

Introduction

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses. Ces réactions s'effectuent dans des conditions « douces » où, normalement, elles seraient très lentes. Si elles ont lieu, c'est parce qu'elles sont catalysées par des macromolécules biologiques : les enzymes.

La plupart des réactions dans les organismes vivants sont catalysées par des protéines appelées enzymes. Les enzymes peuvent à juste titre être appelés le mécanisme catalytique des systèmes vivants. Il existe un nombre très important d'enzymes et on en découvre encore aujourd'hui de nouvelles. Six classes d'enzymes sont répertoriées selon la réaction chimique qu'elles catalysent : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases. Selon cette classification, à chaque enzyme correspond un numéro EC (« Enzyme Commission »). Par exemple : hydrolases (EC 3).

Une enzyme est spécifique d'un substrat, molécule dont elle catalyse la transformation. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée. Leur mode d'action est basé sur la reconnaissance spécifique du substrat par un domaine particulier chez l'enzyme (site actif ou site catalytique). L'activité enzymatique est liée à la structure tertiaire de l'enzyme, et notamment à celle du site actif. Des facteurs comme le pH ou la température, pouvant influencer cette structure tridimensionnelle ou encore l'état d'ionisation du site actif, affectent fortement l'activité enzymatique. Chaque enzyme possède donc une température et un pH d'activité optimale.

Le marché des enzymes industrielles est actuellement tenu par un certain nombre de fabricants comme : Novozyme (Danemark), la Société Gist-Brocades (Hollande), Genentech (USA), Henkel. Novozymes est le premier producteur mondial d'enzymes industrielles. Le marché global des enzymes industrielles était estimé à 3,6 milliards de dollars en l'an 2000. Moins de 30 enzymes comptent pour plus que 90% des enzymes industrielles utilisées : détergence 35% ; amidon 25% ; alimentaire 20% ; autres industries 20%.

Définitions

Enzyme : Protéine présentant des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit.

- Toutes les enzymes sont des protéines.
- Les protéines enzymatiques sont des catalyseurs, c'est-à-dire qu'en agissant à des concentrations très petites, elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée.
- 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.

Substrat : Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme. Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.

Produit : Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme. La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.

Ligand : Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une enzyme. Toutes les molécules ayant une liaison spécifique avec une protéine sont appelées ligands. Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit.

Cofacteur : Corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique :

- pour transporter ou compléter un substrat ;
- pour accepter un produit ;
- comme participant à la structure de l'enzyme.
- Les cofacteurs peuvent être des ions comme l'atome de Zinc de l'anhydrase carbonique ou de petites molécules minérales habituellement présentes dans les milieux biologiques, à commencer bien sûr par la molécule d'eau.
- Certains cofacteurs sont des molécules plus complexes synthétisées par les cellules: nous les appellerons coenzymes

Coenzymes : Molécule biologique intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction :

- les coenzymes libres interviennent dans la réaction de manière stoechiométrique ;
- les coenzymes liés interviennent dans la réaction de manière catalytique.

Classification et nomenclature des enzymes

Principe

1961 - 1972 : Enzyme commission D codification internationale. Un certain nombre d'appellations traditionnelles subsistent, mais l'emploi des numéros de code est aujourd'hui obligatoire dans toutes les publications scientifiques et les documentations techniques et commerciales.

La nomenclature officielle comporte 6 classes, elles-mêmes divisées en sous classes. Le numéro de code spécifie :

- 1 - le type de réaction (classe)
- 2 - le type de fonction du substrat métabolisé (sous-classe)
- 3 - le type de l'accepteur
- 4 - Le numéro d'ordre (dans la sous-sous-classe).

Classes

1 Oxydoréductases : réaction redox portant sur différents résidus, associant des coenzymes, des cytochromes, des accepteurs comme O₂, ...**EC 1.1.1.**

2 Transférases : transfert d'un groupement carboné, phosphoré, azoté, etc. d'une molécule à une autre. On distingue parfois les **aminotransférases** : transfert d'un groupement α-NH₂ d'une molécule sur un céto-acide, en position α : on obtient un nouvel acide aminé et les **transaminases** : le NH₂ n'est pas transféré en α : le nouveau composé n'est pas un acide α aminé. **EC 2.**

3 Hydrolases : liaisons ester, résidus glycosyle, etc.**EC 3.**

4 Lyases : catalysent l'enlèvement ou l'addition d'un groupement autrement que par Hydrolyse. **EC 4.**

5 Isomérases : **EC 5.**

6 Ligases : création d'une liaison entre 2 molécules couplée avec la dégradation d'une liaison à haut potentiel énergétique. **EC 6.**

Le mécanisme de base de la catalyse enzymatique

L'enzyme accélère la réaction sans modifier l'état d'équilibre en abaissant l'énergie d'activation du substrat. La première étape implique la formation d'un complexe enzyme-substrat et la spécificité d'un substrat par des interactions/adaptation réciproque via des liaisons de faibles énergies. Les enzymes stabilisent aussi l'état de transition et assurent la transformation du substrat en produit, libéré avec l'enzyme.

- **Théoriquement, une seule réaction possible, sur un seul substrat**
- **En fonction de l'environnement atomique du site catalytique, un seul type de réaction sera possible :**
 - **acide - base**
 - **redox, par échange d'électrons avec des ions métalliques (cytochromes)**
 - **transferts de groupements**

Les enzymes abaissent l'énergie d'activation. **L'énergie d'activation** ou l'énergie libre d'activation (ΔG^\ddagger) est l'énergie qui doit être absorbée par les réactifs pour que leurs liaisons soient brisées. Les réactifs doivent atteindre un état de transition instable dans lequel les liaisons sont plus fragiles et plus faciles à briser. Même une réaction exergonique, où le ΔG est négatif, requiert l'absorption d'énergie pour atteindre l'état de transition.

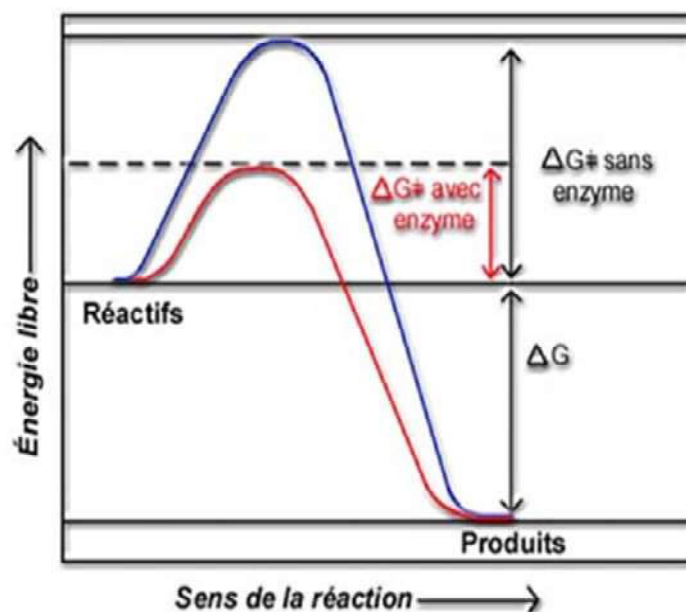


Figure1 : Abaissement de l'énergie d'activation

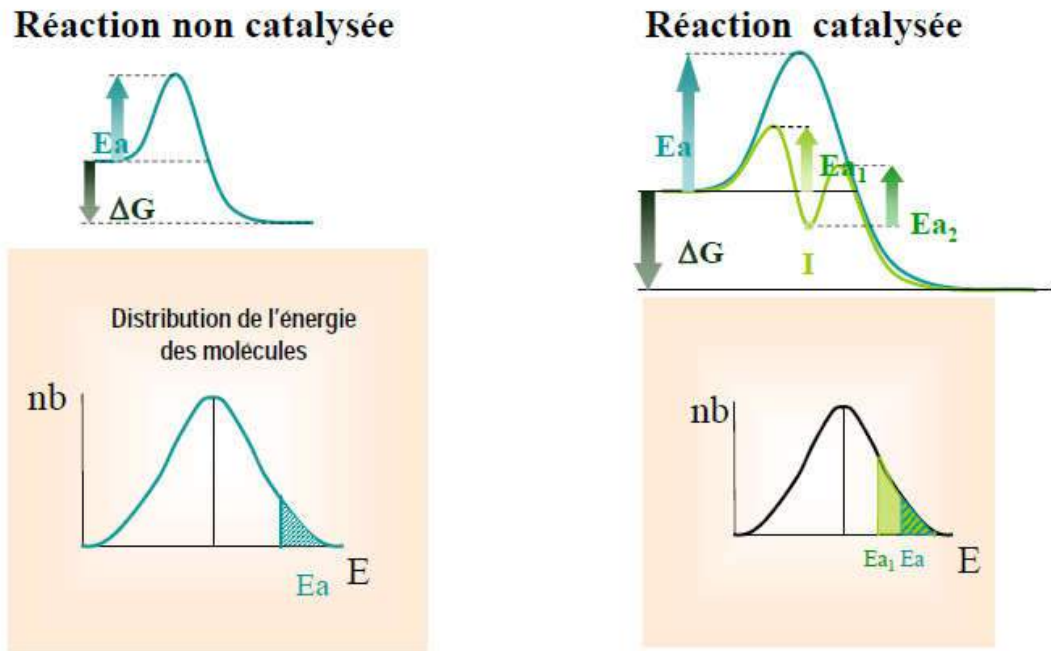


Figure 2 : Barrière d'énergie d'activation et vitesse

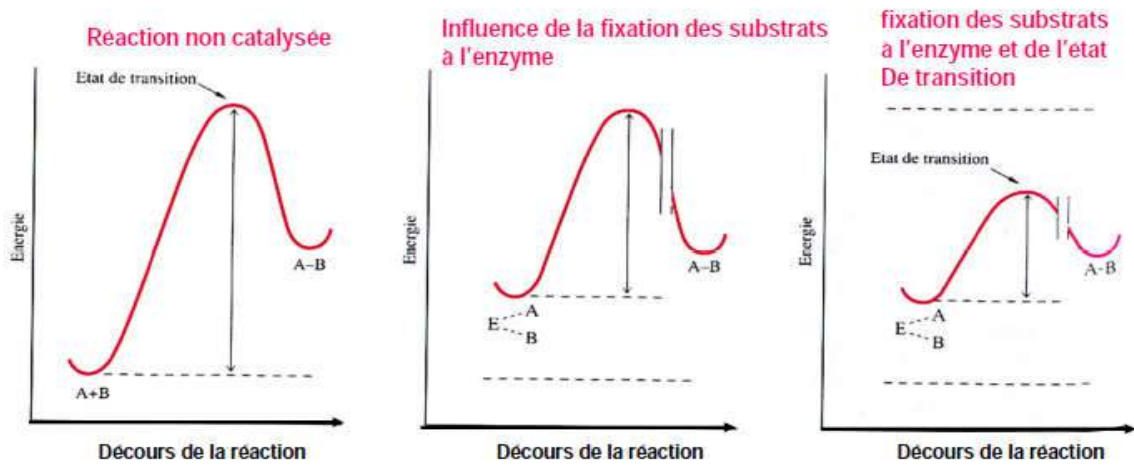


Figure 3 : Barrière d'énergie d'activation et affinité

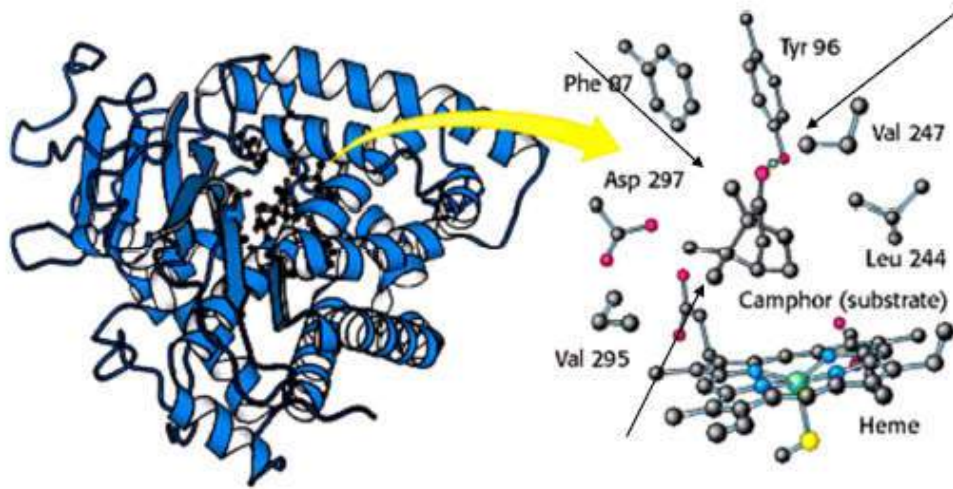


Figure 4 : Causes structurales de l'affinité enzyme/substrat

RÉACTEURS ENZYMATIQUES ET FERMENTEURS

Les procédés de préparation de plusieurs produits alimentaires de grande consommation comportent au moins une étape mettant en jeu des microorganismes ou des enzymes :

- lorsque cette étape fait appel à des micro-organismes qui se développent en consommant une partie d'un réactif appelé substrat et en transformant l'autre en divers produits, le réacteur employé est un fermenteur ;
- si cette étape est une réaction biochimique catalysée par des enzymes transformant un substrat en produit, elle est réalisée dans un réacteur enzymatique.

Il est courants de faire une distinction entre fermenteurs et réacteurs enzymatiques, car les premiers mettent en jeu de la matière vivante et doivent souvent fonctionner en conditions stériles. L'objectif de cette partie est de présenter, d'un point de vue général, les différents types de fermenteurs et de réacteurs enzymatiques, leurs principes de conception et leurs modes d'utilisation

1. Principes de choix et de dimensionnement

Le **choix** du type de bioréacteur à utiliser dépend du nombre de phases à mettre en présence pour effectuer la bioréaction : une seule phase liquide ou une phase gaz dispersée dans une phase liquide (cas de cultures aérobies) ou encore une phase solide dispersée dans une phase liquide (cas, par exemple, d'enzymes immobilisées).

Il convient de remarquer que les micro-organismes ayant une taille inférieure à 20 µm et une masse volumique très proche de celle des milieux de culture, on assimile les suspensions de microorganismes dans les milieux de culture à une phase liquide pseudohomogène. Bien sûr cette hypothèse n'est plus valable si les microorganismes tendent à s'agglomérer pour former des flocons (levures) ou des pelotes (champignons filamenteux).

Le choix du type de bioréacteur effectué, son **dimensionnement** et son **mode de conduite** reposent sur la connaissance des vitesses des réactions biochimiques ou biologiques et de leur couplage avec les vitesses de transfert de substrats, lorsque ceux-ci se trouvent dans une autre phase. Une présentation générale et rapide des principaux bioréacteurs est nécessaire.

2. Principaux types de bioréacteurs

Comparativement aux réactions chimiques, les bioréactions s'effectuent toujours dans un solvant, l'eau, et les concentrations en substrats et produits, ainsi que les vitesses de réaction, sont faibles. Pour obtenir des productions convenables, il est donc nécessaire de recourir à des volumes réactionnels et des temps de séjour importants ; par exemple, en brasserie, la fermentation principale s'effectue dans des cuves pouvant atteindre 600 m³ et dure de 5 à 10 jours. Les principaux appareils utilisés pour effectuer des bioréactions sont les cuves mécaniquement agitées, aérées ou non, les colonnes à bulles et les airlifts et, enfin, les réacteurs à lit fixe ou fluidisé.

2.1 Cuve mécaniquement agitée

La cuve mécaniquement agitée est le réacteur choisi lorsque tous les acteurs de la bioréaction (substrats, enzymes, micro-organismes) sont dans une phase liquide unique. Sous réserve d'une agitation suffisante pour que la phase liquide soit parfaitement mélangée, le seul phénomène à prendre en compte dans le dimensionnement et la conduite du bioréacteur est la vitesse de la bioréaction.

La cuve agitée est employée pour effectuer des réactions enzymatiques avec des enzymes en solution ou encore des fermentations anaérobies. Dans ce dernier cas, le gaz carbonique produit se désorbe du milieu de culture sous forme de bulles, mais sa concentration en phase liquide, constante et donnée par la loi de Henry, n'intervient pas, en général, dans l'expression de la vitesse de croissance du micro-organisme.

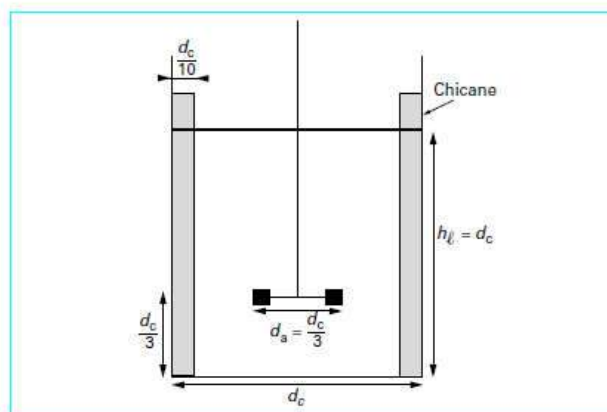


Figure 5 : Cuve mécaniquement agitée

2.2 Cuve mécaniquement agitée aérée

La cuve mécaniquement agitée aérée est utilisée pour la production de micro-organismes en aérobiose. L'oxygène qui est très peu soluble dans les milieux de fermentation (8 mg/L à 25 °C dans l'eau) est alors le substrat limitant.

La vitesse globale de formation des micro-organismes est la résultante du couplage entre leur vitesse propre de croissance et la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gaz dispersée vers le milieu de fermentation. La puissance mécanique consommée sert à la fois à mélanger la phase liquide et à générer une aire interfaciale importante entre les bulles de gaz et le milieu de fermentation.

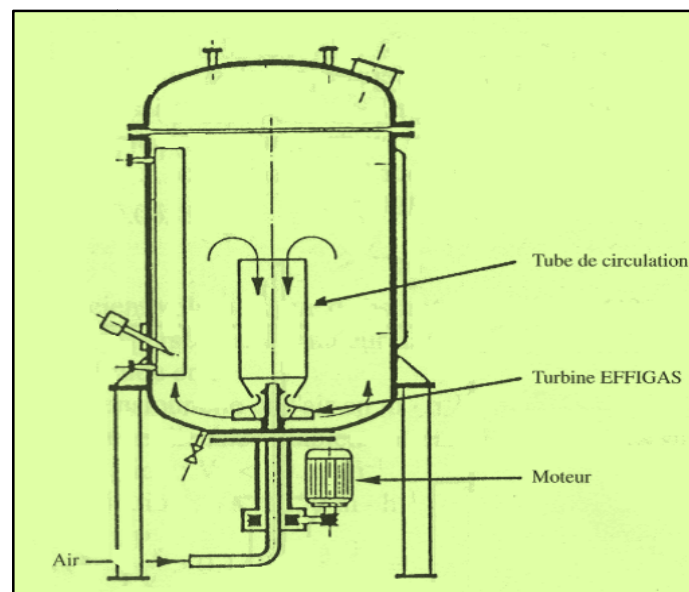


Figure 6: Cuve mécaniquement agitée aérée.

2.3 Colonne à bulles et réacteur airlift

La colonne à bulles est un réacteur également utilisé pour la production de micro-organismes en aérobiose. Les bulles d'air injectées à la base de la colonne apportent l'oxygène aux microorganismes et mélangent la phase liquide au cours de leur mouvement ascendant. Comme pour la cuve mécaniquement agitée aérée (§ 1.2.2), la vitesse globale de formation des micro-organismes est la résultante du couplage entre leur vitesse propre de croissance et la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gaz dispersée vers le milieu de fermentation.

Comparativement à la cuve mécaniquement agitée aérée, la colonne à bulles ne comporte pas de pièces en mouvement et ne consomme pas de puissance mécanique d'agitation. Sa fiabilité est plus grande et son coût en investissement et en fonctionnement plus faible. Par contre, ses performances de transfert d'oxygène sont nettement moins bonnes, car aucun effet mécanique ne vient s'opposer à la coalescence des bulles de gaz, phénomène qui diminue l'aire interfaciale entre les bulles de gaz et le milieu de fermentation. La colonne à bulles est aussi employée lors des fermentations anaérobies, l'agitation pneumatique étant alors réalisée par les bulles de gaz carbonique dégagées in situ pendant la fermentation ; on peut citer, à titre d'exemple, les cuves de vinification. Le réacteur airlift est un appareil dérivé de la colonne à bulles et est utilisé pour les seules cultures aérobies.

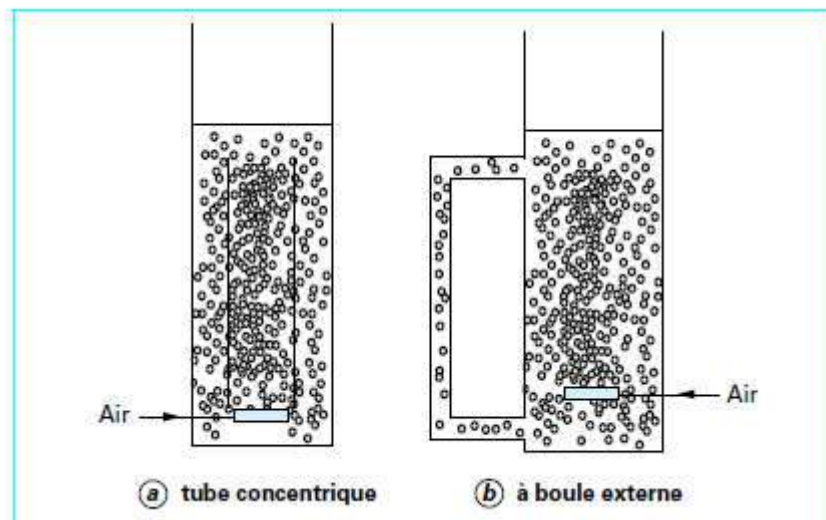


Figure 7 : Réacteur airlift

2.4 Réacteurs à couche fixe et couche fluidisée

L'usage d'enzymes en solution entraîne leur perte après réaction, puisqu'il est impossible de les extraire du milieu réactionnel. L'immobilisation d'enzymes à la surface ou à l'intérieur d'un support solide est une technique permettant de les séparer facilement du milieu réactionnel liquide et donc de les réutiliser.

Les réacteurs à enzymes immobilisées sont exclusivement des colonnes percolées par le liquide, à couche fixe ou couche fluidisée de particules solides. En effet, le recours à une cuve

mécaniquement agitée est à proscrire, car on peut difficilement dépasser un taux de solide de 10 % dans un tel appareil, alors que ce taux est de l'ordre de 60 % dans une colonne garnie de particules solides sphériques. D'autre part, dans une cuve agitée, les chocs de particules solides sur le mobile d'agitation peuvent entraîner leur destruction.

La vitesse globale de la réaction enzymatique est ici la résultante du couplage entre la vitesse de transfert du substrat du coeur de la phase liquide à l'interface des particules solides, la vitesse de diffusion du substrat à l'intérieur des particules et la vitesse intrinsèque de la bioréaction. Ces trois vitesses sont heureusement rarement toutes les trois du même ordre de grandeur. Le choix entre couche fixe ou couche fluidisée dépend du caractère colmatant des solutions à traiter et de la taille des particules solides. La fluidisation permet de s'affranchir des risques de colmatage, mais les performances de transfert de matière liquide-solide d'une couche fluidisée sont plus limitées que celles d'une couche fixe.

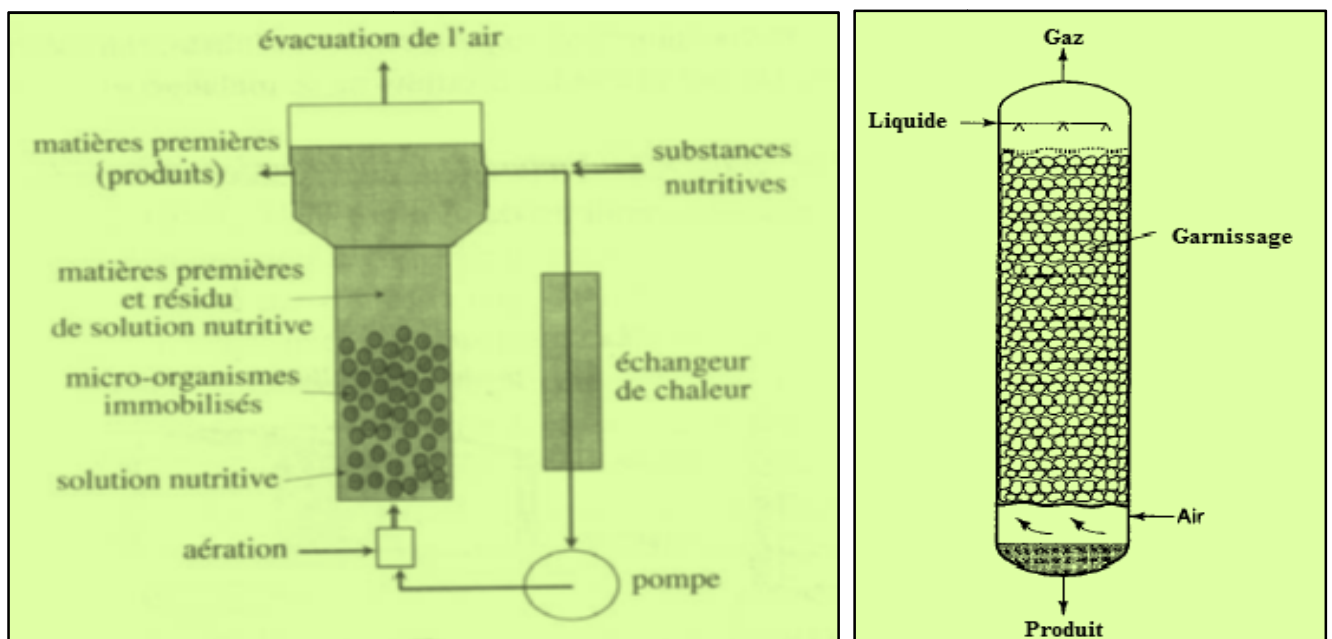


Figure 8 : Réacteur à lit fluidisé et à lit fixe

2.5 Les bioréacteurs à membranes (BRM)

L'utilisation des modules membranaires associés aux bioréacteurs en vue du recyclage des cellules conduit à travailler avec des concentrations cellulaires élevées, on peut donc augmenter les productivités et par voie de conséquence, réduire la taille des installations et diminuer les prix de revient. De plus, ces dispositifs permettent d'envisager, en parallèle, l'extraction des composés produits par le métabolisme, d'où le concept de fermentation extractive, particulièrement intéressante dans le cas où les produits formés sont inhibiteurs.

Sur la base de l'immobilisation des biocatalyseurs et le fonctionnement de la membrane, généralement les bioréacteurs membranaires sont classifiés en deux types :

- Des biocatalyseurs sont suspendus en solution, compartimentés par la membrane et où celle-ci sert seulement à la séparation.
- Des biocatalyseurs sont immobilisés dans la membrane, celle-ci agit en tant que support des biocatalyseurs et unité de séparation.

Différentes techniques d'immobilisation peuvent être utilisées, comme l'attachement à une surface par **adsorption** ou par **liaison covalente**, l'**encapsulation** ou encore l'**inclusion** dans une matrice. En plus de la variété de formes des membranes et types de membranes (tel que ceux à fibre creuse).

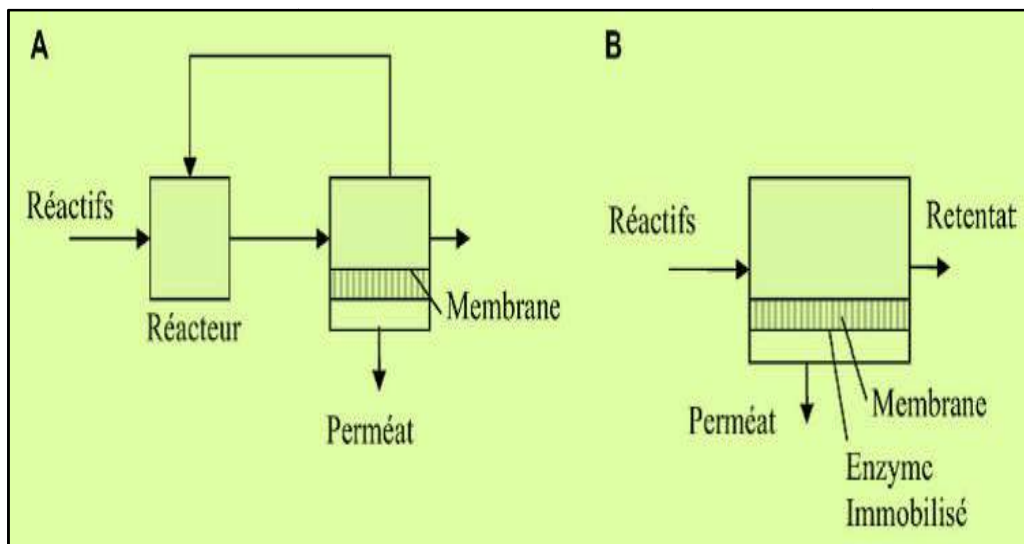


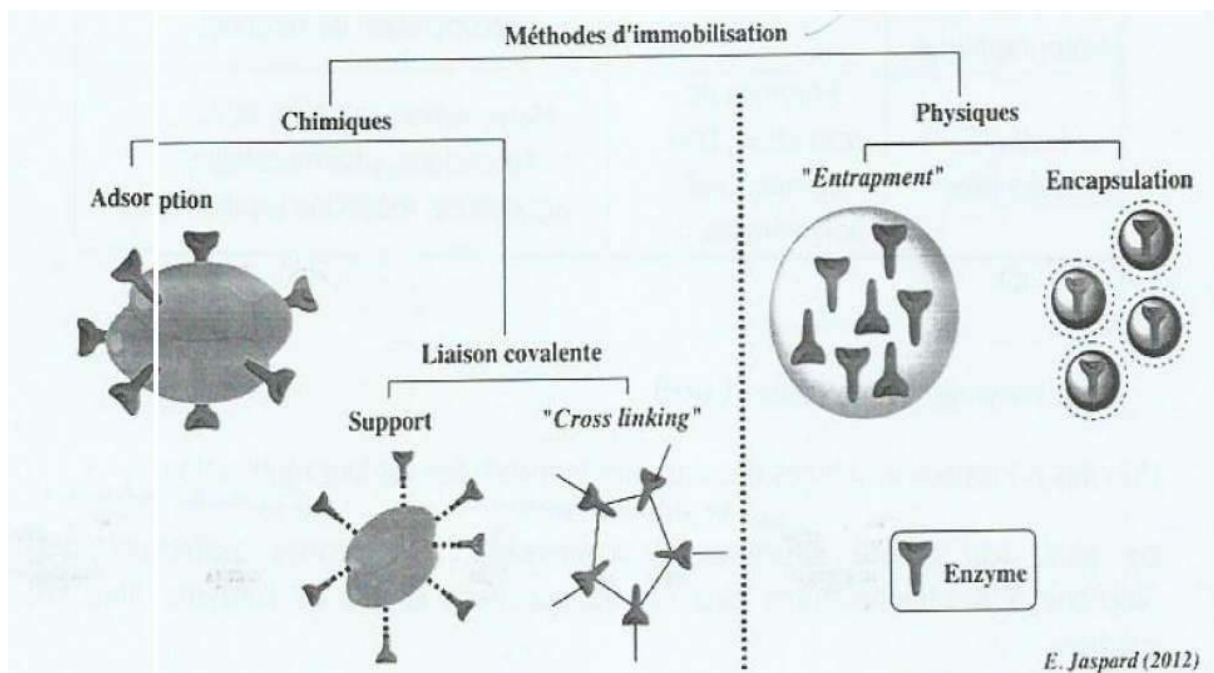
Figure 09: Les principaux types des bioréacteurs membranaires.

Bioréacteurs et enzymes immobilisées

Pour séparer facilement les enzymes des milieux liquides après réaction, on peut les fixer soit à la surface de particules non poreuses, soit à l'intérieur de particules poreuses. L'un des principaux avantages des enzymes immobilisées est leur réutilisation. De plus leur stabilité structurale est augmentée. Cela permet d'effectuer des réactions à des températures plus élevées que dans le cas de l'enzyme libre en solution. En revanche, leur activité est parfois diminuée car une partie des sites actifs peuvent être masqués.

Exemples d'enzymes immobilisées commercialisées :

- "Novozyme 435®" (Novozymes) : lipase immobilisée de *Candida antarctica* sur résine acrylique. A ne pas confondre avec "lipase from *Candida antarctica* type B" - CALB.
- "Novozym 539® HP F" : protéase de *Bacillus*
- "Lipozyme® TL IM" (Novozymes) : lipase immobilisée de *Thermomyces lanuginosus*



Exemples de méthodes d'immobilisation

- Adsorption sur résine
- Support : liaisons ioniques ou covalentes, chélation
- Réticulation (**Cross-linking**) : réactifs bifonctionnels ou multifonctionnels

(glutaraldehyde, bi-diazobenzidine, hexaméthylène di-isocyanate).

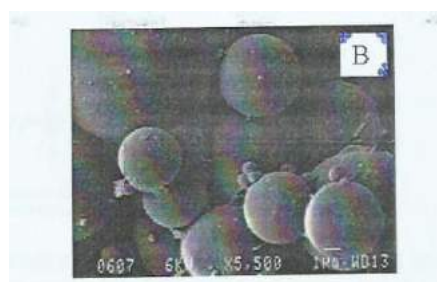
- Par piège (**entrapment**) : enzyme incorporée dans le réseau d'un gel semi-permeable ou dans une membrane polymère semi-perméable (collagène, polyacrylamide)
- Par encapsulation ou inclusion : aérogel de silice, fibres.

Comparaison de différentes méthodes d'immobilisation					
Caractéristiques	Adsorption	Liaisons ioniques	Liaisons covalentes	"Cross-linking"	"Piège" ("Entrapment")
Préparation	Facile	Facile	Difficile	Difficile	Difficile
Coût	Faible	Faible	Elevé	Modéré	Faible
Force des liaisons	Faible	Modérées	Fortes	Fortes	Fortes
Régénération	Oui	Oui	Non	Non	Non
Perte d'enzyme	Oui	-	Non	-	Oui
Activité enzymatique	Faible	Elevée	Elevée	Modérée	Elevée

Autoimmobilisation (Cross linking self- immobilisation)

Elle s'effectue via des interactions entre molécules d'enzymes : il n'y a pas besoin d'une matrice pour l'immobilisation (cout réduit) et l'activité volumétrique est augmentée. il existe différentes techniques de cross-linking :

- **CLEA** : Cross-linked Enzyme Aggregate
- **CSDE** : Cross-linked Spray Dried enzyme
- **CLEC**: Cross-linked Enzyme Crystals
- **CLES** : Cross-linked Enzyme from Solution



TP1 : Immobiliser de l'invertase sur billes poreuses à matrice styrenedivinylbenzène macroréticulé (résine Amberlite) et groupement actif échangeur d'anions.

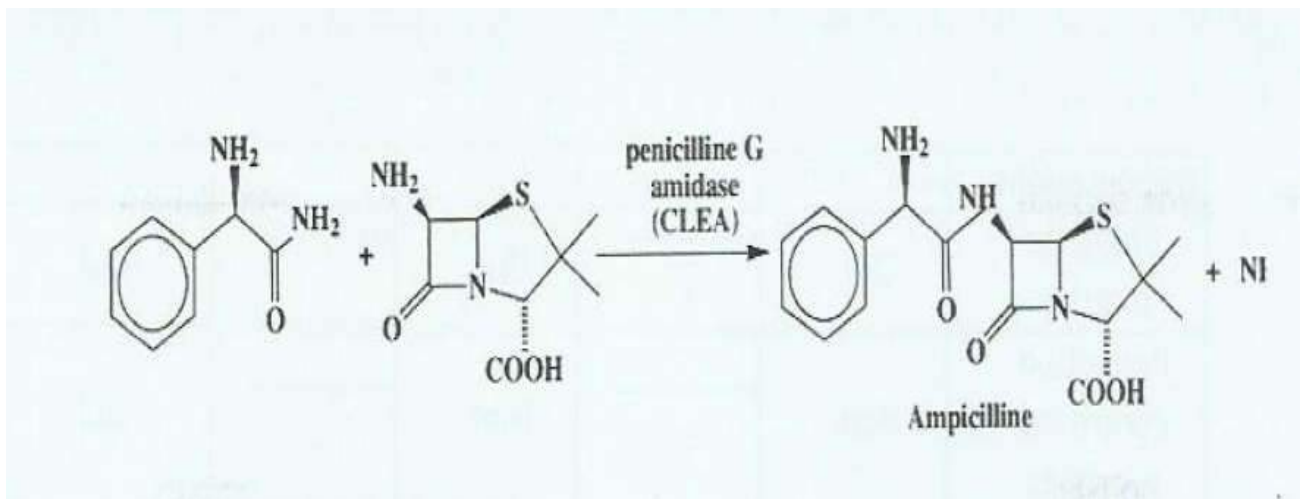
TP2 : Conception d'un petit réacteur tubulaire à invertase immobilisée

TP3 Intégration de l'équation de Michaelis et application théorique à un réacteur tubulaire.

La synthèse d'antibiotiques est un exemple d'application des enzymes immobilisées dans l'industrie pharmaceutique.

La penicillinase (**β -lactamase-EC3.5.2.6**) immobilisée est utilisée pour la conversion de la pénicilline-G ou V en acide 6-amino pénicillinique (**6-APA**).

L'ampicilline est produite à partir du 6-APA avec la penicilline-G amidase (EC3.5.1.11) immobilisée (**CLEA**).



Exemples d'applications des enzymes immobilisées dans l'industrie pharmaceutique	
<ul style="list-style-type: none"> • Production de corticostéroïdes Production d'acides aminés Production de L-DOPA (L-3,4-dihydroxy-phénylalanine) • Exemples d'autres molécules produites par 	<ul style="list-style-type: none"> • La prednisolone est produite à partir de la cortisone avec des enzymes immobilisées extraites de <i>Curcuria lanata</i>. La L-aspartase-4-décarboxylase immobilisée permet la conversion de l'aspartate en alanine. La β-tyrosinase immobilisée permet la synthèse de L-DOPA (traitement de la maladie de Parkinson). • coenzyme-A, pro-insuline, interleukine-2,

des enzymes immobilisées	anticorps monoclonaux, prostaglandines, anthraquinone, bacitracine, nikkomycine ...
--------------------------	---

Exemples d'applications d'enzymes immobilisées dans le diagnostique médical

aldolase	troubles musculaires
glutamate oxaloacétate transférase	infarctus du myocarde
iso-citrate déshydrogénase	hépatite
choline estérase	empoisonnement par des dérivés organo-phosphoriques
phosphatase alcaline et β-lactamase	analyse d'antigènes-anticorps

Exemples d'applications des enzymes immobilisées dans l'industrie	
Céphalosporine amidase	glutaryl-7-ACA ==> 7-ACA (ACA = acide 7-amino céphalosporanique)
Amino acylase	D,L - acide aminé acylé ==> L - acide aminé
Aspartase	acide fumarique ==> acide aspartique
Fumarase	acide fumarique ==> acide malique
Aspartase β-décarboxylase	acide aspartique ==> alanine
Nitrile hydratase	acrylonitrile ==> acrylamide
Glucose isomérase	glucose ==> sirop à fort taux de fructose
Lipase	Rac-1-phényléthylamine ==> (S)-1-phényléthylamine

Les enzymes immobilisées sont aussi utilisées comme biosenseurs (mesure de la concentration de molécules dans les fluides corporels). Un biosenseur (aussi appelé biocapteur) est un dispositif détecteur, semi-biologique associant trois éléments :

- **L'échantillon à étudier** : eau, air, sol matériel biologique (tissus, microorganisme, organites, récepteurs cellulaires, enzymes, anticorps,...)
- **Un élément capteur** (éventuellement sous la forme d'une puce électronique) détectant des changements physico chimiques sous forme de signaux (présence/absence) biochimiques et/ou physiques ou chimiques dans un milieu (externe ou interne au corps humain) et émettant un signal biologique. Le capteur (élément détecteur) peut fonctionner selon des principes aussi variés que physicochimiques, optiques, piézoélectriques, électrochimiques et ou plus rarement magnétique ou thermométrique). C'est aussi un transducteur, c'est-à-dire que son rôle est de transformer le signal résultant de l'interaction de l'analyte avec l'élément biologique en un autre signal, qui peut être plus facilement mesurable et quantifiable.
- **Un élément électronique** associé ou processeurs de signal permettant l'affichage ou l'impression ou l'envoi sous forme de fichier ou base de données des résultats. L'appareil peut être muni d'une mémoire pour stocker des séries temporelles de données.

Senseurs de protéases

L'activité des protéases peut être étudiée avec des senseurs polymères dont le principe est semblable à celui du senseur avidine :

- Le polymère conjugué anionique est un dérivé du PPE
- Une chaîne polypeptidique cationique sur laquelle est fixée une molécule piège à son extrémité

Comme dans le cas du senseur avidine, la solution aqueuse n'est pas luminescente initialement. Les protéases introduites dans le milieu hydrolysent des liaisons peptidiques, les molécules pièges sont alors relarguées en solution et la luminescence est rétablie.

Les senseurs de protéases peuvent détecter des concentrations nanomolaires d'enzymes (exemple, la thrombine) en quelques minutes.

Application des enzymes dans l'industrie

Les enzymes sont de plus en plus utilisées en applications industrielles. Elles permettent notamment de remplacer les produits chimiques. Elles sont produites par fermentation de microorganismes (bactéries, levures ou champignons) génétiquement modifiés ou non. Ces préparations enzymatiques ne sont pas pures, elles possèdent de nombreux additifs et impuretés. Elles renferment généralement plusieurs activités enzymatiques.

Les enzymes produites en quantités industrielles sont majoritairement d'origine microbienne. Leurs applications concernent principalement les détergents et le secteur agroalimentaire.

1. Applications

Les préparations enzymatiques commerciales sont utilisées dans divers secteurs

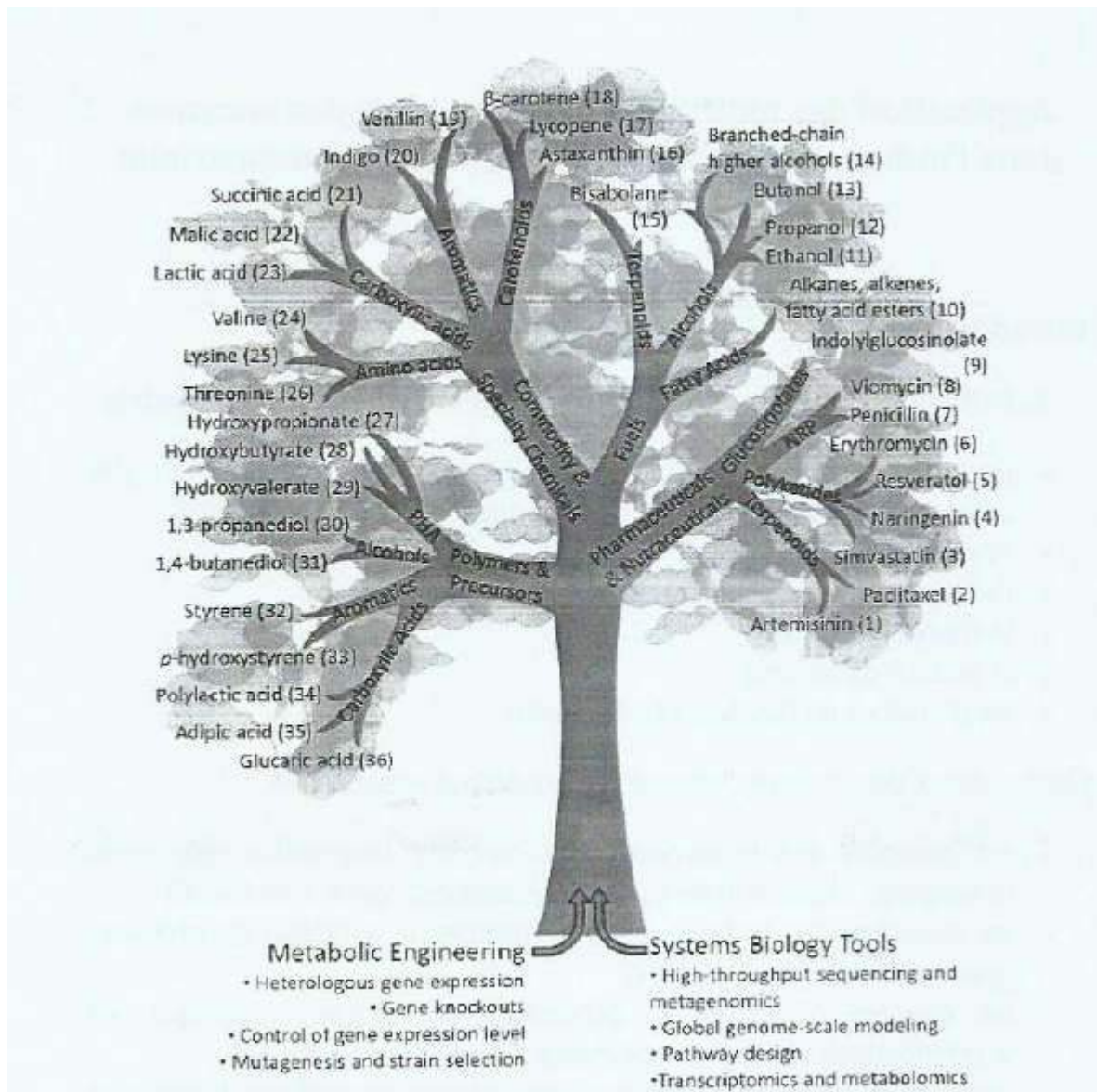
Industriels :

- Agroalimentaire: alimentation humaine et animale.
- L'industrie des détergents (application potentielle des détergents qui contiendraient des enzymes fonctionnelles à 100°C).
- L'industrie de l'amidon.
- La chimie fine
- Le secteur de la santé
- Le domaine de l'analyse et des capteurs.
- Industrie du textile, délavage des jeans,
- Détergents ménagers et industriels...

Les nouveaux domaines en « omique » et « l'ingénierie métabolique »

- Les avancées de techniques pour contrôler l'expression des gènes « **gene Knockouts** ».
- Les avancées des techniques pour contrôler la synthèse de protéines « **L'interférence ARN** ».
- Les données issues de la génomique, de la transcriptomique, de la protéomique, de la métabolomique.

- Les connaissances issues des modèles élaborés de systèmes biologiques « Reconstruction métabolique à l'échelle d'un génome ».
- Ont contribué au développement de l'ingénierie métabolique « metabolic engineering » afin de transformer des organismes vivants pour produire ou transformer des composés organiques d'intérêt industriel « **Microbial cell factories** ».



Les enzymes sont utilisées dans l'industrie quand des catalyseurs spécifiques sont nécessaires. Cependant, l'emploi des enzymes est en général limité par rapport aux nombres de réactions pour lesquelles la nature les a élaborées comme catalyseurs, en particulier du fait de leur instabilité structurale (dénaturation) en présence de solvants organiques, pH extrêmes ou à hautes températures.

En conséquence, l'ingénierie des protéines est un domaine de recherche très actif afin de créer des enzymes aux propriétés originales qui catalysent des réactions qui ne se produisent pas dans la nature. Exemple des enzymes d'organismes extremophiles. Les enzymes et les composés organiques issus d'organismes extremophiles drainent un marché mondial potentiel de 17 milliards de dollars. La filière pharmaceutique représenterait 5 milliards de dollars.

Les enzymes d'organismes extremophiles catalysent des réactions dans des conditions non standard. Certaines de ces enzymes maintiennent leur enveloppes d'hydratation et demeurent actives même en solution quand l'eau ambiante (fortes concentration ioniques) ou à basses températures.

Les enzymes sont utilisées pour maîtriser et/ou pour améliorer les propriétés technofonctionnelles des aliments. Dans le tableau sont résumés les effets principaux des activités enzymatiques sur les propriétés fonctionnelles des produits alimentaires.

Tableau 1 – Effets des activités enzymatiques sur les propriétés fonctionnelles [20]		
Enzymes	Ingédients	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 présure 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
Hydrolyse des glycannes		
β-Galactosidase	Lactose → glucose + galactose	Accroissement de la solubilité et du pouvoir sucrant
Invertase	Saccharose → 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) → maltodextrines, glucose	Baisse de viscosité. Solubilisation → 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 → accroissement de la dépendance de la gélification vis-à-vis du pH Hydrolyse de liaisons osidiques → baisse de viscosité
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

www.dalmer.fr (2016) 5:2015-2023 pour le compte de 720.00.205.78 - univ. albert-leroux - mise de belair / bilalcolat

Les détergents et tensioactifs

1. Les détergents

L'utilisation des enzymes dans l'industrie des détergents représente l'application industrielle la plus importante à la fois en termes de valeur et de quantité. Il suffit de penser aux lessives.

Les enzymes les plus utilisées sont les protéases, mais beaucoup d'autres hydrolases peuvent également être ajoutées aux préparations pour aider à l'élimination de taches très diverses.

Les marques de lessive les plus performantes combinent protéases, amylases, lipases et cellulases pour augmenter l'efficacité du lavage. Chacune de ces enzymes est capable d'attaquer un type particulier de tache ou de salissures.

Le fait d'inclure plusieurs types d'activité enzymatique dans le détergent permet ainsi d'éliminer des salissures contenant différentes substances.

Les thio-protéases (comme la papaine) seraient oxydées par les agents oxydants.

Les métallo-protéases (comme la thermolysine) perdraient leur cofacteur métallique par complexation avec les adoucisseurs d'eau ou les ions hydroxyle.

Cependant, l'une des améliorations récentes dans la composition des détergents est l'introduction d'une cellulase d'origine fongique, stable aux pH alcalins, dans les lessives textiles pour le coton. Au cours du lavage, de petites fibres sont soulevées de la surface du fil de coton ce qui a pour conséquence de modifier le sens de l'étoffe et de réduire le brillant des couleurs. Le traitement par la cellulase élimine ces petites fibres sans endommager les fibres principales, et restaure ainsi l'aspect original de l'étoffe.

Exemple, une tache alimentaire peut contenir des protéines, des lipides et de l'amidon.

Les efforts de l'industrie pour modifier les enzymes qui entrent dans la composition des détergents portent entre autre, sur un accroissement de leur stabilité à la chaleur, à des pH alcalins et à d'autres conditions sévères. En effet, une fois relarguées des granules dans lesquelles elles sont conditionnées, les enzymes doivent résister :

- Aux tensioactifs non ioniques
- Aux savons
- Aux agents oxydants

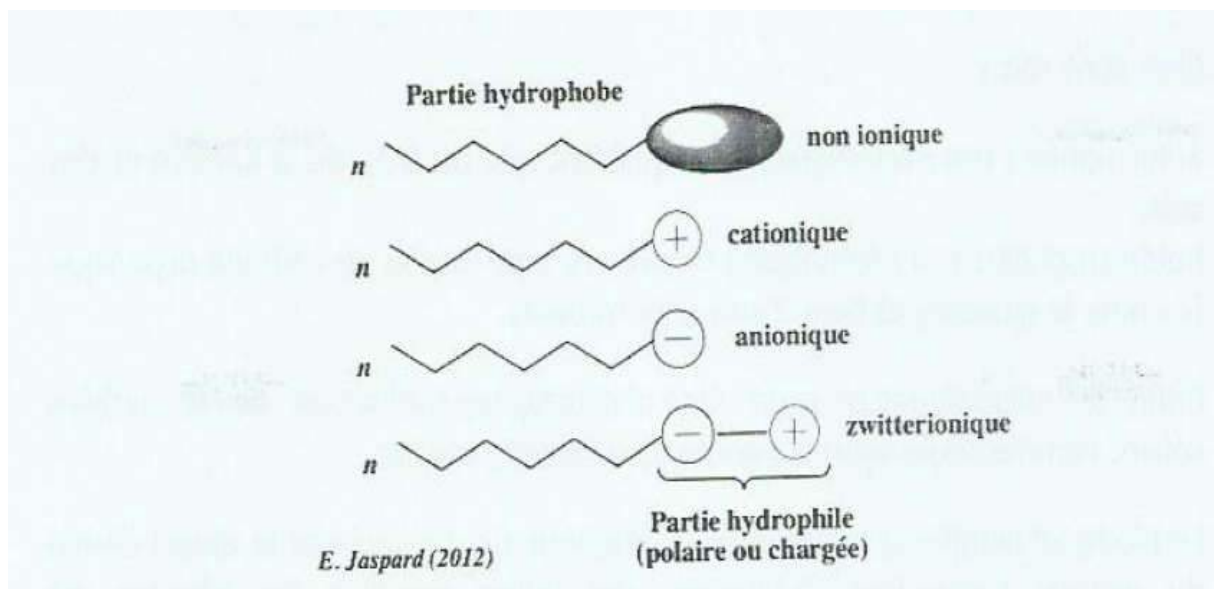
- Aux agents qui augmentent l'aspect lumineux
- Aux autres composés plus ou moins actifs
- Et ce à des pH compris entre 8.0 et 10.5
- Enfin, l'incorporation d'enzymes a pour but une efficacité à des températures moins élevées (économie d'énergie). Cependant, les enzymes doivent rester actives jusqu'à 60°C.

Constituant	Composition (%)
Sodium tripolyphosphate (adoucisseur d'eau, dégrassage) Remplacé à terme par du carbonate de sodium plus des protéases, pour des raisons écologiques	38
Sodium alcane sulphonate (tensioactif)	25
Sodium perborate tetrahydrate (agent oxydant)	25
Sodium alcane carboxylates (savon)	3
Sodium sulfate (adoucisseur d'eau)	2,5
Sodium carboxyméthyle cellulose (agent dégrasant)	1,6
Sodium métasilicate (liant, épaississant)	1,0
Protéase de <i>Bacillus</i> (3% active) Les enzymes ne représentent qu'un très faible pourcentage dans la composition des détergents.	0,8
Agent fluorescent	0,3
Agent anti-moisissure et parfum	trace

2. Les tensioactifs

Les tensioactifs ou agents de surface (surfactant) modifient la tension superficielle entre les surfaces des molécules. Ce sont des molécules amphiphiles : une partie hydrophobe et une partie polaire ou chargée.

- Les tensioactifs non ioniques ont une charge nette nulle et ne s'ionise pas dans l'eau
 - Les tensioactifs à liaison ester ($R-CO-O-R'$). Exemple : Triton 100X, Nonidet P-40, Brij 35, Tween 80.
 - Tensioactifs à liaison éther ($R-O-R'$). Exemple : éther d'alcool.
 - Tensioactifs à liaison amide ($R-CO-NH-R'$). Exemple la série des « Comperlan ».
- Les tensioactifs cationiques libèrent un cation dans l'eau
- Les tensioactifs anioniques libèrent un anion dans l'eau
- Les tensioactifs zwitterioniques ou amphotères : ils contiennent un groupement acide et basique et libèrent un anion ou un cation selon le pH.



Le caractère hydrophile ou hydrophobe prédominant d'un tensioactif est caractérisé par la balance hydrophile/ lipophile (**Hydrophilic-lipophilic balance- HLB**).

L'échelle varie de 0 à 20 (Méthode de Griffin) :

- 0 correspond à une molécule complètement lipophile (hydrophobe)
- 20 correspond à une molécule complètement hydrophile
- La méthode a été ultérieurement affinée (Méthode de Davies).

Production de tensioactifs par les bactéries (**Microbial Biosurfactants**)

Deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* (**GS9-119 et DS10-129**) capables de dégrader les huiles, ont été utilisées pour la synthèse d'un bio tensioactifs : le rhamnolipide (biodégradable, non toxique, utilisation potentielle en cosmétique, source de rhamnose).

Enzymes utilisés dans les détergents

Elles sont produites par des souches de Bacillus, principalement par deux entreprises

- NOVO Industri A/S (par sa filiale Novozyme) produit et fournit 3 protéases :
 - L'alcalase à partir de *B.licheniformis*
 - L'esperase à partir d'une souche alcalophile de *B.licheniformis*
 - La savinase à partir d'une souche de *B.amyloliquefaciens*
- Gist-Brocades (Groupe DSM) produit et fournit la maxatase à partir de *B.licheniformis*.

L'alcalase et la maxatase sont 2 protéases de la famille de subtilisine (**EC 3.4.21.62**). Elles sont recommandées pour un usage de 10 à 65°C et un pH de 7 à 10.5.

La savinase et l'esperase peuvent être utilisées jusqu'à pH 11 et 12 respectivement.

L' α amylase présente dans les détergents est un variant de type termamyle (**Européen patent specification- EP 1 423 513 B1**) utilisée aussi dans la fabrication de sirops à base de glucose. Cette α amylase est particulièrement efficace pour les détergents de machine à laver, la vaisselle et les taches de féculants.

Choix des protéases à sérine

Toutes ces enzymes protéolytiques sont des endo protéases à sérines non spécifiques. En effet seules les protases à sérines peuvent être utilisées dans la formulation des détergents.

Préparation industrielle des enzymes :

Les enzymes peuvent avoir plusieurs origines :

- Une origine végétale
- Une origine animale
- Une origine microbienne

Tableau : Les principales origines des enzymes.

L'origine	L'enzyme	Le nom d'espèce
Végétale	Les protéases	Papaïne <i>carica papaya</i>
Animale	Pepsine	Les bovins
Microbienne	Invertase	Levure <i>S. cerevisiae</i>

Enzyme d'origine microbienne

Les cellules microbiennes sont les plus largement utilisées pour obtenir une bonne sécrétion d'enzyme. La production industrielle d'enzyme est orientée vers la fermentation, les principaux avantages des enzymes sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques
- Une possibilité d'utilisation de matière première bon marché;
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des conditions de fermentation

La production industrielle d'enzymes suppose donc un certain nombre d'étapes.

1. Définition de l'enzyme recherchée :

Il est nécessaire de déterminer les propriétés que cette enzyme devra posséder :

- **Spécificité:** bien que dans l'industrie, les enzymes soient souvent utilisés pour hydrolyser des macromolécules complexes, dont les sites de coupure nécessitent généralement l'utilisation d'un type d'enzyme précis.

- **L'optimum de pH :** ce facteur a une influence variable selon les enzymes, chaque enzyme est activée à un intervalle de pH précis.
- **L'optimum de température:** Généralement, les utilisations souhaitent disposer d'enzyme supportant des températures élevées, de telles températures préservent la stérilité du milieu de réaction.

2. Sélection de la souche microbienne :

Les plus importantes méthodes d'isolements utilisées étant les cultures d'enrichissement suivi d'une subculture sur milieu sélectif.

La souche isolée pour être définitivement retenue doit présenter un certain nombre de Caractéristiques :

- Se développe dans un milieu simple et bon marché;
- Produire le moins possible de métabolites secondaires;
- Excréter l'enzyme de façon à ce que celui ci soit facilement séparée et purifiée;
- Ne pas conduire aux différents polluants;
- Ne pas être pathogène ou produire des produits toxiques.

3. Production d'enzyme par fermentation

Traditionnellement, les enzymes microbiennes étaient produites par culture en surface, en couche mince sur milieu liquide ou milieu semi –solide, cette technique est encore utilisée pour certaines productions (enzyme d'origine fongique). Mais cette technique présente des difficultés au niveau de contrôle de température d'aération et d'humidité. C'est pourquoi les cultures submergées (fermées) sont maintenant préférées aux cultures de surface.

Les cultures en milieu liquide agité sont mieux adaptées au différent contrôle par des méthodes modernes et réduisent les risques de contamination. De plus elles se prêtent mieux aux opérations d'extrapolation et d'optimisation pour ce passage de fermenteur pilote de laboratoire au fermenteur industriel.

4. Extraction et purification

Après la fermentation les enzymes doivent être séparées des cultures et de milieu par les opérations simples telle que ; Centrifugation, filtration, précipitation. L'extraction consiste en la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires nécessitent un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire par des procédés mécaniques, physiques ou chimiques.

Dans le cas des enzymes endocellulaires leur récupération exigent une étape supplémentaire de broyage ou de la lyse des cellules microbiennes, puis ces enzymes sont purifiées comme les enzymes exocellulaire.

5. Préparation enzymatique commerciale

Les enzymes industrielles sont commercialisées sous différentes formes selon l'application :

- Solide : dans ce cas les préparations sont peu concentrées en principe actif, c'est-à-dire en enzyme. Les enzymes solides sont faciles à transporter et à stocker. Les deux formes principales sont la poudre et les granulés.
- Liquide : dans ce cas les préparations enzymatiques sont concentrées en principe actif ; exemple l'alpha amylase utilisée dans l'industrie de l'amidon.
- Immobilisées : comme la glucose isomérase, l'enzyme qui transforme le glucose en fructose.

6. Réglementation

Les enzymes utilisées en alimentation humaine sont soumises à une réglementation. Le critère essentiel est celui de l'innocuité. Les enzymes contenues dans les préparations enzymatiques doivent être obtenues dans les conditions suivantes :

- Les tissus animaux servant à la production des enzymes doivent provenir d'animaux en bon état sanitaire au moment de l'abattage et aptes à la consommation. Les tissus animaux doivent être parfaitement sains et en excellent état de conservation.
- Le matériel végétal utilisé pour l'extraction des enzymes doit être issu des parties normalement comestibles des plantes saines.

- Les microorganismes utilisés pour la production des enzymes sont choisis pour leur innocuité ; ils sont sans effet que ce soit pour l'homme ou l'animal, et ne fabriquent pas de toxines.

Les préparations enzymatiques à usage alimentaire doivent répondre à un certain nombre de critères chimiques et biologiques et ne doivent contenir aucun autre élément en quantité dangereuse du point de vue toxicologique. De plus, leur emploi ne doit pas entraîner une augmentation de la numération bactérienne totale normalement admise dans les denrées alimentaires.

7. Critères de pureté chimique :

- Cadmium : pas plus de 0,5 mg par kilogramme ;
- Mercure : pas plus de 0,5 mg par kilogramme ;
- Arsenic : pas plus de 3 mg par kilogramme ;
- Plomb : pas plus de 10 mg par kilogramme.

8. Critères de pureté biologique :

- Germes totaux : moins de 50 000 germes par gramme ;
- Salmonelle : absence dans 25 gramme de produit ;
- Coliformes : moins de 30 germes par gramme de produit ;
- Anaérobies sulfite-réducteurs : moins de 30 germes par gramme de produit ;
- *Staphylococcus aureus* : absence dans 1 gramme de produit ;
- Activité antibiotique : aucune.