

Les enzymes : Applications industrielles et analytiques

Simon J. Charnock

PhD (Doctor of Philosophy).

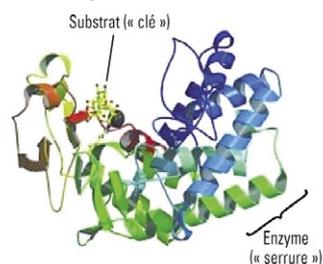
Barry V. McCleary

PhD, DScAgr (Doctor of Science in Agriculture).

Tous les organismes vivants, des bactéries jusqu'à l'être humain, dépendent pour leur existence de catalyseurs biologiques, appelés enzymes. Après des millions d'années d'évolution, ces micromachines, composées de protéines, sont capables de réaliser des tâches biochimiques très précises.

Certaines enzymes ont été conçues par la Nature pour fabriquer des composés chimiques, tandis que d'autres jouent un rôle dans la décomposition ou la modification de tels composés. Ces « réactions » impliquent la création ou la rupture de liaisons chimiques, et les enzymes font en sorte que ces réactions se produisent beaucoup plus rapidement, souvent des millions de fois plus vite, qu'elles ne le feraient en l'absence d'enzymes, d'où le nom de « catalyseurs ». Cependant, leur capacité d'accélérer les réactions chimiques n'est qu'une seule des propriétés utiles des enzymes. Leur caractéristique la plus remarquable et la plus intéressante

■ **Figure 1 : L'enzyme pectate-lyase au moment de la catalyse.**



Le substrat, indiqué en jaune, possède la bonne forme pour se glisser profondément dans le sillon (« site actif ») de l'enzyme, où protégée contre l'environnement aqueux à l'extérieur, la catalyse enzymatique peut se produire efficacement. 

■ **Tableau 1 : Enzymes industrielles et leurs utilisations.**

| Enzyme | Application | Secteur |
|-------------------|--|----------------------------------|
| Protéase | Dégradation des protéines | Détergents |
| Cellulase | Dégradation du cellulose | Détergents |
| Lipase | Dégradation des lipides | Détergents |
| Amylase | Dégradation de l'amidon | Détergents |
| Amylase | Conversion de l'amidon en glucose | Traitement de l'amidon |
| Glucoamylase | Conversion de l'amidon en glucose | Traitement de l'amidon |
| Glucose Isomérase | Production du sirop de glucose à haute teneur en fructose | Traitement de l'amidon |
| Xylanase | Améliorer l'assimilation des nutriments chez les volailles | Aliments pour animaux |
| Phytases | Améliorer la disponibilité des nutriments | Aliments pour animaux |
| Protéases | Améliorer la digestion des protéines | Aliments pour animaux |
| Xylanase | Élimination du lignine « blanchiment biologique » | Papeterie |
| Arabinanase | Élimination du trouble après macération | Traitement des fruits et légumes |
| Amylase | Élimination du trouble d'amidon dans les jus | Traitement des fruits et légumes |
| Polygalacturonase | Augmenter le rendement en jus | Traitement des fruits et légumes |
| Hydrolases | Casser les gels de biopolymères | Gaz et pétrole |
| Chymosine | Caillage lors de la production de fromages | Produits laitiers |
| Uréase | Élimination de l'urée | Vin |
| Pectinase | Augmenter le rendement en jus | Vin |
| Protéase | Attendrissement des viandes | Boucherie |
| Amylase | Désencollage | Textiles |
| Amylase | Contrôle de procédé | Boulangerie |
| Beta-glucanase | Éviter les problèmes de filtration | Bière |
| Protéase | Augmenter le rendement de surface | Tannerie |

est sans doute leur « spécificité », autrement dit leur capacité à ne reconnaître que le composé chimique, ou « substrat », pour lequel elles sont conçues et à ignorer tout autre composé. Bien que cette propriété soit restée mystérieuse pendant de nombreuses années, en raison de l'invisibilité des enzymes même pour les microscopes les plus puissants, les techniques scientifiques permettent désormais d'observer les enzymes dans leurs détails les plus infimes. Il a été constaté que la forme des enzymes s'apparente à une « serrure » biologique, tandis que les substrats sur lesquels elles agissent sont semblables à une « clé ». L'action des enzymes est analogue à l'ouverture d'une porte fermée à clé : une réaction ne se produit que si la bonne clé (substrat) est mise dans

la bonne serrure (enzyme). Par exemple, la **figure 1** montre une enzyme, la pectinase, en tout début de catalyse, au moment où le substrat, le pectate (en jaune), s'est diffusé dans le site actif (la serrure) de l'enzyme. Comme un artisan serrurier, la Nature possède la capacité de modifier légèrement la forme de ses serrures, et par conséquent de faire des enzymes nouvelles ou « évoluées ». En effet, la Nature fait évoluer des enzymes depuis tellement longtemps qu'il existe aujourd'hui des enzymes spécifiques pour fabriquer, modifier ou dégrader tout composé naturel !

L'application industrielle des enzymes

Il n'était donc pas surprenant que les industriels se trouvent parmi les premiers à reconnaître et exploiter l'énorme potentiel des enzymes, car ils ont compris que s'il était possible d'accélérer les réactions, les procédés de production pourraient être réalisés en beaucoup moins de temps, à des températures et des pressions plus basses ou avec des matières premières moins chères. Dans d'autres situations, les enzymes ont rendu certaines réactions commercialement viables pour la première fois. Aujourd'hui le marché mondial des enzymes industrielles se développe rapidement, étant actuellement valorisé à plus de 2 milliards d'euros par an. Les principaux secteurs sont les détergents, le traitement de l'amidon et la production d'aliments pour animaux, mais comme le **tableau 1** le montre, les enzymes sont désormais

■ **Tableau 2: Kits d'essais enzymatiques et leurs utilisations pour la bio-analyse aujourd'hui.**

| Kit d'essai | Domaine d'application | | |
|--|-----------------------|----------|----------|
| | Médecine | Aliments | Boissons |
| Acétaldéhyde | | • | • |
| Acide acétique | | • | • |
| Alanine aminotransférase | • | | |
| Alpha-amylase | • | • | |
| Ammoniac | • | • | • |
| Amylose/Amylopectine | | • | |
| Arabinane | | • | • |
| L-Arabinose/D-Galactose | • | • | |
| L-Arginine/Urée/Ammoniac | | | • |
| Acide L-ascorbique | | • | • |
| L-Asparagine/Ammoniac | | • | |
| L-Asparagine/Acide L-aspartique | | • | |
| Aspartate aminotransférase | • | | |
| Aspartame | | • | • |
| Beta-glucane | | | • |
| Beta-amylase | | • | • |
| Dioxyde de carbone | • | | • |
| Cholestérol | • | • | |
| Acide citrique | | • | • |
| Créatine Kinase | • | | |
| Ethanol | • | • | • |
| Fructose | • | • | |
| D-Fructose/D-Glucose | | • | • |
| Acide formique | | • | • |
| Galactomannane | | • | |
| Glucomannane | | • | |
| Acide D-gluconique/D-Glucono-δ-lactone | | • | • |
| D-Glucose | • | • | • |
| Glucose-6-phosphate déshydrogénase | • | | |
| Glucose oxydase | | • | |
| Acide L-glutamique | | • | |
| Glycérol | | • | • |
| Acide D-3-hydroxybutyrique | • | • | |
| Acide D-isocitrique | | • | • |
| Acide D-L-lactique | | • | • |
| Acide L-lactique | • | • | • |
| Sorbitol/Xylitol/Lactitol | | • | • |
| Lactose/D-Galactose | | • | • |
| Lactulose | | | • |
| Leucine aminopeptidase | • | | |
| Acide D-malique | | | • |
| Acide L-malique | | • | • |
| Maltose/Saccharose/D-Glucose | | • | • |
| D-Mannitol/Isomalte/L-Arabitol | | • | • |
| D-Mannose/D-Fructose/D-Glucose | | • | |
| Nitrate | | • | • |
| Acide oxalique | | • | • |
| Identification des pectines | | • | |
| Raffinose/D-Galactose | | • | |
| Raffinose/D-Glucose | | • | |
| Amidon résistant | | • | |
| Dégradation de l'amidon | | • | |
| Acide succinique | | • | • |
| Saccharose/D-Fructose/D-Glucose | | • | • |
| Saccharose/D-Glucose | | • | |
| Saccharose/Lactose/D-Glucose | | • | |
| Sulfite | | • | • |
| Fibres alimentaires totales | | • | |
| Amidon total | | • | |
| Tréhalose/D-Glucose | | • | |
| Triglycérides | • | • | |
| Urée/Ammoniac | • | • | • |
| Acide urique | • | | |
| Beta-glucane levures/champignons | | • | |

utilisées dans de nombreuses applications très diverses, allant du « blanchiment biologique » du papier jusqu'aux techniques plus efficaces pour l'extraction du pétrole et du gaz naturel. En général, l'utilisation des enzymes est très rentable, sans danger et reconnue comme une technologie « verte » ou écologique.

L'industrie alimentaire

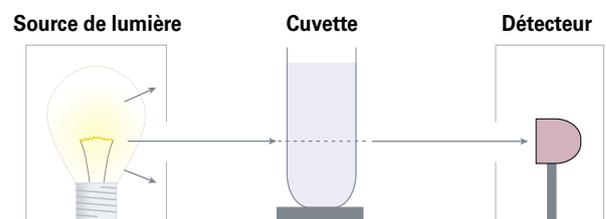
Aujourd'hui, la plupart des applications pour les enzymes industrielles se trouvent dans l'industrie alimentaire. L'application de la technologie enzymatique débuta dans les années 1960, avec l'utilisation de la glucoamylase pour augmenter le rendement et la pureté du glucose produit à partir de l'amidon ainsi que pour faciliter la cristallisation lors de ce procédé. Cette application a très vite remplacé les méthodes classiques d'hydrolyse acide, à faible rendement, et a permis de réduire de 30 % le coût lié à la vapeur d'eau, de 50 % la production de cendres et de 90 % la production de sous-produits. Le grand développement suivant fut l'invention de la glucose-isomérase immobilisée en 1973, ce qui a permis pour la première fois la production industrielle des sirops de glucose à forte teneur en fructose à partir de l'amidon. Parmi les autres grandes applications, on peut citer l'utilisation de l'amylase pour garder la fraîcheur du pain et des gâteaux, l'utilisation de la protéase, de l'amylase et de la glucanase pour la production efficace de la bière, l'utilisation des protéases d'origine animale ou autre (la présure), de la lipase, de la lysozyme et de la beta-galactosidase dans la production de fromages et d'autres produits laitiers, l'utilisation de la pectine-lyase et de la cellulase pour la production du jus et de la purée de carotte, et l'utilisation de la protéase pour l'attendrissement des viandes

et pour améliorer les propriétés de solubilité, de mise en émulsion, de gélification ou de moussage de divers autres produits alimentaires.

L'industrie des boissons

La première utilisation des enzymes industrielles dans l'industrie des boissons remonte aux années 1930, lorsque la société Röhm & Haas lança sur le marché la pectinase « Pectinol K » pour la clarification du jus de pomme trouble. Aujourd'hui, en plus des nombreuses applications pour la clarification, les préparations enzymatiques sont utilisées pour augmenter le rendement en jus et pour diminuer la consommation énergétique, grâce à la décomposition enzymatique des pectines et d'autres composés dans les parois cellulaires végétales, avec pour résultat soit une macération partielle plus efficace, soit la liquéfaction complète. Les préparations de pectinase contiennent des enzymes primaires, telles que la pectine-lyase, la pectinestérase et la polygalacturonase, ainsi que de plus faibles concentrations de composants secondaires, tels que la cellulase et la xylanase. Dans la filière viticole, l'utilisation des préparations de pectinase est autorisée pour augmenter les rendements en jus, et la beta-glucanase peut s'employer comme aide à la clarification et à la filtration. Actuellement, des interrogations importantes existent quant à la présence de carbamate d'éthyle dans le vin; ce produit cancérigène se forme à partir de l'éthanol et de l'urée (si cette dernière est présente) lors de l'élevage du vin. Comme mesure de précaution, l'utilisation de l'enzyme uréase, pour éliminer l'urée dans le vin et donc empêcher la formation de carbamate d'éthyle, a récemment été approuvée par l'Office International de la Vigne et du Vin (OIV).

■ **Figure 2: Une simple représentation d'un spectrophotomètre.**



L'industrie des détergents

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

L'âge de la bio-analyse enzymatique

Dès les années 1960, les chercheurs ont compris le grand potentiel des enzymes pour le diagnostic médical et pour l'analyse des aliments et des boissons. Cependant, pour une utilisation analytique, l'enzyme doit être d'une pureté exceptionnelle, car même si les enzymes individuelles sont exquisément spécifiques, dans la Nature elles sont généralement en présence de nombreuses autres enzymes, et ces « contaminants » doivent être éliminés pour que l'enzyme soit utilisable au laboratoire. De plus, les enzymes analytiques doivent souvent être utilisées en de grandes quantités, et dans les années 1960, la préparation des quantités nécessaires n'était tout simplement pas viable, ou bien trop consommatrice de temps et donc trop chère. Un dernier obstacle : l'appareil nécessaire pour suivre les réactions enzymatiques, le spectrophotomètre, bien qu'inventé au cours des années 1940, était toujours dans ses premiers jours et beaucoup trop cher pour les analyses courantes. Cependant, dès les années 1980, les progrès dans la production à grande échelle d'enzymes industrielles, couplés d'une série d'avancées scientifiques afférentes, surtout en ce qui concerne les méthodes permettant aux scientifiques d'identifier et d'isoler des enzymes jusqu'alors inconnues, ont eu pour résultat la mise sur le marché d'un grand nombre d'enzymes pures en de bonnes quantités. Avec la disponibilité très large des spectrophotomètres, l'âge de la « bio-analyse enzymatique » est

■ **Tableau 3 : Sociétés participant activement à la mise au point et à la fabrication de kits d'essais enzymatiques et de produits afférents.**

| Produits | Applications | Société | Site Web |
|---------------------------|-----------------------------------|---|--|
| Réactifs | Diagnostic médical | Roche | www.roche-diagnostics.com |
| | Analyse des produits laitiers | (mis au point à l'origine par Boehringer) | |
| | Analyse des aliments | | |
| Kits d'essais et réactifs | Analyse des produits laitiers | Megazyme | www.megazyme.com |
| | Analyse des aliments | | |
| | Analyse des aliments pour animaux | | |
| | Analyse des boissons (vin) | | |
| Kits d'essais et réactifs | Diagnostic médical | Merck | www.merck.de |
| | Analyse des boissons (vin) | | |
| Kits d'essais et réactifs | Diagnostic médical | Trinity Biotech | www.trinitybiotech.com |

né. À ce moment, une société allemande, Boehringer Mannheim, a mis au point les premiers « kits d'essais » enzymatiques, devenant le leader sur le marché en tant que fournisseur des produits « Gold Standard » pendant les 20 années suivantes. Aujourd'hui, la même technologie mise au point dans les années 1980 par Boehringer Mannheim est toujours disponible auprès de la division Diagnostic d'une société multinationale, Roche, qui a acquis en 1997 la célèbre société allemande.

La bio-analyse enzymatique aujourd'hui

Depuis 25 ans, le coût réel des spectrophotomètres et des kits d'essais enzymatiques a chuté de façon importante, tandis que l'expertise nécessaire pour effectuer ces essais est à la fois moins exigeante et plus répandue. De plus, il y a désormais non seulement un bon nombre de fabricants de kits d'essai, ce qui favorise la concurrence, mais certains d'entre eux élargissent même la gamme de kits d'essais enzymatiques et de réactifs afférents ou bien ils améliorent systématiquement les points faibles des produits existants. En effet, la gamme de kits d'essais enzymatiques pour le diagnostic médical est actuellement en expansion continue, tout comme celle pour l'analyse des aliments et boissons. Le potentiel énorme de la bio-analyse enzymatique peut être apprécié à la vue de la longue liste de kits d'essais dans le **tableau 2**.

Les sociétés qui développent activement et fabriquent des kits d'essais enzymatiques et des produits afférents sont présentées dans le **tableau 3**.

Les propriétés et la sélection d'enzymes adaptées aux applications industrielles et analytiques

Comme toutes les autres protéines, les enzymes sont sensibles aux facteurs environnementaux comme la température, le pH et la concentration ionique, et dans certaines conditions, une enzyme peut même perdre son activité catalytique de façon permanente en raison de la « précipitation » ou de la « dénaturation ». De plus, toutes les enzymes ont différentes caractéristiques biochimiques, telles que différentes affinités pour le substrat (la « valeur K_m »), une vitesse variable de réaction (la « valeur V_{max} »), une valeur optimale de pH variable, des exigences variables en matière de cofacteur et des concentrations ioniques optimales variables. Les réactions enzymatiques peuvent également être influencées de manière importante par les « inhibiteurs », tels que les ions des métaux lourds ou d'autres composés biologiques, qui modifient les propriétés biochimiques d'une enzyme et ralentissent la réaction.

Parfois cette inhibition est voulue par la Nature comme mécanisme de contrôle sur l'activité d'une enzyme donnée, mais dans d'autres cas ce phénomène est dû au simple fait qu'un autre composé convient au site actif de l'enzyme en question. Par conséquent, lors de la mise au point d'applications industrielles ou analytiques, après la sélection d'une enzyme en raison de la réaction qu'elle catalyse, les chercheurs doivent ensuite soigneusement vérifier que l'enzyme est suffisamment stable dans les conditions d'utilisation et que dans ces conditions la catalyse se fait efficacement. De plus, un dernier défi doit être relevé pour les enzymes analytiques, car il faut trouver un moyen pour quantifier avec exactitude les produits de la réaction. C'est pour cela qu'un spectrophotomètre doit être utilisé.

Qu'est-ce qu'un spectrophotomètre et comment fonctionne-t-il ?

Un spectrophotomètre est une machine qui fait passer une quantité de lumière très précise à travers une solution mise dans un récipient spécial en plastique ou en verre, appelé cuvette. La solution absorbe une partie de la lumière, et la lumière non absorbée sort de l'autre côté de la cuvette où elle est quantifiée avec exactitude par le détecteur du spectrophotomètre (**figure 2**). La différence entre la quantité de lumière qui entre dans la

■ **Figure 3 : Un kit d'essai enzymatique type.**



Dans ce cas, les réactifs du kit d'essai sont fournis en flacons individuels protégés par un récipient en polystyrène, qui permet aussi un stockage facile. Ce kit d'essai commercial pour l'acide L-malique comprend 5 réactifs : le flacon 1 contient une solution tampon de glycylglycine 1 M (pH 10,0) et de L-glutamate 1 M ; le flacon 2 contient 180 mg de NAD⁺ ; le flacon 3 contient 1,25 ml de l'enzyme glutamate-oxaloacétate transaminase ; le flacon 4 contient 1,25 ml de l'enzyme L-malate déshydrogénase ; et le flacon 5 contient 5 ml d'une solution étalon d'acide L-malique (0,15 mg/ml).

cuvette et la quantité qui en sort est appelée « évolution de l'absorbance » et elle est mesurée en « unités d'absorbance » ; par conséquent, plus grande est la quantité de lumière absorbée, plus grande sera l'absorbance.

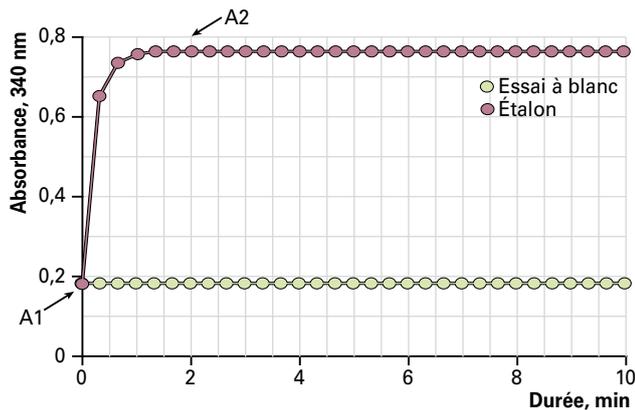
De quoi un kit d'essai enzymatique est-il composé ?

Un kit d'essai contient tous les réactifs sous une forme facile à utiliser et dans la quantité nécessaire pour effectuer un certain nombre d'analyses, dans les conditions optimales pour les enzymes en question. En plus des enzymes elles-mêmes, les kits d'essais contiennent en général une solution tampon (pour contrôler le pH de la réaction et donc l'activité optimale des enzymes), un cofacteur tel que le NADP⁺ ou NADPH (pour pouvoir suivre une évolution éventuelle de l'absorbance), et un étalon, généralement sous forme de liquide prêt à l'emploi (figure 3). Les kits d'essais sont stockés à 4 °C, et leur durée de vie varie d'un fabricant à l'autre, les meilleurs produits étant stables pendant plus de 2 ans.

Quel matériel de laboratoire est nécessaire ?

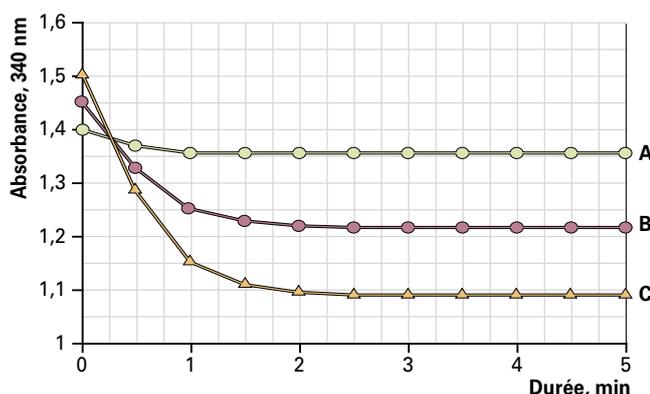
Outre le spectrophotomètre, il faut très peu de matériel de laboratoire pour effectuer les bio-analyses enzymatiques ; il faut un jeu de pipettes (par ex. de chez Gilson®) avec des embouts jetables en plastique pour dispenser avec exactitude des volumes liquides entre 20 µl et 1000 µl, ainsi que des cuvettes ou tubes jetables en plastique (en fonction du type de spectropho-

■ **Figure 4 : L'évolution de l'absorbance (hausse) pendant un essai pour l'acide L-malique.**



Après addition de l'enzyme L-malate déshydrogénase (à 0 min ; A1) pour commencer la réaction, l'absorbance (cercles pleins) augmente rapidement de 0,19 à 0,77. Comme on peut le constater, l'absorbance n'augmente plus à partir de 1,5 minute environ (A2), ce qui représente donc le point final de cette réaction pour l'acide L-malique. Les cercles vides représentent la réaction « à blanc » sans échantillon.

■ **Figure 5 : L'évolution de l'absorbance (baisse) pendant un essai pour l'ammoniac.**



La baisse de l'absorbance à 340 nm fait suite à l'incubation d'un moût rouge non traité avec un kit d'essai (rapide) pour l'ammoniac. A, réaction à blanc ; B, 25 µl du moût rouge ; C, 50 µl du moût rouge.

tomètre utilisé). Un simple appareil de filtration et de traitement d'échantillon peut également s'avérer nécessaire, en fonction de la nature des échantillons à analyser.

Comment l'essai est-il réalisé ?

Un mélange d'essai est d'abord préparé en mélangeant dans une cuvette un petit volume de la solution tampon, de l'eau distillée, le(s) cofacteur(s) et l'échantillon. Le dernier réactif à ajouter est l'enzyme, qui est spécifique pour la substance à analyser. Ensuite, l'évolution de l'absorbance due à la réaction est déterminée. Dans la pratique, cela se fait en mesurant l'absorbance de la solution d'essai avant l'addition de l'enzyme (A1) et de nouveau après l'achèvement de la réaction ou l'arrivée à un « point final » (A2). Ensuite, on calcule la différence d'absorbance (A2-A1 ; figure 4). Une réaction « à blanc » est également effectuée sans l'échantillon. L'écart entre les différences d'absorbance pour les 2 réactions (entre les réactions « échantillon » et « à blanc ») est ensuite utilisé dans une équation simple fournie dans chaque kit d'essai afin de calculer la quantité de la substance à analyser en g/l ou en pourcentage. Des consignes détaillées mais simples sont fournies avec tous les kits, et certaines sociétés proposent, à titre gracieux sur le Web, des outils informatiques pour effectuer automatiquement des calculs à partir des données d'absorbance. Pour une explication plus détaillée du fonctionnement des kits d'essais, veuillez voir les exemples suivants :

Exemple 1 : Dosage de l'ammoniac (NH₄⁺)

La détermination quantitative de l'ammoniac est très importante pour le diagnostic médical ainsi que pour l'analyse des aliments et des boissons. Par exemple, dans la filière viticole, un dosage exact de l'ammoniac est essentiel pour vérifier la présence de teneurs optimales en

azote disponible pour la levure, afin d'assurer une bonne fermentation et la production d'un vin de bonne qualité ainsi que pour éviter une addition excessive de phosphate diammonique (DAP), qui peut provoquer la formation de carbamate d'éthyle. Pour le dosage de l'ammoniac, la réaction enzymatique entraîne une baisse de l'absorbance plutôt qu'une hausse (figure 5). Une seule enzyme, la glutamate déshydrogénase, est nécessaire pour catalyser la réaction (équation 1).

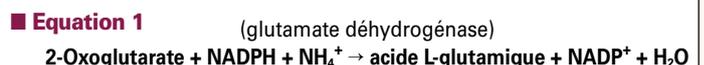
Pendant la réaction, le NADPH, qui absorbe fortement la lumière, est converti en NADP⁺, qui n'absorbe pas la lumière, et par conséquent, l'absorbance baisse au cours de la réaction jusqu'à ce que le point final soit atteint. Le 2-oxoglutarate est un substrat supplémentaire dont l'enzyme a besoin, et il est présent en excès afin que la réaction puisse avancer aussi vite que possible.

Lorsqu'il faut doser l'ammoniac et l'urée, comme c'est le cas dans la filière viticole, la réaction du kit d'essai pour l'ammoniac peut être complétée par l'addition ultérieure d'uréase, selon l'équation 2. Dans la pratique, cela se fait en effectuant deux réactions : après que la première réaction « à l'ammoniac » a atteint son point final, une deuxième réaction est initiée par l'addition d'uréase, ce qui entraîne une nouvelle baisse de l'absorbance (figure 6).

Dans ce cas, l'uréase produit deux molécules d'ammoniac (sous forme d'ions d'ammonium, NH₄⁺), ce qui est pris en compte dans l'équation pour le calcul des résultats.

Exemple 2 : Dosage du D-glucose et du D-fructose

Dans la production des aliments et des boissons, la quantification du D-glucose et du D-fructose est très importante, car ces sucres sont présents dans de nombreux ingrédients ou sont ajoutés sous forme de sirop de glucose à forte teneur en fructose.



Dans la filière viticole, le D-glucose et le D-fructose sont les principaux sucres fermentescibles utilisés par la levure, et ils représentent environ 25 % du poids du jus de raisin frais. En fin de fermentation, les teneurs résiduelles en ces sucres sont également dosées avant toute addition éventuelle.

Comme dans l'exemple ci-dessus pour l'urée et l'ammoniac, les kits d'essais pour le D-glucose et le D-fructose sont aussi conçus pour mesurer indépendamment les deux substances à analyser dans une même cuvette; cependant, dans ce cas, ce sont les produits des réactions qui absorbent de la lumière, et donc c'est une hausse de l'absorbance qui est mesurée. De plus, dans le cas de l'analyse du D-glucose et du D-fructose, quatre réactions chimiques participent au schéma final.

La première réaction implique la conversion du D-glucose et du D-fructose en D-glucose-6-phosphate (G-6-P) et en D-fructose-6-phosphate (F-6-P), respectivement, par l'action de l'enzyme hexokinase (équations 3 et 4). Aucune évolution de l'absorbance ne se produit à ce stade de la séquence de réactions, mais ces conversions doivent se produire avant les réactions qui font évoluer l'absorbance.

Lors de la prochaine étape, après une première mesure de l'absorbance (A1), l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase est ajoutée à la cuvette, et le G-6-P est rapidement converti en gluconate-6-phosphate, et en même temps le NADP⁺, qui n'absorbe pas la lumière, est converti en

NADPH, qui, lui, absorbe fortement la lumière (équation 5). Le résultat est une hausse de l'absorbance qui est représentative (« stœchiométrique ») de la quantité de D-glucose dans l'échantillon. Lors de cette réaction, le F-6-P n'est pas modifié, car comme son nom l'indique, la glucose-6-phosphate déshydrogénase n'agit que sur le G-6-P.

Lorsque la conversion du G-6-P est complète, l'absorbance (A2) est mesurée, et ensuite la dernière enzyme, la phosphoglucose-isomérase, est ajoutée à la cuvette. Cette enzyme convertit le F-6-P en G-6-P (équation 6), ce dernier étant immédiatement converti en gluconate-6-phosphate selon l'équation 5, ce qui augmente encore l'absorbance, de manière stœchiométrique en fonction de la quantité de D-fructose dans l'échantillon. Lorsque le point final est atteint, une dernière mesure d'absorbance est prise (A3). Comme le montre la figure 7, les deux réactions sont très rapides, et en général il ne faut qu'environ 10 mn pour effectuer un essai pour le D-glucose et le D-fructose.

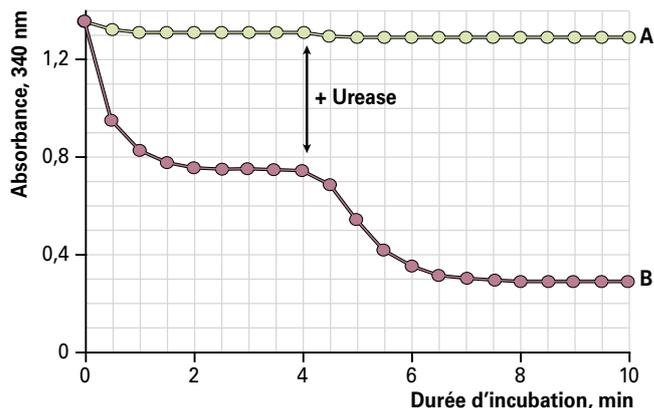
Quel est l'avenir de la bio-analyse enzymatique ?

Avec la baisse des prix des spectrophotomètres et des kits d'essais, associée à la plus grande disponibilité de l'expertise nécessaire pour les utiliser, le marché de la bio-analyse enzymatique est en plein essor. Mais la croissance sur ce marché entre actuellement dans une nouvelle phase plus dynamique, car des sociétés innovatrices augmentent considérablement le nombre de kits d'essais.

De nouveaux kits sont lancés, mais aussi les kits existants sont améliorés pour les rendre plus rapides et plus stables, offrant à l'analyste une plus grande flexibilité. Depuis deux ans, le nombre de kits d'essais pour l'analyse des aliments et des boissons est passé de 40 environ à près de 60, et on s'attend à ce qu'il y ait plus de 80 kits de ce type d'ici deux ans!

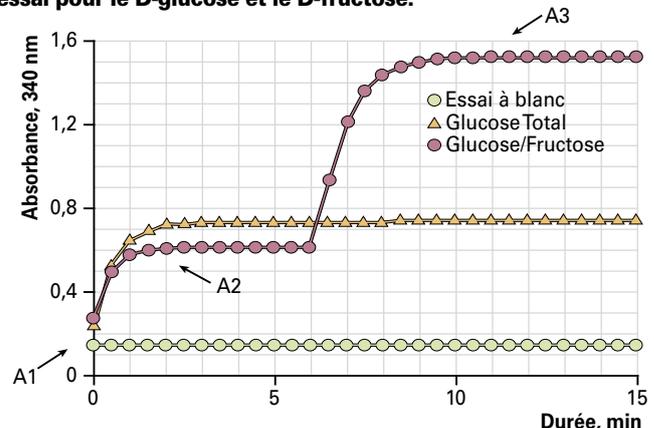
Grâce aux sociétés qui possèdent désormais la capacité de mettre rapidement au point de nouveaux kits pour répondre à l'évolution de la législation ou des technologies dans l'industrie alimentaire, par exemple en matière d'étiquetage, la bio-analyse enzymatique a certainement un avenir brillant devant elle.

■ **Figure 6: La baisse séquentielle de l'absorbance lors d'un essai pour l'ammoniac et l'urée.**



La baisse de l'absorbance à 340 nm lors de l'incubation d'une solution étalon d'urée et d'ammoniac utilisant un kit d'essai (rapide) pour l'urée et l'ammoniac. A, réaction à blanc; B, 4 µg d'ammoniac plus 7 µg d'urée. L'uréase a été ajoutée au moment indiqué par la flèche.

■ **Figure 7: La hausse séquentielle de l'absorbance lors d'un essai pour le D-glucose et le D-fructose.**

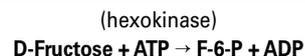


Après addition de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (à 0 min; A1) pour commencer la réaction, l'absorbance (cercles pleins) augmente rapidement de 0,13 à 0,61. Comme on peut le constater, l'absorbance n'augmente plus à partir de 2 minutes environ (A2), ce qui représente donc le point final de cette réaction pour le D-glucose. Le point d'addition de la phosphoglucose isomérase est indiqué (+ PGI), et l'absorbance augmente encore pour atteindre 1,53. Comme on peut le constater, l'absorbance n'augmente plus à partir de 10 minutes environ (A3), ce qui représente donc le point final de cette réaction pour le D-fructose. Les cercles vides représentent la réaction « à blanc » sans échantillon, tandis que les triangles représentent une réaction effectuée avec une solution de contrôle de D-glucose, fournie dans le kit.

■ **Equation 3**



■ **Equation 4**



■ **Equation 5**



■ **Equation 6**



Megazyme International Ireland Ltd.
 Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland
 Phone : + 353 1 286 1220 - Fax : + 353 1 286 1264
 E-mail : info@megazyme.com - www.megazyme.com