

Introduction en génie enzymatique

Le génie enzymatique est une branche de l'ingénierie des bioprocédés qui relève de l'exploitation des enzymes en passant par l'identification de leurs spécificités, les conditions de leur purification, leur modification dans le but d'améliorer leurs propriétés et les conditions optimales de la catalyse enzymatique et enfin la production à grande échelle à des fins appliquées.

I) Origines des enzymes

L'origine des enzymes industrielles peut avoir plusieurs sources : Origine végétale, Origine animale, Origine microbienne ;

I.1) Origine végétale Les enzymes végétales les plus utilisés sont généralement des protéases à l'instar : Les enzymes végétales les plus utilisés sont généralement des protéases à l'instar :

- **Papaïne** est une protéase à cystéine extraite à partir d'une substance appelée latex, produite dans les fruits (papaye) avant maturité.
- **Caricaine** : Il est également obtenu à partir de papaye. Ces enzymes sont largement utilisées dans la transformation des aliments sans gluten.
- **Actinidaine (actinidine)** : protéase digestive extraite à partir du kiwi.
- **Ficine (fiscine)** enzyme protéolytique extraite à partir du latex du figuier.
- **Bromélaïne (broméline)** enzyme protéolytique extraite des tiges et racines fraîches de l'ananas.
- **Phyepsine** Ceci est obtenu à partir d'orge, il est utilisé dans la coagulation du lait.

Il y'a d'autres enzymes également d'origines végétales telles les amylases extraites de céréales, et lipoxygénases et phospholipase,

I.2) Origine animale

Les enzymes d'origine animale sont des protéases gastriques. Les plus employés sont la présure (constitué principalement de chymosine), les pepsines; bovine, porcine et de poulet. Ces protéases sont formées à partir d'un précurseur (zymogène), forme inactive, secrété par la muqueuse gastrique. La pepsine est l'enzyme d'origine animale la plus largement utilisée. Son utilisation à pH acide présente l'avantage de limiter la contamination microbienne.

I.3). Origine microbienne

Présente plusieurs avantages par rapport aux enzymes d'origine animale ou végétale : leurs types d'activité catalytique sont plus variés, leur stabilité face aux variations de température et de pH est meilleure. On peut trouver des proteases, amylases, pectinases, l'invertase etc (voir tableau. I).

II) Localisations et structures des enzymes

Dans la paroi cellulaire Leur localisation différente selon la structure de la paroi des cellules qui diffèrent selon leur origine.

II.1) Structure de la paroi cellulaire

En ce qui concerne les eucaryotes supérieurs, seuls les cellules végétales présentent une paroi de nature pectocellulosique. Il n'en est pas de même pour les microorganismes qui possèdent une paroi

Introduction en génie enzymatique

très solide dont la structure diffère selon le type de microorganisme (peptidoglycane) pour les bactéries ou des complexes glucanes-chitines pour les champignons

II.2) Localisation des enzymes

Peuvent être divisés en trois catégories :

- **Enzymes extracellulaires** (exo cellulaire) : synthétisées à l'intérieur de la cellule et excrétées dans l'espace extracellulaire.
- **Enzymes endocellulaires** (intra cellulaire) : synthétisées et utilisés à l'intérieur de la cellule.

III) Principales méthodes d'extraction et de purification

Les processus de séparation des enzymes et de purification consistent généralement à deux grands traitements l'extraction et la purification (figure1)

III.1) Méthodes d'extraction

L'extraction a pour objectif de libérer les enzymes des cellules ou des structures subcellulaires au sein desquelles ils se trouvent. Il donc nécessaire de détruire selon le cas la paroi, la membrane cellulaire et les structures subcellulaires par des procédés tels :

III.1.1) Méthodes mécaniques

Les méthodes mécaniques sont les méthodes qui nécessitent une certaine sorte de force pour séparer les particules ou contenus intracellulaires.

- **Broyage manuel** Le broyage au mortier et pilon (en porcelaine, en agate) (figure 2.a). Très simple. S'utilise par exemple pour la lyse de levures ou de tissus végétaux. Souvent associé avec un échantillon congelé (-80°C, diazote liquide).
- **Utilisation d'abrasifs** (BROYEUR à billes (de type secouant ou billes de verre)

Le broyeur à billes, également connu sous le nom de méthode de battage des billes (Figure 2. b), est une méthode de broyage mécanique des cellules largement utilisée en laboratoire. Agitation violente en présence de microbilles de verre, désintègre les microorganismes par rupture de la paroi et permet la libération des constituants cytoplasmique.

- **Bead beater Genie (glass bead homogenization)**

C'est un batteur à billes de laboratoire polyvalent. Avec son mouvement vertical, il est idéal pour lyser, extraire ou homogénéiser, en utilisant un mouvement de mélange vertical intense. (Vidéo).

- **Homogénéisateurs à haute pression**

L'homogénéisation en milieu liquide est la technique de rupture cellulaire la plus largement utilisée pour les petits volumes et les cellules en culture. Les cellules sont lysées en forçant la suspension cellulaire ou tissulaire à travers un espace étroit. Les homogénéisateurs utilisent des forces de cisaillement sur la cellule similaires à la méthode des billes. (Vidéo)

V.1.2) Méthodes non mécaniques

V.1.2.1) Lyse physique

L'extraction physique est une méthode sans contact direct, qui utilise une force externe pour rompre la membrane cellulaire. Les différentes forces comprennent la chaleur, la pression et l'énergie sonore. Ils peuvent être classés en lyse thermique, cavitation et choc osmotique.

- **Ultrasonication**

Introduction en génie enzymatique

Elle consiste en la destruction des cellules par les ultrasons, qui grâce à des chocs brutales détruit les tissus cellulaires. Une telle méthode est utilisée pour la perturbation des cellules bactériennes, fongiques et les tissus finement coupés. Vidéo

- **Lyse thermique**

Dans la lyse thermique, la chaleur est fournie aux cellules pour dénaturer les protéines membranaires et lyser les cellules. La lyse cellulaire peut être effectuée par des cycles répétés de congélation (-20°C) et de décongélation (37°C). Cela provoque la formation de cristaux de glace ce qui provoque la désintégration de la membrane cellulaire

- **Choc osmotique**

Il permet de briser certaines cellules fragiles avec un minimum de dommages. Les cellules sont incubées dans une solution hypo-osmotique.

- **Thermolyse (Protéine de choc thermique) :**

Cette méthode est très simple et économique pour les produits thermostables. Une chaleur élevée inactive les cellules en perturbant la paroi cellulaire et en libérant des produits intracellulaires. L'effet de la chaleur dépend de divers facteurs tels que le pH, la température, l'agent chélateur, la force ionique, la présence d'enzymes (protéolytiques et hydrolytiques), le temps.

- **Lyse électrique (électroporation) :**

La lyse électrique (EL) fait référence à la lyse des cellules par désintégration de la membrane plasmique à l'aide d'un champ électrique bref et élevé.

V.1.2.2) Enzymes lytiques

La lyse ou la perturbation cellulaire peut être réalisée par des enzymes digestives qui décomposeront la paroi cellulaire microbienne. Différents types et souches de cellules ont des types différents de parois et de membranes cellulaires. Ainsi, l'enzyme à utiliser dépend également du type de cellule et de la souche. (lysozyme, lyticase, chitinase)

V.1.2.3) Méthodes chimiques

- **Perméabilisants chimiques**

Les produits chimiques tels que le toluène, l'éther, l'alcool phényléthylique, le benzène, le méthanol, le chloroforme, etc. forment un canal dans la membrane cellulaire. Ce sont des solubilisants lipidiques qui forment des pores à travers lesquels le contenu cellulaire est libéré.

- **Antibiotiques**

La polymyxine, les azoles et la nystatine sont des inhibiteurs de la membrane cellulaire, détruisent les inhibiteurs de la membrane cellulaire et détruisent la formation de la membrane cellulaire, provoquant la libération du contenu cellulaire.

Introduction en génie enzymatique

- **Détergents**

Ils sont également appelés tensioactifs. Ils solubilisent les lipides et dénaturent les protéines. Il existe trois types de détergents : Anionique – par exemple SDS ; Cationique ; Non ionique-tween-20, tritan X-100, tritan X-400 etc.

- **Agent chélatant**

L'EDTA est un bon exemple d'agent chélateur. Il chélate les cations (bivalents) et les rend indisponibles pour les cellules, provoquant une perturbation de la membrane cellulaire. (Mg^{2+} , Ca^{2+})

V.2) Méthodes de purification

Le but de la purification est l'isolement de la molécule à partir d'un mélange complexe (cellules ou autres particules), elle est effectuée sur un milieu d'extraction. Il existe plusieurs méthodes pour la purification des enzymes des méthodes ☐ Décantation

- **Filtration**

La filtration est utilisée pour séparer les composants du soluté dans une solution fluide en fonction de leur dimensionnement en faisant circuler une suspension liquide sous une pression différentielle à travers un milieu poreux. Il existe deux catégories principales de filtration membranaire, à savoir la filtration à flux frontale et filtration à flux tangentiel, comme montré dans la vidéo

- **Dialyse**

La dialyse est une technique de séparation des molécules en solution selon leur poids moléculaire, à travers des membranes semi-perméables (figure 4. d).

- **Précipitation différentielle (fractionnée)**

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines, Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de solution qui les contient. L'électrolyte le plus employé pour la précipitation différentielle est le sulfate d'ammonium.

- **Filtration sur gel (chromatographie d'exclusion)**

Il s'agit ici d'une séparation des protéines selon leur taille utilisant un tamis moléculaire (Vidéo) . Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel (tableau II) est remplie d'une résine poreuse. La taille des pores est telle que certaines protéines (petites) peuvent être piégées, alors que d'autres (trop grosses) ne peuvent pas entrer du tout et passent tout droit.

- **Chromatographie échangeuse d'ions**

Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette. Pour cela, on utilise des résines chargées négativement (chromatographie échangeuse de cations) ou positivement (chromatographie échangeuse d'anions). L'éluion des molécules fixées peut alors être réalisée de différentes manières. Vidéo