
Cours de génie enzymatique

Djamel Edine KATI

Université de Béjaia – FSNV Départeme
des Sciences Alimentaires

Cours destiné aux étudiants en :

- Master 1 Sciences alimentaires
- Master 1 BAAN

Assuré depuis le 2^e semestre de l'année
universitaire 2011/2012.

Important : La compréhension de ce cours nécessite des pré-requis en biochimie, enzymologie fondamentale, Outils de biologie moléculaire et chimie organique.

Le Génie enzymatique

L'**Enzymologie**, branche de la biochimie, est la discipline consacrée à l'étude des propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes. 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.

Contenu de la matière :

Chap1 : Rappel sur l'enzymologie

- Rappel sur l'enzymologie, la Fixation protéines-ligand et leur relation avec le génie enzymatique

Chap 2 : Domaines d'utilisation des enzymes

- Utilisation des enzymes dans la transformation d'aliments, dans l'amélioration des propriétés fonctionnelles de constituants d'aliments...
- Utilisation des enzymes dans les méthodes d'analyses de biologie moléculaire.
- Les biocapteurs enzymatiques

Chap 3 : Génie des procédés enzymatiques

- Etude des procédés qui permettent d'exploiter et d'améliorer les propriétés de la catalyse enzymatique (Surexpression et marquage (tag) d'enzyme en vu de leur purification)..

Chap 4 : Production des enzymes

- Les diverses sources, la fermentation, les bioréacteurs enzymatique, production d'enzyme à grande échelle.

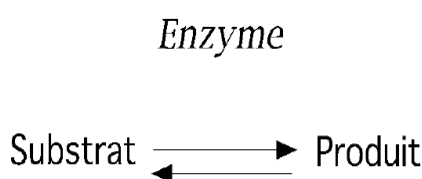
Chap 1 : Rappel sur l'enzymologie

- Rappel sur l'enzymologie, la Fixation protéines-ligand et leur relation avec le génie enzymatique

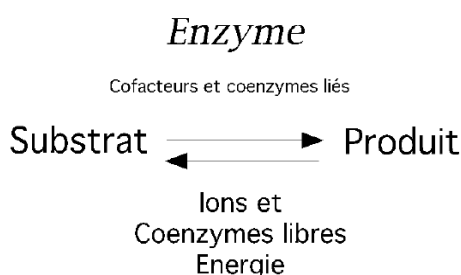
Principaux Rappels

a. L'enzyme

- Toutes les enzymes sont des protéines (15 000 <M enz< plusieurs millions de daltons) ;
- Les enzymes sont **des « bio » catalyseurs** de réactions ;
- Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux ;
- Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement : sa conservation dans le génome est favorisée par le besoin qu'éprouve cet être vivant de faire cette réaction.
- La formulation réactionnelle :



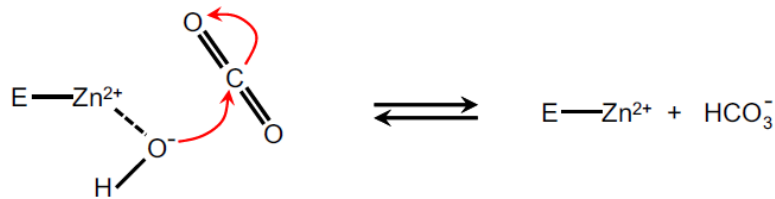
Ou avec cofacteur :



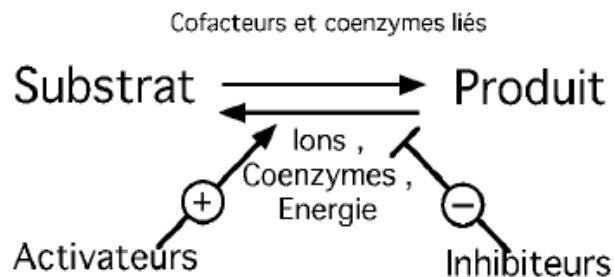
- ❖ **Substrat de l'enzyme** : Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformé grâce à l'action catalytique d'une réaction. Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.
- ❖ **Produit** : Molécules produite au cours d'une réaction catalysée par une enzyme. Produit résultat de la catalyse.
- ❖ **Cofacteur** : appelé aussi effecteur positif, sont des atomes (exemple des métaux Mg, Zn, Mn, Fe...) ou des molécules (non protéique : NAD, FAD, CoA) qui interviennent dans la réaction enzymatique comme activateur, mais ne sont pas transformés définitivement à la fin de cette réaction. ils interviennent pour transporter le substrat, pour recevoir le produit ou comme participant à la structure de l'enzyme. Les coenzymes sont également des cofacteurs que l'on peut qualifier de « biologique ».

Exemple de l'action de l'anhydrase carbonique sur le gaz carbonique. Le Zn^{++} intervient ici comme cofacteur :

Réaction avec cofacteur : Ici le Zn



- ❖ **Inhibiteur** : appelé également effecteur négatif et comme son nom l'indique, il s'agit d'un atome ou de molécule pouvant inhiber la réaction catalytique. Son action peut se situer sur l'enzyme comme sur son substrat.

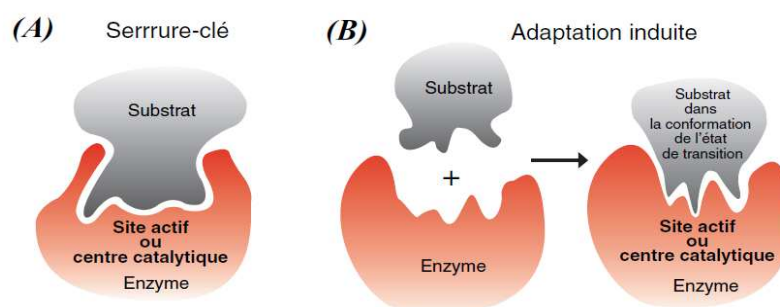


Les principaux inhibiteurs sont :

- Les inhibiteurs irréversibles : liaison covalente avec un des acides aminés du site actif
- Les inhibiteurs réversibles compétitifs : analogie structurelle – mais pas de catalyse
- Les inhibiteurs réversibles non compétitifs : pas d'analogie structurelle – mais se fixe sur d'autre site de l'enzyme spécifique à cet inhibiteur
- Des inhibiteurs à effets mixtes : pas d'analogie mais se fixe sur des sites spécifiques au niveau de l'enzyme
- L'inhibition par excès de substrat : mauvaise liaison E – S.

b. La Fixation protéines-ligand

La liaison protéines-ligand est à la base de l'étude des interactions de l'enzyme avec son substrat, et par conséquent la formation du complexe « E-S : enzyme-substrat ». Ce modèle implique que l'enzyme ne se lie à un substrat qu'au niveau d'un seul site, dit site actif, et que ce dernier n'accepte qu'un substrat spécifique, comme une serrure qui ne peut fonctionner qu'avec sa propre clé (voir figure suivante).

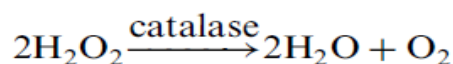


Ce modèle donne alors une interprétation claire de la spécificité enzymatique. Autre modèle mis en évidence est l'adaptation induite. Ainsi, l'enzyme et/ou son substrat sont modifié quelque peu pour se lier étroitement. Quelque soit le modèle, il est bien établi que la liaison E-S est non covalente. En effet, les liaisons sont faibles dans la plus part des cas (liaisons électrostatiques, hydrophobes).

c. La catalyse enzymatique

Définition de La catalyse : Un catalyseur agit à de très faibles concentrations, il augmente la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat. Dans le cas de l'enzyme, a la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée et peut reprendre à nouveau une nouvelle catalyse.

Exemple : La réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est accélérée **10 fois** par l'intervention de la catalase.

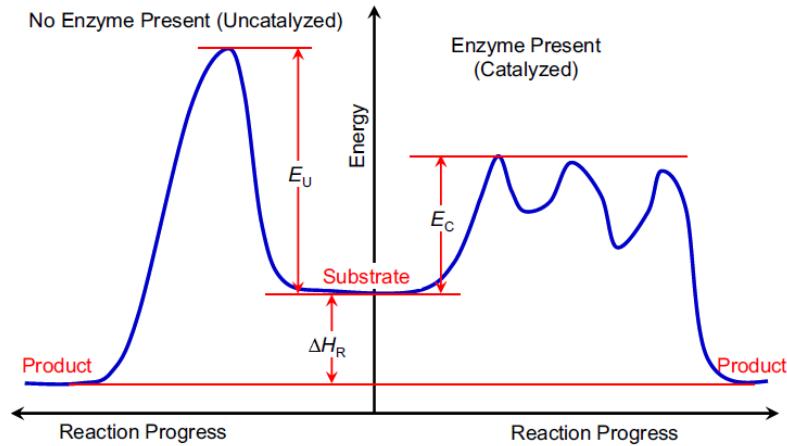


Les propriétés catalytiques des enzymes sont essentiellement dues aux caractéristiques d'un site dit actif au sein de la structure tridimensionnelle. Le site actif étant constitué d'acides aminés polaires à forte réactivité pouvant s'ioniser dans des conditions particulière formant des anions ou cations. Ces derniers peuvent alors participer à de fortes interactions électrostatiques avec des groupes de charge opposée appartenant au substrat.

Side chain group	Amino acid	Functions and interactions
Hydrocarbon	Alanine, leucine, valine, isoleucine	van der Waals
Aromatic	Phenylalanine, tyrosine, tryptophan	van der Waals, π -electron stacking
Carboxyl	Aspartic acid, glutamic acid	Electrostatic, hydrogen bonding, acid-base catalysis
Amino	Lysine, arginine	Electrostatic, hydrogen bonding, acid-base catalysis
Imidazole	Histidine	Electrostatic, hydrogen bonding, acid-base catalysis, van der Waals, π -electron stacking
Hydroxyl	Serine, threonine, tyrosine	Hydrogen bonding, acid-base catalysis
Amide	Asparagine, glutamine	Hydrogen bonding
Sulfhydryl	Cysteine	Hydrogen bonding, electrostatic, acid-base catalysis

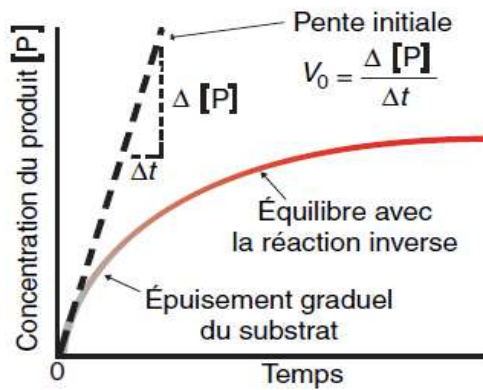
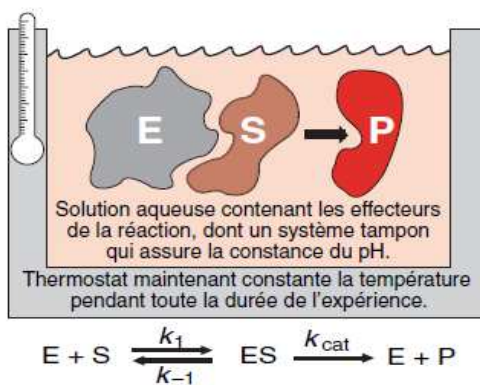
La catalyse enzymatique

- Ne modifie pas les constantes d'équilibre des réactions catalysées, impliquant la préservation des produits d'une réaction donnée.
- Diminue les énergies d'activation des réactions (figure suivante).
-

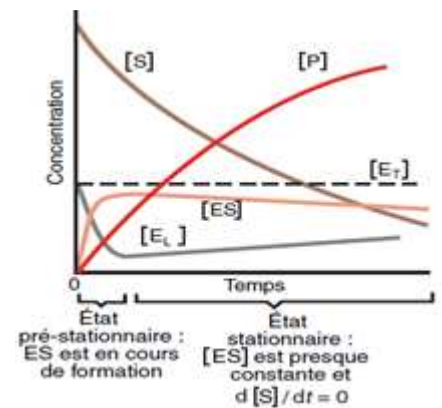


La figure ci-dessus représente l'énergie d'activation d'une réaction catalysée (enzyme) et non catalysée. Remarquez la $E_c < E_u$.

Cinétique enzymatique



Important : Les aspects liés à l'étude de la cinétique enzymatique ne seront pas traité dans ce cours. Il est toutefois indispensable de les avoir comme pré-requis pour une meilleure compréhension des chapitres du cours consacré au génie enzymatique.



La sélectivité de l'action enzymatique

Un des avantages majeurs de l'utilisation des enzymes dans la catalyse est leur sélectivité. Les principaux types de sélectivités sont :

- Chimiosélectivité ;

Spécificité liée au type de liaison, groupements fonctionnels présent sur la molécule, ex : protéases qui coupent les liaisons peptidiques NH-CO et séparent les acides aminés

- Régiosélectivité ;

ex : trypsine coupe après un acide aminé basique, chymotrypsine après un acide aminé aromatique

- Stéréosélectivité ;

ex : L-amino-oxydase ou D-amino-oxydase, α ou β -galactosidase, furamase qui réagit sur le furamate en configuration E pour donner du malate...

La classification des enzymes :

1. **Les oxydoréductases** catalysent les réactions d'oxydo-réduction. La plupart de ces enzymes sont connus sous le nom de deshydrogénases, mais certains d'entre eux sont appelés oxydases, peroxydases, oxygénases ou réductases.

2. **Les transférases** catalysent les réactions de transfert de groupes moléculaires d'une molécule à une autre. Cette classe inclut les kinases.

3. **Les hydrolases** catalysent les clivages hydrolytiques.

4. **Les lyases** catalysent les réactions d'élimination d'un substrat, non hydrolytique et non oxydative, ou lyse, avec création d'une double liaison. Dans le sens inverse, les lyases catalysent l'addition d'un substrat à une double liaison d'un second substrat ; une lyase qui catalyse une réaction d'addition dans les cellules est souvent appelée synthase.

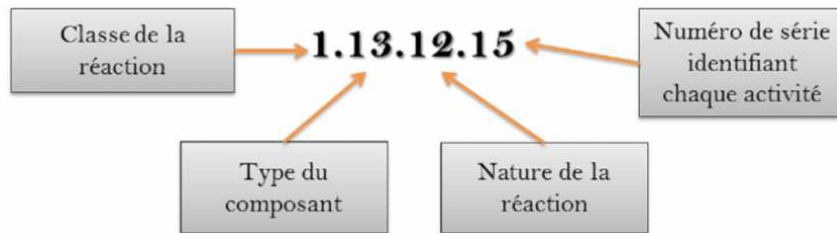
5. **Les isomérases** catalysent les réactions d'isomérisation ou les réarrangements intramoléculaires.

6. **Les ligases** catalysent les réactions de ligation au cours desquelles deux molécules sont unies. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie chimique, le plus souvent sous forme d'ATP. Les ligases sont aussi dénommées synthétases. Chaque enzyme a un numéro de code qui permet d'identifier.

Nomenclature des enzymes : Une codification permet de donner plusieurs informations sur l'enzyme en question.

Exemple : l'anhydrase carbonique catalyse la réaction 4.2.1.1, ce qui signifie qu'elle agit sur une réaction d'addition au niveau d'une liaison double (premier nombre 4), que la réaction crée une liaison entre des atomes de carbone et d'oxygène (deuxième nombre 2), que le corps ajouté est une molécule d'eau (troisième nombre 1) et qu'elle est la première de cette espèce (quatrième nombre 1).

Autre exemple : la codification EC 1.13.12.15 correspond à la 3,4-dihydroxyphenylalanine oxydative deaminase.

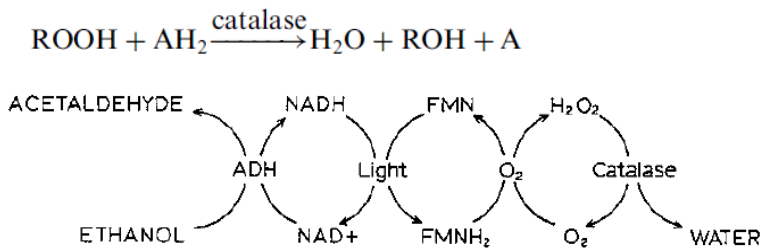


Les principes catalytiques en fonction du type d'enzyme

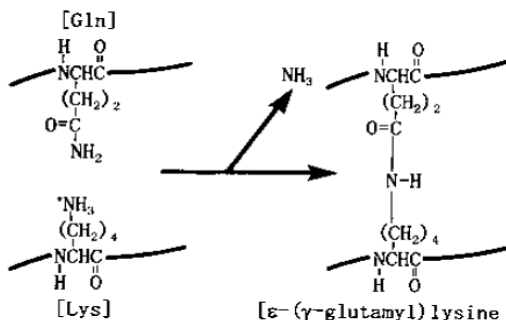
Le tableau suivant résume les 6 classes d'enzymes et les principales réactions catalysées.

Summary of the International Classification of Enzymes		
Classification		Reaction catalyzed
Oxidoreductases:	$A^- + B = A + B^-$	Electron transfer
Transferases:	$A-B + C = A + B-C$	Group transfer reactions
Hydrolases:	$A-B + H_2O = A-H + B-OH$	Hydrolysis reactions
Lyases:	$\begin{array}{c} X \quad Y \\ \quad \\ A-B = A=B + X-Y \end{array}$	Group addition removal to/from double bond
Isomerases:	$\begin{array}{c} X \quad Y \quad Y \quad X \\ \quad \quad \quad \\ A-B = A-B \end{array}$	Transfer of groups in molecular resulting in isomeric forms
Ligase (synthesis):	$A-B = A-B$	Generation of C-C, S-S, G-O, and C-N bonds condensation and ATP cleavage

Exemple Oxydoréductase : Catalysent les réactions d'oxydoréduction.



Exemple transférase : Transfert de groupes moléculaires.



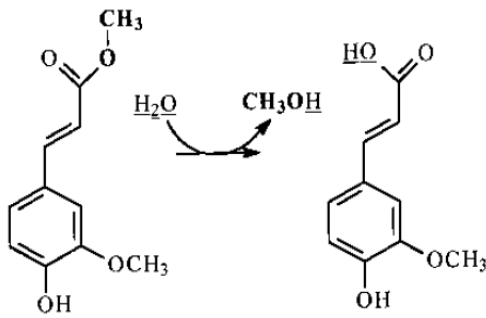
Oxidoreductases

- 1.1 Acting on the CH-OH group of donors
- 1.2 Acting on the aldehyde or oxo group of donors
- 1.3 Acting on the CH-CH group of donors
- 1.4 Acting on the CH-NH₂ group of donors
- 1.5 Acting on the CH-NH group of donors
- 1.6 Acting on NADH or NADPH
- 1.7 Acting on other nitrogenous compounds as donors
- 1.8 Acting on a sulfur group of donors
- 1.9 Acting on a heme group of donors
- 1.10 Acting on diphenols and related substances as donors
- 1.11 Acting on hydrogen peroxide as acceptor
- 1.12 Acting on hydrogen as donor
- 1.13 Acting on single donors with incorporation of molecular oxygen (oxygenases)
- 1.14 Acting on paired donors with incorporation of molecular oxygen
- 1.15 Acting on superoxide radicals as acceptor
- 1.16 Oxidizing metal ions
- 1.17 Acting on CH₂ groups
- 1.18 Acting on reduced ferredoxin as donor
- 1.19 Acting on reduced flavodoxin as donor
- 1.97 Other oxidoreductases

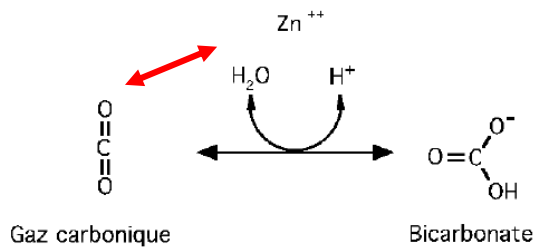
2. Transferases

- 2.1 Transferring one-carbon groups
- 2.2 Transferring aldehyde or ketone residues
- 2.3 Acyltransferases
- 2.4 Glycosyltransferases
- 2.5 Transferring alkyl or aryl groups, other than methyl groups
- 2.6 Transferring nitrogenous groups
- 2.7 Transferring phosphorous-containing groups
- 2.8 Transferring sulfur-containing groups

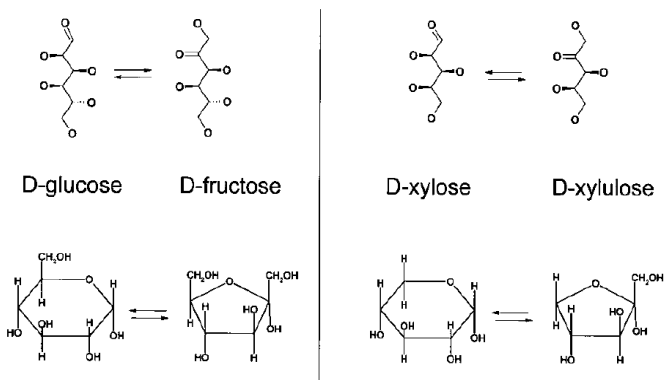
Exemple d'hydrolase :



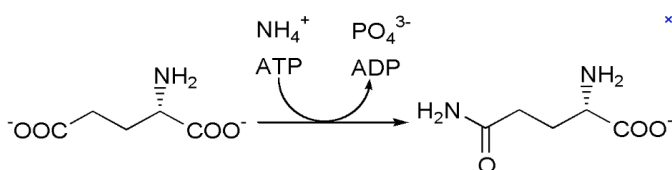
Exemple de lyase : addition d'un substrat à une double liaison



Exemple : Réactions d'isomérisation ou les réarrangements intramoléculaires.



Exemple : de Ligase



Hydrolases

- 3.1 Acting on ester bonds
- 3.2 Glycosidases
- 3.3 Acting on ether bonds
- 3.4 Acting on peptide bonds (peptidases)
- 3.5 Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds
- 3.6 Acting on acid anhydrides
- 3.7 Acting on carbon-carbon bonds
- 3.8 Acting on halide bonds
- 3.9 Acting on phosphorus-nitrogen bonds
- 3.10 Acting on sulfur-nitrogen bonds
- 3.11 Acting on carbon-phosphorus bonds

Lyases

- 4.1 Carbon-carbon lyases
- 4.2 Carbon-oxygen lyases
- 4.3 Carbon-nitrogen lyases
- 4.4 Carbon-sulfur lyases
- 4.5 Carbon-halide lyases
- 4.6 Phosphorus-oxygen lyases
- 4.99 Other lyases

Isomerases

- 5.1 Racemases and epimerases
- 5.2 *cis-trans*-isomerases
- 5.3 Intramolecular oxidoreductases
- 5.4 Intramolecular transferases (mutases)
- 5.5 Intramolecular lyases
- 5.99 Other isomerases

Ligases

- 6.1 Forming carbon-oxygen bonds
- 6.2 Forming carbon-sulfur bonds
- 6.3 Forming carbon-nitrogen bonds
- 6.4 Forming carbon-carbon bonds
- 6.5 Forming phosphoric ester bonds

Les Facteurs d'influence de la catalyse

Facteurs intrinsèque à la réaction : liés aux protagonistes de la catalyse

- Intégrité de l'enzyme
- Concentration de l'enzyme
- Activation de l'enzyme
- Intégrité du Substrat
- Concentration

Facteurs extrinsèque : liés à l'environnement réactionnel tel l'action des agents physiques

a. pH

L'action du pH se situe et se traduit par la modification de :

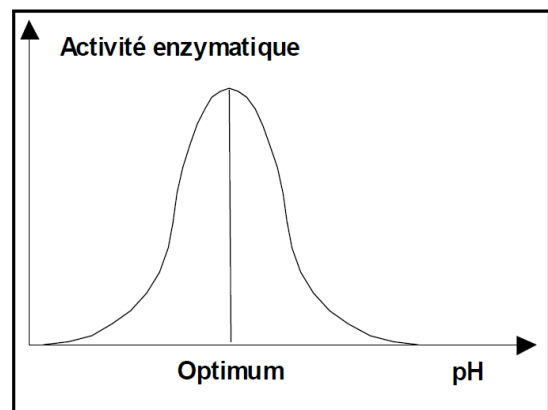
- la Conformation de la protéine enzymatique (ionisation des acides aminés)
- la Disponibilité des fonctions chimiques de l'enzyme et / ou du substrat (i.e. le substrat réel doit être sous une certaine forme, qui n'est pas nécessairement la forme de la neutralité).

- Il est admis qu'à 2 unités du pH optimum, l'activité de l'enzyme est réduite de 100 fois.

--> **Inhibition réversible**

- À des pH extrêmes, une attaque acide ou basique dénature l'enzyme.

--> **Inhibition irréversible**



Exemple de travaux sur la détermination du pH optimal d'activité d'enzymes. Cas de la HorseRadish Peroxydase et de la Laccase.

Ces travaux sont nécessaires à la détermination des conditions optimales de la catalyse enzymatique.

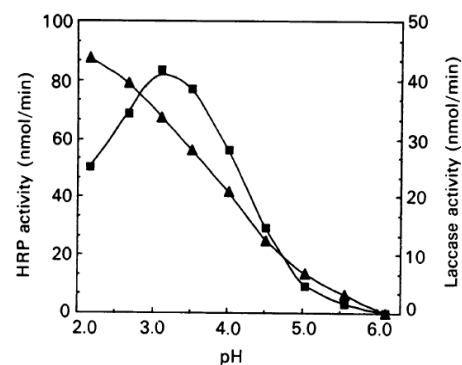
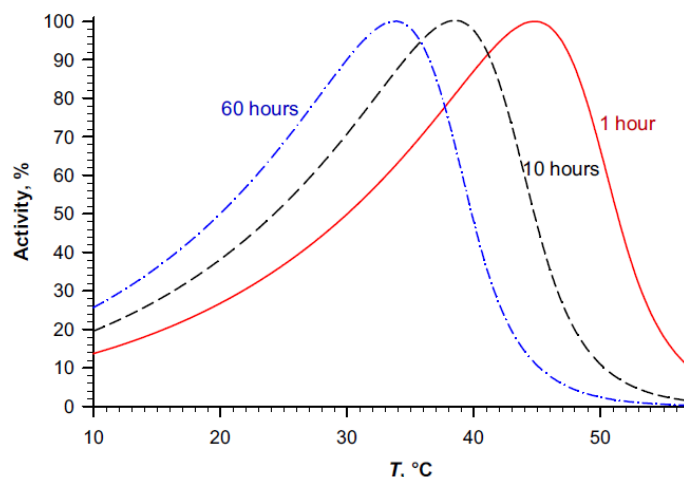


Fig. 4. pH optimum for the oxidation of 1,2,4,5-tetramethoxybenzene by HRP and laccase A

Reaction mixtures contained 7.5 mM-1,2,4,5-tetramethoxybenzene and either 50 ng of HRP (■) or 0.25 µg of laccase A (▲) in 1 ml of 50 mM-tartrate/citrate buffer. HRP-catalysed reactions were initiated with 0.5 mM-H₂O₂. Initial velocities were determined at 450 nm (see the Materials and methods section).

b. Effet de la température

Activité et Dénaturation : l'activité de l'enzyme augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à un certain seuil. la température de dénaturation peut varier, mais seules quelques exceptions s'éloignent vraiment de la gamme 40 - 60 °C (protéines thermostables).



La figure ci-contre montre l'effet de la température et de la durée d'exposition sur l'activité enzymatique. L'allure ascendante traduit l'activation alors que l'allure descendante informe de la température de dénaturation.

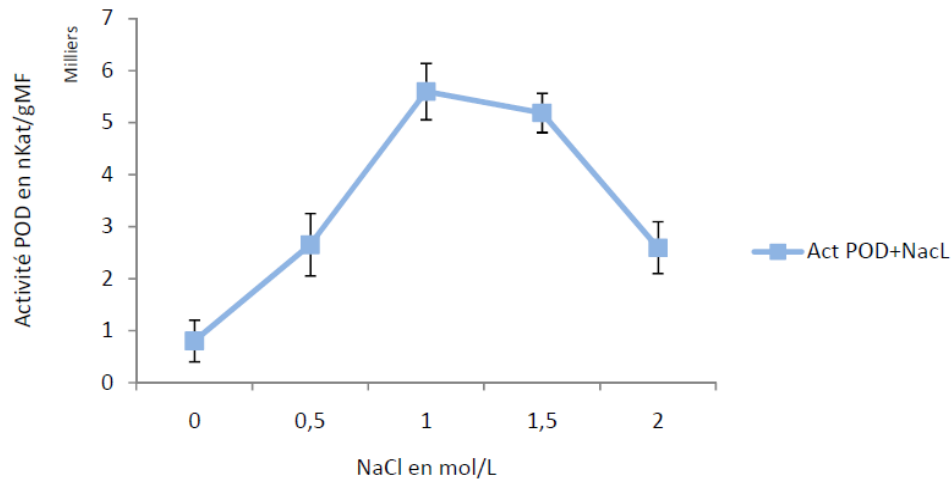
Il est toutefois important de préciser l'importance de l'effet combiné de la température et du pH sur l'activité de l'enzyme. Le tableau suivant montre les pK_a s et les températures d'ionisation exprimées en quantité de chaleur de l'ionisation des groupements fonctionnels communément trouvés dans les enzymes.

Group	Usual pK_a	Approximate charge at p	Heats of ionisation (kJ mole ⁻¹)
Carboxyl (C-terminal, glutamic acid, aspartic acid)	3 - 6	-1.0	5
Ammonio (N-terminal) (lysine)	7 - 9	+1.0	+45
	9 - 11	+1.0	+45
Imidazolyl (histidine)	5 - 8	+0.5	+30
Guanidyl (arginine)	11 - 13	+1.0	+50
Phenolic (tyrosine)	9 - 12	0.0	+25
Thiol (cysteine)	8 - 11	0.0	+25

The pK_a (defined as $-\text{Log}_{10}(K_a)$) is the pH at which half the groups are ionised. Note the similarity between the K_a of an acid and the K_m of an enzyme, which is the substrate concentration at which half the enzyme molecules have bound substrate.

c. Influence de la force ionique du milieu

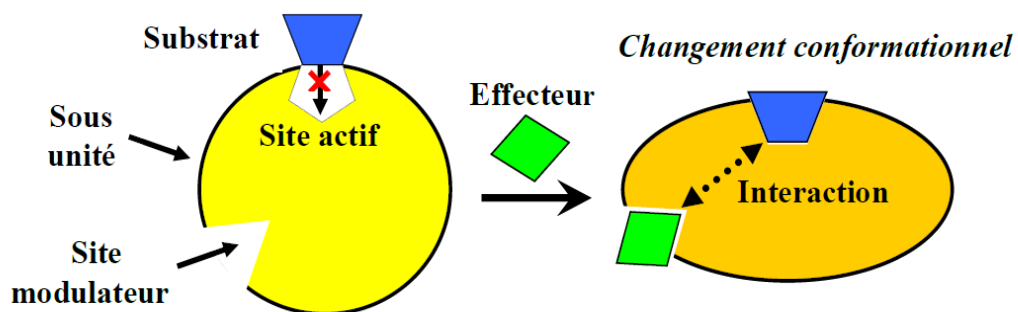
En présence d'eau dans différentes conditions de pH et de force ionique, la solubilité des composés peut varier (diminuer ou augmenter leur affinité envers la phase aqueuse). Autre les effets sur les enzymes (conformation, ionisation de site actifs), la disponibilité des substrats peut donc être également affectée.



Exemple de travaux d'optimisation de l'activité enzymatique en fonction de la force ionique du milieu.

L'Allostérie

L'allostérie désigne une variation de conformation de protéines sous l'effet de la fixation d'un substrat ou d'une molécule effectrice, d'où l'acquisition de propriétés particulières (changement d'activité.) On décrit cela comme des effets coopératifs. Ceux ci sont concevables si et seulement si la macromolécule est sous forme oligomérique.



L'enzyme allostérique possède un site actif et un site modulateur sur lequel vient se fixer l'effecteur. Les enzymes allostériques sont en général complexes, formées de plusieurs sous-unités, régulatrices et catalytiques.

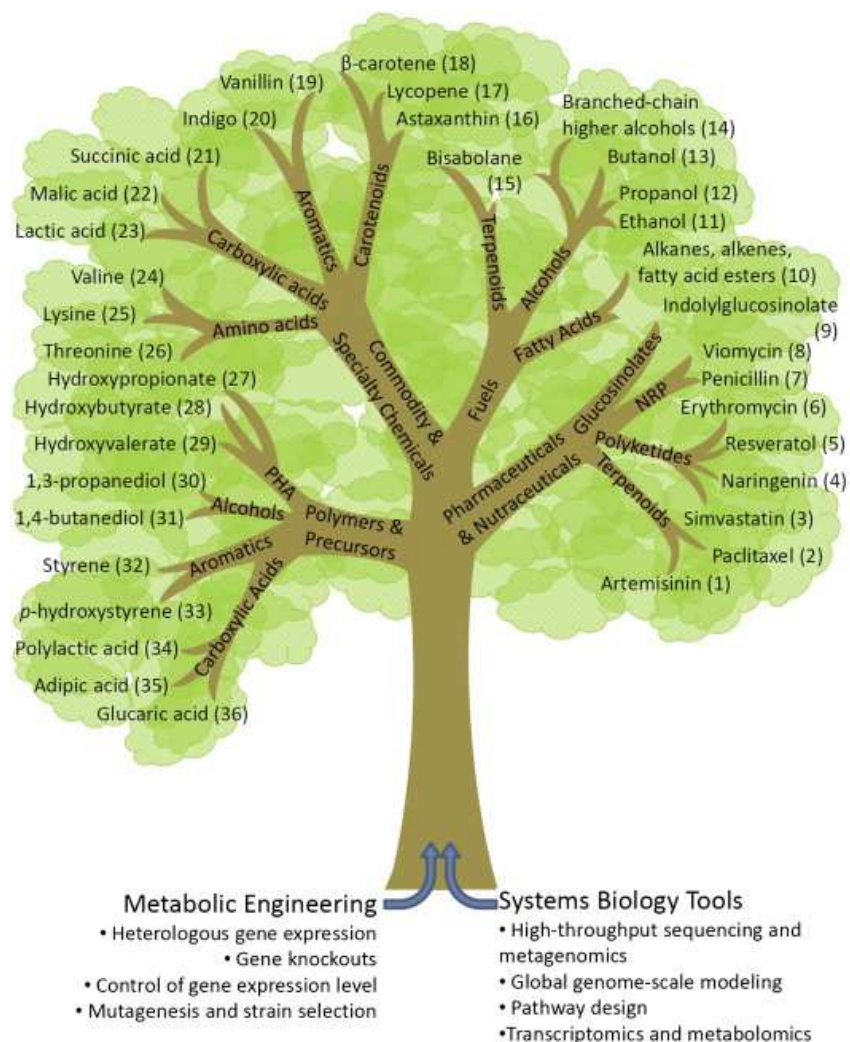
Chapitre 2 : Domaines d'utilisation des enzymes

- Le génie enzymatique dans la biotechnologie
- Utilisation des enzymes dans la transformation d'aliments, dans l'amélioration des propriétés fonctionnelles de constituants d'aliments...
- Utilisation des enzymes dans les méthodes d'analyses de biologie moléculaire.
- Utilisation des enzymes en thérapie et analyse
- Utilisation des enzymes dans les industries non alimentaires ;
- Les biocapteurs

Le génie enzymatique dans la biotechnologie

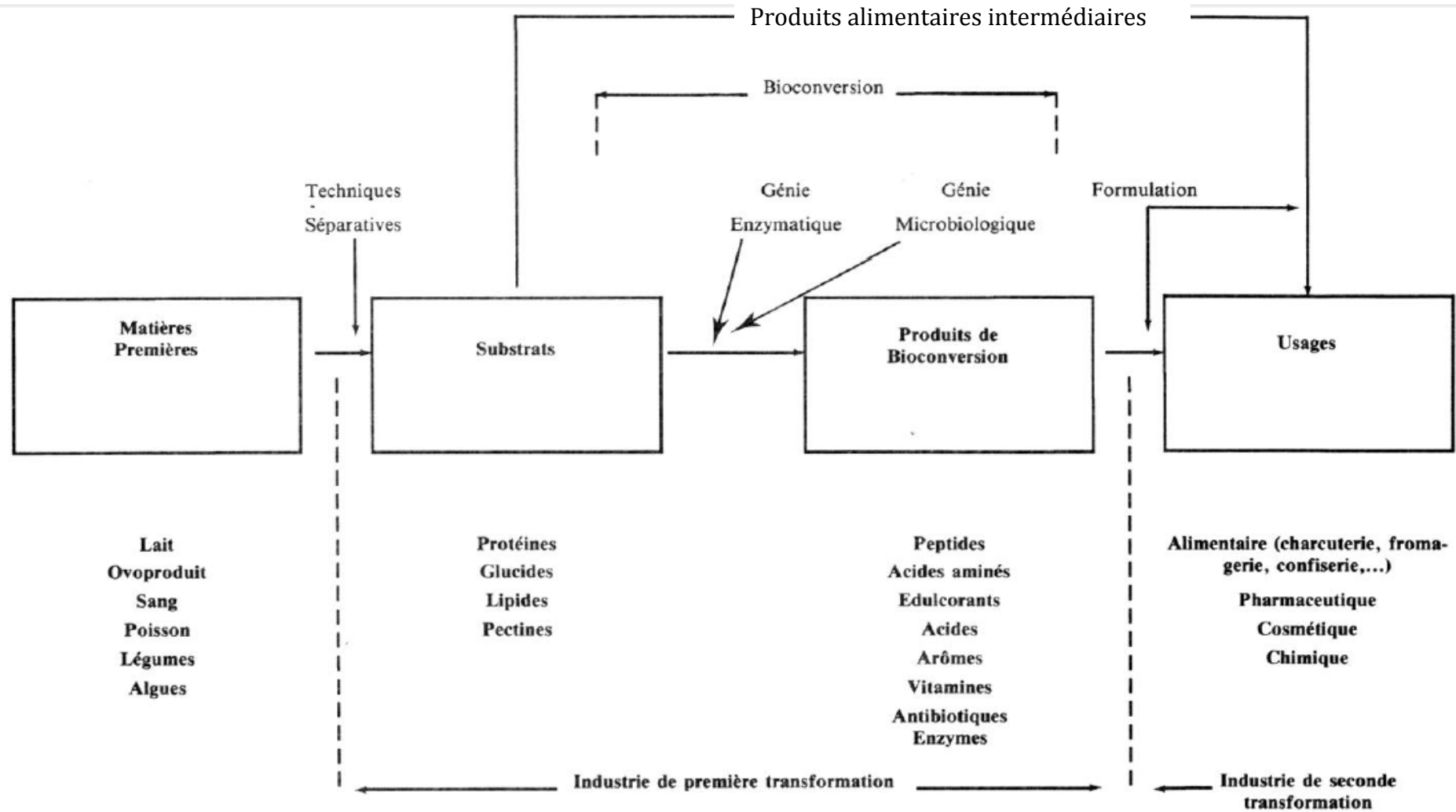
Les avancées actuelles et future du génie enzymatique sont aussi le résultat du développement de **l'ingénierie métabolique**. Les nouvelles approches : **génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique** viennent ainsi consolider l'évolution continue du génie enzymatique :

- Technique de contrôle de la production des protéines
- Technique de contrôle de l'expression des gènes
- Utilisation des données issues des approches en « omique »



Pour bien situer la discipline du « génie enzymatique » dans les biotechnologies, autant que le génie microbiologique, il est admis que le génie enzymatique prend position dans les processus de bioconversion, et plus précisément de l'étape substrat à l'obtention des produits de bioconversion (voire schéma ci-dessous).

LES DIFFÉRENTES ÉTAPES D'UN PROCESSUS BIOTECHNOLOGIQUE

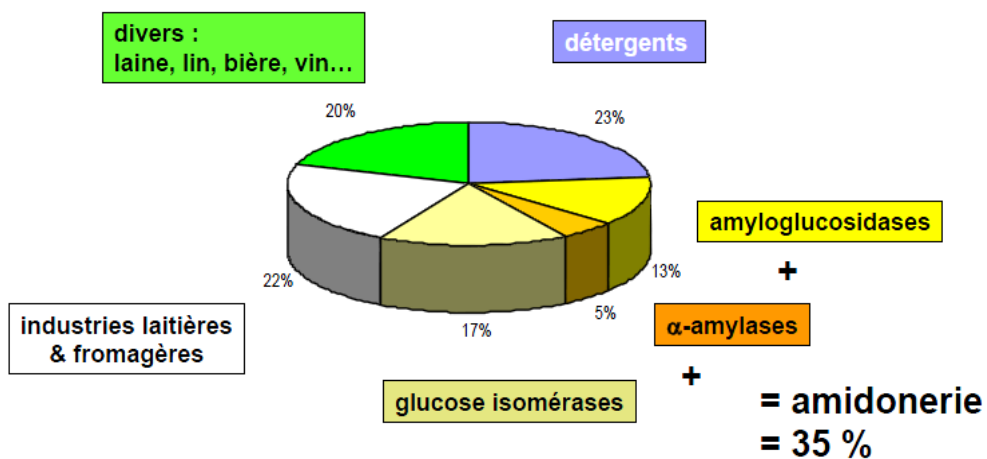


Les Domaines d'utilisation des enzymes

L'utilisation des enzymes sous leurs principales formes (préparation enzymatique ou purifiée) connaît son essor essentiellement au XXe siècle. Le développement et la maîtrise des procédés d'extraction des enzymes des cellules (microbienne, végétales et animale) ont permis les diverses utilisations largement connues aujourd'hui.

Les proportions illustrées ci-dessus montrent la répartition des principaux domaines utilisant les enzymes actuellement. La prédominance des utilisations alimentaires est évidente par l'addition des proportions d'utilisation dans ce domaine. L'utilisation des enzymes dans les secteurs de l'industrie agroalimentaire représente 65 % du chiffre d'affaires du marché des enzymes industrielles.

Domaines d'applications en parts de marché (5-10 Md \$)

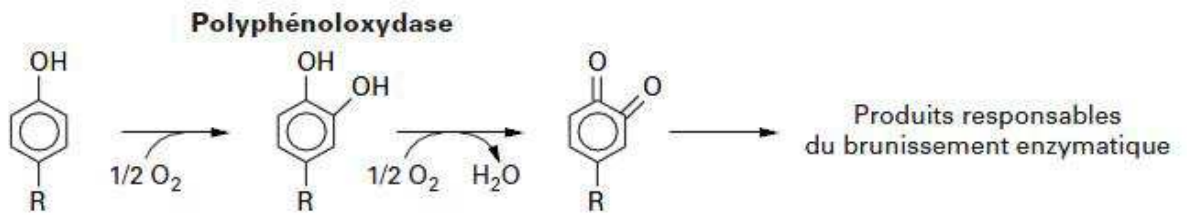


Globalement, les raisons du développement de l'utilisation des enzymes sont d'ordre technologique ou économique.

Les diverses utilisation des enzymes dans l'alimentaire

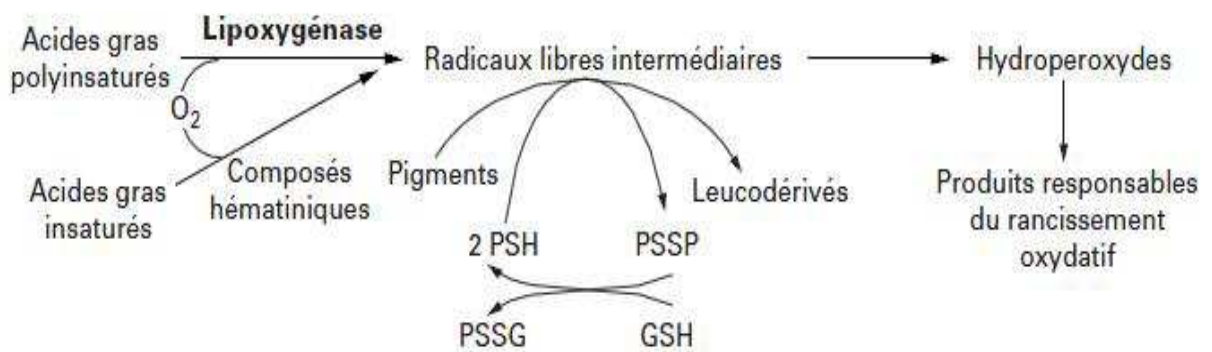
Enzyme	Source	Action in food	Food applications
α -Amylase	Cereal seeds, e.g. wheat, barley	Starch hydrolysis to oligosaccharides	Bread making, brewing (malting)
β -Amylase	Sweet potato	Starch hydrolysis to maltose	Production of high malt syrups
Papaine	Latex of unripe papaya fruit	Food and beverage protein hydrolysis	Meat tenderization, chill haze prevention in beer
Broméline	Pineapple juice and stem	Muscle and connective tissue protein hydrolysis	Meat tenderization
Ficine	Fig fruit latex	As bromelain	As bromelain and papain but not widely used due to cost
Trypsin	Bovine/porcine pancreas	Food protein hydrolysis	Production of hydrolyzates for food flavouring (mostly replaced now by microbial proteinases)
Chymosin (rennet)	Calf abomasum	κ -Casein hydrolysis	Coagulation of milk in cheese making
Pepsin	Bovine abomasum	As chymosin + more general casein hydrolysis in cheese	Usually present with chymosin as part of 'rennet' (Présure)
Lipase/esterase	Gullet of goat and lamb; calf abomasum; pig pancreas	Triglyceride (fat) hydrolysis	Flavour enhancement in cheese products; fat function modification by interesterification
Lipoxygenase	Soya bean	Oxidation of unsaturated fatty acids in flour	Bread dough improvement
Lysozyme	Hen egg white	Hydrolysis of bacterial cell wall polysaccharides	Prevention of late-blowing defects in cheese by spore-forming bacteria
Lactoperoxidase	Cheese whey; bovine colostrum	Oxidation of thiocyanate ion to bactericidal hypothiocyanate	Cold sterilization of milk

Les utilisations dans l'alimentaire ne se restreint pas à l'exploitation des propriétés catalytiques des enzymes, elle regroupe également les opérations visant à contrôler voir inhiber des enzymes pouvant altérer les qualités organoleptiques ou techno-fonctionnelles d'un aliment ou d'un constituants alimentaires. Exemple des brunissements enzymatiques observés dans certains aliments (exemple de la pomme de terre ou de la banane tranchée) dû à la formation des quinones issus de l'oxydation des polyphénols.



Cette réaction est catalysée par la polyphénoloxydase (PPO). Cette dernière est désactivée avec des traitements thermiques appropriés ou par modification des conditions catalytiques de la PPO (acidification du milieu).

Le rancissement (odeur et goût de rance dans les aliments riche en matière grasse est dû essentiellement à l'action de la lipoxygénase. Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation des acides gras polyinsaturés et conduit à l'apparition de molécules responsable du phénomène de rancissement.



Les procédés appliqués dans les IAA font souvent appel au « vide », absence d'oxygène ou aux procédés de dénaturations d'enzymes indésirables.

Les tableaux suivants regroupent les plus importantes utilisations des enzymes des les IAA dans le but d'agir sur les propriétés techno-fonctionnelles.

1. Utilisation des lipases, oxydoréductases et enzymes de synthèse

Enzymes	Ingrédients	Effets sur les propriétés fonctionnelles
Hydrolyse des lipides		
Lipases microbiennes	Triacylglycérols en émulsion	Libération de mono et diacylglycérols tensioactifs Libération d'acides gras volatils (arômes)
	Triacylglycérols en cosolvant	Estérification → changement de point de fusion Synthèse de triacylglycérols
Oxydoréductases		
Glucose oxydase	Blanc d'œuf (élimination du glucose)	Poudre insensible aux réactions de Maillard
	Acide linoléique	Composés odorants (aldéhydes, lactones)
	Concentrés protéiques contaminés par lipides insaturés	Perte de solubilité
Enzymes de synthèse		
Phosphokinase	Caséines et protéines diverses	Gélification en présence de Ca ⁺⁺
Transglutaminase	Protéines → polymérisats	Gélification
Cyclodextrineglucanotransférase	Maltodextrines → cyclodextrines	Encapsulats de molécules hydrophobes

2. Utilisation des protéases

Enzymes	Ingrédients	Effets sur les propriétés fonctionnelles
Hydrolyse des protéines		
Protéases – endocellulaires – exocellulaires microbiennes	Protéines de muscle (viande, poisson)	Attendrissement, solubilisation Préparation aromatique
Protéases – digestives – microbiennes – végétales	Concentrés protéiques, lactosérum Caséine native (micelles) Caséinates Globine du cruor Gluten	Solubilisation. Propriétés tensioactives accrues Coagulation préure Propriétés tensioactives accrues Solubilisation et décoloration Solubilisation. Propriétés tensioactives
Protéase en milieu peu hydraté ou avec cosolvant	Caséine, ovalbumine	Réaction « plastéine » → gélification
Phosphatases (microbienne acide et alcaline)	Caséine native	Perte de structure compacte Accroissement de la protéolyse (coagulation)
Phosphatase végétale	Caséine Phosvitine	Baisse de sensibilité au Ca ⁺⁺ et aux cations divalents

3. Hydrolases sur polymères glucidiques

Enzymes	Ingrédients	Effets sur les propriétés fonctionnelles
Hydrolyse des glycanes		
β -Galactosidase	Lactose \rightarrow glucose + galactose	Accroissement de la solubilité et du pouvoir sucrant
Invertase	Saccharose \rightarrow glucose + fructose	Accroissement de la solubilité et du pouvoir sucrant
α et β -Glucosidase	Glycoprotéines du blanc d'œuf	Diminution du pouvoir moussant
Amylases et enzymes débranchantes +	Amidons (maïs, pomme de terre) \rightarrow maltodextrines, glucose	Baisse de viscosité. Solubilisation \rightarrow sirops Pouvoir sucrant accru
α -Glucosidase	Concentrés protéiques de légumineuses (féverole)	Élimination de l'amidon Élimination d' α -galactosides
Pectinases Polyméthylestérases + Polygalacturonases microbiennes	Pectines	Déméthylation \rightarrow accroissement de la dépendance de la gélification vis-à-vis du pH Hydrolyse de liaisons osidiques \rightarrow baisse de viscosité

Utilisation des enzymes dans les industries alimentaires

A. Raffinage enzymatique d'huiles alimentaires

Le dégomme enzymatique est la méthode la plus récente pour dégommer les huiles végétales, y compris l'huile de soja. Elle constitue une technique adéquate pour le raffinage physique qui requiert de faibles teneurs en phosphore et qui ne peuvent être atteintes grâce aux méthodes conventionnelles de démuçilagination (traitement à l'acide, dégomme à l'eau, super-dégomme, etc.). Cette technique a initialement été développée par la compagnie allemande LurgiGmbH, elle est également connue sous le nom de procédé Enzymax®.

Le but de ce procédé est de convertir grâce à **une phospholipase**, les phospholipides non hydratés en une forme hydratée avec pour avantages un accroissement du rendement en huile, des coûts de fabrication réduits ainsi que la diminution des effluents.

Le procédé Enzymax peut être subdivisé en quatre principales étapes :

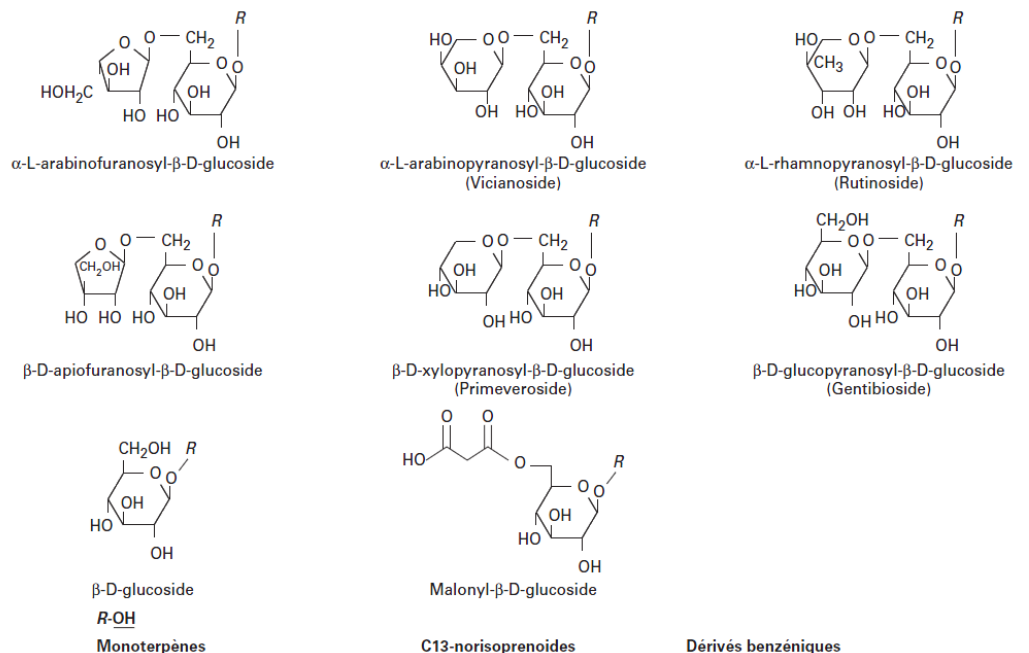
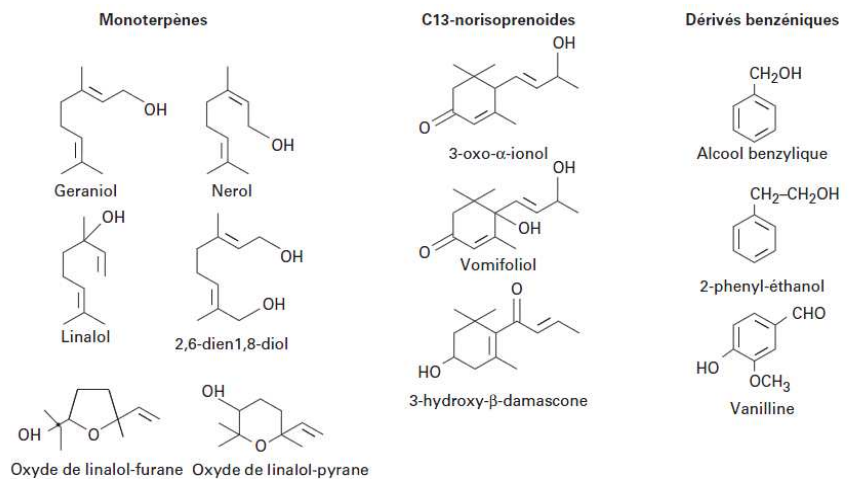
1. Ajustement des conditions optimales de réaction de l'enzyme, pH et température.
2. Addition de la solution enzymatique.
3. Déroulement de la réaction enzymatique.
4. Séparation des phospholipides hydratés de l'huile.

Les huiles obtenues à la suite de ce procédé de dégomme poursuivent un raffinage physique. Elles sont ainsi envoyées directement à la section de décoloration sans passer par l'étape de neutralisation. En effet, l'élimination des AGL dans ce cas se fera par distillation sous vide au cours de la désodorisation.

B. Amélioration de la perception des arômes naturels

Biosynthèse des arômes chez les végétaux et dans les produits fermentés traditionnels : Développement des arômes dans les produits par la maîtrise des précurseurs d'arômes : cas des terpénols et des thiols : Plusieurs arômes naturels, sont des composés organiques volatils (COV) liés : dérivés glycosylés ou dérivés cystéinylés.

Exemple de structure de molécules aromatique faisant parti des COV biologique.



Structure de précurseurs glycosidiques aromatiques rencontrés

Utilisation des β D-glucosidases

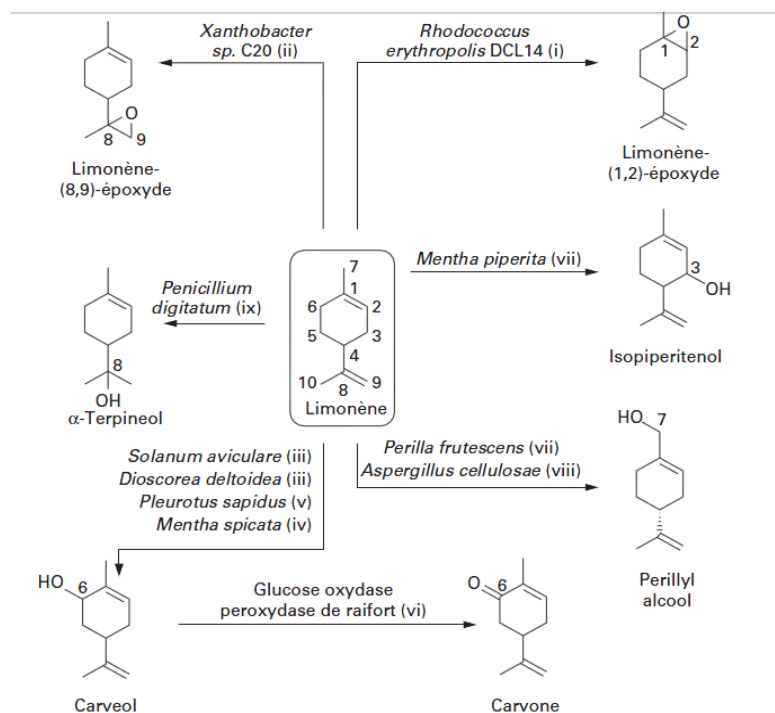
Les dérivés glycosylés les plus étudiés ont un aglycone de type phénolique (vanilline) ou terpénique. C'est le cas dans de nombreux fruits (tableau ci-contre), dont le raisin muscat. La glycosylation améliore la solubilité de ces molécules volatiles généralement hydrophobes, ce qui améliore aussi, sans doute, leur élimination vers les vacuoles. La liaison entre le glycosyl et l'aglycone peut être hydrolysée par une des nombreuses glycoside hydrolases présentes chez les plantes et les microorganismes (82 familles de ces enzymes sont répertoriées). Les propriétés des B -Dglucosidases ont été les mieux étudiées.

Tableau 1 - Effet de l'usage des préparations de β -glucosidases de levures sur la libération de composés volatils ($\mu\text{g/L}$), après incubation 12 h à 30 °C, à partir de glycosides dans les jus de fruits (d'après [38])

Arômes	Monoterpènes		Dérivés benzéniques	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai
Pêche (1)	350	1 260	260	1 350
Cerise	480	1 180	2 600	3 700
Fraise	100	770	130	1 080
Fruit de la passion (1)	180	200	250	500
Orange	110	870	nd	200
Papaye	1 800	2 200	nd	nd
Pomme	180	500	110	200
Raisin (Muscat de Rosada)	1 492	2 685	nr	nr

nd : non détecté
nr : non rapporté
(1) les augmentations observées de pinène et terpinène n'ont pas été comptées, car elles ne peuvent pas être dues à leur libération à partir de glycosides.

Bioconversion de substrat aromatique pour la synthèse de nouvelles molécules aromatiques. Ici sont illustrés des exemples d'utilisation de microorganismes produisant les enzymes de conversion nécessaire. Ce mode de production d'arômes peut prétendre à la substitution de la production d'arômes de synthèses chimiques.



C. Utilisation des enzymes dans la Synthèse, structuration et déstructuration de molécules

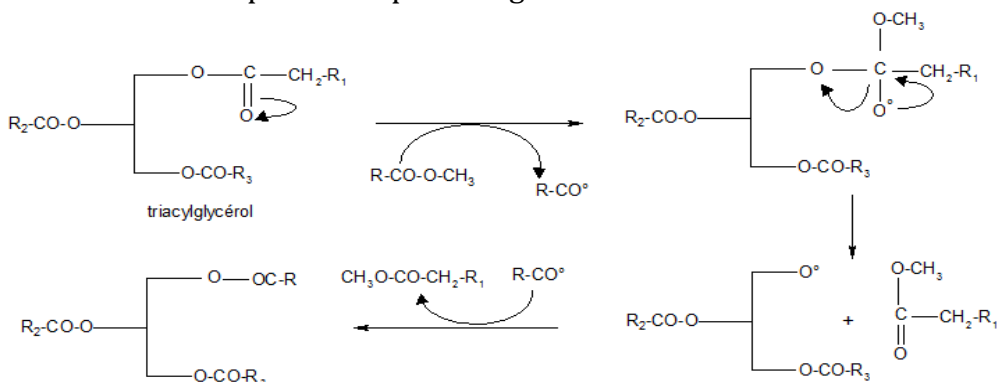
- a. Enzymes catalysant des synthèses : La synthèse chimique de molécules d'intérêt reste jusqu'à nos jours la plus utilisée (points fort):
- Maîtrise des procédés et développement du génie chimique ;
 - stabilité des réactions et savoir faire ;
 - haut rendements de réaction.

Cependant, présentant de sérieuses menaces en terme de pollution de l'environnement et/ ou en terme de toxicité pour la faune et la flore et les conséquences sur la santé humaine, de nombreux travaux de substitution par des méthodes dites « **chimie verte** » ont été mis au point. Ces techniques font appel à des procédés basés sur l'utilisation de biomolécules ayant des propriétés catalytiques semblables à la catalyse chimique. **Les enzymes en sont le meilleur exemple.**

Exemple les plus courants :

Les protéases et lipases en milieu peu hydraté ou en milieu « cosolvant » catalysent des synthèses de « pseudo » peptides ou protéines (plastéines) et surtout de nouveaux triacylglycérols ou phospholipides. Certaines transférases comme les cyclodextrines glucanotransférases ont la propriété de cycliser les chaînes linéaires de maltodextrines en α , β ou γ -cyclodextrines à respectivement 6, 7 et 8 unités glucose reliées par des liaisons α 1 - 4.

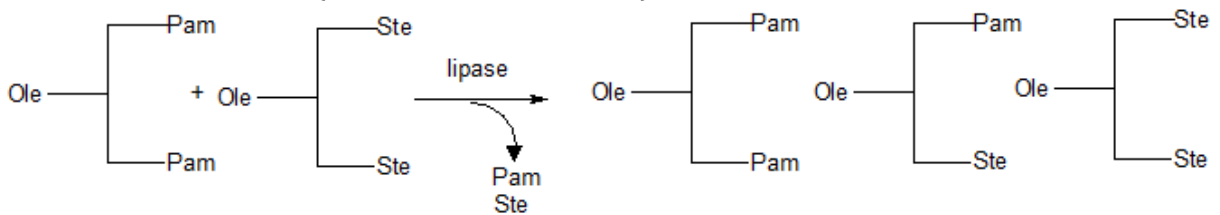
L'interestérification : C'est une technique qui permet de remodeler les structures lipidiques de façon à obtenir de nouvelles propriétés rhéologiques ou nutritionnelles. Dans la nature les triacylglycérols sont généralement conçus sur le schéma suivant : distribution aléatoire position 1,3 et 2, les acides gras saturés sont pratiquement exclusivement dans les position 1 et 3 avec une saturation en position 2 pour les graisses animales.



L'interestérification permettra de lever la distribution aléatoire des acides gras. Cette technique est connue depuis la moitié du XVIIIème siècle et utilisée depuis 1940 dans l'industrie des corps gras et plus particulièrement pour modifier les propriétés du lard et son utilisation en panification. Il y a un regain d'intérêt depuis 1970 avec la mise sur le marché des remplaceurs de matière grasse.

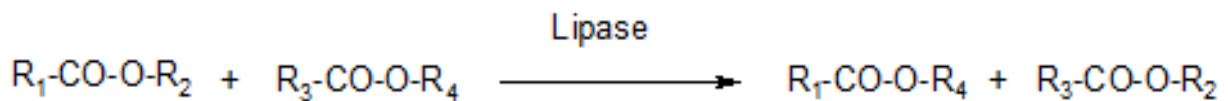
L'interestérification enzymatique permet d'obtenir des structures particulières utilisées en chocolaterie par exemple ou encore en confiserie. On peut espérer obtenir des structures mieux définies que par réaction chimique. Les lipases vont intervenir dans les différents types de réaction. Les mécanismes seront les mêmes que par voie chimique, le catalyseur est remplacé par la lipase.

Les lipases les plus utilisées : *Pseudomonas fluorescens*, *Chromobacterium viscosum*, *Mucor miehei*, dans ce dernier cas, la lipase réagit plus spécifiquement sur des ester où les acides gras sont à courte chaîne et plutôt saturés. Les lipases vont surtout réagir en position sn1 et 3 très rarement en sn2 (voire réaction suivante).



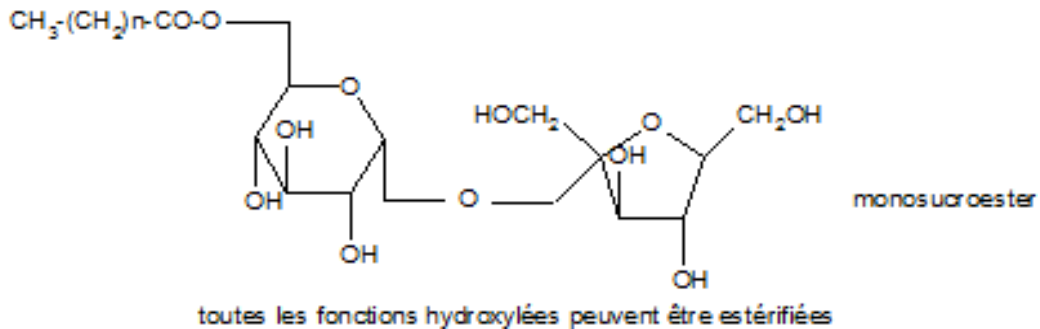
L'interestérification en chocolaterie :

Remplacement du beurre de cacao. le chocolat renferme 30% de beurre de cacao et, comme ce produit est relativement onéreux, on cherche à fabriquer des matières grasses qui possèdent les mêmes propriétés rhéologiques et plus particulièrement des triacylglycérols possédant une plage de fusion comprise entre 29 et 43°C. Le beurre de cacao est constitué par 3 triacylglycérols différents PamOleSte (41-52%), PamOlePam (16%) et SteOleSte (18-27%). Le traitement de l'huile de coton hydrogéné et d'huile d'olive en présence de lipase donne après interestérification les triacylglycérols suivants : PamOleSte à une concentration pratiquement identique à ce qu'on trouve dans le beurre de cacao et SteOleSte en concentration légèrement supérieure donnant une zone de fusion comprise entre 29 et 49°C. Il est possible d'obtenir des résultats analogues en traitant un mélange d'huile de tournesol et de palme.



D. La synthèse d'ester de sucres (Sucroester)

Les esters de sucres sont des esters d'acides gras et de sucres simples. Se sont des tensioactifs non-ioniques présentant de nombreux avantages dont notamment la diversité des structures disponibles et le caractère inoffensif, tant pour la santé que pour l'environnement.



Toutes les fonctions hydroxylées du sucre en question peuvent être estérifiées

Principales Applications :

- alimentation humaine
- formulation de médicaments
- produits phytosanitaires
- étude des protéines membranaires.
- activités biologiques

Tableau 1. Avantages des esters de sucres en tant que tensioactifs — *Advantages of sugar esters as surface active molecules* (Ducret *et al.*, 1995; 1996).

- matières premières peu coûteuses et renouvelables
- biodégradabilité complète tant en aérobiose qu'en anaérobiose
- molécules ne présentant ni toxicité (lors de la digestion, les sucroesters sont convertis en sucres et en acides gras, donc en molécules métabolisables), ni caractère irritant
- absence de goût et d'odeur
- molécules non-ioniques
- large gamme de structures disponibles

Exemples d'application alimentaires :

- les sauces épaisses car ils évitent la précipitation des matières solides et améliorent la dispersion,
- le lait concentré pour éviter la séparation de phase et améliorer la dispersion,
- les crèmes foisonnées afin d'obtenir une émulsion stable,
- les crèmes glacées pour préserver la cohésion de la matière grasse pendant la surgélation, donner une texture lisse et douce,
- les gâteaux, génoises pour améliorer le volume et donner une croûte fine et homogène,
- le chocolat afin de diminuer la viscosité et éviter la déformation à la chaleur.

Le principe de la synthèse enzymatique des scuroesters :

Utilisation d'enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase, nom abrégé d'une triacylglycérol acylhydrolase) **dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, l'activité de la lipase est inversée, passant de l'hydrolyse à l'estérification.** Trois aspects sont à prendre en compte, à savoir le rendement réactionnel, la rentabilité et le respect de la législation concernant l'utilisation des solvants dans le domaine alimentaire.

Principaux paramètres à maîtriser :

- **L'activité d'eau :** Une teneur minimale en eau est nécessaire afin de maintenir l'enzyme dans sa conformation active. Cette teneur varie en fonction du type de lipase.
- **La nature de solvant organique:** le solvant doit pouvoir solubiliser les substrats. Le volume de solvant doit également être optimisé afin de ne pas diminuer le contact des réactifs avec l'enzyme.
- **La nature du donneur acyle**

Condition de synthèse : tableau ci-dessus.

Tableau 4. Comparaison entre la synthèse chimique et la synthèse enzymatique — *Comparison between chemical and enzymatic ways of synthesis.*

Synthèse chimique	Synthèse enzymatique
Avantages	
– Économique	– Sélectivité
– Rapide	– Conditions de réaction douces
– Bons rendements	– Label "naturel"
– Réalisable avec de nombreuses molécules	– Purification aisée
	– Conditions "solvent free" possibles
	– Composition du produit définie
Inconvénients	
– Toxicité (solvant et catalyseur)	– Coûteuse au niveau industriel
– Faible sélectivité	– Problèmes de solubilité des substrats
– Température élevée (caramélisation, formation d'artéfacts, cyclisation, etc.)	– Rendements fort variables
– Composition du produit non définie	– Temps de réaction longs (> 24 h)

Tableau 3. Exemples d'esters de sucres produits par voie enzymatique — *Examples of sugar esters produced by an enzymatic process.*

Sucre	Acide	Enzyme	Solvant	Temps de réaction	Rendement	Référence
Sorbitol	oléique	Novozym 435	2-méthyl-2-butanol	24 h	58 %	Ducret <i>et al.</i> , 1996
	caprylique	Novozym 435	2-méthyl-2-butanol	7 h	42 %	Ducret <i>et al.</i> , 1996
	myristique	lipase d' <i>Aspergillus niger</i>	hexane	24 h	55 %	Gulati <i>et al.</i> , 2000
Fructose	oléique	Novozym 435	2-méthyl-2-butanol	24 h	58 %	Ducret <i>et al.</i> , 1996
	stéarique	SP 382	Tert-butanol	48 h	24 %	Oguntimein <i>et al.</i> , 1993
	palmitique	lipase d' <i>Aspergillus terreus</i>	hexane	24 h	70 %	Gulati <i>et al.</i> , 2000
	myristique	CAL-B-EP 100	Tert-butylméthyléther	24 h	75 %	Cao <i>et al.</i> , 1997
Glucose	oléique	Novozym 435	2-méthyl-2-butanol	24 h	78 %	Ducret <i>et al.</i> , 1996
	palmitique	Novozym 435	acétone	72 h	86 %	Cao, Fisher, 1997
	stéarique	SP 382	Tert-butanol	48 h	10 %	Oguntimein <i>et al.</i> , 1993
	linoléique	lipase de <i>Byssochlamys fulva</i> NTG9	Tert-butanol	24 h	48 %	Ku, Hang, 1995
	palmitique	Novozym 435	Tert-butanol	24 h	46 %	Cao, Fisher, 1998
	laurique	SP435	acétone	72 h	98 %	Arcos <i>et al.</i> , 1998
	divinylapinique	protéase de <i>Streptomyces</i> sp.	diméthylformamide	168 h	56 %	Shibatani <i>et al.</i> , 1997

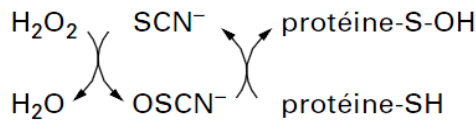
E. Enzyme et qualité hygiénique des aliments

Des produits agricoles - et, en particulier, ceux d'origine animale comme l'oeuf et le lait - contiennent des protéines qui ont un pouvoir **bactéricide ou bactériostatique**. Ces biomolécules sont soit lytiques (lysozyme E.C.3.2.1.17), soit inhibitrices de micro-organismes (peroxydase E.C.1.11.1.7). Ces propriétés sont exploitées pour maîtriser la qualité hygiénique des aliments. Par ailleurs, certaines enzymes comme la catalase (E.C.1.11.1.6) ou la b-lactamase (E.C.3.5.2.6) peuvent détruire des molécules qui ont été introduites dans le milieu (peroxyde d'hydrogène, antibiotique) ; d'autres biocatalyseurs (par exemple, la glucose oxydase E.C.1.1.3.4) génèrent dans le milieu des produits inhibiteurs.

Le lysozyme est utilisé au Japon pour améliorer la conservation des produits marins congelés comme les huîtres ou les crevettes. Des travaux récents ont, par ailleurs, montré que l'utilisation du lysozyme permettait d'inhiber la croissance de *Listeria monocystogenes* à une température de 5 °C.

Les lactoperoxydase : Exemple d'utilisation du pouvoir **bactéricide ou bactériostatique** : La peroxydase agit de manière indirecte par la production de molécules intermédiaire bactéricide ou bactériostatique le cas de la transformation du thiocyanate (SCN⁻) en ion hypothiocyanate (OSCN⁻)

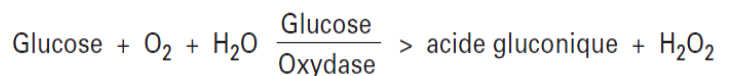
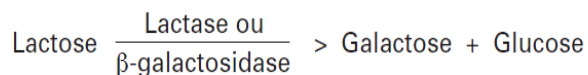
L'ion hypothiocyanate (OSCN⁻) est le principe actif selon le mécanisme suivant :



Dans le lait se trouve une lactoperoxydase (LP) en quantités appréciables et le système LP/SCN/H₂O₂ peut être optimisé

La mise en œuvre de ce système de protection sur le lait en tank à la ferme comporte deux stades. Dans un premier temps, environ 10 % du lactose est hydrolysé par addition d'une lactase pour produire *in situ* du glucose. Ensuite, le glucose est oxydé par une glucose oxydase que l'on rajoute à la première traite, le plus tôt possible.

L'équation simplifiée de ces réactions est la suivante :



F. Biodisponibilité et acceptabilité des aliments

But : Un traitement enzymatique peut améliorer la valeur biologique de certains produits:

- Hydrolyse de molécules complexes
- Restructuration
- Réduction ou élimination du pouvoir allergisant de certaines molécules (

Quelques cas :

- Hydrolyse du lactose
- Préparation des laits de nourrissons à partir de lait de vache
- Réduction de l'allergénicité des protéines et préparation d'hydrolysats. E. g. : gluten, protéines de lait (l'hydrolyse de la β -lactoglobuline)

Utilisation des enzymes dans les industries non alimentaires

a. L'utilisation des enzymes dans l'élaboration des biocapteurs

Les biocapteurs : D'après Gronow*, un biocapteur est un outil ou un système analytique constitué d'un composé biologique immobilisé, appelé « **ligand** », relié à un **transducteur** qui transforme le signal biochimique en un signal physique quantifiable. Selon l'Union internationale de la chimie pure et appliquée (IUPAC), un biocapteur doit être petit et compact, avoir un signal réversible, donner des déterminations précises (réactions « on off ») et établir une connexion réelle entre le matériel biologique et le transducteur.

Transducteur : peut être de nature électrochimique, optiques, thermiques, ampérométriques, acoustiques...

Les ligands le plus souvent employés :

Enzymes, anticorps, cellules entières, les organites cellulaires, les acides nucléiques, les antigènes ou encore les récepteurs peuvent aussi être utilisés. Il est en fait possible d'utiliser toute molécule biologique permettant l'analyse spécifique de l'analyte recherché.

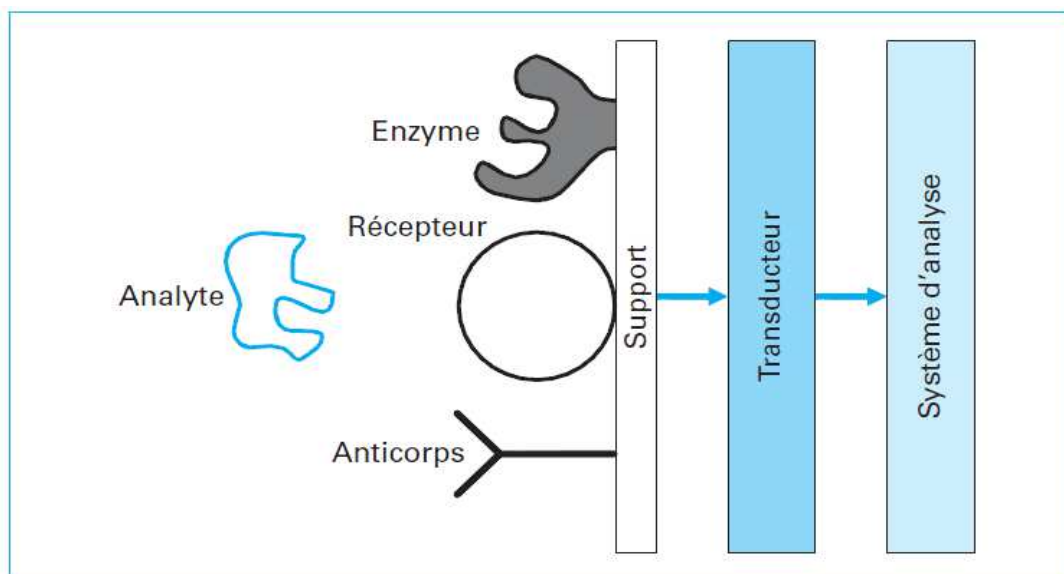


Figure 1 – Schéma simplifié d'un biocapteur avec l'analyte, le ligand immobilisé sur le support, le transducteur et l'appareil de mesure du signal

Les composés biologiques fixés peuvent être séparés en deux catégories :

- Ceux ayant **une activité catalytique**, comme les enzymes et les microorganismes,

- Ceux **fixant simplement l'analyte sans modification**, comme les anticorps et les récepteurs. L'étape de reconnaissance peut donc révéler un événement soit dynamique soit statique.

En alimentaire :

Besoin de techniques analytiques fiables et peu coûteuses pour contrôler la qualité des aliments et des produits alimentaires (produits finis ou matières premières). La non généralisation en alimentaire de cet outils est due : travaux restés au stade de recherche académique. Pas de biocapteurs génériques commerciaux disponibles et aucun n'est dédié à l'industrie agroalimentaire.

Biocapteurs à enzymes

Les biocapteurs à **enzymes** utilisent des enzymes spécifiques pour la capture et la génération catalytique d'un produit qui est alors directement mesuré grâce à une large gamme de transducteurs (électrochimiques, optiques, thermiques, ampérométriques, acoustiques...). Ce type de biocapteurs a été souvent utilisé pour la quantification de contaminants tels que les pesticides, herbicides ou antibiotiques.

L'immobilisation des enzymes sur les supports de transduction :

Les groupements fonctionnels disponibles pour les enzymes ou les protéines proviennent des chaînes latérales des acides aminés, notamment les groupements ϵ -amine de la lysine, carboxyle de l'aspartate et du glutamate, sulfhydryles de la cystéine et hydroxyphénolique de la tyrosine. Des réactifs biofonctionnels, tels que le glutaraldéhyde, le carbodiimide sont aussi très utilisés pour l'immobilisation de protéines.

Utilisation des activités enzymatiques comme marqueurs

- Marqueurs de qualité post-récolte (produits d'origines végétales) : **e.g.** activité de l' α -amylase (graines céréalières)
- Marqueur de présence de contaminants : **e.g.** Utilisation de la spécificité de l'activité enzymatique pour la détection de contaminant (toxine fongique : principe de détection d'exoantigène)
- Marqueurs d'états physiologiques e.g. mesure de l'activité d'enzymes impliquée dans la maturation, sénescence (fruits et légumes); ou activité d'enzymes hydrolytiques ou de structure (dégradation ou synthèses de molécules biologiques caractéristique d'une réponse physiologique à un traitement, un stress,etc).

b. Utilisation des enzymes dans les méthodes d'analyses de biologie moléculaire.

L'utilisation des enzymes dans les méthodes de biologies moléculaire est bien ancrée dans les principes analytique de la biologie moléculaire. Les propriétés extraordinaires que possèdent certaines enzymes, en l'occurrence leur action sur les acides nucléique (synthèse, restriction, ligation, transcription...) font d'elles des outils incontournables dans le génie génétique. Ici, nous développerons quelques exemples d'utilisation d'enzymes dans les techniques de clonage et d'amplification de l'ADN.

Utilisation des enzymes de restriction : Les enzymes de restriction agissent au niveau de site bien précis au niveau de l'ADN. Elles sont dites endonucléase car elles coupent à l'intérieur de l'ADN et non pas au niveau de ces extrémités. Les coupures donnent des « bouts francs » ou extrémité cohésives.

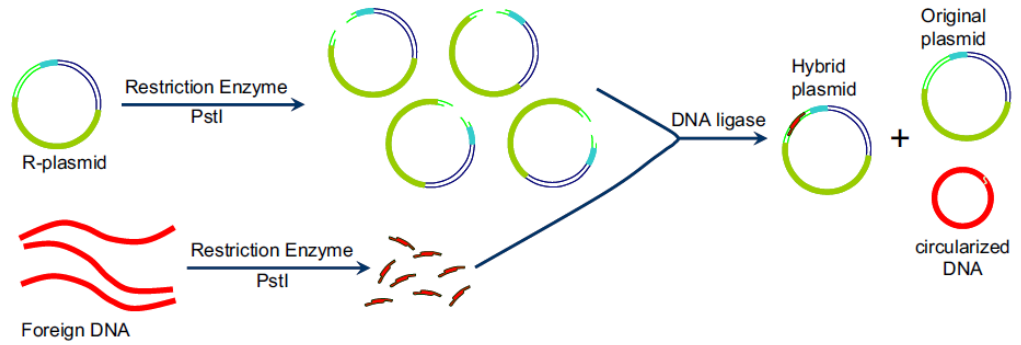
Restriction enzyme	Source	Recognition sequence and location of cuts
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	
HaellI	<i>Haemophilus aegyptius</i>	
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
HindIII	<i>H. influenzae</i>	
EcoRI	<i>E. coli</i>	

Il existe des milliers d'enzymes de restriction. Le tableau ci-contre regroupe :

- les enzymes de restrictions les plus utilisés (nom commercial)
- leurs sources respectives.
- Le site et mode d'action de restriction (coupure)

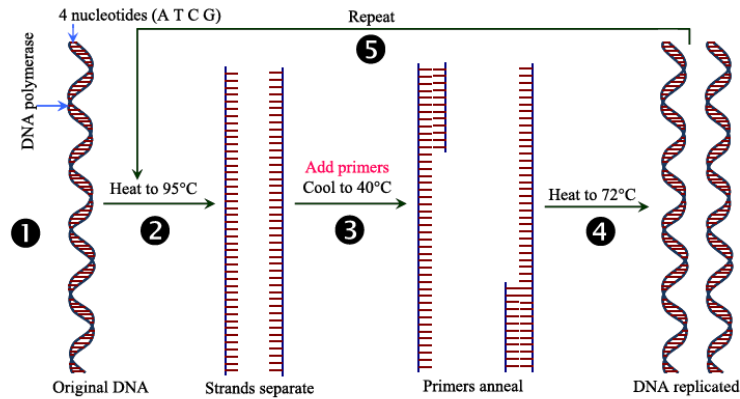
Les ADN ligase : Ce sont des enzymes qui lient les fragments d'ADN après coupure ou altération. Elles agissent également au niveau de site bien précis. Les enzymes de restriction et de ligation s'utilisent conjointement lors des opérations d'insertion de gène.

Utilisation des enzymes de restriction pour l'insertion de gène dans un plasmide.

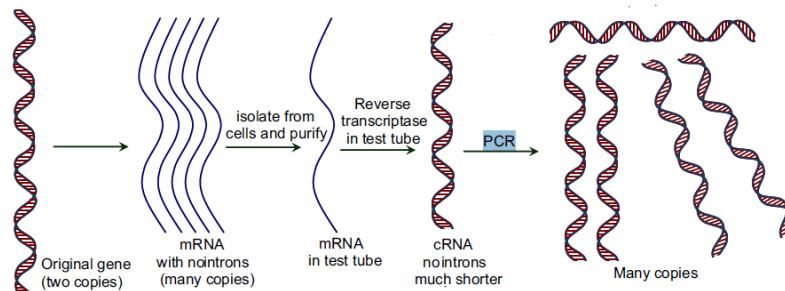


L'ADN Polymérase :

L'utilisation la plus connue est la réplication de l'ADN. Ainsi, en présence des bases ACTG+enzyme+ADN, le fragment d'ADN peut être dupliqué. En *in vivo*, cette enzyme est responsable de la synthèse de l'ADN à partir des monomères deoxynucléotides.



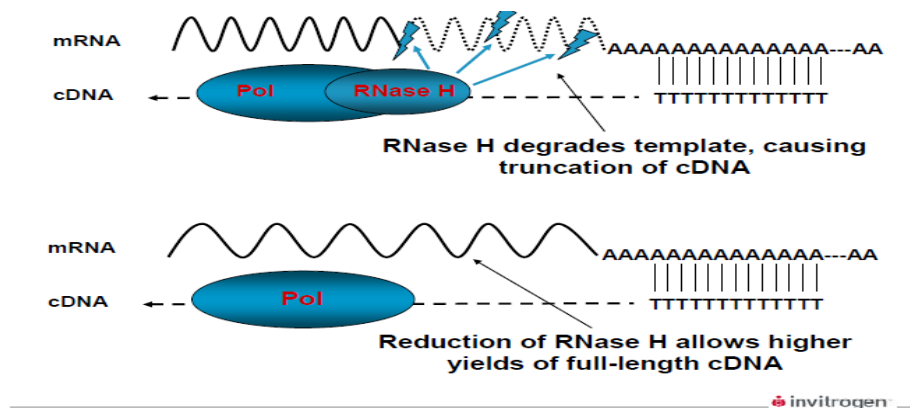
Cette enzyme est utilisée dans toutes les étapes *in vitro* de techniques de biologie moléculaire faisant appel à la réplication du brin d'ADN. La PCR (Polymerase chain reaction) est une méthode d'amplification de l'ADN, permettant ainsi d'avoir plusieurs copies utilisable dans les techniques d'analyse de l'expression de gène ou dans le génie génétique.



La Taq polymérase est l'ADN polymérase utilisée en PCR.

La transcriptase inverse : enzyme servant à synthétiser de l'ADN complémentaire ADNc à partir de l'ARN. Etape cruciale dans la RT-PCR (revers transcription-PCR). Le principe de son fonctionnement est lié à sa composition. En effet, elle comprend en général une polymérase de l'ADN ARN-dépendante et une polymérase de l'ADN ADN-dépendante, lesquelles travaillent en synergie pour réaliser la transcription en sens inverse de la direction standard. Cette transcription inverse ou rétrotranscription permet comme son nom l'indique de transcrire à l'envers c'est-à-dire d'obtenir de l'ADN à partir d'ARN

Exemple de la La SuperScript™ III Issue de Mu-MoLV RT mutante du virus de la Leucémie Murine Moloney pour laquelle on a gardé l'activité polymérase mais on a détruit l'activité RNase H (cela permet la synthèse un DNAc en pleine longueur et avoir un bon rendement de synthèse).



Elle peut être utilisée pour la synthèse d'ADNc à partir de longs séquences d'ARN (> 5 kb). L'activité de la RNase H peut détruire les ARN m lorsque les temps d'incubation sont longs. Or des temps d'incubation suffisamment longs sont souvent nécessaires pour synthétiser de longs ADNc.

c. Autres Utilisations des enzymes dans les industries non alimentaires

- L'industrie textile ;
- Les industries des détergents et tensioactifs ;
- L'énergétique : biofuel ;
- Nanotechnologie.

d. Utilisation des enzymes en thérapie et analyse.

Le tableau suivant regroupe les principales applications des enzymes dans le domaine thérapeutique.

Tableau 2 – Principaux enzymes utilisés au laboratoire (analyse et synthèse) et en médecine (analyse et thérapeutique)	
Aldolase	Synthèse de sucres.
Aminoacide acylases .	Dédoublement (1) des aminoacides synthétiques.
Aminoacide transaminases	Synthèses d'acides aminés.
Asparaginase.....	Traitement de la leucémie.
Catalase	Analyse et thérapeutique.
Cholestérol oxydase ..	Détermination analytique du cholestérol - oxydation de stérols.
Déshydrogénases	Déshydrogénation d'alcools.
Dextranases.....	Hydrolyse du dextrane.
Estérases.....	Dédoublement (1) d'acides et d'alcools par hydrolyse des esters.
Glucose oxydase.....	Analyse (dosage du glucose).
Aminoacide décarboxylases	Décarboxylation des acides aminés.
Hémicellulase	Hydrolyse de l'hémicellulose.
Lipases	Hydrolyse des corps gras.
	Dédoublement (1) d'acides et d'alcools par saponification des esters.
Lysozyme (2)	Thérapeutique (bactéricide).
Protéases (3)	Thérapeutique.
Streptokinase	Thérapeutique (dissolution des caillots sanguins).
Thrombase	Thérapeutique (antihémorragique).
Urate oxydase	Thérapeutique (traitement de la goutte).
(1) Séparation des deux formes optiquement actives d'un mélange racémique.	
(2) Ne pas confondre avec les lysosomes qui sont des organites intracellulaires contenant des hydrolases.	
(3) En particulier papaïne, chymopapaïne et chymotrypsine.	

Applications aux diagnostics

Enzymes plasmatiques ou sériques.

- Enzymes fonctionnelle.
 - Pseudocholinestérase
 - Enzymes de la coagulation
- Enzymes non fonctionnelles.
 - Exocrines (Lipase pancréatique, Amylase pancréatique, Trypsine...)
 - Intracellulaires vraies (indicatrice de Localisation intracellulaire, Perméabilité des membranes, Solubilité de l'enzyme, Vitesse de circulation du liquide, Vitesse de destruction ou d'excrétion : Lactico-déshydrogénase, Aspartate aminotransférase, Alanine aminotransférase).

Chap 3 : Génie des procédés enzymatiques

- Etude des procédés qui permettent d'exploiter et d'améliorer les propriétés de la catalyse enzymatique (Surexpression et marquage (tag) d'enzyme en vu de leur purification)..

Génie des procédés enzymatiques

Avantages de l'utilisation des enzymes

- Réaction en conditions « douces »
- L'Utilisation de petites quantités de catalyseurs (enzymes) assure l'obtention des produits de la réaction ;
- Bioressource renouvelable et Biodégradabilité des enzymes;
- Diversité des enzymes impliquant une investigation continue ;
- Très haute Spécificité de la réaction à catalyser
- Possibilité de recyclage des enzymes ;
- Procédés non polluants ;
- peu de co- ou sous produits ;
- Maîtrise de l'ingénierie de transformation des enzymes et des organismes producteurs d'enzymes ;
- Risque de toxicité quasi inexistant ;
- ... etc.

Limites de l'utilisation des enzymes :

a. Limites liées à la production :

- Cout de production
- Procédés d'extraction et de purification laborieux

b. Limites liées à l'utilisation :

- De faibles quantités d'impuretés peuvent inhiber les enzymes ;
- Le recyclage des enzymes n'est pas systématique ;
- La catalyse continue est encore en développement ;
- Maintien des Conditions de catalyse et étroitesse de la marge de manœuvre ;
- Les enzymes, édifices tridimensionnels, peuvent subir une dénaturation thermique qui entraîne évidemment une perte d'activité catalytique ;
- Les enzymes étudiés principalement jusqu'ici fonctionnent bien dans les milieux aqueux. Or de nombreuses substances organiques ont des solubilités faibles dans l'eau. Quelques solutions :
 - travailler en milieu aqueux avec le produit en suspension (souvent, la vitesse de dissolution est faible et risque de limiter la vitesse de transformation) ;
 - travailler en milieu hétérogène avec des solvants organiques peu miscibles à l'eau ;
 - Des milieux micellaires et des microémulsions se prêtent bien aux transformations enzymatiques, mais la séparation du produit peut poser des problèmes à cause de la présence des surfactants nécessaires à la formation de ces milieux ;

Un milieu homogène du type eau-solvant organique miscible peut aussi être envisagé, mais il est peu favorable. Les enzymes sont en général soit inhibés, soit dénaturés par le solvant organique.

Il est possible de catégoriser les utilisations en deux principaux types :

1. Utilisation indirecte par l'intervention de l'organisme producteur des enzymes :
 - Présence naturelle dans les matières premières animale et végétales (exemple de l'utilisation traditionnelle de latex de figuier pour provoquer la floculation du lait (action d'un enzyme protéolytique dite « Ficine » sur les caséines du lait).
 - Utilisation d'organisme ou de microorganismes produisant les enzymes (exemple forme de levain : amylase de levure, lipase et protéase de champignon ou bactérie intervenant dans l'affinage des fromages..)

2. Utilisation directe par ajout d'extrait enzymatique (extrait brut, préparation enzymatique ou enzyme finement purifiée (exemple de l'utilisation de chymosine, enzyme responsable de la coagulation du lait, pour les pectinases, enzyme permettant de réduire la viscosité des jus de fruit).

procédés d'utilisation des enzymes

Les enzymes sont utilisées en industrie ou en R&D sous plusieurs formes, et ce, afin de répondre à des contraintes technologiques et de coût.

Utilisation des enzymes non immobilisée : est la première utilisation, l'utilisation directe est toujours appliquée essentiellement par l'utilisation des préparations enzymatiques (agroalimentaire et textile). Cependant beaucoup d'inconvénients sont constatés :

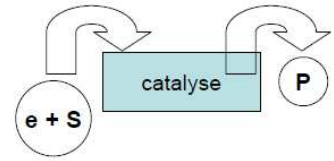
- Recyclage difficile voire impossible
- Élimination des enzymes et purification des produits de la bioconversion
- Environnement catalytique difficile à maîtriser
- Coût des enzymes
- ...

Les procédés d'immobilisations sont une solution aux inconvénients précédemment cités.

Le principal but de l'immobilisation est de pouvoir pallier à l'inconvénient majeur de la catalyse discontinue. L'objectif étant de :

- Réduire les coûts par le recyclage
- Minimiser l'instabilité des enzymes en solution
- Les enzymes non immobilisées sont difficiles à recycler. L'immobilisation permet le recyclage

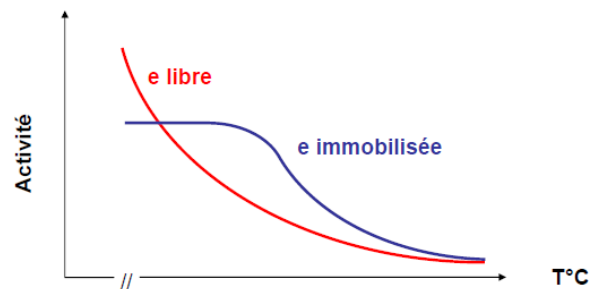
➔ Catalyse discontinue



L'immobilisation des enzymes présente quelques inconvénients :

- **Baisse d'activité par rapport aux enzymes libres**

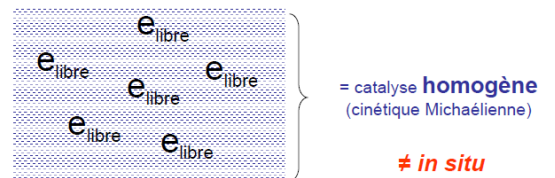
Cependant, une plus grande stabilité est constatée. La baisse d'activité est en liaison direct avec le processus de formation du complexe E-S.



Pour mieux comparer :

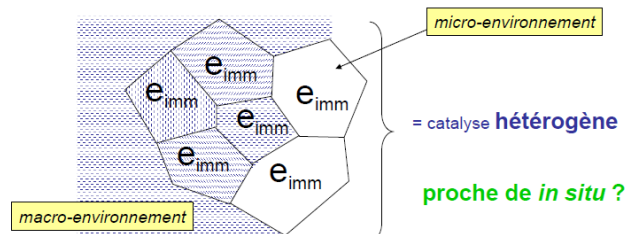
L'environnement de l'enzyme libre est caractérisé par :

- L'enzyme est isolée de l'environnement cellulaire
- Toutes les molécules sont identiques
- L'environnement est continu



L'environnement de l'enzyme immobilisée est caractérisé par :

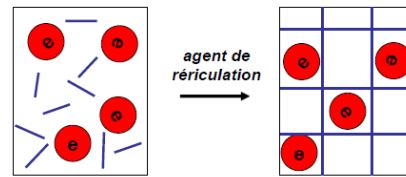
- Confinement ou fixation de l'enzyme
- Les molécules ne sont pas identiques
- L'environnement est discontinu



L'immobilisation par inclusion

Le principe de l'inclusion de l'enzyme est basé sur la construction d'un réseau polymérique tridimensionnel organisé à partir de monomères. Ce dernier est destiné à inclure et à immobiliser l'enzyme. Il est cependant important de prendre en considération la mobilité des substrats et leur accès aux enzymes. Ce type de réseau est construit en présence de l'enzyme. C'est le cas des gels pouvant être formé après initiation avec des agents de réticulation.

• gels

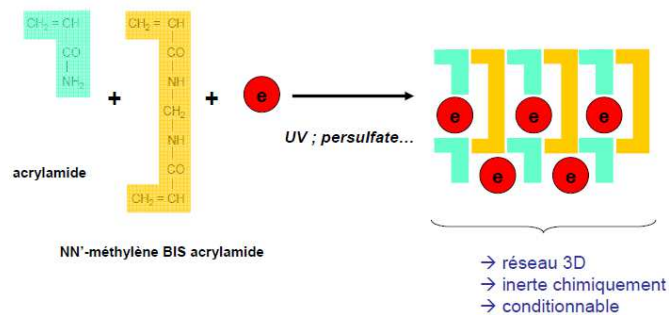


e libre dans une solution de monomères

e confinée dans un réseau polymérique

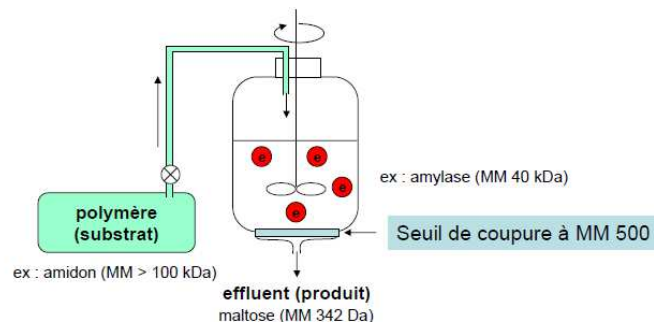
→ polyacrylamide
→ polyéthylène glycol
→ polyvinyl pyrrolidone
→ amidon

• Ex : gels de polyacrylamide



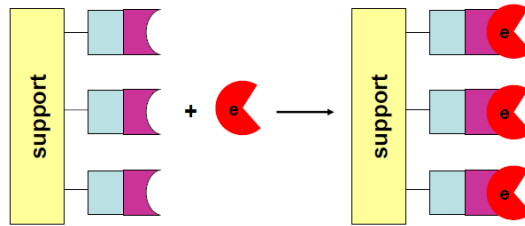
• macro-volumes

- enzyme confinée dans un espace limité par une *membrane hémiperméable*
- choix des *seuils de coupure* (MM 500 à 300 000 Da)

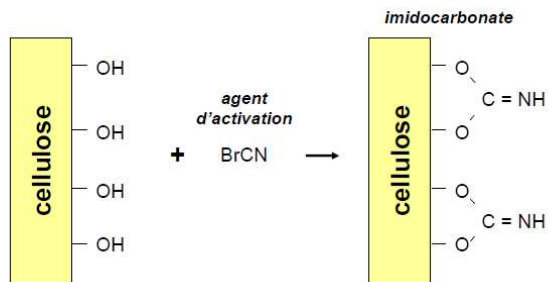


Immobilisation par liaison covalente

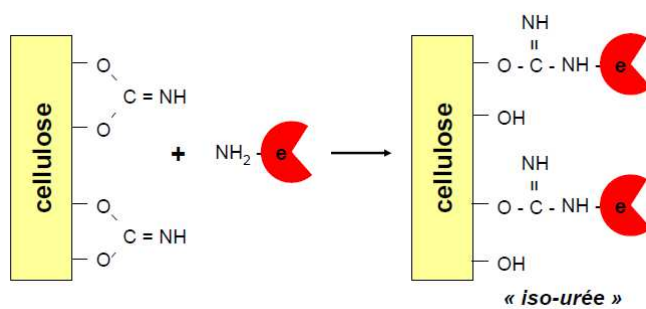
- Principe de l'immobilisation
 - 2ème étape : *fixation* de l'enzyme



- exemple : immobilisation au bromure de cyanogène (BrCN)
 - activation*

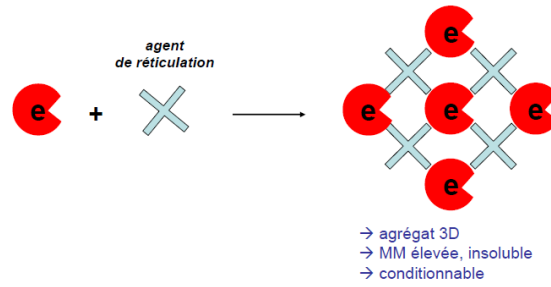


- exemple : immobilisation au bromure de cyanogène (BrCN)
 - fixation*



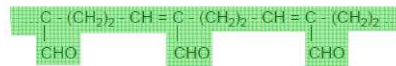
Immobilisation par réticulation

- Principe
 - pontages intermoléculaires

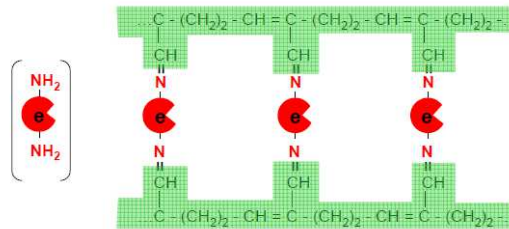


- exemple : réticulation au glutaraldéhyde $\text{OHC} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CHO}$

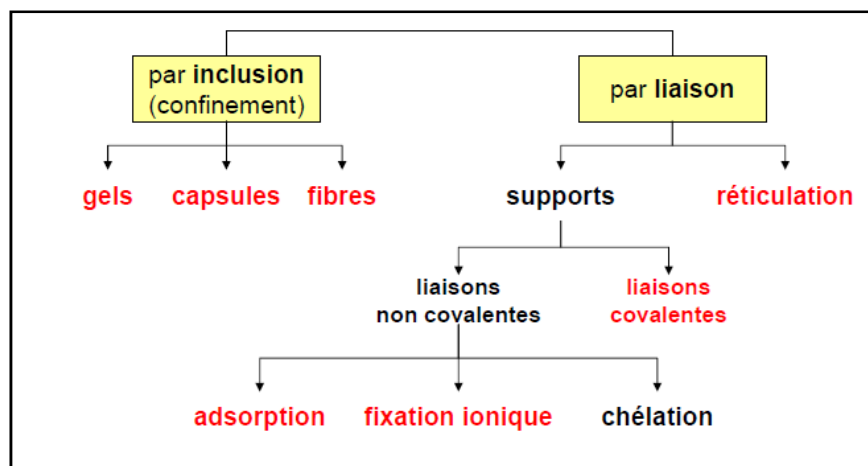
- 1ère étape : polymérisation (pH 7,5 - 8,5 ; 25°C)



- 2ème étape : réticulation



Résumé des principales méthodes d'immobilisation



Catalyse hétérogène

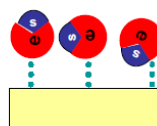
- Particularités des enzymes immobilisées
 - changement d'environnement physicochimique
 - altération de la structure IV^{aire} (liaisons)

➡ **modification des paramètres cinétiques ; ↘ activité**

- Exemple : β -galactosidase microbienne

Origine	Activité %	
	libre	immobilisée (mg /g)
<i>Aspergillus</i>	95	80 - 90 (81)
<i>Lactobacillus</i>	80	20 - 30 (114)

- Risque de gêne stérique
 - activité = f (taille de S)



- Exemple : trypsine
 - caséine : MM 24 kDa
 - BAEE : MM 0,34 kDa

trypsine	Activité %	
	BAEE	caséine
<i>libre</i>	100	100
<i>immobilisée</i>	88	17

- Sensibilité aux inhibiteurs enzymatiques
 - même constat que précédemment : activité = f (taille de I)

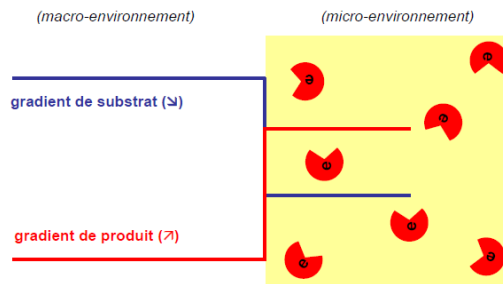
- Exemple : trypsine
 - 3 inhibiteurs anti-trypsiniques

inhibiteurs	MM kDa	% inhibition	
		libre	immobilisée
<i>extrait de soja</i>	21	100	48
<i>extrait de haricot</i>	9	100	63
<i>NGB</i>	0,3	100	100

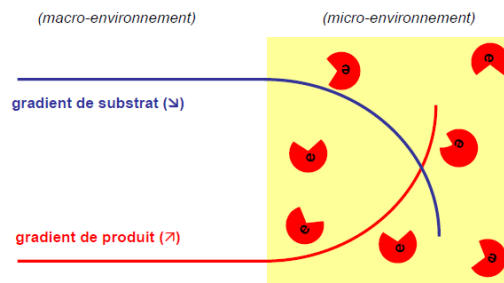
Partage et diffusion

- Généralités :
 - l'immobilisation crée deux environnements (macro ; micro)
 - interactions entre réactants / micro-environnement → partage
 - mobilité des réactants dans les deux environnements → diffusion
- gradients de concentration en réactants
 - **discontinus**, si conditions de partage
 - **continus**, si conditions de diffusion

- condition de partage

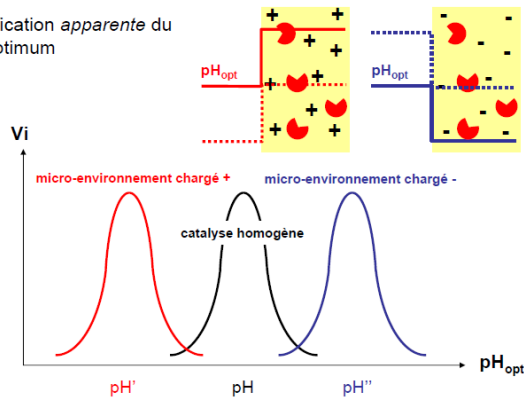


- condition de diffusion

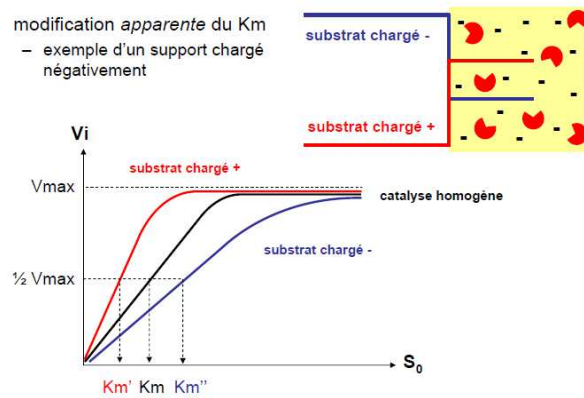


Conséquences du partage

modification *apparente* du pH optimum

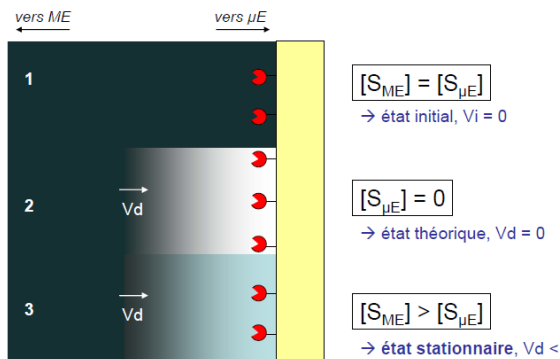


- modification *apparente* du K_m
 - exemple d'un support chargé négativement

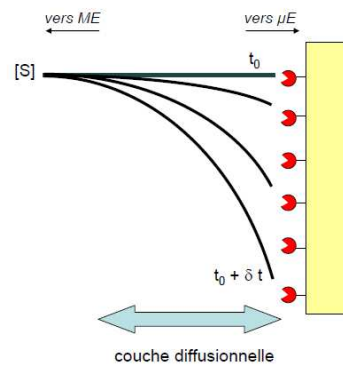


Conséquences de la diffusion

- Vitesse de diffusion (V_d) et vitesse de réaction (V_i)



- L'état stationnaire s'installe progressivement



- K_m apparent $>$ K_m vrai
- K_m apparent = $f(V_d)$
- K_m apparent = $f(\text{débit})$

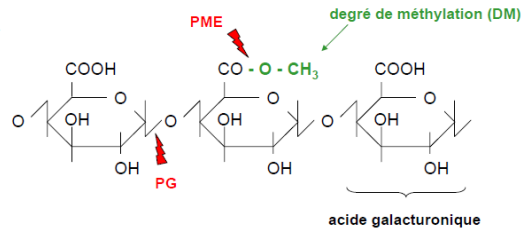
Débit (ml / h)	K_m apparent * (g / l)
10	59
50	13
100	8
200	6
250	5

* bioréacteur à amyloglucosidase

Exemples d'applications industrielles

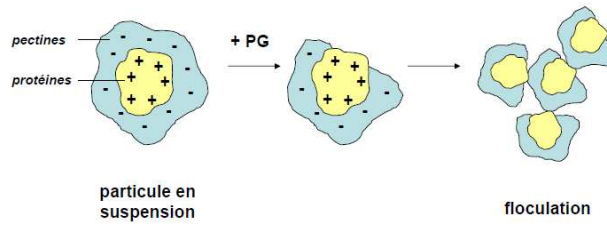
- Industrie des boissons
 - origine de la *turbidité* : les « **pectines** »

- rappels

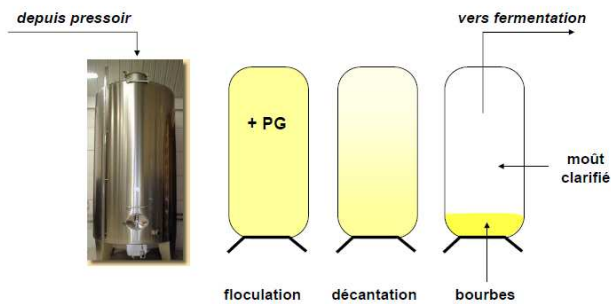


- DM < 5% → acide pectique
- 5% < DM < 50% → PFM
- DM > 50% → PHM
- dégradables par les « pectinases »

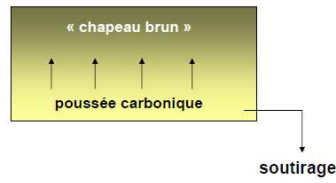
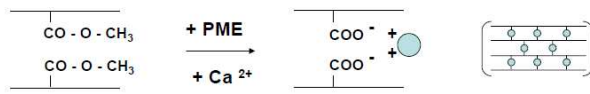
- Industrie des boissons
 - débourbage* des moûts (vinification en blanc)



- Industrie des boissons
 - débourbage* des moûts (vinification en blanc)



- Industrie des boissons
 - clarification des cidres

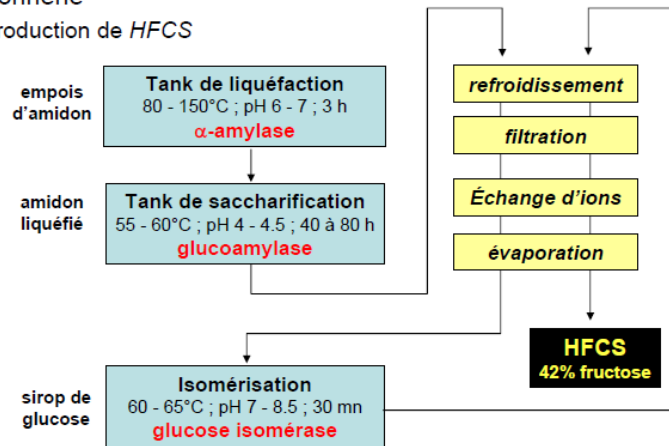


- amidonnerie
 - production de HFCS

- pouvoir édulcorant du fructose
- sodas, jus de fruits, fruits au sirop, crèmes glacées...
- source = maïs
- co-produits = huile, gluten, amidon séché, fibres...

Exemples d'applications industrielles

- amidonnerie
 - production de HFCS



Chap 4 : Production des enzymes

- Les diverses sources, la fermentation, les bioréacteurs enzymatique, production d'enzyme à grande échelle.

Production et utilisation des enzymes à grande échelle

Enzymes industrielle

Enzymes d'origine non fermentaire

Origine végétale et animale :

Dans les procédés traditionnels, la majeure partie de la transformation est due aux enzymes endogènes, essentiellement les protéases digestives. Afin d'abaisser les coûts de production, l'utilisation d'enzymes (essentiellement les protéases et lipase) a été préconisée pour la fabrication des produits de bioconversion.

Inconvénients :

- rendement d'extraction faible ;
- développement lente des végétaux et animaux par rapport aux microorganismes ;
- procédés d'extraction laborieux.

=== → inconvénient majeur : Production irrégulière.

Enzymes d'origine fermentaires :

Actuellement, les sources d'enzymes sont principalement d'origine microbienne (fongique, bactériennes) et grâce aux génies génétique et microbiologique, il est devenu possible de provoquer la surexpression de protéines enzymatiques et d'en modifier les propriétés. Les principaux avantages :

- croissance rapides
- diversité des microorganismes
- amélioration génétique aisée
- faible cout de production
- réglementation des souches et des substrats.

=== → avantage majeur : Production régulière.

La bioproduction des enzymes

Il existe deux types de biosynthèse des enzymes par les organismes vivants :

Biosynthèse d'enzymes endo cellulaire : il s'agit essentiellement des enzymes intervenants dans le métabolisme général cellulaire.

Biosynthèse d'enzymes exocellulaire

Les formes de production et d'utilisation des enzymes :

Les préparations enzymatiques (PE) : Les préparations enzymatiques utilisées dans les IAA contiennent une à plusieurs enzymes actives responsables des transformations techno-fonctionnelles souhaitées. Autre les enzymes, la préparation enzymatique peut contenir :

- des additifs (agents diluants, stabilisant, conservateurs, ...);
- des constituants du milieu source des enzymes (exemple des résidus du milieu de culture fermentaire des microorganismes d'où les enzymes sont extraites ;
- De faibles quantités de PE sont généralement utilisées (exemple dégomme enzymatique des huiles : *30 g denzymes* → *1 Tonne huile*) ;
- Après bioconversion, des procédés adéquats sont utilisés afin d'éliminer les enzymes.

Enzymes purifiée (EP) :

	Préparation enzymatiques	Enzymes purifiées
Pureté	-	+
Quantité produite	Dizaines de tonnes	Quelques kilogrammes
prix	Faible	élevé
Réaction catalysée	Faible VA	Forte VA
Utilisation	IAA, Textiles	Industrie pharmaceutique, R analyses...

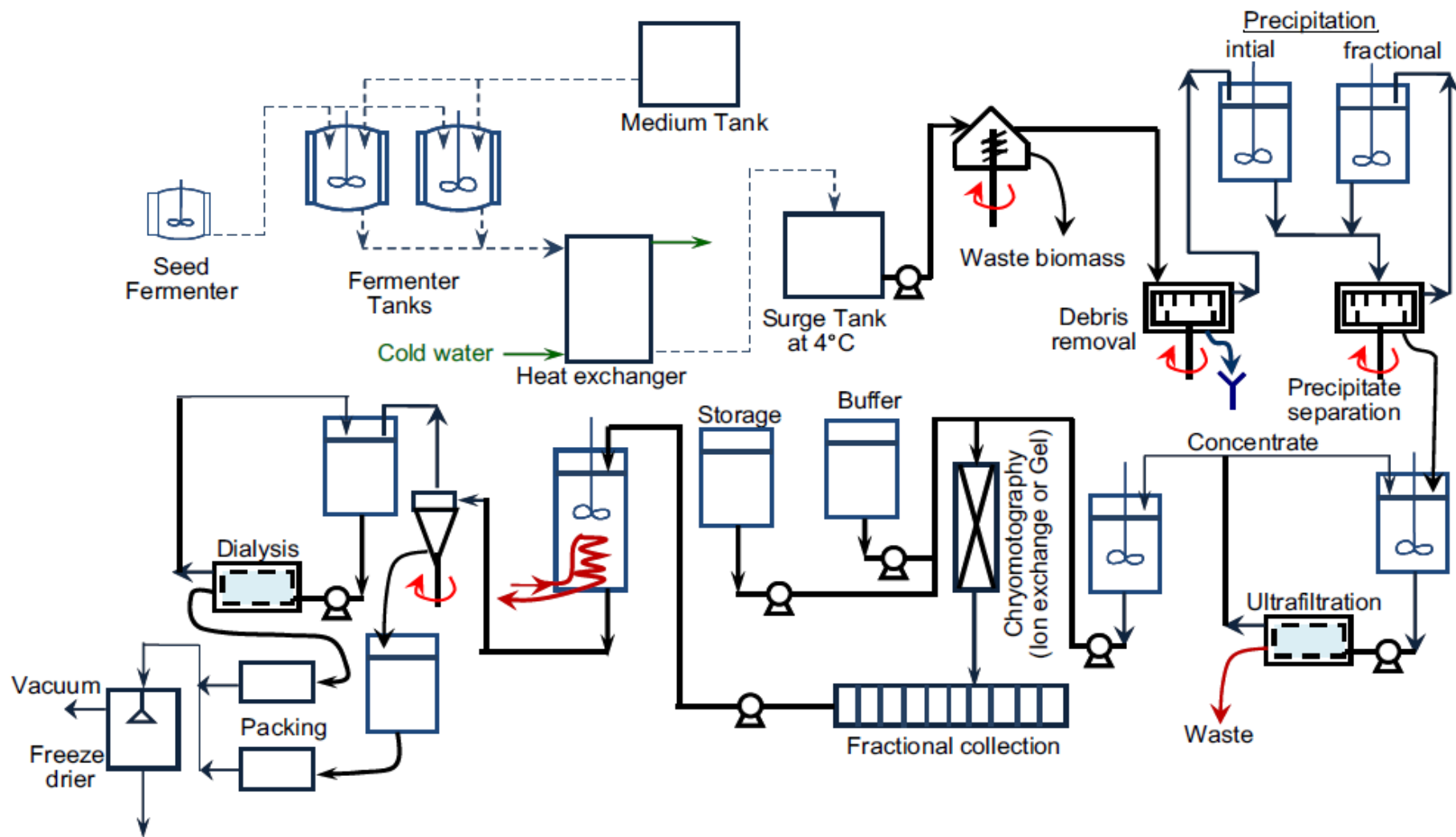


Diagramme de fabrication d'une enzyme exocellulaire

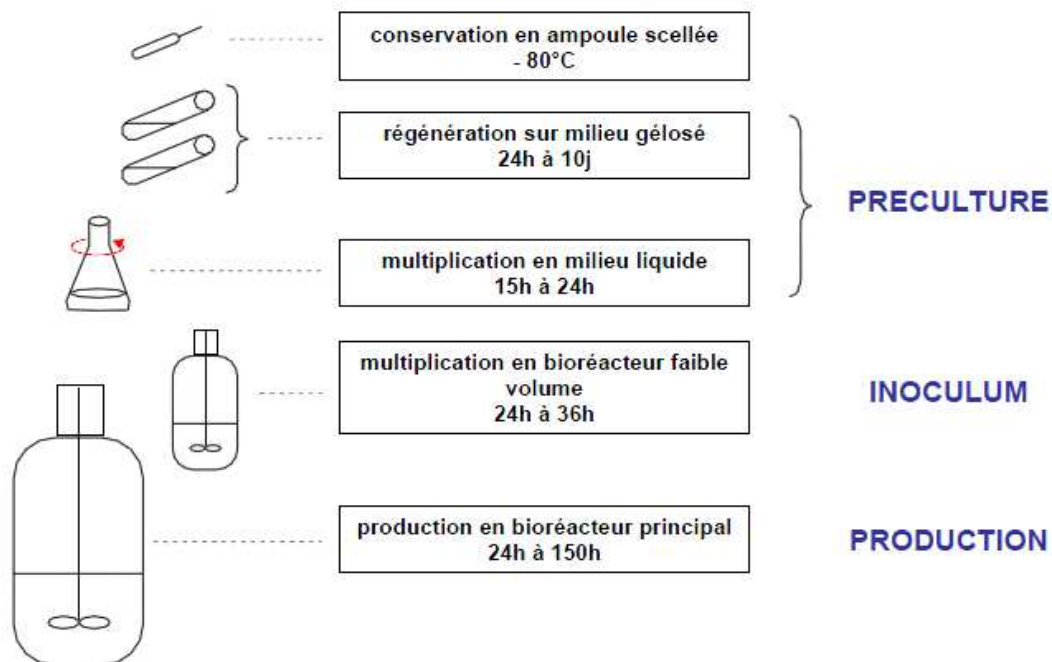
Production des enzymes par les microorganismes :

Principaux microorganismes utilisés

- **bactéries**
 - *Bacillus sp.*
 - *Streptomyces sp.*
 - *E. coli*
- **champignons filamenteux**
 - *Aspergillus oryzae*
 - *Aspergillus niger*
- **levures**
 - *Saccharomyces cerevisiae*
 - *Candida lipolytica*
 - *Kluyveromyces sp.*

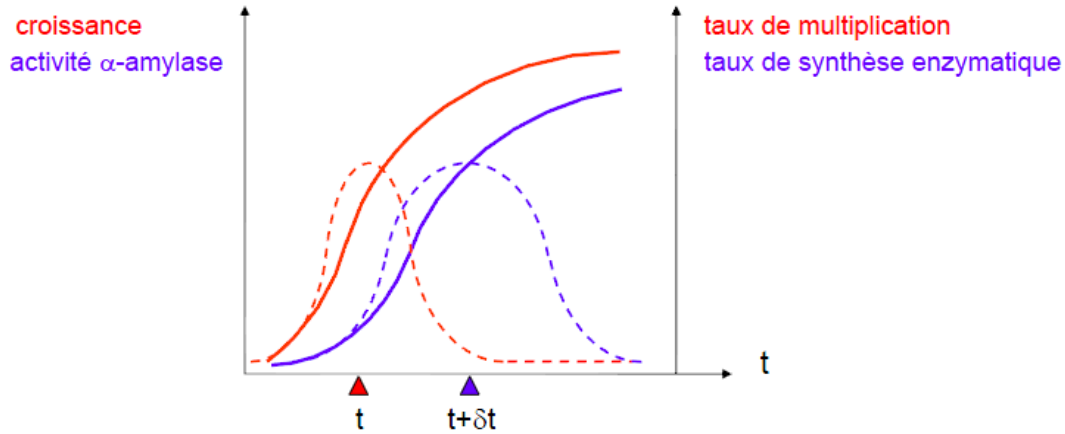
Utilisation des bioréacteurs

méthodologie des bioréacteurs



Les étapes ci-dessus ne concernent que la culture des microorganismes sources d'enzymes à extraire.

- méthodologie des bioréacteurs
- croissance microbienne / activités enzymatiques ?
 - ex : *Bacillus amyloliquefaciens* → α-amylase



Au

cours du développement microbien, un suivi de la biosynthèse et de l'activité de l'enzyme renseigne sur le bon déroulement de la culture.

Extraction et purification des enzymes après culture

- **Diagramme général**

- **Remarques**

- extraction
- fractionnement
- purification

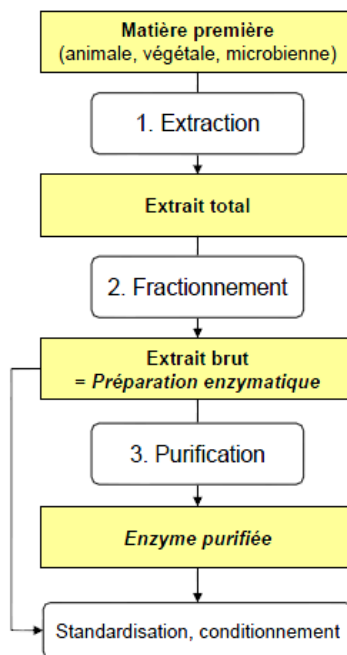
- **Rappels**

- taux de purification ?

$$T = \frac{\text{Activité spécifique}_n}{\text{Activité spécifique}_{n-1}}$$

- rendement de purification ?

$$R = \frac{(\text{Activité absolue} \times \text{volume})_n}{(\text{Activité absolue} \times \text{volume})_{n-1}}$$



- Les cellules sont récupérées par filtration ou centrifugation

-rupture des membrane

-possibilité d'augmenter la perméabilité membranaire sans rupture.

-procédés de séparation des débris cellulaire, acides nucléiques...

Les principales méthodes d'extraction: il s'agit de l'extraction des enzymes endocellulaires. les méthodes d'extraction se basent quasiment toutes sur la rupture membranaire. Elles doivent cependant assurer l'intégrité des protéines enzymatiques. Ces méthodes s'avèrent non spécifique et l'on parle d'extrait brut après extraction.

Les méthodes d'extraction mécanique

- **abrasion** → microbilles de verre
- **homogénéisation à haute pression** → « liquid shear »



« French press »

- 25 °C
2 500 bars

- **Sonication** → 20 kHz



- **choc osmotique** → solutions hypertoniques
- **choc thermique** → *n* cycles congélation / décongélation
- **choc hydrique** → « spray drying »

Les méthodes d'extraction Physique



Les méthodes d'extraction chimique

- **lyse alcaline** : → pH 12 (NaOH, KOH)
- **lyse enzymatique !** → lysozyme (protéine du blanc d'œuf)
 - rupture des liaisons $\beta,1-4$ des peptidoglycans
 - bactéries gram+
- **détergents** → rôle dispersant des membranes
 - ioniques (lauryl sulfate Na^+)
 - non ioniques (Tween, Teepol, Triton)
- **solvants** → séparation du « non protéique »
 - toluène
 - butanol
 - acétone
 - chloroforme...

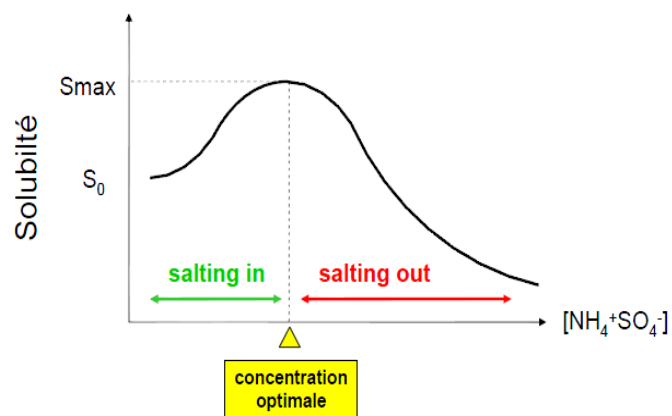
La purification d'enzyme

Les principaux objectifs de la purification des enzymes sont :

- Isoler une enzyme particulièrement recherchée à partir de l'extrait brut ;
- Eliminer les principaux agents d'inhibition des enzymes ;
- Eliminer les activités contaminantes

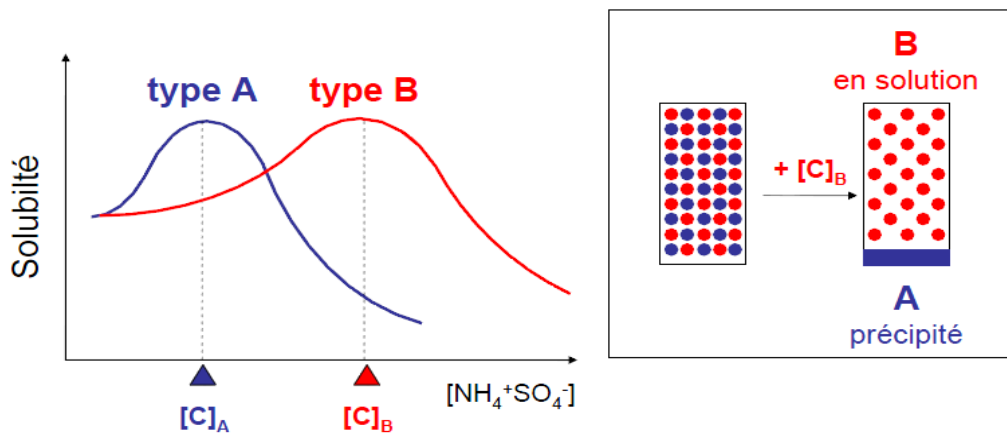
La précipitation fractionnée :

- par addition de sels, d'alcools, d'ions métalliques
- exemple → fractionnement au sulfate d'ammonium



- L'augmentation de la force ionique du milieu augmente l'activité d'une enzyme (salting in). Au-delà d'une certaine concentration, une précipitation est provoquée (salting out).

- Application à la purification des protéines :



Exemple de production et de purification d'une enzyme

- production de **glucose déshydrogénase** par *Bacillus megaterium*
 - culture de *B. megaterium*, M 1286 → extraits de levure, peptones, glucose...
 - [GDH]_{max} après 20 – 24 h de culture
 - filtration des bactéries après culture
 - extraction par homogénéisation haute pression
 - centrifugation
 - récupération du surnageant (extrait brut)
 - purification

	Volume (dm ³)	Protéines (g.dm ³)	Activité GDH (kUI.dm ³)
Extrait brut + NH ₄ SO ₄ , 60%	80	38	23
Surnageant + NH ₄ SO ₄ , 90%	72	15,2	18,4
Précipité reprise tampon	4	48	200
gel filtration			
Filtrat	10	12,3	65
ultrafiltration			
Ultrafiltrat	3	24,7	200
lyophilisation			
Lyophilisat	106 g	0,55 kg/kg	4,5 kUI/g

taux de purification obtenu par ultrafiltration ?
rendement de cette étape ?

	Volume (dm ³)	Protéines (g.dm ³)	Activité GDH (kUI.dm ³)
Filtrat	10	12,3	65
ultrafiltration			
Ultrafiltrat	3	24,7	200

$$\text{Taux de purification} = \frac{\text{Activité spécifique}_n}{\text{Activité spécifique}_{n-1}} = \frac{200 / 24,7}{65 / 12,3} = \frac{8,09}{5,28} = 1,5$$

$$\text{Rendement} = \frac{(\text{Activité absolue} \times \text{volume})_n}{(\text{Activité absolue} \times \text{volume})_{n-1}} = \frac{200 * 3}{65 * 10} = \frac{600}{650} = 0,92 \text{ (92 \%)}$$

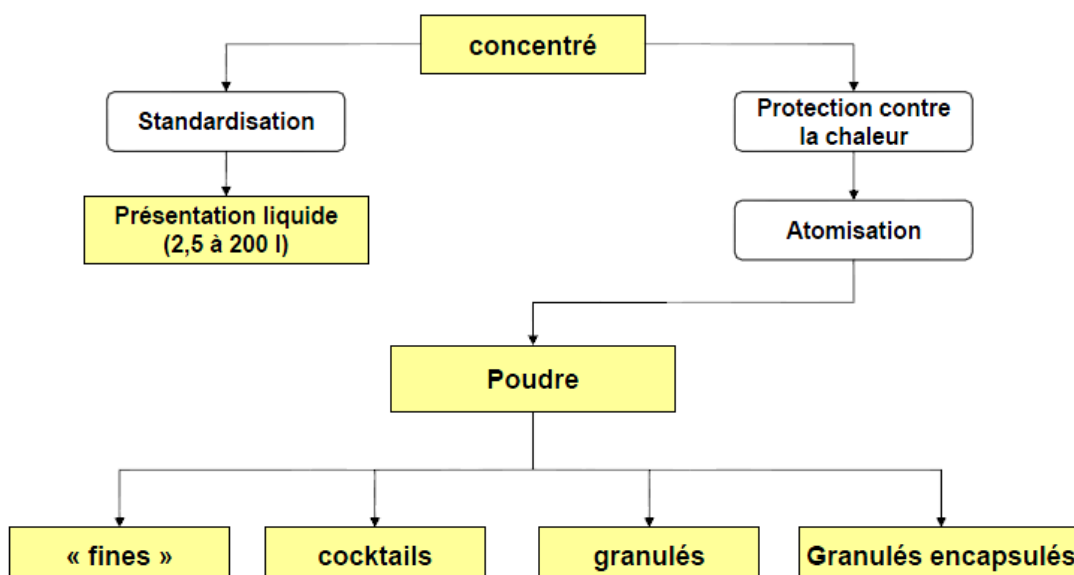
	Volume (dm ³)	Protéines (g.dm ³)	Activité GDH (kUI.dm ³)	A. abs (kUI)	R	A. spé (kUI/g)	T
Extrait brut + NH ₄ SO ₄ , 60%	80	38	23	1840		0,60	
Surnageant + NH ₄ SO ₄ , 90%	72	15,2	18,4	1324	72%	1,21	2
Précipité reprise tampon	4	48	200	800	60%	4,16	3,4
gel filtration Filtrat	10	12,3	65	650	81%	5,29	1,3
ultrafiltration Ultrafiltrat	3	24,7	200	600	92%	8,10	1,5
lyophilisation Lyophilisat	106 g	0,55 kg/kg	4,5 kUI/g	477	80%	8,20	1

Rendement total de la purification = 26%

Taux de purification global = 13,7

Conditionnement

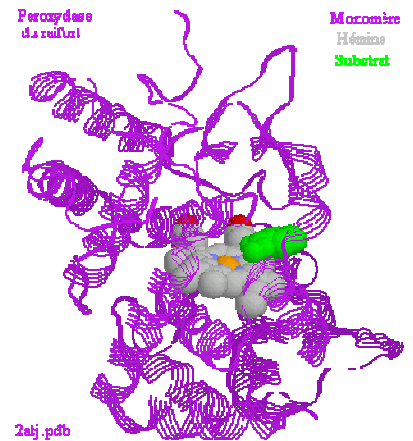
(présentation, formulation commercialisation)



Travaux Pratiques de Génie Enzymatique

TP 1 : Travaux Pratiques de Génie Enzymatique

Les Peroxydases



Les peroxydases (Oxydoreductases, Exemple : EC 1.11.1.9) ont une grande importance (régulation, protection, synthèse,...) elles sont plus connues pour leurs aptitudes de destruction des radicaux peroxydes d'hydrogène (molécule toxiques provoquant l'oxydation de molécules d'intérêt pour les organismes vivants). Les lactoperoxydase sont également utilisées pour la production de molécules possédant un pouvoir bactéricide ou bactériostatique (exemple de la stabilisation des laits de traite: production de l'hypothiocyanate). Elles sont d'autre part utilisées dans certaines techniques immunoenzymatiques mais aussi dans le dosage du glucose car leur intervention permet la formation de produits colorés. Les peroxydases sont également des marqueurs de certain d'états physiologiques. Etant une enzyme dont l'activité est aisément mesurable *in vitro*, nous allons afin d'atteindre les objectifs de ce TP.

Objectif du TP : Suivre la cinétique de réaction de catalyse enzymatique
Calculer l'activité enzymatique

1. Effet du pH du milieu réactionnel sur l'activité enzymatique
2. Mise en évidence de la variabilité de l'activité POD en fonction de l'état physiologique des tissus biologiques dont elle est extraite : notions de marqueur enzymatique.

Tableau 1 : Expérimentation 1 (Effet du pH sur l'activité enzymatique)

Valeur de pH	3	6	8
Activité correspond	?	?	?

Tableau 2 : Expérimentation 2 (Effet du des traitements sur l'activité enzymatique)

Traitement du Légume	Lot témoin	Traitement 1	Traitement 2
Activité correspond	?	?	?

Principe de dosage (POD = peroxydase)

Le dosage de l'activité enzymatique des peroxydases est basé sur la réaction suivante :



Prélèvement des échantillons

Echantillon : Navet (*Brassica rapa L.*). Découper finement et rapidement le légume et disposer 5 g dans 10 mL de tampon Phosphat citrat pH 6. Mettre le contenant dans un bac à glace. Afin de stabiliser l'échantillon à froid.

Broyage

Broyer très finement dans le tampon pH 6 à l'Ultra Turax jusqu'à l'obtention d'un broyat homogène.

Composition du tampon ci-dessous

- Acide citrique C₆H₈O₇ (0,5M)
- Sodium phosphate Na₂HPO₄ (0,5M)

Centrifugation

-Transférer 10 ml de chaque solution d'échantillon dans des tubes à essais

-Centrifuger 10 min à 5000 rpm.

Initiation de la catalyse et dosage

A l'aide de micropipettes, Prélever 20 µl du surnageant de chaque échantillon et les mettre dans une cuve contenant 980 µl de tampon réactionnel (cf. composition du tampon réactionnel ci-dessous).

Tampon réactionnel :

- 50 ml de tampon citrate – phosphate (pH 3, 6 et 8)
- 100 µl de gaïacol
- 50 µl de H₂O₂

Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre chaque 30 seconde à 470 nm, pendant 5 min.

Calcul de l'activité enzymatique :

Note : l'activité peroxydase est exprimée en nKat/g MF selon l'équation suivante :

$$nKat/g \text{ MF} = \frac{\Delta DO \times V_{réac} \times 4 \times V_{essai}}{\Delta t \times P_{essai} \times \lambda \times 1 \times MF}$$

DO/Δt: pente de la courbe de l'activité peroxydase

V réact : volume réactionnel (1ml soit 10^{-3} L dans la cuve spectrophotomètre)

V essai : volume d'essai (..... ml soit $2 \cdot 10^{-3}$ L de tampon pour le broyage)

t : Temps de dosage de l'activité peroxydasique exprimé en seconde.

P essai : prise d'essai ($20 \mu\text{L} = 20 \cdot 10^{-6}$ L d'échantillon)

λ : Coefficient d'extinction moléculaire ($26,6 \cdot 10^3$ L. mol⁻¹. cm⁻¹ pour le gaïacol)

1 : Longueur de la cuve (1 cm)

MF : poids des cotylédons (g de matière fraîche)

Nomenclatures internationales et recommandations sur les unités :

- Les volumes doivent être exprimés en « L » ;
- Le temps doit s'exprimer en « s » ;
- Le coefficient d'extinction molaire doit être exprimé en « L. nmol⁻¹. cm⁻¹ » autrement dit : au lieu de $26,6 \cdot 10^3$ L. mol⁻¹. cm⁻¹, c'est **26,6 .10⁻⁶ L. nmol⁻¹. cm⁻¹**. car selon la doc **1 nKat = 1 nmol/s**
Pour le facteur 10^3 dans la partie numérateur de la formule citée sur les cahiers labo, je le maintiens du fait que le spectrophotomètre me donne des **milli ABS/minutes**. Que je convertis en **Abs/S**.

En unité enzymatique :

$$1U = 16,67 \text{ nmol/s} = 16,67 \text{ nkat}$$

Ce qui est demandé :

- 1- Représenter graphiquement la cinétique enzymatique dans les différentes conditions de dosage : Absorbance = f(temps)
- 2- Calculer les paramètres cinétiques possibles à évaluer (V_0 , K_m , V_{max}). que déduisez-vous ?
- 3- Comparez les activités enzymatiques en fonction du pH. Que déduisez-vous ?
- 4- Comparez les activités enzymatiques en fonction des traitements subits par le tissu biologique. Que déduisez-vous ?

Références et ressources documentaires

Ouvrages

SHIJIE LIU Bioprocess engineering- Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Réactor desingn, 1st Edition, Elsevier, 2013

Julio Polaina and Andrew P. MacCabe Industrial Enzymes Structure, Function and Applications. Springer, 2007.

Robert J. Whitehurst And Maarten van Oort : Enzymes in Food Technology. 2nd edition willey Blackwell, 2010.

Serge Weinman : TOUTE LA BIOCHIMIE, Dunob, 2004

Thèses

KATI D. E. : Mécanismes de défense chez les végétaux et notion d'élicitation : cas de *Cucumis melo* et d'un stimulateur des défenses naturelles « le FEN560 ». Université de Montpellier, 2010.

Extraction de lipides en voies aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration – application à la valorisation de co-produits de poissons (*Sardina pilchardus*)

Articles

Techniques de l'ingénieur :

Jean-Pierre RIBA : Réacteurs enzymatiques et fermenteurs (F 3 - 600).

Guy LINDEN : Transformation des produits alimentaires par les enzymes (F 3-500).

Broussolle C. et Brulé G : Les biotechnologies dans l'industrie agroalimentaire : champ d'application et impact économique, Économie rurale. N°192193, 1989

Ressources en ligne

http://www.umc.edu.dz/vf/cours/cours_genie_genetique/chap1.pdf (consulté en janvier 2012)

<http://biochimej.univ-angers.fr/> (consulté en octobre 2013)

Introduction au génie enzymatique – document en ligne INRA- France.