

Applications des enzymes immobilisées

Introduction :

L'intérêt que portent aujourd'hui les organismes de recherche, les industriels et les équipes médicales aux enzymes immobilisées tient à leur stabilité et à la facilité de leur séparation des mélanges réactionnels, d'où la possibilité de répéter facilement plusieurs cycles de traitement avec une même préparation.

1. Les producteurs des enzymes :

Novozyme (Danemark)	50%
DSM (Hollande)	20%
Genencor international (USA)	15%
Amano, Nagase (Japon)	10%
Solvay-Miles (USA)	5%

2. Répartition de ventes d'enzymes en 2005 :

Industrie	Pourcentage
Détergents	32 %
Autres	29 %
Amidon	15 %
Produits laitiers	14 %
Textile	10 %

En fait, 75 % des enzymes utilisées en industrie sont des hydrolases pour dépolymériser des substances naturelles.

- 40 % protéases (produits laitiers et détergents)
- Carboxylase (industrie de l'amidon et du textile, boulangerie, alcools)

3. Application industrielles :

3.1. Domaines d'application en industrie agroalimentaire (IAA):

Les plus importantes sont :

Glucoserie :

Fabrication d'édulcorant (produit qui est capable de donner une saveur sucrée à une préparation alimentaire) à partir de l'amidon tel que le sirop de glucose et de fructose.

- ✓ α -amylases bactériennes : liquéfaction de l'amidon
- ✓ Amyloglucosidases fongiques : saccharification (hydrolyse amylasique de l'amidon gélatinisée, qui fournit essentiellement le maltose)

- ✓ Glucose-isomérases bactériennes : HFCS (high fructose corn syrup : c'est un nouveau produit sucrant obtenu par conversion enzymatique de l'amidon)

Sucrierie :

Cristallisation et raffinage

- ✓ Mélibiose fongique : hydrolyse du raffinose (trisaccharide très soluble ne possédant pas de goût sucré : 2 glucose et 1fructose. Il peut être scindé enzymatiquement en mélibiose)

Panification :

Ensembles des opérations permettant la fabrication du pain.

- ✓ Protéases fongiques : pétrissage (grâce à l'hydratation et au travail mécanique, il permet l'obtention d'un réseau de gluten, cohésif et viscoélastique, qui assurera la rétention du gaz carbonique, de l'éthanol et des arômes produits au cours de la fermentation)
- ✓ Xylanases fongiques : viscosité, élasticité ;
- ✓ Lipases : renforcer le gluten, ce qui donne une pâte plus stable et une meilleure qualité du pain.

Industrie des boissons :

- ✓ Pectinases fongiques : clarification des jus (élimination des composés responsables du trouble)
- ✓ Pectinases + hémicellulases : pressabilité des pulpes et des moûts (amélioration de la libération du jus de pulpe) ;
- ✓ α -amylases fongiques : jus de pommes, poires ;
- ✓ Les enzymes sont aussi largement utilisées dans la production de vin.

Macération/liquéfaction :

La macération est une opération consistant à faire tremper un produit alimentaire dans un produit pour le parfumer ou le conserver ; alors que la liquéfaction consiste à faire passer un composé à l'état liquide.

Cellulase, pectinases fongiques :

- ✓ Nectars (boisson à base de jus ou purée de fruits additionnée d'eau et de sucre) ;
- ✓ Coulis (sauce réalisée à partir de substances alimentaires diverses réduites en purée).

Industries laitières et fromagères :

- ✓ Protéases animales (chymosine ou presure)
- ✓ Ferments lactiques : laits acidulé, yaourts, fromages
- ✓ Lactases : lait dé lactosé. Elle scinde le lactose du lait en glucose et galactose. Elle est utilisée pour les produits laitiers qui sont consommés par les intolérants au lactose.

3.2. Domaines d'application hors l'industrie agroalimentaire :

Industrie des détergents :

Cette industrie est actuellement la plus grande utilisatrice d'enzymes industrielles, employant des *protéases*, *lipases*, *amylases* et *cellulases*, surtout pour la production des lessives « biologiques ». Ces enzymes décomposent rapidement ou libèrent les souillures qui normalement ne sont éliminées qu'à des températures beaucoup plus élevées ou par l'action de plus grandes quantités de détergents chimiques sur une période plus longue.

Industrie textile :

La présence des enzymes dans l'industrie du textile tend à se renforcer pour des raisons d'efficacité, de sélectivité et de protection de l'environnement.

- ✓ Amylases / cellulases : délavage des jeans = éclaircir la couleur (stone washed)
- ✓ Amylases bactériennes : désencollage de l'amidon
- ✓ Cellulases diverses : anti-bouloches (éviter la formation des petites boules pelucheuses d'un tissu sous l'effet de frottement)
- ✓ Pectinases fongiques : rouissage (élimination partielle des ciments pectiques des faisceaux de fibres de certaines plantes textiles telles que lin, chanvre)

Industrie des papiers (papeterie) :

- ✓ Xylanase : utilisée dans le blanchiment de la pâte ; ce qui réduit considérablement les besoins en produits chimiques de blanchiment à base de chlore ;
- ✓ Amylase : fabrication du papier (modification de l'amidon) ;
- ✓ Lipases : enlèvement des substances collantes qui provoquent des problèmes dans les machines à papier.

Industrie du cuir (tannerie) :

Cette industrie utilise des enzymes protéolytiques et lipolytiques. Ces enzymes (bactériennes et fongiques) sont utilisées pour enlever les parties non désirées et rendre le cuir plus souple et plus facile à teindre.

Industrie de l'alimentation animale :

L'ajout de xylanases à base de blé dans l'alimentation de poulets de chair augmente l'énergie métabolisable disponible.

Elle réduit la viscosité ; ce qui augmente l'absorption des nutriments, libère les éléments nutritifs par hydrolyse de fibres non dégradables et réduit la quantité de matières fécales.

Des enzymes dans les produits de soins personnels :

Ces produits constituent un domaine relativement nouveau pour les enzymes.

- ✓ Certaines solutions contenant des protéinases et des lipases sont utilisées pour le nettoyage des lentilles de contact.

- ✓ La catalase est utilisée pour retirer le peroxyde d'hydrogène résiduel après la désinfection des lentilles de contact.
- ✓ Certaines pâtes dentifrices contiennent la glucoamylase et la glucose oxydase.
- ✓ Les enzymes sont également étudiées pour des applications dans la peau et des produits de soins capillaires.

4. Application thérapeutiques et pharmaceutiques :

Certaines maladies ont pour origine l'absence ou l'insuffisance de systèmes enzymatiques, ce qui se traduit par la carence d'un métabolite essentiel qui devrait être synthétisé ou, au contraire, par l'accumulation d'un produit toxique qui n'est pas dégradé.

Le traitement de certains troubles pathologiques (dus à une déficience enzymatique) par l'administration d'enzymes se heurte à des difficultés : Destruction par les protéases ou l'acidité de l'estomac ou hydrolyse par les macrophages. Dans ce cas l'enzyme est associée à une molécule protectrice (albumine, dextrine, polyéthylène glycol), ou alors incluse dans des microcapsules.

Les enzymes utilisées en thérapie proviennent de différentes sources : bactéries, champignons, animaux, plantes et même l'être humain. Actuellement, ces enzymes sont obtenues préférentiellement par la technologie de l'ADN recombinant et des protéines recombinantes.

Exemples :

- ✓ Agents anti-thromboses : plasmine.
- ✓ Agents de coagulation : thrombine, facteur III
- ✓ Maladies génétiques : adénosine désaminase, glucocérébrosidase, ...
- ✓ Cancer : asparaginase, urate oxydase, arginine désaminase, ...
- ✓ Maladies infectieuses : lysozyme, chitinase, ribonucléase, ...
- ✓ Certaines enzymes sont utilisables comme aides digestives (amylase, galactosidase, cellulase, lactase, pepsine, papaïne, lipase, pancréatine, ...).

Certaines enzymes sont employées pour élaborer des médicaments (pénicilline/ β -lactamase, ampicilline et amoxycilline/pénicilline amidase, stéréospécificité/acylase et estérase, ibuprofène/lipase, ...)

5. Applications analytiques :

- ✓ Dès les années 1960, les chercheurs ont compris le grand potentiel des enzymes pour le diagnostic médical et pour l'analyse des aliments et des boissons (biocapteur et Kit d'essai enzymatique).
- ✓ Contrairement à la majorité des enzymes industrielles, les enzymes analytiques ont besoin d'être libre des activités secondaires ; cela signifie que les procédés de purification complexes sont nécessaires.
- ✓ Les biocapteurs sont le développement le plus important de la chimie analytique. L'application la plus largement utilisé est un biocapteur de glucose, impliquant la réaction catalysée par la glucose-oxydase.
- ✓ Plusieurs instruments commerciaux sont disponibles qui appliquent ce principe pour la mesure des molécules comme : le glucose, le lactate, le lactose, le saccharose, l'éthanol, le méthanol, le taux de cholestérol et de certains acides aminés.

6. Les biocapteurs :

6.1. Historique :

Le premier biocapteur développé a été l'œuvre de Leland Clark en **1956** dans le but de déterminer la concentration en oxygène dissous dans le sang (Leland, 1956). Leland Clark a été connu comme le « père des biocapteurs » et son invention de l'électrode à oxygène porte son nom : Clark électrode.

En **1962**, ce biocapteur a été amélioré par le même chercheur afin de mesurer le taux de glucose dans le sang (Clark et Lyon, 1962), suivi par la découverte du premier biocapteur potentiométrique permettant de détecter l'urée par Guilbault et Montalvo en **1969**.

L'année **1975**, a connu la découverte du premier immuno-capteur dédié au dosage de l'éthanol et l'acide lactique par Suzuki et al.

Au cours des dernières décennies, le domaine des biocapteurs a connu un ampleur remarquable sous la pression de divers domaines d'applications. Leur caractère compact et portatif ainsi que leur grande spécificité et sensibilité font d'eux une des meilleures alternatives aux techniques analytiques existantes.

6.2. Définition :

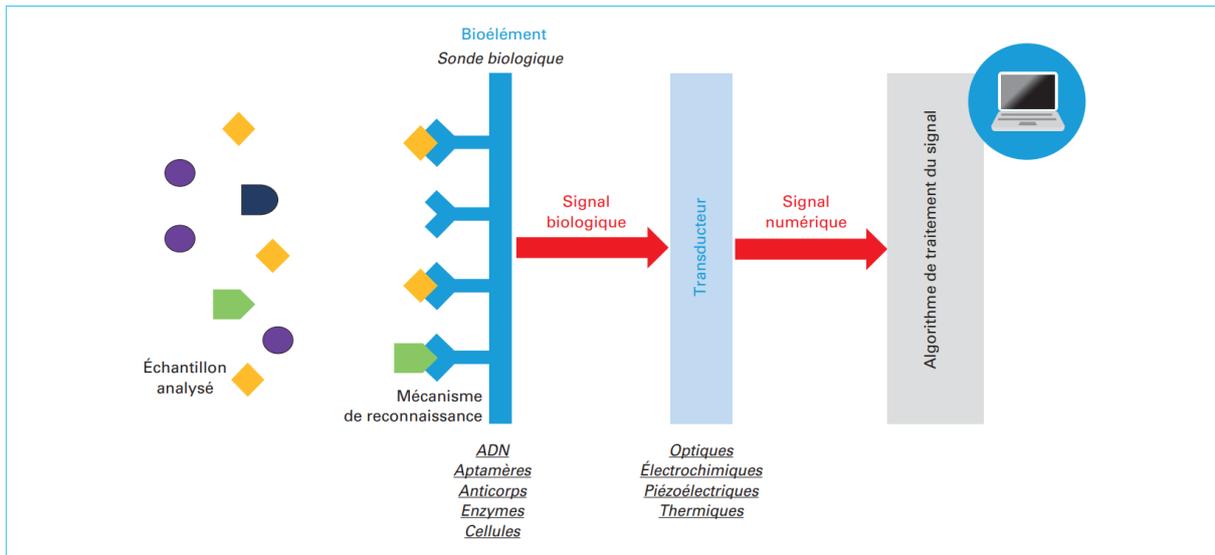
Un **biocapteur** est un outil ou un système de détection qui contient des composants biochimiques spécifiques (enzymes, anticorps, bactéries ou levures) immobilisés, appelés « ligand », associés à des composants électroniques transmettant et transformant un signal de nature biochimique en signal physique. Ce système permet la mesure d'un paramètre physique, chimique ou biologique.

6.3. Principe :

Ce dispositif analytique est, par conséquent, la résultante de la synergie entre un élément de reconnaissance biologique immobilisé (bioélément) et un capteur physique : le transducteur.

Les éléments biologiques de reconnaissance peuvent être de natures très différentes (anticorps, enzymes, ADN, cellules). Ces derniers vont interagir avec leur environnement et, de cette interaction va naître un signal analogique spécifique (émission de photons, modification de pH, de masse, d'activité respiratoire...).

Le rôle du transducteur est alors de convertir le signal biologique en signal numérique analysable. La nature des signaux biologiques va directement conditionner le type de transducteur utilisé. Par conséquent, le développement de tels systèmes requiert des compétences avancées dans les domaines de la biologie, de la physico-chimie et du traitement du signal impliquant donc d'étroites collaborations interdisciplinaires.



6.4. Composition d'un biocapteur :

- **Le biorécepteur (ligand) :**

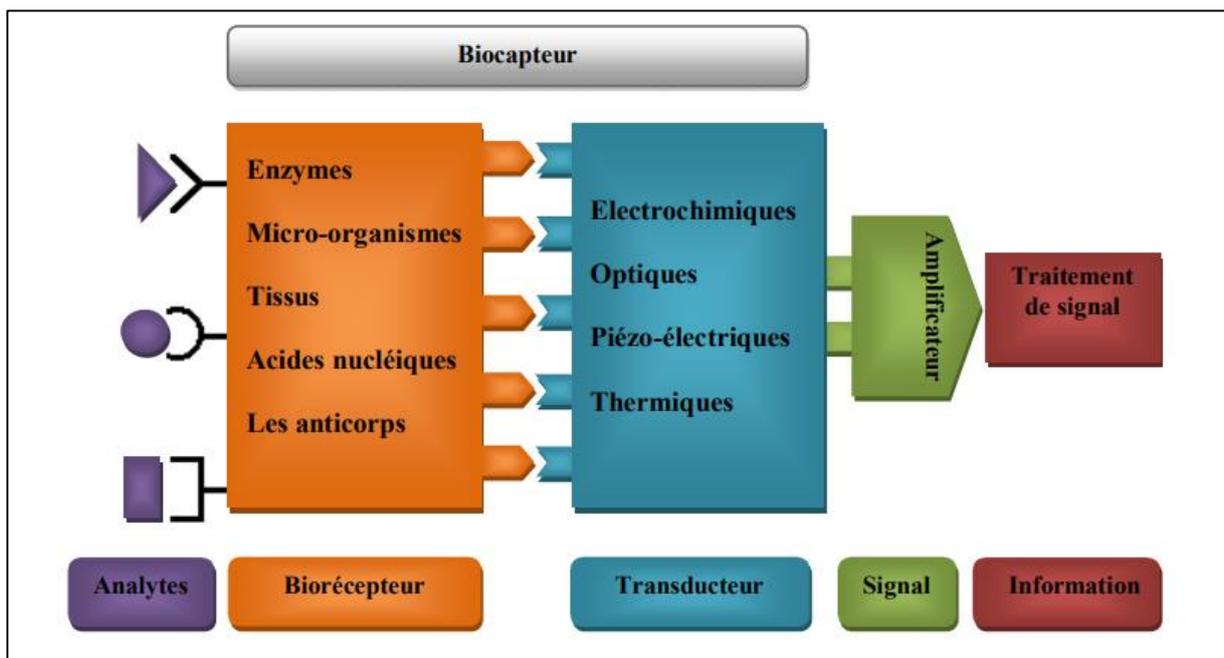
Il constitue l'élément de capture spécifique du biocapteur et en théorie, toute structure biochimique ou biologique possédant cette capacité de reconnaissance spécifique est utilisable. Exemples : enzymes, cellules animales ou végétales, bactéries, récepteur protéique membranaire, ADN,

- **Le transducteur :**

Le transducteur est l'élément physique qui sert à exploiter la modification biochimique, issue d'une interaction entre un analyte et le biorécepteur, pour la transformer en signal électrique.

- **Le conditionneur :**

C'est l'élément qui peut assurer des rôles d'amplification, acquisition et traitement du signal pour le transformer en une information dans un format approprié pour l'utilisateur.



6.5. Classification des biocapteurs :

Les biocapteurs peuvent être classés suivant différents critères :

- ✓ Par type de biorécepteur : biocapteurs enzymatiques, immunologiques, etc...
- ✓ Par type de transducteur : biocapteurs optiques, électrochimiques, thermiques, etc...

En fait, les biocapteurs enzymatiques sont les plus utilisées et les plus commercialisées. En effet, ils 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 méthodes d'immobilisation des enzymes sont variées :

- ~ Immobilisation sur des billes de verre poreux ;
- ~ Liaisons covalentes sur membranes de dialyse ;
- ~ Réticulation avec du glutaraldéhyde ;
- ~ Immobilisation sur gel d'agarose.

6.6. Caractéristiques des biocapteurs :

Spécificité (sélectivité) :

La spécificité est apportée par le biorécepteur, le plus souvent une enzyme. La spécificité est une propriété inhérente d'une enzyme et ne peut pratiquement pas être modulée. Certaines enzymes ont une spécificité très étroite.

Stabilité :

C'est l'aptitude à maintenir l'activité catalytique au cours du temps, est également une propriété inhérente d'une enzyme donnée. Cependant, certains paramètres expérimentalement contrôlables comme le pH, la nature du tampon ou la température, influent sur la stabilité.

Sensibilité :

Ce paramètre correspond au rapport entre l'accroissement de la réponse du capteur et la variation correspondante de la grandeur à mesurer.

Réutilisation :

La réutilisation de l'élément sensible du biocapteur est rendue possible par l'immobilisation.

Reproductibilité :

C'est parmi les paramètres les plus importants. Il indique la capacité du biocapteur à donner des réponses très voisines pour des mesures répétées de la même quantité de la grandeur à mesurer.

Exactitude :

C'est l'accord entre le résultat de la mesure et la valeur vraie de la grandeur mesurée et l'écart est appelé erreur absolue.

Limite de détection (résolution):

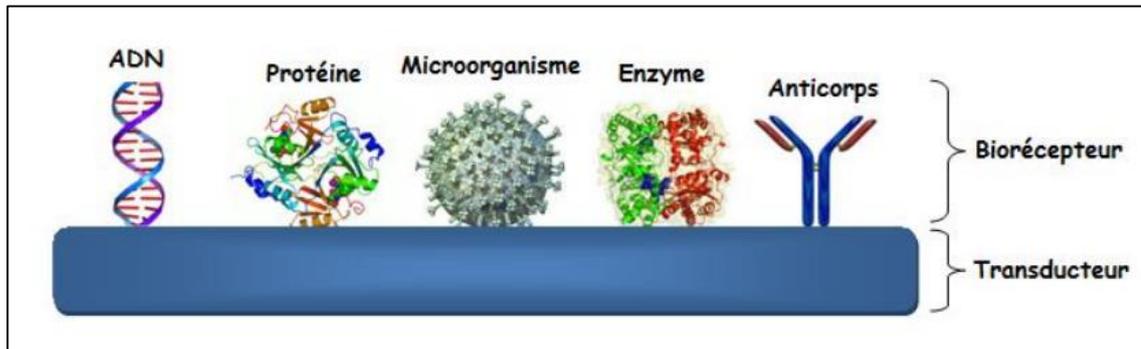
C'est la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée par le biocapteur d'une façon significative.

La linéarité :

Dans le domaine de linéarité, la variation de la valeur de sortie est proportionnelle à la variation de la grandeur mesurée.

Temps de réponse :

La rapidité est caractérisée par le temps que met le biocapteur à réagir à une variation brusque de la grandeur mesurée. La connaissance du temps de réponse d'un biocapteur est un élément essentiel lors de la réalisation de mesures.

**6.7. Domaines d'application des biocapteurs enzymatique :**

Domaine d'application	Utilisation
Industrie agroalimentaire	<ul style="list-style-type: none"> • Détection et quantification des nutriments • Détection des agents pathogènes • Détection des toxines, produits chimiques toxiques et métaux lourds • Surveiller les procédés de fermentation
Santé	<ul style="list-style-type: none"> • Estimation du glucose, cholestérol, troponine cardiaque, CRP • Détection de l'éthanol dans le sang humain • Analyse de biomarqueur de certaines maladies tel le cancer • détection des agents viraux (HIV, COVID 19, ...)
Environnement	<ul style="list-style-type: none"> • Mesure des métaux lourds • Mesure des polluants organiques • Détection des composés toxique • détection des agents pathogènes