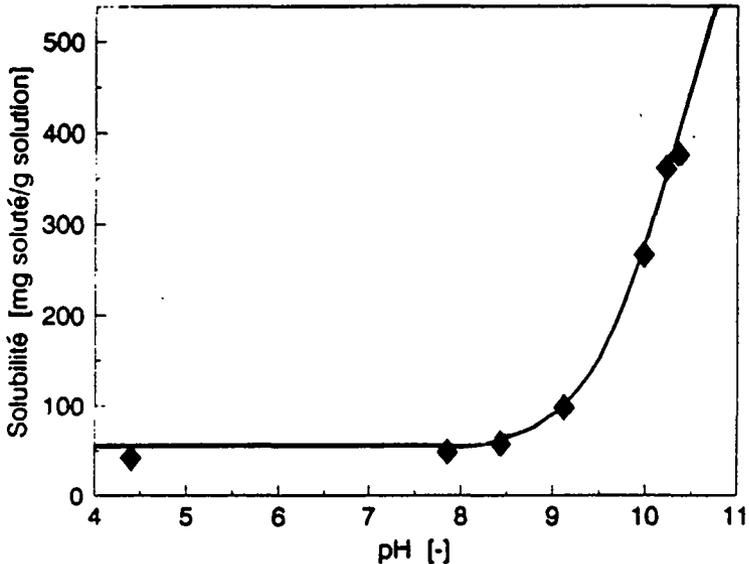


Figure 2.19: Solubilité de la Phe en fonction du pH à 50 °C (d'après Nass, 1988)

On constate que sur le domaine de pH où l'on envisage de travailler (entre 4 et 7), la solubilité de l'acide aminé est presque constante et se situe légèrement au dessus de 50 mg/g de solution, ce qui correspond à 315 mmol.l⁻¹ environ.

Orella et Kirwan (1989) ont quant à eux étudié la solubilité de quelques acides aminés caractéristiques dans des mélanges eau / alcools aliphatiques. On y apprend qu'à 25 °C, pH 5.5 et pour une fraction molaire voisine de 0.2, le n-propanol augmente d'environ 35 % la solubilité de la phénylalanine par rapport à celle mesurée dans l'eau pure aux mêmes conditions, qui est de 160 mmol.l⁻¹ environ. Cet effet n'est que peu intéressant dans le cadre de la réaction étudiée, vu que la fraction molaire maximale atteignable pour le n-propanol par hydrolyse du propyl-ester n'excède pas 0.003.

pH [-]	6.35	6.45	6.58	6.72	7.00	7.25	7.52	8.95
Solubilité [mmol.l ⁻¹]	300	250	200	150	100	75	60	40

Tableau 2.15: Solubilité du PAPE en phase aqueuse à 30 °C

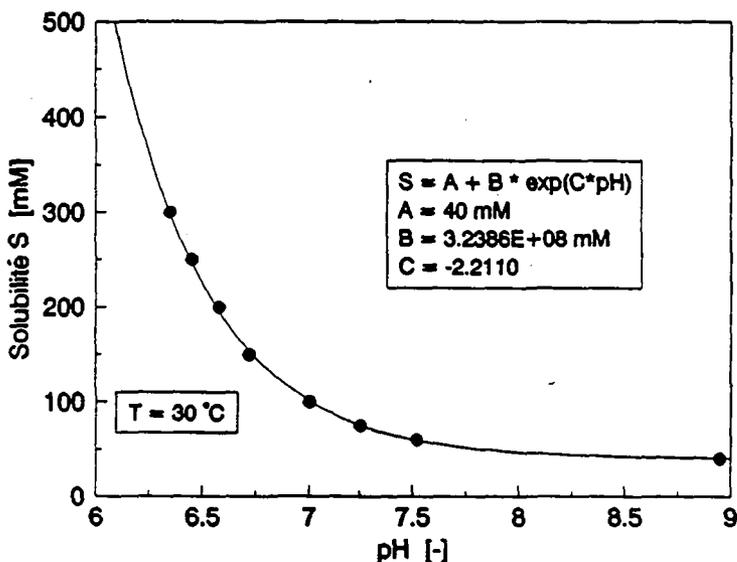


Figure 2.20: Solubilité du PAPE en phase aqueuse à 30 °C

La courbe qui passe à travers les points de la figure 2.20 est une optimisation des paramètres A, B et C pour une équation de la forme:

$$\text{Solubilité} = S = A + B \cdot e^{(C \cdot \text{pH})}$$

Avec:

$$A = 40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$B = 3.2386 \cdot 10^8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$C = -2.2110 [-]$$

La diminution rapide de la solubilité de l'ester lors d'une augmentation du pH illustre bien les problèmes évoqués dans l'introduction, à savoir l'impossibilité de travailler à des valeurs voisines ou supérieures à celle du pK_a de l'ester. Non seulement on risquerait une précipitation dans le réacteur, mais en plus on limiterait sérieusement la capacité et la productivité de celui-ci.

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 2

BRINK, L.E.S.; TRAMPER, J. (1985): Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis

Biotechnol. Bioeng., 27, 1258-1269

CALABRESE, R.V.; CHANG, T.P.K.; DANG, P.T. (1986): Drop breakup in turbulent stirred tank contactors. Part 1: Effect of dispersed phase viscosity

A.I.Ch.E. Journal, 32 (4), 657-666

DAVIS, S.S. (1973): Use of substituant constants in structure-activity relations and the importance of the choice of standard state

J. Pharm. Pharmacol., 25, 293-296

FUJITA, T.; IWASA, J.; HANSCH, C. (1964): A new substituent constant, Π , derived from partition coefficients

J. Am. Chem. Soc., 86, 5175-5180

HANSCH, C.; LEO, A. (1979): Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology

John Wiley & Sons Ed., New York

LAANE, C.; BOEREN, S.; HILHORST, R.; VEEGER, C. (1987): Optimization of biocatalysis in organic media

Biocatalysis in organic media, C. Laane, J. Tramper and M.D. Lilly editors, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 65-83

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K. (1985): On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis

Trends in Biotechnol., 3 (10), 251-252

LUGRIN, C. (1985): Résolution optique de phénylalanine à l'aide de chymotrypsine en système biphasique

Travail de diplôme, Département de chimie, EPFL, CH-1015 Lausanne

MARGOT, A.O. (1987): Influence de solvants organiques sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique du propylester de phénylalanine

Travail de diplôme, Département de chimie, EPFL, CH-1015 Lausanne

MARQUARDT, D.W. (1963): An algorithm for least-square estimation of nonlinear parameters

J. Soc. Industr. Appl. Math., 11 (2), 431-441

MOLNAR, I.; HORVATH, C. (1977): Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by high performance liquid chromatography

J. Chromat., 142, 623-640

NASS, K.K. (1988): Representation of the solubility behavior of amino acids in water

A.I.Ch.E. Journal, 34 (8), 1257-1266

NYS, G.G.; REKKER, R.F. (1973): Statistical analysis of a series of partition coefficients with special reference to the predictability of folding of drug molecules. The introduction of hydrophobic fragmental constants (f-values)

Chim. Thérap., 8 (5), 521-535

NYS, G.G.; REKKER, R.F. (1974): The concept of hydrophobic fragmental constants (f-values) II. Extension of its applicability to the calculation of lipophilicities of aromatic and heteroatomic structures

Eur. J. Med. Chem., 9 (4), 361-375

ORELLA, C.J.; KIRWAN, D.J. (1989): The solubility of amino acids in mixtures of water and aliphatic alcohols

Biotechnology Progress, 5 (3), 89-91

REKKER, R.F.; de KORT, H.M. (1979): The hydrophobic fragmental constant; an extension to a 1000 data points set

Eur. J. Med. Chem., 14 (6), 479-488

RIDDICK, J.A.; BUNGER, W.B. (1970): Organic solvents, physical properties and methods of purification 3rd edition

Techniques of chemistry, Vol. 2, Wiley Interscience, New York

3. CINÉTIQUE DE L'ENZYME SOLUBLE

3.1 HYDROLYSES EN MILIEU AQUEUX A pH CONSTANT

3.1.1 Partie expérimentale

A moins qu'il n'en soit fait mention, toutes les expériences décrites ci-après ont été réalisées à une température de 30 °C et à un pH constant de 5.5; cette valeur permettait l'étude de l'hydrolyse du PAPE sur une large plage de concentrations, la solubilité de l'ester devenant trop limitée au-delà. On était également assuré d'éviter tout problème d'autohydrolyse et de transpeptisation.

30 ml d'ester en solution aqueuse étaient introduits dans la cuve de titration à double manteau déjà décrite. Le milieu contenait également du CaCl_2 à raison de $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, composé dont l'utilité sera expliquée plus loin. Une fois la température de consigne atteinte et le pH ajusté, 1 ml d'une solution d'enzyme était ajouté et le régulateur de pH mis en route. On mesurait alors le volume de NaOH consommé au cours du temps soit sur un enregistreur, soit à l'aide d'un système d'acquisition de données par ordinateur. Les concentrations de toutes les espèces étaient calculées afin de tenir compte de la dilution provoquée par l'adjonction de l'enzyme.

Le rapport entre la masse de base consommée pour titrer les protons et celle de phénylalanine n'est cependant pas 1:1. La figure 3.1, qui est un fragment de la figure 1.16, permet de mieux apprécier la situation. En effet, à cause des propriétés acide-base du substrat et de la phénylalanine, l'hydrolyse de la forme acide de l'ester (réaction 2 sur la figure 3.1) est pratiquement le seul processus qui génère des H^+ quantitativement, de par la faible valeur du pK_a pour le groupement carboxylique de l'acide aminé (1.83), qui induit une libération quantitative des protons par la réaction 3 dès qu'on se trouve au dessus de pH 3. Une autre source de protons est constituée par l'équilibre acide-base du groupe amino de l'acide aminé (réaction 4). La dégradation de l'ester neutre (1) ne produisant que de la phénylalanine sous forme zwitterionique (schéma du haut), celle-ci ne libérera des H^+ que selon l'équilibre (4).

On appelle justement fraction titrable f_t le rapport stoechiométrique entre les masses de base consommée et de phénylalanine produite. Connaissant les réactions impliquant la libération des protons, on voit aisément que cette fraction

sera égale à la fraction massique de substrat sous forme acide à laquelle on ajoutera celle d'acide aminé dont le groupe amino n'est pas protoné et soustraira celle avec le groupement carboxylique non dissocié, d'où l'expression 3.1. Comme le système est monophasique et de volume constant, on notera que l'on peut utiliser aussi bien les rapports des concentrations que les fractions massiques des différentes espèces en présence.

$$f_t = x_S^n + x_F^b - x_F^a \quad (3.1)$$

3.1

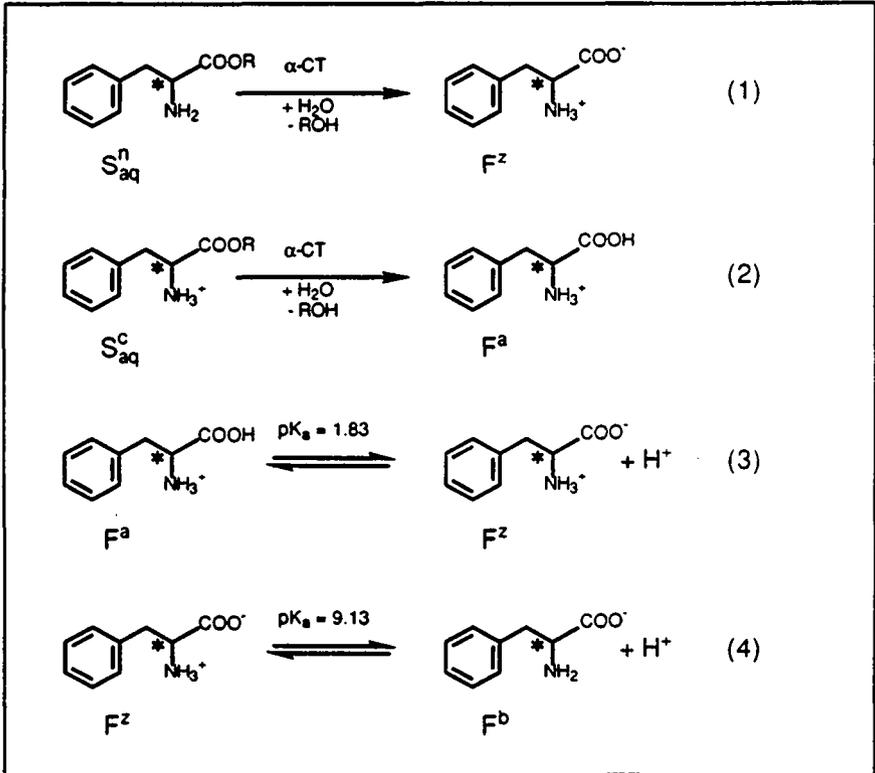


Figure 3.1: Processus de libération des protons lors de l'hydrolyse

Sachant, de par la définition des équilibres acide-base, que:

$$\frac{x_S^a}{x_S^b} = \frac{K_a(S)}{H^+} \cdot \frac{x_F^b}{x_F^a} = \frac{K_a(F, NH_2)}{H^+} \quad \text{et} \quad \frac{x_F^a}{x_F^b} = \frac{H^+}{K_a(F, COOH)} \quad 3.2, 3.3, 3.4$$

On obtient finalement, pour la fraction titrable en milieu aqueux:

$$f_t = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a(S))}} + \frac{1}{1 + 10^{(pK_a(F, NH_2) - pH)}} - \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a(F, COOH))}} \quad 3.5$$

Cette grandeur dépend bien évidemment du pH, et ce de la façon illustrée à la figure 3.2.

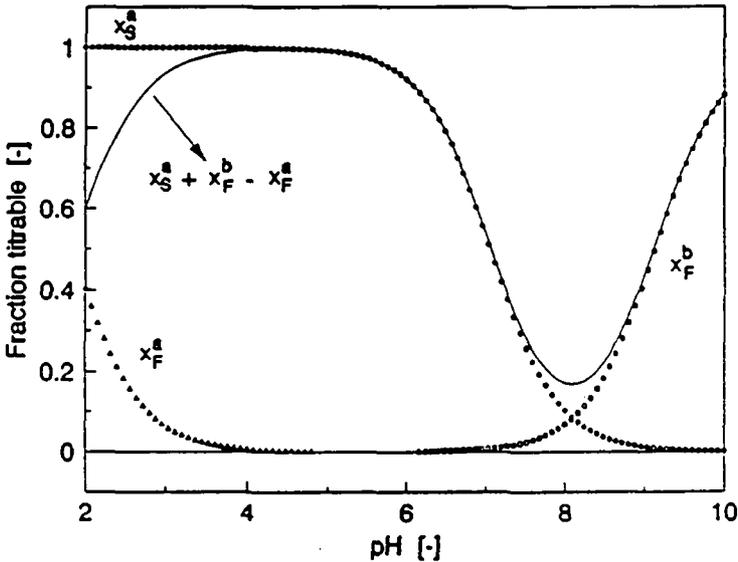


Figure 3.2: f_t en fonction du pH en milieu 100 % aqueux ($T=30\text{ }^\circ\text{C}$)

Vu qu'on travaille à pH constant et donc à fraction titrable constante, la relation entre la masse de base injectée et le taux de conversion est tout simplement:

$$m_B = f_t \cdot m_{Phe} = f_t \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot S_o \cdot X\right) \cdot V_{aq} \quad 3.6$$

Avec $S_0 = (S_{L0} + S_D) = 2 S_{L0}$ si on hydrolyse un mélange racémique. D'où, pour le taux de conversion:

$$X = \frac{1}{f_i} \cdot \frac{2 m_B}{S_0 \cdot V_{aq}} \quad 3.7$$

3.1.2 Théorie

Le modèle le plus connu pour la description mathématique des réactions enzymatiques est celui proposé successivement par Brown (1902) et Henri (1901-1904), puis développé par Michaelis et Menten (1913); il suppose les étapes suivantes: formation d'un complexe enzyme-substrat ES, puis dégradation irréversible de ce dernier avec séparation finale de l'enzyme et du produit. Un tel schéma est présenté à la figure 3.3.

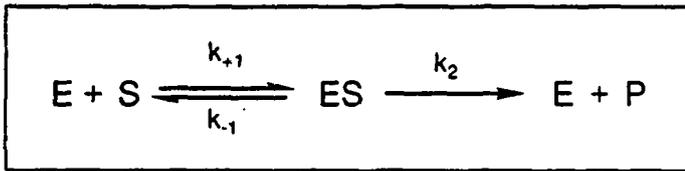


Figure 3.3: Schéma réactionnel selon Michaelis et Menten

Pour un système fermé, les vitesses d'évolution des espèces ES et P s'expriment comme:

$$\frac{dES}{dt} = k_{+1} \cdot E \cdot S - (k_{-1} + k_2) \cdot ES \quad 3.8$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot ES \quad 3.9$$

Expressions que l'on peut compléter par un bilan massique sur l'enzyme:

$$E_0 = E + ES \quad 3.10$$

On doit se rendre compte à ce stade que le système d'équations différentielles ci-dessus ne peut pas être résolu analytiquement, mais doit être intégré numériquement si on veut avoir accès à la phase transitoire de la réaction

enzymatique. Les cas où on a besoin de cette information sont cependant assez rares, et on peut le plus souvent se contenter de modéliser le processus en supposant sa quasi-stationnarité. On peut alors faire des hypothèses sur les étapes limitantes de ce dernier, tout en gardant à l'esprit le caractère simplificateur d'une telle pratique.

Si on suppose que l'équilibre de formation du complexe est suffisamment rapide pour ne pas être perturbé par la réaction proprement dite ($k_{-1} \gg k_2$), alors on a:

$$k_{+1} \cdot E \cdot S = k_{-1} \cdot ES \quad 3.11$$

Si $k_{-1} \gg k_2$, alors le complexe ES atteint rapidement une concentration stationnaire et d'après 3.8 on a:

$$\frac{dES}{dt} = 0 \quad 3.12$$

La combinaison de 3.10 et 3.11 donne alors:

$$ES = \frac{E_0 \cdot S}{K_s + S} \quad \text{Avec } K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \text{ (constante de dissociation de ES)} \quad 3.13$$

Et l'expression 3.9 pour la vitesse de formation de P devient:

$$R_p = \frac{dP}{dt} = k_2 \cdot E_0 \cdot \frac{S}{K_s + S} = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{Avec } V_{\max} = k_2 \cdot E_0) \quad 3.14$$

On normalise souvent la vitesse de réaction par rapport à la concentration d'enzyme, ce qui donne:

$$R_{p,n} = \frac{R_p}{E_0} = k_2 \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad 3.15$$

L'équation 3.15 est plus connue sous le nom d'équation de Michaelis-Menten, et a une forme caractéristique que l'on retrouvera très souvent. k_2 représente la vitesse de réaction (normalisée) maximale atteignable, lorsqu'on a $S \gg K_s$. On considère à ce moment que toute l'enzyme se trouve sous forme complexée ES.

Mais l'équation 3.15 ci-dessus ne constitue qu'un cas particulier de l'approche de Briggs et Haldane (1925), qui se sont contentés de supposer un état quasi-stationnaire pour l'intermédiaire ES, dont la concentration ne varie alors plus. La conséquence directe en est que:

$$\frac{dES}{dt} \cong 0 \Rightarrow k_{-1} \cdot E \cdot S = (k_1 + k_2) \cdot ES \quad 3.16$$

L'équation de vitesse à laquelle on arrive après développement a exactement la même forme que 3.15:

$$R_{p,n} = \frac{R_p}{E_0} = k_2 \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad 3.17$$

Le paramètre K_m est appelé constante de Michaelis et vaut cette fois:

$$K_m = \frac{k_1 + k_2}{k_{-1}} \quad 3.18$$

3.1.3 Influence de l'eau et des nucléophiles

Mais un modèle élémentaire à un seul substrat tel qu'on vient de le décrire peut s'avérer par trop simplifié pour la description efficace des réactions d'hydrolyse comme celle des dérivés de la phénylalanine par la chymotrypsine. Les études de **Bender et al. (1964)** sur ce thème ont d'ailleurs largement contribué à le démontrer. Il a le premier tenu compte du fait que la réaction d'hydrolyse implique la participation d'une molécule d'eau, ainsi que la production d'une molécule d'alcool. Il a donc supposé une étape supplémentaire lors de laquelle l'alcool est libéré, conduisant à la formation d'un intermédiaire enzyme-acyle. C'est dans l'étape suivante de désacylation qu'intervient la molécule d'eau, lors de l'hydrolyse proprement dite. On se rend bien compte de la difficulté à évaluer l'influence de la concentration de l'eau en solution aqueuse mais vu le caractère nucléophile de la réaction, Bender s'est demandé si un composé autre que H_2O pouvait participer à la désacylation.

Plusieurs indices plaidaient d'ailleurs en faveur de cette théorie. Par exemple, l'augmentation de la constante de vitesse pour la désacylation de l'acétyl- α -chymotrypsine en présence d'éthanol, et la détection d'acétate d'éthyle dans le milieu; dans le même ordre d'idées, il a aussi observé une réaction d'échange entre le méthyl- C^{14} -ester de la N-acétyl-L-phénylalanine et du méthanol

non marqué, réaction catalysée par l' α -CT. Celle-ci promeut donc non seulement l'hydrolyse des esters, mais également leur transestérification, une fois ceux-ci mis en présence du nucléophile approprié. Moresoli (1990) a étudié une réaction de ce type, à savoir la transestérification de l'ester n-propylique de phénylalanine en présence de 1,4-butanediol en tant que second nucléophile. Celui-ci, toujours d'après Bender et al. (1964), se trouve alors en compétition avec l'eau pour la désacylation et ce directement depuis le sein de la solution, aucun site spécifique pour l'eau ou le nucléophile n'ayant pu être détecté sur l'enzyme. Le schéma réactionnel finalement proposé par Bender est illustré à la figure 3.4 qui suit:

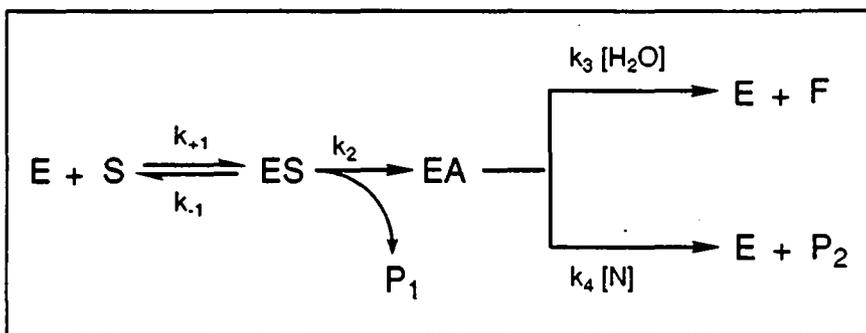


Figure 3.4: Mécanisme de réaction selon Bender et al. (1964)

Un cas de figure légèrement différent se présente si le nucléophile N est tout simplement l'alcool, libéré lors de la formation du complexe enzyme-acyle EA. A ce moment, la compétition lors de la désacylation peut conduire soit à la libération du produit, soit à celle du substrat. Cette dernière situation est montrée à la figure 3.5 ci-après. On y a de plus introduit la notion d'un substrat spécifique optiquement actif, comme le L-PAPE. Dans les schémas et équations suivantes, la molécule hydrolysée sera donc désormais désignée par \$S_L\$, et le produit d'hydrolyse par \$F_L\$. De plus, on supposera que les deux formes de l'ester (chargée et neutre) sont hydrolysées à la même vitesse par la chymotrypsine.

La mise en équations de ce mécanisme est la suivante:

$$\frac{dES}{dt} = k_{+1} \cdot E \cdot S_L - (k_{-1} + k_2) \cdot ES_L$$

$$\frac{dEA}{dt} = k_2 \cdot ES_L - (k_3 \cdot [H_2O] + k_4 \cdot [P]) \cdot EA \quad 3.20$$

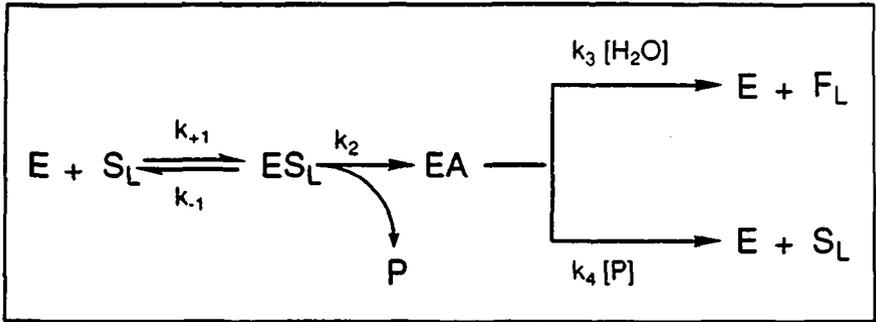


Figure 3.5: Compétition eau-alcool pour la désacylation

Avec le bilan sur l'enzyme:

$$E + ES_L + EA = E_0 \quad 3.21$$

La vitesse de disparition du substrat (d'apparition des produits) vaut quant à elle:

$$-\frac{dS_L}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{dF_L}{dt} = R_F = k_3 \cdot [H_2O] \cdot EA \quad 3.22$$

Comme dans le cas précédent, on peut supposer un équilibre très rapide pour la formation du complexe ES_L avec $k_{+1} \gg k_2$, et un état stationnaire pour l'intermédiaire EA. Les dérivées 3.19 et 3.20 s'annulent alors. Afin de faciliter sa résolution, le système des équations 3.19 à 3.21 peut être présenté sous forme matricielle:

$$\begin{vmatrix} k_{+1} \cdot S_L & -(k_{+1} + k_2) & 0 \\ 0 & k_2 & -(k_3 \cdot [H_2O] + k_4 \cdot [P]) \\ 1 & 1 & 1 \end{vmatrix} \cdot \begin{vmatrix} E \\ ES_L \\ EA \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 0 \\ 0 \\ E_0 \end{vmatrix}$$

Ou

M

e

=

y

3.23

Comme le déterminant D de M est différent de zéro et qu'au moins un des éléments de y est non-nul, on peut appliquer la règle de Cramer. Chaque élément e_j du vecteur e vaut alors:

$$e_j = \frac{D_j}{D} \quad 3.24$$

L'expression de D_j se simplifie, $y_3 = E_0$ étant le seul élément de y différent de zéro. A_{ij} est le cofacteur de l'élément y_j .

$$D_j = \sum_{i=1}^3 A_{ij} \cdot y_i = A_{3j} \cdot E_0 \quad 3.25$$

Donc:

$$e_j = \frac{A_{3j} \cdot E_0}{D} \quad 3.26$$

Mais comme on sait par l'équation 3.21 que:

$$\sum_{j=1}^3 e_j = E_0 \quad 3.21$$

On arrive à la conclusion que:

$$\sum_{j=1}^3 \frac{A_{3j}}{D} = 1 \Rightarrow \sum_{j=1}^3 A_{3j} = D \quad 3.27$$

Il suffit donc de calculer les cofacteurs A_{3j} sans s'occuper de D , la concentration de chaque espèce enzymatique e_j s'exprimant finalement en fraction de la concentration initiale d'enzyme E_0 selon:

$$e_j = \frac{A_{3j}}{\sum_{j=1}^3 A_{3j}} \cdot E_0 \quad 3.28$$

On obtient donc après calcul les expressions suivantes:

$$E = \frac{(k_{-1}+k_2) \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}]) \cdot E_0}{(k_{-1}+k_2) \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}]) + k_{+1} \cdot S \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}] + k_2)} \quad 3.29$$

$$ES = \frac{k_{+1} \cdot S \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}]) \cdot E_0}{(k_{-1}+k_2) \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}]) + k_{+1} \cdot S \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}] + k_2)} \quad 3.30$$

$$EA = \frac{k_{+1} \cdot S \cdot k_2 \cdot E_0}{(k_{-1}+k_2) \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}]) + k_{+1} \cdot S \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}] + k_2)} \quad 3.31$$

L'équation 3.22 pour la vitesse d'apparition du produit devient alors, après combinaison avec 3.31:

$$\frac{dF_1}{dt} = R_F = \frac{k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] \cdot k_{+1} \cdot S \cdot k_2 \cdot E_0}{(k_{-1}+k_2) \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}]) + k_{+1} \cdot S \cdot (k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] + k_4 \cdot [\text{P}] + k_2)} \quad 3.32$$

La concentration de l'eau pouvant être considérée comme constante dans une solution aqueuse, on peut poser:

$$k_{3b} = k_3 \cdot [\text{H}_2\text{O}] \quad 3.33$$

L'expression 3.32, une fois divisée en haut et en bas par $(k_{3b} \cdot k_{+1})$, devient:

$$\frac{dF_1}{dt} = R_F = \frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S}{\left(\frac{k_{-1}+k_2}{k_{+1}}\right) \cdot \left(1 + \frac{k_4}{k_{3b}} \cdot [\text{P}]\right) + S \cdot \left(1 + \frac{k_4}{k_{3b}} \cdot [\text{P}] + \frac{k_2}{k_{3b}}\right)} \quad 3.34$$

Si de plus on réarrange légèrement 3.34, on retrouve une formule pour la vitesse de réaction normalisée analogue à celle de Briggs et Haldane, à savoir:

$$R_{F,n} = \frac{R_F}{E_0} = k_2^{app} \cdot \frac{S}{K_m^{app} + S} \quad 3.35$$

Avec les expressions suivantes pour les deux paramètres:

$$k_2^{app} = \left(\frac{k_2 \cdot k_{3b}}{(k_{3b} + k_4 \cdot [\text{P}] + k_2)} \right) \quad 3.36$$

$$K_m^{app} = \left(\frac{k_{3b} + k_4 \cdot [P]}{(k_{3b} + k_4 \cdot [P] + k_2)} \right) \cdot K_m \quad 3.37$$

A partir de là, si on pose maintenant:

$$k = \frac{k_4}{k_{3b}} \quad \text{et} \quad k_x = \frac{k_2}{k_{3b}} \quad 3.38$$

Ainsi que:

$$P = P_0 + S_{Lo} \cdot X \quad 3.39$$

On arrive à l'expression suivante pour la vitesse initiale normalisée d'apparition de la phénylalanine:

$$R_{F,n}^0 = \frac{k_2 \cdot S_{Lo}}{K_m \cdot (1 + k \cdot P_0) + S_{Lo} \cdot (1 + k \cdot P_0 + k_x)} \quad 3.40$$

Si on mesure cette vitesse pour différentes concentrations initiales de propanol (tout en gardant S_{Lo} constante) et qu'on rapporte les valeurs obtenues à celle qui correspond à $P_0 = 0$, on arrive à:

$$\frac{(R_{F,n}^0)_{P_0=0}}{(R_{F,n}^0)} = \frac{k_2 \cdot \frac{S_{Lo}}{K_m + S_{Lo} \cdot (1 + k_x)}}{\frac{k_2 \cdot S_{Lo}}{K_m \cdot (1 + k \cdot P_0) + S_{Lo} \cdot (1 + k \cdot P_0 + k_x)}} \quad 3.41$$

L'équation 3.41, une fois simplifiée, devient:

$$\frac{(R_{F,n}^0)_{P_0=0}}{(R_{F,n}^0)} = \frac{K_m \cdot (1 + k \cdot P_0) + S_{Lo} \cdot (1 + k \cdot P_0 + k_x)}{K_m + S_{Lo} \cdot (1 + k_x)} \quad 3.42$$

D'où:

$$\frac{(R_{F,n}^0)_{P_0=0}}{(R_{F,n}^0)} = 1 + \frac{K_m + S_{Lo} \cdot k}{K_m + S_{Lo} \cdot (1 + k_x)} \cdot P_0 \quad 3.43$$

Le rapport des deux vitesses va donc toujours évoluer linéairement en fonction de la concentration initiale de l'alcool. A partir de cette équation générale, on peut cependant distinguer deux situations extrêmes:

a) L'acylation est le processus limitant. Cela revient à poser $k_2 \ll k_{3b}, k_4$, avec pour conséquence directe $k_x \approx 0$. On arrive alors à:

$$\frac{(F_{F,n}^0)_{P_0=0}}{(F_{F,n}^0)} = 1 + k \cdot P_0 \quad 3.44$$

b) La désacylation est l'étape la plus lente. Il en découle pour les valeurs respectives des constantes de vitesse: $k_{3b}, k_4 \ll k_2$. On se rend aisément compte que, par suite, $k_x \gg k$. A ce moment, la pente de la droite définie à l'équation 3.43 devient très faible. **Bender (1964)**, dans son commentaire sur les différentes situations possibles, la suppose même nulle. Ceci est tout à fait raisonnable dans le sens où la constante k doit être nettement inférieure à 1, vu que c'est la réaction d'hydrolyse qui prédomine. La vitesse de réaction ne devrait donc pas dépendre de P_0 , ou alors de façon beaucoup moins marquée que dans le cas où c'est l'acylation qui est l'étape limitante.

On a posé à nouveau le problème, en le présentant cette fois sous la forme d'un système d'équations différentielles. D'après le schéma réactionnel de la figure 3.5, on peut écrire:

$$\frac{dE}{dt} = (k_{3b} + k_4 \cdot P) \cdot EA + k_{-1} \cdot ES_L - k_{+1} \cdot E \cdot S_L \quad 3.45$$

$$\frac{dES_L}{dt} = k_{+1} \cdot E \cdot S_L - k_{-1} \cdot ES_L - k_2 \cdot ES_L \quad 3.46$$

$$\frac{dEA}{dt} = k_2 \cdot ES_L - (k_{3b} + k_4 \cdot P) \cdot EA \quad 3.47$$

$$\frac{dS_L}{dt} = k_4 \cdot P \cdot EA + k_{-1} \cdot ES_L - k_{+1} \cdot E \cdot S_L \quad 3.48$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot ES_L - k_4 \cdot P \cdot EA \quad 3.49$$

$$\frac{dF_L}{dt} = k_{3b} \cdot EA \quad 3.50$$

Comme seule hypothèse simplificatrice, on a supposé l'état stationnaire pour la concentration de l'intermédiaire ES_L . L'équation 3.46 s'annule donc ($dES_L/dt = 0$), ce qui conduit à:

$$k_{+1} \cdot E \cdot S_L - k_{-1} \cdot ES_L = k_2 \cdot ES_L \quad 3.51$$

$$E \cdot S_L = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}} \cdot ES_L = K_m \cdot ES_L \quad 3.52$$

Après combinaison avec 3.51 et 3.52, on réduit à cinq le nombre d'équations différentielles dans le système. Elles sont données ci-après:

$$\frac{dE}{dt} = (k_{3b} + k_4 \cdot P) \cdot EA - k_2 \cdot ES_L \quad 3.53$$

$$\frac{dEA}{dt} = k_2 \cdot \frac{E \cdot S_L}{K_m} - (k_{3b} + k_4 \cdot P) \cdot EA \quad 3.54$$

$$\frac{dS_L}{dt} = k_4 \cdot P \cdot EA - k_2 \cdot \frac{E \cdot S_L}{K_m} \quad 3.55$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot \frac{E \cdot S_L}{K_m} - k_4 \cdot P \cdot EA \quad 3.56$$

$$\frac{dF_L}{dt} = k_{3b} \cdot EA \quad 3.57$$

Les équations 3.53 à 3.57 ont été intégrées simultanément à l'aide d'une méthode numérique, et ce pour les conditions initiales suivantes:

$$(E)_{t=0} = E_0 = 0.04 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \quad (\Leftrightarrow 1.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ env. d}'\alpha\text{-chymotrypsine})$$

$$(EA)_{t=0} = 0$$

$$(S_L)_{t=0} = S_{L0} = 40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$(P)_{t=0} = P_0 = 0, 50 \text{ ou } 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$(F_L)_{t=0} = 0$$

On a ainsi pu simuler la réaction pour différentes valeurs relatives des constantes cinétiques correspondant à trois situations possibles, et évaluer l'influence d'une concentration initiale variable de propanol dans chaque cas. Les valeurs utilisées sont reportées dans le tableau 3.1, et les courbes simulées dans

les figures 3.6 à 3.8. On a varié le rapport k_2/k_{3b} tout en gardant $k = k_4/k_{3b}$ constant et égal à 0.005. En effet, comme on l'a déjà dit, c'est l'hydrolyse qui est la réaction principale et k doit donc être petit. La constante K_m a quant à elle été fixée à $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, et la vitesse de l'étape la plus lente à 25 min^{-1} .

k_2 [min^{-1}]	k_{3b} [min^{-1}]	k_4 [$\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	P_0 [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Etape limitante
25	2500	12.5	0	Acylation
25	2500	12.5	50	
25	2500	12.5	100	
25	25	0.125	0	Pas d'étape limitante
25	25	0.125	50	
25	25	0.125	100	
2500	25	0.125	0	Désacylation
2500	25	0.125	50	
2500	25	0.125	100	

Tableau 3.1: Valeurs des constantes cinétiques pour les simulations

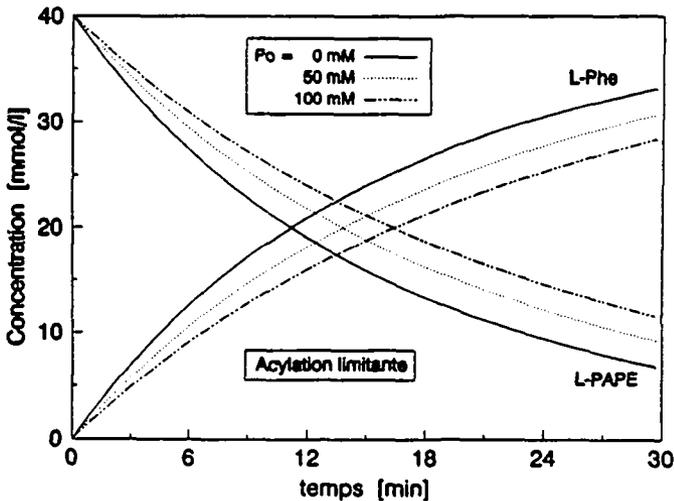


Figure 3.6: Influence simulée du propanol, étape d'acylation limitante ($k_2 \ll k_{3b}$)

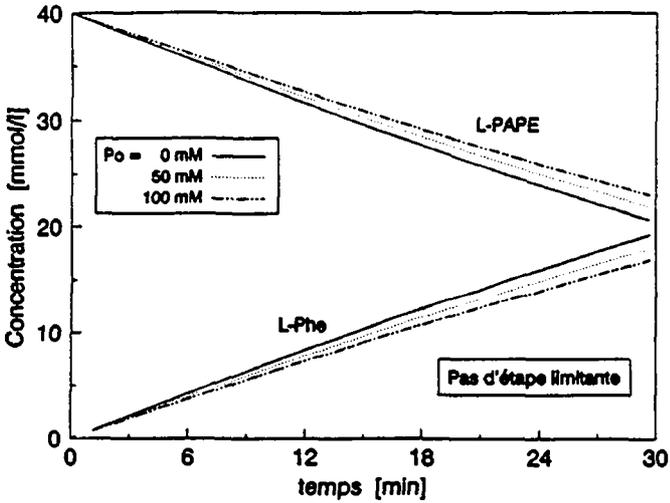


Figure 3.7: Influence simulée du propanol, pas d'étape limitante ($k_2 = k_{3b}$)

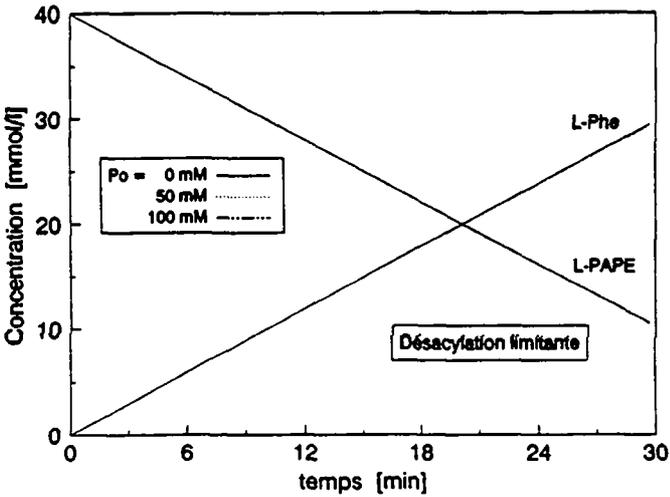


Figure 3.8: Influence simulée du propanol, désacylation limitante ($k_2 \gg k_{3b}$)

Vu la grande différence des valeurs de k_2 et k_{3b} dans le cas de la désacylation limitante, on pensait observer un écart important entre les évolutions du propanol et de la phénylalanine, le premier étant formé lors d'une étape beaucoup plus rapide. Cependant, à cause du facteur 1000 séparant les concentrations de substrat et d'enzyme, celle du complexe EA reste très faible et les deux produits apparaissent à une vitesse qu'il n'est pas possible de différencier sur l'échelle de temps utilisée.

Les résultats des simulations confirment de plus ce qu'on avait pu déduire des équations de **Bender et al. (1964)**, à savoir que dans le cas où $k_2 \ll k_{3b}$, on observe une influence nette de la concentration de propanol sur la vitesse d'apparition des produits (figure 3.6). Cette influence diminue au fur et à mesure que la vitesse d'acylation augmente par rapport à celle de désacylation (figure 3.7), et finit par ne plus être observable une fois cette dernière étape devenue le processus limitant: en effet, les trois courbes de la figure 3.8 sont pratiquement confondues.

Quelques expériences d'hydrolyse à différentes concentrations initiales de propanol devraient donc facilement permettre de caractériser le système réactionnel et d'opter définitivement pour l'un ou l'autre modèle.

Dans tous les développements qui suivent, on ne traitera cependant que les cas où c'est l'étape d'acylation qui est la plus lente, ce qui revient à poser $k_x = 0$ dans l'équation 3.40, qui se simplifie alors de la façon suivante:

$$R_{P,n} = \frac{k_2 \cdot S_{Lo}}{K_m \cdot (1 + k \cdot P_o) + S_{Lo} \cdot (1 + k \cdot P_o)} = \frac{k_2}{(1 + k \cdot P_o)} \cdot \frac{S_{Lo}}{K_m + S_{Lo}} \quad 3.58$$

L'étude d'une réaction par la détermination de sa vitesse initiale et de la dépendance de celle-ci envers les divers constituants a été pendant longtemps la méthode la plus employée pour la détermination des constantes cinétiques d'un modèle. Elle est néanmoins assez fastidieuse, dans le sens où elle nécessite la mesure d'une réaction complète pour obtenir un point, ce qui limite fortement la quantité d'information accessible. C'est pourquoi on travaille de plus en plus avec la forme intégrée de l'équation de vitesse, qui modélise l'évolution complète du temps en fonction du taux de conversion. Si on réécrit l'équation 3.58 pour avoir la vitesse de réaction en fonction du taux de conversion, on a:

$$R_{F,n} = \frac{S_{L0}}{E_0} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{k_2}{1 + k \cdot P} \cdot \frac{S_L}{K_m + S_L} \quad 3.59$$

On sait que $P = P_0 + S_{L0} \cdot X$ et que $S_L = S_{L0} \cdot (1-X)$. Dans le cas où $P_0 = 0$, 3.59 devient:

$$R_{F,n} = \frac{S_{L0}}{E_0} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{k_2}{1 + k \cdot S_{L0} \cdot X} \cdot \frac{S_{L0} \cdot (1-X)}{K_m + S_{L0} \cdot (1-X)} \quad 3.60$$

On peut simplifier à droite et à gauche par S_{L0} , et diviser le membre de droite en haut et en bas par $(1-X)$, ce qui mène à:

$$\frac{1}{E_0} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{k_2}{1 + k \cdot S_{L0} \cdot X} \cdot \frac{1}{\frac{K_m}{1-X} + S_{L0}} \quad 3.61$$

Il est ensuite possible de séparer les variables et d'écrire:

$$\int_0^t k_2 \cdot E_0 \cdot dt = \int_0^X (1 + k \cdot S_{L0} \cdot X) \cdot \left(\frac{K_m}{1-X} + S_{L0} \right) \cdot dX \quad 3.62$$

L'intégration se fait facilement, avec pour résultat:

$$E_0 \cdot t = \frac{1}{k_2} \cdot \left(S_{L0} \cdot (1-k \cdot K_m) \cdot X \cdot K_m \cdot (1+k \cdot S_{L0}) \cdot \ln(1-X) + \frac{1}{2} \cdot k \cdot S_{L0}^2 \cdot X^2 \right) \quad 3.63$$

On remarquera que l'équation ci-dessus donne l'évolution de $E_0 t$ en fonction de X et non pas l'inverse. Ceci est dû à la structure de l'équation de vitesse, qui ne permet pas d'exprimer X en fonction de t . On peut néanmoins, sur la base de courbes expérimentales, estimer les paramètres cinétiques du modèle à l'aide d'un programme de régression non-linéaire basé sur l'algorithme de Marquardt déjà évoqué précédemment. Un exemple d'un tel programme appelé FMKP0 est donné en annexe. Il correspond à l'intégration de l'équation de vitesse 3.59.

Mais la forme L du substrat n'est pas la seule espèce présente dans le milieu réactionnel, et il faudra donc tenir compte des éventuels effets inhibiteurs dus aux autres participants, voire au substrat lui-même. Les cas d'inhibition les plus fréquemment rencontrés sont illustrés à la figure 3.9 ci-après.

Afin de ne pas refaire le développement de tous les bilans, on se contentera de résumer l'effet des inhibiteurs sur la vitesse de réaction dans le tableau 3.2. Il est à noter que les équations 3.64 à 3.66 qui y sont présentées restent justes tant que ce n'est pas l'alcool P qui est l'inhibiteur. De plus on continuera ici à considérer l'acylation comme étant le processus limitant, et donc à utiliser les relations précédemment obtenues (équations 3.35 et 3.59), à savoir:

$$R_{F,n} = \frac{R_F}{E_o} = k_2^{app} \cdot \frac{S_L}{K_m^{app} + S_L}$$

$$k_2^{app} = \left(\frac{k_2}{(1 + k \cdot P)} \right)$$

$$K_m^{app} = K_m$$

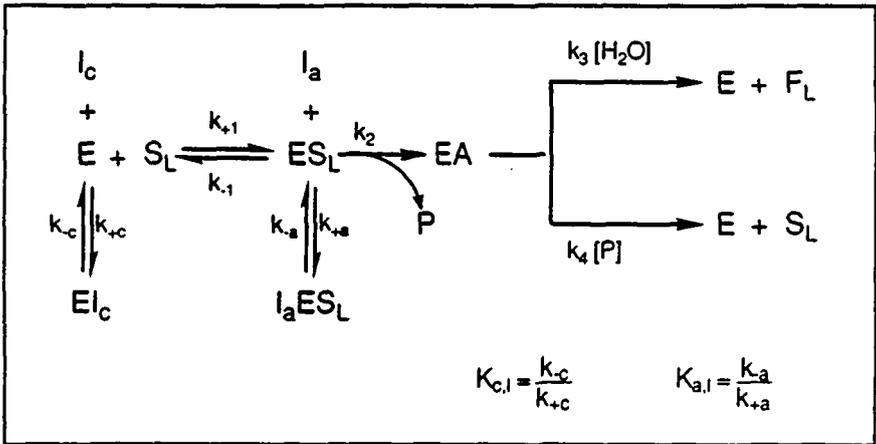


Figure 3.9: Schéma général des mécanismes d'inhibition

Dans le cas d'une inhibition compétitive, le substrat et l'inhibiteur I_c sont en compétition pour l'occupation du site actif de l'enzyme. alors qu'un processus anticompétitif agit sur l'intermédiaire enzyme-substrat. Ces complexes de l'inhibiteur ainsi formés sont appelés "complexes cul-de-sac" ("dead-end complexes"), c'est-à-dire qu'ils ôtent à l'enzyme toute propriété catalytique. Un inhibiteur mixte I_m (ou non compétitif) cumule les propriétés des deux premiers, en s'adsorbant de façon réversible aussi bien sur E que sur ES_L. Une inhibition non

compétitive pure est caractérisée par le fait que $K_{a,1} = K_{c,1} = K_{m,1}$, et c'est alors la vitesse maximale qui est diminuée d'un rapport $\frac{K_{m,1}}{I_m + K_{m,1}}$

Inhibition	Vitesse de réaction (équation 3.35)
Compétitive	$R_{F,n} = \frac{R_F}{E_o} = k_2^{app} \cdot \frac{S_L}{K_m^{app} \cdot \left(1 + \frac{I_c}{K_{c,1}}\right) + S_L}$ <p style="text-align: right;">3.64</p>
Anticompétitive	$R_{F,n} = \frac{R_F}{E_o} = k_2^{app} \cdot \frac{S_L}{K_m^{app} + S_L \cdot \left(1 + \frac{I_a}{K_{a,1}}\right)}$ <p style="text-align: right;">3.65</p>
Mixte (non compétitive)	$R_{F,n} = \frac{R_F}{E_o} = k_2^{app} \cdot \frac{S_L}{K_m^{app} \cdot \left(1 + \frac{I_c}{K_{c,1}}\right) + S_L \cdot \left(1 + \frac{I_a}{K_{a,1}}\right)}$ <p style="text-align: right;">3.66</p>

Tableau 3.2: Effet des inhibiteurs sur la vitesse de réaction

On a un cas particulier d'inhibition anticompétitive quand le substrat, en excès, s'adsorbe une deuxième fois sur l'enzyme et bloque le processus de dégradation, tout comme les autres inhibiteurs.

3.1.4 Mesure de l'influence de Ca^{2+}

Avant de commencer l'étude expérimentale de la cinétique, on a voulu vérifier l'influence maintes fois décrite du cation Ca^{2+} sur l'activité de la chymotrypsine, et surtout à quelle concentration il fallait l'ajouter au milieu. On a donc effectué des hydrolyses à trois concentrations de $CaCl_2$ différentes (0, 2.5 et 5 $mmol \cdot l^{-1}$) selon le mode opératoire décrit au début du chapitre, essais dont les résultats sont illustrés par la figure 3.10. On peut y observer l'effet du calcium et constater qu'il est maximal déjà à 2.5 $mmol \cdot l^{-1}$. Par précaution, toutes les expériences suivantes seront cependant effectuées avec 5 $mmol \cdot l^{-1}$ de $CaCl_2$ dans la phase aqueuse.

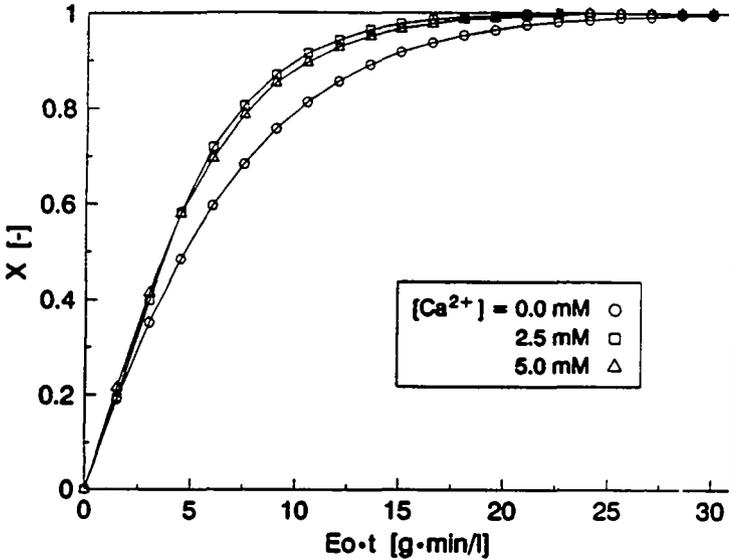


Figure 3.10: Effet du cation Ca^{2+} sur l'activité de l'enzyme

$T = 30$ °C, $pH = cte = 5.5$, $S_o = 100$ mmol.l⁻¹, $E_o = 0.75$ g.l⁻¹

3.1.5 Identification de l'étape limitante

Avant de développer un modèle cinétique complet, il était avantageux de savoir quelle hypothèse concernant le processus limitant pouvait être appliquée. Quelques hydrolyses ont donc été menées à bien avec des concentrations initiales de propanol croissantes. La figure 3.11 montre l'évolution du taux de conversion X , calculé à partir du volume de NaOH consommé et de l'expression 3.7. L'axe du temps a été normalisé par rapport à la concentration initiale d'enzyme E_o , le temps de réaction et l'activité lui étant reliés de façon inversement proportionnelle et proportionnelle respectivement.

Le calcul de la vitesse initiale de la réaction a été réalisé de la façon suivante: la première partie de la courbe d'hydrolyse ($0 < X < 0.2$) était représentée selon l'expression 3.67.

$$X = \frac{A \cdot E_o t}{B + E_o t} \Rightarrow \left(\frac{dX}{d(E_o t)} \right)_{E_o t = 0} = \frac{A}{B}$$

Les paramètres A et B une fois optimisés donnaient alors accès à :

$$R_{F,n}^2 = S_{Lo} \cdot \left(\frac{dX}{d(E_0 \cdot t)} \right)_{E_0 t = 0} = S_{Lo} \cdot \frac{A}{B}$$

3.68

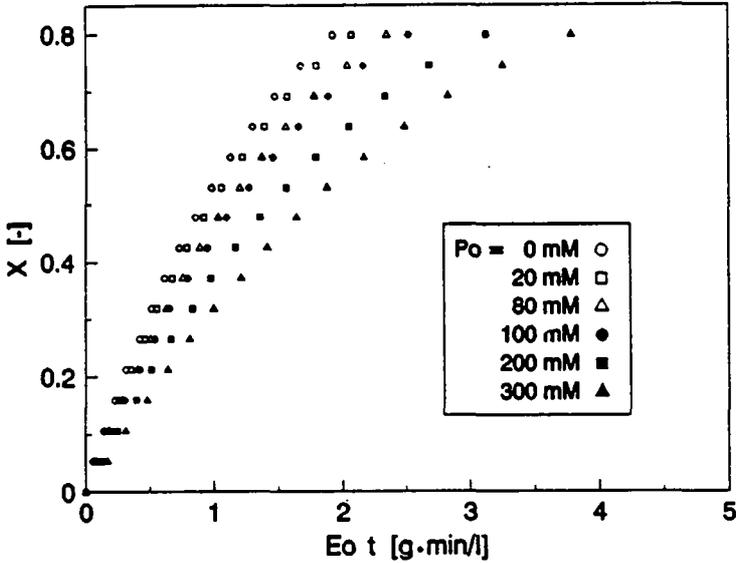


Figure 3.11: Effet de la concentration initiale de propanol

T = 30 °C, pH = cte = 5.5, S₀ = 80 mmol·l⁻¹, E₀ = 0.10 g·l⁻¹

P ₀ mmol·l ⁻¹	(R _{F,n}) mmol·g ⁻¹ ·min ⁻¹	$\frac{(R_{F,n}^2)_{P_0=0}}{(R_{F,n}^2)}$ [-]
0	31.45	1.00
20	27.11	1.16
80	24.39	1.29
100	23.14	1.36
200	18.34	1.72
300	14.56	2.16

Tableau 3.3: Etude de l'influence de l'alcool en tant que nucléophile

Les concentrations initiales de propanol testées, ainsi que les valeurs absolues et relatives de la vitesse initiale sont reportées dans le tableau 3.3 ci-avant.

On a ensuite représenté graphiquement le rapport entre la vitesse initiale de réaction sans propanol ($P_0 = 0$) et avec, comme proposé à l'équation 3.43. On peut constater à la figure 3.12 qu'on a une relation linéaire. La pente de la droite de régression est faible mais non nulle, et vaut:

$$\frac{K_m + S_{Lo} \cdot k}{K_m + S_{Lo} \cdot (1 + k_x)} = 3.69 \cdot 10^{-3} \pm 1.83 \cdot 10^{-4} \quad \text{l} \cdot \text{mmol}^{-1}$$

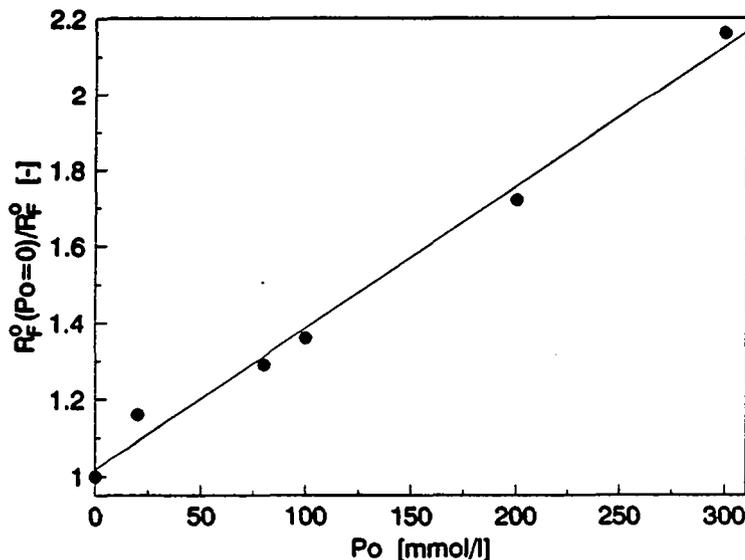


Figure 3.12: Vitesse initiale relative en fonction de P_0

$$T = 30 \text{ } ^\circ\text{C}, \text{ pH} = \text{cte} = 5.5, S_0 = 80.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}, E_0 = 0.10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

Ce résultat, ainsi que l'influence de P_0 observée à la figure 3.11 permettent de définir l'acylation comme étant l'étape limitante dans le processus d'hydrolyse. La pente de la droite correspond donc à la valeur de k .

Le fait qu'elle soit faible signifie que l'hydrolyse est très largement favorisée par rapport à la réaction avec le deuxième nucléophile, mais il ne faut pas perdre

de vue que ceci est dû principalement à la haute concentration d'eau dans le système. En effet si on multiplie k par cette concentration ($55\,550 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ env.), on obtient le rapport des constantes de vitesse k_4/k_3 qui vaut quant à lui presque 205. Les constantes cinétiques sont donc dans un rapport complètement opposé à celui des vitesses de réaction observées, car la loi d'action des masses joue en faveur de l'hydrolyse. Ceci est confirmé par les résultats de Moresoli (1990) qui a fait les mêmes mesures mais à pH 6.25 et sur une plage de concentrations initiales de propanol plus vaste (entre 0 et $600 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Elle a également observé une relation linéaire qui, après régression, a fourni une valeur de k aux alentours de $1.49 \cdot 10^{-3} \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}$, soit à peu près la moitié de celle déterminée ici. La différence n'est pas très grande et pourrait être expliquée par celle des pH auxquels les essais ont été effectués. Lors de ses essais de transestérification réalisés en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) afin de réduire la concentration d'eau dans le milieu, elle avait de plus observé que jusqu'à des concentrations voisines de 20% v/v, le DMSO n'influçait pratiquement pas le rendement maximal, la productivité à ce rendement et la sélectivité du produit de transestérification. Comme ces propriétés sont spécifiques de la désacylation, on peut envisager que l'effet du solvant se fasse sentir de façon plus marquée au niveau de l'étape limitante, à savoir l'acylation.

Suite aux observations faites ci-avant, c'est dorénavant l'expression suivante qui sera utilisée pour la vitesse de réaction:

$$R_{F,n} = \frac{k_2}{1+k\cdot(P_o+S_{L_o}\cdot X)} \cdot \frac{S_{L_o}\cdot(1-X)}{K_m+S_{L_o}\cdot(1-X)} \quad 3.69$$

Le fait que l'acylation soit le processus limitant peut paraître surprenant pour l'hydrolyse d'un ester si on se réfère aux observations de certains auteurs. Il est en effet communément admis (Dupaix et Bechet, 1973) que l'étape la plus lente change avec la nature du groupe partant. Les travaux de Zerner et al. (1964) avaient d'ailleurs montré que pour l'hydrolyse de dérivés de N-acétyl-acides aminés comme la phénylalanine et le tryptophane (substrats spécifiques à l' α -chymotrypsine), c'est l'acylation qui était limitante pour les esters et la désacylation pour les amides. Cependant cette règle souffre quelques exceptions, notamment lors de réactions avec des substrats moins spécifiques et à des valeurs du pH différentes. Il semblerait en effet que ce dernier paramètre puisse influencer

suffisamment la vitesse des différentes étapes pour changer l'étape limitante (Laidler et Bunting, 1973).

3.1.6 Hydrolyse du L-PAPE

On a réalisé une série d'hydrolyses avec différentes concentrations initiales de substrat énantiomériquement pur, à savoir le L-PAPE. La mesure de l'évolution de la phénylalanine ainsi que l'estimation des vitesses initiales de la réaction ont été effectuées de la même manière qu'au sous-chapitre précédent. Les concentrations de substrat et d'enzyme utilisées ainsi que les valeurs de la vitesse initiale sont reportées dans le tableau 3.4.

S_{L_0} mmol.l ⁻¹	E_0 g.l ⁻¹	$R_{F,n}^0$ mmol.g ⁻¹ .min ⁻¹
1.5	0.02	3.98 ± 0.23
3.0	0.02	7.50 ± 0.34
4.0	0.02	10.56 ± 0.62
6.0	0.02	13.63 ± 0.44
9.0	0.02	17.84 ± 1.09
12.0	0.02	22.47 ± 1.46
15.0	0.02	26.50 ± 1.35
18.0	0.04	28.17 ± 1.24
24.0	0.04	31.66 ± 1.93
36.0	0.04	38.29 ± 1.20
64.5	0.04	39.65 ± 1.53
100.1	0.04	43.47 ± 1.87

Tableau 3.4: Vitesses initiales d'hydrolyse du L-PAPE

On a ensuite procédé à l'optimisation des paramètres cinétiques de deux modèles qui sont ceux de Michaelis-Menten et de Bender (avec étape d'acylation limitante). Ces valeurs ont de plus été estimées tant pour la cinétique de vitesse initiale ($R_{F,n}^0 = f(S_{L_0})$) que pour la forme intégrée de l'équation de vitesse ($E_{0t} = f(X)$), afin de permettre une comparaison. A noter que dans les deux modèles l'équation pour la vitesse initiale de la réaction est la même, vu que dans l'équation 3.69 le terme en $\frac{1}{1+k \cdot P}$ tombe si l'on n'a pas de propanol dans le milieu avant le début de l'hydrolyse. On a déjà procédé à l'intégration du modèle de Bender pour

aboutir à l'équation 3.63. En procédant de la même manière, avec l'équation de vitesse selon Michaelis-Menten, on arrive à:

$$E_o \cdot t = \frac{S_{10}}{k_2} \cdot X - \frac{K_m}{k_2} \cdot \ln(1-X) \quad 3.70$$

Les valeurs obtenues ont été reportées dans le tableau 3.5, avec à chaque fois la somme des carrés des erreurs (σ^2) correspondante, pour les mesures de vitesse initiale (σ^2 (Ro)) et pour les courbes conversion / temps (σ^2 (X)). La grandeur de ce paramètre donne une idée de la qualité du modèle pour la description des points mesurés à l'aide des valeurs optimisées des constantes cinétiques:

Résultats	Michaelis-Menten ou Bender $R_o = f(S_o)$	Michaelis-Menten $E_o \cdot t = f(X)$	Bender $E_o \cdot t = f(X)$
k_2 [mmol/(g·min)]	50.74 ± 1.34	43.87 ± 0.24	59.18 ± 1.23
K_m [mmol/l]	14.98 ± 1.05	12.45 ± 0.12	17.70 ± 0.45
k [l/mmol]	0.0122 ± 0.85·10 ⁻³
σ^2 (Ro) [mmol ² /(g·min) ²]	14.06	82.77	113.3
σ^2 (X) [-]	0.2105	0.1243	0.0375

Tableau 3.5: paramètres optimisés pour la cinétique d'hydrolyse du L-PAPE

On a reporté sur le graphique 3.13 les valeurs de $R_{F,n}^0$ recalculées à partir des résultats des optimisations. On ne peut que constater le bon accord entre les mesures et le modèle qui y correspond (courbe 2). Néanmoins si les valeurs de la forme intégrale du modèle ont plus de peine à prédire la vitesse initiale, l'inverse est tout aussi vrai si l'on compare les valeurs de σ^2 (X). Ceci n'a cependant rien d'anormal et découle de la structure même des programmes d'optimisation, qui sont basés sur des modes d'évaluation différents et qui ne minimisent donc pas la même fonction de mérite.

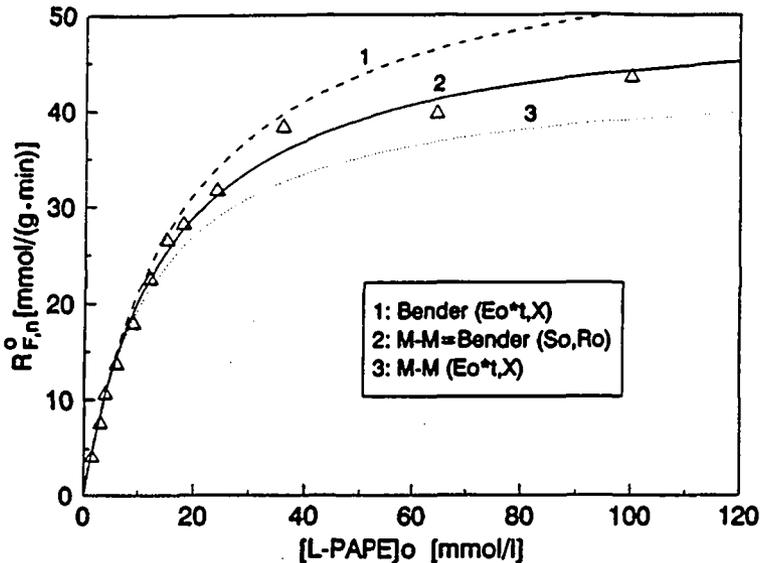


Figure 3.13: Vitesse initiale en fonction de la concentration de L-PAPE

T = 30 °C, pH = cte = 5.5

On a également comparé les courbes de conversion calculées avec les différents lots de paramètres obtenus pour constater la nette supériorité du modèle de Bender, dont la capacité à décrire les mesures peut être constatée sur la figure 3.14. Afin de ne pas surcharger le graphique, on n'a sélectionné que six courbes expérimentales sur l'ensemble des douze. On notera encore dans le tableau 3.5 l'écart entre les valeurs de k_2 et K_m optimisées à partir des vitesses initiales et celles obtenues à partir des mesures du taux de conversion, qui est certainement dû encore une fois en grande partie à la différence de structure des deux programmes. Dans le cas du modèle selon Bender où ce facteur entre aussi en ligne de compte, on peut cependant penser que l'effet du propanol est surestimé, d'où des paramètres k_2 et K_m plus grands que ceux trouvés avec la mesure de R_o . Ceci expliquerait l'écart entre la valeur de k trouvée par régression linéaire et celle optimisée par le programme. C'est néanmoins le modèle de Bender que l'on utilisera à l'avenir, car il est le seul à tenir compte de l'influence de l'alcool libéré. La démarche proposée par Das (1983), qui utilise le modèle de Michaelis-Menten pour décrire l'hydrolyse de l'ester n-butylique de phényltalanine par l' α -chymotrypsine paraît donc un peu trop simplifiée.

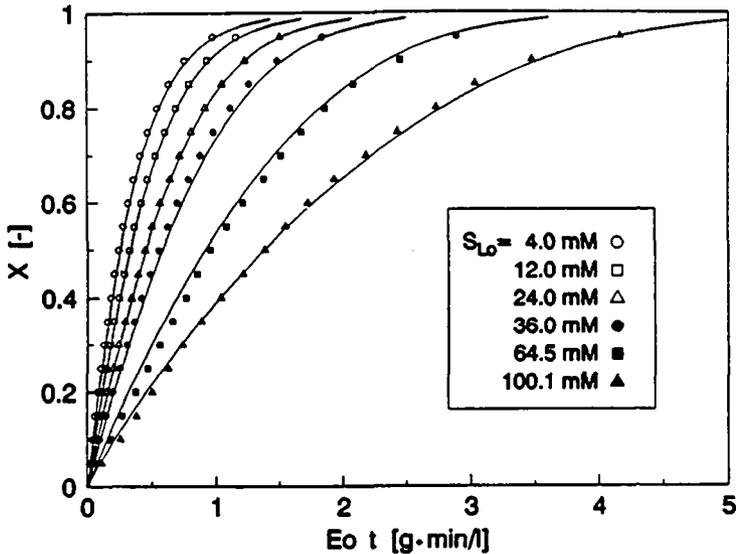


Figure 3.14: Courbes d'hydrolyse du L-PAPE à différentes concentrations
 $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = \text{cte} = 5.5$ (modèle: Bender intégral)

3.1.7 Influence du D-PAPE

On l'a déjà vu, la spécificité de α -chymotrypsine vis-à-vis du L-PAPE est de pratiquement 100 %. **Dupaix et Bechet (1973)** ont reporté pour un substrat spécifique de cette enzyme, l'ester méthylique de la N-benzyloxycarbonyl phénylalanine, un rapport de $V_{\text{max}} / K_m^{\text{app}}$ environ 400'000 fois plus grand pour l'énantionère L que pour le D. Néanmoins si le D-PAPE n'est pas hydrolysé, cela ne signifie pas qu'il n'interagit pas avec l'enzyme. Vu la similitude de structure des deux énantionères, il est même probable qu'il puisse aussi s'adsorber sur le site actif, avec un effet inhibiteur de type compétitif. Cette hypothèse a été étudiée dans une série d'essais avec des mélanges racémiques et d'autres contenant diverses proportions de S_L et S_D . Ceux-ci sont présentés dans le tableau 3.6 ci-après. Pour quantifier l'effet de ce réactant supplémentaire, on a ajouté un terme d'inhibition compétitive K_{iC} au modèle précédent. L'équation de vitesse prend alors la forme présentée dans le tableau 3.2 (équation 3.64, avec $i_C = S_D$). Une fois intégrée, on

obtient une expression dont la forme générale, que l'on retrouvera souvent par la suite, est du type:

$$E_0 \cdot t = A \cdot X + B \cdot \ln(1-X) + C \cdot X^2$$

Avec les expressions suivantes pour A, B et C:

$$A = \frac{S_{L0}}{k_2} \cdot \left(1 + k \cdot K_m \cdot \left(1 + \frac{S_D}{K_{c,S}} \right) \right)$$

$$B = -\frac{K_m}{k_2} \cdot (1 + k \cdot S_{L0}) \cdot \left(1 + \frac{S_D}{K_{c,S}} \right)$$

$$C = \frac{1}{2} \cdot \frac{k}{k_2} \cdot S_{L0}^2$$

3.71

S_{L0} mmol.l ⁻¹	S_D mmol.l ⁻¹
10	10
25	25
25	50
25	75
50	50
50	100
50	150
75	75
75	125
75	175
100	100
150	150

Tableau 3.6: Concentrations initiales de S_L et S_D étudiées

On a optimisé le paramètre $K_{c,S}$, en gardant les mêmes valeurs de k et K_m que celles obtenues précédemment. k_2 a quant à lui également été laissé flottant, car il exprime l'activité de l'enzyme (ou sa concentration effective), et celle-ci est sujette à quelques variations suivant l'âge de la solution stock ou son mode de

préparation (d'autant plus que les résultats ont été obtenus sur des intervalles de temps assez longs, avec des lots d'enzyme différents). On trouve reportées dans le tableau 3.7 les valeurs optimisées (en gras) ainsi que les paramètres qu'on a gardés constants.

$k = 0.0122$	$[l \cdot \text{mmol}^{-1}]$
$K_m = 17.70$	$[\text{mmol} \cdot l^{-1}]$
$k_2 = 47.92 \pm 0.96$	$[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$
$K_{c,s} = 54.74 \pm 3.25$	$[\text{mmol} \cdot l^{-1}]$

Tableau 3.7: Estimation de la constante d'inhibition du D-PAPE

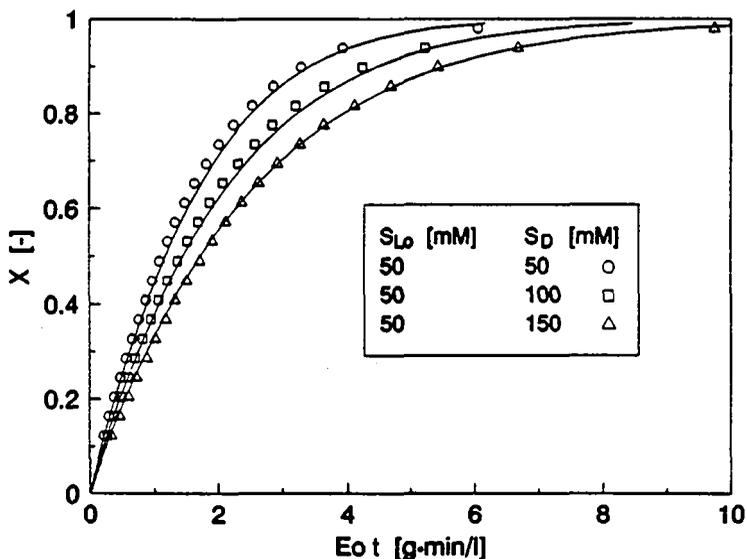


Figure 3.15: Hydrolyse en présence de D-PAPE à différentes concentrations

$T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = \text{cte} = 5.5$

Comme on peut le voir, la valeur de k_2 optimisée est nettement inférieure à celle déterminée précédemment pour l'hydrolyse du L-PAPE. Cette différence est sûrement due aux problèmes de variation de l'activité enzymatique évoqués plus haut. Les figures 3.15 et 3.16 permettent d'évaluer la concordance entre les

mesures et les courbes calculées à l'aide du modèle pour quelques-uns des essais de cette série.

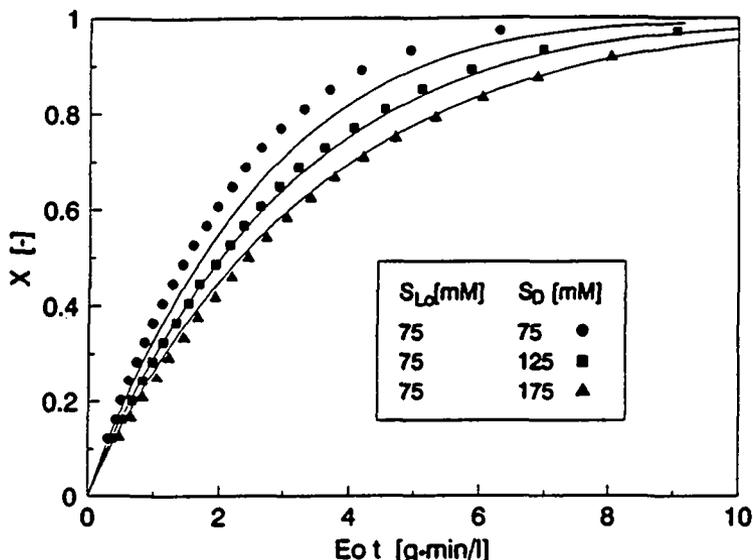


Figure 3.16: Hydrolyse en présence de D-PAPE à différentes concentrations
 $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = \text{cte} = 5.5$

3.1.8 Influence du contre-ion

Le contre-ion c_i qui accompagne le substrat est un partenaire de la réaction dont on n'a pas parlé jusqu'ici et dont l'influence n'est pas à négliger. Lugrin (1985) avait travaillé avec un ester n-propylique de phénylalanine couplé au sulfate de propyle (HPrSO_4). L'origine de sa présence est à trouver dans le mode de fabrication de l'ester, synthétisé à partir de phénylalanine et de n-propanol en excès dans H_2SO_4 concentré. Ce composé se trouve donc présent dans le milieu réactionnel en concentration constante et égale à la somme de celles du D- et du L-PAPE ($S_D + S_{L0}$).

Les résultats obtenus ont montré un fort effet inhibiteur dû au HPrSO_4 . Il est illustré à la figure 3.17 ci-après, qui montre l'évolution de la vitesse initiale de réaction en fonction de S_{L0} . C'est ce qui a justifié le rejet de ce substrat au profit du PAPE / HCl, aucun effet du HCl sur la vitesse de réaction n'ayant pu être mis en

évidence. Tous les essais autres que ceux présentés dans le tableau 3.8 ci-après ont donc été réalisés avec l'ester sous forme de chlorhydrate.

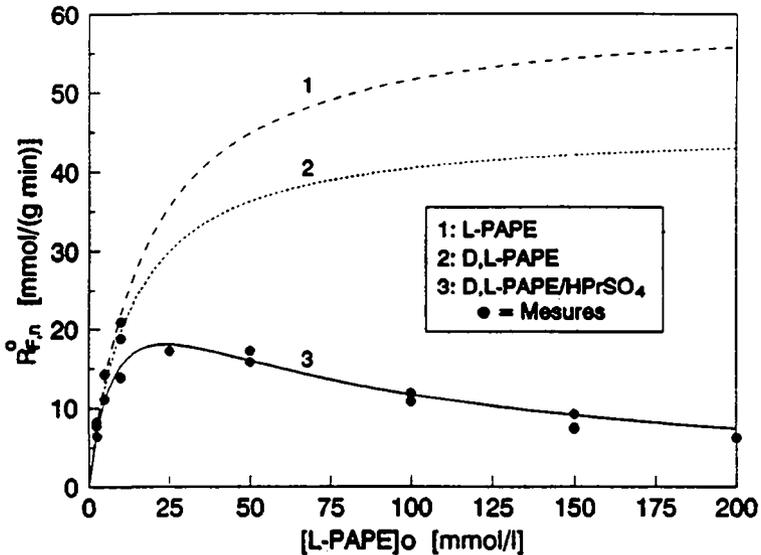


Figure 3.17: Effet du contre-ion sulfate de propyle sur la vitesse de réaction
 $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = \text{cte} = 5.5$ (modèle: HPrSO_4 non compétitif)

On a complété le modèle de base avec un terme d'inhibition mixte due au sulfate de propyle (cf figure 3.9 et tableau 3.1, équation 3.56). on a à nouveau gardé constants les paramètres cinétiques précédemment obtenus et optimisé les valeurs des constantes d'inhibition $K_{c,ci}$ et $K_{a,ci}$, ainsi que celle de k_2 qu'on a laissée flottante pour les mêmes raisons qu'avant. L'équation servant de base au modèle a le même "squelette" que la précédente, à savoir:

$$E_0 \cdot t = A \cdot X + B \cdot \ln(1-X) + C \cdot X^2$$

A, B et C ont par contre des expressions différentes et valent:

$$A = \frac{S_{L_0}}{k_2} \cdot \left(\left(1 + \frac{C_i}{K_{a,ci}} \right) \cdot k \cdot K_m \cdot \left(1 + \frac{S_D}{K_{c,S}} + \frac{C_i}{K_{c,ci}} \right) \right)$$

$$B = -\frac{K_m}{k_2} \cdot (1 + k \cdot S_{L_0}) \cdot \left(1 + \frac{S_D}{K_{c,S}} + \frac{C_i}{K_{c,ci}} \right)$$

$$C = \frac{1}{2} \cdot \frac{k}{k_2} \cdot \left(1 + \frac{C_i}{K_{a,ci}}\right) \cdot S_{Lo}^2$$

3.72

$S_{Lo} = S_D$ mmol.l ⁻¹	$C_i = 2 \cdot S_{Lo}$ mmol.l ⁻¹	E_o g.l ⁻¹
2.5	5.0	0.014
2.5	5.0	0.028
2.5	5.0	0.060
5.0	10.0	0.028
5.0	10.0	0.060
10.0	20.0	0.014
10.0	20.0	0.028
10.0	20.0	0.060
25.0	50.0	0.028
50.0	100.0	0.140
50.0	100.0	0.280
100.0	200.0	0.280
100.0	200.0	0.600
150.0	300.0	0.140
150.0	300.0	0.280
150.0	300.0	0.600
200.0	400.0	0.280
200.0	400.0	0.600

Tableau 3.8: Essais réalisés avec le D,L-PAPE / HPrSO₄

Les valeurs optimisées sont reportées dans le tableau 3.9 ci-après:

$k = 0.0122$	[l.mmol ⁻¹]
$K_m = 17.70$	[mmol.l ⁻¹]
$K_{c,S} = 54.74$	[mmol.l ⁻¹]
$k_2 = 56.90 \pm 1.39$	[mmol.g ⁻¹ .min ⁻¹]
$K_{c,ci} = 130.10 \pm 38.12$	[mmol.l ⁻¹]
$K_{a,ci} = 62.67 \pm 1.72$	[mmol.l ⁻¹]

Tableau 3.9: Estimation des constantes d'inhibition mixte de HPrSO₄

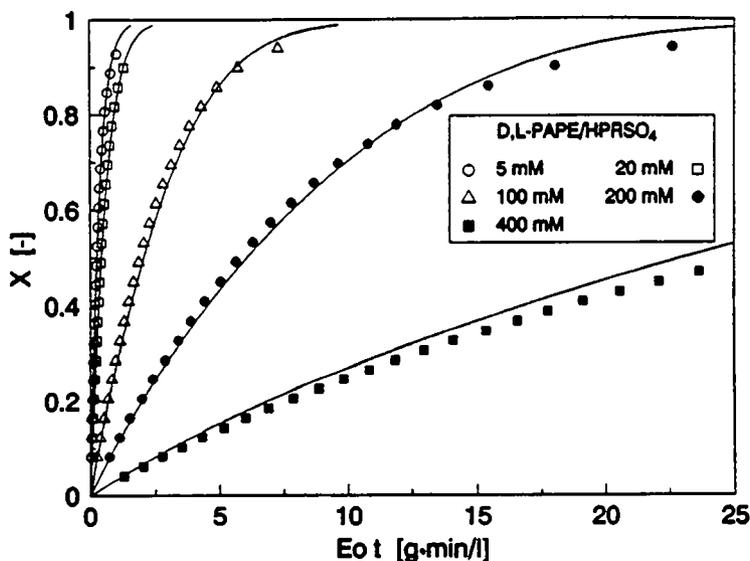


Figure 3.18: Hydrolyse du D,L-PAPE en présence du contre-ion sulfate de propyle
 $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = \text{cte} = 5.5$ (modèle: HPrSO_4 non compétitif)

Comme on le voit dans la première série de résultats, l'intervalle de confiance sur $K_{c,ci}$ est voisin de 30 %. De plus $K_{c,ci}$ et $K_{a,ci}$ sont du même ordre de grandeur, ce qui pourrait suggérer une inhibition purement non compétitive. Cela revient à poser $K_{c,ci} = K_{a,ci} = K_{n,ci}$ dans 3.72 et une fois le programme d'optimisation modifié en conséquence, procéder à une nouvelle estimation, dont le résultat est donné dans le tableau 3.10 ci-après.

$k = 0.0122$	$[\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}]$
$K_m = 17.70$	$[\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$
$K_{c,S} = 54.74$	$[\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$
$k_2 = 60.79 \pm 0.99$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$K_{n,ci} = 63.70 \pm 1.90$	$[\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$

Tableau 3.10: Inhibition non compétitive par HPrSO_4

Une partie des points expérimentaux est présentée à la figure 3.18 qui précède, en même temps que les courbes pleines correspondant au modèle d'inhibition non compétitive. Ce dernier semble tout à fait adapté à la description des mesures.

3.1.9 Influence de la L-phénylalanine, modèle global

Afin d'avoir une idée aussi complète que possible de l'influence des différents partenaires de la réaction, on a encore fait deux essais: l'un tout à fait standard ($S_{Lo} = S_D = 25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) et l'autre dans des conditions identiques, mais avec une concentration initiale en L-phénylalanine (F_o) de $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, soit quatre fois la quantité correspondant à 100 % de conversion du L-PAPE. On a pu constater un effet sur la vitesse de réaction, et on en a tenu compte dans le modèle avec l'adjonction d'une constante d'inhibition de type compétitif.

Sur la base des résultats obtenus dans ce qui précède, on a alors développé un modèle cinétique global tenant compte de concentration initiales non nulles de phénylalanine et de propanol pour l'hydrolyse du D,L-PAPE / HCl en phase aqueuse à pH constant. De plus, on a écarté les essais avec l'ester combiné au sulfate de propyle, ce substrat ne présentant plus d'intérêt pour la suite de l'étude. L'équation de vitesse s'écrit comme suit:

$$S_{Lo} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{k_2 \cdot E_o}{1 + k \cdot (P_o + S_{Lo} \cdot X)} \cdot \frac{S_{Lo} \cdot (1 - X)}{K_m \cdot \left(1 + \frac{S_D}{K_{c,S}} + \frac{F_o + S_{Lo} \cdot X}{K_{c,F}}\right) + S_{Lo} \cdot (1 - X)} \quad 3.73$$

L'expression finale qu'on a obtenue après intégration et qui a servi de base au programme d'optimisation est la suivante:

$$E_o \cdot t = A \cdot X + B \cdot \ln(1-X) + C \cdot X^2$$

Avec:

$$A = \frac{S_{Lo}}{k_2} \cdot \left[(1 + k \cdot P_o) \cdot \left(1 - \frac{K_m}{K_{c,F}}\right) - k \cdot K_m \cdot \left(1 + \frac{S_D}{K_{c,S}} + \frac{F_o + S_{Lo}}{K_{c,F}}\right) \right]$$

$$B = - \frac{K_m}{k_2} \cdot \left[(1 + k \cdot (P_o + S_{Lo})) \cdot \left(1 + \frac{S_D}{K_{c,S}} + \frac{F_o + S_{Lo}}{K_{c,F}}\right) \right]$$

$$C = \frac{k S_{L_0}^2}{2 \cdot k_2} \cdot \left(1 - \frac{K_m}{K_c \cdot F}\right)$$

3.74

Une série de 14 expériences a été réalisée avec les concentrations initiales de substrat et de phénylalanine indiquées dans le tableau 3.11.

S_{L_0} mmol.l ⁻¹	S_D mmol.l ⁻¹	F_0 mmol.l ⁻¹
20.1	10.0	20.0
20.0	10.0	100.0
20.0	205.0	60.1
20.0	400.0	20.1
20.0	400.0	100.0
110.0	10.0	60.0
110.0	205.0	20.0
110.0	205.0	60.2
110.0	205.0	100.0
110.0	400.0	60.0
200.0	10.0	100.0
200.0	205.0	60.2
200.0	400.0	20.1
200.0	400.0	100.0

Tableau 3.11: Hydrolyses avec $F_0 \neq 0$

On a cette fois-ci optimisé tous les paramètres en même temps sur l'ensemble des expériences réalisées en milieu monophasique, à pH 5.5 et 30 °C. Les valeurs des paramètres ainsi obtenus sont reportées dans le tableau 3.12, et quelques courbes (expérimentales et modélisées) présentées à la figure 3.19. On a obtenu 4 valeurs de k_2 , chacune d'entre elles correspondant à une série d'expériences:

- k_2 (1) \leftrightarrow Hydrolyse du L-PAPE (12 exp., 228 pts)
- k_2 (2) \leftrightarrow Influence du D-PAPE (12 exp., 253 pts)
- k_2 (3) \leftrightarrow Effet d'une $P_0 \neq 0$ (6 exp., 86 pts)
- k_2 (4) \leftrightarrow Essais avec diverses S_{L_0} , S_D et F_0 (14 exp., 520 pts)

Les résultats traités ici représentent un ensemble de 44 expériences totalisant 1087 points expérimentaux. On n'a cependant optimisé les paramètres que pour des taux de conversion n'excédant pas 85 %, les valeurs plus élevées étant entachées d'une erreur beaucoup plus importante, ce qui réduit le nombre de données "utiles" à 780.

$k_2 (1) = 54.84 \pm 1.41$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k_2 (2) = 49.74 \pm 1.28$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k_2 (3) = 66.04 \pm 2.28$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k_2 (4) = 47.3 \pm 1.58$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k = 0.0074 \pm 3.33\cdot 10^{-4}$	$[\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}]$
$K_m = 15.94 \pm 0.59$	$[\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$
$K_{c,S} = 36.03 \pm 1.46$	$[\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$
$K_{c,F} = 167.89 \pm 23.10$	$[\text{r}\cdot\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}]$

Tableau 3.12: Optimisation globale des paramètres du modèle

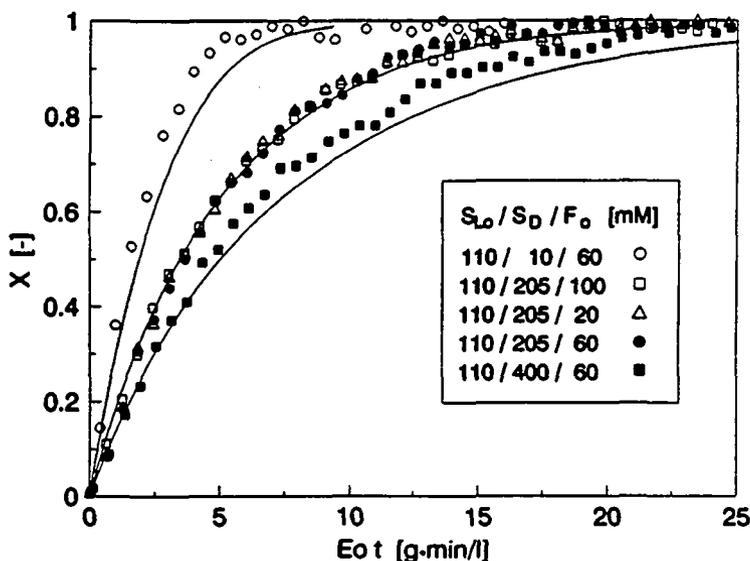


Figure 3.19: Hydrolyse du D,L-PAPE / HCl avec $F_0 \neq 0$

$T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = \text{cte} = 5.5$

L'optimisation globale entraîne quelques changements en ce qui concerne les constantes cinétiques déjà étudiées. La valeur de k retenue est plus proche de celle déterminée précédemment par régression linéaire. L'effet du propanol en tant que second nucléophile en compétition avec l'eau est donc diminué, alors que l'inhibition compétitive par le D-PAPE est renforcée ($K_{c,S}$ diminuant d'un tiers environ). K_m , quant à lui, ne change que très peu. Autre aspect important, l'effet inhibiteur de type compétitif par la phénylalanine est moins grand que prévu si on considère $K_{c,F}$, qui est presque 5 fois plus grand que $K_{c,S}$. La figure 3.19 ci-après le montre d'ailleurs de façon encore plus nette: pour une même concentration de substrat, la vitesse de réaction ne diminue qu'à cause de S_D , les trois courbes où F_0 varie (au milieu de la série) étant superposées. On devra donc reconsidérer l'effet de ce produit et s'il se révèle négligeable aux conditions expérimentales utilisées, on pourra au besoin simplifier le modèle.

Moresoli (1990) a étudié la cinétique d'un système réactionnel identique à celui-ci en utilisant le même schéma réactionnel que celui présenté à la figure 3.5 (quand le second nucléophile, à savoir le 1,4 butanediol, n'est pas présent). Comme c'est également le modèle de **Bender (1964)** avec l'acylation comme étape limitante qu'elle a choisi, la comparaison est d'autant plus raisonnable et intéressante.

Comme dans le présent travail, elle a d'abord étudié séparément l'hydrolyse du L-PAPE, l'influence de l'ester sous forme D (inhibiteur de type compétitif) et celle du propanol, avant de faire une évaluation globale des paramètres du modèle. Les valeurs des constantes cinétiques qu'elle a optimisées à partir de 314 points expérimentaux sont consignées dans le tableau 3.13 ci-dessous.

$k_2 = 52.5 \pm 0.32$	$[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$
$k = 0.00153 \pm 2.9 \cdot 10^{-5}$	$[\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1}]$
$K_m = 7.1 \pm 0.13$	$[\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}]$
$K_{c,S} = 22.0 \pm 0.44$	$[\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}]$

Tableau 3.13: Paramètres cinétiques optimisés par **Moresoli (1990)**

Les constantes ci-dessus sont proches de celles qu'on a obtenues: k_2 concorde tout à fait avec la fourchette de valeurs observées dans les différentes séries d'essais qu'on vient de décrire, tandis que les trois autres paramètres sont plus petits. La différence la plus importante est certainement celle concernant k (qui diminue d'un facteur voisin de 5), à cause de la grande influence de ce paramètre sur le déroulement de la réaction (on reviendra plus loin sur la sensibilité paramétrique du modèle). Sa valeur, optimisée à partir des courbes de **Moresoli (1990)**, est d'ailleurs très proche de celle qu'elle avait aussi déterminée par régression linéaire, alors que dans notre cas on a un facteur supérieur à 2. Son K_m est inférieur de moitié aux $16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ du tableau 3.12, mais ceci est certainement compensé (en partie du moins) par l'effet inhibiteur du D-PAPE, qui se trouve renforcé. **Moresoli (1990)** n'a pas envisagé d'influence de la phénylalanine, ce qui n'est pas gênant du tout si on considère la valeur élevée de $K_{C,F}$ reportée au tableau 3.12.

Les différences qu'on vient d'énumérer peuvent trouver leur origine dans le fait que l'on a travaillé à un pH constant de 5.5 pour les expériences décrites ici, alors que **Moresoli (1990)** l'ajustait à 6.25. Il est donc fort possible que les propriétés de l' α -chymotrypsine varient dans une mesure non négligeable sur cet intervalle de 0.75 unité. De plus, ses optimisations portaient sur des courbes d'hydrolyse où le taux de conversion ne dépassait jamais 0.5, restant même parfois en dessous de 0.3. Les valeurs du tableau 3.12 tiennent quant à elles compte de valeurs de X allant jusqu'à 0.85. C'est notamment vers ces valeurs que des paramètres comme k ont le plus d'influence, car la concentration de propanol y est beaucoup plus importante qu'au début de la réaction. Pour conclure, le nombre d'expériences de chaque série et leurs poids respectifs jouent encore certainement un rôle loin d'être négligeable.

3.2 HYDROLYSES EN SYSTEME BIPHASIQUE A pH CONSTANT

3.2.1 Partie expérimentale

Les hydrolyses en présence de la phase organique ont été réalisées avec la même installation que celle décrite au chapitre 3.1, à savoir la cuve de titration agitée magnétiquement et thermostatée à 30 °C. Le pH de consigne auquel on a travaillé est également le même qu'avant, à savoir 5.5.

Un volume connu de substrat en solution aqueuse était introduit dans la cuve et mis en contact avec le volume désiré de phase organique. Le mélange était placé sous agitation vigoureuse afin de faciliter la dispersion du MIBK dans la phase aqueuse et d'accélérer l'équilibre de la température. Une fois celui-ci atteint, le pH était ajusté à 5.5 à l'aide de NaOH 1N. Les adjonctions étaient suffisamment espacées pour permettre aux concentrations de s'équilibrer, et donc à la lecture du pH de se stabiliser. Une fois toutes les valeurs de consigne atteintes, 1 ml d'une solution de l'enzyme était ajouté à la dispersion et la régulation du pH était alors mise en route. On notera encore que chacune des phases était saturée par l'autre, afin d'éviter lors du mélange tout problème dû à leur miscibilité partielle, surtout aux faibles valeurs de v_{or} .

3.2.2 Fraction titrable en système biphasique

Comme au sous-chapitre 3.1 précédent, les concentrations initiales de substrat et d'enzyme étaient calculées pour tenir compte de la dilution provoquées par l'adjonction du catalyseur. Dans le même ordre d'idées on doit également, dans ces expériences avec régulation de pH, tenir compte de la fraction titrable pour calculer le taux de conversion à partir du volume de NaOH consommé; c'est d'autant plus important que le phénomène de partage vient compliquer la situation. Le raisonnement ne change pas quant à la définition de f_t , elle reste identique à l'expression 3.1, à savoir:

$$f_t = x_S^c + x_F^b - x_F^a$$

Si ces trois grandeurs varient toutes en fonction du pH, il n'y a par contre que x_S^c qui dépend de v_{aq} , comme on l'a vu au chapitre 2; x_F^b et x_F^a restent inchangées, vu que la phénylalanine se trouve exclusivement en phase aqueuse. L'influence de l'équilibre acide-base du groupe carboxylique de la phénylalanine n'est

cependant pas très grande dans le domaine de pH où on travaille, comme le montrait déjà la figure 3.1 au début de ce chapitre.

Le substrat sous forme acide (chargée) n'étant pas soluble dans la phase organique, sa fraction massique dans le système vaut, par définition et par analogie avec l'équation 2.35:

$$x_{S, \text{aq}}^c = \frac{m_{S, \text{aq}}^c}{m_{S, \text{tot}}} = \frac{S_{\text{aq}}^c \cdot V_{\text{aq}}}{(S_{\text{aq}}^c + S_{\text{aq}}^n) \cdot V_{\text{aq}} + S_{\text{or}} \cdot V_{\text{or}}} \quad 3.75$$

Les équations développées lors de l'étude du partage biphasique du substrat (sous-chapitre 2.3.7) avaient mené aux expressions suivantes:

$$S_{\text{aq}}^c = 10^{(\text{p}K_a(\text{S}) - \text{pH})} \cdot S_{\text{aq}}^n \quad 2.7$$

$$S_{\text{or}}^n = P_c(\text{S}) \cdot S_{\text{aq}}^n \quad 2.8$$

D'où, après combinaison avec 3.75 et en introduisant encore v_{aq} :

$$x_{S, \text{aq}}^c = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a(\text{S}))} \cdot \left(1 + P_c(\text{S}) \cdot \frac{1 - v_{\text{aq}}}{v_{\text{aq}}}\right)} \quad 3.76$$

L'expression complète de f_t en fonction de la fraction volumique aqueuse et du pH est donc:

$$f_t = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a(\text{S}))} \cdot \left(1 + P_c(\text{S}) \cdot \frac{1 - v_{\text{aq}}}{v_{\text{aq}}}\right)} + \frac{1}{1 + 10^{(\text{p}K_a(\text{F}, \text{NH}_2) - \text{pH})}} \cdot \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a(\text{F}, \text{COOH}))}} \quad 3.77$$

L'équation 3.65 est illustrée à la figure 3.20 ci-après, pour un $P_c(\text{S})$ de 123 et un $\text{p}K_a(\text{S}) = 7.06$. Les valeurs de $\text{p}K_a(\text{F}, \text{NH}_2)$ et $\text{p}K_a(\text{F}, \text{COOH})$ pour la phénylalanine ont été tirées du tableau 1.2 et valent 9.13 et 1.83 respectivement. A nouveau, on constate la faible influence de l'équilibre acide-base du groupe carboxylique de la phénylalanine dans le domaine de pH où on travaille ($\text{pH} > 3$). La relation entre le taux de conversion et le volume de base reste elle aussi la même, elle est donnée par l'équation 3.7:

$$X = \frac{1}{f_t} \cdot \frac{2 m_B}{S_o \cdot V_{aq}}$$

3.7

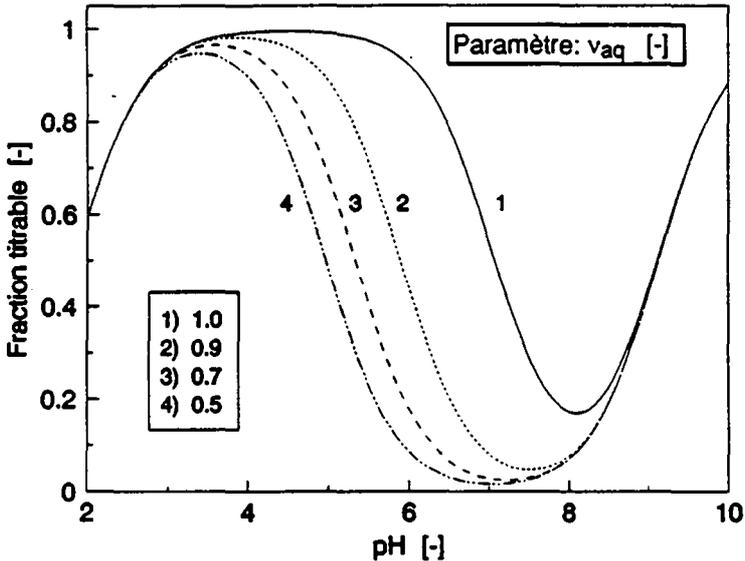


Figure 3.20: Fraction titrable en système biphasique pour différents v_{aq}

3.2.3 Adaptation du modèle cinétique

La modélisation de la réaction en système biphasique à pH constant repose sur les hypothèses préliminaires suivantes:

1) La réaction n'a lieu qu'en phase aqueuse, vu que l'enzyme y est confinée (elle n'est pas soluble dans la phase organique).

2) La L-phénylalanine reste aussi exclusivement en phase aqueuse, du fait des charges qu'elle porte en permanence. Le D,L-PAPE et le n-propanol, quant à eux, se distribuent entre les phases de la façon présentée dans le chapitre précédent.

3) Le modèle cinétique développé dans le sous-chapitre précédent pour la réaction en système monophasique aqueux reste donc valable.

4) Sur la base de ce qui précède, seul l'effet du partage biphasique sur les concentrations des réactants et par conséquent sur les propriétés acide-base du système sera à prendre en considération. On gardera cependant à l'esprit que si le modèle tient compte de la distribution des partenaires, il suppose par contre l'équilibre des concentrations à chaque instant. Ceci peut devenir gênant en cas de problèmes liés au transfert de matière entre les phases.

Une réserve supplémentaire à l'hypothèse 4 doit être apportée, dans le sens où on peut encore avoir un effet inhibiteur, voire dénaturant, de la phase organique sur l'enzyme. En effet, comme on l'a vu précédemment, le MIBK est soluble dans l'eau à raison de 1,7 % à 20 °C, ce qui n'est pas négligeable et représente une concentration de l'ordre de 170 mmol.l⁻¹.

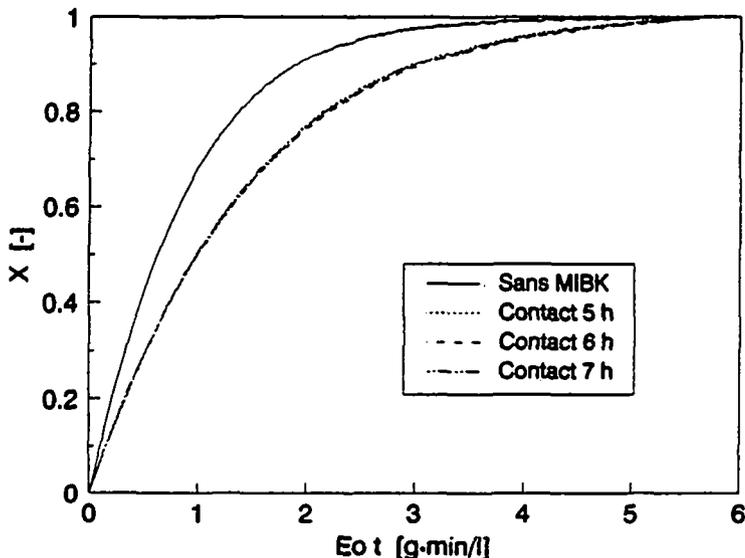


Figure 3.21: Effet du MIBK sur l'activité de l'enzyme

$$S_{L0} = S_D = 50 \text{ mmol.l}^{-1}, E_0 = 0.05 \text{ g.l}^{-1}, T = 30 \text{ }^\circ\text{C}, \text{pH} = \text{cte} = 5.5$$

Margot (1987) n'avait pas observé d'effet sensible des solvants étudiés sur l'activité de l'enzyme. Cependant, cette dernière n'entrait en contact avec la phase organique que lors de son adjonction dans le réacteur. Afin d'étudier l'influence d'un contact prolongé entre les deux, on a utilisé de l'eau saturée en MIBK pour préparer les solutions d'enzyme et de substrat. La même hydrolyse a

été réalisée plusieurs fois, la première en l'absence totale de solvant dans le système, et les autres à différentes valeurs du temps de contact entre le catalyseur et la phase organique. Les résultats obtenus sont reportés à la figure 3.21 ci-avant, en même temps que les conditions de réaction. On peut constater une diminution assez importante de la vitesse de réaction dès les premiers instants du contact, effet qui ne semble pas s'aggraver au cours du temps, les courbes suivantes étant pratiquement superposées. C'est pourquoi on penserait plutôt à un effet inhibiteur qu'à une dénaturation. On a donc complété le modèle pour un milieu aqueux saturé en solvant en y ajoutant une inhibition mixte par le MIBK. Comme la concentration du solvant dans l'eau ne varie pas avec le taux de conversion et reste égale à la concentration de saturation, cette dernière et les constantes d'inhibition ont donc été chaque fois condensées en un seul terme, à savoir $1/K_{c\phi}$ et $1/K_{a\phi}$.

L'équation de vitesse pour un système monophasique aqueux saturé en MIBK devient donc:

$$S_{L_0} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{k_2 \cdot E_0 \cdot S_{L_0} \cdot (1 - X)}{1 + k_i(P_0 + S_{L_0} \cdot X) \left[K_m \left(1 + \frac{S_D}{K_{CS}} + \frac{F_0 + S_{L_0} \cdot X}{K_{CF}} + \frac{1}{K_{c\phi}} \right) + S_{L_0} \cdot (1 - X) \left(1 + \frac{1}{K_{a\phi}} \right) \right]}$$

3.78

L'adaptation du modèle à la réaction en système biphasique à pH constant est simple et découle des hypothèses déjà évoquées: il suffit de remplacer la concentration de chaque espèce dans l'équation 3.78 par sa valeur en phase aqueuse une fois le partage biphasique accompli. Cette valeur dépendra donc, comme on l'a vu au chapitre 2, du coefficient de partage de la substance, du taux de conversion, du pH et de la fraction volumique aqueuse v_{aq} . On développera ci-dessous les expressions pour chaque espèce, non sans avoir précisé que les concentrations initiales indiquées le sont toutes par rapport au volume de la phase aqueuse uniquement.

Concentration de substrat en phase aqueuse:

Comme on l'a vu lors de l'étude du partage biphasique, la concentration de L-PAPE en phase aqueuse est égale à sa concentration totale $S_{L_{tot}}$ multipliée par la valeur de $x_{S,aq}$ au pH et à la fraction volumique aqueuse du système, que l'on a définie au chapitre 2. Cette relation se traduit par:

$$S_{L,aq} = S_{L,tot} \cdot X_{S,aq} \quad 3.79$$

Si de plus on introduit le taux de conversion, on arrive à :

$$S_{L,aq} = S_{L,o} \cdot (1 - X) \cdot X_{S,aq} \quad 3.80$$

Avec dans les deux expressions (équation 2.38):

$$X_{S,aq} = \frac{1}{1 + \frac{P_c(S)}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}} \quad 2.38$$

L'expression pour le D-PAPE est identique à l'équation 3.76. En effet, comme ce composé n'est pas transformé, il suffit de remplacer $S_{L,tot}$ par $S_{D,tot}$. Du fait que l'on ne travaille pas forcément avec un mélange racémique, on a préféré ne pas supposer a priori $S_{L,o} = S_{D,tot}$.

Concentration de n-propanol en phase aqueuse:

La définition du coefficient de partage du n-propanol (équation 2.39) nous permet d'écrire, si on tient compte du taux de conversion et d'une éventuelle concentration initiale non nulle de ce composé :

$$P_{aq} = P_{tot} \cdot X_{P,aq} = (P_o + S_{L,o} \cdot X) \cdot X_{P,aq} \quad 3.81$$

Avec:

$$X_{P,aq} = \frac{1}{1 + P_c(P) \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}} \quad 3.82$$

Concentration de L-phénylalanine en phase aqueuse:

Ce produit restant uniquement en phase aqueuse ($X_{F,aq} = 1$), on a simplement:

$$F_{aq} = F_{tot} = F_o + S_{L,o} \cdot X \quad 3.83$$

On arrive finalement à l'équation de vitesse suivante:

$$S_{L0} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{k_2 \cdot E_0}{1 + k \cdot P_{aq}} \cdot \frac{S_{L,aq}}{K_m \cdot \left(1 + \frac{S_{D,aq}}{K_{c,S}} + \frac{F_{aq}}{K_{c,F}} + \frac{1}{K_{c,\phi}}\right) + S_{L,aq} \cdot \left(1 + \frac{1}{K_{a,\phi}}\right)} \quad 3.84$$

On peut ensuite remplacer $S_{L,aq}$, $S_{D,aq}$, P_{aq} et F_{aq} par les fonctions du taux de conversion et des caractéristiques du système qui leur correspondent (équations 3.77 et suivantes). Pour faciliter l'intégration et alléger la notation on a restructuré l'expression 3.84, qui devient ainsi (après simplification à droite et à gauche par S_{L0} et division en haut et en bas par $x_{aq,S} \cdot (1 - X)$):

$$\frac{dX}{dt} = \frac{k_2 \cdot E_0}{\left(1 + k \cdot x_{P,aq} \cdot (P_0 + S_{L0} \cdot X)\right) \left[\frac{K_m}{x_{S,aq} \cdot (1 - X)} \cdot \left(C_C + \frac{S_{L0}}{K_{c,F}} \cdot X\right) + S_{L0} \cdot A_C \right]} \quad 3.85$$

On trouve dans l'expression 3.85:

a) un " groupe compétitif " indépendant du taux de conversion (C_C) qui multiplie le terme en K_m et qui vaut:

$$C_C = 1 + \frac{S_D \cdot x_{S,aq}}{K_{c,S}} + \frac{F_0}{K_{c,F}} + \frac{1}{K_{c,\phi}} \quad 3.86$$

b) Un " groupe anticompetitif " indépendant de la conversion (A_C) qui affecte S_{L0} dans le dénominateur:

$$A_C = 1 + \frac{1}{K_{a,\phi}} \quad 3.87$$

Une fois ces définitions posées, on sépare les variables et on intègre de la même manière que précédemment, avec pour résultat une équation de la forme:

$$E_0 \cdot t = A \cdot X + B \cdot \ln(1-X) + C \cdot X^2$$

Avec:

$$A = \frac{S_{L0}}{k_2} \cdot \left[\left(1 + k \cdot x_{P,aq} \cdot P_0\right) \cdot \left(A_C \cdot \frac{K_m}{x_{S,aq} \cdot K_{c,F}}\right) \cdot \frac{k \cdot K_m \cdot x_{P,aq}}{x_{S,aq}} \cdot \left(\frac{S_{L0}}{K_{c,F}} + C_C\right) \right]$$

$$B = \frac{K_m}{k_2 \cdot x_{S, aq}} \cdot \left[\left(\frac{S_{L,0}}{K_{c,F}} + C_C \right) \cdot (1 + k \cdot x_{P, aq} \cdot (P_0 + S_{L,0})) \right]$$

$$C = \frac{k \cdot S_{L,0}^2 \cdot x_{P, aq}}{2 \cdot k_2} \left[A_C - \frac{K_m}{x_{S, aq} \cdot K_{c,F}} \right]$$

3.88

$S_{L,0}$ mmol·l ⁻¹	S_D mmol·l ⁻¹	v_{aq} [-]
5.0	5.0	1.0
5.0	5.0	0.9
5.0	5.0	0.7
5.0	5.0	0.5
10.0	10.0	1.0
10.0	10.0	0.9
10.0	10.0	0.7
10.0	10.0	0.5
17.5	17.5	1.0
17.5	17.5	0.9
17.5	17.5	0.7
17.5	17.5	0.5
25.1	25.1	1.0
25.0	25.0	0.9
25.0	25.0	0.7
25.0	25.0	0.5
50.0	50.0	1.0
50.0	50.0	0.9
50.0	50.0	0.7
50.0	50.0	0.5
100.0	100.0	1.0
100.0	100.0	0.5

Tableau 3.14: Essais en système biphasique à pH constant

3.2.4 Résultats

L'équation 3.88 a servi de base à un programme FORTRAN d'optimisation de paramètres selon l'algorithme de Gauss-Newton. Celui-ci a permis l'estimation des constantes cinétiques pour une série de 66 hydrolyses à pH constant, en systèmes mono- et biphasique, totalisant 1547 couples de valeurs (X , $E_0 \cdot t$). On n'indique ici que les conditions expérimentales des hydrolyses en système biphasique (tableau 3.14 ci-avant). On y a fait varier la fraction volumique de phase organique pour chaque concentration de substrat, afin de visualiser l'effet du partage des réactants sur le déroulement de la réaction. La description de toute la série (systèmes mono- et biphasique) est cependant donnée dans les annexes.

On a donc optimisé les paramètres cinétiques de l'équation 3.88 en attribuant une valeur de k_2 à chacune des cinq séries d'essais, pour les raisons déjà plusieurs fois évoquées. Une première estimation ayant mené à une valeur élevée et peu "sûre" de $K_{a,\phi}$ par rapport à $K_{c,\phi}$, on a simplifié le modèle en ne gardant que la partie compétitive de l'inhibition par le solvant organique. On a de plus laissé flotter la valeur du coefficient de partage du PAPE. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 3.15 ci-après. Les différents k_2 se rapportent aux mêmes séries d'expériences que dans le tableau 3.12; la constante $k_2(5)$, quant à elle, correspond aux essais en système biphasique à pH constant présentés dans le tableau 3.14 qui précède.

$k_2(1) = 56.11 \pm 1.37$	$[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$
$k_2(2) = 51.50 \pm 1.24$	$[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$
$k_2(3) = 68.71 \pm 2.21$	$[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$
$k_2(4) = 49.81 \pm 1.53$	$[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$
$k_2(5) = 44.91 \pm 1.55$	$[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$
$k = 0.00766 \pm 3.14 \cdot 10^{-4}$	$[\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1}]$
$K_m = 16.41 \pm 0.57$	$[\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}]$
$K_{c,S} = 35.16 \pm 1.31$	$[\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}]$
$K_{c,F} = 141.39 \pm 16.06$	$[\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}]$
$K_{c,\phi} = 1.46 \pm 0.20$	$[-]$
$P_c(S) = 192.7 \pm 6.6$	$[-]$

Tableau 3.15: Valeurs des paramètres pour les 66 essais à pH constant

Si on compare les tableaux 3.12 et 3.15, l'adjonction de la série d'essais en système biphasique n'entraîne pas de grand changement dans les valeurs des paramètres déjà évalués précédemment. C'est la constante d'inhibition compétitive par la phénylalanine qui change le plus, mais qui reste cependant quatre fois plus importante que $K_{c,S}$. De son côté, $K_{c,\phi}$ est très faible mais elle correspond au quotient de la concentration de MIBK en phase aqueuse et de la constante d'inhibition proprement dite. C'est aussi la raison pour laquelle elle n'a pas d'unité. Cette concentration ne variant pas au cours du temps et valant à peu près $170 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, on arrive à une constante d'équilibre de l'ordre de $115 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. La valeur optimisée du coefficient de partage est plus élevée d'un facteur 1.5 environ que celle déterminée expérimentalement (on passe de 123 à 193). La différence est assez importante, mais il faut se rendre compte que ce paramètre n'intervient que dans le calcul de $x_{S,aq}$, qui s'exprime selon:

$$x_{S,aq} = \frac{1}{1 + \frac{P_c(S)}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}} \quad 2.38$$

On le voit, $x_{S,aq}$ est beaucoup plus sensible aux erreurs sur $(pH - pK_a)$, qui est une puissance de 10, et à celles sur v_{aq} (qui ont d'autant plus d'importance que la fraction volumique aqueuse diminue), qu'aux fluctuations du coefficient de partage. Le $P_c(S)$ ainsi calculé compense donc à lui seul toutes ces influences.

$k_2 (1) = 55.87 \pm 1.40$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k_2 (2) = 49.18 \pm 1.12$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k_2 (3) = 67.46 \pm 2.21$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k_2 (4) = 44.75 \pm 1.18$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k_2 (5) = 49.51 \pm 1.83$	$[\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$
$k = 0.00815 \pm 3.54\cdot 10^{-4}$	$[\text{l}\cdot\text{mmol}^{-1}]$
$K_m = 16.86 \pm 0.62$	$[\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$
$K_{c,S} = 39.76 \pm 1.50$	$[\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$
$K_{c,\phi} = 0.70 \pm 0.06$	$[-]$

Tableau 3.16: Modélisation des 66 essais à pH constant
 $P_c(S) = 123$, pas d'influence de la phénylalanine

Cependant, la valeur de $P_c(S)$ mesurée précédemment paraissant plus digne de confiance, on a procédé à une nouvelle optimisation basée exactement sur le même modèle, mais avec le coefficient de partage fixé à 123. Comme de plus l'effet inhibiteur de la phénylalanine est fortement sujet à caution, on a également simplifié le modèle en supprimant le terme en $K_{c,F}$. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.16 ci-avant.

Comme on peut le voir, la simplification du modèle ne porte pas préjudice à la qualité de la description des points expérimentaux. Les valeurs des constantes cinétiques restent très proches de celles obtenues précédemment, avec un intervalle de confiance tout à fait comparable. On négligera donc à l'avenir l'influence de la phénylalanine, qui avait manifestement été surévaluée. La concordance entre le modèle et les points mesurés pour deux séries d'hydrolyses en système biphasique peut être évaluée sur les figures 3.22 et 3.23 ci-après.

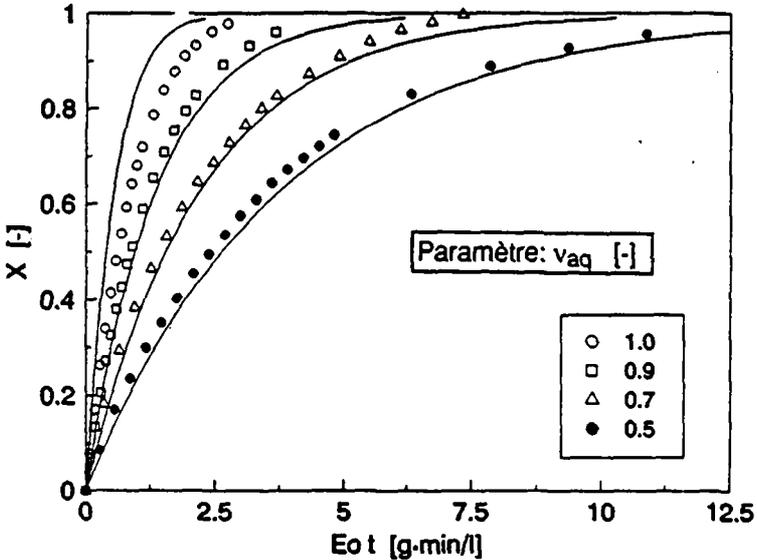


Figure 3.22: Hydrolyses à pH constant en système biphasique
 $S_{L0} = S_D = 10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = \text{cte} = 5.5$

L'effet du partage biphasique sur la concentration de substrat en phase aqueuse est bien pris en compte, avec comme conséquence une diminution de la vitesse de réaction quand on augmente v_{or} pour une même S_{L0} . On dispose donc

maintenant d'un outil suffisamment performant pour prédire l'évolution du taux de conversion en fonction des caractéristiques physico-chimiques du système (mono- ou biphasique) et des concentrations des divers participants. Cette information va pouvoir être utilisée par la suite pour la conception d'un réacteur destiné à l'hydrolyse en continu. Mais auparavant, on a également besoin de connaître le comportement du système à pH flottant, une régulation n'étant plus envisageable dans ce type d'opération.

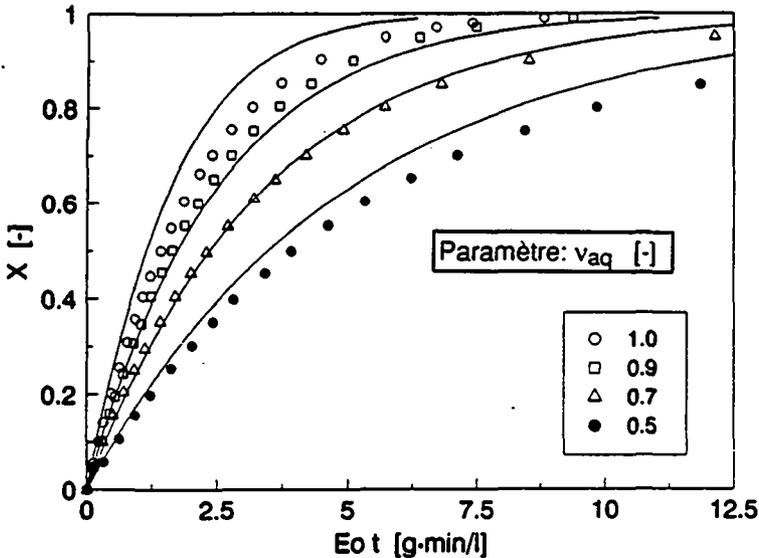


Figure 3.23: Hydrolyses à pH constant en système biphasique
 $S_{L0} = S_D = 50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = \text{cte} = 5.5$

3.2.5 Sensibilité paramétrique du modèle

La démarche suivie pour l'estimation des constantes cinétiques mérite quelques commentaires. On a procédé d'abord par étapes, en augmentant graduellement la complexité du système réactionnel, et en gardant constantes les valeurs optimisées lors de la série précédente. Ceci permet d'avoir rapidement une idée de l'ordre de grandeur du paramètre étudié, mais fait aussi perdre une certaine quantité d'informations qu'on " masque " derrière les variables fixées, et dont le programme ne peut tenir compte qu'en jouant sur celles qu'il optimise.

C'est pourquoi il est de loin préférable, une fois qu'on a pu opter pour un modèle, de lui faire optimiser toute la série des paramètres sur l'ensemble des valeurs expérimentales. On a pu constater dans notre cas que cela n'entraînait pas de bouleversement important, sauf peut-être pour la valeur de $K_{c,S}$, qui était passée de 55 à 36 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Cet exemple illustre bien ce qu'on vient de dire, dans le sens où le D-PAPE est présent dans presque toutes les séries d'expériences effectuées et qu'il ne serait pas logique de n'en tenir compte que dans celle effectuée pour évaluer son influence sur le déroulement de la réaction.

Pour pouvoir rendre aux variations enregistrées leur poids réel, on a tenté d'évaluer grossièrement la sensibilité du modèle par rapport aux paramètres, c.-à-d. sa dérivée partielle vis-à-vis de chacun d'eux. Dans ce but, on a calculé le temps nécessaire à l'obtention d'un taux de conversion donné ($E_{0t}(X=50\%) = 2.08842 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$), et étudié les changements absolu et relatif de E_{0t} causés par une variation de $\pm 1\%$ de chaque paramètre autour de sa valeur. Les résultats de ces calculs sont reportés dans le tableau 3.17 ci-après (pour les unités, se référer à la liste des symboles).

P(l)	Valeur	$E_{0t}(+\Delta P)$	$E_{0t}(-\Delta P)$	$\Delta E_{0t}/2\Delta P(l)$	$\Delta E_{0t_{rel}}/0.02$
pH	5.5	2.04739	2.13945	-0.8369	-2.2041
$pK_a(S)$	7.06	2.04704	2.13668	-0.6348	-2.1461
$P_c(S)$	123	2.09124	2.0856	+0.00226	+0.1350
$P_c(P)$	1.26	2.08764	2.08921	-0.0628	-0.0376
v_{aq}	0.90	2.06824	2.10899	-2.2639	-0.9756
K_m	17.0	2.10273	2.07412	+0.0842	+0.6850
k	0.008	2.09486	2.08198	+80.500	+0.3084
k_2	55.0	2.06774	2.10952	-0.0380	-1.0003
$K_{c,S}$	40.0	2.08456	2.09236	-0.0098	-0.1867
$K_{c,\phi}$	0.7	2.08236	2.09460	-0.8743	-0.2930

Tableau 3.17: Dérivées estimées du modèle par rapport aux paramètres

Les valeurs ci-dessus montrent qu'en ce qui concerne les changements absolus (avant-dernière colonne), c'est incontestablement k qui a le plus de poids à cause de sa valeur très faible. La comparaison des variations relatives souligne par contre l'influence notable du pH (du pK_a), de k_2 , v_{aq} et K_m . P_c n'a par contre, comme on avait déjà pu le constater, qu'un effet très limité, qui justifie le fait qu'on ait préféré abandonner la valeur optimisée au profit de celle mesurée.

3.3 HYDROLYSES EN SYSTEME BIPHASIQUE A pH FLOTTANT

Ces expériences réalisées principalement par de Riedmatten (1986) lors de son travail de diplôme avaient pour but premier de tester la validité de la méthode proposée, à savoir la possibilité d'hydrolyser le PAPE sans que le pH du milieu chute assez pour porter préjudice à l'activité de l'enzyme, et ce grâce à l'adjonction d'un solvant organique au système réactionnel. Dans un deuxième temps, il s'agissait également d'optimiser les conditions expérimentales, à savoir le pH initial, ainsi que les concentrations et la fraction volumique de chacune des phases. Un dernier aspect qui a été abordé lors de cette étape est le développement d'un modèle destiné à décrire l'évolution du pH en fonction du taux de conversion et des conditions initiales décrites ci-dessus. En effet, la connaissance à tout instant de la valeur de X correspondant au pH mesuré permettrait un accès beaucoup plus rapide à la cinétique de la réaction.

3.3.1 Partie expérimentale

Les essais en réacteur fermé présentés ici ont tous été réalisés dans la cuve de titration thermostatée à 30 °C, mais cette fois sans régulation de pH. Les volumes respectifs de chacune des deux phases (solution aqueuse de substrat et MIBK) étaient introduits dans le réacteur et mis en contact aussi intime que possible sous agitation vigoureuse. Une fois la température de consigne atteinte, on ajoutait du NaOH 5N pour ajuster le pH à la valeur initiale désirée et, une fois celle-ci obtenue, on lançait la réaction en injectant dans la cuve 1 ml d'enzyme en solution aqueuse. Comme on l'a déjà dit, chacune des phases était déjà saturée par l'autre avant le mélange, et les solutions aqueuses contenaient toutes du CaCl_2 à raison de $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Le pH étant cette fois laissé flottant, le dosage de la L-phénylalanine par titrimétrie n'était plus possible; c'est pourquoi les analyses servant à la détermination du taux de conversion étaient faites par HPLC selon le mode opératoire décrit au début du chapitre 2. On pouvait par contre mesurer en ligne sur un enregistreur l'évolution du pH au cours du temps.

3.3.2 Théorie

Si la situation se complique quand on aborde la réaction d'hydrolyse à pH flottant dans le système biphasique, c'est principalement à cause du fait que les

caractéristiques acide-base du système, l'activité de l'enzyme et l'équilibre de partage du substrat changent quand le pH varie, comme c'est le cas au fur et à mesure de l'avancement de la réaction. On progressera donc pas à pas dans la modélisation de la réaction à pH flottant, en commençant par considérer l'évolution du pH en fonction du taux de conversion seul et en négligeant le facteur temps. Cette façon de procéder permet de ne pas avoir à tenir compte (pour le moment) de la vitesse d'évolution du taux de conversion, autrement dit de la cinétique. Cette première étape se résume donc à calculer le pH d'un milieu en fonction de la concentration des diverses espèces qu'il contient et/ou qui y sont formées.

La structure du raisonnement est la suivante: la réaction produit de la phénylalanine, qui libère des protons dans le milieu, provoquant une baisse du pH; les deux processus (conversion du substrat et baisse du pH) ont de plus en plus une influence sur l'équilibre de partage des substances entre les phases. Tous ces phénomènes sont donc liés de façon très étroite, comme on va le voir dans ce qui suit.

On l'a déjà vu précédemment, les protons (H^+) ne sont pas libérés dans le milieu équimolairement par rapport à la phénylalanine; les deux quantités sont reliées par la fraction titrable de la façon suivante:

$$dH^+ = S_{Lo} \cdot f_t \cdot dX \quad 3.89$$

La fraction titrable en système biphasique a déjà été définie, et vaut:

$$f_t = \frac{1}{1+10^{(pH - pK_a(S))} \cdot \left(1 + P_c(S) \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}\right)} + \frac{1}{1+10^{(pK_a(F, NH_2) - pH)}} \cdot \frac{1}{1+10^{(pH - pK_a(F, COOH))}} \quad 3.77$$

Le paramètre qui régit quant à lui le changement de pH par rapport à la quantité de protons générée ou introduite dans le milieu est le pouvoir tampon β , que l'on définit comme:

$$\beta = - \frac{dH^+}{dpH} = \ln(10) \cdot \left(H^+ + OH^- + \sum_{i=1}^n C_{i,tot} \cdot x_{i,tot}^{acid} \cdot x_{i,tot}^{bas} \right) \quad 3.90$$

Si on titre un composé en solution aqueuse avec un acide fort, le pouvoir tampon β est égal à l'opposé de l'inverse de la pente de la courbe, et il est maximal

quand le pH est égal au pK de la substance. On a ajouté intentionnellement l'indice "tot" aux fractions x_i des composés car dans le système biphasique on considère la quantité totale existant sous forme acide ou basique, ce qui inclut donc la masse contenue dans la phase organique. $C_{i,tot}$ représente quant à lui la quantité totale de l'espèce i présente dans le système divisée par le volume de la phase aqueuse, autrement dit la concentration qu'elle aurait dans celle-ci au taux de conversion du moment si son coefficient de partage était nul.

La combinaison des équations 3.89 et 3.90 mène rapidement à l'expression différentielle cherchée:

$$\frac{dpH}{dX} = -\frac{1}{\beta} \cdot S_{Lo} \cdot f_i \quad 3.91$$

f_i étant connue, on va donc s'attacher à définir le pouvoir tampon dans le système biphasique $H_2O / MIBK$, en calculant pour chaque composé les concentrations globales ($C_{i,tot}$) et les fractions massiques ($x_{i,tot}$). On précisera encore que le calcul est basé sur un équilibre spontané des concentrations entre les phases et sur une conversion directe des formes basiques en formes acides par l'action des protons. On rappellera pour finir que toutes les concentrations initiales (S_{Lo} , S_D , F_0) sont définies par rapport au volume de la phase aqueuse uniquement.

Concentration globale de substrat

Dans le cas du D-PAPE qui n'est pas converti, celle-ci est constante et vaut:

$$S_{D,tot} = S_D \quad 3.92$$

Dans le cas du L-PAPE, on a par contre:

$$S_{L,tot} = S_{Lo} \cdot (1 - X) \quad 3.93$$

Fractions du substrat sous formes acide (chargée) et basique (neutre)

Les équations déjà développées dans le chapitre 2 lors de l'étude du phénomène de partage donnaient:

$$x_{S, aq}^c = x_{S, tot}^{acd} = 10^{(pK_a(S) - pH)} \cdot x_{S, aq}^b \quad 2.7$$

ainsi que:

$$x_{S, or}^b = P_c(S) \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}} \cdot x_{S, aq}^b \quad 2.8$$

On remarquera que comme le substrat chargé (acide) n'est pas soluble en phase organique, on a:

$$x_{S, aq}^c = x_{S, tot}^{acd} \quad 3.94$$

La fraction massique acide de PAPE vaut alors:

$$x_{S, tot}^{acd} = \frac{10^{(pK_a(S) - pH)}}{1 + 10^{(pK_a(S) - pH)} + P_c(S) \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}} \quad 3.95$$

La fraction massique totale de PAPE sous forme basique vaut donc logiquement:

$$x_{S, tot}^{bas} = 1 - x_{S, tot}^{acd} = \frac{1 + P_c(S) \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}}{1 + 10^{(pK_a(S) - pH)} + P_c(S) \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}} \quad 3.96$$

Finalement, et comme les deux énantiomères du PAPE ont le même comportement acide-base, on trouve pour la contribution de l'ester au pouvoir tampon du système:

$$\beta(S) = (S_D + S_{Lo} \cdot (1 - X)) \cdot x_{S, tot}^{acd} \cdot x_{S, tot}^{bas} \quad 3.97$$

Cas du n-propanol

La participation du n-propanol aux propriétés acide-base du système peuvent être considérées comme totalement négligeables, vu le très faible degré de dissociation du groupement hydroxyle dans la série des n-alcanols. On n'aura donc pas à tenir compte de ce composé dans le calcul du pouvoir tampon.

Concentration globale de phénylalanine

Elle évolue en parallèle avec la conversion du substrat, ce qui donne, dans le cas où sa concentration initiale n'est pas nulle:

$$F_{L,tot} = F_{Lo} + S_{Lo} \cdot X \quad 3.98$$

En ce qui concerne les propriétés acide-base de l'acide aminé, il faut garder à l'esprit qu'on a deux groupes différents susceptibles d'être protonés: le groupement carboxylique et le groupement amino, qui ont tous deux des pK très différents (respectivement 1.83 et 9.13, comme on l'a déjà vu). L'influence de chacun de ceux-ci sera donc plus ou moins importante suivant le domaine de pH où on se trouve.

Fractions acide et basique du groupement $-NH_2$

De par la définition du pK_a , et comme la phénylalanine reste exclusivement en phase aqueuse, on arrive rapidement à:

$$x_{F,tot}^{acd}(NH_2) = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a(F,NH_2))}} \quad 3.99$$

Ainsi qu'à:

$$x_{F,tot}^{bas}(NH_2) = 1 - x_{F,tot}^{acd}(NH_2) = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a(F,NH_2) - pH)}} \quad 3.100$$

Fractions acide et basique du groupement $-COOH$

De façon analogue à ce qui précède, on obtient:

$$x_{F,tot}^{acd}(COOH) = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a(F,COOH))}} \quad 3.101$$

$$x_{F,tot}^{bas}(COOH) = 1 - x_{F,tot}^{acd}(COOH) = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a(F,COOH) - pH)}} \quad 3.102$$

La contribution totale de la phénylalanine au pouvoir tampon du système vaudra donc:

$$\beta(F) = \beta(F, \text{NH}_2) + \beta(F, \text{COOH}) \quad 3.103$$

Avec:

$$\beta(F, \text{NH}_2) = (F_o + S_{Lo} \cdot X) \cdot (x_{F, \text{tot}}^{\text{cd}}(\text{NH}_2) \cdot x_{F, \text{tot}}^{\text{as}}(\text{NH}_2)) \quad 3.104$$

$$\beta(F, \text{COOH}) = (F_o + S_{Lo} \cdot X) \cdot (x_{F, \text{tot}}^{\text{cd}}(\text{COOH}) \cdot x_{F, \text{tot}}^{\text{as}}(\text{COOH})) \quad 3.105$$

Le pouvoir tampon du système biphasique, d'après l'équation 3.90, s'exprimera donc comme:

$$\beta = \ln(10) \cdot (H^+ + OH^- + \beta(S) + \beta(F, \text{NH}_2) + \beta(F, \text{COOH})) \quad 3.106$$

Comme il est plus facile de travailler avec le pH qu'avec H^+ , on peut reformuler 3.106 en utilisant le produit de dissociation de l'eau $K_w = H^+ \cdot OH^-$, ou plus précisément le paramètre $pK_w = -\log(K_w)$:

$$\beta = \ln(10) \cdot (10^{-\text{pH}} + 10^{(\text{pH} - pK_w)} + \beta(S) + \beta(F, \text{NH}_2) + \beta(F, \text{COOH})) \quad 3.107$$

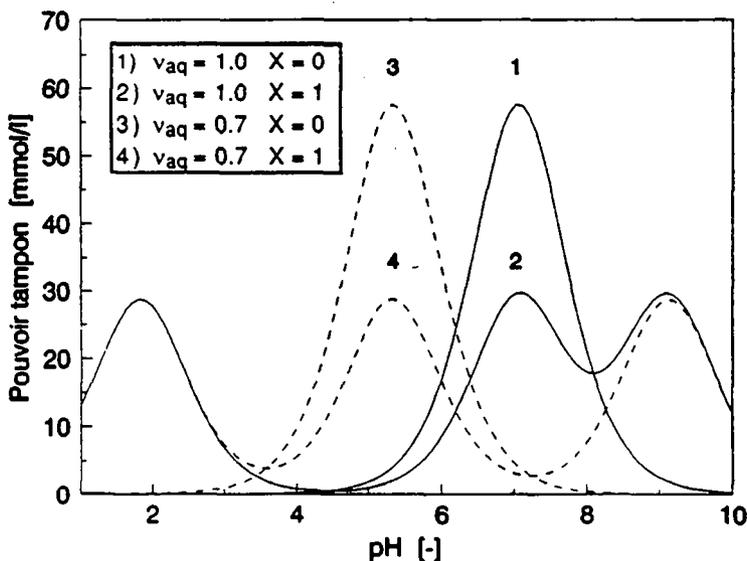


Figure 3.24: Pouvoir tampon du système en fonction de X et de v_{aq}
 $S_{Lo} = S_D = 30 \text{ m.mol.l}^{-1}$, $P_c(S) = 123$

On a représenté l'équation 3.107 dans la figure 3.24 ci-avant, qui donne le pouvoir tampon du système en fonction du pH pour deux valeurs du taux de conversion et de la fraction volumique aqueuse. Les trois pics qu'on peut observer sur la courbe 2 correspondent pour $v_{aq} = 1$ aux pK_a de l'ester (7.06) et de la phénylalanine (1.83 et 9.13 pour les groupements carboxylique et amino respectivement). On peut de plus très bien visualiser l'effet de la phase organique qui ne déplace que le pouvoir tampon du substrat (la phénylalanine ne se partage pas), sa valeur maximale se trouvant décalée vers des pH plus favorables à l'activité enzymatique.

Il est maintenant possible de compléter l'équation 3.91 exprimant la variation différentielle du pH en fonction de X:

$$\frac{dpH}{dX} = -\frac{1}{\beta} \cdot S_{Lo} \cdot f_i \quad 3.91$$

Avec:

$$\beta = \ln(10) \cdot (10^{-pH} + 10^{(pH - pK_a(H_2O))} + \beta(S) + \beta(F, NH_2) + \beta(F, COOH)) \quad 3.107$$

et

$$f_i = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a(S))}} \cdot \frac{1}{\left(1 + P_c(S) \cdot \frac{1 - v_{aq}}{v_{aq}}\right)} + \frac{1}{1 + 10^{(pK_a(F, NH_2) - pH)}} - \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a(F, COOH))}} \quad 3.77$$

Cette équation différentielle ne peut cependant pas être intégrée analytiquement, et demande l'emploi d'une méthode numérique comme celle de Runge-Kutta. On a alors la possibilité de calculer l'évolution du pH en fonction du taux de conversion à partir des caractéristiques du système (v_{aq} , pH_0), ainsi que de celles des réactants (S_{Lo} , S_D , $pK_a(S)$, $P_c(S)$, F_o , $pK_a(F, NH_2)$, $pK_a(F, COOH)$). Ceci va permettre de justifier, au niveau théorique tout au moins, l'utilisation d'une phase organique dans le but de diminuer la chute de pH causée par la réaction. C'est ce que montrent les courbes de la figure 3.25 ci-après, calculées pour différentes valeurs de v_{aq} et de pH_0 . Elles permettent de juger l'effet du MIBK, déjà très important même à des fractions volumiques aussi faibles que 0.1, et de constater qu'à chaque pH_0 correspond une valeur de v_{or} minimale, qui permet au pH de ne pas chuter trop bas. Ceci est dû principalement au décalage de la valeur

maximale du pouvoir tampon vers des pH plus bas causé par le partage du substrat entre les phases, effet très visible à la figure 3.24.

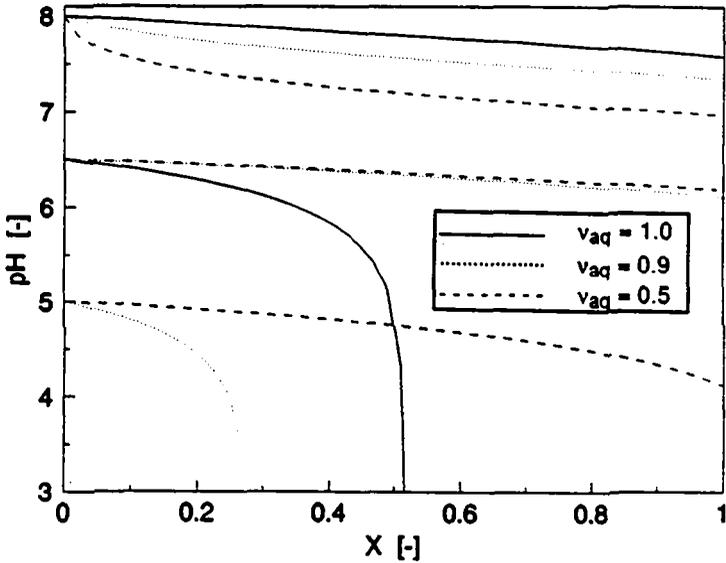


Figure 3.25: pH en fonction de X pour différents pH_0 et v_{aq} ($P_c(S) = 123$)

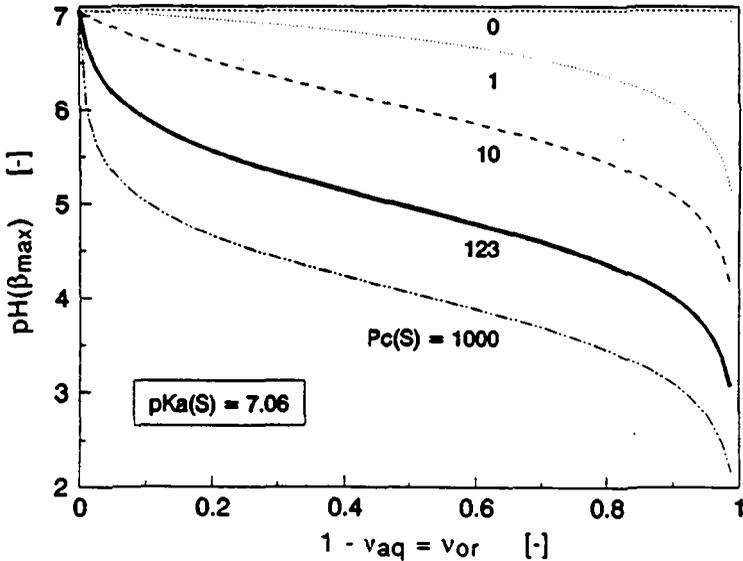


Figure 3.26: $pH(\beta_{max})$ en fonction de v_{or} pour quelques valeurs de $P_c(S)$

L'influence de la concentration de substrat sur le changement de pH est quant à elle minime, car dans l'équation 3.91, on trouve S_{L0} au numérateur et au dénominateur (inclus dans l'expression de β) de $\frac{d\text{pH}}{dx}$, d'où une compensation quasi simplificatrice.

La figure 3.26 ci-avant montre quant à elle la valeur du pH correspondant au pouvoir tampon maximal en fonction de v_{or} . On constate très vite que ces valeurs de pH correspondent à celles du pK_a^{app} défini au chapitre 2, paramètre qui vaut:

$$\text{pH}(\beta_{\text{max}}) = \text{pK}_a^{\text{app}} = \text{pK}_a(\text{S}) \cdot \log \left(1 + \frac{1 - v_{\text{aq}}}{v_{\text{aq}}} \cdot P_c(\text{S}) \right) \quad 2.23$$

Une autre propriété révélée par la figure 3.24 est l'importance insoupçonnée de la contribution du D-PAPE au pouvoir tampon du système. En effet ce composé, bien que n'étant pas transformé, titre une partie non négligeable des protons libérés par la réaction. Son utilité à ce niveau-là compense donc largement son influence en tant qu'inhibiteur compétitif sur la vitesse de la réaction. S'il n'était pas présent dans le système, le pouvoir tampon du substrat tendrait vers zéro au fur et à mesure que le taux de conversion se rapprocherait de 1, et la conséquence sur l'évolution du pH serait celle illustrée à la figure 3.27 (courbe du bas), qui est très importante si on la compare à celle du racémat correspondant (courbe du haut).

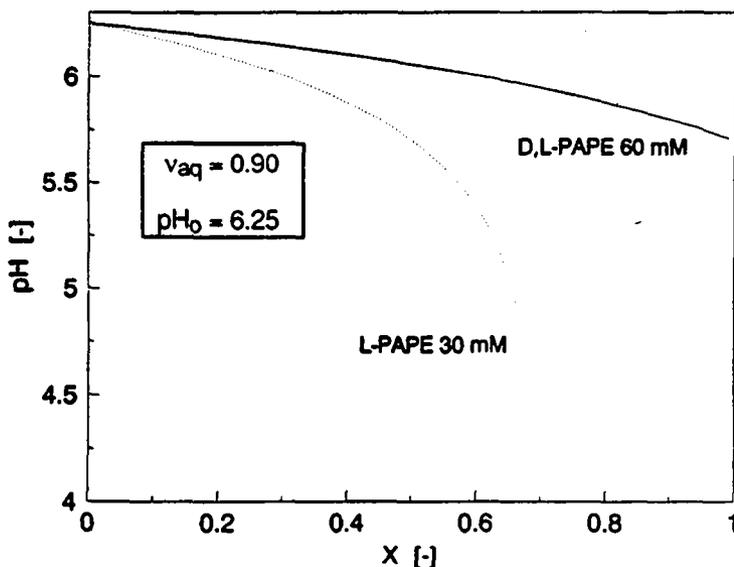


Figure 3.27: Influence du D-PAPE sur la chute du pH ($P_c(\text{S}) = 123$)

3.3.3 Cinétique de la réaction à pH flottant

Plus que la relation entre les valeurs du pH et de X, on aimerait savoir à quelles vitesses ces deux grandeurs vont évoluer. On a donc posé les bases d'un tel modèle cinétique en utilisant la description du pH en fonction du taux de conversion déjà faite au sous-chapitre 3.3.2, et en y ajoutant le facteur temps. Bien évidemment, ces trois grandeurs sont étroitement liées, et on arrivera encore moins que précédemment à obtenir une expression analytique. On va donc de nouveau avoir besoin de méthodes d'intégration numérique comme celle de Runge-Kutta.

La seule information qui manque encore pour l'élaboration du modèle est celle décrivant l'évolution de l'activité catalytique de l' α -chymotrypsine en fonction du pH. Comme l'optimum peut varier d'une classe de substrat à l'autre, il était préférable de faire la mesure pour l'hydrolyse du L-PAPE plutôt que de se baser sur des données de la littérature. On a donc effectué la même réaction en milieu aqueux, à diverses valeurs du pH qui était maintenu constant. La comparaison des activités s'est faite sur la base des vitesses initiales mesurées, et des temps nécessaires pour atteindre 40 % et 80 % de conversion. Les équations cinétiques développées précédemment montrent que ces trois grandeurs sont proportionnelles à k_2 , ce qui est suffisant pour une échelle de comparaison relative.

pH [-]	$R_{F,n}^0$ mmol.g ⁻¹ .min ⁻¹	$E_{0,t}$ 40% g.min ⁻¹	$E_{0,t}$ 80% g.min ⁻¹	$(R_{F,n}^0)_{rel}$ [-]	$(E_{0,t} 40\%)_{rel}$ [-]	$(E_{0,t} 80\%)_{rel}$ [-]
4.0	4.27	4.41	15.71	0.132	0.090	0.066
4.5	7.19	2.04	7.31	0.222	0.194	0.141
5.0	13.59	1.09	3.56	0.419	0.363	0.290
5.5	25.32	0.51	1.41	0.782	0.775	0.733
5.75	29.38	0.44	1.24	0.907	0.894	0.831
6.0	31.40	0.40	1.07	0.969	1.000	0.964
6.25	32.39	0.40	1.03	1.000	1.000	1.000
6.5	29.33	0.42	1.07	0.905	0.936	0.967
7.0	25.33	0.49	1.21	0.782	0.804	0.856
7.5	18.26	0.69	1.75	0.564	0.573	0.589

Tableau 3.18: Activité relative de l' α -CT soluble en fonction du pH

$$T = 30 \text{ }^\circ\text{C} \quad S_{L0} = S_D = 30 \text{ mM} \quad v_{aq} = 1.0 \quad E_0 = 0.08 \text{ g.l}^{-1}$$

Les résultats obtenus ont été reportés dans le tableau 3.18 ci-avant, ainsi que les conditions de réaction.

Comme le montre la figure 3.28, les trois grandeurs relatives suivent pratiquement la même évolution, qui affiche un maximum net aux environs de pH 6.3. On observe de plus que l'activité de l'enzyme pour cette réaction s'annule pratiquement en dessous de pH 4. Afin de pouvoir utiliser les valeurs discrètes de $k_{2,rel}$ dans le modèle, on a tenté de les décrire à l'aide d'une fonction polynômiale du troisième ordre. Le résultat obtenu est le suivant:

$$\frac{k_{2,rel}}{k_{2,max}} = k_{2,rel} = 10.128 - 6.790 \cdot \text{pH} + 1.445 \cdot \text{pH}^2 - 0.095 \cdot \text{pH}^3$$

3.108

Cette fonction correspond à la courbe pleine de la figure 3.28.

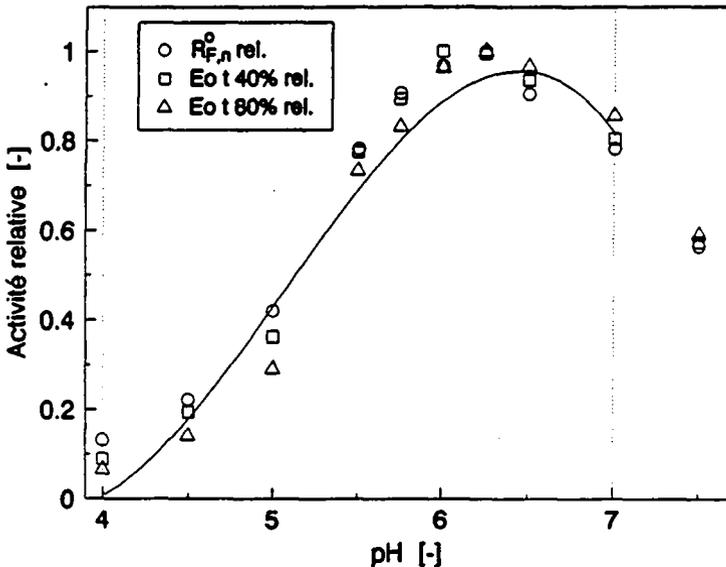


Figure 3.28: Activité relative de l' α -CT soluble en fonction du pH

Le polynôme choisi décrit assez bien l'activité de l'enzyme, mais sur un domaine de pH limité situé entre 4.0 et 7.0, et défini par les traitillés verticales sur le graphique. On devra donc être conscient du fait que les calculs effectués avec des valeurs du pH en dehors de ce domaine ne correspondent plus à aucune réalité expérimentale.

On dispose maintenant de toutes les informations nécessaires au développement du modèle cinétique pour la réaction en système biphasique à pH flottant. Celui-ci va s'articuler autour de deux équations différentielles connues, que l'on devra intégrer simultanément.

La première est l'équation de base donnant l'évolution du pH en fonction du taux de conversion, à savoir l'expression 3.91:

$$\frac{dpH}{dX} = \frac{-1}{\beta} \cdot S_{Lo} \cdot f_1 \quad 3.91$$

Les définitions complètes de β et f_1 ont déjà été données aux équations 3.107 et 3.77 respectivement.

La seconde exprime la variation du temps de réaction normalisé E_0t en fonction de X , et n'est rien d'autre que l'inverse de la vitesse de réaction multiplié par la concentration initiale de L-PAPE. Cette définition correspond à l'inverse de l'équation 3.85, et mène à:

$$\frac{E_0 \cdot dt}{dX} = \frac{(1 + k \cdot x_{P, aq} \cdot (P_0 + S_{Lo} \cdot X)) \left[\frac{K_m}{x_{S, aq} \cdot (1 - X)} \cdot \left(C_c + \frac{S_{Lp}}{K_{c,F}} \cdot X \right) + S_{L,o} \cdot A_c \right]}{k_2(pH \ 5.5) \cdot (14.7076 - 9.86 \cdot pH + 2.0984 \cdot pH^2 - 0.138 \cdot pH^3)} \quad 3.109$$

L'expression 3.85 a été modifiée dans le sens où on y a ajouté la dépendance de k_2 vis-à-vis du pH. On remarquera au passage que les coefficients de ce polynôme ont changé par rapport à ceux de la figure 3.28 car on a préféré, pour des raisons de commodité, exprimer k_2 en fonction de sa valeur à pH = 5.5, qui est celle déterminée lors des optimisations pour les hydrolyses à pH constant. Les variations de C_c , $x_{S, aq}$ et $x_{P, aq}$ en fonction du pH sont déjà connues (équations 2.38 et 3.82), et il n'est pas nécessaire de les réécrire ici.

Les deux équations différentielles 3.91 et 3.109 ont donc été intégrées à l'aide du programme FORTRAN BIFLOT donné en annexe. Les courbes simulées des figures 3.29 et 3.30 ci-après montrent l'évolution de E_0t , X et pH pour différentes conditions expérimentales. La température est comme toujours égale à 30 °C, et les constantes cinétiques utilisées celles obtenues à l'aide des estimations de paramètres du chapitre 3.2, qui sont données dans le tableau 3.16. L'influence de la phénylalanine a donc été négligée, et le coefficient de partage du

PAPE fixé à la valeur mesurée de 123. On a utilisé une valeur de k_2 (correspondant à un pH de 5.5) égale à $60 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

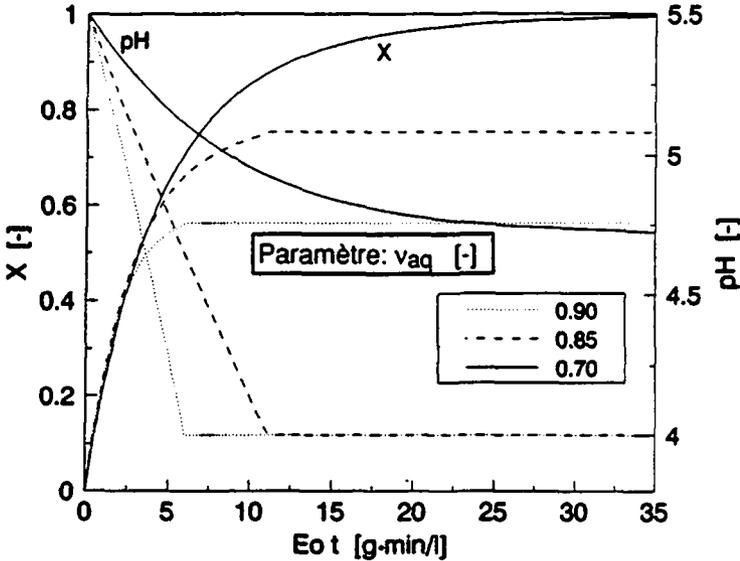


Figure 3.29: Simulations pour l'hydrolyse en système biphasique à pH flottant
 $S_{L0} = S_D = 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH}_0 = 5.5$, $k_{20} = 60 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

A la figure 3.29, on a varié la fraction volumique aqueuse, en gardant le pH initial égal à 5.5. A cette valeur, l'activité enzymatique est assez grande, mais décroît rapidement avec le taux de conversion. Comme de plus le pouvoir tampon du milieu 100 % aqueux est très faible, on peut s'attendre à une chute importante du pH aux valeurs de v_{aq} proches de 1. C'est effectivement ce qui se passe, et comme on a supposé l'enzyme complètement désactivée en dessous de pH 4.0, on a annulé la vitesse de la réaction dès que cette valeur était atteinte. On peut donc voir que la fraction volumique de phase organique minimale pour atteindre 100 % de conversion sans que le pH chute plus bas que 4 se situe entre 0.15 et 0.30 (0.25 environ).

La figure 3.30 permet de comparer les réactions à pH flottant et constant pour une fraction volumique aqueuse maintenue à 0.9. Si on part de pH 6.0, on se trouve au maximum du pouvoir tampon et le pH décroît de moins de 0.35 unité entre 0 et 60 % de conversion. C'est ce qui explique que la courbe à pH flottant et

celle à pH constant = 6.0 soient pratiquement confondues, sauf vers la fin de la réaction.

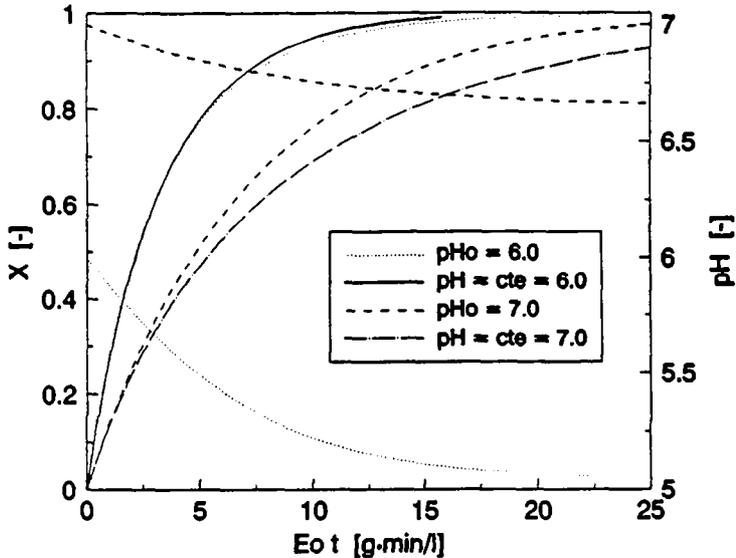


Figure 3.30: Simulations pour l'hydrolyse en système biphasique à pH flottant
 $S_{Lo} = S_D = 100 \text{ mmol.l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$
 $k_{20} (\text{pH } 6.0) = 76.92 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$
 $k_{20} (\text{pH } 7.0) = 70.51 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$

La réaction à pH flottant peut même être plus rapide que celle à pH constant, comme le montrent les autres courbes du graphique 3.30. En effet à $\text{pH}_0 = 7.0$, la constante de vitesse et le pouvoir tampon augmentent tous les deux avec le taux de conversion (i.e. avec la chute du pH), d'où l'accélération sensible observée par rapport à la courbe pointillée.

3.3.4 Résultats

Les essais réalisés par de Riedmatten (1986) ont consisté, dans un premier temps, en la détermination d'un pH de départ optimal vis-à-vis de la productivité du système pour l'hydrolyse du PAPE à pH flottant en système

biphasique. On n'a donc fait varier que pH_0 en gardant constantes les autres caractéristiques du système, à savoir:

$$S_{Lo} = S_D = 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$v_{aq} = 0.5 \text{ [-]}$$

Comme on l'a déjà expliqué les concentrations indiquées se rapportent au volume de la phase aqueuse, et le taux de conversion a été déterminé par analyse HPLC des échantillons prélevés au cours du temps. L'évolution du pH était quant à elle mesurée en continu.

Les figures 3.31 à 3.33 (partie a) montrent quelques-unes des courbes d'hydrolyse mesurées, avec sur l'échelle de droite la lecture du pH. Sur la partie b de chaque graphique on a également reporté l'évolution du pH, mais en fonction du taux de conversion cette fois; cette représentation permet une comparaison des valeurs expérimentales et des courbes calculées à l'aide du modèle. On peut voir que la description théorique est assez éloignée des valeurs mesurées, l'écart entre les deux ne diminuant que vers la fin de la réaction; la forme même des courbes ne correspond parfois pas, comme dans les essais avec $pH_0 = 6.0$ ou 6.5 . Dans la plupart des cas cependant, la chute de pH reste tout à fait acceptable pour l'enzyme, et on arrive à une conversion totale du L-PAPE. Le temps nécessaire à cette transformation varie par contre selon le pH initial car comme on l'a vu lors du développement de la cinétique, ce dernier paramètre influence autant le partage biphasique du substrat que le pouvoir tampon du système ou encore et surtout l'activité de l'enzyme. La combinaison de ces effets se traduit par des variations importantes de la productivité (cf tableau 3.19 ci-après), laquelle montre un maximum très net à $pH_0 = 6.0$. Ce résultat est quant à lui tout à fait en accord avec ce qu'on avait pu observer quant à l'activité de l'enzyme et au pouvoir tampon du système aux environs de cette valeur.

Il n'a par contre pas été possible d'appliquer aux courbes de conversion le modèle cinétique développé au sous-chapitre précédent, car cela aurait nécessité l'estimation simultanée de deux séries de paramètres étroitement liés. En effet, il aurait fallu tenir compte en même temps de l'évolution de la conversion et de celle du pH, qui dépendent de nombreux paramètres communs, en ajustant leurs valeurs de façon à équilibrer au mieux les écarts. Or, on ne disposait pas d'un tel outil mathématique.

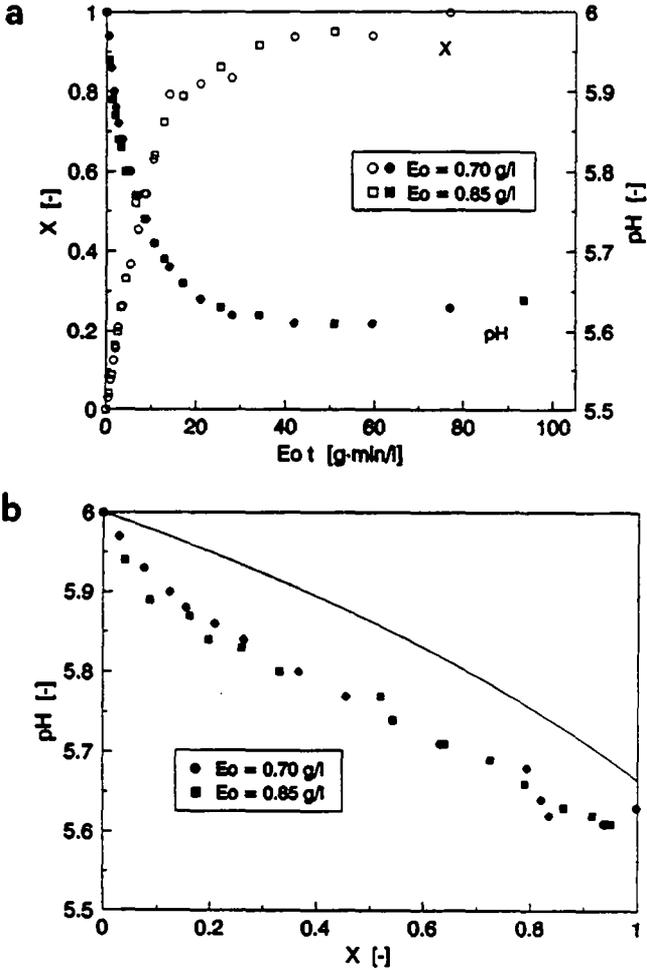


Figure 3.31: Hydrolyse du PAPE à pH flottant ($pH_0 = 6.0$)
 $T = 30$ °C, $S_{L0} = S_D = 100$ mmol·l⁻¹, $v_{aq} = 0.5$

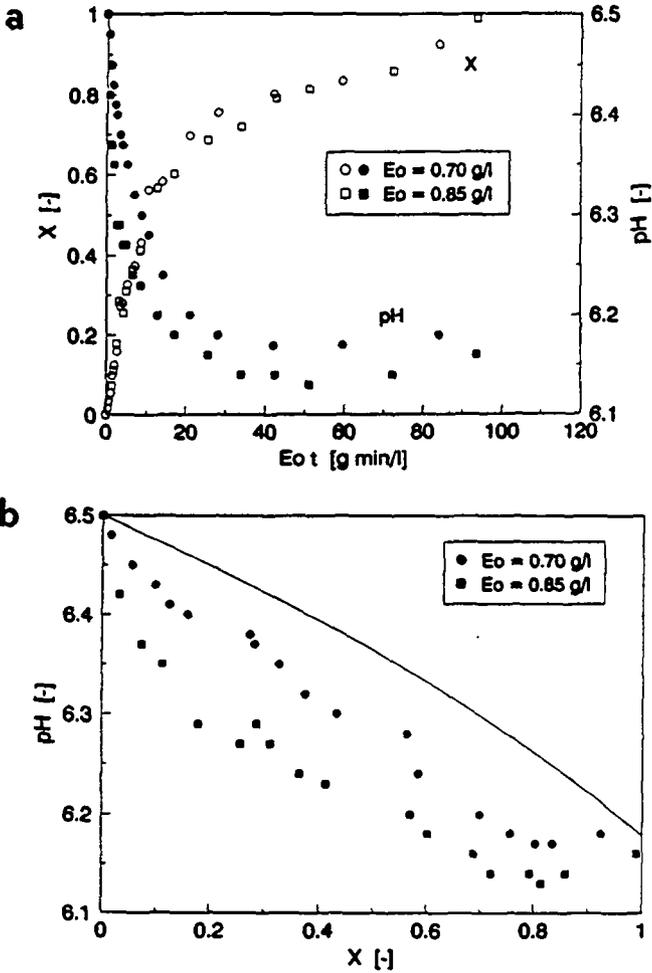


Figure 3.32: Hydrolyse du PAPE à pH flottant ($pH_0 = 6.5$)
 $T = 30$ °C, $S_{L0} = S_D = 100$ mmol.l⁻¹, $v_{aq} = 0.5$

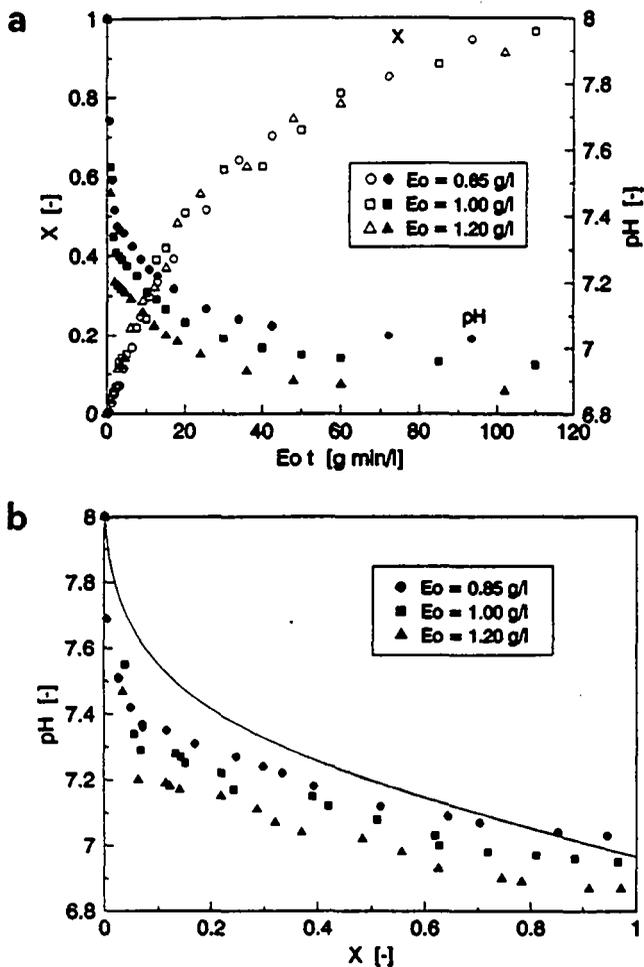


Figure 3.33: Hydrolyse du PAPE à pH flottant ($pH_o = 8.0$)
 $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $S_{L0} = S_D = 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.5$

On a reporté dans le tableau 3.19 toutes les valeurs du pH au début et à la fin de la réaction, ainsi que celles de la vitesse initiale et de la productivité à 80 % de conversion. Cette dernière est peut-être plus représentative de la rapidité de la transformation, les analyses HPLC étant entachées d'une erreur non négligeable

le plus souvent due à la prise d'échantillons nombreux mais de faible volume (100 μ l) et aux diverses manipulations subies par ceux-ci. L'estimation de la vitesse initiale selon la méthode déjà décrite au sous-chapitre 3.1.5, qui se fait par définition à des faibles valeurs du taux de conversion, est donc sujette à caution et n'est donnée qu'à titre indicatif. A noter encore que R_0 et L_p ont été toutes deux normalisées par rapport à la concentration d'enzyme.

E_0 [$g \cdot l^{-1}$]	pH_0 [-]	pH_t [-]	$R_{F,n}^0$ [$mmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$]	$L_{p80\%}$ [$mmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$]
0.70	5.6	5.18	12.87	3.28
0.85	5.6	5.25	9.55	
0.70	6.0	5.69	8.03	4.65
0.85	6.0	5.66	8.04	
1.00	6.0	5.67	8.99	
0.70	6.5	6.20	6.79	2.13
0.85	6.5	6.12	7.61	
1.00	6.5	6.15	5.59	
0.70	7.0	6.53	4.62	0.98
0.85	7.0	6.50	3.81	
1.00	7.0	6.58	3.87	
0.70	7.5	6.79	2.97	1.19
0.85	7.5	6.79	2.69	
1.00	7.5	6.75	3.23	
0.85	8.0	7.04	2.59	1.33
1.00	8.0	6.95	4.50	
1.20	8.0	6.87	3.86	

Tableau 3.19: Recherche d'un pH_0 optimal pour la réaction en système biphasique ($S_{L0} = S_D = 100 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$, $v_{aq} = 0.5$)

$pH_0 = 6.0$, qui correspond à la productivité la plus grande à $v_{aq} = 0.5$, a été gardée comme pH initial afin d'étudier l'influence de la fraction volumique du MIBK sur la chute de pH et la productivité. Les autres conditions de réaction, gardées constantes, étaient les suivantes:

$$S_{L0} = S_D = 100 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$$

$$T = 30 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$pH_0 = 6.0 \text{ [-]}$$

Les figures 3.34 à 3.36 montrent comme précédemment dans leur partie a les évolutions du taux de conversion et du pH en fonction du temps, et dans leur partie b celle du pH vis-à-vis du taux de conversion.

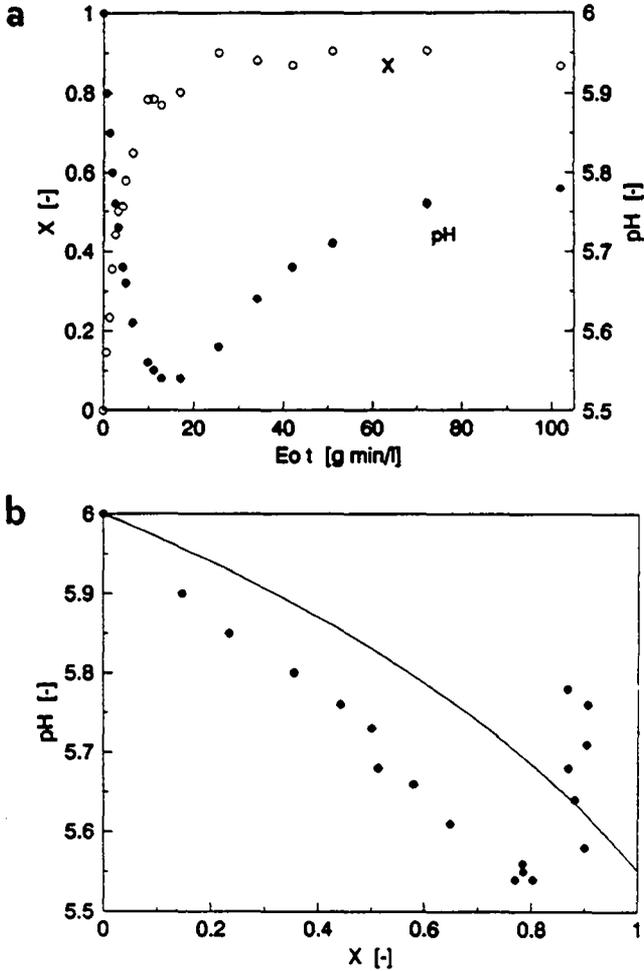


Figure 3.34: Hydrolyse du PAPE à pH flottant ($v_{aq} = 0.8$)
 $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $S_{L0} = S_D = 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH}_0 = 6.0$

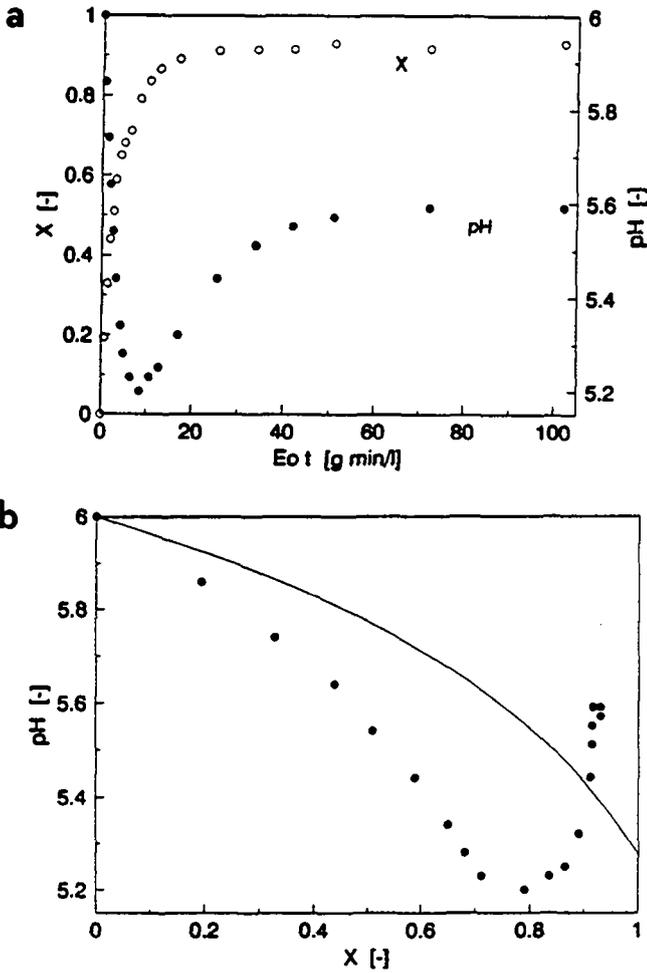


Figure 3.35: Hydrolyse du PAPE à pH flottant ($v_{aq} = 0.9$)
 $T = 30$ °C, $S_{L0} = S_D = 100$ mmol·l⁻¹, $pH_0 = 6.0$

On ne peut que constater à nouveau dans cette série l'écart entre le modèle et les expériences, avec cependant un fait nouveau: en fin de réaction, le pH remonte plus haut que sa valeur théorique, sans que l'on puisse trouver d'explication logique à cela. Dans les figures 3.34 a et 3.35 a, on peut même voir le

pH chuter d'abord très rapidement, passer par un minimum, puis remonter lentement vers une valeur stable. Ce comportement n'avait pu être observé lors de la première série de mesures à pH flottant. Tout au plus le trouve-t-on à peine esquissé à la figure 3.31 a ($pH_0 = 6.0$, $v_{aq} = 0.5$).

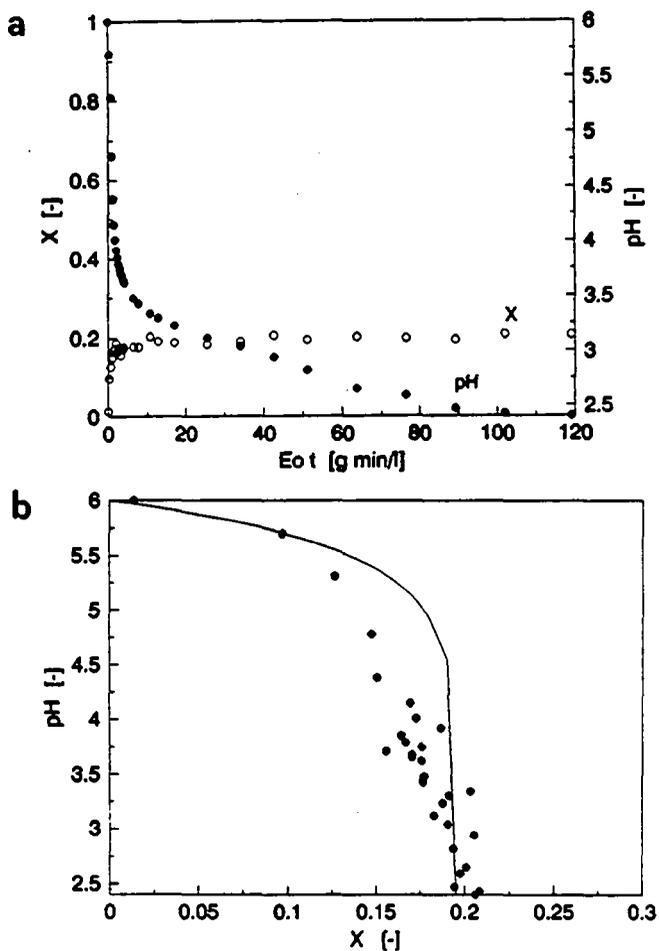


Figure 3.36: Hydrolyse du PAPE à pH flottant ($v_{aq} = 1.0$)
 $T = 30$ °C, $S_{L0} = S_D = 100$ mmol.l⁻¹, $pH_0 = 6.0$

E_0 [g.l ⁻¹]	v_{aq} [-]	pH _f [-]	$R_{F_o}^n$ [mmol.g ⁻¹ .min ⁻¹]	$L_p 80\%$ [mmol.g ⁻¹ .min ⁻¹]
0.70	0.50	5.69	8.03	4.65
0.85	0.50	5.66	8.04	
1.00	0.50	5.67	8.99	
0.70	0.60	5.61	19.71	6.02
0.85	0.60	5.64	30.96	
0.85	0.65	5.53	14.83	3.74
0.85	0.80	5.78	26.20	7.41
0.85	0.90	5.59	39.78	11.76
0.85	0.95	4.05	31.02	-
0.85	1.00	2.40	67.15	-

Tableau 3.20: Recherche d'un v_{aq} optimal pour la réaction en système biphasique ($S_{L_0} = S_D = 100 \text{ mmol.l}^{-1}$, $pH_0 = 6.0$)

Les résultats obtenus lors de cette étude sont consignés dans le tableau 3.20 ci-avant. L_p ne cesse d'augmenter en même temps que v_{aq} jusqu'à 0.9, valeur qui correspond au maximum. La chute de pH reste jusque là assez constante et aux environs de 0.4 unité, mais au-delà ($v_{aq} = 0.95$ et 1), elle est de plusieurs unités, ce qui mène à la désactivation de l'enzyme et à l'arrêt de la réaction, la conversion ne dépassant pas 20 %. C'est pourquoi la productivité du système pour ces deux essais n'a pu être évaluée.

Si on considère maintenant l'ensemble des mesures à pH flottant, deux constatations principales émergent du lot des observations:

- C'est au début de la réaction que l'écart augmente le plus rapidement. Il diminue ensuite vers les taux de conversion élevés, pour atteindre son minimum à la fin de la réaction.
- L'expérience pour laquelle on obtient la meilleure concordance est celle avec $pH_0 = 8.0$ et $v_{aq} = 0.5$ (figure 3.33 b). On observe cependant que l'écart vis-à-vis du modèle augmente avec la concentration d'enzyme, qui passe de 0.85 à 1.2 g.l⁻¹.

Ces indications permettent d'apporter un élément de réponse, si on se souvient que le modèle théorique suppose à tout instant l'équilibre de partage établi entre les phases. Or il se peut, surtout avec les hautes concentrations d'enzyme utilisées (de 0.7 jusqu'à 1.2 g.l⁻¹), que la vitesse de réaction (et donc de libération des protons) soit trop rapide par rapport à celle du transfert du substrat neutre depuis le solvant organique vers la phase aqueuse; le pH pourrait alors descendre dans cette dernière plus bas que la valeur prédite. Une fois la réaction presque terminée et sa vitesse fortement réduite, la limitation disparaîtrait et le pH se rapprocherait peu à peu de sa valeur à l'équilibre. Cette hypothèse semble confirmée par le fait que l'écart augmente quand le pH initial diminue et quand v_{aq} augmente, ce qui correspond dans les deux cas à une augmentation de la concentration de substrat en phase aqueuse et donc de la vitesse initiale de la réaction. Comme on l'a également noté auparavant, l'augmentation de la concentration d'enzyme tend également à accentuer la déviation, notamment quand la concentration de substrat en phase aqueuse est faible, comme c'est le cas à $pH_0 = 8.0$ et $v_{aq} = 0.5$ (figure 3.33). D'un autre côté, c'est aussi dans ces conditions que le modèle décrit le mieux les mesures. Il n'y a cependant rien de paradoxal là-dedans puisque la concentration de substrat en phase aqueuse est très faible et qu'on se trouve assez éloigné de l'optimum d'activité pour l'enzyme. La vitesse de réaction pourrait donc bien ne pas être assez grande pour que le transfert du substrat devienne un facteur trop sévèrement limitant. Ceci expliquerait également des comportements du pH au cours du temps comme ceux reportés aux figures 3.34 et 3.35. Il commence par diminuer fortement et rapidement, avant de passer par un minimum et de remonter lentement vers une valeur finale assez proche de celle prédite par le modèle.

Le fait qu'elle finisse même par passer au dessus de la courbe en fin de réaction reste cependant inexplicable, sauf peut-être par l'incertitude sur la valeur de v_{aq} , l'influence de ce paramètre vis-à-vis de dpH/dX devenant de plus en plus sensible au fur et à mesure qu'on se rapproche de 1. On a toujours pris garde, comme déjà vu, à utiliser des phases liquides saturées l'une par l'autre afin de minimiser ce problème, mais il n'est pas impossible d'un autre côté que le phénomène de partage du substrat (et du propanol) puisse être responsable de changements non négligeables du volume de la phase organique.

Pour revenir au problème de l'écart par rapport à l'équilibre lors des hydrolyses à pH flottant, un élément de confirmation supplémentaire peut être trouvé dans la bonne concordance du modèle et de la pratique pour l'essai en

milieu 100 % aqueux (figure 3.36). En effet dans un tel cas l'évolution du pH n'est pas soumise à un équilibre de transfert, et on peut voir qu'à ce moment-là la prédiction est beaucoup plus correcte.

L'étude des résultats qui précèdent montre en tout cas la validité du principe de la réaction en système biphasique dans le but de limiter la chute de pH due à la réaction, même si celle-ci est plus importante que ne le laisse prévoir le modèle mathématique testé. Il ne semble cependant pas que celui-ci doive être mis en cause, les écarts observés semblant plutôt dus à une limitation du système réactionnel.

Par contre cela pose un problème supplémentaire dans le sens où l'utilisation du modèle cinétique présenté dans le sous-chapitre 3.3.3 pour décrire les expériences de de Riedmatten (1986) est encore moins envisageable. Non seulement on ne dispose pas de l'algorithme d'optimisation adéquat, mais en plus la condition de base, à savoir l'équilibre de partage spontané, n'est pas remplie. Dans le cas d'une hydrolyse suffisamment lente par rapport au transfert du substrat neutre à l'interface solvant organique / phase aqueuse, c.-à-d. à des concentrations d'enzyme beaucoup plus faibles que celles utilisées, il se pourrait cependant qu'on reste suffisamment proche des conditions théoriques pour que les équations proposées deviennent applicables.

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 3

BENDER, M.L.; CLEMENT, G.E.; GUNTER, C.R.; KEZDY, F.J. (1964): The kinetics of α -chymotrypsin reactions in the presence of added nucleophiles
J. Amer. Chem. Soc., **86**, 3697-3703

CHAPLIN, M.F.; BUCKE, C. (1990): Enzyme technology, 1st ed.
Cambridge University Press, Cambridge (GB)

DAS, J. (1983): α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of L-Phe-n-butyl ester
Proc. Indian Natn.Sci. Acad., 49 A (3), 392-397

DUPAIX, A.; BECHET, J.-J. (1973): Comparison of the α -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of esters with different leaving groups
FEBS Letters, 34 (2), 185-188

LAILLER, K.J.; BUNTING, P.S. (1973): Chemical kinetics of enzyme action, 2nd ed.
Clarendon Press, Oxford (GB)

LUGRIN, C. (1985): Résolution optique de phénylalanine à l'aide de chymotrypsine en système biphasique
Travail de diplôme, Département de chimie, EPFL, CH-1015 Lausanne

MARGOT, A.O. (1987): Influence de solvants organiques sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique du propylester de phénylalanine
Travail de diplôme, Département de chimie, EPFL, CH-1015 Lausanne

MORESOLI, C. (1990): Etude de la transestérification d'un mélange racémique de l'ester propylique de la phénylalanine à l'aide de chymotrypsine
Thèse EPFL N° 835, CH-1015 Lausanne

De RIEDMATTEN, J.-Y. (1986): Résolution optique de phénylalanine à l'aide de chymotrypsine en système biphasique à pH flottant
Travail de diplôme, Département de chimie, EPFL, CH-1015 Lausanne

ZERNER, B.; BOND, R.P.M.; BENDER, M.L. (1964): Kinetic evidence for the formation of acyl-enzyme intermediates in the α -chymotrypsin-catalyzed hydrolyses of specific substrates
J. Amer. Chem. Soc., 86, 3674-3679

4. HYDROLYSE DU PAPE AVEC L'ENZYME FIXEE

Les mesures qui précèdent avaient pour but l'application en continu de l'hydrolyse enzymatique en milieu biphasique. L'efficacité d'un tel système ayant été démontrée avec l'enzyme soluble, l'étape suivante concerne la mise en oeuvre d'une chymotrypsine immobilisée sur un support solide. C'est en effet le moyen le plus simple de séparer le catalyseur et les différents partenaires à la sortie du réacteur, et de stopper la réaction. Par contre on introduit une troisième phase dans le système, qui induit des étapes supplémentaires de diffusion du substrat vers le catalyseur solide, d'adsorption, de réaction et de retour des produits vers le sein de la solution qui peuvent s'avérer limitantes. C'est la possibilité d'utiliser l'enzyme sous cette forme dans le système biphasique qui a donc été étudiée dans ce chapitre.

4.1 PARTIE EXPERIMENTALE

L'enzyme fixée a été gracieusement fournie par la maison Hoechst AG, dont le procédé d'immobilisation est décrit en détail dans un brevet (Keller, 1984). Le support, constitué de particules de silicagel (diamètre compris entre 0.1 et 0.3 mm), est activé d'abord par contact avec une solution dans l'acétone de 3-aminopropyl triéthoxysilane puis, après séchage, avec une solution aqueuse de glutardialdéhyde à 25 %. Les particules sont alors dispersées quelques heures à température ambiante dans une solution aqueuse d' α -chymotrypsine (46 g.l^{-1}) tamponnée à pH 7.5. Le catalyseur ainsi obtenu est stocké après lavage dans du tampon phosphate 0.1 M (pH 7.5, avec 0.1 mM d'azide de sodium). La réaction de couplage de l'enzyme sur le support est présentée et comparée avec d'autres méthodes de fixation par Hartmøler (1986).

Le catalyseur a été utilisé aussi bien en dispersion dans une cuve agitée que sous forme de lit fixe dans un réacteur tubulaire continu. La première configuration a servi à comparer l'enzyme fixée et la chymotrypsine soluble au niveau de l'activité, et donc à dimensionner le réacteur continu. On a pu y réaliser des hydrolyses à pH constant (dosage de la phénylalanine par titrimétrie) ou flottant (dosage par analyse HPLC), avec présence ou non de phase organique. La procédure de mise en route de la réaction était identique à celle décrite au chapitre 3 pour les essais en système mono- ou biphasique. Une fois les conditions initiales de pH et de température atteintes, à chaque fois sous forte agitation, le volume désiré d'enzyme immobilisée était ajouté à l'aide d'une seringue tronquée pour

faire démarrer l'hydrolyse. C'est pourquoi la concentration E_0 de catalyseur s'exprimera dorénavant en ml.l^{-1} et le temps de réaction normalisé $E_0.t$ en ml.min.l^{-1} .

Le réacteur constitué par la cuve de titration décrite au début du chapitre 2 a quand même été légèrement modifié pour cette partie de l'étude: pour éviter une trop grande abrasion des particules de catalyseur dispersées dans la cuve, le barreau magnétique ne reposait plus directement sur le fond de celle-ci. Il était suspendu à une mince tige métallique tournant en même temps et qui le maintenait à 1 cm de hauteur. Mais, avant l'étude de la réaction proprement dite et le dimensionnement d'un réacteur continu à lit fixe d'enzyme, on s'est attaché à caractériser les particules constituant ce dernier.

4.2 CHARACTERISATION DE L'ENZYME FIXEE

4.2.1 Taille des particules de catalyseur

On a dans un premier temps déterminé la distribution de la taille des particules d'enzyme fixée. L'appareil employé à cet effet (Laser diffraction particle sizer modèle 2600 c, Malvern Instruments, Malvern, (GB)) mesure la diffraction selon Fraunhofer d'un rayon laser à travers une suspension des grains en milieu liquide (Weiner (1984), Allen (1981)). Chaque angle de diffraction est caractéristique d'une taille, et l'intensité lumineuse mesurée à cet angle fonction du nombre de particules ayant cette dimension, celles-ci étant de plus supposées sphériques. On a procédé à une série de trois mesures, et la figure 4.1 montre les résultats moyens obtenus sous forme de deux courbes:

La première (a) donne le pourcentage des particules ayant une taille inférieure à celle de l'abscisse correspondante (l'échelle étant logarithmique).

La seconde (b) correspond à la dérivée de (a) par rapport au diamètre D_p des grains, et représente la "fréquence d'apparition" des particules de la taille considérée. On peut voir qu'elle affiche un maximum net aux environs de 200 μm .

A partir des données brutes mesurées, plusieurs diamètres moyens peuvent être calculés. Celui correspondant à la distribution volumique vaut:

$$D_p(4,3) = 219.0 \pm 78.4 \mu\text{m}$$

Dans une distribution, $D_p(4,3)$ est défini par (avec $n(D_p)$ = nombre de particules de diamètre D_p):

$$D_p(4,3) = \frac{\int_{D_p}^{D_p^{\max}} D_p^4 \cdot n(D_p) \cdot dD_p}{\int_{D_p}^{D_p^{\max}} D_p^3 \cdot n(D_p) \cdot dD_p}$$

4.1

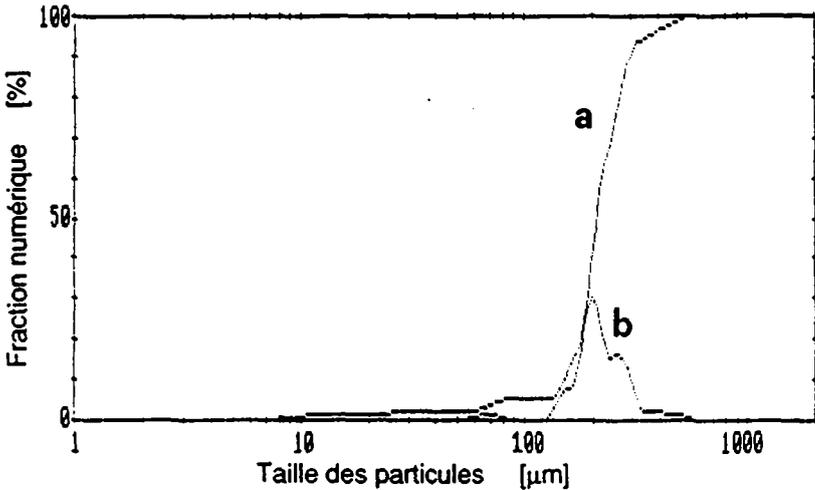


Figure 4.1: Distribution de la taille des particules pour le catalyseur

4.2.2 Porosité du lit

On a ensuite mesuré la porosité ϵ d'un lit de particules catalytiques. Ce paramètre est important pour le calcul du temps de contact entre les réactifs et l'enzyme dans le réacteur continu. Moresoli (1990) avait utilisé dans son travail la valeur communément admise de 0.48 pour des remplissages irréguliers. Il était donc intéressant de vérifier cette hypothèse. La méthode employée est simple: on mesure la distribution de temps de séjour (DTS) dans le volume réactionnel, en suivant la réponse du système à une injection-impulsion de traceur inerte. Une fois le temps de séjour moyen déterminé et connaissant le débit, on en déduit le volume libre entre les particules qui, divisé par le volume total du lit, donne la porosité de ce dernier.

L'appareillage utilisé comportait une pompe (modèle E avec tête SS8C, Metering Pumps Limited, London (GB)), qui envoyait un débit connu d'eau distillée à travers une colonne pour la chromatographie liquide de 14 mm de diamètre intérieur contenant l'enzyme fixée. La hauteur du lit valant 167 mm, son volume était donc de 25.7 ml. A l'entrée de la colonne, un septum permettait l'injection rapide de 0.5 ml d'une solution aqueuse de dextrane à 0.5 % (T500, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala (S)). La concentration de ce dernier à la sortie du réacteur était suivie en continu à l'aide d'un polarimètre (modèle 241, Perkin Elmer, Beaconsfield (GB)) et enregistrée sur ordinateur à l'aide d'un système d'acquisition de données. La réponse du polarimètre étant linéaire dans le domaine de concentrations en dextrane étudié, la seule mesure du signal de sortie U suffisait pour les calculs. Pour une série de n points de mesure discrets, on sait que le temps de séjour moyen \bar{t} est approché par:

$$\bar{t} \cong \frac{\sum_{i=1}^n t_i \cdot U_i \cdot \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n U_i \cdot \Delta t_i} \quad 4.2$$

Si les mesures sont prises à des intervalles de temps réguliers ($\Delta t_i =$ constante), l'expression 4.2 se simplifie en:

$$\bar{t} \cong \frac{\sum_{i=1}^n t_i \cdot U_i}{\sum_{i=1}^n U_i} \quad 4.3$$

La dispersion des temps de séjour autour de la valeur moyenne vaut quant à elle, toujours pour une série de n points de mesure discrets:

$$\sigma^2 \cong \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})^2 \cdot U_i \cdot \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n U_i \cdot \Delta t_i} \quad 4.4$$

Si, à nouveau, $\Delta t_i =$ constante, 4.4 devient:

$$\sigma^2 \equiv \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})^2 \cdot U_i}{\sum_{i=1}^n U_i}$$

4.5

Il faut cependant faire attention au fait que le volume de la tuyauterie qui va du point d'injection au lit catalytique et de ce dernier jusqu'au polarimètre retarde la sortie du traceur, et qu'on doit déduire ce "volume mort" du volume libre total calculé. Pour en connaître la valeur, on a fait une mesure de DTS en court-circuitant la colonne, qui correspond à la courbe A de la figure 4.2 ci-après. Une réponse typique du lit est quant à elle donnée par le pic B. Le signal de sortie, mesuré en volts, a été normalisé par rapport à sa valeur maximale.

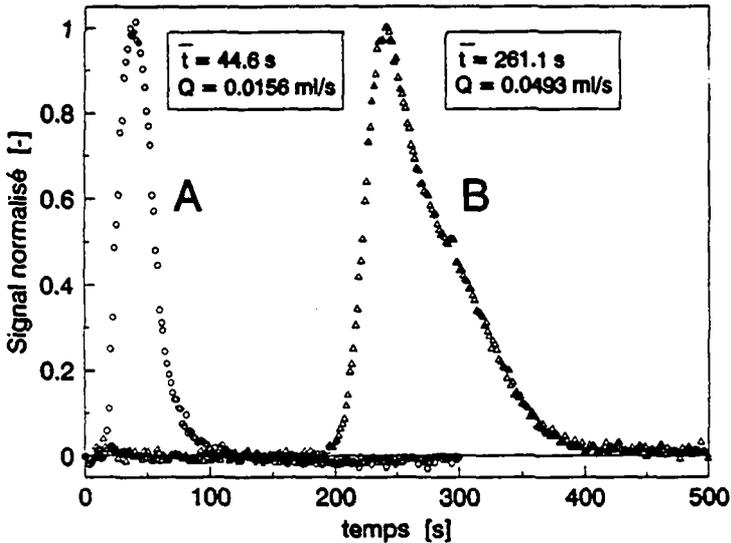


Figure 4.2: Réponse à une injection-impulsion de traceur

Le volume mort est obtenu en multipliant le temps de séjour moyen des expériences où la colonne est court-circuitée (\bar{t}_{cc}) par le débit Q :

$$V_{mort} = \bar{t}_{cc} \cdot Q$$

4.6

Le volume libre interstitiel (V_{int}) se calcule alors comme suit:

$$V_{\text{int}} = \bar{t} \cdot Q_1 - V_{\text{mort}} = \bar{t} \cdot Q_1 - \bar{t}_{\text{cc}} \cdot Q_2 \quad 4.7$$

On obtient finalement la porosité du lit (ϵ) selon:

$$\epsilon = \frac{V_{\text{int}}}{V_{\text{lit}}} \quad 4.8$$

Les résultats des mesures effectuées sont reportés dans le tableau 4.1 ci-après.

Q [ml·s ⁻¹]	\bar{t} [s]	σ^2 [s ²]	V _{lit} [ml]	V _{int} +V _{mort} [ml]	V _{int} [ml]	ϵ [-]
0.0156	$\bar{t}_{\text{cc}} = 45.0$	222	***	V _{mort} : 0.70	***	***
0.0156	$\bar{t}_{\text{cc}} = 44.6$	225	***	V _{mort} : 0.70	***	***
0.0252	503.6	6392	25.7	12.67	11.97	0.466
0.0493	261.1	1706	25.7	12.88	12.18	0.474
0.0600	212.6	1260	25.7	12.76	12.06	0.469

Tableau 4.1: Mesure de la porosité du lit catalytique

On obtient donc une valeur moyenne de ϵ qui vaut 0.47, ce qui permet d'affirmer que la valeur de 0.48 utilisée a priori constitue dans ce cas une bonne approximation.

4.2.3 Comparaison enzyme fixée / enzyme soluble

Afin que le volume du lit catalytique à dimensionner et donc que les temps de passage à travers celui-ci permettent l'étude d'une plage de taux de conversion intéressante, on doit se faire une idée des activités relatives de la chymotrypsine soluble et de l'enzyme immobilisée. Pour cela, on a commencé par mesurer le profil d'activité de cette dernière en fonction du pH. On a utilisé les mêmes conditions réactionnelles que celles mises en œuvre avec l'enzyme native, à savoir:

$$S_{\text{Lo}} = S_{\text{D}} = 30 \text{ mM}$$

$$T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$v_{\text{aq}} = 1.0$$

La concentration de catalyseur valait quant à elle $E_0 = 30 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$. Le volume d'enzyme introduit dans le réacteur et définissant la concentration de celle-ci doit être compris comme le volume total des particules et des interstices. Comme au chapitre 3.3.4, on a comparé les vitesses initiales et les temps normalisés nécessaires à l'obtention de 40 et 80 % de conversion. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4.2 avec les valeurs de pH étudiées. Le volume de NaOH consommé enregistré par acquisition de données fournit une quantité de points plus importante et permet de faire une régression linéaire sur la première partie de la courbe afin de déterminer la vitesse initiale de la réaction.

pH [-]	$R_{F,n}^0$ $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	$E_0\cdot t$ 40% $\text{ml}\cdot\text{min}\cdot\text{l}^{-1}$	$E_0\cdot t$ 80% $\text{ml}\cdot\text{min}\cdot\text{l}^{-1}$	$(R_{F,n}^0)_{\text{rel}}$ [-]	$(E_0\cdot t$ 40%) _{rel} [-]	$(E_0\cdot t$ 80%) _{rel} [-]
4.0	$6.12\cdot 10^{-3}$	2310	***	0.083	0.074	***
4.5	$13.92\cdot 10^{-3}$	968	2910	0.190	0.177	0.160
5.0	$24.18\cdot 10^{-3}$	524	1395	0.330	0.326	0.334
5.5	$42.93\cdot 10^{-3}$	290	780	0.585	0.590	0.597
5.5	$42.69\cdot 10^{-3}$	293	750	0.582	0.584	0.621
5.75	$60.87\cdot 10^{-3}$	204	537	0.830	0.838	0.867
6.0	$70.86\cdot 10^{-3}$	177	466	0.966	0.966	1.000
6.0	$64.89\cdot 10^{-3}$	194	510	0.884	0.881	0.914
6.25	$73.38\cdot 10^{-3}$	171	471	1.000	1.000	0.989
6.5	$63.96\cdot 10^{-3}$	196	524	0.872	0.872	0.889
6.5	$64.41\cdot 10^{-3}$	197	518	0.878	0.868	0.900
6.75	$68.22\cdot 10^{-3}$	187	519	0.930	0.914	0.898
7.0	$64.80\cdot 10^{-3}$	195	555	0.883	0.872	0.840
7.0	$61.95\cdot 10^{-3}$	208	587	0.844	0.822	0.794
7.5	$48.87\cdot 10^{-3}$	263	659	0.666	0.650	0.707

Tableau 4.2: Activité relative de l' α -CT immobilisée en fonction du pH

A la figure 4.3, on peut comparer les valeurs ci-dessus avec les mesures faites pour l'enzyme soluble, et remarquer que l'immobilisation du catalyseur ne modifie en rien l'emplacement de l'optimum du pH ni la forme de la courbe en cloche déjà observée auparavant. Kawamura et al. (1981) n'avait lui non plus pas observé de déplacement du pH optimum pour l' α -chymotrypsine liée de façon covalente à du Sepharose CL-4B (dérivé de polysaccharide insoluble). D'autres

auteurs comme Goldstein (1976) ou Brodelius (1978) ont par contre observé le contraire, et supposent que ce décalage est dû aux charges locales pouvant apparaître dans la matrice suivant le type de support utilisé. Par exemple, pour la chymotrypsine immobilisée sur un copolymère polyanionique, le pH optimum se situe à une valeur plus haute (9.5) que celui de l'enzyme native (8.3), et avec un dérivé polycationique à une valeur plus basse (7.0). La réaction de référence était l'hydrolyse de l'ester éthylique de l'acétyl-L-tyrosine.

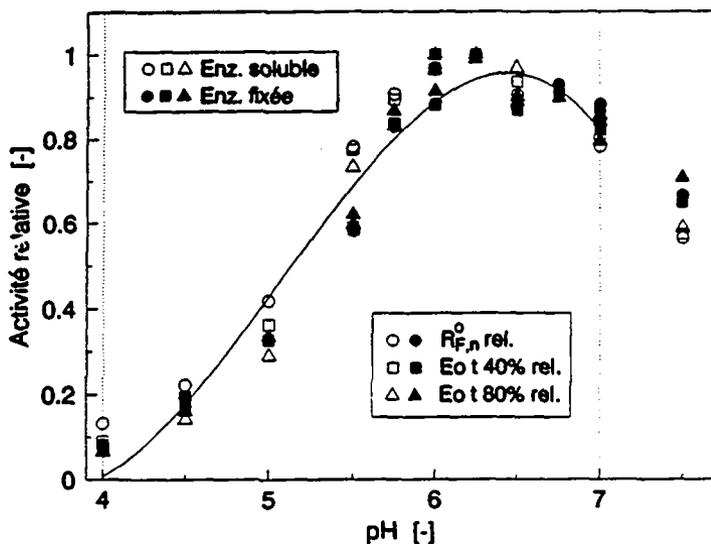


Figure 4.3: Activité relative des α -CT soluble et fixée en fonction du pH

On voit de façon nette que la courbe d'activité n'est pas symétrique par rapport au pH optimal, et qu'elle ne décroît pas aussi vite après le maximum qu'avant. Cette caractéristique n'a rien de bizarre et est probablement inhérente à l'enzyme; il faut cependant signaler qu'aux valeurs de pH les plus élevées on a rencontré quelques problèmes liés à la solubilité du substrat, qui est justement de l'ordre de $60 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ à pH 7.5. Des mesures légèrement faussées pour la vitesse et les temps de réaction auraient pu en résulter.

On a ensuite effectué quelques hydrolyses à pH constant avec le L-PAPE seul à différentes concentrations. Les courbes mesurées par acquisition de données (figure 4.4) peuvent être comparées avec les mêmes réactions, réalisées

précédemment avec l'enzyme soluble (figure 4.5). Les concentrations étudiées, ainsi que les $E_0 \cdot t$ 40% et 80% ont été reportés dans le tableau 4.3 qui suit.

S_{L0} mmol.l ⁻¹	$E_0 \cdot t$ 40% sol. g.min.l ⁻¹	$E_0 \cdot t$ 40% fix. ml.min.l ⁻¹	$E_0 \cdot t$ 80% sol. g.min.l ⁻¹	$E_0 \cdot t$ 80% fix. ml.min.l ⁻¹
10.0	0.196	281	0.583	738
20.0	0.329	347	0.884	893
30.0	0.367	408	1.043	1065
50.0	0.576	474	1.585	1233

Tableau 4.3: Comparaison entre les deux formes de l'enzyme

En faisant pour le tableau 4.3 la moyenne des rapports des $(E_0 \cdot t)$ pour l'enzyme soluble et immobilisée, on arrive au résultat suivant: 1ml d' α -CT fixée équivaut à $0.941 \cdot 10^{-3}$ g de chymotrypsine native

Les conditions expérimentales étaient les suivantes:

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = constante = 5.5

$v_{aq} = 1.0$

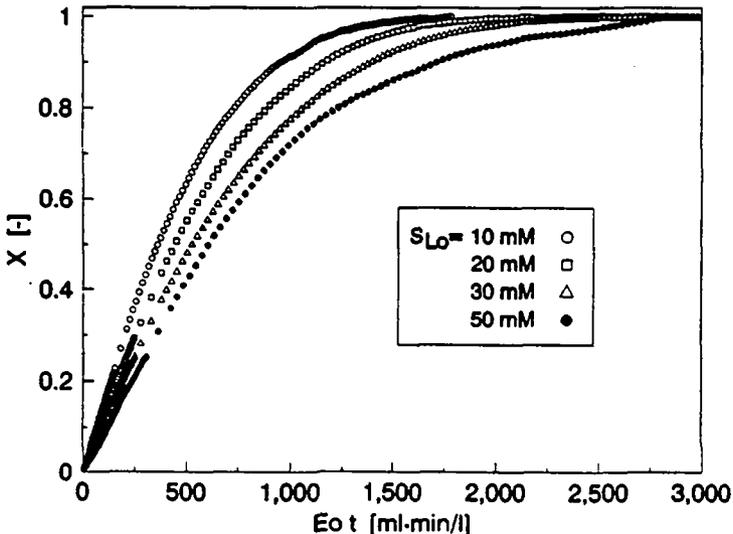


Figure 4.4: Hydrolyse du L-PAPE avec l'enzyme fixée

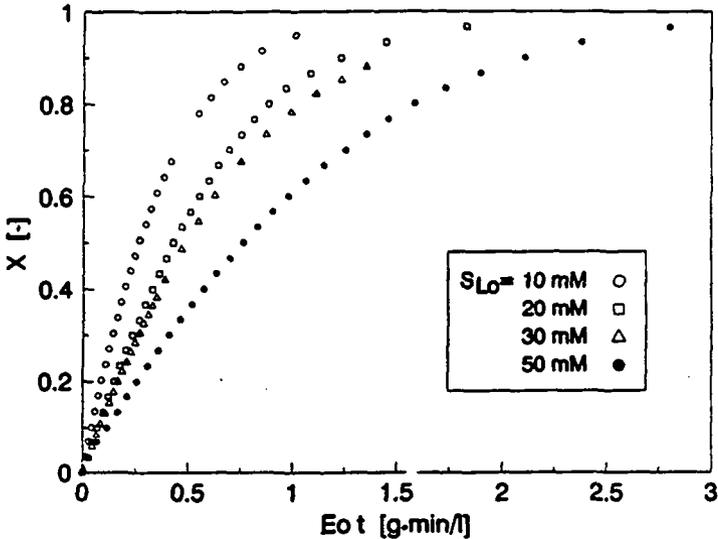


Figure 4.5: Hydrolyse du L-PAPE avec l'enzyme soluble

4.2.4 Hydrolyse du racémate à pH constant

Afin de compléter ces mesures, on a effectué quelques réactions à pH constant avec les concentrations de racémate correspondant à celles de L-PAPE étudiées précédemment. Les conditions expérimentales étaient les mêmes que pour la série d'essais précédente, et les courbes enregistrées sont reportées à la figure 4.6 ci-après.

Si on compare les figures 4.4 et 4.6, on s'aperçoit alors que la réaction se déroule plus vite avec le mélange racémique qu'avec le L-PAPE seul, malgré la présence de S_D qui est un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse (en tout cas avec l'enzyme soluble). Une inversion de l'influence du D-PAPE qui serait devenu un "effecteur" de l'enzyme immobilisée semblait néanmoins peu probable. On a alors réalisé une expérience avec une concentration en énantiomère D double de celle de L pour voir si la réaction allait encore s'accélérer. Cela n'a pas été le cas, l'effet observé étant donc déjà maximal avec le mélange racémique.

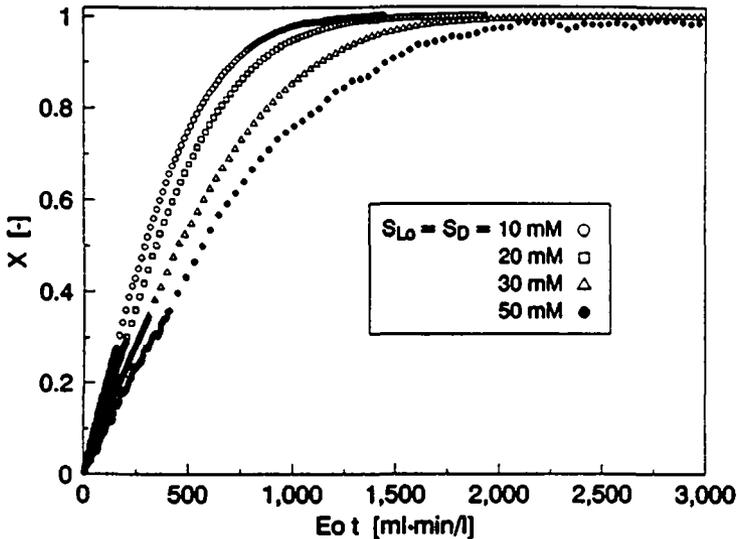


Figure 4.6: Hydrolyse du D,L-PAPE avec l'enzyme fixée

Une explication plus plausible à cette anomalie pourrait être un pH plus bas à la surface et / ou à l'intérieur du grain de catalyseur qu'au sein de la phase aqueuse, phénomène lié à un problème de transfert de matière. L'accumulation de H^+ à proximité du site actif entraînerait une baisse de l'activité enzymatique d'autant plus importante qu'à pH 5.5 le pouvoir tampon de la solution est très faible, et que la courbe d'activité de l'enzyme décroît assez rapidement. Quand par contre le D-PAPE, qui ne réagit pas, est présent dans le milieu et donc aussi dans la particule, l'inhibition compétitive dont il est le vecteur peut se trouver compensée par l'effet de tamponnage local du milieu permettant d'absorber les protons libérés par la réaction. Pour mettre ce phénomène en évidence, on a broyé l'enzyme de façon à réduire autant que possible la taille des grains de catalyseur, et à favoriser le transfert de matière. La distribution de taille ainsi obtenue est illustrée à la figure 4.7 ci-après. Elle est beaucoup plus large et aplatie qu'avant, et le diamètre moyen ainsi déterminé ($D_p(4,3) = 70.5 \pm 67.7 \mu m$) n'a pas une grande signification.

On a alors réalisé les mêmes hydrolyses du L- et du D,L-PAPE que précédemment, avec pour résultat les courbes des figures 4.8 et 4.9. On retrouve cette fois la tendance inhibitrice de l'énantiomère D à ralentir la production de

L-phénylalanine, tout en observant une vitesse plus grande pour l'hydrolyse avec l'enzyme broyée qu'avec l'enzyme fixée originale (si on compare les figures 4.5 et 4.8, ainsi que 4.6 et 4.9 respectivement).

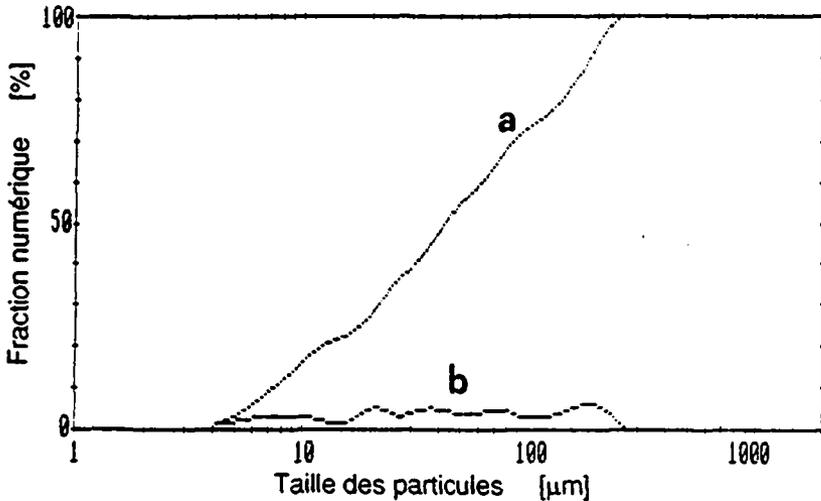


Figure 4.7: Distribution de la taille des particules pour le catalyseur broyé

Ceci tendrait donc à confirmer l'hypothèse évoquée auparavant à propos d'une baisse locale de pH et de l'effet tampon dû au substrat qui ne réagit pas. On ne peut cependant pas être sûr d'avoir complètement éliminé tout problème lié au transfert de matière, surtout au vu de la qualité du broyage effectué (voir figure 4.7). Il ne sera donc pas possible d'appliquer tel quel à l'enzyme fixée le modèle cinétique développé pour le catalyseur soluble.

On ne pourra pas non plus utiliser l'enzyme broyée pour exclure ou prendre en compte l'influence du transfert de matière interne. En effet, il n'est pas possible de distinguer si l'accélération de la réaction après broyage est due à du catalyseur se trouvant dans les pores de la particule, à une amélioration du transfert de matière par réduction de la taille des grains ou à une combinaison de ces deux effets.

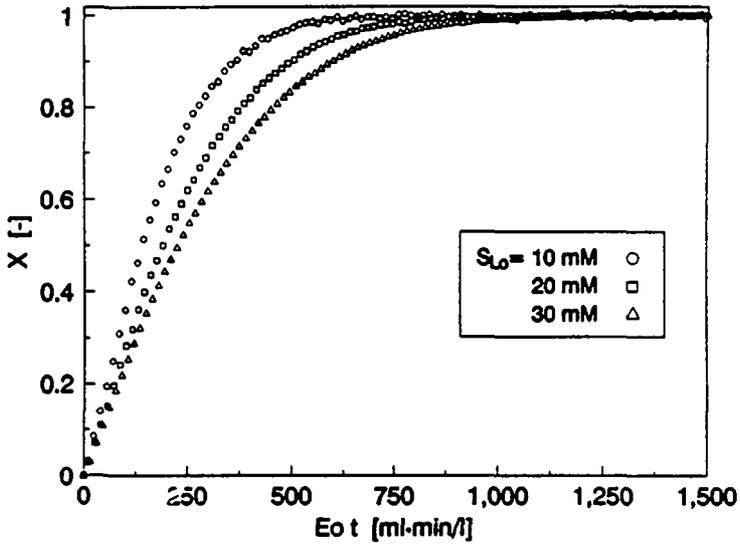


Figure 4.8: Hydrolyse du L-PAPE/HCl avec l'enzyme broyée

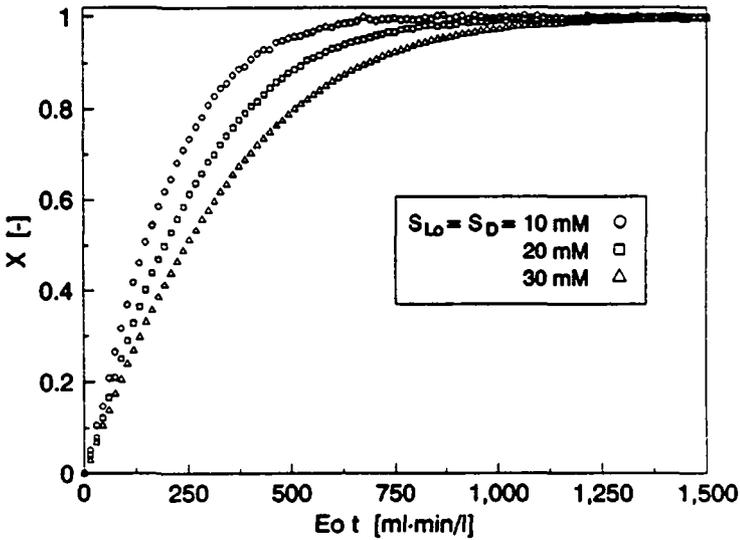


Figure 4.9: Hydrolyse du D,L-PAPE/HCl avec l'enzyme broyée

4.2.5 Influence du transfert de matière interne

Moresoli (1990) avait déterminé par calcul théorique l'efficacité du catalyseur pour la même réaction, mais à un pH un peu plus élevé à savoir 6.25. Une approche simplifiée avait conduit à un module de Thiele ϕ de 1.35, et conséquemment à une efficacité η de l'enzyme évaluée à 0.9, ce qui permettait de négliger l'influence du transfert de matière interne. Ce résultat étant à considérer d'après l'auteur avec une certaine prudence, on s'est intéressé de plus près aux particules elles-mêmes, et à une évaluation aussi directe que possible de leur porosité. Sur un échantillon pesant 0.265 g de chymotrypsine fixée convenablement préparé, on a mesuré la distribution de la taille des pores à l'aide d'un porosimètre à mercure (Porosimeter 2000 et Macropores Unit 120 de Carlo Erba Strumentazione, Rodanò (I)). La courbe de pénétration du mercure est donnée à la figure 4.10 ci-après.

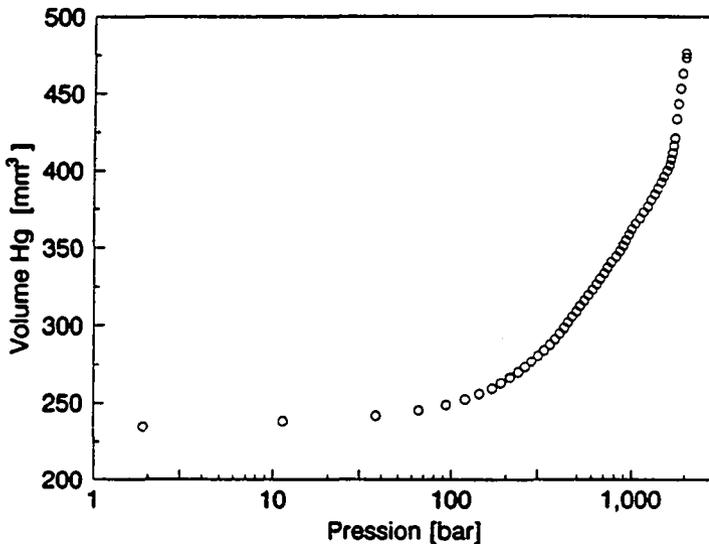


Figure 4.10: Courbe pression-volume de pénétration pour l' α -CT fixée

Le diamètre moyen des pores déterminé à partir de la courbe obtenue vaut:

$$\bar{D}_{\text{pore}} = 21.1 \mu\text{m}$$

Une seule mesure ayant pu être faite, cette valeur est assez peu fiable. Elle semble d'autant moins réaliste que la pénétration du mercure aux pressions faibles (qui correspondent aux pores les plus grands) peut être due à une désaggrégation de l'échantillon, dont les particules une fois séchées ont tendance à s'agglomérer.

C'est ce que tendent à montrer les photos 1 à 4 prises au microscope électronique à balayage de champ (microscope Cambridge Stereoscan 250), sur lesquelles on n'observe aucune faille, aucun pore de la taille annoncée. Les particules (dont la taille correspond tout à fait aux mesures faites avec le diffractomètre) sont lisses, et la couche de dépôt à leur surface compacte. L'épaisseur de cette dernière avoisine les 5 μm , et on y détecte des aspérités d'une taille tout au plus voisine voire sensiblement inférieure, comme le montrent les photos 3 et 4. Il semble donc improbable qu'une grande quantité d'enzyme se trouve localisée dans les pores des particules de silice, et qu'une limitation de la réaction par des problèmes de transfert ou de gradients de concentrations à l'intérieur de ceux-ci doive être prise en considération.



Photo 1: Particules de catalyseur, agrandies 170 fois. La surface en apparaît lisse et exempte de pores ou d'aspérités.



Photo 2: Particule de catalyseur, agrandie 945 fois. On distingue la couche de dépôt et la surface du grain de silicagel en certains endroits.



Photo 3: Surface d'un grain, agrandie 2700 fois

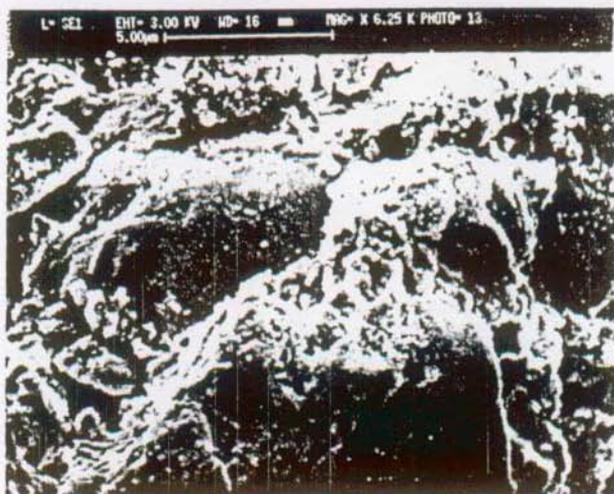


Photo 4: Détail de la photo 3. Les inégalités de la couche de dépôt que l'on peut observer ont toutes une taille inférieure au micromètre.

4.2.6 Influence du transfert de matière externe

Le transfert interne ayant pu être écarté en tant que facteur limitant, on a cherché à savoir si la diffusion à travers le film liquide stagnant à l'extérieur de la particule pouvait être la cause du comportement observé. Le calcul théorique est basé sur l'estimation du nombre de Damköhler (2) Da_{II} , qui exprime le rapport entre les vitesses maximales de réaction et de transfert par diffusion.

A l'état stationnaire, on peut écrire pour le flux diffusionnel:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{D_S}{\delta} \cdot A_p \cdot (S_b - S_R) = k_L \cdot A_p \cdot (S_b - S_R)$$

4.9

Avec: D_S = coeff. de diffusion du substrat	$[m^2 \cdot s^{-1}]$
δ = épaisseur du film stagnant	$[m]$
A_p = surface externe des particules	$[m^2]$
S_b = conc. de substrat dans le bulk	$[mmol \cdot l^{-1}]$
S_R = conc. de substrat à la surface du grain	$[mmol \cdot l^{-1}]$

On le voit, dn/dt est maximal pour $S_R = 0$. Si on se trouve à l'état stationnaire, celui-ci est contrebalancé par la vitesse de transformation et on a alors, pour une cinétique de Michaelis-Menten:

$$k_L \cdot A_p \cdot (S_b - S_R) = V_p \cdot k_2 \cdot E_1 \cdot \frac{S_R}{K_m + S_R} = r_{\text{eff}} \quad 4.10$$

Avec: $k_L = \text{coeff. de transfert de matière} = \frac{D_S}{\delta}$ $[m \cdot s^{-1}]$
 $V_p = \text{volume des particules catalytiques}$ $[l]$
 $k_2 = \text{constante de vitesse}$ $[mmol \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}]$
 $E_1 = \text{concentration d'enzyme}$ $[g \cdot (ml \text{ de cat.})^{-1}]$
 $r_{\text{eff}} = \text{vitesse de réaction mesurée}$ $[mmol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}]$

Dans le cas de la réaction (membre de droite de l'équation 4.10), c'est pour $S_R = S_b$ que la vitesse est maximale.

A partir de l'équation 4.10, et si on définit les variables adimensionnelles suivantes:

$$f_1 = \frac{S_R}{S_b} \quad \kappa = \frac{K_m}{S_b} \quad Da_{II} = \frac{k_2 \cdot E_1}{k_L \cdot a_p \cdot S_b} = \frac{V_{\text{max}}}{k_L \cdot a_p \cdot S_b} \quad 4.11$$

Avec: $a_p = \frac{A_p}{V_p}$ 4.12

L'équation 4.10 devient alors: $\frac{1 - f_1}{Da_{II}} = \frac{f_1}{\kappa + f_1}$ 4.13

Si on résoud 4.13 par rapport à f_1 , on arrive à:

$$f_1 = \frac{B}{2} \cdot \left(\pm \sqrt{\frac{4\kappa}{B^2} - 1} \right) \quad \text{Avec: } B = Da_{II} + \kappa - 1 \quad 4.14, 4.15$$

Les signes + et - dans 4.14 sont à utiliser quand $B > 0$ et $B < 0$ respectivement. Il est cependant difficile de savoir en général si les vitesses que l'on mesure correspondent à un transfert sans limitation. On définit donc un facteur d'efficacité η_x , qui exprime le rapport entre la vitesse de réaction observée r_{eff} et la vitesse sans influence du transfert ($S_R = S_b$):

$$\eta_x = \frac{f_i / (\kappa + f_i)}{1 / (\kappa + 1)} = \frac{r_{\text{eff}}}{V_{\text{max}} / (\kappa + 1)} \quad 4.16$$

La grandeur $\eta_x \cdot Da_{II}$ est par contre accessible et représente:

$$\eta_x \cdot Da_{II} = \frac{r_{\text{eff}} \cdot (\kappa + 1)}{k_L \cdot a_p \cdot S_b} \quad 4.17$$

Connaissant ou ayant estimé cette grandeur, on peut obtenir le facteur d'efficacité à partir de courbes donnant η_x en fonction de $\log(\eta_x \cdot Da_{II})$, avec κ comme paramètre. Il est ensuite possible de déterminer Da_{II} en retour à l'aide de courbes $\eta_x = f(\log(Da_{II}))$. L'itération graphique peut se poursuivre jusqu'à concordance des valeurs obtenues.

Dans le but d'estimer la vitesse maximale de transfert diffusionnel, on a utilisé les valeurs suivantes, trouvées dans la littérature pour des composés de structure et de taille aussi proches que possible de celles du PAPE.

$D_S = 9.15 \cdot 10^{-10}$	$[m^2 \cdot s^{-1}]$	(Phénylalanine, 37 °C) (Uddin et al., (1990))
$k_L = 5.09 \cdot 10^{-5}$	$[m \cdot s^{-1}]$	(Saccharose, invertase immobilisée, $D_p = 0.2$ mm) Geankoplis et al., (1987))
$D_p = 200$	$[\mu m]$	(Diamètre des particules, mesuré par diffraction laser (cf sous-chapitre 4.2.1))

en divisant D_S par k_L , on arrive à une valeur d'environ 20 μm pour δ , ce qui semble raisonnable.

Prenons comme exemple la réaction montrée à la figure 4.6 avec l'enzyme non broyée et le L-PAPE 50 $mmol \cdot l^{-1}$ ($= S_b$). Si on suppose que le K_m n'a pas trop changé suite à l'immobilisation, on a alors: $\kappa \approx 17/50 = 0.34$ [-]. La vitesse initiale de réaction qu'on a estimée pour cet essai vaut: $r_{\text{eff}} = 0.0212$ [$mmol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}$].

La concentration d'enzyme immobilisée dans le réacteur vaut 30 $ml \cdot l^{-1}$, ce qui correspond à une fraction volumique des particules solides ϵ_p de 0.03 [-]. L'aire spécifique vaut alors $a_p = 6 \cdot \epsilon_p / D_p = 6 \cdot 0.03 / (0.2 \cdot 10^{-3}) = 900$ [m^{-1}].

D'après l'équation 4.17, on arrive finalement au résultat suivant:

$$\eta_x \cdot Da_{II} = \frac{r_{\text{eff}} \cdot (\kappa + 1)}{k_L \cdot a_p \cdot S_b} \approx 0.012 \quad [-]$$

Avec un $\log(\eta_x \cdot Da_{II}) = -1.91$, on trouve même sans faire plusieurs itérations un facteur d'efficacité de l'enzyme supérieur à 95 % pour toute valeur de κ , et par voie de conséquence un Da_{II} nettement inférieur à 1. Ceci tendrait donc à éliminer toute possibilité que le transfert par diffusion dans le film soit responsable du comportement étrange de la réaction avec l'enzyme immobilisée, d'autant plus que la valeur du k_L donnée par Geankoplis et al. (1987) avait été déterminée pour une valeur du nombre de Reynolds de 0.358, qui est nettement inférieure à ce qu'on obtient dans un réacteur agité comme celui où la réaction étudiée ci-avant a été réalisée.

Bien que ce dernier résultat soit à considérer avec une certaine prudence, la ou les causes de l'accélération de la réaction en présence de S_D devront donc être cherchées ailleurs que dans les transferts extra- ou intraparticulaires. Le fait que le phénomène s'atténue lorsqu'on travaille à des pH plus proches de $pK_a(S)$ est en tout cas une indication que le pouvoir tampon, local ou non, joue un rôle important dans ce processus.

4.2.7 Hydrolyse en système biphasique dans le réacteur fermé

Après les premiers essais avec une phase liquide aqueuse, on a réalisé deux hydrolyses avec l'enzyme immobilisée en présence de 10 % volumiques de solvant organique, l'une à un pH constant de 5.5 et l'autre à 6.0. Les courbes obtenues par titrimétrie sont reportées à la figure 4.11 ci-après, dont la légende donne également les conditions de réaction. Il est utile de préciser que le volume de la phase aqueuse doit être compris comme la somme des volumes de la solution aqueuse et de l'enzyme immobilisée. On a donc dû tenir compte de ce fait pour le calcul des concentrations et des fractions volumiques.

Aux mêmes conditions de concentrations et de fractions volumiques, on a également réalisé deux hydrolyses à pH flottant, l'une partant de pH 6.10 et l'autre de 6.25. L'évolution du pH était suivie en continu et le taux de conversion déterminé par analyse HPLC (valeurs mesurées en annexe). Les résultats obtenus sont quant à eux reportés à la figure 4.12 ci-après, sur laquelle on a tracé en pointillé à titre de comparaison la courbe d'hydrolyse à un pH constant de 6.0.

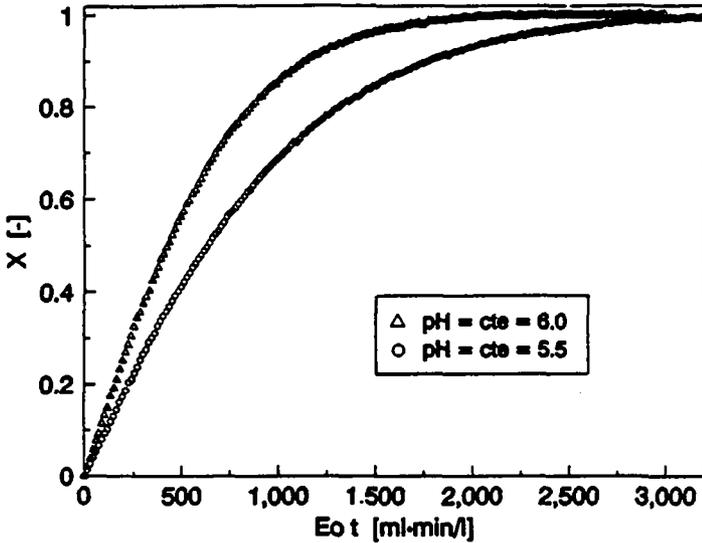


Figure 4.11: Hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $S_{Lo} = S_D = 30\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, pH constant

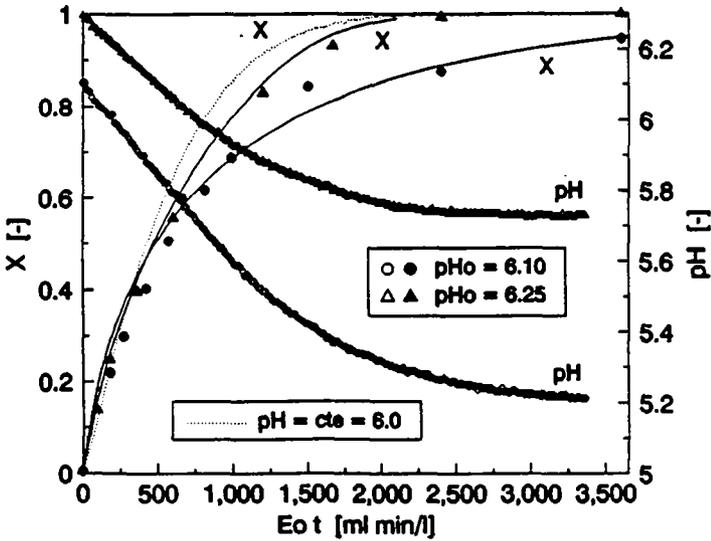


Figure 4.12: Hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $S_{Lo} = S_D = 30\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, pH flottant

Une fois de plus on constate qu'à ces conditions, 10 % volumiques de phase organique suffisent pour convertir tout le L-PAPE sans que le pH chute de plus d'une unité en partant de 6.1, et de 0.6 unité en partant de 6.25. Par conséquent l'activité de l'enzyme et le pouvoir tampon du système restent au voisinage de l'optimum, et la réaction est presque aussi rapide qu'à pH constant.

On a essayé d'appliquer aux résultats obtenus le modèle développé pour l'évolution du pH en fonction du taux de conversion. On peut constater à la figure 4.13 que la correspondance est bien meilleure pour ces essais que pour ceux réalisés avec l'enzyme soluble. Ceci s'explique si on compare les valeurs absolues des vitesses initiales de réaction dans les deux cas. Celles enregistrées avec l'enzyme soluble, voisines de $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, étaient trop importantes pour que le système reste à l'équilibre supposé par le modèle. Par contre avec l'enzyme immobilisée, on se situe aux environs de $1.2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, ce qui est suffisamment lent pour que les concentrations dans chacune des phases restent proches de leur valeur à l'équilibre, d'où la bonne concordance avec l'évolution calculée. Les deux valeurs de la vitesse de réaction données ci-avant ont été obtenues avec la pente en $X = 0$ mesurée sur la courbe d'hydrolyse à $\text{pH} = 6.0$ de la figure 4.11 pour l'enzyme immobilisée, et par calcul à l'aide des paramètres cinétiques du tableau 3.16 pour l' α -CT soluble.

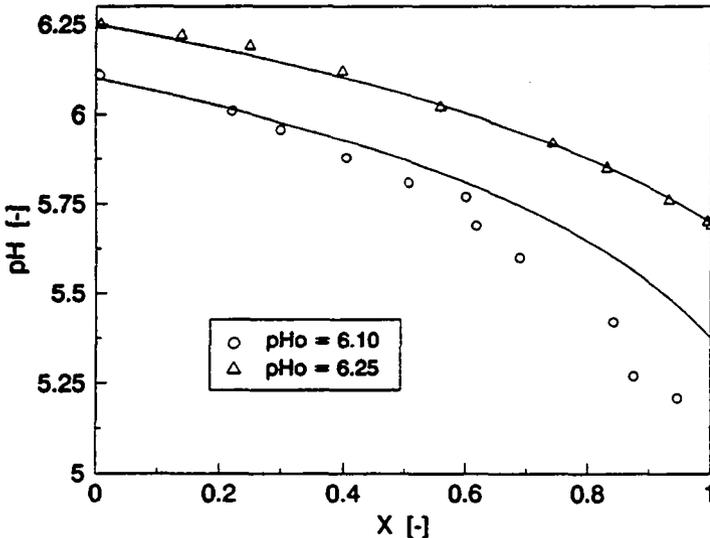


Figure 4.13: $\text{pH} = f(X)$: valeurs mesurées et calculées

4.3 REACTION EN CONTINU

Sur la base des résultats qui précèdent, on a donc conçu l'installation pour l'hydrolyse du PAPE en continu déjà décrite dans la partie expérimentale (cf figure 2.4). On rappellera ici la nature de ses deux composantes principales:

- La cuve cylindrique d'un volume de 2l, agitée mécaniquement par une turbine et équipée de chicanes. On y dispersait les phases aqueuse et organique sous forte agitation, et on y ajustait le pH à sa valeur initiale.
- Le réacteur lui-même, composé d'une colonne pour la chromatographie remplie d'enzyme immobilisée. L'émulsion formée par les deux phases y était pompée aux débits imposés par une pompe à piston.

Pour tous les essais réalisés avec l'installation en continu (à la seule exception du premier), on s'est fixé les conditions mentionnées dans le tableau 4.4 ci-dessous:

$T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ $S_{L0} = S_D = 30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $v_{\text{aq}} = 0.9 \text{ [-]}$ $\text{pH}_0 = 6.25$
--

Tableau 4.4: Conditions expérimentales pour les essais en continu

4.3.1 Essais avec le lit fixe de 25 ml

Le réacteur utilisé contenait un lit fixe d'enzyme de volume total $V_{\text{lit}} = 25 \text{ ml}$ et de porosité $\epsilon = 0.47$. Le diamètre intérieur de la colonne étant de 10 mm, la hauteur du lit valait donc 318 mm. Connaissant le débit de la pompe Q , le temps de passage τ se calculait comme:

$$\tau = \frac{V_{\text{lit}} \cdot \epsilon}{Q} = 0.47 \cdot \frac{V_{\text{lit}}}{Q}$$

Comme de plus la concentration de l'enzyme est donnée par rapport au volume de phase aqueuse, on la définira de la façon suivante:

$$E_0 = \frac{1000}{1 \cdot (1 - \varepsilon) + 1 \cdot \varepsilon \cdot v_{aq}} = \frac{1000}{1 - \varepsilon \cdot (1 - v_{aq})} \quad [\text{ml} \cdot \text{l}^{-1}] \quad 4.19$$

Le temps de réaction normalisé $E_0 \cdot \tau$ vaut par conséquent:

$$E_0 \cdot \tau = \frac{1000}{1 - \varepsilon \cdot (1 - v_{aq})} \cdot \varepsilon \cdot \frac{V_{lit}}{Q} \quad 4.20$$

Lors du premier essai, on a voulu vérifier l'effet de la chute de pH sur la performance du réacteur continu. On a donc pompé à travers le lit une solution de D,L-PAPE 60 mmol.l⁻¹ 100 % aqueuse et non tamponnée. Comme le montrent les résultats du tableau 4.5, le pH descend de plus de 3.5 unités à cause du faible pouvoir tampon du milieu et le taux de conversion ne dépasse pas 35 %, même pour les temps de séjour les plus élevés. L'enzyme doit donc être rapidement désactivée par l'acidité du milieu, et une grande partie du lit catalytique rendue totalement inactive.

Q [ml.min ⁻¹]	Δp [bar]	E ₀ · τ [ml.min ⁻¹ · l ⁻¹]	pH	[PAPE] [mmol.l ⁻¹]	[L-Phe] [mmol.l ⁻¹]	X [-]
1.50	3	7833	2.52	50.6	11.1	0.37
3.29	5	3571	2.57	52.8	8.5	0.30
4.98	7	2359	2.64	53.8	8.0	0.27
7.23	10	1625	2.69	54.0	7.6	0.26

Tableau 4.5: Hydrolyse avec le lit de 25 ml, v_{aq} = 1.0, pH₀ = 6.25

On a ensuite fait la même expérience, mais cette fois avec le MIBK présent à raison de 10 % v/v (↔ v_{aq} = 0.9). On a pu alors s'assurer que la dispersion des deux phases préparée dans la cuve agitée était suffisamment stable pour traverser le lit catalytique sans qu'une coalescence trop importante ait lieu. En effet, les gouttelettes de solvant à la sortie du réacteur avaient une taille tout à fait similaire à celle observée à l'entrée. Aux débits les plus importants, soit aux environs de 10 ml.min⁻¹, on a même parfois récupéré des émulsions encore plus fines, très lentes à se séparer. Cette observation est certainement à mettre sur le compte des

turbulences dans le lit, et des propriétés tensio-actives de la phénylalanine et du PAPE.

Les résultats obtenus lors de ce deuxième essai sont reportés dans le tableau 4.6 ci-après. Le taux de conversion aux mêmes débits qu'auparavant est notablement plus important et avoisine les 70 %. Par contre, même si les temps de séjour varient d'un facteur voisin de 7.5, la valeur de X reste pratiquement constante. Cette dernière a été calculée sur la base de la concentration de phénylalanine mesurée dans l'échantillon, et il en sera ainsi pour tous les autres essais de la série. En effet, ce produit n'étant pas sujet à un partage biphasique, on est sûr de le trouver quantitativement dans la phase aqueuse. On s'assurait néanmoins de récupérer le maximum de substrat en mélangeant intimement l'échantillon avec le même volume de HCl 1N (cf partie expérimentale, chapitre 2.1), et on peut voir que la somme des concentrations de PAPE et de L-Phe reste la plupart du temps proche de 60 mmol.l^{-1} .

Q [ml.min ⁻¹]	Δp [bar]	$E_0 \cdot \tau$ [ml.min ⁻¹ .l ⁻¹]	pH [-]	[PAPE] [mmol.l ⁻¹]	[L-Phe] [mmol.l ⁻¹]	X [-]
1.54	4	8006	4.84	34.6	24.7	0.82
1.54	4	8006	4.36	33.6	20.8	0.69
3.33	6	3703	4.08	38.9	20.7	0.69
8.16	10	1511	3.97	39.7	19.9	0.66
11.43	13	1079	4.30	39.1	18.2	0.61

Tableau 4.6: Hydrolyse avec le lit de 25 ml, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$

Lors de l'essai suivant on n'a analysé que la phase aqueuse sortant du réacteur et pour le temps de séjour le plus long, on a traité l'échantillon aqueux de deux façons différentes, qui sont indiquées dans le tableau 4.7 par "*" et "**":

- *: l'échantillon de phase aqueuse a été mélangé avec un volume égal de HCl 1N avant d'être séché à l'étuve sous vide et dissous à nouveau dans l'éluant HPLC.
- ** : l'échantillon a été dilué directement dans l'éluant et analysé sans autre traitement

Le résultat obtenu étant pratiquement identique dans les deux cas, on a gardé comme technique celle demandant le moins de manipulations, à savoir la dilution directe. A la fin de l'essai, on est revenu à ce même débit pour voir si la conversion obtenue était reproductible et si l'enzyme n'était pas affectée d'une quelconque façon pendant la durée de fonctionnement de l'installation. Cette mesure est quant à elle signalée par un "#", et la valeur de X mesurée semblable aux deux précédentes. On observe par contre une valeur du pH plus basse.

Comme on ne dose que le PAPE se trouvant en phase aqueuse, on a divisé les concentrations mesurées par la fraction de substrat en phase aqueuse pour $v_{aq} = 0.9$ et aux conditions de pH à la sortie du réacteur pour obtenir les valeurs de [PAPE] reportées dans le tableau 4.7. La méthode donne des résultats tout à fait satisfaisants, les bilans pour cette série se trouvant tous dans une plage qui va de 91 à 104 %.

Q [ml.min ⁻¹]	Δp [bar]	$E_0 \cdot \tau$ [ml.min ⁻¹ .l ⁻¹]	pH [-]	[PAPE] [mmol.l ⁻¹]	[L-Phe] [mmol.l ⁻¹]	X [-]
1.50	4	8220	4.49	37.4	23.6	0.79
1.50*	4*	8220*	4.49*	39.9*	22.3*	0.74*
1.50**	4**	8220**	4.49**	39.2**	22.7**	0.76**
1.50#	4#	8220#	4.26#	32.3#	22.3#	0.74#
3.34	5	3691	3.95	38.9	20.5	0.68
5.21	7	2367	3.80	38.6	22.4	0.75
6.82	8	1808	3.87	40.0	19.7	0.66

Tableau 4.7: Hydrolyse avec le lit de 25 ml, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$

Bien que les premières mesures pour la réaction continue en présence de MIBK soient encourageantes, on se trouve confronté à divers problèmes:

- Si on compare les taux de conversion obtenus grâce au lit fixe avec ceux enregistrés aux mêmes conditions dans la cuve agitée, on constate des différences importantes. Alors que la conversion totale est atteinte rapidement (aux environs de 2500 ml.min⁻¹.l⁻¹) dans le réacteur fermé, on dépasse à peine 75 % avec le réacteur continu, et ce même à des temps supérieurs à 7500 ml.min⁻¹.l⁻¹. On se heurte donc visiblement à une limite supérieure dans les taux de conversion atteignables.

- Si la chute de pH à travers le lit est moindre grâce aux 10 % v/v de MIBK ajoutés à la phase aqueuse simple, elle reste quand même bien supérieure à ce que prévoit le modèle, modèle d'ailleurs tout à fait en accord avec les mesures dans la cuve agitée. La valeur enregistrée à la sortie de la colonne est de plus très longue à se stabiliser et il arrive même, comme le montre le tableau 4.7, qu'elle évolue dans le faux sens, à savoir une augmentation du pH quand X croît.

- On est limité vers le haut dans la plage de débits (et donc de temps de séjour) atteignables dans le réacteur tubulaire. En effet, tous les taux de conversion mesurés sont plus grands que 0.6, les valeurs inférieures correspondant à des flux difficiles à atteindre à cause de la perte de charge à travers le lit catalytique; cette dernière est de plus fluctuante et peu reproductible, mais devient de toute façon trop élevée quand le débit dépasse $12 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.3.2 Essais avec le lit fixe de 4.2 ml

Q [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]	Δp [bar]	$E_0 \cdot \tau$ [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$]	pH [-]	[PAPE] [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	[L-Phe] [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	X [-]
1.43	9	1433	6.06	44.3	25.2	0.79
2.36	11	868	6.04	44.6	23.0	0.74
3.23	14	634	6.03	46.6	20.6	0.76

Tableau 4.8: Hydrolyse avec le lit de 4.2 ml, $v_{aq} = 0.9$, $\text{pH}_0 = 6.25$ (Essai 1)

Q [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]	Δp [bar]	$E_0 \cdot \tau$ [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$]	pH [-]	[PAPE] [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	[L-Phe] [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	X [-]
9.09	15	225	5.56	52.2	10.9	0.36
7.23	14	283	5.51	50.4	12.8	0.43
5.27	25	389	5.45	49.3	15.2	0.51
5.27	25	389	5.49	51.0	16.2	0.54
4.14	14	495	5.40	48.2	16.6	0.55
3.29	12	623	5.30	46.5	18.3	0.61
2.33	6	879	5.24	44.7	20.6	0.69
1.46	10	1404	5.05	40.5	22.3	0.74

Tableau 4.9: Hydrolyse avec le lit de 4.2 ml, $v_{aq} = 0.9$, $\text{pH}_0 = 6.25$ (Essai 2)

Afin d'avoir accès à des valeurs de $E_0 \cdot \tau$ (i.e. de X) plus intéressantes, on a donc réduit le volume du réacteur en utilisant cette fois une colonne HPLC en inox d'un diamètre interne de 4.6 mm et de 250 mm de long. Avec ce lit catalytique de 4.2 ml, on a procédé à deux essais aux mêmes conditions que précédemment, dont les résultats sont présentés dans les tableaux 4.8 et 4.9 ci-avant.

4.3.3 Essais avec le lit de 4.2 ml et l'enzyme diluée

On s'est alors rendu compte que les temps de séjour accessibles étaient encore trop élevés. Il était cependant difficilement envisageable de diminuer encore la taille du réacteur, le rapport $D_{\text{tube}}/D_{\text{particule}}$ étant déjà passé de 45 pour le lit de 25 ml à 20 pour la colonne HPLC. On a donc décidé de diluer l'enzyme dans le lit, si possible avec des grains de mêmes caractéristiques mécaniques que ceux du catalyseur. On a donc pour cela désactivé totalement une certaine quantité d'enzyme en la laissant sous agitation pendant 15 h dans du HCl 1 N à 70 °C. Après refroidissement et lavage on a mélangé un volume d' α -CT active avec trois volumes d'enzyme inerte. On obtient ainsi un lit catalytique quatre fois moins actif que le précédent, qui permet d'accéder à des $E_0 \cdot \tau$ quatre fois plus petits, par diminution cette fois de E_0 et non de τ . Les mesures faites avec l'enzyme diluée dans la colonne HPLC sont reportés dans le tableau 4.10.

Q [ml·min ⁻¹]	Δp [bar]	$E_0 \cdot \tau$ [ml·min ⁻¹ ·l ⁻¹]	pH [-]	[PAPE] [mmol·l ⁻¹]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
8.62	16	59	6.03	54.1	5.7	0.19
5.35	12	96	6.01	60.7	6.9	0.23
3.50	9	146	6.00	53.1	9.1	0.30
2.49	5	206	5.95	51.8	12.0	0.40
1.36	2	377	5.90	55.0	13.3	0.44
0.45	1	1138	5.60	29.9	21.1	0.70

Tableau 4.10: Hydrolyse avec le lit de 4.2 ml (α -CT diluée), $v_{\text{aq}} = 0.9$, $\text{pH}_0 = 6.25$

Afin de voir si la limitation observée pour le taux de conversion avait un caractère définitif, on a fait passer un volume important de dispersion à travers le réacteur à un débit supposé constant, mais qui a fluctué tout au long de l'essai entre 1.0 et 1.7 ml·min⁻¹ sans qu'on change le réglage de la pompe. Le volume récolté à la sortie du réacteur a alors été remis dans la cuve agitée et son pH ajusté

à nouveau à la valeur initiale de 6.25. Le mélange a alors passé une seconde fois dans le réacteur. et on a pu observer une augmentation du taux de conversion (valeurs marquées d'un "#") par rapport au premier passage, comme le montre le tableau 4.11. X a été calculé comme d'habitude sur la base de la concentration de phénylalanine mesurée, mais par rapport à un total de $64 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pour [PAPE] + [L-Phe]. On peut également constater le comportement erratique et les valeurs excessives de la perte de charge à travers le lit, qui n'a pratiquement jamais eu de comportement stable ou reproductible tout au long de ces essais.

Q [ml·min ⁻¹]	Δp [bar]	$E_0 \cdot \tau$ [ml·min ⁻¹ ·l ⁻¹]	pH [-]	[PAPE] [mmol·l ⁻¹]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
1.46	12	351	5.76	40.6	24.0	0.74
1.10	18	466	5.76	41.2	23.3	0.72
1.10	20	466	5.72	40.2	22.5	0.72
1.01	20	507	5.74	41.0	22.9	0.72
1.25	30	410	5.75	42.8	21.2	0.66
1.67#	18#	307#	5.90#	31.5#	26.0#	0.81#
1.67#	11#	307#	5.82#	32.3#	26.1#	0.82#
1.52#	24#	337#	5.79#	33.0#	28.9#	0.90#

Tableau 4.11: Hydrolyse avec le lit de 4.2 ml (α -CT diluée), $v_{aq} = 0.9$
 $pH_0 = 6.25$. Avec deuxième passage à travers le lit (#),
à partir d'un taux de conversion de 0.72.

4.3.4 Comparaison des résultats

On a finalement regroupé toutes les mesures en continu sur le graphique 4.14 ci-après. Chaque symbole correspond à une série de mesures, caractérisée par le volume du lit et le type d'enzyme utilisés. On peut constater que malgré la disparité des types et des volumes de remplissage évoquée auparavant, les mesures se complètent assez bien et qu'une évolution plus ou moins continue de X en fonction du temps de passage se dégage de l'ensemble. Le taux de conversion affichant un net plateau vers les hautes valeurs de $E_0 \cdot \tau$, on a sommairement modélisé son comportement en optimisant selon Marquardt les constantes A et B d'un modèle de la forme:

$$X = \frac{A \cdot E_0 \cdot \tau}{B + E_0 \cdot \tau}$$

4.21

Avec pour résultat:

$$A = 0.79 \text{ [-]}$$

$$B = 155 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$$

Le modèle n'a aucune signification physique, mais permet au moins d'estimer la conversion limite atteignable, soit 79 %.

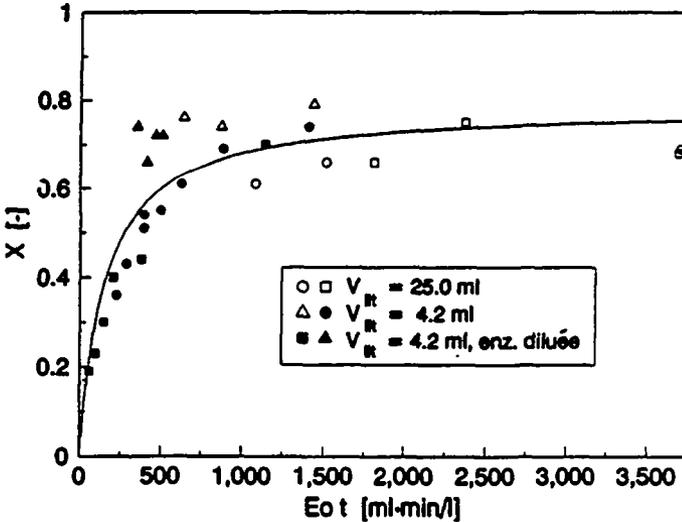


Figure 4.14: Mesures avec le réacteur continu

Autre phénomène remarquable: si on compare les dérivées des courbes pour les figures 4.12 ($\text{pH}_0 = 6.25$) et 4.14, on observe qu'aux faibles taux de conversion, la vitesse de réaction est plus élevée dans le réacteur tubulaire, avant de redevenir inférieure à celle dans la cuve agitée aux environs de $X = 0.47$. Cette constatation pour le moins intéressante est cependant à considérer avec prudence, et pourrait n'être due qu'aux erreurs de mesure et d'analyse (plus importantes aux faibles temps de séjour et conversions), et aux différentes concentrations et qualités d'enzyme utilisées. Cette tendance se devait donc d'être vérifiée et étudiée plus en détail en cas de confirmation.

Auparavant on s'est intéressé, pour les résultats des tableaux 4.5 à 4.11, à l'évolution du pH en fonction du taux de conversion. Celle-ci est présentée à la figure 4.15, avec comme référence la courbe correspondant au modèle théorique ainsi que les points mesurés dans le réacteur fermé. On n'y retrouve pas du tout la même continuité qu'à la figure précédente: premièrement, comme on l'a déjà évoqué, le pH n'évolue parfois pas dans le bon sens avec le lit le plus volumineux, c-à-d. qu'il augmente en même temps que le taux de conversion. De plus, on constate tout de suite que les valeurs du pH mesurées à la sortie du réacteur continu sont pratiquement toutes trop basses par rapport à l'équilibre symbolisé par la courbe théorique. L'écart est d'autant plus important que l'activité et la concentration de l'enzyme sont grandes. En effet, les pH finals les plus bas correspondent au lit d'enzyme de 25 ml, après lequel on enregistre des pH inférieurs à 4, pour lesquels l'enzyme est totalement inactive. On se rapproche de la courbe avec celui de 4.2 ml, où la concentration d'enzyme est pourtant la même mais dont le volume est plus petit. Un des deux essais présentés se trouve même bizarrement au dessus de la courbe sans qu'une explication ait pu être trouvée à ce phénomène, les deux expériences ayant été réalisées dans des conditions identiques.

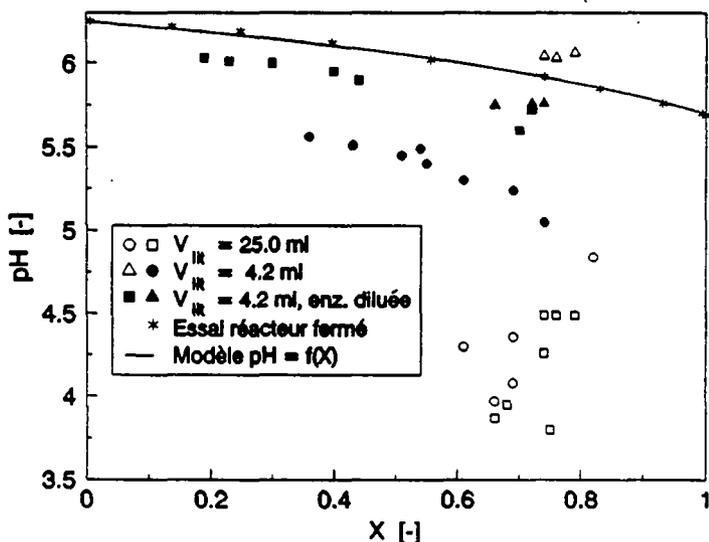


Figure 4.15: $pH = f(X)$ pour la réaction en continu

Il se pourrait cependant qu'un reste de tampon phosphate (pH 7.5) avec lequel on purge le réacteur entre deux essais soit responsable de cette "anomalie", vu que le pH est identique pour les trois valeurs de X mesurées. Dans le cas du lit catalytique de 4.2 ml composé d'enzyme "diluée", on se rapproche encore de la courbe d'équilibre. L'explication de ce phénomène repose certainement sur les mêmes bases que celle proposée pour les essais à pH flottant avec l'enzyme soluble, à savoir un transfert de substrat neutre à travers l'interface phase organique / phase aqueuse trop lent par rapport à la vitesse de réaction pour limiter efficacement la chute du pH. Si l'équilibre est pratiquement conservé dans la cuve agitée aux mêmes conditions, c'est que la concentration d'enzyme n'y est que de 30 ml^{-1} , alors qu'elle est plus de 30 fois plus grande dans le réacteur continu. Indication supplémentaire: quand on laissait quelques ml de dispersion sous agitation après la prise, on observait une remontée lente mais régulière du pH de l'échantillon. Cette hypothèse pourrait également expliquer le plateau observé avec le taux de conversion, pour autant que ce dernier ne soit pas dû à un autre phénomène limitant comme le transfert de matière du substrat depuis la phase aqueuse vers la surface du catalyseur. On conçoit facilement cependant que l'équilibre des concentrations entre les deux phases liquides soit encore moins rapidement atteint à l'intérieur du lit catalytique que dans le réacteur agité, et qu'à vitesses de réaction comparables le premier affiche des performances moindres.

4.4 IDENTIFICATION DU TRANSFERT LIMITANT

On s'est efforcé ici de faire une discrimination entre les hypothèses proposées pour expliquer les limitations observées, tout en affinant la qualité des mesures pour la réaction avec l'enzyme immobilisée à pH flottant. Dans ce but, on a préparé un nouveau lot de chymotrypsine diluée, en quantité suffisante pour qu'il soit possible d'utiliser le même préparat dans les diverses installations tout au long de la série d'essais, qui comportait trois étapes:

Lors de la première on a réalisé deux hydrolyses dans le réacteur fermé, où les trois phases sont mises en contact aussi intime que possible à l'aide d'un agitateur magnétique. On a utilisé pour cela deux vitesses d'agitation différentes: la première de 500 et l'autre de 250 min^{-1} environ.

On a ensuite procédé à deux essais avec le réacteur tubulaire, selon le même mode opératoire que celui précédemment décrit.

La réaction a également été menée à bien dans un troisième type de réacteur, à savoir la cuve agitée munie d'une boucle de recirculation passant à travers un lit catalytique de faible volume. Cette installation a déjà été décrite au sous-chapitre 2.1.3. La colonne où se trouve le catalyseur a un diamètre intérieur de 22 mm. L'avantage d'une telle configuration réside dans le fait qu'on peut faire varier la vitesse débitante à travers le lit indépendamment du temps de contact entre l'enzyme et les réactifs. De plus, l'agitation régnant dans la cuve ainsi que le volume de cette dernière permettent de supposer que les concentrations y sont constamment en équilibre. On ne devrait donc mesurer ici que l'influence du transfert de matière de la phase aqueuse vers le grain de catalyseur, et ce à divers degrés de turbulence à l'intérieur de la partie réactive de la boucle.

Les expériences réalisées sont décrites en détail dans le tableau 4.12 ci-après alors que les conditions expérimentales, toujours les mêmes, sont rappelées encore une fois:

$$T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$S_{L0} = S_D = 30\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$$

$$v_{aq} = 0.9$$

$$pH_0 = 6.25$$

ESSAI	REACTEUR	CONDITIONS
STR1	Fermé	$E_0 = 30\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ (Enz. "active") Agitation: 500 min^{-1}
STR2	Fermé	$E_0 = 30\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ (Enz. "active") Agitation: 250 min^{-1}
TUB1	Tubulaire	$V_{lit} = 4.2\text{ ml}$ (Enz. "diluée"), $\epsilon = 0.47$
TUB2	Tubulaire	$V_{lit} = 4.2\text{ ml}$ (Enz. "diluée"), $\epsilon = 0.47$
REC1	Cuve + recirc.	$V_{lit} = 25\text{ ml}$ (Enz. "diluée"), $\epsilon = 0.47$ $h_{lit} = 66\text{ mm}$ $V_{cuve} = 169\text{ ml}$, $V_{boucle} = 23\text{ ml}$ $\dot{V}_R = 30.0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
REC2	Cuve + recirc.	$V_{lit} = 5\text{ ml}$ (Enz. "diluée"), $\epsilon = 0.47$ $h_{lit} = 13\text{ mm}$ $V_{cuve} = 169\text{ ml}$, $V_{boucle} = 21\text{ ml}$ $\dot{V}_R = 30.0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
REC3	Cuve + recirc.	$V_{lit} = 5\text{ ml}$ (Enz. "diluée"), $\epsilon = 0.47$ $h_{lit} = 13\text{ mm}$ $V_{cuve} = 169\text{ ml}$, $V_{boucle} = 21\text{ ml}$ $\dot{V}_R = 7.1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$

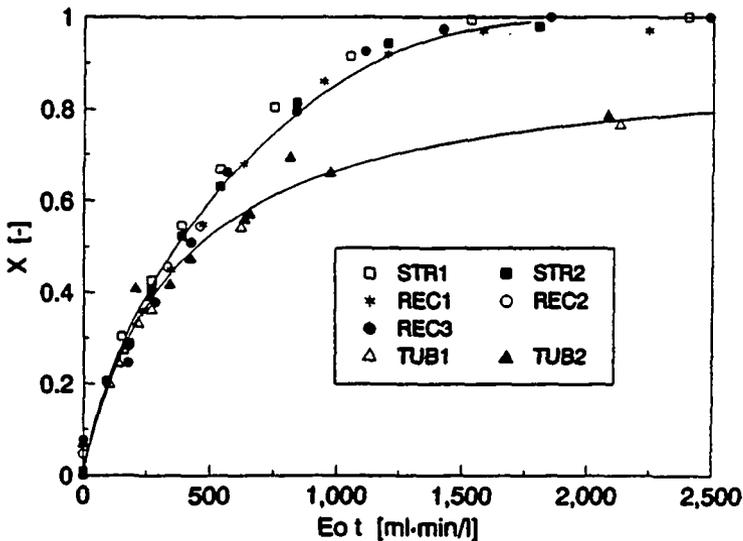
Tableau 4.12: Caractéristiques des trois installations utilisées.

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.16, qui montre l'évolution mesurée pour le taux de conversion dans les différentes expériences. Les valeurs mesurées pour les concentrations et le pH sont données dans des tableaux en annexe. On a utilisé deux modèles simples pour tracer les courbes pleines sur le graphique. La courbe du haut, qui passe à travers les points de la cuve agitée et du réacteur avec recirculation, est définie par:

$$E_o \cdot t = 86.60 \cdot X - 218.07 \cdot \ln(1-X) + 689.14 \cdot X^2 \quad [\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{l}^{-1}] \quad 4.22$$

La courbe du bas, quant à elle, a pour expression:

$$X = \frac{0.912 \cdot E_o \cdot t}{367.1 + E_o \cdot t} \quad [-] \quad 4.23$$

**Figure 4.16:** Evolution de X en fonction de E_ot pour les trois réacteurs

On constate:

- Que la vitesse de réaction dans le réacteur tubulaire est cette fois toujours inférieure à celle dans la cuve agitée. La tendance observée ne se vérifie donc pas, et était certainement due aux erreurs d'analyse et/ou à des fluctuations de l'activité enzymatique entre les différents lots utilisés. La figure 4.17 ci-après représente l'évolution des vitesses de réaction en fonction de X, qui correspondent aux valeurs de $S_{L0} \cdot \frac{dX}{dE_0 \cdot t} = f(X)$ pour chacune des deux équations 4.22 et 4.23.

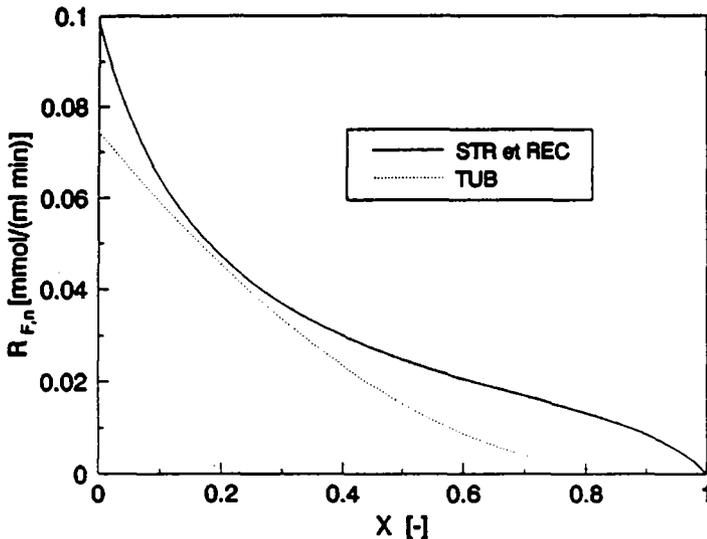


Figure 4.17: Vitesse de réaction en fonction de X

- Que la conversion est toujours très nettement plus faible dans le réacteur tubulaire que dans le système fermé, mais avec une valeur maximale prédite par le modèle qui se situe maintenant à 0.91. On peut donc raisonnablement penser qu'il n'y a en fait pas de limite à proprement parler aux taux de conversion théoriquement accessibles avec le réacteur tubulaire, mais que ceux-ci ne peuvent être atteints dans des temps raisonnables à cause de transferts limitants.

- Qu'on n'observe pas d'influence de la vitesse d'agitation sur le déroulement de l'hydrolyse pour les deux essais en système fermé. On se trouve

donc vraisemblablement à l'équilibre en tout temps, comme le laissaient penser les résultats précédents.

- Que les courbes $X = f(E_0 \cdot t)$ se recouvrent complètement pour les essais en configurations "cuve agitée discontinue" (essais STR) et "cuve avec recirculation" (essais REC). On a donc là une confirmation des hypothèses évoquées précédemment, à savoir que c'est le transfert du substrat neutre à travers l'interface phase organique / phase aqueuse qui est limitant lors de la réaction en continu dans le réacteur tubulaire.

En effet, les conditions dans la boucle de recirculation étaient comparables à celles imposées à travers le lit catalytique dans la colonne HPLC, à savoir des vitesses débitantes situées entre 60 et 3 $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ (définies par rapport au diamètre de la colonne vide, c.-à-d. 0.46 cm): dans l'essai REC1, on avait un lit de 25 ml d'enzyme diluée, assurant néanmoins une activité élevée. Le débit, fixé à 30 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, imposait au liquide une vitesse d'écoulement (diamètre interne du tube vide = 22 mm) v_b de 7.9 $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$. Le temps de séjour de 103 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ assurait quant à lui un ΔX_0 d'environ 21 % lors du premier passage. On ne se trouve donc pas dans le cas d'un réacteur différentiel, mais cela n'est semble-t-il pas obligatoire pour que le système reste très proche de l'équilibre.

L'expérience REC2 correspond quant à elle à un lit 5 fois plus petit qu'avant ($V_{\text{lit}} = 5 \text{ ml}$) traversé par le même débit de 30 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$; comme v_b ne change pas, le temps de séjour est par conséquent 5 fois plus faible que dans l'essai précédent. Le taux de conversion au premier passage ΔX_0 atteint 6 %. On s'approche ici un peu plus d'un réacteur différentiel, et on ne peut constater aucun effet sur la vitesse de réaction par rapport au réacteur fermé ou à l'essai REC1.

Pour l'hydrolyse faite dans REC3 on a utilisé le même lit de 5 ml, avec cette fois un débit plus faible de 7.1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\Leftrightarrow v_b = 1.9 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$). Si le temps de passage à travers le lit se rapproche de celui dans REC1 ($\Delta X_0 = 19 \%$), le temps de séjour dans le volume tampon de la cuve est lui 4 fois plus important, et facilite d'autant l'établissement de l'équilibre.

On a donc joué ici avec le degré de turbulence dans les phases liquides qui traversent le lit et avec le temps laissé au système pour s'équilibrer, sans que ces paramètres n'influencent le cours de la réaction. Le transfert des réactants du sein de la phase aqueuse vers la surface du grain de catalyseur n'est donc pas le

facteur limitant pour le système étudié. Dans le réacteur tubulaire exploité en mode continu, c'est par conséquent l'équilibre des concentrations dans la dispersion H₂O/MIBK qui n'arrive pas à être maintenu, à cause de la vitesse de réaction excessive induite par la haute concentration d'enzyme dans le réacteur et vraisemblablement d'un contact moins intime entre les deux phases liquides que dans le réacteur fermé ou la cuve avec recirculation. Le fait d'utiliser l' α -CT diluée améliore la performance du système si on compare les figures 4.14 et 4.16, mais il est difficilement envisageable d'utiliser un lit fixe d'activité beaucoup plus faible, à cause du volume que ce dernier aurait alors et des pertes de charge qu'il engendrerait.

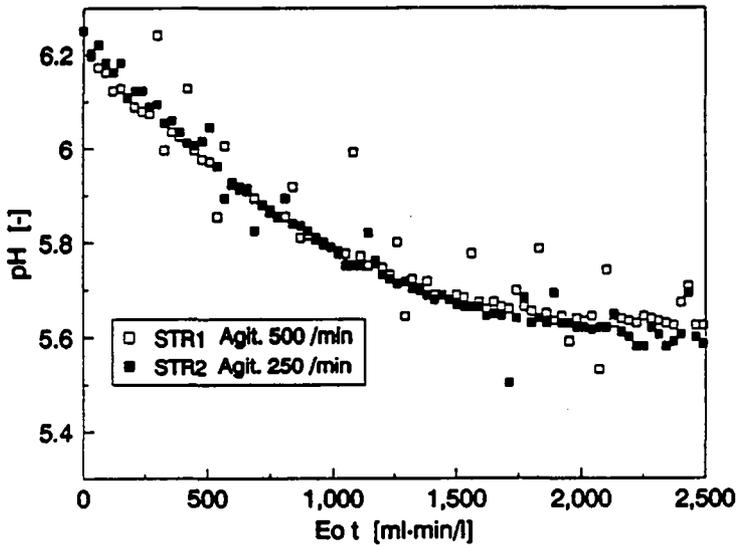


Figure 4.18: $\text{pH} = f(E_o t)$, réacteur fermé

Une confirmation supplémentaire des hypothèses avancées est apportée par le comportement du pH en fonction du temps dans les trois configurations. Il a été reporté chaque fois sur la même échelle aux figures 4.18 à 4.20, afin de faciliter les comparaisons. Elles permettent de constater que, à temps de séjour égaux et même aux plus faibles valeurs, c'est bien dans le réacteur tubulaire que le pH est le plus bas.

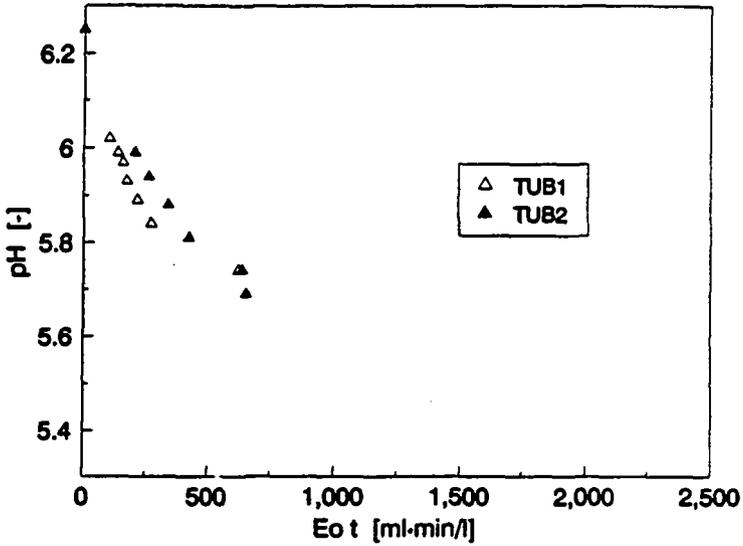


Figure 4.19: $\text{pH} = f(E_o t)$, réacteur tubulaire en continu

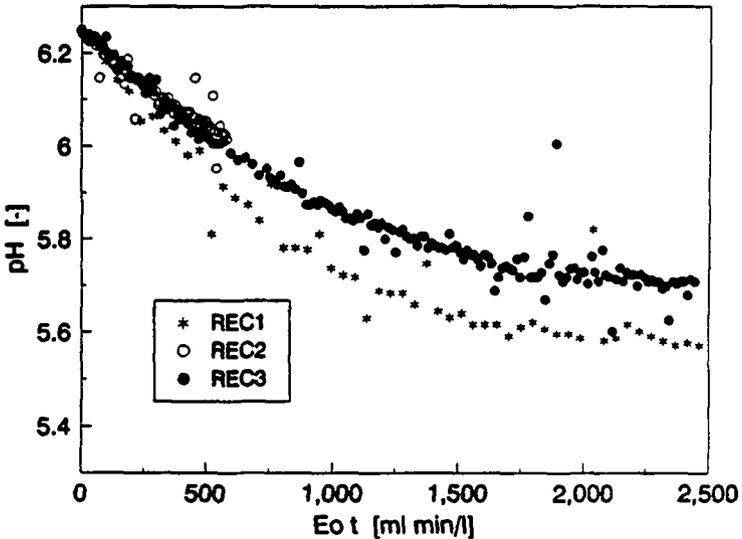


Figure 4.20: $\text{pH} = f(E_o t)$, cuve agitée avec recirculation

Pour la réaction dans le système à recirculation, on observe des différences de comportement. Elles peuvent être expliquées par le fait que dans les essais REC2 et REC3, le lit moins volumineux et le temps de séjour plus long dans la cuve sont les causes respectives des valeurs de pH plus élevées que dans l'essai REC1, où la concentration d'enzyme et le débit à travers la cuve sont plus importants.

Les faibles différences également constatées dans l'évolution du pH en comparant les essais STR et REC peuvent elles aussi être mises sur le compte du temps laissé aux phases pour se mettre à l'équilibre. L'influence de ces variations sur la vitesse de réaction n'est cependant pas assez grande pour que l'on observe un effet sensible sur la vitesse de réaction.

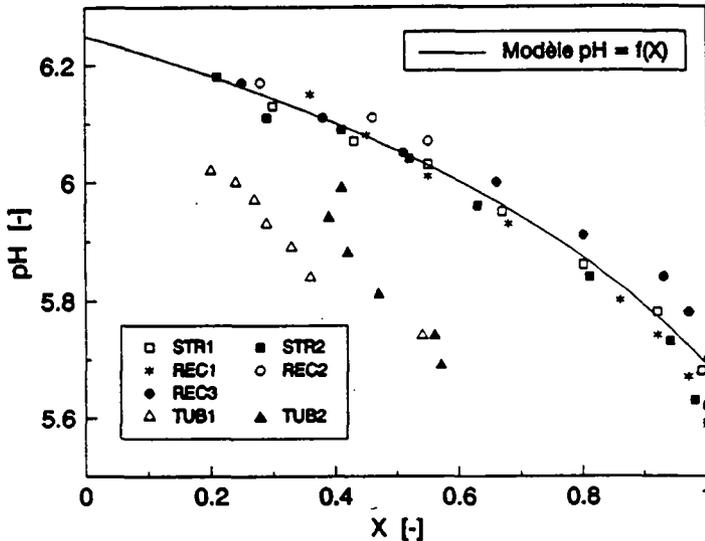


Figure 4.21: Evolution du pH en fonction de X pour les trois réacteurs

Dernier élément de comparaison, l'évolution du pH en fonction du taux de conversion représentée à la figure 4.21 ne fait que confirmer tout ce qui a été dit jusqu'à maintenant: les valeurs mesurées à la sortie du réacteur tubulaire sont encore une fois les plus éloignées de la courbe théorique correspondant à l'équilibre, mais évoluent cette fois dans un sens logique. Il faut mentionner encore une fois la lenteur avec laquelle elles se stabilisent. On peut également se rendre

compte que les différences au niveau de l'évolution temporelle du pH disparaissent presque complètement quand on considère son comportement en fonction du taux de conversion. Les courbes des essais STR et REC sont donc en excellent accord avec les prédictions théoriques.

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 4

ALLEN, T. (1981): Particle size measurement, 3rd edition
Chapman & Hall, New York

BRODELIUS, P. (1978): Industrial applications of immobilized biocatalysts
Adv. Biotechnol., 10, 75-129

GEANKOPLIS, C.J.; HAERING, E.R.; HU, M.C. (1987): Reaction kinetics and mass-transfer effects in a fixed-bed biochemical reactor with invertase immobilized on alumina
Ind. Eng. Chem. Res., 26, 1810-1817

GOLDSTEIN, L. (1976): Kinetic Behavior of immobilized enzyme systems
Meth. Enzymol., 44, 397-443

HARTMEIER, W. (1986): Immobilisierte Biokatalysatoren: eine Einführung, 1st edition
Springer Verlag, Berlin

KAWAMURA, Y.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. (1981): Stability of immobilized α -chymotrypsin
Biotechnol. Bioeng., 23, 1219-1236

KELLER, R. (1984): Verfahren zur Herstellung aromatisch substituierter L-aminosäuren
E.P. 178 553 A2, 18.10.1984

MORESOLI, C. (1990): Etude de la transestérification d'un mélange racémique de l'ester propylique de la phénylalanine à l'aide de chymotrypsine
Thèse EPFL N° 835, CH-1015 Lausanne

UDDIN, M.S.; HIDAJAT, K.; CHING, C.B. (1990): Liquid chromatographic evaluation of Equilibrium and kinetic parameters of large molecule amino acids on silica gel
Ind. Eng. Chem. Res., 29, 647-651

WEINER, B.B. (1984): Modern methods of particle size analysis, 1st edition
Chemical Analysis, Vol. 73, John Wiley & Sons, New York

5. CONCLUSIONS, PERSPECTIVES

5.1 SYSTEME REACTIONNEL

Par rapport aux problèmes rencontrés lorsqu'on procède à l'hydrolyse des esters de la phénylalanine en milieu purement aqueux, le système réactionnel sélectionné constitue une solution avantageuse. L'ester n-propylique présente une bonne stabilité vis-à-vis de l'autohydrolyse, sa solubilité dans l'eau à 30 °C et aux pH utilisés permet encore une vitesse de réaction intéressante et son caractère lipophile marqué favorise le partage biphasique. Son comportement par rapport à la réaction de transestérification ainsi que la sélectivité de l'enzyme envers l'énantiomère L n'ont pu être étudiés, et pourraient constituer un complément d'information intéressant. On n'a cependant presque jamais mesuré de taux de conversion supérieurs à 100 % (aux erreurs d'analyse et d'échantillonnage près), ce qui constitue déjà une bonne indication en faveur d'une sélectivité pratiquement égale à 1 pour le L-PAPE. Le fait d'utiliser le PAPE sous forme d'hydrochlorure au lieu de l'ester couplé avec le contre-ion sulfate de propyle est aussi très important, vu l'effet de ce dernier sur la vitesse de réaction.

Le choix du MIBK comme phase organique est un peu plus discutable. Bien qu'il se soit révélé tout à fait satisfaisant dans son rôle d'extraction du PAPE neutre avec un coefficient de partage de 123, il présente quelques inconvénients notables: c'est un solvant relativement soluble dans l'eau (1.7 %) et qui absorbe fortement dans l'UV, empêchant ainsi l'analyse en continu de la phase aqueuse par cette méthode. De plus, il dissout ou dégrade rapidement la grande majorité des matériaux plastiques, ce qui ne va pas sans poser quelques problèmes au niveau de la conception du réacteur. Dans le large spectre de phases organiques potentiellement utilisables, on pourrait retenir par exemple le n-octanol déjà testé, pour sa transparence aux UV, sa faible tension de vapeur, sa solubilité très limitée dans l'eau et son caractère moins agressif; le coefficient mesuré pour le partage du PAPE sous forme neutre dans ce solvant est de 113, ce qui est bien suffisant pour réaliser l'hydrolyse en système biphasique dans des conditions favorables. Seul le problème d'une possible transestérification catalysée par la chymotrypsine serait à étudier avant d'en envisager l'utilisation.

5.2 HYDROLYSE AVEC L'ENZYME SOLUBLE

le modèle cinétique dérivé de celui proposé par Bender semble tout à fait apte à décrire correctement l'évolution de la réaction à pH constant, en tenant compte aussi bien de l'effet des divers participants que de l'influence de la fraction volumique de phase organique. On peut raisonnablement négliger l'inhibition par la L-phénylalanine, comme le montrent finalement les résultats des optimisations et les expériences réalisées. L'influence du solvant organique, qu'on a considéré ici comme un inhibiteur de type compétitif en concentration constante, n'est par contre pas à négliger. Une fois encore, la recherche d'un solvant avec un effet moins marqué sur le catalyseur pourrait être très profitable.

Le modèle n'est cependant pas applicable tel quel à la réaction à pH flottant dans les conditions auxquelles elle a été étudiée, c.à-d. à des concentrations d'enzyme importantes, voisines de $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Même en tenant compte de l'évolution de l'activité enzymatique en fonction du pH, on se heurte aux problèmes de transferts limitants déjà évoqués. Ceux-ci ne sont pas pris en considération par le modèle développé, lequel suppose à tout instant l'équilibre des concentrations. Si la réaction était menée à bien à des vitesses sensiblement plus faibles (i.e. à des valeurs de $E_0 \leq 0.05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) avec une agitation suffisante, la prédiction pour la valeur du pH en fonction de X serait certainement beaucoup plus correcte.

Les avantages du solvant organique ne s'arrêtent pas à l'augmentation substantielle du pouvoir tampon aux valeurs du pH proches de l'optimum pour l'enzyme. L'accroissement possible de la charge en substrat du système et par conséquent de sa productivité peuvent se révéler très intéressants en vue d'une application industrielle du procédé. La limite supérieure de cette charge serait cependant déterminée par la solubilité maximale de la phénylalanine aux conditions opératoires, car on souhaite éviter toute précipitation de ce produit au sein d'un lit fixe de catalyseur.

5.3 HYDROLYSE AVEC L'ENZYME FIXEE

Les expériences faites dans le réacteur fermé ont montré que la mise en oeuvre d'un système à trois phases eau / solvant organique / catalyseur solide pour la réaction d'hydrolyse du PAPE était tout à fait possible, et ce aussi bien à pH constant que flottant. Vu la concentration suffisamment faible du catalyseur ($30 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$, qui correspondent à environ $0.03 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ d' α -CT soluble), on a même pu

constater que le modèle décrivant la chute de pH en fonction du taux de conversion et des autres conditions de réaction était assez fiable.

Le modèle cinétique proposé pour l'hydrolyse avec l'enzyme soluble n'a quant à lui pas pu être utilisé pour les essais avec la chymotrypsine immobilisée. Le fait qu'on mesure une réaction plus rapide avec le racémate qu'en présence de L-PAPE seulement montre clairement l'influence non négligeable de phénomènes conduisant à des chutes locales du pH au voisinage de la particule de catalyseur. La diffusion dans les pores ayant pu être mise hors de cause, le phénomène pourrait être dû à des problèmes de transport dans le film liquide entourant les grains. L'effet semble cependant s'atténuer quand on travaille à des pH supérieurs à 5.5, valeur à laquelle ces observations ont été faites.

En comparant les essais dans l'installation en continu avec ceux réalisés dans les autres réacteurs, on a pu identifier l'origine des limitations observées. Le transfert de matière entre les deux phases liquides est trop lent, à plus forte raison au vu de la concentration d'enzyme et de la qualité du mélange dans le réacteur. Les mesures faites avec le lit de 25 ml montrent qu'on peut aller jusqu'à inactiver totalement une partie du catalyseur, même avec des conditions initiales garantissant une chute de pH modérée. Diluer l'enzyme d'un facteur 4 n'est un remède que dans la mesure où, grâce à une vitesse de réaction plus faible, on s'éloigne moins vite de l'équilibre. Il reste cependant très difficile de dépasser 80 % de conversion, et comme la performance diminue en même temps que la vitesse de réaction, cela n'est que peu satisfaisant dans l'optique d'une application industrielle. Une solution plus acceptable consisterait à diviser le réacteur en trois ou quatre lits catalytiques de faible volume mais de grande activité, séparés par des cuves agitées destinées à favoriser le rétablissement de l'équilibre entre deux étapes de réaction. Cette proposition est illustrée à la figure 5.1 ci-après.

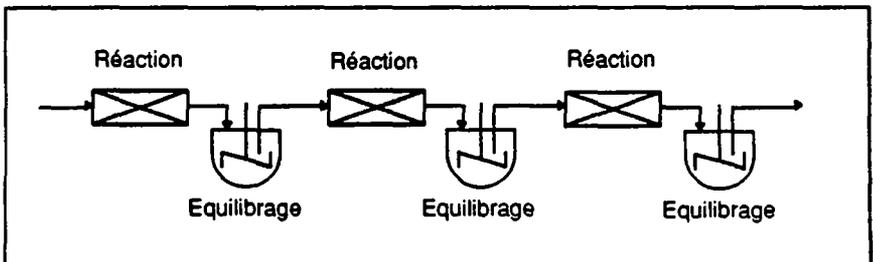


Figure 5.1: Modification proposée pour l'installation en continu

5.4 REACTIONS CATALYTIQUES EN SYSTEME TRIPHASIQUE

Outre son intérêt au niveau de la production en continu de L-phénylalanine ou d'autres acides aminés, l'hydrolyse des esters dans un système à trois phases comme celui qu'on a mis en oeuvre ici constitue un système-test encore très peu étudié, et par conséquent un domaine d'investigation extrêmement riche et prometteur. De nombreux exemples d'utilisation de réacteurs triphasiques ont déjà été rapportés dans la littérature, mais il s'agit presque uniquement de milieux hétérogènes gaz / liquide / solide. Quand le solide est le catalyseur de la réaction, on parle de réacteurs à suspension ("slurry reactors"). Ce "déséquilibre" au niveau des résultats publiés sur le sujet se retrouve dans le livre de Doraiswamy et Sharma (1984), qui donne un traitement théorique illustré d'exemples d'applications pour un grand nombre de réactions en milieux hétérogènes, et qui ne contient qu'un paragraphe concernant un système liquide-liquide-solide catalytique. Il s'agissait là d'un cas particulier de catalyse par transfert de phase (CTP), dans lequel le vecteur de transfert est greffé sur une matrice en polymère. A la différence du cas de la réaction enzymatique, qui a lieu à l'interface phase aqueuse/particule, le catalyseur pour la CTP doit se trouver à l'interface des deux phases liquides, d'où une grande influence de l'affinité du support pour chacune de celles-ci. Ce nouveau genre de réaction, baptisé en anglais "Triphase Catalysis", a par exemple été étudié en réacteur fermé par Marconi et Ford (1983), qui a déterminé quels étaient les transferts limitants dans son système. Ragaini et al. (1986) a travaillé quant à lui avec un lit fixe de particules catalytiques à travers lequel il pompait en circuit fermé une dispersion des deux phases liquides, dans une configuration identique à celle utilisée au chapitre 4 (cuve agitée avec boucle de recirculation). Dans la plupart des expériences traitées par ces deux auteurs, la réaction était contrôlée par la diffusion dans le film liquide au voisinage de la particule. Deux brèves revues du sujet ont été présentées par Regen (1979) et Ford (1984).

5.5 PERSPECTIVES

Il serait donc intéressant d'étudier de façon plus approfondie le transfert de l'ester à travers l'interface phase organique/phase aqueuse et ce qui l'influence, d'abord dans un système agité standard permettant l'accès à des paramètres comme le $k_L \cdot a$ et l'aire interfaciale a . On pourra y travailler avec ou sans réaction, avec l'enzyme soluble ou immobilisée.

L'étude du transfert dans le lit catalytique devrait être plus complexe à mener à bien, mais non moins riche d'enseignements. Il conviendra principalement de caractériser au mieux le comportement de l'émulsion traversant le lit de catalyseur. En effet, tous les travaux publiés sur les écoulements biphasiques en milieux poreux font état d'une fraction non négligeable de phase dispersée retenue dans les interstices de la matrice (Dullien (1988), Klausmeyer (1986)). Ces phénomènes ont été abondamment étudiés dans le cadre de la récupération du pétrole par injection d'eau sous pression dans les sédiments rocheux où il est souvent retenu. Le lit d'enzyme fixée est certes beaucoup moins compact que ce genre de milieu, mais quelques essais effectués avec une émulsion traversant une colonne en verre remplie de silicagel avaient montré une rétention importante de la phase organique colorée. La diminution de la porosité du lit qui en découle ainsi que la contribution du solvant retenu aux échanges de matière dans le flux traversant constituent donc des informations de première importance dans l'optique d'une compréhension plus approfondie du sujet.

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE 5

DORAISWAMY, L.K.; SHARMA, M.M. (1984): Heterogeneous reactions: analysis, examples, and reactor design (volume 2: fluid-fluid-solid reactions)
John Wiley & Sons, Inc., New York

DULLIEN, F.A.L. (1988): Two-phase flow in porous media
Chem. Eng. Technol., 11, 407-424

FORD, W.T. (1984): Immobilized phase-transfer catalysts
Chem. Tech., 436-439, July 1984

KLAUSMEYER, U. (1986): Strömung zweiphasiger Flüssigkeitsgemische in porösen Strukturen
Chem.-Ing.-Tech., MS 1501/86

MARCONI, P.F.; FORD, W.T. (1983): Catalytic effectiveness due to mass transfer limitations in triphase catalysis by polymer-supported quaternary onium salts
J. Catal., 83, 160-167

RAGAINI, V.; VERZELLA, G.; GHIGNONE, A.; COLOMBO, G. (1986): Fixed-bed reactors for phase-transfer catalysis. A study of a liquid-liquid-solid reaction
Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., 25, 878-885

REGEN, S. (1979): Triphase catalysis
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 18 (6), 421-429

ANNEXES

Conditions expérimentales des essais à pH constant avec l'enzyme soluble	II
Résultats des analyses HPLC pour les essais avec l' α -CT immobilisée	IV
Listages des programmes FORTRAN	
MARQSG	VIII
FMTIT3	XI
FMKPO	XIII
MINV	XV
FNELIN	XVI
SUM	XVII
RKMER	XVIII
BIFLOT	XX
DERIV	XXII
Curriculum vitae	XXIII

Essai N°	SL ₀ [mmol.l ⁻¹]	SD [mmol.l ⁻¹]	P ₀ [mmol.l ⁻¹]	PA ₀ [mmol.l ⁻¹]	V _{aq} [-]
1	1.5	0.0	0.0	0.0	1.0
2	3.0	0.0	0.0	0.0	1.0
3	4.0	0.0	0.0	0.0	1.0
4	6.0	0.0	0.0	0.0	1.0
5	9.0	0.0	0.0	0.0	1.0
6	12.0	0.0	0.0	0.0	1.0
7	15.0	0.0	0.0	0.0	1.0
8	18.0	0.0	0.0	0.0	1.0
9	24.0	0.0	0.0	0.0	1.0
10	36.0	0.0	0.0	0.0	1.0
11	64.5	0.0	0.0	0.0	1.0
12	100.1	0.0	0.0	0.0	1.0
13	10.0	10.0	0.0	0.0	1.0
14	25.0	25.0	0.0	0.0	1.0
15	25.0	50.0	0.0	0.0	1.0
16	25.0	75.0	0.0	0.0	1.0
17	50.0	50.0	0.0	0.0	1.0
18	50.0	100.0	0.0	0.0	1.0
19	50.0	150.0	0.0	0.0	1.0
20	75.0	75.0	0.0	0.0	1.0
21	75.0	125.0	0.0	0.0	1.0
22	75.0	175.0	0.0	0.0	1.0
23	100.0	100.0	0.0	0.0	1.0
24	150.0	150.0	0.0	0.0	1.0
25	40.0	40.0	0.0	0.0	1.0
26	40.0	40.0	20.0	0.0	1.0
27	40.0	40.0	80.0	0.0	1.0
28	40.0	40.0	100.0	0.0	1.0
29	40.0	40.0	200.0	0.0	1.0
30	40.0	40.0	300.0	0.0	1.0
31	20.1	10.0	0.0	20.0	1.0
32	20.0	10.0	0.0	100.0	1.0
33	20.0	205.0	0.0	20.1	1.0
34	20.0	400.0	0.0	100.0	1.0
35	20.0	400.0	0.0	60.1	1.0
36	110.0	10.0	0.0	60.0	1.0
37	110.0	205.0	0.0	20.0	1.0
38	110.0	205.0	0.0	60.2	1.0
39	110.0	205.0	0.0	100.0	1.0
40	110.0	400.0	0.0	60.0	1.0
41	200.0	10.0	0.0	100.0	1.0

42	200.0	205.0	0.0	60.2	1.0
Essai N°	SL ₀ [mmol.l ⁻¹]	SD [mmol.l ⁻¹]	P ₀ [mmol.l ⁻¹]	PA ₀ [mmol.l ⁻¹]	V _{aq} [-]
43	200.0	400.0	0.0	20.1	1.0
44	200.0	400.0	0.0	100.0	1.0
45	5.0	5.0	0.0	0.0	1.0
46	5.0	5.0	0.0	0.0	0.9
47	5.0	5.0	0.0	0.0	0.7
48	5.0	5.0	0.0	0.0	0.5
49	10.0	10.0	0.0	0.0	1.0
50	10.0	10.0	0.0	0.0	0.9
51	10.0	10.0	0.0	0.0	0.7
52	10.0	10.0	0.0	0.0	0.5
53	17.5	17.5	0.0	0.0	1.0
54	17.5	17.5	0.0	0.0	0.9
55	17.5	17.5	0.0	0.0	0.7
56	17.5	17.5	0.0	0.0	0.5
57	25.1	25.1	0.0	0.0	1.0
58	25.0	25.0	0.0	0.0	0.9
59	25.0	25.0	0.0	0.0	0.7
60	25.0	25.0	0.0	0.0	0.5
61	50.0	50.0	0.0	0.0	1.0
62	50.0	50.0	0.0	0.0	0.9
63	50.0	50.0	0.0	0.0	0.7
64	50.0	50.0	0.0	0.0	0.5
65	100.0	100.0	0.0	0.0	1.0
66	100.0	100.0	0.0	0.0	0.5

Tableau A1: Concentrations et fractions volumiques aqueuses étudiées avec l'enzyme soluble à pH constant

$E_0 \cdot t$ [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
0	6.10	0.2	67.1	0.01
180	6.00	7.4	57.8	0.22
270	5.95	10.0	54.7	0.30
420	5.87	13.6	50.1	0.40
570	5.80	17.0	47.9	0.51
660	5.76	20.1	47.2	0.60
810	5.68	20.7	43.5	0.62
990	5.59	23.1	41.5	0.69
1500	5.41	28.2	37.4	0.84
2400	5.26	29.4	35.4	0.88
3600	5.20	31.8	35.9	0.95

Tableau A2: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 $T = 30\text{ °C}$, $S_{L0} = S_D = 30\text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.10$
 Essai en réacteur fermé, figures 4.12 et 4.13

$E_0 \cdot t$ [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
0	6.25	0.2	68.6	0.01
90	6.22	4.8	74.6	0.14
180	6.19	8.5	60.5	0.25
360	6.12	13.6	51.1	0.40
600	6.02	19.1	51.3	0.56
900	5.92	25.4	36.5	0.74
1200	5.85	28.5	38.4	0.83
1665	5.76	31.9	34.5	0.93
2400	5.70	34.1	32.2	0.99
3600	5.69	35.8	32.7	1.00

Tableau A3: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 $T = 30\text{ °C}$, $S_{L0} = S_D = 30\text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$
 Essai en réacteur fermé, figures 4.12 et 4.13

$E_{0,t}$ [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
0	6.25	0.2	57.3	0.01
150	6.13	9.1	50.8	0.30
270	6.07	12.5	45.9	0.43
390	6.03	16.2	42.9	0.55
540	5.95	19.9	39.6	0.67
750	5.86	25.0	37.1	0.80
1050	5.78	28.6	33.9	0.92
1530	5.68	30.5	30.8	0.99
2400	5.67	33.5	29.8	1.05
3300	5.62	33.4	30.3	1.05

Tableau A4: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 T = 30 °C, $S_{Lo} = S_D = 30 \text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$, agitation: 500 min^{-1}
 Essai STR1 en réacteur fermé, figures 4.16, 4.18 et 4.21

$E_{0,t}$ [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
0	6.25	-	56.0	0.00
90	6.18	5.8	50.6	0.21
180	6.11	8.3	49.6	0.29
270	6.09	11.8	46.0	0.41
390	6.04	15.6	44.0	0.52
540	5.96	19.0	41.2	0.63
840	5.84	25.3	36.8	0.81
1200	5.73	29.0	32.5	0.94
1800	5.63	30.2	31.4	0.98
2700	5.59	30.9	30.1	1.01

Tableau A5: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 T = 30 °C, $S_{Lo} = S_D = 30 \text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$, agitation: 250 min^{-1}
 Essai STR2 en réacteur fermé, figures 4.16, 4.18 et 4.21

$E_{0,t}$ [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
237	6.15	10.0	36.1	0.36
347	6.08	12.4	33.5	0.45
473	6.01	15.3	32.1	0.55
631	5.93	19.0	31.1	0.68
947	5.80	23.8	27.9	0.86
1199	5.74	25.5	25.7	0.92
1578	5.67	27.1	24.1	0.97
2241	5.63	27.0	23.7	0.97
2841	5.62	27.8	22.6	1.00

Tableau A6: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 $S_{L0} = S_D = 30 \text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$, $V_R = 30 \text{ ml·min}^{-1}$, $V_{lit} = 25 \text{ ml}$
 Essai REC1 en réacteur fermé, figures 4.16, 4.20 et 4.21

$E_{0,t}$ [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
0	6.25	1.2	50.0	0.005
178	6.17	6.5	39.6	0.28
334	6.11	10.6	35.7	0.46
462	6.06	12.7	33.7	0.55

Tableau A7: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 $S_{L0} = S_D = 30 \text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$, $V_R = 30 \text{ ml·min}^{-1}$, $V_{lit} = 5 \text{ ml}$
 Essai REC2 en réacteur fermé, figures 4.16, 4.20 et 4.21

$E_{0,t}$ [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
0	6.25	2.1	52.4	0.01
178	6.17	6.1	43.7	0.25
284	6.11	10.2	43.7	0.38
426	6.05	13.5	39.4	0.51
568	6.00	17.6	35.6	0.66
838	5.91	22.0	33.4	0.80
1108	5.84	26.2	30.4	0.93
1420	5.78	27.1	28.5	0.97
1847	5.73	28.5	27.5	1.02

Tableau A8: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK
 $S_{L0} = S_D = 30 \text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$, $V_R = 7.1 \text{ ml·min}^{-1}$, $V_{lit} = 5 \text{ ml}$
 Essai REC3 en réacteur fermé, figures 4.16, 4.20 et 4.21

Débit Q [ml·min ⁻¹]	E ₀ ·t [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
0.00	0	6.25	0.1	59.3	0.00
5.02	102	6.02	5.8	52.8	0.20
3.69	139	5.99	7.2	51.5	0.24
3.22	159	5.97	8.3	52.6	0.27
2.96	173	5.93	8.6	51.6	0.29
2.35	218	5.89	10.0	50.3	0.33
1.90	270	5.84	11.1	50.3	0.36
0.82	622	5.74	17.4	46.7	0.54
0.24	2125	-	26.8	43.3	0.77

Tableau A9: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK

$S_{L0} = S_D = 30 \text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$

Essai TUB1 en réacteur tubulaire continu, figures 4.16, 4.19 et 4.21

Débit Q [ml·min ⁻¹]	E ₀ ·t [ml·min·l ⁻¹]	pH [-]	[L-Phe] [mmol·l ⁻¹]	[D,L-PAPE] [mmol·l ⁻¹]	X [-]
0.00	0	6.25	2.1	58.8	0.07
2.47	207	5.99	13.5	53.0	0.41
1.96	262	5.94	12.9	52.9	0.39
1.50	342	5.88	13.2	50.2	0.42
1.21	423	5.81	15.2	48.9	0.47
0.81	636	5.74	18.0	46.1	0.56
0.78	654	5.69	17.9	44.8	0.57
0.63	813	-	22.3	41.9	0.69
0.53	974	-	21.0	42.6	0.66
0.25	2078	-	25.6	39.6	0.79

Tableau A10: Mesures pour l'hydrolyse avec l'enzyme fixée en présence de MIBK

$S_{L0} = S_D = 30 \text{ mmol·l}^{-1}$, $v_{aq} = 0.9$, $pH_0 = 6.25$

Essai TUB2 en réacteur tubulaire continu, figures 4.16, 4.19 et 4.21


```

30 DX(IL) = -S/ST(IL)
C
333 DO 50 I=1,NP 50 XA(I) = X(I)+H*DX(I)
    CALL FMAR(XA,JTJ,JTF,FTFA,NP,ND,II,2)
C
    ICN = ICN+1
    TYPE 2,ICS,ICN,(XA(N),N=1,NP),FTFA
    IF(IS.EQ.5) GOTO 55
    WRITE(IS,2) ICS,ICN,(XA(N),N=1,NP),FTFA
55 IF(FTFA.GE.FTFV) GOTO 444
    ICS = ICS+1
    ALAM = ALAM/NY
    DO 60 IL=1,NP
60 X(IL) = XA(IL)
    FTFV = FTFA
    DO 70 I=1,NP
    IF(X(I).EQ.0.) GOTO 70
    ST(I) = ABS(DX(I)/X(I))*100.
70 CONTINUE
    SDX = SUM(1,ST,NP)/NP
    IF(SDX.LT.EPS) GOTO 99
    CALL FMAR(X,JTJ,JTF,FTFV,NP,ND,II,3)
    GOTO 111
C
    IF(ICN.GT.NCY) GOTO 99
    DEN = SUM(2,DX,NP)*SUM(2,JTF,NP)
    NUM = 0.
    DO 80 L=1,NP
80 NUM = NUM+DX(L)*JTF(L)
    COSPHI = -NUM/SQRT(DEN)
    PHI = ATAN(SQRT(1.-COSPHI**2)/COSPHI)
    IF(PHI.GE.PHI0) GOTO 555
    H = H/2.
    GOTO 333
555 ALAM = ALAM*NY
    GOTO 222
C
C -----
C Print section :
C -----
99 TYPE 2,ICS,ICN,(X(N),N=1,NP),FTFV
    IF(IS.EQ.5) GOTO 44
    WRITE(IS,2) ICS,ICN,(X(N),N=1,NP),FTFV
2 FORMAT(/ # succ., # total = ,2I4 /
1' P(I), ITI = ,6(2X,E11.4),',',5(2X,E11.4))
    GOTO 44
122 TYPE 17
17 FORMAT(/' *** Singular matrix ***'/)
44 TYPE 3
3 FORMAT(/$ Once again with same data ? N .... )
    ACCEPT 13,A
13 FORMAT(A1)
    IF(A.EQ.'Y') GOTO 1111
    IF(IND.EQ.1) GOTO 999
C
C -----
C Variance-covariance analysis :
C -----
CALL MINV(JTJV,SM,10,NP,IND)
    IF(IND.EQ.1) GOTO 122
    FM = SQRT(FTFV/(ND-NP))
    DO 90 I=1,NP
90 ST(I) = SQRT(SM(I,I))
    DO 100 I=1,NP
    DX(I) = FM*ST(I)
    SV(I) = 100.

```

```

IF(X(I).EQ.0.) GOTO 100
SV(I) = SV(I)*DX(I)/ABS(X(I))
100 CONTINUE
I = 0
DO 110 IL=2,NP
DO 110 IC=1,IL-1
I = I+1
110 CC(I) = SM(IL,IC)/(ST(IL)*ST(IC))
C
C -----
C Final print section, statistics :
C -----
WRITE(IS,5) NP,ND,FTFV,FM
5 FORMAT('1// Variance-covariance analysis ://
1' No. of parameters = ',I2,/'
1' No. of data = ',I3,/'
1' Sum of squares = ',E13.6,/'
1' Mean error of observations = ',E13.6,/'
WRITE(IS,9)
9 FORMAT(' ',80('-'))
WRITE(IS,6)
6 FORMAT(' Matrix of covariance coefficients ://)
I = 1
DO 120 IL=2,NP
IE = I+IL-2
WRITE(IS,12) (CC(L),L=1,IE)
120 I = IE+1
12 FORMAT(' ',9(2X,F7.4)/)
WRITE(IS,9)
WRITE(IS,7)
7 FORMAT('// Parameters and standard deviations ://)
WRITE(IS,8) (I,X(I),DX(I),SV(I),I=1,NP)
8 FORMAT(' P(',I1,') = ',E13.6,' +- ',E13.6,' = +- ',F9.4, [%]')
C
C -----
C
TYPE 14
14 FORMAT(' $ Do you want GRAPHICS ? N.... ')
ACCEPT 13,B
IF(B.NE.'Y') GOTO 999
CALL FMAR(X,JTJ,JTF,FTF,NP,ND,I,4)
C
999 TYPE 15
15 FORMAT(' $ Once again with new data ? N.... ')
ACCEPT 13,C
IF(C.NE.'Y') STOP
ICS = 1
ICN = 1
IF(IS.EQ.6) WRITE(IS,16)
16 FORMAT('1')
II = 0
GOTO 1111
END

```

```

C -----
C Module name :      FMTIT3      Vers. 07-May-85 Fla
C
C Updated for MARQSG : 03-Jul-86 Fla
C Model for simple titration to find the pK-value
C  $pH = pK + \lg(Vb+Vbi) - \lg(Vbo-(Vb+Vbi))$ 
C
C Link with :  MARQSG
C              SESLIB, [LIB480,MODLIB] opt.
C -----
SUBROUTINE FMAR(P,JTJ,JTF,FTF,IP,NV,II,K)
REAL J(100,3),JTF(10),JTJ(10,10)
DIMENSION Y(100),X(100),P(10),F(100)
DIMENSION XP(100),YP(100)
DATA IDD/100/
C -----
C
C GOTO (33,1111,222,333) K
C
C TYPE 1
1  FORMAT(/$ Give : init. pK & Vbo & Vbi ....)
ACCEPT *,P(1),P(2),P(3)
C
IF(II.NE.0) GOTO 1111
IP = 3
II = 1
TYPE 3
3  FORMAT(/$ Give filenames for - V(base) , pH -/)
CALL ASSIGN(1,..-13)
READ(1,*,END=22) (X(N),N=1,IDD)
22 CALL CLOSE(1)
NO = N-1
CALL ASSIGN(1,..-13)
READ(1,*,END=44) (Y(N),N=1,IDD)
44 CALL CLOSE(1)
N = N-1
IF(NO.EQ.N) GOTO 111
TYPE 2
2  FORMAT(/$ *** Files not compatible ***/)
STOP
C
111 TYPE 4,NO
4  FORMAT(/$ No. of data = ',I4,/'
1$ Give No. of data : begin & end ....')
ACCEPT *,IB,IE
DO 10 I=IB,IE X(I-IB+1) = X(I)
10 Y(I-IB+1) = Y(I)

```

```

      NV = IE-IB+1
C -----
1111 FTF = 0.
C -----
      DO 200 I=1,NV
      YC = P(1)+ALOG10(X(I)+P(3))-ALOG10(P(2)-(X(I)+P(3)))
      F(I) = YC-Y(I)
200  FTF = FTF+F(I)**2
      IF(K.NE.1) RETURN
C -----
222  DO 500 I=1,NV
      J(I,1) = 1.
      J(I,2) = -0.434294/(P(2)-(X(I)+P(3)))
500  J(I,3) = 0.434294/(X(I)+P(3))-J(I,2)
C -----
C Calculation of JTJ and JTi :
C -----
      DO 300 IL=1,IP
      S = 0.
      DO 40 I=1,NV
40   S = S + J(IL,I)*F(I)
      JTF(IL) = S
      DO 300 IC=1,IP
      S = 0.
      DO 50 I=1,NV
50   S = S + J(IL,I)*J(I,IC)
300  JIJ(IL,IC) = S
      RETURN
C -----
333 CALL GRINI
      CALL SCOS(X,Y,NV)
      DX = (X(NV)-X(1))/100
      DO 20 I=1,100
      XP(I) = X(1) + I*DX
20   YP(I) = P(1)+ALOG10(XP(I)+P(3))-ALOG10(P(2)-(XP(I)+P(3)))
C -----
      PAUSE ' MAIN'
      CALL SAXS
      CALL SPFS(X,Y,1,NV)
      CALL SCPS(XP,YP,100)
      CALL SENS
C -----
      RETURN
      END

```

```

C -----
C
C Module name :          F M K P 0          Vers. 16-May-88 Sicr
C
C Function : Modified model for the hydrolysis of PAPE by CHYMO
C Model : k2 supposed << k3,k4 (=> EA = 0)
C
C Propanol present in the system at t = 0
C
C      P(1) = k2
C      P(2) = k = k4/k3
C      P(3) = Km
C
C Link with :  MARQSG
C              FNELIN
C              MATH
C -----
C
C SUBROUTINE FMAR(P,JTJ,JTF,FTF,NP,ND,II,K)
C
C REAL J(400,5),JTF(10),JTJ(10,10)
C DIMENSION X(400,2),P(10),PR(3),Y(50,3)
C DIMENSION F(400),PL(3),PLP(3),PLM(3)
C DATA IDD/250/
C
C -----
C GOTO (33,1111,222,333) K
C -----
C Entry section :
C -----
33 TYPE 1
1  FORMAT(/$ Give init. par. : k2 + k + Km .... )
   ACCEPT *(P(I),I=1,3)
   IF(II.NE.0) GOTO 1111
   NP = 3
   II = 1
   TYPE 2
2  FORMAT(/$ Give : No.val. + No.exp. + Xmax .... )
   ACCEPT *.ND,NE,XMAX
   TYPE 3
3  FORMAT(/$ Give filenames for : X + t/)
   DO 10 I=1,2
   CALL ASSIGN(1,,-13)
   READ(1,*) (X(N,I),N=1,ND)
10  CALL CLOSE(1)
   TYPE 4
4  FORMAT(/$ Give filename for : Eo + L-So + Po/)
   DO 20 I=1,3
   CALL ASSIGN(1,,-13)
   READ(1,*) (Y(N,I),N=1,NE)
20  CALL CLOSE(1)
C -----
C L = 0
C IND = 1
C N = 0
C DO 550 I=1,ND
C IF(X(I,1).GE.XMAX) GOTO 55
C IF(IND.EQ.0) GOTO 22
C L = L+1
C IND = 0
22 N = N+1
   IF(X(I+1,2).LT.X(I,2)) IND = 1
   X(N,1) = X(I,1)
   X(N,2) = X(I,2)-Y(L,1)

```

```

GOTO 550
55 IF(X(I+1,2).LT.X(I,2)) IND = 1
550 CONTINUE
ND = N

C
C -----
C
1111 FTF = 0.
L = 0
IND = 1
DO 100 I=1,ND
IF(IND.EQ.0) GOTO 11
L = L+1
PL(1) = Y(L,2)/P(1)*(1.+P(2)*(Y(L,3)-P(3)))
PL(2) = -P(3)/P(1)*(1.+P(2)*(Y(L,3)+Y(L,2)))
PL(3) = 0.5*P(2)/P(1)*Y(L,2)**2
IND = 0
11 CALL FNIT(PL,X(I,2),XC,X(I,1))
F(I) = XC-X(I,1)
FTF = FTF+F(I)**2
IF(X(I+1,2).LT.X(I,2)) IND = 1
100 CONTINUE
IF(K.NE.1) RETURN

C
C -----
222 DO 200 I=1,NP
200 PR(I) = P(I)

C
DO 600 N=1,NP
L = 0
IND = 1
DO 500 I=1,ND
IF(IND.EQ.0) GOTO 44
L = L+1
PR(N) = 1.01*P(N)
PLP(1) = Y(L,2)/PR(1)*(1.+PR(2)*(Y(L,3)-PR(3)))
PLP(2) = -PR(3)/PR(1)*(1.+PR(2)*(Y(L,3)+Y(L,2)))
PLP(3) = 0.5*PR(2)/PR(1)*Y(L,2)**2
PR(N) = 0.99*P(N)
PLM(1) = Y(L,2)/PR(1)*(1.+PR(2)*(Y(L,3)-PR(3)))
PLM(2) = -PR(3)/PR(1)*(1.+PR(2)*(Y(L,3)+Y(L,2)))
PLM(3) = 0.5*PR(2)/PR(1)*Y(L,2)**2
DP = 0.02*P(N)
IND = 0
44 CALL FNIT(PLP,X(I,2),XP,X(I,1))
CALL FNIT(PLM,X(I,2),XM,X(I,1))
J(I,N) = (XP-XM)/DP
IF(X(I+1,2).LT.X(I,2)) IND = 1
500 CONTINUE
600 PR(N) = P(N)

C
C -----
C Calculation of JTJ and JTI :
C -----
DO 300 IC=1,NP
JTF(IC) = 0.
DO 300 I=1,ND
300 JTF(IC) = JTF(IC)+J(I,IC)*F(I)
DO 400 IL=1,NP
DO 400 IC=1,NP
JTJ(IL,IC) = 0.
DO 400 I=1,ND
400 JTJ(IL,IC) = JTJ(IL,IC)+J(I,IL)*J(I,IC)
C
333 RETURN
END

```

```

C
C
C-----
C
C  Module name :      MINV      Vers. 25-Nov-85 Fla
C
C  Function:   Inversion of a matrix by the method of Gauss-Jordan
C              Pivoting down the diagonal in rows
C              Simple precision
C              Matrix is totally destroyed !!!
C
C  Use : CALL MINV(X,XI,nl,n,i)
C
C  with - X : matrix
C         XI : inverse of the matrix X
C         nl : dimension of X,XI in main prog.
C         n  : actual size of matrix X
C         i  : indicator   i = 0 normal return
C                   i = 1 singular matrix
C-----
C
C  SUBROUTINE MINV(X,XI,NL,N,IND)
C
C  DIMENSION X(NL,NL),XI(NL,NL)
C
C  IND = 0
C  IPM = 0
C  DO 100
C  IC=1,N
C  DO 100 IL=1,N
C  XI(IL,IC) = 0.
100  IF(IL.EQ.IC) XI(IL,IC) = 1.
C
C  DO 10 IC=1,N
C  D = 0.
C  IP = 0
C  DO 50 I=IC,N
C  V = ABS(X(I,IC))
C  IF(V.LE.D) GOTO 50
C  IP = I
C  D = V
50  CONTINUE
C
C  IF(IP.EQ.0) GOTO 99
C  IPM = MAX0(IPM,IP)
C  IF(IP.EQ.IC) GOTO 11
C  DO 60 I=IC,N
C  D = X(IC,I)
C  X(IC,I) = X(IP,I)
60  X(IP,I) = D
C  DO 600 I=1,N
C  D = X(I,IC)
C  X(I,IC) = X(IP,I)
600 X(IP,I) = D
C
C  11  D = X(IC,IC)
C  DO 20 KC=IC,N
20  X(IC,KC) = X(IC,KC)/D
C  DO 200 KC=1,IPM
200 X(IC,KC) = X(IC,KC)/D
C
C  DO 30 JL=1,N
C  IF(IL.EQ.IC) GOTO 30
C  D = X(IL,IC)
C  DO 40 KC=IC,N

```

```

40  X(IL,KC) = X(IL,KC)-X(IC,KC)*D
    DO 400 KC=1,IPM
400  XI(IL,KC) = XI(IL,KC)-XI(IC,KC)*D
30  CONTINUE
10  CONTINUE
C
    RETURN
C
99  IND = 1
    RETURN
    END

```

```

C
C
C -----
C  Module name :      F N E L I N      Vers. 20-May-86 Fla
C
C  Function : Newton-iteration for solving the equation
C
C  Et = a·X + b·ln(1-X) + c·X2
C
C  in the form X = f(Et)
C
C -----
C  SUBROUTINE FNIT(P,T,U,UI)
C
C  DIMENSION P(1)
C  -----
C
C  EPS = T/10000.
C  U = UI
C  DO 100 I=1,10
C  IF(U.LT.0.) U=0.001
C  IF(U.GE.1.) U=0.999
C  UC = ALOG(1.-U)
C  TC = P(1)*U+P(2)*UC+P(3)*U**2
C  E = T-TC
C  DE = -P(1)+P(2)/(1.-U)-2.*P(3)*U
C  DU = -E/DE
C  U = U+DU
100 IF(ABS(E).LT.EPS) RETURN
C
    RETURN
    END

```

```
C -----  
C  
C Module name :          S U M          Vers. 12-Jan-86 Fla  
C  
C Function : Sum of the elements of a vector to an integer power  
C  
C Simple precision  
C  
C Use : Res = SUM (np,V,nd)  
C  
C with NP : exponent (any integer No.)  
C       V : vector  
C       ND : actual # of data in V  
C -----  
C  
C FUNCTION SUM(NP,V,ND)  
C DIMENSION V(1)  
C  
C IF(NP.EQ.0) GOTO 11  
C IF(NP.EQ.1) GOTO 22  
C  
C S = 0  
C DO 10 I=1,ND  
10 S = S+V(I)**NP  
C SUM = S  
C RETURN  
C  
C 11 SUM = ND  
C RETURN  
C  
C 22 S = 0.  
C DO 20 I=1,ND  
20 S = S+V(I)  
C SUM = S  
C RETURN  
C END
```



```

10  YI(J) = Y(J) + (G1(J)-3.*G3(J)+4.*G4(J))*H/2.
    XI = X + H
    CALL DERIV (YI,XI,G5)
C    CALCUL DE L'ERREUR SUR CHAQUE FONCTION
    DO 11 J=1,N
    YI(J) = Y(J) + (G1(J)+4.*G4(J)+G5(J))*H/6.
    ET = -(G1(J) - 4.5*G3(J) + 4.*G4(J) - 0.5*G5(J))*H/3.
    ERR(J) = 0.
    Z = ABS(YI(J))
    EZ = 1.E-20
    IF (Z.GT.EZ) ERR(J)=ABS(ET/Z)
11  CONTINUE
C
C    CHANGEMENT DE PAS SUIVANT L'ERREUR TOLEREE
C
    ICA = 0
    DO 14 J=1,N
    IF (ERR(J).LT.ERRMAX(J)) GO TO 13
    NHS2 = NHS2 + 1
    IF (NHS2.GT.20) GO TO 995    ! 20 divisions de H par 2 au max.
    H = H/2.
    DO 12 JP=1,N
12  YI(JP) = Y(JP)
    IK = 0
    GO TO 6
13  IF (ERR(J).GT.ERRMAX(J)/16.) ICA=1
14  CONTINUE
    IF (IK.EQ.1) GO TO 16
    IF (ICA+NHS2.EQ.0) H=H*2.    ! Retour au pas initial
    NHS2 = 0
C
C    REINITIALISATION POUR LE PAS SUIVANT
C
    X = XI
    DO 15 J=1,N
15  Y(J) = YI(J)
    GO TO 5
C
C    MEMORISATION ET REINITIALISATION
C
16  IK = 0
    H = H0
    DO 17 J=1,N
    YTAB(J,KTAB) = YI(J)
17  Y(J) = YI(J)
    X = XTAB(KTAB)
    KTAB = KTAB+1
    IF (KTAB.LE.ITAB) GO TO 5
    RETURN
995  WRITE (5,996) NHS2
996  FORMAT(1X,'ARRET APRES',I3,'DIVISIONS PAR 2 DU PAS')
    CALL DERIV (Y,X,G5)
    WRITE(5,997) X,H,(Y(I),I=1,N)
    WRITE(5,998) (G5(I),I=1,N)
997  FORMAT(/' Dernière valeur de X : ',G12.4/,
    '1' Dernière valeur de H : ',G12.4/,
    '1' Dernière valeur de Y :',/,5(2X,10G12.4,))
998  FORMAT(/' Dernières valeurs des dérivées : ',/,5(2X,10G12.4,))
    STOP
999  WRITE (5,1000)
1000 FORMAT (
    '1' Il y a plus de 50 équations : Modifiez le programme RKMER .)
    STOP
    END

```

```

C
C
C -----
C
C Nom du programme :   BIFLOT Vers. 03-Dec-90  SiCr
C
C Ce programme calcule la courbe  $X = f(Eot)$  pour l'hydrolyse
C du DL-PAPE en système biphasique à pH flottant. Le pH est
C le paramètre central, car on doit tenir compte de son influence
C sur:
C   - l'activité de l'enzyme (k2)
C   - le pouvoir tampon du système (BET)
C   - la fraction titrable (FT)
C   - l'équilibre de partage biphasique (XAS,XAP)
C
C La variable commune aux deux équations différentielles est le
C taux de conversion X
C
C Couplé avec : RKMER
C
C -----
C
C BYTE A,B,C,M
C DIMENSION XTAB(101),YTAB(2,101),Y0(2),ERRMAX(2)
C COMMON/VAR/PKS,PCS,PCP,PKAA,PKAS,PKW,PHU,PHL,AF
C COMMON/VAR/SLO,SD,P0,F0
C COMMON/VAR/XK2M,XKM,XK,XKCS,XKCF,XKCK
C
C -----
C
C TYPE 1
C 1  FORMAT(/$ Donnez : SLo, SD, P0, F0 .... [mmol/l] )
C    ACCEPT *,SLO,SD,P0,F0
C
C TYPE 2
C 2  FORMAT(/$ Donnez : k2(pH 5.5) .... [mmol/(g*min)] )
C    ACCEPT *,XK2M
C
C -----
C
C 2000 TYPE 2001
C 2001 FORMAT(/$ Donnez : pHo(max) , pH(min) .... [-] )
C      ACCEPT *,PHU,PHL
C
C TYPE 3
C 3  FORMAT(/$ Donnez : vaq ... [-] )
C    ACCEPT *,AF
C
C -----
C
C Propriétés acide-base
C -----
C
C PKS = 7.06      ! [-]
C PCS = 123.      ! [-]
C PCP = 1.263     ! [-]
C PKAA = 9.13     ! [-]
C PKAS = 1.83     ! [-]
C PKW = 13.83    ! [-]
C -----
C
C Paramètres cinétiques
C -----
C
C XKM = 16.73     ! [mmol/l]
C XK  = 0.00791   ! [l/mmol]
C XKCS = 35.05   ! [mmol/l]
C XKCF = 124.52  ! [mmol/l]
C XKCK = 0.636   ! [-]
C
C -----
C
C TYPE 4

```

```

4  FORMAT(/$ Stockage des valeurs de : X, Eo1, pH ?..(YYY))
ACCEPT 2004,A,B,C
C  -----
IF(A.NE.'Y') GOTO 11
TYPE 5
5  FORMAT(' AT --. GIVE FILENAME FOR - X -/')
CALL ASSIGN(1,..13)
11 IF(B.NE.'Y') GOTO 44
TYPE 6
6  FORMAT(' AT --. GIVE FILENAME FOR - Eo1 -/')
CALL ASSIGN(2,..13)
44 IF(C.NE.'Y') GOTO 111
TYPE 7
7  FORMAT(' AT --. GIVE FILENAME FOR - pH -/')
CALL ASSIGN(3,..13)
C  -----
111 X0 = 0.
    XF = 0.995
    Y0(1) = 0.
    Y0(2) = PHU
    ITAB = 100
    N = 2
    H = 0.001
    ERRMAX(1) = 1.E-5
    ERRMAX(2) = 1.E-5
    CALL RKMER (X0,XF,Y0,N,H,ERRMAX,1,ITAB,XTAB,YTAB)
    DO 100 I=1,ITAB
100 TYPE 2005,I,XTAB(I),YTAB(1,I),YTAB(2,I)
C  -----
IF(A.NE.'Y') GOTO 22
WRITE(1,2006) (XTAB(I),I=1,ITAB)
22 IF(B.NE.'Y') GOTO 33
WRITE(2,2006) (YTAB(1,I),I=1,ITAB)
33 IF(B.NE.'Y') GOTO 999
WRITE(3,2006) (YTAB(2,I),I=1,ITAB)
C  -----
999 CALL CLOSE(1)
    CALL CLOSE(2)
    CALL CLOSE(3)
    TYPE 2002
2002 FORMAT ('$Un nouveau calcul ?... Y')
ACCEPT 2003,M
IF (M.NE.'N') GO TO 2000
2003 FORMAT (A1)
2004 FORMAT(3A1)
2005 FORMAT(' I , X , Eo1, pH = ',I4,3(2X,F9.5))
2006 FORMAT(E13.6)
END

```

SOUS-PROGRAMME D'ECRITURE DES DERIVEES

Donne l'équation de vitesse (modèle cinétique) et la dérivée de l'évolution du pH en fonction du taux de conversion

Appel: CALL DERIV(Eo^t,X,dEot)
ou CALL DERIV(pH,X,dpH)

avec: Eo^t valeur actuelle du temps normalisé
X taux de conversion actuel du L-PAPE
pH valeur du pH
dEot Eo^t·d/dX = G(1)
dpH dpH/dX = G(2)

SUBROUTINE DERIV(Y,X,G)

DIMENSION Y(2),G(2)

COMMON/VAR/PKS,PCS,PCP,PKAA,PKAS,PKW,PHU,PHL,AF

COMMON/VAR/SLO,SD,P0,F0

COMMON/VAR/XK2M,XKM,XK,XKCS,XKCF,XKCK

DATA AL10/2.302585/

Définition de dpH/dX = dY(2)/dX

PH = Y(2)

FW = 10.**(-PH) + 10.**(PH-PKW)

FS1 = 1.+10.**(PKS-PH)+PCS*(1.-AF)/AF

FS2 = 10.**(PKS-PH)

FS3 = 1.+PCS*(1.-AF)/AF

FS = FS2*FS3/FS1**2.

FA1 = 1.+10.**(PH-PKAA)

FA2 = 1.+10.**(PKAA-PH)

FA = 1/(FA1*FA2)

FC1 = 1.+10.**(PH-PKAS)

FC2 = 1.+10.**(PKAS-PH)

FC = 1/(FC1*FC2)

BET = FW*(SD+SLO*(1.-X))*FS + (F0+SLO*X)*(FA+FC)

FT = FS2/FS1 + 1/FA2 - 1/FC1

Définition de Eo^t·d/dX = dY(1)/dX

FS1 = 1.+10.**(PKS-PH)+PCS*(1.-AF)/AF

FS2 = 10.**(PKS-PH)

XAS = (1.+FS2)/FS1

XAP = 1/(1.+PCP*(1.-AF)/AF)

GC = 1.+SD*XAS/XKCS+F0/XKCF+1/XKCK

GX = SLO/XKCF

XK2=XK2M*(28.119-17.283*PH+3.445*PH**2-0.218*PH**3)

T1 = 1.+XK*XAP*(P0+SLO*X)

T2 = XKM*(GC+GX*X)/(XAS*(1.-X))

Dérivées à intégrer

G(1) = T1*(T2+SLO)/XK2

G(2) = - FT*SLO/(BET*AL10)

RETURN
END

CURRICULUM VITAE

Nom, prénom : CRELIER Simon
Date de naissance : le 2 mars 1963
Lieu de naissance : Yverdon-les-bains (VD)
Commune d'origine : Bure (JU)
Nationalité : Suisse
Langue maternelle : français
Autres langues : anglais, allemand (écrit)

Etudes, formation

1968-1973 : Ecoles primaires à Mollens et Ballens (VD)
1973-1979 : Collège secondaire de Morges (VD)
Juillet 1979 : Certificat d'études secondaires type C
1979-1981 : Gymnase Cantonal de la Cité, Lausanne (VD)
Juillet 1981 : Maturité fédérale type C
1981-1985 : Ecole Polytechnique Fédérale, Lausanne (VD)
Janvier 1986 : Diplôme d'ingénieur chimiste EPF
1986-1991 : Ecole Polytechnique Fédérale, Lausanne (VD)
Institut de Génie Chimique
Travail de doctorat sous la direction du prof. A. Renken

