
Université Mohamed KHIDER Biskra
Faculté des Sciences Exacte et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique

Dr. Deghima. A

Année Universitaire 2020/2021

Chapitre II : Production des enzymes

Sommaire

1. Introduction	1
2. Isolation et Purification	1
2.1. Préparation des matières premières biologiques	3
2.1.1. Organes animaux	3
2.1.2. Matériel végétal	3
2.1.3. Les microorganismes	3
2.1.3.1. Avantages économiques	4
2.1.3.2. Avantages techniques	5
2.2. Rupture cellulaire	6
2.2.1. Rupture cellulaire par des méthodes mécaniques	6
2.2.2. Rupture cellulaire par des méthodes non mécaniques	8
2.3. Séparation de la matière solide	9
2.3.1. Filtration	9
2.3.2. Centrifugation	12
2.3.3. Floculation	15
2.3.4. Extraction liquide-liquide	17
2.4. Concentration	18
2.4.1. Méthodes thermiques	19
2.4.2. Précipitation	19
2.4.3. Ultrafiltration	21
2.3.5. Dialyse	22
2.5. Purification	23
2.5.1. La cristallisation	23
2.5.2. Électrophorèse	24
2.5.3. Chromatographie	25
2.6. Formulation du produit	29
2.6.1. La stabilité	30
2.6.2. Emballage	30
2.7. Traitement des déchets	31
3. Contrôle de l'activité enzymatique	31
3.1. Unités Enzymatiques	32
3.2. Quantification des protéines	33

3.2.1.	Absorption ultraviolette	33
3.2.2.	Méthode de Biuret	33
3.2.3.	Méthode BCA	33
3.2.4.	Méthode de Lowry	34
3.2.5.	Liaison protéine-colorant	34
3.2.6.	Analyse de Kjeldahl	34

Chapitre II : Production des enzymes

1. Introduction

La technologie enzymatique est principalement engagée dans la production, isolement, purification et utilisation d'enzymes soit sous forme soluble soit forme immobilisée, au profit de l'humanité. Avec le progrès dans la technologie de l'ADN recombinant, l'ingénierie enzymatique produit un groupe d'enzymes plus efficace et diversifié avec applications en microbiologie, biochimie, diagnostic, thérapeutique, biocatalyse ... etc. L'objectif global de cette la technologie émergente consiste à produire des produits durables uniques à fonction spécifique pour répondre aux besoins d'une population croissante.

2. Isolation et Purification

Les matières premières pour l'isolation des enzymes sont des organes animaux, du matériel végétal et des micro-organismes. Le tableau 1 montre la contribution des différents organismes à la production des enzymes commerciale.

Tableau 1 : Contribution relative des différents organismes à la production des enzymes commerciales.

Organism	Relative contribution
Fungi	60%
Bacteria	24%
Yeast	4%
Streptomyces	2%
Higher animals	6%
Higher plants	4%

Les enzymes sont universellement présentes dans les organismes vivants ; chaque cellule synthétise un grand nombre d'enzymes différentes pour maintenir ses réactions métaboliques. Le choix des procédures de purification enzymatique dépend de leur emplacement. Isolement des enzymes intracellulaires impliquent souvent la séparation de mélanges biologiques complexes. Alors que, les enzymes extracellulaires sont généralement libérées dans le milieu avec seulement quelques autres composants. Les enzymes sont des protéines très complexes et leur degré élevé de la spécificité en tant que catalyseurs ne se manifeste qu'à l'état natif. La conformation native est atteinte dans des conditions spécifiques de pH, de température et de force ionique. Par conséquent, seulement des méthodes douces et spécifiques peuvent être utilisées pour l'isolement enzymatique. La figure 1 montre la séquence d'étapes impliquées dans la récupération des enzymes. Le degré de pureté des enzymes commerciales va des enzymes brutes à des formes très purifiées et dépend de l'application.

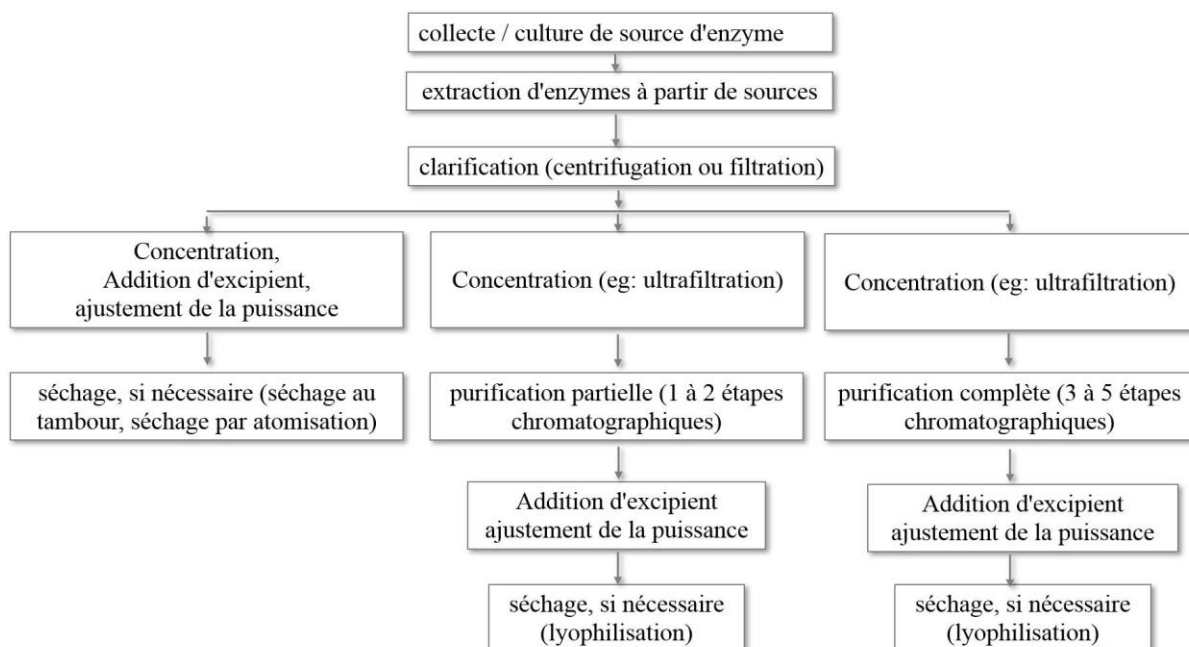


Figure 1 : Procédure générale de production des enzymes industrielles (à gauche), analytique (Centre), et thérapeutique (à droite)

2.1. Préparation des matières premières biologiques**2.1.1. Organes animaux**

Les organes animaux doivent être transportés et stockés à basse température pour conserver l'activité enzymatique. Les organes doivent être débarrassés de la graisse et du tissu conjonctif avant de les geler. Les organes congelés peuvent être hachés avec des machines généralement utilisées dans l'industrie de la viande, et les enzymes peuvent être extraites avec une solution tampon. Outre le broyage mécanique, la digestion enzymatique peut également être utilisée. La graisse attachée aux organes interfère avec les étapes de purification ultérieures et peut être éliminée avec des solvants. Cependant, l'activité enzymatique pourrait être influencée négativement par cette procédure.

2.1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal peut être broyé avec différents concasseurs ou broyeurs, et les enzymes souhaitées peuvent être extraites avec des solutions tampons. Les cellules peuvent également être lysées par un traitement antérieur avec des enzymes lytiques.

2.1.3. Les microorganismes

Les microorganismes sont une importante source d'enzymes. Un gène peut être transféré dans un microorganisme pour que cet organisme produise une protéine qu'il ne produit pas naturellement. Alternativement, la modification du génome d'un microorganisme peut modifier les propriétés des protéines afin qu'elles puissent être isolées et purifiées plus facilement. De telles modifications pourraient, par exemple, provoquer la libération d'enzymes intracellulaires dans le milieu externe ; modifier la charge nette et, par conséquent, les propriétés chromatographiques des protéines ; ou conduire à la formation de protéines fusionnées.

La plupart des enzymes utilisées dans le commerce sont des enzymes extracellulaires, et la première étape de leur l'isolement est la séparation des cellules de la solution. Pour les enzymes intracellulaires, qui sont aujourd'hui isolées en quantités croissantes, la première étape consiste à broyer pour rompre les cellules.

2.1.3.1. Avantages économiques

La quantité d'enzyme produite et le temps de production favorise grandement l'utilisation de micro-organismes. Par exemple, lors de la production de la présure (une enzyme de coagulation du lait utilisée dans la fabrication du fromage), l'approche traditionnelle consiste à utiliser l'enzyme extraite de l'estomac d'un veau (une jeune vache se nourrissant encore du lait de sa mère). La quantité moyenne de présure extraite de l'estomac d'un veau est de 10 kg, et il faut plusieurs mois d'élevage intensif pour produire un veau. En comparaison, un fermenteur de 1000 litres de *Bacillus subtilis* recombinant peut produire 20 kg d'enzyme en 12 h. Ainsi, le produit microbien est clairement préférable d'un point de vue économique et est **exempt des problèmes éthiques qui entourent l'utilisation des animaux**. En effet, la plupart des fromages actuellement vendus dans les supermarchés sont fabriqués à partir de lait coagulé avec des enzymes microbiennes (convient donc aux végétariens).

Un autre avantage de l'utilisation d'enzymes microbiennes est leur facilité d'extraction. De nombreuses enzymes microbiennes utilisées dans les processus biotechnologiques sont sécrétées de manière extracellulaire, ce qui simplifie grandement leur extraction et leur purification. **Les enzymes intracellulaires microbiennes sont également souvent plus faciles à obtenir que les enzymes animales ou végétales équivalentes**, car elles nécessitent généralement moins d'étapes d'extraction et de purification.

Les sources animales et végétales doivent généralement être transportées vers l'installation d'extraction, **alors que lorsque des micro-organismes sont utilisés, la même installation peut généralement être utilisée pour la production et l'extraction.** De plus, les enzymes animales et végétales commercialement importantes sont souvent situées dans un seul organe ou tissu, **de sorte que le matériau restant est essentiellement un déchet dont l'élimination est nécessaire.**

Enfin, les enzymes d'origine végétale et animale présentent de grandes variations de rendement et peuvent n'être disponibles qu'à certaines périodes de l'année, alors qu'aucun de ces problèmes n'est associé aux enzymes microbiennes.

2.1.3.2. Avantages techniques

Les enzymes microbiennes ont souvent des propriétés qui les rendent plus aptes à une exploitation commerciale. Par rapport aux enzymes d'origine animale et végétale, **la stabilité des enzymes microbiennes est généralement élevée.** Par exemple, la stabilité à haute température des enzymes des microorganismes thermophiles est souvent utile lorsque le procédé doit fonctionner à des températures élevées (par exemple pendant le traitement de l'amidon).

Les micro-organismes sont également très sensibles à la modification génétique pour produire des enzymes nouvelles ou modifiées, **en utilisant des méthodes relativement simples telles que l'insertion de plasmides.** La manipulation génétique des animaux et des plantes est techniquement beaucoup plus difficile, coûte plus cher et fait toujours l'objet de préoccupations éthiques importantes, en particulier au Royaume-Uni.

2.2. Rupture cellulaire

2.2.1. Rupture cellulaire par des méthodes mécaniques

L'**homogénéisation à haute pression** est la méthode la plus courante de rupture cellulaire. La suspension cellulaire est pressée à travers une valve et heurte un anneau d'impact (par exemple, un homogénéisateur Manton-Gaulin) (Figure 2).

Les cellules sont rompues par les forces de cisaillement et la décompression simultanée. Selon le type de machine, sa capacité varie de 50 à 5000 L / h. Les parois cellulaires rigides des petites bactéries ne sont que partiellement rompues aux pressions jusqu'à 55 MPa (550 bars) atteintes par cette méthode.

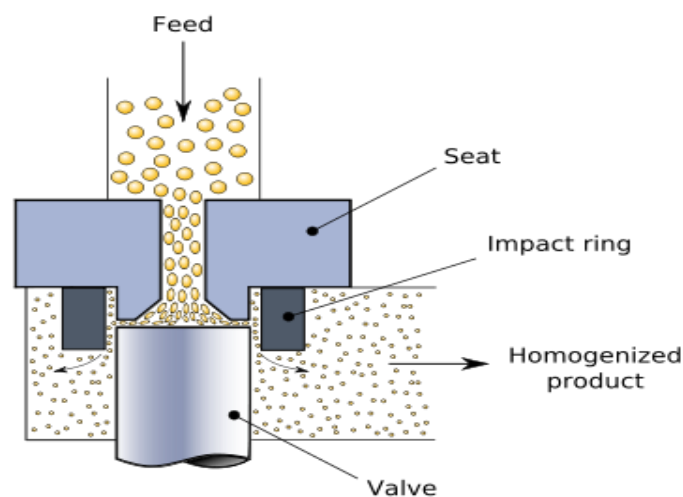


Figure 2 : Rupture mécanique cellulaire par homogénéisateur Manton-Gaulin

Cependant, des pressions plus élevées entraîneraient une exposition supplémentaire à la chaleur ($2,28^{\circ}\text{C}$ pour 10 MPa). Par conséquent, l'augmentation du rendement enzymatique résultant d'une rupture cellulaire améliorée pourrait être contrecarré par une inactivation partielle provoquée par le chauffage et des forces de cisaillement plus élevées. Par conséquent, **un refroidissement efficace doit être fourni.**

Le **broyage humide des cellules** dans un broyeur à billes à grande vitesse est une autre méthode efficace de rupture cellulaire. Des billes de verre d'un diamètre de 0,2 à 1 mm sont utilisées pour briser les cellules. Son contenant amovible est rempli de petites billes de verre sur lesquelles on verse la suspension de cellules. La suspension se répartit entre les billes. Il est important de remplir complètement le contenant et de ne pas y laisser d'air pour éviter de faire de la mousse et d'oxyder les protéines. Le tout est alors scellé et on lance la machine, qui fait furieusement tourbillonner les billes de verre dont l'action abrasive a tôt fait de réduire les cellules en charpie. Séparer les billes du lysat est très facile parce que les billes coulent au fond dès que l'agitation cesse. Compte tenu des paramètres optimaux tels que la vitesse d'agitation, le nombre et la taille des billes de verre, le débit, la concentration cellulaire et la température, une libération de protéines allant jusqu'à 90% peut être obtenue en un seul passage.

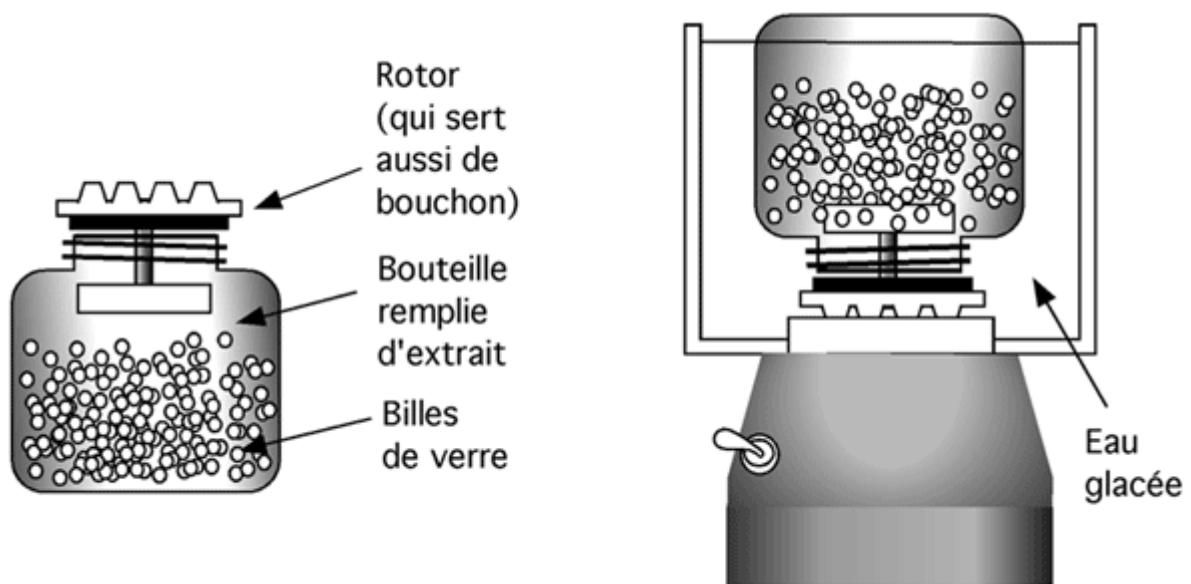


Figure 3 : Schéma représentant l'appareil utilisé dans l'extraction par billes de verre

2.2.2. Rupture cellulaire par des méthodes non mécaniques

Les cellules peuvent fréquemment être rupturées par une **lyse chimique, thermique ou enzymatique**. Le **séchage des micro-organismes** et la préparation de poudres d'acétone sont des procédures standard dans lesquelles la structure de la paroi cellulaire est modifiée pour permettre l'extraction ultérieure du contenu cellulaire. **Les ultrasons à des fréquences déterminées** sont généralement utilisés en laboratoire, Dans cette procédure, les cellules sont rupturées par cavitation. **Une température optimale doit être maintenue en refroidissant la suspension cellulaire car la chaleur est générée dans le processus**. Des problèmes supplémentaires peuvent résulter de la génération de radicaux libres. Des **méthodes basées sur des enzymes** ou une **autolyse** peuvent aussi être utilisées. Si la protéine est justement dans un compartiment cellulaire, on utilise généralement un détergent doux (Triton, Tween, etc., quelquefois déoxycholate) pour la libérer en dissolvant les membranes de ce compartiment. L'emploi de détergent doit souvent être fait de façon contrôlée car ils peuvent briser les lysosomes, ce qui libèrent des enzymes hydrolytiques (protéases, nucléases, etc) qui peuvent attaquer et détruire les enzymes ou autres molécules qu'on veut isoler. Des précautions particulières doivent être prises si on travaille avec des enzymes sensibles à la dégradation ou peu nombreuses. Certains tissus comme le pancréas et le foie sont reconnus pour contenir de grandes quantités de ces enzymes, ce qui pose tout un défi quand on travaille avec ces tissus. Une solution fréquente à ce problème est l'inclusion dans les solutions d'inhibiteurs de protéases qui sont soit physiologiques (inhibiteur de trypsine, antipaïne. leupeptine...) ou artificiels (E64, PMSF...). Pour maximiser leur action, on les emploie souvent en mélange ("cocktails") à large spectre d'action. Ensuite on utilise diverses techniques pour séparer l'enzyme recherchée de toutes les autres présentes.

2.3. Séparation de la matière solide

Après la rupture cellulaire, l'étape suivante est la séparation des enzymes extracellulaires ou intracellulaires des cellules ou des fragments cellulaires, respectivement. Cette opération est assez difficile en raison de la petite taille des cellules bactériennes et de la légère différence entre la densité des cellules et celle du milieu de fermentation. Les grandes cellules, par exemple les cellules de levure, peuvent être éliminées par **décantation**.

2.3.1. Filtration

Le taux de filtration est fonction de la surface du filtre, de la pression, de la viscosité et de la résistance offertes par le filtre et le milieu de filtration. Pour un liquide propre, tous ces termes sont constants ce qui se traduit par un débit constant pour une perte de charge constante. Le volume cumulé de filtrat augmente linéairement avec le temps. Lors de la filtration des suspensions, l'épaisseur croissante du filtre de filtration formé et la résistance concomitante diminuent progressivement le débit. Des difficultés supplémentaires peuvent survenir en raison de la compressibilité du matériel biologique. Dans ce cas, la résistance offerte par le filtre et donc la vitesse de filtration dépendent de la pression appliquée. **Si la pression appliquée dépasse une certaine limite, le filtre peut s'effondrer et un blocage total du filtre peut en résulter.**

a) Filtres à pression

Un filtre-pressé (filtre à plaques, filtre à chambre) est utilisé pour filtrer les petits volumes ou pour éliminer les précipités formés lors de la purification (**Figure 4**). La capacité de retenir la matière solide est limitée et la méthode est plutôt exigeante en travail. Cependant, ces filtres conviennent parfaitement à la filtration fine de solutions enzymatiques.

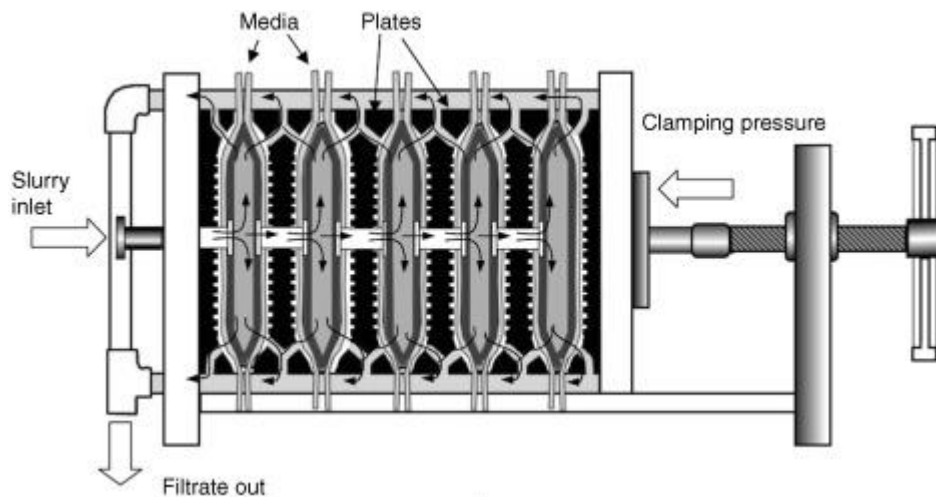


Figure 4: Filtre à plaques

b) Filtres à vide

La filtration sous vide est généralement la méthode de choix car les matériaux biologiques sont facilement compressibles. Un filtre à vide rotatif (**Figure 5**) est utilisé dans la filtration continue de grands volumes. La suspension est généralement mélangée avec un adjuvant de filtration, par exemple du kieselguhr (une roche sédimentaire siliceuse), avant d'être appliquée au filtre. Le tambour de filtre est recouvert d'une mince couche d'adjuvant de filtration (pré-couche). Le tambour est divisé en différentes sections afin que le filtre puisse également être lavé et séché. La couche externe est ensuite éliminée en utilisant une série de fils sans fin ou par une décharge par raclage (couteau). L'enlèvement d'une mince couche de pré-couche expose à chaque fois une nouvelle zone de filtrage. **Ce système est utile pour éviter une augmentation de la résistance avec l'accumulation des débris sur le filtre au cours de la filtration.**

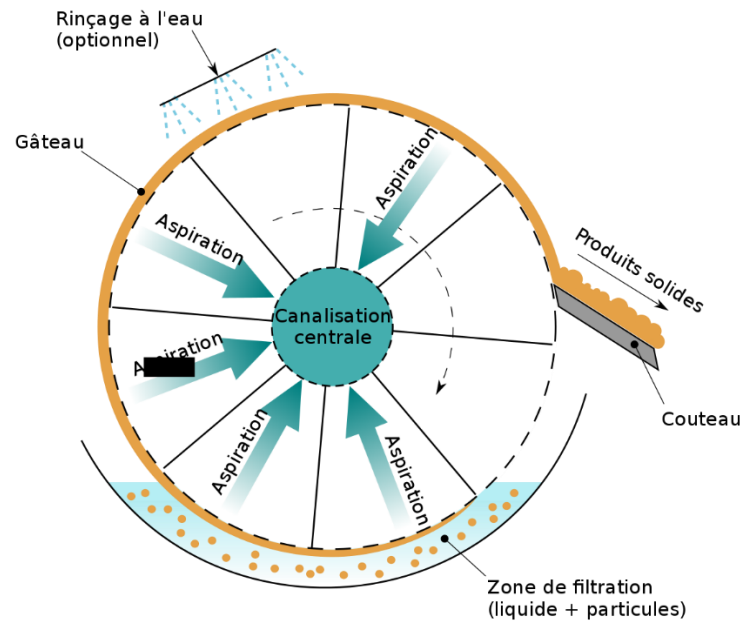


Figure 5 : Représentation schématique d'un Filtres à vide

c) Filtration à flux croisé

Dans les méthodes conventionnelles, la suspension s'écoule perpendiculairement au matériel filtrant (**Figure 6** à gauche). En filtration tangentielle, le flux entrant s'écoule parallèlement à la zone du filtre (**Figure 6** à droite), évitant ainsi l'accumulation des débris de filtration et la résistance accrue à la filtration. Pour maintenir un débit de filtration suffisamment élevé, cette méthode doit consommer une quantité d'énergie relativement importante, sous la forme des débits élevés sur les membranes. Avec les membranes maintenant disponibles, des taux de perméat de 30–50 L/m²/h peuvent être atteints.

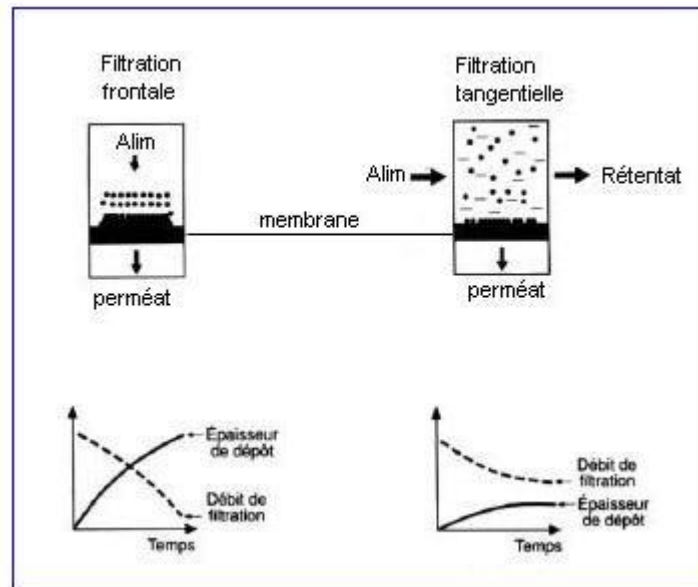


Figure 6: Différence entre filtration frontale et filtration tangentielle

2.3.2. Centrifugation

La vitesse de sédimentation d'une cellule bactérienne d'un diamètre de 0,5 μm est inférieure à 1 mm/h. Une séparation économique ne peut être obtenue que par sédimentation dans un champ centrifuge. La gamme d'applications des centrifugeuses dépend de la taille des particules et de la teneur en solides (tableau 2).

Tableau 2 : Différents type de centrifuge utilisés lors de l'extraction des enzymes

Type of centrifuge	Solids content, %	Particle size, μm
Multichamber separator	0-5	0.5-500
Desludging disk separator	3-10	0.5-500
Nozzle separator	5-25	0.5-500
Decanter	5-40	5-50 000
Sieve centrifuge	5-60	5-10 000
Pusher centrifuge	20-75	100-50 000

a) Décanteurs (centrifugeuses à spirales)

Appelée aussi tamiseur centrifuge, elles fonctionnent avec de faibles forces centrifuges et sont utilisés dans la séparation de grosses cellules ou la précipitation des protéines. La matière solide est déchargée en continu par un transporteur à vis se déplaçant à une vitesse de rotation différentielle.

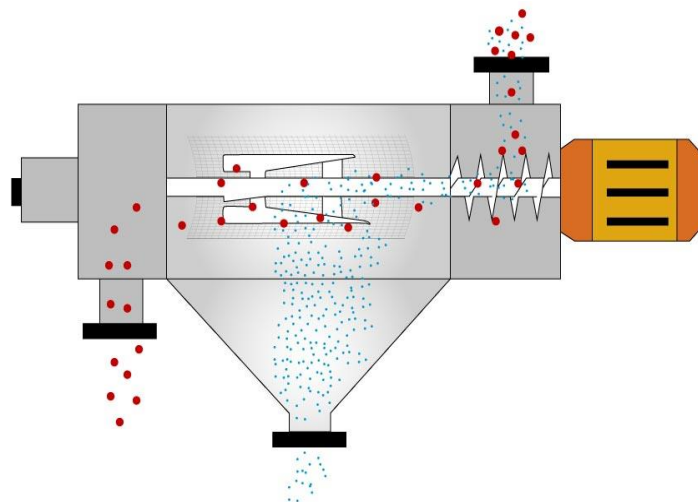


Figure 7 : Représentation schématique d'un Décanteurs (centrifugeuses à spirales)

b) Centrifugeuses à bol tubulaire

Elles sont conçues pour des forces centrifuges très élevées et peuvent être utilisées pour sédimenter de très petites particules. Cependant, ces centrifugeuses ne peuvent pas être utilisées un processus continu. De plus, les matières solides doivent être éliminées à la main périodiquement. Elles sont particulièrement adaptées à la séparation de deux phases liquides, ou à la clarification d'une phase liquide peu chargée en particules. Elles trouvent des applications dans le raffinage de l'huile végétale (séparation des savons), et dans la clarification des liquides (industrie pharmaceutique, chimique et alimentaire). Le flux de fluide entrant et sortant de la centrifugeuse est continu. La phase la plus lourde se décharge par la sortie gauche et le fluide plus léger se décharge par la sortie droite.

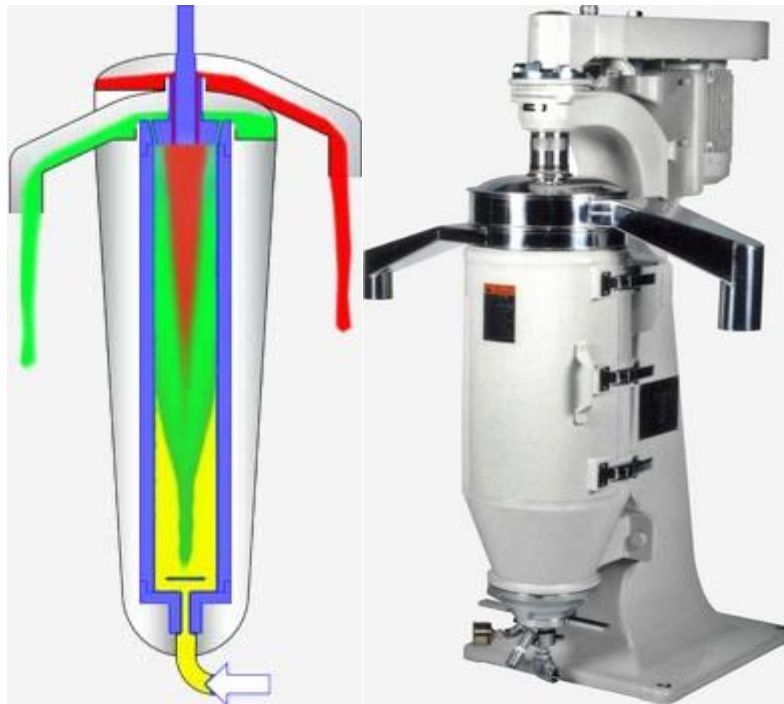


Figure 8 : Représentation schématique d'une centrifugeuse à bol tubulaire

c) Séparateurs (centrifugeuses à disques)

Elles sont aussi appelées décanteur à assiettes et peuvent être utilisés dans l'élimination continue des solides d'une suspension. Les solides sont évacués par un port de décharge à commande hydraulique (décharge intermittente) ou par un agencement de buses (décharge continue). Les bactéries et les fragments cellulaires peuvent être séparés par une combinaison de forces, jusqu'à 15 000 gravimétries. Des centrifugeuses à empilement de disques qui peuvent être stérilisées à la vapeur sont utilisées pour l'ADN recombinant techniques en système fermé.

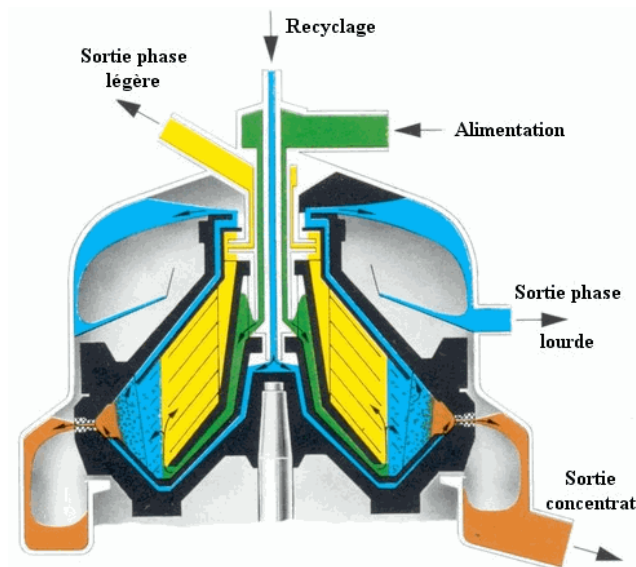


Figure 9 : Représentation schématique d'un séparateur (décanteur à assiettes)

2.3.3. Flocculation

La séparation des cellules bactériennes ou des débris cellulaires par filtration ou centrifugation peuvent entraîner des difficultés considérables en raison de leur petite taille et de leurs propriétés physiques. La nature compressible des cellules est le principal facteur limitant pour l'utilisation de la filtration comme étape de séparation pour les supprimer. La faible perméabilité d'un culot cellulaire typique se traduit par un débit de filtration souvent trop lent pour être pratique. **En élimination cellulaire par centrifugation, la petite taille et la faible différence de densité entre les cellules ou les débris cellulaires entraîne une faible vitesse de sédimentation.** La flocculation des suspensions cellulaires a été rapportés pour faciliter la séparation des cellules à la fois par filtration et centrifugation.

La flocculation est le processus par lequel des particules déstabilisées sont amenées à venir ensemble, établir un contact et former ensuite des agrégats plus gros.

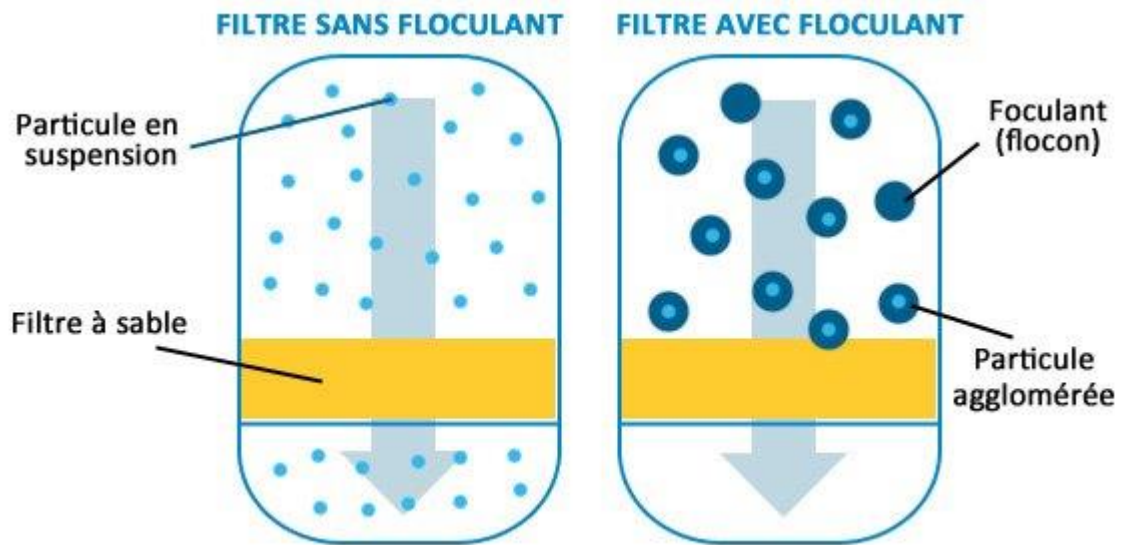


Figure 10 : Filtration avec et sans floculation

Les agents floculants sont des additifs capables d'augmenter le degré de floculation d'une suspension. Ils peuvent être organique ou inorganique, et naturel ou synthétique. Les floculants organiques synthétiques sont de loin les agents les plus couramment utilisés pour la floculation cellulaire dans les procédés industriels. Il s'agit généralement de substances polymères chargées, solubles dans l'eau, d'un poids moléculaire moyen allant d'environ 103 à supérieur à 5106 Kda et sont généralement appelés polyélectrolytes et peuvent être chargé positivement ou négativement et sont appelés polyélectrolytes cationiques (polyéthylèneimine et polyvinyleamine) et anioniques (poly (acide acrylique), pectines et alginates), respectivement. Les polyélectrolytes contenant à la fois des charges positives et négatives sont appelés polyampholytes (polybétaines). La floculation des débris cellulaires par les polyélectrolytes est un processus en deux étapes. La première étape est la neutralisation de la charge de surface sur les cellules en suspension ou les débris cellulaires. La seconde étape implique la liaison de ces particules de gros agrégats. Dans certains cas, la floculation peut également fournir une purification

en éliminant sélectivement les protéines indésirables, les acides nucléiques, les lipides et l'endotoxine du bouillon cellulaire.

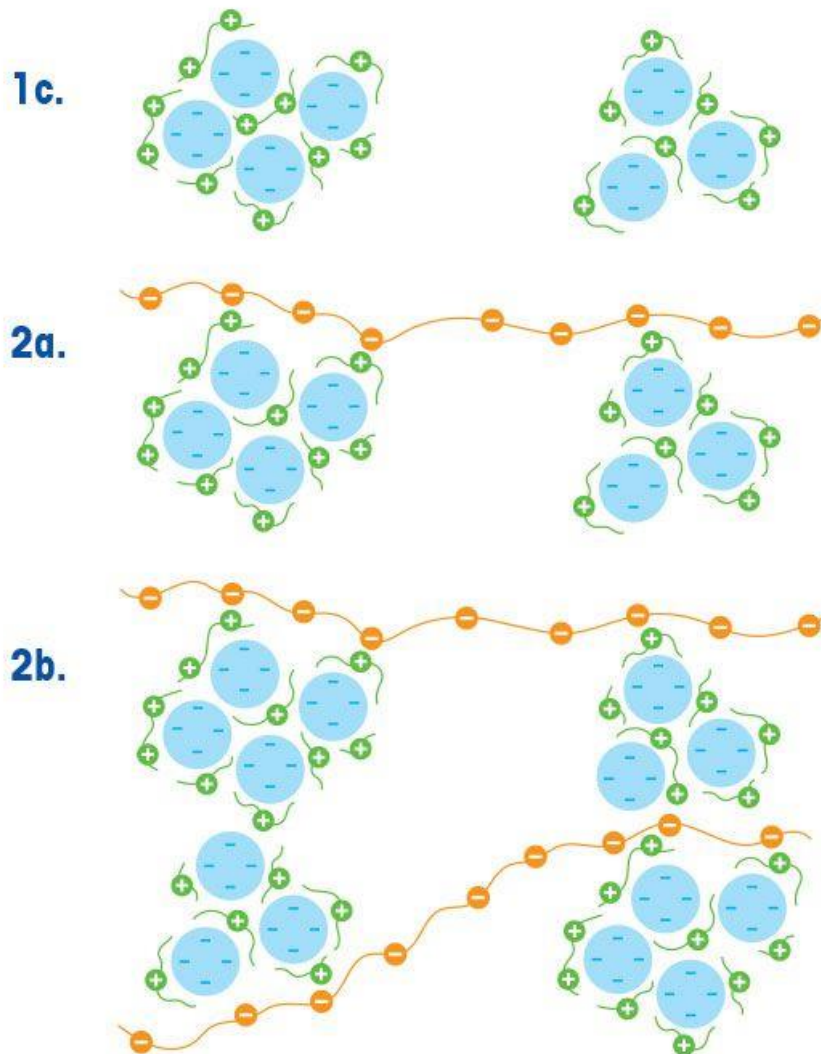


Figure 11: Flocculation par un mélange de polyélectrolyte cationique et anionique

2.3.4. Extraction liquide-liquide

Les extractions liquide-liquide (LLE) constituent une alternative de purification intéressante. L'extraction liquide-liquide est le transfert de certains composants d'une phase à une autre lorsque des phases liquides non miscibles ou partiellement solubles sont mises en contact les unes avec les autres. Ce procédé est largement utilisé dans l'industrie chimique en raison de sa simplicité, de ses faibles coûts et de sa facilité de

mise à l'échelle. C'est une méthode utilisée pour isoler les enzymes intracellulaires dans un système aqueux à deux phases. Cette méthode est basée sur le mélange de différents polymères, par exemple le dextrane (phase inférieure) et le poly (éthylène glycol) (phase supérieure), ou un polymère et un sel (phosphate potassium/phosphate sodium) en solution aqueuse, à une certaine concentration les deux polymères vont constituer deux phases aqueuses non miscibles **séparant ainsi les molécules selon leurs coefficients de partage**.

On peut chimiquement modifier l'un des polymères en attachant un ligand pour lequel des récepteurs existent sur le matériau d'intérêt. Dans le dernier cas, la procédure qui en résulte est appelée **partitionnement par affinité**. Le partage d'affinité (AP) est basé sur l'interaction préférentielle / biospécifique entre la molécule et les ligands d'affinité. L'interaction aboutit à un complexe de ligand d'affinité biomolécule qui se répartit sélectivement en l'une des phases laissant les substances ou protéines contaminantes dans l'autre phase. On peut atteindre une pureté de 90% par cette méthode.

2.4. Concentration

La concentration enzymatique dans le matériau de départ est souvent très faible. Le volume de matériau à traiter est généralement très important et des quantités importantes de déchets doivent être éliminées. Ainsi, si l'épuration économique doit être réalisée, le volume de départ de la matière doit être diminuée par concentration. Seules des procédures de concentration modérée qui n'inactivent pas les enzymes peuvent être utilisées. Celles-ci comprennent les méthodes thermiques, la précipitation et, de plus en plus, la filtration sur membrane.

2.4.1. Méthodes thermiques

Seul un bref traitement thermique peut être utilisé pour la concentration car les enzymes sont thermolabiles. Des évaporateurs avec des composants rotatifs qui produisent un film liquide mince (évaporateur à couche mince, évaporateur centrifuge à couche mince) ou des évaporateurs à circulation (évaporateur à tube long) peuvent être utilisés.

2.4.2. Précipitation

Les enzymes sont des protéines très complexes possédant à la fois des groupes ionisables et hydrophobes qui interagissent avec le solvant. En effet, les protéines peuvent être amenées à s'agglomérer et, finalement, à précipiter en modifiant leur environnement. La précipitation est en fait une procédure simple pour concentrer les enzymes.

a) Précipitations avec des sels

Des concentrations élevées de sel agissent sur les molécules d'eau entourant la protéine et modifient les forces électrostatiques responsables de la solubilité. Le sulfate d'ammonium est couramment utilisé pour la précipitation ; par conséquent, c'est un agent efficace pour concentrer les enzymes. Les enzymes peuvent également être fractionnées, dans une mesure limitée, en utilisant différentes concentrations de sulfate d'ammonium. **La corrosion de l'acier inoxydable et du ciment par le sulfate d'ammonium est un inconvénient, qui pose des problèmes supplémentaires dans le traitement.** Le sulfate de sodium est plus efficace de ce point de vue, mais il est moins soluble et doit être utilisé à des températures de 35–40 °C. La concentration optimale de sel nécessaire à la précipitation doit être déterminée expérimentalement et varie généralement de 20 à 80% de saturation.

b) Précipitation avec des solvants organiques

Les solvants organiques influencent la solubilité des enzymes en réduisant la constante diélectrique du milieu. L'effet de solvation des molécules d'eau entourant l'enzyme est modifié ; l'interaction des molécules de protéines est augmentée ; et par conséquent, une agglomération et une précipitation se produisent. Les solvants couramment utilisés sont l'éthanol et l'acétone. Des résultats satisfaisants ne sont obtenus que si la concentration de solvant et la température sont soigneusement contrôlées car les enzymes peuvent être facilement inactivées par des solvants organiques.

c) Précipitations avec des polymères

Les polymères généralement utilisés sont les polyéthylèneimines et poly (éthylène glycols) de différentes masses moléculaires. Le mécanisme de cette précipitation est similaire à celui des solvants organiques et résulte d'une modification de l'effet de solvation des molécules d'eau entourant l'enzyme. La plupart des enzymes précipitent au polymère à des concentrations allant de 15 à 20%.

d) Précipitation au point isoélectrique

Les protéines sont des ampholytes et portent à la fois des groupes acides et basiques. La solubilité des protéines est fortement influencée par le pH et est minimale au point isoélectrique auquel la charge nette est nulle. Parce que la plupart des protéines ont des points isoélectriques dans la gamme acide, ce processus est également appelé précipitation acide. Les précipitations sont généralement effectuées à petite échelle. Des problèmes peuvent survenir lors de l'extension de ce processus. Le temps de mélange, le temps de séjour dans le réacteur (qui affecte la formation d'agglomérats et l'activité enzymatique) et les forces de cisaillement générées par l'agitation (qui affecte les agrégats formés) sont des paramètres critiques. Lorsque le volume en cours de traitement

est important, le temps de mélange est suffisamment long et, en particulier avec des solvants organiques, une dénaturation des protéines peut se produire. Des expériences ont été menées pour surmonter les difficultés de ce type en utilisant un processus continu.

2.4.3. Ultrafiltration

Une membrane semi-perméable permet la séparation des molécules de solvant des molécules d'enzyme plus grosses car seules les molécules plus petites peuvent pénétrer dans la membrane lorsque la pression osmotique est dépassée. C'est le principe de tous les procédés de séparation membranaire, y compris l'ultrafiltration. L'ultrafiltration et la filtration à flux transversal sont basées uniquement sur l'effet tamisage. Dans le traitement des enzymes, la filtration à flux transversal est utilisée pour récolter les cellules, tandis que l'ultrafiltration est utilisée pour la concentration et le dessalage. Les membranes disponibles pour l'ultrafiltration peuvent exclure des molécules allant de 1000 to 300 000 dalton.

La membrane semi-perméable exclut les molécules plus grosses, qui ont tendance à s'accumuler près de la surface de la membrane. En raison des différents taux de diffusion de molécules de différentes tailles, la capacité de séparation de la membrane change. Ainsi, la membrane retient les petites molécules plus fortement que ce que l'on pourrait attendre de sa porosité. Cet effet limite l'applicabilité de la séparation membranaire. La formation de couches de gel sur la membrane est réduite en maintenant un écoulement turbulent ou un écoulement laminaire à haut débit. La perte de perméabilité est également causée par un encrassement de la membrane ou un dépôt sur la membrane. En particulier, des agents anti-mousses issus de solutions de fermentation se déposent sur la membrane et rendent la concentration des enzymes plus difficile.

2.3.5. Dialyse

La solution contenant l'enzyme d'intérêt doit être traitée avant que les étapes de purification ne soient possibles. Les enzymes peuvent être séparées des petites molécules en profitant de la plus grande taille des enzymes par rapport aux autres molécules. La dialyse à travers une membrane semi-perméable (SEM), telle qu'une membrane de cellulose avec des pores bien définis est souvent réalisée pour séparer une protéine de choix des autres contaminants. La solution de protéines partiellement purifiée est placée dans un sac de dialyse et le sac est suspendu dans un volume beaucoup plus grand de tampon de force ionique appropriée. Les molécules de protéines ayant des dimensions nettement supérieures au diamètre des pores du sac de dialyse sont retenues, alors que les plus petites molécules et les ions traversent les pores de ces membranes et émergent dans le dialysat à l'extérieur du sac. Cette technique est utile pour enlever un sel ou d'autres petites molécules, mais elle ne fait pas la distinction entre les différentes protéines efficacement. Des sacs de dialyse de poids moléculaire défini sont souvent utilisés pour purifier des protéines de taille définie. Par exemple, un sac de dialyse ayant un poids moléculaire de 12 000 peut être utilisé en toute sécurité pour purifier des protéines ayant un poids de ~ 20 000 mais ne peut pas convenir aux protéines avec un poids moléculaire de 10 000. Souvent, entre les différentes étapes de purification, il faut éliminer les sels ou produits utilisés dans ces méthodes, on utilise alors une dialyse ou une ultrafiltration.

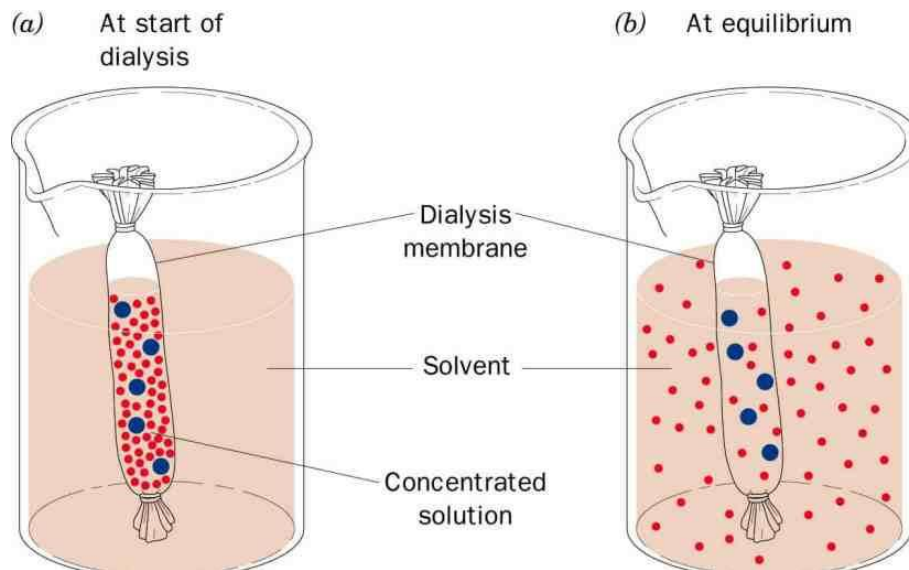


Figure 12: Procédure de la dialyse

2.5. Purification

Pour de nombreuses applications industrielles, des préparations enzymatiques partiellement purifiées suffiront ; cependant, les enzymes à des fins diagnostique et à usage médical doivent être hautement purifiées. Les procédures spéciales utilisées pour la purification enzymatique sont la cristallisation, l'électrophorèse et la chromatographie.

2.5.1. La cristallisation

La cristallisation est une technique de purification qui peut être utilisée pour concentrer et dessaler les protéines de la même manière que la précipitation. La cristallisation des protéines est une technologie de séparation puissante car elle concentre, purifie et stabilise simultanément le produit. La cristallisation est une précipitation contrôlée à partir d'une solution aqueuse avec quatre variables principales qui contrôlent la morphologie et la récupération des cristaux : la concentration en protéines, la concentration en précipitant (Sels, tampons, Poly (Ethylène) glycol, et des solvants), le pH et la température. Elle est similaire à la précipitation en ce que des particules solides sont formées à partir d'une solution. Cependant, les précipités ont une morphologie mal

définie et sont caractérisés par une petite taille des particules, tandis que les cristaux sont très ordonnés avec des tailles de particules généralement plus grandes pour la cristallisation (**Figure 13**). Plusieurs protéines ont été cristallisées à des concentrations entre 0.5 et 50 mg/ml. Les grandes molécules nécessitent moins de concentrations alors que pour les plus petites molécules de plus grandes concentrations sont demandées pour la cristallisation.

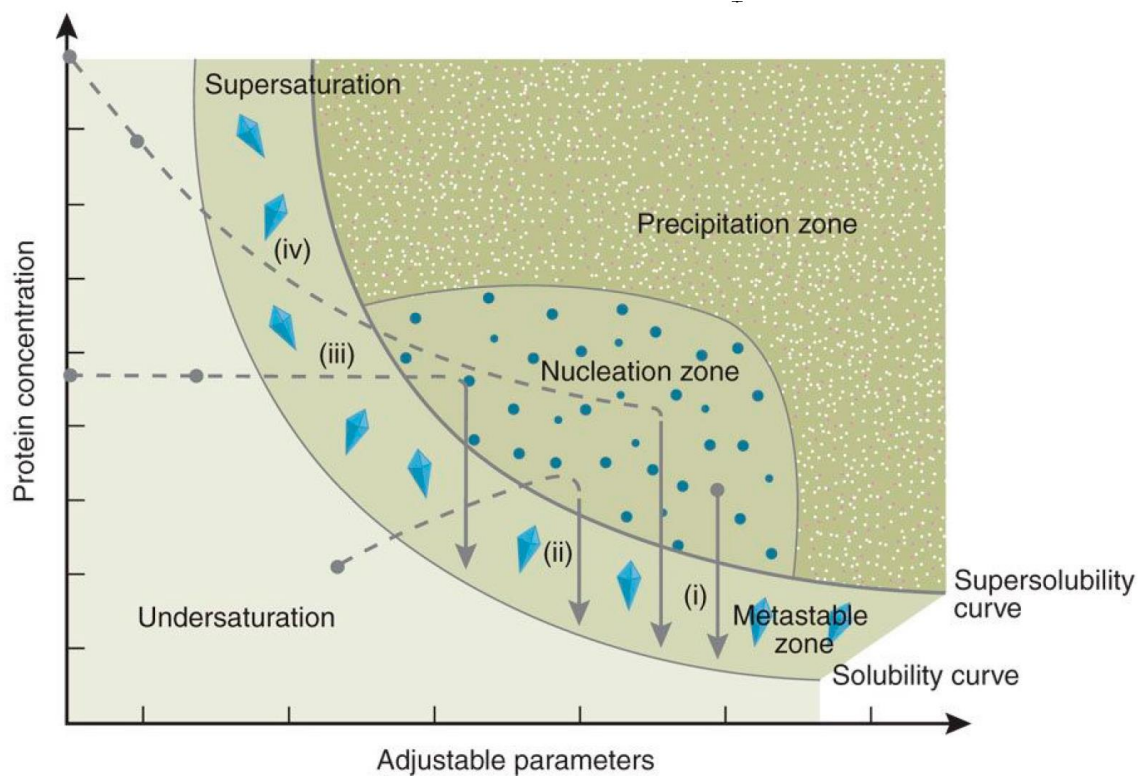


Figure 13 : Domaine de cristallisation des enzymes

2.5.2. Électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de séparation utilisant la migration des molécules chargées dans un champ électrique. Les protéines possédant de nombreux groupements ionisables et sont des molécules amphotères dont la charge dépend du pH du milieu ainsi que de leur propre pHi.

Si $pH < pHi$ la charge nette est positive

Si $pH = pHi$ la charge nette est neutre

Si $pH > pHi$ la charge nette est négative

Cette technique est utilisée pour purifier les enzymes au niveau des laboratoires. Selon les conditions, les procédures suivantes peuvent être utilisées : Electrophorèse de zone, La focalisation isoélectrique (IEF), SDS-PAGE. La chaleur générée par l'électrophorèse et les interférences causées par la convection sont des problèmes associés à l'application de cette méthode à l'échelle industrielle.

2.5.3. Chromatographie

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique, qui sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

La classification des chromatographies peut se faire en fonction des **mécanismes de séparation**. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : **la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers**. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

a) Chromatographie par échange d'ions

Cette technique est souvent efficace au cours des premières étapes du processus de purification. La solution protéique est ajoutée à une colonne contenant un polymère insoluble (par exemple de la cellulose) qui a été modifié afin que ses caractéristiques ioniques déterminent le type d'ion mobile (c'est-à-dire cation ou anion) qu'il attire. Les protéines dont la charge nette est opposée à celle du matériau échangeur d'ions s'y lieront, tandis que toutes les autres protéines passeront à travers la colonne. Un changement ultérieur de pH ou l'introduction d'une solution saline modifiera les forces électrostatiques, permettant à la protéine retenue d'être à nouveau récupérée (Elution).

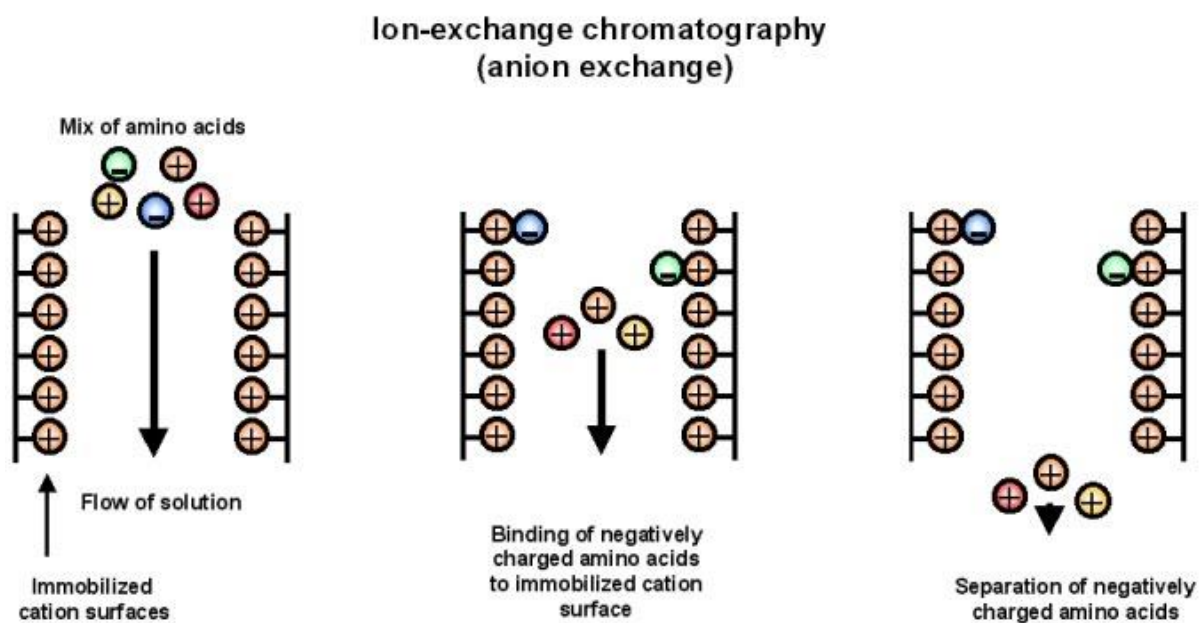


Figure 14: Chromatographie échangeuse d'ions

b) Filtration sur gel

Cette méthode peut être utilisée dans les étapes ultérieures d'un protocole de purification pour séparer les molécules sur la base de la taille moléculaire. Les colonnes contenant un lit de particules de gel réticulées tels que Sephadex sont utilisés. Ces particules de gel excluent les grosses molécules de protéines tout en permettant l'entrée de molécules plus

petites. La séparation se produit parce que les molécules de protéines plus grosses suivent un chemin le long de la colonne entre les particules de Sephadex (occupant une plus petite fraction du volume de la colonne). Les molécules plus grosses ont donc un temps d'élution plus court et sont d'abord récupérées à partir de la colonne de filtration sur gel.

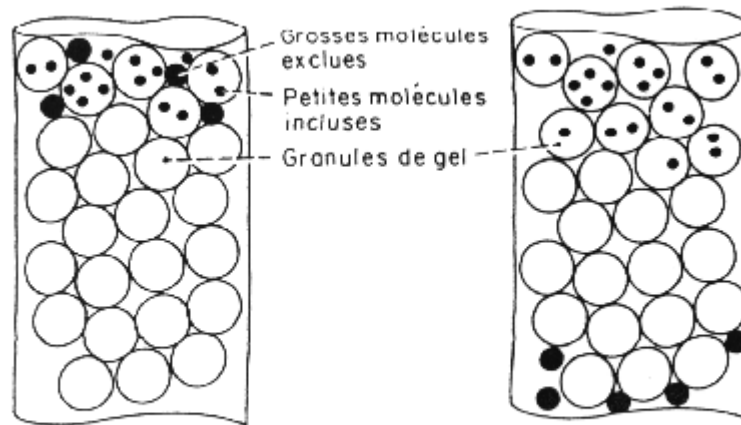


Schéma du tamisage moléculaire.

Figure 15: Chromatographie d'exclusion stérique

c) Chromatographie d'affinité

Ces procédures peuvent souvent permettre aux protocoles de purification d'être considérablement simplifié. Typiquement, en ce qui concerne la purification enzymatique, une colonne serait remplie d'une phase stationnaire particulière à laquelle une molécule de ligand telle qu'un analogue de substrat, un inhibiteur ou un cofacteur de l'enzyme d'intérêt serait fermement liée. Comme le mélange d'échantillon est passé à travers la colonne, l'enzyme interagit avec et se lie au ligand immobilisé, étant retenu dans la colonne lorsque tous les autres composants du mélange passent à travers la colonne. Par la suite, une solution du ligand est introduite dans la colonne pour libérer (éluer) et ainsi récupérer l'enzyme liée de la colonne sous une forme hautement purifiée.

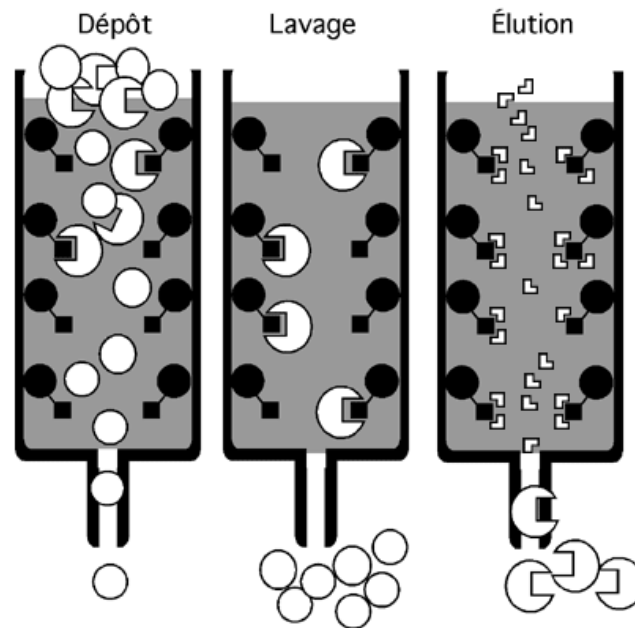


Figure 16: Chromatographie d'affinité

Il existe de nombreuses procédures alternatives de chromatographie d'affinité capables de séparer les enzymes en se liant à des zones de la molécule loin de leur site actif. Les progrès de la biologie moléculaire nous permettent de purifier des protéines recombinantes, y compris des enzymes, grâce à un **marquage d'affinité**. Dans une approche typique, le gène de l'enzyme d'intérêt serait modifié pour coder pour une autre séquence d'acides aminés courte au N- ou C- terminal.

Par exemple, une procédure de marquage à la polyhistidine est disponible pour donner des produits protéiques avec six résidus histidine consécutifs ou plus à leur extrémité N- ou C- terminale. Lorsqu'un mélange contenant la protéine d'intérêt marquée est ensuite passé à travers une colonne contenant une résine d'agarose d'acide **nickel-nitrilo-triacétique** (Ni-NTA), les résidus d'histidine sur la protéine recombinante se lient aux ions nickel attachés à la résine de support, en retenant la protéine, tandis que d'autres composants protéiques et non protéiques traversent la colonne. L'éluion de la protéine

liée peut alors être accomplie en ajoutant de l'imidazole à la colonne, ou en réduisant le pH à 5-6 pour déplacer la protéine marquée His des ions nickel.

De telles techniques sont donc capables d'isoler rapidement et très efficacement une enzyme à partir d'un mélange complexe en une seule étape, et fournissent typiquement des puretés de protéines allant jusqu'à 95%.

2.6. Formulation du produit

Les enzymes sont vendues sous forme de concentrés liquides stabilisés ou sous forme de particules solides. La formulation doit minimiser les pertes d'activité enzymatique pendant le transport, le stockage et l'utilisation. Les enzymes sont souvent exposées à des environnements humides, chauds ou oxydants dans les applications industrielles telles que les détergents, les textiles, les aliments et les boissons. Les formulations améliorent la stabilité en neutralisant les principales forces de désactivation : dénaturation, désactivation du site catalytique et protéolyse.

Une préparation enzymatique doit être formulée en fonction de son application. À des fins d'analyse, il doit être facile à pipeter et - si possible - exempt de stabilisants et de conservateurs qui pourraient altérer sa fonction. Par exemple, la glutamate déshydrogénase (E.C. 1.4.1.3) ne doit contenir aucune trace d'ammoniac s'il doit être utilisé pour le dosage enzymatique de l'urée ou de l'ammonium.

Dans les kits de réactifs utilisés pour l'analyse enzymatique dans les laboratoires cliniques ou pour l'analyse alimentaire, l'enzyme peut être utilisée de préférence sous forme lyophilisée. Comparé aux solutions enzymatiques, le matériau solide est dans certains cas plus facile à mélanger avec d'autres composants solides et stable pendant une période de temps plus longue, même à une température légèrement élevée.

2.6.1. La stabilité

Un facteur très important dans l'application des enzymes est leur stabilité sous forme concentrée ou diluée et après mélange avec d'autres substances. Cela s'applique à la fabrication de produits à des fins pharmaceutiques, de chimie alimentaire ou d'analyse enzymatique. Certains enzymes peuvent être stabilisés en ajoutant du glycérol (50% en volume), du sulfate d'ammonium (environ 3,2 mol / L) ou du chlorure de sodium (3 mol / L) à leur solution aqueuse. De plus, de nombreuses enzymes peuvent être conservées sous forme lyophilisée pendant une longue période de temps en présence de stabilisants tels que des sels, des conservateurs, des protéines inertes (principalement de l'albumine sérique bovine) ou des glucides.

La plupart des enzymes utilisées dans l'analyse sont stockées à env. 4 °C ; les solutions d'endonucléases de restriction doivent être maintenues à -20 °C ou moins pour maintenir l'activité catalytique. Pour éviter la dégradation par l'humidité, la préparation enzymatique réfrigérée doit être réchauffée avant ouverture. **La congélation et la décongélation peuvent, dans certains cas, altérer l'activité des enzymes.**

En particulier pour les applications dans des kits de test commerciaux, certaines enzymes sont modifiées par immobilisation, par exemple par réticulation covalente avec des biopolymères comme la cellulose ou le dextrane. Cela améliore la stabilité des solutions et / ou la résistance à la chaleur.

2.6.2. Emballage

Une sélection rigoureuse des matériaux d'emballage est très importante pour la manipulation des enzymes. Les bouteilles et les bouchons utilisés pour les enzymes lyophilisées doivent être absolument étanches pour empêcher l'accès à l'humidité. Des bouteilles en verre ou en plastique ainsi que bouchons (caoutchouc ou plastique) ne doit

libérer aucune trace de métaux lourds ou d'autres substances inactivant les enzymes dans la solution ou suspension enzymatique. Dans certains cas, les enzymes doivent être protégées de la lumière et conditionnées dans des bouteilles en verre brun.

2.7. Traitement des déchets

En raison de la concentration généralement faible d'enzyme dans la matière de départ, le volume de matière à traiter est important et des quantités substantielles de déchets sont accumulées. Le milieu de fermentation épuisé peut encore contenir de grandes quantités de nutriments. Cependant, le recyclage n'est généralement pas possible en raison de la présence de métabolites dans le milieu. Les restes d'organes solides et mycélium, qui sont utilisés comme aliments pour animaux, peuvent être séparés. Ces derniers doivent être soigneusement vérifiés pour la présence des métabolites indésirables, comme des antibiotiques, avant d'être donnés aux animaux.

Dans les techniques de l'ADN recombinant, la nécessité de maintenir un confinement absolu est de grande préoccupation. Les déchets doivent être inactivés chimiquement ou thermiquement avant leur élimination, pour s'assurer qu'aucun organisme vivant ne s'échappe dans l'environnement.

3. Contrôle de l'activité enzymatique

La qualité des préparations enzymatiques est caractérisée par l'activité, la pureté, la stabilité, la formulation et le conditionnement. Ces paramètres dépendent les uns des autres, mais la formulation et le conditionnement sont faciles à contrôler et à maintenir constants. Les autres paramètres s'influencent mutuellement de manière à ce que la qualité soit considérée comme fonction de l'activité, pureté et stabilité

Après chaque étape de concentration ou de purification l'activité enzymatique est calculée pour vérifier l'efficacité des méthodes utilisées.

3.1. Unités Enzymatiques

Il est difficile de mesurer la quantité d'enzyme en unités de masse ou de concentration molaire ; l'activité enzymatique est définie en termes de vitesse de réaction.

L'Unité Internationale (I.U.) est la quantité d'enzyme requise pour convertir 1 μmol de substrat en produit en 1 min à une température et pH spécifiés (ex. pH 7.0 et 25°C) et sous des conditions de saturation du substrat :

$$\text{I.U.} = 1\text{-}\mu\text{mol substrat consommé/min}$$

Le katal (kat) est l'unité d'activité catalytique. C'est la quantité d'enzyme qui transforme 1 mole de substrat par seconde. C'est l'unité la plus cohérente avec le système International mais pas trop utilisée.

Il existe une relation entre l'IU et le katal :

$$1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol/min} = 16,69 \text{ nmol/s} = 16,67 \text{ nkat}$$

L'activité spécifique d'une enzyme est l'activité catalytique par unité de masse de protéine (I.U./mg d'enzyme solide mesurée expérimentalement)

Le taux de roulement (« turnover number » en anglais) exprime l'activité catalytique en terme d'unités par mol d'enzyme pure (au lieu de mg de protéine).

Le taux de purification d'une enzyme est le rapport de l'AS mesurée après une étape de purification, sur l'AS mesurée à l'étape précédente.

Le rendement correspond à un nombre d'UE mesuré après une étape de purification, sur un nombre d'UE mesuré à l'étape précédente

3.2. Quantification des protéines

La teneur en protéines étant le point de référence le plus important pour la détermination de l'activité spécifique d'une préparation enzymatique, plusieurs méthodes de détermination des protéines sont brièvement décrites dans les paragraphes suivants. Toutes ces procédures sont basées sur des principes différents et dépendent de la composition en acides aminés des protéines enzymatiques, ils donneront donc des valeurs différentes.

3.2.1. Absorption ultraviolette

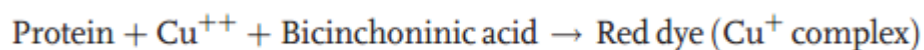
En raison de leur teneur en acides aminés aromatiques, les protéines présentent un maximum d'absorption à 270–280 nm. Pour de nombreuses protéines pures, référence des valeurs ont été établies pour l'absorbance à 280 nm d'une solution contenant 10 mg/mL (A_{280}). WARBURG et CHRISTIAN ont trouvé une formule qui prend en compte la teneur en acide nucléique. Pour une plus grande précision, l'absorbance est également mesurée à des longueurs d'onde plus basses, par exemple 235 nm.

3.2.2. Méthode de Biuret

La réaction des liaisons peptidiques avec les ions cuivre dans une solution donne un complexe violet qui peut être déterminé par photométrie. L'intensité est une fonction linéaire de la concentration protéique.

3.2.3. Méthode BCA

La méthode BCA de la société Pierce est utilisée pour de nombreuses protéines échantillons. Il combine la méthode biuret avec les caractéristiques de BCA :



Le complexe permet la quantification spectrophotométrique des protéine en solutions aqueuses.

3.2.4. Méthode de Lowry

La méthode de Lowry combine la réaction de biuret des protéines avec réduction du réactif phénol Folin – Ciocalteu (phosphomolybdique – phosphotungstique acide) par des résidus de tyrosine et de tryptophane. La réduction est favorisée par le cuivre – complexe protéique. Cette méthode est très sensible, mais elle est affectée par de nombreux autres composés. La méthode a été modifiée pour surmonter ces problèmes et obtenir une relation linéaire entre l'absorbance et la teneur en protéines.

3.2.5. Liaison protéine-colorant

Des tentatives de liaison protéine-colorant ont été faites pour déterminer la concentration protéique en utilisant des colorants. La méthode publiée par BRADFORD prédomine désormais. Elle est basée sur le décalage du maximum d'absorption de Blue de Coomassie Brilliant G 250 de 465 à 595 nm, qui se produit lorsque le colorant se lie à la protéine.

3.2.6. Analyse de Kjeldahl

Avant l'établissement des procédures colorimétriques, la concentration en protéines était calculée à partir de la teneur en azote en utilisant un facteur empirique.

