

DOMAINES D'APPLICATION DES ENZYMES

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

Les 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.

Les proportions illustrées ci-dessus montrent la répartition des principaux domaines utilisant les enzymes actuellement. La prédominance des utilisations alimentaire est évidente par l'addition des proportions d'utilisation dans ce domaine. L'utilisation des enzymes dans les secteurs de l'Industrie agroalimentaire représente 65 % du chiffre d'affaires de la marche des enzymes industrielles. Globalement, les raisons du développement de l'utilisation des enzymes sont d'ordre technologique ou économique.

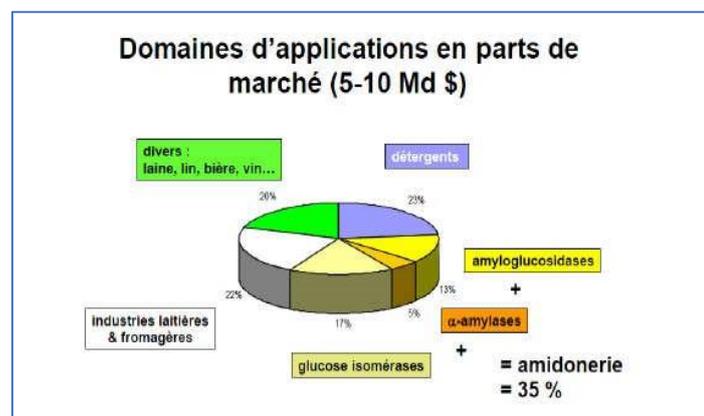


Figure. Domaines d'application des enzymes

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.

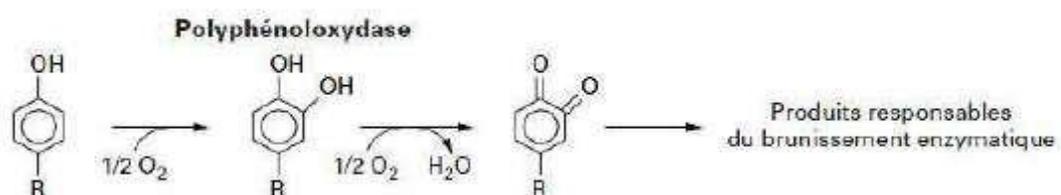
En conséquence, l'ingénierie des protéines est un domaine de recherche très actif afin de créer des enzymes aux propriétés originales qui catalysent des réactions qui ne se produisent pas dans la nature. Exemple des enzymes d'organismes extrémophiles. Les enzymes et les composés organiques issus d'organismes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

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

1. Applications agro-alimentaires

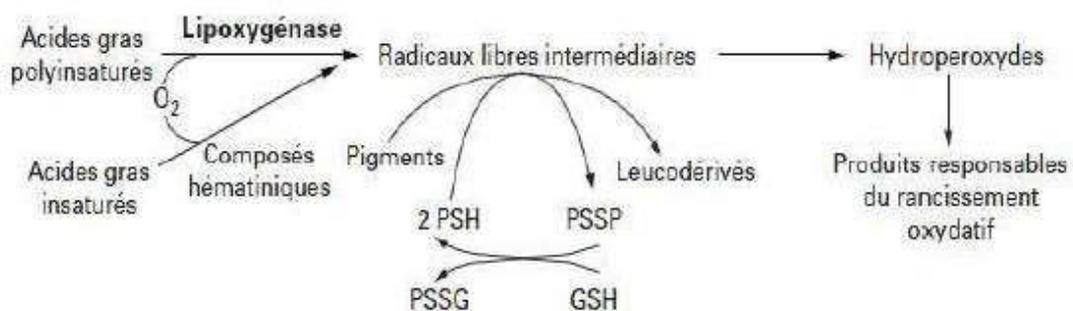
Les enzymes sont utilisées depuis des siècles dans la production alimentaire mais ne sont connues et maîtrisées que depuis le XXème siècle. Elles sont naturellement présentes dans des ingrédients utilisés pour produire des aliments.

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



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

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



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

a. Raffinage enzymatique d'huiles alimentaires

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

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

Le procédé Enzymax peut être subdivisé en quatre principales étapes :

1. Ajustement des conditions optimales de réaction de l'enzyme, pH et température.
2. Addition de la solution enzymatique.

3. Déroulement de la réaction enzymatique.

4. Séparation des phospholipides hydratés de l'huile.

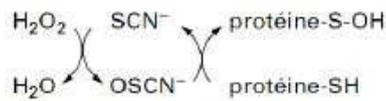
Les huiles obtenues à la suite de ce procédé de dégomme poursuivent un raffinage physique. Elles sont ainsi envoyées directement à la section de décoloration sans passer par l'étape de neutralisation. En effet, l'élimination des AGL dans ce cas se fera par distillation sous vide au cours de la désodorisation.

b. Enzyme et qualité hygiénique des aliments

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

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

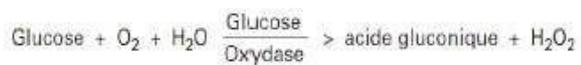
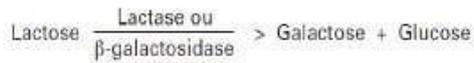
Les lactoperoxydase : Exemple d'utilisation du pouvoir bactéricide ou bactériostatique : La peroxydase agit de manière indirecte par la production de molécules intermédiaires bactéricides ou bactériostatiques le cas de la transformation du thiocyanate (SCN⁻) en ion hypothiocyanate (OSCN⁻). L'ion hypothiocyanate (OSCN⁻) est le principe actif selon le mécanisme suivant:



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

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

L'équation simplifiée de ces réactions est la suivante :



c. Amélioration de la perception des arômes naturels

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

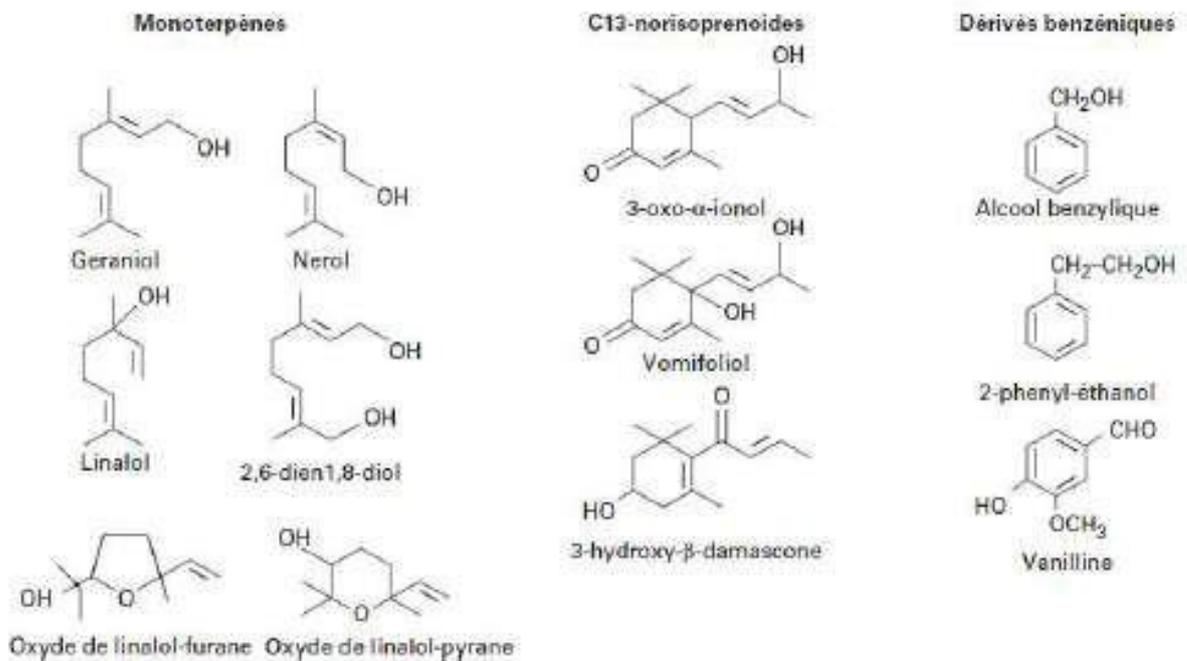


Figure 27. Exemple de structure de molécules aromatique faisant parti des COV biologique

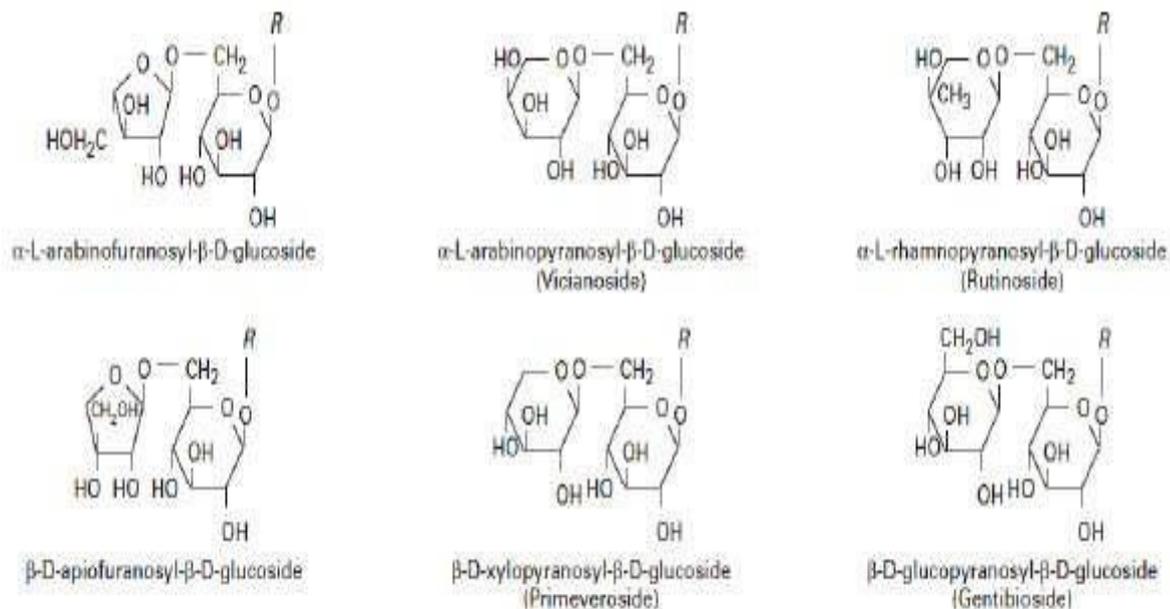


Figure 28. Structure de précurseurs glycosidiques aromatiques rencontrés.

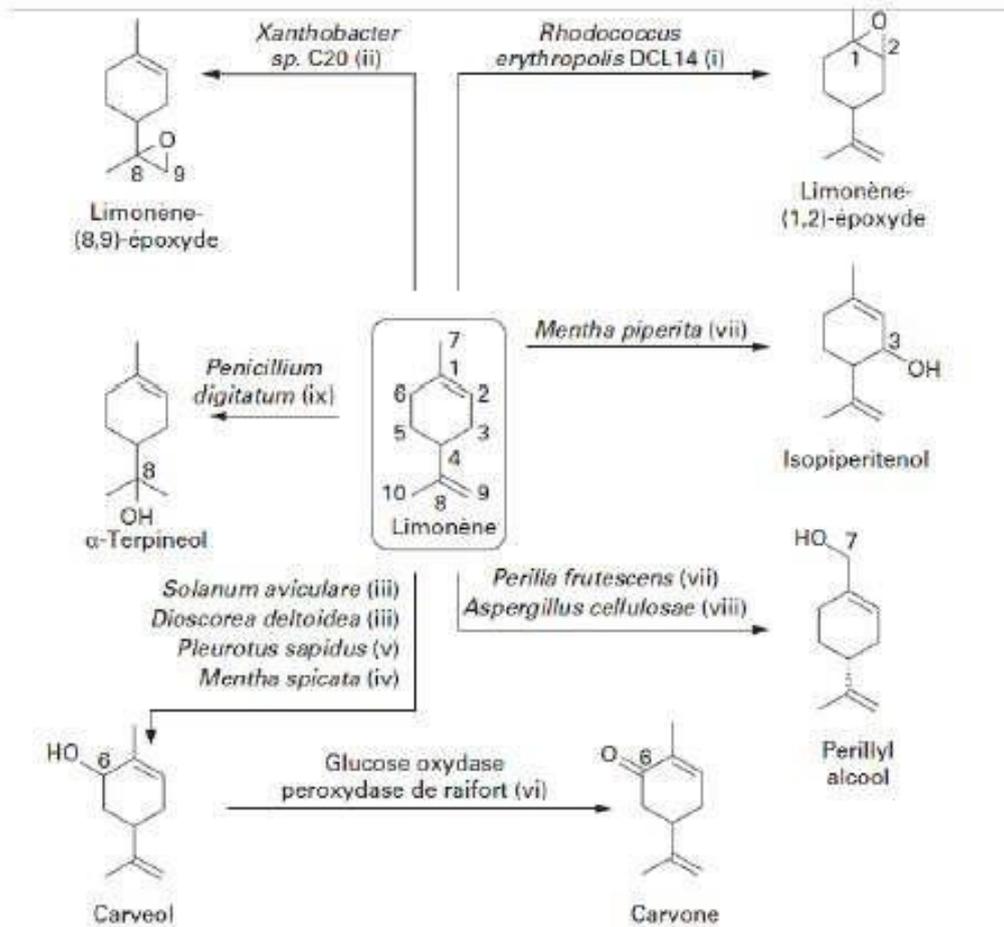
Exemple1. Utilisation des β D-glucosidases

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

Tableau. Effet de l'usage de préparation de β D-glucosidases de levures sur la libération de composés volatils ($\mu\text{g/l}$) après incubation 12h à 30°C , à partir de glucosides dans les jus de fruits.

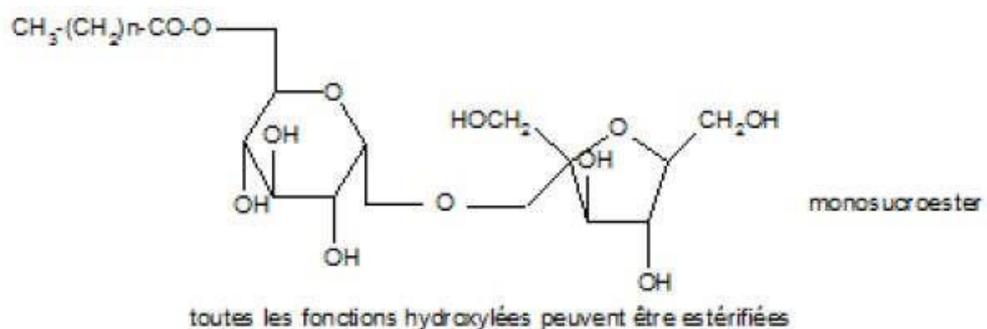
Arômes	Monoterpènes		Dérivés benzéniques	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai
Pêche (1)	350	1 260	260	1 350
Cerise	480	1 180	2 600	3 700
Fraise	100	770	130	1 080
Fruit de la passion (1)	180	200	250	500
Orange	110	870	nd	200
Papaye	1 800	2 200	nd	nd
Pomme	180	500	110	200
Raisin (Muscat de Rosada)	1 492	2 685	nr	nr
nd : non détecté nr : non rapporté (1) les augmentations observées de pinène et terpinène n'ont pas été comptées, car elles ne peuvent pas être dues à leur libération à partir de glycosides.				

Exemple2. Bioconversion de substrat aromatique pour la synthèse de nouvelles molécules aromatiques. Ici sont illustrés des exemples d'utilisation de microorganismes produisant les enzymes de conversion nécessaire. Ce mode de production d'arômes peut prétendre à la substitution de la production d'arômes de synthèses chimiques.



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

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



Principales applications des sucroesters:

- Alimentation humaine
- Formulation de médicaments

- Produits phytosanitaires
- Etude des protéines membranaires.
- Activités biologiques

Exemples d'application alimentaires:

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

Principe de la synthèse enzymatique des scuroesters:

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

Principaux paramètre à maîtriser :

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

Synthèse chimique	Synthèse enzymatique
Avantages	
<ul style="list-style-type: none"> - Économique - Rapide - Bons rendements - Réalisable avec de nombreuses molécules 	<ul style="list-style-type: none"> - Sélectivité - Conditions de réaction douces - Label "naturel" - Purification aisée - Conditions "solvent free" possibles - Composition du produit définie
Inconvénients	
<ul style="list-style-type: none"> - Toxicité (solvant et catalyseur) - Faible sélectivité - Température élevée (caramélisation, formation d'artéfacts, cyclisation, etc.) - Composition du produit non définie 	<ul style="list-style-type: none"> - Coûteuse au niveau industriel - Problèmes de solubilité des substrats - Rendements fort variables - Temps de réaction longs (> 24 h)

e. Biodisponibilité et acceptabilité des aliments

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

- Hydrolyse de molécules complexes
- Restructuration
- Réduction ou élimination du pouvoir allergisant de certaines molécules (Quelques cas:
 - _ Hydrolyse du lactose
 - _ Préparation des laits de nourrissons à partir de lait de vache
 - _ Réduction de l'allergenicité des protéines et préparation d'hydrolysats. E. g. : gluten, Protéines de lait (l'hydrolyse de la β -lactoglobuline).

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

a. Enzymes catalysant des synthèses : La synthèse chimique de molécules d'intérêt reste jusqu'à nos jours la plus utilisée (points fort):

- Maîtrise des procédés et développement du génie chimique ;
- stabilité des réactions et savoir faire ;
 - a. - haut rendements de réaction

Cependant, présentant de sérieuses menaces en terme de pollution de l'environnement et/ ou en terme de toxicité pour la faune et la flore et les conséquences sur la santé humaine, de

nombreux travaux de substitution par des méthodes dites « chimie verte » ont été mis au point. Ces techniques font appel à des procédés basés sur l'utilisation de biomolécules ayant des propriétés catalytiques semblables à la catalyse chimique. Les enzymes en sont le meilleur exemple.

Exemples les plus courants :

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

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

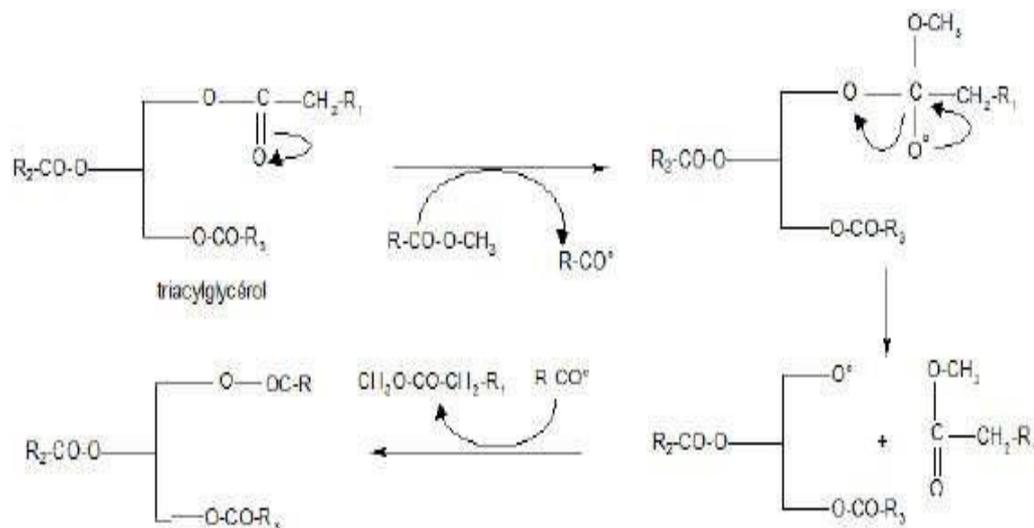


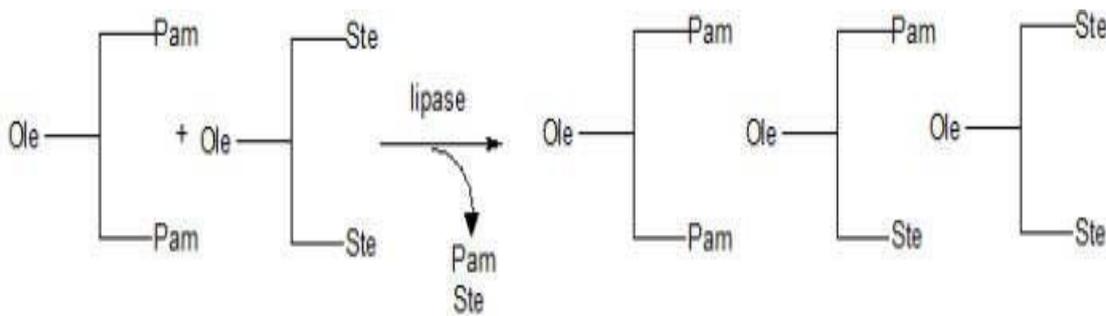
Figure 29. Réaction d'interestérification

L'interesterification permettra de lever la distribution aléatoire des acides gras. Cette technique est connue depuis la moitié du XVIII^{ème} siècle et utilisée depuis 1940 dans l'industrie des corps gras et plus particulièrement pour modifier les propriétés du lard et son utilisation en

panification. Il y a un regain d'intérêt depuis 1970 avec la mise sur le marché des remplaceurs de matière grasse.

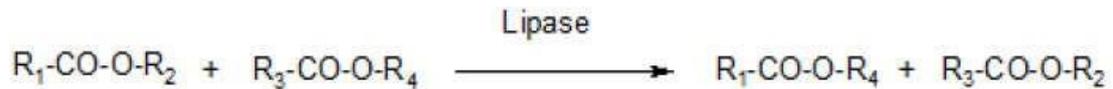
L'interesterification enzymatique permet d'obtenir des structures particulières utilisées en chocolaterie par exemple ou encore en confiserie. On peut espérer obtenir des structures mieux définies que par réaction chimique. Les lipases vont intervenir dans les différents types de réaction. Les mécanismes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

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



L'interesterification en chocolaterie :

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



Clarification enzymatique des jus de fruits

La transformation des fruits en jus clairs, en jus troubles ou en jus concentrés nécessite dans la plupart des cas un traitement enzymatique. Utilisées en extraction (avant pressage) les enzymes permettent d'augmenter les rendements en jus et d'optimiser le pressage (gain économique important). Sur jus, elles favorisent une clarification rapide par diminution de la viscosité et améliorent la filtrabilité. Erbslöh Geisenheim a mis au point une large gamme de formulations enzymatiques permettant de répondre à chaque problématique et ce qu'elles que soient les caractéristiques de la matière première à traiter.

Les industriels spécialisés dans les jus (de pommes notamment) utilisent largement les systèmes enzymatiques afin de garantir aux consommateurs une qualité organoleptique optimale des jus. C'est particulièrement le cas avec les pectinases qui sont très utilisées en industries végétales car elles permettent d'avoir de meilleurs rendements au niveau des filtrations et stabilités des jus, spécifiquement sur les fruits tropicaux.

Les enzymes en panification

Dans le secteur de la boulangerie, la recherche des causes du pourrissement ou du durcissement du pain reste sans réponses. De nombreuses fabriques de pain utilisent des émulsionnants chimiques, par exemple les monoglycérides, afin de retarder le durcissement du pain. Cependant, depuis quelques années, les enzymes, substances plus naturelles, remplacent les monoglycérides. On obtient avec l'amylase un pain à l'aspect plus frais qu'avec les agents chimiques.

Les enzymes participent au processus de panification. Certaines sont aujourd'hui ajoutées en quantités très faibles (entre 10 et 100 g/tonne de farine) pour l'optimiser. Cependant, le développement de nouvelles méthodes de production plus performantes et l'utilisation de nouvelles sources d'enzymes telles que les micro-organismes produisant une source spécifique d'enzymes utilisés dans l'industrie agroalimentaire ont conduit à l'utilisation d'enzymes plus

complexes. Leurs domaines d'application sont très variés et on les retrouve non seulement en panification mais aussi en pâtisserie et en viennoiserie.

Additifs

Les additifs alimentaires sont des substances ajoutées en faibles quantités aux aliments industriels pour en améliorer la saveur, la texture, l'apparence... Composés d'une molécule simple (contrairement aux ingrédients souvent plus complexes) ils possèdent tous un code, Exxx, attribué par la Commission du Codex Alimentarius.

Les additifs alimentaires se décomposent en plusieurs groupes en fonction de leur rôle

- les colorants
- les conservateurs
- les antioxydants
- les agents de texture (dont les émulsifiants et les amidons modifiés)
- les édulcorants
- les exhausteurs de goût
- les acidifiants

Les enzymes alimentaires sont des produits contenant une ou plusieurs enzymes capables de catalyser une réaction biochimique spécifique. Ces produits sont obtenus à partir de plantes, d'animaux, de micro-organismes ou de produits dérivés, y compris un produit obtenu par un procédé de fermentation à l'aide de micro-organismes. Elles sont ajoutées à des denrées alimentaires à des fins technologiques à toute étape de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage. Les fonctions technologiques de ces enzymes alimentaires peuvent être par exemple d'agir sur la coagulation de la caséine pour la fabrication de fromages, ou encore de dégrader l'amidon en sucres fermentescibles.

2.Applications médicales et pharmaceutiques

Le développement des applications médicales pour les enzymes a été au moins aussi important que celui des applications industrielles, reflétant l'ampleur des récompenses potentielles: par exemple, les enzymes pancréatiques sont utilisées depuis le XIXe siècle pour le traitement des troubles digestifs. La variété des enzymes et leurs applications thérapeutiques potentielles sont

considérables. A l'heure actuelle, les applications les plus réussies sont extracellulaires: utilisations purement topiques, l'élimination des substances toxiques et le traitement des troubles de la vie en danger dans la circulation sanguine.

3.Enzymes utilisées dans les méthodes d'analyses de biologie moléculaire

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

a. Enzymes de restriction:

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

b. ADN Polymérase:

L'utilisation la plus connue est la réplication de l'ADN. Ainsi, en présence des bases ACTG+enzyme+ADN, le fragment d'ADN peut être dupliqué. En in vivo, cette enzyme est responsable de la synthèse de l'ADN à partir des monomères deoxynucléotides. Cette enzyme est utilisée dans toutes les étapes in vitro de techniques de biologie moléculaire faisant appel à la réplication du brin d'ADN. La PCR (Polymerase chain reaction) est une méthode d'amplification de l'ADN, permettant ainsi d'avoir plusieurs copies utilisable dans les techniques d'analyse de l'expression de gène ou dans le génie génétique

c. Transcriptase inverse:

Enzyme servant à synthétiser de l'ADN complémentaire ADNc à partir de l'ARN. Etape cruciale dans la RT-PCR (revers transcription-PCR). Le principe de son fonctionnement est lié à sa composition. En effet, elle comprend en général une polymérase de l'ADN ARNdépendante et une polymérase de l'ADN ADN-dépendante, lesquelles travaillent en synergie pour réaliser

la transcription en sens inverse de la direction standard. Cette transcription inverse ou rétrotranscription permet comme son nom l'indique de transcrire à l'envers c'est-à-dire d'obtenir de l'ADN à partir d'ARN.

4. Enzymes utilisées en thérapie et analyse.

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

Tableau. Enzymes utilisées en domaine thérapeutique

Enzyme	EC number	Reaction	Use
Asparaginase	3.5.1.1	L-Asparagine $H_2O \longrightarrow$ L-aspartate + NH_3	Leukaemia
Collagenase	3.4.24.3	Collagen hydrolysis	Skin ulcers
Glutaminase	3.5.1.2	L-Glutamine $H_2O \longrightarrow$ L-glutamate + NH_3	Leukaemia
Hyaluronidase ^a	3.2.1.35	Hyaluronate hydrolysis	Heart attack
Lysozyme	3.2.1.17	Bacterial cell wall hydrolysis	Antibiotic
Rhodanase ^b	2.8.1.1	$S_2O_3^{2-} + CN^- \longrightarrow SO_3^{2-} + SCN^-$	Cyanide poisoning
Ribonuclease	3.1.26.4	RNA hydrolysis	Antiviral
β -Lactamase	3.5.2.6	Penicillin \longrightarrow penicilloate	Penicillin allergy
Streptokinase ^c	3.4.22.10	Plasminogen \longrightarrow plasmin	Blood clots
Trypsin	3.4.21.4	Protein hydrolysis	Inflammation
Uricase ^d	1.7.3.3	Urate + $O_2 \longrightarrow$ allantoin	Gout
Urokinase ^e	3.4.21.31	Plasminogen \longrightarrow plasmin	Blood clots

^aHyaluronoglucosaminidase ; ^bthiosulphate sulfurtransferase ; streptococcal cysteine protease ;^durate oxidase ;^e plasminogen activator.

5. Les biocapteurs

Le terme « biocapteur » représente la fusion de deux des plus importantes technologies de ce siècle : l'électronique et les biotechnologies. Leur association permet des dosages rapides, sensibles et spécifiques.

Un biocapteur est un système analytique alliant des technologies différentes issues par exemple de la biologie moléculaire, la microélectronique, l'optique et l'informatique. Il se compose d'un élément biologique, que l'on appelle « ligand » ou biorécepteur, lui-même lié à un transducteur (pouvant être optique ou plus généralement électromagnétique, électrochimique, piézoélectrique, calorimétrique ou acoustique) permettant de transformer un signal biochimique en un signal physique quantifiable (figure 19). Selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), un biocapteur est un appareil qui utilise des réactions biochimiques spécifiques médiées par des enzymes isolées, des immunosystèmes, des tissus, organites ou des cellules entières pour détecter des composés chimiques en général par des signaux électriques, thermiques ou optiques.

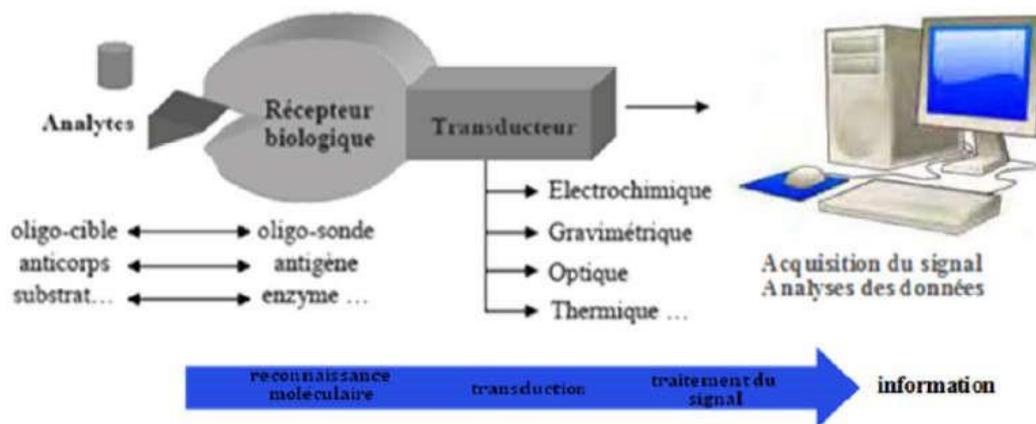


Figure . Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Le récepteur biologique peut être de diverses natures (enzymes, organites cellulaires, cellules, tissus...) catalyse des réactions biochimiques de substrats, ou interagit avec des structures complémentaires (antigène, anticorps, ADN ou récepteur-hormones...) conduisant à des changements de propriétés physiques, chimiques ou optiques des substrats. Ces différents changements de propriétés et leurs amplitudes nous permettent de déterminer la quantité de matière ayant interagit par unité de surface, c'est-à-dire le taux de recouvrement de notre biocapteur. Quant au transducteur, il convertit ce changement en un signal électrique mesurable. Ce signal électrique va finalement être transmis au système d'analyse de données et traité par des circuits électroniques [16], après avoir éventuellement subi une amplification

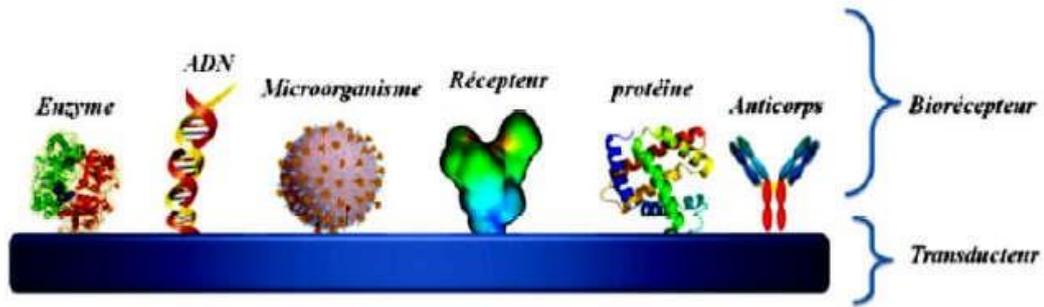


Figure. Représentation schématique des différents bio récepteurs

Ils existent différents types de biocapteur. Les biocapteurs enzymatiques sont les plus utilisées et les plus commercialisées. En effet, elles présentent un grand nombre d'avantages notamment la reproductibilité des lots mais par contre il peut y avoir une instabilité de leur fonctionnement et la nécessité d'utiliser un cofacteur ou plusieurs enzymes associées pour un même biocapteur. Les enzymes utilisées sont les enzymes REDOX (réductases, oxydases, oxydo-réductases) et les enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, estérases).

Exemple. Biocapteur à glucose (glucomètre): Utilise la glucose oxydase (GOD ou GOx) immobilisée selon la réaction suivante:

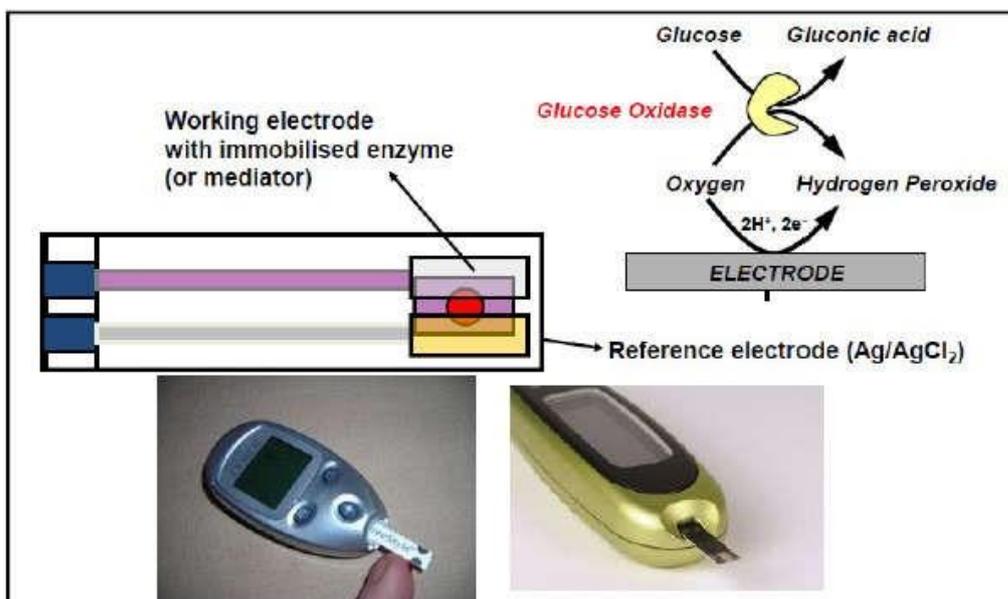


Figure. Biocapteur à glucose (glucomètre).

Exemple. 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.

6. Applications industrielle

1. Industrie du papier

Le blanchiment est l'élimination de la lignine des pulpes chimiques du papier. Cette étape de la fabrication du papier est nécessaire pour des raisons esthétiques ainsi que pour améliorer les qualités du produit final. Le blanchiment est constitué de diverses étapes et varie en fonction du type de substances utilisées. On utilise traditionnellement pour le blanchiment de la pâte kraft des composés chlorés. Cette méthode produisant des déchets toxiques (mutagènes, cancérigènes, bioaccumulables) qui entraînent de nombreuses altérations des systèmes biologiques, l'utilisation de ces agents blanchissants est interdite dans divers États développés. Les enzymes sont une bonne alternative aux agents blanchissants chlorés. L'utilisation de xylanases dans l'étape de blanchiment de la pâte kraft permet d'éviter le chlore et de réduire les déchets toxiques, d'éliminer l'étape du goulot de bouteille (en raison de la capacité limitée des cuves de dioxyde de chlore), d'augmenter le degré de blanc de la pâte et de diminuer les coûts de l'opération, notamment dans les usines qui utilisent de grandes quantités de dioxyde de chlore. Enfin, le prétraitement aux enzymes permet également d'augmenter le degré de blanc final de la pâte et de réduire la présence des agents chimiques dans l'étape du blanchiment.

Le désencrage est une étape nécessaire si l'on souhaite utiliser comme matières premières des fibres récupérées dans la fabrication de papier et de carton ; la réutilisation de ces fibres dépend de l'élimination des encres et des autres polluants. Le désencrage présente néanmoins des inconvénients, notamment dans le cas du papier recyclé et produit de nouveaux déchets solides et liquides. Voici les enzymes utilisées dans les étapes du désencrage : les lipases, les estérases,

les pectinases, les hemicellulases, les cellulases et les enzymes lignitiques. Les deux premières, les lipases et les estérases, dégradent les encres à base d'huiles végétales. Les autres (les pectinases, les hemicellulases, les cellulases et les enzymes lignitiques), modifient la surface de la fibre de cellulose ou les unions proches des particules d'encre, ce qui libère la teinture de la fibre et permet de la séparer par flottation ou lavage.

2. Industrie Des détergents

L'industrie des détergents utilise le plus gros volume d'enzymes, c'est-à-dire 45 % du total du marché. Les enzymes utilisées dans ce secteur sont les protéases, bactériennes et fongiques, les amylases, les cellulases et les lipases. Les enzymes les plus présentes sur le marché sont les protéases bactériennes, dont il existe actuellement une grande variété.

Ces enzymes possèdent des propriétés nettoyantes croissantes et une grande stabilité face aux oxydants. Les alpha-amylases sont très efficaces en ce qui concerne la dégradation des chaînes d'amidon, ce qui est la raison pour laquelle elles améliorent l'élimination des particules de poussière et de terre qui restent présentes dans les tissus à cause de la trame des polymères de l'amidon. Utiliser les protéases et les amylases conjointement permet d'obtenir un meilleur lavage des tissus ; en effet, il y a diminution de la charge des produits chimiques dans le détergent et de la température de lavage.

Les cellulases sont quant à elles utilisées à la place des tensioactifs ioniques pour améliorer la douceur des tissus en coton. Elles sont également actives dans l'élimination des particules de poussière et de terre car elles éliminent les microfibrilles des fibres de coton, ce qui produit de plus un effet de brillantage de la couleur. 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 :

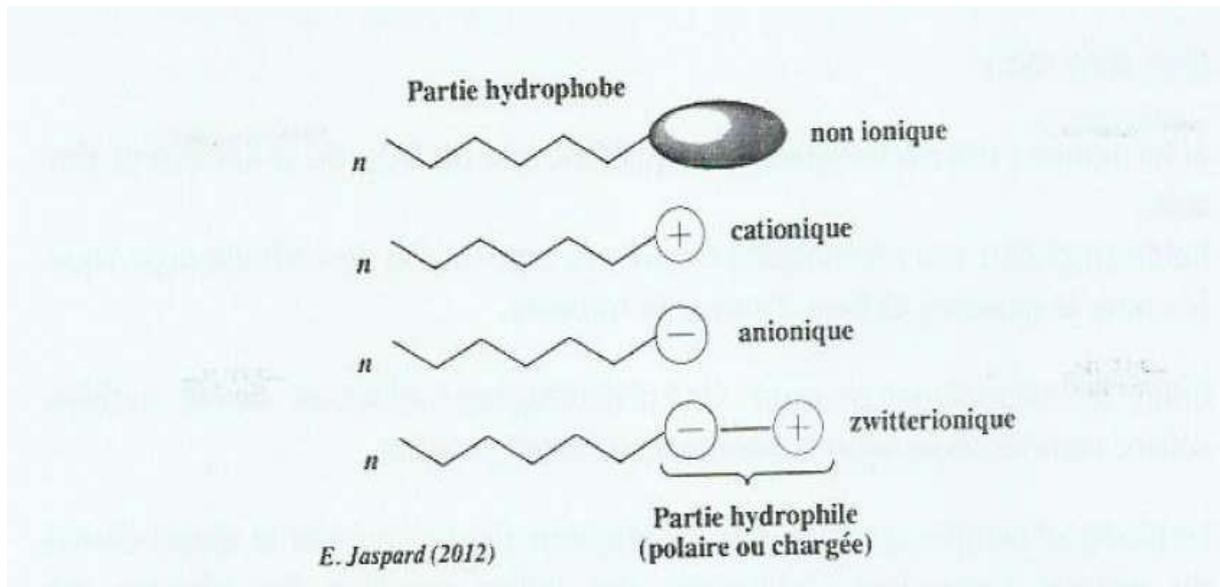
- Aux tensioactifs non ioniques
- Aux savons
- Aux agents oxydants
- Aux agents qui augmentent l'aspect lumineux
- Aux autres composés plus ou moins actifs
- Et ce à des pH compris entre 8.0 et 10.5
- Enfin, l'incorporation d'enzymes a pour but une efficacité à des températures moins élevées (économie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

Les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides présentes dans les taches de graisse, ce qui les rend hydrophiles et permet une élimination facile au lavage. Il faut signaler que les enzymes utilisées dans les détergents ont un impact sur l'environnement positif. Elles entraînent en effet des économies énergétiques dues à la réduction des températures du lavage, permettent la réduction de la teneur en produits chimiques des détergents, sont biodégradables, n'ont pas d'impact négatif dans les processus d'épuration des eaux et ne présentent pas de risques pour la vie aquatique.

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 (European 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 protéases à sérines peuvent être utilisées dans la formulation des détergents.

3. Désencollage de textile

L'amidon est la substance naturelle dont on recouvre le fil à coudre pour augmenter sa résistance avant le tissage. Cet amidon doit être éliminé avant de procéder aux traitements finaux du tissu: blanchiment, teinture, traitements spéciaux, etc. L'élimination traditionnelle s'effectuait auparavant en milieu acide. Aujourd'hui, le désencollage enzymatique utilise des amylases en remplacement de l'acide. L'industrie textile utilise ce procédé biotechnologique depuis le début du XXe siècle. Les amylases sont très efficaces dans le désencollage et ne génèrent pas de problèmes de déchets dangereux pour l'environnement comme c'est le cas des acides minéraux, des bases ou des oxydants.

4. Industrie de cuir

Le tannage des peaux est l'un des processus industriels aux enzymes les plus anciens. En voici les étapes traditionnelles : séchage, trempage, élimination des poils et de la laine, raclage et tannage. Le tannage utilise de nombreux produits chimiques pour éliminer les poils, les graisses et les protéines non-désirées (élastine, kératine, albumine et globuline), laissant intact le collagène dans l'étape précédant le tannage de la peau. Les produits chimiques utilisés nuisant considérablement à l'environnement, on utilise aujourd'hui des protéases telles que la trypsine

et les lipases. Ces substances, qui réduisent l'utilisation des sulfites, des solvants organiques et des tensioactifs synthétiques, permettent d'obtenir un produit doté de meilleures propriétés finales.

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>

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