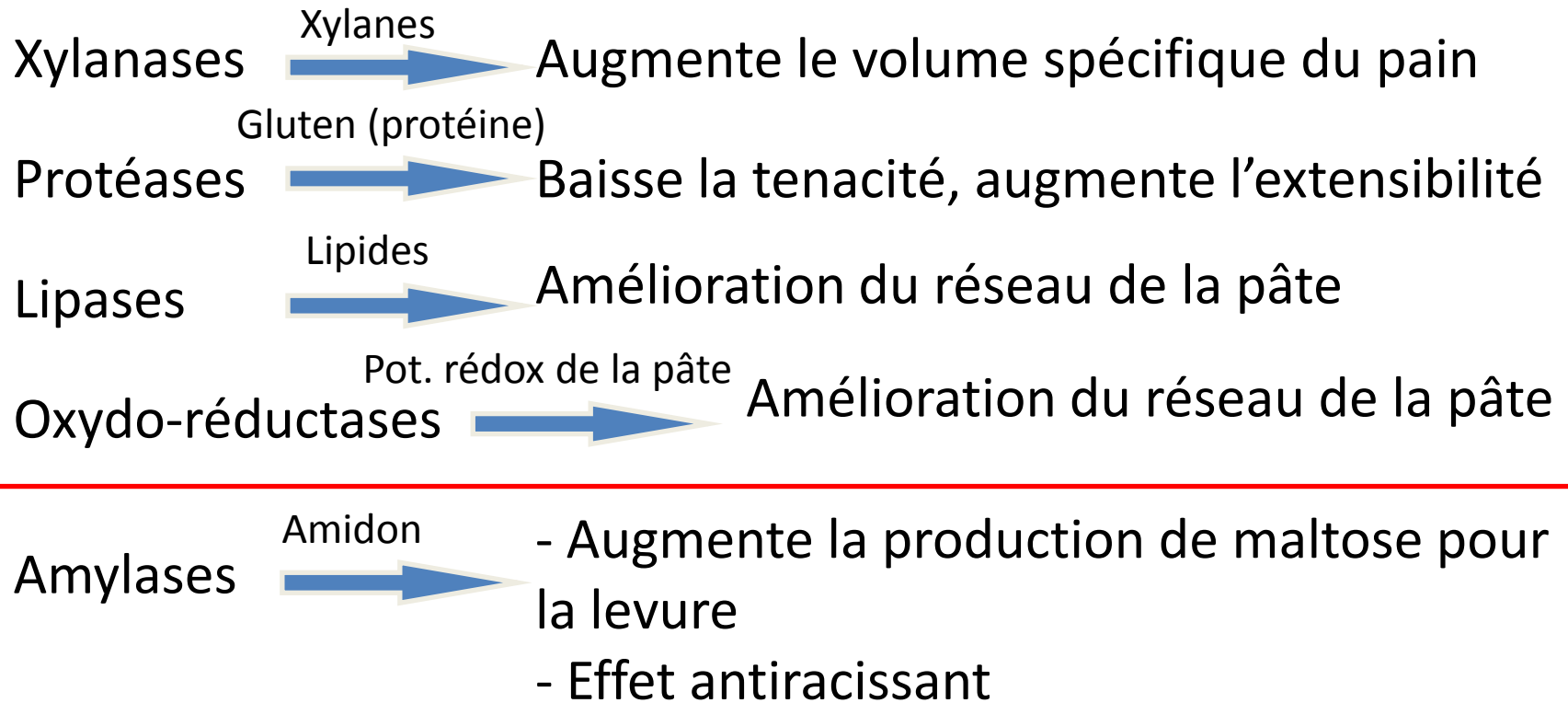




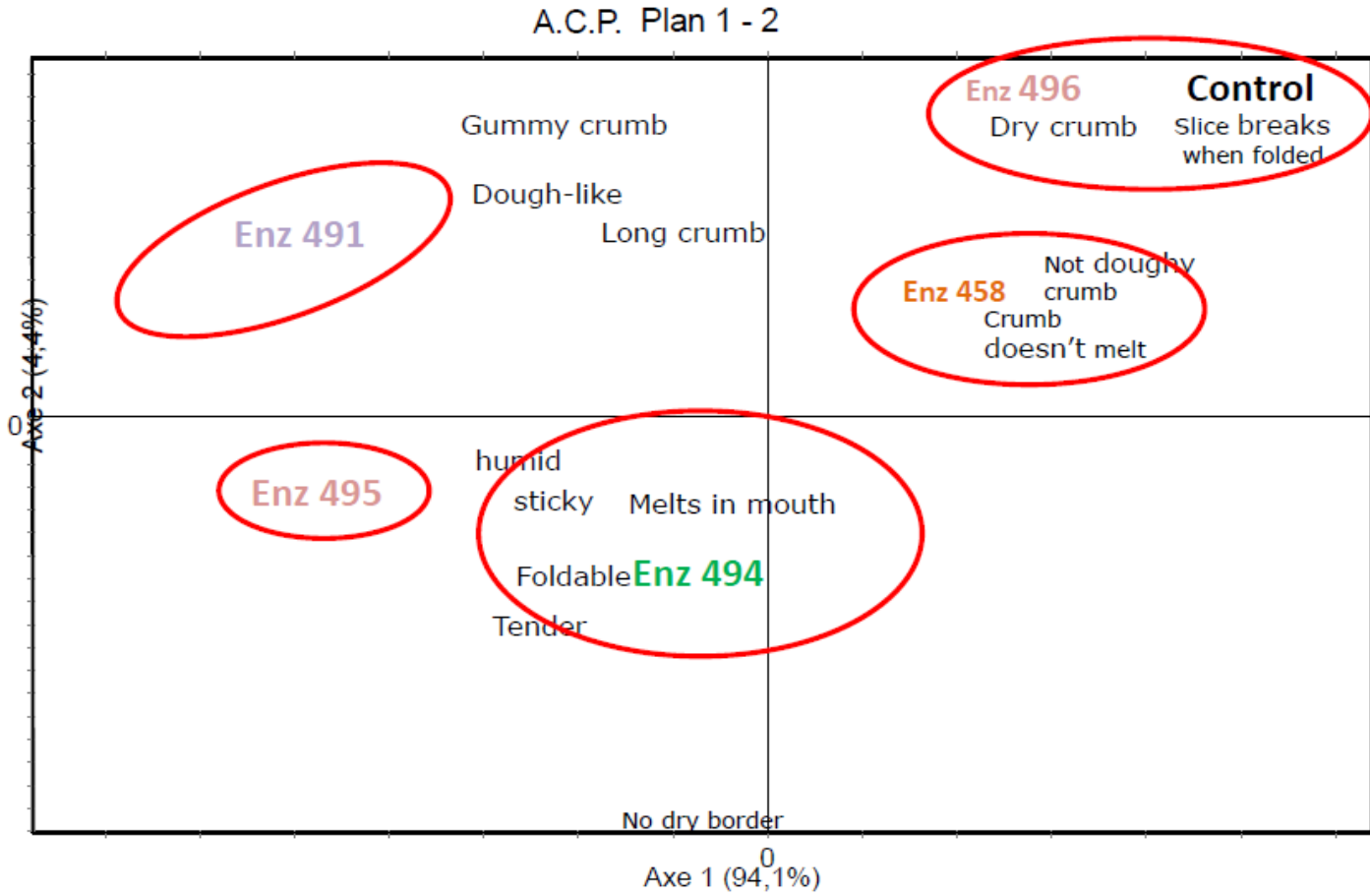
## Une de nos missions :

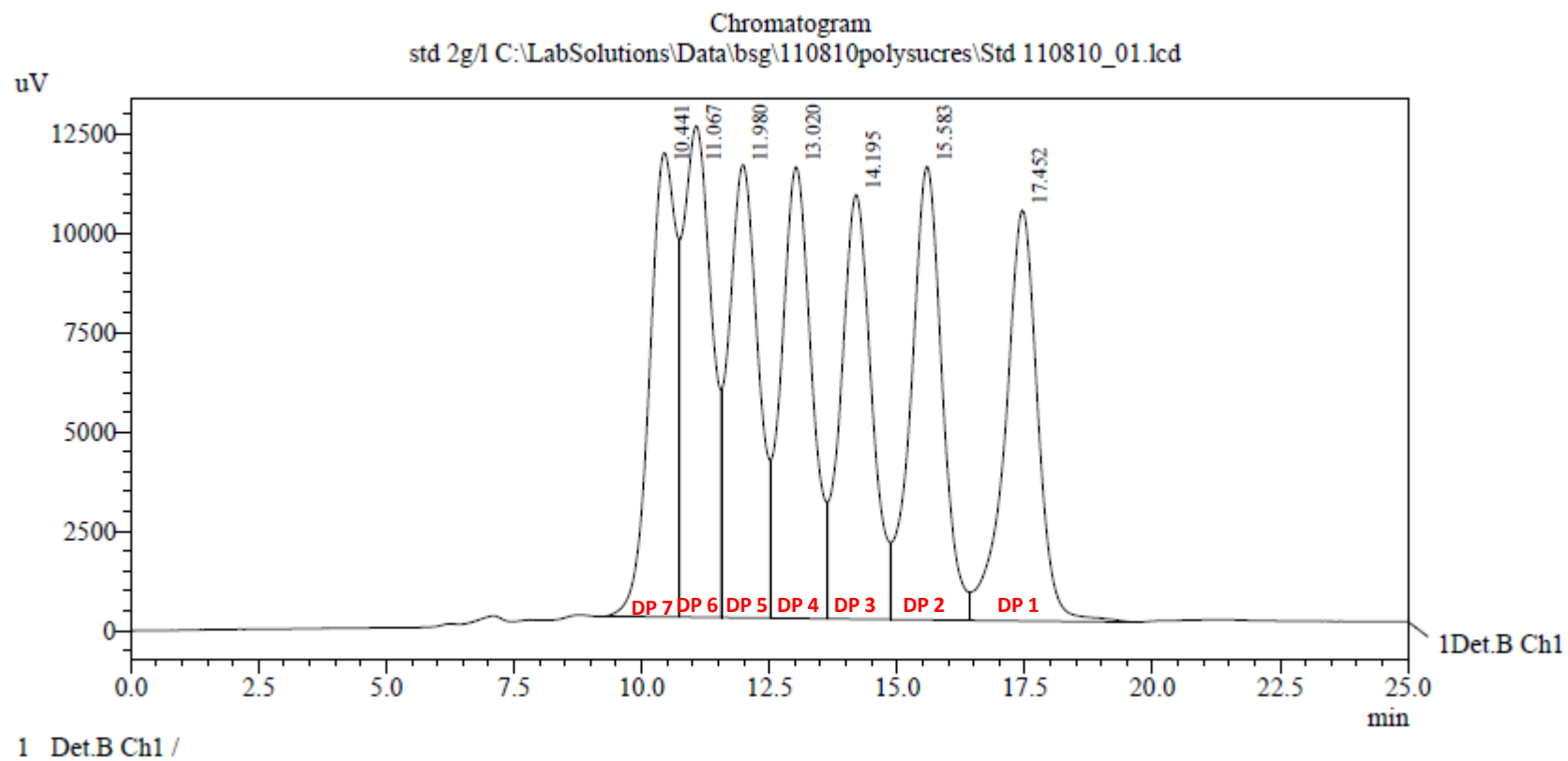
**Savoir identifier et discriminer les différentes enzymes proposées sur le marché.**

**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**



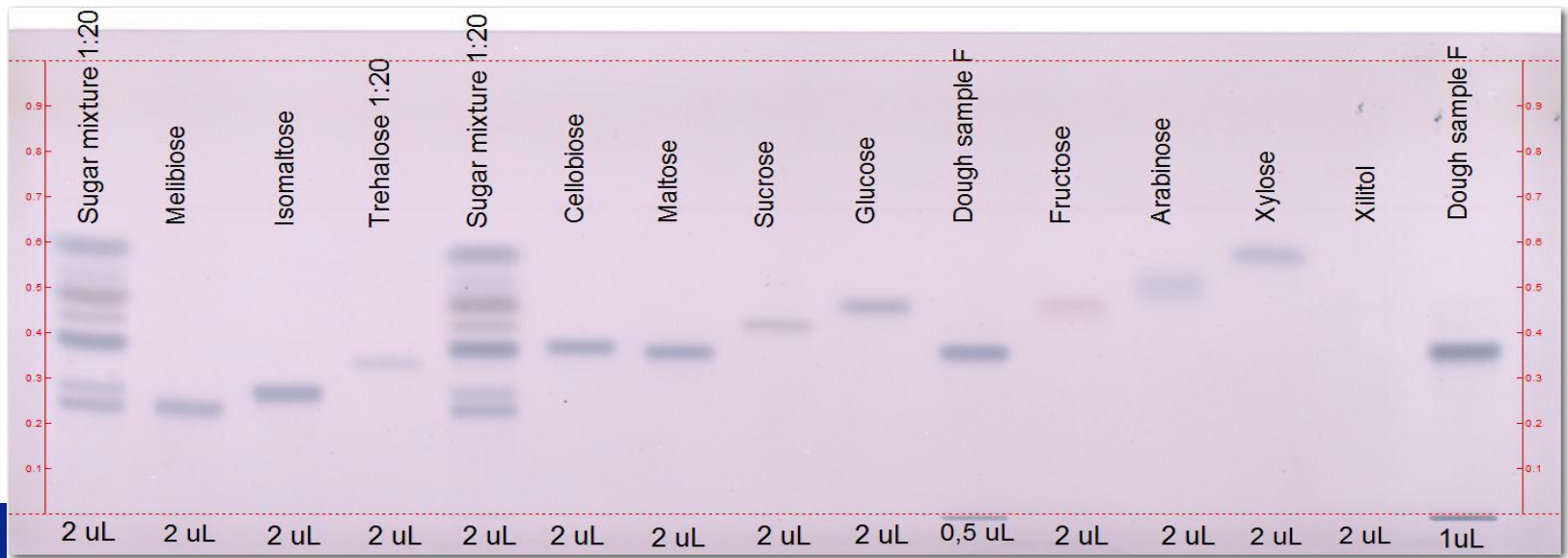
# Problématique Amylases





## Méthode CAMAG :

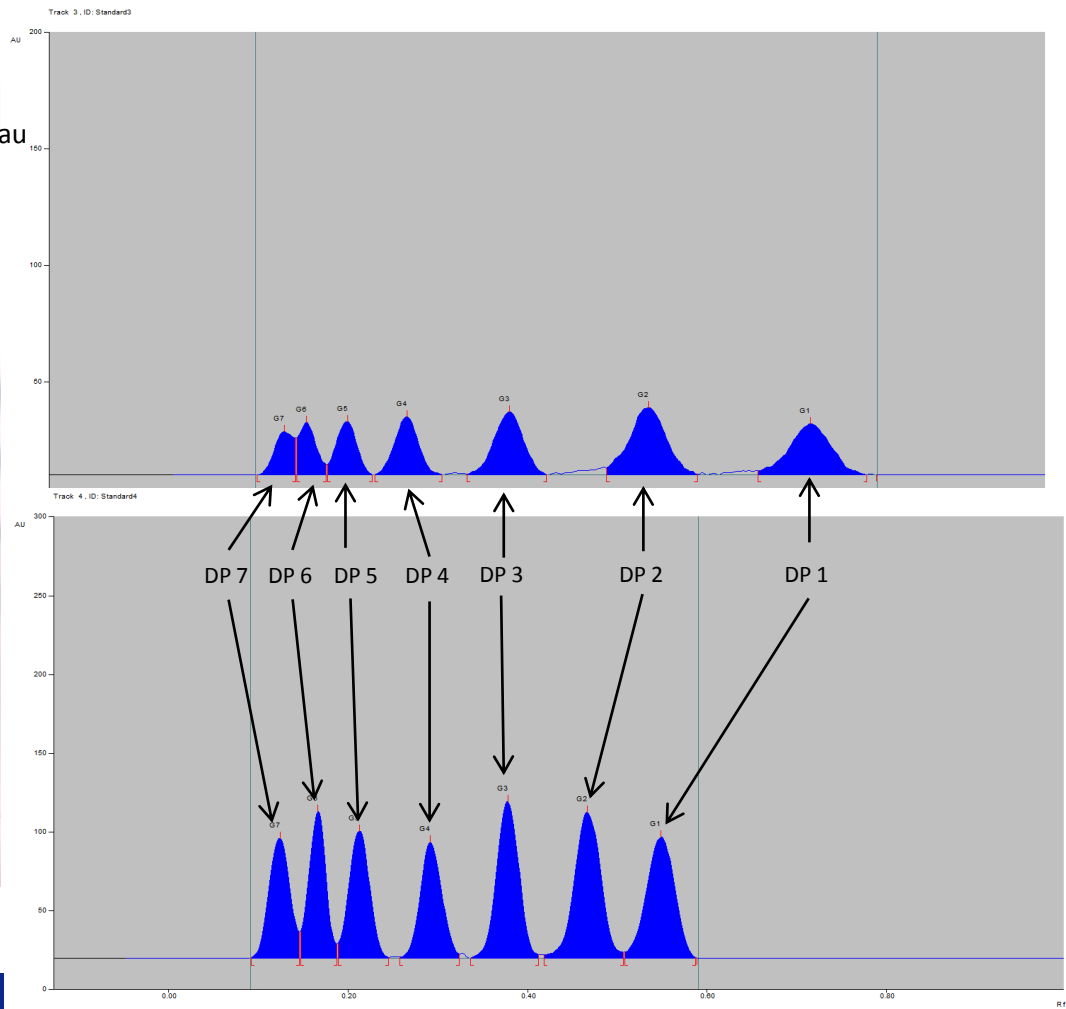
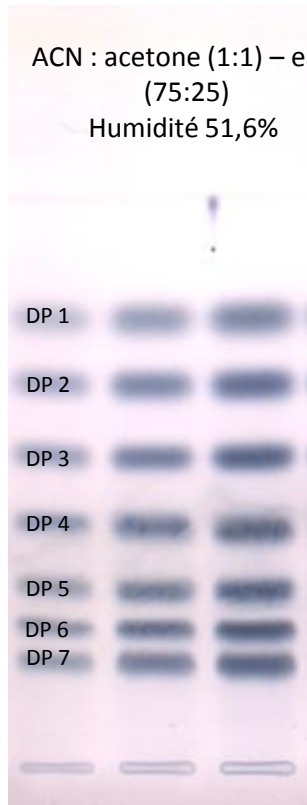
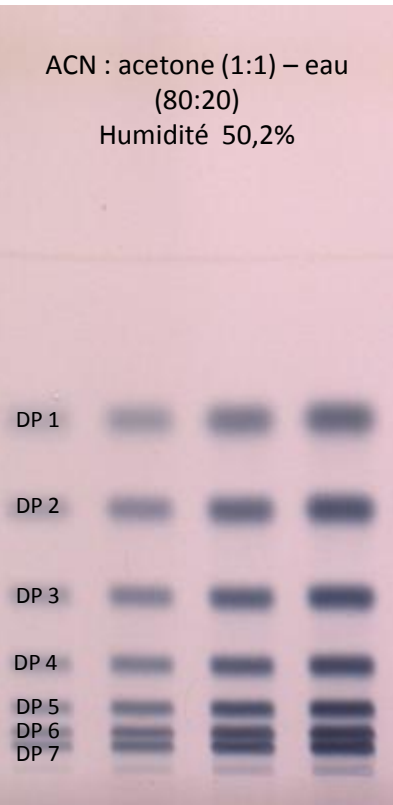
- Plaque: silica gel 60 F254 (ATS 4)
- Solvant de migration: Acetonitrile : acetone (1:1) – eau (80:20) (ADC2)
- Saturation: 20 min avec papier filtre
- Humidité: 50,2%
- Séchage 5 minutes
- réactif de dérivatisation : Aniline-diphénylamine- acide phosphorique (cuve à immersion)
- chauffage 15 minutes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



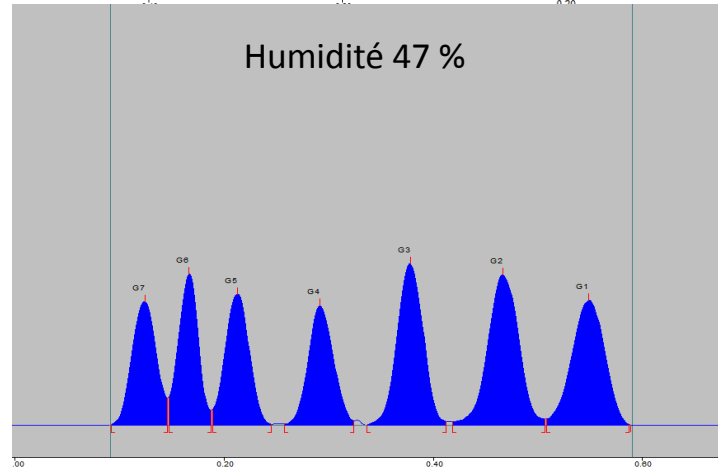
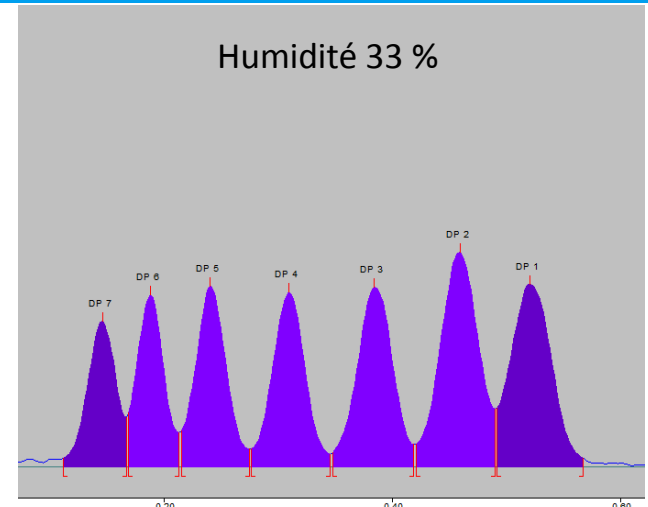
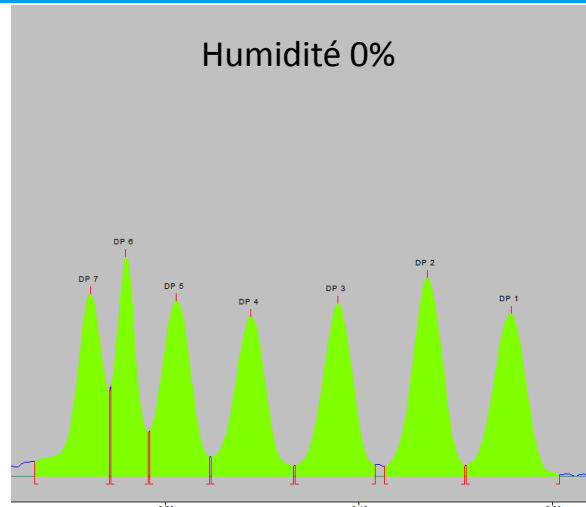
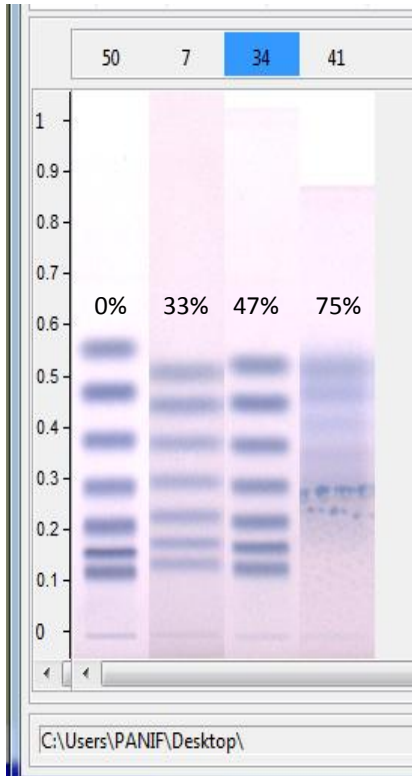
## Méthode CAMAG sur DP1 à DP7:

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

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





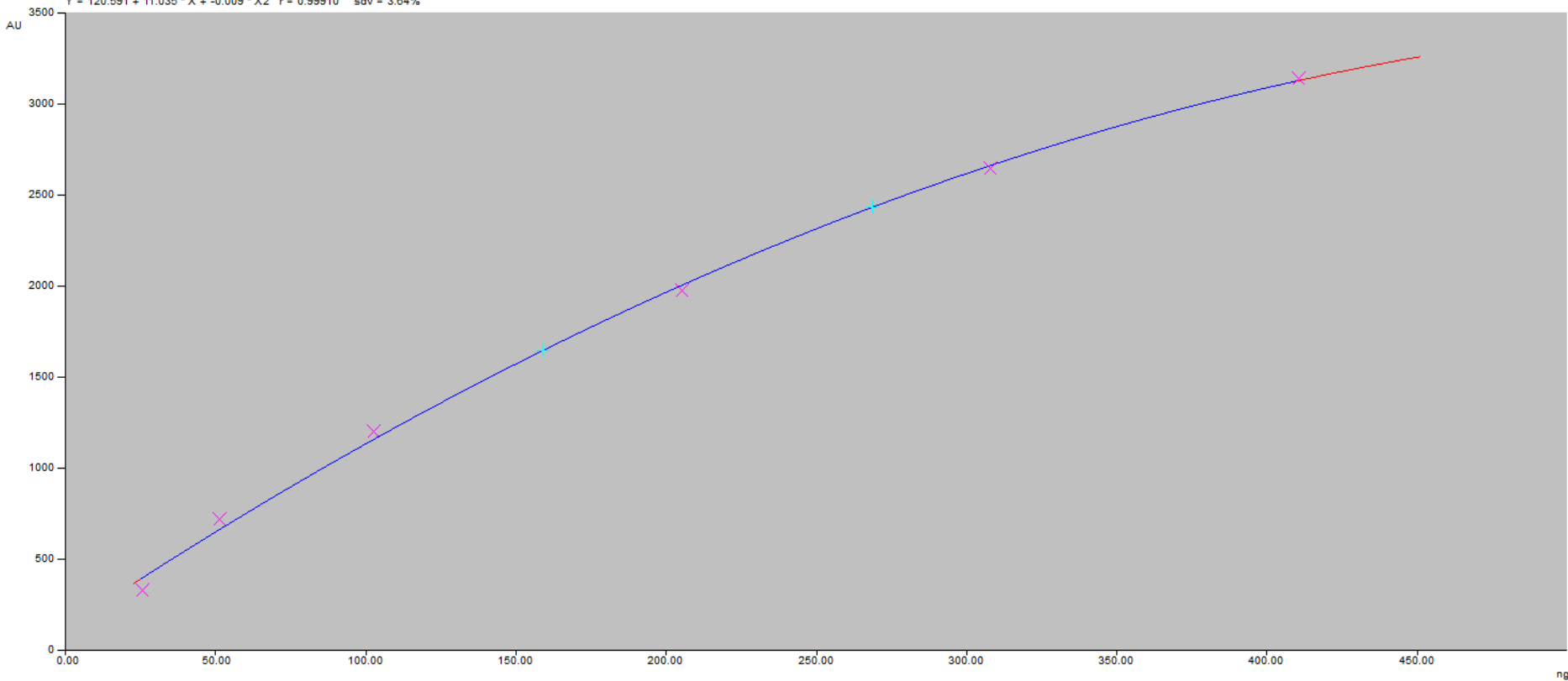


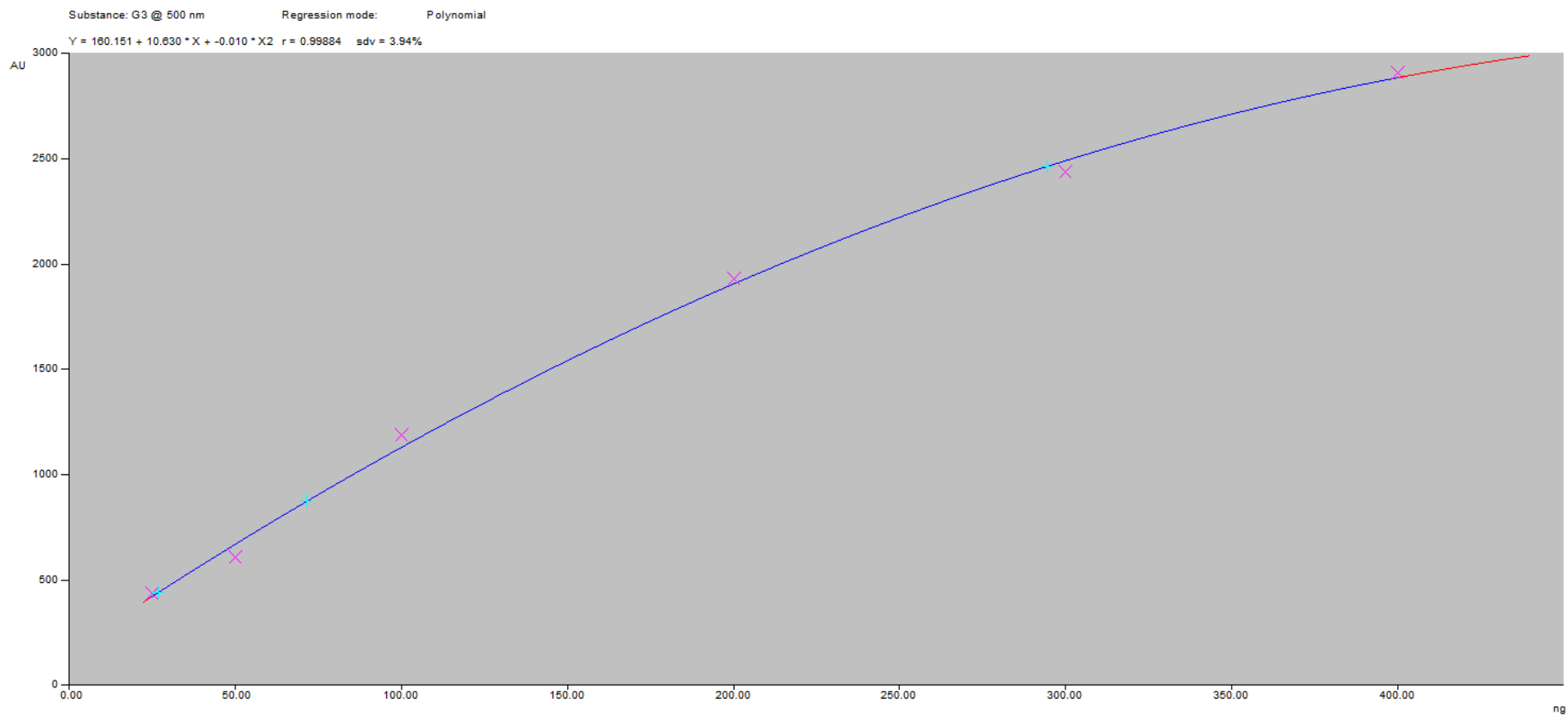
## Gamme DP1 (Glucose)

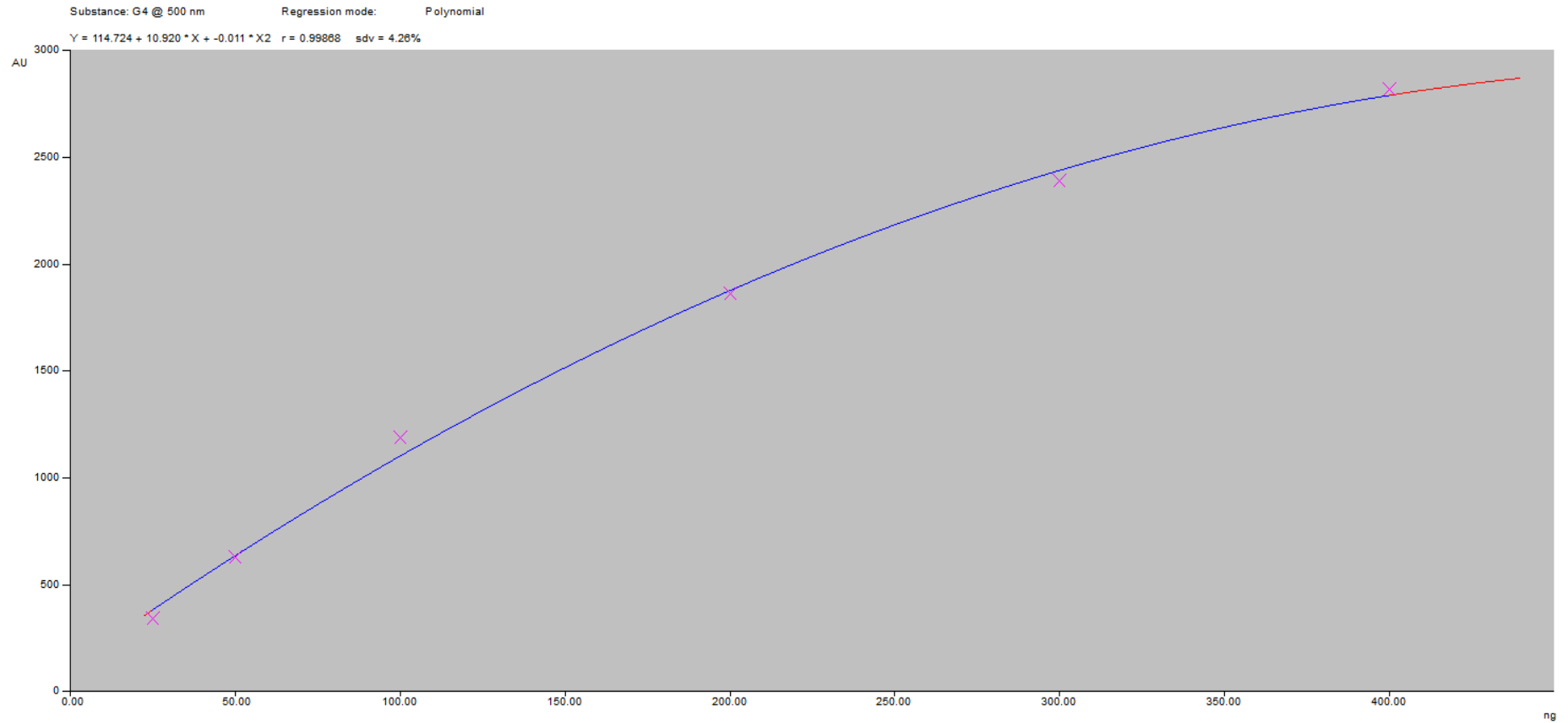
Track	Vial	Rf	Amount Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	
1	A2	0.55		23.70	70.95 ng	480.64	73.49 ng	Sample Enz 496 1/3 pesée 1
2	A1	0.55	164.13 ng	43.14		868.73		Std Level 4
3	A6							Sample Enz 496 1/10 pesée 2: No peak detected or peak deleted
4	A10							Sample Enz 496 1/50 pesée 3: No peak detected 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

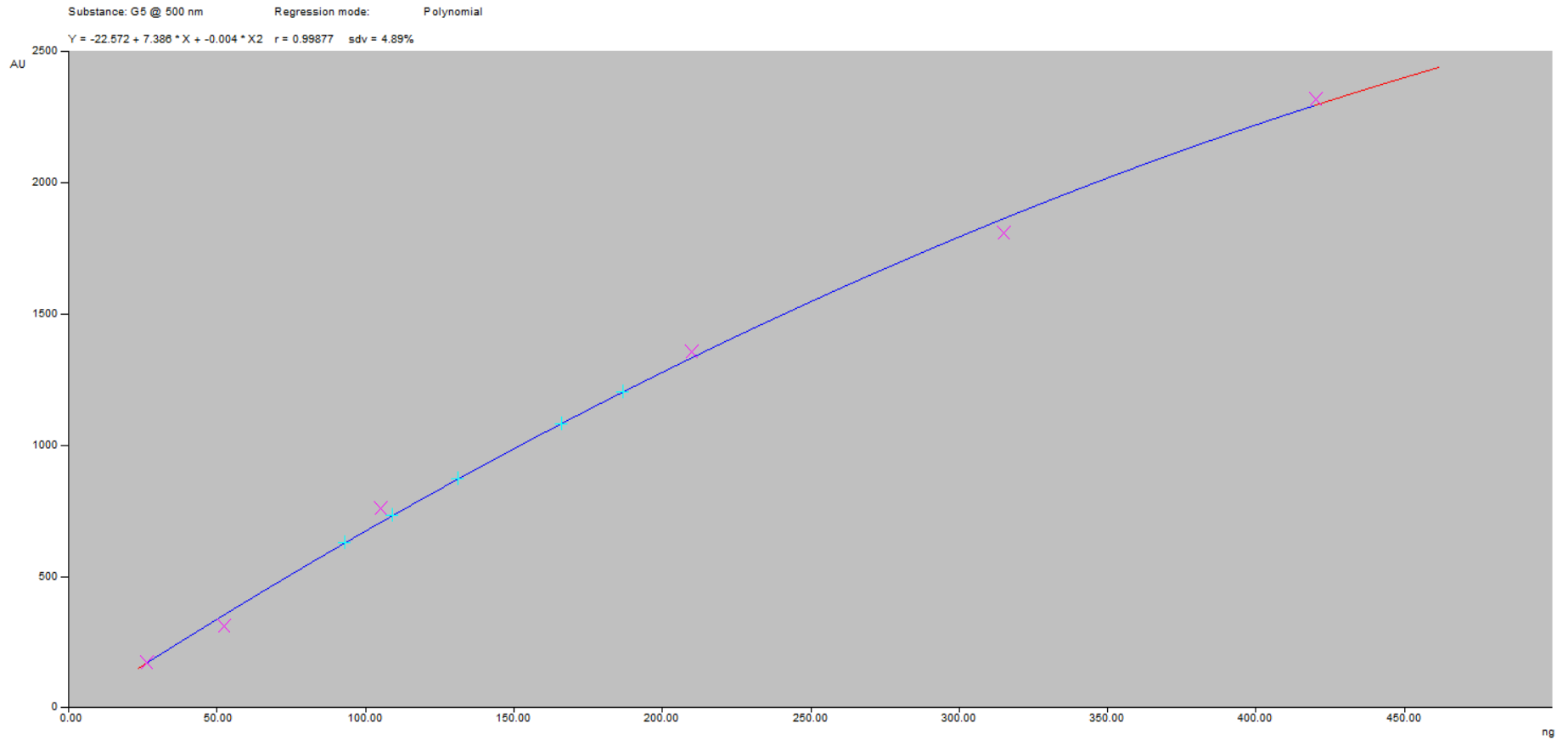
Substance: G2 @ 500 nm      Regression mode: Polynomial

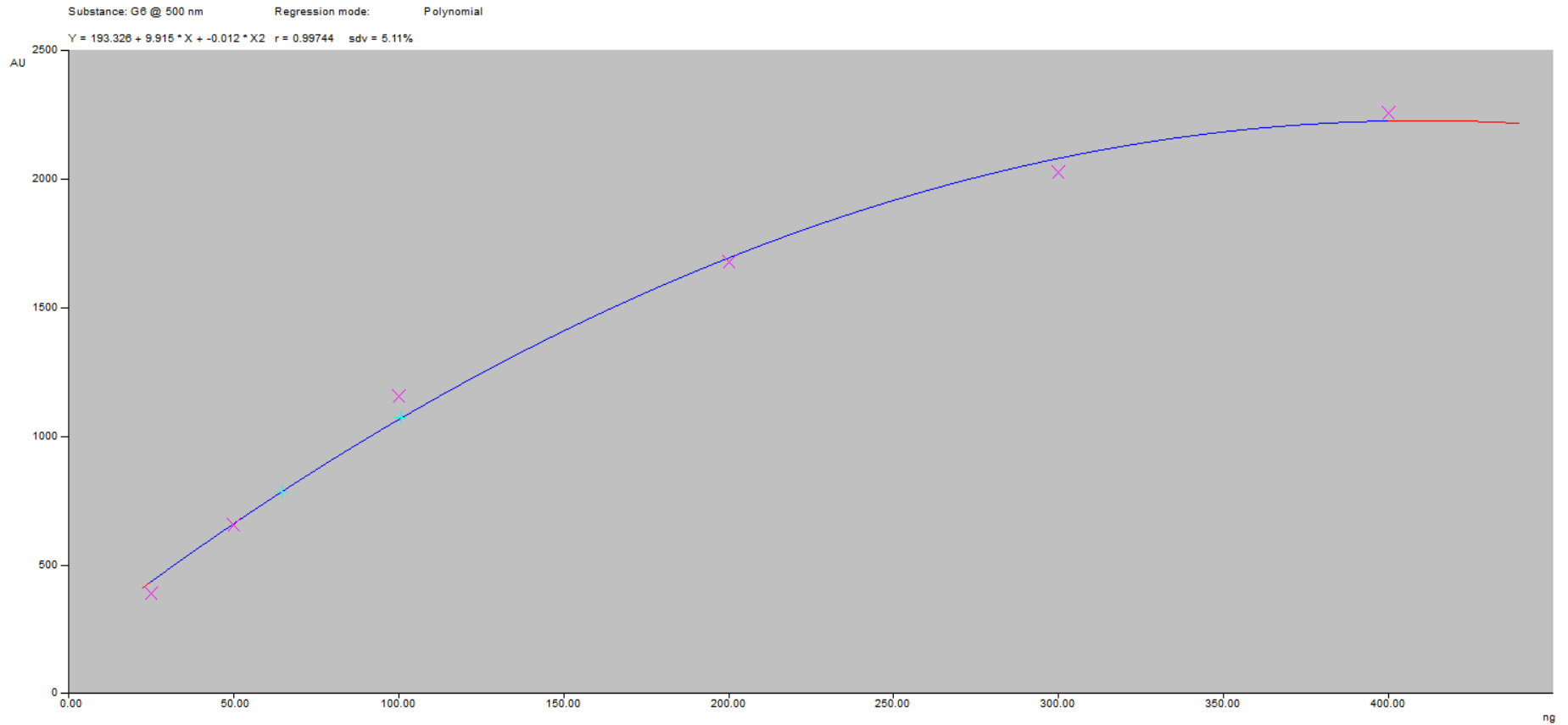
$Y = 120.591 + 11.035 * X + -0.009 * X^2$      $r = 0.99910$      $sdv = 3.64\%$





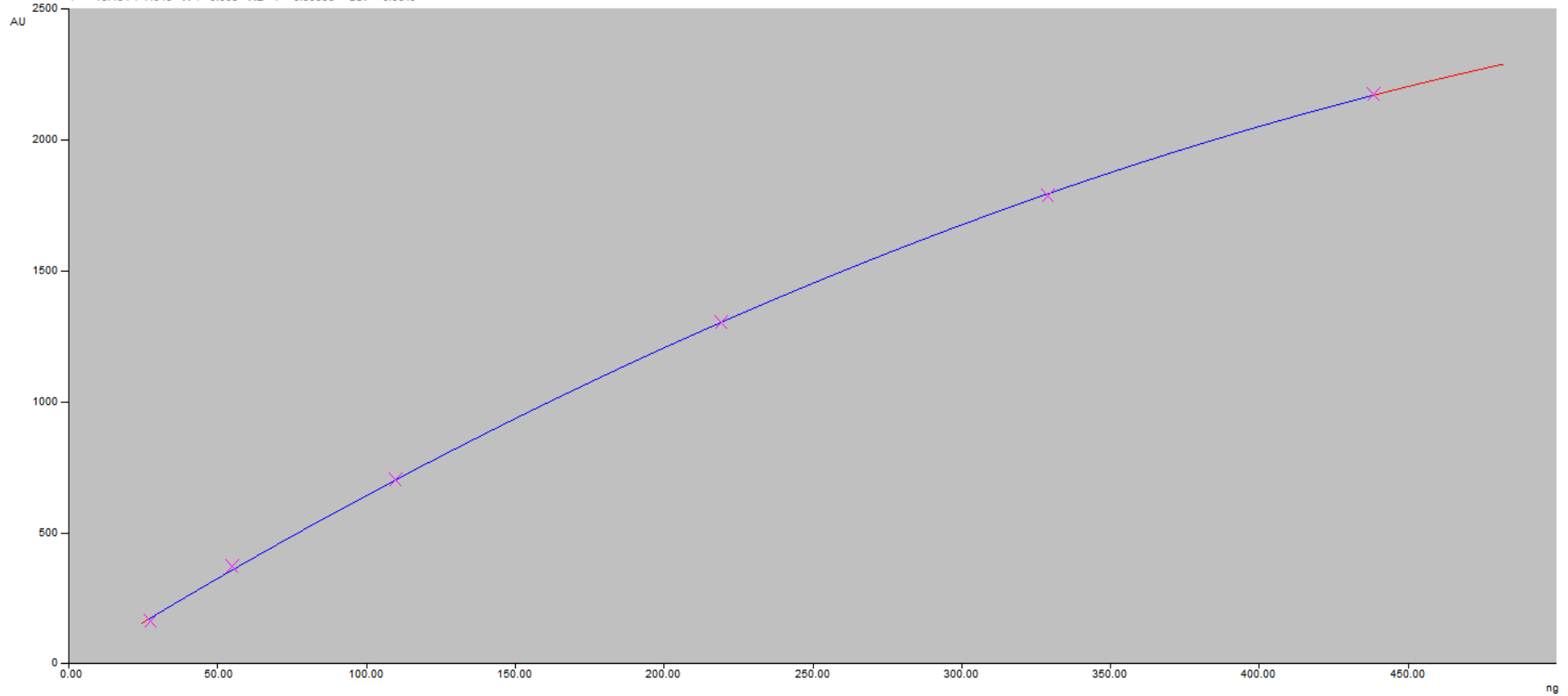






Substance: G7 @ 500 nm      Regression mode: Polynomial

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





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  $\mu$ .

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%.

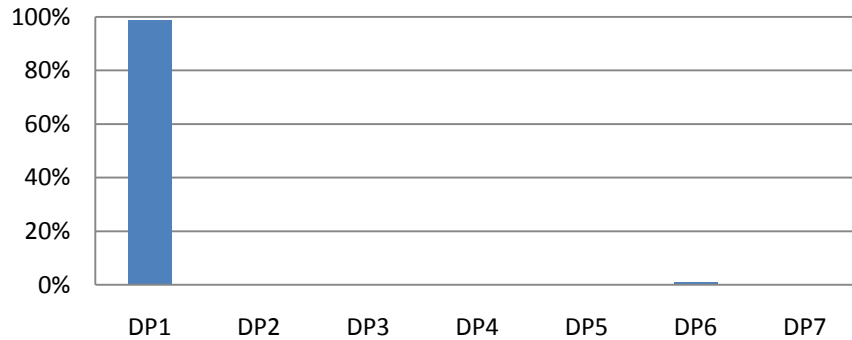
- Introduire dans des tubes à hémolyse en verre 1 ml de la solution enzymatique
- Disposer les tubes 5 minutes dans l'eau glacée.
- Ajouter 1 ml de substrat (sous agitation) dans les tubes contenant la solution enzymatique.
- Couvrir avec du papier aluminium.
- Incuber exactement 40 minutes à 25°C.
- 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

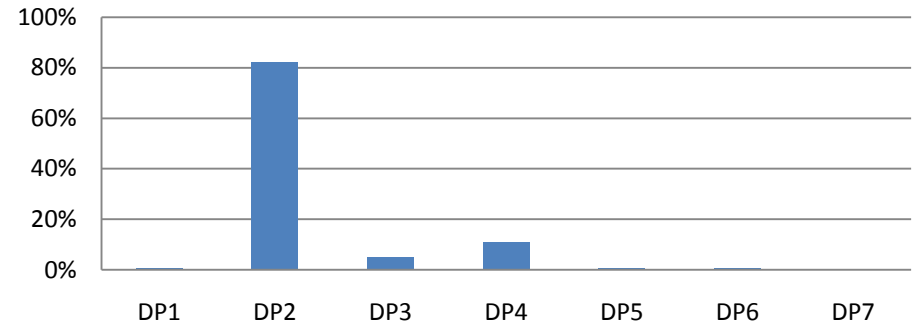


Enz 496 [g/l]/ g d'Enz	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7
	28,1	26,3	111,4	1597,2	0	0	0
Répartition en % des DP produits	2%	1%	6%	91%	0%	0%	0%

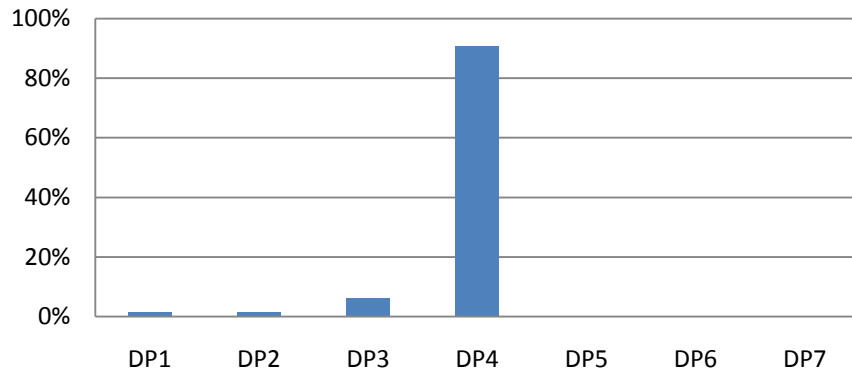
### Répartition en % des DP produits par Enz 487



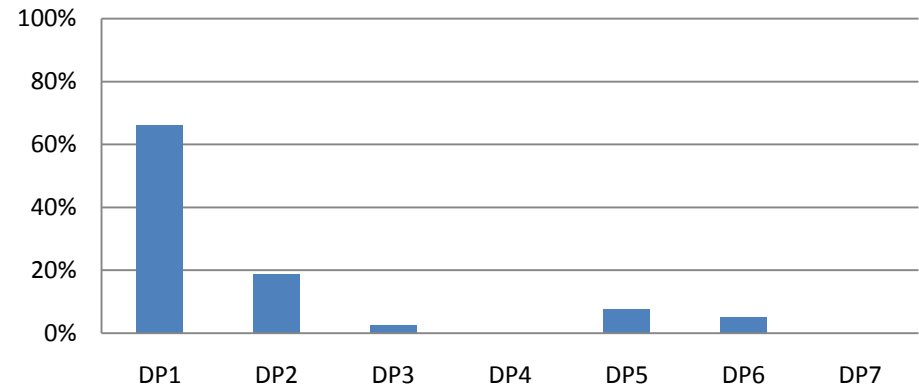
### Répartition en % des DP produits par Enz 458



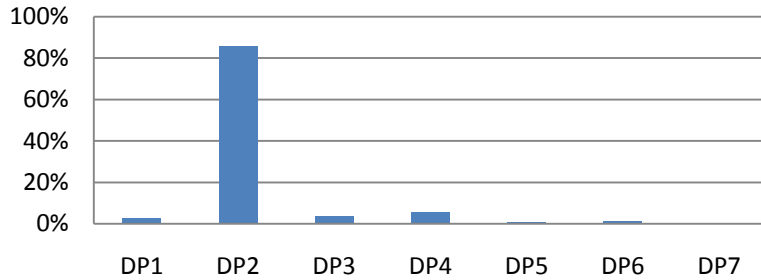
### Répartition en % des DP produits par Enz 496



### Répartition en % des DP produits par Sensea

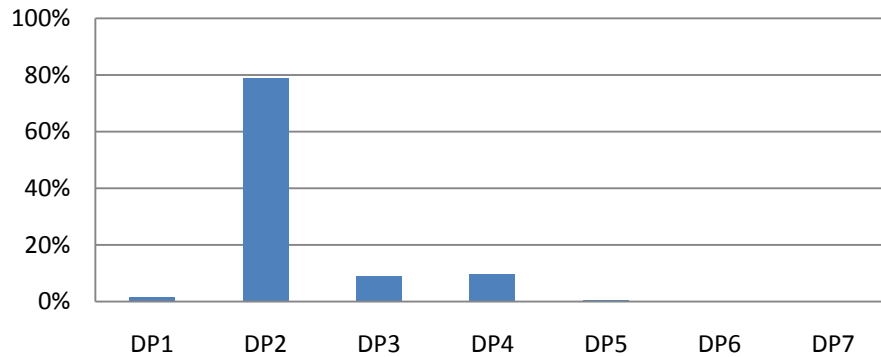


### Répartition en % des DP produits par Enz 494



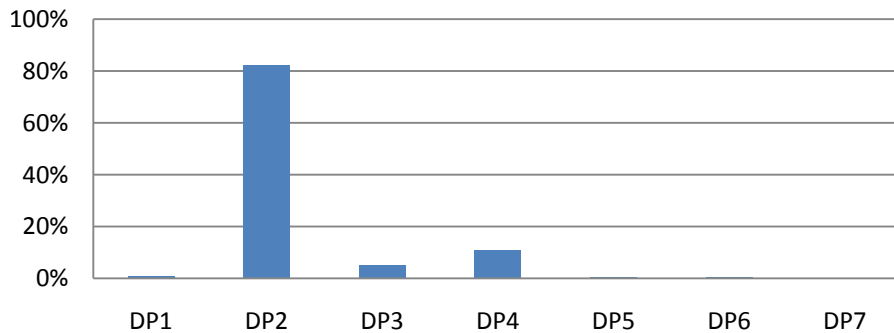
Enz 494 [g/l]/ g d'Enz	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7
	77,5	2410,2	108,0	154,1	20,5	33,5	0
Répartition en % des DP produits	3%	86%	4%	5%	1%	1%	0%

### 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%

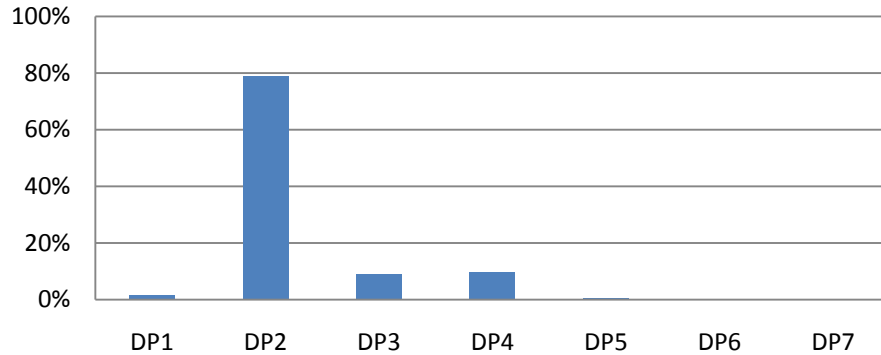
### Répartition en % des DP produits par Enz 458



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%

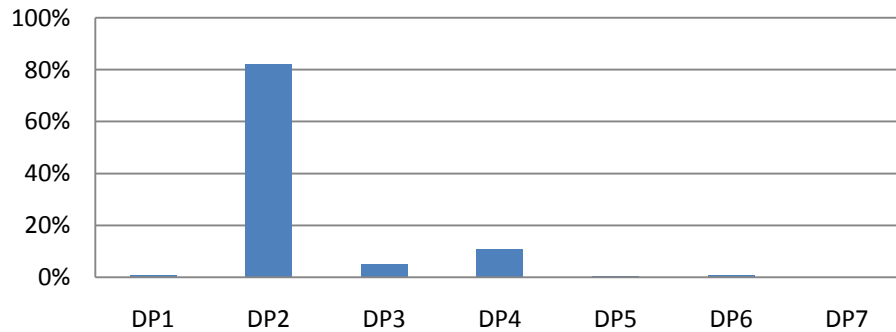
	DP2/DP4
Enz 494	15,64
Enz 491	8,15
Enz 458	7,54

### 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

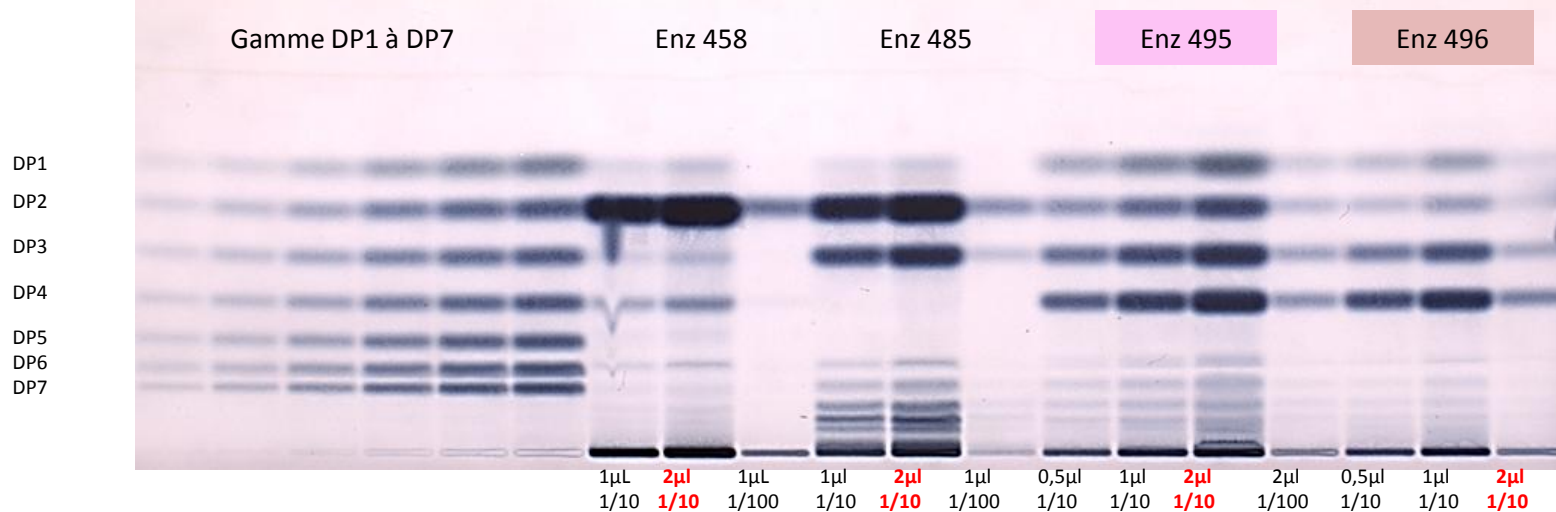


Enz 458 [g/l] / g d'Enz	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7
Enz 458 [g/l] / g d'Enz	11,9	1320,9	79,9	175,1	7,8	9,1	0
Répartition en % des DP produits	1%	83%	5%	11%	0,5%	1%	0%

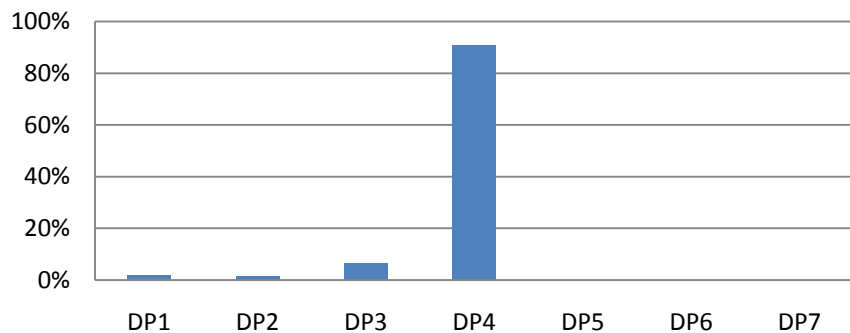
	DP2/DP1	DP2/DP3
Enz 491	46,82	8,68
Enz 458	111,00	16,53

	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

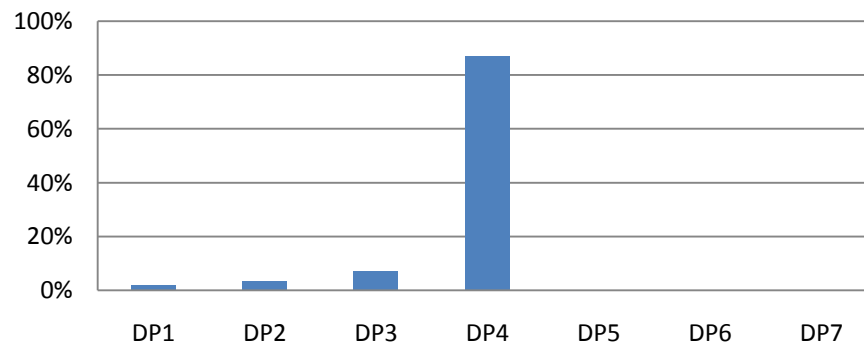
Solvant de développement:  
ACN/Acétone (1:1) / eau (75:25)



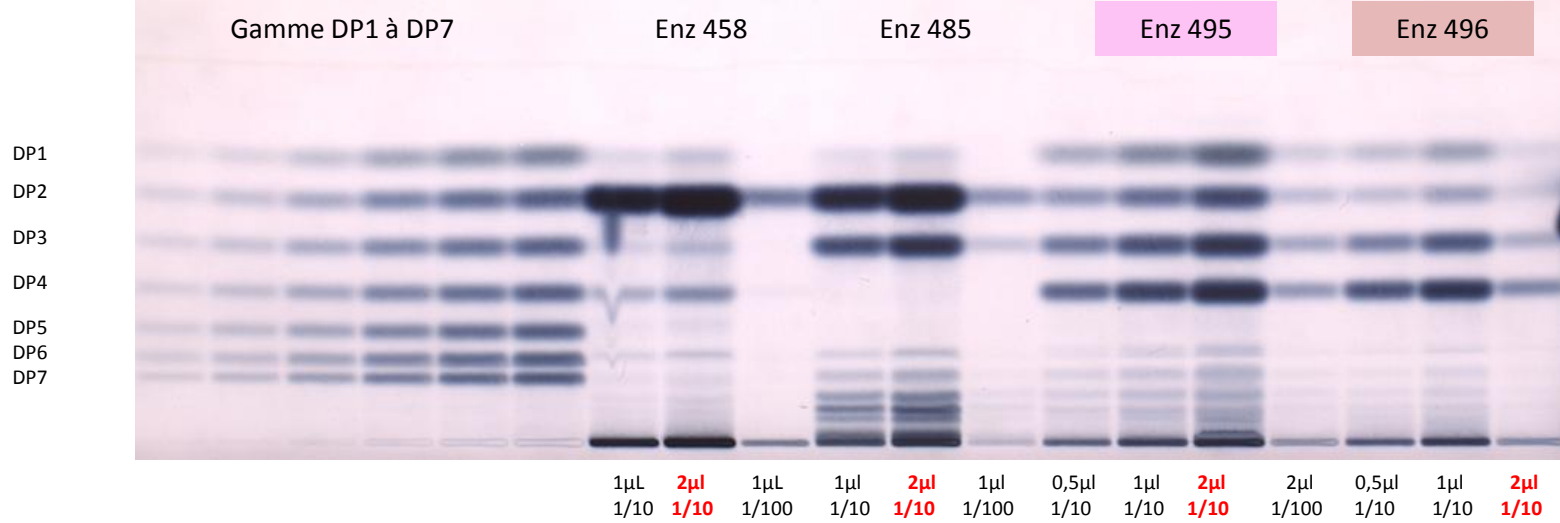
Répartition en % des DP produits par Enz 496



Répartition en % des DP produits par Enz 495

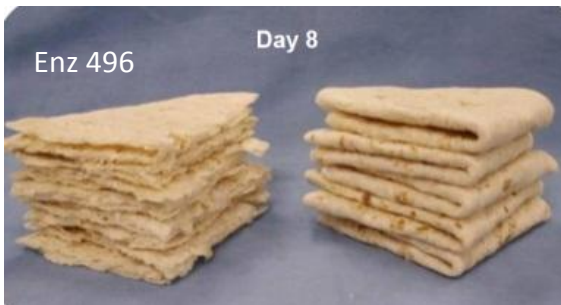


Solvant de développement:  
ACN/Acétone (1:1) / eau (75:25)



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%

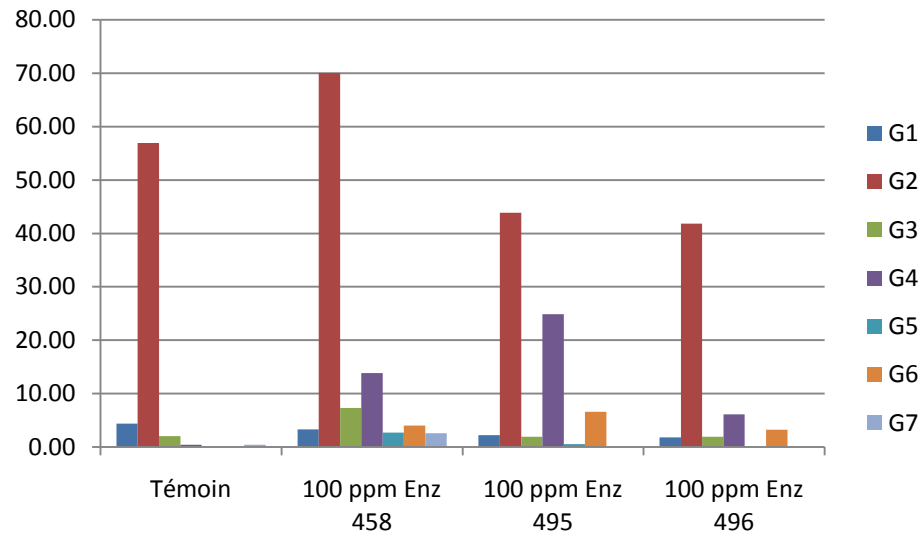


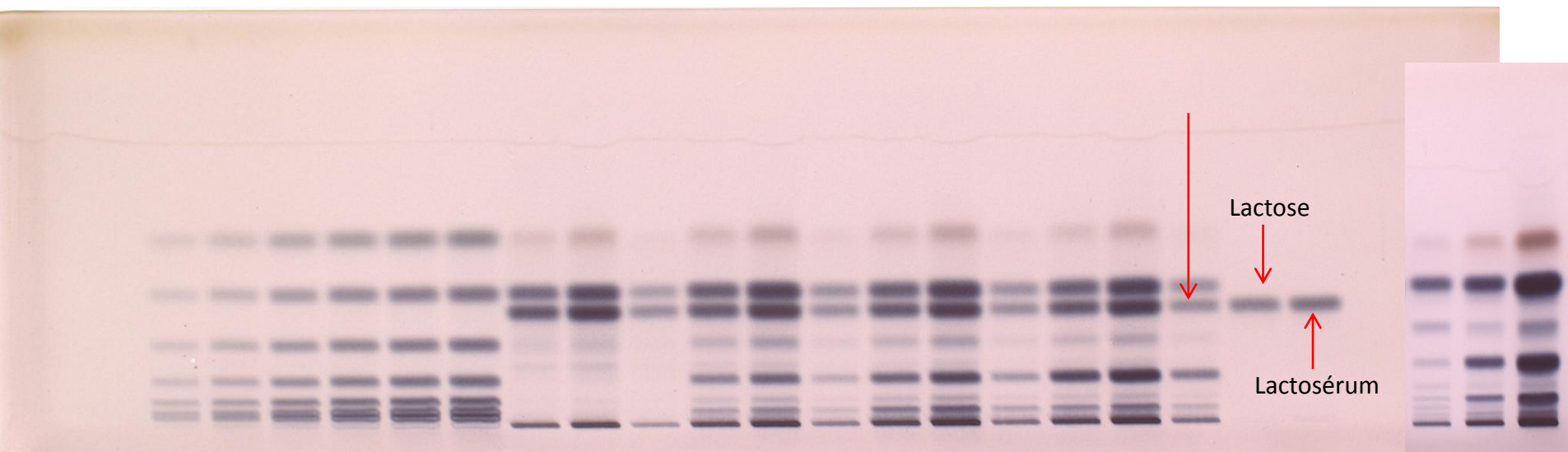
	DP4/DP2
Enz 495	23,98
Enz 496	60,73





# Dosage DP1 à DP7 sur mie de pain





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