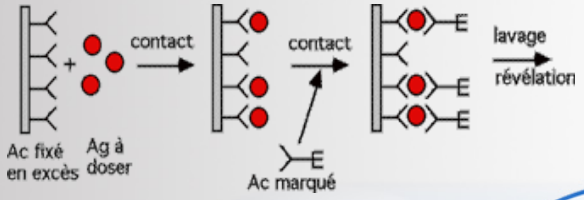
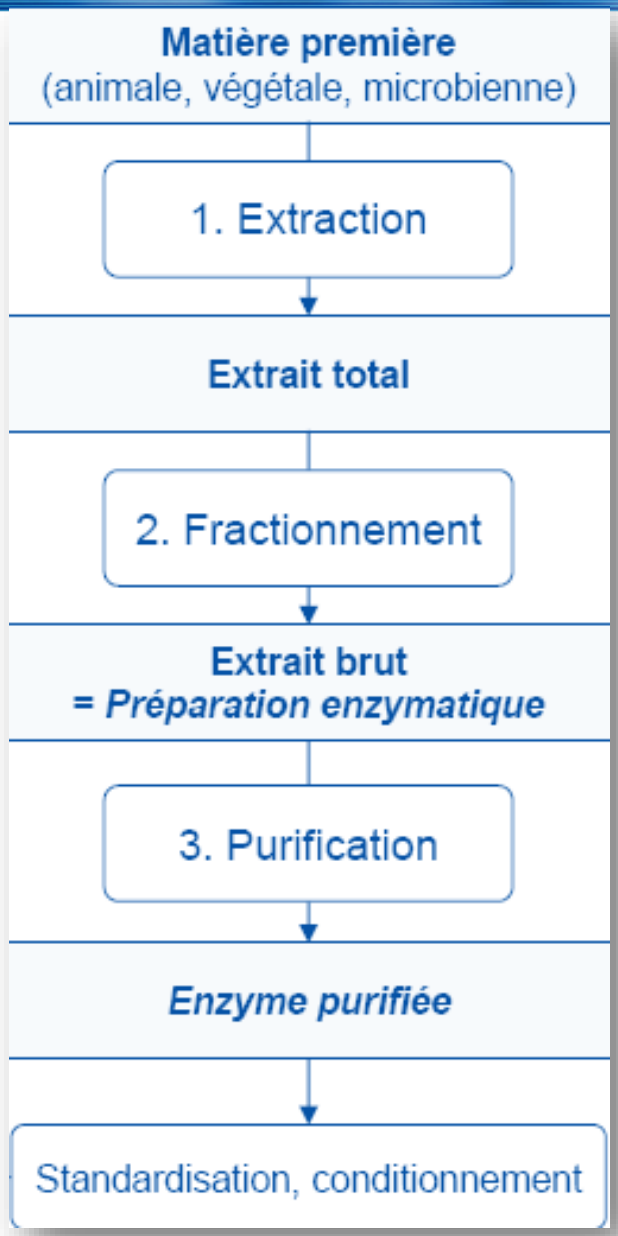
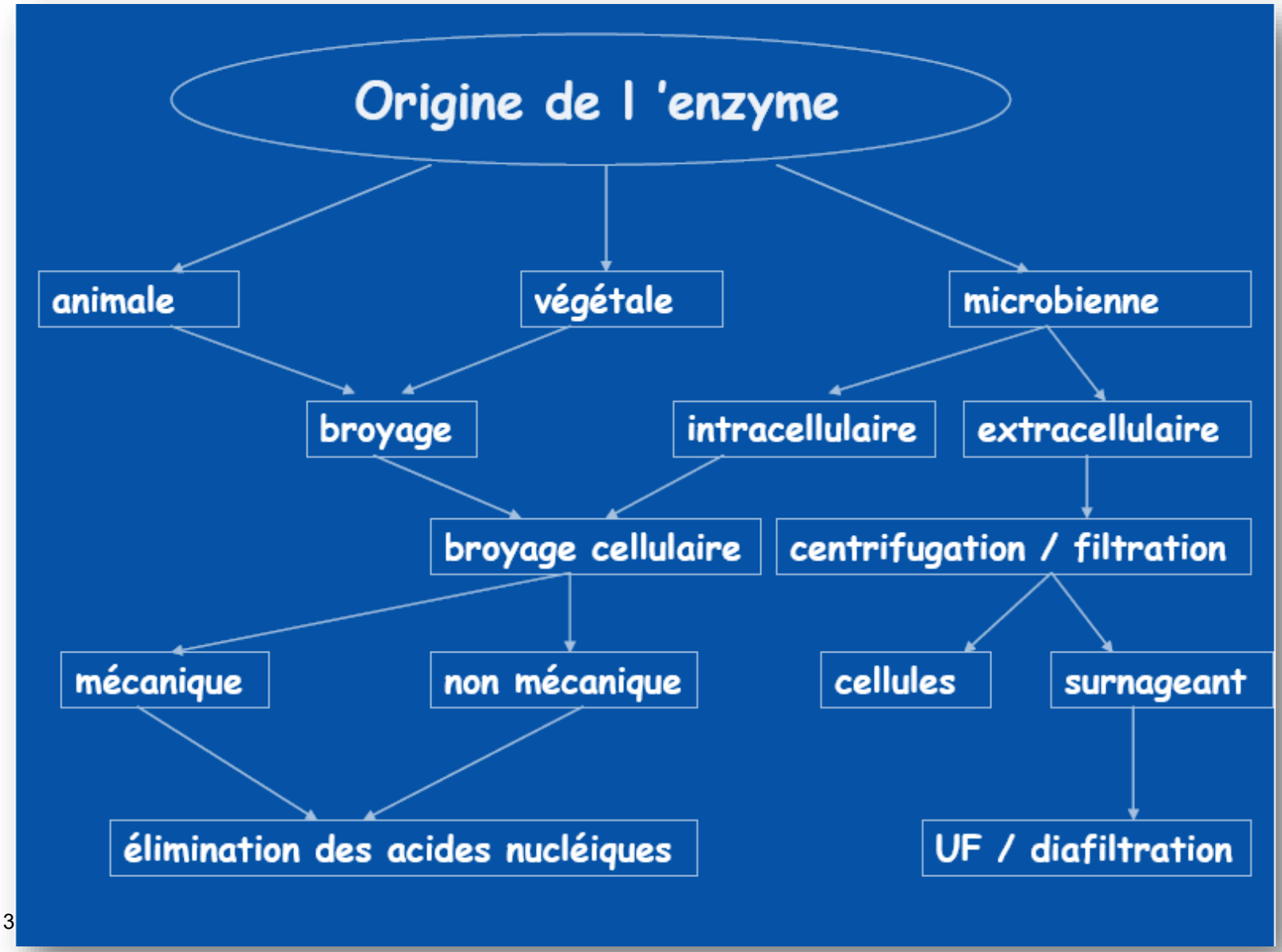


Immobilisation des enzymes

Prof. Khaled MB
PhD biology – Health & Environment/Nutrition
UDLSBA

جامعة جيلالي ليابس
سيدي بلعباس
UDL
Université
DJILLALI LIABES
Sidi Bel-Abbès


Matière première
(animale, végétale, microbienne)
1. Extraction
Extrait total
2. Fractionnement
Extrait brut
= Préparation enzymatique
3. Purification
Enzyme purifiée
Standardisation, conditionnement


Origine de l 'enzyme
animale
végétale
microbienne
broyage
intracellulaire
extracellulaire
broyage cellulaire
centrifugation / filtration
mécanique
non mécanique
cellules
surnageant
élimination des acides nucléiques
UF / diafiltration

Principales Méthode d'extraction

1. Méthodes mécaniques

- **abrasion** → microbilles de verre
- **homogénéisation** à haute pression → « liquid shear »
- **Sonication** → 20 kHz

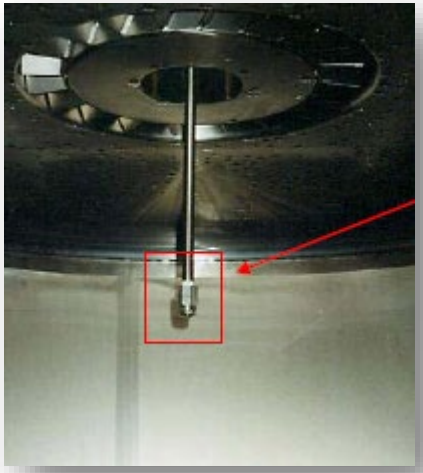
« French press »

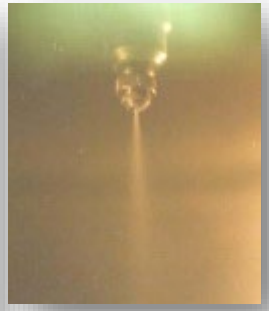
- 25 °C
2 500 bars

Principales Méthode d'extraction

2. Méthodes physiques

- choc **osmotique** → solutions hypertoniques
- choc **thermique** → *n* cycles congélation / décongélation
- choc **hydrique** → « spray drying »





3. Méthodes chimiques

- **lyse alcaline :** → pH 12 (NaOH, KOH)
- **lyse enzymatique !** → lyzozyme (protéine du blanc d'œuf)
  - rupture des liaisons β,1-4 des peptidoglycanes
  - bactéries gram+
- **détergents** → rôle dispersant des membranes
  - ioniques (lauryl sulfate Na^+)
  - non ioniques (Tween, Teepol, Triton)
- **solvants** → séparation du « non protéique »
  - toluène
  - butanol
  - acétone
  - chloroforme…

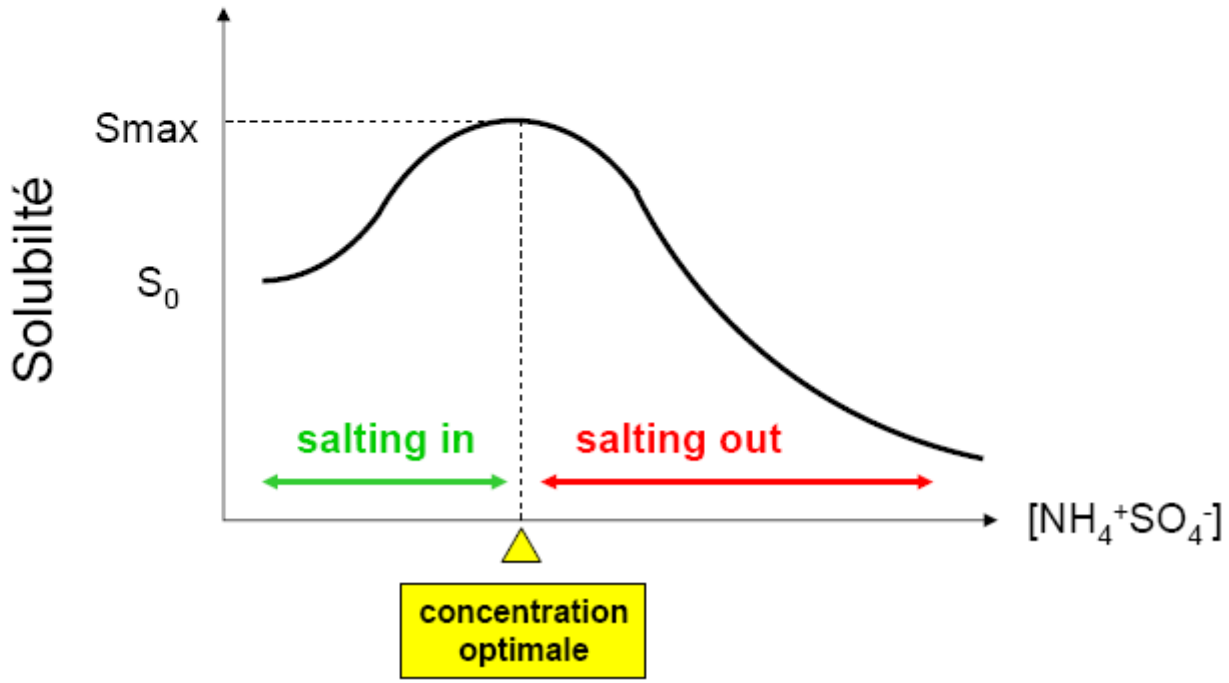
2. Principales Méthode de Purification

- **Objectifs**
  - purifier une (ou plusieurs) enzyme(s) à partir d'un extrait brut
  - éliminer les activités contaminantes

2. Principales Méthode de Purification

Précipitation fractionnée

- par addition de sels, d'alcools, d'ions métalliques
- exemple → fractionnement au sulfate d'ammonium



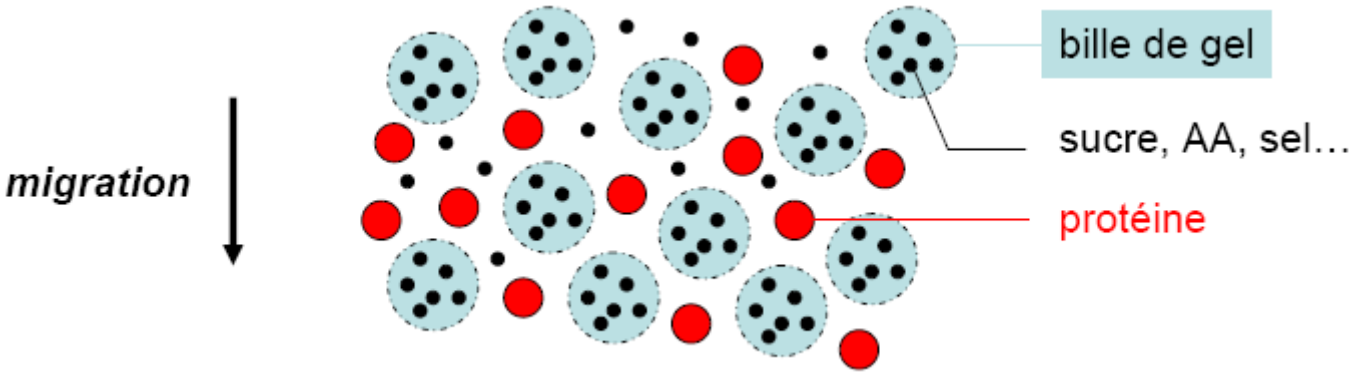
Méthodes chromatographiques

- **Généralités** :
  - reposent sur la *migration différentielle* des constituants d'un mélange
  - selon leur *coefficients de partage*
  - vis-à-vis de deux *phases* :
    - phase **mobile** (ou d'entraînement) → éluant
    - une phase **stationnaire** (ou de rétention) → support
  - nombreuses techniques

Chromatographie de gel filtration

- Principe
  - séparation en fonction de MM et encombrement
  - phase stationnaire = « gel » (tamis)

    → polydextrane, polyacrylamide, poystyrène, verre…
  - séparation conditionnée par :
    - Ø des pores
    - degré de réticulation des gels

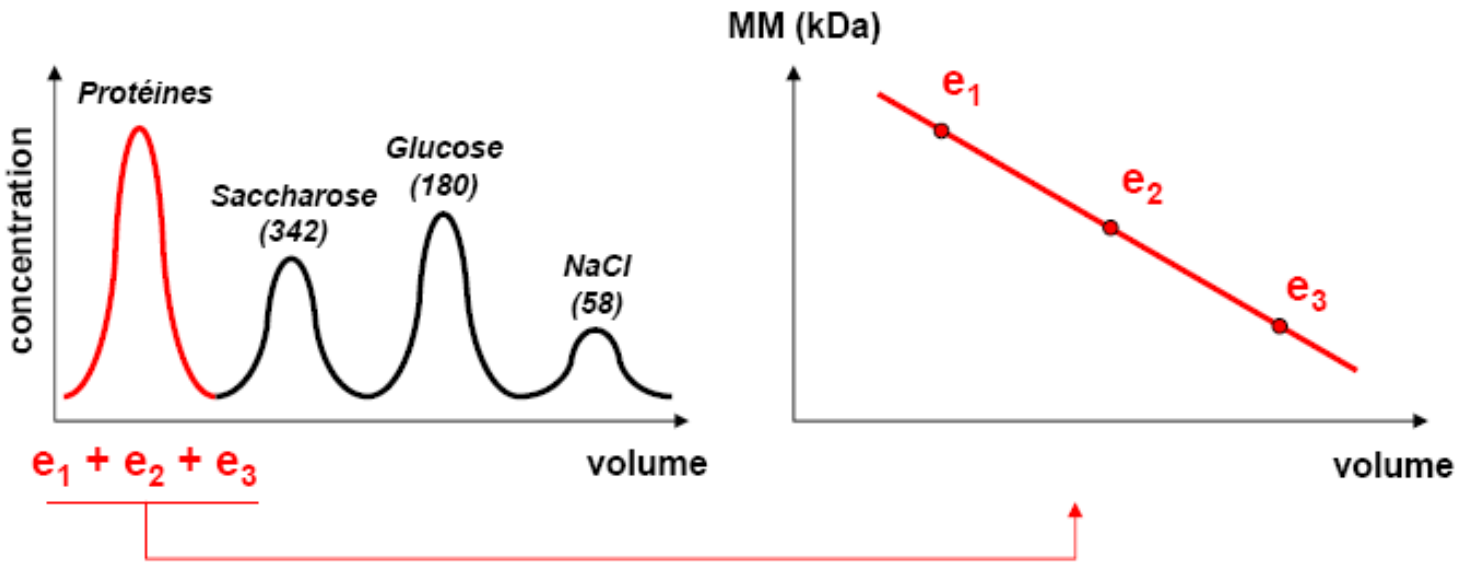


Chromatographie de gel filtration

- exemple de **séparation** : → Séphadex G

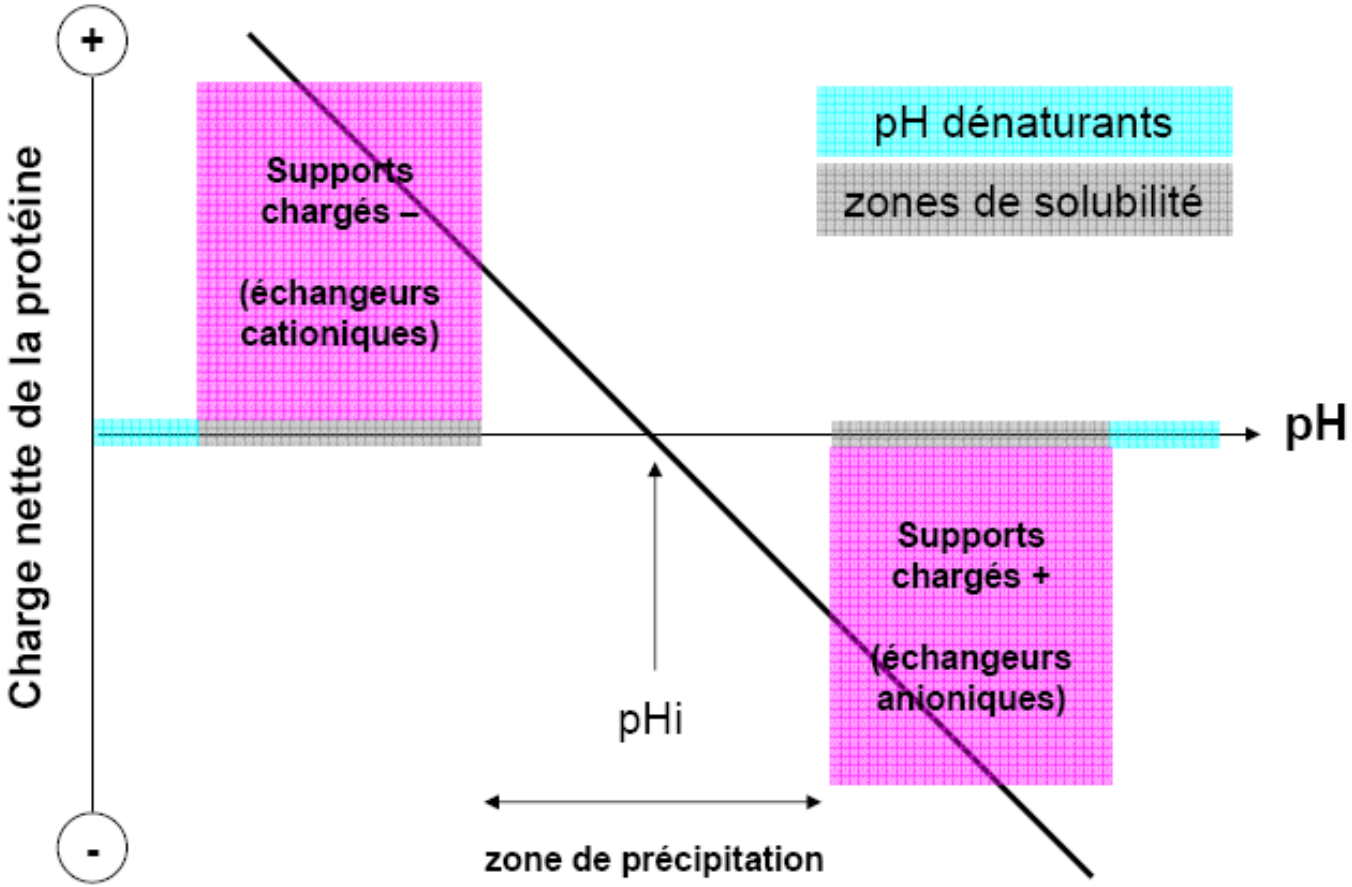
Extrait brut (G25)

Extrait protéique (G200)

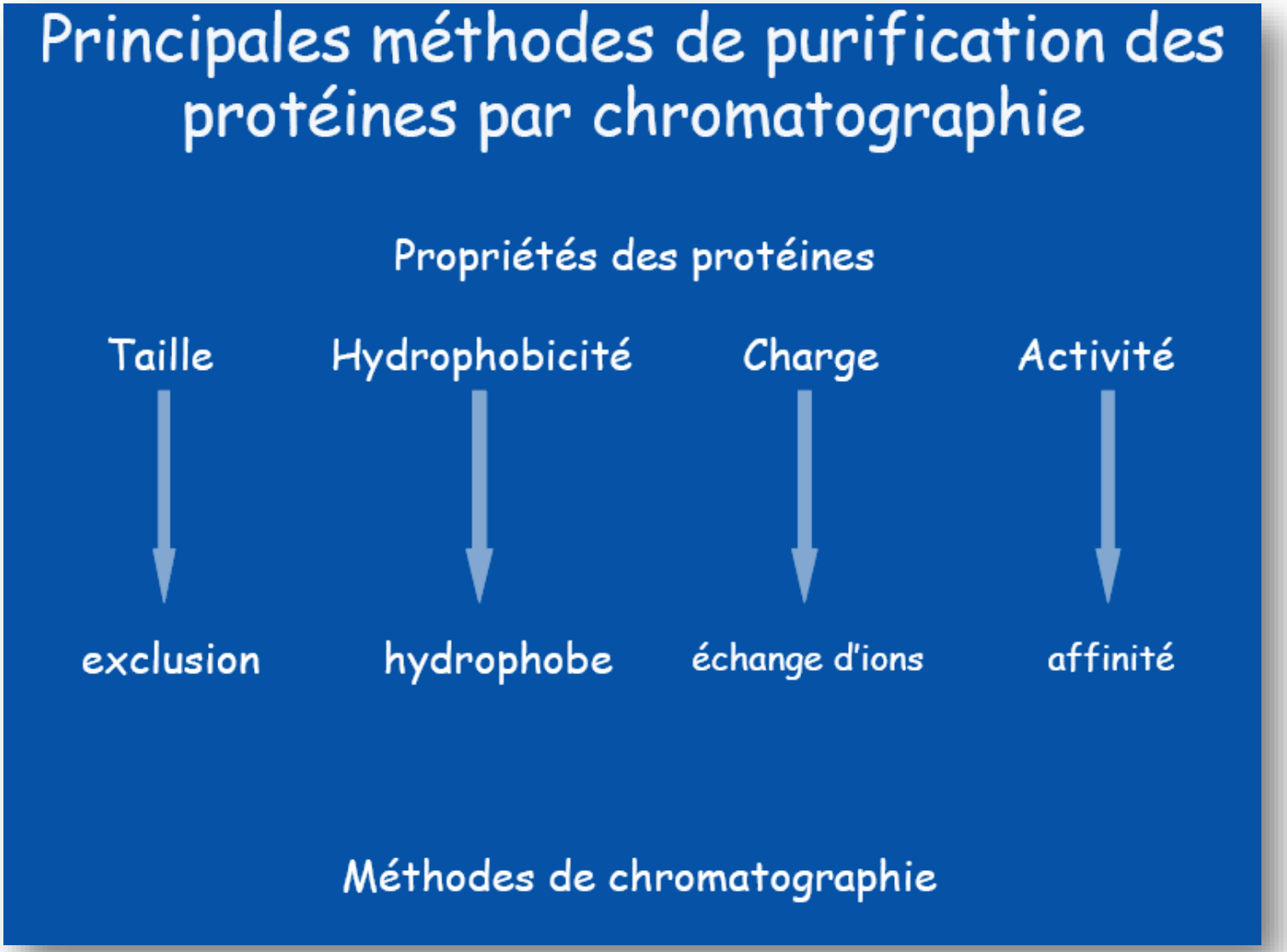


2. Principales Méthode de Purification

Chromatographie d'échange d'ions



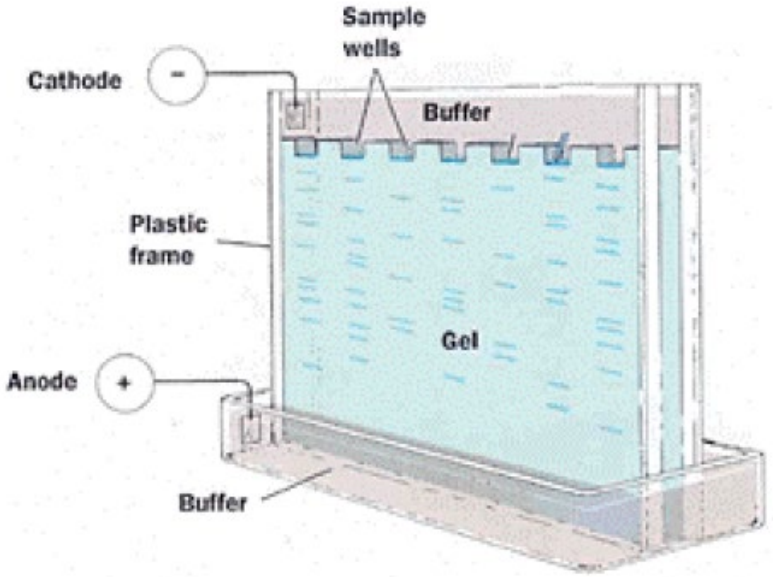
2. Principales Méthode de Purification



Protein/Enzyme Purification

Determination of Purity of Enzyme after Purification Procedure

Although several methods are available for determining purity, the easiest to apply and best method is PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE).
Thus, determination of purity is done by PAGE:



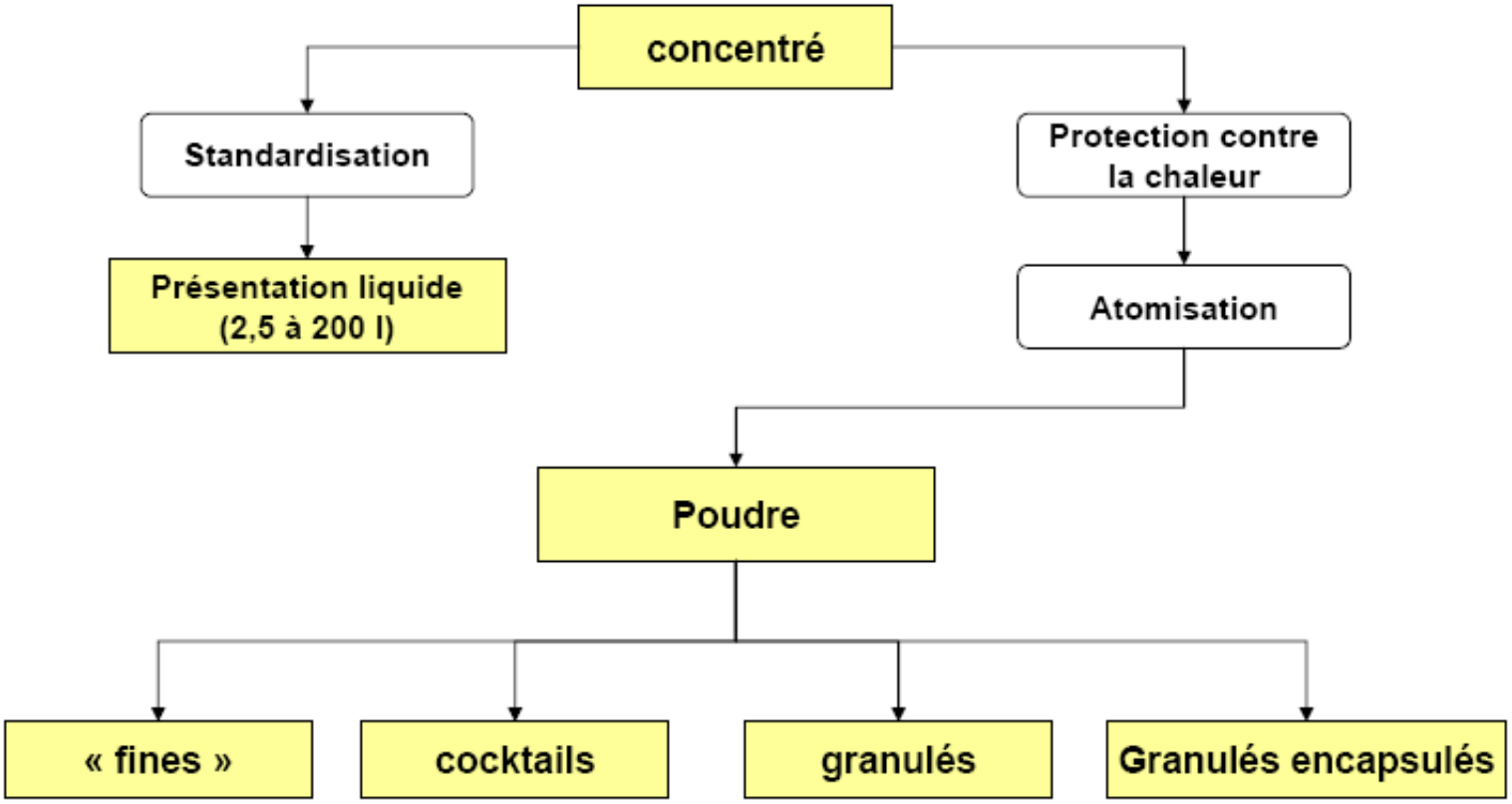
©1990 John Wiley & Sons

Then after electrophoresis the gel can be stained for enzyme activity and for protein content

Exemple simple de production d'enzyme

- production de **glucose déshydrogénase** par *Bacillus megaterium*
  - culture de *B. megaterium*, M 1286 → extraits de levure, peptones, glucose…
  - $[GDH]_{max}$ après 20 – 24 h de culture
  - filtration des bactéries après culture
  - extraction par homogénéïsation haute pression
  - centrifugation
  - récupération du surnageant (extrait brut)
  - purification

Conditionnement
(présentation, formulation commercialisation)

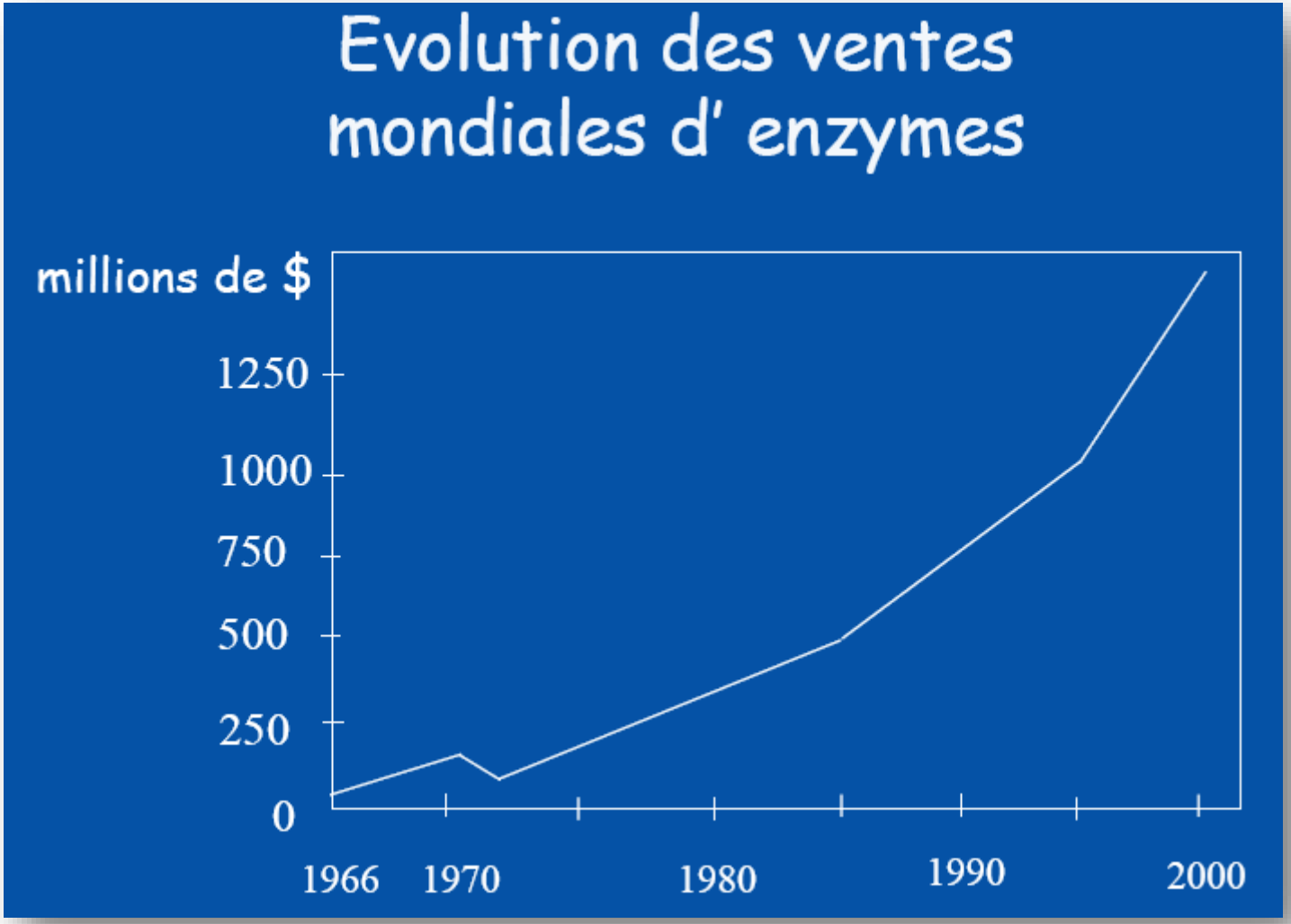


PAUSE

Les producteurs d'enzymes

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

PAUSE


Evolution des ventes mondiales d' enzymes
millions de $
1250
1000
750
500
250
0
1966
1970
1980
1990
2000

PAUSE

Enzymes produites par *A. niger*

Endo	Glucose oxydase Catalase
Exo	alpha-amylase Amyloglucosidase Maltase Cellulase Pectinase Béta-glucanase Inulinase Lipase Lactase Protéase acide

IMMOBILISATION

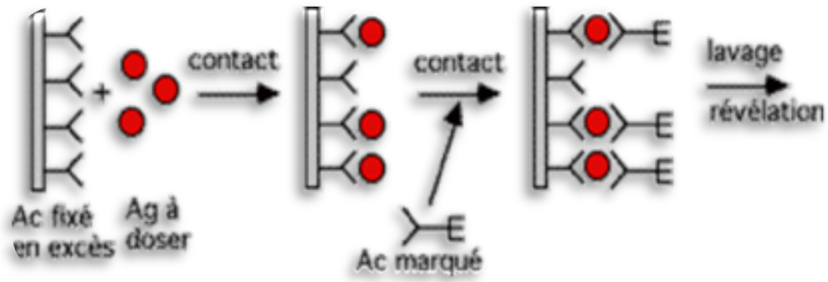
DES ENZYMES

Définition

L’immobilisation d’une enzyme consiste en sa rétention dans une phase insoluble par liaison chimique ou rétention physique.

L’intérêt d’utiliser des enzymes immobilisées dans des bio réacteurs tient essentiellement à leur récupération facile que celles des enzymes solubles.

Définition

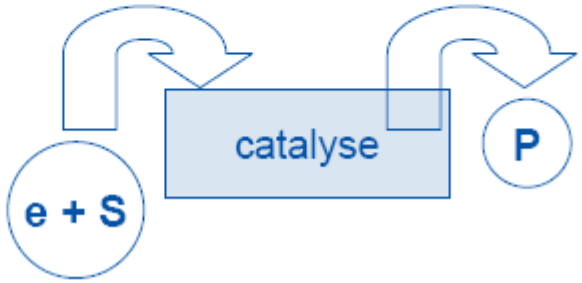


☞ Donc par enzyme immobilisée on entendra une enzyme retenue par des moyens mécaniques dans une région de l'espace avec rétention de l'activité catalytique pour une utilisation en continu et / ou de façon répétée.

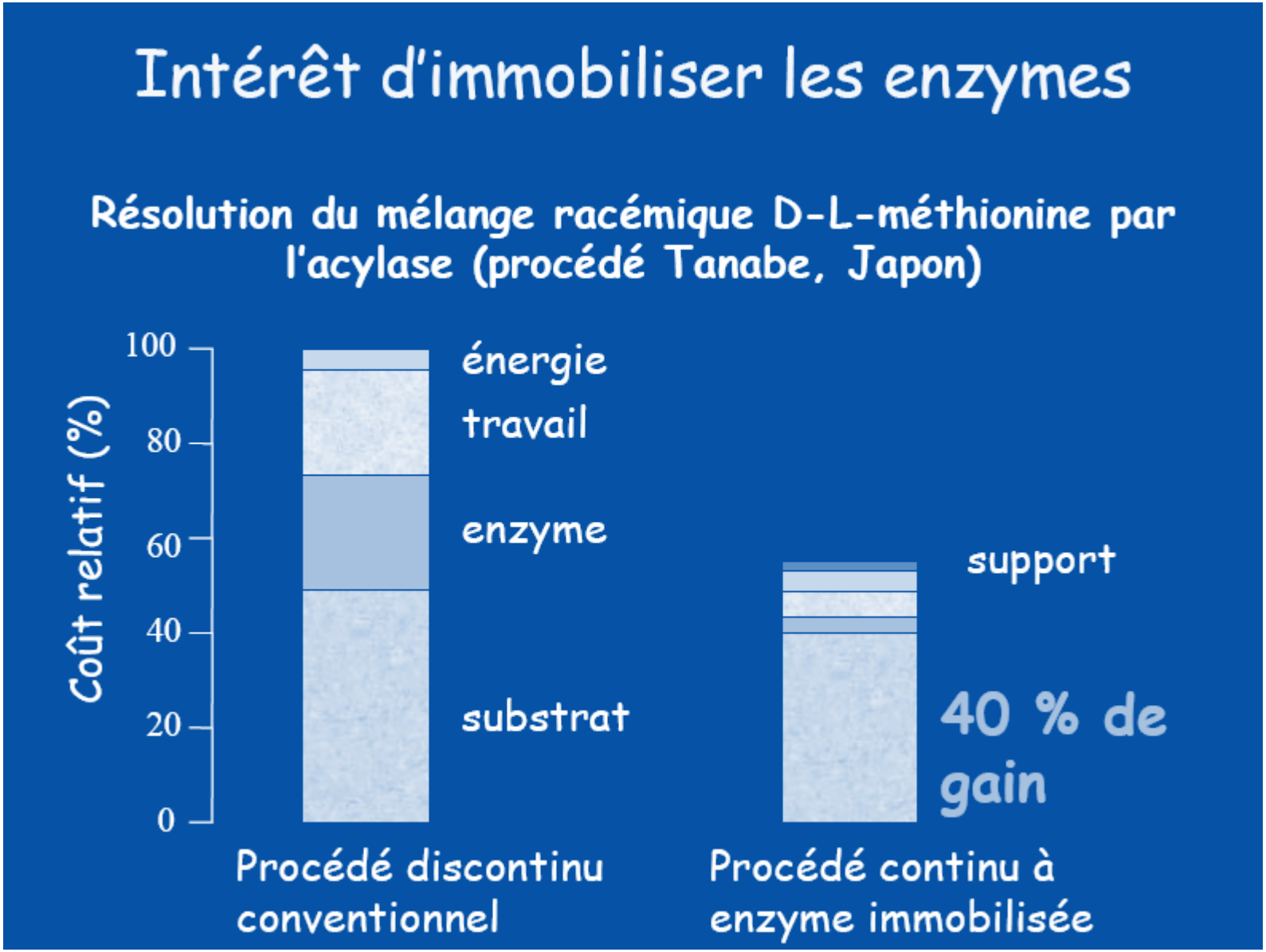
Intérêt ?

- **Pourquoi ?**
  - coût d'obtention (extraction, purification)
  - instabilité en solution
  - recyclage difficile après catalyse

Catalyse discontinue

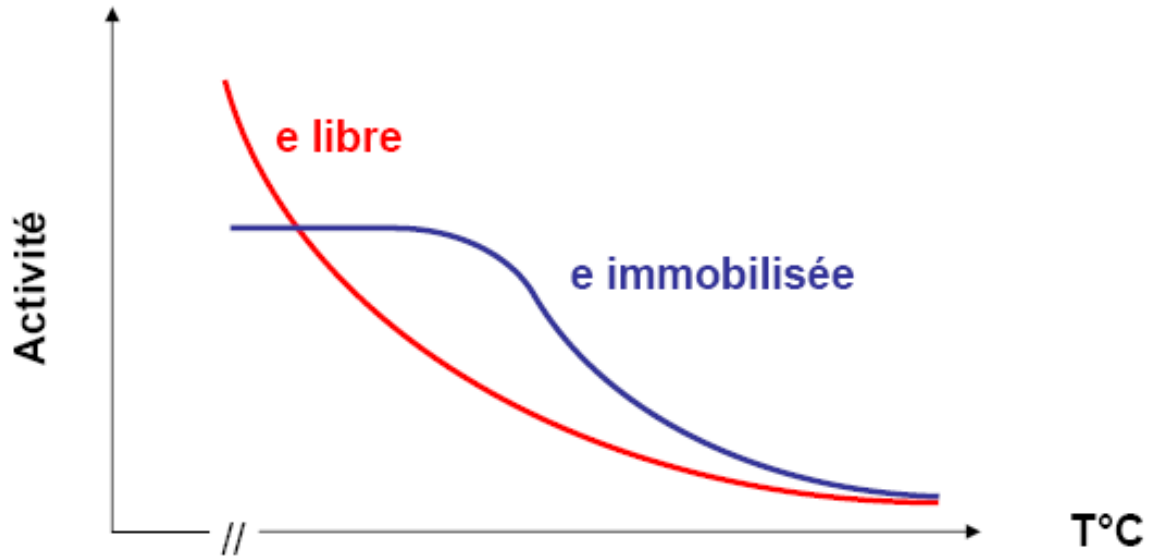


Intérêt ?


Intérêt d'immobiliser les enzymes
Résolution du mélange racémique D-L-méthionine par l'acylase (procédé Tanabe, Japon)
Coût relatif (%)
100
80
60
40
20
0
énergie
travail
enzyme
substrat
support
40 % de gain
Procédé discontinu conventionnel
Procédé continu à enzyme immobilisée

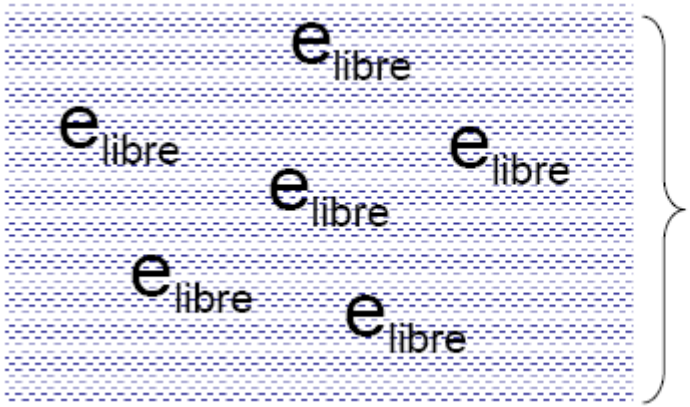
Propriétés des enzymes immobilisées

- activité ↘ ; stabilité ↗



Environnement de catalyse

- Enzyme **libre**
  - isolée de l'environnement cellulaire
  - toutes les molécules sont identiques
  - l'environnement est *continu*

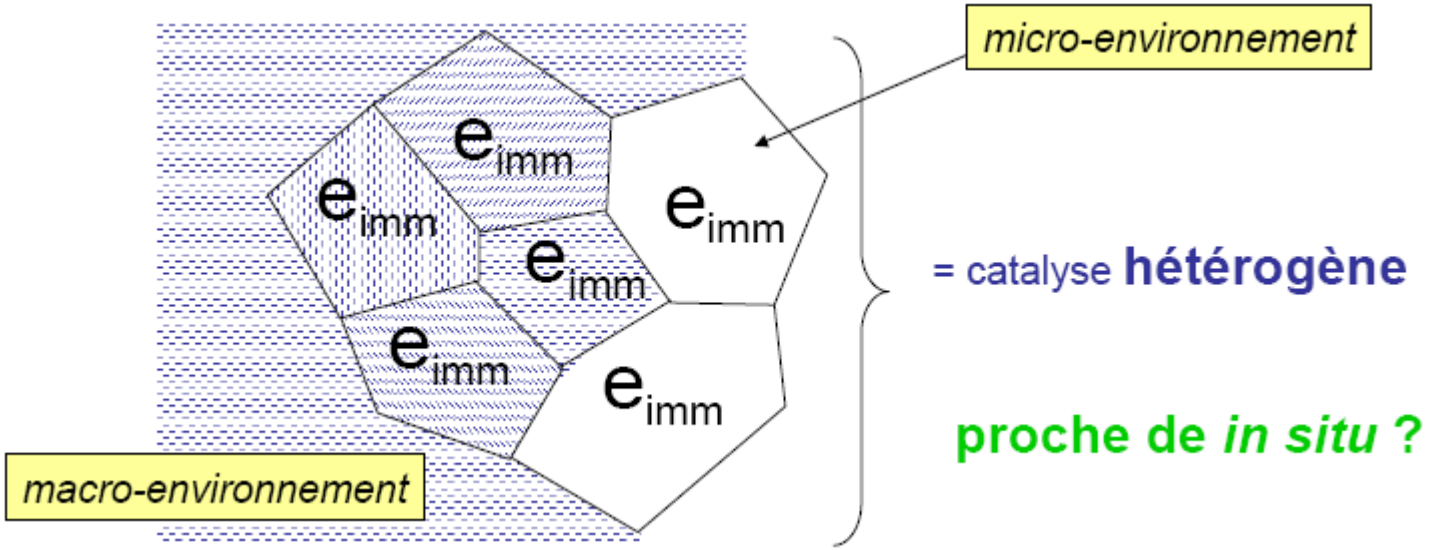


= catalyse **homogène**
(cinétique Michaélienne)

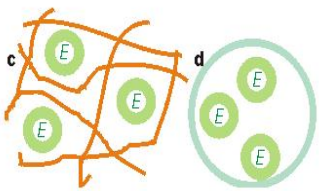
≠ in situ

Environnement de catalyse

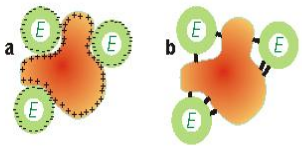
- Enzyme **libre**
- Enzyme **immobilisée**
  - fixée ou confinée
  - toutes les molécules ne sont pas identiques
  - l'environnement est *discontinu*



MÉTHODES D'IMMOBILISATION



Méthodes par confinement (Ou Inclusion)

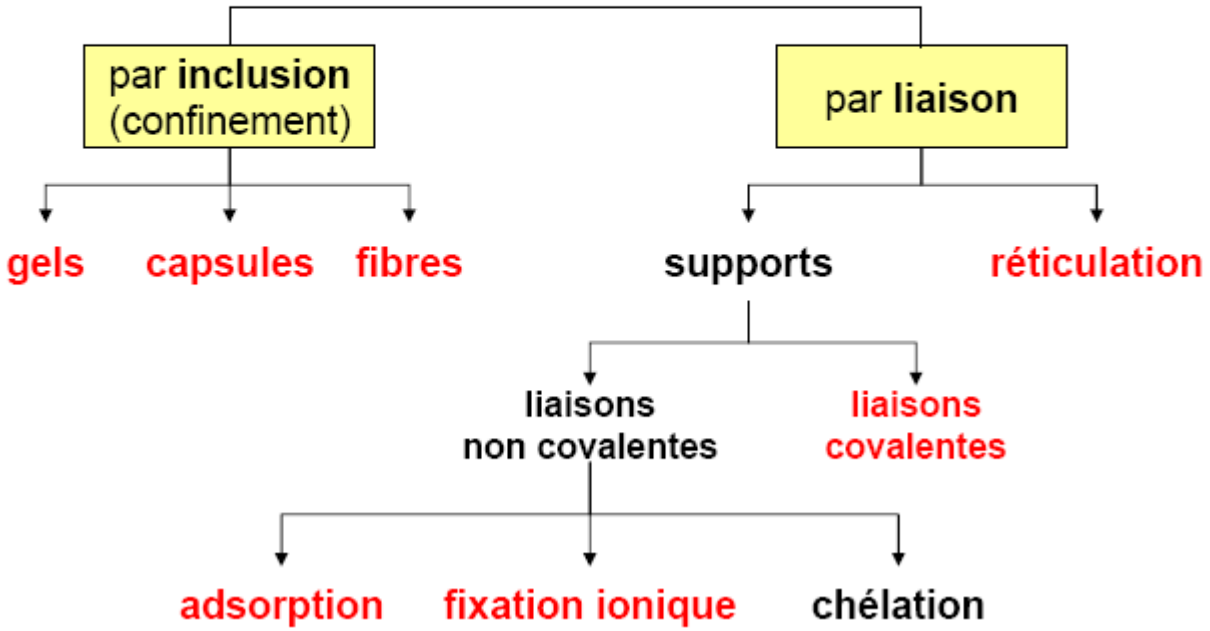


Méthodes avec mise en jeu de liaisons

MÉTHODES D'IMMOBILISATION

Principes d'immobilisation

- Comment ?



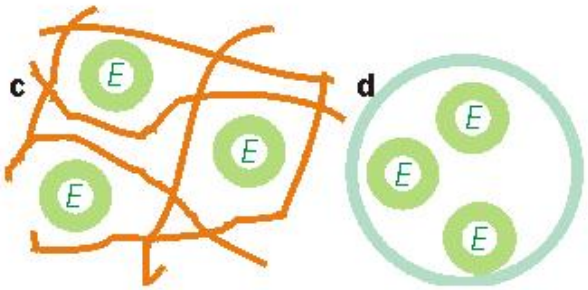
MÉTHODES D'IMMOBILISATION

Le choix d'une méthode d'immobilisation est une tâche délicate : il n'existe pas de méthode universelle

MÉTHODES D'IMMOBILISATION

	Confinement ou inclusion	Mise en jeu des liaisons		
		Fixation sur support		
Caractéristiques		Liaison non covalente	Liaison covalente	Réticulation
Préparation	Difficile	Simple	Difficile	Moyenne
Force de la liaison	Moyenne	Faible à moyenne	Forte	Forte
Activité de l'enzyme	Faible	Elevée	Elevée	Faible
Régénération	Difficile	Possible	Impossible	Impossible
Coût	Moyen	Faible à moyenne	Elevé	Moyen
Stabilité	Grande	Faible à moyenne	Grande	Grande

1. Méthodes par confinement (Ou Inclusion)



1. Méthodes par confinement (Ou Inclusion)

L'inclusion

- Les enzymes sont retenues à l'intérieur d'une matrice poreuse

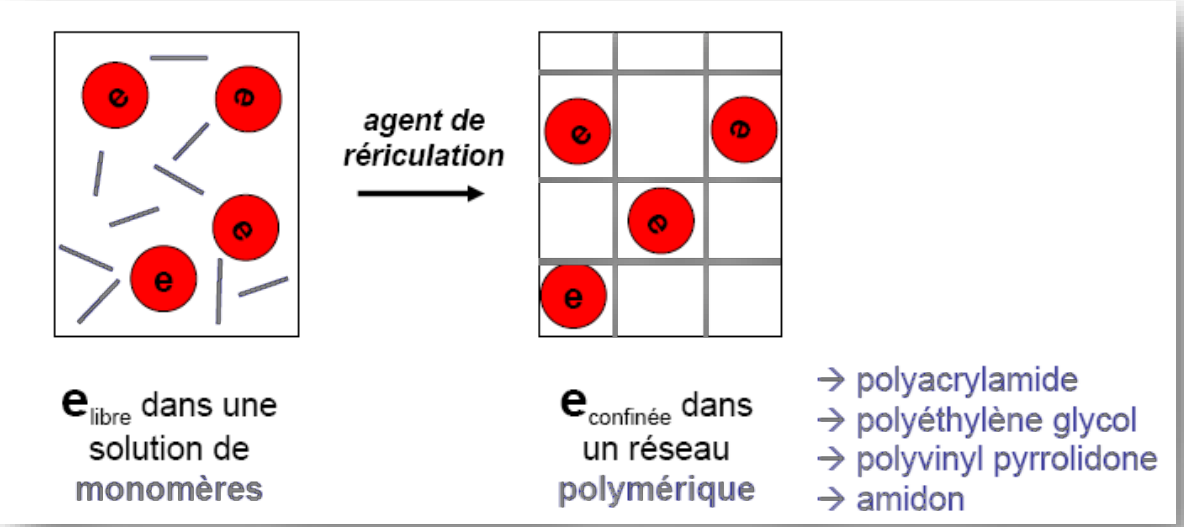
Inclusion dans un gel

Inclusion dans une micro-capsule

Inclusion dans une fibre

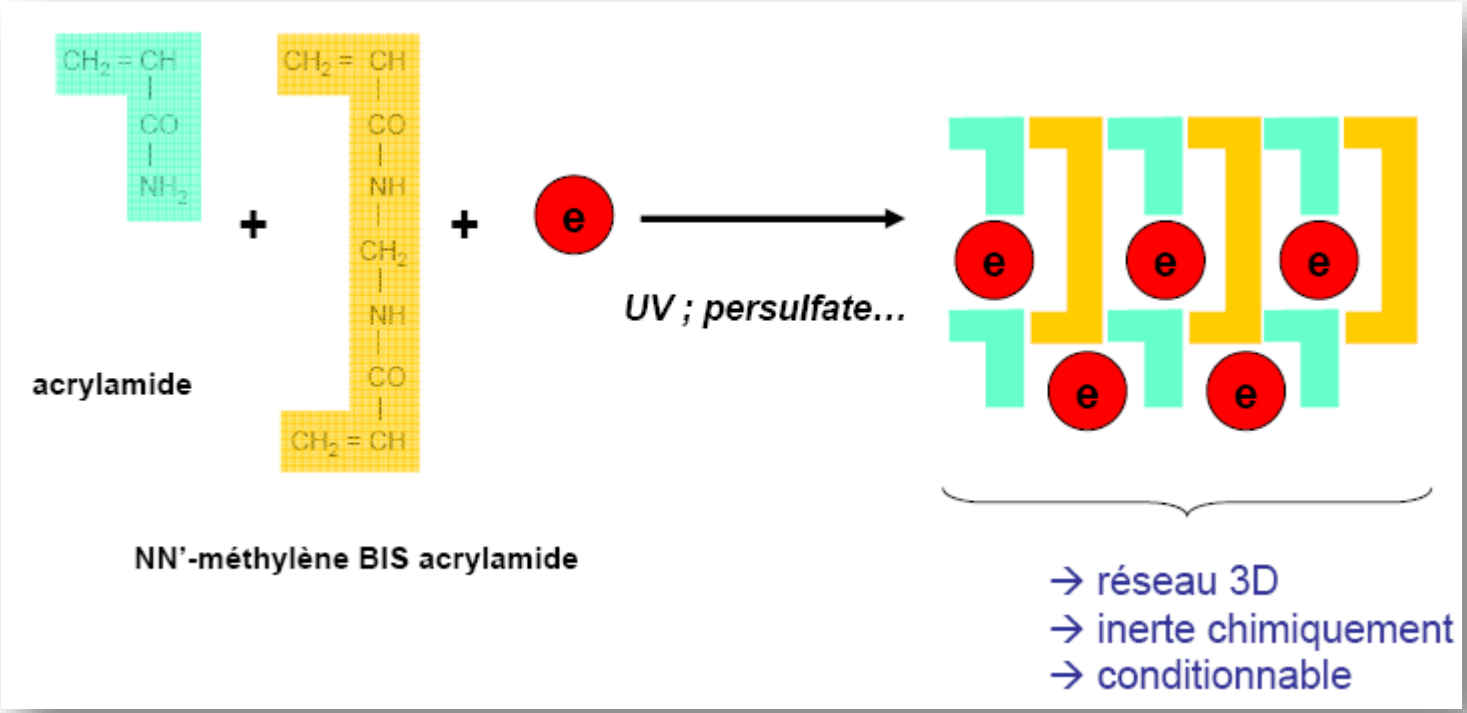
1. Inclusion dans une matrice

1.1 Gels



C'est la méthode la plus utilisée. L'enzyme est emprisonnée dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble très souvent le polyacrylamide ou l'alginate.

1.1.1 Gels de Polyacrylamide



1.1.1 Gels de Polyacrylamide

L'inconvénient de l'inclusion dans les monomères d'acrylamide et la toxicité .

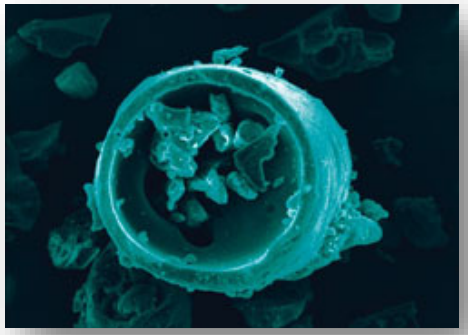
L'alginate est un polyoside formant une solution visqueuse en présence de cations monovalents comme le sodium. En présence de cations bivalents comme le calcium il forme un gel.

1.1.1 Gels de Polyacrylamide

La solution enzymatique est mélangée à une solution d'alginate de Na^{++} puis le mélange est dispersé goutte à goutte dans une solution de CaCl. L'alginate se gélifie sous forme de billes dans lesquelles l'enzyme est retenue. Cette méthode est très simple mais possède deux inconvénients majeurs :

- le réseau formé est presque toujours trop lâche pour retenir complètement l'enzyme ;
- en présence d'agent complexant du calcium, le gel se solubilise.

1.1.2 La micro-encapsulation

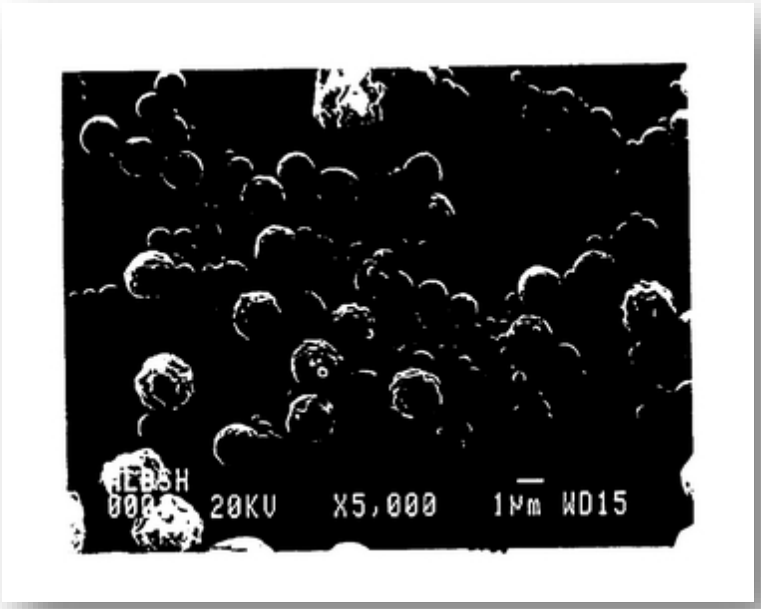


L'enzyme est retenue dans une microcapsule délimitée par une membrane semi – perméable exemple : membrane de nylon (biodégradable). Les microcapsules peuvent être récupérées par centrifugation.

Les enzymes encapsulées sont d'assez grande stabilité. Cette technique évite les réactions immunologiques et l'hypersensibilité (important en thérapie enzymatique).

L'application industrielle n'existe pas encore.

1.1.2 La micro-encapsulation

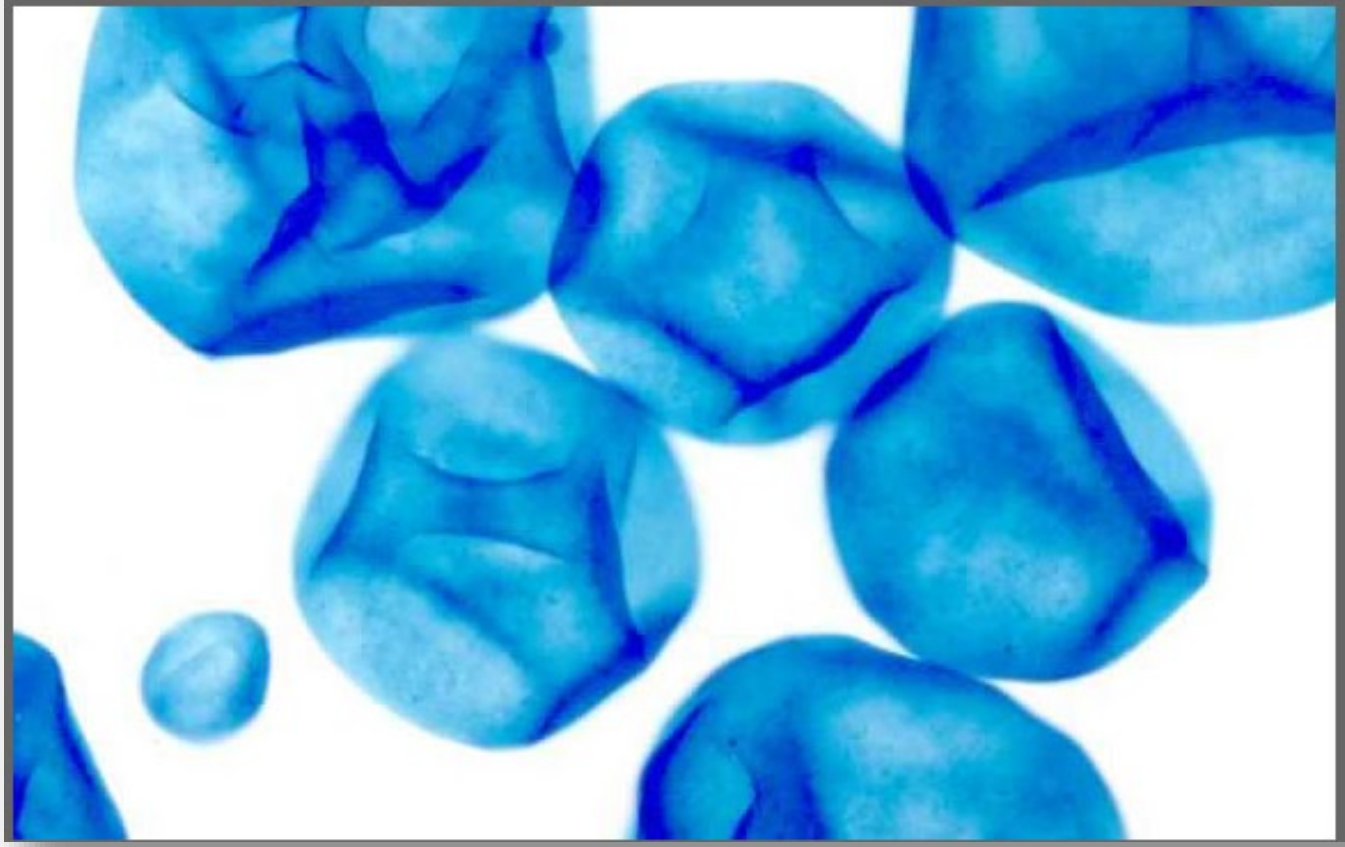


Microencapsulateur d'enzymes

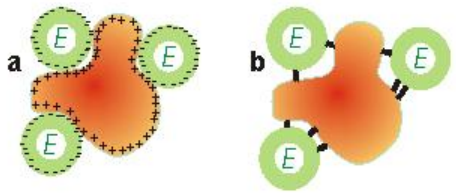
1.1.2 La micro-encapsulation

Microcapsules obtenues par réticulation de protéines de soja. Cliché en microscopie optique

© CNRS/URCA - Photo M. -C. Lévy



2. Méthodes par mise en jeu de liaisons

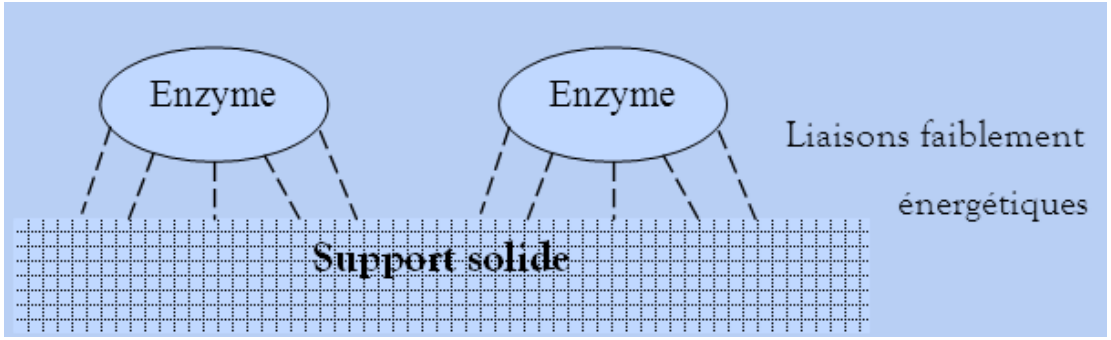


Contrairement aux méthodes par confinement, l'immobilisation est due ici à la formation de liaisons fixant les molécules d'enzymes :

Les liaisons, crées entre l'enzyme et le support, peuvent être non covalentes ou covalentes.

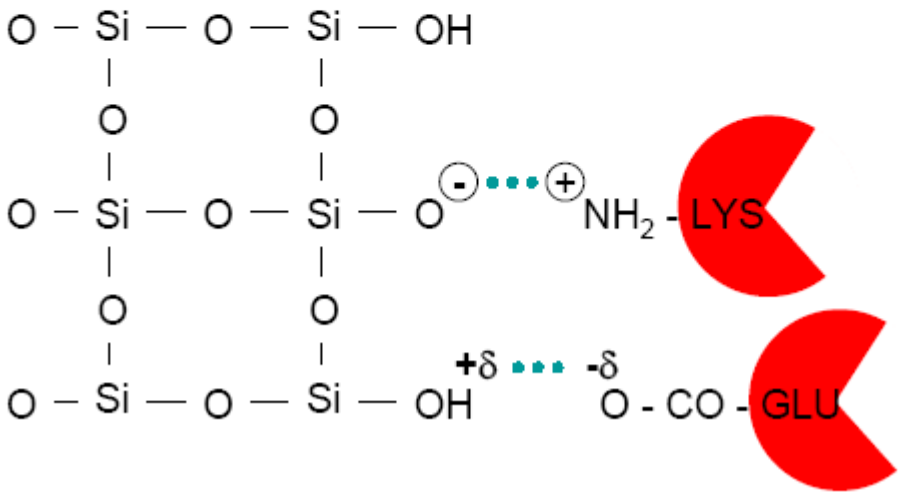
2.1 .1 Par Adsorption

A la surface d'une matrice insoluble poreuse (**verre poreux, les argiles et la silice poreuse**) ou non avec des liaison faibles (liaisons hydrogène, de Van der Waals, interaction hydrophobes) c'est la méthode la plus ancienne.



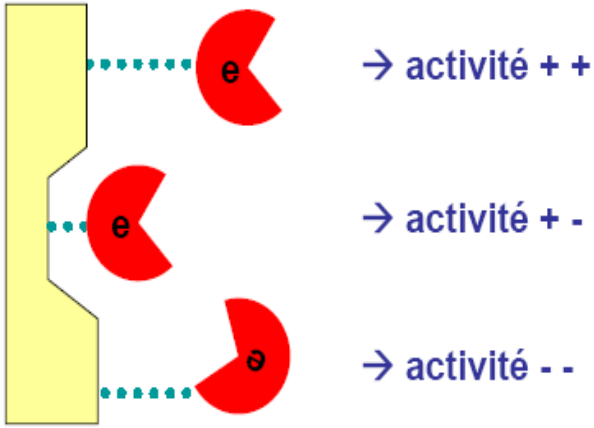
2.1 .1 Par Adsorption

- liaisons **faibles**
  - électrostatiques (forces de Van der Waals)
  - ioniques
  - hydrogène
- support minéral : **verre poreux** (silice)



2.1 .1 Par Adsorption

- avantages
  - facile à mettre en œuvre (pH)
  - fixation rapide au support
- inconvénients
  - fixation faible (désorption par le substrat)
  - orientation de l'enzyme ?



En plus pas d'intervention d'agents chimiques donc pas de changement conformationnel et par conséquent pas ou peu de perte d'activité.

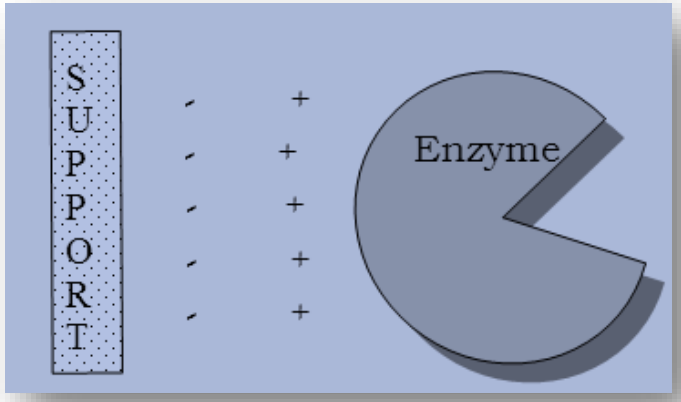
2.1 .1 Par Adsorption ionique sur support chargé

Le support utilisé peut être minéral ou organique :

on utilise généralement une phase stationnaire échangeuse d'ions.

Cette méthode n'est possible que s'il existe pour l'enzyme un domaine de pH non dénaturant où la molécule est convenablement ionisée.

Le principal inconvénient est la fragilité de la fixation.



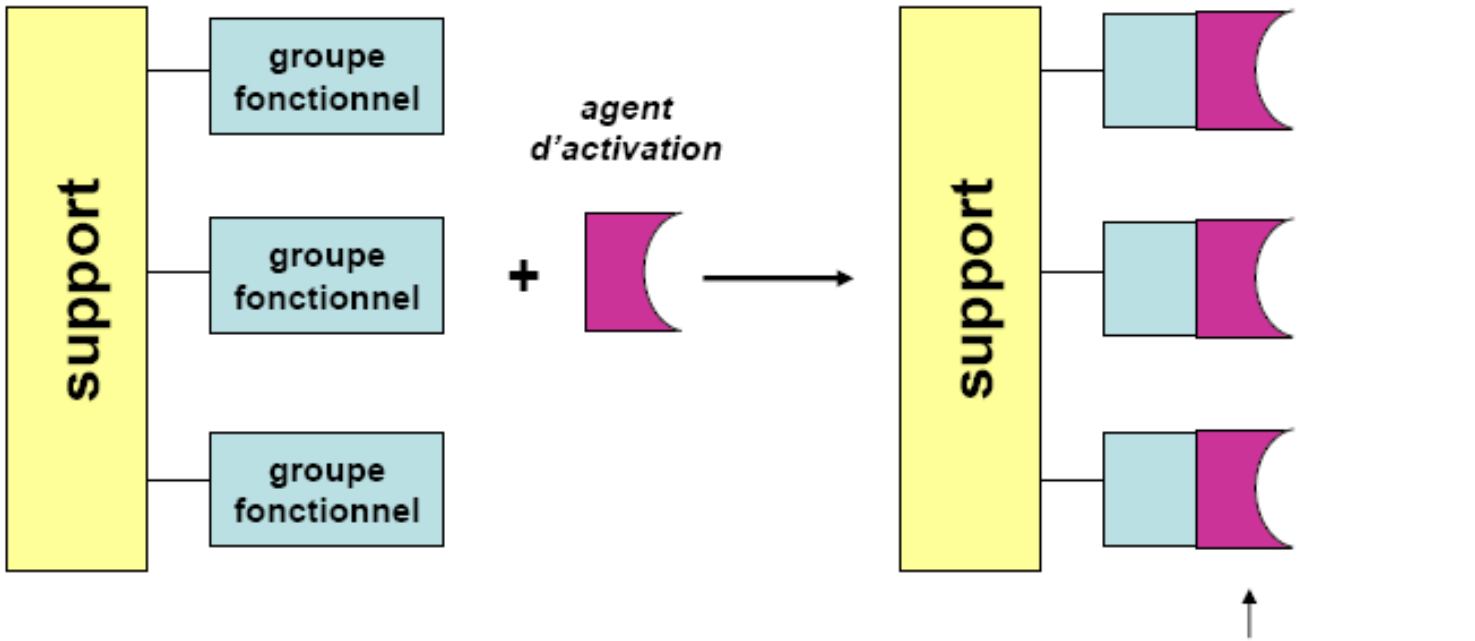
2.1 Liaisons Covalentes (LC)

La fixation est réalisée en formant des liaisons covalentes entre les groupements fonctionnels du support et les groupements fonctionnels de l'enzyme.

La fixation nécessite généralement une activation préalable des groupements fonctionnels du support ou l'utilisation d'un agent de condensation. **Exemple** : Le bromure de cyanogène **CNBr (méthode d'Axen & Porath)**

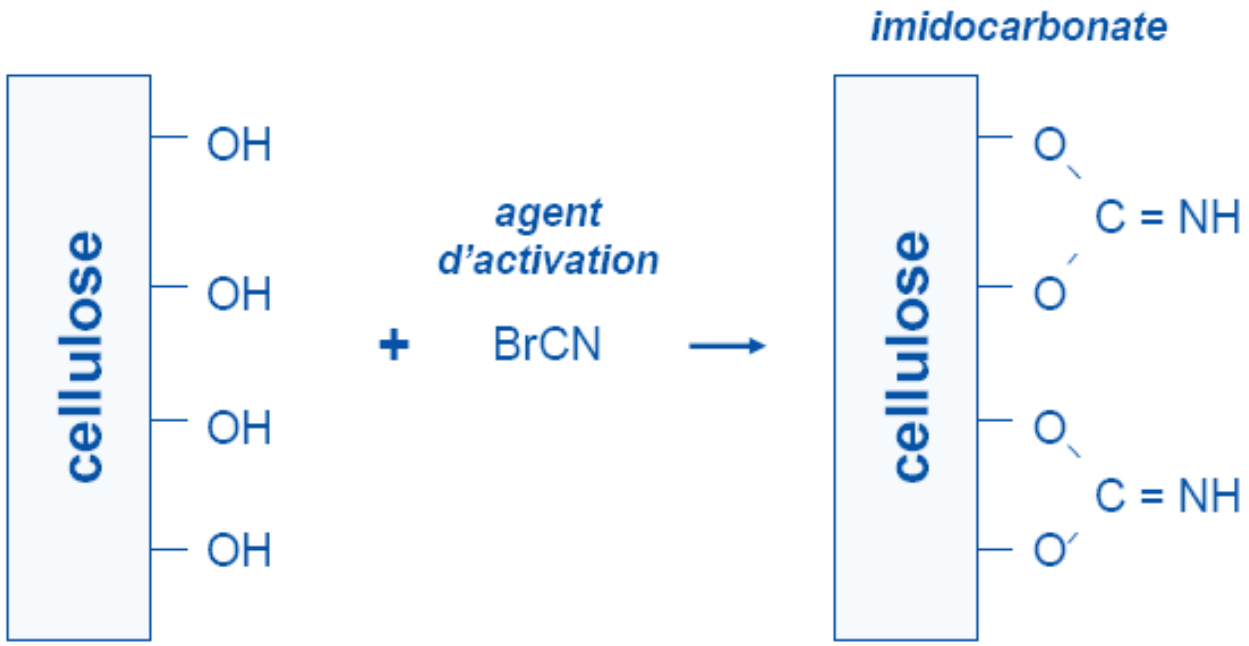
2.1 Liaisons Covalentes (LC)

– 1ère étape : *activation* du support



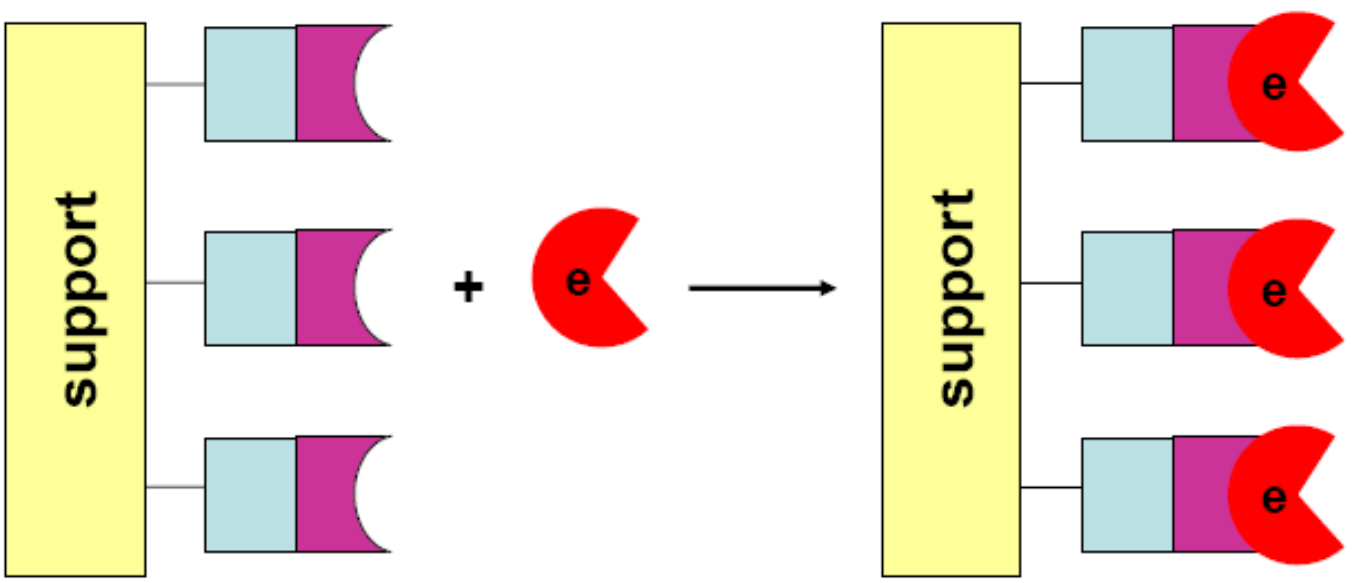
2.1 Liaisons Covalentes (LC)

- exemple : immobilisation au **bromure de cyanogène (BrCN)**
  - *activation*



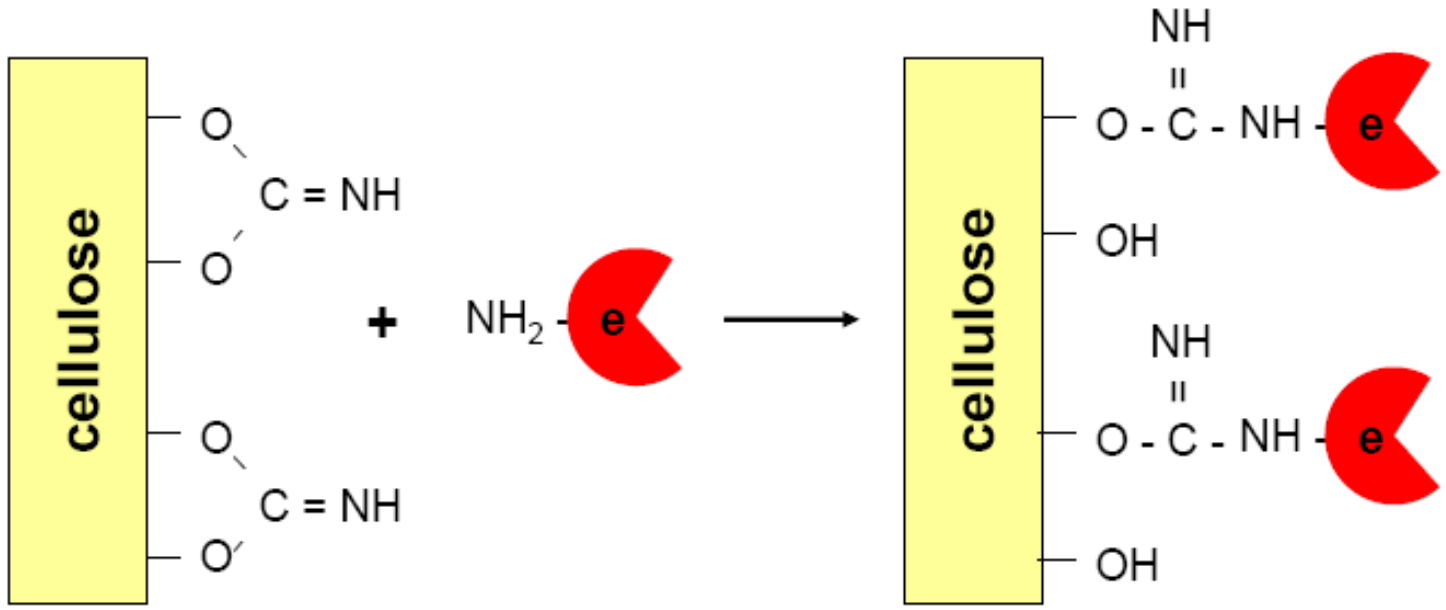
2.1 Liaisons Covalentes (LC)

– 2ème étape : *fixation* de l'enzyme

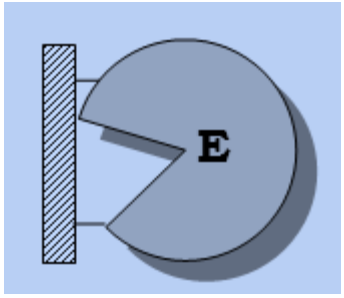
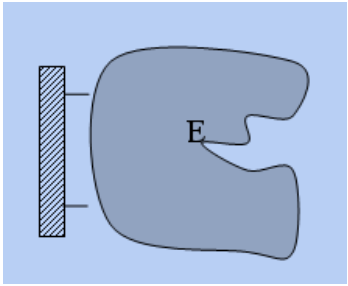


2.1 Liaisons Covalentes (LC)

- exemple : immobilisation au **bromure de cyanogène (BrCN)**
  - *fixation*



Avantage & Inconvénients

1. L’avantage est la solidité de liaison

2. L’inconvénient de la méthode d’immobilisation par covalence, outre sa difficulté de mise en œuvre et son caractère dénaturant par suite de la distorsion possible de la structure spatiale de la molécule.