

- Extraction et purification des enzymes

Pour étudier une protéine (enzyme) en détail il faut la séparer des autres protéines cellulaires, les cellules contiennent des milliers de protéines différentes, la préparation à l'état pur d'une protéine donnée est essentielle avant que ses propriétés, sa composition en acide aminé et sa séquence puissent être déterminées.

La question est comment une protéine donnée peut être purifiée ? L'origine d'une protéine est généralement un tissu animal, végétal ou des cellules microbiennes, exemple de l'amylase extraite des céréales, la même enzyme est extraite à partir de la salive d'animal, l'invertase extraite à partir des levures.

La purification des protéines est un processus de plusieurs étapes : Extraction, Précipitation, Dialyse, Séparations par chromatographie, Électrophorèse ...

Principe d'extraction

L'extraction désigne l'action de séparer une enzyme du composé dont elle fait partie. Cette méthode consiste à libérer l'enzyme de la cellule par éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire par des procédés mécanique, physique ou chimique.

Pour l'isolement d'une enzyme, il est toujours préférable de choisir une source enrichie en cette enzyme particulière.

➤ Méthode physico-chimique

Choc osmotique Les cellules sont incubées dans une solution hypo-osmotique. Cherchant à rétablir l'équilibre osmotique, l'eau pénètre dans la cellule et finit par causer une rupture de la membrane plasmique.

➤ Méthodes mécaniques

Congélation-décongélation Refroidissement brusque La concentration du soluté intra et extracellulaire Formation des cristaux intra et extracellulaire Cassures dans la cellule

Broyage ou agitation avec des abrasifs Agitation violente Microbilles de verre désintègre les microorganismes avec rupture de la paroi

Bombe à disruption La pression force l'azote à se solubiliser dans les liquides. On libère alors la pression tout d'un coup; l'azote en solution reprend son état gazeux, forme des bulles à l'intérieur des cellules et le fait éclater. Chambre pressurisée Cellules Azote à haute pression

Homogénéisateur d'Elvejm de potier Equipement simple Pilon sous forme de tige de verre mécanique.

Les billes de verre La suspension se répartit entre les billes, le tout est alors scellé et on lance la machine, qui fait furieusement tourbillonner les billes de verre dont l'action abrasive fait de dégrader les cellules.

➤ **Méthodes chimiques**

Extraction chimique Consiste à mélanger le produit en solution aqueuse avec un petit volume de solvant organique dans lequel il est très soluble. On agite ensuite vigoureusement le mélange pour permettre au produit de se déplacer de la phase aqueuse vers la phase organique, puis on récupère celle-ci.

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

Purification

Définition : Est un ensemble d'opérations visant à enlever toutes les impuretés d'un extrait brut contenant l'enzyme d'intérêt. Elle a comme objectifs essentiels d'avoir:

- un maximum du rendement de l'enzyme;
- un maximum de pureté possible;
- un maximum de son activité catalytique.

➤ **Méthodes de purification**

- Méthodes basées sur les différences de solubilité
- Méthodes basées sur la taille des molécules
- Méthodes basées sur les propriétés ioniques

Méthodes basées sur les différences de solubilité Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium C'est une technique douce (préserve en générale la structure, et donc la

fonction des enzymes.) solution protéique sulfate d'ammonium déshydratation et précipitation des protéines, induisant ainsi le phénomène de relargage.

Les ions sulfates et ammonium sont petits et neutralisent efficacement les charges des protéines.

Cette méthode devra être suivie d'un lavage pour éliminer le sel résiduel.

Méthodes basées sur la taille des molécules Dialyse Permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane de dialyse. Cylindres allongés fermés aux deux extrémités contiennent le liquide à dialyser « boudin » de dialyse Il est placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre-dialyse.

Centrifugation Différences de densité si la particule a une densité plus élevée que le fluide en lequel elle est immergée, elle tend à émigrer en bas, suivant la direction de force de pesanteur.

Filtration membranaire Consiste à séparer les particules solides qui se trouvent en suspension dans un liquide par une membrane, tout en limitant son colmatage pour obtenir un fonctionnement stable.