

Valentin SMEETS, Margot VANDER VERREN,
Damien P. DEBECKER*

Université catholique de Louvain (UCLouvain),
Institute of Condensed Matter and Nanosciences (IMCN),
Place Louis Pasteur, 1, box L4.01.09,
1348 Louvain-La-Neuve, Belgium.
damien.debecker@uclouvain.be

Préparation de catalyseurs hybrides chémo-enzymatiques par atomisation

Résumé

L'intérêt de combiner des catalyseurs chimiques (artificiels) et des enzymes apparait de plus en plus clairement, en particulier dans le contexte du développement de procédés plus efficaces, intensifiés, et durable. La fabrication de catalyseurs solides hétérogènes hybrides (chémo-enzymatiques) doit permettre de tirer parti des avantages offerts par les deux partenaires de ces catalyseurs bifonctionnels. Pour contourner la difficulté à intégrer des catalyseurs solides cristallins et microporeux (comme les zéolithes) avec les enzymes dans un même matériau, nous présentons deux voies d'assemblage physique basés sur l'atomisation (ou spray drying). Dans la méthode indirecte, des nanocristaux de zéolithe (le titanosilicate « TS-1 ») sont agrégés par spray drying pour former des sphères creuses dans lesquelles sont ensuite piégées les enzymes (glucose oxydase ou « GOx ») sous forme d'agrégats réticulés. Dans la méthode directe, une solution de complexes « enzymes-polyélectrolytes » est intégrée à la suspension de nanocristaux de TS-1 et le mélange est séché par spray pour forcer l'assemblage de l'hybride. Ces deux méthodes aboutissent à des matériaux bifonctionnels qui permettent de réaliser des réactions en cascade, comme démontré ici pour l'époxydation de

l'alcool allylique (chémo-catalyse sur la TS-1) alimentée par le peroxyde d'hydrogène produit in situ (biocatalyse par la GOx).

1. Introduction

Alors que la catalyse est historiquement divisée en trois sous-catégories – homogène, hétérogène, et enzymatique, il apparait maintenant essentiel de tirer parti des avantages et forces que chacune de ces catalyses offre afin de développer des procédés de synthèse plus respectueux de l'environnement [1]. Plus de 85% des produits chimiques sont actuellement produits à l'aide de catalyseurs hétérogènes ou homogènes et, bien que ces deux types de catalyse permettent d'atteindre des hauts niveaux de performance en termes de sélectivité et rendement dans un large spectre d'applications, la catalyse hétérogène se démarque de par sa robustesse (*i.e.* la capacité de travailler à haute température et haute pression, la recyclabilité, etc) [2, 3]. Elle est effectivement avantageusement utilisée dans l'industrie puisque les catalyseurs hétérogènes permettent de travailler de manière continue et sont facilement récupérables (et réutilisables) après réaction, ce qui permet de réduire les coûts de production [4].

Les enzymes, utilisées en biocatalyse, offrent également de nombreux avantages puisqu'elles permettent de produire des composés à haute valeur ajoutée dans des conditions de réactions douces (basse température, milieux aqueux, pression atmosphérique) avec une grande sélectivité et spécificité [5]. Cependant, travailler avec des enzymes à l'échelle industrielle peut s'avérer complexe car ces dernières souffrent d'une faible stabilité. Les enzymes, ordonnées en structures primaire, secondaire et tertiaire (voire dans certains cas quaternaire), peuvent en effet être dénaturées une fois que leur structure tertiaire (ou quaternaire) est altérée. La conséquence directe de la dénaturation est une perte de l'activité enzymatique [6, 7]. Ce phénomène est observé lorsque l'enzyme est soumise à des stress extérieurs tels qu'une température élevée, l'agitation mécanique, la présence d'un composé chimique dénaturant, un pH extrême, etc. Le risque de dénaturation durant la réaction ainsi que la difficulté de séparer l'enzyme du milieu réactionnel en fin de réaction peuvent engendrer des coûts d'utilisation élevés pour les procédés industriels.

Une solution pour pallier ces problèmes est d'immobiliser l'enzyme sur un support solide afin de créer un système hétérogène [8]. En effet, l'immobilisation sur un support solide (par adsorption, ancrage covalent ou encapsulation par exemple) permet dans un grand nombre de cas de stabiliser l'enzyme contre les conditions de la réaction tout en facilitant sa récupération en fin de réaction [9]. De plus, l'immobilisation permet d'envisager des procédés continus, par exemple en réacteur à lit fixe [10]. Dans l'optique de tirer davantage profit de l'immobilisation d'une enzyme sur un support, il est envisageable d'utiliser un catalyseur hétérogène comme support plutôt qu'un support inerte. Le catalyseur obtenu, qualifié de catalyseur hybride, combine alors les avantages et activités des deux partenaires – enzyme et catalyseur inorganique – sur un seul et même solide. Un tel catalyseur bifonctionnel offre des perspectives attrayantes pour effectuer des réactions chémo-enzymatiques en cascade au sein d'un même milieu réactionnel [11]. Dans

de tel système, le produit de la première réaction est utilisé comme substrat pour la seconde réaction. Actuellement, bien que l'intérêt pour les systèmes catalytiques hybrides chémo-enzymatiques s'intensifie, seuls quelques exemples de ce type de combinaisons existent dans la littérature [12-14].

Parmi celles-ci, une combinaison enzyme-zéolithe a été investiguée par le groupe de recherche de Grunwaldt afin de réaliser des réactions d'époxydation [15, 16]. Cette réaction d'oxydation sélective à haut intérêt industriel permet de produire des intermédiaires réactifs pouvant ensuite être transformés en résines, plastiques, revêtements et autres produits à haute valeur ajoutée [17]. Parmi les oxydants les plus couramment utilisés, le peroxyde d'hydrogène est actuellement l'un des plus intéressants puisqu'il est considéré comme un oxydant « vert » [18, 19]. En effet, le seul sous-produit formé en travaillant avec H_2O_2 comme oxydant est l'eau. Néanmoins, bien que l'utilisation de H_2O_2 s'inscrive dans le cadre des « principes de la chimie verte », les peroxydes sont généralement instables et corrosifs, ce qui peut entraîner des risques en matière de sécurité lors du transport, de la manutention, et du stockage. Pour cette raison, le peroxyde d'hydrogène est généralement transporté sous forme de solutions aqueuses diluées, ce qui entraîne une augmentation des coûts de transport. Additionné à cela, le procédé de production du H_2O_2 (procédé à l'antraquinone) est relativement polluant et entraîne d'importants coûts énergétiques [19].

Les problèmes engendrés par l'utilisation du peroxyde d'hydrogène peuvent être évités en envisageant de produire celui-ci *in situ* à l'aide d'une enzyme de type oxydase [20]. En 2010, Grunwaldt *et al.* [16] ont proposé de coupler la glucose oxydase (GOx), une enzyme produisant de la D-glucono- δ -lactone par oxydation de glucose en présence d'oxygène et formant du peroxyde d'hydrogène comme co-produit, avec la zéolithe TS-1 (Schéma 1). Cette zéolithe offre en effet de très bonnes performances pour la transformation d'oléfines en époxydes en présence de H_2O_2 [20, 21]. Elle est ainsi

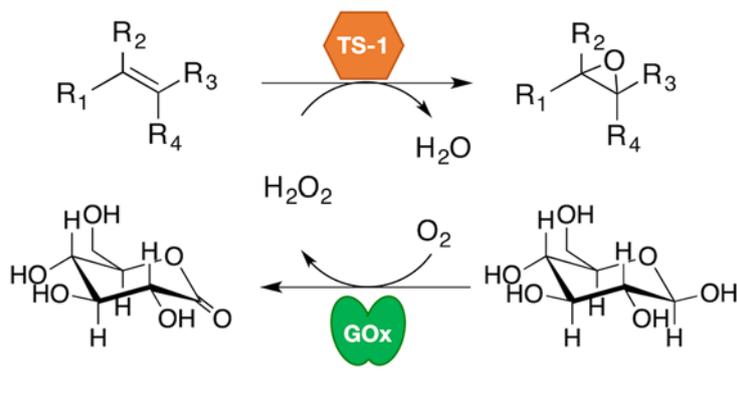


Schéma 1. Réaction d'époxydation chémo-enzymatique résultant du couplage de la glucose oxydase (GOx) et de la zéolithe TS-1.

notamment utilisée à l'échelle industrielle par BASF pour la production de l'oxyde de propylène. Dans le cas de la réaction en cascade, le peroxyde d'hydrogène utilisé comme oxydant dans la réaction d'époxydation est produit par l'enzyme, ce qui permet d'avoir une production contrôlée et *in situ* de l'oxydant, évitant ainsi les problèmes inhérents à la production centralisée de ce dernier (voir ci-dessus).

2. Du défi de coupler une enzyme et une zéolithe

Bien que l'étude menée par Grunwaldt *et al.* sur l'époxydation chémo-enzymatique des oléfines ait montré des résultats encourageants pour la production de glycidol au départ d'alcool allylique dans un milieu contenant le TS-1 et la glucose oxydase en solution (jusqu'à environ 16% de conversion de l'alcool allylique avec une sélectivité de 23% pour l'époxyde), la production d'époxyde a chuté de façon importante lorsque l'enzyme a été immobilisée sur le TS-1 *via* un ancrage covalent (greffage en présence de 3-aminopropyltriéthoxysilane [APTES] et glutaraldéhyde) [16]. Ce résultat décevant découle d'une série de limitations pour la combinaison d'une enzyme et d'une zéolithe (ainsi que tout autre solide aux propriétés structurales et texturales similaires) au sein d'un même solide. Durant la préparation, la microporosité du réseau zéolithique (0,55 nm dans le cas de la TS-1) limite le greffage de l'enzyme à la surface

externe, ce qui contribue à restreindre le contenu (et donc l'activité) enzymatique ainsi qu'à exposer l'enzyme immobilisée au milieu réactionnel où les contraintes mécaniques sont susceptibles d'affecter sa stabilité. Par ailleurs, dans le cas de la glucose oxydase, une limitation supplémentaire est la désactivation de l'enzyme par le peroxyde d'hydrogène lui-même (inhibition réversible à l'échelle du site actif et désactivation irréversible par réaction au niveau de la chaîne peptidique) [22, 23]. Cette dernière limitation nécessite un contrôle fin de la localisation des sites actifs afin d'éviter l'accumulation de H₂O₂.

3. Vers une nouvelle stratégie de couplage enzyme-zéolithe

Afin de réduire la dépendance aux propriétés physico-chimiques de la zéolithe et ainsi de mieux contrôler le contenu enzymatique au sein du solide, nous avons dans un premier temps décidé de travailler sur la formation d'agrégats enzyme-zéolithe par atomisation (Schéma 2). Cette approche consiste à mélanger deux flux constitués d'une suspension liquide (contenant les précurseurs) et d'un gaz comprimé qui s'expande au niveau de la buse, générant un spray composé de fines gouttelettes de la suspension liquide qui, sous l'effet d'un gradient de température, vont sécher rapidement. Du fait de ses nombreux avantages en termes de productivité et de facilité de mise en œuvre, cette technique de séchage en spray (« Spray-drying ») est

couramment utilisée dans l'industrie chimique, pharmaceutique, et alimentaire afin d'obtenir des poudres [24, 25]. Au niveau des molécules biologiques, le séchage en spray est couramment utilisé pour la fabrication de microparticules à base de protéines tel que le collagène [26]. En revanche, très peu d'exemples ont été répertoriés concernant l'atomisation d'enzymes pour lesquels la préservation des structures tertiaires et quaternaires lors du séchage est essentielle au maintien de l'activité [27]. Au niveau des zéolithes, le procédé d'atomisation a notamment été exploité afin de créer des microsphères à porosité hiérarchisée formées par assemblage de nano-cristaux de zéolithe [28]. En effet, bien que les nano-cristaux de zéolithe soient très actifs, en pratique leur manipulation est compliquée. L'assemblage en microsphères permet de les manipuler aisément (filtration, centrifugation, réutilisation, disposition en réacteur continu à lit fixe, etc.) Par ailleurs, l'ajout d'une petite quantité de précurseur de silice permet de renforcer la rigidité de la structure en générant *in situ* un agent liant (« binder ») par chimie sol-gel [29, 30], ce qui permet d'accroître la résistance du matériau aux contraintes mécaniques.

Inspirés par les travaux précités sur l'atomisation de protéines d'une part, et de nano-zéolithes d'autre part, nous avons décidé dans une première approche d'exploiter l'atomisation afin

d'incorporer – en une étape – la glucose oxydase sous sa forme libre à des microsphères zéolithiques poreuses formées par l'agrégation de cristaux de TS-1. Un précurseur de silice a été ajouté en faible proportion (10 % en volume) comme agent liant entre les cristaux de zéolithes. Ce mélange est atomisé et séché à basse température (50°C) afin de réduire les risques de dénaturation de l'enzyme tout en garantissant l'agrégation des cristaux de zéolithes et l'intégration des enzymes dans le matériau. Bien que permettant d'incorporer avec succès l'enzyme au solide, cette approche ne donne que des résultats médiocres en ce qui concerne la préservation de l'activité enzymatique (2% d'activité résiduelle, voir Figure 2). Comme attendu, l'exposition de l'enzyme libre aux conditions de l'atomisation (évaporation rapide du solvant, hautes températures, forces de cisaillement) a provoqué la désactivation de cette dernière. Ce résultat démontre l'importance de développer des stratégies qui permettent de maintenir l'activité de l'enzyme durant la préparation. Ci-dessous, nous décrivons deux méthodes dites « directe » [31] et « indirecte » [32] pour la préparation de catalyseurs hybrides par atomisation (Schéma 3).

3.1. Méthode « indirecte »

Dans cette approche, une sphère zéolithique creuse est obtenue par atomisation et utilisée

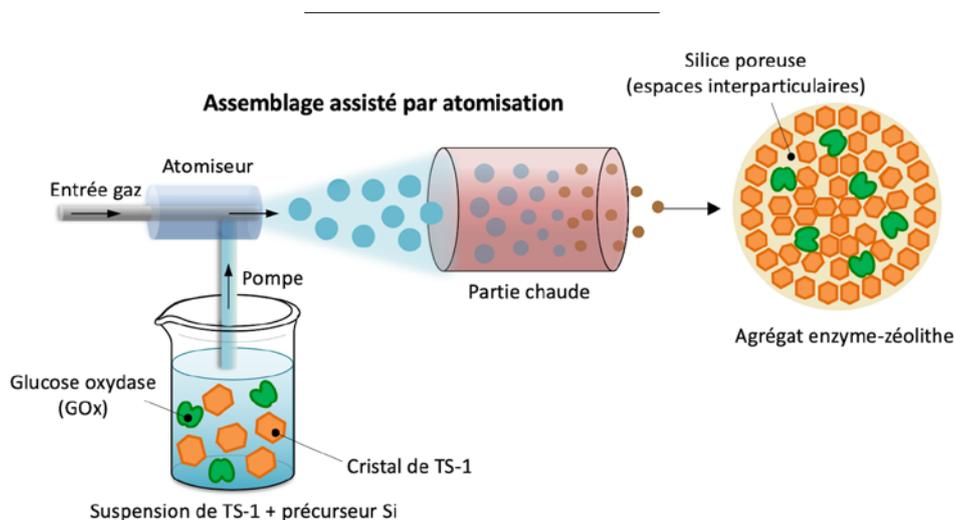


Schéma 2. Formation d'agrégats enzyme-zéolithe par atomisation à l'aide d'un appareil de séchage en spray.

comme hôte pour l'enzyme qui est agrégée *in situ* afin d'éviter son lessivage du solide (Schéma 3A). Cette méthode en deux étapes requiert l'utilisation de milieux de synthèse distincts afin de contrôler d'une part la morphologie et la porosité du solide inorganique, et d'autre part la localisation de l'enzyme dans le solide. Ce système de compartimentalisation entre l'enzyme et la zéolithe se distingue donc de l'approche « directe » dans laquelle des complexes enzymatiques sont directement distribués de façon homogène au sein de l'agrégat de zéolithes formé par atomisation (voir Section 3.2).

3.1.1. Synthèse du solide inorganique

Dans un premier temps, des sphères zéolithiques creuses ont été obtenues au départ d'une suspension de nano-cristaux de zéolithes TS-1

[33] à laquelle a été ajouté un précurseur de silice faisant office d'agent liant entre les cristaux de TS-1. Des agents porogènes (le surfactant F127 et l'hydroxyde de tétrapropylammonium, TPAOH) sont également incorporés dans la silice amorphe afin d'y ménager une porosité (*ca.* 10–20 nm, voir Figure 1) [34] et rendre la cavité centrale accessible aux enzymes (6,0 x 5,2 x 7,7 nm) [35]. Ces derniers assurent également un accès aux sites actifs des zéolithes des microsphères.

Ce mélange a été atomisé à basse température (80°C) afin de favoriser une morphologie sphérique des particules, et le solide ainsi formé et séché a ensuite été calciné à haute température (550°C pendant 5h) afin d'éliminer les agents porogènes et de révéler ainsi la porosité du matériau. Les paramètres utilisés lors de l'atomisation ont été choisis afin de favoriser

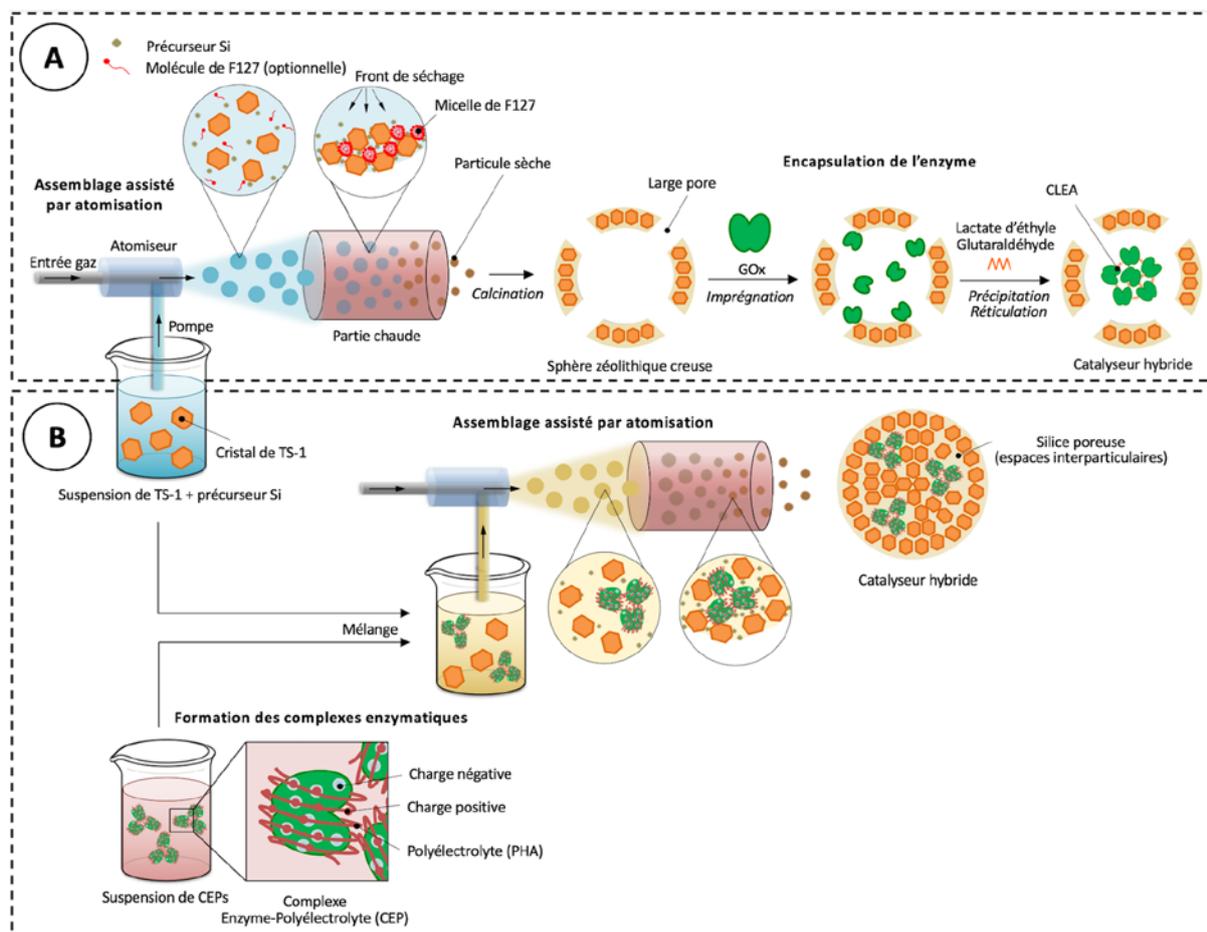


Schéma 3. Développement de nouveaux catalyseurs hybrides par atomisation. (A) = méthode « indirecte », (B) = méthode « directe ».

la formation de particules creuses, ce qui nous a permis d'obtenir des sphères à porosité hiérarchisée constituée d'une cavité centrale macroporeuse (*ca.* 0,4–1 mm) et d'une croute mésoporeuse (10–20 nm) formée par l'agrégation des particules de zéolithes microporeuses liés par une phase de silice amorphe mésoporeuse (Figure 1). Le volume poreux total de ces particules est de $1,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ pour une surface spécifique externe de $320 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. En comparaison, les nanocristaux de TS-1 présentent un volume poreux de $0,43 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (dont $0,28 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ associé au volume interparticulaire) et une surface spécifique externe de $130 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. L'activité intrinsèque des zéolithes TS-1 en époxydation a été préservée après atomisation, indiquant que le procédé n'a pas affecté la structure de la zéolithe ainsi que l'accessibilité des sites actifs.

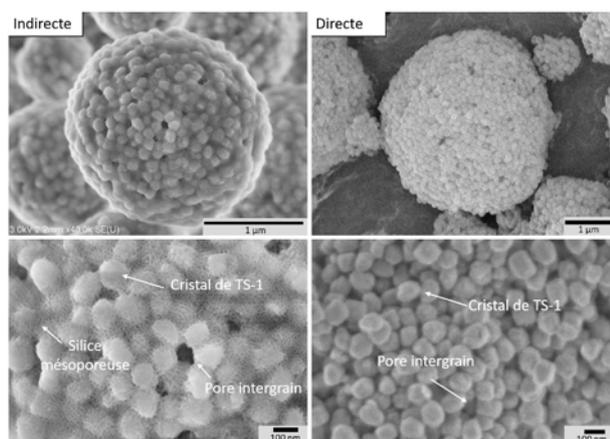


Figure 1. Images obtenues par microscopie électronique à balayage des catalyseurs hybrides synthétisés par les méthodes « indirecte » (gauche) et « directe » (droite).

3.1.2. Encapsulation de l'enzyme

Dans un second temps, le solide inorganique (microsphères creuses) a été mis en suspension dans une solution enzymatique dont la concentration a été ajustée afin de satisfaire à un contenu théorique de 50 mg d'enzyme par gramme de matériau. Une fois le solide imprégné, l'excès de solution enzymatique a été retiré par centrifugation et un agent précipitant, le lactate d'éthyle, a été ajouté au solide afin d'entraîner la précipitation des enzymes dès lors encapsulées dans le solide inorganique. L'ajout consécutif d'un agent réticulant, le glutaraldéhyde, à la suspension

a ensuite permis d'unir les enzymes précipitées par un lien covalent, formant ainsi des agrégats enzymatiques dénommés « CLEAs » (« Cross-Linked Enzyme Aggregates ») [36, 37]. Le matériau hybride ainsi obtenu a ensuite été lavé à l'eau distillée et remis en suspension aqueuse. Le contenu en enzyme mesuré expérimentalement par ATG est de 37 mg g^{-1} , soit environ 75% du contenu nominal. Le contenu final en enzyme étant dépendant du volume poreux des sphères zéolithiques, celui-ci peut aisément être ajusté en modifiant la concentration en enzymes dans le milieu d'imprégnation. L'activité de l'enzyme immobilisée est inférieure à celle de l'enzyme libre (Figure 2), ce qui est le résultat de la réticulation des enzymes qui peut entraver l'accès à certains sites actifs. Néanmoins, une étude de la stabilité thermique réalisée sur l'enzyme libre et encapsulée dans les microsphères creuses a montré que l'enzyme encapsulée résiste mieux à une augmentation de température de 25°C à 45°C que l'enzyme libre. Ceci pourrait être un atout majeur pour la survie des enzymes en conditions réactionnelles. Aucun lessivage de l'enzyme n'a par ailleurs été observé sur le catalyseur hybride.

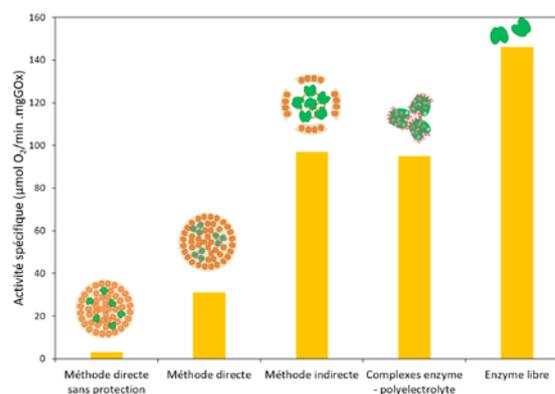


Figure 2. Activité enzymatique de la glucose oxydase dans les différents hybrides de ce travail, ainsi que sous sa forme complexée et libre. Conditions expérimentales : $T = 45^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,0$, $[\text{Glucose}] = 200 \text{ mM}$, $[\text{O}_2] = 0,8 \text{ mM}$. La mesure de l'activité enzymatique de l'hybride synthétisé par méthode directe est entachée d'une erreur relative de $\pm 5,5\%$ ($n = 3$). Nous considérons que cette erreur relative est similaire pour les autres mesures.

3.2. Méthode « directe »

Dans cette deuxième approche, la synthèse du catalyseur hybride est réalisée par le spray drying directement à partir d'une suspension contenant

à la fois les nanocristaux de zéolithe et l'enzyme (Schéma 3B). Pour éviter la désactivation complète de l'enzyme dans le spray, celle-ci est préalablement stabilisée via la formation de complexes enzyme–polyélectrolyte. Les sphères formées par la méthode directe sont donc le résultat de l'agrégation des nanocristaux de zéolithes en présence des complexes enzymatiques qui sont distribués de manière homogène dans l'agrégat.

3.2.1. Préparation de la suspension de complexes enzyme-polyélectrolyte

Dans un premier temps, une suspension de complexes enzyme–polyélectrolyte a été obtenue en mélangeant une solution enzymatique de glucose oxydase et une solution de poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH). La formation des complexes enzymatiques est spontanée et repose sur les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals présentes entre la surface de l'enzyme, chargée négativement, et le PAH portant plusieurs charges positives par molécule [38]. Les quantités de chacun des constituants de la suspension ont au préalable été optimisées afin de s'assurer que toutes les enzymes présentes en solution sont complexées par le polyélectrolyte (ratio de charge (+) / (-) = 6.6). Les complexes ainsi obtenus ont une taille moyenne de 1 μm . L'activité enzymatique résiduelle dans les complexes atteint 65% de celle obtenue avec l'enzyme libre (Figure 2). Cette diminution d'activité est probablement le résultat de limitations diffusionnelles au sein des complexes, ou de la création d'un micro-environnement qui diffère du reste de la solution. En particulier, le pH peut être modifié localement au sein du complexe [39, 40]. Une stabilisation de l'activité enzymatique est d'ailleurs observée sur la fenêtre de pH 6–7 pour les complexes, alors que dans le cas de l'enzyme libre, l'activité chute rapidement quand le pH dépasse 6. La stabilité thermique de l'enzyme dans les complexes reste quant à elle identique à celle de l'enzyme libre.

3.2.2. Synthèse du catalyseur hybride

Dans un second temps, la suspension de complexes enzyme–polyélectrolyte a été mélangée à une suspension de zéolithes TS-1

contenant un précurseur de silice (10 % en volume). La concentration de complexes enzyme–polyélectrolyte dans le milieu de synthèse a été ajustée afin d'obtenir un contenu théorique en enzymes de 45 mg g^{-1} dans le matériau final. Le séchage par atomisation, réalisé également à 50°C, a induit l'agrégation des cristaux de zéolithes et des complexes enzymatiques en particules de taille comprise entre 0,8 et 5 μm . Le volume poreux total de ces particules est de 0,3 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ pour une surface spécifique externe de 125 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. Contrairement aux microsphères obtenues par la méthode indirecte les particules synthétisées dans cette section ne sont pas creuses. La porosité est issue exclusivement des espaces interparticulaires (Figure 1). L'activité intrinsèque initiale des zéolithes en époxydation est réduite de moitié dans le matériau hybride.

A l'inverse de la méthode indirecte, il n'est pas possible de prédire la localisation des complexes enzymatiques au sein des agrégats zéolithiques. L'hypothèse la plus probable est qu'ils sont distribués de manière homogène dans les agrégats. L'incorporation des complexes enzymatiques dans le matériau a été vérifiée par ATG. L'immobilisation par cette méthode permet d'incorporer la totalité des EPCs avec un contenu en matière organique de 53 mg g^{-1} (vs. 50 mg g^{-1} en théorie). L'activité des complexes enzymatiques dans le matériau hybride s'élève quant à elle à 35 U mg^{-1} , ce qui équivaut à une activité enzymatique résiduelle de 33% comparée à celle des complexes (Figure 2). Cette fois encore, aucun lessivage de l'enzyme n'a été observé dans ce matériau.

4. Évaluation des performances des catalyseurs hybrides pour l'époxydation chémo-enzymatique de l'alcool allylique

Afin d'évaluer les performances des catalyseurs hybrides, nous avons utilisé comme réaction modèle l'époxydation de l'alcool allylique avec production biocatalytique et *in situ* de H_2O_2 au départ de glucose et d'oxygène. Pour ce type de réaction en cascade, l'introduction de TS-1 seul n'induit aucune activité du fait de l'absence de

H_2O_2 . *A contrario*, l'utilisation de la zéolithe couplée à la glucose oxydase permet d'induire une catalyse en tandem où le produit de la première réaction catalytique – dans ce cas l'oxydation du glucose par l'enzyme avec co-production de H_2O_2 – est utilisé comme substrat pour la seconde réaction – ici l'époxydation de l'alcool allylique en présence de H_2O_2 et catalysée par la zéolithe (Figure 3, voir aussi Schéma 1).

Une étude préliminaire des conditions expérimentales sur les deux partenaires catalytiques a été réalisée afin de définir une fenêtre opératoire commune. Par ailleurs, afin de pallier la consommation d'oxygène par l'enzyme, un système de boucle de régénération composé d'une pompe et d'une membrane perméable à l'oxygène a été mis en place. En outre, un titrage en continu de l'acide gluconique produit par l'enzyme a été prévu afin de prévenir une acidification du milieu et ainsi de maintenir le pH à une valeur constante. Dans ces conditions opératoires optimisées, les deux catalyseurs hybrides ont été testés individuellement, en suivant les concentrations en glucose (Figure 3a), H_2O_2 (Figure 3b), et époxyde (glycidol, Figure 3c).

Comme le montre la Figure 3, une production d'époxyde *via* la réaction en cascade a été observée pour les deux catalyseurs hybrides (conversion de glucose allant de 34 à 50% et sélectivité pour l'époxyde comprise entre 66 et 69% après 24h de réaction). Par ailleurs, des comportements distincts ont été observés sur les deux matériaux. D'une part, le catalyseur obtenu par la méthode « indirecte » montre une productivité initiale en époxyde plus importante associée à une grande vitesse de consommation du glucose. D'autre part, ce même catalyseur semble se désactiver plus rapidement que son homologue obtenu par la méthode « directe », comme en témoigne la décroissance rapide de la concentration en H_2O_2 après 1h ainsi que la diminution de la vitesse de production de l'époxyde au-delà de 2h. Au final, c'est le catalyseur obtenu par la méthode « directe » qui montre une production en époxyde supérieure au terme de la réaction (24h). A ce moment, la concentration en H_2O_2 n'est pas nulle, indiquant par ailleurs que l'enzyme est toujours active. A l'inverse, le catalyseur obtenu par la méthode « indirecte » semble ne plus présenter d'activité enzymatique au terme de la réaction, indiquant une inactivation de l'enzyme dans ce matériau.

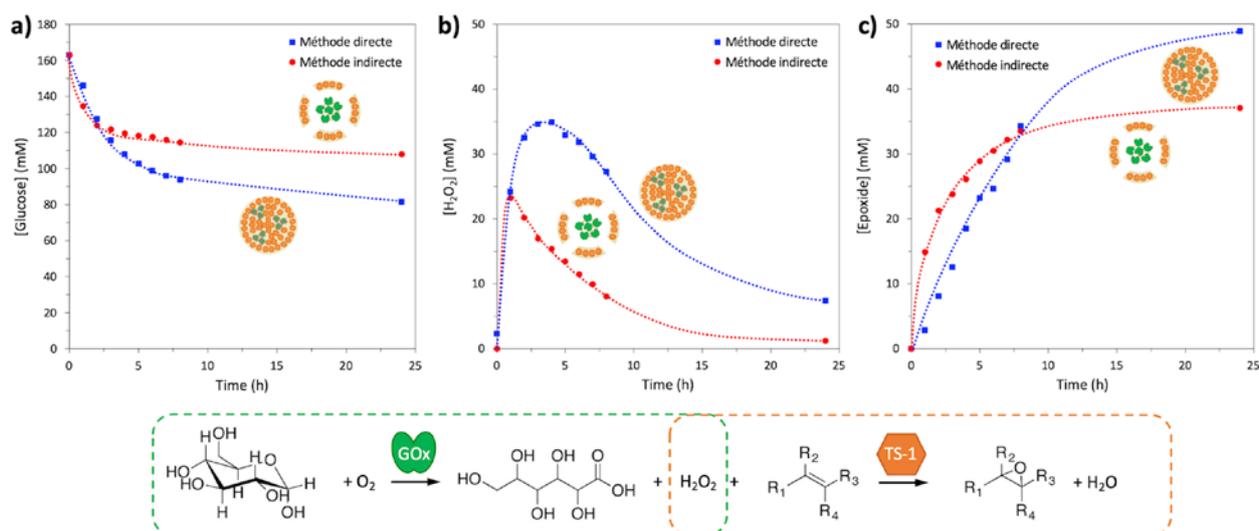


Figure 3. Époxydation chémo-enzymatique de l'alcool allylique en présence des catalyseurs hybrides obtenus par atomisation. a) Évolution de la concentration en glucose, b) évolution de la concentration en H_2O_2 , c) évolution de la concentration en époxyde (glycidol). Conditions expérimentales : $T = 45^\circ\text{C}$, $[\text{Glucose}] = 0,16 \text{ M}$, $[\text{CATA}] = 5 \text{ g.l}^{-1}$, $[\text{alcool allylique}] = 0,9 \text{ M}$, temps de réaction = 24 h.

Le peroxyde d'hydrogène est connu pour désactiver l'enzyme de façon irréversible du fait de sa réactivité à l'encontre de certains résidus de l'enzyme. La différence de comportement entre les deux catalyseurs hybrides semble indiquer que la distribution spatiale des espèces catalytiques a un effet sur la stabilité de l'enzyme. Plus que l'association des deux partenaires catalytiques, la proximité entre les sites actifs semble favoriser la stabilité de l'enzyme (par la conversion rapide du peroxyde) et donc les performances du catalyseur hybride. Cette observation nous encourage (dans les travaux de recherche en cours) à tenter de concevoir des catalyseurs hybrides avec un meilleur contrôle sur l'organisation spatiale des deux entités catalytiques pour améliorer les performances.

5. Conclusion

Dans diverses applications, il apparaît opportun de chercher à tirer parti des avantages offerts par les enzymes d'une part et de ceux offerts par les catalyseurs hétérogènes d'autre part. L'idée de développer des catalyseurs hybrides chémo-enzymatiques permet d'envisager des procédés intensifiés et potentiellement plus verts. Au-delà de l'exemple de réaction discuté ici (une oxydation sélective alimentée par du peroxyde d'hydrogène produit in situ), de nombreuses transformations chimiques pourraient être réalisées en cascade avec des productivités et des sélectivités améliorées : synthèse de molécules chirales, valorisation de composés biosourcés, etc. Cependant, certains catalyseurs hétérogènes sont peu adaptés pour former de tels hybrides avec les enzymes. En particulier, il est compliqué d'immobiliser des enzymes sur/dans des catalyseurs solides cristallins et/ou microporeux comme les zéolithes.

Dans cette contribution, nous avons montré que les méthodes d'atomisation (spray) peuvent être avantageusement utilisées pour obtenir des catalyseurs hybrides « enzyme + zéolithe ». L'avantage principal est que ces méthodes reposent sur des assemblages physiques, en lieu place des stratégies classiques d'encapsulation

dans les pores (trop petits), de simple physisorption (interactions trop faibles) ou de greffage covalent (inefficace ou dénaturant). Dans une première approche, la voie aérosol donne accès à des objets creux (microcapsules, aussi appelées microsphères) constitués de l'agrégation de nanocristaux de zéolithe, qui peuvent être utilisés comme « cargo » pour les enzymes piégées dans la cavité centrale. Cette méthode indirecte (en deux étapes) permet aisément d'adapter les proportions d'enzymes et de zéolithes. Dans une deuxième approche, il s'agit de forcer l'agrégation entre les zéolithes et les enzymes directement par le séchage de gouttelettes qui contiennent les deux espèces. Cette méthode directe nécessite la mise en place de stratégies de stabilisation de l'enzyme pour augmenter sa résistance aux conditions dénaturantes du spray. Nous montrons ici l'intérêt de la formation de complexes enzymes-polyélectrolytes pour une telle stabilisation. Les deux méthodes ont permis de mener des réactions chémo-enzymatiques en cascade.

L'organisation spatiale des deux espèces catalytiques au sein de l'hybride (mêlées intimement ou au contraire compartimentées) est un élément crucial à évaluer, optimiser, et exploiter pour mener efficacement les réactions chimiques en cascade. Ce paramètre de proximité gouverne le comportement de l'hybride en influant sur les désactivations mutuelles, le transfert rapide des intermédiaires réactionnels, etc. Les procédés aérosol sont idéalement positionnés pour générer des catalyseurs hybrides modèles qui permettront d'élucider ces phénomènes et potentiellement de préparer certains catalyseurs du futur pour l'industrie chimique.

Références

- [1] F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding and U. T. Bornscheuer, *Nat Catal*, 2018, **1**, 12–22.
- [2] J. N. Armor, *Catalysis Today*, 2011, **163**, 3–9.
- [3] S. T. Oyama, *Mechanisms in Homogeneous and Heterogeneous Epoxidation Catalysis*, Elsevier Science, 2011.
- [4] M. J. Climent, A. Corma and S. Iborra, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 1072–1133.
- [5] N. J. Turner, *Trends in Biotechnology*, 2003, **21**, 474–478.
- [6] M. Koizumi, H. Hirai, T. Onai, K. Inoue and M. Hirai, *J. Appl. Cryst.*, 2007, 175–178.
- [7] C. C. M. Groot and H. J. Bakker, *Journal of Physical Chemistry*, 2016, 1800–1804.
- [8] A. A. Homaci, R. Sariri, F. Vianello and R. Stevanato, *Journal of Chemical Biology*, 2013, **6**, 185–205.
- [9] S. Nisha, A. Karthick and G. Nallathambi, *Chemical Science Review and Letters*, 2012, 148–155.
- [10] L. van den Biggelaar, P. Soumillion and D. P. Debecker, *RSC Advances*, 2019, **9**, 18538–18546.
- [11] F. Dumeignil, M. Guehi, A. Gimbernat, M. Capron, N. Lopes Ferreira, R. Froidevaux, J.-S. Girardon, R. Wojcieszak, P. Dhulster and D. Delcroix, *Catalysis Science & Technology*, 2018, **00**, 1–27.
- [12] D. P. Debecker, V. Smeets, M. Van der Verren, H. Meersman Arango, M. Kinnaer and F. Devred, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2020, 100437.
- [13] X. Li, X. Cao, J. Xiong and J. Ge, *Small*, 2019, 1902751.
- [14] A. Gimbernat, M. Guehl, M. Capron, N. Lopes Ferreira, R. Froidevaux, J.-S. Girardon, P. Dhulster, D. Delcroix and F. Dumeignil, *ChemCatChem*, 2017, **9**, 2080–2084.
- [15] P. N. R. Vennestrøm, C. H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt and J. M. Woodley, *ChemCatChem*, 2010, **2**, 249–258.
- [16] P. N. R. Vennestrøm, E. Taarning, C. H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt and J. M. Woodley, *ChemCatChem*, 2010, **2**, 943–945.
- [17] G. Grigoropoulou, J. H. Clark and J. A. Elings, *Green Chemistry*, 2003, **5**, 1–7.
- [18] C. Lennicke, J. Rahn, R. Lichtenfels, L. A. Wessjohann and B. Seliger, *Cell Communication and Signaling*, 2015, **13**.
- [19] J. M. Campos-Martin, G. Blanco-Brieva and J. L. G. Fierro, *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, **45**, 6962–6984.
- [20] C. M. Wong, K. H. Wong and X. D. Chen, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **78**, 927–938.
- [21] V. Smeets, E. M. Gaigneaux and D. P. Debecker, *ChemCatChem*, 2022, **14**, DOI:10.1002/cctc.202101132.
- [22] J. Bao, K. Furumoto, M. Yoshimoto, K. Fukunaga and K. Nakao, *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **13**, 69–72.
- [23] K. Kleppe, *Biochemistry*, 1966, **5**, 139–143.
- [24] A. Sosnik and K. P. Seremeta, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2015, **223**, 40–54.
- [25] A. B. D. Nandiyanto and K. Okuyama, *Advanced Powder Technology*, 2011, **22**, 1–19.
- [26] M. Lama, F. M. Fernandes, A. Marcellan, J. Peltzer, M. Trouillas, S. Banzet, M. Grosbot, C. Sanchez, M. Giraud-Guille, J. Lataillade, B. Coulomb, C. Boissière and N. Nassif, *Small*, 2020, **16**, 1902224.
- [27] K. Samborska, D. Witrowa-Rajchert and A. Gonçalves, *Drying Technology*, 2005, **23**, 941–953.
- [28] M. Klumpp, L. Zeng, S. A. Al-Thabaiti, A. P. Weber and W. Schwieger, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2016, **229**, 155–165.
- [29] G. Davies, J. Driver, A. Ward, L. Negahdar and J. McGregor, *J. Phys. Chem. C*, 2021, **125**, 22591–22602.
- [30] D. P. Debecker, S. L. Bras, C. Boissière, A. Chaumonnot and C. Sanchez, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 4112–4155.
- [31] M. Van der Verren, V. Smeets, A. vander Straeten, C. Dupont-Gillain and D. P. Debecker, *Nanoscale Advances*, 2021, **3**, 1646–1655.
- [32] V. Smeets, W. Baaziz, O. Ersen, E. M. Gaigneaux, C. Boissière, C. Sanchez and D. P. Debecker, *Chemical Science*, 2020, **11**, 954–961.
- [33] A. Thangaraj, M. J. Eapen, S. Sivasanker and P. Ratnasamy, *Zeolites*, 1992, **12**, 943–950.
- [34] V. Smeets, C. Boissière, C. Sanchez, E. M. Gaigneaux, E. Peeters, B. F. Sels, M. Dusselier and D. P. Debecker, *Chem. Mater.*, 2019, **31**, 1610–1619.
- [35] A. Y. Khan, S. B. Noronha and R. Bandyopadhyaya, *Biochemical Engineering Journal*, 2014, **91**, 78–85.
- [36] R. A. Sheldon and S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6223–6235.
- [37] R. Schoevaert, M. W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A. P. G. Kieboom, F. van Rantwijk, L. A. M. van der Wielen and R. A. Sheldon, *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, **87**, 754–762.
- [38] A. vander Straeten, A. Bratek-Skicki, L. Germain, C. D’Haese, P. Eloy, C.-A. Fustin and C. Dupont-Gillain, *Nanoscale*, 2017, **9**, 17186–17192.
- [39] L. Goldstein, Y. Levin and E. Katchalski, *Biochemistry*, 1964, **3**, 1913–1919.
- [40] Y. Zhang, Q. Wang and H. Hess, *ACS Catalysis*, 2017, **7**, 2047–2051.