PRODUCTION INDUSTRIELLE DES ENZYMES

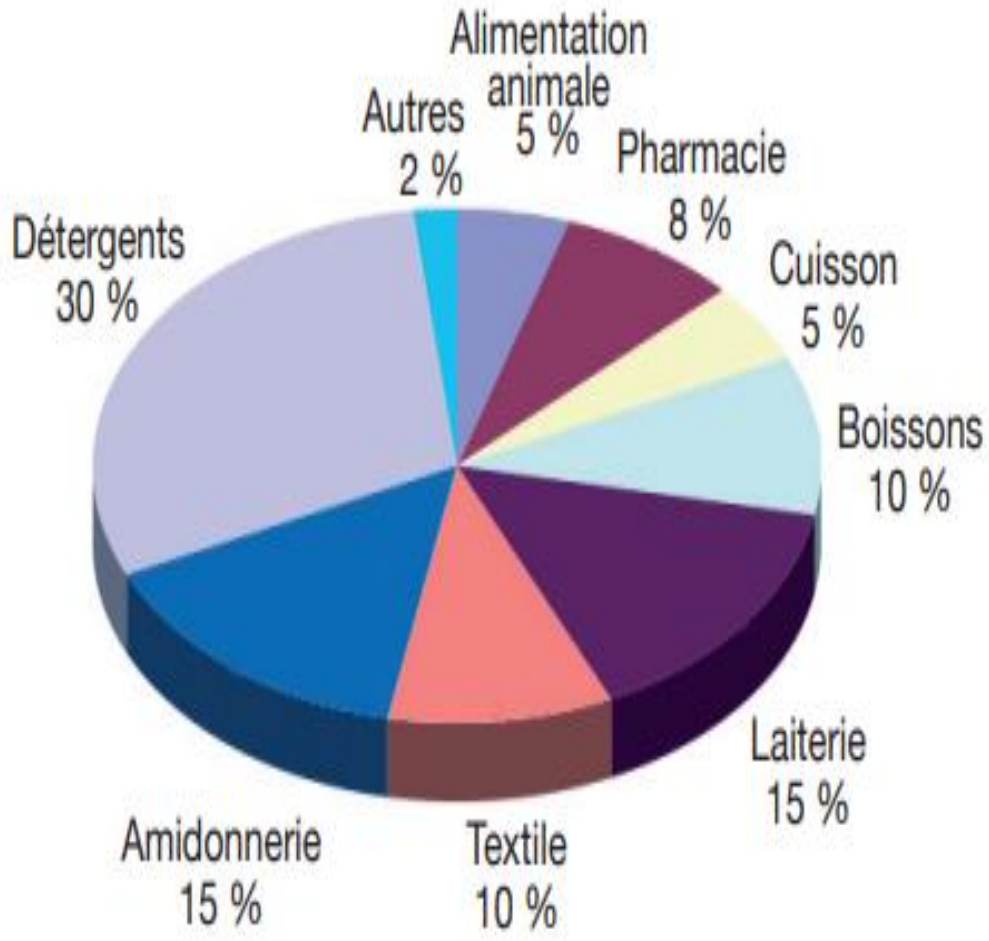
Dr. Amari Salima

Master II Microbiologie appliquée

MARCHÉ DES ENZYMES

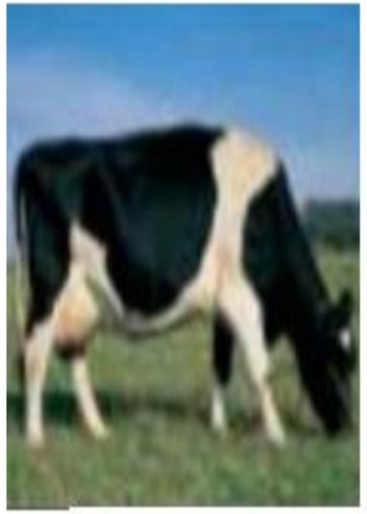
L'utilisation des enzymes à des fins industrielles est rendue difficile par leur instabilité, l'activité catalytique est souvent perdue en quelques heures.

Les enzymes sont utilisées dans toutes les industries de la fermentation, que ce soit pour les produits agroalimentaires (jus de fruit, sucre, additifs, viandes, céréales, laits, fromages, plats cuisinés, pain, biscuiterie), dans l'industrie pharmaceutique (antibiotiques, acides divers, vitamines), l'industrie biomédicale (réactifs), les industries biochimiques du nettoyage et de la décontamination (détergents, traitement des surfaces)



ORIGINES DES ENZYMES

Cellules d'organes de vegetaux/animaux



Animals (≅ 8%)

Fermentations microbiennes

Enzymes intracellulaires

Microorganisms (>80%)

Enzymes extracellulaires

Latex de plantes

Plants (≅ 4%)

ORIGINES DES ENZYMES

Une origine végétale:

Les enzymes d'origine végétale et spécialement les protéases

→la papaïne en provenance d'une plante tropicale (*Carica papaya L.)*

→la broméline extraite de l'ananas (*Ananas comosus Merr*),

→la ficine issue de la figue (*Ficus globrata*)

→**Une origine animale:**

Les enzymes d'origine animale incluent des protéinases comme la pepsine et la présure.

ORIGINES DES ENZYMES

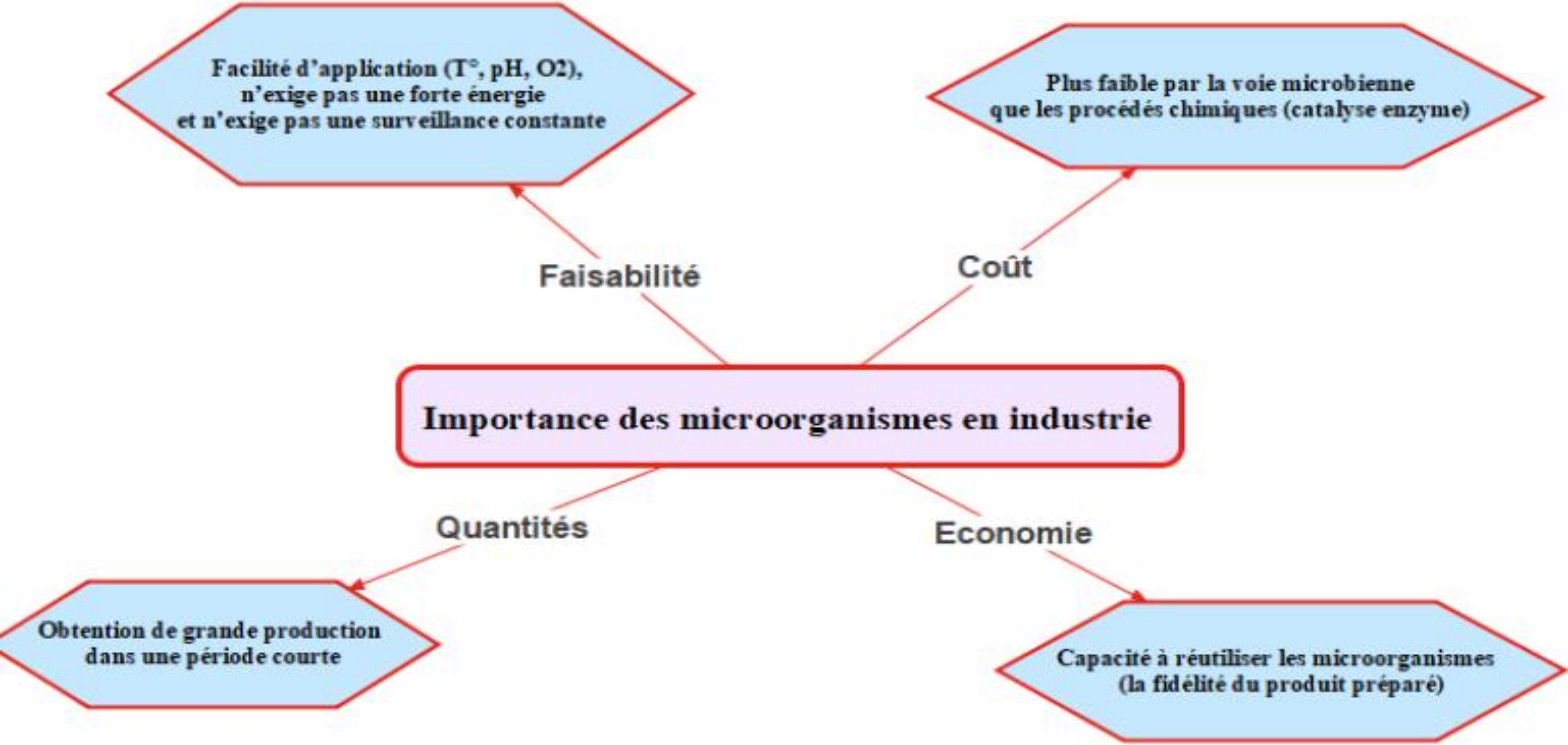
Une origine microbienne:

Dés que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les micro-organismes

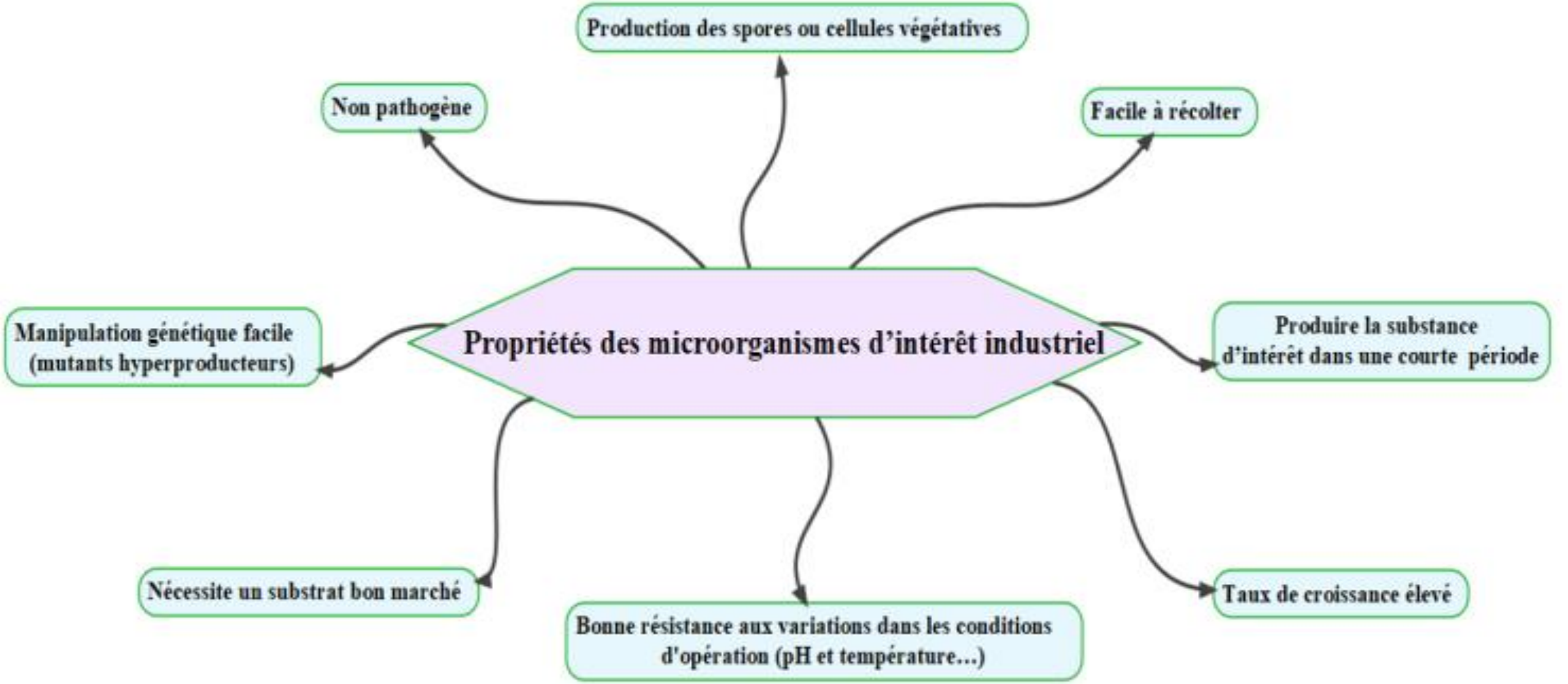
la production industrielle d'enzymes s'orientée vers les processus fermentaires.

La plupart des enzymes industrielles sont produites par un nombre limité de microorganismes tels que les moisissures Aspergillus, Trichoderma et Streptomyces, le genre bactérien Bacillus

AVANTAGES D' UTILISTION DES MICROORGANISMES



PROPRIÉTÉS DES MICROORGANISMES À INTÉRÊT INDUSTRIEL



Extraction/ production des enzymes

L'extraction des enzymes à partir les plantes et les animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler.

Les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production qui est indépendante des contraites géographiques et contraintes saisonières .

L’intérêt de l’industrie agroalimentaire pour les enzymes

AINSI, UNE POSSIBILITÉ D’ UTILISER DE MATIÈRE PREMIÈRE BON MARCHÉ.

DES RENDEMENTS DE PRODUCTIONS PEUT ÊTRE AMÉLIORÉS PAR L’AMÉLIORATION DES SOUCHES MICROBIENNES ET L’OPTIMISATION DES CONDITION

AINSI, UNE PURIFICATION FACILE EN CAS DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES

ENZYMES FONGIQUES DANS LE SECTEUR AGROALIMENTAIRE

Enzymes d'origines fongiques

Enzyme	EC	Sources		Application
α-Amylase	3.2.1.1	*Aspergillus*	E	panification
Catalase	1.11.1.6	*Aspergillus*	I	Alimentaire
Cellulase	3.2.1.4	*Trichoderma*	E	Traitement dechets solides
Dextranase	3.2.1.11	*Penicillium*	E	Alimentaire
Glucose oxidase	1.1.3.4	*Aspergillus*	I	Alimentaire
Lactase	3.2.1.23	*Aspergillus*	E	Laiterie
Lipase	3.1.1.3	*Rhizopus*	E	Alimentaire
Rennet	3.4.23.6	*Mucor miehei*	E	Fromagerie
Pectinase	3.2.1.15	*Aspergillus*	E	Boissons
Protease	3.4.23.6	*Aspergillus*	E	Boulangerie

E:extracellulaire I: Intracellulaire

ENZYMES BACTERIENNE DANS LE SECTEUR AGROALIMENTAIRE

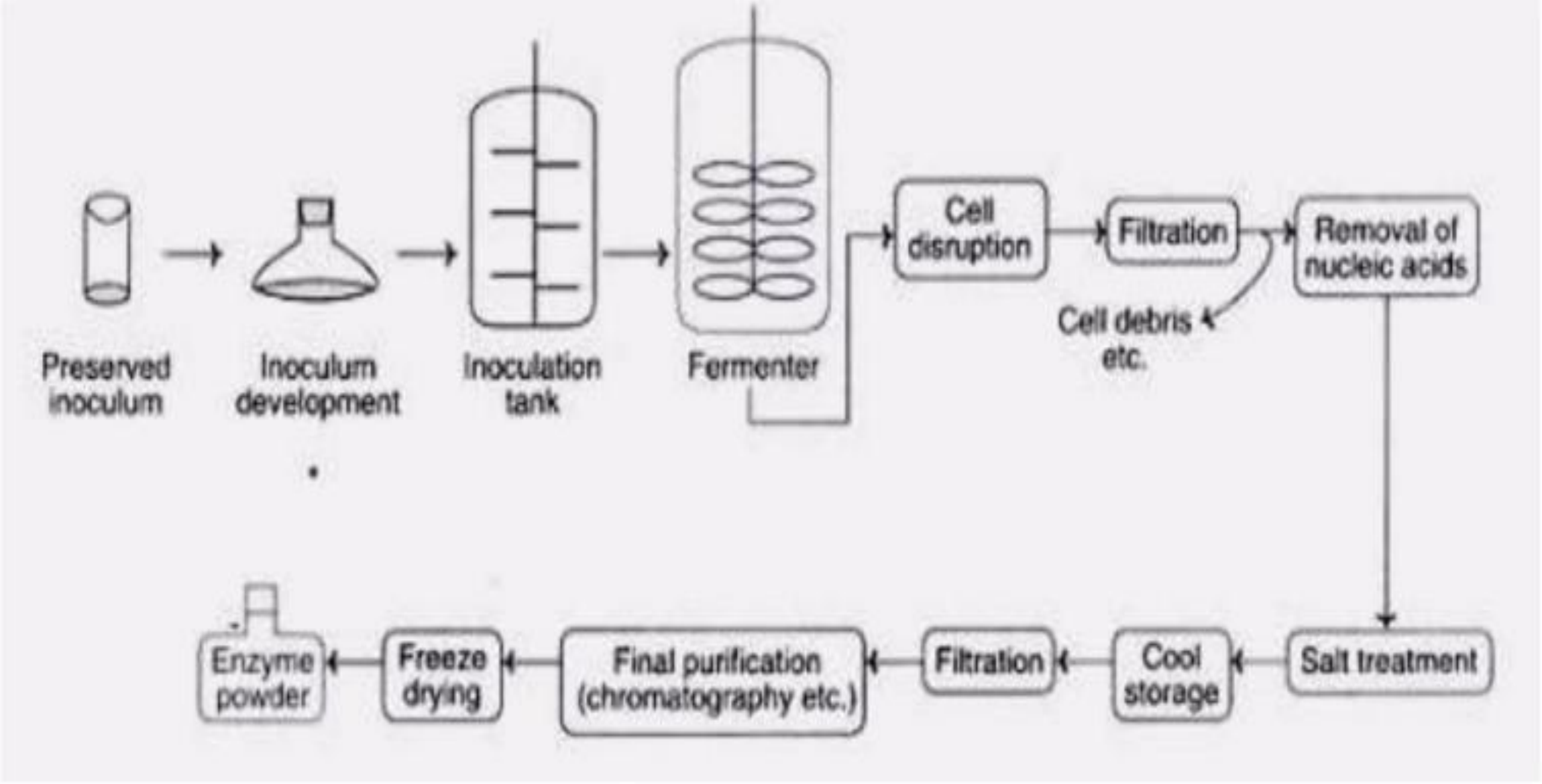
Enzymes d'origines bacteriennes

Enzyme		Sources		Application
α-Amylase	3.2.1.1	*Bacillus*	E	Amidon
β-Amylase	3.2.1.2	*Bacillus*	E	Amidon
Asparaginase	3.5.1.1	*Escherichia coli*	I	Santé
Glucose isomerase	5.3.1.5	*Bacillus*	I	Sirop de fructose
Penicillin amidase	3.5.1.11	*Bacillus*	I	Pharmaceutique
Protease	3.4.21.14	*Bacillus*	E	Détergent

ETAPES DE PRODUCTION D'ENZYMES

- CHOIX D'UNE ENZYME INDUSTRIELLE
- CHOIX DES SOUCHES PRODUCTRICES
- AMELIORATION DES SOUCHES PRODUCTRICES
- FORMULATION DU MILIEU
- PROCESSUS DE FABRICATION
- RÉCUPEEATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

ETAPES DE PRODUCTION D'ENZYMES



CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CHOIX D'UNE ENZYME INDUSTRIELLE

- Activité maximale en présence des basses concentrations du substrat
- N a pas besoin du cofacteur
- Réaction enzymatique accomplit dans un bref délai
- Effets des inhibiteurs
- Affinité aux substrats
- Spécificité

CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CHOIX DES MICROORGANISMS PRODUCTRICES

Les critères les plus importants pour la sélection du micro-organisme sont

- l'organisme doit produire **les quantités maximales d'enzyme souhaitées** en peu de temps tandis que les quantités d'autres métabolites produites sont minimales.

- Dans le meilleur des cas **l'enzyme est sécrétée à l'extérieur de la cellule**. Ceci rend l'extraction et la purification beaucoup plus faciles comparées à la production des enzymes intracellulaires, qui doivent être purifiées des milliers de protéines cellulaires et d'autres composants.

CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CHOIX DES MICROORGANISMS PRODUCTRICES

- l'organisme producteur doit répondre aux exigences de confinement (c'est-à-dire faire partie des souches GRAS « generaly recognized as safe »). Ce qui est particulièrement important lorsque l'enzyme produite est employée en industrie alimentaire.

- Une fois l'organisme sélectionné, l'amélioration de la souche pour optimiser la production d'enzymes peut être réalisée par des méthodes appropriées (mutagènes, rayons UV).

FORMULATION DU MILIEU DE CULTURE

- Le milieu de culture choisi doit contenir tous les nutriments nécessaires pour favoriser une croissance adéquate des micro-organismes qui aboutira finalement à une bonne production d'enzymes

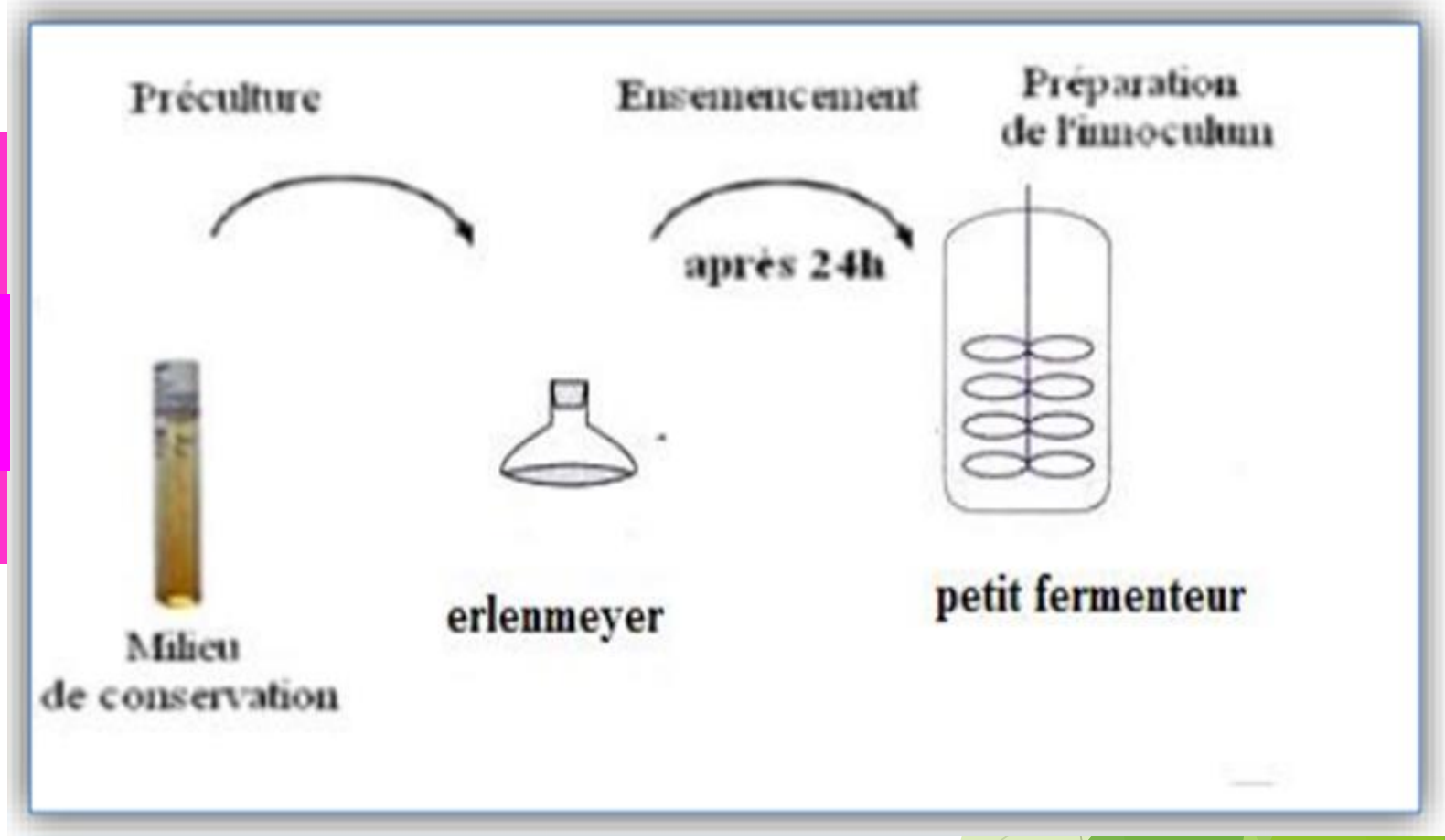
- Les ingrédients du milieu doivent être facilement disponibles à faible coût et être sans danger sur le plan nutritionnel. Parmi les substrats couramment utilisés pour le milieu, on trouve l'hydrolysat d'amidon, l'eau de macération de maïs, l'extrait de levure, le lactosérum et la farine de soja. Certaines céréales (blé) et légumineuses (arachide) ont également été utilisées.

- Le pH du milieu doit être maintenu optimal pour une bonne croissance microbienne et une bonne production d'enzymes.

PROCESSUS DE FABRICATION

Préparation d'inoculum

la capacité de production de la souche doit être préservée et tout risque de contamination doit être éliminé.



Paramètres à contrôler

- pH
- O2
- Humidté
- Temperature
- Mousses

RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

L'enzyme produite peut être excrétée dans le milieu de culture (enzymes extracellulaires) ou être présente dans les cellules (enzymes intracellulaires).

Selon les besoins, l'enzyme commerciale peut être brute ou hautement purifié

outre, il peut se présenter sous forme solide ou liquide.

Les étapes de traitement en aval, c'est-à-dire les étapes de récupération et de purification employées, dépendront de **la nature de l'enzyme et du degré de pureté souhaité.**

RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

Élimination des débris cellulaires :**La filtration ou la centrifugation** peuvent être utilisées pour éliminer les débris cellulaires.

Élimination des acides nucléiques :Les acides nucléiques interfèrent avec la récupération et la purification des enzymes. Ils peuvent être précipités et éliminés par **l'ajout de polycations** tels que les polyamines, la streptomycine et la polyéthylèneimine.

L'élimination des acides nucléiques n'est pas nécessaire dans les aliments pour animaux, mais elle l'est dans les aliments pour humains.

RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

Précipitation enzymatique :Les enzymes peuvent être précipitées à l'aide de sels (sulfate d'ammonium) et de solvants organiques (isopropanol, éthanol et acétone).

La précipitation est avantageuse car l'enzyme précipitée peut être dissoute dans un volume minimal pour concentrer l'enzyme.

Répartition liquide-liquide :Une concentration supplémentaire des enzymes souhaitées peut être obtenue par extraction liquide-liquide à l'aide de polyéthylène glycol ou de polyamines.

RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

En général, la récupération d'une enzyme extracellulaire présente dans le bouillon est relativement plus simple par rapport à une enzyme intracellulaire.

Les étapes de récupération et de purification seront les mêmes pour les enzymes intracellulaires et extracellulaires, une fois que les cellules sont perturbées et que les enzymes intracellulaires sont libérées.

PURIFICATION ET RECUPERATION DES ENZYMES

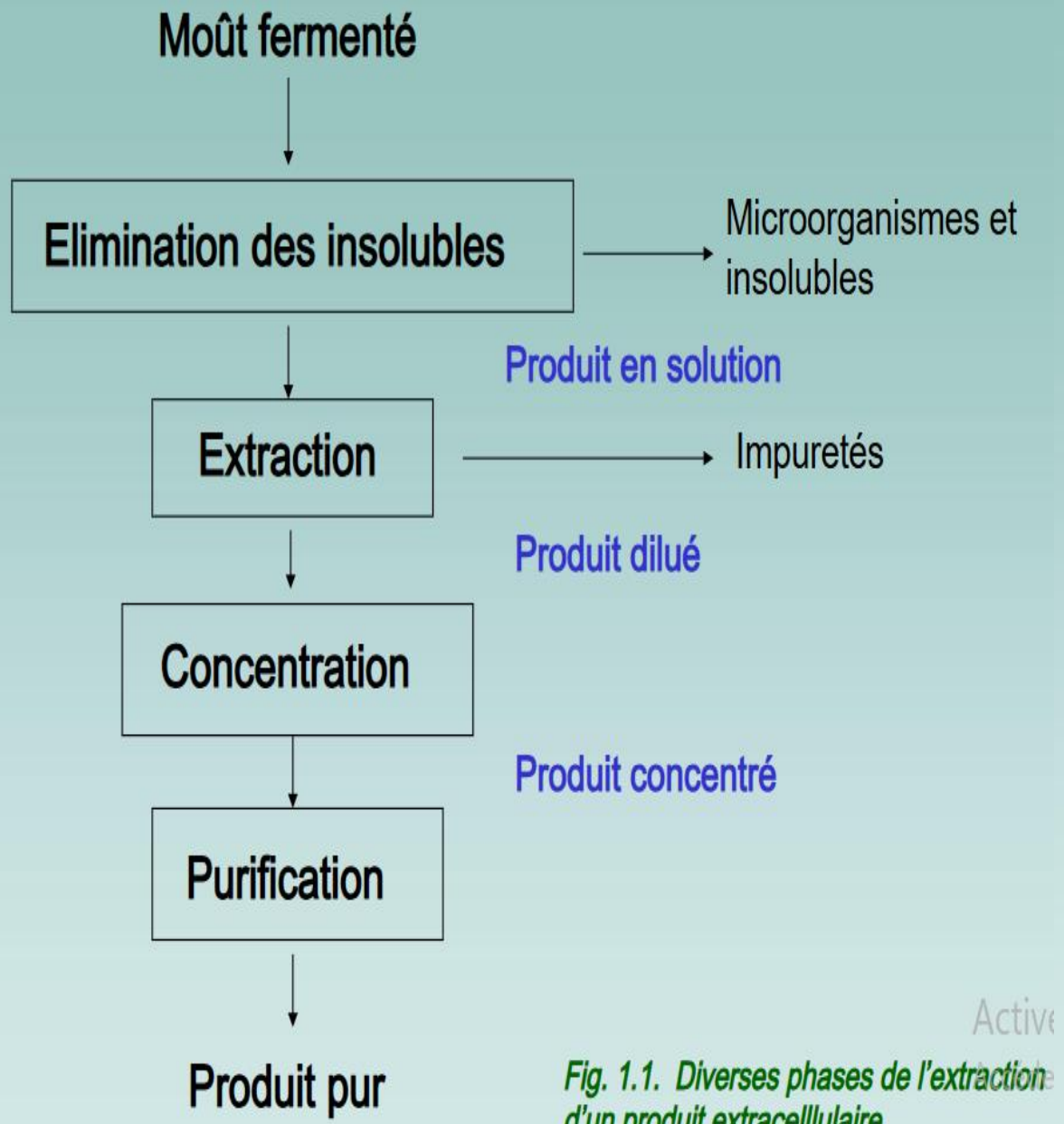


Fig. 1.1. Diverses phases de l'extraction d'un produit extracelllulaire

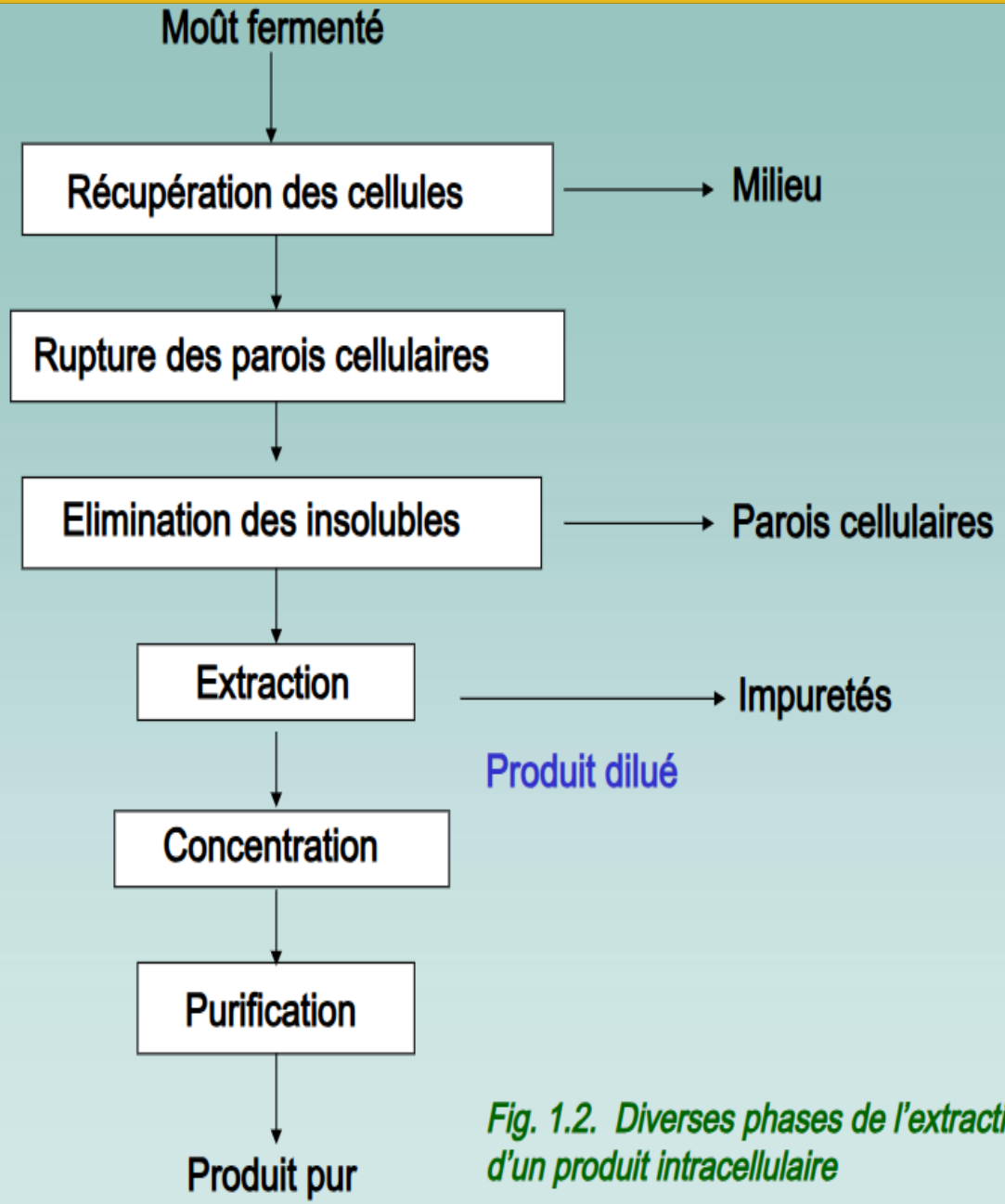


Fig. 1.2. Diverses phases de l'extraction d'un produit intracellulaire

RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

Pour la libération d'enzymes intracellulaires, des techniques spéciales sont nécessaires à la perturbation cellulaire.
Les cellules microbiennes peuvent être décomposées par des

Moyens physiques (sonication, billes de verre).

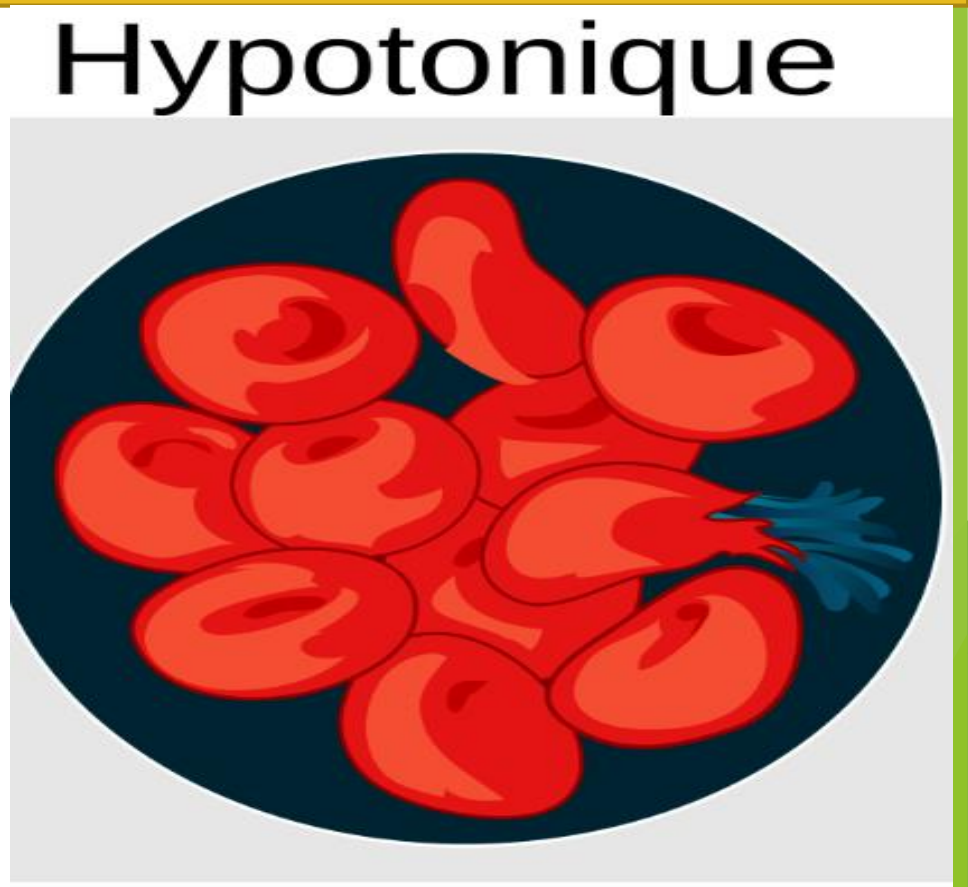
Les parois cellulaires des bactéries peuvent être lysées par l'enzyme lysozyme (Choc enzymatique). Pour les levures, on utilise l'enzyme ß-glucanase.

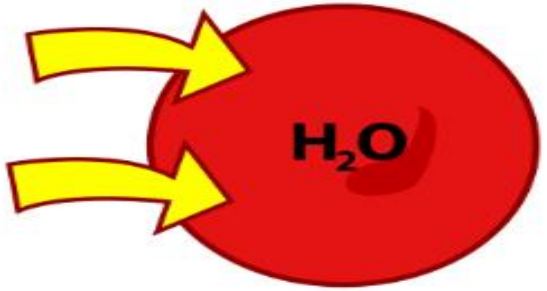
Cependant, les méthodes enzymatiques sont coûteuses.

RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

Choc osmotique

- Permet de briser certaines cellules fragiles
- Les cellules sont incubées dans une solution hypo-osmotique.
- L'eau pénètre dans la cellule
- Une rupture de la membrane plasmique





Congélation/décongélation

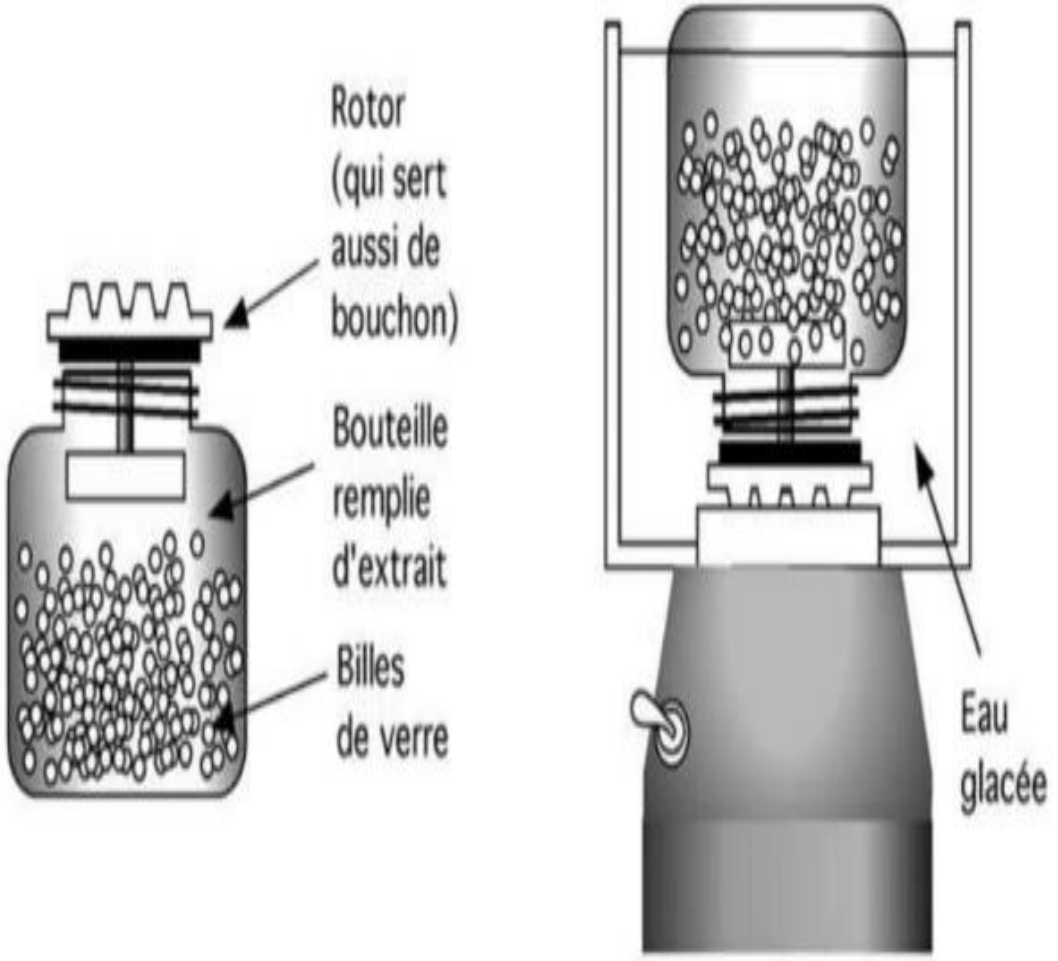
Refroidissement brusque

La concentration du soluté intra et extracellulaire

la formation de cristaux intra et extracellulaires entraîne des cassures dans la membrane

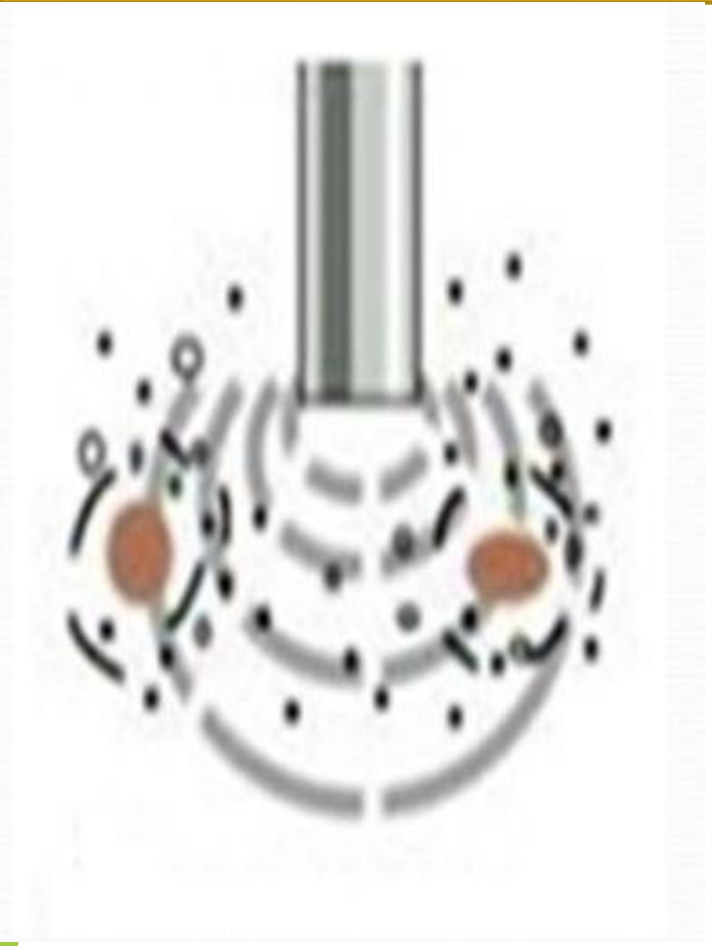
Broyage ou agitation avec des abrasifs

- L'agitation violente en présence de microbilles de verre
- Rupture de la paroi



RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

Sonication



- vibration violente ,
- Formation de bulles par "cavitation »,
- Écrasement des cavitations,
- Éclatement des cellules

Consiste à détruire les cellules par l'emploi d'un Sonicateur, qui engendre des ondes de pression Ultrasonique. Le Sonicateur génère beaucoup de chaleur. Il est donc important de travailler à froid.

Choc enzymatique

- Avec les levures, les plantes, les bactéries, il faut tenir compte de la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique.
- Pour ceci les enzymes lytiques comme les cellulases, Pectinases, etc., peuvent être employées pour rompre les parois de ces

Extraction liquides liquide

- C'est une opération qui consiste à extraire un ou plusieurs constituants d'une solution A (solvant initial) au contact d'un solvant liquide B (solvant d'extraction) pour lequel le ou les constituants à isoler ont une grande affinité par rapport au liquide initial Les deux solvants A et B sont non miscibles. L'extraction liquide-liquide est aussi nommée extraction par solvant

- Avec les levures, les plantes, les bactéries, il faut tenir compte de la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique.

Extraction solide liquide

Une extraction liquide-solide se déroule en deux étapes. Une première étape consiste en un passage d'un soluté (ou de solutés) d'un milieu liquide à un milieu solide, ce dernier ayant pour finalité de retenir ce (ou ces) soluté (s).

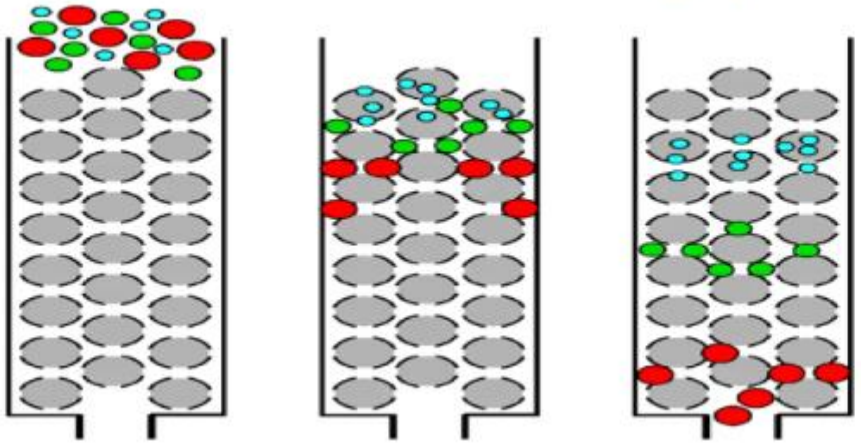
RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

Séparation par chromatographie

Il existe plusieurs techniques chromatographiques pour la séparation et la purification des enzymes. Il s'agit notamment de la chromatographie par échange d'ions,
la chromatographie par exclusion,
la chromatographie par affinité,
la chromatographie par interaction hydrophobe

la chromatographie par échange d'ions est la plus couramment utilisée pour la purification des enzymes.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

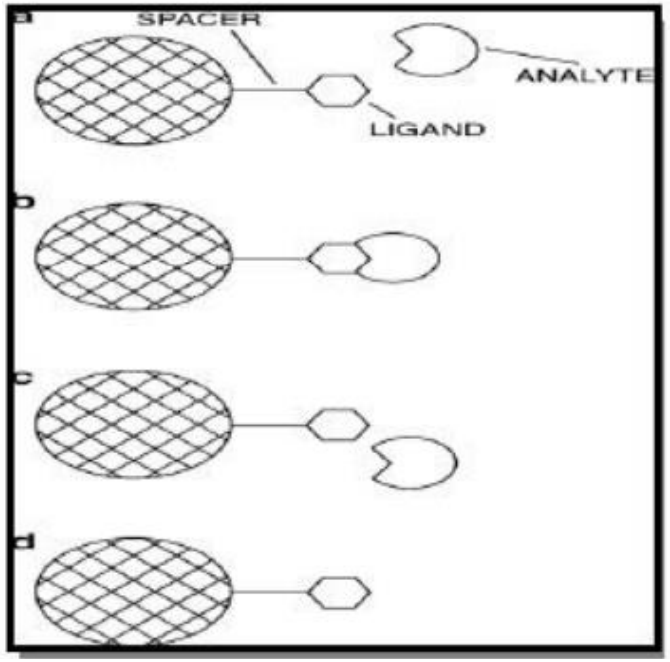


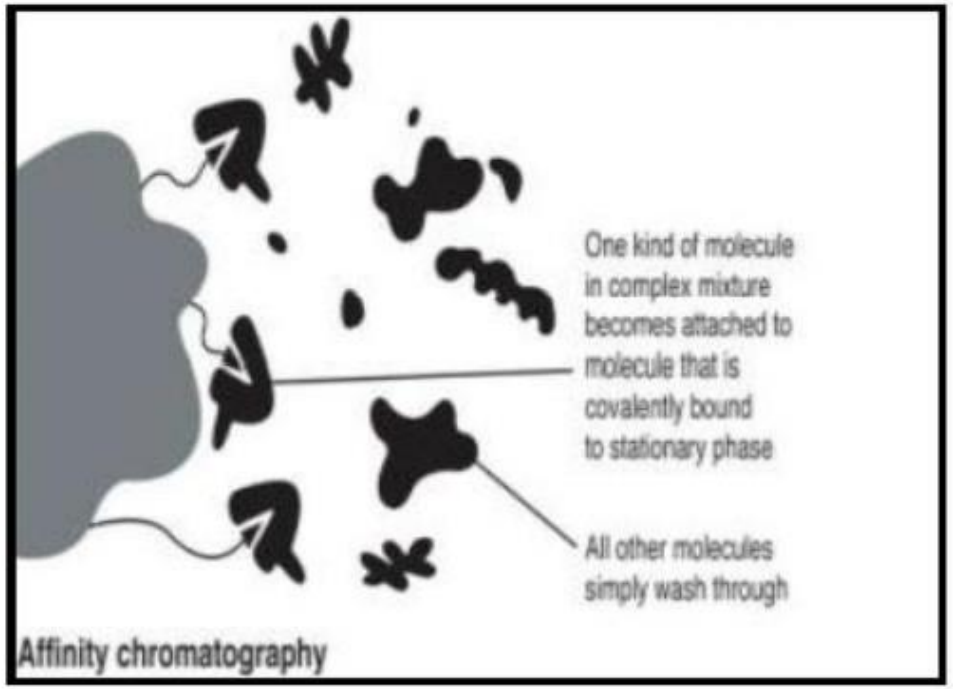
Chromatographie d'exclusion de taille (gel-filtration)

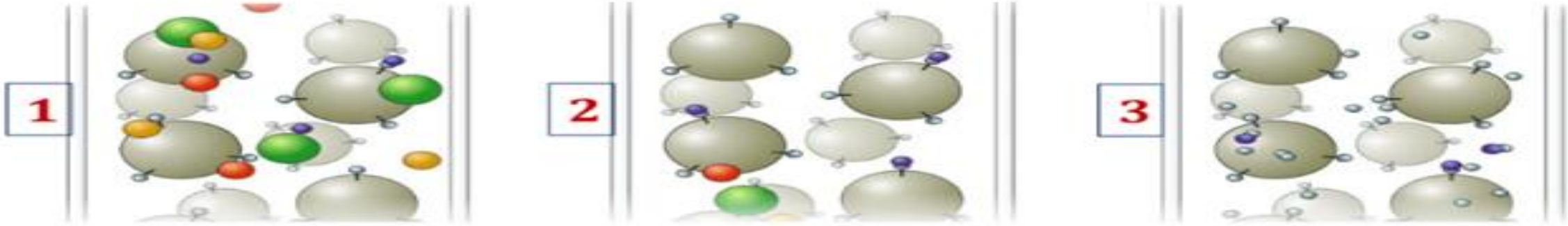
- Aussi appelé *chromatographie par tamisage moléculaire*
- Consiste en de petites billes contenant des pores d'une taille spécifique :
  - Les billes sont composées de dextran (Séphadex), d'agarose (Sépharose) ou de polyacrylamide (Séphacryl).
  - La taille des pores des billes est voisine des macromolécules à séparer.
  - Les protéines plus grosses que les pores n'entrent pas dans les billes, ont moins de volume à traverser et *vont éluer en premier*;
  - Les protéines plus petites que les pores vont entrer dans les billes de leur élution sera retardée: elles *élueront donc plus tard.*;
- Les protéines sont séparées selon leur *masse moléculaire*;

CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

- Cette méthode repose sur la spécificité et la réversibilité de l'interaction entre une macromolécule (protéine) et son substrat
- Le support contient un ligand spécifique de la macromolécule à purifier lié par une liaison covalente
- Seule la macromolécule fixant le ligand est retenue
- En général, l'élution se fait par un excès de ligand







1- **Incubation** des protéines avec le support immobilisé sur la colonne

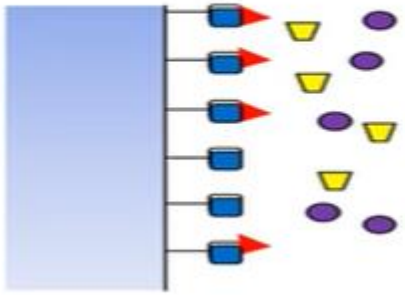
2- **Lavage** pour enlever les molécules qui s'accrochent sur support avec des liaisons non spécifiques

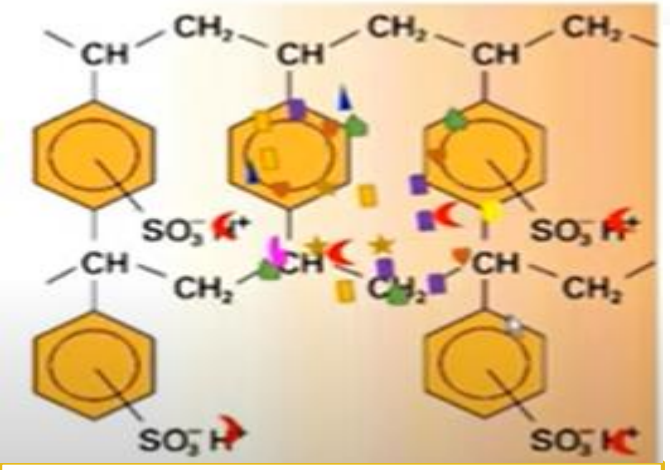
3- **Elution** avec un tampon qui contient une molécule qui a une affinité plus importante avec le support

CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'IONS

La chromatographie d'échanges d'ions se déroule en 3 étapes

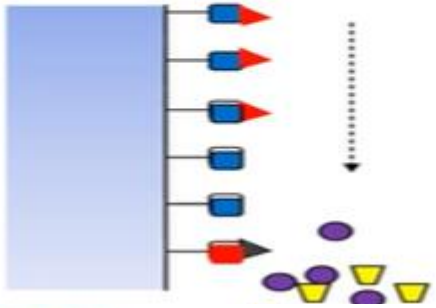
Etape de fixation

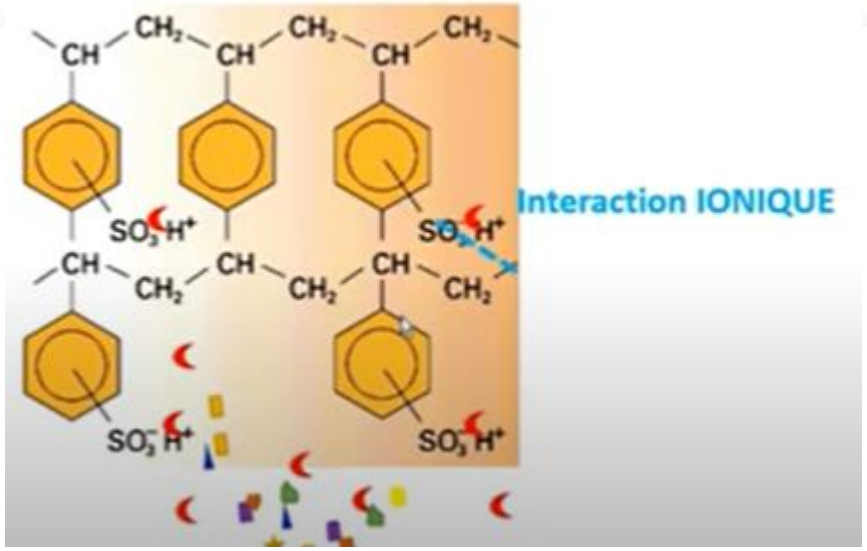




Seules les enzymes chargés positivement, sont retenues par la résines cationiques. Les molécules non retenues sont les molécules qui ne portent pas de charges ou de charges négatives

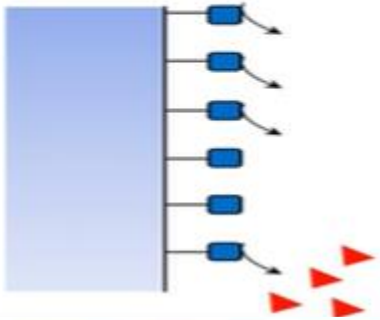
Etape de lavage = purification

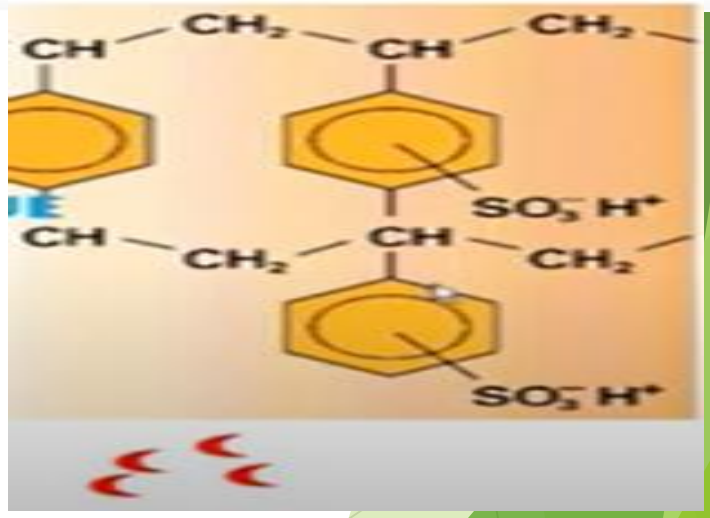




Les molécules chargées positivement reste chargées retenues par la résine cationique, alors les autres petit à petit évacuées. Les molécules retenues par des interactions ioniques

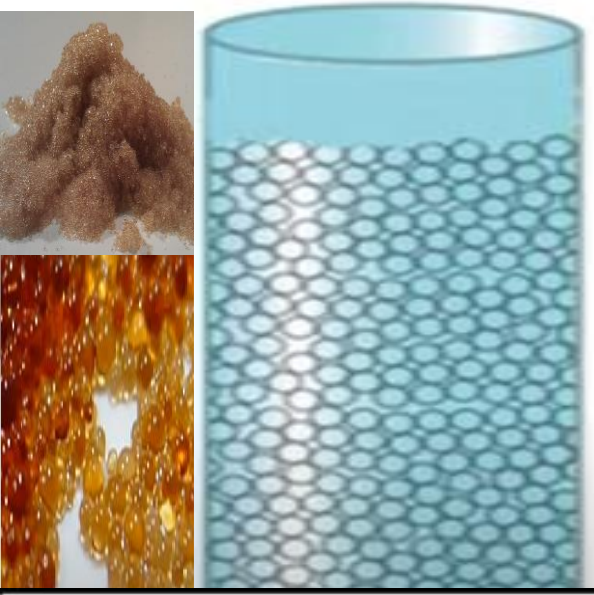
Etape d'élution



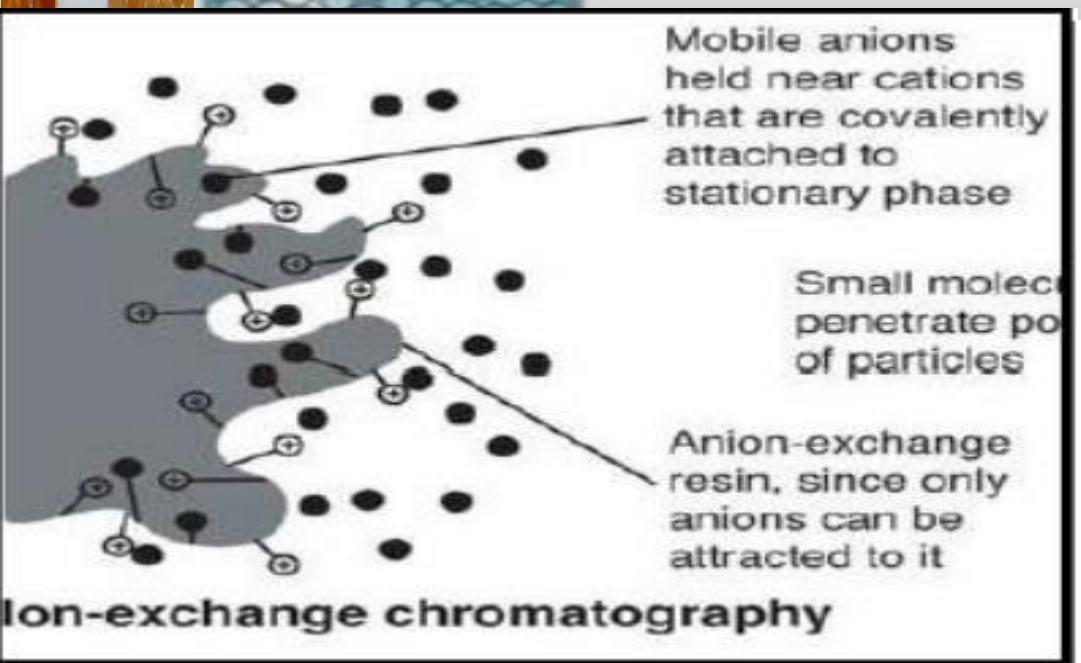


Enfin, les molécules rouges chargées positivement chargées retenues par la résine cationique sont éluées (décrochés).

CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'IONS



Un grain de phase fixe



La chromatographie d'échange d'ion est la plus communément utilisée comme technique de séparation des protéines.

Une matrice **chargé positivement** est appelée un **échangeur d'anions**, car elle se lie ions ou **molécules chargés négativement** en solution.

Une matrice **chargée négativement** est appelé un **échangeur de cations** parce qu'il lie des ions ou des **molécules chargés positivement**

RÉCUPÉRATION ET PURIFICATION DES ENZYMES

SÉCHAGE ET EMBALLAGE :La forme concentrée de l'enzyme peut être obtenue par séchage.
Cela peut être réalisé à l'aide d'évaporateurs à film ou de lyophilisateurs.

L'enzyme séchée peut être conditionnée et commercialisée.
Pour certaines enzymes, la stabilité peut être obtenue en les conservant dans des suspensions de sulfate d'ammonium.

Toutes les enzymes utilisées dans les aliments ou les traitements médicaux doivent être d'une grande pureté et doivent répondre aux spécifications requises par les organismes de réglementation. **Ces enzymes doivent être totalement exemptes de substances toxiques, de micro-organismes nocifs et ne doivent pas provoquer de réactions allergiques.**

BIORÉACTEURS OU FERMENTOUR

EST UN APPAREIL OU CUVE QUI PERMET LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES POUR LA PRODUCTION DE LA BIOMASSE

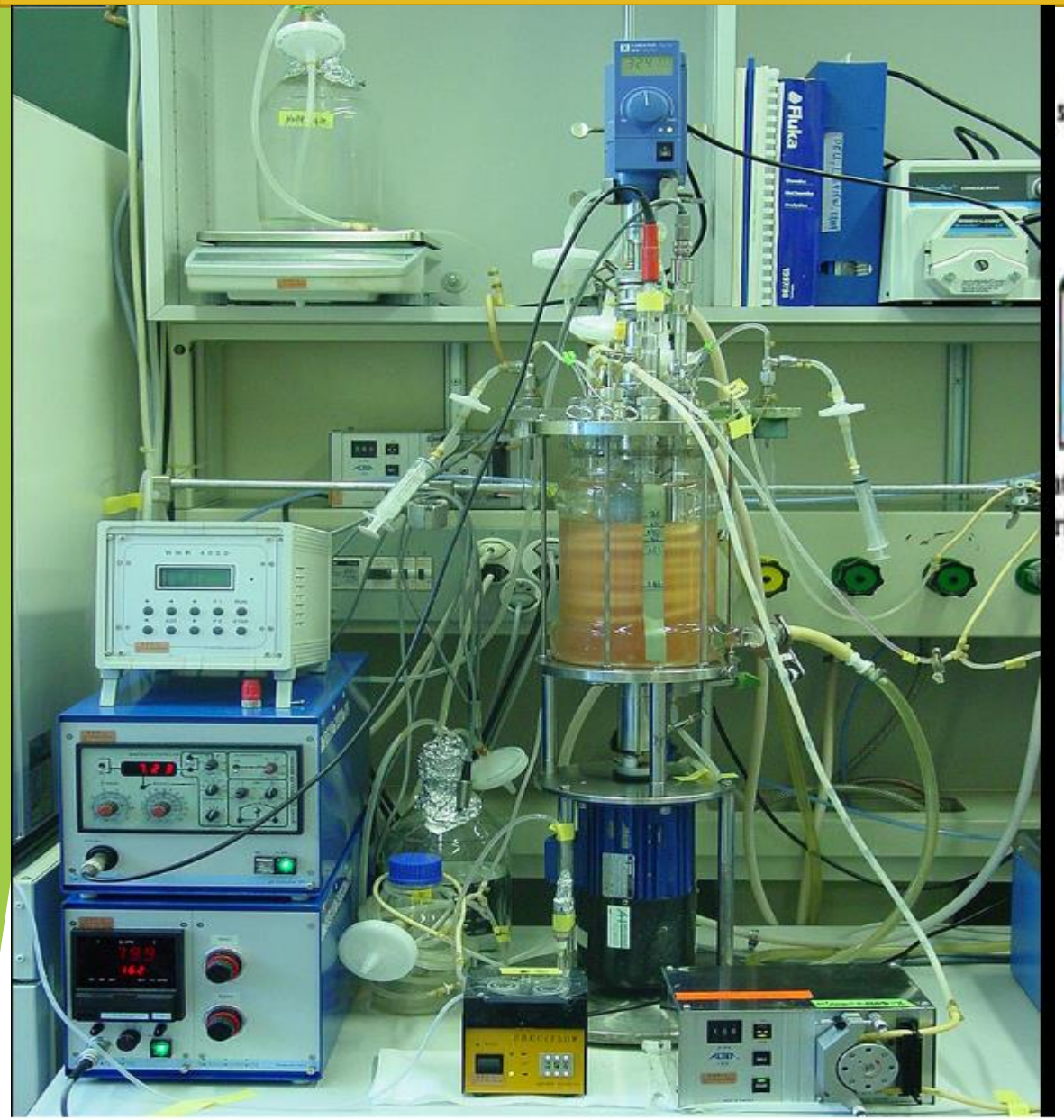
ASSURE LE CONTRÔLE LES CONDITIONS PHYSICOCHIMIQUES POUR AVOIR LE BON RENDEMENT DE PRODUCTIVITÉ

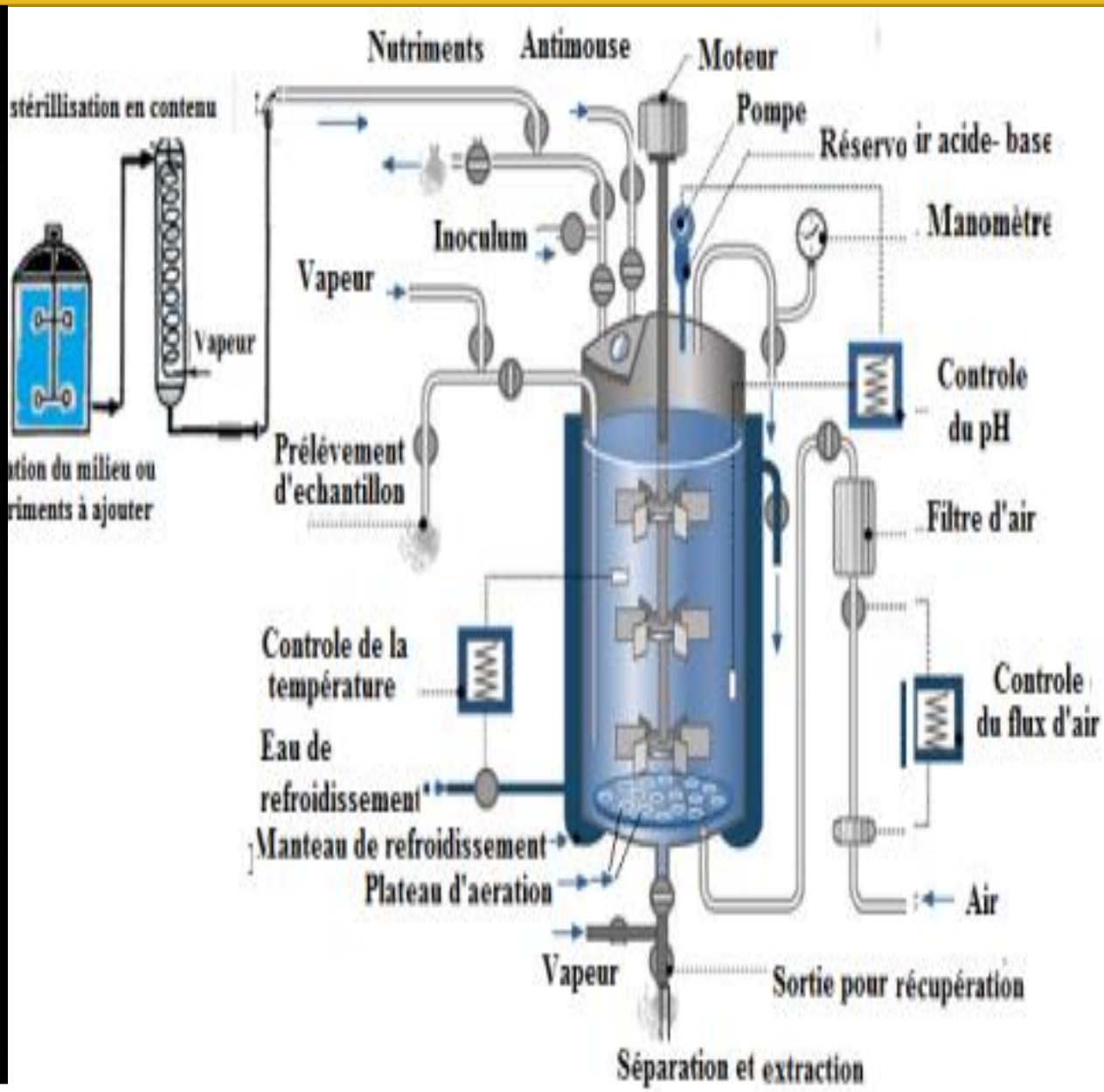
ALLANT DE 1 À 5L POUR CEUX DE LABORATOIRE
JUSQU' UN 500.000 L POUR LES FERMENTEURS INDUSTRIELS

PEUVENT ÊTRE DIVISÉ EN PLUSIEURS GROUPES

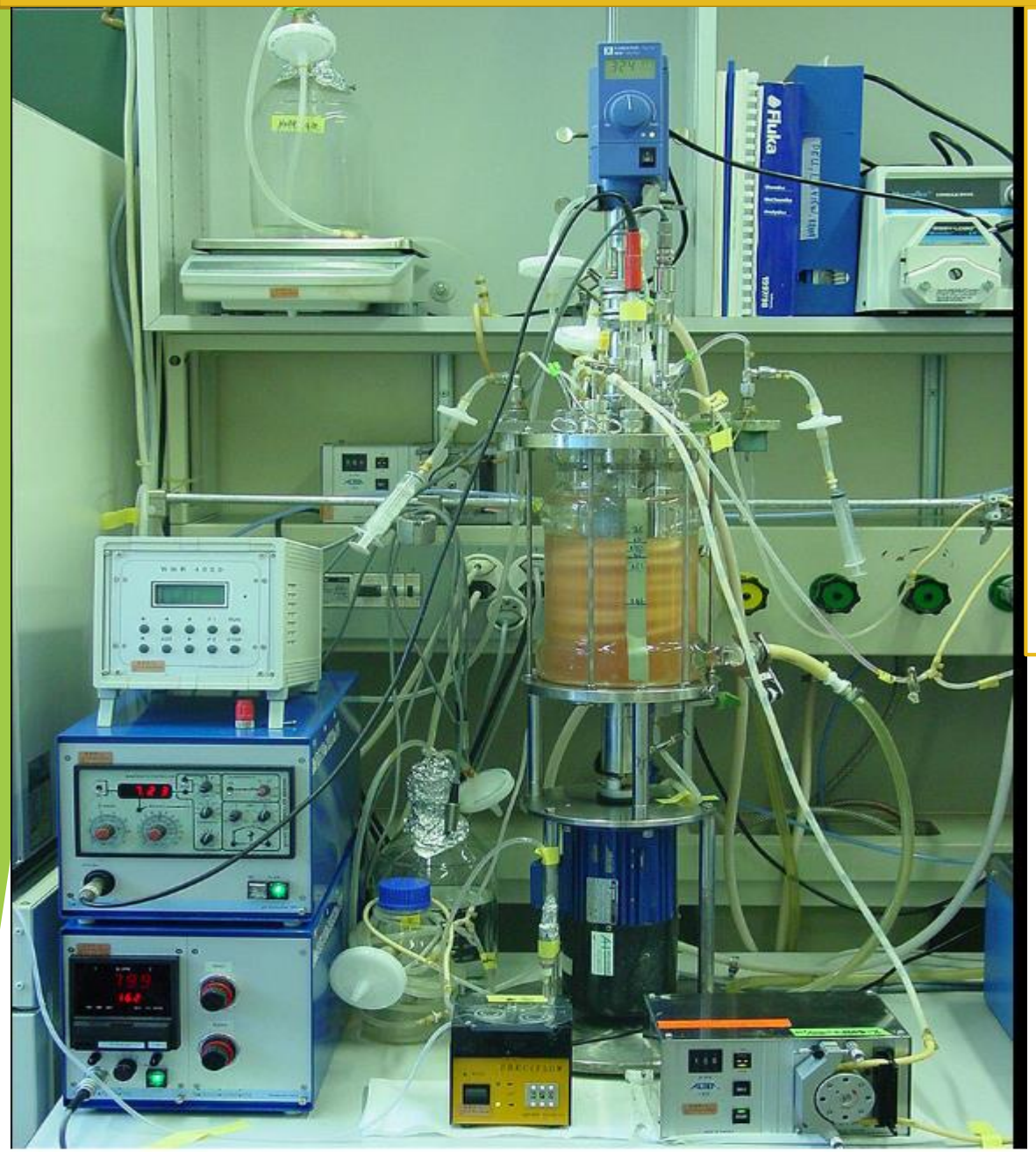
- AGITATION
- CULTURE
- SYSTEMEN DE FERMENTATION

BIORÉACTEURS OU FERMENTOUR





BIORÉACTEURS OU FERMENTOUR



- **Une cuve** ou enceinte en verre en acier inoxydable
- **Un bouchon** si nécessaire pour ne pas laisser passer l'air du milieu intérieur et celui du milieu extérieur
- **Une seringue** avec cathéter pour injecter une solution
- **Un système d'agitation** comportant **une ou plusieurs turbines** selon leur taille
- **Des capteurs** pour la mesure de la température (thermomètre), du *p*H (pH-mètre), de la concentration en oxygène dissous (sonde oxymétrique), …
- **Un système de contrôle-commande géré par ordinateur** permettant d'enregistrer et piloter tous les paramètres de fonctionnement

Les bioréacteurs permettent la fabrication de nombreux produits :
bière, yaourts, additifs alimentaires
vaccins, antibiotiques, anticorps, vitamines, acides aminés

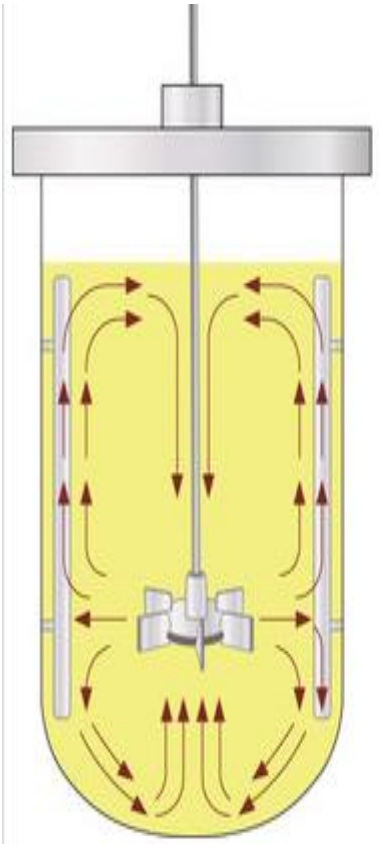
BIORÉACTEURS SELON AGITATION

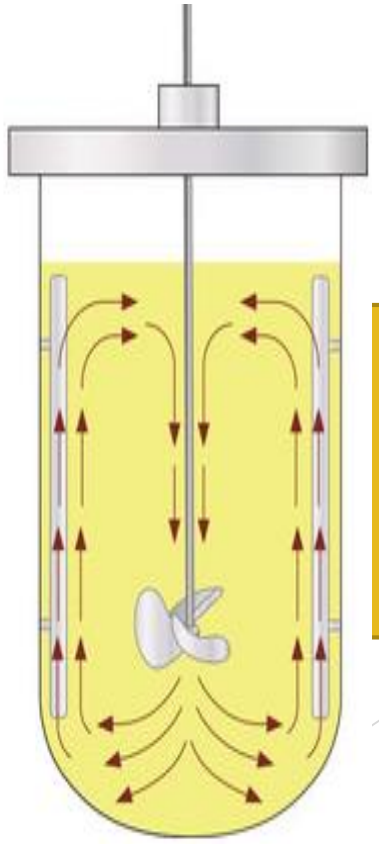
BIORÉACTEUR SELON AGITATION

BIORÉACTEUR A AGITATION MECANIQUE

AGITATION ROTATIFS A DEBIT RADIAL

le plus simple (allant d'un litre à 500.000 litres)





AGITATION ROTATIFS A DEBIT AXIAL

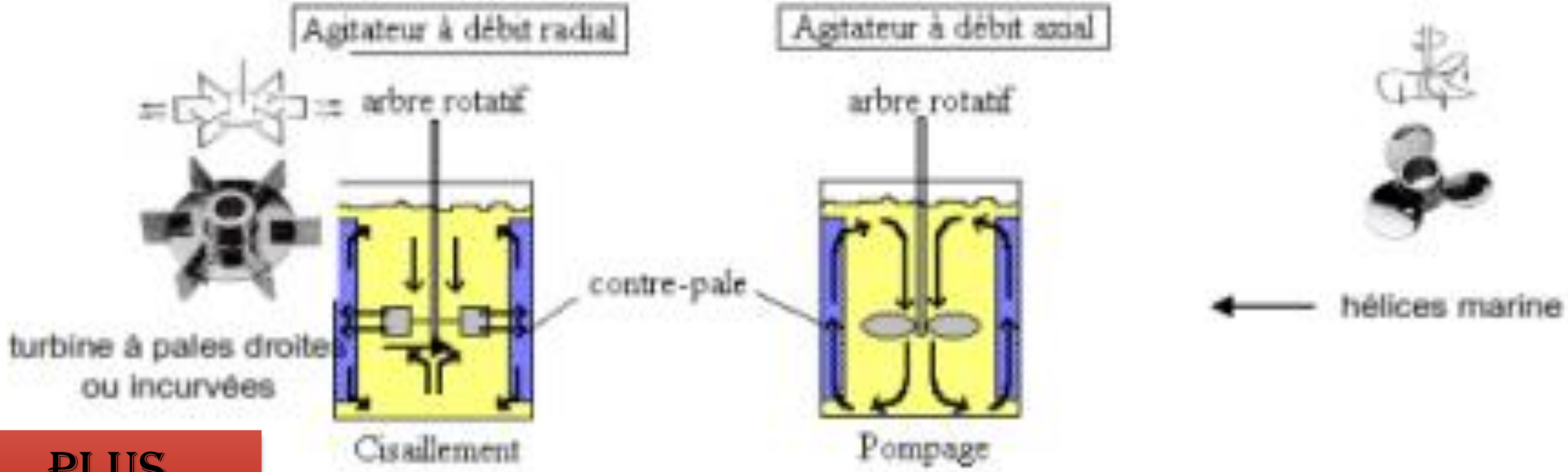
BIORÉACTEURS SELON AGITATION

AGITATION ROTATIFS A DEBIT RADIAL

BACTÉRIES, LEVURES
MOUVEMENT RADIAL ET AXIAL
TURBINE À PAROIS DROITES
BONNE AÉRATION

AGITATION ROTATIFS A DEBIT AXIAL

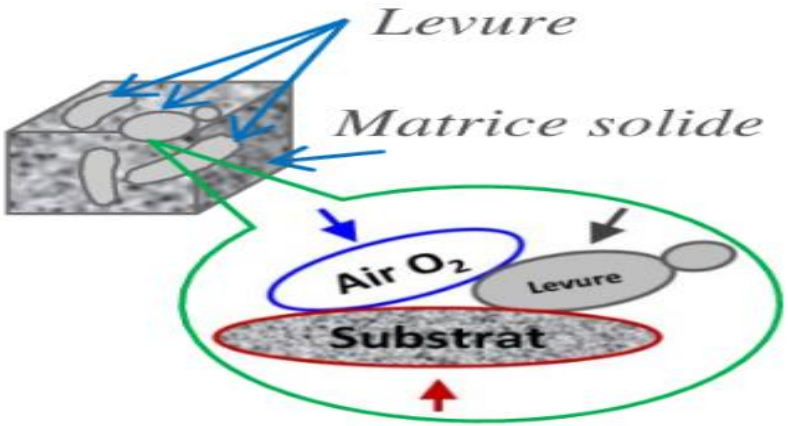
CELLULES FRAGILES
MOUVEMENT AXIAL
HÉLICES MARINES
L'AÉRATION N'EST PAS BONNE



PLUS UTILISÉE

BIOREACTEURS SELON CULTURE

FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE (FMS)



croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre

FERMENTATION EN MILIEU LIQUIDE (FML)

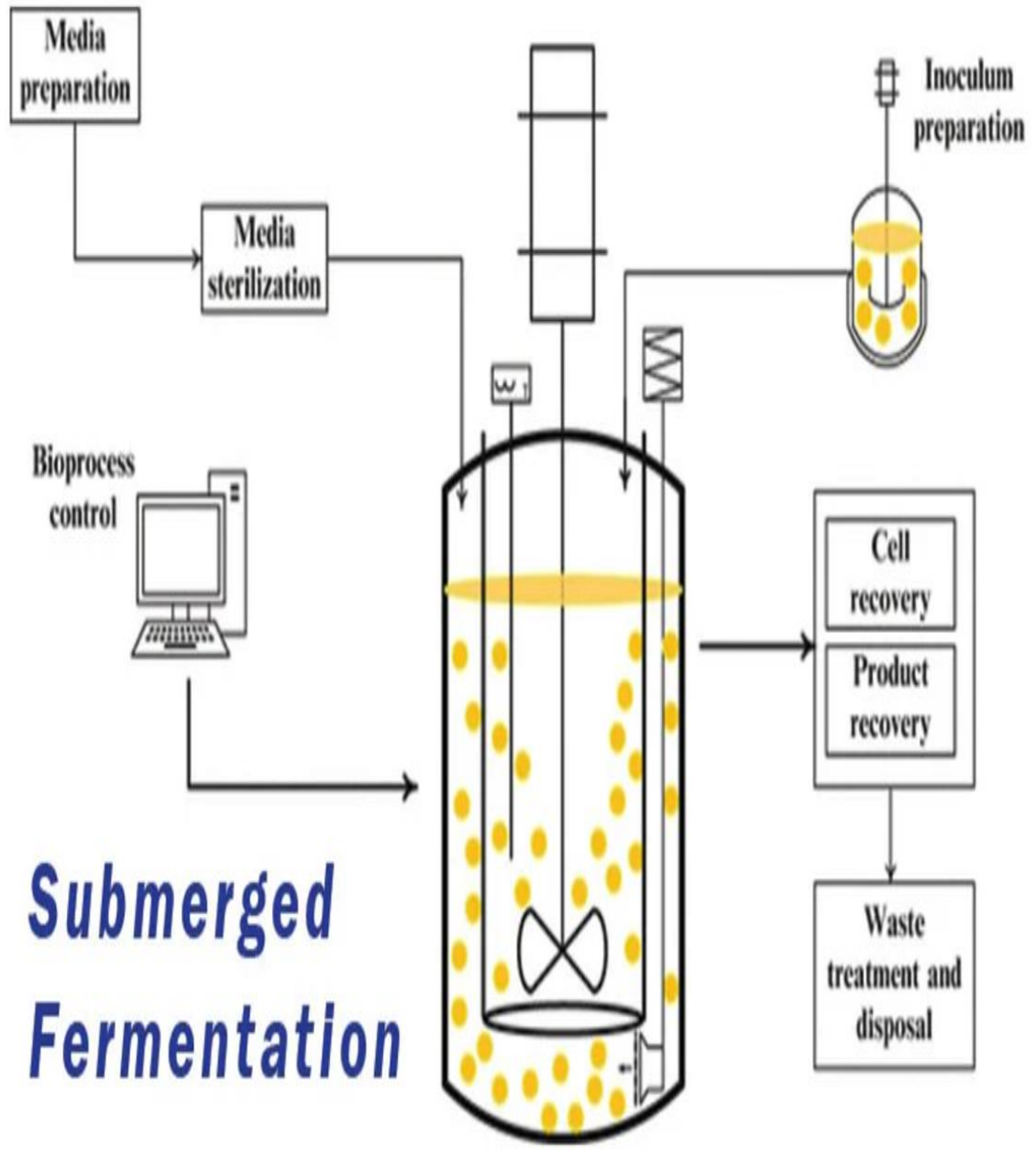
le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau,

FERMENTATION SUBMMERGÉ

le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide

FERMENTATION SUBMMERGÉE (SMF)

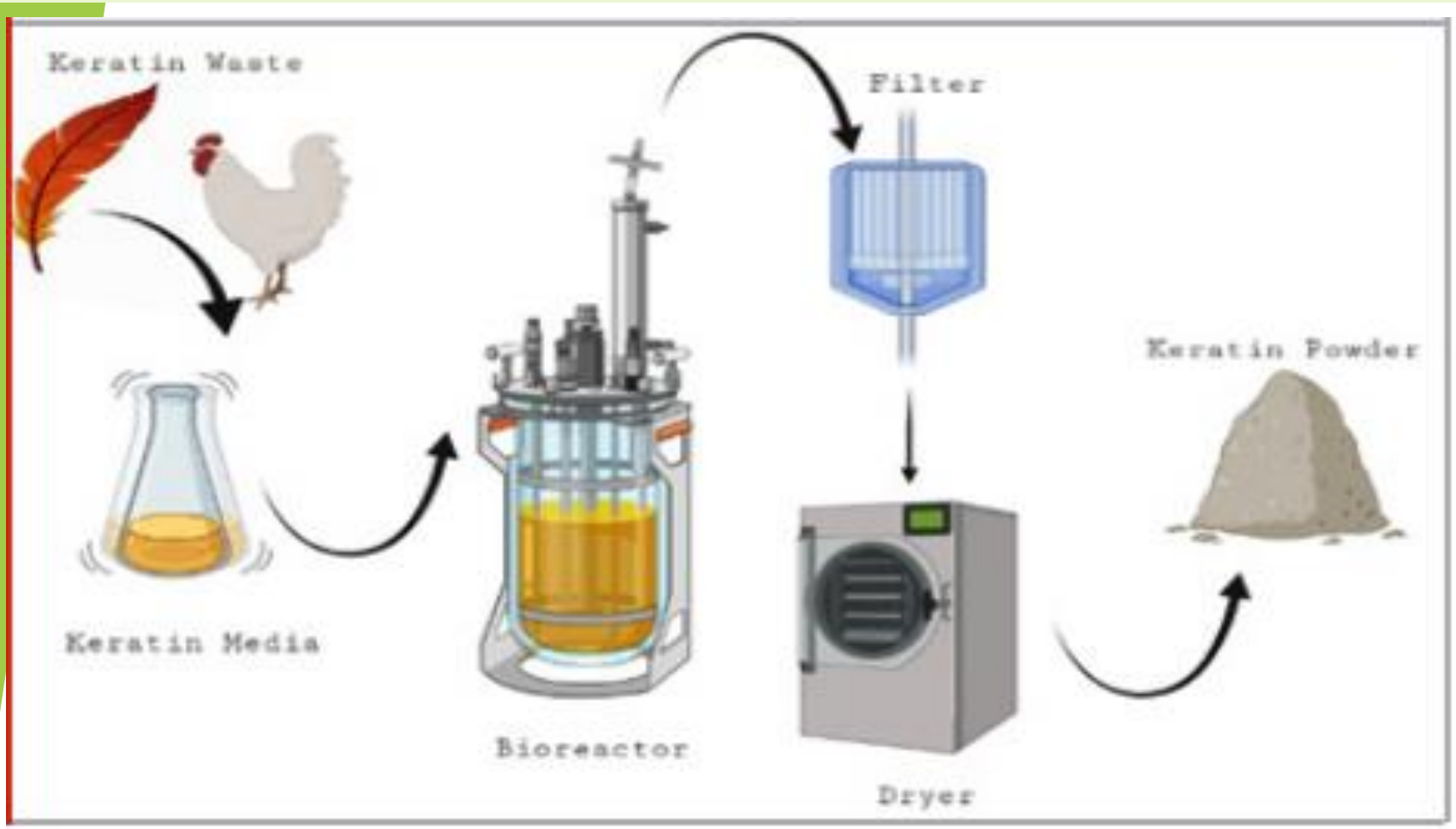
- Utilise des substrats **liquides** à écoulement libre, tels que la mélasse et les bouillons.
- Cette technique de fermentation **convient aux micro-organismes** tels que **les bactéries** qui nécessitent une teneur en humidité élevée pour leur croissance.
- Le SmF est principalement utilisé pour **l'extraction de métabolites secondaires qui doivent être utilisés sous forme liquide**
- Les produits issus de la fermentation **sont sécrétés dans le bouillon** de fermentation.



AVANTAGES SMF

Cette méthode présente plusieurs avantages.

- La stérilisation du milieu et le processus de purification des produits finis peuvent être réalisés facilement.
- Le contrôle des paramètres du processus tels que la température, le pH, l'aération, le transfert d'oxygène et l'humidité peut également être effectué de manière pratique.



Exemple de production de *Keratinase* par fermentation submergée

Les plumes sont utlisés comme source de carbone pour l'induction des Kératinases provenant des bactéries par Bacillus sp

les bactéries ou des champignons ont été cultivés dans un milieu liquide contenant des substrats kératiniques ou des plumes sous forme de carbone sources

Des kératinases intracellulaires extracellulaires ont été majoritairement obtenu (fermentation immergée).

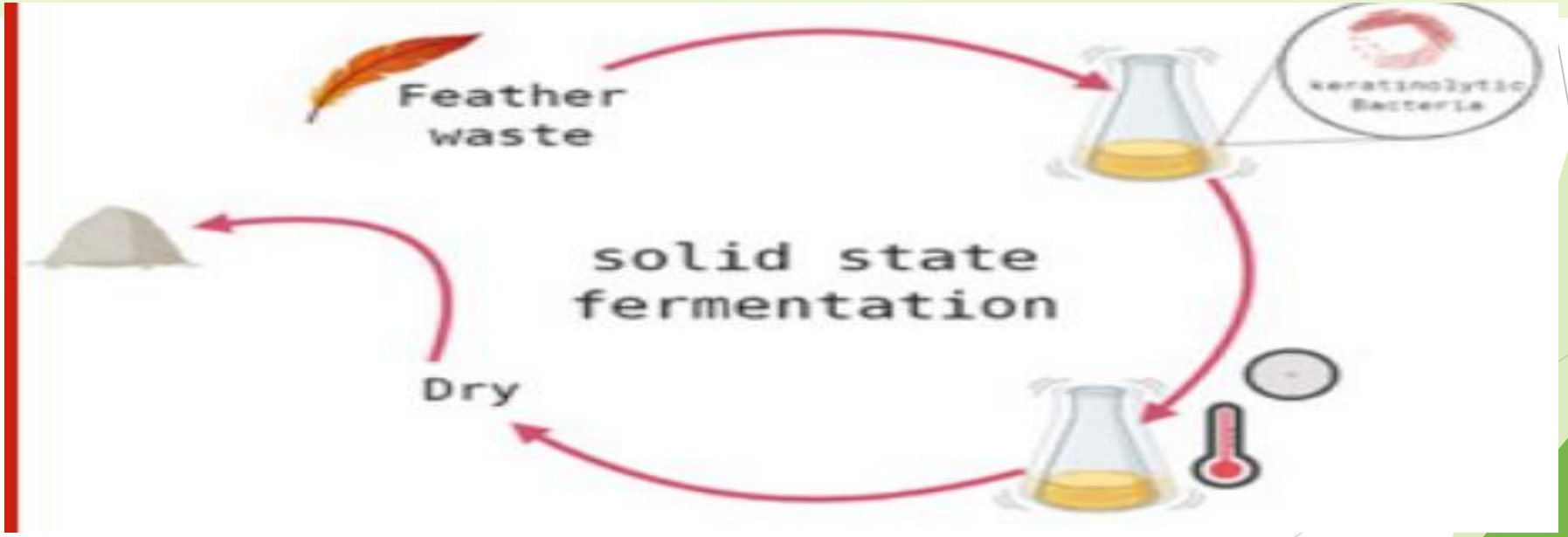
IL est clair que la kératine ou la plume agissent comme un inducteur pour production de kératinases

FERMENTAION EN MILIEU SOLIDE

- La fermentation à l'état solide est une méthode utilisée pour les microbes qui nécessitent moins d'humidité pour leur croissance.
- Les substrats solides sont utilisés

Principal avantage de cette méthode est que

- Les déchets riches en nutriments peuvent être facilement recyclés et utilisés comme substrats dans cette méthode.



Exemple de production de *Keratinase* par fermentation en milieu solide

BIOREACTEURS SELON LE SYSTÈME DE FERMENTATION

CULTURE DISCONTINUE BATCH OU NON RENOUVLÉE

Les cellules sont initialement inoculées dans un milieu frais et aucun autre élément nutritif n'est ajouté jusqu'à ce que le produit désiré soit produit.

En fin de fermentation, le fermenteur est nettoyé pour une prochaine culture

Ce mode de fermentation est le seul utilisé pour la production de métabolites secondaires surtout pour les antibiotiques.

CULTURE CONTINUE ALIMENTÉE FED-BETCH

alimentée en continu par un milieu nutritif.

La croissance démarre plus vite dans un volume de culture réduit.

Le volume dans la cuve augmente alors au cours du temps.

Lorsque la cuve est remplie, l'alimentation est coupée (la conduite est alors en mode discontinu)

Le fed batch permet en pratique un gain de temps, une augmentation de productivité et une possibilité de modification du milieu en cours de culture. Mais le risque de contamination est élevé

Ex: la production de la pénicilline

CULTURE CONTINUE

-le milieu de croissance frais est ajouté en permanence, et les cellules et le milieu épuisé sont éliminés simultanément

Le volume de culture microbienne est constant où le débit de milieu est égal au mélange de biomasse-milieu liquide, de façon à maintenir le volume du réacteur constant