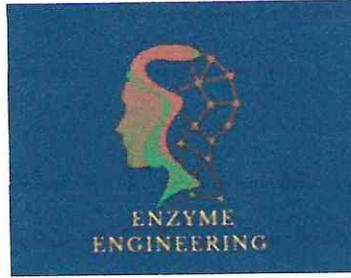


## POLYCOPIE PEDAGOGIQUE

### Cours de Génie-Enzymatique



Cours destinés aux étudiants en Master de Biochimie-Immunologie

et Master de Biochimie

Réalisé par le Dr. Scheherazede KASSOUAR

Année : 2023/2024

# Le Génie Enzymatique



## Sommaire

<b>I. Introduction au génie enzymatique.....</b>	
<b>II. Structures et activités des enzymes.....</b>	P6
<b>II.1. Action cinétique.....</b>	P6
<b>II.2. Nomenclature.....</b>	P6
<b>II.3. Relations structure/activité.....</b>	P7
<b>II.4. Mode d'action des enzymes.....</b>	P8
<b>III. Les principaux domaines d'utilisation des enzymes dans l'industrie.....</b>	P8
<b>IV. Production d'enzymes par fermentation.....</b>	P10
<b>IV.1. La Biomasse.....</b>	P10
<b>IV.2. La Fermentation.....</b>	P10
<b>IV.3. Les enzymes : Le choix de la souche.....</b>	P14
<b>IV.4. Les milieux de production.....</b>	P16
<b>IV.5. La conduite de la Fermentation.....</b>	P16
<b>V. Extraction et purification des enzymes.....</b>	P17
<b>V.1.Séparation des produits insolubles.....</b>	P18
<b>V.1.1.La centrifugation.....</b>	P18
<b>V.1.2.La centrifugation différentielle.....</b>	P18
<b>V.1.3.La lyse cellulaire.....</b>	P18
<b>V.1.4. La précipitation .....</b>	P21
<b>V.1.5. La filtration ou séparation membranaire.....</b>	P21
<b>V.2. Séparation des produits solubles .....</b>	P23
<b>V.2.1 La chromatographie échangeuse d'ions.....</b>	P23
<b>V.2.2. La chromatographie d'affinité.....</b>	P26

V.2. Séparation des produits solubles .....	P23
V.2.1 La chromatographie échangeuse d'ions.....	P23
V.2.2. La chromatographie d'affinité.....	P26
V.2.3. L'électrophorèse SDS PAGE.....	P30
V. 3. Le test catalytique.....	P31
<b>VI. Immobilisation des enzymes.....</b>	<b>P32</b>
VI.1. Introduction.....	P32
<b>VI.2. Les différentes méthodes d'immobilisation.....</b>	<b>P33</b>
VI.2.1 Immobilisation par adsorption .....	P34
VI.2.2 Immobilisation par liaisons covalentes.....	P38
VI.2.3 Immobilisation par inclusion.....	P42
VI.2.4 Immobilisation par encapsulation ou insertion dans une membrane.....	P43
<b>VII. Domaines d'Applications des enzymes immobilisées .....</b>	<b>P45</b>
<b>VIII. Exemples d'applications des enzymes dans l'industrie.....</b>	<b>P51</b>
<b>Exemple 1 : Production de la levure de panification par voie biotechnologique.....</b>	<b>P51</b>
<b>Exemple 2 : La transformation des produits alimentaires par les enzymes.....</b>	<b>P79</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>P109</b>





## LISTE DES FIGURES

**Figure 1** : Structure tridimensionnelle de deux enzymes très largement utilisées dans les industries alimentaires.

**Figure 2** : Présentation d'un fermenteur.

**Figure 3** : Fermenteur industriel.

**Figure 4** : Les différents bioréacteurs.

**Figure 5** : Sonicateur (Fisherbrand <sup>TM</sup>).

**Figure 6** : La French press.

**Figure 7** : Les différents procédés de filtration membranaire.

**Figure 8** : La chromatographie par échange d'ions.

**Figure 9** : La chromatographie d'affinité.

**Figure 10** : Colonne de chromatographie d'affinité.

**Figure 11** : Appareillage SDS PAGE.

**Figure 12** : Gel SDS PAGE après coloration au bleu de coomassie.

**Figure 13** : Les différentes techniques d'immobilisations.



**LISTE DES TABLEAUX :**

**Tableau 1 :** Présentation des enzymes et leurs applications dans les domaines industriels Agroalimentaire et hors Agroalimentaire.

**Tableau 2 :** Les microorganismes producteurs d'enzymes.

**Tableau 3 :** Les milieux de cultures.



## I. Introduction

Le **génie** est l'aptitude naturelle de l'esprit qui rend capable de concevoir, de créer des choses, des concepts exceptionnels, c'est l'art d'utiliser au mieux l'information et les outils à fin de créer et de concevoir pour répondre à des situations problématiques.

Le **génie enzymatique** est par conséquent l'art d'utiliser l'enzyme à une fin précise en passant par l'identification de ses spécificités, ses caractéristiques, sa production et les conditions de son utilisation.

Exemple l'utilisation des enzymes dans la production du biodiesel. Dans ce cas il s'agit de l'utilisation de cellulase pour la dépolymérisation et la digestion enzymatique de la cellulose pour produire des monomères simples d'utilisation.

L'enzyme est une molécule (protéine ou ARN dans le cas des ribozymes) permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire sans modifier l'équilibre formé. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction : ce sont des catalyseurs biologiques (ou biocatalyseurs).

### **Exemple: Propriétés du principe actif :**

Les enzymes permettent d'accélérer des réactions chimiques. Par exemple, la cellulase permet d'aider à la dégradation de la cellulose

Les enzymes sont utilisées dans l'industrie quand des catalyseurs extrêmement 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 catalyseur, en particulier du fait de leur instabilité structurale (dénaturation) en présence de solvants organiques, aux pH extrêmes ou à hautes températures.

En conséquence, l'ingénierie des protéines est un domaine de recherche très actif afin de créer de nouvelles enzymes aux propriétés originales qui catalysent des réactions qui ne se produisent pas dans la nature.



## II. Structures et activités des enzymes

L'usage industriel des enzymes s'est largement développé dans un premier temps du fait de leur intérêt dans les lessives (qui reste quantitativement un de leurs débouchés majeurs), mais le recours à leur usage systématique pour améliorer les propriétés des aliments date de moins d'un demi-siècle.

### II.1 Action cinétique

Les enzymes facilitent les réactions chimiques ayant lieu dans les organismes vivants. C'est la principale famille de molécules capable de catalyse chimique chez les êtres vivants. Les enzymes mises en œuvre peuvent avoir plusieurs origines :

- les matières premières constituant l'aliment (lipoxygénase et hydroperoxyde lyase du soja, phénols oxydases des fruits et légumes, cathepsines du muscle...)
- elles peuvent aussi provenir des micro-organismes dans les produits fermentés ( $\beta$ -galactosidase des bactéries lactiques, méthionine  $\gamma$ -lyases des bactéries et levures d'affinage, nitrate réductase des staphylocoques technologiques du saucisson...)
- elles peuvent aussi être ajoutées à l'aliment sous forme purifiée (chymosine mise en œuvre pour la fabrication fromagère, hémicellulases utilisées en panification...).

### II.2 Nomenclature

Les enzymes sont classées selon une nomenclature internationale (Enzyme Classification, EC), composée de quatre chiffres (EC A.B.C.D.). Le premier chiffre correspond à la classe d'enzyme (par exemple, EC 3.B.C.D. = hydrolase), le deuxième chiffre précise le type de modification (par exemple, EC 3.4.C.D = hydrolyse d'une liaison peptidique), le troisième

chiffre précise la catégorie précédente (par exemple, EC 3.4.22.D est une cystéine une cystéine endopeptidase), le dernier chiffre donne un numéro dans la catégorie.

Par **exemple** la papaïne trouvée dans la papaye est une des 32 cystéines protéinases répertoriées et aura pour numéro : EC 3.4.22.2

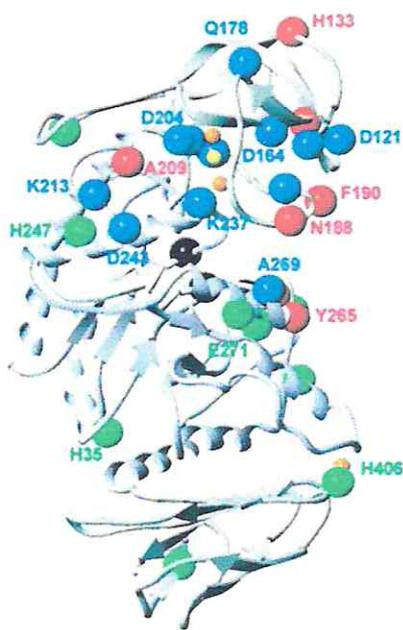
### II.3 Relations structure/activité

Les structures de ces protéines sont de mieux en mieux connues. Les progrès du séquençage des gènes les codant, les facilités de clonage et de surexpression, les possibilités de cristallisation des protéines et d'analyse de leurs structures tridimensionnelles permettent de construire des modèles moléculaires qui facilitent la compréhension de leur fonctionnement.

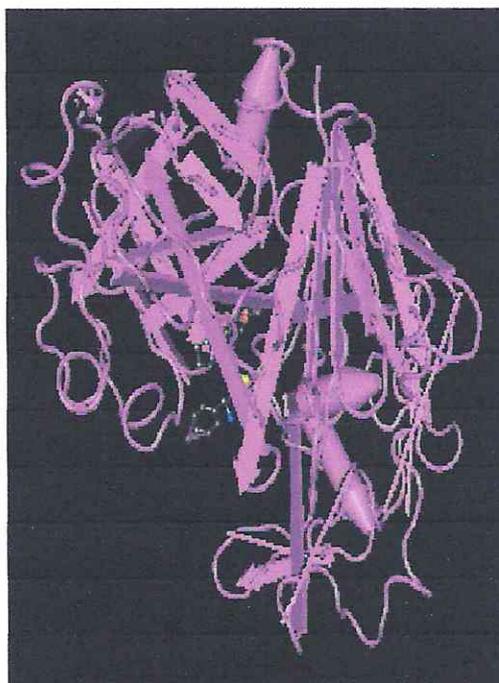
La figure 2 donne deux exemples de structures tridimensionnelles d'enzymes d'intérêt pour les industries alimentaires. Pour les seules lipases, qui hydrolysent une fonction ester entre un alcool comme le glycérol et un acide gras, actuellement plus de 18 500 protéines ayant une activité de ce type ont été répertoriées d'après la *Lipase Engineering Database* (<http://www.led.uni-stuttgart.de>). Ce type de base de données permet de connaître les points communs entre ces protéines et d'émettre des hypothèses sur leur fonctionnement.

Cet ensemble de connaissances constitue un outil puissant pour améliorer les procédés de production et pour améliorer ou diversifier leurs applications





a



b

**Figure 1 :** Structure tridimensionnelle de deux enzymes très largement utilisées dans les industries alimentaires (a) l'alpha amylase de *Bacillus licheniformis* (Declerck et al. 2003), (b) la chymosine de veau (*Bos taurus*) (précurseur) (Groves et al. 1998).



#### II.4 Mode d'action des enzymes

Les acides aminés de la protéine enzymatique ont une organisation précise qui détermine l'action de l'enzyme mais les différentes parties de la chaîne d'acides aminés n'ont pas toutes le même rôle. Certaines zones de la protéine favorisent la mise en place du substrat par rapport au site actif. Dans cette partie, le repliement de la chaîne est particulièrement important. Certains acides aminés interagissent avec les substrats et les cofacteurs et favorisent une réaction chimique (catalyse enzymatique). Les cofacteurs sont des molécules qui interviennent de façon transitoire dans la réaction enzymatique en tant que cosubstrats et facilitent la réaction. Parmi les plus connus, citons le NAD<sup>+</sup> pour les réactions d'oxydoréduction, le coenzyme A pour l'activation des fonctions acides, l'ATP pour les réactions de phosphorylation de substrats. Les acides aminés du site actif de l'enzyme se retrouvent d'une espèce à l'autre. Prenons l'exemple des lipases qui hydrolysent les triglycérides. Les données permettant d'établir la structure tridimensionnelle de la protéine montrent qu'il se forme, sur la partie externe de la protéine, une sorte de rail hydrophobe,

lequel va favoriser l'accrochage du substrat sur la protéine et favoriser l'interaction des atomes de la fonction ester avec les acides aminés constituant le site actif. Du point de vue fonctionnel, la **lipolyse** permet d'améliorer les propriétés liantes et émulsifiantes des ingrédients lipidiques ; du point de vue nutritionnel, elle facilite leur digestion.

### III. Les principaux domaines d'utilisation des enzymes dans l'industrie

- L'industrie de l'amidon
- L'agroalimentaire (alimentation humaine et animale)
- La chimie fine (exemple de détergents contenant des enzymes fonctionnelles à 100°C)
- Le secteur de la santé etc.

Les enzymes ont une action spécifique sur certains composés. Elles permettent la transformation rapide et efficace de ceux-ci à des températures modérées.

Au cours des fermentations alimentaires, ce sont les multiples enzymes des cellules microbiennes qui provoquent les modifications complexes observées. Il est également possible de faire intervenir des enzymes seules, en l'absence de toute cellule vivante. Ces enzymes jouent plusieurs rôles dans les productions alimentaires industrielles :



Traitement de la nourriture	Amylases fongiques et de plantes	Production de sucres à partir d'amidon : fabrication de sirops. Boulangerie : fermentation de sucres par les levures pour produire le dioxyde de carbone qui lève la pâte.
	<u>Protéases</u>	Les fabricants de biscuit les utilisent pour baisser la teneur en protéines de la farine. Pré-digestion des aliments pour bébés.
	Cellulases, pectinases	Clarification des jus de fruit.
	<u>Papaine</u>	Attendrit la viande pour la cuisson.
Brasserie	Les enzymes de l'orge sont libérées pendant le stade d'écrasement lors de la fabrication de la bière.	Elles dégradent l'amidon et les protéines pour produire des sucres simples, des acides aminés et des peptides utilisés par la levure pour la fermentation.
	Enzymes d'orge produites industriellement : Amylase, glucanases, protéases Bétaglucanases et arabinosylanases Amyloglucosidase et pullulanases Protéases Acétolactate décarboxylase	Largement utilisées dans le brassage pour remplacer les enzymes naturelles de l'orge. Découpent les polysaccharides et les protéines du malt. Améliorent les caractéristiques du moût ("wort") et la filtration de la bière. Bière de faible calorie et ajustage de la fermentabilité. Enlèvent le trouble produit pendant l'entreposage de la bière. Augmente l'efficacité de la fermentation en réduisant la formation de <u>diacétyle</u> .
Industrie laitière	Rennine extraite de l'estomac de jeunes animaux ruminants (exemple : veaux, agneaux) Enzymes produites par voie microbienne Lipases lactases	Hydrolyse des protéines lors de la fabrication de fromage. Utilisation croissante dans l'industrie laitière. Production du Roquefort : améliore le mûrissement de la moisissure bleue. <u>Hydrolyse du lactose en glucose et galactose.</u>

Industrie de l'amidon	<u>Amylases</u> , amyloglucosidases et glucoamylases Glucose isomérase	Convertissent l'amidon en glucose et différents sirops. Convertit le glucose en fructose pour produire des sirops à partir de féculents. Ces sirops ont des propriétés adoucissantes et des valeurs calorifiques plus basses que le saccharose pour le même niveau de douceur.
Industrie du papier	Amylases, xylanases, cellulases et ligninases	Hydrolysent l'amidon pour baisser la viscosité du papier et aider à sa découpe et à son surfaçage. Les xylanases réduisent la quantité d'agents chimiques nécessaires au blanchiment; les cellulases lissent les fibres, améliorent le drainage de l'eau et facilitent l'enlèvement de l'encre; les ligninases hydrolysent la lignine pour adoucir le papier.
Industrie du carburant biologique	Cellulases et ligninases	Hydrolyse de la <u>cellulose</u> dans les sucres fermentables lors de la production d'éthanol à partir de la cellulose. Récupération des résidus de lignine.

Détergents biologiques	Protéases excrétées par les bactéries Amylases Lipases Cellulases	Pré-trempeage et applications liquides directes pour enlever les taches des vêtements d'origine protéique. Détergents pour enlever les résidus d'amidon résistants. Utilisé pour enlever les taches grasses et huileuses. Utilisé dans les adoucissants biologiques.
Nettoyants de lentilles de contact Industrie du caoutchouc Industrie photographique	Protéases Catalase Ficine (protéase)	Désinfectant protéique. Production d'oxygène à partir du peroxyde pour transformer le latex en mousse. Dissolution de la gélatine des films et récupération de l'argent.

Tableau 1 : Présentation des enzymes et leurs applications dans les domaines industriels Agroalimentaire et hors Agroalimentaire.



#### IV. Production d'enzymes par fermentation

##### IV.1. La Biomasse :

Le terme de biomasse désigne le matériel organique cellulaire des organismes mis en culture (animaux, végétaux ou microbiens). La biomasse microbienne est aussi appelée "Single Cell Protein" (SCP) ou protéines d'organismes unicellulaire (POU). Cette biomasse microbienne peut être une source de protéines, des vitamines, des antibiotiques, des vaccins, additifs alimentaires, des aliments, le bioéthanol etc.

Une technique est utilisée dans la production de ces produits, il s'agit de la fermentation.

##### IV.2. La fermentation

La fermentation est une réaction biochimique de conversion de l'énergie chimique contenue dans une source de carbone (souvent du glucose) en une autre forme d'énergie directement utilisable par la cellule en l'absence de dioxygène (milieu anaérobie). Comme le disait Louis Pasteur, « la fermentation, c'est la vie sans l'air. »

La fermentation se distingue de la respiration cellulaire par son faible rendement énergétique.

On distingue:



- La fermentation lactique
- La fermentation alcoolique

*La fermentation alcoolique* est un processus biochimique par lequel des carbohydrates, principalement le glucose, sont décomposés en milieu anoxique en éthanol et en dioxyde de carbone.

*La fermentation lactique*, ou lacto-fermentation, est un mode de production d'énergie anaérobie qui, en présence de glucides et de bactéries spécifiques (les ferments lactiques), induit la formation d'acide lactique. Il est à l'œuvre dans la fabrication des produits fermentés à base de lait comme le yaourt.

#### - **Le Fermenteur :**

Un bioréacteur, appelé également fermenteur ou propagateur, est un appareil dans lequel on multiplie des micro-organismes (levures, bactéries, champignons microscopiques, algues, cellules animales et végétales) pour la production de biomasse, ou pour la production d'un métabolite.

Contrairement aux systèmes plus simples utilisés pour faire pousser des micro-organismes, comme par exemple les fioles, le bioréacteur permet de contrôler les conditions de culture (température, pH, aération, etc.), et de ce fait, il permet de récolter des informations de plus grande fiabilité

Un fermenteur est construit en général sur le modèle d'un bioréacteur sans toutefois de système d'aération. Dans le domaine de la biotechnologie, le terme de fermenteur est parfois utilisé sans aucune distinction par rapport à celui de bioréacteur.

#### - **Description du fermenteur:**

Une cuve ou enceinte en verre (pour les modèles de laboratoire) ou en acier inoxydable

Description :

- Un bouchon nécessaire pour contrôler le passage de l'air au milieu intérieur et celui au 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 pH (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.

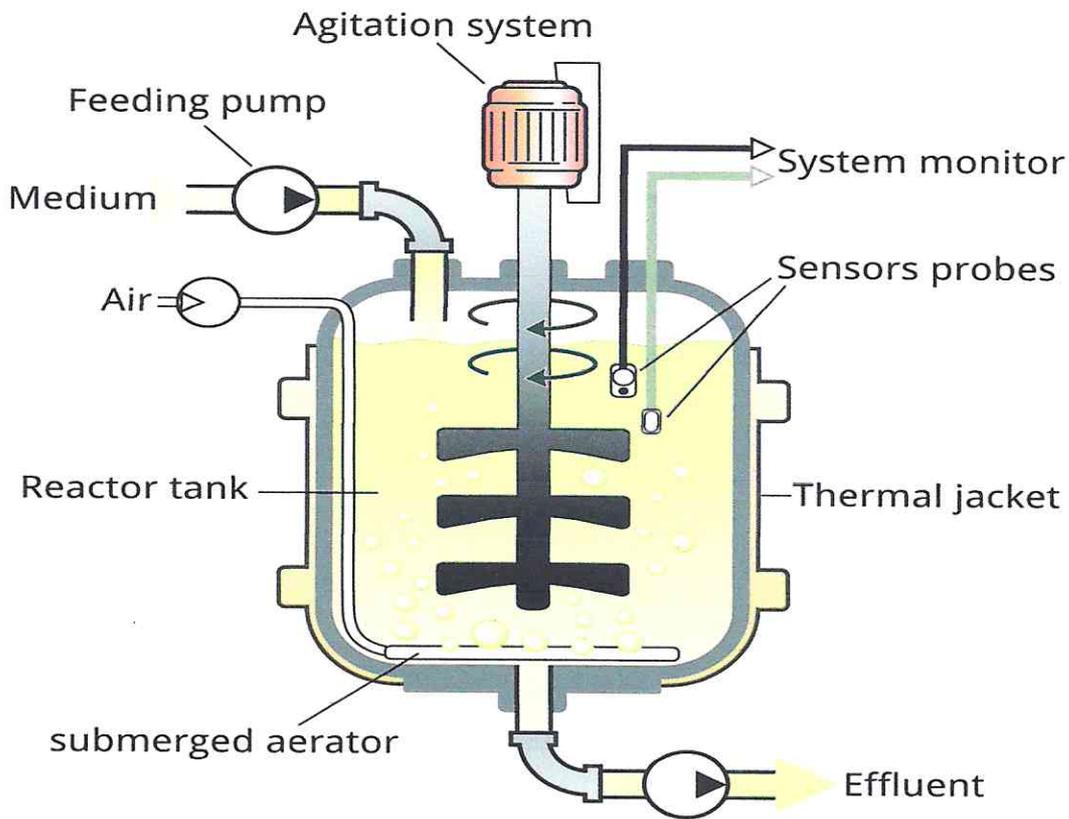


Figure 2 : Présentation d'un fermenteur





Figure 3 : Fermenteur industriel

#### - Les différents types de Fermenteurs

En génie microbienne, le terme de bioréacteur peut désigner un système permettant la culture de biomasse microbienne. Les bioréacteurs permettent la fabrication de nombreux produits : bière, yaourts, additifs alimentaires, vaccins, antibiotiques, anticorps, vitamines, acides organiques etc.

Il existe plusieurs types de fermenteurs:

- Les fermenteurs de laboratoire: de 0,1 L à 15 L,
- Les fermenteurs industriels: de 100L à 100 000 L,
- Bioréacteurs jetables à volume varié,
- Bioréacteurs de 200 000 L dans le cas de production industrielle d'éthanol par exemple.





Figure 4 : Les différents bioréacteurs (a, c : Bioréacteurs Industriels ; b et d : Bioréacteurs de laboratoires)

### IV.3. Les enzymes : Le choix de la souche

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique complexe. Elles sont purifiées à partir de diverses matières biologiques premières. Seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion significative, et sont préparées industriellement, car les micro-organismes présentent de nombreux avantages comme source d'enzymes: croissance exponentielle et la disponibilité

Pour la production d'une enzyme industrielle, le choix de la souche appropriée est déterminant, surtout dans la majorité des cas ce sont les applications à des fins alimentaires qui ont connu un développement significatif.

Dans les secteurs non alimentaires (chimie, diagnostic, analyses diverses...), le choix des souches n'est pas soumis aux mêmes contraintes. De façon générale, les micro-organismes sont sélectionnés selon les principaux critères suivants:

- fournir une bonne production d'enzymes
- En un minimum de temps
- les enzymes extracellulaires (généralement des hydrolases) sont préférables aux endocellulaires (dont l'extraction est difficile à réaliser)
- La souche doit pouvoir se développer sur des substrats "bon marché".

Enzymes	Micro-organismes producteurs
Invertase	Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis ; Aspergillus usamii
Lipase	Mucor javanicus; Lucor mihei Rhizopus arrhizus; Aspergillus effusus
Pectinestérase, Pectine lyase, Polygalacturonase	Aspergillus usamii; Aspergillus wentii Aspergillus niger; Penicillium funiculosum
Alpha amylase	Bacillus licheniformis; Bacillus subtilis Aspergillus niger; Aspergillus oryzae
Glucose isomérase	Streptomyces albus Actinoplanes missouriensis Bacillus coagulans
Lactase	Kluyveromyces fragilis Kluyveromyces lactis

Tableau 2 : Les microorganismes producteurs d'enzymes



#### IV.4 Les milieux de production

Les milieux de production sont soit des milieux synthétiques ou complexes. Les matières premières apportent les éléments nutritifs (énergie, carbone, azote, phosphore, soufre, vitamines etc.)

Substrats	Exemples
Source de carbone et d'énergie	Farine de céréales, farine de soja, amidons de maïs, de pomme de terre, les sous produits tels le lactosérum et les mélasses.
Source d'azote (organique)	Farines de poisson, gélatine, caséine, farine de soja, coton, maïs et arachide.
Sels minéraux et substances de croissance exigées	Extrait de levure, huiles végétales, farines de graines oléagineuses

Tableau 3 : Les milieux de cultures

#### IV.5 La conduite de la Fermentation

Les fermenteurs utilisés atteignent des volumes de 100 à 200 m<sup>3</sup>. Suivant les enzymes et les procédés, la fermentation dure de 30 à 150 heures.

Conduite de la fermentation : Elle se fait dans un milieu riche, où les paramètres physico-chimiques sont régulés en continu: l'oxygène, pH, température, moussage (réduit par l'addition d'antimousse); De plus, la mesure de l'activité enzymatique est effectuée à intervalles réguliers.

##### - L'induction

Les inducteurs doivent être présents dans les milieux de production (exemple: l'amidon pour l'amylase, l'urée pour l'uréase, le xylose pour la xylose isomérase). Certaines molécules agissent comme inducteurs à faible concentration et comme répresseur à fortes doses (exemple: le cellobiose pour les cellulases). Un effet inducteur est très souvent démontré par des analogues de substrats (exemple: isopropyl-béta-Dithiogalactoside qui est l'analogue du

lactose pour la  $\beta$ -galactosidase). Les coenzymes peuvent aussi avoir un effet inducteur (exemple: la thiamine augmente la production de la pyruvate carboxylase).

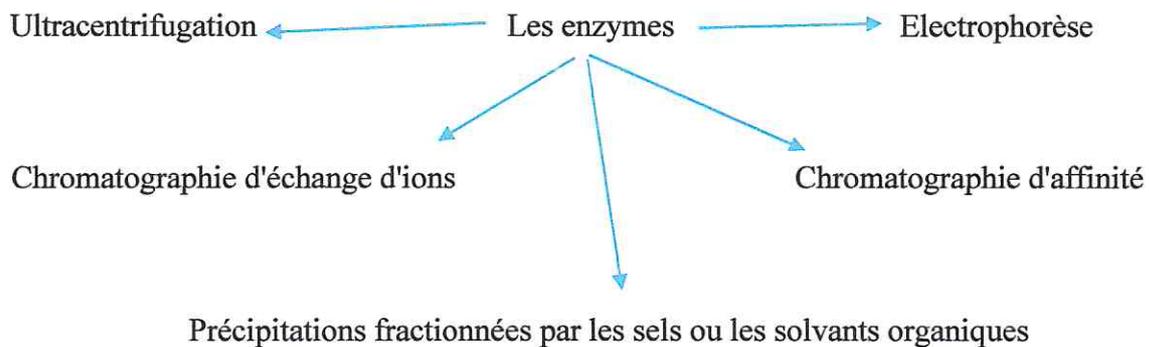
## V. Extraction et purification des enzymes

Dès que la fermentation est terminée, la culture est refroidie entre 3 et 5°C. Les enzymes doivent alors être séparées des cellules et du milieu de culture (centrifugation ou filtration).

Dans le cas des enzymes endocellulaires, la récupération est plus difficile et suppose une étape supplémentaire de broyage ou de lyse des cellules microbiennes (atomisation ou utilisation du tween 80).

Enfin, les enzymes sont traitées de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités.

Différentes techniques de séparation et de purification des enzymes selon leurs propriétés globales :



## **V.1. Séparation des produits insolubles**

### **V.1.1. La centrifugation :**

La centrifugation est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange en fonction de leur densité en les soumettant à une force centrifuge. Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse

### **V.1.2. La centrifugation différentielle :**

La séparation s'effectue selon la taille des particules. Cette méthode est utilisée pour :

- Culoter des cellules ou des bactéries,
- Obtenir des préparations partiellement pures d'organites et de macromolécules,
- Pour l'étude des organites, les tissus où les cellules doivent être au préalable rompues avec formation d'un homogénat.

Durant la centrifugation, les grosses particules sédimentent plus vite que les petites.

### **V.1.3. La Lyse cellulaire :**

Si le produit désiré est intracellulaire, les cellules doivent être brisées. La méthode de « brisure » dépend du type cellulaire et de la nature du produit intracellulaire d'intérêt. Les méthodes de rupture cellulaire peuvent être classifiées en deux catégories:

- a- La lyse Mécanique
- b- La lyse non mécanique



**a- La lyse Mécanique :**

Les méthodes mécaniques en milieu liquide dans un mortier ou par sonication.

- *La Sonication*

Les vibrateurs ultrasoniques sont utilisés pour briser les parois et membranes des bactéries et des cellules animales ou végétales. La fréquence des ondes est de l'ordre de 20 kHz.



Figure 5 : Sonicateur (Fisherbrand™ Sonicateur 505 avec sonde)



- *La French Press*

## Rupture cellulaire

- Les méthodes mécaniques en milieu liquide – French press
  - L'appareil vise à forcer les cellules à passer dans un espace plus petit qu'elles, ce qui déchire leur membrane
  - Il consiste en un cylindre creux en métal dans lequel s'enfonce un piston de métal nanti de plusieurs o-rings d'un caoutchouc très solide.
  - A la base du cylindre, une petite valve est installée; celle-ci peut être obstruée par une petite bille en teflon.
  - La suspension de cellules est versée dans le cylindre. Le piston est installé, obstruant le trou, et une puissante vis sans fin commence à l'enfoncer dans le cylindre
  - Comme il n'y a que peu d'air dans le cylindre et qu'un liquide est incompressible, l'enfoncement du piston fait très rapidement grimper la pression sur les parois du cylindre.
  - Quand on ouvre légèrement la valve, la suspension de cellules est éjectée et les cellules sont déchiquetées.



Figure 6 : la French press

**b- La lyse non mécanique :**

Avec les levures, les plantes, les bactéries, il faut tenir compte de la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique. Pour les bactéries on peut utiliser différents enzymes comme le lysozyme (du blanc d'œuf). Pour les cellules végétales, on utilise un mélange de deux enzymes, la cellulase et la pectinase en raison de la nature biochimique de la paroi dite pecto-cellulosique.

#### V.1.4. La précipitation :

Il s'agit généralement de la première étape dans la purification d'une protéine intracellulaire ou extracellulaire. Les protéines dans un milieu de culture peuvent être séparées des autres composants par précipitation au moyen de 2 méthodes:

- Addition de sels: le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , le sulfate de dextran, le sulfate de streptomycine,
- Réduction de la solubilité à basse température par l'ajout de solvants organiques.

#### V.1.5. La filtration ou Séparation membranaire :

La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux. La filtration conventionnelle utilise de la toile, de la fibre de verre, etc. comme filtre. Les mêmes principes de filtration peuvent être utilisés pour séparer des petites particules en utilisant des membranes de polymères.

Par exemple dans l'**industrie laitière**, quatre procédés de filtration membranaire différents sont employés : microfiltration (MF), ultrafiltration (UF), nanofiltration (NF) et osmose inverse (RO). La figure 5 illustre quels composants laitiers et de lactosérum peuvent être concentrés au moyen de chaque processus, selon la densité de la membrane.

Les procédés de séparation membranaire peuvent être classés en 3 catégories selon la taille des particules à séparer :

- Microfiltration
- Ultrafiltration
- Osmose inverse
- Nanofiltration



*a- La Microfiltration :*

La microfiltration (MF) utilise le type de membrane avec les pores les plus ouverts, pour retenir les bactéries, les spores et les globules gras du flux entrant et aussi pour le fractionnement du lait écrémé.

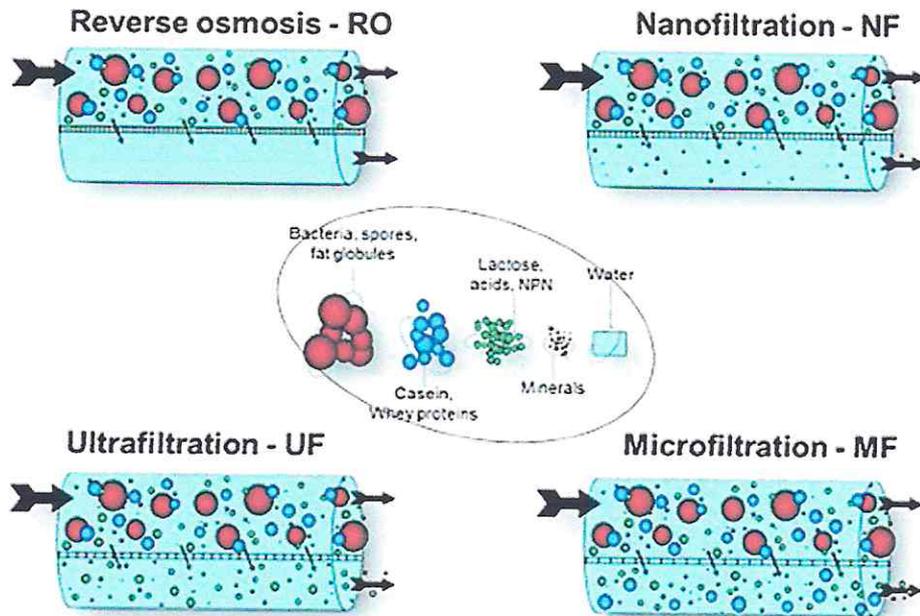


Figure 7 : Les différents procédés de filtration membranaire

*b- L'Ultrafiltration UF :*

La membrane d'ultrafiltration sépare le flux (par exemple le lait écrémé) en deux flux, permettant ainsi à l'eau, aux sels dissous, au lactose et aux acides de la traverser, tout en conservant (et par conséquent concentrant) les protéines et les matières grasses séparées.

*c- L'Osmose Inverse OI (ou Reverse Osmosis RO) :*

L'osmose inverse est le processus à membrane le plus restrictif en terme de séparation des liquides. Il concentre tous les solides, et seule l'eau peut traverser la membrane ; toutes les matières dissoutes et en suspension sont rejetées.

*d- La Nanofiltration NF :*

La nanofiltration (NF) sépare divers minéraux d'un liquide, permettant uniquement aux fluides et à certains ions monovalents de traverser la membrane.

## **V.2. Séparation des produits solubles :**

### **V.2.1. La Chromatographie échangeuse d'ions**

La Chromatographie échangeuse d'ions permet la séparation de molécules chargées (la séparation est en fonction de la charge électrique). La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions électrostatiques (ioniques) avec des composés (protéines) ionisées. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution (Figure 6). C'est une séparation des composés basée sur des interactions ioniques réversibles entre une phase stationnaire appelée échangeur d'ion, des contre ions échangeables ou mobiles et un soluté ou protéine chargée.



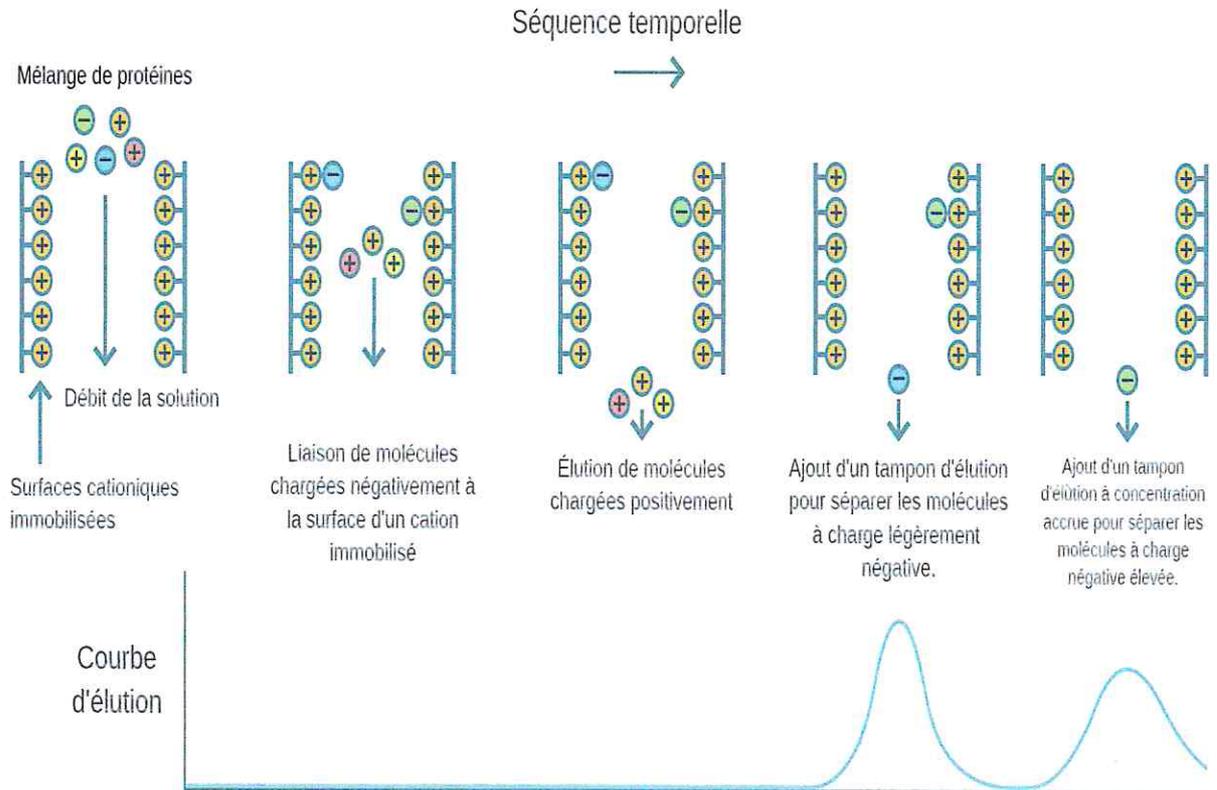


Figure 8 : La chromatographie par échange d'ions

*a- Les échangeurs d'ions :*

Les échangeurs d'ions sont des solides plus au moins poreux, gélifiables le plus souvent se présentant sous forme granulée. Ils constituent un réseau de macromolécules insolubles. Il existe deux grands groupes de résines utilisées dans ce type de chromatographie :

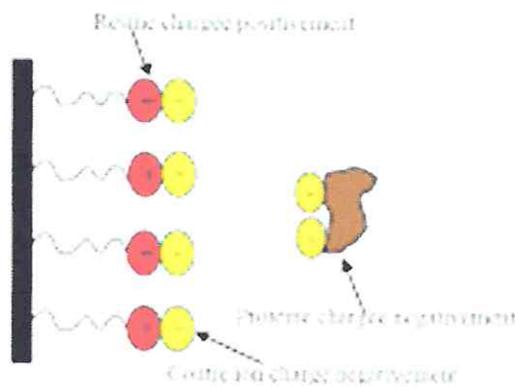
- **Les résines échangeuses de cations** dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature anionique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:
  - Résines cationiques fortes: Résines sulfoniques (très fortement ionisées quel que soit le pH)
  - Résines cationiques intermédiaires: Résines phosphoriques
  - Résines cationiques faibles: Résines carboxyliques (non ionisées en milieu acide fort)

- Résines cationiques très faibles: Résines phénoliques (ionisées en milieu basique uniquement).

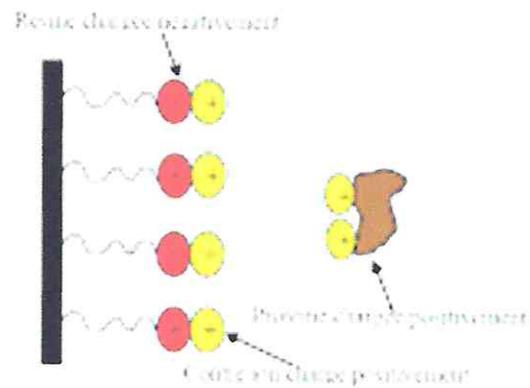
- **Les résines échangeuses d'anions** dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature cationique, elles se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines anioniques fortes (résines à amine quaternaire)
- Résines anioniques faibles (résine à amine secondaire).

### Echangeur Anionique



### Echangeur Cationique



*b- Le Mode opératoire :*

Il consiste à :

- Choisir le gel
- Choisir la phase mobile
- Remplir la colonne
- Equilibrer la colonne (fixation des contre ions)
- Injecter l'échantillon (l'étape de fixation ou adsorption des protéines)
- Effectuer l'élution (étape de désorption par la Fi ou pH)
- Récupérer les fractions
- Analyser le chromatogramme



- Régénérer le gel,

Donc, la colonne est remplie, sans irrégularité, puis équilibrée (l'effluent doit avoir la même composition que l'éluant). Lorsque le dépôt de l'échantillon est fait, on procède à une élution soit en modifiant le pH, soit en modifiant la force ionique de l'éluant. On peut opérer avec un gradient continu ou un gradient discontinu. Le pH influe sur la charge nette de la protéine (caractère amphotère):

- Si le pH du milieu est supérieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée négativement: Pour l'éluer, il faut diminuer le pH. Les protéines seront chargées positivement et elles décrocheront de la résine.
- Si le pH du milieu est inférieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée positivement: Pour l'éluer, il faut augmenter le pH. Les protéines seront chargées négativement, elles décrocheront de la résine. La force ionique exerce un effet de compétition entre la protéine fixée et des autres ions (déplacement des ions fixés «les protéines» par un autre ion qui est fortement chargé et de concentration plus élevée (exemple : Cl<sup>-</sup>, HO<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>...)).

*c- Les applications :*

La chromatographie échangeuse d'ions s'applique pour l'analyse et la séparation de sels minéraux, d'acides aminés, de peptides, de protéines, enzymes, nucléotides, acides nucléiques, lipides et de glucides ionisés.

### **V.2.2 La Chromatographie d'affinité**

Dans cette chromatographie, la phase stationnaire est un effecteur ayant une affinité biologique pour un soluté bien précis greffé sur un support macromoléculaire chimiquement inerte. Cette technique met en jeu des interactions spécifiques et réversibles entre la substance à analyser et des composés spécifiques, souvent de nature protéique.

Les types d'affinités les plus utilisées sont:

- Affinité antigène-anticorps
- Affinité enzyme-substrat

- Affinité hormone-récepteur (récepteur-ligand).

Souvent, la molécule fixée est l'anticorps ou le substrat ou le ligand. Ce qui permettra de purifier l'antigène ou l'enzyme ou le récepteur selon le cas.

- La Phase stationnaire (gel d'affinité) : constituée d'un effecteur fixé par covalence par l'intermédiaire d'un bras de fixation (spacer) à un support qui peut être une carboxyméthylcellulose, du Séphadex ou un gel de polyacrylamide.

- Les effecteurs :

Affinité antigène-anticorps: anticorps, antigènes, haptènes.

Affinité enzyme-substrat: substrats, analogues, inhibiteurs réversibles, coenzymes.

Affinité ligand-récepteur: hormones, peptides, analogues peptidiques.

**a- Les étapes de la chromatographie d'affinité :**

- *Etape de fixation :*

Le soluté est chargé sur la colonne d'affinité, seule la molécule présentant une affinité pour l'effecteur greffé sur la phase stationnaire sera retenue. Souvent, au moins l'un des deux partenaires de l'interaction est une protéine (P), l'autre sera qualifié de ligand (L) de cette protéine:  $P + L \rightleftharpoons PL$ .

- *Etape de purification :*

Le passage du tampon dans la colonne, permet à toutes les molécules non retenues d'être éliminées et éluées.

- *Etape d'éluion :*

La molécule fixée est décrochée de la phase stationnaire et sera recueillie dans l'éluât. Pour éluer un soluté, il est nécessaire de modifier certains paramètres comme le pH et la force ionique, ceci peut être réalisée à l'aide de :

- Un tampon avec un pH différent de celui ayant permis la fixation, ceci va induire un changement de l'état d'ionisation de la protéine et l'affinité du ligand va changer voire même disparaître donc il y aura désorption.

- Utiliser un tampon de force ionique différente de celle ayant permis la fixation du soluté.
- Faire une compétition avec un ligand libre.

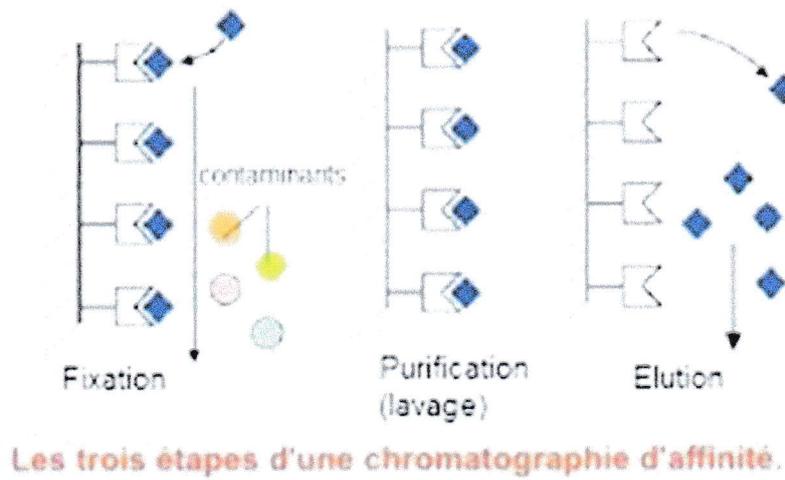


Figure 9 : La chromatographie d'affinité



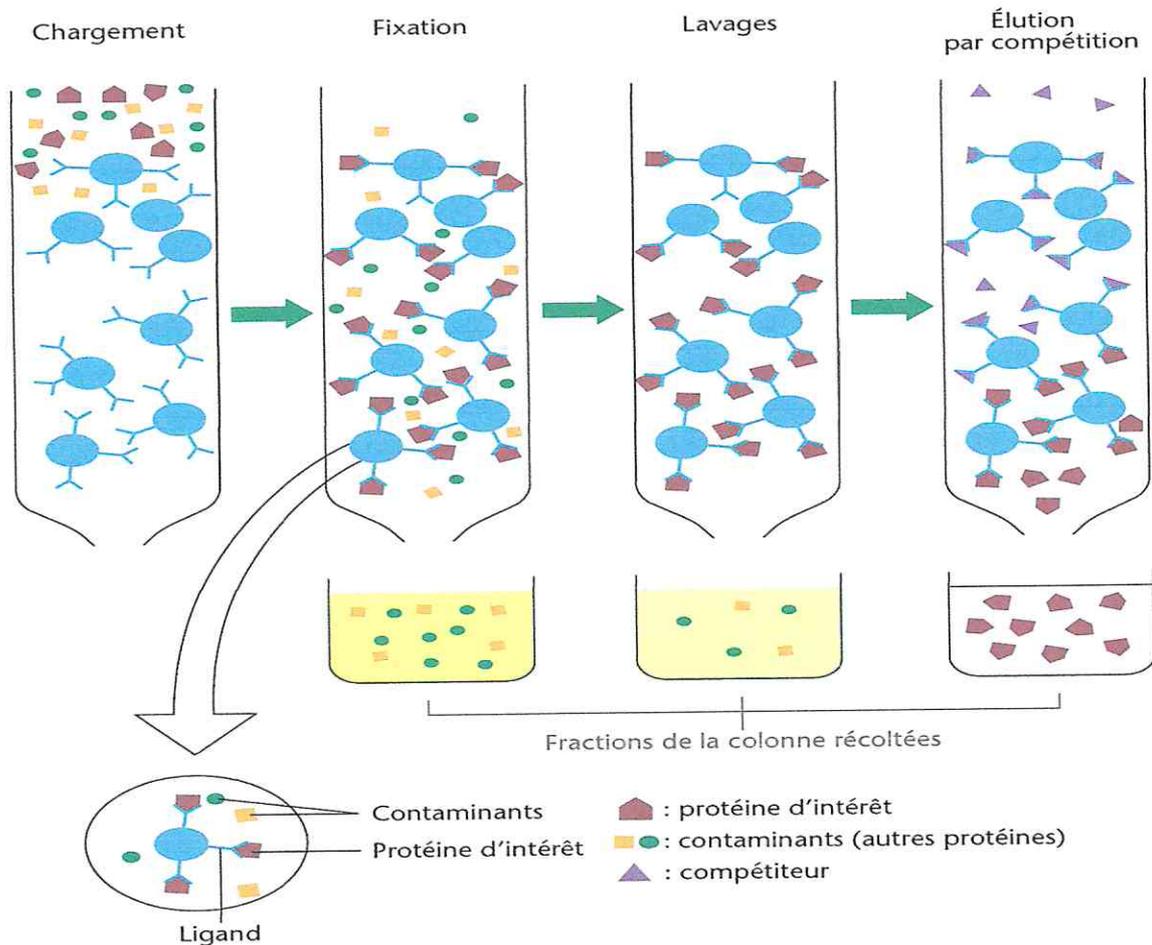


Figure 10 : Colonne de chromatographie d'affinité

### b- Les applications de la chromatographie d'affinité :

C'est une technique très utilisée pour isoler des protéines comme les enzymes. De nombreux types de molécules peuvent être utilisés comme ligand, le meilleur exemple est l'immunoaffinité, car les anticorps sont des ligands très efficaces pour isoler leurs antigènes spécifiques. L'interaction entre un antigène et son anticorps est très forte. Le problème dans ce type de chromatographie est de détacher l'antigène ou l'enzyme si c'est le cas, sans endommager l'anticorps et la phase stationnaire à laquelle il est rattaché. On doit donc utiliser des conditions douces de détergents, comme le Tween par exemple, de pH et de forces ioniques.

### V.2.3 L'électrophorèse SDS PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécyl sulfate de sodium) est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation.

La manipulation nécessite :

- une cuve à électrophorèse + un générateur électrique,
- un gel de polyacrylamide (précoulé en cassette ou à préparer) contenant des puits pour dépôt,
- des solutions tampons adaptées au gel.

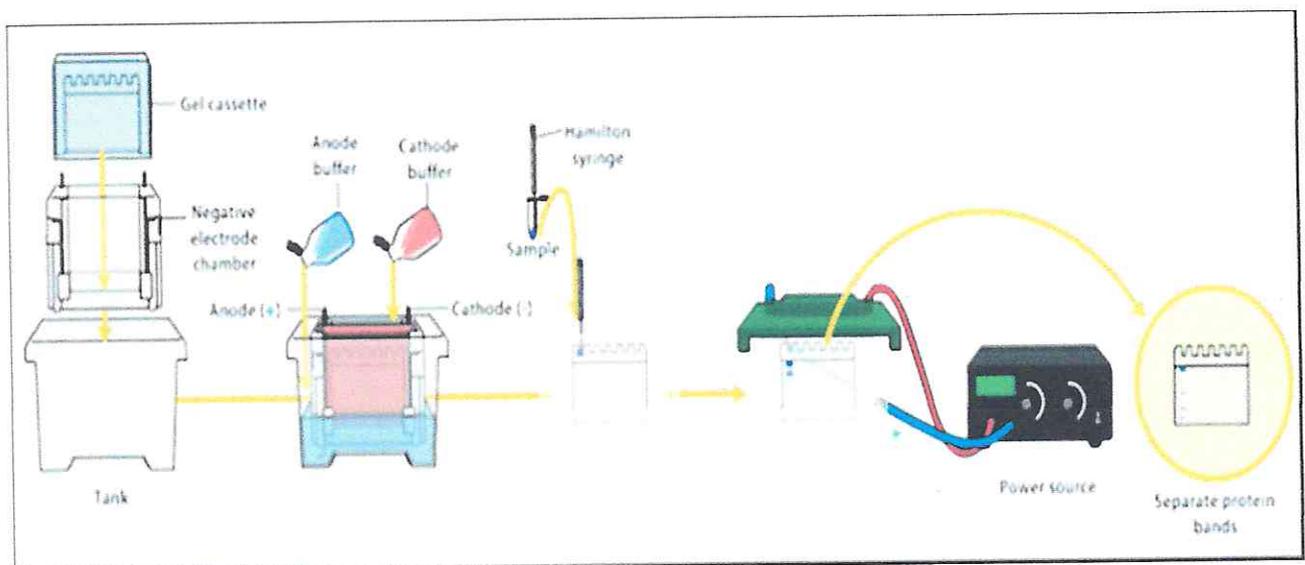


Figure 11 : Appareillage SDS PAGE

Le gel de polyacrylamide est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide, en présence d'agents de polymérisation (TEMED, persulfate d'ammonium par exemple). Plus la concentration en acrylamide est élevée, plus les pores seront petits et plus les molécules seront freinées dans le gel.

Comme toute technique électrophorétique, le SDS-PAGE permet la séparation des particules en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille. Dans le cas du SDS-PAGE, la séparation est réalisée en conditions dénaturantes en raison de l'ajout de SDS (dodécyl sulfate de sodium) qui est un détergent fort possédant une longue

queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. La structure native de la protéine est donc dénaturée et une charge apparente négative est alors conférée à la protéine.

En présence de SDS, les protéines auront donc toutes une charge apparente négative, elles migreront donc toutes vers l'anode. Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Les protéines ayant un petit poids moléculaire, seront moins retenues dans les pores du gel de polyacrylamide et migreront donc plus loin que les grosses.



Figure 12 : Gel SD PAGE après coloration au bleu de coomasie

### V.3. Le test catalytique :

Après identification des enzymes d'intérêt un test catalytique est nécessaire pour vérifier la fonctionnalité du site actif de l'enzyme.

## **VI. Immobilisation des enzymes**

### **VI. 1. Introduction :**

L'immobilisation d'enzyme est une technique qui convertit une enzyme hydrosoluble en une forme insoluble pouvant être facilement récupérée et réutilisée. L'immobilisation peut améliorer les applications des enzymes de nombreuses manières, telles que la production de produits chimiques et pharmaceutiques, le biocapteur enzymatique, etc. Dans les années 1960, plusieurs technologies industrielles utilisant des enzymes immobilisées ont été développées. Un exemple en est l'isomérisation enzymatique du glucose en fructose pour la production de sirop de maïs à haute teneur en fructose (HFCS). Généralement, les réactions enzymatiques industrielles avant le milieu des années 1970 utilisent des substrats et des produits solubles dans des solutions aqueuses. A partir de 1975, divers procédés enzymatiques utilisant des solvants organiques ont été mis en place de manière industrielle.

Le développement de nouvelles méthodes analytiques pour la recherche et l'industrie fait de plus en plus appel à l'utilisation d'enzymes spécifiques. Cependant le coût de production des enzymes demeure prohibitif. En effet, il faut d'abord les extraire de milieux biologiques puis les purifier. De plus, du fait de leur solubilité souvent élevée, les enzymes peuvent être contaminées par le produit de réaction qui se trouve dans la même phase. L'enzyme est souillée et sa purification entraîne de nouvelles dépenses. De plus avec le temps les enzymes se dénaturent et donc ne fonctionnent plus aussi efficacement. Il est nécessaire de les remplacer après plusieurs cycles d'utilisation, mais cela implique des dépenses supplémentaires. Il est donc essentiel de trouver une méthode pour stabiliser les enzymes contre leur dénaturation.

L'immobilisation d'enzymes dans des matrices solides ou dans des gels permet la séparation de la protéine et du produit de réaction, dans deux phases différentes, empêchant la contamination avec le produit. Ce procédé permet alors la réutilisation de la biomolécule. Les matériaux d'immobilisation les plus utilisés sont des matériaux chimiquement inertes, insolubles et rendant insoluble l'enzyme. Ce sont plus particulièrement des matrices polymériques et inorganiques mono, bi, ou tridimensionnelles.

## VI.2. Les différentes méthodes d'immobilisation :

Il existe différentes techniques d'immobilisation pouvant être aussi bien chimiques que physiques. On peut notamment citer cinq méthodes, couramment utilisées, présentant chacune des avantages et des inconvénients.

- L'adsorption (par liaisons hydrophobes, liaisons électrostatiques ou ioniques hydrogène et de Van Der Waals)
- Par liaison covalentes
- L'encapsulation (ou insertion dans une membrane)
- Par inclusion (dans un gel, une fibre, microcapsule ou bille)

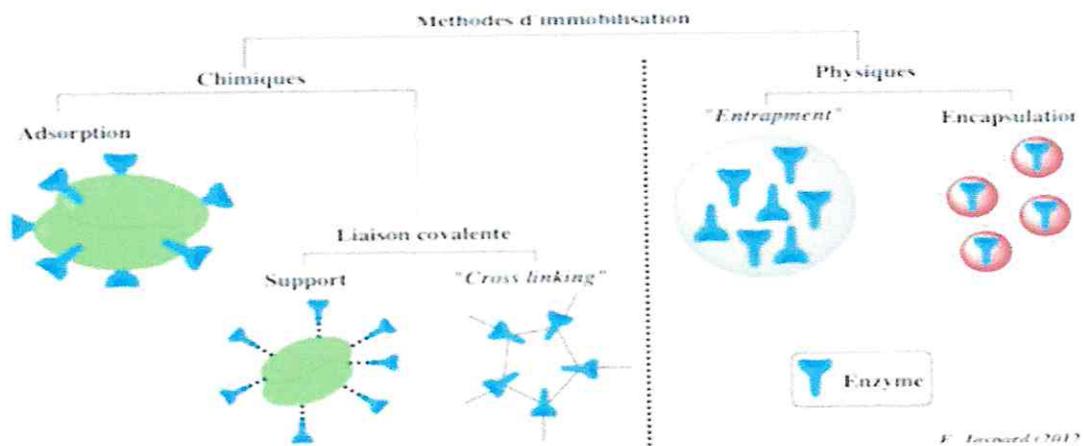


Figure 13 : Les différentes techniques d'immobilisations

Plusieurs conditions doivent être respectées dans le choix d'une méthode d'immobilisation :

- l'activité de l'enzyme doit être maintenue
- Le substrat doit pouvoir pénétrer facilement dans la couche pour accéder à l'emplacement actif de l'enzyme
- Le transfert de masse du substrat et des molécules de produit par la couche immobilisée ne doit pas être gêné.

### VI.2.1 Immobilisation par adsorption :

L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface d'immobilisation. L'adsorption est due à des interactions de type ionique, hydrophobe ou encore aux liaisons hydrogène entre l'enzyme et la surface du support. L'adsorption d'enzymes sur des matrices insolubles est la méthode la plus simple. La procédure implique l'incubation de l'enzyme avec l'adsorbant dans des conditions appropriées de pH, force ionique et température. Le matériau hybride est récupéré après filtration ou centrifugation et la surface est enfin rincée à l'aide d'une solution tampon pour nettoyer la surface des enzymes non adsorbées. Les interactions qui existent entre l'enzyme et l'adsorbant, sont des interactions faibles de type électrostatiques ou Van der Waals. Cependant, le procédé d'adsorption est réversible et peut conduire dans certaines conditions d'utilisation à la désorption de la biomolécule et donc à l'altération du matériau. Toutefois des différents modes d'immobilisation, l'adsorption est la méthode qui induit le moins de modification de la conformation de l'enzyme active, c'est pourquoi c'est la technique préférée pour l'immobilisation des enzymes.



### Immobilisation par adsorption



**Liaisons hydrophobes :**  
● Résidus hydrophobes  
● Résidus hydrophiles

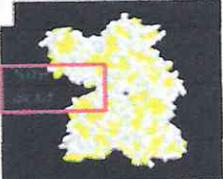
La plus part des résidus en surface sont hydrophiles, les résidus hydrophobes tendent à s'enfuir à l'intérieur de la protéine.



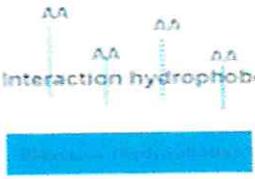
**Liaisons ioniques :**  
● Résidus chargés (+)  
● Résidus chargés (-)

Les résidus chargés, souvent à la surface, interagissent pour former, si possible, des liaisons ioniques.

### Adsorption hydrophobe



**Acides Amines hydrophobes**



Interaction hydrophobe

**AA : Phénylalanine  
Leucine  
Isoleucine**

**Supports :**  
Plastique  
(plaques ELISA)  
Films  
Latex (billes)  
Polyacrylates



L'immobilisation Adsorption hydrophobe a comme désavantage de masquer une partie des sites actifs

amax<sub>app</sub> diminue

## ADSORPTION IONIQUE

**Adsorption Electrostatique**

ENZYME

AA(+), AA(+), AA(+), AA(+)

Interaction hydrophile

(-), (-), (-), (-)

Filmus COO<sup>-</sup>

AA(+): Lysine (+)  
Arginine (+)  
Histidine (+)

Supports (-):  
Films COO<sup>-</sup>  
Plastique fonctionnalisé (-)  
Résines amberlite (-)  
Résines Dowex  
Carboxyméthylcellulose

**Adsorption Electrostatique (suite)**

AA (-): Glutamate (-)  
Aspartate (-)

Supports (+):  
Films R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>  
Plastique fonctionnalisé (+)  
Résines amberlite (+)  
Résines DEAE cellulose  
etc.



## Adsorption Electrostatique

### Ponts d'hydrogène, Van der Waals

AA (B<sup>-</sup>,B<sup>+</sup>):  
Glutamine  
Asparagine  
Histidine  
Cystéine

AA  
polaires

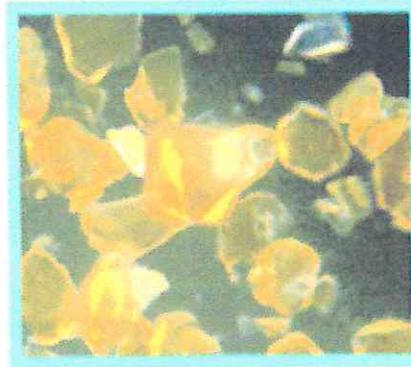
### Supports (B<sup>+</sup>,B<sup>-</sup>):

Silice, verre, sable, argile (B<sup>-</sup>)

Polysaccharides : dextrane Sephadex (B<sup>-</sup>)

Charbon actif (B<sup>+</sup>)

Microphotographie de l'alcool  
déshydrogénase adsorbé sur des particules  
de verre (billes).



Microphotograph courtesy of Dr. David Dikovskii, Department of Biological Sciences, University of Toronto





### Immobilisation par adsorption

<u>Avantages +++</u>	<u>Inconvénients . . .</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simple (sans réactifs)</li> <li>• Rapide</li> <li>• Bon Marché</li> <li>• Bons rendements (1g/g)</li> <li>• Simple a régénérer</li> <li>• Matrices variées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liaisons réversibles dépendantes du pH, force ionique, température</li> <li>• Désorption possible</li> <li>• Pertes à chaque lavage</li> </ul>

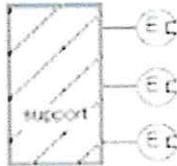
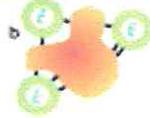
**Utilisée en milieu industriel :  
cas des lipases (industrie de l'huile)**

### VI.2.2 Immobilisation par liaison covalentes :

Il s'agit de la réticulation ou co-réticulation avec un agent bi fonctionnel (généralement en association avec 1 à 3 polymères). Il est possible d'immobiliser les molécules d'enzyme en procédant à leur pontage covalent à l'aide de réactifs bi fonctionnels tel que le glutaraldéhyde. Ces liaisons covalentes intermoléculaires donnent des composés de haut poids moléculaire qui sont insolubles dans l'eau. Il est également possible de co-réticuler une enzyme et une protéine inactive, par exemple, l'albumine. L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. La réticulation est également utilisée pour accroître la stabilité du complexe enzyme-support obtenus après adsorption ou inclusion.

## Immobilisation par liaison covalente

Sur support solide :



- ♦ Liaisons stables
- ♦ Résistantes après lavage
- Faibles rendements 0.02-0.3 g/g

Plusieurs chimies possibles en fonction de la nature du support et des acides aminés impliqués

Lysine, glutamate, aspartate, histidine et tyrosine



**Les AA chargés sont souvent à la surface**

- Résidus chargés (+)
- Résidus chargés (-)

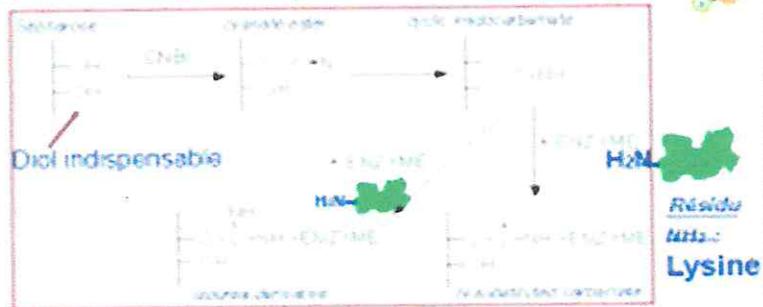


## Immobilisation par liaison covalente

Sur support

1. Amidation induite par bromure de cyanogène
2. Amidation avec activation par carbodiimide
3. Amination avec activation par éthylchloroformate

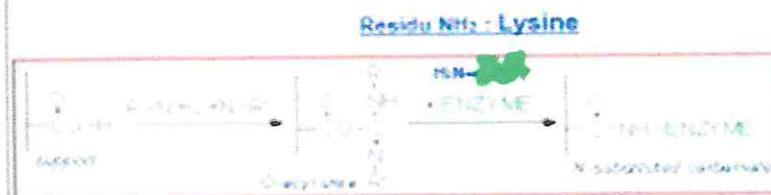
## 1. Amidation induite par bromure de cyanogène



### Supports

Polysaccharides (cellulose, agarose, sepharose, ...)  
Gel de silice  
Verre poreux

## 2. Amidation par activation avec une carbodiimide

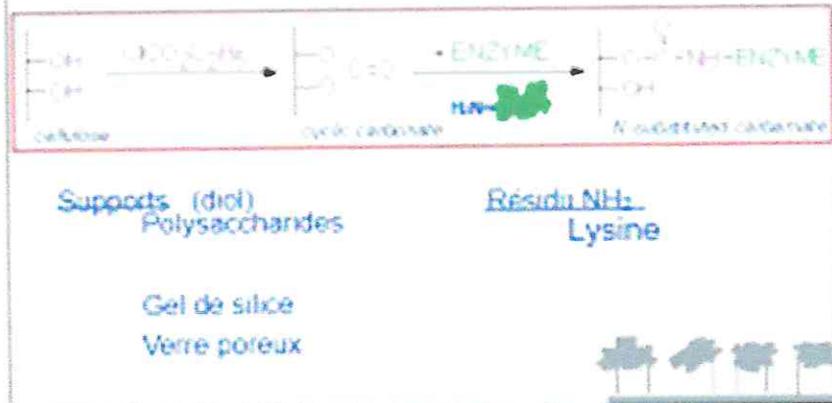


### Supports (COOH)

Silices fonctionnalisées  
Plastiques fonctionnalisés



### 3. Amidation par activation avec éthylchloroformate $\text{ClCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$



#### Les avantages et les inconvénients de l'immobilisation par liaisons covalentes :

##### Les avantages :

- Stabilité accrue à cause de la liaison covalente
- Grande variété de support minéraux (verre, silice, céramique etc.) et organiques (cellulose, polymère synthétique etc.)
- Possibilité d'effectuer l'immobilisation en présence de substrat pour éviter l'inactivation (protection du site actif)

##### Les inconvénients :

- Mise en œuvre de réactions chimiques souvent complexes
- Risques de modifications chimiques de l'enzyme (perte d'activité)
- Nécessite de purifier l'enzyme préalablement
- L'immobilisation est plus complexe à réaliser
- Rendements de fixation inférieurs à 100%.

### VI.2.3 Immobilisation par inclusion :

**Immobilisation par inclusion**



Les enzymes sont renfermées dans de pores de gels 1g/g

L'inclusion peut être purement physique ou couplé avec une liaison covalente copolymérisation avec du chlorure d'acryloyle  $\text{CH}_2=\text{CH}\cdot\text{CO}\cdot\text{Cl}$  et polyacrylamide

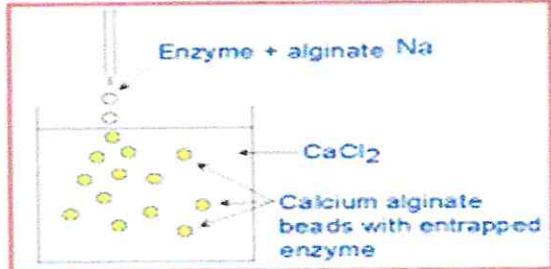
**Méthodes courantes d'inclusion**



**Billes d'alginate de calcium  
(polysaccharide acide)**

Une solution d'enzyme et d'alginate de sodium est ajoutée (goutte à goutte) dans une solution de chlorure de calcium.

Les ions calcium (+2) remplacent les ions sodium (+1)



Il en résulte de billes d'alginate calcique qui contiennent l'enzyme.

## Les avantages et les inconvénients de l'immobilisation par inclusion :

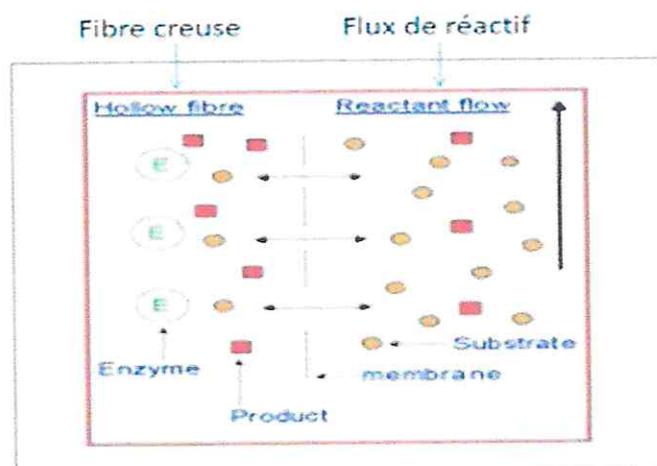
Les Avantages :

- Elle est économique,
- facile à mettre en œuvre et peut s'appliquer à un nombre élevé d'enzymes.

Les Inconvénients :

- L'enzyme peut diffuser à travers la matrice au cours de l'utilisation
- Elle n'est applicable que pour des substrats de petite taille.
- Les groupements actifs de l'enzyme peuvent réagir avec la matrice et entraîner une diminution de l'activité catalytique.

### VI.2.4 Encapsulation ou insertion dans une membrane :



## L'immobilisation enzymatique

- ◊ L'immobilisation permet l'utilisation efficace et en continu des enzymes.
- ◊ Elle permet la séparation des produits.
- ◊ L'adsorption est réversible.
- ◊ L'immobilisation covalente est permanente mais chère.
- ◊ L'inclusion est généralement appliquée mais elle comporte de problèmes de diffusion.
- ◊ L'insertion dans de membranes est une méthode flexible mais chère.
- ◊ L'immobilisation d'enzymes porte des effets considérables dans leur cinétique.

Adsorption    Liaison covalentes    Inclusion    Encapsulation

Generalised comparison of different enzyme immobilisation techniques.

Characteristics	Adsorption	Covalent binding	Entrapment	Membrane confinement
Preparation	Simple	Difficult	Difficult	Simple
Cost	Low	High	Moderate	High
Binding force	Variable	Strong	Weak	Strong
Enzyme leakage	Yes	No	Yes	No
Applicability	Wide	Selective	Wide	Very wide
Running Problems	High	Low	High	High
Matrix effects	Yes	Yes	Yes	No
Large diffusional barriers	No	No	Yes	Yes
Microbial protection	No	No	Yes	Yes

Weak : faible

leakage: fuite

Wide : large



## VII. Domaines d'applications des enzymes immobilisées :

Grâce à leur grande spécificité d'action (bio spécificité), les enzymes immobilisées constituent un outil de fabrication et d'analyse important dans de nombreux secteurs. En effet, **en médecine**, des papiers imprégnés des solutions enzymatiques sont utilisés dans certains tests cliniques (dosage du cholestérol, de l'acide urique, des hormones etc.). Les techniques ELISA utilisent également des enzymes fixées (liées à des anticorps eux-mêmes fixés par adsorption sur les parois de petites cuvettes en plastiques), destinées à des dosages cliniques.

En **thérapeutique**, le traitement de certains troubles pathologiques (dus à une déficience enzymatique) par l'administration d'enzymes se heurte à des difficultés comme la destruction par les protéases 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.

En **agroalimentaire**, les enzymes ont une action spécifique sur certains composés. Elles permettent la transformation rapide et efficace de ceux-ci à des températures modérées. En effet, au cours des fermentations alimentaires, ce sont les multiples enzymes des cellules microbiennes qui provoquent les modifications complexes observées. Il est également possible de faire intervenir des enzymes seules, en l'absence de toute cellule vivante. Ces enzymes jouent plusieurs rôles dans les productions alimentaires industrielles.

Voici quelques exemples d'enzymes utilisées dans le domaine agroalimentaire :



### Amylases

Action :	<i>(hydrolyse de l'amidon en sucres solubles)</i>
Sources :	<i>Aspergillus oryzae (moisissure) Bacillus subtilis (bactérie)</i>
Usages :	<i>Améliorer la fermentation (pain, bière) Clarifier les jus de fruits et de légumes...</i>



Les amylases ( $\alpha$ -amylase, 6-amylase, amyloglucosidase et  $\alpha$ -glucosidase ou maltase) hydrolysent l'amidon en sucres solubles.

Elles peuvent être produites en quantité importante par des moisissures (comme *Aspergillus oryzae* et *A. niger*) et des bactéries (comme *Bacillus subtilis*).

Les amylases bactériennes, à l'inverse des amylases fongiques, sont thermorésistantes mais rapidement inactivées en pH acide.

Les principaux usages des amylases sont :

- Élimination de l'amidon dans les jus et les extraits de fruits, ce qui les clarifie et facilite leur filtration
- Clarification du vin et de la bière.
- Conversion de l'amidon de céréales en sirops de sucres (tel le sirop de maïs).
- Accélération de la levée de la pâte à pain.

Saccharification de l'amidon de céréales (en complément ou en remplacement des amylases du malt d'orge) avant la fermentation alcoolique durant la fabrication de la bière.

Le malt est une **céréale** germée, en général de l'**orge**, qui est cuite pour qu'elle dégage tous ses **arômes**.

### Invertase

Action :	<i>hydrolyse le saccharose en glucose et fructose</i>
Sources :	<i>Saccharomyces cerevisiae (levure) Candida utilis</i>
Usages :	<i>Réduire la cristallisation dans les sirops Produire du sucre inverti</i>

L'invertase hydrolyse le saccharose (sucre de table) en glucose et fructose.

Son action donne un sirop plus fluide, qui a un plus grand pouvoir sucrant, une pression osmotique plus élevée et qui cristallise moins facilement que le saccharose.

Dans l'industrie, l'invertase est produite principalement par des levures: *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Candida utilis*.

Le sucre inverti est utilisé en grande quantité pour la fabrication de confiseries, de gommes à mâcher et de pâtisseries.

<b>Lactase</b> (B-Galactosidase) (A-galactosidase)	
<i>Action :</i>	<i>Hydrolyse le lactose en glucose et galactose</i>
<i>Sources :</i>	<i>Aspergillus niger (moisissure) Kluyveromyces fragilis (levure) Candida</i>
<i>Usages :</i>	<i>Faire disparaître le lactose dans les produits laitiers</i>

La bêta-galactosidase hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Elle est produite par certaines levures et moisissures, comme *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae*. L'enzyme peut être utilisée pour enlever le lactose du lait, ce qui le rend plus digeste pour les personnes souffrant d'intolérance au lactose. Son action donne un lait plus sucré et plus soluble, ce qui est favorable pour la fabrication de lait en poudre, lait concentré, lait congelé et base de crème glacée. On l'ajoute aussi au lait pour accélérer la fabrication du fromage frais. Cette enzyme permet également la valorisation du lactosérum, un sous-produit de la fabrication du fromage, en transformant ce produit riche en lactose en un liquide plus sucré utilisé en confiserie ou comme substrat pour la culture de levures. L'alpha-galactosidase est une enzyme qui hydrolyse les glucides complexes ou oligosaccharides (raffinose, stachyose et verbascose) contenus dans plusieurs légumes (fèves, haricots, pois, soja, choux...) en sucres simples facilement assimilables. Ces oligosaccharides, qui ne sont pas digérés par nos sucs digestifs mais fermentés par la flore intestinale, sont à l'origine de problèmes de flatulence. L'addition d'une petite quantité d'enzyme a-galactosidase aux mets incriminés, juste avant leur consommation, permet de digérer la plus grande partie des oligosaccharides qu'ils contiennent et prévient donc la flatulence. Cette enzyme, produite par des moisissures, est maintenant commercialisée et offerte au grand public dans les pharmacies et les magasins de produits naturels.

<b>Glucose isomérase</b>	
<i>Action :</i>	<i>conversion du glucose en fructose</i>
<i>Sources :</i>	<i>Streptomyces, Bacillus coagulans, Arthrobacter</i>
<i>Usages :</i>	<i>Production du sirop de maïs à teneur élevée en fructose</i>

La glucose isomérase convertit le glucose en fructose. Cette enzyme est produite industriellement par différentes bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* et *Actinoplanes*. La glucose isomérase est surtout utilisée pour la fabrication de sirop de maïs riche en fructose. Ce sirop est d'abord produit par l'action d'amylases sur l'amidon de maïs. Le sirop glucose qui en résulte est ensuite traité avec la glucose isomérase qui le convertit en Fructose, ce qui rend le sirop plus sucré (car le fructose a un pouvoir sucrant supérieur à celui du glucose). Il est très utilisé en confiserie et dans la préparation de boissons non alcoolisées.

### Glucose oxydase

Action :	transformation du glucose en acide gluconique
Sources :	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i>
Usages :	Éliminer le glucose dans les œufs déshydratés

La glucose oxydase est produite par *Aspergillus niger*, *Penicillium purpu-rogenum* et d'autres moisissures semblables. Cette enzyme catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique. Une autre enzyme, la catalase (produite par *Aspergillus niger* ou *Micrococcus lysodeikticus*), est jointe à la préparation enzymatique pour décomposer le peroxyde d'hydrogène formé. Cette préparation est employée principalement pour éliminer le glucose des blancs d'œuf ou des œufs entiers avant leur séchage, ce qui aide à prévenir leur brunissement, leur détérioration et améliore leurs propriétés moussantes.

### Pectinases

Action :	hydrolyse de la pectine
Sources :	<i>Aspergillus niger</i> (moisissure) <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Penicillium</i>
Usages :	Clarifier le vin ou le jus de fruits et de légumes Empêcher la gélification

Les pectinases produites par des moisissures (principalement *Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae*) permettent d'hydrolyser la pectine des fruits et d'éviter ainsi la formation de gel lorsque celui-ci est contre-indiqué (jus de fruits concentrés, par exemple). Ces enzymes permettent la clarification des jus de fruits, du vin, du vinaigre et des sirops. L'addition de pectinases dans des fruits écrasés aide à l'extraction du jus.



### Cellulase

Action :	<i>Hydrolyse de la cellulose en sucres</i>
Sources :	<i>Trichoderma viride (moisissure) Aspergillus niger (moisissure)</i>
Usages :	<i>Clarifier les jus de fruits Produire davantage de sucres fermentescibles</i>

La cellulase permet de dégrader la cellulose en sucres solubles. Elle est produite par différentes espèces de mycètes comme *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Stachybothrys atra*, etc.

Cette enzyme permet de produire davantage de sucres fermentescibles dans le moût de brasserie. Elle aide également à clarifier les jus de fruits.

### Lipases

Action :	<i>Hydrolyse les lipides en acides gras et glycérides</i>
Sources :	<i>Saccharomyces lipolytica (levure) Aspergillus niger (moisissure) Pénicillium roqueforti, Rhizopus, Candida lipolytica</i>
Usages :	<i>Produire davantage de composés d'arômes dans les fromages et autres produits laitiers</i>

Les lipases agissent sur les matières grasses en les hydrolysant en glycérides, acides gras et glycérol.

Elles sont produites par un grand nombre de levures et de moisissures comme *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Pénicillium roqueforti*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida lipolytica*, *Torulopsis ernobii* et certaines bactéries du genre *Pseudomonas*.

Les lipases peuvent être utilisées pour améliorer la saveur des fromages, de la crème glacée, de la margarine, du beurre, de pâtisseries et d'autres produits.

Elles permettent également d'éliminer les graisses insolubles dans les préparations de poissons et de blancs d'œufs destinées à la déshydratation.

### Enzymes protéolytiques (Proteases)

Action :	Hydrolyse des protéines en acides aminés
Sources :	<i>Aspergillus oryzae</i> (moisissure) <i>Bacillus subtilis</i> (bactérie)
Usages :	Améliorer la texture de la pâte à pain Stabiliser la bière

Les proteases hydrolysent les protéines.

Chaque type d'enzymes brise les chaînes polypeptidiques à des endroits précis, libérant des peptides puis des acides aminés.

Les bactéries *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus* et la moisissure *Aspergillus oryzae* sont les principales sources d'enzymes protéolytiques d'origine microbienne.

Les usages sont :

- Amélioration de la texture de la pâte (action sur le gluten de la farine)
- Attendrissement de la viande.
- Clarification et stabilisation de différents liquides comme la bière (empêche la formation d'opacité durant le refroidissement).
- Amélioration de la filtrabilité de certains liquides et de blancs d'œufs destinés à la déshydratation.

Production de protéines hydrolysées solubles.

### Rennine (ou rennet)

Action :	coagulation de la caséine du lait
Sources :	<i>Mucor pusillus</i> (moisissure) <i>Mucor miehei</i> (moisissure) <i>Endothia parasitica</i>
Usages :	Coaguler le lait pour la fabrication de fromages

D'autres proteases permettent la coagulation de la caséine du lait.

C'est le cas de la rennine fongique, qui peut remplacer la présure bovine pour la fabrication de fromages.

Les espèces utilisées actuellement pour cette production sont *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* et *Mucor pusillus*.





## VIII. Exemples d'applications des enzymes dans l'industrie

### EXEMPLE 1 :

#### PRODUCTION DE LA LEVURE DE PANIFICATION PAR VOIE BIOTECHNOLOGIE

##### Introduction :

La levure de boulangerie peut, à juste titre, être considérée comme un des plus anciens produits issus de la fermentation industrielle. Aujourd'hui encore, elle est un des plus importants produits de la biotechnologie, à la fois par la quantité (plus de 2,5 millions de tonnes annuelles) et par la fonction (les qualités du pain levé à la levure sont reconnues à travers le monde, dépassant les frontières nationales et culturelles).

Pour le biochimiste et le généticien, son importance va plus loin que sa place dans l'industrie agroalimentaire et que son rôle dans la panification. En effet, *Saccharomyces cerevisiae*, espèce à laquelle appartient la levure de boulangerie, a été et est encore l'un des organismes modèles parmi les plus utilisés dans les laboratoires de recherche universitaires pour des études biochimiques, physiologiques et génétiques : c'est l'eucaryote le plus simple (eucaryote : cellule différenciée contenant un noyau ; l'homme comme la levure est un eucaryote) ; sa croissance est rapide avec un doublement toutes les deux heures, sa manipulation en laboratoire est aisée et son utilisation séculaire dans les aliments fermentés est l'assurance de son innocuité.

La majeure partie des connaissances sur la physiologie et la génétique de « *Saccharomyces cerevisiae* » a été acquise dans les laboratoires universitaires sur des souches dites de laboratoire que Carlos Gancedo [1] appelle avec humour « *Saccharomyces laboratorii* ». Ces souches, mieux adaptées aux analyses génétiques que les souches industrielles, présentent des taux de croissance et des niveaux d'activité fermentaire nettement inférieurs à ceux des souches de levure utilisées par les industries de fermentation. En conséquence, ces connaissances ne peuvent être utilisées directement et doivent être transposées aux souches industrielles et aux conditions industrielles d'utilisation de la levure. Les avancées scientifiques ont permis des progressions importantes dans la maîtrise des cultures en fermenteur, la stabilisation du produit par séchage ménageant (c'est-à-dire en lit fluidisé, permettant de conserver 80 % du pouvoir fermentatif), par exemple, et la construction de

nouvelles souches mieux adaptées aux habitudes alimentaires rencontrées dans les pays utilisateurs et aux contraintes liées à l'évolution des techniques boulangères.

La levure de boulangerie est donc à la fois un produit traditionnel et un produit en évolution permanente.

## 1. La levure *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.1 Principales caractéristiques

La levure de boulangerie est un champignon unicellulaire, de la classe des Ascomycètes, du genre *Saccharomyces* (le nom réfère à son affinité pour le sucre) et de l'espèce *cerevisiae* (le nom réfère à son rôle dans la fabrication de la bière); le nom *Saccharomyces cerevisiae* a été donné à la levure de bière en 1838 par Meyer.

On peut observer, au microscope optique, des cellules individualisées, de forme ovoïde, de 4 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Un gramme de levure pressée contient 8 à 10 milliards de cellules. Sur une coupe observée en microscopie électronique, on distinguera, de l'extérieur vers l'intérieur, la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique, le noyau, des vacuoles, des ribosomes et des mitochondries (figure 1).

La **paroi cellulaire**, d'une épaisseur de  $70 \pm 10$  nm, représente 15 à 18 % des matières sèches cellulaires ; elle est composée presque exclusivement de polysaccharides : des glucanes, polymères de glucose, reliés par des liaisons  $\beta$  1-3 et  $\beta$  1-6 et des mannanes, polymères de mannose, dont le squelette est formé de liaisons  $\beta$  1-6 et dont les ramifications comprennent des liaisons  $\beta$  1-2 et  $\beta$  1-3.

Le rôle de la paroi est principalement de protéger et de maintenir la forme de la cellule de levure, grâce à sa structure semi-rigide : les glucanes forment un réseau de fibrilles maintenu par liaisons covalentes et liaisons hydrogène ; les mannanes et les complexes mannanes-protéines, de masses moléculaires élevées et insolubles, forment la couche la plus externe, portant les déterminants antigéniques.

Cependant, la paroi a une certaine élasticité qui lui permet de réagir, par des variations de volume cellulaire, aux conditions de pression osmotique du milieu.

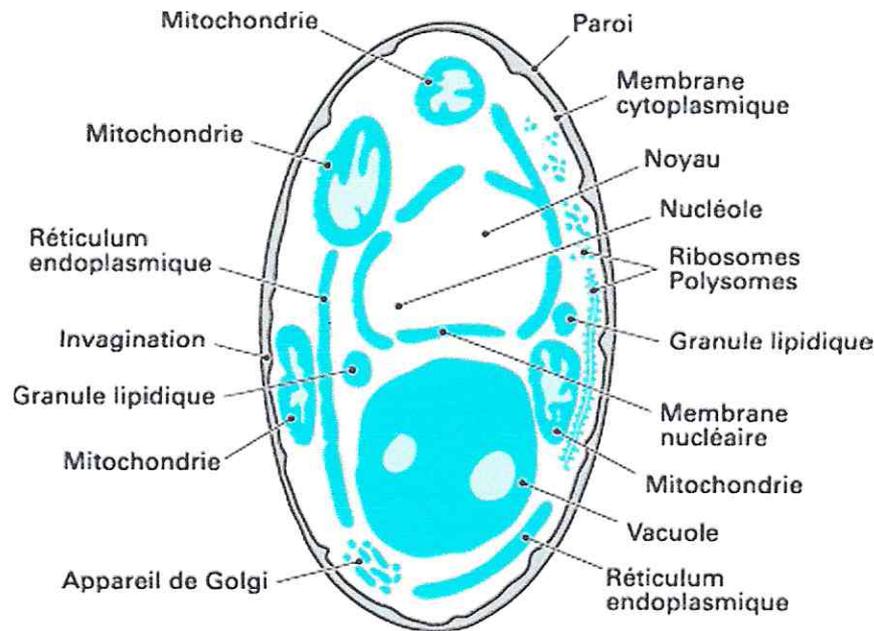


Figure 1 : Schéma d'une cellule de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*)

La **membrane cytoplasmique**, composée principalement de lipides (triglycérides, phospholipides et stérols), de protéines et de lipoprotéines, a une structure en bicouche, caractérisée par un arrangement des molécules phospholipidiques côte à côte et dos à dos, avec les groupements polaires vers l'extérieur. Dans cette structure s'intercalent les protéines.

Le rôle de la membrane est capital pour le métabolisme de la levure. Ses trois fonctions principales sont:

- de former une barrière extensible qui permet à la cellule de gonfler ou de rétrécir selon la pression externe ;
- de contrôler l'entrée ou la sortie de solutés, soit par diffusion simple, soit par transport actif grâce à de nombreuses enzymes appelées perméases ;
- de servir de base sur laquelle les composants de la paroi sont attachés.



Le **cytoplasme** est une substance colloïdale dans laquelle se déroule toute une série de réactions biochimiques.

Il contient de nombreux **organites** dont les principaux sont :

- le **réticulum endoplasmique** et l'**appareil de Golgi**, réseau de membranes, intervenant dans la sécrétion de protéines ;
- le **noyau** qui contient les chromosomes au nombre de 16 pour la forme haploïde ;
- les **vacuoles**, lieux de stockage de nombreuses substances de réserve. Elles jouent pour la levure le rôle de lysosomes, c'est-à-dire qu'elles contiennent à l'état inactif des enzymes (protéases, nucléases, estérases...) capables d'hydrolyser certaines macromolécules. Ces enzymes deviennent actives, en particulier au cours de la lyse cellulaire ;
- les **mitochondries**, structures sphériques ou en bâtonnets, de 0,3 à 1 µm de large et jusqu'à 3 µm de long, entourées d'une double membrane. Elles sont le siège de la respiration. Elles sont équipées d'enzymes capables d'oxyder divers substrats, avec des systèmes de transport d'électrons et d'enzymes qui convertissent l'énergie libre des réactions oxydatives en ATP ;
- les **ribosomes**, sites de synthèse des protéines sont des particules composées de deux sous-unités (40 S et 60 S) et ressemblent aux ribosomes des autres organismes. La levure de boulangerie est caractérisée par sa richesse en ARN ribosomique (ARN = acide ribonucléotidique).

La levure de boulangerie appartient à un groupe relativement mineur de levures : les levures aérobies facultatives et fermentaires, capables d'utiliser le glucose en présence ou en absence d'oxygène et de fermenter le glucose même en présence d'air.

La levure tire son énergie du sucre (figure 2).

- En **anaérobiose**, le sucre est fermenté. L'oxydation du glucose est incomplète :

Glucose ® CO<sub>2</sub> + éthanol + énergie (56 kcal soit 234 kJ)

Cette voie métabolique, appelée glycolyse, fait intervenir pas moins de 12 enzymes, qui constituent de 30 à 65 % des protéines cytosoliques selon les cas.

On estime que 95 % du glucose est transformé en CO<sub>2</sub> + alcool et que 5 % aboutit à des produits de fermentations secondaires : glycérol, acides organiques, aldéhydes, esters, alcools supérieurs, etc.

L'ensemble de ces réactions est la base de la fermentation panair : le gaz carbonique provoque la levée de la pâte tandis que les métabolites secondaires contribuent à la création du goût et de l'arôme du pain.

- En **aérobiose**, l'oxydation du glucose est complète :

Glucose ® CO<sub>2</sub> + eau + énergie (688 kcal soit 2 880 kJ)

Comme en anaérobie, le glucose suit la voie de la glycolyse jusqu'au pyruvate ; mais, en présence d'oxygène, celui-ci ne sera pas transformé en éthanol mais en acétyl-CoA qui permettra l'entrée dans le cycle de dégradation des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs qui permet la synthèse de composés riches en énergie, précurseurs de lipides et de protéines.



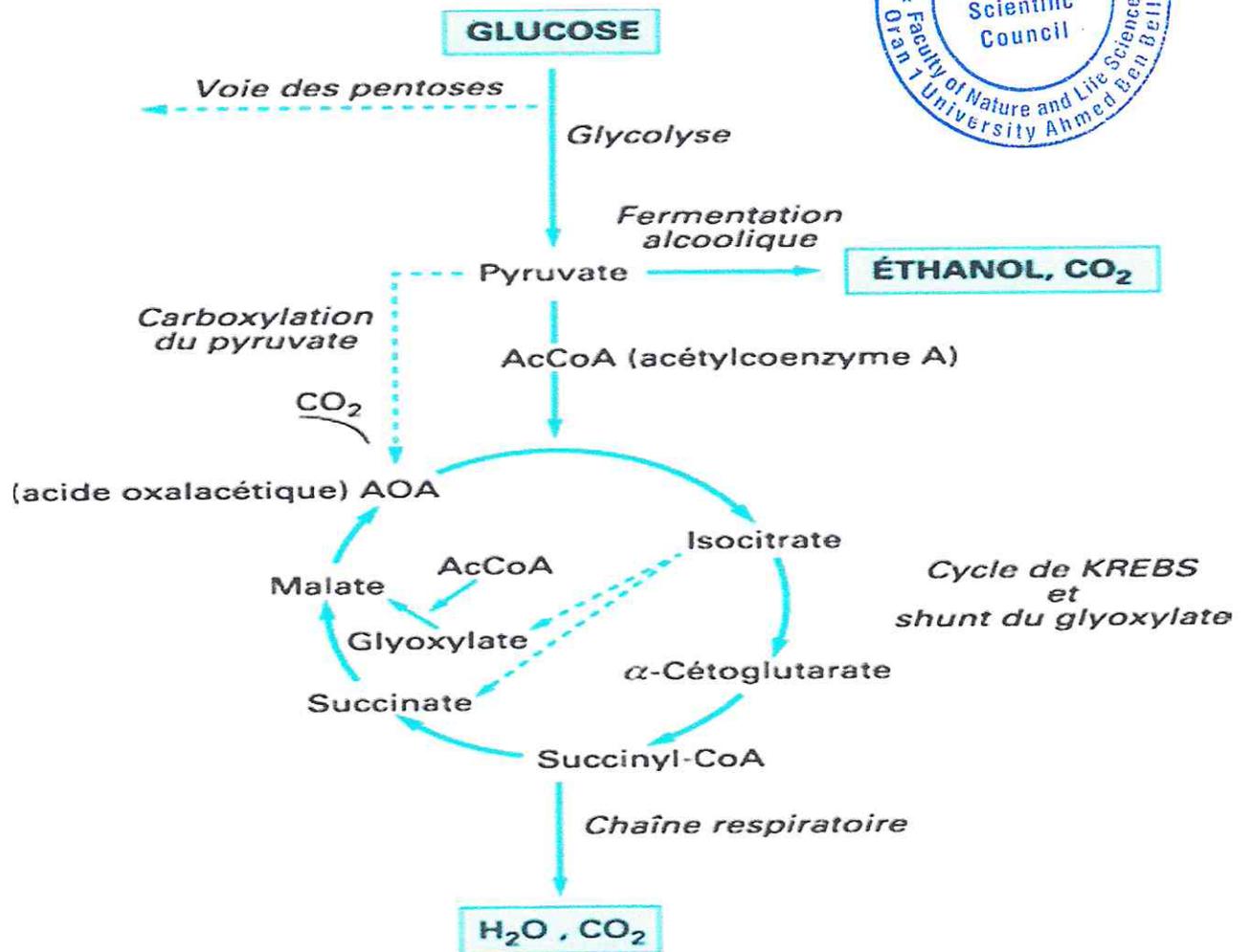


Figure 2 : Voies métaboliques de dégradation du glucose (synthèse)

- En raison de son meilleur rendement énergétique, la voie respiratoire est utilisée préférentiellement par la levure. Cependant, si la concentration en sucre du milieu augmente ( $> 100$  mg/L), il y a inhibition de la respiration par la fermentation et production d'alcool malgré la disponibilité d'oxygène.

C'est *l'effet Crabtree*, appelé aussi effet glucose ou répression catabolique ou, dans certains documents anciens, « *contre-effet Pasteur* » : le glucose réprime l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans son propre métabolisme ou dans celui d'autres sources de carbone. Dans la levure, ce sont principalement les enzymes du cycle de Krebs qui sont soumises à la répression catabolique.

Ce phénomène de **répression catabolique** revêt une grande importance dans la production industrielle de levure et justifie le procédé d'alimentation continue, appelé procédé « fedbatch ».

## 1.2 Rôle de la levure dans la panification

Comme nous pouvons le voir (cf. encadré « *Historique* »), la fermentation joue un rôle prépondérant dans l'élaboration des qualités physiques du pain, par la levée de la pâte qui contribue à la formation du réseau glutineux, et dans le développement de ses qualités organoleptiques grâce aux fermentations secondaires.

La pâte à pain est constituée de farine, d'eau, de sel (1,5 à 2 % de la farine), de levure (0,5 à 6 % selon les formules), auxquels peuvent être ajoutés, selon les recettes, du sucre, des matières grasses et des adjuvants ou additifs autorisés appelés améliorants de panification.

- **Il convient de distinguer trois types de sucres pouvant être fermentés par la levure :**

les **sucres préexistants**, qui représentent environ 1 % de la farine : **glucose, fructose, saccharose, raffinose et lévuline** qui est un polymère formé d'un résidu glucose relié à plusieurs molécules de fructose. L'invertase de la levure, enzyme externe, est capable d'hydrolyser saccharose, raffinose et lévuline pour libérer du glucose et du fructose directement assimilables et fermentescibles ;

le **maltose**, qui provient de la dégradation enzymatique de l'amidon de la farine par les  $\alpha$  et  $\beta$ -amylases présentes dans celle-ci, pénètre grâce à une perméase spécifique dans la cellule où il est hydrolysé par la maltase en deux molécules de glucose. Maltase et maltoperméase sont induites par le maltose et plus ou moins réprimées par le glucose, selon les souches ;

les **sucres ajoutés**, dont la dose et la nature varient selon les recettes et les pays. En France, le **saccharose** est encore souvent employé mais il peut être remplacé, comme aux USA, par des **sirops de glucose et fructose**, plus faciles à utiliser en

boulangerie industrielle. Dans d'autres pays, des matières premières locales, comme le jus de datte, peuvent être employées.

Lorsque la quantité de sucre ajouté augmente (> 5 % de la farine), on observe une diminution de l'activité fermentative, proportionnelle à l'augmentation de la pression osmotique. Cette dernière étant proportionnelle au nombre de molécules dissoutes dans l'eau libre de la pâte, on notera que l'addition de sirop de glucose + fructose engendre une pression osmotique supérieure à celle d'une quantité équivalente de saccharose.

Pour la même raison, les levures riches en invertase seront moins performantes dans les pâtes riches en saccharose que des levures à taux d'invertase plus bas.

#### **Historique de la panification et de la levure :**

Il y a au moins cinq mille ans que l'homme a inventé le pain, après avoir utilisé, pendant une très longue période, des préparations de céréales, bouillies ou galettes, comme élément de base de sa nourriture.

Les Égyptiens puis, plus tard, les Hébreux, ont observé que, avec de la pâte naturellement fermentée, on pouvait faire lever les galettes traditionnelles et leur donner une saveur et une texture nouvelles : **le pain était né.**

Les boulangers continuèrent pendant longtemps à utiliser presque exclusivement l'ensemencement au levain, pâte dans laquelle on a laissé se développer les microorganismes naturellement présents dans la farine. Ces microorganismes sont des levures de différents genres et espèces et des bactéries acidifiantes.

À la fin du XVII<sup>e</sup> siècle, les boulangers français commencèrent à ajouter de la levure de bière au levain, ce qui améliorait le goût et accélérait la levée du pain. C'est vers 1840 qu'un boulanger autrichien introduisit en France l'utilisation de la levure seule. La fabrication du pain viennois, dite *sur poolish*, restait limitée aux pains de luxe car elle nécessitait une première préparation liquide, faite d'eau, de farine et de levure, qu'on laissait fermenter plusieurs heures avant d'ajouter le reste de la farine, de l'eau et du sel pour obtenir la pâte.

Les premières levures pressées, commercialisées sous forme de blocs, apparurent en Allemagne en 1825. Mais l'industrie de la levure a réellement démarré en Autriche en 1867 avec le procédé **Mautner**. Ce procédé empirique consistait à préparer un moût de grains, de telle sorte que le dégagement gazeux entraînait la levure à la surface où elle était recueillie.

En 1872, le baron **Max de Springer**, venu de Vienne, créa à Maisons-Alfort, près de Paris, la première fabrique française de levure de grains, selon la méthode viennoise : **ce furent les débuts de la société Fould-Springer.**

La Société « **Lesaffre et Bonduelle** », ancêtre du groupe Lesaffre, imita son confrère et commença également en 1872 à vendre, comme levure de boulangerie, la levure extraite des moûts de fermentation de grains, produits dans sa distillerie de Marcq-en-Barœul, près de Lille.

Les recherches de Louis Pasteur en 1876 avaient révélé que l'insufflation d'air favorisait la croissance de la levure – les levuriers adoptèrent rapidement l'aération continue du moût qui permettait d'obtenir davantage de levure et moins d'alcool.

Les progrès décisifs se firent entre 1915 et 1920 en Allemagne et au Danemark avec le procédé d'alimentation continue qui consiste à synchroniser l'addition des sucres, dont se nourrit la levure, avec la croissance de celle-ci. La fabrication moderne de levure repose toujours sur ces bases.



### **1.3 Principaux types de pains**

La variété des pains est très grande, aussi bien en France que dans les cinq continents. Elle est le reflet des usages, de la demande du consommateur, des matières premières disponibles et aussi des impératifs techniques.

On distingue sept grandes familles de pains.

- **Les pains à croûte dure** : c'est le pain français traditionnel.
- **Les pains de mie ou pains toasts** cuits en moule : c'est le pain anglo-saxon par excellence. Sa fabrication est plus « automatisable » que celle du pain français, ce qui explique le développement important de la boulangerie industrielle dans ces pays.
- **Les pains plats ou pains arabes** : il en existe deux grandes variétés.

Pour le pain de type libanais, la pâte, composée de farine, eau, sel et levure, est laminée en fines galettes, mise à reposer pendant une heure et cuite en moins d'une minute dans un four brûlant à 500 ou 600 °C. Pendant la cuisson, le disque de pâte se gonfle brusquement et se dégonfle à la sortie du four, produisant ainsi une fine galette formée de deux couches.

La seconde variété est une galette plus épaisse et avec une mie plus importante ; elle correspond au *baladi égyptien* ou à la *pita grecque*.

- **Les pains noirs** qui sont traditionnellement consommés en Allemagne et dans toute l'Europe de l'Est. Ils sont à base de farines complètes et de farine de seigle. Pour limiter le collant, on inclut dans la pâte des acidifiants (levain, vinaigres). Ces pains acides, très denses, se conservent très longtemps.
- **Le pain vapeur** est largement répandu en Chine et dans toute l'Asie du Sud-Est. Le produit final, assez dur et sans couleur, se consomme garni de viande ou de farce aux légumes et aux herbes.
- **Les pains frits** sont plus proches d'une bouillie de céréales cuite en friture que d'un véritable pain. On peut citer, à titre d'exemple, le *chappati* en Inde ou la *tortilla* au Mexique.
- **Les pains gâteaux**, riches en sucre (20 à 30 % par rapport à la farine), en matières grasses et parfois en œufs, consommés le plus souvent comme friandises, se rencontrent aussi bien en Europe (la *brioche*, le *cramique belge*) qu'en Extrême-Orient (les *rotimanis* indonésiens) ou au Mexique avec le *pan dulce*.



#### 1.4 Obtention de nouvelles souches

La diversité des recettes de pain dans le monde et aussi l'évolution des technologies boulangères et les exigences industrielles et économiques de la production nécessitent un travail important d'amélioration des souches de levure de boulangerie.

Le généticien dispose aujourd'hui de techniques performantes issues du génie génétique mais les techniques classiques, mutagenèse et hybridation, ne sont pas délaissées pour autant.

*Saccharomyces cerevisiae* présente deux modes de reproduction. Dans des conditions favorables, la levure se multiplie par bourgeonnement. Le bourgeon grossit et se détache de la cellule-mère pour donner une cellule-fille identique. C'est la **multiplication végétative ou reproduction asexuée**.

Il existe également une **reproduction sexuée**. En effet, en carence de nutriments et en présence d'acétate, la cellule de levure diploïde (2 lots de chromosomes) ou tétraploïde (4 lots) va sporuler ; la cellule se transforme en une asque composée en théorie de 4 spores ; pratiquement, dans les souches industrielles, de 1 à 4 spores.

Dans ce processus de reproduction sexuée, une cellule à  $2n$  chromosomes donne naissance à 4 spores à  $n$  chromosomes : c'est la **méiose** ou division réductionnelle. Dans l'asque, 2 spores sont de signe  $a$  et 2 sont de signe  $\alpha$ . Le croisement n'est possible qu'entre 2 cellules de signes opposés : il y a donc hétérothallisme. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, de nombreuses recombinaisons géniques ont lieu lors de la méiose d'où une grande diversité génétique des haploïdes ou ségrégeants et la possibilité d'établir des programmes de croisements entre ségrégeants issus de souches ayant des propriétés différentes.

Bien que les protocoles utilisés dans les laboratoires universitaires ne puissent être transposés aux souches industrielles, en raison de la faible fréquence d'obtention de spores viables et de l'impossibilité d'utiliser des tests simples pour la sélection, c'est ainsi pourtant que nombre de souches de levure de boulangerie utilisées actuellement ont été construites.

Nous citerons les souches rapides, adaptées à la fermentation du maltose, performantes sur des pâtes pas ou peu sucrées ainsi que les souches à large spectre d'utilisation, performantes à la fois sur pâtes sucrées et non sucrées.

Les mutants, spontanés ou induits, ont été relativement peu exploités pour les levures industrielles. La mutagenèse induite par agents chimiques ou rayonnements peut endommager des gènes importants pour les propriétés industrielles. L'isolement de mutants spontanés réduit cet écueil, mais il reste essentiel de disposer d'un test de sélection efficace. Des mutants présentant des propriétés de meilleure résistance à la congélation ont ainsi pu être obtenus.

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'éviter ces difficultés en agissant avec précision au niveau d'un gène. Elles permettent ainsi, soit de modifier ou de supprimer une activité, soit d'introduire une nouvelle fonctionnalité, ce que ne permet pas la génétique traditionnelle.

Ainsi ont été construites, par exemple, des levures de boulangerie capables d'utiliser le lactose, le mélibiose ou le maltose de façon constitutive.

Grâce au séquençage complet du génome de la levure en 1996, premier génome d'un organisme eucaryote séquencé, l'approche moléculaire se développe rapidement dans les laboratoires universitaires et industriels. Cependant, il existe une réaction négative forte des consommateurs à l'encontre des aliments contenant des organismes génétiquement modifiés (OGM) et, à notre connaissance, aucune levure génétiquement modifiée n'est utilisée aujourd'hui pour faire du pain.



## **2. Conditions industrielles de production**

### **2.1 Matières premières**

---

Les matières premières utilisées doivent répondre aux exigences nutritionnelles imposées par la croissance et la multiplication des cellules de levure. Si la levure est produite sur un milieu de composition définie, à base de glucose comme substrat carboné et de sels d'ammonium et de phosphore comme sources d'azote et de phosphate, le milieu de culture devra être complété par un apport de sels minéraux, de vitamines et d'oligoéléments. Une composition type de milieu a été donnée dans le brevet de Plomb et est reprise dans le tableau 1. Ce milieu est complexe et onéreux, c'est pourquoi les mélasses de sucrerie de betterave ou de canne sont des substrats de choix sur les plans économique et technique et sont, à ce jour, la principale matière première utilisée en levurerie.

Leur composition est variable et dépend des procédés sucriers dont elles sont issues ainsi que de la qualité des récoltes. On trouvera, dans le tableau 2, la composition type de mélasses de betterave et de canne, extraite du livre de Reed et Nagodawithana.

- Les 77 à 82 % des matières sèches de la mélasse apportent pour l'essentiel du **saccharose** comme **source de carbone**, des **minéraux**, des **oligoéléments** et des **vitamines**. La mélasse de betterave contient environ 1 à 1,5 % de raffinose (trisaccharide formé de galactose-glucose-fructose) dont la levure n'assimile que le résidu fructose car elle ne possède pas d'activité  $\alpha$ -galactosidase pour hydrolyser le mélibiose (galactose-glucose).
- **Besoins nutritifs pour la croissance de la levure, pour un kilogramme de glucose dans le milieu**

Matière première	Quantité	Matière première	Quantité
Sels minéraux		Vitamines	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24 g	B1	25 mg
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	12 g	B2	1,25 mg
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1,6 g	B5	95 mg
		B6	12 mg
Oligoéléments		Biotine	0,5 mg
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1 025 mg	Acide <i>p</i> -aminobenzoïque	5,8 mg
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	192 mg	Acide nicotinique	40 mg

CuSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	30 mg	Acide nicotinamide	40 mg
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	17 mg		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	23 mg	Inositol	1 440 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	23 mg	Ribitol	43 mg
KI	11 mg		

**Composition type des mélasses (en % des matières sèches totales)**

Matière première	Mélasse de betterave	Mélasse de canne
Sucres totaux	66,5	73,1
Saccharose	63,5	45,5
Raffinose	1,5	0
Sucre inverti	0	22,1
Autres	1,5	5,5
Composés organiques totaux	23,0	15,2
AG et PY [1]	4,0	2,4
Aminoacides	3,0	0
Bétaïne	5,5	0
Autres formes d'azote	0	3,1
Acides organiques	5,5	7,0
Pectines, etc.	5	2,7
Composés minéraux totaux	10,5	11,7
K <sub>2</sub> O	6,0	5,3
Na <sub>2</sub> O	1,0	0,1
CaO	0,2	0,2
MgO	0,2	1,0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ; Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,1	0
SiO <sub>2</sub>	0,1	0
Cl	1,7	1,1
SO <sub>2</sub> + SO <sub>3</sub>	0,5	2,3
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,1	0,8



N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,4	0
Autres	0,2	0,9

- La levure a besoin de **biotine** (vitamine H) pour sa croissance. Les mélasses de canne en sont riches (0,5 à 0,8 ppm). Dans le cas de fermentations sur mélasses de betterave ou d'autres substrats carbonés comme des hydrolysats d'amidon, cette vitamine doit être ajoutée à raison de 60 à 100 µg pour 100 g de matières sèches de levure produite. Les autres vitamines sont habituellement présentes en quantités suffisantes dans les mélasses. Les vitamines B1 et B6 sont quelquefois ajoutées pour améliorer l'activité fermentative de la levure.
- L'apport **azoté** des mélasses est largement insuffisant pour couvrir les besoins de la levure. La bétaine présente dans la mélasse de betterave n'est pas assimilée.

Le taux d'azote de la levure de boulangerie varie de 6 à 9 % sur matières sèches soit 37 à 56 % de protéines. La composition azotée dépend de la qualité souhaitée : une levure riche en azote est plus active mais moins stable. L'apport d'azote dans le milieu se fait habituellement sous forme d'hydroxyde ou de sels d'ammonium (sulfate ou phosphate), ou d'urée. Cette dernière, qui exige pour sa bonne assimilation des niveaux élevés de biotine, est utilisée principalement avec la mélasse de canne.

- La mélasse manque de **phosphore**. En règle générale, la composition en phosphore de la levure, exprimée en P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, représente un tiers de celle de l'azote, soit entre 2 et 3 % sur matières sèches. Le phosphore est ajouté sous forme d'acide phosphorique ou de ses sels.
- Les mélasses contiennent suffisamment de **potassium**, de **calcium** et de **soufre**, mais du **magnésium** (et parfois du **zinc**) doivent être ajoutés.
- Elles peuvent, dans certains cas, présenter une **toxicité** pour la croissance des levures. Les éléments toxiques sont mal définis ; ils proviennent des techniques agricoles ou sucrières (ammonium quaternaire, sulfites, fongicides) ou de minéraux en excès (Na<sup>+</sup>) ou encore d'acides gras à chaînes courtes. Dans le processus de levurerie, la mélasse

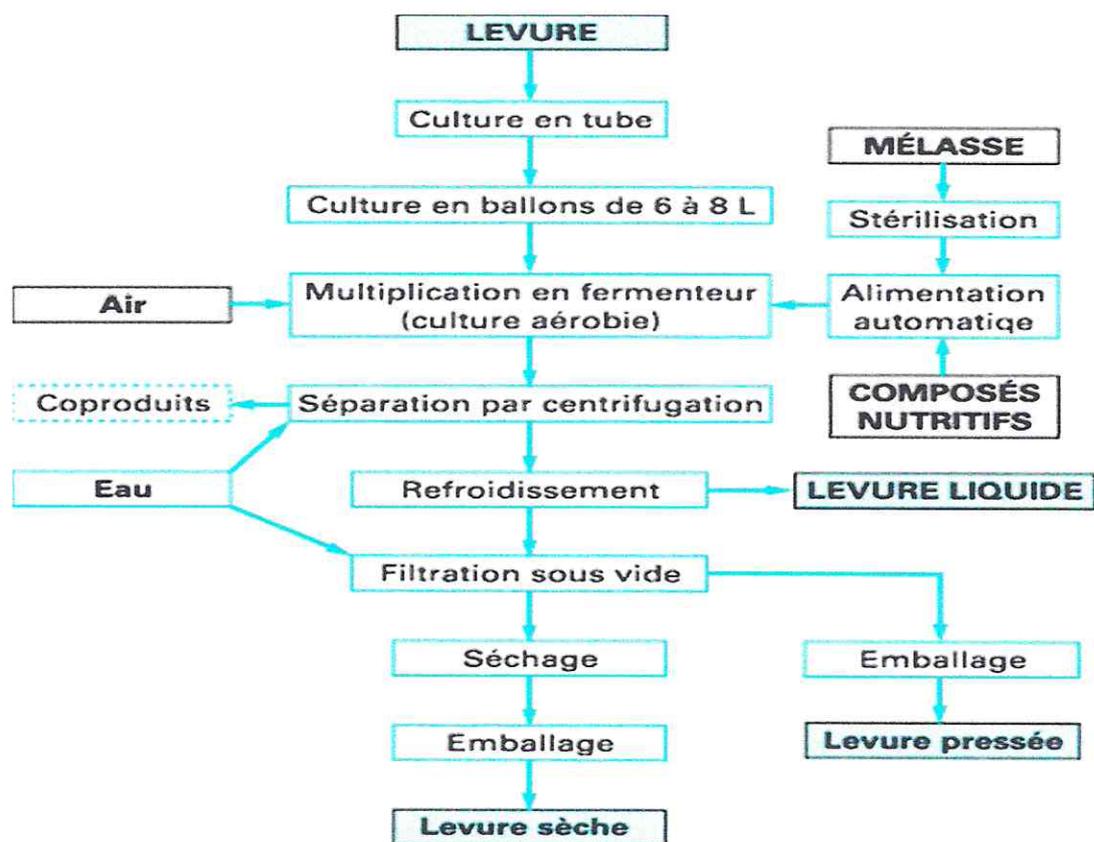
est filtrée, diluée, clarifiée et stérilisée. Il est relativement facile de clarifier la mélasse de betterave, tandis que la mélasse de canne contient des substances colloïdales qui rendent la clarification plus difficile.

- D'autres substrats carbonés peuvent être utilisés pour la production de levure de boulangerie. Autrefois, avant 1920, la principale source de carbone était le **maltose** dérivé des moûts de grains convertis en maltose. Les **sirops de glucose**, obtenus par hydrolyse enzymatique des amidons de maïs ou de blé, sont une bonne matière première potentielle, pouvant être utilisée seule, comme source de carbone, ou en complément d'autres matières premières carbonées et présentant l'avantage de diminuer sensiblement la DCO des effluents.

- **2.2 Premières étapes de la fabrication :** La conduite de la multiplication des cellules de levure répond à un triple objectif :
  - celui de fournir au client un produit adapté à ses besoins, notamment en termes de pouvoir fermentatif, de stabilité et de présentation ;
  - celui de maîtriser les risques de contamination microbiologique ;
  - celui de produire la levure au meilleur prix.

À partir du tube gélosé contenant la souche, une série de cultures dans des volumes de plus en plus grands conduira au produit commercial. Les différentes étapes de la production sont présentées figure 3.





**Procédé de fabrication de la levure**

Les premières étapes, réalisées au laboratoire dans des conditions strictes de stérilité, sont appelées *culture pure*. Elles sont réalisées dans un milieu nutritif riche composé de saccharose et d'extrait de levure en *batch* agité. Il y a donc coproduction d'alcool.

Dans ces conditions de semi-aérobie, le rendement biomasse/sucre est faible. Les récoltes sont de 20 à 50 g/L, soit 6 à 15 g de matières sèches/L.

Une récolte de 500 g environ (exprimée en levure à 30 % de matières sèches) sera suffisante pour ensemer un premier fermenteur industriel de 8 à 10 m<sup>3</sup> dit *préfermenteur*. À partir de cette première étape de fermentation industrielle, également conduite en *batch*, avec une faible aération, la mélasse sert de substrat.

Il faut une vingtaine d'heures pour obtenir environ 200 kg de levure (soit un taux d'enrichissement de 400 fois) qui serviront à l'ensemencement de la cuve de première génération industrielle (G1).

## 2.3 Cycle industriel

### 2.3.1 Conditions générales

Les fermentations commerciales sont menées en mode *Fed- batch*. Cette méthode consiste à pourvoir aux besoins en sucres de la levure en les apportant graduellement, de telle sorte qu'ils ne s'accumulent pas dans le milieu. La mélasse est coulée en quantités progressives, en fonction de la masse cellulaire présente à un instant donné, et de la capacité du milieu à dissoudre l'oxygène. Il n'y a pas de soutirage simultané et la fermentation se termine quand le fermenteur est plein. La durée totale d'une fermentation est comprise entre 10 et 18 h.

- Le **rendement théorique de conversion du sucre en levure** en anaérobie est  $Y_s = 0,075$  (g/g) tandis que, en conditions d'aérobie sur substrat mélasse, il est généralement de l'ordre de 0,5 : on comprend aisément que le producteur de levure recherche les conditions permettant d'optimiser le rendement. Il faut pour cela respecter deux conditions :

- ❖ le taux de croissance :

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

ne doit pas dépasser 0,2 ;

- ❖ avec  $x$  biomasse,
- ❖  $t$  temps ;
- ❖ la concentration du substrat présente à un moment donné ne doit pas dépasser 1 mM en glucose pour éviter l'effet Crabtree 1.1 .

- Le **quotient respiratoire** ( $RQ = Q_{CO_2}/Q_{O_2}$ ) est défini comme le rapport entre le  $CO_2$  produit  $Q_{CO_2}$ , exprimé en moles de  $CO_2$  par gramme de matières sèches de levure et par heure, et l'oxygène consommé  $Q_{O_2}$ , exprimé en moles d' $O_2$  par gramme de matières sèches de levure et par heure.

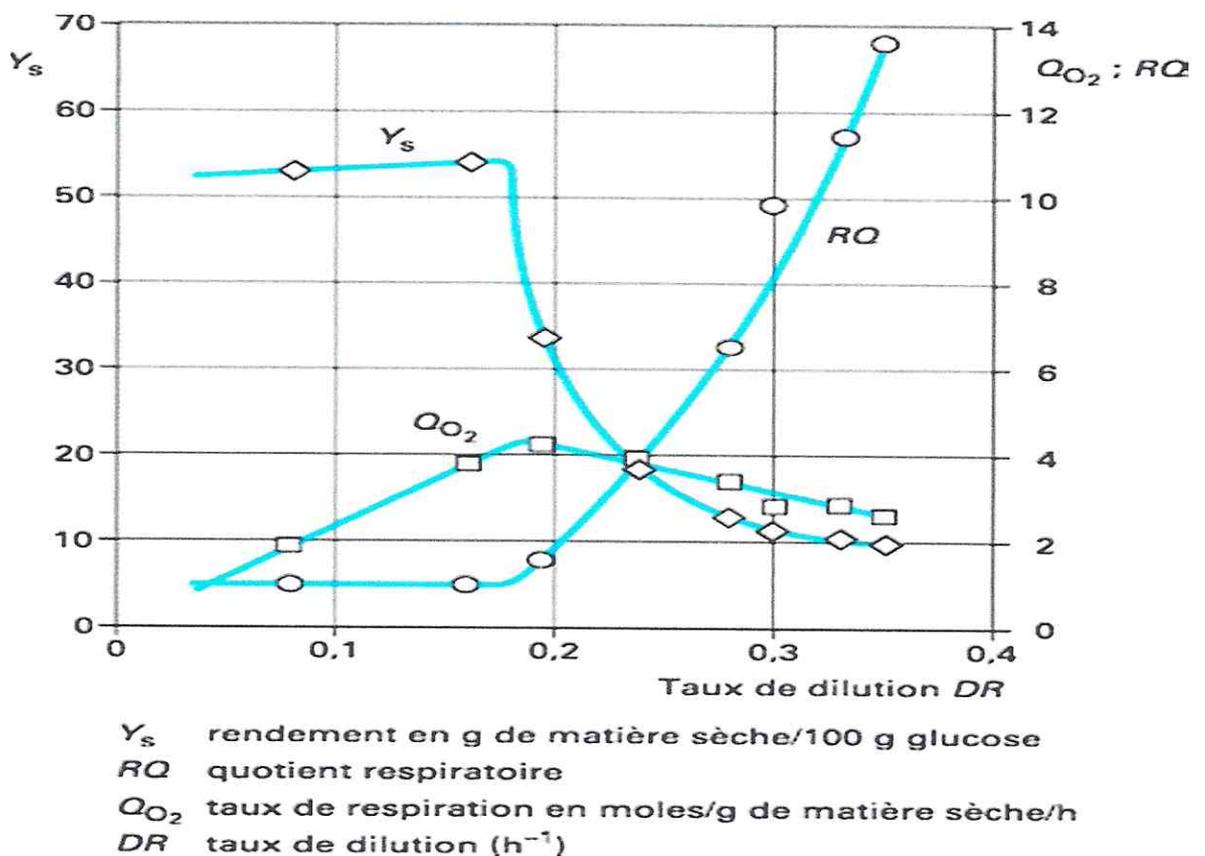
En aérobie, le quotient respiratoire est égal à 1. Pour des taux de croissance supérieurs au taux critique  $\mu$  qui est environ de 0,2 et dépend des conditions de préculture et de la souche utilisée, le quotient respiratoire augmente à des niveaux correspondant à la



fermentation. Très rapidement, il y a production d'éthanol et le rendement chute de manière drastique. Cet effet est démontré en fermentation continue, à l'état d'équilibre, en faisant varier le taux de dilution, c'est-à-dire le taux de renouvellement du milieu dans le fermenteur qui est égal au taux de croissance (figure 4).

La **quantité d'oxygène** nécessaire à la croissance est de l'ordre de 1 g d'oxygène par gramme de matières sèches de levure. L'oxygène est fourni en « soufflant » de l'air à travers le liquide contenu dans le fermenteur. Le volume d'air soufflé par minute est de 1 fois à 1,5 fois le volume de liquide dans le fermenteur. On peut utiliser de l'air enrichi en oxygène.

L'efficacité des systèmes d'aération est très variable. D'une façon générale, il est intéressant d'obtenir des bulles plus petites qui remontent plus lentement dans le fermenteur et qui présentent une plus grande surface totale de bulles, ce qui améliore la surface d'échange et le transfert d'oxygène.

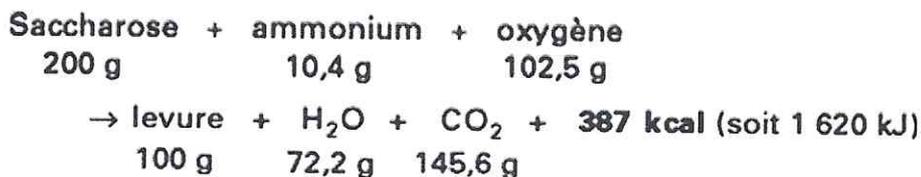


**Figure 4** - Effet du taux de dilution sur le métabolisme de la levure en culture continue



De nombreux systèmes ont été décrits et sont utilisés : réacteurs à boucle de type *air-lift*, réacteurs à colonne à bulles, réacteurs-tanks agités.

- L'aération intense des fermenteurs provoque une formation de mousse importante, nécessitant l'emploi d'agents anti mousses : huiles végétales de qualité alimentaire ou antimousses synthétiques autorisés. L'addition d'antimousse se fait automatiquement grâce à une sonde située au-dessus du niveau de liquide dans le fermenteur. Les agents antimousses affectent le transfert d'oxygène d'une façon complexe : ils tendent à diminuer les coefficients de transfert d'oxygène, mais augmentent la surface de l'interface entre les bulles d'air et le liquide.
- La levure de boulangerie tolère une **large gamme de pH**, de 3 à 6 avec un optimum de croissance à pH 4,5 à 5. La plupart des fermentations commerciales commencent à des pH bas pour limiter la contamination bactérienne et se terminent à pH entre 5 et 6.
- La production de levure dégage une **grande quantité de chaleur** qui est fonction du taux de multiplication et de la concentration cellulaire. La valeur mesurée est de l'ordre de 4,4 kcal/g (18,4 kJ/g) de matières sèches produites, supérieure à la valeur théorique de 3,9 kcal/g (16,3 kJ/g) qui est déduite de l'équation simplifiée de Harrison.



Le refroidissement des cuves se fait par circulation d'eau froide dans un réseau de tuyauteries situé le long des parois du fermenteur ou par échangeur thermique à plaques. La capacité de refroidissement des cuves est le deuxième facteur limitant, après l'apport d'oxygène, pour la productivité des grands fermenteurs.

Au dernier stade de fermentation, la concentration finale en cellules atteint régulièrement 5 à 6 % (exprimé en matières sèches). Expérimentalement, au stade pilote, avec un transfert d'oxygène adapté, des concentrations de 10 % peuvent être atteintes.

### 2.3.2 Générations successives

Le premier stade de *fedbatch* (G1) permet de récolter entre 35 et 40 fois l'ensemencement initial. Les conditions ne sont plus celles d'une stérilité parfaite mais sont en conformité avec les normes de l'agroalimentaire.

La récolte obtenue, séparée ou non du moût, servira à ensemer la 2<sup>e</sup> génération industrielle (G2). Les taux de multiplication sont plus bas car le coefficient de transfert de l'oxygène et la capacité de refroidir le fermenteur limitent la concentration de la biomasse pouvant être produite. On récolte 5,5 à 6 fois la quantité de levure ensemencée dont une partie servira à ensemer la génération suivante.

La conduite de dernière génération, ou **génération commerciale**, est primordiale pour ce qui concerne la qualité de la levure :

- l'ajustement de la composition biochimique (azote, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, sucres de réserve) dont dépendront le pouvoir fermentatif et la stabilité ;
- l'aptitude à fermenter dans des conditions d'applications spécifiques (pâtes acides, sucrées, surgelées...);
- l'aptitude à subir des traitements physiques comme le séchage.

En génération commerciale, la multiplication totale est également de l'ordre de 6. Elle se termine habituellement par une phase de mûrissement dont le but est d'assurer la stabilité de la levure en lui permettant de synthétiser des sucres de réserve (tréhalose, glycogène) en fin de fermentation.





## 2.4 Récolte et conditionnement de la levure fraîche

La séparation des cellules de levure du moût de fermentation s'effectue en continu sur des centrifugeuses à plateaux, qui permettent de laver la levure et d'obtenir une suspension ou crème de levure à 18 à 20 % de matières sèches, ce qui correspond à environ 50 % de cellules en volume.

La crème est refroidie à 4 °C sur échangeur à plaques et stockée à cette température dans des cylindres de garde.

- La levure peut être vendue sous cette forme **liquide** qui correspond à une demande de la boulangerie industrielle, principalement en Australie, aux États-Unis et au Canada.

Cette présentation, qui nécessite un investissement en tanks de stockage chez l'utilisateur, se développe également en Europe. **Ses avantages sont :**

- la possibilité d'automatiser le dosage de la levure ;
- une dispersion homogène dans la pâte en pétrissage à haute vitesse ;
- la possibilité de standardiser l'activité de la levure ;
- une bonne stabilité assurée par un bon contrôle de la température de stockage ;
- pas de matériaux d'emballage à éliminer ;
- un coût plus faible car peu d'opérations unitaires après la fermentation.

- La présentation la plus répandue reste la levure pressée, sous forme de blocs compacts appelés pains de levure. Elle est obtenue par concentration de la crème sur un filtre rotatif sous vide, appelé déshydrateur. L'addition de 0,5 % de sel à la crème avant la filtration permet d'extraire plus d'eau des cellules par la différence de pression osmotique.

Deux rampes de lavage éliminent le sel du gâteau de levure aspiré sur la précouche de fécule du déshydrateur. On obtient ainsi des matières sèches de 30 à 33 %. Après raclage, le gâteau est malaxé, boudiné et extrudé au travers de filières téflonnées de sections carrées, puis divisé en pains.

La filtration peut également être réalisée sous pression sur des filtres-presses à travers des toiles. Un des avantages de ce procédé est qu'il ne nécessite pas d'adjuvant de filtration.

- Une présentation alternative, appréciée des industriels, est la **levure émietlée**, sous forme de particules relativement fines et d'écoulement facile, ce qui lui permet d'être dosée automatiquement. Elle est emballée en sacs de 25 kg.

La **levure fraîche**, sous ses différentes présentations, doit être transportée et stockée à des températures de 3 à 7 °C. Elle conserve ainsi une bonne activité fermentative et une bonne qualité bactériologique pendant au moins 3 à 4 semaines.

## 2.5 Techniques de séchage

C'est pendant la Seconde Guerre mondiale qu'a été développé aux États-Unis un produit à 92 % de matières sèches, sous forme de **granules à réhydrater**, présentant une stabilité suffisante pour être transporté sur de longues distances et conservé dans des conditions difficiles.

Les années 1970 ont vu apparaître une nouvelle génération de **levure sèche active**, qualifiée d'**instantanée**, en raison de la possibilité de l'utiliser directement dans la pâte, sans passer par une phase de réhydratation préalable.

Les différentes techniques de séchage partent du gâteau de levure prélevé à la sortie du déshydrateur.

- La **levure sèche à réhydrater** peut être produite sous forme de granules plus ou moins poreux ou de sphérules, petites billes de 0,2 à 1 mm de diamètre. La levure à 30-35 % de matières sèches est extrudée en particules de 1 à 4 mm de section et 1 à 3 cm de long.

Pour la production de **granules**, ces fibres sont transportées en continu sur un tapis à mailles métalliques, dans un tunnel comportant 4 à 6 chambres traversées par des flux d'air verticaux portés à des températures différentes. La durée du processus de séchage est de 3 à 5 h, à des températures ne dépassant pas 45 °C. Les « granules » sont obtenus par broyage et tamisage.

Les **sphérules** sont obtenues par séchage, dans des tambours rotatifs, de particules extrudées comme ci-dessus. Les particules sont projetées, en permanence, dans un courant d'air chaud jusqu'à 60 °C, qui traverse le tambour. Leur frottement continu contre la paroi entraîne la formation de petites billes qui se lissent et s'entourent d'une « coque » de cellules mortes qui fera office de barrière protectrice contre l'oxygène et l'humidité. Le séchage, jusqu'à l'obtention de 92,5 % ± 1 % de matières sèches, peut être mené entièrement en tambour ou bien on pourra préférer une finition sur tour. La durée totale du processus est de l'ordre de 15 à 18 h.

- La **levure sèche instantanée** est obtenue par traitement sur lit fluidisé, en continu ou par batches successifs. Lors du malaxage, un émulsifiant est ajouté à la levure pour favoriser la réhydratation ; il s'agit en général de monoesters de sorbitan.

Le gâteau de levure est ensuite extrudé en « vermicelles » de 0,6 mm de diamètre et de 20 à 40 cm de longueur. Le passage de l'air chaud s'effectue au travers de soles perforées, de bas en haut, ce qui a pour effet de mettre en suspension les vermicelles qui se fragmentent. La température de l'air est élevée pendant la phase d'évaporation de l'eau libre, mais le produit ne devra pas dépasser 40 °C pendant la seconde phase du séchage.

La durée totale du séchage est de l'ordre d'une heure pour atteindre 95 % de matières sèches. Les particules obtenues sont fines et poreuses, ce qui les rend très hygroscopiques et perméables à l'oxygène. L'emballage est donc effectué sous vide d'air après balayage d'azote ou sous gaz neutre dans des sachets formés d'un complexe de polyéthylène et d'aluminium imperméable à l'eau et à l'air.

- Depuis le milieu des années 1980 est apparue une présentation nouvelle et originale appelée **LHIS ou levure à humidité intermédiaire surgelée**. Il s'agit de vermicelles, préparés comme pour la levure sèche instantanée mais sans émulsifiant, séchés sur lit fluidisé jusqu'à des matières sèches de 78 ± 2 % et ensuite surgelés et conservés à - 20 °C.

L'avantage de ce procédé est qu'il permet d'obtenir une levure :

à pouvoir fermentatif élevé car, si le séchage est bien conduit, la perte d'activité due au séchage est peu importante jusque 80 % de matières sèches environ ;

avec un maintien de ce pouvoir fermentatif pendant 2 ans ou plus ;

qui peut être utilisée comme de la levure sèche instantanée grâce à sa caractéristique *free flowing*.

**Note :**

*free flowing* : écoulement facile, grâce à la présentation en petites particules de 0,6 mm de diamètre et quelques millimètres de longueur, durcies par le froid.

## 2.6 Contrôle sur les produits finis

Le contrôle qualité régulier porte sur les cinq points suivants.

**Aspect et caractères organoleptiques :**

La levure de teinte claire, blanc crème ou ivoire, doit présenter une odeur *sui generis* (due au glutathion et à la vitamine B<sub>1</sub>) sans odeur étrangère. Pour la levure pressée en pains, la consistance et la friabilité sont contrôlées. Pour les levures sèches, on surveillera la taille et la forme des particules.

▪ **Composition biochimique :**

Le contrôle porte sur le taux de matières sèches, d'azote et de phosphore.

▪ **Activité fermentative:**

L'aptitude à fermenter la pâte à pain est vérifiée sur chaque lot. Différentes méthodes sont utilisées permettant de mesurer la vitesse du dégagement de gaz carbonique sur des pâtons à base de farine de blé auxquels sont ajoutés les principaux ingrédients rencontrés dans les formules de panification : chlorure de sodium, sucres, sels d'acides faibles. Les plus répandues utilisent le *fermentomètre de Burrows et Harrison*, qui



permet douze mesures simultanées sur des pâtons à base de 20 g de farine, le *Risographe*, matériel proche du fermentomètre qui permet l'enregistrement des volumes gazeux en fonction du temps sur douze réacteurs contenant 100 g de pâte, le *fermentographe SJA*, le *rhéofermentomètre de Chopin*. Ces deux derniers appareils, qui permettent de travailler sur des pâtons de 250 à 400 g, sont plus proches de la panification mais plus lourds à mettre en œuvre en routine.

- **Bonne aptitude à la conservation:**

Cela concerne le maintien de l'aspect et surtout du pouvoir fermentatif après un test de vieillissement accéléré à 21 ou 26 °C pour les levures pressées, à 35 ou 43 °C pour les levures sèches.

- **Qualité bactériologique :**

Dans la mesure où les étapes de production industrielle ne sont pas conduites de façon totalement stérile, la levure de boulangerie contient toujours une microflore étrangère, principalement composée de bactéries lactiques. Le plan de contrôle est établi de façon à vérifier l'absence de bactéries pathogènes. Le nettoyage des fermenteurs et de tous les équipements (pompes, vannes, tuyauteries) est un point important pour limiter la contamination, mais il ne faut pas négliger les étapes de récolte et d'emballage : la levure fournit un excellent milieu de culture pour les contaminants bactériens et tout dépôt de levure sur les équipements devient rapidement source d'infection.

- D'autres analyses sont réalisées à fréquences déterminées soit pour vérifier des paramètres relatifs à la **sécurité alimentaire**, tels que métaux lourds, résidus de pesticides, nitrates, nitrites, nitrosamines, soit pour déterminer des **composés cellulaires particuliers**, tels que lipides, tréhalose, vitamines





### 3. Fiche produit

#### 3.1 Présentation

---

- **La levure fraîche est vendue :**

- en vrac, sous forme de crème à  $18 \pm 2$  % de matières sèches ;

- en vrac, sous forme de levure émietée, emballée en sacs de papier multicouche, doublés de polyéthylène, de 25 kg, soudés afin d'en préserver l'étanchéité ;

- sous forme de blocs ou pains. Le conditionnement habituel est le carton de 10 kg, contenant quatre fardeaux de cinq paquets de 500 g chacun. Chaque fardeau est enveloppé de cellophane assurant une conservation optimale du produit. On trouve également des cubes de 20 à 40 g, destinés à la ménagère.

- **La levure sèche active à réhydrater, sous forme de granules ou de sphérules, est emballée sous air :**

- dans des boîtes de métal ou de plastique, de 125 ou 500 g ;

- dans des sacs ou fûts en plastique de 25 kg ;

- il existe également des sachets de 5 à 11 g pour la grande distribution.

- **La levure sèche instantanée est emballée :**

- sous vide ou sous gaz neutre, en sachets de 450 ou 500 g ;

- en caisses-poches de 10 kg ;

- il existe également des sachets de 10 ou 125 g pour la consommation domestique.

Les sachets sous vide d'air sont durs, ils garantissent la bonne stabilité du produit à température ambiante.

Pour la mise en œuvre de la levure sèche instantanée, il faut éviter tout contact direct avec l'eau froide, la glace ou les parois des pétrins réfrigérés.

- La L<sub>HIS</sub> est emballée sous air dans des poches de polyéthylène de 3,5 ou 14 kg. Il faut la stocker en froid négatif de préférence à -20 °C et éviter toute rupture de la chaîne de froid.
- **3.2 Composition type des produits commercialisés**

Une composition type des levures de boulangerie est donnée dans le tableau 3.



### 3.3 Valeur nutritionnelle

En prenant les coefficients en kcal/g de : 4 pour les protéines ; 4 pour les glucides (assimilables) ; 9 pour les lipides ; on obtient par calcul une valeur énergétique de 250 à 320 kcal/100 g de produit sec (soit 1 046 à 1 340 kJ). La levure est riche en quelques aminoacides essentiels : lysine (6 à 8 % /protéines), leucine (6 à 8 %), isoleucine (4 à 6 %), phénylalanine (4 à 6 %) et en vitamines du groupe B.

**Composition type des levures de boulangerie**

Composé [1]	Quantité	Composé	Quantité
Azote (g/100 g MS)		Vitamines (mg/100 g)	
Total	6 à 9	Thiamine (B1)	2 à 15
Phosphore en P 205 (g/100 g MS)		Riboflavine (B2)	2 à 8
Total	1,8 à 3	Pyridoxine (B6)	0,5 à 6

<b>Sucres (g/100 g MS)</b>		<b>Niacine (PP ou B3)</b>	10 à 60
Total	35 à 45	<b>Acide folique (B9)</b>	1 à 6
Dont : glucanes	8 à 12	<b>Acide pantothénique (B5)</b>	5 à 15
mannanes	8 à 12	<b>Minéraux (g/100 g MS)</b>	
tréhalose	10 à 18	<b>Fe</b>	0,005 à 0,100
glycogène	1 à 5	<b>Ca</b>	0,02 à 0,15
<b>Lipides (g/100 g MS)</b>		<b>Mg</b>	0,05 à 0,25
Total	4 à 7	<b>K</b>	0,8 à 2,5
Dont : phospholipides	1,5 à 3	<b>Métaux lourds (ppm/MS)</b>	
stérols	0,4 à 0,8	<b>Pb</b>	< 0,2
<b>Oligoéléments (ppm/MS)</b>		<b>Cd</b>	< 0,1
<b>Cu</b>	< 10	<b>As</b>	< 0,5
<b>Zn</b>	< 150	<b>Hg</b>	< 0,05
		<b>Se</b>	< 0,5

- [1] -MS : matière sèche.





## EXEMPLE 2 :

### LA TRANSFORMATION DES PRODUITS ALIMENTAIRES PAR LES ENZYMES

#### INTRODUCTION

Premier secteur industriel où l'homme a exploité la catalyse enzymatique, le domaine agroalimentaire offre de multiples et diverses raisons d'utiliser les enzymes. Elles sont essentiellement soit d'ordre **technologique** : accélération ou régularisation de phénomènes enzymatiques, amélioration des qualités technofonctionnelles du produit fabriqué, mise au point de produits nouveaux, valorisation de sous-produits, soit d'ordre **économique** : amélioration des conditions de travail ou de la productivité, régularisation des prix sur le marché.

Vue d'ensemble sur les applications industrielles :

Les utilisations des enzymes dans le secteur agroalimentaire représentent près de 65 % du chiffre d'affaires du marché des enzymes industrielles et seule une quarantaine d'entre elles est utilisée dans cette industrie.

Selon une étude d'un cabinet conseil (Frost & Sullivan), le revenu total pour les enzymes industrielles en Europe était estimé en 1995 à, au moins, 455 millions de dollars et devrait atteindre 906 millions de dollars en 2003. La diminution des prix est la principale donnée qui affecte les marchés. Celle-ci est imputable à l'augmentation de la production d'enzymes par ingénierie génétique et devrait se poursuivre d'ici la fin du millénaire.

Les enzymes les plus importantes en termes de revenus sont encore les protéases qui couvraient 34,4 % du marché en 1995 et, à l'horizon 2003, elles risquent d'être détrônées par les lipases (38,5 % du marché prévu) qui sont suivies par les glycosidases (30,5 %).

Les principaux acteurs économiques du développement industriel de ces catalyseurs biologiques dans le secteur agro-industriel sont, d'une part, les transformateurs de la production agricole, d'autre part, les concepteurs et réalisateurs

de préparations enzymatiques utilisées à l'échelle industrielle. Les gros consommateurs d'enzymes sont l'industrie des détergents, la fromagerie, l'amidonnerie et d'autres industries alimentaires d'origines végétales (secteurs des boissons, boulangerie-pâtisserie, confiserie...).

L'industrie des enzymes qui se caractérise par un chiffre d'affaires assez modeste, pèse peu sur l'évolution technologique des filières où l'on fait appel à elle. Par contre, comme les principales sources d'enzymes à usage industriel sont d'origine microbienne, elle a grandement contribué au développement des industries de fermentation. Etant donné, précisément, ces conditions de production, il reste à ces biocatalyseurs de nombreuses possibilités de développement : augmentation des rendements de production, modification de leurs activités, de leurs spécificités ou de leurs stabilités. Mais ce secteur industriel possède-t-il les moyens pour réaliser les travaux de recherche-développement propres à assurer aux enzymes le futur brillant qu'on s'accorde généralement à leur reconnaître ?

## 1. Maîtrise et amélioration des propriétés technofonctionnelles :

### 1.1 Maîtrise des qualités organoleptiques des aliments

Depuis longtemps les enzymes jouent un rôle important dans les caractéristiques des aliments. Elles agissent :

- soit en étant présentes naturellement dans les matières premières animales (lipase et protéase du lait et de la viande) ou végétales (protéase, oxydase et lipase dans les graines) ;
- soit en provenant de micro-organismes contaminants ou ajoutés sous forme de levain (amylase de levure, lipase et protéase de champignon ou bactérie intervenant dans l'affinage des fromages) ; ces micro-organismes produisent souvent plusieurs enzymes capables de catalyser une séquence de réactions (par exemple, c'est le cas des préparations de souches aromatisantes) ;
- soit sous forme de préparation purifiée ajoutée à l'aliment ; c'est le cas pour la chymosine, enzyme responsable de la coagulation du lait, pour les pectinases, enzymes permettant de réduire la viscosité des jus de fruits.



Beaucoup d'autres enzymes sont utilisées en technologie alimentaire pour modifier la texture (protéases, amylases...), l'arôme (lipase) ou la saveur (protéase).

Dans de nombreux cas, les modifications sensorielles engendrées par les enzymes sont indésirables soit par la simple présence des produits de la réaction, soit par une quantité excessive de ceux-ci si la réaction est trop prononcée. La maîtrise des propriétés sensorielles passe nécessairement par l'inhibition de certaines activités (traitement thermique de végétaux nécessaire pour détruire les oxydases responsables de brunissement et de défauts de goût) ou par des pratiques technologiques ne favorisant pas les activités enzymatiques indésirables.

### 1.2 Amélioration de propriétés technofonctionnelles

Les enzymes sont utilisées pour maîtriser et/ou pour améliorer les propriétés technofonctionnelles des aliments. Dans le tableau 1 sont résumés les effets principaux des activités enzymatiques sur les propriétés fonctionnelles des produits alimentaires

#### Effets des activités enzymatiques sur les propriétés fonctionnelles



Enzymes	Ingrédients	Effets sur les propriétés fonctionnelles
Hydrolyse des protéines		
Protéases– endocellulaires – exocellulaires microbiennes	Protéines de muscle (viande, poisson)	Attendrissement, solubilisation  Préparation aromatique
Protéases– digestives  – microbiennes  – végétales	Concentrés protéiques, lactosérum  Caséine native (micelles)  Caséinates	Solubilisation. Propriétés tensioactives accrues  Coagulation présure  Propriétés tensioactives accrues

	Globine du cruor	Solubilisation et décoloration
	Gluten	Solubilisation. Propriétés tensioactives
Protéase en milieu peu hydraté ou avec cosolvant	Caséine, ovalbumine	Réaction « plastéine » <sup>®</sup> gélification
Phosphatases (microbienne acide et alcaline)	Caséine native	Perte de structure compacte Accroissement de la protéolyse (coagulation)
Phosphatase végétale	Caséine Phosvitine	Baisse de sensibilité au Ca <sup>++</sup> et aux cations divalents
Hydrolyse des glycannes		
$\beta$ -Galactosidase	Lactose <sup>®</sup> glucose + galactose	Accroissement de la solubilité et du pouvoir sucrant
Invertase	Saccharose <sup>®</sup> glucose + fructose	Accroissement de la solubilité et du pouvoir sucrant
$\alpha$ et $\beta$ -Glucosidase	Glycoprotéines du blanc d'œuf	Diminution du pouvoir moussant
Amylases et enzymes débranchantes +	Amidons (maïs, pomme de terre) <sup>®</sup> maltodextrines, glucose	Baisse de viscosité. Solubilisation <sup>®</sup> sirops Pouvoir sucrant accru
$\alpha$ -Glucosidase	Concentrés protéiques de légumineuses (féverole)	Élimination de l'amidon Élimination d' $\alpha$ -galactosides
Pectinases	Pectines	Déméthylation <sup>®</sup>

Polyméthylestérases + Polygalacturonases microbiennes		accroissement de la dépendance de la gélification vis-à-vis du pH  Hydrolyse de liaisons osidiques ® baisse de viscosité
Hydrolyse des lipides		
Lipases microbiennes	Triacylglycérols en émulsion	Libération de mono et diacylglycérols tensioactifs  Libération d'acides gras volatils (arômes)
	Triacylglycérols cosolvant	Estérification ® changement de point de fusion  Synthèse de triacylglycérols
Oxydoréductases		
Glucose oxydase	Blanc d'œuf (élimination du glucose)	Poudre insensible aux réactions de Maillard
	Acide linoléique	Composés odorants (aldéhydes, lactones)
	Concentrés protéiques contaminés par lipides insaturés	Perte de solubilité
Enzymes de synthèse		
Phosphokinase	Caséines et protéines diverses	Gélification en présence de Ca <sup>++</sup>
Transglutaminase	Protéines polymérisats ®	Gélification

Cyclodextrineglucanotransférase	Maltodextrines cyclodextrines	®	Encapsulats de molécules hydrophobes
---------------------------------	----------------------------------	---	---

Effets des activités enzymatiques sur les propriétés fonctionnelles



### 1.2.1 Enzymes de dépolymérisation

La **protéolyse limitée** permet en général :

- une amélioration de la solubilité des protéines ;
- une diminution de la viscosité et de la fermeté de gels protéiques ;
- un accroissement des propriétés tensioactives des protéines de masse moléculaire élevée pour des degrés d'hydrolyse faibles mais, au contraire, une perte de la capacité stabilisante d'émulsion pour des degrés d'hydrolyse élevés.

L'**hydrolyse limitée** des glycanes (amidon, pectines...) a les effets suivants :

- baisse de rétention d'eau et de viscosité ;
- baisse de fermeté des gels.

Quant à la **lipolyse**, elle permet, grâce à la libération d'acides gras, d'améliorer les propriétés liantes et émulsifiantes des ingrédients lipidiques.

### 1.2.2 Enzymes de polymérisation

La transglutaminase (E.C.2.3.2.13) a été utilisée pour former des ponts covalents entre groupes amides de l'asparagine et la glutamine et groupe  $\epsilon$  lysyle :

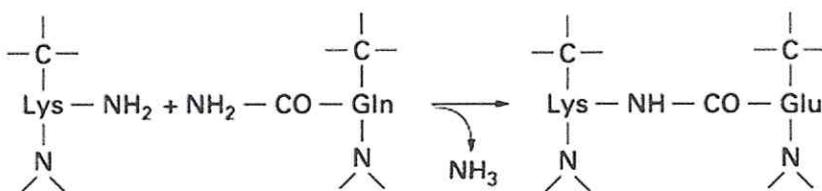


Figure 1 - image

Cette réaction, mise en œuvre dans les cellules vivantes et dans une étape terminale de la coagulation sanguine, peut conduire à d'énormes édifices polypeptidiques qui sont aptes à fixer beaucoup d'eau et à inclure des petites molécules. Selon le degré de réticulation, on obtient un accroissement de la viscosité et même une gélification de solutions. C'est ainsi que les protéines de soja, de blé, les caséines, la myosine sont utilisées pour former des films, des gels et stabiliser des émulsions.

### 1.2.3 Oxydoréductases

Ces enzymes ont fait l'objet de publications récentes. Elles jouent un rôle essentiel dans les industries de cuisson des céréales. La figure 2 représente précisément les principaux systèmes d'oxydoréduction intervenant en agroalimentaire. Leur action peut se résumer en quelques lignes.

Par la production de radicaux libres, l'oxydation des lipides insaturés ou d'autres substrats oxydables (polyphénols, par exemple) provoque généralement des réactions de polymérisation des protéines (formation de ponts disulfure ou de ponts carbonylamine) avec une perte de solubilité et d'une grande partie des propriétés tensioactives.

### 1.2.4 Enzymes de modification de chaînes latérales de macromolécules

Les pectinéméthylestérases (E.C.3.1.1.11) associées aux pectinases hydrolysent les fonctions esters des pectines dont elles modifient le degré de méthylation ; cette réaction aboutit en général à des degrés de méthylation compris entre 10 et 30 % et modifient ainsi le phénomène de gélification et les conditions optimales de pH et de composition minérale ( $\text{Ca}^{++}$ ) qui y sont reliées.



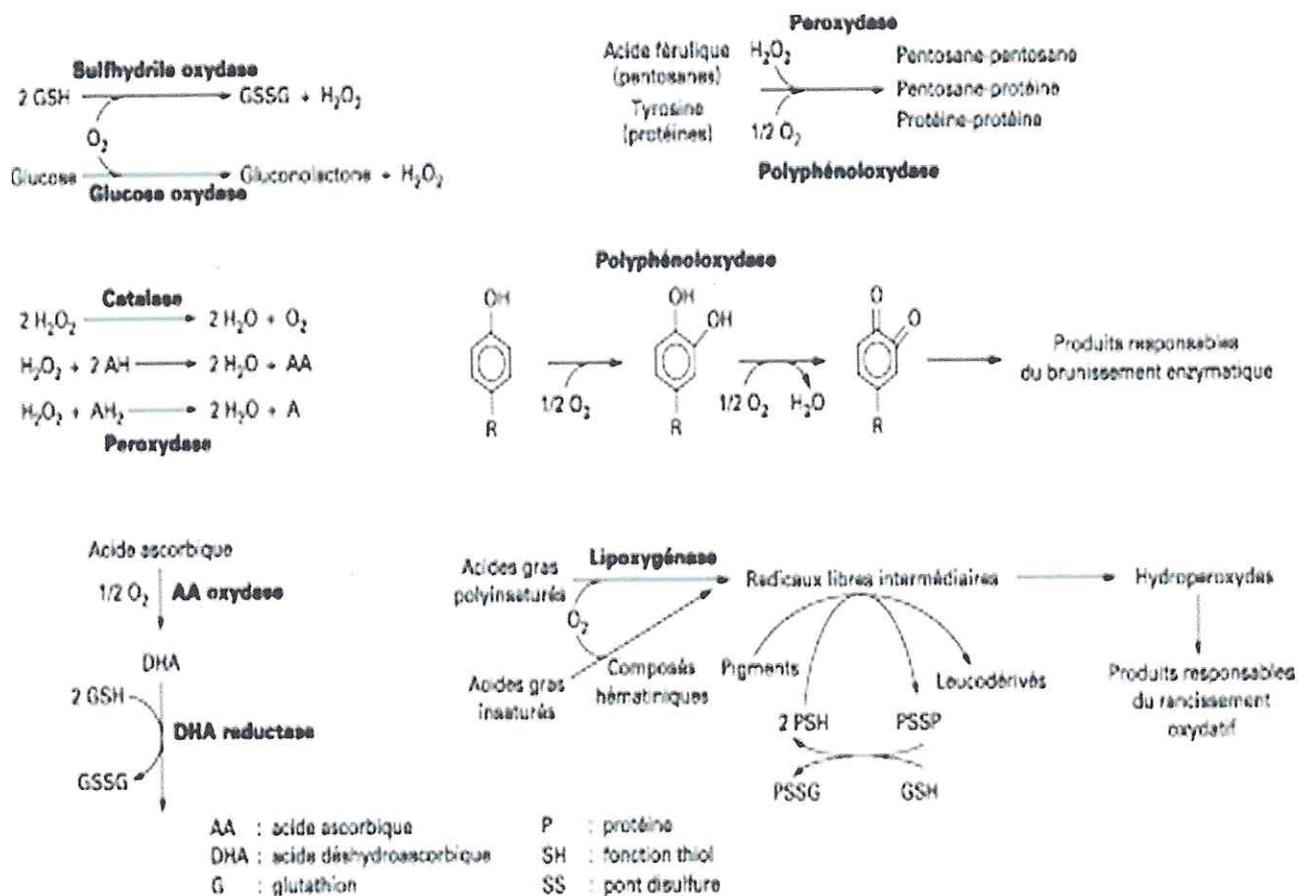


Figure 2 - Schéma des principaux systèmes d'oxydoréduction intervenant en agroalimentaire

La phosphorylation et la glycosylation enzymatiques sont applicables aux protéines alimentaires mais la spécificité des conditions réactionnelles est si stricte qu'elle limite leur rôle.

La déphosphorylation des caséines par des phosphatases acides ou alcalines augmente fortement la stabilité d'émulsion sans différence significative de viscosité. De plus, au cours de l'affinage des fromages, des phosphatases pourraient intervenir dans la déphosphorylation des caséines les rendant ainsi plus hydrolysables par les enzymes protéolytiques.

Les protéases telles que la papaïne peuvent avoir une activité acylante en introduisant des groupements thiol dans les protéines de soja ; il en résulte une modification des propriétés fonctionnelles.



### 1.3 Applications dans les filières agroalimentaires

Les enzymes endogènes et/ou exogènes peuvent contribuer à l'élaboration de la texture (coagulation du lait) ou à son évolution dans le processus de maturation (viande, poisson, fruits, légumes), d'affinage (fromage, saucissons secs...).

Les produits des réactions enzymatiques peuvent intervenir directement ou indirectement par apport de précurseurs sur la saveur et l'arôme des produits finis.



#### 1.3.1 Filière laitière

La première étape de la transformation du lait en fromage est la coagulation. Quand elle s'effectue par la voie enzymatique, elle résulte d'une déstabilisation de la fraction caséinique par hydrolyse spécifique de la caséine  $\kappa$  (liaison Phe<sup>105</sup>Met<sup>106</sup>) sous l'action de chymosine (E.C.3.4.23.4). Dans la présure extraite de la caillette de veau nourri au lait, cette enzyme se trouve en compagnie d'une autre protéase coagulante : la pepsine (E.C.3.4.23.1-2).

Pour pallier aux déséquilibres de l'offre et de la demande en matière de présure de veau, différentes solutions ont été proposées : à savoir, la mise en œuvre de protéases d'origine animale (pepsine bovine, pepsine porcine), d'origine végétale (*Cynara cardunculus*), d'origine microbienne (*Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) ou l'utilisation de chymosine recombinante. Cette protéase produite chez *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli* ou *Aspergillus niger* est autorisée en remplacement de la présure de veau dans certains pays.

La mise en œuvre de substituts de chymosine a des répercussions à la fois sur la texture, le rendement fromager et l'affinage. Leurs spécificités enzymatiques sont, en effet, différentes de celles de la chymosine ; de plus, leur rétention dans le caillé lors de l'égouttage est inférieure à celle de la chymosine. Par contre, la chymosine recombinante a des caractéristiques physico-chimiques et des propriétés coagulantes identiques à celle du veau.

Le choix de l'enzyme coagulante est une décision importante qui appartient au fromager. La sélectivité de la coupure de la caséine K assure en effet l'intégrité des protéines pendant cette transition délicate du lait liquide au coagulum. Une enzyme trop peu sélective risque de

continuer à hydrolyser les caséines pendant la phase de coagulation. On risque alors de perdre des fractions azotées dans le lactosérum.

Ce risque est majeur : il détermine le rendement fromager, c'est-à-dire le nombre de kilogrammes de fromages que l'on obtient pour 100 kilogrammes de lait mis en œuvre. C'est un critère principal de la réussite économique de la transformation fromagère. En perdant un pour cent de rendement, on remet en cause la rentabilité globale du processus de transformation du lait en fromage. Cela justifie le fait que l'on juge d'abord les enzymes coagulantes sur leur aptitude à préserver les rendements.

La texture, la saveur et l'arôme du fromage sont la résultante de modifications physico-chimiques des fractions protéiques et lipidiques consécutives à l'action des enzymes et des micro-organismes. Les protéases et les lipases impliquées dans le déroulement de l'affinage sont :

- présentes dans le lait : plasmine (E.C.3.4.21.7) ;
- apportées par les agents coagulants : chymosine, lipases ;
- secrétées ou libérées par les micro-organismes : levain, flore secondaire.



En ce qui concerne la chymosine, dans les fromages à pâte cuite, de type emmental, comté, beaufort, grana, parmesan..., l'enzyme coagulante n'intervient pas ou de façon marginale dans la protéolyse pendant l'affinage. Le chauffage du caillé en cuve autour de 53 °C inactive, en effet, en très grande partie cette enzyme. Pour les autres fromages (par exemple, type pâte pressée : gouda, cheddar...), la chymosine coupe la caséine  $\alpha_{s1}$  dans la première phase de la protéolyse pendant l'affinage. Cette activité protéolytique jouera un rôle majeur sur la formation de la texture et du goût du fromage prêt à la consommation. L'ensemble des enzymes susceptibles de jouer un rôle dans le déroulement de l'affinage est de mieux en mieux connu. De nombreuses études ont été réalisées pour tenter d'accélérer le déroulement de l'affinage, pour en réduire les coûts, notamment dans le cas de pâtes pressées.

Plusieurs voies sont envisagées:

- addition directe d'enzymes (protéases et lipases) dans le lait ou le caillé sous forme libre ou encapsulée (liposomes) ;
- lyse des micro-organismes du fromage (lysozyme-lysine phagique) pour libérer leur contenu enzymatique ;

- surexpression des activités protéolytiques-peptidasiques des micro-organismes (levains).

Les effets les plus marquants de cette addition d'enzymes sont obtenus avec les lipases. L'hydrolyse des acylglycérols conduit en effet à des acides gras qui ont une action importante sur les caractéristiques olfactives de certains fromages – et notamment les pâtes persillées (roquefort, bleu des Causses, bleu d'Auvergne...) – par suite de leur transformation en cétoacides, méthylcétones, lactones.

De même, l'addition de lipases à du lait de vache peut générer des saveurs proches de celles obtenues à partir de lait de chèvre et de brebis. Celles-ci sont utilisées en fabrication de fêta, manchego et romano à partir de lait de vache. La note de fromage bleu peut être également renforcée par certaines lipases. Dans le cas de certains fromages (ras-kopaniste), l'apport de lipases à du lait pasteurisé permet d'obtenir des saveurs proches de celles obtenues à partir du lait cru.

En résumé, l'importance des acides gras libres dans la saveur caractéristique de différents produits laitiers n'a cessé de croître. Certains acides gras, comme les acides caproïque ( $C_6:0$ ), caprylique ( $C_8:0$ ) et caprique ( $C_{10:0}$ ) donnent un goût piquant, poivré au fromage. Les lipases actives dans les fromages « italiens » (provolone, romano...) sont traditionnellement dérivées de caillettes des jeunes veaux ou d'agneaux.

### **1.3.2 Produits carnés**

Les enzymes protéolytiques musculaires jouent un rôle très important dans le processus d'attendrissage des viandes. Elles sont en effet responsables des altérations structurales et biochimiques des muscles conduisant à une fragilisation de ce tissu et, par voie de conséquence, à l'amélioration de sa tendreté, qualité la plus recherchée par le consommateur. La variabilité importante de cette qualité, qui a pour origine une grande diversité des matières premières, a conduit les industriels à s'intéresser aux technologies d'attendrissage « artificiel » des viandes et, plus particulièrement, à celles qui font appel à des enzymes exogènes comme la papaïne (E.C.3.4.22.2), la ficine (E.C.3.4.22.3) ou les collagénases (E.C.3.4.24.3). Selon le but recherché (attendrissage de muscles plus ou moins riches en collagène, amélioration de morceaux susceptibles d'être ensuite consommés en steak ou bouillis, uniformisation de la tendreté de viandes à griller...), l'une ou l'autre ou un mélange

adapté de ces protéases sera utilisé. En plus des mécanismes physico-chimiques de maturation des viandes, des réactions enzymatiques agissent de façon synergique. Trois systèmes protéolytiques ont été identifiés au niveau du tissu musculaire :

- les protéases neutres calcium dépendantes appelées calpaïnes (E.C.3.4.22.17) actives à pH neutre ;
- les protéases lysosomales désignées sous le nom de cathepsines (B,D, L et H) actives entre pH 4,0 et 6,0 ;
- le complexe multicatalytique appelé protéasome.

Une majorité des modifications qui ont lieu au niveau de la structure myofibrillaire est due à l'action synergique des calpaïnes et des cathepsines, chacun des deux types de protéases étant incapable d'engendrer séparément toutes ces variations.

La maturation des viandes est fortement dépendante de la température. Ainsi, entre 0 et 40 °C, le coefficient de température ou  $Q_{10}$  est très élevé et voisin de 2,5. Cela signifie que chaque fois que la température est abaissée de 10 °C, la vitesse d'attendrissage est divisée par 2,5. En fait, cette relation n'est pas aussi simple puisque non linéaire sur toute la plage de température.

L'attendrissage artificiel n'offre d'intérêt que pour la viande bovine car les viandes de porc, d'agneau ou de volaille sont généralement suffisamment tendres du fait de l'âge d'abattage de ces animaux qui est physiologiquement très bas.

L'attendrissage enzymatique de la viande grâce à l'action de protéases exogènes d'origines diverses est interdit en France au niveau industriel. Seule l'utilisation de sels attendrisseurs est autorisée et cette autorisation ne concerne que la papaïne, enzyme extraite de la papaye.

Le sel attendrisseur à base de papaïne est exclusivement réservé à la consommation domestique avec une proportion de papaïne comprise entre 20 et 30g/kg de sel de cuisine. Par contre, l'utilisation d'extraits de fruits (papaye, ananas) est autorisée. L'effet attendrisseur de ces extraits bruts est réel mais la maîtrise du degré d'attendrissage est délicate, voire impossible.

Compte tenu que la viande est généralement stockée à basse température, ces protéases ne seront pleinement actives que lors de la cuisson et leur efficacité sera bien entendu d'autant

plus grande que la montée en température sera lente. Pour la papaïne, l'optimum d'efficacité est atteint aux environs de 40-50 °C et son activité ne cessera qu'après dénaturation de l'enzyme elle-même par la chaleur, dénaturation qui intervient aux environs de 75-80 °C. Pour cette raison, les sels attendrisseurs sont ajoutés à la viande juste avant cuisson.

Bref, l'attendrissement enzymatique des viandes présente un intérêt sur le plan industriel et le seul facteur limitant au développement de cette technologie reste la législation. Cette dernière est d'ailleurs en cours de renégociation au niveau européen. L'état actuel de la réglementation fait que très peu de travaux de recherches sont actuellement réalisés dans ce domaine aussi bien en France qu'en Europe. Les principaux résultats ont été obtenus aux États-Unis où la réglementation est beaucoup plus souple.

### 1.3.3 Produits de la mer

Les produits de la mer (poissons, crustacés, mollusques et algues) ont été transformés depuis des siècles en utilisant les activités d'enzymes endogènes ou exogènes. Comme la chair de poisson constitue une source de protéines de haute valeur nutritive, les « faux-poissons », les farines brutes ainsi que les sous-produits constituent donc une réserve importante de protéines susceptibles d'être consommées après transformation par hydrolyse enzymatique. Dans les hydrolysats qui constituent aujourd'hui, au niveau commercial, le plus important procédé enzymatique de transformation du poisson, il convient de distinguer, d'une part, les produits traditionnels (autolysats ou hétérolysats) et, d'autre part, les hétérolysats industriels dont la finalité est de modifier les matières protéiques disponibles afin de leur apporter une valeur ajoutée nutritionnelle et économique.

Une revue récente a recensé l'abondante littérature qui décrit les techniques de production des différents produits traditionnels fermentés ou maturés. Toutes ces préparations obéissent au besoin impératif de contrôler la prolifération bactérienne en additionnant du sel et/ou du saccharose, en jouant sur le pH, la force ionique et le potentiel rédox ; il en résulte une faible vitesse de l'autolyse et une durée longue des procédés (généralement 6 mois).

Dans les procédés traditionnels, la majeure partie de la transformation est due aux enzymes endogènes, essentiellement les protéases digestives. Afin d'abaisser les coûts de production, l'utilisation d'enzymes végétales (bromélaïne, papaïne et ficine) a été préconisée pour la fabrication d'une sauce de poisson de faible goût pouvant être ajoutée à la sauce traditionnelle



(nam-pla). C'est la bromélaïne qui (concentration 0,8 % en masse ; cofacteur cystéine 0,025M, 33 ×C) donne les meilleurs résultats et permet d'obtenir en 21 jours un produit de qualité satisfaisante au goût amer peu prononcé.

Au cours du procédé d'anchoitage (préparation d'un anchois salé et mûré), la forte teneur en sel du milieu, les faibles valeurs de l'activité de l'eau (0,7-0,8) et du pH (autour de 5) inhibent la croissance de bactéries d'altération. L'hydrolyse des tissus est due quasi exclusivement aux protéases endogènes et les composés volatils caractéristiques sont des cétones et des alcools produits par l'activité de ces biocatalyseurs endogènes et des dérivés d'aldéhydes auto-oxydés.

Les pulpes, les farines et les concentrés protéiques de poisson sont couramment employés en nutrition animale ; ils sont peu solubles et possèdent de faibles propriétés nutritionnelles. La production d'hydrolysats protéiques de poisson permet de mieux valoriser ces produits en les destinant à l'alimentation humaine (arômes, compléments protéiques). L'hydrolyse est effectuée par ajout au produit à transformer de protéases exogènes, essentiellement d'origine microbienne et il faut éviter la formation de petits peptides amers.

L'ensilage de poisson peut être une alternative à la production de farine de poisson car la séparation de l'huile est effectuée après hydrolyse enzymatique et/ou chimique au lieu d'un procédé thermique et mécanique. Les ensilages sont préparés à partir de poissons broyés qui sont hydrolysés après acidification du milieu (pH égal à environ 4,5) et par inoculation de bactéries lactiques. La bonne qualité nutritionnelle et l'effet probiotique des ensilages permettraient leur utilisation pour l'élevage de porcs.

Les enzymes mises en jeu lors de la préparation des hydrolysats sont soit d'origine endogène, soit produites par les bactéries présentes dans le milieu, soit d'origine commerciale.

Certaines enzymes endogènes digestives présentent des propriétés originales (par exemple, une activité importante à 4 ×C). La publication de Haard contient un inventaire de ces caractéristiques particulières. De même, les bactéries présentes dans les sauces de poisson orientales croissent jusqu'à des concentrations de NaCl de 4M et présentent des activités enzymatiques de type lipase, gélatinase et caséinase. En général, les protéases issues des bactéries halophiles sont actives à des concentrations en NaCl élevées mais sont dénaturées à des concentrations en sel inférieures à 2 ou 3M.



Répétons que la cinétique d'autolyse des produits de la mer est un processus lent et l'addition de protéases exogènes permet de réduire le temps de maturation et donc les coûts de production. Dans cette filière comme dans les autres, la spécificité de substrat peut être considérée comme le premier critère de choix d'une enzyme, à côté d'autres facteurs comme le pH<sub>o</sub>, la thermostabilité, la présence d'activateurs et d'inhibiteurs, le prix et la disponibilité du catalyseur.

### Exemple

les protéases les plus couramment utilisées sont extraites à partir de sources essentiellement microbiennes (monozyme, pronase...), mais aussi animales (pepsine) et végétales (papaine, ficine, bromélaïne).

#### 1.3.4 Industries végétales

Étant donné la prépondérance et la diversité des macromolécules végétales dans le monde vivant, les possibilités d'applications des enzymes pour transformer et modeler les matières premières végétales sont innombrables. Mais il existe quelques limites dans la mise en œuvre des enzymes sur des substrats végétaux.

- L'utilisation de différentes enzymes permet d'améliorer la qualité des produits de **boulangerie** et de **pâtisserie**.
  - ✦ En premier lieu, l'apport d' $\alpha$ - et  $\beta$ -amylase à la farine de blé permet d'accroître un peu la teneur en oses libres fermentescibles (en moyenne de 1 à 2 % dans la plupart des farines). Cet apport permet une **meilleure fermentation** avec production de gaz et un bon gonflement de la pâte boulangère : on obtient des pains bien lacunaires, non collants. De plus, on peut déterminer la proportion de dextrans produite en réglant le rapport  $\alpha/\beta$  des amylases de la farine. On limite ainsi la réaction de Maillard (cf. article F 3 400 *Modifications biochimiques des constituants alimentaires* dans ce traité) à la cuisson et on obtient des croûtes ni trop épaisses, ni trop colorées.
  - ✦ La maîtrise du **rassissement** du pain peut être acquise également par un apport enzymatique. Rappelons que le rassissement est dû à la rétrogradation de l'amylose et de l'amylopectine de la forme soluble hydratée en des formes cristallines pauvres en eau : le pain devient dur et cassant et perd toute qualité.



Une solution classique consiste à ajouter des tensioactifs empêchant ce phénomène sur l'amylose ; l'emploi d'un monoacylglycérol (ou un analogue structural) qui occupe le centre de l'hélice de cette fraction de l'amidon retarde le rassissement. Mais un apport d' $\alpha$ -amylase raccourcit les chaînes d'amylopectine les ramenant de 19-21 unités à 12-15 unités glucose. Ce changement de taille diminue la tendance à la rétrogradation et surtout la taille de cristaux qui peuvent se former. La durée de vie du pain s'en trouve prolongée. Une publication récente résume les propriétés et les rôles en panification des amylases.

- L'hydrolyse partielle des constituants du gluten par un apport de protéases bactériennes avant la formation de la pâte coupe certaines liaisons endopeptidiques, ce qui **réduit l'élasticité** et **améliore l'extensibilité** de la pâte ; en conséquence, le pétrissage mécanique devient plus efficace car la déchirure de la pâte ne se produit plus. Cette technologie est utilisée dans l'industrie des *crackers*. De même, avec certaines exopeptidases fongiques, on accroît la libération d'acides aminés, modulant ainsi la réaction de Maillard, donc ses conséquences sur la flaveur du pain, la consistance et la couleur de la croûte.

- ✳ En **panification**, l'emploi des hémicellulases s'est largement répandu ces dernières années. Précisons tout d'abord que le terme « hémicellulase » est une appellation générique qui recouvre une grande diversité d'enzymes dégradant des polysaccharides de la paroi cellulaire des végétaux. En pratique, les hémicellulases jouant un rôle en panification ont essentiellement comme substrat les pentosanes des farines. Les farines de blé contiennent en effet entre 2 et 3 % de pentosanes constitués principalement de d-xylose et de l-arabinose. En conséquence, les enzymes efficaces sont principalement des endoxylanases (E.C.3.2.1.32). Ajoutées à une dose optimale aux farines (entre 50 et 100 ppm), ces biocatalyseurs convertissent en partie les pentosanes insolubles, à caractère défavorable pour la qualité boulangère, en pentosanes solubles qui sont eux bénéfiques. Cela se traduit par une amélioration des caractéristiques de pâte (extensibilité, élasticité, collant) et de pain (volume, aspect, mie) [25]
- 🌐 . En cas d'addition excessive, une trop forte proportion de pentosanes est dégradée ce qui rend les pâtes molles et collantes.



Les systèmes d'oxydoréduction intervenant en panification sont schématisés dans la figure 2. La lipoxygénase (E.C. 1.13.11.12), qui catalyse l'oxydation moléculaire des acides gras non estérifiés, joue un rôle majeur, quoique indirect, dans les modifications conformationnelles des micelles lipoprotéiques assurant l'agrégation des protéines entre elles pour former le gluten. L'activité de cette enzyme est faible dans la farine de blé, elle est considérablement plus élevée dans les farines de légumineuses. À noter également que cette enzyme ne figure pas sur la liste des enzymes autorisées en industrie alimentaire.

La farine contient également une acide ascorbique oxydase (E.C. 1.10.3.3.). Elle catalyse l'oxydation par l'oxygène moléculaire de l'acide l-ascorbique – additif couramment utilisé en panification – en acide l-déshydroascorbique. Ce dernier oxyde le glutathion en présence de glutathion déshydrogénase (E.C. 1.8.5.1). Le glutathion oxydé devient alors indisponible pour participer aux réactions d'échange de ponts disulfures avec les protéines ; il en résulte un raffermissement de la pâte.

Parmi les autres oxydoréductases présentes dans la pâte, il convient de mentionner :

- les polyphénoloxydases (E.C. 1.10.3.1, 1.10.3.2 et 1.14.18.1) qui oxydent les composés phénoliques pour former des quinones, lesquelles, après une série de réactions, conduisent à des polymères colorés en brun ;
- la glucose oxydase (E.C. 1.1.3.4.) qui catalyse l'oxydation du glucose en d-gluconolactone et eau oxygénée. Cette enzyme n'existe pas dans la farine mais l'utilisation de préparations fongiques de glucose oxydase a été préconisée dans le but de raffermir les pâtes ;
- la sulfhydryle oxydase (E.C. 1.8.3.2) qui provoque l'oxydation du glutathion réduit en glutathion oxydé tout en produisant de l'eau oxygénée. En outre, des oxydoréductases comme la catalase (E.C. 1.11.1.6) et la peroxydase (E.C. 1.11.1.7) décomposent ce peroxyde d'hydrogène.

- Dans la fabrication de la **bière**, les enzymes utilisées ont pour finalité :
  - ✳ de suppléer ou de remplacer les enzymes des matières premières (malt, orge cru, grits de maïs, brisure de riz, etc.) en ajoutant généralement un mélange d' $\alpha$ -amylase ou amyloglucosidase +  $\beta$ -glucanase + protéase neutre ;
  - ✳ d'améliorer et de régulariser le procédé et la qualité de la bière ; par exemple, l'addition de préparations commerciales contenant des activités  $\beta$ -glucanasiques (extraites de *Penicillium emersonii* car encore actives à 80 °C), seules ou associées à des activités pentosanases, xylanases, arabinases secondaires, permet d'améliorer la filtration de la maïsche et de la bière ;
  - ✳ de produire de nouvelles bières ; ainsi l'addition de glucoamylase permet d'obtenir des bières contenant moins d'oligosaccharides résiduels.
  
- L'irruption des enzymes en technologie des **jus** de fruits et de légumes a profondément modifié les techniques de fabrication dans ce secteur industriel. Et pourtant, des enzymes exogènes sont utilisées dans l'industrie des fruits et légumes depuis plus d'un demi-siècle.
  - ✳ Les enzymes de **macération** sont caractérisées par leur forte activité polygalacturonase (E.C.3.2.1.15.) et l'absence presque totale de pectine méthylestérase (E.C.3.1.1.11). L'action de ces biocatalyseurs se limite à une hydrolyse partielle des pectines de la lamelle moyenne, suffisante pour dissocier les cellules tout en les conservant intactes en suspension dans un jus rendu visqueux par la présence des pectines solubilisées. Du reste, la charge des pectines solubilisées et dégradées est importante pour la stabilité et la qualité des produits obtenus.

Malgré les nombreuses études effectuées sur la macération enzymatique, elle est encore, pour l'heure, peu pratiquée au stade industriel. En effet, comme la vitesse de la macération décroît au cours du temps, il est presque impossible d'obtenir une macération complète du tissu dans un temps et avec une concentration en enzyme compatibles avec les contraintes de la production industrielle.

- ✳ Bien évidemment, dans le cas de la **liquéfaction** de tissus végétaux, l'hydrolyse de la paroi cellulaire doit être plus importante que lors de la

macération. Il s'agit non seulement de désorganiser les tissus, mais également de favoriser l'écoulement du cytoplasme et du contenu vacuolaire.

### Exemple

Pour certains fruits mous (fraises, framboises...) une destruction partielle de la pectine facilite le pressurage et augmente la teneur et la quantité de jus ainsi que la présence de pigments anthocyaniques.

Par conséquent, la liquéfaction la plus performante est obtenue par l'action simultanée des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques. Cependant, le rapport entre les différentes activités et la présence d'hémicellulases contaminantes influent sur le rendement de la liquéfaction et sur la composition en polyosides du jus. De plus, l'oxydation des composés phénoliques entraîne la formation de complexes entre pigments et polysaccharides limitant leur dégradabilité. Ce problème a été résolu soit par addition de polyvinylpyrrolidone insoluble, soit par oxydation-aération (condensation en pigments noirs insolubles).



### Exemple

Dans le cas du jus de pomme, la baisse de viscosité est obtenue par une activité combinée de la pectine estérase et de l'endopolygalacturonase sur des pectines hautement estérifiées en solution ;

la clarification du jus de pomme est possible avec la pectine lyase (E.C.4.2.2.10), mais cette enzyme est moins efficace dans la clarification du jus de raisin qui contient seulement entre 45 et 60 % de pectines estérifiées. Il faut une concentration préalable (à 45-50 °C) pour arriver à une clarification et dépectinisation complètes.

Bref, l'enzymage avant pressurage entraîne une baisse de viscosité qui améliore la filtrabilité des jus. Il permet de réduire le temps de filtration lors de la clarification des moûts, ainsi que le temps et l'énergie nécessaires à l'évaporation des jus limpides pour la fabrication des concentrés.

- Les enzymes pectinolytiques sont également utilisées pour valoriser des coproduits dans l'**industrie des fruits**. Ainsi, dans le traitement du citron, les pulpes sont lavées à contre-courant et les pectinases sont ajoutées pour obtenir le maximum de « *solides solubles* » et la viscosité la plus faible de façon à pouvoir concentrer le produit final. C'est la même démarche qui est utilisée pour produire des quantités importantes de substances capables de donner un trouble dans les boissons produites à partir de différents agrumes.

Ainsi, dans la fabrication des nectars, qui sont des boissons pulpeuses dans lesquelles le jus visqueux maintient une quantité importante de matières en suspension, la meilleure stabilité a été obtenue dans le cas de fruits tropicaux avec la préparation commerciale la plus riche en pectine méthylestérase, endopolygalacturonase et pectine lyase.

En résumé, les **préparations enzymatiques commerciales** contenant plus ou moins les activités évoquées ci-dessus sont utilisées pour le **traitement de la pulpe ou du jus**. Elles trouvent leurs applications dans des productions telles que boissons sucrées non alcoolisées à base de fruits ou de légumes, vinification ou cidrerie. Mais l'optimisation de la liquéfaction de fruits ou de légumes à l'aide de préparations enzymatiques commerciales reste empirique pour une large part. De nombreuses publications et fiches techniques rapportent les meilleures conditions pour la liquéfaction de divers végétaux. En outre, la généralisation de l'utilisation d'enzymes exogènes comme éléments de procédés ne doit pas occulter la présence d'enzymes endogènes.



## 2. Biodisponibilité et acceptabilité des aliments :

L'acceptabilité de certains produits alimentaires peut être limitée par le sous-équipement enzymatique de certains individus (lactase) ou par la présence de facteurs antinutritionnels (antiprotéases) ou encore par l'allergénicité de certains constituants (protéines du lait, de l'œuf...). Un traitement enzymatique peut améliorer la valeur biologique de ces produits.

### 2.1 Hydrolyse du lactose

Le lait et les dérivés laitiers à lactose hydrolysé présentent un intérêt nutritionnel pour les nourrissons alactasiques ou déficients en lactose, pour les vieillards souffrant de troubles digestifs résultant d'une diminution de la sécrétion de lactase ainsi que pour les enfants de certaines ethnies chez qui le caractère adaptatif de la sécrétion de lactase n'existe pas.

L'hydrolyse du lactose présente des avantages technologiques et économiques

- amélioration du pouvoir sucrant ;
- aptitude accrue au brunissement non enzymatique ;
- solubilité des produits d'hydrolyse beaucoup plus élevée que celle du lactose en évitant les phénomènes de cristallisation observés en milieu concentré (on peut envisager de concentrer les lactosérums jusqu'à 70 à 80 % de matière sèche, ce qui permet une bonne conservation).

C'est donc une des voies de valorisation du lactosérum. L'hydrolyse du lactose offre à l'industrie laitière de nouveaux créneaux de commercialisation, notamment dans le secteur des industries de seconde transformation (chocolaterie, biscuiterie, confiserie...).

Toutes les  $\beta$ -galactosidases (E.C.3.2.1.23) utilisées dans le secteur industriel sont d'origine microbienne. Certaines enzymes ont un pH optimal d'activité voisin de la neutralité (*Kluyveromyces lactis* ou *K.fragilis*), d'autres présentent une activité maximale vers un pH de 4,5 (*Aspergillus niger* ou *A.oryzae*). Ces préparations doivent être exemptes de protéases contaminantes, car ces activités pourraient être responsables de l'apparition d'une certaine amertume dans le produit laitier final.

L'hydrolyse peut être réalisée en bain (batch) à 37 °C ou à basse température, l'enzyme étant ensuite inactivée par traitement thermique du lait ou du lactosérum. Pour obtenir des pourcentages élevés de conversion du lactose (jusqu'à 80 %), des temps de contact de plusieurs heures sont exigés, et le pH ne doit jamais descendre à des valeurs inférieures à pH 5,5 avec les lactases de *Kluyveromyces*.

Différents procédés continus ont été développés, mettant en œuvre soit des réacteurs à membrane, soit des réacteurs à enzymes immobilisées, ces derniers fonctionnant ou en réacteur agité, ou en réacteur piston.

## 2.2 Digestibilité des lipides



Les lipases font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques (E.C.3.1.1.3.). D'origine (bactérienne, fongique, pancréatique, hépatique, gastrique) et de propriétés diverses, elles peuvent catalyser l'hydrolyse d'un grand nombre d'esters carboxyliques, mais montrent une forte spécificité envers les substrats glycériques. Les triacylgcérols naturels étant insolubles dans l'eau, les lipases hydrolysent dans les conditions physiologiques les liaisons esters carboxyliques à l'interface de la phase aqueuse dans laquelle l'enzyme est en général initialement soluble.

La spécificité des lipases par rapport aux triacylgcérols peut être subdivisée en trois catégories :

- la typosélectivité par rapport à un type d'acide gras donné ;
- la régiosélectivité : le pouvoir d'hydrolyser préférentiellement les liaisons esters carboxyliques en position externes sn-1 et sn-3 (esters primaires) vis-à-vis de la position interne sn-2 (esters secondaires) ;
- la stéréosélectivité : la capacité de discrimination entre deux énantiomères dans le cas d'un substrat racémique et la capacité de discrimination entre deux groupements stéréohétérotopiques mais homomorphiques (énantiotopiques) dans le cas des acylglycérols prochiraux (position sn-1 contre sn-3).

**Note :** sn : abréviation internationale de l'expression (en anglais) numérotation stéréospécifique.

### **2.3 Réduction de l'allergénicité des protéines et préparation d'hydrolysats**

L'allergénicité des protéines peut être réduite par hydrolyse enzymatique. L'inconvénient de cette protéolyse réside – surtout dans le cas de protéines animales – dans la formation possible de peptides amers. Par exemple, l'hydrolyse de la  $\beta$ -lactoglobuline est effectuée lors de la préparation de certains produits laitiers à usage diététique ou thérapeutique (maternisation des laits, alimentations entérales).

À noter, d'une part, que la présence d'exopeptidases dans les préparations enzymatiques peut réduire l'amertume et, d'autre part, que ces hydrolysats protéiques doivent être thermiquement stables car il est indispensable d'inactiver les enzymes mises en œuvre.

Toujours pour la même finalité **diététique** et **médicale**, des hydrolyses de protéines sont réalisées pour libérer des peptides biologiquement actifs.



### **Exemple**

La préparation à l'échelle industrielle de phosphopeptides transporteurs de minéraux par hydrolyse pancréatique d'une solution de caséinate ajustée à pH 8,0 en réacteur enzymatique à membrane.

Mais les hydrolysats de protéines peuvent également être utilisés à **usage alimentaire** (fabrication de soupes, de sauces...). Ils peuvent servir d'exhausteurs de goût en les additionnant, par exemple, à des produits texturés, afin de les rendre plus savoureux : surimi ou faux crabe, steak structuré... Les enzymes les plus fréquemment employées sont la papaïne, les protéases alcalines de *Bacillus subtilis*.

Dans la même optique de finalité, à savoir l'amélioration de l'acceptabilité des aliments, il convient de mentionner l'utilisation de la phytase végétale (E.C.3.1.3.26) obtenue à partir d'*Aspergillus niger* après recombinaison génétique. Cette enzyme libère les phosphates à partir du phytate des farines céréaliers ; cela permet d'améliorer la qualité nutritionnelle des aliments pour animaux (environ la moitié des aliments destinés aux élevages porcins sont désormais soumis à ce traitement). Dans le futur, la technologie peut évoluer vers la supplémentation des rations par des graines de colza transgénique dans lequel on a transféré et fait exprimer le gène d'une phytase.

### **3. Maîtrise de la qualité hygiénique :**

#### **3.1 Action bactériostatique et bactéricide**

#### **3.2 Destruction de constituants bactériostatiques**

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  $\beta$ -

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.

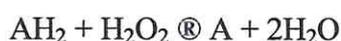


### 3.1 Action bactériostatique et bactéricide

Le lysozyme ou muraminidase présent dans de nombreuses sécrétions (salive, larmes, lait, œuf...) coupe des liaisons glucosidiques entre l'acide *N*-acétylmuramique et la *N*-acétylglucosamine; la sensibilité des bactéries au lysozyme dépend de l'accessibilité du substrat. Les gram<sup>+</sup> sont en général plus sensibles. Cette enzyme est parfois ajoutée au lait de fromagerie destiné à la fabrication de pâtes pressées pour limiter la fermentation butyrique due au développement de *C. tyrobutyricum*. Ce biocatalyseur peut également être ajouté à tout un ensemble de produits alimentaires (sauces, poissons et viandes restructurées). Cet antibactérien naturel, qui présente une bonne stabilité thermique aux pH acides et dont l'activité est préservée en présence de sels et de glucides, est très largement utilisé dans de nombreux pays (USA, Japon...)

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 monocystogenes* à une température de 5 °C.

La peroxydase, métalloenzyme avec un noyau hème, catalyse en présence d'un accepteur (A) la réaction :



C'est donc une enzyme d'oxydation indirecte; elle libère l'oxygène atomique de peroxydes comme l'eau oxygénée et cet oxygène est accepté par une substance présente dans le milieu.

La peroxydase, par elle-même, n'a pas d'effet bactériostatique ou bactéricide. Elle catalyse l'oxydation du thiocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) par le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Les produits obtenus en fin de réaction (sulfate, cyanate...) sont sans effet, mais les intermédiaires de réaction ont une action puissante.

L'ion hypothiocyanate ( $\text{OSCN}^-$ ) est le principe actif selon le mécanisme suivant.

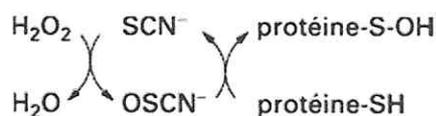


Figure 3 - image



L'effet antibactérien de la peroxydase est donc réversible en présence d'agents réducteurs comme la cystéine et on a observé l'oxydation de groupements sulfhydryles en acides sulféniques correspondants ( $-\text{S-OH}$ ).

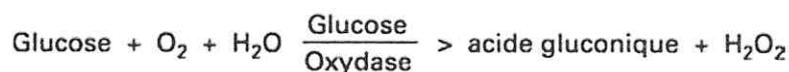
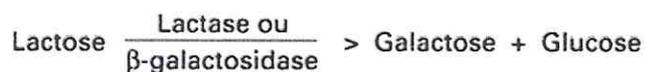
Dans le lait se trouve une lactoperoxydase (LP) en quantités appréciables et le système LP/SCN/ $\text{H}_2\text{O}_2$  peut être optimisé.

Comme la concentration en enzyme n'est pas un facteur limitant du système et que le taux de thiocyanate varie de 0,02 à 0,25 mM selon l'alimentation de l'animal, seule l'eau oxygénée fait défaut ; la réaction ne peut donc se produire que s'il y a un apport extérieur.

L'activation idéale du système peut être obtenue en ajustant le taux de  $\text{SCN}^-$  entre 0,20-0,25 mM (12-15 ppm) et en générant une quantité équimoléculaire de peroxyde d'hydrogène par un système enzymatique.

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 :



À la fin du traitement, l'addition de catalase permet de décomposer le peroxyde d'hydrogène en excès.

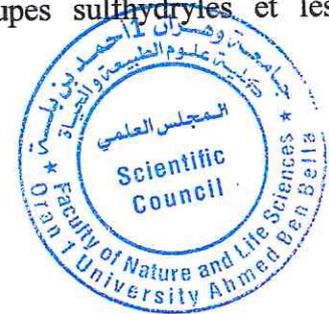
Ce traitement peut également être appliqué à l'aide d'un réacteur enzymatique où se trouvent coimmobilisées la  $\beta$ -galactosidase et la glucose oxydase.

L'hypothiocyanate a un effet chaotropique sur la membrane des bactéries, puisqu'après quelques minutes de contact le potassium et les acides aminés sont libérés dans le milieu. Les composants cellulaires les plus souvent oxydés sont les groupes sulfhydryles et les nicotinamides nucléotides (NADH, NADPH).

**Note :**

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

NADPH : phosphate de nicotinamide adénine dinucléotide réduit.



Le système peroxydase a un effet bactéricide sur de nombreux germes pathogènes et un effet bactériostatique sur certains gram<sup>+</sup> tels les streptocoques lactiques et les lactobacilles thermophiles. Cette différence de sensibilité semble dépendante de la structure et de la démontre l'importance de ce système vis-à-vis de la régulation du système écologique de la flore orale et intestinale.

Un des intérêts industriels de ce système antibactérien réside dans la conservation du lait cru, du poisson frais. Ainsi, ce traitement combiné à un stockage à basse température permet, par exemple, d'éviter sur une longue période la prolifération de la flore psychotrophe.

Un système peroxydase actif existe dans différents « sites ». Les peroxydases salivaire, lacrymale, utérine présentent, en effet, de fortes similitudes sur le plan biochimique et immunologique avec la lactoperoxydase.

Aussi, en plus de la stabilisation du lait et de divers produits alimentaires, d'autres applications du système peroxydase sont développées :

- protection des jeunes animaux comme anti-infectieux intestinal, antidiarrhéique ;
- agent de lutte contre la carie et la plaque dentaire ;
- protection des muqueuses (dermatologie).

### 3.2 Destruction de constituants bactériostatiques

La glucose oxydase, par oxydation du glucose en acide gluco-nique (cf. équation de réaction précédente) génère dans le milieu du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui a des propriétés bactéricides ; cette enzyme, utilisée dans le blanc d'œuf pour réduire la teneur en glucose, permet simultanément d'améliorer la qualité hygiénique.

La glucose oxydase a également été proposée comme antioxydant pour les produits riches en matière grasse, comme le beurre, la poudre de lait ou la mayonnaise. Elle ne semble pas beaucoup utilisée dans ce domaine, vraisemblablement par la concurrence des antioxydants chimiques autorisés, nettement moins chers, ou par l'utilisation de gaz inerte dans les poudres de lait.

De même, la présence de pénicilline dans le lait consécutive à des traitements des animaux pose parfois des difficultés technologiques même à faible teneur. Il a été proposé de détruire cet antibiotique par de la  $\beta$ -lactamase.

#### 4. Utilisation des enzymes dans l'industrie des PAI :

À partir de matières premières agricoles et en mettant en œuvre des procédés qui s'appuient sur une bonne connaissance des caractéristiques physico-chimiques des constituants, on peut isoler des fractions aux qualités nutritionnelles et fonctionnelles bien définies et spécifiques de leur utilisation.

L'industrie alimentaire peut ainsi élaborer des agents de texture, des émulsifiants, des arômes, des colorants, des édulcorants..., **produits alimentaires intermédiaires (PAI)** qui ne sont autres que les « *pièces détachées* » que les industries agroalimentaires et la restauration collective utilisent de plus en plus dans la formation des aliments par assemblage d'ingrédients.

Dans la confection des ingrédients (extraction, fractionnement ou synthèse, modifications souhaitées des propriétés technofonctionnelles), les enzymes – en particulier les hydrolases – jouent un rôle essentiel.

Les enzymes sont largement utilisées dans les techniques d'extraction des PAI à partir de matières premières et dans des réactions de synthèse d'ingrédients.



## 4.1 Utilisation dans les procédés d'extraction

### 4.1.1 Procédés de solubilisation

Il s'agit de méthodes assez coûteuses pour solubiliser par des protéases des protéines très insolubles (poisson, viande) ou insérées dans des complexes insolubles (protéines végétales).

En réalité, cette technique n'est valable que si la protéolyse est limitée et si on inactive totalement les protéases après action ; de plus, de petits peptides au goût amer peuvent apparaître. Des hydrolysats très aromatiques sont ainsi obtenus à partir de poisson (nuoc-mam), de protéines myofibrillaires de diverses espèces (poulet, bœuf...) ou de protéines de soja.

De même, l'action de différentes enzymes (protéases, lipases) sur des concentrés protéiques et lipidiques d'origine laitière conduit à la préparation de bases fromagères utilisées comme ingrédients alimentaires destinés à la préparation de sauces, salades, *snacks*, potages... Ces EMC (*Enzyme Modified Cheese*) apportent des précurseurs d'arômes voir des arômes. La teneur en acides gras volatils peut être dix fois supérieure à celle d'un fromage jeune.

Cette technique de solubilisation peut être utilisée pour éliminer des constituants indésirables par leur goût ou leur toxicité ; dans les extraits protéiques de légumineuses, on est parfois amené à éliminer ainsi les  $\alpha$ -galactosides par des  $\alpha$ -glycosidases.

Notons également le procédé de décoloration du cruor du sang bovin qui utilise des protéases pour rendre extractible l'hème de l'hémoglobine ; dans ce cas on obtient des peptides de petite taille et non pas la globine proprement dite.

### 4.1.2 Procédés de précipitation

La coagulation du lait par la chymosine de la présure est une étape d'extraction de caséine sous forme de caillé de fromagerie avec élimination dans la phase liquide qui exsude des

autres protéines. La coagulation du fibrinogène du sang par la thrombine est également une séparation spontanée des hématies du sérum liquide par formation d'un réseau de fibrine.

La précipitation des protéines par des protéases coagulantes (végétale ou animale) est possible également pour extraire les protéines de soja.



## 4.2 Utilisation pour la production de molécules sapides ou odorantes

### 4.2.1 Utilisation des hydrolases

Des hydrolases d'origines diverses permettent de dépolymériser des macromolécules ; parmi les exemples les plus connus citons la production de maltodextrines et de glucose par l'action d'amylases et d' $\alpha$ -glucosidases sur l'amidon de maïs, la production de peptides et d'acides aminés amers, sucrés ou acides, par action de protéases sur les caséines, la production d'acides gras volatils par l'action de lipases sur la matière grasse laitière.

### 4.2.2 Utilisation des oxydases

Les lipoxygénases participent par oxydation d'acides gras insaturés (acide linoléique principalement) à l'élaboration de composés carbonylés très odorants (voir § 1.3.4). L'utilisation de précurseurs très différents permet d'obtenir des composés de nature chimique variée tels que les lactones avec des rendements supérieurs.

### 4.2.3 Enzymes catalysant des synthèses

Les protéases et lipases en milieu peu hydraté en milieu « cosolvant » catalysent des synthèses de « pseudo » peptides ou protéines (plastéines) et surtout de nouveaux triacylglycérols ou phospholipides.

Certaines transférases comme les cyclodextrines glucanotransférases ont la propriété de cycliser les chaînes linéaires de maltodextrines en  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -cyclodextrines à respectivement 6, 7 et 8 unités glucose reliées par des liaisons  $\alpha$  1 @ 4.

### 4.2.4 Enzymes de réaction d'isomérisation

La réaction la plus utilisée comporte l'isomérisation du glucose en fructose par la glucose isomérase avec obtention de sirops à pouvoir sucrant élevé.

#### 4.2.5 Conclusion

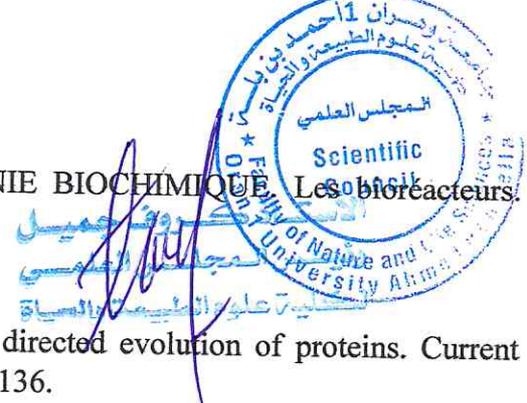
Il apparaît que les procédés enzymatiques ouvrent de nouvelles voies pour la production de PAI aux propriétés fonctionnelles bien maîtrisées. Si certaines préparations enzymatiques sont déjà très largement utilisées à l'échelle industrielle (protéases, lipases, amylases, pectinases) pour modifier des propriétés de texture des ingrédients, d'autres restent encore limitées en raison du coût de purification des enzymes et en raison également de la présence de techniques physiques ou chimiques concurrentes plus adaptées. Rappelons enfin que les méthodes enzymatiques conservent aux produits obtenus toute leur valeur nutritionnelle.





## Références bibliographiques

- Balchin, D., M. Hayer-Hartl, and F.U. Hartl. 2016. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*. 353(6294): p. aac4354.
- Beaumesnil. 2012. <https://sms-bse-bgb.ac-normandie.fr/Electrophorese-SDS-PAGE-principe-et-exemple-d-application-en-STL>.
- Biotechnologie. <https://fr.slideshare.net/slideshow/biotec06final-1ppt/262899661>.
- Botham, K.M. 2017. *Biochimie de Harper: De Boeck Supérieur*.
- Chromatographie échangeuse d'ions. [https://blog\\_fr.interchim.com/analyse-purification-proteines-chromatographie-iex/](https://blog_fr.interchim.com/analyse-purification-proteines-chromatographie-iex/).
- Electrophorèse SDS PAGE. <https://sms-bse-bgb.ac-normandie.fr/Electrophorese-SDS-PAGE-principe-et-exemple-d-application-en-STL>.
- Enzymologie et génie enzymatique. <https://telum.umc.edu.dz/enrol/index.php?id=266>.
- Fermenteurs industriels. <https://www.adbiotec.com/produits/bioreactors-fermenters/>.
- Fermenteurs. <https://lavallab.com/fr/products/fermenteurs-bioreacteurs/fermenteurs-bioreacteurs-industriels/>.
- Garnier A. 2010. *Les bioréacteurs*. GCH-2103A. Université LAVAL.
- Génie enzymatique. Association française de normalisation. 1986. <https://vitrinelinguistique.oqlf.gouv.qc.ca/fiche-gdt/fiche/3290014/genie-enzymatique>
- Guilloton, M. and B. Quintard, *Biochimie 2003*: Dunod.
- Hingorani, K.S. and L.M. Gierasch. 2014. Comparing protein folding in vitro and in vivo: foldability meets the fitness challenge. *Curr Opin Struct Biol*. 24: p. 81-90.

- 
- Jolicoeur M. 2018. Cours GCH8650. GÉNIE BIOCHIMIQUE. Les bioreacteurs. Ecole polytechnique Montréal.
  - Lane, M.D. and B. Seelig, Advances in the directed evolution of proteins. Current opinion in chemical biology, 2014. 22: p. 129-136.
  - Les biotechnologies bleues : Du génie génétique au génie enzymatique ou fermentaire. [https://www.racontemoilaterre.com/livre/9781784059743-les-biotechnologies-bleues-du-genie-genetique-au-genie-enzymatique-ou-fermentaire-joel-fleurence/?provenance=wishlist\\_list](https://www.racontemoilaterre.com/livre/9781784059743-les-biotechnologies-bleues-du-genie-genetique-au-genie-enzymatique-ou-fermentaire-joel-fleurence/?provenance=wishlist_list).
  - Les enzymes immobilisées. <https://fr.scribd.com/document/536284143/enzymes-immobilises>.
  - Madigan M., J. Martinko. 2007. Biologie des microorganismes. 11e Ed. Pearson Education- Paris-France. 1047p.
  - Pierre Douzou, Gilbert Durand, Gérard Siclet. 2001. Le génie enzymatique. Dans Les biotechnologies, pages 77 à 88.
  - Procédés de séparation. <https://www.tetrapak.com/fr-fr/solutions/integrated-solutions-equipment/processing-equipment/membrane-filtration/filtration-processes>.
  - Purification des protéines. [https://blog\\_fr.interchim.com/analyse-purification-proteines-chromatographie-iex/](https://blog_fr.interchim.com/analyse-purification-proteines-chromatographie-iex/).
  - Résines en échange d'ions. <https://uae.fr/glossaire/resines/>.
  - Sirisha, V.L. and A. Jain, Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. Adv Food Nutr Res, 2016. 79: p. 179-211.
  - Sonication. <https://www.fishersci.fr/shop/products/sonicator-with-probe/12893543>.
  - Technique de l'ingénieur. Production de la levure de panification par voie biotechnologique. <https://www.techniques-ingenieur.fr/glossaire/panification>.
  - Transformation des produits alimentaires par les enzymes. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/biotech-pour-les-systemes-agricoles-et-alimentaires-42700210/transformation-des-produits-alimentaires-par-les-enzymes-f3700/>.
  - Voet, D., J.G. Voet, and L. Domenjoud, Biochimie 2016: De Boeck.