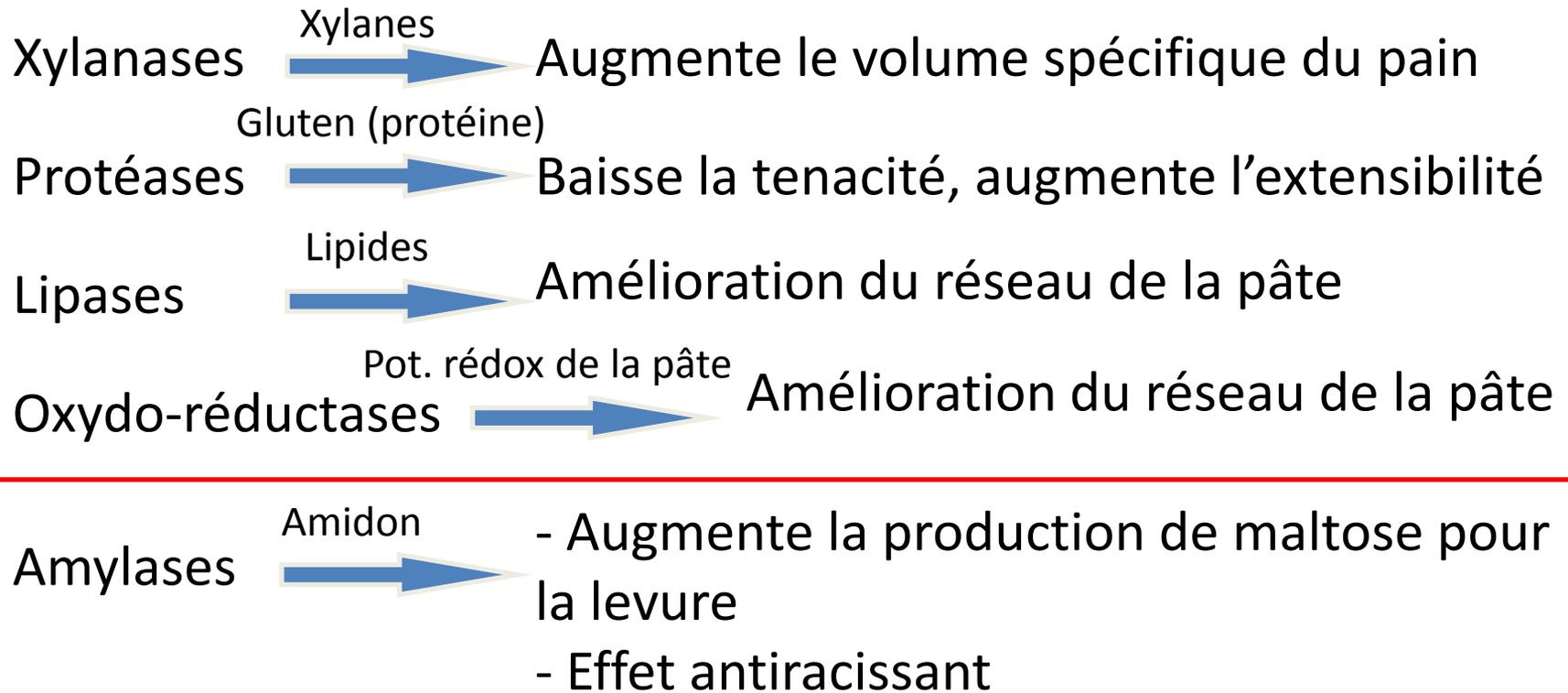




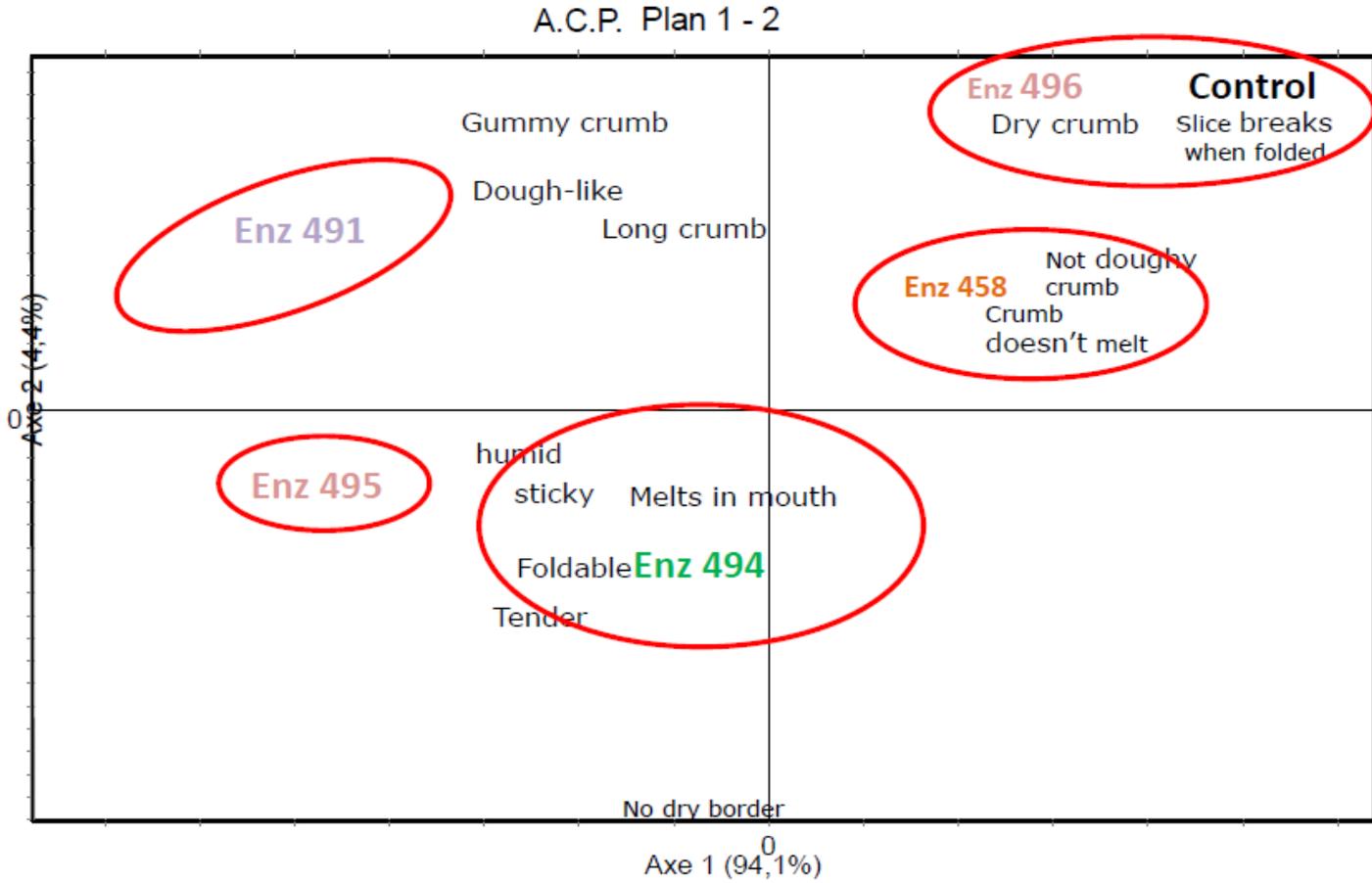
Une de nos missions :

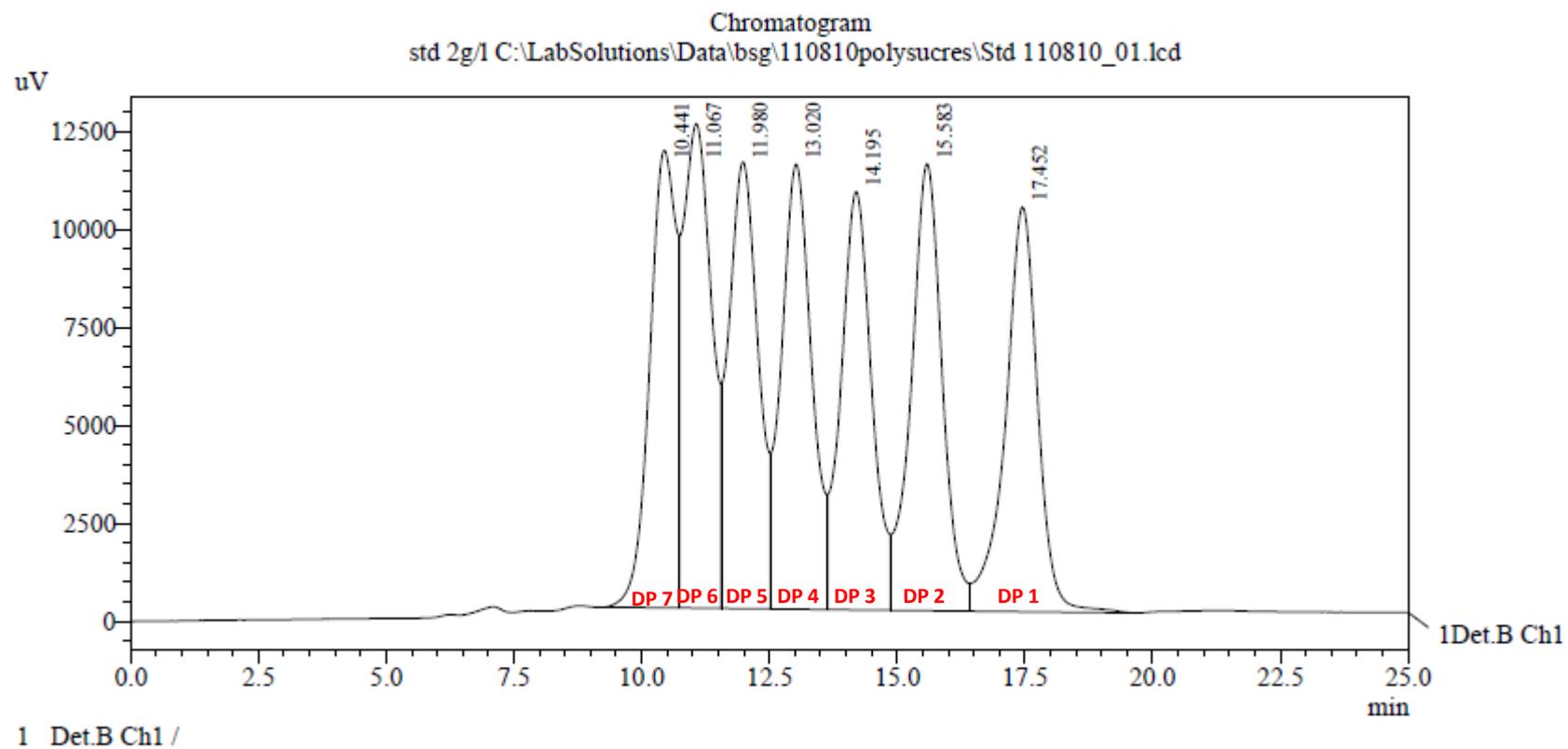
Savoir identifier et discriminer les différentes enzymes proposées sur le marché.

**Pour cela, développement d' Enzymologie classique :
détermination de la concentration en U/g et de
l'activité sur différents substrats ou à
différents pH et températures conduisant à
établir la « signature » de chaque enzyme**



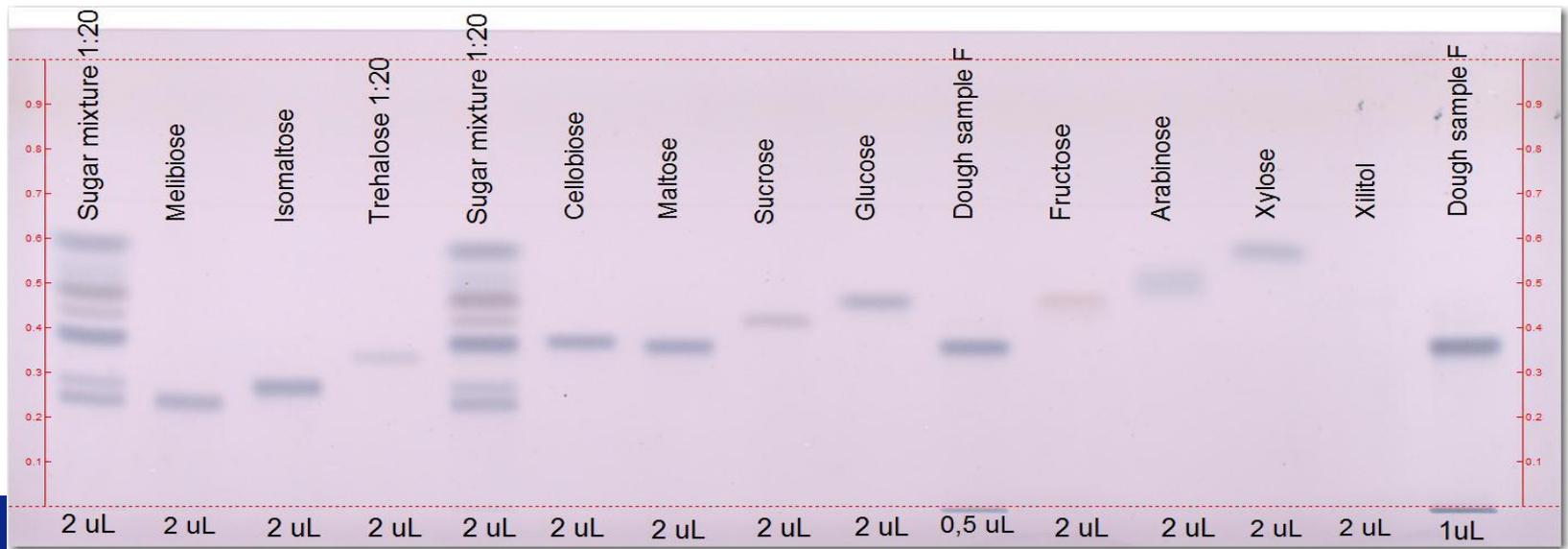
Problématique Amylases





Méthode CAMAG :

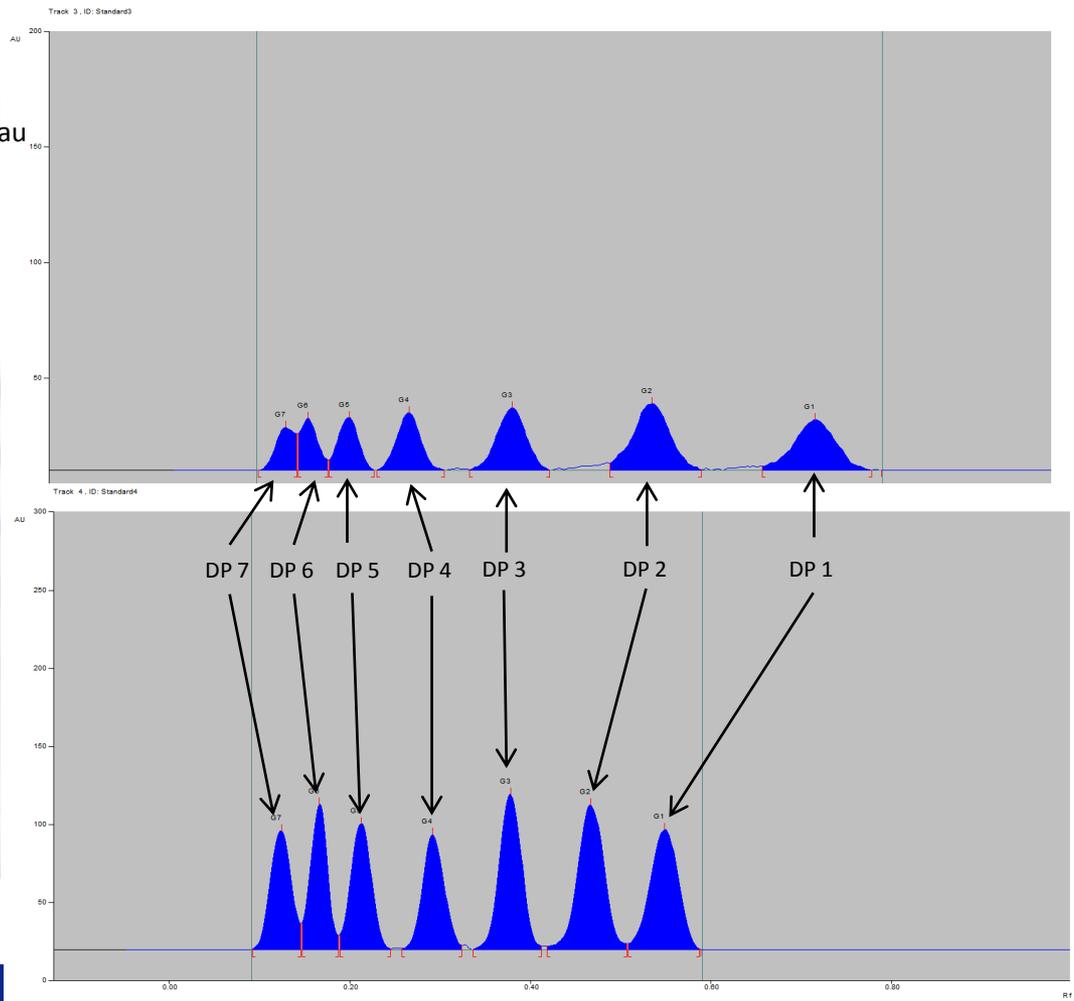
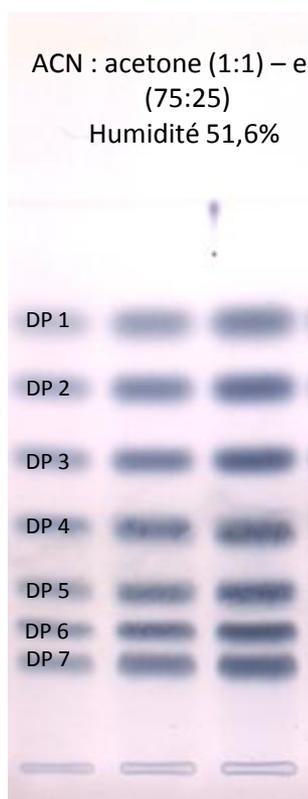
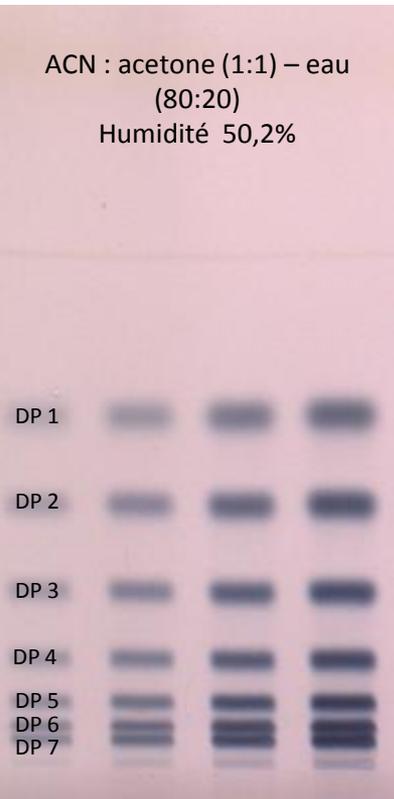
- Plaque: silica gel 60 F254 (ATS 4)
- Solvant de migration: Acetonitrile : acetone (1:1) – eau (80:20) (ADC2)
- Saturation: 20 min avec papier filtre
- Humidité: 50,2%
- Séchage 5 minutes
- réactif de dérivatisation : Aniline-diphénylamine- acide phosphorique (cuve à immersion)
- chauffage 15 minutes à 120°C
- Scanner 4 à 500 nm lampe tungstène

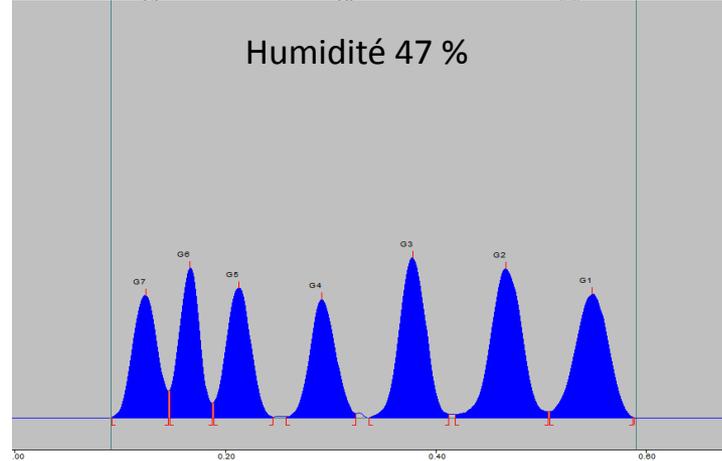
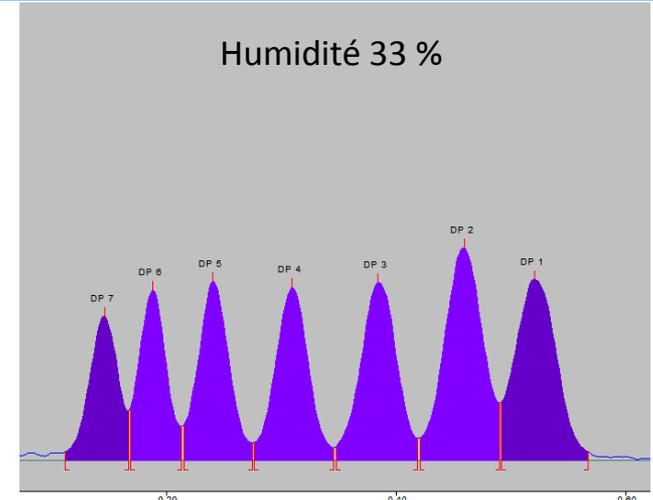
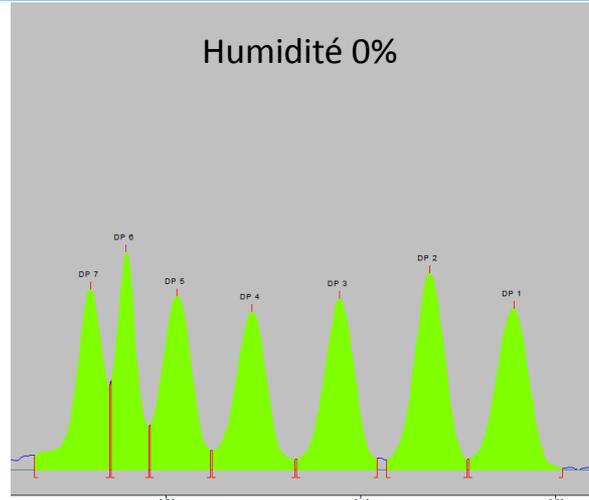
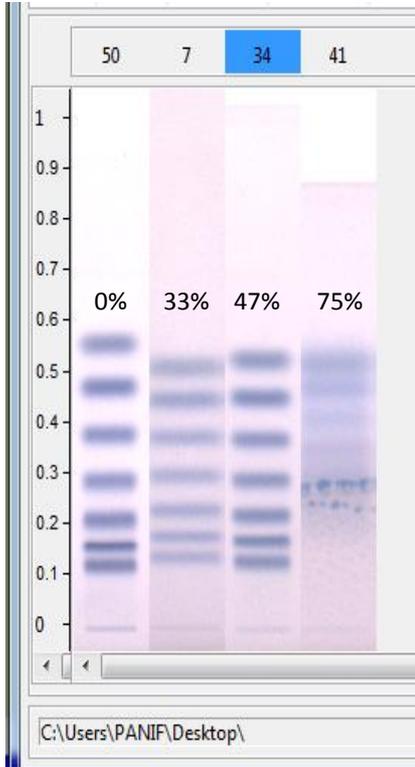


Méthode CAMAG sur DP1 à DP7:

ACN : acetone (1:1) – eau
(80:20)
Humidité 50,2%

ACN : acetone (1:1) – eau
(75:25)
Humidité 51,6%



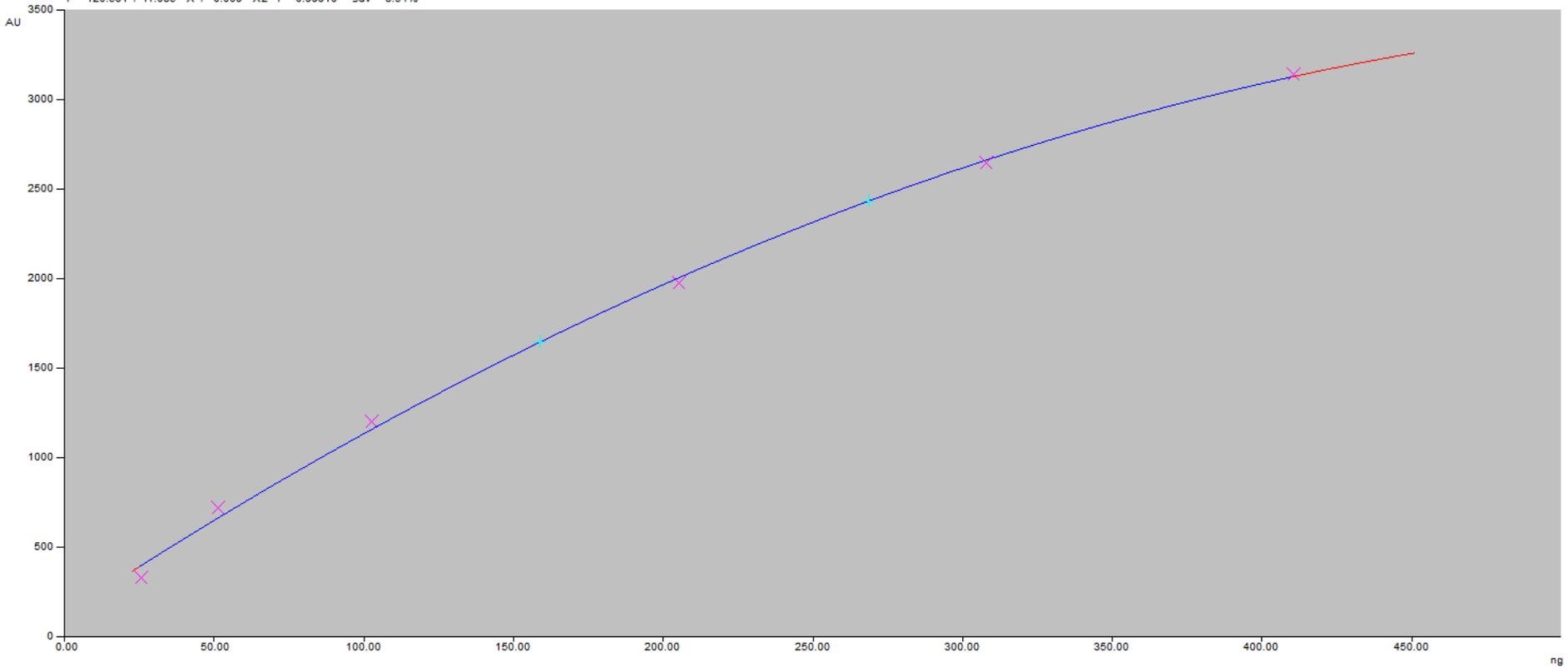


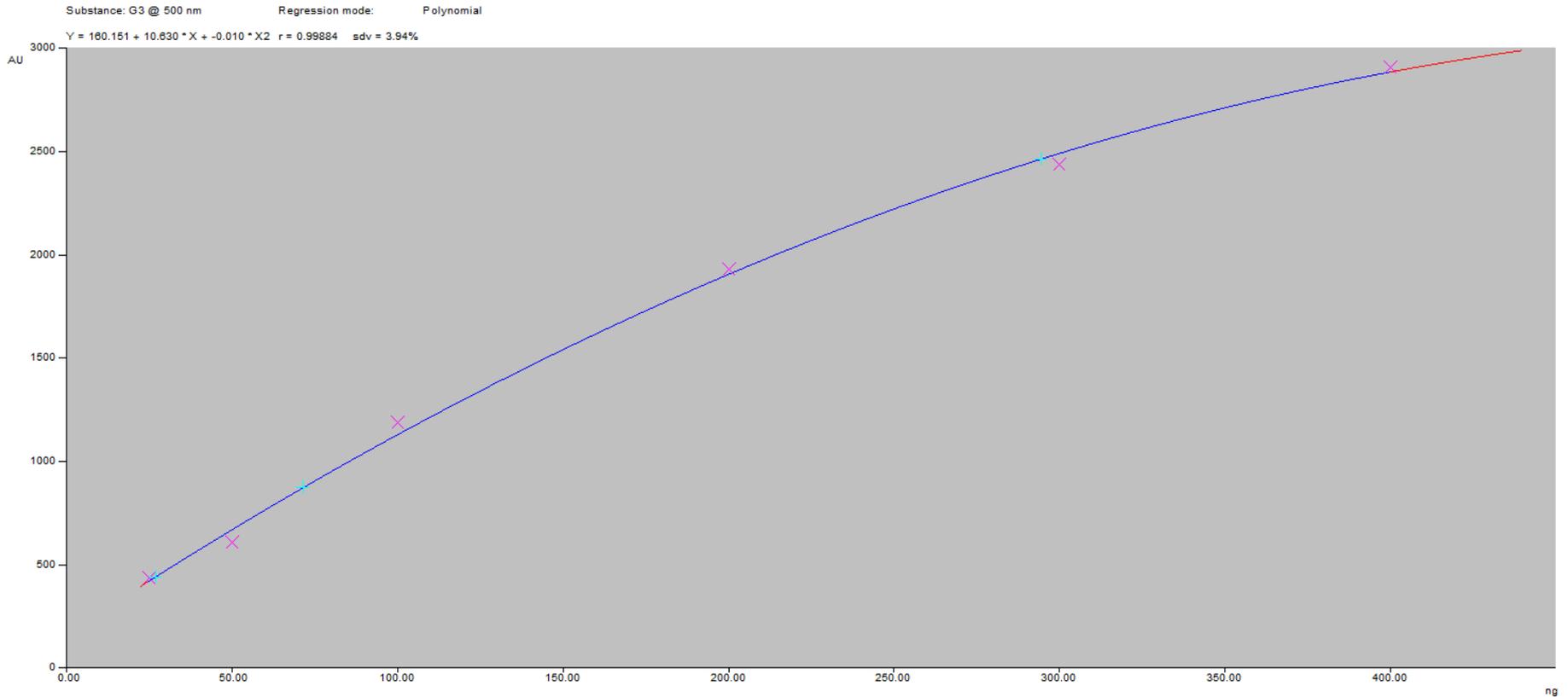
Gamme DP1 (Glucose)

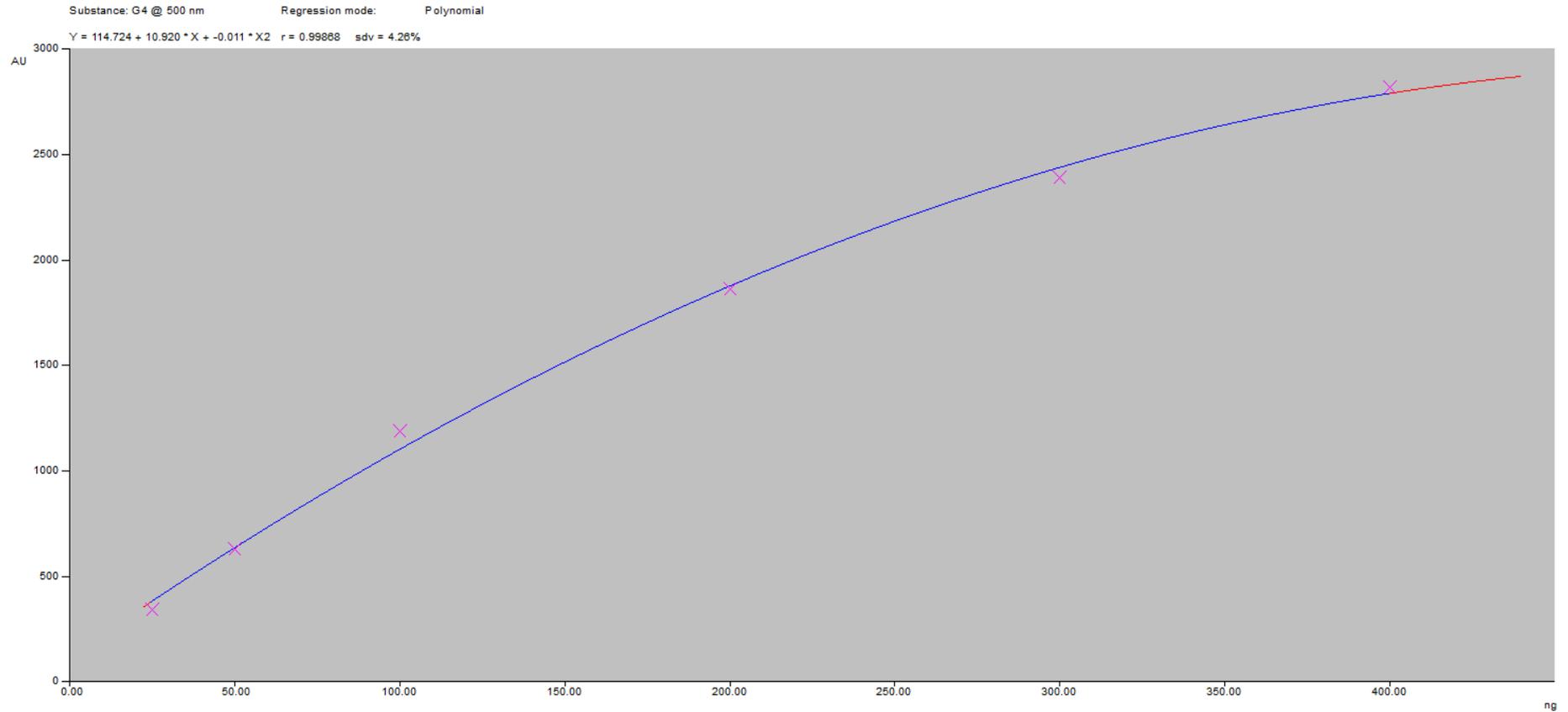
| Track | Vial | Rf | Amount Fraction | Height | X(calc) | Area | X(calc) | |
|-------|------|------|-----------------|--------|----------|---------|----------|---|
| 1 | A2 | 0.55 | | 23.70 | 70.95 ng | 480.64 | 73.49 ng | Sample Enz 496 1/3 pesée 1 |
| 2 | A1 | 0.55 | 164.13 ng | 43.14 | | 868.73 | | Std Level 4 |
| 3 | A6 | | | | | | | Sample Enz 496 1/10 pesée 2: No peak detected or peak deleted |
| 4 | A10 | | | | | | | Sample Enz 496 1/50 pesée 3: No peak detected or peak deleted |
| 5 | A1 | 0.55 | 79.42 ng | 25.06 | | 498.05 | | Std Level 2 |
| 6 | B4 | | | | | | | Sample Enz 496 1/10 pesée 5: No peak detected or peak deleted |
| 7 | A11 | 0.54 | | 23.25 | 69.26 ng | 461.61 | 69.95 ng | Sample Enz 496 1/3 pesée 4 |
| 8 | A3 | | | | | | | Sample Enz 496 1/10 pesée 1: No peak detected or peak deleted |
| 9 | A1 | 0.55 | 211.78 ng | 54.45 | | 1097.72 | | Std Level 5 |
| 10 | B5 | | | | | | | Sample Enz 496 1/50 pesée 5: No peak detected or peak deleted |
| 11 | A5 | 0.55 | | 22.97 | 68.20 ng | 477.76 | 72.95 ng | Sample Enz 496 1/3 pesée 2 |
| 12 | A9 | | | | | | | Sample Enz 496 1/10 pesée 3: No peak detected or peak deleted |
| 13 | A1 | 0.56 | 121.77 ng | 38.48 | | 763.67 | | Std Level 3 |
| 14 | B2 | | | | | | | Sample Enz 496 1/50 pesée 4: No peak detected or peak deleted |
| 15 | A4 | | | | | | | Sample Enz 496 1/50 pesée 1: No peak detected or peak deleted |
| 16 | A8 | 0.56 | | 21.30 | 61.97 ng | 429.26 | 64.00 ng | Sample Enz 496 1/3 pesée 3 |
| 17 | A1 | 0.56 | 37.06 ng | 14.38 | | 276.61 | | Std Level 1 |
| 18 | A7 | | | | | | | Sample Enz 496 1/50 pesée 2: No peak detected or peak deleted |
| 19 | B1 | | | | | | | Sample Enz 496 1/10 pesée 4: No peak detected or peak deleted |
| 20 | B3 | 0.56 | | 21.39 | 62.31 ng | 435.42 | 65.12 ng | Sample Enz 496 1/3 pesée 5 |

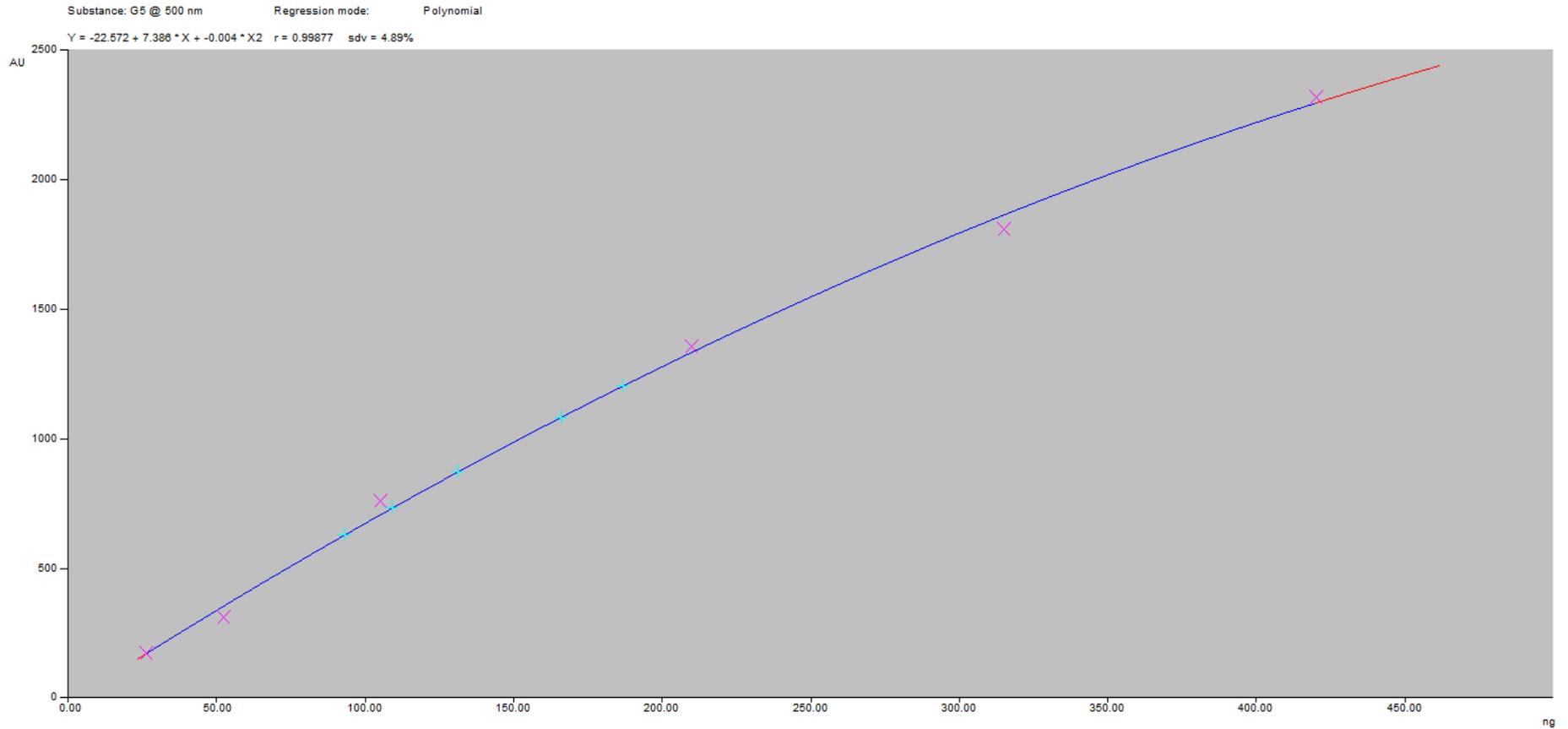
Substance: G2 @ 500 nm Regression mode: Polynomial

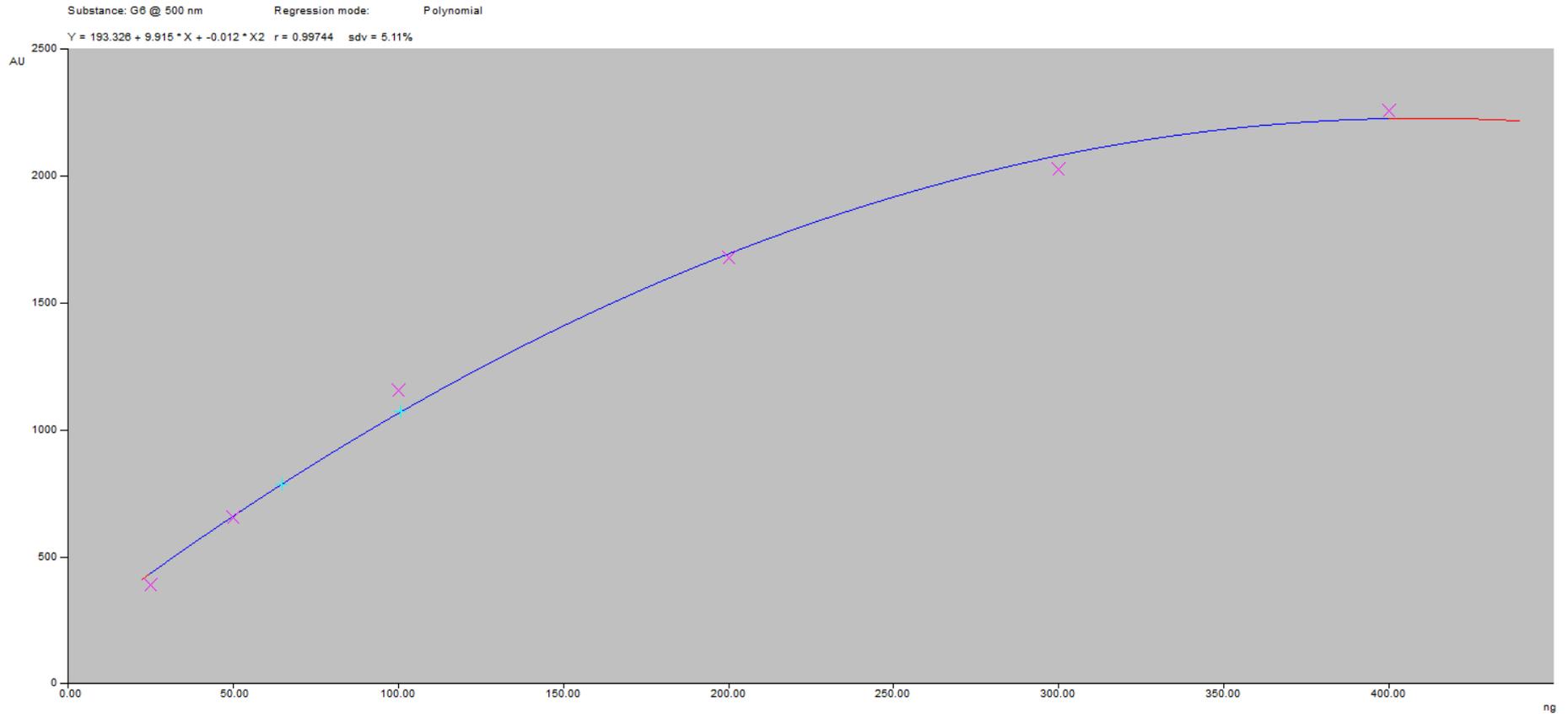
$$Y = 120.591 + 11.035 * X + -0.009 * X^2 \quad r = 0.99910 \quad \text{sdv} = 3.64\%$$





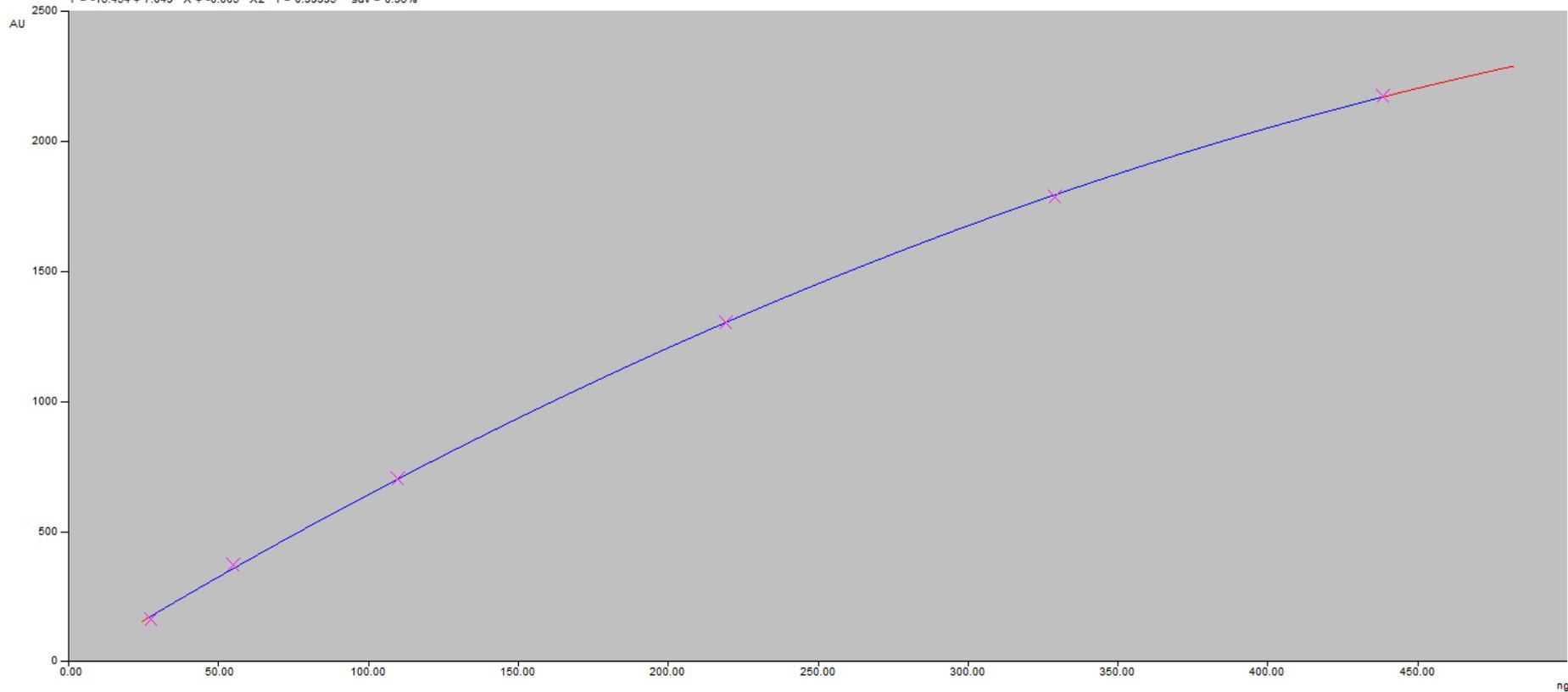






Substance: G7 @ 500 nm Regression mode: Polynomial

$$Y = -16.454 + 7.049 * X + -0.005 * X^2 \quad r = 0.99995 \quad \text{sdv} = 0.96\%$$



Toutes les enzymes ont été préparées de la même façon :

- dilution au 1/100 dans de l'eau distillée, agitation pendant 20 minutes
- centrifugation à 4000 T/min pendant 5 minutes puis filtration avec filtre 0.45 μ .

La solution substrat d'amidon préparée est à 4% : 2 g d'amidon dans 50 ml d'eau distillée avec une ébullition de 2 minutes. Ajout de 0,5 ml de solution tampon d'acétate 2M pH 4,5.

Le pH du substrat est ajusté à pH 4,5 avec de la soude 32%.

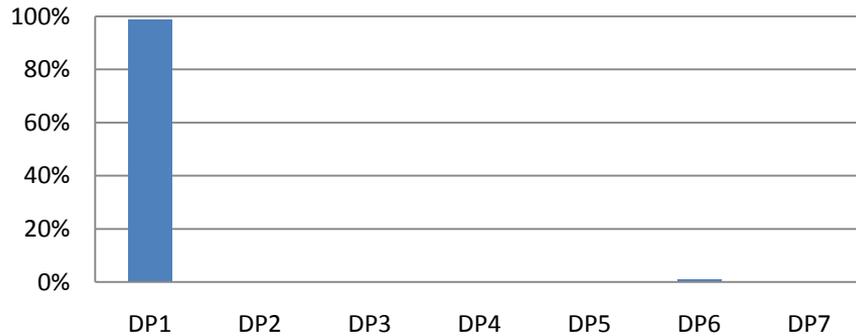
- Introduire dans des tubes à hémolyse en verre 1 ml de la solution enzymatique
- Disposer les tubes 5 minutes dans l'eau glacée.
- Ajouter 1 ml de substrat (sous agitation) dans les tubes contenant la solution enzymatique.
- Couvrir avec du papier aluminium.
- Incuber exactement 40 minutes à 25°C.
- Arrêter la réaction en mettant les tubes 5 minutes à 100°C.
- Refroidir les tubes 5 minutes dans un bain d'eau à température ambiante.
- Agiter soigneusement chaque tube.
- Avant l'analyse en HPTLC, tous les milieux réactionnels (mélange Enzyme/substrat) sont filtrés avec un filtre 0,45 µ.

Exemple avec Enz 496

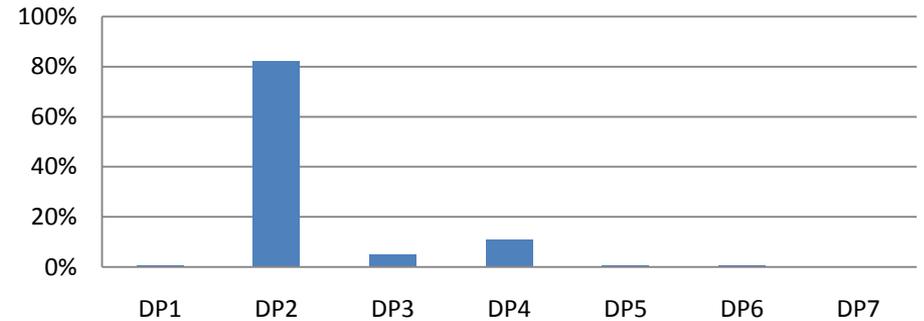


| Enz 496 [g/l]/ g d'Enz | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 | DP5 | DP6 | DP7 |
|-------------------------------------|------|------|-------|--------|-----|-----|-----|
| | 28,1 | 26,3 | 111,4 | 1597,2 | 0 | 0 | 0 |
| Répartition en % des DP produits | 2% | 1% | 6% | 91% | 0% | 0% | 0% |

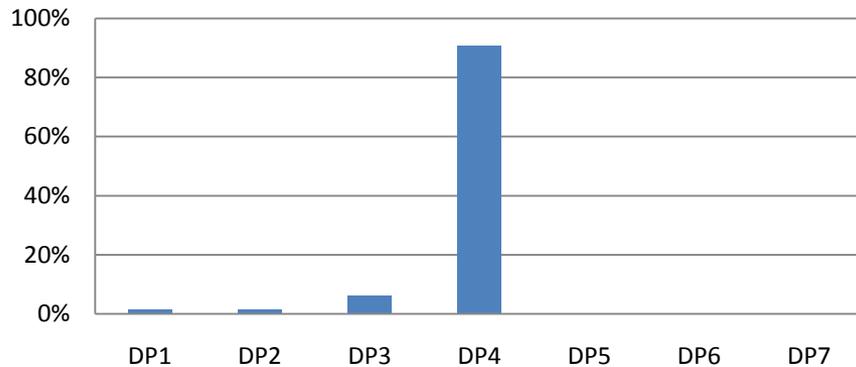
Répartition en % des DP produits par Enz 487



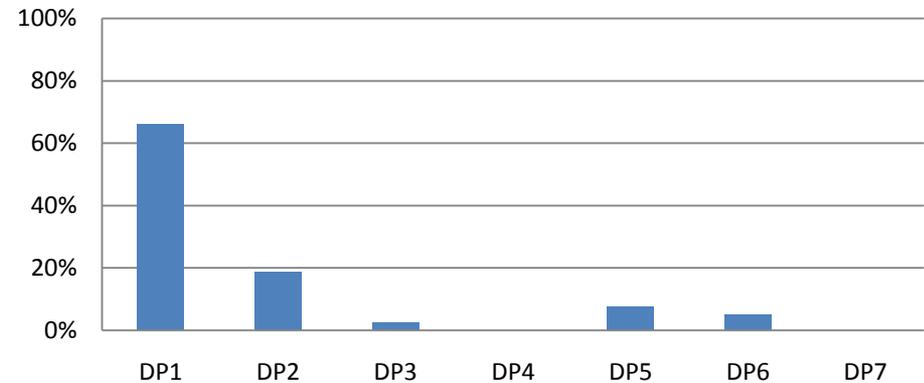
Répartition en % des DP produits par Enz 458



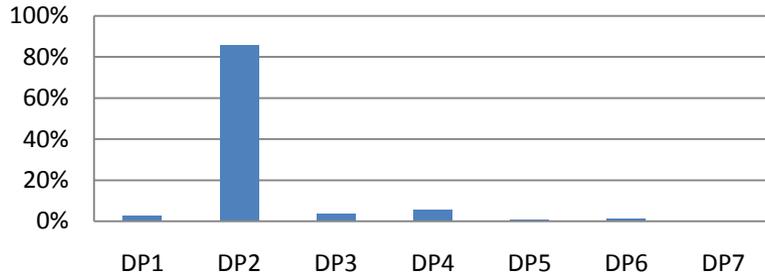
Répartition en % des DP produits par Enz 496



Répartition en % des DP produits par Sensea

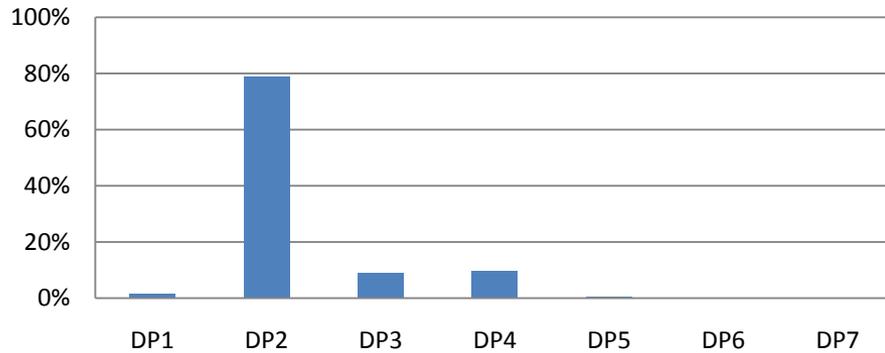


Répartition en % des DP produits par Enz 494



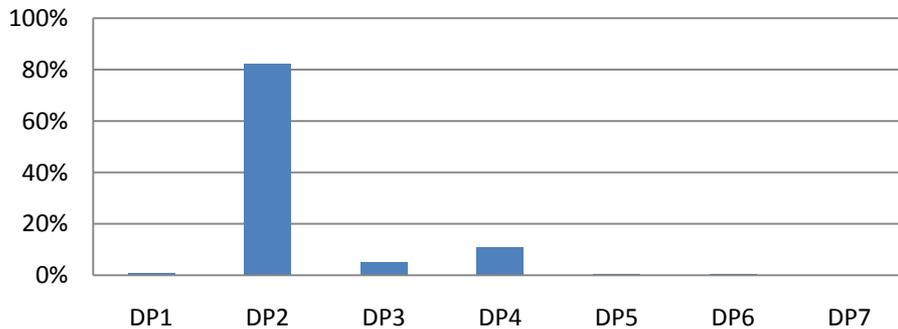
| Enz 494 [g/l]/ g d'Enz | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 | DP5 | DP6 | DP7 |
|-------------------------------------|------|--------|-------|-------|------|------|-----|
| | 77,5 | 2410,2 | 108,0 | 154,1 | 20,5 | 33,5 | 0 |
| Répartition en % des DP produits | 3% | 86% | 4% | 5% | 1% | 1% | 0% |

Répartition en % des DP produits par Enz 491



| Enz 491 [g/l]/ g d'Enz | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 | DP5 | DP6 | DP7 |
|-------------------------------------|------|--------|-------|-------|-----|-----|-----|
| | 29,0 | 1357,8 | 156,4 | 166,7 | 8,6 | 5,5 | 0 |
| Répartition en % des DP produits | 2% | 79% | 9% | 10% | 1% | 0% | 0% |

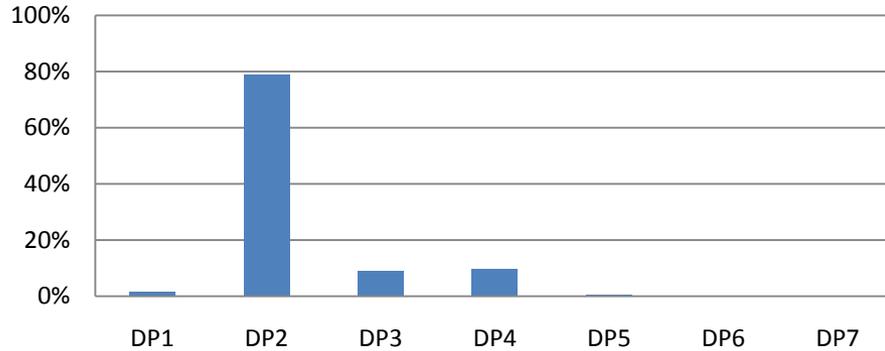
Répartition en % des DP produits par Enz 458



| Enz 458 [g/l]/ g d'Enz | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 | DP5 | DP6 | DP7 |
|-------------------------------------|------|--------|------|-------|------|-----|-----|
| | 11,9 | 1320,9 | 79,9 | 175,1 | 7,8 | 9,1 | 0 |
| Répartition en % des DP produits | 1% | 83% | 5% | 11% | 0,5% | 1% | 0% |

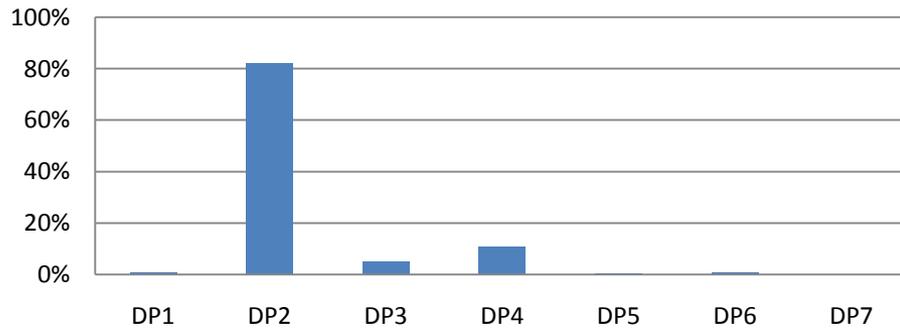
| | DP2/DP4 |
|---------|---------|
| Enz 494 | 15,64 |
| Enz 491 | 8,15 |
| Enz 458 | 7,54 |

Répartition en % des DP produits par Enz 491



| Enz 491 [g/l] / g d'Enz | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 | DP5 | DP6 | DP7 |
|----------------------------------|------|--------|-------|-------|-----|-----|-----|
| Enz 491 [g/l] / g d'Enz | 29,0 | 1357,8 | 156,4 | 166,7 | 8,6 | 5,5 | 0 |
| Répartition en % des DP produits | 2% | 79% | 9% | 10% | 1% | 0% | 0% |

Répartition en % des DP produits par Enz 458

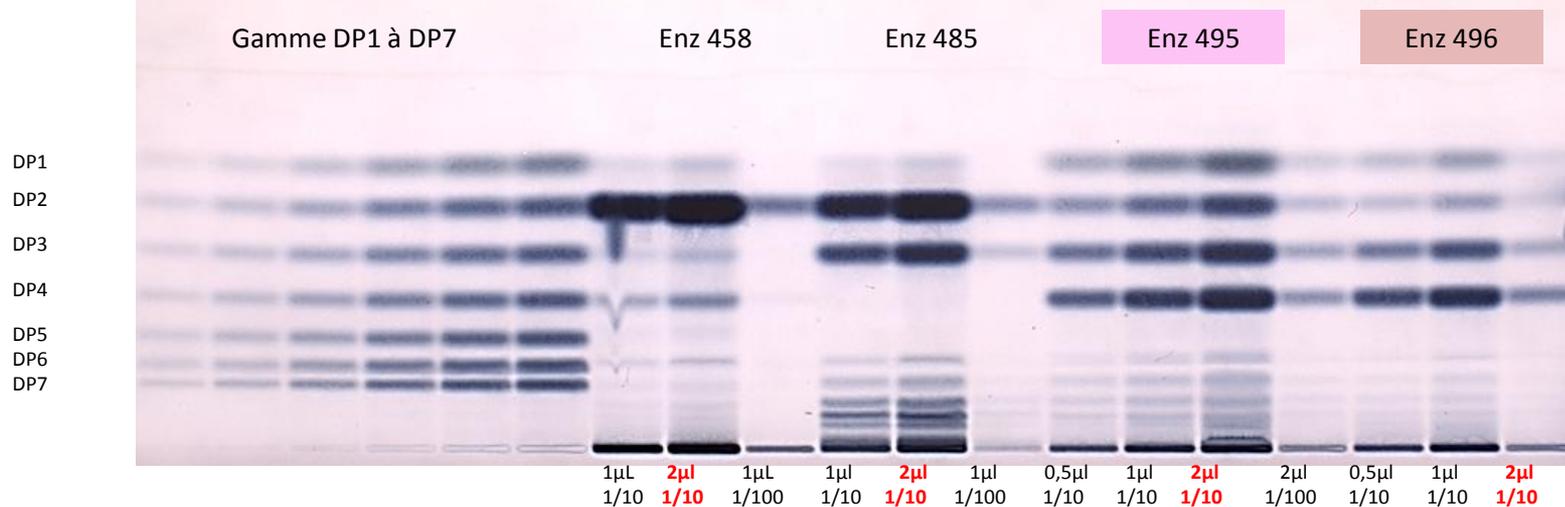


| Enz 458 [g/l] / g d'Enz | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 | DP5 | DP6 | DP7 |
|----------------------------------|------|--------|------|-------|------|-----|-----|
| Enz 458 [g/l] / g d'Enz | 11,9 | 1320,9 | 79,9 | 175,1 | 7,8 | 9,1 | 0 |
| Répartition en % des DP produits | 1% | 83% | 5% | 11% | 0,5% | 1% | 0% |

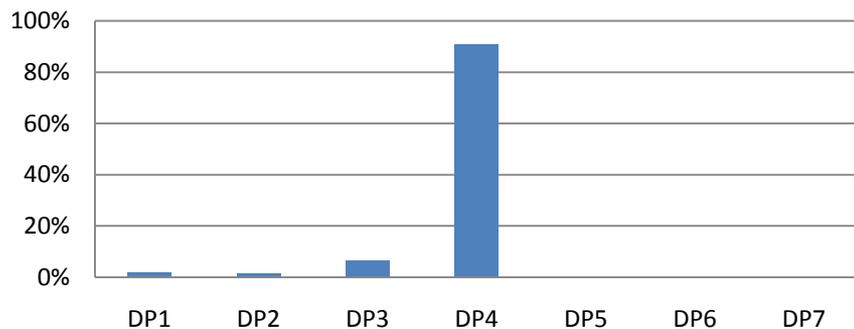
| | DP2/DP1 | DP2/DP3 |
|---------|---------|---------|
| Enz 491 | 46,82 | 8,68 |
| Enz 458 | 111,00 | 16,53 |

| | Céralpha u/g | Bétamyl-3 u/g | Manu u/g | AMG u/g |
|---------|--------------|---------------|----------|---------|
| Enz 496 | 1596 | 3 | 3 | 7 |
| Enz 495 | 1882 | 4 | 4 | 10 |

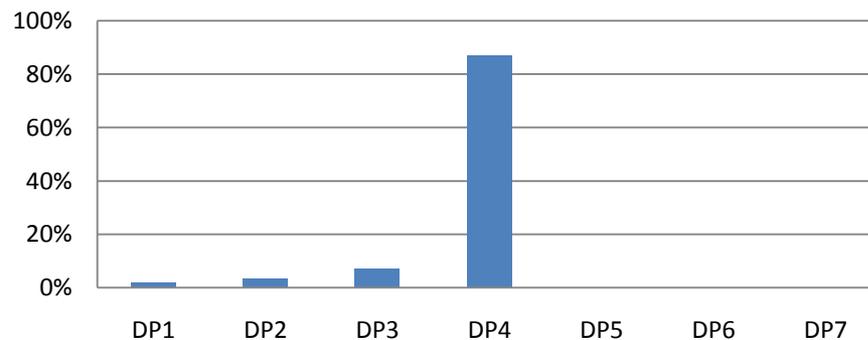
Solvant de développement:
ACN/Acétone (1:1) / eau (75:25)



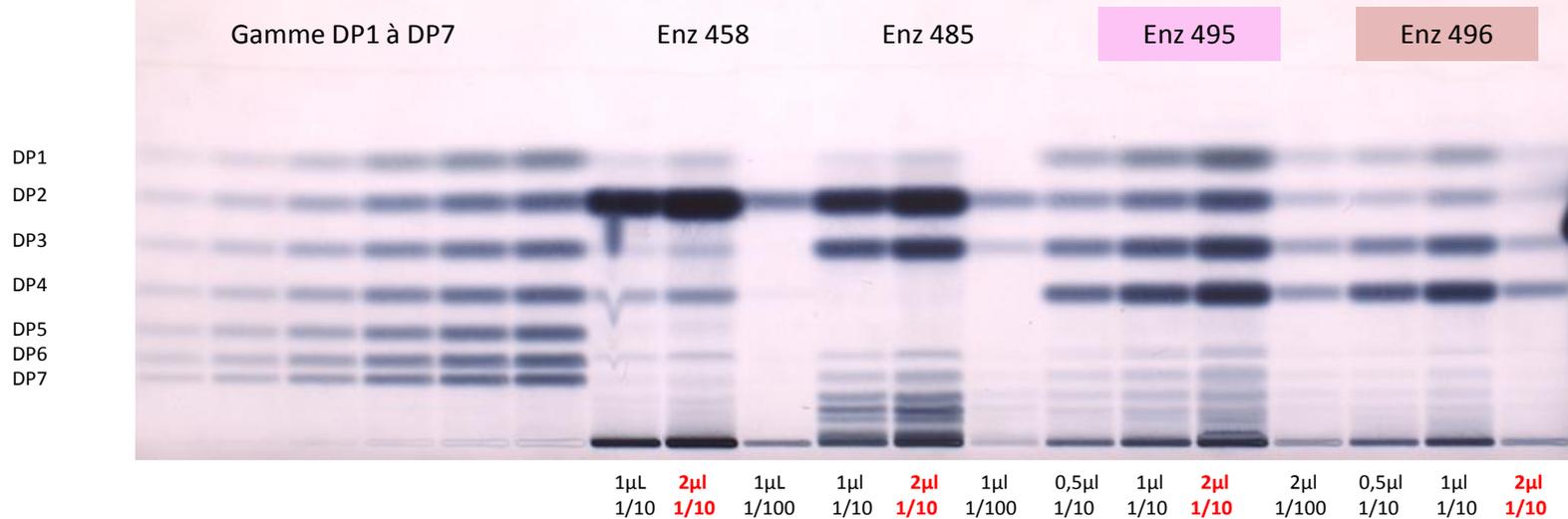
Répartition en % des DP produits par Enz 496



Répartition en % des DP produits par Enz 495

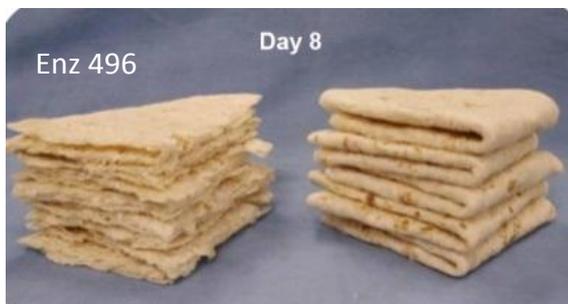


Solvant de développement:
ACN/Acétone (1:1) / eau (75:25)



| Enz 495 [g/l]/ g d'Enz | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 |
|-------------------------------------|------|------|-------|--------|
| | 51,4 | 91,0 | 183,1 | 2181,8 |
| Répartition en % des DP produits | 2% | 4% | 7% | 87% |

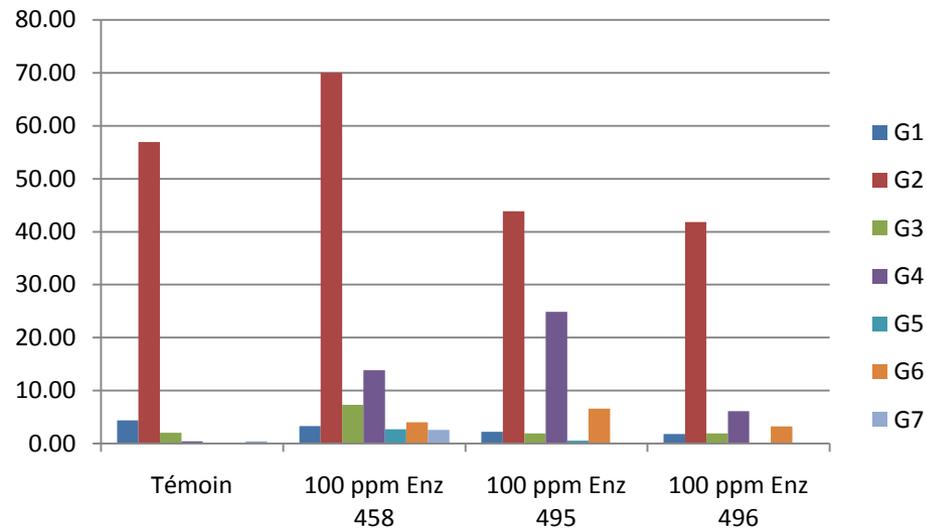
| Enz 496 [g/l]/ g d'Enz | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 |
|-------------------------------------|------|------|-------|--------|
| | 28,1 | 26,3 | 111,4 | 1597,2 |
| Répartition en % des DP produits | 2% | 1% | 6% | 91% |

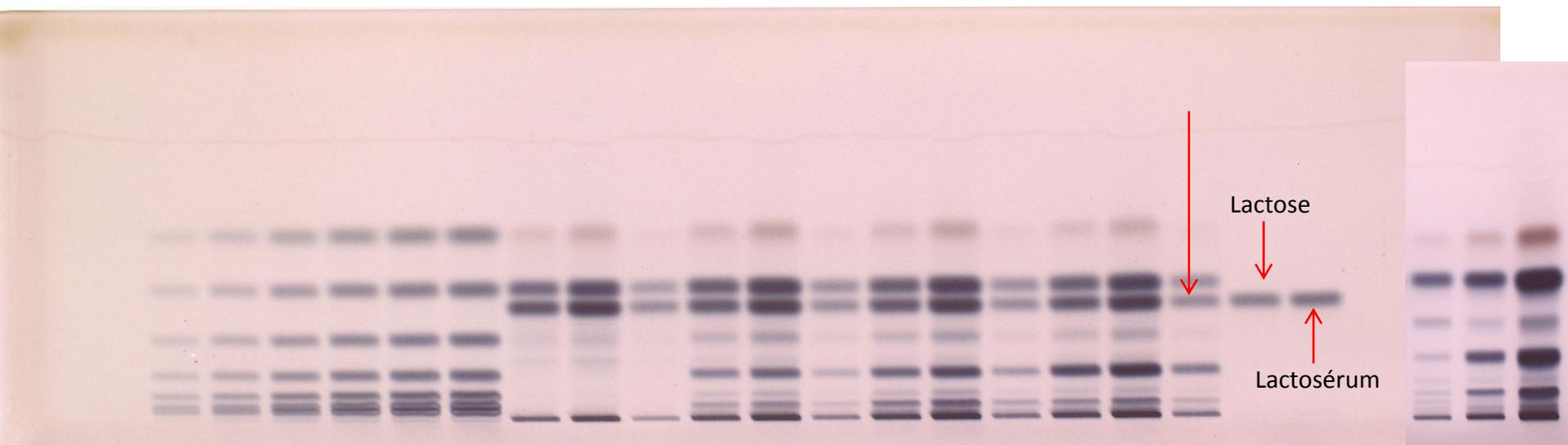


| | DP4/DP2 |
|---------|---------|
| Enz 495 | 23,98 |
| Enz 496 | 60,73 |



Dosage DP1 à DP7 sur mie de pain





- Dosage Amylase sur matrice mie de pain
- Dosage lipase sur substrat DGDG