

MAg/574.88-21/02.

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAÏD – TLEMCCEN
FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du
Diplôme de Magister en

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

**PREPARATION ET ETUDES CINETIQUES DE LA β -FRUCTOSIDASE
DE LEVURE (*Saccharomyces cerevisiae*)
SOLUBLE ET IMMOBILISEE**

Présenté par

Mlle ALNAJJAR Asma Radwan Mohammad

devant le jury composé de :

Président :

M. TALEB BENDIAB Sid Ahmed, Professeur, Université de Tlemcen

Examineurs :

M. BENALI Mohammed, Maître de Conférences, Université de Sidi Bel Abbès

M. GHALEM Saïd, Maître de Conférences, Université de Tlemcen

M. ABDELOUAHID Djamel Eddine, Maître Assistant Chargé de Cours, Université de Tlemcen

Encadreur :

Mlle GAOUAR Ouassila, Maître de Conférences, Université de Tlemcen

Année Universitaire

1421 – 1422 / 2000 – 2001

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAÏD – TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

.....
.....
.....

Mémoire

En vue de l'obtention du
Diplôme de Magister en

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

PREPARATION ET ETUDES CINETIQUES DE LA β -FRUCTOSIDASE
DE LEVURE (*Saccharomyces cerevisiae*)
SOLUBLE ET IMMOBILISEE

Présenté par

Mlle ALNAJJAR Asma Radwan Mohammad

devant le jury composé de :

Président :

M. TALEB BENDIAB Sid Ahmed, Professeur, Université de Tlemcen

Examineurs :

M. BENALI Mohammed, Maître de Conférences, Université de Sidi Bel Abbès

M. GHALEM Saïd, Maître de Conférences, Université de Tlemcen

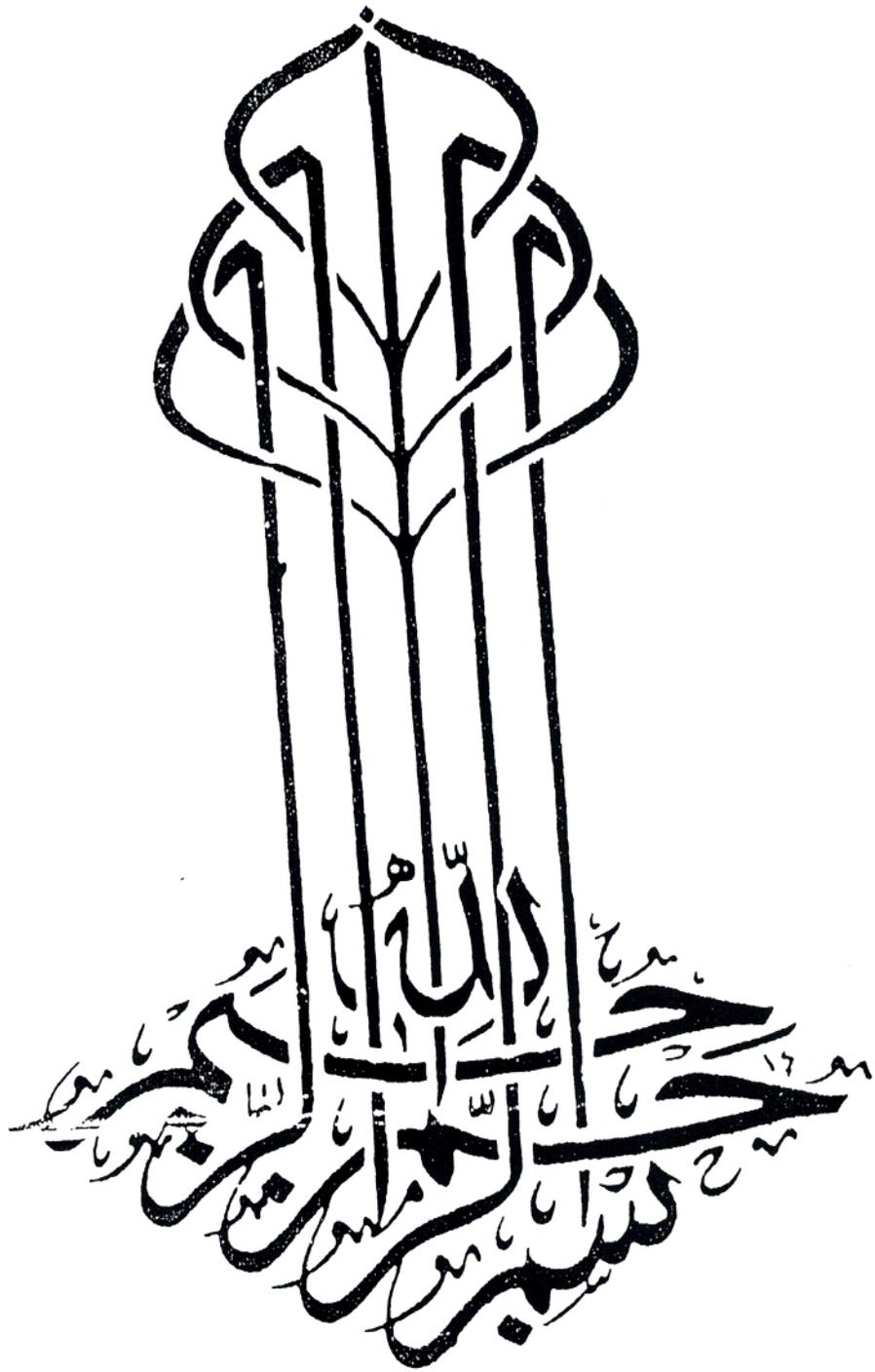
M. ABDELOUAHID Djamel Eddine, Maître Assistant Chargé de Cours, Université de
Tlemcen

Encadreur :

Mlle GAOUAR Ouassila, Maître de Conférences, Université de Tlemcen

Année Universitaire

1421 – 1422 / 2000 – 2001



Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie

A mes chers parents avec tous mes respects et ma tendresse et avec tout l'amour que je leur porte, en signe d'affection, de gratitude et de reconnaissance pour tous leurs encouragements et leur sacrifices tout au long de mes études.

A mes frères, mes soeurs, spécialement Fatma.

A toute ma famille.

A mes amies.

A tous ceux que j'estime.

Enfin, à tous ceux qui œuvrent pour la science.

REMERCIEMENTS

Ce travail est l'expression sincère de mes remerciements et le témoignage de mon profond respect pour mon encadreur, Dr. Gaouar O., Maître de Conférences, au Département de Biologie, à l'Université de Tlemcen, qui m'a accueillie dans son laboratoire, encadrée, conseillée et soutenue tout le long de ce travail et qui a généreusement trouvé le temps et la patience de lire ce manuscrit et d'y apporter les corrections nécessaires.

Je remercie vivement Monsieur Taleb Bendiab, Professeur au Département de Chimie de l'Université de Tlemcen, de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider mon jury.

Je tiens à remercier également Monsieur Ghalem, Maître de Conférences au Département de Chimie de l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Benali, Maître de Conférences au Département de Biologie de l'Université de Sidi Bel Abbès, de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury.

Je remercie également Monsieur Abdelouahid, Maître Assistant Chargé de Cours au Département de Biologie de l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

J'adresse aussi mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes du Département de Biologie ou d'ailleurs qui m'ont aidée à réaliser ce travail, particulièrement Messieurs Chabane-Sari D., Djaziri R., Boucherit K., Lahfa F., Chabane-Sari S.M., sans oublier de remercier Messieurs Zaoui S. et Drissi M. d'avoir mis à ma disposition leur bureau pendant la réalisation de ce modeste travail.

Enfin, mes remerciements vont à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

ملخص

اهتم عملنا أولاً بالحصول على المستخلص الخام لأنفرتاز خميرة البيرة (*Saccharomyces cerevisiae*) ودراسة مختلف العوامل الفيزيائية والكيميائية المؤثرة على نشاط هذا الأنزيم .

ثم تطرقنا إلى عملية تثبيت الأنفرتاز الخام في كريات الجينات الكالسيوم، ودراسة تغيرات السلوك الحركي للأنزيم الناتجة عن عملية التثبيت.

لقد تم الإستنتاج بأن عملية التثبيت ترفع قيم الأس الهيدروجيني المثلى (باتجاه ال pH القاعدي).

بالإضافة إلى ذلك، يظهر لنا بأن مستخلص الأنفرتاز الخام، يحتوي على نوعين من الأنزيمات المتماثلة بالنسبة للأنزيم الحر ال pH الأمثل يكون 3.6 و 4.8، أما pH الأنزيم المثبت فإنه يقع في pH=4.0 وبين pH=5.2 و 5.6 .

إن درجة الحرارة المثلى للأنفرتاز تنخفض بعد عملية التثبيت، من 60 درجة مئوية للأنزيم الحر إلى 55 درجة مئوية للأنزيم المثبت.

إن الاستقرار الحراري يتأثر كذلك بعملية التثبيت، حيث يكون الشكل الحر للأنزيم مستقرًا لمدة 6 ساعات في 45 °، بينما يجب خفض درجة الحرارة إلى 37 °، حتى يتم الحفاظ على نشاط ثابت للأنزيم المثبت خلال نفس الفترة الزمنية.

تركيز السكر الذي يقودنا إلى أكبر سرعة ابتدائية، يكون أكثر ارتفاعاً عند الأنزيم الحر (بالترتيب: 0.5 مول/ل و 0.2 مول/ل).

إن ثابت ميكاليس (Km) للأنزيم المثبت، يكون أعلى من ذلك الخاص بالأنزيم الحر. بالمقابل، السرعة العظمى للأنزيم تنخفض بعد عملية التثبيت.

كلا من شكلي الأنزيم الحر والمثبت، يوضعا أولاً في مفاعل صغير، هزاز، غير مستمر (متقطع)، (سعته التفاعلية: 100 مل)، وذلك بهدف الحصول على منحنيات سير تفاعل تحليل السكروز تحت تأثير درجة الحرارة، تركيز الأنزيم و تركيز السكروز .

بعد ذلك يتم عمل بعض محاولات تحليل السكروز في مفاعل مستمر، بطبقة ثابتة محتوية على الأنفرتاز المثبت في كريات الجينات (قطر طبقة الكريات: 1.5 سم، إرتفاع طبقة الكريات: 2.3 سم) ثم تتم دراسة تأثير معدل الجريان (التدفق) المغذي للمفاعل على معدل تحليل السكروز.

الكلمات الأساسية: أنفرتاز - خميرة البيرة - حركية الأنزيم - أنزيم مثبت - الجينات.

RESUME

Notre travail consistait, dans un premier temps, à obtenir une préparation brute d'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* et à étudier l'influence de divers paramètres physico-chimiques sur l'activité de cette enzyme. Par la suite, nous avons procédé à l'immobilisation de l'invertase brute par inclusion dans des billes d'alginate de calcium et nous avons étudié les modifications du comportement cinétique de l'enzyme dues à l'immobilisation.

Nous avons constaté que l'immobilisation avait tendance à augmenter les valeurs des pH optimums (décalage vers les pH basiques). De plus, il semblerait que la préparation brute d'invertase contienne deux iso-enzymes. Pour l'enzyme soluble, les pH optimums sont 3,6 et 4,8 ; pour l'enzyme immobilisée ils se situent à 4,0 et entre 5,2 et 5,6.

La température optimale de l'invertase diminue après immobilisation. Elle passe de 60°C pour la forme soluble, à 55°C pour la forme immobilisée.

La stabilité thermique est elle aussi altérée par l'immobilisation. La forme soluble est stable durant 6 h à 45°C, mais il faut abaisser la température à 37°C afin de maintenir constante l'activité de l'enzyme immobilisée pendant la même durée.

La concentration en saccharose conduisant à la vitesse initiale la plus grande est plus élevée pour l'enzyme immobilisée que pour l'enzyme libre (respectivement 0,5 mol/l et 0,2 mol/l).

La constante de Michaelis de l'invertase immobilisée est également supérieure à celle de l'enzyme libre. En revanche, la vitesse maximale de l'enzyme diminue après l'immobilisation.

Les deux formes d'enzymes ont été mises en œuvre d'abord dans un petit réacteur agité discontinu (d'un volume réactionnel de 100 ml) afin d'obtenir les courbes de progression de la réaction d'hydrolyse du saccharose. Les effets de la température, de la concentration d'enzyme et de la concentration en substrat ont été évalués. Quelques essais d'hydrolyse en continu ont ensuite été réalisés dans un petit réacteur continu à lit fixe contenant l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate (diamètre du lit de billes: 1,5 cm ; hauteur du lit de bille: 2,3 cm). L'influence du débit d'alimentation du réacteur sur le taux de conversion du saccharose a été estimée.

Mots clés: Invertase – *Saccharomyces cerevisiae* - Cinétique enzymatique – Enzyme immobilisée – Alginate

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES

a	Paramètre du modèle cinétique établi pour les hydrolyses en mode discontinu ; "a" peut être assimilé à la concentration initiale en substrat en mmol/l
b	Paramètre du modèle cinétique établi pour les hydrolyses en mode discontinu ((mmol.min/l) ^{1/2})
DNSA	Acide 3,5 – dinitrosalicylique
DO	Densité optique (adimensionnel)
K	Constante
kDa	Kilodaltons
K _i	Constante d'inhibition par excès de substrat (mol.l ⁻¹)
K _m	Constante de Michaelis (mol.l ⁻¹)
P/P	"Poids/poids" (adimensionnel)
P/V	"Poids/volume" (mg/ml)
S	Substrat
S ₀	Concentration initiale en substrat (mol/l)
T	Température (°C)
t	Temps (min ou h)
tr	Tour
UI	Unité internationale (quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions définies)
V _{in}	Vitesse initiale (μmol.l ⁻¹ .min ⁻¹)
V _{max}	Vitesse maximale (μmol.l ⁻¹ .min ⁻¹)
V/V	"Volume/volume" (adimensionnel)

SOMMAIRE

INTRODUCTION	13
Synthèse Bibliographique	
I. L'INVERTASE	17
1. Définition et rôle physiologique	17
2. Localisation de l'invertase	18
3. Structure de l'invertase	20
4. Mécanisme d'action	21
5. Régulation de la biosynthèse de l'invertase	23
6. Caractéristiques générales de l'invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
a. pH	24
b. Température	25
c. Substrat	25
d. Inhibiteurs	26
7. Propriétés des autres invertases	27
8. Importance industrielle de l'invertase	28
9. Importance industrielle des produits libérés par l'invertase	28
II. GENERALITES SUR <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
1. Définition et position systématique	30
2. Caractères généraux	31
3. Importance industrielle	32
4. Les enzymes sécrétées par <i>S. cerevisiae</i>	33

III. L'IMMOBILISATION	34
1. Généralités sur l'immobilisation	34
a. Méthodes d'immobilisation des enzymes	35
α . Méthodes de confinement (ou inclusion)	36
β . Méthodes avec mise en jeu de liaisons	36
b. Intérêt des enzymes immobilisées	37
c. Supports d'immobilisation	38
2. Immobilisation de l'invertase	39
3. L'inclusion dans l'alginate	41
a. Caractéristiques et propriétés des alginates	41
b. Immobilisation de biocatalyseurs dans le gel d'alginate	44
c. Inconvénients de l'immobilisation dans le gel d'alginate	45
IV. BIOREACTEURS A ENZYMES	46
Matériel & Méthodes	
I. PRINCIPAUX PRODUITS UTILISES	48
II. PREPARATION DE L'ENZYME SOLUBLE	48
1. Principe	49
2. Mode opératoire	49
III. DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE L'ENZYME SOLUBLE	50
1. Principe de la mesure	50
2. Evaluation de l'activité β – fructosidasique	51
3. Calcul de l'activité enzymatique volumique	55
4. Calcul de l'activité enzymatique spécifique	56

IV. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES DANS LA PREPARATION D'INVERTASE PAR LA METHODE DU BIURET	57
1. Principe	57
2. Mode opératoire	57
V. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME SOLUBLE	60
1. Effet de la concentration en enzyme dans des conditions standards (25°C, pH 4,8)	60
2. Effet de la concentration en substrat (saccharose) dans des conditions standards (25°C, pH 4,8)	60
3. Effet du pH	61
4. Effet de la température	61
5. Stabilité thermique de l'enzyme	61
VI. ENZYME IMMOBILISEE DANS DES BILLES D'ALGINATE	62
1. Preparation des billes d'alginate	62
2. Evaluation de l'activité de l'enzyme immobilisée	63
3. Calcul de l'activité enzymatique de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate	66
4. Essai d'immobilisation de l'invertase dans des billes d'alginate avec formation de liaisons covalentes	67
VII. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME IMMOBILISEE	68
1. Effet du pH	68
2. Effet de la température	69
3. Stabilité thermique de l'enzyme immobilisée	69
4. Effet du substrat sur l'enzyme immobilisée	69

VIII. HYDROLYSE DISCONTINUE DU SACCHAROSE PAR L'INVERTASE SOLUBLE ET PAR L'INVERTASE IMMOBILISEE DANS UN REACTEUR DISCONTINU	70
IX. HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE PAR L'INVERTASE IMMOBILISEE PAR INCLUSION DANS UN REACTEUR A LIT FIXE	71
Résultats & Discussion	
I. ETUDE DE LA STABILITE DE LA PREPARATION D'INVERTASE	73
II. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME SOLUBLE DANS DES CONDITIONS STANDARDS DE pH ET DE TEMPERATURE (TAMPON ACETATE pH 4,8 – 0,1 M ; T = 25°C)	76
1. Effet de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale	76
2. Effet de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse	78
III. DETERMINATION DES PARAMETRES OPTIMAUX DE L'INVERTASE LIBRE	84
1. Effet du pH	84
2. Effet de la température	86
3. Stabilité thermique de l'invertase soluble à pH 4,8	88
4. Effet du pH sur l'activité enzymatique à température élevée (45°C)	92
5. Stabilité de l'enzyme à pH 4,4	94

6. Effet de la concentration en saccharose sur la vitesse d'hydrolyse (à pH 4,4 et à 45°C)	97
IV. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME IMMOBILISEE DANS LES BILLES D'ALGINATE	102
1. Activité de l'enzyme immobilisée	102
2. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme immobilisée	103
3. Effet de la température sur l'activité de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate	107
4. Stabilité thermique de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate	109
5. Effet de la concentration de saccharose sur la vitesse initiale de l'enzyme immobilisée	112
6. Immobilisation de l'invertase par inclusion dans les billes d'alginate et réticulation	119
V. HYDROLYSE DISCONTINUE DU SACCHAROSE PAR L'INVERTASE SOLUBLE ET PAR L'INVERTASE IMMOBILISEE	123
1. Influence de la température sur la consommation du substrat par l'enzyme soluble et par l'enzyme immobilisée	124
2. Effet de la concentration d'enzyme sur la consommation du substrat par l'enzyme libre et par l'enzyme immobilisée	129
3. Effet de la concentration en saccharose sur la cinétique d'hydrolyse par l'enzyme libre et par l'enzyme immobilisée	133

VI. HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE PAR L'INVERTASE IMMOBILISEE PAR INCLUSION DANS UN REACTEUR A LIT FIXE	137
CONCLUSION	142
ANNEXE	145
I. Préparation du réactif à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)	146
II. Préparation du réactif du biuret	146
BIBLIOGRAPHIE	147

INTRODUCTION



L'exploitation industrielle des micro-organismes pour la fabrication de substances utiles conduit à une gamme de produits très variés et révèle des possibilités infinies chez les micro-organismes. La production de molécules d'intérêt, ainsi que le traitement des déchets, passera de plus en plus par la mise en œuvre d'enzymes ou de cellules entières.

Parmi les micro-organismes d'intérêt industriel, on trouve la souche *Saccharomyces cerevisiae*. Elle a un rôle important dans le domaine alimentaire où elle fait l'objet d'une production de masse pour servir de levure de boulangerie ou pour la synthèse d'enzymes.

L'invertase est l'enzyme caractéristique de cette souche. Elle catalyse l'hydrolyse du saccharose en sucre inverti utilisé dans les industries alimentaire et pharmaceutique.

Notre travail consistait à préparer une invertase bon marché à partir d'une levure de boulangerie commerciale et à immobiliser l'enzyme ainsi obtenue en vue de son utilisation dans un réacteur continu réalisant l'hydrolyse du saccharose.

Les différentes étapes de notre travail ont été les suivantes :

1. Mise au point d'un protocole de préparation de l'extrait d'invertase de levure (*Saccharomyces cerevisiae*).
2. Etude de la stabilité de cet extrait durant un stockage prolongé à +4°C.

3. Etude des propriétés cinétiques de l'enzyme libre : étude de l'influence des concentrations d'enzyme et de substrat ; détermination des valeurs de K_m , de V_{max} , et de la constante d'inhibition par le substrat ; recherche du pH optimal et de la température optimale ; étude de la stabilité thermique entre 25 et 60°C et de la stabilité à différents pH.
4. Immobilisation de l'invertase par inclusion dans des billes d'alginate.
5. Etude des propriétés cinétiques de l'enzyme immobilisée : pH optimal, température optimale, stabilité thermique, K_m , V_{max} , constante d'inhibition par le substrat.
6. Essais d'immobilisation de l'invertase par inclusion dans des billes d'alginate et réticulation.
7. Etudes cinétiques en réacteur discontinu de l'invertase libre et de l'invertase immobilisée : étude de l'influence de la température, de la concentration en enzyme et de la concentration en substrat.
8. Essais préliminaires d'hydrolyse du saccharose en réacteur continu à lit fixe.



SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'INVERTASE

1. Définition et rôle physiologique

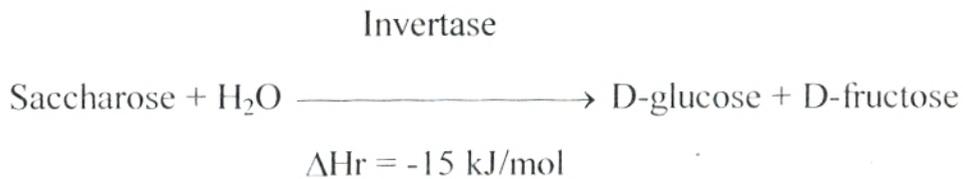
Les β -fructosidases sont des enzymes qui révèlent une activité β -D-O-fructofuranosyl fructohydrolase. Elles sont capables de transférer les résidus β -D-O-fructofuranosides (ou leurs dérivés) des glucides à l'eau sous forme de D-fructose.

Les substrats naturels des β -fructosidases incluent le saccharose (disaccharide) et ses dérivés tels que le saccharose-6-phosphate, le raffinose (trisaccharide), les polyfructanes (inuline).

Les β -fructosidases qui sont incapables d'hydrolyser les polyfructanes sont appelées sucrales [E.C. 3.2.1.26] et sont divisées en invertases et sucrose-6-phosphate hydrolases [79].

La levure *Saccharomyces cerevisiae* exprime l'invertase sous deux formes : la forme extracellulaire qui est majoritaire et la forme intracellulaire (minoritaire). Ces deux formes dérivent d'une structure de gène commune [93, 94]. Leur différence résulte de la présence de deux acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale de l'invertase extracellulaire [94]. Malgré cela, les deux formes d'invertases hydrolysent le saccharose avec la même efficacité [93, 94].

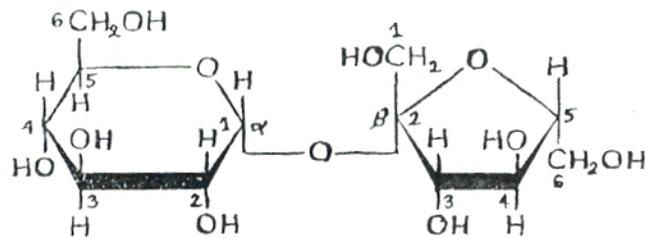
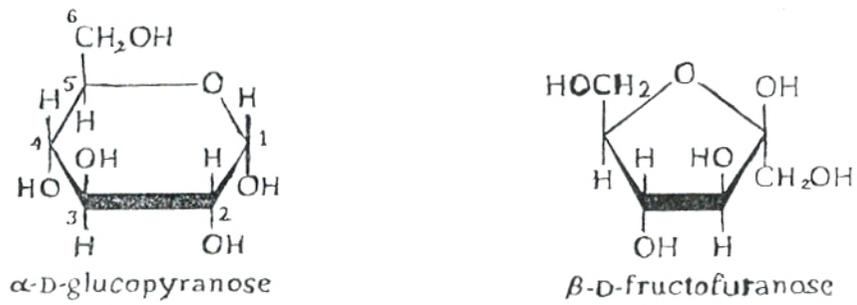
La réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase en glucose et fructose pour donner du sucre inverti est la suivante (cf. **figure 1**) [44] :



D'après Wolf *et al.* (1999), l'invertase ne montre pas d'activité pour d'autres saccharides, mais d'après Reddy et Maley (1996), cette enzyme hydrolyse le saccharose facilement et d'autres familles de substrats tels l'inuline et le raffinose mais avec une affinité moins importante.

2. Localisation de l'invertase

L'invertase extracellulaire (glycosylée) est localisée dans l'espace périplasmique et l'invertase intracellulaire (non glycosylée) est localisée dans le cytosol. Cette différence entre les deux formes qui sont issues du même gène est due à la présence d'un signal peptidique à l'extrémité N-terminale de l'invertase périplasmique ; l'invertase intracellulaire est dépourvue de ce signal peptidique et elle est donc retenue dans le cytoplasme [93].



Saccharose [β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranoside]

Figure 1 : Structures du saccharose,
du glucose et du fructose

3. Structure de l'invertase

L'invertase extracellulaire de levure est une glycoprotéine largement oligomérique [108]. Son unité fonctionnelle native est un homodimère ayant une masse moléculaire de 120 000 daltons [59, 93, 108].

D'après la séquence ADN du gène SUC2, la forme active de l'invertase extracellulaire est constituée de 513 résidus d'acides aminés par sous unité [93].

L'invertase de levure est caractérisée par un grand degré d'hétérogénéité, principalement attribuable à la liaison avec les chaînes externes d'oligosaccharides [25]. Elle contient 14 sites de glycosylation (sequons) par sous unité. Sur chaque site, la glycosylation se fait à des degrés variables. Exceptionnellement, le chevauchement entre les sites 4 et 5 permet de glycosyler marginalement le site 5. Le site 4 (Asn – Asn – Thr) est complètement glycosylé contrairement au site 5 (Asn – Thr – Ser) qui est le moins glycosylé [95]. Le degré de glycosylation des divers sites est aussi influencé par la localisation de ces sites dans la structure secondaire de la protéine [95]. La glycosylation augmente la stabilité de l'invertase et joue un rôle dans la mobilité de cette enzyme [25].

La nature du chemin sécrétoire et la réaction de glycosylation associées à la biosynthèse de l'invertase dans la levure ont été largement étudiées [93]. Après la sécrétion d'invertase dans le cytoplasme, l'invertase extracellulaire migre vers l'espace périplasmique *via* le réticulum endoplasmique. Le taux de migration

est dépendant des nombres et longueurs des chaînes oligosaccharidiques [94]. Au cours du transport, l'enzyme acquiert en moyenne dix oligosaccharides de mannose qui représentent 50% (P/P) de sa masse moléculaire [25, 94]. Les oligosaccharides de mannose semblent aider l'auto-association en homodimères fonctionnellement actifs à l'intérieur de tétramères, hexamères et octamères, qui ont tous la même activité spécifique [93,94]. L'enzyme retenue dans l'espace périplasmique est sous forme d'homooctamères [25].

4. Mécanisme d'action

L'invertase est l'une des plus anciennes enzymes dont on ait étudié le mécanisme d'action [93].

Reddy et Maley (1996) et Kaplan *et al.* (1997) rapportent que le mécanisme réactionnel d'hydrolyse du saccharose par l'invertase, impliquerait la protonation de l'oxygène glycosidique du saccharose par le donneur de proton (cystéine 205) suivie par l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique du fructose par le groupe carboxylate de l'Asp₂₃ (aspartate 23).

Il n'y a pas beaucoup de connaissances sur les résidus d'acides aminés qui contribuent à la fixation et à l'hydrolyse du saccharose. Les études d'inactivation utilisant le conduitol β époxyde (CBE) indiquent que le CBE réagit avec un groupe carboxylate spécifique dans l'invertase de levure pour inactiver l'enzyme. L'inactivation

résulte de la modification d'un seul résidu d'acide aminé. L'analyse de la séquence peptidique révèle que l'Asp₂₃ est le résidu modifié. Le rôle d'Asp₂₃ dans le processus catalytique est démontré en substituant l'Asp par l'Asn (asparagine) en utilisant le site mutagénique direct du gène SUC 2. L'enzyme mutante est inactive, ce qui confirme le rôle de l'Asp₂₃ dans le processus catalytique [93].

Par ailleurs, diverses études suggèrent que les 4 histidines de l'invertase (His 13, His 37, His 57 et His 250) sont des donneurs de proton mais cette proposition est en contradiction avec le fait que quand ces histidines sont remplacées par des résidus de glycine, l'activité enzymatique représente encore 92 à 100% de celle de l'enzyme native.

De plus, on a trouvé qu'un résidu de glutamate (Glu 204) est aussi essentiel pour l'hydrolyse du saccharose. Lorsqu'on remplace ce résidu par un résidu alanyl, la constante catalytique (K_{cat}) est réduite 3000 fois. Le glutamate semble servir de donneur de proton dans l'hydrolyse de la liaison glycosidique [94].

Compte tenu de ces résultats, Reddy et Maley (1996) proposent un autre mécanisme réactionnel pour l'invertase. Selon ce mécanisme Glu₂₀₄ sert de donneur de proton qui transfère le proton de H₂O à l'oxygène glycosidique du saccharose, alors que le nucléophile Asp₂₃ attaque le C₂ (carbone 2) du fructose entraînant la formation d'un complexe « enzyme–fructosyl » (stabilisé par des liaisons covalentes)

et la libération du glucose. En présence d'une concentration élevée en substrat, le complexe « enzyme–fructosyl » peut transférer le résidu fructosyl à un alcool primaire tel que le méthanol ou l'éthanol et à des monosaccharides [94].

Dans certains cas, le résidu Cys 205 intervient dans la réaction catalytique à cause de sa proximité avec Glu 204. Il est possible que le Cys 205 joue un rôle dans la catalyse en maintenant un microenvironnement favorable autour du site actif, ou peut être en aidant la fixation du substrat [94].

5. Régulation de la biosynthèse de l'invertase

Sur le plan commercial, l'invertase est biosynthétisée principalement par les espèces de levures : *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces carlsbergensis* [108].

Le gène SUC2 de levure est le gène structural de l'invertase. Il produit deux types d'invertases différentes :

- L'invertase extracellulaire (glycosylée) qui est l'objet d'une répression catabolique par le glucose, c'est-à-dire que son expression dépend de la concentration en glucose [25, 35, 90, 93].
- L'invertase intracellulaire (non glycosylée) est une enzyme constitutive qui est élaborée toujours à des vitesses et à des concentrations constantes quelle que soit l'activité métabolique du micro-organisme. Elle est donc considérée comme faisant

partie de la machinerie enzymatique de base et permanente de la cellule [93, 99].

6. Caractéristiques générales de l'invertase de

Saccharomyces cerevisiae

Les caractéristiques les plus importantes des enzymes pour leur utilisation pratique sont leurs dépendances vis à vis du pH et de la température.

a. pH

Le pH du milieu intervient sur l'état d'ionisation de nombreux sites internes de la molécule d'enzyme. Ses effets sont donc multiples et affectent [84] :

- La structure de l'enzyme.
- L'association entre enzyme et substrat.
- Le mécanisme réactionnel.

Selon la littérature, les préparations purifiées d'invertase de levure sont hétérogènes du point de vue de leur point isoélectrique, ce qui indique la présence d'au moins deux isoenzymes [76].

Au contraire de la plupart des autres enzymes, l'invertase représente une activité relativement élevée dans la zone de pH comprise entre 3,5 – 5,5 bien que le pH optimum soit d'environ 4,5 [108].

b. Température

Comme pour n'importe quelle réaction chimique, la température a une influence sur la vitesse des réactions enzymatiques, mais de nombreux facteurs en compliquent les effets. Par exemple, varie avec la température : la structure de l'enzyme, la stabilité du complexe enzyme-substrat, l'ionisation de certains sites [84]. L'activité enzymatique de l'invertase atteint un maximum à 55°C [108].

c. Substrat

Un grand nombre d'enzymes industrielles sont des hydrolases. Elles sont souvent induites par le substrat sur lequel elles agissent [60].

Le saccharose est l'un des produits de la photosynthèse et la forme dominante de translocation des glucides dans les plantes supérieures correspondant à une forme de stockage de l'énergie [1, 64]. Ses deux principales sources industrielles sont la canne à sucre qui contient le plus de saccharose en masse et la betterave [15, 37, 115].

Le saccharose est un diholoside non réducteur, son nom scientifique est « α -D-glucopyranosyl (1→2) β -D-fructofuranoside ». Le saccharose est composé d'un α -D-glucose et d'un β -D-fructose liés par une liaison osidique (*cf.* **figure 1**) [98, 108].

L'hydrolyse du saccharose donne un mélange équimolaire de fructose et glucose dénommé sucre inverti qui a des applications dans différents processus industriels [37].

L'hydrolyse peut se faire sous l'effet de l'acidité et de la chaleur [1] ou par l'invertase (saccharase) [52] qui doit son nom au fait qu'elle inverse l'activité optique du milieu réactionnel de dextrogyre à lévogyre [105].

La masse molaire du saccharose étant de 342,30 g, le saccharose peut donc être considéré comme un substrat de faible masse molaire [50].

Dans l'industrie agroalimentaire, le saccharose est employé comme conservateur : lorsque la concentration du saccharose est suffisante 40,2% (P/P) , le développement des micro-organismes est inhibé [15].

d. Inhibiteurs

Les métaux lourds sont de puissants inhibiteurs de l'invertase. Les ions argent (Ag^+) qui touchent les histidines de la chaîne latérale de l'enzyme, rendent cette dernière inactive [108]. La réduction de la vitesse initiale par les ions Ag^+ dépend de la concentration de métal lourd. Une concentration de 4 μmol d' AgI/kg de solution peut inhiber 50% de l'activité enzymatique de l'invertase [47].

Par ailleurs, le substrat et les produits de la réaction peuvent aussi être des inhibiteurs de l'enzyme [108].

7. Propriétés des autres invertases

Dans la classification des enzymes, la famille des glycosylhydrolases (E.C. 3.2.) rassemble la plupart des protéines à activité β -fructosidase. On y trouve les saccharases d'eucaryotes et de procaryotes, les fructanases bactériennes et les inulinases fongiques [79].

Du point de vue des séquences en acides aminés, l'invertase de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) présente une homologie de 30–31% avec les saccharases bactériennes et de 27–29% avec les invertases d'origine végétale [94].

L'invertase d'*Aspergillus niger* est la seule saccharase de moisissure qui ait une séquence d'acides aminés non homologue de celle de l'invertase de levure [79].

Dans un même règne, on peut trouver des invertases ayant des propriétés différentes. Ainsi, dans le règne végétal, on trouve les exemples suivants :

- Dans le levain de riz, il y a trois types d'invertases acides nommées IT₁, IT₂ et IT₃ dont les masses moléculaires sont respectivement 220 kDa – 59 kDa et 67 kDa. Les pH optimums sont 3,5 – 6 – 5,5 respectivement. Les trois enzymes peuvent hydrolyser le saccharose et le raffinose mais pas le maltose [64].
- Dans la racine de betterave rouge (*Beta vulgaris L.*), on a deux formes d'invertases acides qui ont des masses moléculaires différentes 65 kDa et 46 kDa. Ces enzymes

sont surtout actives sur le saccharose mais gardent une activité appréciable sur le raffinose et le stachyose [74].

8. Importance industrielle de l'invertase

L'invertase est une enzyme largement utilisée dans l'industrie alimentaire et en particulier dans la confiserie pour obtenir un sirop liquide ou semi visqueux [21, 55, 75, 108]. Elle est aussi utilisée pour empêcher la cristallisation des sucres dans les produits alimentaires ou permettre l'assimilation de l'alcool dans les vins fortifiés [76]. De plus, elle améliore le contrôle des composants volatils du vin, du cognac et des liqueurs aqueuses [76].

9. Importance industrielle des produits libérés par l'invertase

Sur le plan industriel, le sucre inverti est produit, soit par hydrolyse enzymatique, soit par hydrolyse acide. La catalyse enzymatique est particulièrement adaptée à la production de sucre inverti à très haut degré d'hydrolyse [37, 65].

Une hydrolyse partielle ou totale du saccharose apporte à l'utilisateur les avantages suivants [22] :

- Hygroscopicité plus élevée.
- Activité de l'eau plus basse.
- Pouvoir sucrant passant de 1 à 1,1.

Le sucre inverti en solution est nettement plus fluide que le saccharose liquide (à 20°C une solution de saccharose a une viscosité trois fois plus élevée qu'une solution équivalente de sucre inverti) [65].

Le sucre inverti est employé, surtout en raison de ses propriétés humectantes, dans la confiserie humide (gommes, fondants, pâtes de fruits), la pâtisserie industrielle (pain d'épices, madeleines ...). En raison de ses propriétés physiques (pouvoir sucrant, abaissement de la température de congélation...), il est aussi utilisé dans les crèmes glacées, les sorbets et les boissons [22, 65].

Industriellement, le sucre inverti total peut être utilisé pour la fabrication de fructose, de sorbitol ou de mannitol. Il est en concurrence avec l'isoglucose [22].

Le fructose peut être utilisé pour l'alimentation parentérale. C'est également un sucre intéressant dans le régime de certains diabétiques et pour l'alimentation de l'effort. Il a récemment été inscrit, sous le nom de lévulose, à la pharmacopée [15]. Il est apprécié dans le domaine alimentaire pour son pouvoir sucrant qui vaut 1,7 fois celui du saccharose et parce qu'il ne cristallise pas facilement [17, 21, 56, 108].

II. GENERALITES SUR *Saccharomyces cerevisiae*

1. Définition et position systématique

Les *Saccharomyces* sont des micro-organismes eucaryotes qui sont classés parmi les levures qui sont définies comme étant des champignons unicellulaires immobiles [9].

La classification des levures (qui a été remaniée en 1984 par Kreger Van Rÿ) montre que le genre *Saccharomyces* appartient à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des endomycétales et à la famille des *Saccharomycetaceae*. Cette nouvelle classification a conduit à une simplification importante puisqu'en appliquant le critère d'interfertilité, 17 souches, anciennement d'espèces différentes, sont devenues les représentantes d'une seule espèce : *Saccharomyces cerevisiae* [61].

Dans le genre *Saccharomyces*, les espèces les plus courantes sont *S. cerevisiae* et *S. exigus*. En règle générale, *S. cerevisiae* est l'espèce majoritaire [70].

Dans la littérature, on rencontre souvent les noms de *S. ellipsoïdus*, *S. turbidans*, *S. uvarum*, *S. minor*, *S. bayanus*, et *S. diastaticus*. Ces espèces, d'un point de vue taxonomique, ne sont que des variétés de l'espèce *S. cerevisiae* et elles ne diffèrent que par des propriétés technologiques correspondant à quelques caractéristiques enzymatiques mineures [61, 70].

2. Caractères généraux

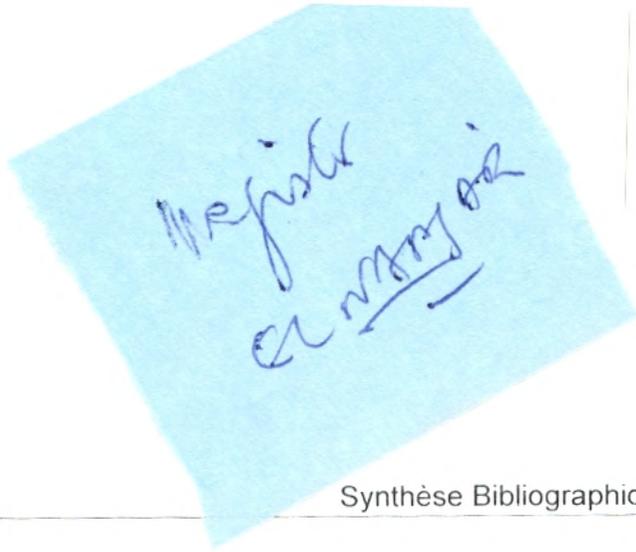
Le choix d'une levure pour une application déterminée implique de connaître les caractéristiques de souche [13].

Les *Saccharomyces* comportent 17 paires de chromosomes. Les dimensions et les aspects dépendent fréquemment des conditions de culture et de l'âge des cellules [9]. Le volume cellulaire de *Saccharomyces* est voisin de $45 \mu\text{m}^3$ tout en évoluant, pendant le cycle cellulaire. Aux évolutions des dimensions et des volumes des cellules est associée une variation de matière sèche. Pour *S. cerevisiae*, la teneur en matière sèche s'élève régulièrement [9].

La sélection des souches se base sur des critères. A côté de critères technologiques assez faciles à cerner : vitesse de fermentation, degré d'atténuation, tolérance à l'alcool ..., il faut aussi considérer des critères d'ordre sensoriel : souches non productrices de mauvaises odeurs telles que H_2S [14, 33].

De plus, il faut que les souches produisent le moins possible de métabolites secondaires comme les antibiotiques par exemple, et qu'elles excrètent l'enzyme de façon à ce que celle-ci soit facilement séparée et purifiée. Elles ne doivent pas conduire à la formation de polluants et elles ne doivent pas être pathogènes ou produire des composés toxiques [11, 14, 73].

En bref, la souche doit avoir le caractère d'alimentarité c'est à dire faire partie des souches G.R.A.S. (« Generally Recognized As Safe ») [11, 28].



3. Importance industrielle

S. cerevisiae est une souche industrielle largement utilisée dans le domaine alimentaire. Environ 80% des levures présentes dans le levain du pain français, appartiennent à cette espèce [70]. *S. cerevisiae* est d'ailleurs appelée « levure de boulangerie » et sa production annuelle est de l'ordre de 1,7 millions de tonnes par an [61]. *S. cerevisiae* est aussi utilisée pour la production d'éthanol, de biomasse et pour la sécrétion d'enzymes [90].

Pour l'élaboration de boissons alcoolisées, le genre *S. cerevisiae* est aussi retenu. Les souches sont sélectionnées pour leur capacité à supporter des taux d'éthanol de 12 à 15% (V/V) et à hydrolyser les oligosaccharides, tels le maltotriose et le maltotétraose en glucose pour optimiser la transformation de l'amidon en éthanol [51].

La souche *S. cerevisiae* a été immobilisée pour la production de biomasse, d'invertase, d'éthanol et pour une utilisation dans le processus de « prise de mousse » du champagne [26]. Différentes techniques d'immobilisation ont été utilisées. On peut citer l'inclusion dans un gel de polyacrylamide ou d'alginate, l'inclusion dans les fibres d'un gel d'acétate de cellulose–titane–iso–propoxide, l'immobilisation dans des disques de gélatine [25, 26, 59, 116].

L'invertase des cellules immobilisées serait moins sensible aux attaques protéolytiques endogènes que celles des cellules libres correspondantes [27].

Avec les progrès de la génétique, les possibilités d'amélioration des souches sont théoriquement infinies, d'une part par mutation, d'autre part au moyen des techniques utilisant l'ADN recombinant [11]. De plus, le génie génétique permet d'augmenter le rendement enzymatique des micro-organismes [39, 82].

4. Les enzymes sécrétées par *S. cerevisiae*

Les cellules de micro-organismes et de plantes sont considérées comme des paquets d'enzymes à partir desquels les enzymes peuvent être isolées pour être utilisées dans des opérations variées [54].

On a rapporté que toutes les espèces de levures de boulangerie synthétisent beaucoup d'invertase [83]. Parmi les enzymes d'intérêt industriel synthétisées par *S. cerevisiae*, on trouve aussi la phosphatase acide [9].

III. L'IMMOBILISATION

1. Généralités sur l'immobilisation

De très nombreuses études ont été consacrées à la préparation d'enzymes immobilisées [68, 91]. L'utilisation d'enzymes et de cellules immobilisées dans le domaine alimentaire n'est pas récente.

Comme le rappellent Weetall et Zelko (1983), l'utilisation des cellules immobilisées remonte à 1820, époque à laquelle Schuetzenbach a fixé des micro-organismes sur des copeaux de bois pour convertir l'éthanol en acide lactique. L'immobilisation des enzymes commence à l'époque de la première guerre mondiale quand Nelson et Griffin (1916) immobilisent l'invertase par adsorption sur le charbon actif. Depuis ces premières expériences, la méthodologie d'immobilisation des enzymes et des cellules est passée de l'état d'art à celui de science [116].

La promesse de la technologie d'immobilisation n'est pas complètement tenue et plusieurs processus sont encore en cours de développement [114]. Cependant durant les dernières années, la recherche et les projets de développement ont permis de faire progresser de manière significative les techniques d'immobilisation d'un grand nombre d'enzymes [8].

Les enzymes immobilisées sont utilisées dans les domaines industriel et médical, dans des applications analytiques et dans des biocapteurs [50, 78, 115, 116]. De plus, les enzymes immobilisées

peuvent servir d'agents biotechnologiques de décontamination et de restauration du sol [19].

a. Méthodes d'immobilisation des enzymes

Les techniques d'immobilisation sont nombreuses [62]. Elles consistent à rendre l'enzyme insoluble, par un traitement physique ou chimique convenable pour éviter la perte de l'activité biologique [31]. Les principales techniques peuvent être rassemblées en 2 grands groupes (*cf.* **figure 2**).

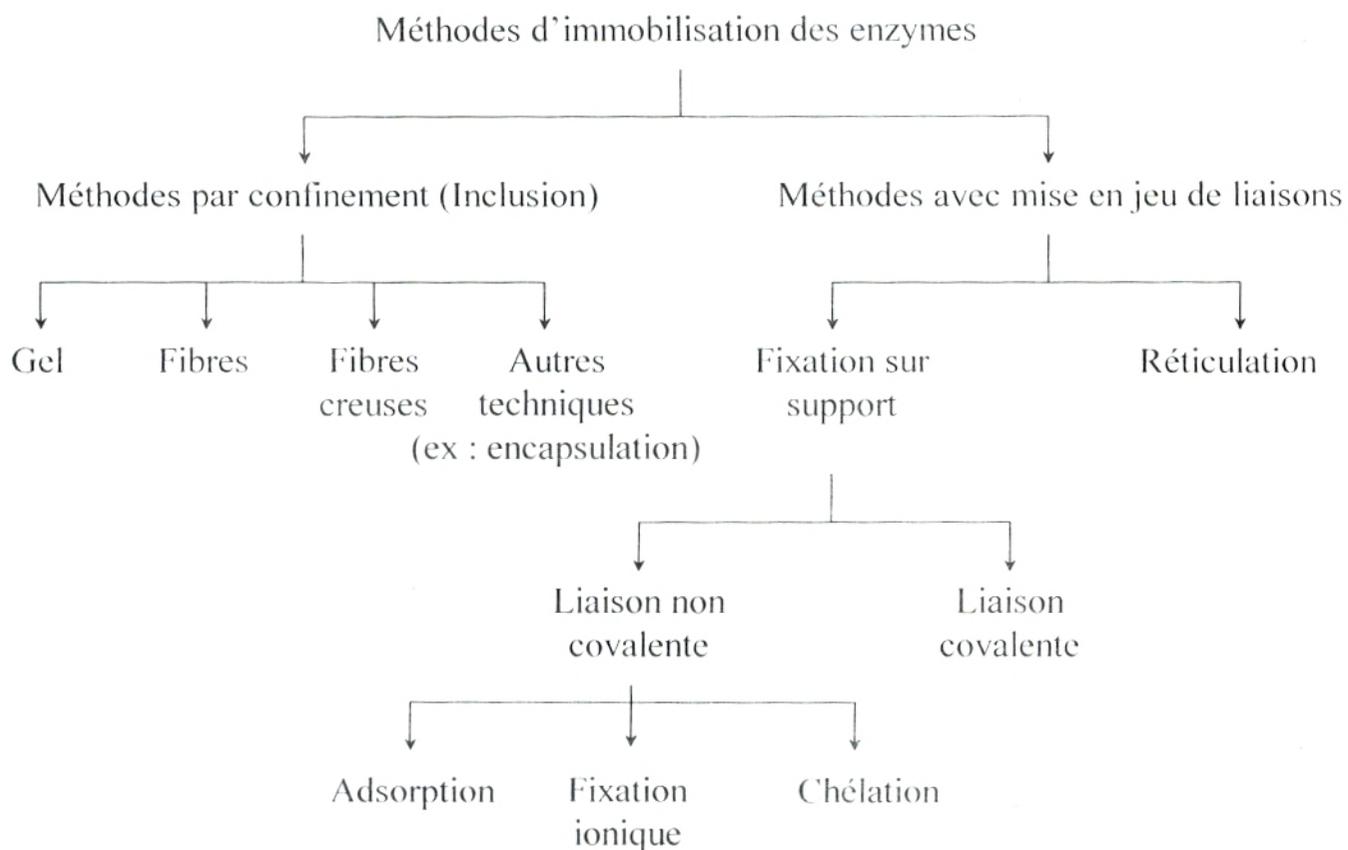


Figure 2 : Les différentes méthodes d'immobilisation [22]

α. Méthodes de confinement (ou inclusion)

Les molécules d'enzymes sont retenues à l'intérieur d'une trame solide (gel, fibres, microcapsules) que l'on fait précipiter autour d'elles. La protéine enzymatique est ainsi isolée du milieu extérieur mais la diffusion de petites molécules (substrats et produits) est maintenue. Si d'une manière générale ces techniques sont faciles à mettre en œuvre, l'immobilisation n'est pas forcément très durable [22].

Les inconvénients majeurs sont habituellement le manque de réactivité avec les substrats de masses moléculaires élevées et la tendance du support à se solubiliser avec le temps.

Les milieux généralement utilisés pour l'inclusion sont : le polystyrène, les matériaux cellulose, l'alcool-polyvinyl et les polydextranes [116].

Les alginates et les carraghénanes extraits d'algues présentent de remarquables propriétés gélifiantes et conviennent également bien à l'inclusion des enzymes ou des cellules entières [7].

β. Méthodes avec mise en jeu de liaisons

Les molécules d'enzymes sont :

- Soit retenues sur des supports solides par des liaisons non covalentes (adsorption, liaison ionique ...) ou covalentes ; la mise en œuvre d'une telle fixation est plus ou moins complexe [22]. Les supports utilisés sont les polycarbohydrates,

les oxydes métalliques, le verre, les céramiques et le charbon actif [116].

- Soit réticulées par un pontage covalent de manière à former un réseau, le plus souvent de masse moléculaire élevée et insoluble, sans recours à un support [22]. Les agents réticulants peuvent être des aldéhydes tels que le glutaraldéhyde ou le formaldéhyde ou d'autres réactifs tels que : l'hexaméthylène diamine, la benzidine, l'O-dianisidine et les isocyanates bifonctionnels [46, 116].

b. Intérêt des enzymes immobilisées

L'industrie actuelle montre un grand intérêt pour l'utilisation des enzymes insolubles [91]. Les avantages des enzymes immobilisées sont variés. Les avantages majeurs sont :

- Les enzymes immobilisées peuvent être séparées facilement du substrat et du produit de la réaction ce qui permet un meilleur contrôle du processus [16, 24, 34, 54, 92, 114].
- Les enzymes immobilisées peuvent être réutilisées plusieurs fois, dans des réacteurs batch ou dans des processus continus, sans perte d'activité au cours d'une longue période [46, 54, 57, 97].
- L'immobilisation permet de compenser le coût élevé de l'enzyme, surtout dans le domaine analytique [24].

- L'immobilisation provoque généralement une amélioration de la stabilité thermique de l'enzyme et confère à l'enzyme une résistance élevée à la dénaturation [8, 115].
- L'immobilisation peut allonger la demi-vie des enzymes.
- Les systèmes à enzymes immobilisées sont de bons modèles pour l'étude des cinétiques enzymatiques *in vivo* [54].

c. Supports d'immobilisation

L'immobilisation des enzymes sur une large série de supports et par différentes méthodes a été étudiée intensivement durant ces dernières années [88]. Le choix du support dépend de l'enzyme que l'on veut immobiliser et du réacteur dans lequel cette enzyme doit être utilisée [5]. Pour choisir tel ou tel support pour une application spécifique il faut toujours connaître les propriétés de ce support et les conditions qu'il doit subir telles que la force ionique, le pH, la température et la gamme des débits [114]. De plus, la dimension des pores du support et la grosseur de ses particules sont susceptibles d'influencer l'activité de l'enzyme immobilisée [18]. Les supports polymériques pouvant former des liaisons covalentes sont les plus utilisés pour l'immobilisation des enzymes [107]. Des polymères naturels de diverses structures chimiques polymérisés par les radiations sont aussi parfois utilisés comme supports d'enzymes [41].

naturels de diverses structures chimiques polymérisés par les radiations sont aussi parfois utilisés comme supports d'enzymes [41].

2. Immobilisation de l'invertase

La première immobilisation d'un catalyseur biologique a été l'adsorption de l'invertase sur le charbon actif en 1916 [80]. Un nouvel effort dans ce domaine ne vient qu'après 1950, mais annonce une réelle ère de l'immobilisation des biocatalyseurs [42].

Plusieurs études ont porté sur l'immobilisation de l'invertase sur divers supports et par des techniques différentes (*cf. tableau 1*).

Tableau 1 : Quelques exemples d'immobilisations de l'invertase sur divers supports

Biocatalyseur	Support	Référence(s)
Invertase	Verre de porosité contrôlée	[115]
Invertase	Gel Ca-Ti-Phosphate	[115]
Invertase	Gel de cellulose-acétate-titane-iso-propoxide	[81]
Invertase	Gel de pectate de Ca	[87]
Invertase + <i>Zymomonas mobilis</i> AMC 3963	Gel d'alginate	[53]
Invertase	Anticorps polyclonaux spécifiques	[49]
Invertase	Gel d'acrylamide polymérisé par rayon γ	[67]
Invertase	Gel d'acrylate polymérisé par rayon γ	[68]
Invertase	Xanthane	[88]
Invertase	Polyamide	[76]
Invertase	Disques compacts poreux de polyglycidyl méthacrylate	[50]
Invertase	Membrane d'ultrafiltration en polysulfone	[44]
Invertase	Billes d'oxirane acrylique	[45]
Invertase	Billes de cellulose modifiée	[102]
Invertase	Cellulose-concanavaleine A	[32, 77, 109]
Invertase	Concanavaleine A greffée sur billes de cellulose et billes de polyglycidyl méthacrylate	[44]

3. L'inclusion dans l'alginate

Dans le domaine alimentaire, la principale technique d'immobilisation utilisée est l'inclusion sous forme de billes dans des gels autorisés comme additifs [89].

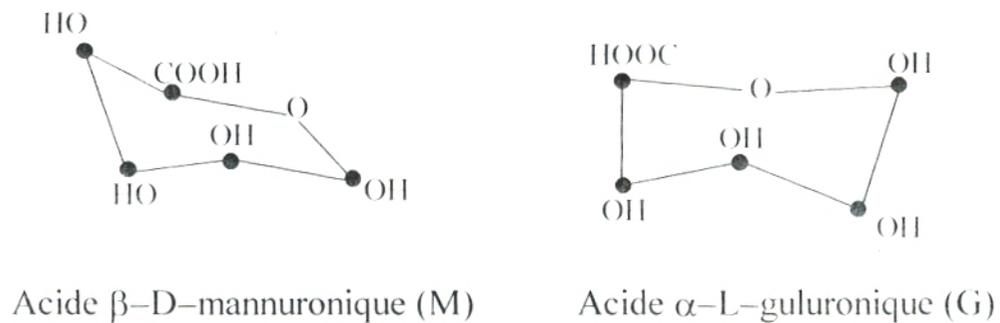
Les méthodes d'inclusion dans des gels ont été développées pour divers organites et des cellules entières. On peut utiliser une grande variété de polymères et réaliser diverses formes de gel (billes, films et rubans) [100]. Les supports qui s'utilisent fréquemment sont des polymères naturels et leurs dérivés [40, 88]. La gélification d'un polysaccharide est généralement simple à mettre en œuvre au laboratoire [62]. L'inclusion des enzymes dans un gel offre un avantage à l'enzyme elle-même qui ne participe pas directement dans la formation de la matrice insoluble dans l'eau et l'immobilisation se fait sans formation de ponts entre la matrice et l'enzyme [24, 81]. Les gels de polyacrylamide, d'alginate et de carraghénanes sont les plus employés [24, 78, 81]. De nombreuses équipes ont choisi l'alginate [100]. L'inclusion dans l'alginate a donné de bons résultats avec plusieurs enzymes mais il est arrivé que des enzymes soient inactivées [24].

a. Caractéristiques et propriétés des alginates

Les alginates sont des polysaccharides extraits des algues brunes. Ce sont des copolymères linéaires d'acide D-mannuronique et d'acide L-gulonique (*cf. figure 3*) [65, 99].

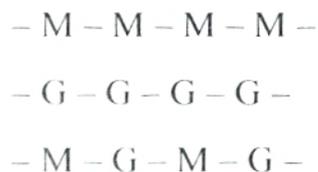
L'alginate est un polysaccharide chargé négativement [62]. Chaque molécule contient des régions homomannuroniques et des régions homoguloniques et aussi des régions où les deux types de résidus alternent [15, 65].

L'assemblage de ces segments en proportions variables dépend de l'espèce et de la partie de l'algue ainsi que du lieu de récolte. La répartition des monomères détermine les propriétés gélifiantes des alginates [15, 65, 99].



**Figure 3 : Structures des monomères
constitutifs des alginates**

Les séquences possibles entre les deux acides associés par des liaisons (1→4) sont [65] :



Chaque année, il y a production de 55 000 tonnes d'alginate, de carraghénanes et d'agar-agar qui sont principalement destinés à l'industrie agroalimentaire [15].

Toutes les opérations du procédé de production des alginate reposent sur les différences de solubilité :

- Les alginate de métaux monovalents et de magnésium sont solubles dans l'eau.
- L'acide alginique et son dérivé calcique y sont pratiquement insolubles [16, 65].

La méthode d'inclusion des enzymes dans les billes d'alginate est basée sur la formation d'un gel [16]. Les alginate de cations monovalents et de magnésium se dissolvent dans l'eau en formant des solutions colloïdales visqueuses à comportement pseudoplastique et ce à faible concentration. L'addition progressive de cations calcium provoque la formation d'un gel élastique, non thermoréversible [15]. Par conséquent les billes d'alginate qui incluent l'enzyme sont formées par l'échange des ions sodium et des ions calcium pour former l'alginate de calcium qui est un polymère insoluble [16].

Dans la pratique, c'est en jouant sur la concentration du milieu en ions calcium que se module la texture et la qualité des gels [15]. L'inclusion est réalisée à température ambiante, à pH et osmolarité physiologiques [62].

b. Immobilisation de biocatalyseurs dans le gel d'alginate

Les hydrocolloïdes sont de plus en plus utilisés comme matériaux d'immobilisation, d'encapsulation et d'enrobage dans les industries alimentaire et pharmaceutique [4].

L'immobilisation dans des billes d'alginate présente l'avantage d'être une technique simple et facile à mettre en œuvre, très douce, rapide et peu coûteuse qui peut être utilisée avec une large gamme de catalyseurs [78, 100]. Il n'est donc pas étonnant que dans plus de 90% des études sur l'immobilisation de cellules on ait eu recours à l'alginate [62].

Les billes d'alginate constituent un support naturel sur lequel il est intéressant de fixer les protéines natives. Cette tentative de fixation a également été réalisée pour différentes enzymes telles que l'uréase [24], l'amyloglucosidase [92] et pour l'immobilisation de microsomes hépatiques humains (une fraction membranaire contenant les UDP-glucuronosyl transférases), pour produire des glucuronides à des fins analytiques (les billes fournissent les meilleurs résultats en termes de production de glucuronides et de stabilité enzymatique) [69].

L'alginate est aussi utilisé pour l'encapsulation de bactéries, de champignons, de micro-algues et d'embryons végétaux (pour réaliser des semences artificielles permettant d'améliorer la croissance des végétaux et d'augmenter leur résistance) [104]. Ainsi, l'enrobage d'apex végétaux (l'apex est la partie centrale du bourgeon) dans l'alginate simplifie le protocole de cryo-conservation. Il permet également une manipulation plus facile de ces apex [30].

c. Inconvénients de l'immobilisation dans le gel d'alginate

Les billes d'alginate préparées présentent certains inconvénients tels que :

- Une légère tendance à moisir, une compaction sous pression élevée, une faible stabilité dans les solutions de concentration ionique élevée [78, 81].
- Une difficulté à obtenir des billes de petites tailles [58, 62].
- Un assouplissement du gel d'alginate en présence de concentrations élevées de K^+ , Mg^{2+} , phosphate, et dans les solutions d'agents chélatants. De plus, le gel peut se dissoudre dans ces solutions en raison de la libération du calcium du gel [46, 58, 62]. Ce dernier problème peut être contourné par un pelliculage ultérieur des billes. La reliquéfaction de la bille ne libérera donc pas le matériel encapsulé [62].
- La fuite des enzymes de masses moléculaires faibles telles que certaines protéases. En particulier, l'inulinase ($MM = 3 - 5.10^3$ g/mol) et l' α -chymotrypsine ($MM = 25000$ g/mol) ne sont jamais immobilisées en gel d'alginate.
- Le gel d'alginate de calcium a tendance à se casser sous l'effet de la prolifération des cellules immobilisées [26].

IV. BIOREACTEURS A ENZYMES

A l'échelle de l'installation pilote de laboratoire ou de l'unité industrielle, plusieurs types de réacteurs sont actuellement utilisés pour la mise en œuvre de cellules ou d'enzymes immobilisées. Il n'existe pas de réacteur universel idéal pour toutes les applications. La technique d'immobilisation et le type de réacteur à retenir dépendent de la nature du biocatalyseur et du secteur d'application (réacteur à enzymes ou à cellules immobilisées, fonctionnant en discontinu ou en continu) [7].

Les principaux avantages des processus continus par rapport aux processus en batch sont la facilité d'automatisation et de contrôle, la réduction des coûts opératoires et l'amélioration de la qualité du produit [110].



**MATERIEL
ET
METHODES**

I. PRINCIPAUX PRODUITS UTILISES

- Acétate de sodium (Prolabo).
- Acide acétique glacial (Gifrer Barbezat).
- Acide 3,5–dinitrosalicylique (Janssen Chemica).
- Alginate de sodium.
- Chlorure de calcium (Merck).
- D(+) saccharose et D(+) glucose (Prolabo).
- D(-) fructose (Fluka A.G.).
- Formaldéhyde 37% (Prolabo).
- Gélatine (Riedel de Haën A.G.).
- Glutaraldéhyde 25% (Serva).
- Hydroxyde de sodium (Azochim).
- Iodure de potassium (Prolabo).
- Potassium–sodium L(+) tartrate (Prolabo).
- *Saccharomyces cerevisiae* (levure sèche de boulangerie).
- Sulfate de cuivre pentahydraté (Riedel de Haën A.G.).

II. PREPARATION DE L'ENZYME SOLUBLE

Un procédé simple d'extraction de l'invertase de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) a été utilisé. Il correspond à une modification du protocole qui est décrit par Loncle (1992).

1. Principe

La mise en solution de l'invertase fait suite à une plasmolyse rapide de la levure, au cours de laquelle les cellules éclatent, suivie d'une autolyse qui libère l'invertase.

2. Mode opératoire

Pour préparer l'enzyme, on procède comme suit :

- Préparer 100 ml de solution 0,1 M de bicarbonate de sodium et 0,01 M d'acétate de sodium (0,84 g de NaHCO_3 + 0,14 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pour un volume final de 100 ml).
- Ajouter 50 g de levure sèche.
- Couvrir et agiter jusqu'à la dissolution complète de la levure.
- Laisser la plasmolyse se dérouler à température ambiante pendant 45 heures.
- Ensuite, ajouter 100 ml d'eau distillée et bien homogénéiser.
- Centrifuger à 2000 g (4000 tr/min) pendant 15 minutes.
- Récupérer le surnageant et y ajouter de l'acide acétique pour acidifier la préparation jusqu'à pH 4,0 environ (l'acide acétique est employé ici comme conservateur).
- Centrifuger cette préparation une deuxième fois à 4000 tr/min pendant 15 minutes.
- Récupérer le surnageant qui contient la plupart de l'enzyme et vérifier le pH de ce nouveau surnageant. L'ajuster à 3,9 si nécessaire.

La préparation d'invertase (aussi appelée extrait enzymatique) obtenue est relativement limpide et peu colorée (sa teinte est légèrement jaune). Cette préparation ne se trouble pas avec le temps et ne s'inactive pas si elle est conservée à 4°C [38].

III. DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE L'ENZYME SOLUBLE

1. Principe de la mesure

On fait réagir, dans des conditions standards de pH et de température, la préparation d'invertase diluée sur une solution de saccharose (substrat).

L'activité β – fructosidasique est évaluée par la quantité de produits formés : glucose et fructose en fonction du temps. Ces produits sont révélés grâce à leur propriété réductrice par un réactif chimique : l'acide 3,5 – dinitrosalicylique (DNSA). En milieu alcalin et à chaud, ce dernier réagit avec les sucres réducteurs et sa coloration vire au rouge – orangé.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de glucose et de fructose libérée dans le milieu réactionnel à la suite de l'hydrolyse du saccharose [66, 86].

2. Evaluation de l'activité β - fructosidasique

- Dans une série de tubes à essais (3 tubes pour chaque durée de réaction), on met 750 μ l de saccharose 0,5 M dissout dans un tampon acétate 0,1 M – pH 4,8.
- Dans chaque tube, on ajoute 250 μ l de préparation d'enzyme diluée (le facteur de dilution peut varier selon l'expérience réalisée).
- La réaction enzymatique se déroule à 25°C pour les durées d'incubation suivantes : 0 – 0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 2,5 minutes.
La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de réactif DNSA (*cf.* « Annexe »). Pour les tubes correspondant au temps « 0 », l'addition de 1 ml de DNSA est effectuée avant celle de l'enzyme.
- La réaction sucres réducteurs – DNSA s'effectue dans un bain-marie bouillant pendant 5 min.
- Les tubes sont ensuite refroidis rapidement dans de l'eau froide, puis on ajoute 10 ml d'eau distillée dans chacun d'eux.
- Enfin, on lit la densité optique du contenu de chaque tube, dans un spectrophotomètre à 530 nm contre le blanc de la courbe d'étalonnage.

La quantité de sucre inverti (glucose et fructose) libérée lors de la réaction enzymatique est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage (*cf.* **figure 4**).

Les solutions étalons de sucre inverti ont les concentrations suivantes :

0 – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 mmol/l

(5 mmol/l = 2,5 mmol/l de glucose + 2,5 mmol/l de fructose).

- Chaque mesure est répétée 3 fois.

Remarque :

La courbe représentant la concentration du produit de la réaction enzymatique en fonction du temps permet de déterminer la vitesse initiale et aussi de choisir la durée d'incubation utilisable pour la méthode en 2 points.

Après vérification de la linéarité de la courbe sur un intervalle de temps = 0 – ... – 2,5 min, on choisit les 2 points : « 0 min » et « 1,5 min » pour la suite du travail (cf. **figure 5**).

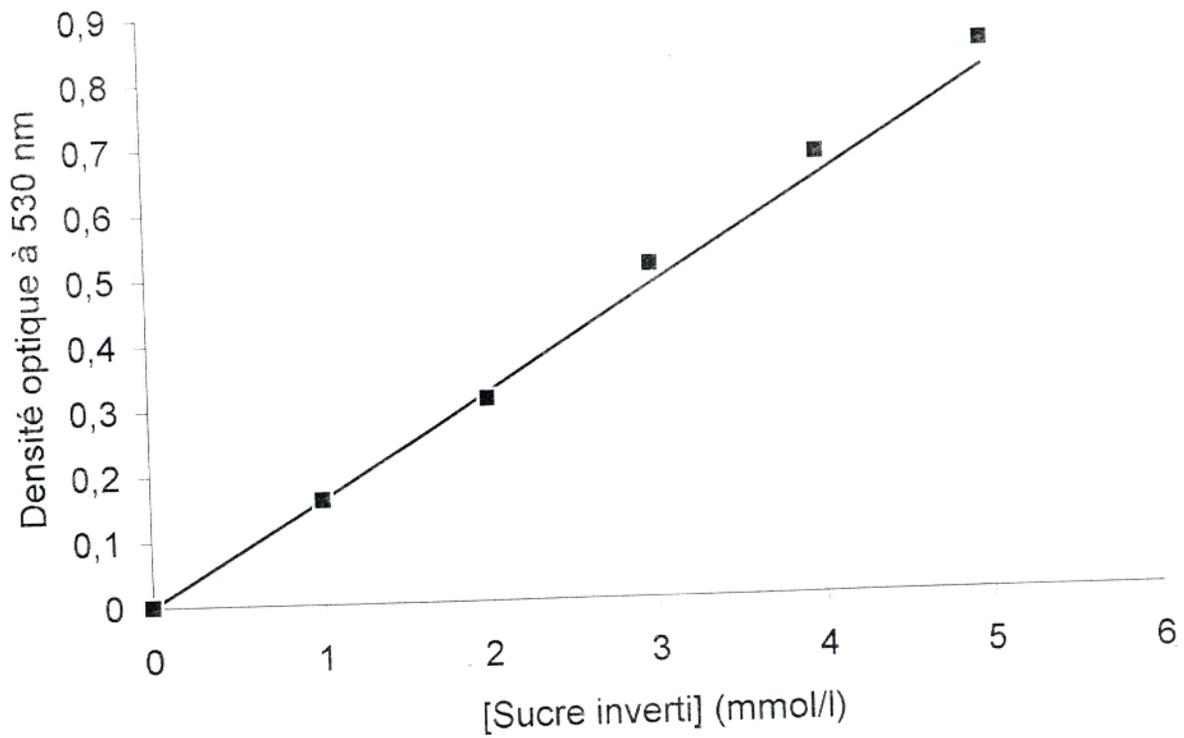


Figure 4 : Droite d'étalonnage pour la méthode au DNSA.

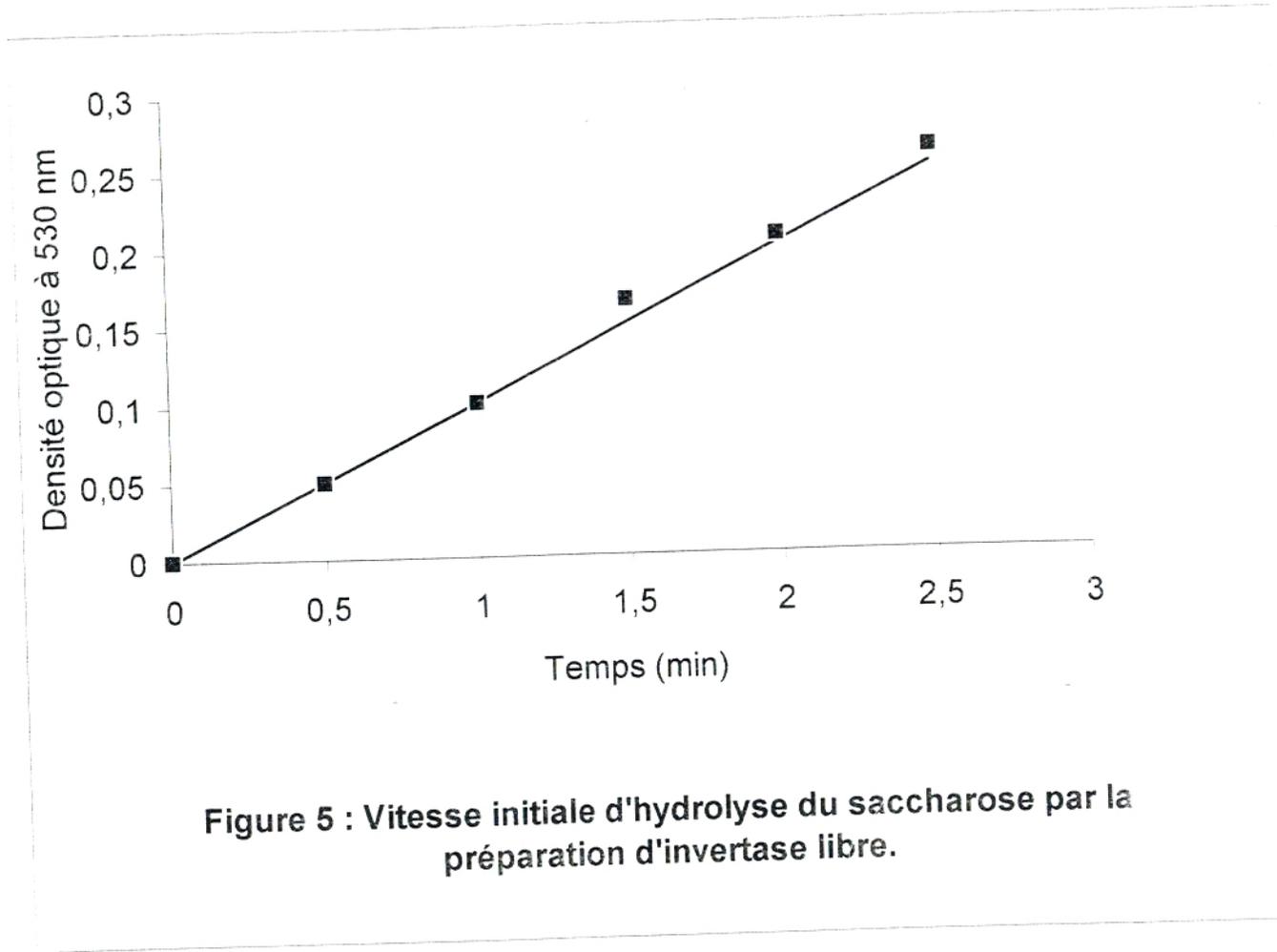


Figure 5 : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose par la préparation d'invertase libre.

3. Calcul de l'activité enzymatique volumique

La courbe d'étalonnage permet de déterminer directement à partir de la variation d'absorbance mesurée, la quantité de sucre inverti formé dans le milieu réactionnel (une nouvelle courbe d'étalonnage est établie à chaque expérience).

Cette courbe permet également de préciser la limite supérieure de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration de sucre inverti.

Pour calculer l'activité enzymatique, on détermine d'abord la vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose par le calcul suivant :

$$V_{in} = \frac{b \cdot 10^3}{2 \cdot b'}$$

V_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

b : Pente de la droite « absorbance du milieu réactionnel en fonction du temps » (unités d'absorbance . min^{-1}).

b' : Pente de la droite d'étalonnage (unités d'absorbance.l.mmol⁻¹).

Le facteur « 1/2 » provient du fait que la formation d'une mole d'inverti correspond à l'hydrolyse d'une 1/2 mole de saccharose.

L'activité volumique est déterminée par le calcul suivant :

$$AV = \frac{V_{in} \cdot V_r \cdot F}{10^3 \cdot V_e}$$

AV : Activité volumique (UI/ml).

V_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

V_r : Volume de milieu réactionnel (1 ml).

V_e : Volume d'enzyme (0,25 ml).

F : Facteur de dilution.

4. Calcul de l'activité enzymatique spécifique

L'activité spécifique est le rapport de l'activité enzymatique volumique (exprimée en UI/ml) et de la concentration en protéines (exprimée en mg/ml) de la préparation d'invertase.

$$AS = \frac{AV}{[\text{Protéines}]}$$

AS : Activité spécifique (UI/mg).

AV : Activité volumique (UI/ml).

[Protéines] : Concentration en protéines (mg/ml).

IV. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES DANS LA PREPARATION D'INVERTASE PAR LA METHODE DU BIURET

1. Principe

Les protéines réagissent avec le réactif du biuret pour donner des complexes colorés bleu-violet. La couleur ainsi formée est due à la réaction du cuivre en milieu alcalin avec les liaisons peptidiques des protéines. L'intensité de la coloration dépend donc de la concentration des protéines présentes [86].

2. Mode opératoire

On prend une série de tubes. Dans chaque tube, on introduit 2 ml d'extrait enzymatique dilué au 1/4 ou au 1/6 et on y ajoute 3 ml de réactif du biuret (*cf.* « Annexe »). On incube ensuite les tubes dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. L'absorbance correspondant à chaque tube est mesurée dans un spectrophotomètre (à une longueur d'onde de 540 nm) contre un blanc composé de 2 ml d'eau distillée et de 3 ml de réactif du biuret.

La concentration en protéines (en mg/ml) est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la gélatine comme étalon (*cf.* **figure 6**).

La concentration en protéines est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Protéines}] \text{ (mg / ml)} = \frac{\text{Absorbance échantillon} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Pente de la droite d'étalonnage (unités d'absorbance.ml.mg}^{-1}\text{)}}$$

La concentration en protéines de l'extrait enzymatique est assimilée à la moyenne des 2 concentrations en protéines déterminées expérimentalement.

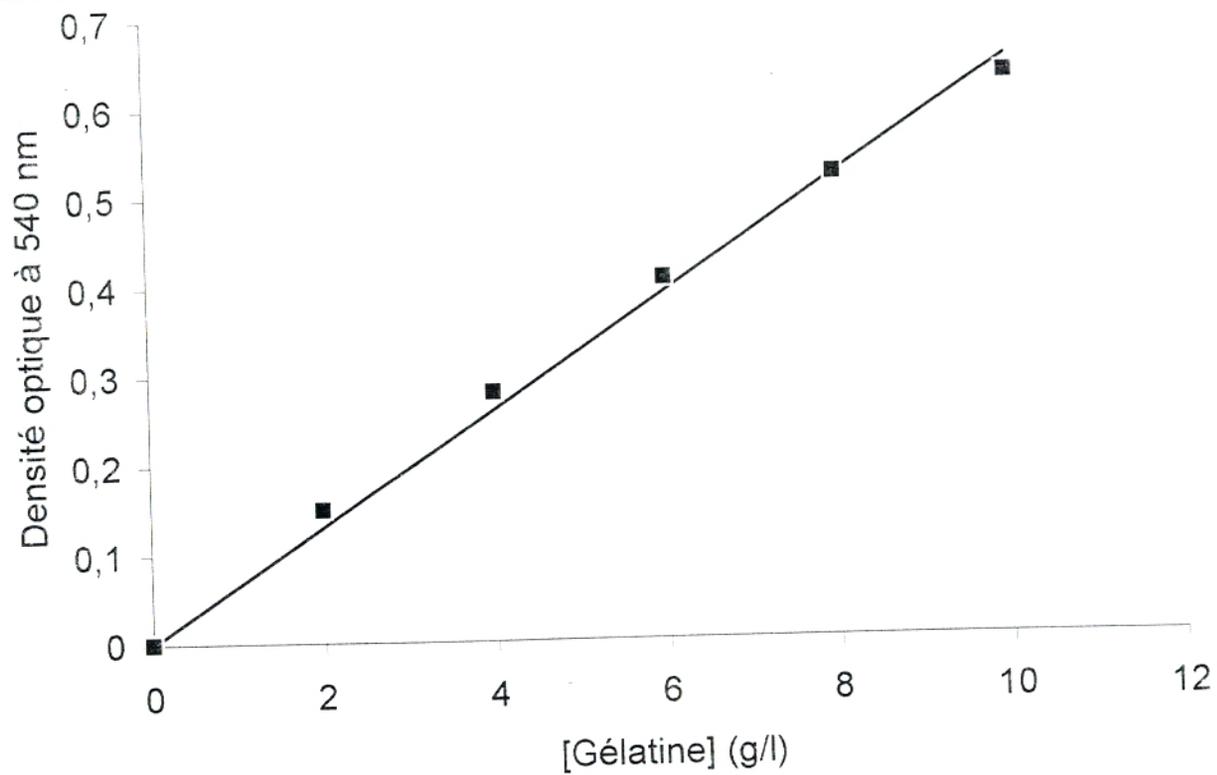


Figure 6 : Droite d'étalonnage pour la méthode du biuret.

V. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME SOLUBLE

1. Effet de la concentration en enzyme dans des conditions standards (25°C, pH 4,8)

Préparer 6 séries de 6 tubes à essais, sachant que chaque série comporte 3 tubes pour le temps « 0 » et 3 tubes pour le temps « 1,5 » min .

Chaque série correspond à l'une des dilutions suivantes de l'extrait enzymatique : $\frac{1}{75}$ - $\frac{1}{100}$ - $\frac{1}{150}$ - $\frac{1}{200}$ - $\frac{1}{250}$ - $\frac{1}{300}$.

L'activité enzymatique est déterminée en suivant la procédure décrite au paragraphe III.

2. Effet de la concentration en substrat (saccharose) dans des conditions standards (25°C, pH 4,8)

Préparer 11 séries de 6 tubes à essais (sachant que chaque série comporte 3 tubes pour le temps « 0 » et 3 tubes pour le temps « 1,5 » min). Chaque série correspond à l'une des concentrations en saccharose suivantes (en mol/l):

0,01 - 0,02 - 0,05 - 0,10 - 0,12 - 0,15 - 0,20 - 0,25 - 0,50 - 0,75 - 1.

La solution d'enzyme est diluée 100 fois. Pour chaque concentration en substrat, on mesure la vitesse initiale d'hydrolyse (cf. paragraphe III).

3. Effet du pH

On mesure l'activité enzymatique à différents pH. Pour cela, on utilise des solutions de tampon acétate 0,1 M de pH compris entre 3,6 et 5,6 pour diluer le substrat et l'enzyme.

La concentration en substrat est 0,5 M. La préparation d'invertase est diluée 300 fois. La température est de 25°C et la durée de réaction vaut 1,5 min.

4. Effet de la température

On mesure l'activité enzymatique aux différentes températures suivantes :

25 – 37 – 45 – 50 – 55 – 60 – 65 – 70 – 75 – 80 °C.

La concentration du saccharose est 0,5 M (le substrat est dissout dans un tampon acétate pH 4,8 – 0,1M).

La dilution de l'enzyme est 300 pour les températures : 25 – 37 – 45 – 70 – 75 – 80 °C et 600 pour les températures : 50 – 55 – 60 – 65 °C.

5. Stabilité thermique de l'enzyme

Dans une série de 6 tubes à essais, on met dans chaque tube 1 ml de préparation d'invertase diluée 100 fois dans du tampon acétate 0,1 M – pH 4,8.

Ces tubes sont incubés à une température donnée pendant une durée maximale de 6 heures. Toutes les heures, on prend un tube et on

mesure son activité enzymatique résiduelle à 25°C en présence de saccharose 0,5 M (cf. paragraphe III). On mesure aussi l'activité enzymatique avant l'incubation.

On renouvelle toute l'expérience à d'autres températures.

VI. ENZYME IMMOBILISEE DANS DES BILLES D'ALGINATE

1. Préparation des billes d'alginate

La méthode de préparation des billes d'alginate est une adaptation de la méthode décrite par Loncle (1992).

Elle consiste à :

- Dissoudre 0,08 g d'alginate de sodium dans 2,5 ml de tampon acétate pH 4,8 – 0,1 M tiède.
- Ajouter 0,5 ml de solution d'enzyme diluée 7 fois dans le tampon acétate 0,1 M – pH 4,8.

La concentration finale d'alginate de sodium est 2,7% (P/V).

- Bien agiter et laisser le mélange se dégazer.
- Verser le mélange dans une seringue de 5 ml (sans aiguille) et le laisser tomber goutte à goutte, d'une hauteur de 20 cm, dans une solution de chlorure de calcium 0,3 mol/l.
- Laisser séjourner les billes formées, 30 minutes dans le chlorure de calcium à température ambiante, et encore 30 minutes à 4°C.

- Filtrer les billes et bien les rincer avec un tampon acétate pH 4,8 – 0,1M plusieurs fois.
- Conserver les billes dans un flacon bien fermé à 4°C.

Le diamètre intérieur de l'embout de la seringue utilisée est 3 mm.

Dans les conditions citées ici, le nombre de billes obtenues varie entre 58 et 63.

2. Evaluation de l'activité de l'enzyme immobilisée

L'activité volumique est déterminée selon le protocole suivant :

- Prendre une série de tubes à hémolyse et mettre dans chacun d'eux :
 - 750 µl de saccharose 0,5 M dissout dans un tampon acétate pH 4,8 – 0,1 M.
 - 250 µl du même tampon acétate pH 4,8 – 0,1 M.
 - une bille d'alginate (contenant l'enzyme immobilisée).
- La réaction enzymatique se déroule à 25°C sous agitation. Les durées d'incubation sont : 0 – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 min.
- La réaction est arrêtée en transférant le milieu réactionnel, dépourvu de la bille d'alginate, dans un tube à essai contenant 1 ml de réactif DNSA (cf. « Annexe »). Pour le tube correspondant au temps « 0 », on n'ajoute pas la bille d'alginate.

- La réaction entre les sucres réducteurs et le DNSA s'effectue dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes.
- Après refroidissement rapide des tubes, on ajoute 10 ml d'eau distillée dans chaque tube.
- Enfin, on lit l'absorbance au moyen d'un spectrophotomètre, à 530 nm, contre le blanc de la courbe d'étalonnage.
- Après vérification de la linéarité de la courbe $V_{in} = f(\text{temps})$ dans l'intervalle [0 – 6 min] , on choisit une durée d'incubation de 5 min pour le reste du travail (*cf.* **figure 7**).

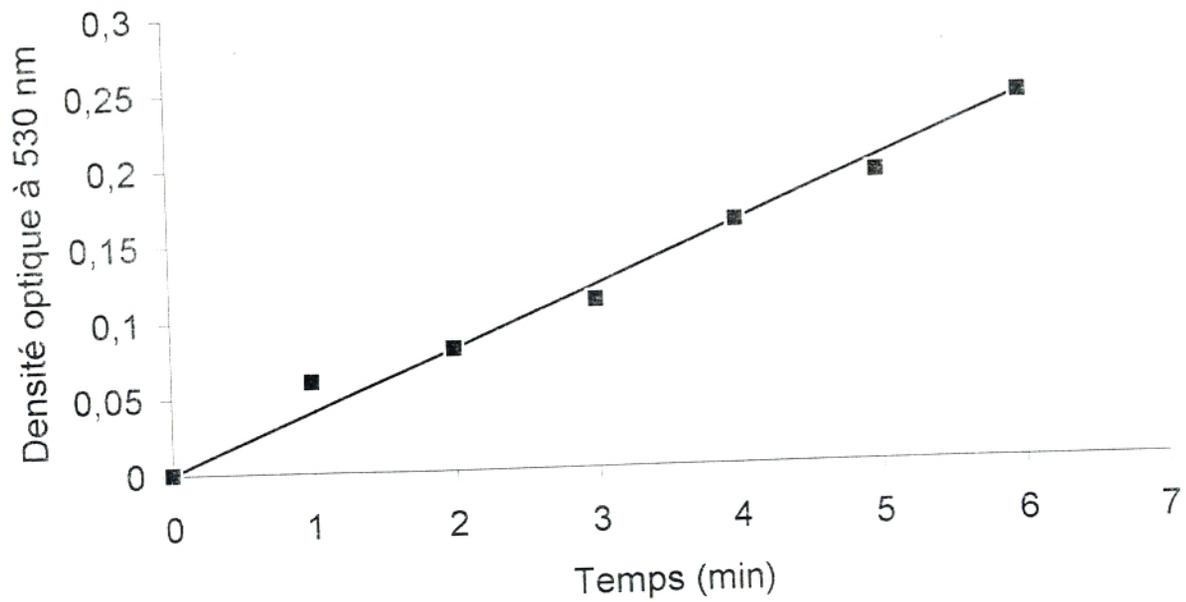


Figure 5 : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate.

3. Calcul de l'activité enzymatique de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate

Pour calculer l'activité enzymatique, on détermine d'abord la vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose par le calcul suivant :

$$V_{in} = \frac{b \cdot 10^3}{2 \cdot b'}$$

V_{in} : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

b : Pente de la droite « absorbance du milieu réactionnel en fonction du temps » (unités d'absorbance . min^{-1}).

b' : Pente de la droite d'étalonnage (Unités d'absorbance.l.mmol⁻¹).

Le facteur « 1/2 » provient du fait que la formation d'une mole de sucre inverti correspond à l'hydrolyse d'une 1/2 mole de saccharose.

L'activité rapportée au volume théorique d'enzyme immobilisée est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Activité volumique (UI/ml)} = \frac{V_{in} \cdot V_r \cdot n \cdot F}{10^3 \cdot V_e}$$

V_r : Volume de milieu réactionnel (1 ml).

n : Nombre total de billes d'alginate (compris entre 58 et 63 billes).

F : Facteur de dilution de la préparation d'invertase (7).

V_e : Volume de préparation d'invertase diluée utilisé pour fabriquer les n billes d'alginate.

4. Essai d'immobilisation de l'invertase dans des billes d'alginate avec formation de liaisons covalentes

Afin de limiter les fuites d'enzyme des billes d'alginate, on a exposé ces billes à divers agents réticulants.

On prépare les billes d'alginate comme décrit au paragraphe VI.1., mais au lieu de les mettre dans une solution de chlorure de calcium seul, on ajoute l'un des réactifs suivants à 1% (V/V).

Les divers réactifs utilisés comportent la fonction aldéhyde et sont soit uni – soit bifonctionnels.

Les réactifs aldéhydiques unifonctionnels utilisés sont le benzaldéhyde et le formaldéhyde. Ce dernier est choisi comme agent de liaison covalente non sélective pour créer des liaisons au hasard entre les enzymes [52].

En ce qui concerne les réactifs bifonctionnels, on utilise le glutaraldéhyde qui est capable de réagir avec deux groupes amines de l'enzyme.

Les fuites éventuelles d'enzyme sont évaluées selon le protocole décrit par Loncle (1992) :

- Préparer pour chaque réactif trois tubes à essais.
- Le premier correspond au temps « 0 », le deuxième sert à mesurer l'activité enzymatique (*cf.* paragraphe VI.2) et le troisième est traité comme le deuxième mais quand le temps d'incubation est terminé, on n'ajoute pas le DNSA mais on verse le milieu réactionnel (sans la bille d'alginate) dans un tube vide et on le réincube pendant 10 minutes à 37°C avant d'ajouter le réactif DNSA.
- Les conditions opératoires sont : saccharose 0,5 M ; tampon acétate pH 4,0 – 0,1 M ; 37°C.

VII. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME IMMOBILISEE

1. Effet du pH

Afin de tester l'influence du pH sur l'enzyme immobilisée, on mesure l'activité enzymatique aux divers pH suivants : 3,6 – 4,0 – 4,4 – 4,8 – 5,2 – 5,6. (On utilise du tampon acétate 0,1 M pour obtenir ces différents pH).

L'activité enzymatique est mesurée selon la procédure décrite au paragraphe VI.2.

2. Effet de température

Afin de déterminer la température optimale de l'enzyme immobilisée, les billes sont incubées pendant 5 min dans une solution de saccharose 0,5 M (au pH optimal trouvé soit pH 4) à diverses températures (25 – 37 – 45 – 50 – 55 – 60 – 65 – 70 – 75 °C).

3. Stabilité thermique de l'enzyme immobilisée

La stabilité thermique de l'enzyme immobilisée a été évaluée en mesurant l'activité résiduelle de l'enzyme exposée à diverses températures.

Pour chaque température, on prépare une série de 6 tubes à essais (chaque tube contenant une bille et 1 ml de tampon acétate pH 4,0 – 0,1 M).

Ces tubes sont incubés à la température voulue pendant une durée maximale de 6 heures. Toutes les heures, l'activité résiduelle est mesurée à 25°C. On mesure aussi l'activité enzymatique avant l'incubation.

4. Effet du substrat sur l'enzyme immobilisée

On a testé l'influence de la concentration du saccharose à la température et au pH optimaux trouvés (soit 37°C et pH 4,0). Les différentes concentrations de substrat testées étaient :

0,05 – 0,10 – 0,20 – 0,25 – 0,50 – 0,75 – 1 – 1,25 – 1,50 M.

Pour chacune de ces concentrations, on a mesuré la vitesse initiale de l'enzyme.

VIII. HYDROLYSE DISCONTINUE DU SACCHAROSE PAR L'INVERTASE SOLUBLE ET PAR L'INVERTASE IMMOBILISEE DANS UN REACTEUR BATCH

Les expériences en mode discontinu avec les enzymes soluble ou incluse dans des billes d'alginate ont été faites dans un bécher, placé dans un bain-marie, et agité régulièrement pour homogénéiser le milieu. Le volume réactionnel était de 100 ml.

Des prélèvements étaient effectués au cours du temps afin d'estimer les quantités de glucose et de fructose libérées par l'enzyme dans le milieu réactionnel.

Dans les échantillons prélevés, l'hydrolyse du saccharose par l'invertase soluble était arrêtée par l'addition d'une solution 0,2 M d'hydroxyde de sodium (1 volume de solution de NaOH pour 1 volume d'échantillon).

On a testé l'influence de la concentration en substrat, de la concentration en enzyme, et de la température.

**IX. HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE PAR
L'INVERTASE IMMOBILISEE PAR INCLUSION
DANS UN REACTEUR A LIT FIXE**

Pour tester l'efficacité et la stabilité de l'enzyme immobilisée, un réacteur a lit fixe a été utilisé. Ce réacteur consistait en un tube de 1,5 cm de diamètre et 15,5 cm de longueur muni d'un tamis à une extrémité pour retenir les billes d'alginate. Dans ce tube était placée une couche de 2,3 cm de billes d'alginate.

Les débits de fluide à l'entrée et à la sortie du réacteur étaient maintenus identiques afin de garder constant le volume de milieu réactionnel dans le réacteur.

Au démarrage, le réacteur était d'abord alimenté avec un tampon acétate 0,1 M – pH 4,0 puis avec la solution de substrat (saccharose 0,5 M). La réaction se déroulait à la température ambiante.

La concentration des produits libérés par la réaction a été déterminée sur des échantillons de fluide sortant du réacteur (la température de chaque échantillon recueilli était notée afin de mettre en évidence d'éventuelles irrégularités de température au cours de l'expérience).

L'efficacité du réacteur a été testée à plusieurs débits.



RESULTATS
&
DISCUSSION

I. ETUDE DE LA STABILITE DE LA PREPARATION D'INVERTASE

Afin d'évaluer la stabilité de l'activité enzymatique de la préparation d'invertase, nous avons effectué un suivi de l'activité volumique de l'invertase sans conservateur et avec un conservateur (l'acide acétique) pendant 5 mois. Les deux préparations d'invertase étaient conservées dans les mêmes conditions.

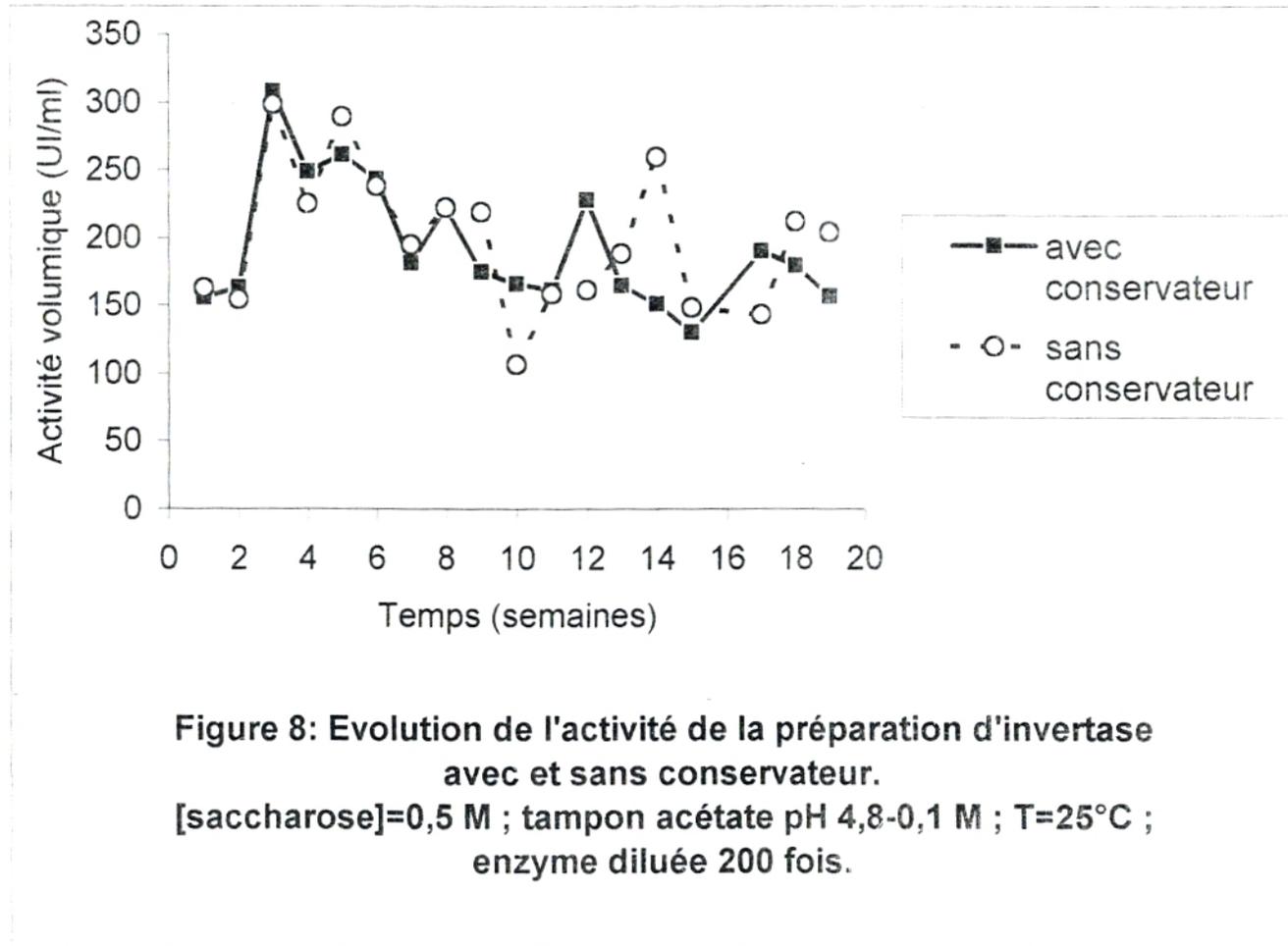
L'activité a été mesurée dans les conditions suivantes : [saccharose] = 0,5 M ; tampon acétate pH 4,8 – 0,1 M ; T=25°C ; enzyme diluée 200 fois.

La **figure 8** montre que durant les quatre premières semaines, il y a une perturbation importante de l'activité des préparations d'enzyme sans conservateur et avec conservateur. Pour cette raison, la préparation d'enzyme n'était pas utilisée durant cette période.

Durant les semaines suivantes, la courbe garde une forme en dents de scie, néanmoins cette allure est acceptable car on n'observe pas de hausse ou de diminution continue de l'activité volumique.

L'effet du conservateur (acide acétique) sur l'activité enzymatique a été évalué : sur la période de 5 mois, l'activité moyenne de l'invertase sans conservateur vaut 196 UI/ml avec un écart type égal à 49 ; l'activité moyenne de l'invertase avec conservateur vaut 186 UI/ml avec un écart type égal à 38.

Ces valeurs indiquent que l'activité β -fructosidasique avec conservateur est moins importante que celle sans conservateur. Cependant, l'influence du conservateur est notable et elle se traduit par la diminution de la perturbation de l'activité volumique.



Par ailleurs, nous avons remarqué que l'acide acétique intervenait dans le processus de purification de la préparation d'invertase en faisant précipiter des protéines.

En effet, la concentration en protéines de l'enzyme sans conservateur (11,3 mg/ml) est supérieure à celle de l'enzyme avec conservateur (7,8 mg/ml) ; alors que les activités spécifiques de ces deux préparations sont respectivement 17 ± 4 UI/mg et 24 ± 5 UI/mg.

Bourgeois (1996) explique que la nature de l'acide présent dans le milieu influe sur la résistance des micro-organismes face à l'acidification.

Ainsi l'acide acétique exerce une forte action inhibitrice à l'encontre de nombreux micro-organismes. La croissance de la plupart des micro-organismes responsables d'intoxications alimentaires et celle des bactéries sporulées sont inhibées à la concentration de 0,1% d'acide acétique non dissocié et la croissance des moisissures toxigènes est inhibée par 0,3% d'acide acétique non dissocié. L'acide non dissocié pénètre librement dans la cellule et comme le milieu intérieur est moins acide, l'acide s'y dissocie en augmentant la concentration interne en protons. Cet afflux de protons réduit la force proton motrice ce qui perturbe certains échanges entre la cellule et son environnement : pénétration de nutriments et d'acides aminés en particulier [12].

II. **DETERMINATION DES PARAMETRES
CINETIQUES DE L'ENZYME SOLUBLE
DANS DES CONDITIONS STANDARDS
DE pH ET DE TEMPERATURE
(TAMPON ACETATE pH 4,8 – 0,1 M ; T = 25°C)**

1. **Effet de la concentration en enzyme sur la vitesse
initiale**

Afin de voir l'influence de la concentration en enzyme sur la vitesse d'hydrolyse, nous avons fait varier la concentration de l'extrait enzymatique en prenant les dilutions suivantes :

$$\frac{1}{75} - \frac{1}{100} - \frac{1}{150} - \frac{1}{200} - \frac{1}{250} - \frac{1}{300}$$

La **figure 9** montre que lorsque la concentration en enzyme augmente, la vitesse initiale augmente et qu'il y a une proportionnalité stricte entre la concentration d'invertase et la vitesse initiale.

La pente de la droite « vitesse initiale en fonction de la concentration en invertase » devrait permettre de déterminer la constante catalytique (K_{cat}) qui se définit comme le nombre de molécules de substrat transformées par unité de temps et par molécule d'enzyme dans des conditions expérimentales données

$$\left(K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_T]} \right)$$

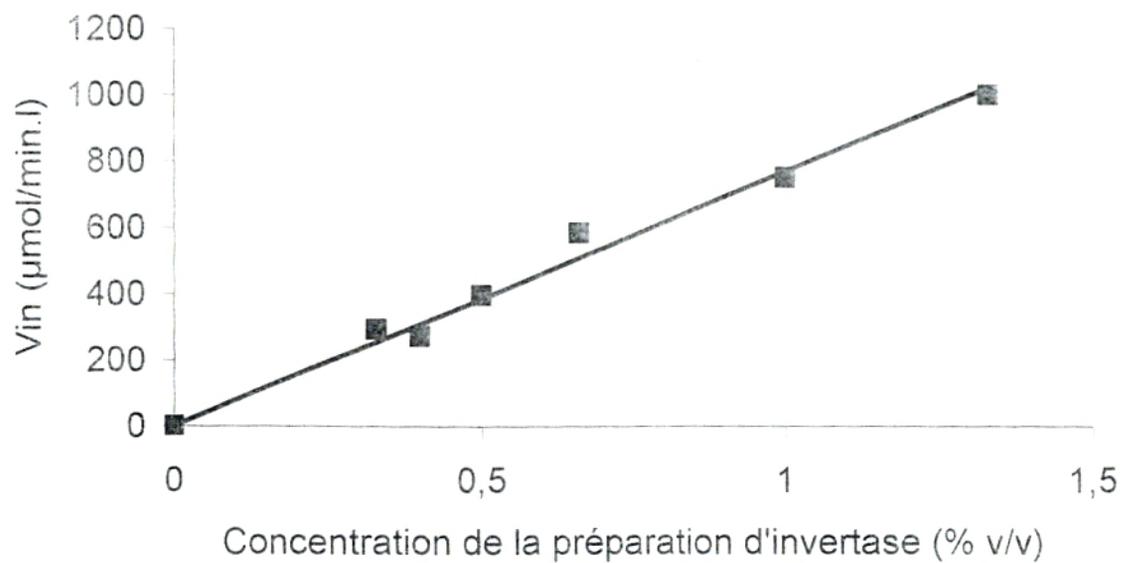


Figure 9 : Effet de la concentration de la préparation d'invertase sur la vitesse initiale.
 [saccharose]=0,5 M ; tampon acétate pH 4,8-0,1 M ; T=25°C.

Cependant, dans notre cas, la concentration molaire de l'enzyme est inconnue ce qui nous empêche de calculer K_{cat} . (Néanmoins, comme la courbe « vitesse initiale en fonction de la concentration en enzyme » est linéaire dans le domaine des dilutions utilisées, nous pouvons comparer entre eux des résultats obtenus avec ces diverses dilutions).

D'après Coutouly (1991), la constante catalytique ne peut être pratiquement obtenue par le calcul que si l'on dispose d'un modèle cinétique et de la valeur numérique des diverses constantes. De plus, la concentration d'enzyme totale ne peut être connue, même dans une préparation pure, car la protéine enzymatique n'est qu'un des composants d'un mélange dans des proportions inconnues et variables en fonction du temps, du mode de préparation, de l'origine, etc.

2. Effet de la concentration en substrat sur la vitesse d'hydrolyse

Afin d'étudier l'effet de la concentration en substrat sur le comportement de l'enzyme, nous avons fait réagir la préparation d'enzyme diluée 100 fois sur diverses concentrations de saccharose (0,01 – 0,02 – 0,05 – 0,1 – 0,12 – 0,15 – 0,20 – 0,25 – 0,50 – 0,75 – 1 mol.l⁻¹).

La relation entre la vitesse initiale de la réaction et la concentration en substrat est représentée sur la **figure 10**.

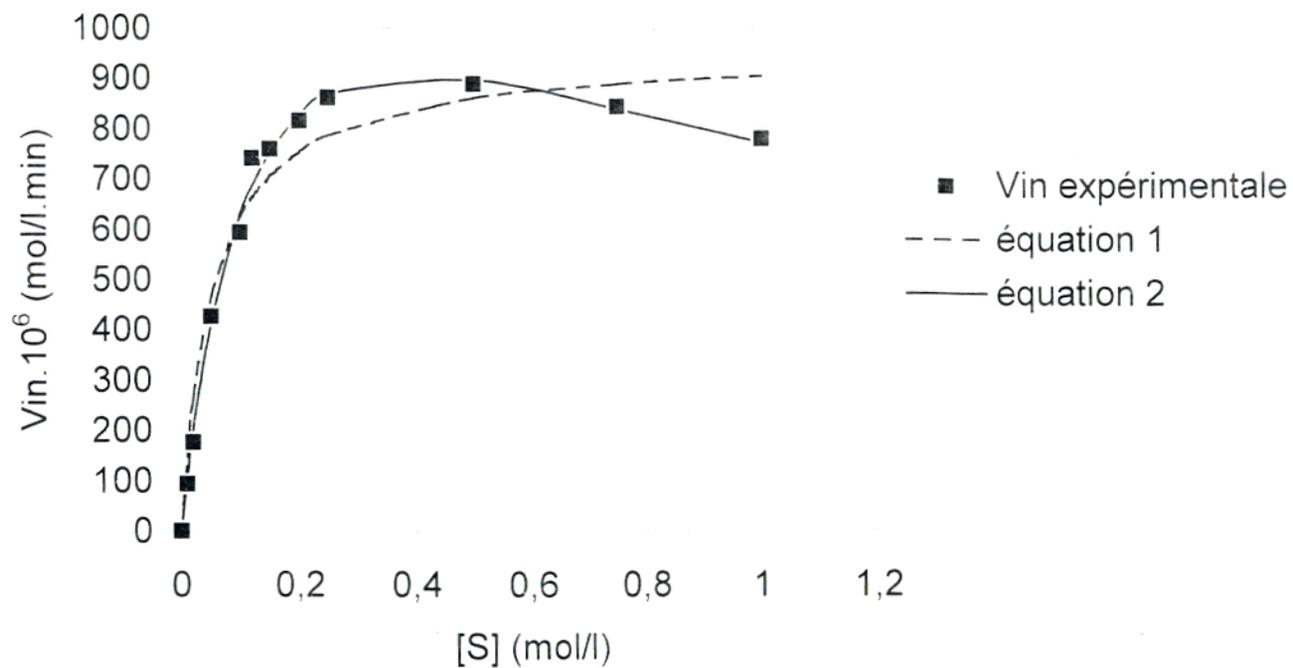


Figure 10 : Effet de la concentration en saccharose sur l'activité de l'enzyme libre.
 Tampon acétate pH 4,8 - 0,1M ; T=25°C ;
 enzyme diluée 100 fois.

L'équation de la courbe tracée en trait discontinu est l'équation de Michaelis et Menten établie pour le cas où l'enzyme ne subit aucun type d'inhibition :

$$V_{in} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{équation 1})$$

(Le carré du coefficient de corrélation (r^2) obtenu en utilisant cette équation est 0,9561.)

Cette courbe permet de déterminer les paramètres cinétiques V_{max} et K_m d'une manière assez peu précise. On obtient :

$$V_{max} = 949,9 \mu\text{mol/l/min} \quad \text{et} \quad K_m = 0,052 \text{ mol/l.}$$

Cependant, on sait que l'invertase subit une inhibition par excès de substrat [22]. Ce phénomène est dû à un mauvais positionnement du substrat sur le site actif de l'enzyme. L'équation 2 permet de prendre en compte ce phénomène :

$$V_{in} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_s}} \quad (\text{équation 2})$$

où K_s est la constante d'inhibition par le substrat.

Le profil de la courbe obtenue en utilisant l'équation 2, révèle l'effet d'inhibition par excès de substrat car il concorde bien avec les points expérimentaux. Du reste, lorsque l'on ajuste les données expérimentales par l'équation 2 (**figure 10**), le carré du coefficient de corrélation ($r^2 = 0,9951$) est plus élevé que lorsque l'on utilise l'équation 1. L'équation 2 décrit donc mieux la cinétique observée que l'équation 1.

Les paramètres cinétiques trouvés à partir de l'équation 2 sont :

$$V_{\max} = 1483 \mu\text{mol/l/min}, K_m = 0,127 \text{ mol/l} \text{ et } K_s = 1,26 \text{ mol/l}.$$

Dans ces conditions, la concentration de saccharose pour laquelle la vitesse initiale est maximale est 0,25 mol/l.

Pour une détermination plus précise des constantes cinétiques, on utilise habituellement la représentation de Lineweaver et Burk (**figure 11**) obtenue en traçant $\frac{1}{V_{\text{in}}}$ en fonction de $\frac{1}{[S]}$. L'équation de cette courbe est l'inverse de l'équation 1 :

$$\frac{1}{V_{\text{in}}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (\text{équation 3})$$

Avec cette représentation V_{\max} vaut 1278 $\mu\text{mol/l/min}$ et K_m vaut 0,125 mol/l. On constate que ces valeurs sont plus proches de celles obtenues avec l'équation 2 que de celles obtenues avec l'équation 1.

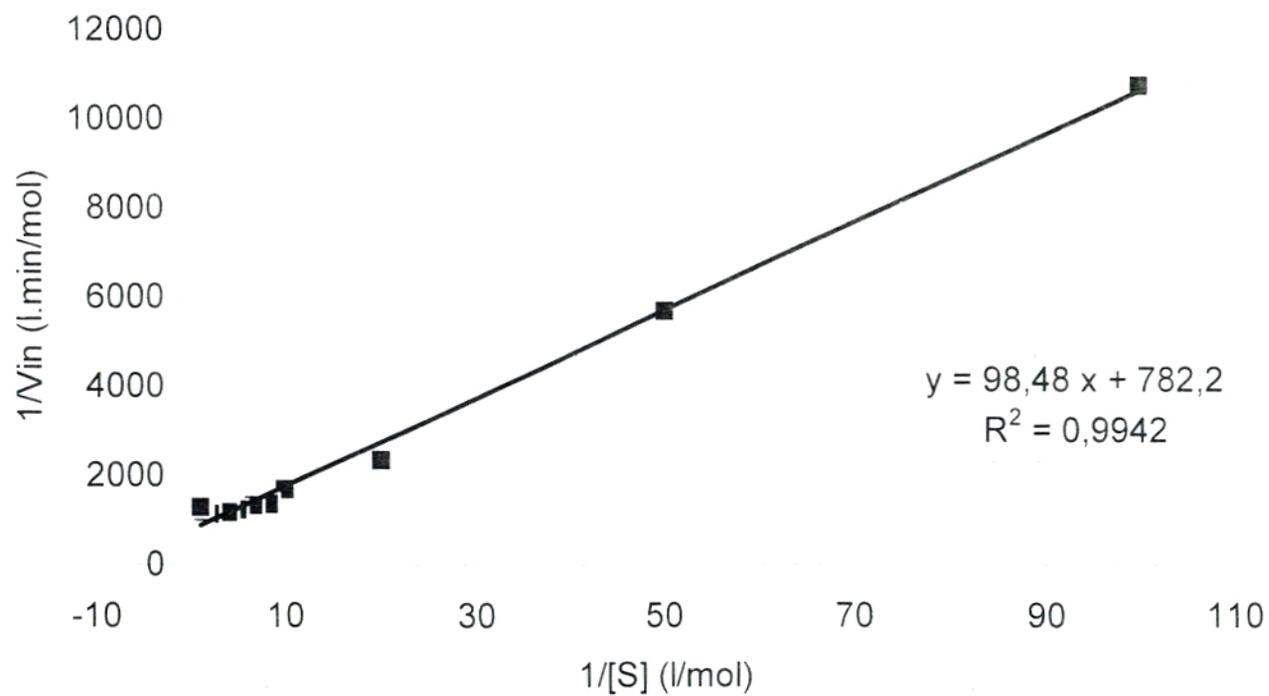


Figure 11 : Représentation de Lineweaver et Burk pour l'enzyme libre.
 Tampon acétate pH4,8 - 0,1 M ; T=25°C ;
 enzyme diluée 100 fois.

L'ensemble des résultats obtenus est récapitulé dans le **tableau 2**.

**Tableau 2 : Constantes cinétiques de l'invertase libre
dans les conditions standards
(Tampon acétate pH 4,8 – 0,1 M ; T = 25°C)**

Equation utilisée	V_{max} ($\mu\text{mol/l/min}$)	K_m (mol/l)	K_s (mol/l)	r^2
$V_{in} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$ (N°1)	949,9	0,052	-	0,9561
$V_{in} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_s}}$ (N°2)	1483	0,127	1,26	0,9951
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$ (N°3)	1278	0,125	-	0,9942

Docolomansky *et al.* (1994) ont testé, sur l'invertase soluble, l'effet de différentes concentrations de saccharose (comprises entre 0,001 M et 1 M) dans le tampon acétate 0,1 M – pH 4,7 à 25°C. Ils ont trouvé : $K_m = 36,4 \text{ mmol/l}$ et $K_s = 1783 \text{ mmol/l}$ [32].

III. DETERMINATION DES PARAMETRES OPTIMAUX DE L'INVERTASE LIBRE

1. Effet du pH

L'extrait enzymatique dilué et amené à différents pH avec du tampon acétate 0,1 M (pH 3,6 à pH 5,6) est testé à 25°C dans une solution de saccharose 0,5 M.

La **figure 12** représente l'évolution de l'activité enzymatique relative (c'est-à-dire rapportée à l'activité maximale) en fonction du pH.

Cette courbe montre une persistance importante de l'activité enzymatique (de 91,30% à 100%) aux divers pH, avec un premier maximum à pH 3,6 et un autre à pH 4,8. Dans l'intervalle de pH compris entre 4,0 et 4,4, l'activité de l'invertase se maintient à 95,6%, tandis que dans l'intervalle compris entre pH 5,2 et pH 5,6, cette activité s'abaisse à 91,30%.

Ces résultats semblent indiquer l'existence de deux iso-enzymes dans l'extrait enzymatique brut. Ces deux iso-enzymes sont actives dans la zone des pH allant de 3,6 à 5,6, avec une activité maximale à pH 3,6 pour l'une d'elles et à pH 4,8 pour l'autre.

Cette interprétation est en accord avec le fait que la levure *Saccharomyces cerevisiae* exprime l'invertase sous deux formes. Une forme extracellulaire et une forme intracellulaire qui hydrolysent le saccharose avec la même efficacité [93, 94].

Compte-tenu des résultats obtenus, nous avons choisi de travailler à pH 4,8 dans la suite des expériences.

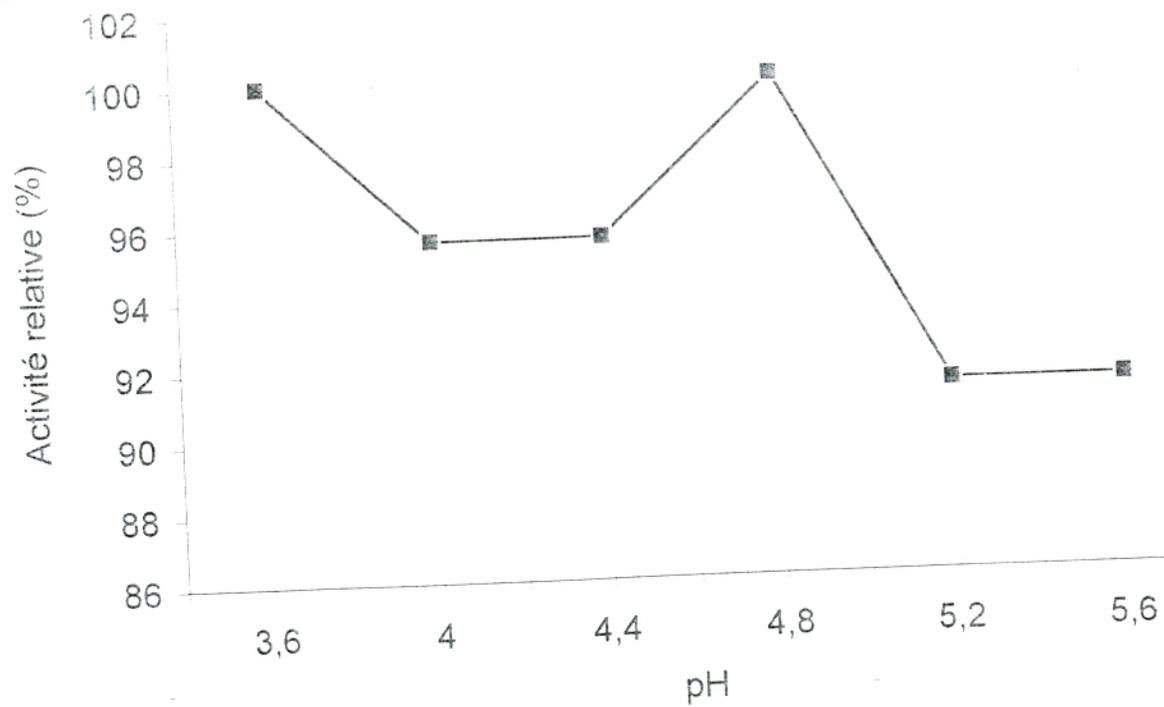


Figure 12 : Effet du pH sur l'activité de l'enzyme libre.
[saccharose]=0,5 M ; tampon acétate 0,1M ; T=25°C ;
enzyme diluée 300 fois.

2. Effet de la température

La **figure 13** montre l'évolution de l'activité enzymatique relative de l'invertase soluble en fonction de la température d'incubation.

L'activité maximale est obtenue à 60 °C. Au delà de cette température, l'activité enzymatique diminue rapidement et ne vaut plus que 9% à 80°C.

Boudrant (1973) et Cojocar (1995) trouvent aussi, pour l'invertase de levure, une température optimale de 60°C.

L'évolution observée de l'activité enzymatique en fonction de la température résulte de deux phénomènes :

- L'activation thermique de la réaction d'hydrolyse .
- La dénaturation thermique de l'enzyme.

De plus, la température optimale observée dépend du temps de réaction qui est ici relativement court : 1,5 min en l'occurrence.

Les principaux avantages d'une température élevée lors de la mise en œuvre des enzymes à l'échelle industrielle sont [22, 48] :

- Vitesse de réaction plus importante, donc diminution du temps nécessaire pour obtenir un taux de conversion déterminé et augmentation de la productivité de l'installation.
- Diminution de la viscosité du milieu ce qui permet de minimiser l'énergie dépensée pour agiter le milieu.
- Solubilité élevée du substrat et du ou des produit(s) de réaction.
- Réduction des proliférations microbiennes.

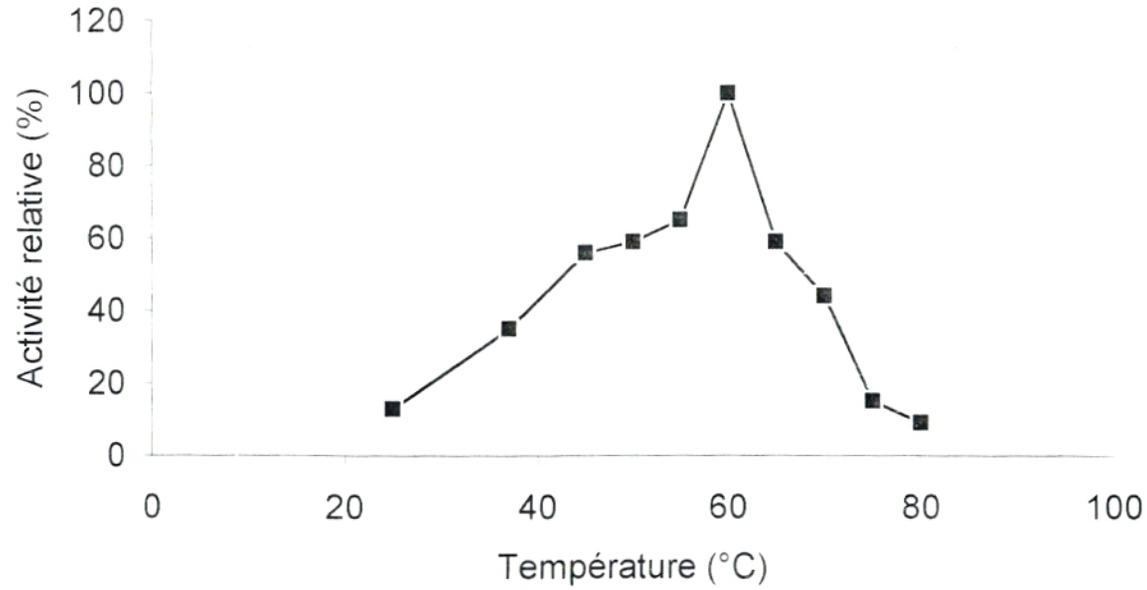


Figure 13 : Effet de la température sur l'activité de l'enzyme libre.

**[saccharose]=0,5 M ; tampon acétate pH=4,8-0,1M ;
enzyme diluée 300 fois pour : T=25- 37- 45- 70- 75- 80°C
et 600 fois pour : T=50- 55- 60- 65°C.**

3. Stabilité thermique de l'invertase soluble à pH 4,8

La stabilité thermique de l'invertase a été étudiée en incubant la solution enzymatique diluée à différentes températures pendant une durée maximale de 6 heures.

La **figure 14** montre l'évolution de l'activité résiduelle de l'invertase en fonction du temps.

L'invertase traitée à 60°C – c'est à dire à la température optimale déterminée lors de l'expérience décrite dans le paragraphe précédent – perd environ 60% de son activité initiale après 4 heures d'incubation. Elle perd à peu près 30% de son activité initiale au bout de 6 heures d'incubation à 55°C.

Quand la température est abaissée à 50°C, l'invertase se stabilise et conserve 90% de son activité initiale après 6 heures d'incubation.

A 45°C, l'invertase soluble présente une stabilité accrue : son activité résiduelle atteint, après 6 heures d'incubation, 95% de l'activité initiale.

Vrabel *et al.* (1994) rapportent que l'invertase pure de levure de boulangerie reste stable durant au moins 6 heures à 40°C et à pH 4,6.

D'après D'Arcadia Cruz *et al.* (1998), l'invertase d'*Aspergillus niger* a une activité maximale à 60°C et cette activité reste stable à cette température pendant 30 minutes.

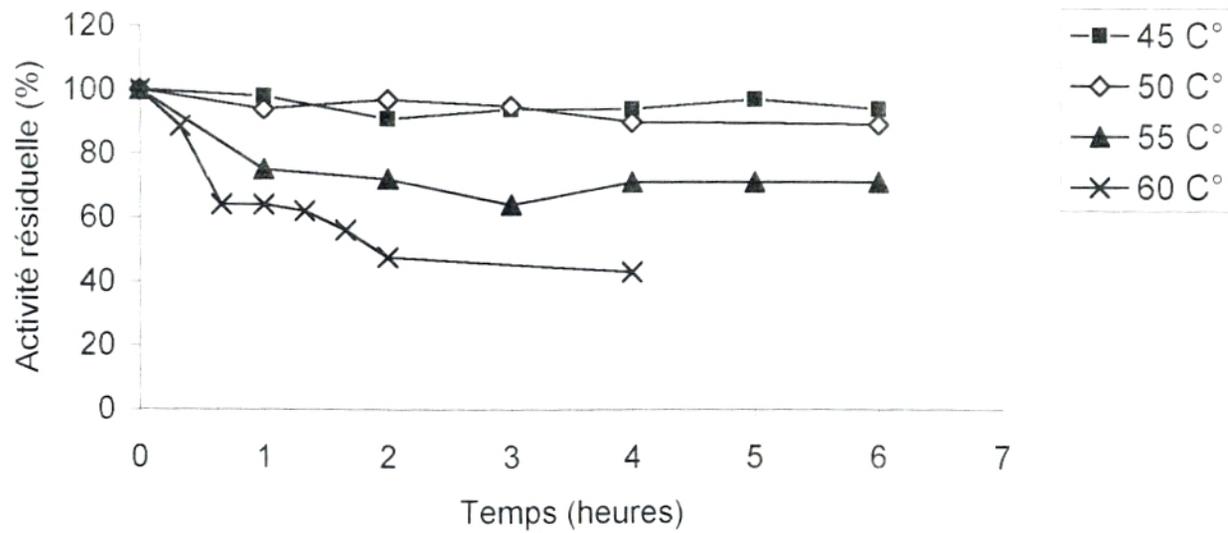


Figure 14 : Stabilité thermique de l'invertase libre.
 [saccharose]=0,5 M ; tampon acétate pH 4,8-0,1M;
 enzyme diluée 100 fois.

La thermostabilité enzymatique est déterminée par la génétique (structure primaire) et par les facteurs environnementaux (la température par exemple) [48].

De nombreux travaux ont été consacrés à la description de l'inactivation des enzymes durant ces dernières 30 années, soit pour rechercher le mécanisme de cette inactivation, soit pour étudier les propriétés de la protéine elle même [3, 85, 108].

L'inactivation rapide des enzymes aux températures élevées est un obstacle majeur à leurs applications biotechnologiques [52]. L'instabilité intrinsèque des enzymes aux températures élevées explique pourquoi la plupart des processus chimiques industriels traditionnels ne sont pas remplacés par des processus utilisant des enzymes immobilisées [97].

Le mécanisme d'inactivation thermique est le suivant :

Quand la température augmente, les atomes de la molécule d'enzyme ont une plus grande énergie et une plus grande tendance au mouvement. Ainsi, ils peuvent acquérir une énergie suffisante pour vaincre les interactions faibles déterminant la structure (ou conformation) des protéines globulaires. Il s'ensuit une modification de la conformation et une diminution d'activité (inactivation) [22].

La dénaturation se définit donc comme le passage d'une structure ordonnée à une structure quelconque, le plus souvent désordonnée, mais sans rupture d'aucune des liaisons covalentes.

Deux nuances sont à ajouter à cette définition :

1) Les ponts disulfures qui unissent les cystéines et contribuent à la stabilité de la structure tridimensionnelle de la protéine sont parfois considérés comme devant être réduits en restes SH ou oxydés en restes cystéiques dans une étude de dénaturation afin de permettre le déroulement de la chaîne peptidique.

2) De même pour les enzymes polymériques, on considère que la séparation en sous-unités ne constitue pas nécessairement une dénaturation mais s'accompagne souvent d'une perte de l'activité enzymatique [85].

En résumé, la dénaturation des enzymes résulte généralement de changements dans la structure tertiaire, de l'oxydation de certains groupes aux températures élevées ou d'autres modifications physiques de la protéine enzymatique [114].

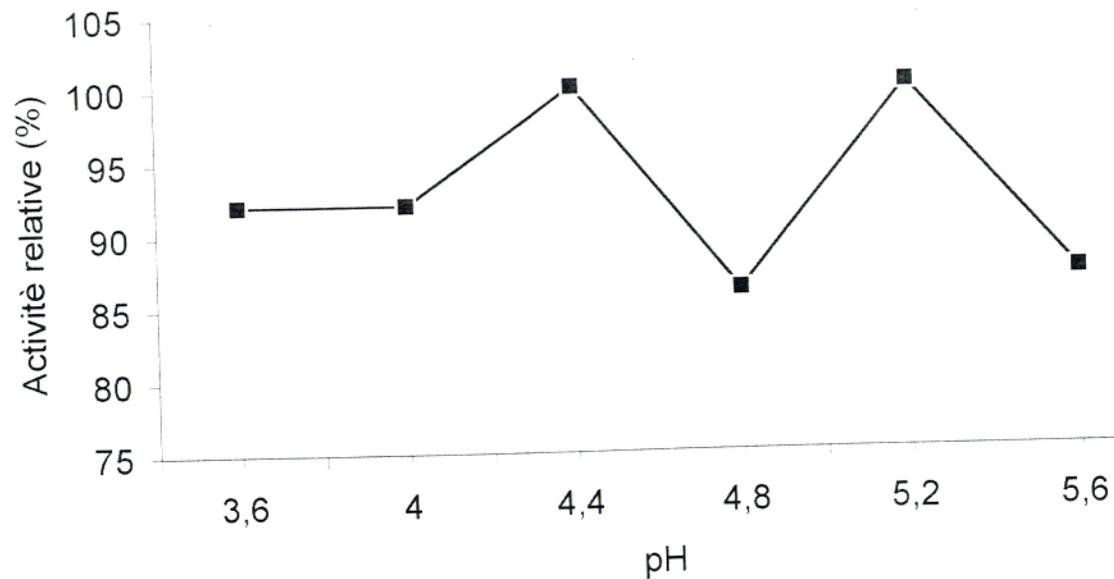
4. Effet du pH sur l'activité enzymatique à température élevée (45°C)

Ayant constaté que la température la plus élevée à laquelle l'enzyme soluble conservait son activité après une exposition de 6 heures était de 45°C, l'activité de l'enzyme soluble a été déterminée à différents pH (dans du tampon acétate 0,1 M de pH 3,6 à 5,6) à 45°C. La concentration de la solution de saccharose était 0,5 M.

La **figure 15** représente la variation de l'activité enzymatique relative en fonction du pH ; cette figure indique que l'invertase est active dans tout le domaine de pH étudié.

Une activité maximale est constatée à deux pH : le pH 4,4 et le pH 5,2.

Nous remarquons que lorsque la température d'incubation s'élève de 25°C à 45°C, les pH optimaux deviennent moins acides (*cf.* paragraphe III.1). La valeur du pH optimal serait donc influencée par la température.



**Figure 15 : Effet du pH sur l'activité de l'enzyme libre à 45°C.
[saccharose]=0,5 M ; tampon acétate 0,1M ;
enzyme diluée 300 fois**

Dans la littérature, on trouve le plus souvent que le pH optimum de l'invertase de levure est 4,5 , ce pH correspondant à une stabilité élevée de l'activité enzymatique dans le milieu réactionnel [21].

Ainsi, d'après Popa *et al.* (1998), le pH du milieu d'incubation influence l'activité enzymatique de l'invertase soluble dont l'activité maximale apparaît à pH 4,5 dans du tampon acétate 0,02 M à 37°C.

L'effet du pH est dû à trois actions indépendantes :

- Un effet de dégradation irréversible (dénaturation) de l'enzyme aux pH extrêmes, causé par des modifications de la structure spatiale de l'enzyme.
- Un effet sur l'état d'ionisation du substrat.
- Enfin, un effet sur l'état d'ionisation de l'enzyme : la variation d'activité en fonction du pH est liée à la variation de l'état d'ionisation d'un nombre restreint de groupes dissociables de la protéine enzymatique [85].

5. Stabilité de l'enzyme à pH 4,4

Il convient de distinguer le pH optimum de la réaction, du pH optimum de la stabilité de l'enzyme, qui lui dépend de la température, de la force ionique et de la nature du tampon [22].

La thermostabilité de l'invertase est élevée à 45°C en présence de tampon acétate pH 4,8 – 0,1 M (*cf.* paragraphe III.3) mais pourrait

être augmentée par des manipulations sur l'environnement de l'enzyme (et/ou par l'état de l'enzyme : libre ou immobilisée). On sait, par exemple, que la stabilité thermique des enzymes peut être influencée par la concentration d'enzyme mise en jeu ou par la présence du substrat durant le traitement thermique [10, 29].

Afin de vérifier l'influence du pH sur la stabilité de l'invertase soluble, nous avons mesuré l'activité résiduelle de l'invertase soluble exposée à 45°C pendant une durée maximale de 6 heures en présence de tampon acétate pH 4,4 – 0,1 M.

La **figure 16** montre que, durant une période d'exposition de 6 heures à 45°C, l'activité résiduelle est en moyenne plus élevée pour l'invertase incubée dans le tampon acétate pH 4,4 – 0,1 M que pour l'invertase incubée dans le tampon acétate pH 4,8 – 0,1 M.

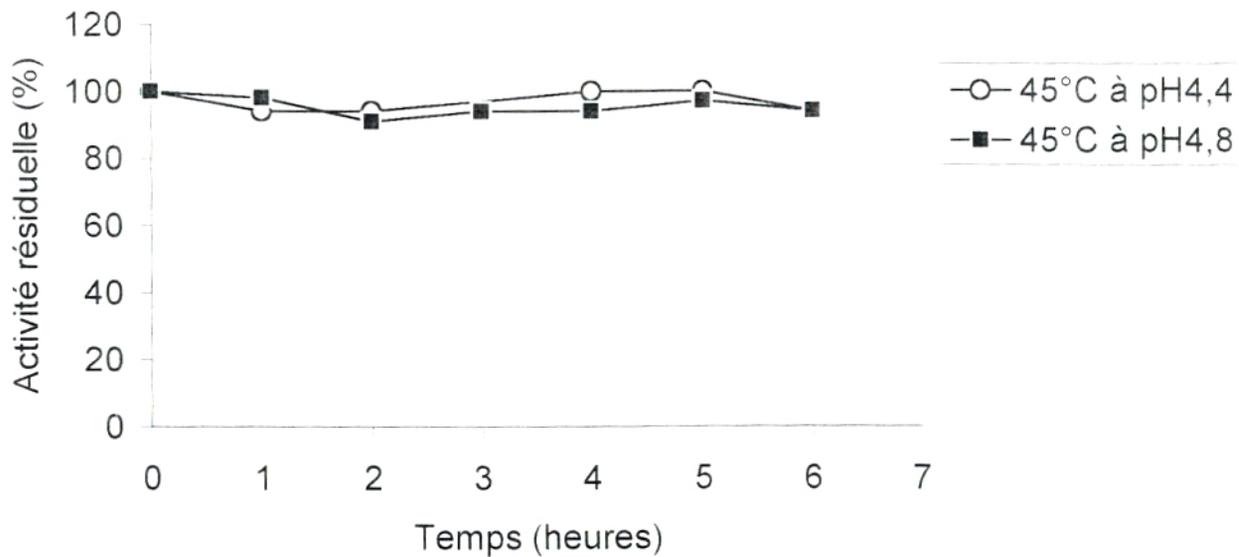


Figure 16 : Stabilité de l'invertase libre aux pH et température optimaux.

**[saccharose]=0,5 M ; tampon acétate 0,1M ; T=45°C ;
enzyme diluée 100 fois.**

6. Effet de la concentration en saccharose sur la vitesse d'hydrolyse (à pH 4,4 et à 45°C)

Nous avons étudié la variation de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale de saccharose en présence de tampon acétate pH 4,4 – 0,1 M et à 45°C.

La **figure 17** représente les résultats obtenus. Ces résultats ont été traités par l'équation de Michaelis Menten (*cf.* équation 1, paragraphe II.2) et par l'équation traduisant l'inhibition par excès de substrat (*cf.* équation 2, paragraphe II.2).

La **figure 18** est la représentation de nos résultats expérimentaux selon la méthode de Lineweaver et Burk.

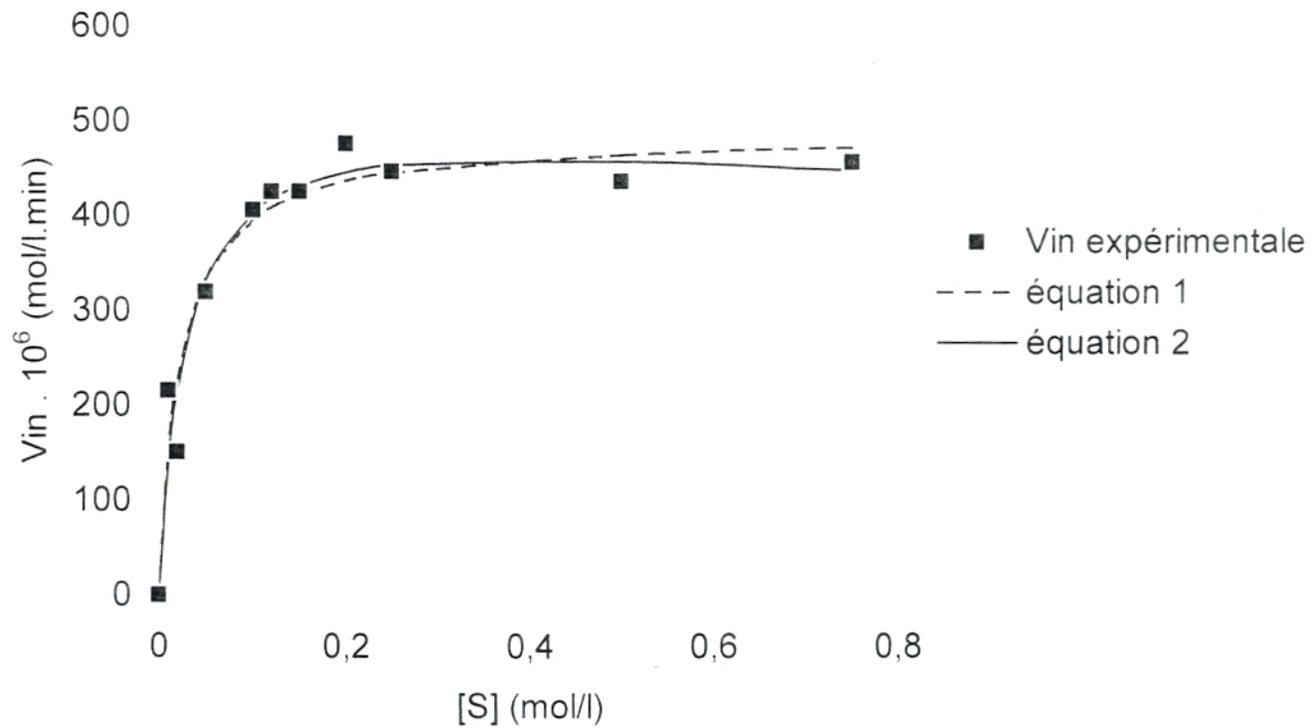


Figure 17 : Effet de la concentration de saccharose sur l'activité de l'enzyme libre.
 Tampon acétate pH 4,4 - 0,1 M ; T=45°C ;
 enzyme diluée 600 fois.

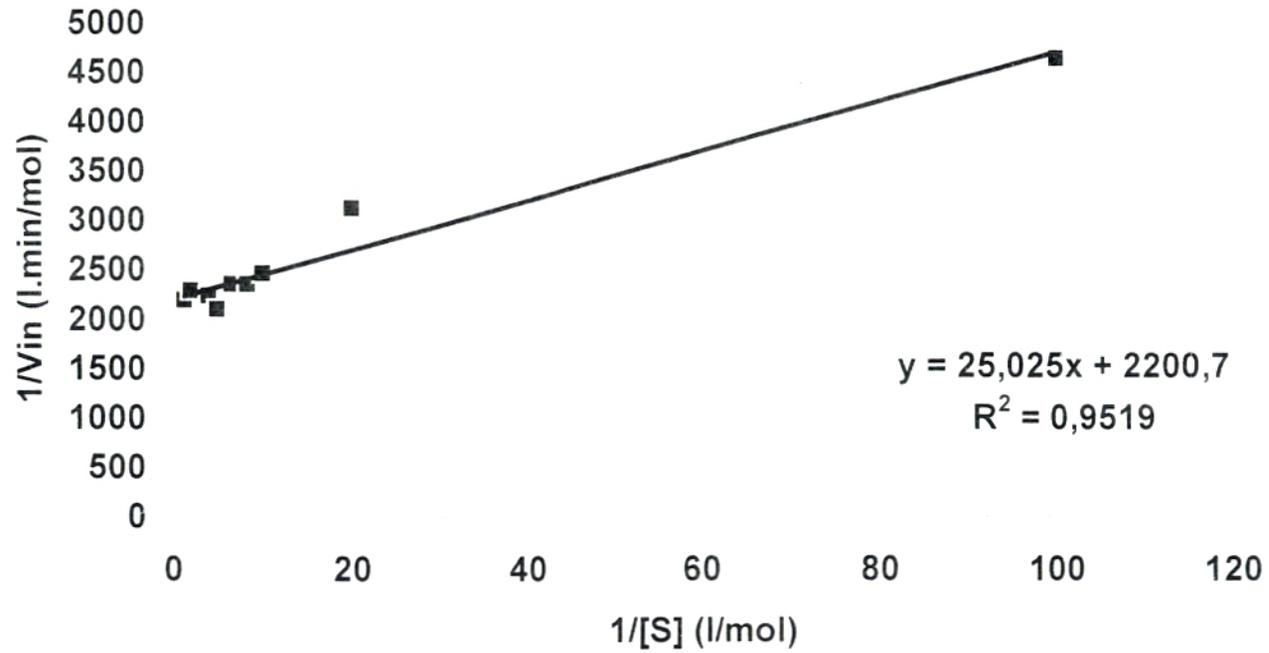


Figure 18 : Représentation de Lineweaver et Burk pour l'enzyme libre.
 Tampon acétate pH 4,4-0,1M ; T=45°C;
 enzyme diluée 600 fois.

Le **tableau 3** récapitule les valeurs des constantes cinétiques déterminées à partir de ces diverses représentations.

TABLEAU 3 : Constantes cinétiques de l'invertase soluble dans les conditions suivantes : Tampon acétate pH 4,4–0,1 M ; T=45°C.

Equation utilisée	V_{\max} ($\mu\text{mol/l/min}$)	K_m (mol/l)	K_s (mol/l)	r^2
$V_{\text{in}} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$ (N°1)	487	0,023	-	0,9433
$V_{\text{in}} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_s}}$ (N°2)	528	0,029	5,34	0,9484
$\frac{1}{V_{\text{in}}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$ (N°3)	454	0,011	-	0,9519

En comparant ces résultats (obtenus à 45°C, à pH 4,4 et avec l'enzyme diluée 600 fois) à ceux trouvés à 25°C, à pH 4,8 et avec l'enzyme diluée 100 fois (*cf.* tableau 2), nous constatons des modifications notables de l'allure des courbes et des valeurs des paramètres cinétiques.

La **figure 17** indique que la vitesse initiale augmente avec la concentration en substrat jusqu'à atteindre un maximum pour une concentration en saccharose d'environ 0,2 mol/l ; au delà de cette concentration, la vitesse initiale diminue.

Cette évolution indique que l'enzyme subit une sorte d'inhibition due aux produits formés par la réaction et/ou à la concentration élevée du substrat.

Ces observations sont plus ou moins en accord avec celles mentionnées dans la littérature.

Ainsi, d'après Filho *et al.* (1999), malgré les inhibitions qu'elle subit, l'invertase peut catalyser l'hydrolyse du saccharose à des concentrations supérieures à 50% (P/V) mais l'augmentation de la concentration du saccharose jusqu'à 80% (P/V) réduit significativement l'activité enzymatique. Cette inhibition aux concentrations élevées pourrait être attribuée à l'agrégation du substrat résultant de la faible concentration d'eau et qui entraîne une viscosité élevée et/ou une faible activité de l'eau [37, 39].

IV. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'ENZYME IMMOBILISEE DANS LES BILLES D'ALGINATE

1. Activité de l'enzyme immobilisée

L'activité d'une enzyme immobilisée est l'activité d'une enzyme dont les propriétés intrinsèques peuvent avoir été modifiées du fait de l'immobilisation et qui est atteinte par des réactants à une concentration différente de celle qui atteint l'enzyme soluble.

De plus, toutes les molécules d'enzyme n'ont pas un comportement identique car la modification des propriétés intrinsèques est plus ou moins importante d'une molécule d'enzyme à une autre [22].

Ces modifications vont jouer un rôle déterminant sur l'activité et sur la stabilité de l'enzyme. Les principaux phénomènes à l'origine de ces altérations sont [7] :

- La modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme sous l'action des contraintes dues à la fixation.
- La modification du micro-environnement : pH local, interactions électrostatiques.
- Les contraintes diffusionnelles.
- L'encombrement stérique.

On conçoit, dans ces conditions, que la mesure expérimentale de l'activité d'une enzyme immobilisée ne fournit qu'une valeur

indiquant le comportement moyen d'un ensemble de molécules dans des situations très diverses [22].

Pour avoir le pourcentage d'activité conservée après immobilisation par rapport à l'activité de l'enzyme soluble mise en jeu, nous avons calculé le rapport suivant :

$$\text{Efficacité de l'immobilisation} = \frac{\text{Activité volumique de l'enzyme immobilisée}}{\text{Activité volumique de l'enzyme non immobilisée}} \times 100$$

Avec une concentration en saccharose de 0,5 mol/l, dans un tampon acétate 0,1 M à pH 4,8 et à 25°C, l'activité catalytique immobilisée représente 40% de l'activité catalytique soluble mise en jeu. Cette efficacité est relativement faible et, compte-tenu du mode d'immobilisation choisi, résulte probablement de contraintes diffusionnelles importantes.

2. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme immobilisée

La **figure 19** indique que la courbe « activité de l'enzyme immobilisée en fonction du pH » comporte un maximum à pH 4,0 et un plateau dans l'intervalle allant de pH 5,2 à pH 5,6 , intervalle dans lequel l'activité enzymatique maximale (100%) est mesurée.

Aux pH 4,0 et 4,8 l'activité enzymatique représente 93% de l'activité maximale.

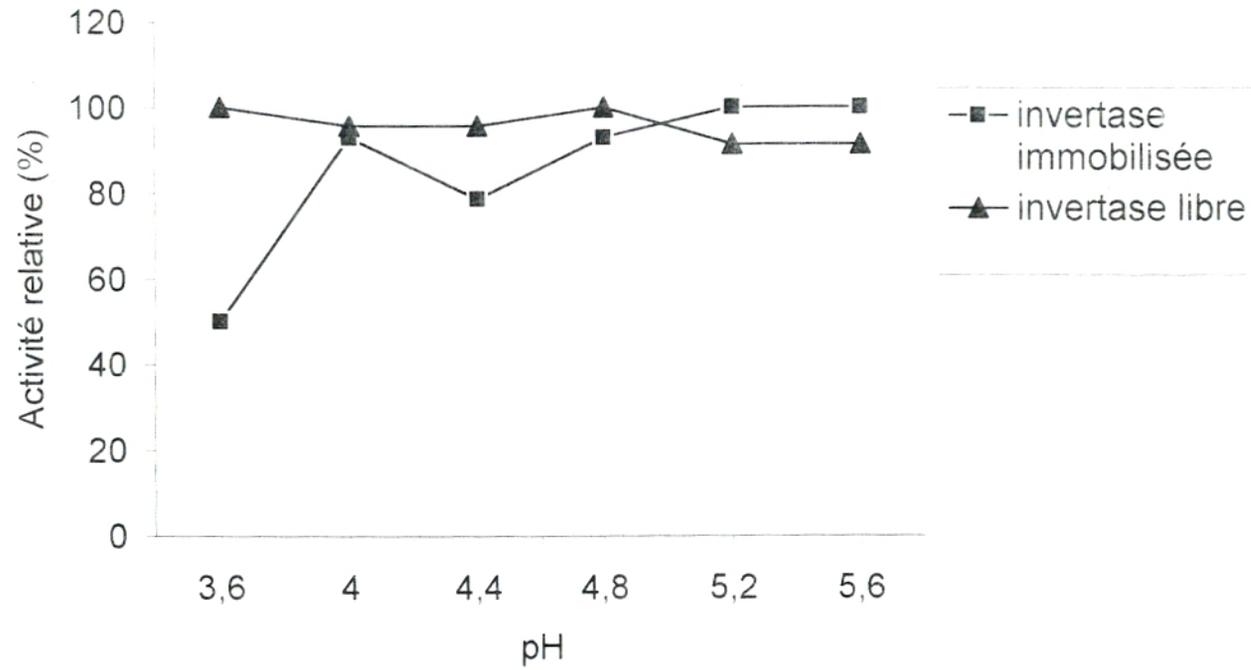


Figure 19 : Effet du pH sur l'activité de l'invertase immobilisée dans des billes d'alginate.
 [saccharose]=0,5 M ; tampon acétate 0,1M ; T=25 °C.

Pour la suite de nos expériences avec l'enzyme immobilisée, nous avons choisi de travailler au « pH optimum » le plus acide (soit pH 4,0) afin de limiter les contaminations microbiennes.

La courbe de variation de l'activité enzymatique relative en fonction du pH obtenue pour l'invertase immobilisée est différente de celle obtenue pour l'enzyme libre.

Ces différences peuvent être dues au fait que l'alginate en tant que support d'inclusion chargé négativement provoque des changements dans l'environnement de l'enzyme immobilisée. Un support chargé négativement attire les ions H^+ (les protons) dans le micro-environnement autour de l'enzyme ce qui signifie que le pH existant dans ce micro-environnement est plus acide que celui de la solution externe. Par contre, le pH mesuré dans le macro-environnement est plus élevé que celui subi par l'enzyme dans le micro-environnement ce qui se traduit par un déplacement apparent du pH optimal de l'enzyme immobilisée en zone basique bien qu'en réalité le pH optimal reste inchangé [7, 17, 113, 114].

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature est difficile à cause des différences dans les conditions expérimentales utilisées (nature du support, source d'enzyme, paramètres physico-chimiques : pH, température et tampon) ; voici néanmoins quelques exemples relevés dans la littérature :

- Le pH optimum de l'invertase immobilisée sur le xanthane est 4,5 (tampon acétate 0,02 M) et l'enzyme immobilisée présente une stabilité plus élevée que l'enzyme non immobilisée. Ce comportement a été expliqué par l'effet du tampon sur les groupes carboxyles libres du support, et par l'aptitude de ce tampon à produire l'ionisation des groupes amines libres sur la chaîne protéique. L'activité enzymatique maximale est obtenue lors de l'ionisation complète des groupes amines et carboxyles libres [88].
- Le pH optimum de l'invertase immobilisée sur des fibres de cellulose avec le glutaraldéhyde est 4,5 et dans l'intervalle de pH compris entre 3,5 et 5,5 l'activité relative vaut plus de 90% ; par contre en dessous de pH 3,0 et au dessus de pH 6,0 , l'activité relative chute à 60% [21].
- L'invertase de *Candida* immobilisée dans des fibres de cellulose-acétate-titane iso-propoxide, montre une activité maximale à pH 5,5 ce qui représente un décalage vers les pH alcalins par rapport à l'enzyme native [81].

3. Effet de la température sur l'activité de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate

Pour évaluer l'effet de la température sur l'activité de l'enzyme immobilisée dans les billes d'alginate, nous avons fait réagir cette enzyme à différentes températures sur du saccharose 0,5 M dans du tampon acétate pH 4,0 - 0,1 M.

L'évolution de l'activité relative en fonction de la température a été représentée sur la **figure 20**.

Pour l'enzyme immobilisée, l'activité maximale est mesurée à 55°C. Au delà de cette température, il y a une diminution de l'activité relative qui peut être expliquée par la dénaturation de l'enzyme.

La température optimum de l'enzyme immobilisée est inférieure à celle de l'enzyme libre. L'enzyme immobilisée dans l'alginate apparaît donc plus thermosensible que l'enzyme libre. Cette diminution de la température optimale peut être causée par l'altération du site actif de l'enzyme lors de l'immobilisation et aussi par des modifications des structures tertiaire et quaternaire de l'enzyme [58].

Pour une invertase d'origine végétale immobilisée par des liaisons covalentes, Cojocarú (1995) a déterminé une température optimale de 50°C.

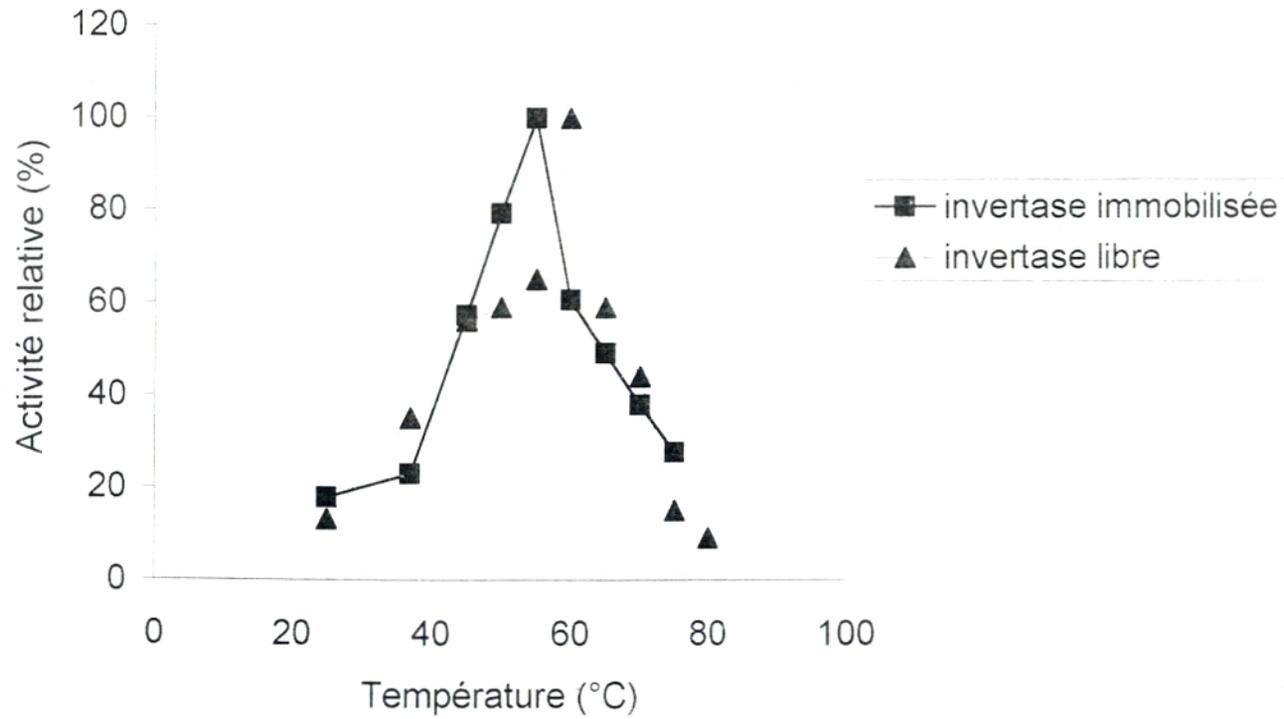


Figure 20 : Effet de la température sur l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate.

[saccharose]=0,5 M ; tampon acétate pH 4,0-0,1M ;
enzyme diluée 2 fois à T=50- 55- 60- 65- 70- 75°C.

4. Stabilité thermique de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate

Après immobilisation, les caractéristiques thermiques peuvent être changées. Dans certains cas, ce changement se traduit par une augmentation de la stabilité thermique due à un accroissement de la rigidité moléculaire de l'enzyme, ce qui empêche les altérations de la structure tertiaire lors du traitement thermique [114].

Afin de tester l'effet de la température sur la stabilité de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate, on mesure l'activité résiduelle de l'invertase immobilisée traitée à différentes températures pendant un intervalle de temps déterminé.

La **figure 21** montre l'évolution de l'activité résiduelle de l'invertase immobilisée exposée pendant une durée maximale de 6 heures à diverses températures.

A 55°C, on observe que l'activité résiduelle diminue progressivement puis s'annule au bout de 3 heures.

A 50°C, l'enzyme perd près de 60% de son activité en 3 heures.

En fait, plus la température diminue, plus l'enzyme est stable. A 37°C, l'invertase immobilisée présente une stabilité maximale (100% de l'activité initiale).

Nous constatons donc que l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate est instable aux températures supérieures à 37°C contrairement à l'invertase soluble qui est encore stable à 45°C.

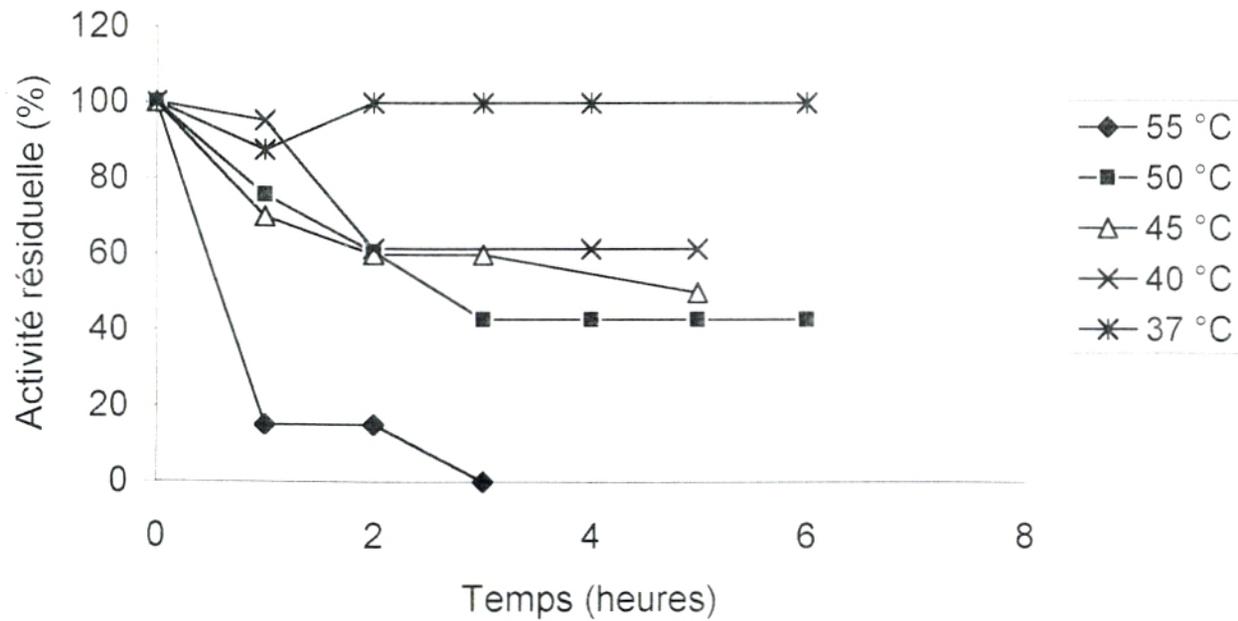


Figure 21 : Stabilité de l'invertase immobilisée à différentes températures.
 [saccharose]=0,5 M ; tampon acétate pH 4,0-0,1 M.

L'invertase immobilisée est donc moins stable que l'invertase soluble. Cela peut indiquer que la conformation de l'enzyme est altérée par l'immobilisation ou qu'il se produit des fuites d'enzyme durant l'incubation.

Des résultats trouvés dans la littérature montrent cependant que la stabilité thermique de l'activité invertase de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* immobilisées dans des capsules d'alginate est relativement meilleure que la stabilité de l'activité invertase des cellules libres. En particulier, l'immobilisation améliore la stabilité thermique de l'invertase à 55°C [20].

L'invertase adsorbée sur résine montre une activité stable à 30°C pendant 8 heures, et à des températures supérieures, il y a une perte d'activité qui est linéaire avec le temps. Par contre, l'invertase en solution reste stable lors d'une incubation analogue à 50°C [10].

Donc comme toutes les autres protéines, les enzymes sont susceptibles de subir une dénaturation thermique quel que soit leur état : libre ou immobilisé. Dans plusieurs cas, le taux d'inactivation et dénaturation de l'enzyme immobilisée est inférieur à celui de l'enzyme libre.

5. Effet de la concentration de saccharose sur la vitesse initiale de l'enzyme immobilisée

Afin d'obtenir la courbe donnant la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat, nous avons placé l'invertase immobilisée en présence de diverses concentrations en saccharose (0,05 – 0,10 – 0,20 – 0,25 – 0,50- 0,75 – 1 – 1,25 – 1,50 mol/l) à pH 4,0 et à 37°C.

La **figure 22** (qui donne la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat) et la **figure 23** (qui donne l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration en substrat) représentent les résultats obtenus.

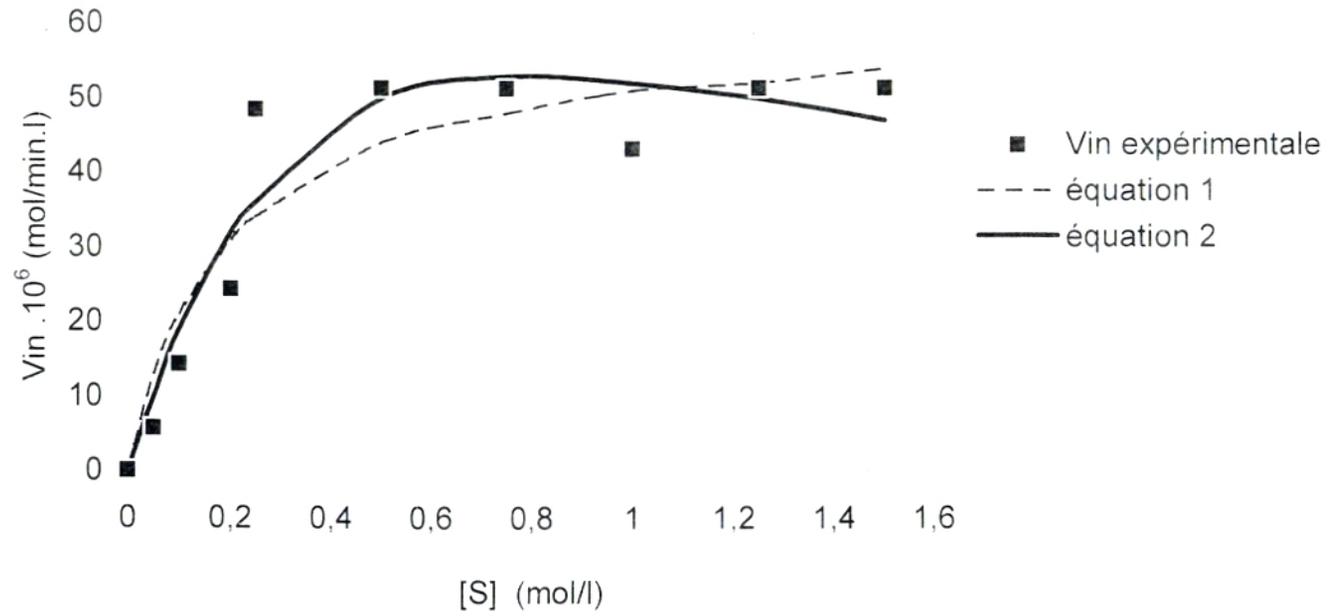


FIGURE 22 : Effet de la concentration en saccharose sur l'activité de l'enzyme immobilisée dans les billes d'alginate. Tampon acétate pH 4,0-0,1 M ; T=37°C.

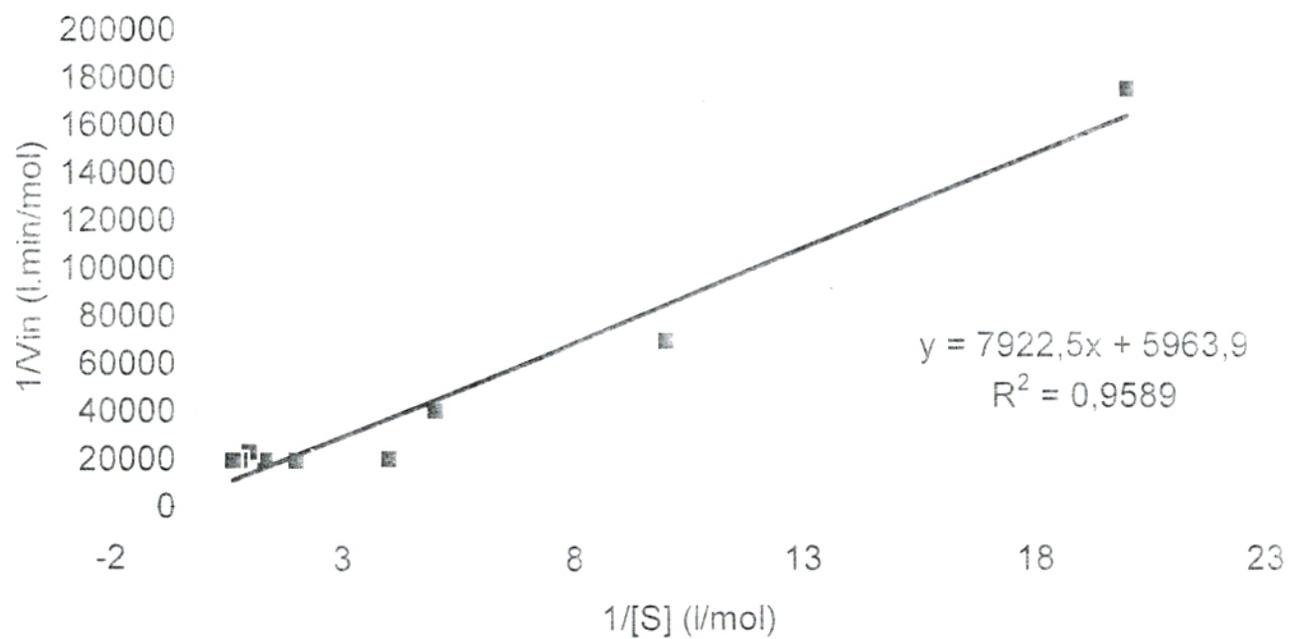


Figure 23 : Représentation de Lineweaver et Burk pour l'enzyme immobilisée.
 Tampon acétate pH 4,0-0,1 M ; T=37 °C

Le **tableau 4** récapitule les valeurs des constantes cinétiques déterminées à partir des **figures 22** et **23**.

En comparant les valeurs portées dans ce tableau, à celles données dans les **tableaux 2** et **3** pour l'enzyme libre, nous constatons que l'immobilisation entraîne une diminution des valeurs de V_{max} et une augmentation des valeurs de K_m .

TABLEAU 4 : Constantes cinétiques de l'invertase immobilisée dans les billes d'alginate, dans les conditions suivantes : Tampon acétate pH 4,0–0,1 M ; T=37°C.

Equation utilisée	V_{max} ($\mu\text{mol/l/min}$)	K_m (mol/l)	K_s (mol/l)	r^2
$V_{in} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$ (N°1)	60,4	0,19	-	0,8817
$V_{in} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_s}}$ (N°2)	140,8	0,65	0,95	0,9133
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$ (N°3)	167,7	1,32	-	0,9589

D'après la **figure 22**, la concentration de saccharose conduisant à la plus grande vitesse initiale de l'enzyme immobilisée vaut environ 0,5 mol/l.

La littérature fait état de larges modifications de la cinétique apparente de l'enzyme après l'immobilisation (en particulier, le K_m apparent de l'enzyme immobilisée est généralement supérieur à celui de la forme soluble [114]). Voici quelques exemples de ces modifications tirés de la littérature :

- L'invertase immobilisée sur polyamide par le glutaraldéhyde montre une activité maximale dans du saccharose 1 M, alors que la forme soluble a une activité maximale dans le saccharose 0,75 M. La chute de la vitesse initiale aux faibles concentrations de substrat peut être expliquée par la faible action de masse du substrat par contre la chute de la vitesse aux concentrations élevées de substrat peut être expliquée par le phénomène d'inhibition par excès de substrat.

La constante de Michaelis obtenue pour l'enzyme immobilisée est 6 fois plus faible que celle de l'enzyme native : le K_m de l'enzyme native est 1,25 M et celui de l'enzyme immobilisée est 0,24 M. La variation de la constante de Michaelis révèle un changement dans la configuration de l'enzyme dû à l'interaction entre le support et l'enzyme [75].

- Un autre exemple montre l'effet de la réticulation sur les valeurs de V_{max} et de K_m de l'invertase (ces valeurs étant estimées par la représentation de Lineweaver et Burk).

Les valeurs de V_{max} et de K_m de l'enzyme native sont respectivement 0,130 mg/ml/min et 26,7 mM de saccharose.

La réticulation de l'enzyme par le formaldéhyde abaisse la valeur de V_{max} à 0,124 mg/ml/min et celle de K_m à 25,2 mM de saccharose [52].

- L'invertase immobilisée sur des anticorps polyclonaux spécifiques a un K_m qui vaut 10,7 μ M ce qui correspond à une diminution assez notable par rapport au K_m de l'invertase soluble (14,2 μ M) [49].

Dans d'autres cas rapportés dans la littérature, il n'y a pas de changement significatif entre le K_m de l'enzyme immobilisée et celui de l'enzyme libre, ainsi :

- D'après Weetall (1974), l'invertase immobilisée sur des particules de verre poreux et celle soluble ont le même K_m qui est 0,448 mM.
- D'après Hatayama *et al.* (1996), l'invertase de *Candida* présente à l'état soluble un K_m égal à $1,50 \cdot 10^{-2}$ M et après immobilisation dans des fibres de cellulose acétate–titane–isopropoxide, le K_m n'est pratiquement pas changé puisqu'il vaut $1,63 \cdot 10^{-2}$ M.

D'une manière générale, l'augmentation de la constante de Michaelis suite à l'immobilisation est déterminée spécialement par les processus de diffusion et peut être limitée par une réduction de la taille des particules sur lesquelles l'enzyme est immobilisée ou par une agitation croissante au cours de la période d'incubation [88].

En conclusion, dans notre cas, la valeur élevée du K_m de l'enzyme immobilisée peut probablement être expliquée par une altération du site actif de l'enzyme ou par la faible affinité du substrat pour la matrice de gel (ce qui entraîne une résistance importante au transfert externe du substrat vers la surface du support). Cette résistance externe s'ajoute à une résistance interne due à la difficulté de diffusion du substrat dans les pores des billes [72].

En définitive, l'augmentation du K_m est généralement liée à des paramètres différents tels que la charge du support et/ou du substrat, les phénomènes diffusionnels et les paramètres opératoires [114].

Par ailleurs, la diminution de la valeur du V_{max} de l'enzyme immobilisée par rapport à celle de l'enzyme native peut être due au manque d'accessibilité du substrat à l'intérieur des pores du support. Afin de réduire les délais de diffusion du substrat et du produit, l'enzyme devrait être immobilisée à la surface du support uniquement [59, 63].

6. Immobilisation de l'invertase par inclusion dans les billes d'alginate et réticulation

Afin de limiter le problème de fuite des enzymes mentionné dans la littérature pour les enzymes immobilisées par inclusion (problème qui limite leur application possible dans les processus continus) on dispose d'une série de réactifs chimiques capables de se combiner d'une façon covalente et assez spécifique avec des groupes fonctionnels particuliers des acides aminés de l'enzyme.

Ces réactifs appartiennent généralement à la famille des aldéhydes. Ce sont en particulier : le formaldéhyde (1%), le benzaldéhyde (1%) et le glutaraldéhyde (1%).

La réaction de formation de la liaison covalente s'effectue entre la ou les fonction(s) aldéhydique(s) du réactif et la fonction amine des résidus lysine de l'enzyme [2 , 22].

Nous avons voulu tester l'intérêt de ces réactifs. Pour cela, nous avons mesuré l'activité de l'enzyme incluse dans les billes d'alginate sans ou avec réticulation par ces réactifs chimiques. Nous avons laissé séjourner les billes contenant l'enzyme immobilisée pendant 5 minutes dans la solution de substrat, ensuite ces billes étaient retirées du milieu réactionnel et ce milieu était incubé pendant 10 min supplémentaires.

Si ce milieu contient de l'enzyme soluble « échappée des billes d'alginate », on devrait constater une variation de son absorbance durant les 10 dernières minutes d'incubation.

Les résultats obtenus sont synthétisés sur la **figure 24**.

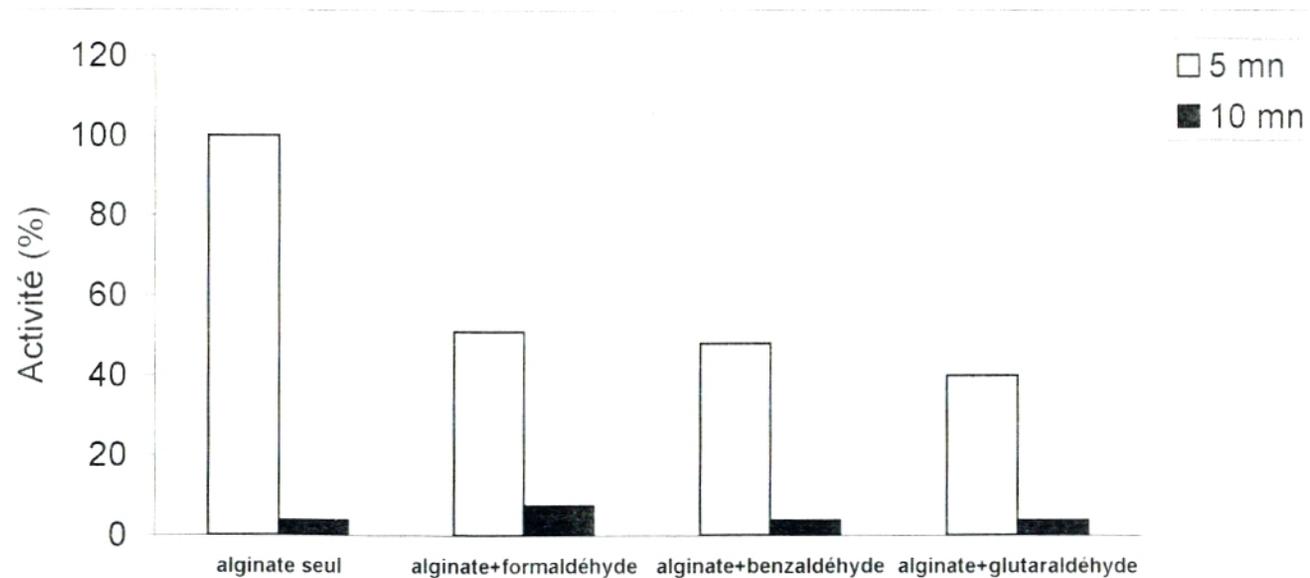


Figure 24 : Effet de la réticulation par divers aldéhydes sur l'activité de l'enzyme immobilisée.
 [saccharose]=0,5 M ; tampon acétate pH 4,0-0,1 M ; T=37 °C

La **figure 24** montre que le traitement des billes d'alginate par divers agents réticulants conduit à une nette diminution de l'activité enzymatique relative (en prenant l'activité de l'enzyme immobilisée dans l'alginate seul comme référence).

En particulier, le traitement par le glutaraldéhyde est celui qui conduit à l'activité la plus faible (soit 40% en activité relative). Cette réduction de l'activité peut être expliquée par l'effet destructif du glutaraldéhyde, réactif bifonctionnel dont les deux groupes aldéhydes peuvent se lier directement à des acides aminés du site actif de l'enzyme.

Le formaldéhyde et le benzaldéhyde ont des effets un peu moins marqués que le glutaraldéhyde.

En présence de benzaldéhyde, l'activité relative ne vaut plus que 48%, par contre en présence de formaldéhyde elle vaut 51%, ce qui signifie que le formaldéhyde est moins agressif que le benzaldéhyde.

Dans la littérature, on trouve que la réticulation de l'invertase par le formaldéhyde (0,015%) provoque (par rapport à l'enzyme native) une perte minimale d'activité et une diminution de 5 à 10% des valeurs de V_{\max} et K_m [52].

En ce qui concerne les fuites d'enzyme des billes vers le milieu réactionnel (surnageant) nous constatons que le traitement de réticulation ne permet pas de les limiter. En effet, l'activité enzymatique mesurée dans le surnageant pour les billes d'alginate non

traitées et pour celles traitées par le benzaldéhyde ou le glutaraldéhyde est la même. Elle est relativement faible et représente 3,70% de l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée dans l'alginate seul.

Pour les billes d'alginate traitées par le formaldéhyde, l'activité retrouvée dans le surnageant représente 7,4% de l'activité enzymatique des billes d'alginate non traitées.

Le fait que l'on n'ait pas mesuré une fuite importante d'enzyme peut être expliqué en partie par la courte durée du temps d'incubation du milieu réactionnel seul après enlèvement des billes (10 min).

La masse moléculaire élevée de l'invertase limite aussi la fuite de l'enzyme des pores du gel.

En définitive, la fuite de l'enzyme, éventuellement fixée par des liaisons covalentes, ne dépend pas seulement de la structure du support mais aussi des propriétés de l'enzyme elle-même (sa masse moléculaire, son degré de purification, son origine) [71, 114].

V. HYDROLYSE DISCONTINUE DU SACCHAROSE PAR L'INVERTASE SOLUBLE ET PAR L'INVERTASE IMMOBILISEE

Après avoir déterminé les paramètres cinétiques de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée dans les billes d'alginate, à partir de mesures de vitesses initiales essentiellement, nous avons procédé au suivi de la réaction d'hydrolyse sur une durée plus longue.

Pour cela, des essais ont été menés dans un petit réacteur fermé (volume réactionnel = 100 ml) et les effets de quelques paramètres tels que la température, la concentration d'enzyme et la concentration en substrat, sur la cinétique d'hydrolyse ont été étudiés.

Dans un premier temps, nous avons essayé d'ajuster nos données expérimentales par l'équation suivante :

$$t = \frac{1}{V_{\max}} \left[K_m \ln \frac{S_0}{S} + (S_0 - S) \right] \quad (\text{équation 4})$$

avec S : concentration résiduelle en substrat au temps t .

S_0 : concentration initiale en substrat.

Cette équation est l'une des nombreuses formes de l'équation de Michaelis–Menten intégrée [36, 96]. Néanmoins, compte-tenu des valeurs négatives trouvées dans certains cas pour K_m (à partir de nos

résultats expérimentaux), nous avons renoncé à utiliser l'équation 4 pour traiter nos données.

Nous avons opté pour un autre modèle cinétique à deux paramètres. Ce modèle établit aussi une relation entre la concentration résiduelle en substrat (S) et le temps (t). Il s'écrit :

$$S = a + 0,25 b^2 t^2 - a^{0,5} b t \quad (\text{équation 5})$$

où a représente la concentration initiale en substrat et b est une constante.

1. Influence de la température sur la consommation du substrat par l'enzyme soluble et par l'enzyme immobilisée

L'effet de la température sur la dégradation du saccharose par les invertases soluble et immobilisée est étudié en effectuant des hydrolyses à des températures comprises entre 25 et 45°C (les autres conditions opératoires sont les mêmes pour tous les essais).

Les **figures 25** et **26** montrent que la vitesse d'hydrolyse du saccharose croît avec l'augmentation de la température. Pour l'enzyme immobilisée, nous remarquons que pendant toute la durée de l'expérience, la vitesse de la réaction semble rester constante à température donnée. On remarque aussi que la cinétique de l'enzyme immobilisée est plus lente que celle de l'enzyme soluble. Cela peut

être expliqué par la lenteur de la diffusion du substrat et des produits du macro-environnement au micro-environnement et *vice versa*.

Néanmoins, cette faiblesse pourrait être compensée par l'avantage de la possibilité de réutiliser l'enzyme immobilisée dans un réacteur batch ou continu.

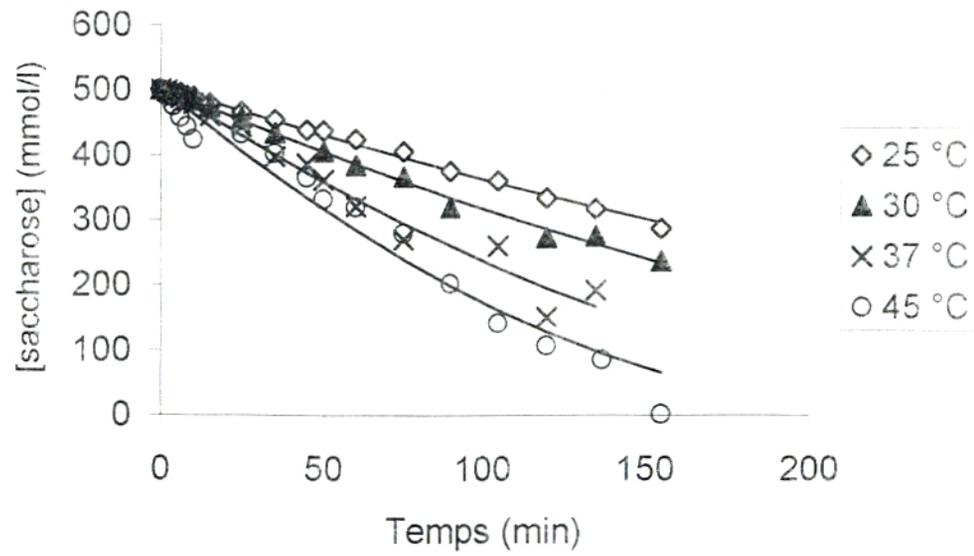


Figure 25 : Effet de la température sur l'hydrolyse du saccharose par l'enzyme libre.
 [saccharose]=0,5 M; [enzyme]=1,25 ml; tampon acétate pH 4,0-0,1M; volume de milieu réactionnel=100 ml.

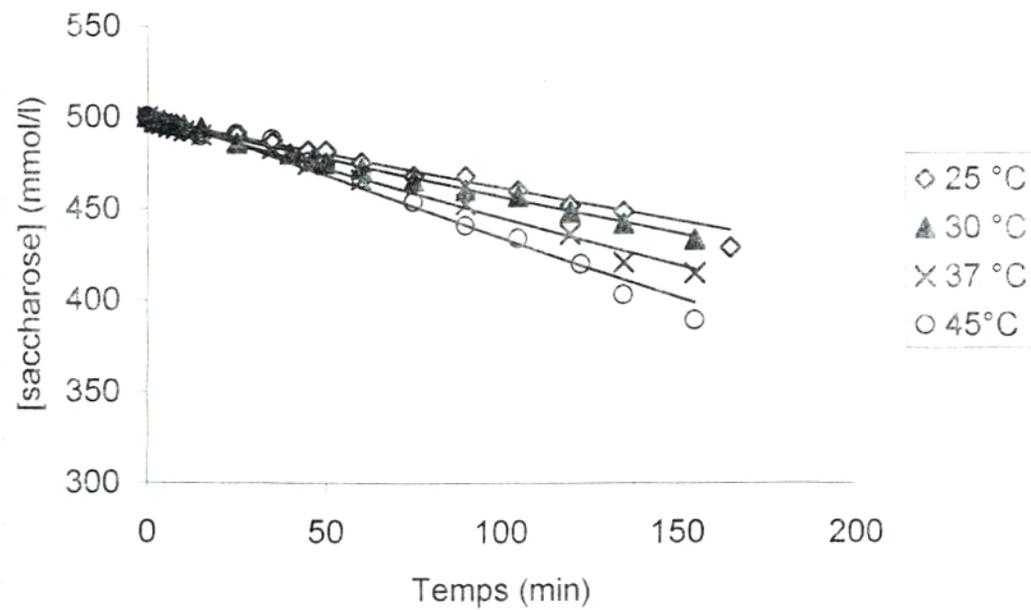


Figure 26 : Effet de la température sur l'hydrolyse du saccharose par l'enzyme immobilisée.
 [saccharose]=0,5 M; [enzyme]=1,25 ml; tampon acétate pH4,0-0,1M; volume de milieu réactionnel =100 ml.

Les **tableaux 5** et **6** regroupent les valeurs déterminées pour les constantes a et b du modèle aux diverses températures utilisées.

Tableau 5 : Valeurs des constantes a et b du modèle cinétique pour l'invertase soluble incubée à différentes températures

Température (°C)	a (mmol/l)	b (mmol.min/l) ^{1/2}	r ²
25	505,25	0,068	0,9952
30	503,23	0,092	0,9951
37	506,56	0,142	0,9752
45	505,13	0,186	0,9669

Tableau 6 : Valeurs des constantes a et b du modèle cinétique pour l'invertase immobilisée incubée à différentes températures

Température (°C)	a (mmol/l)	b (mmol.min/l) ^{1/2}	r ²
25	499,12	0,017	0,9866
30	498,56	0,019	0,9958
37	499,73	0,025	0,9934
45	503,66	0,032	0,9787

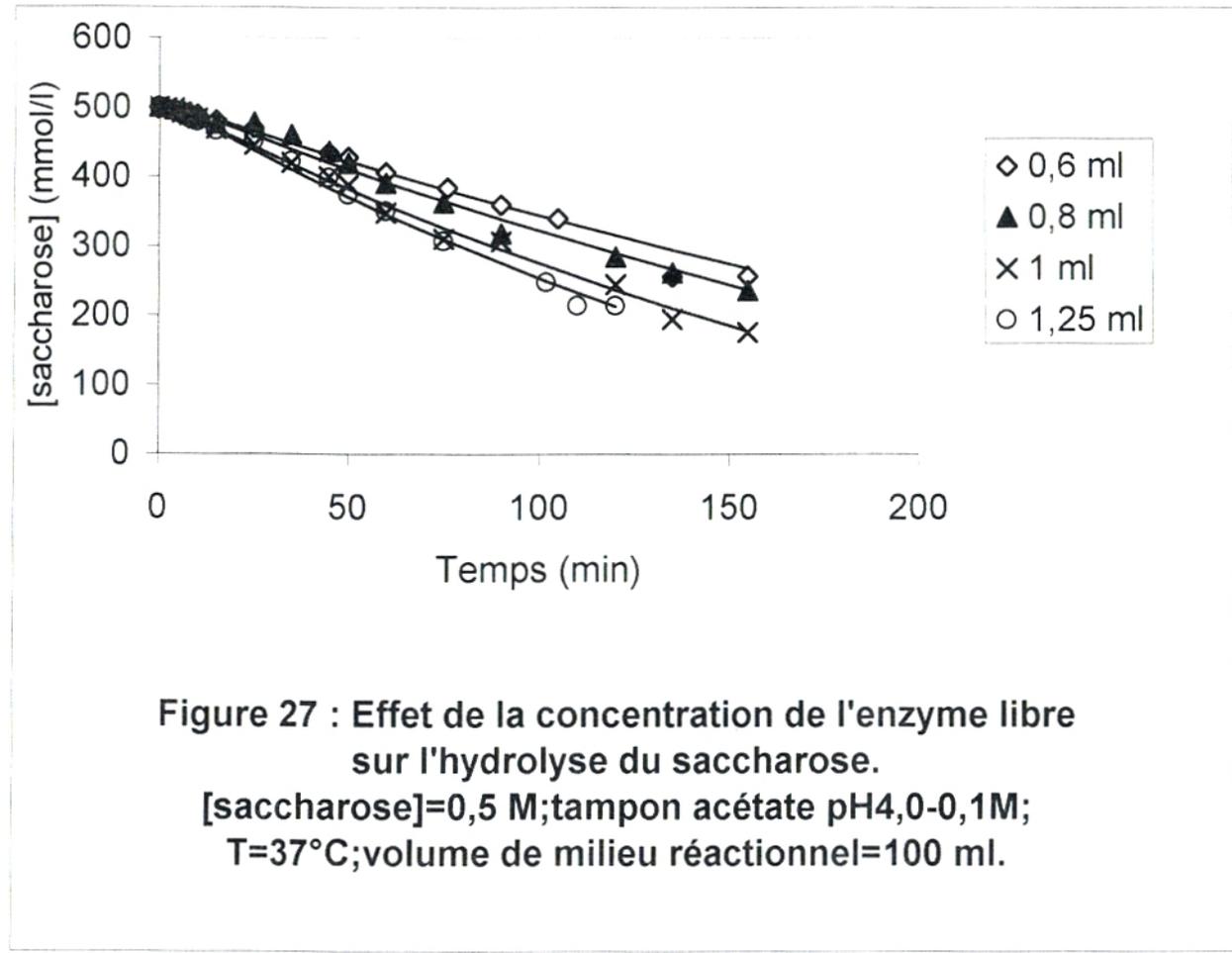
L'examen des **tableaux 5** et **6** permet de constater que a peut effectivement être assimilé à la concentration initiale en substrat (qui est ici de 0,5 mol/l) et que la valeur de b augmente avec la température.

Des expériences précédentes (*cf.* paragraphe IV.4) ayant montré que l'enzyme immobilisée était instable à 45°C (ce qui exclut son utilisation pendant une période prolongée à cette température), nous avons opéré à 37°C dans la suite des expériences.

2. Effet de la concentration d'enzyme sur la consommation du substrat par l'enzyme libre et par l'enzyme immobilisée

L'effet de la concentration d'enzyme sur la dégradation du saccharose par les invertases soluble et immobilisée est étudié en effectuant des hydrolyses à des concentrations d'enzyme de 0,6 – 0,8 – 1 et 1,25 ml pour 100 ml de milieu réactionnel (les autres conditions opératoires sont les mêmes pour tous les essais).

Les **figures 27** et **28** montrent que la vitesse d'hydrolyse du saccharose croît avec la concentration d'enzyme. Dans le cas de l'enzyme immobilisée, les concentrations 1 et 1,25 % conduisent à peu près à la même vitesse de réaction.



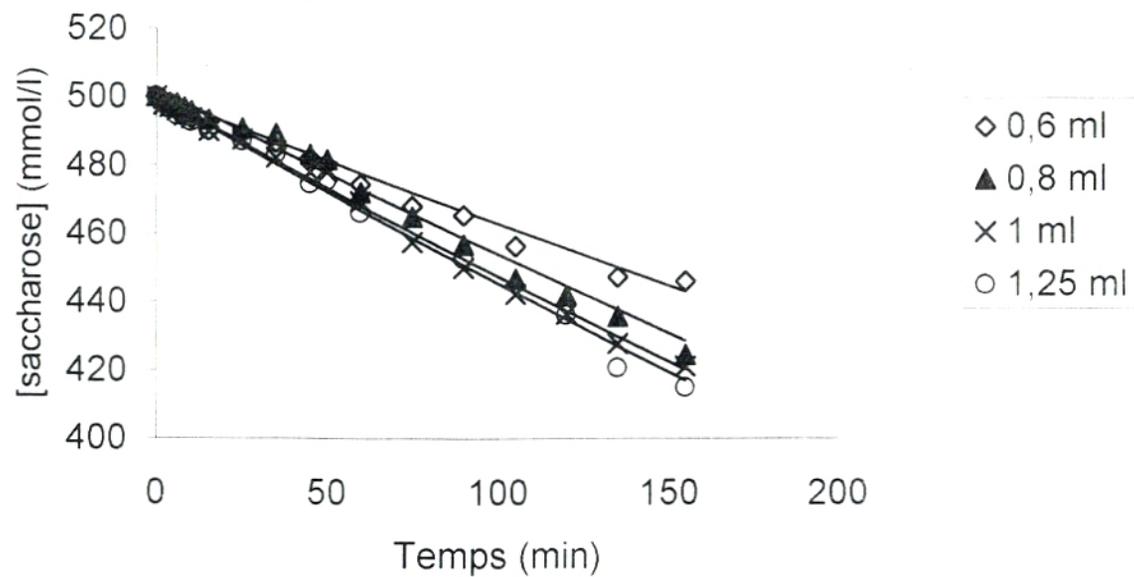


Figure 28 : Effet de la concentration de l'enzyme immobilisée sur la consommation de saccharose. [succharose]=0,5 M; tampon acétate pH 4,0-0,1M; T=37°C; volume de milieu réactionnel=100 ml.

Les **tableaux 7 et 8** regroupent les valeurs déterminées pour les constantes a et b du modèle aux diverses concentrations d'enzyme utilisées.

Tableau 7 : Valeurs des constantes a et b du modèle cinétique pour différentes concentrations de l'invertase soluble

[Enzyme] (% V/V)	a (mmol/l)	b (mmol.min/l) ^{1/2}	r ²
0,6	508,65	0,08	0,9853
0,8	510,49	0,093	0,9856
1	507,40	0,119	0,9950
1,25	509,45	0,133	0,9911

Tableau 8 : Valeurs des constantes a et b du modèle cinétique pour différentes concentrations de l'invertase immobilisée

[Enzyme] (%V/V)	a (mmol/l)	b (mmol.min/l) ^{1/2}	r ²
0,6	500,2	0,017	0,9840
0,8	502,09	0,022	0,9911
1	499,75	0,024	0,9944
1,25	509,45	0,133	0,9911

L'examen des **tableaux 7 et 8** permet à nouveau de constater que a correspond bien à la concentration initiale en substrat (soit 0,5 mol/l) et que la valeur de b augmente avec la concentration en enzyme.

3. Effet de la concentration en saccharose sur la cinétique d'hydrolyse par l'enzyme libre et par l'enzyme immobilisée

L'effet de la concentration en substrat sur la cinétique d'hydrolyse par les invertases soluble et immobilisée est étudié en effectuant des essais d'hydrolyse à diverses concentrations en saccharose (0,1 – 0,25 – 0,5 – 1 – 1,5 mol/l). Les autres conditions opératoires sont les mêmes pour tous les essais.

Les **figures 29 et 30** montrent que la cinétique d'hydrolyse est nettement plus lente dans le cas de l'enzyme immobilisée que dans le cas de l'enzyme libre. Ainsi, pour une concentration initiale en saccharose de 0,1 mol/l, l'hydrolyse par l'enzyme libre est complète au bout de 45 min alors qu'avec l'enzyme immobilisée la quantité de saccharose transformée au bout de 2 heures représente seulement 20% de la quantité initiale de saccharose.

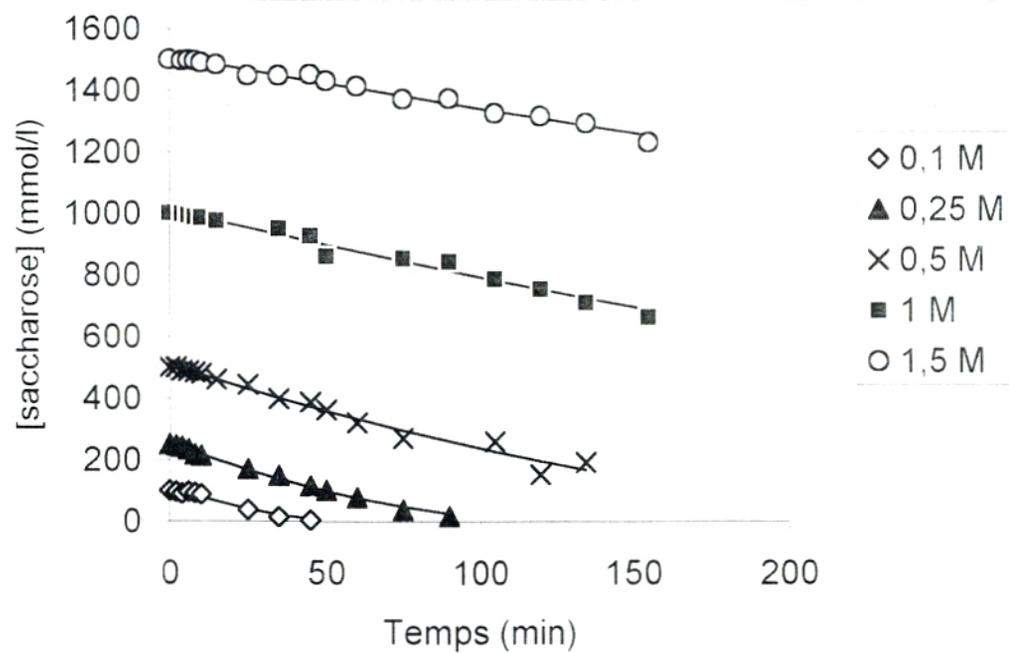


Figure 29 : Effet de la concentration en saccharose sur la cinétique d'hydrolyse par l'invertase libre.
 [enzyme]=1,25 ml; tampon acétate pH 4,0-0,1M;
 T=37°C ; volume de milieu réactionnel =100 ml.

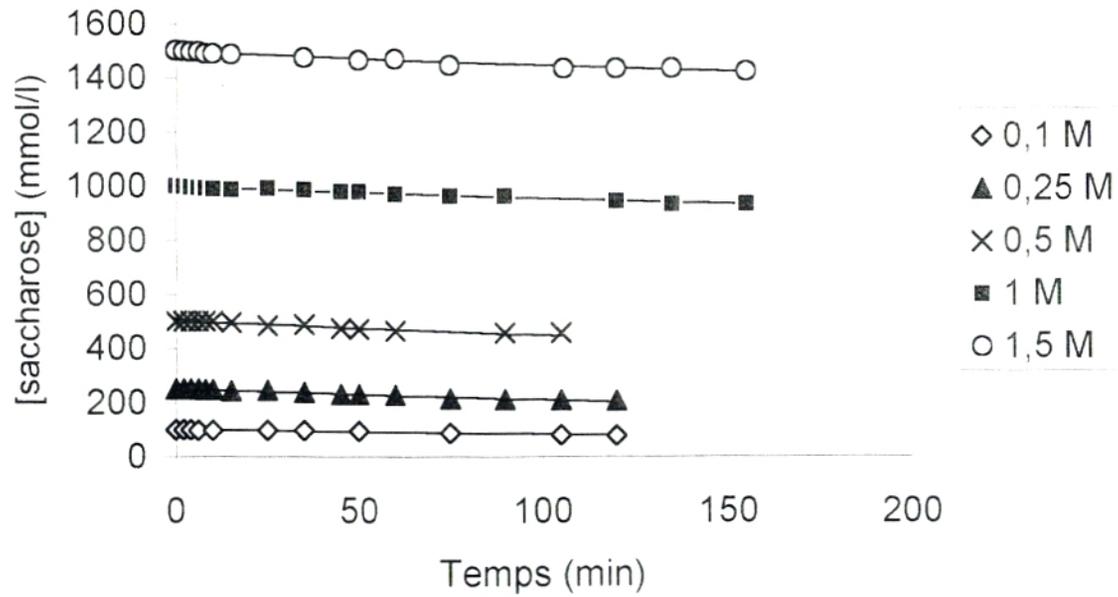


Figure 30 : Effet de la concentration en saccharose sur la cinétique d'hydrolyse par l'invertase immobilisée.
 [enzyme]=1,25 ml ; tampon acétate pH4,0-0,1M;
 T=37°C; volume de milieu réactionnel =100 ml.

Les **tableaux 9** et **10** regroupent les valeurs déterminées pour les constantes a et b du modèle aux diverses concentrations de substrat utilisées.

Tableau 9 : Valeurs des constantes a et b du modèle cinétique pour différentes concentrations en substrat et avec l'invertase soluble

[Saccharose] (mol/l)	a (mmol/l)	b (mmol.min/l) ^{1/2}	r ²
0,1	108,39	0,33	0,9644
0,25	253,63	0,241	0,9951
0,5	506,56	0,142	0,9752
1	1010,01	0,072	0,9780
1,5	1508,11	0,044	0,9819

Tableau 10 : Valeurs des constantes a et b du modèle cinétique pour différentes concentrations en substrat et avec l'invertase immobilisée

[Saccharose] (mol/l)	a (mmol/l)	b (mmol.min/l) ^{1/2}	r ²
0,1	100,38	0,017	0,9298
0,25	250,71	0,027	0,9748
0,5	501,99	0,025	0,9522
1	997,90	0,014	0,9766
1,5	1496,04	0,013	0,9658

Le **tableau 9** permet de constater qu'en présence de l'enzyme soluble, la valeur de la constante b varie en sens inverse de la concentration en substrat.

Le **tableau 10** indique qu'en présence de l'enzyme immobilisée, la valeur de la constante b est maximale pour une concentration en saccharose de 0,25 mol/l ; elle diminue de part et d'autre de cette concentration.

VI. HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE **PAR L'INVERTASE IMMOBILISEE** **PAR INCLUSION DANS UN REACTEUR** **A LIT FIXE**

L'enzyme immobilisée dans les billes d'alginate a été mise en œuvre dans un petit réacteur à lit fixe afin d'étudier le comportement de ces billes pendant une durée d'utilisation relativement longue (le dispositif utilisé est décrit dans le paragraphe IX de la partie « matériel et méthodes »).

Le réacteur était alimenté par une solution 0,5 M de saccharose. La température de chaque prélèvement d'hydrolysate quittant le réacteur a été notée. En effet, la température régnant dans le réacteur conditionne en partie le taux de conversion du substrat (*cf.* paragraphe V.1).

On détermine le taux de conversion du substrat par le rapport : $(S_0 - S) / S_0$, où S_0 est la concentration en substrat dans le fluide entrant dans le réacteur et S est la concentration résiduelle en substrat dans le fluide quittant le réacteur.

La **figure 31** représente l'évolution du taux de conversion du saccharose au cours du temps pour différents débits d'alimentation du réacteur. Nous constatons, que les taux de conversion les plus élevés sont atteints avec les débits les plus grands. Néanmoins, la stabilité opérationnelle du réacteur s'améliore lorsque le débit d'alimentation diminue. Ainsi, pour le débit le plus faible (0,20 ml/min), le taux de conversion maximum est de l'ordre de 25% seulement mais reste à peu près stable pendant environ de 50 heures. Une telle stabilité n'est pas observée aux autres débits utilisés. Néanmoins, le meilleur compromis entre la stabilité opérationnelle et le taux de conversion semble être atteint avec un débit de 0,28 ml/min (auquel correspond un taux de conversion maximum de 61%).

La **figure 32** permet d'évaluer l'amplitude des fluctuations de la température régnant dans le réacteur au cours des essais décrits ci-dessus.

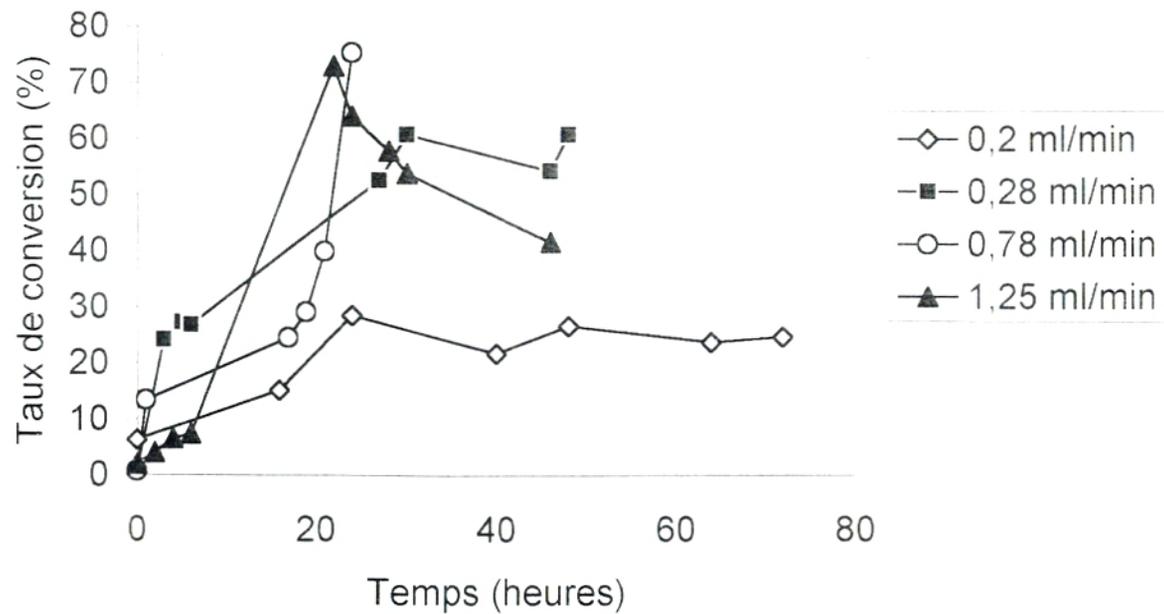


Figure 31 : Evolution du taux de conversion du saccharose au cours du temps pour différents débits d'alimentation du réacteur continu.

[saccharose]=0,5 M; [enzyme]=1,25 ml;
tampon acétate pH4,0-0,1 M; température ambiante.

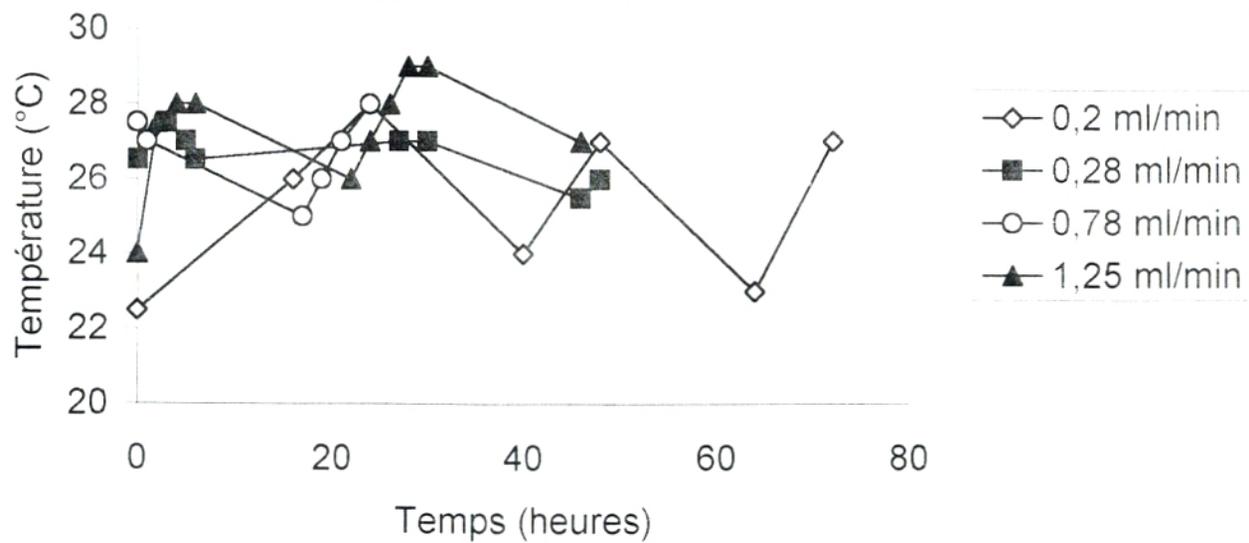
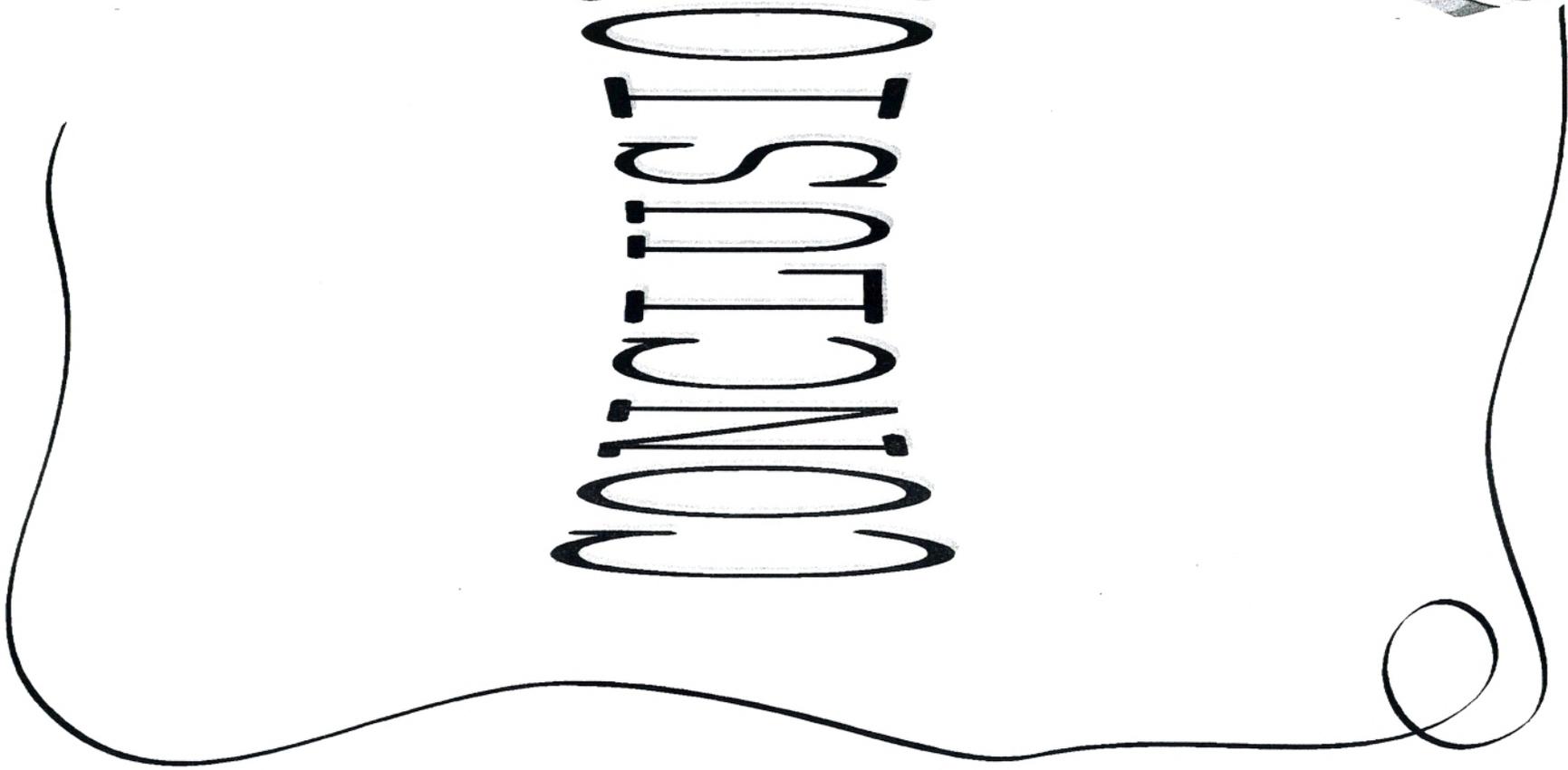
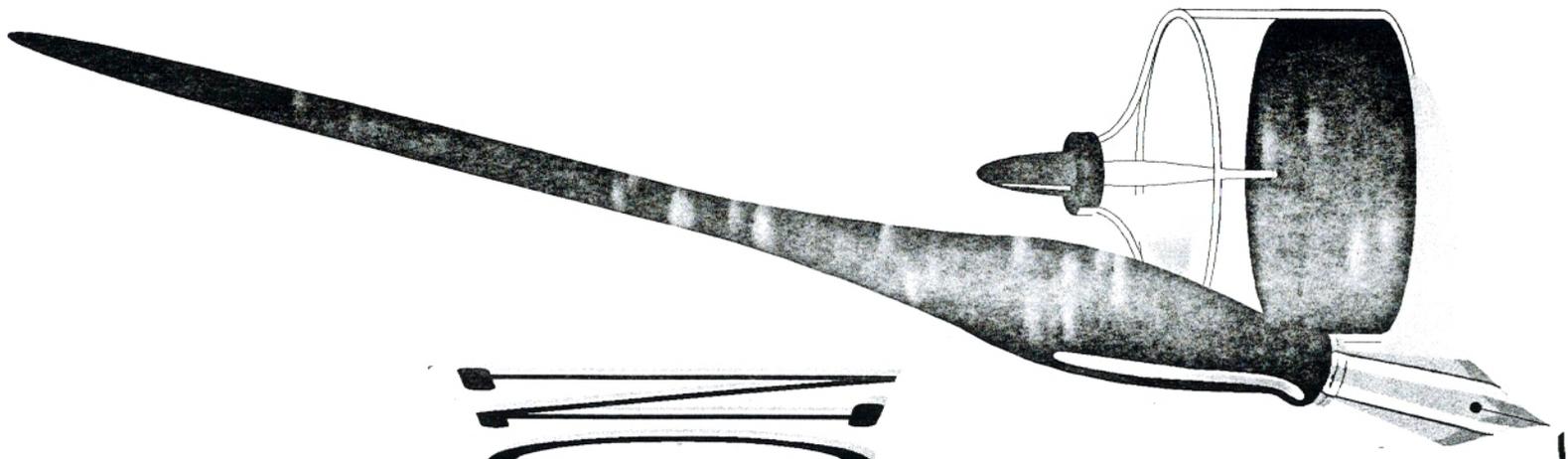


Figure 32 : Evolution de la température dans le réacteur continu au cours du temps.

Nous avons comparé les résultats obtenus à partir du réacteur continu à lit fixe et ceux obtenus à partir du réacteur discontinu dans des conditions similaires ($[\text{saccharose}] = 0,5 \text{ mol/l}$; $[\text{enzyme}] = 1,25 \text{ ml}$; tampon acétate pH 4,0 – 0,1 M ; $T = 25^\circ\text{C}$ en moyenne). Nous avons constaté que le taux de conversion du saccharose atteint 14,2% au bout de 165 min dans le réacteur discontinu, alors qu'il atteint 24% au bout de 180 min dans le réacteur continu alimenté par un débit de 0,28 ml/min. Dans de telles conditions, le système continu semble donc plus performant que le système discontinu.



CONCLUSION



Ce travail avait pour objectif l'étude des comportements cinétiques de l'invertase soluble et de l'invertase immobilisée dans des billes d'alginate en vue de l'utilisation de cette enzyme pour l'hydrolyse du saccharose dans des réacteurs continus.

Pour tenir compte des contraintes de l'industrie, nous avons travaillé avec une préparation brute d'invertase, issue de *Saccharomyces cerevisiae*, (l'utilisation de préparations « brutes » est courante en technologie enzymatique alimentaire parce qu'elle évite les processus coûteux de purification des enzymes). De ce fait, l'étude du comportement de l'enzyme a été relativement compliquée.

Afin de compléter notre étude, nous proposons les travaux suivants :

- Amélioration du protocole de préparation de l'enzyme afin d'obtenir une activité enzymatique plus stable.
- Recherche des conditions optimales d'immobilisation de l'enzyme dans les billes d'alginate (par exemple : détermination des concentrations optimales d'alginate et d'enzyme ; optimisation du diamètre des billes d'alginate ; détermination de la concentration en chlorure de calcium la plus appropriée pour la gélification des billes d'alginate ...).
- Essai de l'enzyme immobilisée dans un réacteur continu minimisant les contraintes diffusionnelles (un réacteur à lit fluidisé par exemple).

En dernier lieu, nous estimons que ce travail peut servir de support :

- A l'étude du comportement cinétique d'autres enzymes (solubles ou immobilisées) d'intérêt industriel.
- A l'étude d'autres techniques d'immobilisation.



ANNEXE

I. PREPARATION DU REACTIF A L'ACIDE

3,5 – DINITROSALICYLIQUE (DNSA)

- Dissoudre 1 g de DNSA dans 20 ml de soude (NaOH) 2 N.
- Ajouter doucement une solution de 30 g de tartrate double de Na,K dissout dans 50 ml d'eau distillée.
- Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et agiter jusqu'à obtention d'une solution homogène de couleur orange-rouge (si nécessaire, chauffer légèrement le mélange).

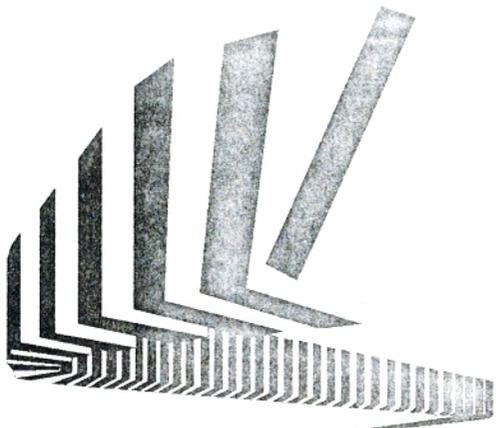
Le réactif DNSA doit être conservé dans un flacon bien fermé et à l'abri de la lumière [6].

II. PREPARATION DU REACTIF DU BIURET

- Dissoudre 3 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) avec 9 g de tartrate double de Na, K dans 500 ml d'eau distillée.
- Ajouter 5 g d'iodure de potassium et compléter à 1 litre avec une solution de soude à 0,4 mol/l.

Le réactif du biuret doit être conservé dans un flacon bien fermé et à l'abri de la lumière [86].





BIBLIOGRAPHIE

1. ANONYME, 1992.

Le sucre, applications alimentaires.
CEDUS (Centre d'Etudes et de Documentation du Sucre),
Paris, 32 pages.

2. ANONYME, 1999.

Bio-Glue : Surgical adhesive for vascular repair.
Fiche technique du produit, Cryolife Inc. International, 1 - 3.

3. AYMARD, C ; BELARBI, A. 2000.

Kinetics of thermal deactivation of enzymes : a simple three
parameters phenomenological model can describe the decay of
enzyme activity, irrespectively of the mechanism.
Enzyme and Microbial Technology, **27**, 612 - 618.

4. BARBOTIN, JN. 1994.

Comportement physiologique et stabilité des cellules immobilisées.
Biofutur, N° 132, 22 - 27.

5. BEDDOWS, CG. 1982.

The immobilization of enzymes, bovine serum albumin, and
phenylpropylamine to poly (acrylic acid) - polyéthylène - based
copolymers.
Biotechnology and Bioengineering, **XXIV**, 1371 - 1387.

6. BERNFELD, P. 1955.

Amylases, α and β .
Methods in enzymology, **1**, 149 - 150.

7. BERSET, C. 1993.

Enzymes immobilisées. *In* : Biotechnologie, R. SCRIBAN,
Paris, Tec et Doc - Lavoisier, 365 - 392.

8. BON, E ; FREIRE, DG ; MENDES, MF ; SOARES, VF. 1984.

Immobilization of glucoamylase on inexpensive supports :
A comparative evaluation.
Biotechnology and Bioengineering Symp., N° 14, 447 - 455.

9. BONALY, R. 1991.

Morphologie et reproduction asexuée des levures.
In : Biotechnologie des levures, JP. LARPENT,
Paris, Masson, 1 - 33.

10. BOUDRANT, J. 1973.

Etude de quelques modèles de réacteurs enzymatiques continus.
Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du
Languedoc, Montpellier, 85 pages.

11. BOUIX, M ; LEVEAU, JY. 1993.

Production des enzymes. *In* : Biotechnologie, R. SCRIBAN,
Paris, Tec et Doc - Lavoisier, 356 - 364.

12. BOURGEOIS, CM. 1996.

Conservateur chimique. *In* : Microbiologie alimentaire,
CM. BOURGEOIS, JF. MESCLE et J. ZUCCA,
Paris, Tec et Doc, Tome 1, 643 - 659.

13. BOURGEOIS, CM ; MAFART, P. 1996.

La brasserie. *In* : Microbiologie alimentaire,
CM. BOURGEOIS et JP. LARPENT,
Paris, Tec et Doc, Tome 2, 92 - 108.

14. BOZE, H ; MOULIN, G ; GALZY, P. 2000.

Production of microbial biomass. *In* : Biotechnology,
G. REED et T. NAGODAWITHIANA Ed.,
Wiley - VCH, 9, 170 - 175.

15. BRUNETON, J. 1993.

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.
Paris, Tec et Doc, 2^e édition, 17 - 45.

**16. BUCHHOLZ, K ; NOLL - BORCHERS M ;
SCHWENGERS, D. 1998.**

Production of leucrose by dextransucrase.
Starch/Stärke, 50, N° 4, 164 - 172.

- 17. BURSTEIN, C. 2000.**
Biotechnologie enzymatique : Mode d'emploi, industrie alimentaire, environnement, médical.
Paris, Polytechnica, 48 - 50.
- 18. CABRAL, JMS ; NOVAIS, JM ; CARDOSO, JP. 1981.**
Immobilization of amyloglucosidase on alkylamine derivatives of metal - link - activated inorganic supports.
Biotechnology and Bioengineering, **XXIII**, 2083 - 2092 .
- 19. CERVELLI, S ; PERRET, D. 1998.**
The immobilized enzymes as biotechnological suggestion for soil decontamination.
Annali di Chimica, **88**, 509 - 515.
- 20. CHANG, HN ; SEONG, GH ; YOO, IK ; PARK, JK ; SEO, JH. 1996.**
Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid - core alginate capsules.
Biotechnology and Bioengineering, **51**, N° 2, 157 - 162.
- 21. COJOCARU, DC. 1995.**
Some properties of invertase immobilized through the covalent binding.
Analele stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza." din Iasi, Tomul **XLI**, S. II, a. biologie Vegetala, 109 - 112.
- 22. COUTOULY, G. 1991.**
Génie enzymatique.
Paris, Masson et Doin, 116 - 118 et 124 - 127.
- 23. D'ARCADIA CRUZ, V ; BELOTE, JG ; DORTA, C ; OLIVEIRA dos SANTOS, LH ; ANDRIOLO, CR ; DE OLIVEIRA KHENAYFES, M ; CRUZ, R. 1998.**
Purification and characterization of β -fructosidase with inulinase activity from *Aspergillus niger* - 245.
Brazilian Archives of Biology and Technology, **41**, N° 3, 288 - 295.

- 24. DAS, N ; KAYASTHA, AM ; MALHOTRA, OP. 1998.**
Immobilisation of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan L.*) in polyacrylamide gels and calcium alginate beads.
Biotechnol. Appl. Biochem., **27**, 25 - 29.
- 25. DE ALTERIIS, E ; ZUECO, J ; RICO, H ; SENTANDREU, R ; PARASCANDOLA, P. 1995.**
Electrophoretic mobility of external invertase from free and gel - immobilized yeast cells.
Res. Microbiol, **146**, 217 - 225.
- 26. DE ALTERIIS, E ; SANTELLA, L ; PARASCANDOLA, P. 1998.**
Effects of immobilization on the behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in an insolubilized gelatin gel.
Recent Res. Devel. in Fermentation and Bioeng., **1**, 65 - 75.
- 27. DE ALTERIIS, E ; ALEPUZ, PM ; ESTRUCH, F ; PARASCANDOLA, P. 1999.**
Clues to the origine of high external invertase activity in immobilized growing yeast : Prolonged SUC2 transcription and less susceptibility of the enzyme to endogeneous proteolysis.
Can. J. Microbiol., **45**, 413 - 417.
- 28. DEBABOV, VG. 1982.**
The industrial use of *Bacilli*.
Academic Press, 331 - 367.
- 29. DE CORDT, S ; VANHOOF, K ; HU, J ; MAESMANS, G ; HENDRICKX, M ; TOBBACK, P. 1992.**
Thermostability of soluble and immobilized α - amylase from *Bacillus licheniformis*.
Biotechnology and Bioengineering, **40**, 396 - 402.
- 30. DEREUDDRE, J. 1994.**
Un outil pour la conservation des ressources génétiques.
Biofutur, N° 132, 39 - 41.
- 31. DIVIES, C ; CACHON, R. 1996.**
Les micro-organismes immobilisés.
In: Microbiologie alimentaire. CM. BOURGEOIS et JP. LARPENT.
Paris, Tec et Doc, Tome 2, 457 - 476.

- 32. DOCOLOMANSKY, P ; GEMEINER, P ; MISLOVICOVA, D ; STEFUCA, V ; DANIELSSON, B. 1994.**
 Screening of concanavalin A - bead cellulose conjugates using an enzyme thermistor with immobilized invertase as the reporter catalyst.
 Biotechnology and Bioengineering, **43**, 286 - 292.
- 33. DRILEAU, JF. 1996.**
 La cidrerie.
In: Microbiologie alimentaire, CM. BOURGEOIS et JP. LARPENT,
 Paris, Tec et Doc, Tome 2, 138 - 147.
- 34. DUPUY, P., 1982.**
 Utilisation des enzymes en technologie alimentaire.
 Paris, Technique et Documentation - Lavoisier, 165 - 171.
- 35. DYNESEN, J ; SMITS, HP ; OLSSON, L ; NIELSEN, J. 1998.**
 Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* : The role of glucose, fructose and mannose.
 Appl. Microbiol. Biotechnol., **50**, 579 - 582.
- 36. ENGASSER, JM. 1993.**
 Réacteurs à enzymes et cellules immobilisées.
In : Biotechnologie, R. SCRIBAN,
 Paris, Tec et Doc - Lavoisier, 431 - 448.
- 37. FILHO, UC ; HORI, CE ; RIBEIRO, EJ. 1999.**
 Influence of the reaction products in the inversion of sucrose by invertase.
 Braz. J. Chem. Eng., **16**, N° 2, 1-7.
- 38. FISCHER, H ; KOHTES, L. 1951.**
 Purification de l'invertase de levure.
 Helvetica Chimica Acta, **XXXIV**, fascicule IV, N° 136, 1123 - 1131.
- 39. GAOUAR, O ; AYMARD, C ; ZAKHIA, N ; RIOS, GM. 1997.**
 Kinetic studies on the hydrolysis of soluble and cassava starches by Maltogenase.
 Starch/Stärke, **49**, 6, 231 - 237.

40. **GARÇON, N. 1994.**
L'encapsulation des vaccins, une voie d'avenir.
Biofutur, N° 132, 31 - 32.
41. **GARNETT, JL ; KENYON, RS ; LIDDY, MJ. 1974.**
Enzyme immobilisation by covalent attachment to novel polymer matrices prepared by a radiation grafting technique.
J.C.S. Chem. Comm., 735 - 736.
42. **GEMEINER, P ; REXOVA - BENKOVA, L ; SEVEC, F ; NORRLOW, O. 1993.**
Immobilized biosystems : Theory and practical applications.
London, Chapman and Hall, 2.
43. **GEMEINER, P ; DOCOLOMANSKY, P ; VIKARTOVSKA, A ; STEFUCA, V. 1998.**
Amplification of flow - microcalorimetry signal by means of multiple bioaffinity layering of lectin and glycoenzyme.
Biotechnol. Appl. Biochem., 28, 155 - 161.
44. **GRAEBNER, H ; GEORGI, U ; HUTTL, R ; WOLF, G. 1998.**
Immobilized enzymes - A simple calorimetric method for the determination of the catalytic activity.
Thermochimica Acta, 310, 101 - 105.
45. **GRAEBNER, H ; KIRCHNER, R ; LERCHNER, J ; WOLF, G ; 1999.**
Flow - calorimetry - a tool for investigation of reactions with incomplete conversion ?
Thermochimica Acta, 337, 39 - 44.
46. **HATAYAMA, H ; SWABE, T ; KUROKAWA, Y. 1996.**
Immobilization of urease on composite fibre by using a gel formation of cellulose acetate and titanium iso - propoxide.
Journal of sol - gel and Technology, 7, 13 - 17.
47. **HUTTL, R ; OEHLISCHLAGER, K ; WOLF, G. 1999.**
Calorimetric investigations of the enzyme catalyzed sucrose hydrolysis.
Thermochimica Acta, 325, 1 - 4.

- 48. ILLANES, A. 1999.**
Stability of biocatalysts.
EJB Electronic Journal of Biotechnology, 2, N° 1, 7 - 15.
- 49. JAFRI, F ; HUSAIN, S ; SALEEMUDDIN, M. 1993.**
Immobilization and stabilization of invertase using specific polyclonal antibodies.
Biotechnol. Appl. Biochem., 18, 401 - 408.
- 50. JOSIC, D ; SCHWINN, H ; STRANCAR, A ;
PODGORNIK, A ; BARUT, M ; LIM, YP ;
VODOPIVEC, M. 1998.**
Use of compact, porous units with immobilized ligands with high molecular masses in affinity chromatography and enzymatic conversion of substrates with high and low molecular masses.
Journal of chromatography A., 803, 61 - 71.
- 51. JOURET, C. 1996.**
Les boissons distillées
In: Microbiologie alimentaire, CM. BOURGEOIS et JP. LARPENT,
Paris, Tec et Doc, Tome 2, 152 - 159.
- 52. KAPLAN, O ; BAKIR, U ; ERARSLAN, A. 1997.**
Thermal inactivation of native and crosslinked invertases.
Biotechnology Techniques, 11, N° 9, 621 - 623.
- 53. KILARA, A ; SHAHANI, KM. 1986.**
Enzymes in food technology.
In : Comprehensive Biotechnology, M. MOO YOUNG Ed.,
Pergamon Press, volume 3, section 3 : Industrial Chemicals,
Biochemicals and Fuels, 1045 - 1064.
- 54. KIRK, LA ; DOELLE, HW. 1993.**
Rapid ethanol production from sucrose without by product formation.
Biotechnology letters, 15, N° 9, 985 - 990.
- 55. KO, S ; LOHA, V ; DU, L ; PROKOP, A ; TANNER, RD. 1999.**
Partitioning invertase between a dilute water solution and generated droplets.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 77 - 79, 501 - 510.

- 56. KOCHHAR, A ; GUPTA, AK ; KAUR, N. 1999.**
Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose.
J. Sci. Food Agric., 79, 549 - 554.
- 57. KRASNOBAJEV, V ; BONIGER, R. 1974.**
Preparation and application of immobilized enzymes for starch degradation.
Proc. IV Int. Congress Food Sci. and Technol., IV, 45 - 49.
- 58. KUROKAWA, Y., K. SUZUKI et Y. TAMAI, 1998.**
Adsorption and enzyme (β - galactosidase) properties of gel fiber prepared by the gel formation of cellulose acetate and titanium isopropoxide.
Biotechnology and Bioengineering, 59, N° 5, 651 - 656.
- 59. KUROKAWA, Y ; IKEDA, Y ; KOUNO, M ; ISHIZAKA, T. 2000.**
Entrap - immobilization of cells (*S. cerevisiae*) on titanium isopropoxide-cellulose gel fiber and its properties.
Japanese Journal of Polymer Science and Technology, *Kobunshi Ronbunshu*, 57, 1, 100 - 104.
- 60. LARPENT, JP ; LARPENT - GOURGAUD, M. 1997.**
Mémento technique de microbiologie.
Paris. Tec et Doc, 3^e éd., 858 - 859.
- 61. LEVEAU, JY ; BOUIX, M. 1993.**
Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel.
Paris, Tec et Doc, 4 - 16 et 85.
- 62. LEVY, MC ; PONCELET, D. 1994.**
Bio-encapsulation, les technologies.
Biofutur, N° 132, 16 - 21.
- 63. LIDDY, MJ ; GARNETT, JL ; KENYON, RS. 1975.**
The insolubilization of trypsin by attachment to radiation graft copolymers of polypropylene.
J. Polymer SCI. : Symposium, N° 49, 109 - 116.

- 64. LIN, SS ; SUNG, HY. 1993.**
Partial purification and characterization of soluble acid invertases from rice (*Oryza sativa*) leaves.
Biochemistry and molecular biology international, **31**, N° 5, 945 - 953.
- 65. LINDEN, G ; LORIENT, D. 1994.**
Biochimie agro - industrielle : Valorisation alimentaire de la production agricole.
Paris. Masson, 271 - 357.
- 66. LONCLE, D. 1992.**
Génie enzymatique.
Paris. Doin, 24 - 259.
- 67. MAEDA, H ; YAMAUCHI, A ; SUZUKI, H. 1973.**
Preparation of immobilized enzymes by γ - ray irradiation.
Biochimica et Biophysica Acta, **315**, 18 - 21.
- 68. MAEDA, H ; SUZUKI, H. 1975.**
Preparation of immobilized enzymes from acrylic monomers under γ - ray irradiation.
Biotechnology and Bioengineering, **XVII**, 119 - 128.
- 69. MAGDALOU, J ; SIEST, G. 1994.**
Billes d'alginate et microsomes.
Biofutur, N° 132, 33 - 34.
- 70. MALINEAU, M ; ARNOUX, M. 1996.**
Les fermentations panaires et pâtisseries.
In: Microbiologie alimentaire, CM. BOURGEOIS et JP. LARPENT, Paris, Tec et Doc, Tome 2, 76 - 90.
- 71. MANECKE, G ; GUNZEL, G ; FORSTER, HJ. 1970.**
Enzymes covalently bound to various polymers and the effects on the properties of these enzymes.
J. Polymer SCI. : Part C, N° 30, 607 - 613.

72. MARSH, DR ; LEE, YY ; TSAO, GT. 1973.
Immobilized glucoamylase on porous glass.
Biotechnology and Bioengineering, XV, 483 - 492.
73. MATTEA, CC ; GLADE, M ; TANAKA, A ; PIRET, J ;
DEMAIN, AL. 1975.
Microbiological studies on the formation of Gramicidin S.
synthetases.
Biotechnology and Bioengineering, XVII, 129 - 142.
74. MILLING, RJ ; LEIGH, RA ; HALL, JL. 1993.
Synthesis of a vacuolar acid invertase in washed discs of storage root
tissue of red beet (*Beta vulgaris L.*).
Journal of experimental Botany, 44, N° 268, 1687 - 1694.
75. MIRZARAKHMETOVA, DT ; ABDURAZAKOVA, SK. 1998.
Production of invertase immobilized on polyamide in a medium with
a high sucrose concentration.
Chemistry of Natural Compounds, 34, N° 3, 309 - 311.
76. MIRZARAKHMETOVA, DT ; ABDURAZAKOVA, SK. 1998.
Kinetics of immobilized and native invertases.
Chemistry of Natural Compounds, 34, N° 3, 312 - 314.
77. MISLOVICOVA, D ; VIKARTOVSKA, A ; GEMEINER, P. 1997.
The glycosylated enzyme - binding assay for the study of the
interaction of free and immobilized lectins with carbohydrates.
J. Biochem. Biophys. Methods, 35, 37 - 48.
78. NAKANE, K ; TAKAHASHI, K ; SUZUKI, F ; KURAKAMA, Y.
1999.
Entrap - immobilization of urease on composite gel fiber of cellulose
acetate and zirconia.
Sen'I Gakkaishi, 55, N° 12, 563 - 568.
79. NAUMOV, DG ; DOROSHENKO, VG. 1998.
 β - Fructosidases : A new superfamily of glycosyl hydrolases.
Molecular Biology, 32 , N° 5, 761 - 766.

- 80. NELSON, JM ; GRIFFIN, EG. 1916.**
Adsorption of invertase.
Contribution from the organic laboratory, Columbia university and
the Harriman research laboratory, N° 263, 1109 - 1115.
- 81. OHMORI, Y ; KUROKAWA, Y. 1994.**
Preparation of fiber - entrapped enzyme using cellulose acetate -
titanium - iso - propoxide composite as gel matrix.
Journal of Biotechnology, **33**, 205 - 209.
- 82. OUTTRUP, H ; NORMAN, BE. 1984.**
Properties and application of a thermostable maltogenic amylase
produced by a strain of *Bacillus* modified by recombinant - DNA
techniques.
Starch/Stärke, **36**, N° 12, 405 - 411.
- 83. PARASCANDOLA, P ; DE ALTERIIS, E ; SCARDI, V. 1993.**
Invertase and acid phosphatase in free and gel-immobilized cells of
Saccharomyces cerevisiae grown under different cultural conditions.
Enzyme Microb. Technol., **15**, 42 - 49.
- 84. PELMONT, J. 1993.**
Enzymes.
Alger, Office des publications universitaires, 188 - 197.
- 85. PENASSE, L. 1974.**
Les enzymes : Cinétique et mécanisme d'action.
Paris, Masson et Cie, 58 - 106.
- 86. PLUMMER, DT. 1989.**
Introduction aux techniques de biochimie.
Paris, 3^e éd., 153 - 180.
- 87. POLAKOVIC, M ; STEFUCA, V ; BALES, V. 1993.**
Heterogeneous enzymic hydrolysis in a biocatalytic packed bed
formed by Ca- pectate gel beads.
Process Biochemistry, **28**, 549 - 552.

- 88. POPA, MI ; DUMITRIU, S ; CARJA, G ; AELENEI, N ; IONESCU, G. 1998.**
Catalytic behaviour of immobilized enzymes on natural polymers.
Prog. Catal., 7, 1, 25 - 30.
- 89. PREVOST, H ; CACHON, R ; CAVIN, JF ; DIVIES, C. 1994.**
Les micro-organismes immobilisés et l'industrie alimentaire.
Biofutur, N° 132, 42 - 45.
- 90. PYUN, YR ; JO, JS ; PARK, JW ; SHIN, HH. 1999.**
Effects of oxygen on invertase expression in continuous culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing the SUC 2 gene.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 334 - 339.
- 91. RAMESH, V ; SINGH, C. 1981.**
Immobilisation of *Bacillus subtilis* α - amylase on zirconia - coated alkylamine glass with glutaraldehyde.
Enzyme Microb. Technol., 3, 246 - 248.
- 92. RAY, L ; MAJUMDAR, SK. 1994.**
Enzymatic hydrolysis of starch to glucose, and immobilization of amyloglucosidase in calcium alginate gel
Research and Industry, 39, 109 - 112.
- 93. REDDY, A. ; MALEY, F. 1990.**
Identification of an active - site residue in yeast invertase by affinity labeling and site directed mutagenesis.
The journal of biological chemistry, 265, N° 19, 10817 - 10820.
- 94. REDDY, A ; MALEY, F. 1996.**
Studies on identifying the catalytic role of Glu - 204 in the active site of yeast invertase.
The journal of biological chemistry, 271, N° 24, 13953 - 13958.
- 95. REDDY, A ; GIBBS, BS ; LIU, YL ; COWARD, JK ; CHANGCHEN, LM ; MALEY, F. 1999.**
Glycosylation of the overlapping sequons in yeast external invertase : Effect of amino acid variation on site selectivity *in vivo* and *in vitro*.
Glycobiology, 9, N° 6, 547 - 555.

- 96. ROY, AB. 1987.**
 Extrait de "Kinetic implications of the analytical use of enzymes".
 Analytical Biochemistry, **165**, 13 - 19.
- 97. SAITO, T ; YOSHIDA, Y ; KAWASHIMA, K ; LIN, KH ;
 INAGAKI, H ; MAEDA, S ; KOBAYASHI, T. 1997.**
 Influence of aldehyde groups on the thermostability of an
 immobilized enzyme on an inorganic support.
 Materials science and engineering C5, 149 - 152.
- 98. SALGAROLO, P. 1990.**
 "Pratique des manipulations de chimie" à l'usage des biologistes.
 178 - 191.
- 99. SERP, D ; CANTANA, E ; HEINZEN, C ;
 VON STOCKAR, U ; MARISON, LW. 2000.**
 Characterization of an encapsulation device for the production of
 monodisperse alginate beads for cell immobilization.
 Biotechnology and Bioengineering, **70**, N° 1, 41 - 53.
- 100. SIMONNEAU, M ; RAMDI, H ; BOISSEAU, S ; POIRIER, V ;
 BERTHELIER, V ; LIEVREMONT, M. 1994.**
 Cellules de mammifères, des outils thérapeutiques.
 Biofutur, N° 132, 28 - 30.
- 101. SOSNITZA, P ; IRTEL, F ; UIBER, R ; PUSSE, M ;
 FAURIE, R ; FISCHER, L ; SCHEPER, T. 1998.**
 Flow injection analysis system for the supervision of industrial
 chromatographic downstream processing in biotechnology.
 Biosensors and Bioelectronics, **13**, 1251 - 1255.
- 102. STEFUCA, V ; GEMEINER, P ; KURILLOVA, L ;
 DANIELSSON, B ; BALES, V. 1990.**
 Application of the enzyme thermistor to the direct estimation of
 intrinsic kinetics using the saccharose - immobilized invertase
 system.
 Enzyme Microb. Technol., **12**, 830 - 835.

- 103. STEFUCA, V ; WELWARDOVA, A ; GEMEINER, P. 1997.**
Flow microcalorimeter auto - calibration for the analysis of immobilized enzyme kinetics.
Analytica Chimica Acta, **355**, 63 - 67.
- 104. STRULLU, DG ; PLENCHETTE, CH. 1994.**
Encapsulation de mycorhizes.
Biofutur, N° 132, 35 - 36.
- 105. STRYER, L. 1997.**
La biochimie.
Paris, Médecine - sciences, Flammarion, 4^e éd., 471.
- 106. THOMAS, D ; LARRETA - GARDE, V. 1997.**
Principes de base de la catalyse enzymatique en milieux complexes.
In : Enzymes en agroalimentaire, V. LARRETA - GARDE,
Paris, Tec et Doc - Lavoisier, 28 - 43.
- 107. VALENTOVA, O ; MAREK, M ; SVEC, F ; STAMBERG, J ;
VODRAZKA, Z. 1981.**
Comparison of different methods of glucose oxidase immobilization.
Biotechnology and Bioengineering, **XXIII**, 2093 - 2104.
- 108. VRABEL, P ; POLAKOVIC, M ; BALES, V. 1994.**
Modeling of inactivation phenomena in oligomeric enzymes.
Computers chem. Engng., **18**, Suppl., S681 - S685.
- 109. VRABEL, P ; POLAKOVIC, M ; GODO, S ; BALES, V ;
DOCOLOMANSKY, P ; GEMEINER, P. 1997.**
Influence of immobilization on the thermal inactivation of yeast invertase.
Enzyme and Microbial Technology, **21**, 196 - 202.
- 110. WANG, NS. 1996.**
Experiment N° 13 : Continuous immobilized enzyme reactor.
Protocole de travaux pratiques, Université du Maryland, Etats-Unis.

- 111. WANG, NS. 1996.**
Experiment N° 14 : Enzyme kinetics of invertase via initial rate determination.
Protocole de travaux pratiques, Université du Maryland, États-Unis.
- 112. WEETALL, HH. 1974.**
Preparation, characterization and applications of enzymes immobilized on inorganic supports.
In : Immobilized biochemicals and affinity chromatography, RB DUNLAP Ed., Plenum Publishing Corporation, New - York, 191 - 212.
- 113. WEETALL, HH. 1974.**
Immobilized enzymes : Analytical applications.
Analytical chemistry, **46**, 602 A - 609 A.
- 114. WEETALL, HH. 1988.**
Enzymes immobilized on inorganic supports.
In : Analytical uses of immobilized biological compounds for detection, medical and industrial uses, GG. GUILBAULT and M. MASCINI Ed., D. Reidel Publishing Company, 1 - 16.
- 115. WEETALL, HH. 1993.**
Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports.
Applied Biochemistry and Biotechnology, **41**, 157 - 188.
- 116. WEETALL, HH ; ZELKO, JT. 1983.**
Application of microbial enzymes for production of food - related products. *In* : Developments in industrial microbiology, A Publication of the Society for Industrial Microbiology, **24**, 71 - 77.
- 117. WOLF, A ; WEBER, A ; HUTTL, R ; LERCHNER, J ; WOLF, G. 1999.**
Sequential flow injection analysis based on calorimetric detection.
Thermochimica Acta, **337**, 27 - 38.

