

REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie

Option : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE



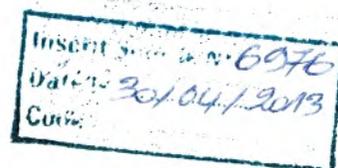
Thème

IMMOBILISATION DE LA β -FRUCTOSIDASE
DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
ET ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES DE TRANSFERT DE MATIÈRE

Présenté par M^{lle} BENZIAN Soulef Ikram

Soutenu le

Devant le jury composé de



Mr MOUSSAOUI A.	Maître de Conférence	, Université de Tlemcen	Président
Mr TABTI B.	Maître de Conférence	, Université de Tlemcen	Examineur
Mr BENMANSOUR A.	Maître de Conférence	, Université de Tlemcen	Examineur
Mr DJAZIRI R.	Maître Assistant Chargé de Cours	, Université de Tlemcen	Examineur
M ^{lle} GAOUAR O.	Maître de Conférence	, Université de Tlemcen	Promotrice

Année Universitaire : 2002 - 2003

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie

Option : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Thème

IMMOBILISATION DE LA β - FRUCTOSIDASE
DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
ET ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES DE TRANSFERT DE MATIÈRE

Présenté par M^{lle} BENZIAN Soulef Ikram

Soutenu le

Devant le jury composé de

Mr MOUSSAOUI A.	Maître de Conférence	, Université de Tlemcen	Président
Mr TABTI B.	Maître de Conférence	, Université de Tlemcen	Examineur
Mr BENMANSOUR A.	Maître de Conférence	, Université de Tlemcen	Examineur
Mr DJAZIRI R.	Maître Assistant Chargé de Cours	, Université de Tlemcen	Examineur
M ^{lle} GAOUAR O.	Maître de Conférence	, Université de Tlemcen	Promotrice

Année Universitaire : 2002 - 2003

Remerciements

Pour avoir eu l'amabilité de m'encadrer, ainsi que pour son aide discrète mais efficace, tout au long de ce travail, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à M^{elle} O. GAOUAR, Maître de Conférence à l'Université AbouBekr Belkaid Tlemcen.

Je remercie vivement Monsieur A. MOUSSAOUI., Maître de Conférence à l'Université AbouBekr Belkaid Tlemcen, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Il m'est agréable de remercier Monsieur B. TABTI, Maître de Conférence à l'Université AbouBekr Belkaid Tlemcen, et Monsieur R. DJAZIRI, Maître Assistant Chargé de Cours à l'Université AbouBekr Belkaid Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur A. BENMANSOUR, Maître de Conférence à l'Université AbouBekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je me dois de remercier Monsieur S. AMEL et Monsieur A DAHMANI, Technicien de laboratoire au département de Biologie à l'Université AbouBekr Belkaid Tlemcen, pour l'aide continue que'ils m'ont apporté tout au long de ma pratique au laboratoire ; ainsi qu'à Monsieur A. BENDIMERAD, Enseignant Chercheur à l'Université d'Es-Sénia d'Oran, pour son aide matérielle. Qu'ils trouvent en ces quelques mots l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie, en dernier lieu, Monsieur S. CHERRAK pour sa présence et son aide quotidienne avec les hauts et les bas qui sont survenu au cours des longs mois de travail assidu qu'a été ce mémoire.

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude des phénomènes de transfert de matière régissant le fonctionnement d'une enzyme immobilisée dans un gel. L'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée dans des billes d'alginate de calcium a été choisie comme réaction modèle.

Nous avons immobilisé l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* dans des billes gel d'alginate de calcium puis nous avons essayé d'améliorer la rétention de l'enzyme par l'ajout de glutaraldéhyde comme agent réticulant. La méthode d'immobilisation a consisté à piéger 2 ml d'enzyme diluée dans un volume final de gel d'alginate de 10 ml (3 % (p/v)) puis à réticuler les billes formées en ajoutant dans la solution de polymérisation du gel (CaCl_2 0.2 M) du glutaraldéhyde 0.25 %. Les billes ainsi formées ont des activités volumiques 1.5 à 2 fois supérieures à celles de billes préparées sans réticulation.

Nous avons mis au point des réacteurs enzymatiques à lit fixe pour l'hydrolyse continue du saccharose. Différents réacteurs ont été expérimentés pour trois concentrations en substrat 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M, et avec la quantité de billes d'enzyme immobilisée correspondant à 10 ml de gel d'alginate. Pour chaque concentration en substrat, les réacteurs ont été soumis à différentes conditions de fonctionnement. Nous avons testé deux températures 25°C et 40°C, et deux, voire trois débits d'alimentation : 0.86 ml/min, 1.6 ml/min, et 0.3 ml/min. Chaque essai se déroulait sur deux jours consécutifs mais était interrompu en fin de la première journée.

L'étude des phénomènes de transfert de matière a indiqué que ces réacteurs étaient tous en régime diffusionnel. De manière générale, les réacteurs réalisés ont donné des taux de conversion satisfaisant (compris entre 13.8 % et 98.9 % selon la concentration considérée).

Mots clés : enzyme immobilisée, alginate, invertase, réacteur à lit fixe, transfert de matière.

Summary

This work is a contribution to the study of the mass transfer phenomena governing the operation of an enzyme immobilized in a gel. The hydrolysis of sucrose by the invertase immobilized in calcium alginate beads is chosen as a model reaction.

We immobilized the invertase of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate beads and we tried to improve the retention of the enzyme by using glutaraldehyde as a cross-linking agent. The method of immobilization consisted in trapping 2 ml of enzyme diluted in a final volume of alginate gel of 10 ml (3 % (w/v)) and in cross-linking the beads formed by adding glutaraldehyde 0.25 % (v/v) to the solution of polymerization (CaCl_2 0.2 M). The beads thus formed have volumic activities 1.5 to 2 times higher than those of beads prepared without cross-linking.

We developed an enzymatic reactor with fixed bed for the continuous hydrolysis of sucrose. Various reactors are tested for three concentrations in substrate 0.2 M, 0.5 M and 0.8 M, and with the quantity of immobilized enzyme beads corresponding to 10 ml of alginate gel. For each substrate concentration, the reactors are subjected to various operating conditions. We tested two temperatures 25°C and 40°C, and two, even three rates of feed: 0.86 ml/min, 1.6 ml/min, and 0.3 ml/min. Each test proceeded over two days consecutive but was interrupted in end of the first day.

In general, the reactors tested gave satisfactory conversion degrees (ranging from 13.8 % to 98.9 % depending on the concentration tested). The study of mass transfer phenomena indicated that those reactors operated in the diffusional mode.

Key words: immobilized enzyme, alginate, invertase, fixed bed reactor, mass transfer.

ملخص

هذا العمل مشاركة في دراسة ظاهرة تنقل المادة التي تتحكم في نشاط الأنزيم مثبتة في جمد. كمثال لتفاعل اختير التحليل المائي لسكر القصب من طرف invertase مثبتة داخل كريات ألجينات الكليسيوم.

لقد قمنا بتثبيت invertase لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* في كريات من جمد ألجينات الكليسيوم وحاولنا تحسين طريقة حجز الأنزيم بإضافة glutaraldehyde كعامل مشبك. طريقة تثبيت الأنزيم كانت بإضافة 2 مل من محلول الأنزيم إلى حجم نهائي من الجمد الألبجينات مساوي ل 10 مل (3% (وزن/حجم)) ثم تشبك الكويرات المكونة في سائل مكثف (0.2 مول/ل) يضاف إليه 0.25% (ح/ح). الكويرات المشكولة لهانشطات حجمية مرة ونصف إلى مرتين أعلى من تلك التي تشكل دون إضافة عامل المشبك.

ثم منا بإنجاز مفاعلات مستمرة ذات طبقة ثابتة. لتحليل المستمر لسكر القصب اختبرنا مختلف المفاعلات بثلاث تركيزات 0.2, 0.5, 0.8 مول/ل بكمية من الكويرات ذات أنزيمات مثبتة موثقة ل 10 مل من جمد ألجينات. لكل تركيز اختبرنا المفاعلات في ظروف مختلفة من حيث درجة الحرارة 25° و 40° م و إثنان إلى ثلاث معدل الجريان المغذية للمفاعل 0.86 مل/د, 1.6 مل/د و 0.3 مل/د. كل تجربة أقيمت على يومين متتاليين لكن يانقطاع في نهاية اليوم الأول. دراسة ظاهرة انتقال المادة تظهر أن كل المفاعلات المنجزة كانت في نظام منتشر و بصفة عامة قامت بتحويلات مرضية (ماين 13.8% و 98.9% حسب التركيز المعبر).

الكلمات الأساسية: أنزيم مثبتة, ألجينات, مفاعل Fixed bed reactor, انتقال المادة:

Abréviations

ARN _m	ARN messenger
A.V.	Activité volumique
D.T.S.	Distribution des temps de séjours
D.O.	Densité optique
F	Facteur de dilution
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
p.s.	Pouvoir sucrant
V _e	Volume enzymatique
V _r	Volume réactionnel
V _{in}	Vitesse initiale
V _{max}	Vitesse maximale
K _M	Constante de Michaelis (μmol.l ⁻¹)
K _S	Constante d'inhibition (μmol.l ⁻¹)
K' _S	Constante d'inhibition (μmol.l ⁻¹)
N	Nombre de billes
r ²	Coefficient de corrélation
X	Taux de conversion (%)
τ	Temps de passage
Φ	Module de Thiele
η	Facteur d'efficacité

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	5
--------------------------	----------

Partie Bibliographique

CHAPITRE I : TECHNOLOGIE ENZYMATIQUE	11
---	-----------

I.1. GENERALITES	12
------------------------	----

I.2. LES METHODES D'IMMOBILISATION	14
--	----

I.2.1. Immobilisation par inclusion.....	14
--	----

I.2.2. Immobilisation par adsorption et liaisons ioniques.....	15
--	----

I.2.3. Immobilisation par liaisons covalentes	15
---	----

I.2.4. Immobilisation par réticulation.....	16
---	----

I.3. LES REACTEURS ENZYMATIQUES	17
---------------------------------------	----

I.3.1. Réacteur agité.....	17
----------------------------	----

I.3.2. Réacteur à lit fixe.....	18
---------------------------------	----

I.3.3. Réacteurs à lit fluidisé	19
---------------------------------------	----

I.3.4. Réacteurs à membrane.....	19
----------------------------------	----

CHAPITRE II : BIOTECHNOLOGIE DU SACCHAROSE.....	20
--	-----------

II.1. GENERALITES	21
-------------------------	----

II.2. STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	21
--	----

II.3. PROPRIETES TECHNOLOGIQUES DU SACCHAROSE	22
---	----

II.4. PRODUIT D'HYDROLYSE : LE SUCRE INVERTI	23
--	----

II.4.1. Composition et mode d'obtention.....	23
--	----

II.4.2. Utilisations et principales propriétés	25
--	----

CHAPITRE III : L'INVERTASE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	26
III.1. GENERALITES SUR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	27
III.1.1. <i>Position taxonomique</i>	27
III.1.2. <i>Critères d'identification</i>	28
III.1.3. <i>Caractères généraux</i>	28
III.2. Propriétés et caractéristiques de l'invertase	30
III.2.1. <i>Généralités</i>	30
III.2.2. <i>Localisation de l'invertase de levure</i>	31
III.2.3. <i>Mécanisme d'action de l'invertase de levure</i>	32
III.2.4. <i>Propriétés de l'invertase</i>	34
III.3. IMMOBILISATION DE L'INVERTASE DE LEVURE.....	35
III.4. L'IMMOBILISATION DE L'INVERTASE PAR L'ALGINATE.....	37
III.4.1. <i>Généralités</i>	37
III.4.2. <i>Structure de l'alginate</i>	38
III.4.3. <i>Propriétés et caractéristiques de l'immobilisation par l'alginate</i>	39

Partie Expérimentale

MATERIEL ET METHODES.....	41
1. PREPARATION DE L'EXTRAIT D'INVERTASE DE LEVURE.....	42
2. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES.....	43
3. DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS	45
4. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	47
4.1. <i>Mesure de l'activité de l'invertase libre</i>	47
4.2. <i>Mesure de l'activité de l'invertase immobilisée</i>	49
5. HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE PAR L'INVERTASE IMMOBILISEE DANS DES BILLES D'ALGINATE.....	52
5.1. <i>Réalisation du réacteur à lit fixe</i>	52
5.2. <i>Détermination des taux de conversion des réacteurs réalisés</i>	52

RESULTATS ET DISCUSSION	55
I. ETUDE DE L'ENZYME SOLUBLE	56
I. 1. Détermination du pH optimum de l'enzyme	56
I.2. Evolution de la préparation enzymatique.....	57
I. 3. Détermination des paramètres cinétiques.....	59
I. 4. Effet de la température.....	62
II. ETUDE DE L'ENZYME IMMOBILISEE DANS DES BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM...	63
II. 1. Optimisation des paramètres d'immobilisation	63
II. 2. Effet du pH sur l'enzyme immobilisée.....	67
II. 3. Effet de la concentration de substrat.....	68
II. 4. Effet de la température	70
III. ETUDE DU REACTEUR ENZYMATIQUE A LIT FIXE.....	72
III. 1. Etude de la distribution des temps de séjours	72
III.2. Hydrolyse continue du saccharose en réacteur à lit fixe	77
III. 3. Etude des phénomènes de transfert de matière dans le réacteur à lit fixe.	88
 CONCLUSION	 103
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 107

Introduction



Depuis la nuit des temps, l'homme utilise les microorganismes, levures ou bactéries à des fins industrielles, la fermentation en est l'exemple le plus marquant. Il s'agit en fait d'une voie métabolique particulière de ces organismes, et l'emploi précisément d'enzymes pour produire de nombreuses substances.

Sous le terme biotechnologie, on désigne couramment tout un ensemble de techniques qui visent à l'exploitation des microorganismes, des cellules animales et végétales et de leurs constituants, tels que les enzymes, pour la production de biens et de services.

La biotechnologie met en œuvre les sciences biologiques (biochimie, biologie cellulaire, biologie et génétique moléculaire, enzymologie, microbiologie,...) dans un contexte industriel, agricole, environnemental ou médical. Elle implique des allers et retours entre les disciplines scientifiques fondamentales et les sciences appliquées.

Les enzymes sont des protéines macromoléculaires qui, par leur efficacité et leur spécificité, catalysent la quasi-totalité des réactions chimiques dans les organismes vivants.

Elles sont étroitement spécifiques d'une réaction chimique donnée, réalisée sur un type de substrat défini. Elles possèdent une spécificité remarquable qui leur permet de différencier des molécules aussi voisines que les stéréo-isomères, de plus on les retrouve intactes à la fin de la réaction réalisée.

Isolées, elles peuvent être utilisables soit directement dans des secteurs industriels variés (détergents, textile, cuir, médicaments, papier, alimentation), soit indirectement, comme catalyseurs dans les processus biochimiques.

Les enzymes sont à la fois peu stables et solubles en phase aqueuse ; pour les utiliser en biotechnologie, il est nécessaire de les immobiliser artificiellement, ce qui les rend souvent plus stables et permet, du fait de leur état fixé, leur utilisation et réutilisation sous forme de colonnes d'enzyme (bioréacteurs) ou de films fixés à des capteurs (biocapteurs).

Cependant, elles ont leurs propres limitations dues à leur sensibilité aux hautes températures, aux variations de pH et aux agents chimiques.

De plus, les réacteurs enzymatiques nécessitent souvent la présence de coenzymes consommées pendant la réaction et dont la régénération s'avère coûteuse. C'est pourquoi les procédés enzymatiques peuvent être compétitifs ou complémentaires de processus chimiques classiques, mais, en pratique, ce sont des réactions d'hydrolyse qui ont été industrialisées car elles ne nécessitent pas la présence de coenzymes.

Du fait de leur nature, les enzymes perdent leurs propriétés au fil du temps. En solution, même si l'enzyme considérée ne s'est pas trouvée inactivée, sa récupération après utilisation suppose un processus à nouveau long et coûteux de purification. Cela explique les limitations à l'utilisation des enzymes solubles, et justifie totalement la mise au point d'enzymes immobilisées sur un support, comme cela a été conceptualisé pour la première fois vers 1950 par le biochimiste allemand Manecke.

Il existe deux raisons principales à cette opération. L'une est, évidemment, d'ordre pratique : une enzyme fixée de façon stable à un support insoluble, pourra, si sa stabilité est suffisante, être récupérée facilement en fin d'opération (par filtration, sédimentation, etc.) et utilisée plusieurs fois de suite. L'autre est d'ordre théorique, mais elle peut avoir d'importantes retombées pratiques : la plupart des enzymes, dans une cellule, ne fonctionnent pas de la manière dont le biochimiste les étudie. *In vivo*, elles sont organisées en complexes multienzymatiques, qu'il s'agisse de systèmes ordonnés, comme les enzymes du métabolisme des lipides, ou structurés, comme les organites cellulaires ou la membrane d'une façon générale. La fixation d'enzymes sur des supports solides représente donc une approximation de ces situations physiologiques à partir desquelles les situations industrielles supposant l'action séquentielle des systèmes d'enzymes peuvent être envisagées. Il est maintenant reconnu que beaucoup d'enzymes agissent non pas à l'état libre mais fixées sur les structures membranaires des cellules.

Les enzymes insolubilisées sont, en général, plus stables que les enzymes en solution. Le mécanisme réactionnel de l'enzyme insolubilisée n'est pas modifié ; cependant, si les produits et le mécanisme catalytique restent inchangés, il n'en est pas de même des constantes cinétiques de la réaction.

Alors que l'activité des enzymes est régie par les lois de la catalyse homogène, l'immobilisation sur support entraîne les conditions de la catalyse hétérogène. Cette dernière introduit des notions de macro- et de micro- environnement.

Le microenvironnement est le milieu dans lequel agit l'enzyme, et le macroenvironnement est constitué par la masse du réacteur, où seront effectuées les mesures de pH, température, concentrations en réactifs, etc.

De ce fait, l'étude cinétique des enzymes immobilisées comprend deux aspects nouveaux par rapport à celle en milieu homogène. L'un tenant à l'enzyme elle-même avec la modification de ses propriétés intrinsèques du fait de l'immobilisation (modification de la conformation, création d'empêchements stériques entre support et site actif) ; l'autre tenant à la présence d'une phase solide, ce qui impose de considérer des phénomènes physiques particuliers tels que les phénomènes de partage des substances entre la phase aqueuse et la phase solide, les limitations diffusionnelles qui sont les difficultés de diffusion des réactants depuis la phase liquide vers l'enzyme fixée, c'est ce qui caractérise les phénomènes de transfert de matière. Ces derniers jouent un rôle très important en catalyse hétérogène que ce soient les transferts externes (de la solution vers la surface du support et *vice versa*, par diffusion et convection) ou/et les transferts internes (à l'intérieur d'un support poreux, d'un gel ou d'une membrane, par diffusion).

La résistance au transport de matière se traduit par l'établissement d'un gradient de concentrations des espèces moléculaires solubilisées dans le milieu, entre la solution externe et l'interface support – liquide. Cette résistance dépend de la masse et de la concentration des réactifs mis en jeu, de la viscosité du milieu et des caractéristiques du support (taille des particules, porosité,...).

De nombreuses méthodes d'immobilisation ont été mise au point, et différentes enzymes ont été immobilisées. La β - fructosidase également connue sous le nom d'« invertase » a été probablement la première enzyme à être employée à grande échelle sous forme immobilisée. Découverte en 1833 par Persoz, l'invertase est la première enzyme à avoir été décrite. Son principe actif a été isolé en 1860 par Berthelot qui fût à l'origine de son nom.

L'hydrolyse du saccharose peut être effectuée selon deux méthodes : l'hydrolyse chimique en milieu acide, méthode dont l'inconvénient majeur est la production de sirops fortement minéralisés et colorés ; ou l'hydrolyse sous l'action de l'invertase.

Le mélange de glucose et de fructose ainsi obtenu, nommé « sucre inversé », ne présente aucun problème de cristallisation contrairement aux solutions concentrées de saccharose. Il présente aussi une plus forte hygroscopicité ; et un pouvoir sucrant plus élevé que le saccharose. L'immobilisation de l'invertase permet d'effectuer l'hydrolyse enzymatique du saccharose selon un processus continu.

En 1916, Nelson et Griffin ont constaté le maintien de son activité après adsorption sur charbon actif. Durant la deuxième guerre mondiale, faute d'acide utilisé habituellement pour l'hydrolyse, l'invertase de levure a été employée à la place. L'autolysat de levure a été adsorbé sur du charbon. Un réacteur muni d'un lit de invertase-charbon était utilisé, l'ensemble était assez stable, les facteurs limitants étant principalement la prolifération microbienne. Le processus était rentable mais pas de façon particulière et le processus d'immobilisation a été abandonné quand l'acide est devenu à nouveau disponible.

Cependant, du fait de l'expansion rapide de la production industrielle d'isoglucose dans le monde entier, l'intérêt de l'application industrielle de l'invertase a diminué malgré la rentabilité certaine de ce procédé. L'isoglucose est un sirop de glucose, obtenu par hydrolyse poussée de l'amidon, dans lequel du glucose est transformé (par isomérisation) en fructose en utilisant les enzymes amylolytiques et la glucose isomérase. Il est également connu sous le nom de « sirop de glucose à haute teneur en fructose » (high fructose corn syrup HFCS).

Ce travail est une contribution à l'étude des phénomènes de transfert de matière régissant le fonctionnement d'une enzyme immobilisée dans un gel. L'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée dans des billes d'alginate de calcium a été choisie comme réaction modèle.

Dans la partie bibliographique du présent mémoire, nous avons donné :

- Un aperçu de la technologie enzymatique en rappelant les différentes méthodes d'immobilisation ainsi que les principaux réacteurs enzymatiques utilisés en biotechnologie ;
- Un résumé des propriétés et utilisations du saccharose et de son produit d'hydrolyse le « sucre inverti » ;
- Et enfin, une présentation succincte de l'enzyme visée par cette étude, l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, avec des généralités sur la levure de boulangerie, et les principales propriétés et caractéristiques de l'invertase dont son mécanisme d'action.

Nous avons d'abord immobilisé l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* dans des billes de gel d'alginate de calcium, puis nous avons essayé d'améliorer la rétention de l'enzyme par l'ajout de glutaraldéhyde comme agent réticulant.

Ensuite, nous avons réalisé un réacteur enzymatique à lit fixe pour l'hydrolyse continue du saccharose. Nous avons testé différentes concentrations de saccharose tout en faisant varier le débit d'alimentation ainsi que la température du système.

Les résultats obtenus ont permis de quantifier l'influence de l'immobilisation sur la cinétique enzymatique.

Chapitre I :
Technologie enzymatique



I.1. Généralités

En technologie alimentaire, les enzymes jouent un double rôle. D'une part, elles sont présentes dans les matières premières, dont elles influencent la saveur, la texture, la couleur, ainsi que les propriétés de conservation. D'autre part, les enzymes sont utilisées comme auxiliaires technologiques pour accroître la qualité des produits, améliorer leurs propriétés organoleptiques, nutritives, ainsi que leurs paramètres physico-chimiques comme la viscosité, la solubilité, ou encore l'aptitude à la conservation. Les enzymes sont aussi utilisées pour l'analyse des aliments notamment sous forme de biocapteurs (dosage de glucose, lécithine, etc.).

D'une manière générale, on distingue les procédés à enzymes libres tels que l'addition de protéases en fromagerie ou l'addition d'amylases pour la liquéfaction d'amidon des céréales, des procédés à enzymes immobilisées tels que l'isomérisation du glucose ou l'hydrolyse du saccharose ou encore l'hydrolyse du lactose du lait.

Les enzymes sont, par définition, des catalyseurs biologiques de réactions chimiques qui se produisent dans la cellule vivante. Elles interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles qu'elles accélèrent par activation spécifique. Elles permettent d'atteindre rapidement l'état d'équilibre de la réaction sans le modifier.

Ces biocatalyseurs sont des acteurs discrets mais omniprésents de la vie cellulaire. Sans ces protéines douées d'un pouvoir catalytique, aucune des réactions indispensables au métabolisme des cellules ne serait possible. (Augère, 2001)

Ce sont des outils de la biotechnologie et de la bio-industrie. La connaissance des enzymes, de leur nature et propriétés, ainsi que de la cinétique des réactions qu'elles catalysent est donc fondamentale. La grande spécificité d'action des enzymes et les conditions très douces, dans lesquelles elles opèrent leur confèrent un avantage certain sur les catalyseurs chimiques ordinaires. Aussi, l'usage de préparations enzymatiques s'est-il considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bio-industrie. Mais l'addition des enzymes en faibles quantités dans les milieux réactionnels, et leur grande instabilité en solution, ne permettent généralement pas leur récupération dans des conditions économiques acceptables. De ce fait, dans les procédés industriels, le biocatalyseur est, la plupart du temps, détruit en fin de cycle et renouvelé au début du suivant. (Berset, 1993)

Les enzymes sont des protéines peu stables et solubles en phase aqueuse. Pour les utiliser en biotechnologie, il est nécessaire de les immobiliser artificiellement, ce qui les rend souvent plus stables et permet, du fait de leur état fixé, leur utilisation et leur réutilisation sous forme de colonne d'enzymes (bioréacteur), ou de films fixés à des capteurs (biocapteurs). (Burnstein, 2000)

De ce fait, le recours à l'immobilisation des enzymes sur support insoluble est une alternative intéressante vu qu'elle s'accompagne souvent d'une augmentation de la stabilité de l'enzyme. Il est maintenant admis que la plupart des enzymes agissent *in vivo* à l'état fixé, notamment au niveau des structures membranaires de la cellule.

L'immobilisation des enzymes offre de nombreuses possibilités et beaucoup d'avantages. Dans le domaine pratique, elle offre la possibilité d'une mise en œuvre en continu, ou de l'utilisation répétée du biocatalyseur.

L'idée n'est pas nouvelle, dès 1916 Nelson et Griffin montrent que l'invertase adsorbée sur charbon actif conserve son activité. Il faut cependant attendre 1950 pour que les premières applications fassent leur apparition. (Coutouly, 1991)

C'est vers 1969, au Japon, que Chibata réalise la première application industrielle, en mettant au point le premier réacteur industriel à enzyme fixée pour la séparation de L- acide aminé à partir d'un mélange racémique correspondant. Ce procédé permet une diminution du prix de revient d'au moins 40% par rapport au procédé conventionnel.

Par définition, l'immobilisation d'une enzyme consiste en sa rétention dans une phase insoluble. L'enzyme sera donc retenue par des moyens mécaniques dans une région de l'espace avec rétention de son activité catalytique pour une utilisation en continu et/ou de façon répétée.

L'activité des enzymes est liée au maintien de l'intégrité de leur conformation tertiaire, en particulier au niveau de leur site actif. Les méthodes d'immobilisation doivent, dès lors, faire appel à des méthodes douces et bien contrôlées, respectant la structure native de la protéine enzymatique. De ce fait, les liaisons créées entre support et enzyme doivent exclure les acides aminés impliqués directement dans la réaction catalytique.

I.2. Les méthodes d'immobilisation

L'intérêt suscité par les enzymes immobilisées a augmenté parallèlement au développement de méthodes variées. La figure n°1 donne une classification des enzymes immobilisées selon le mode de fixation au support.

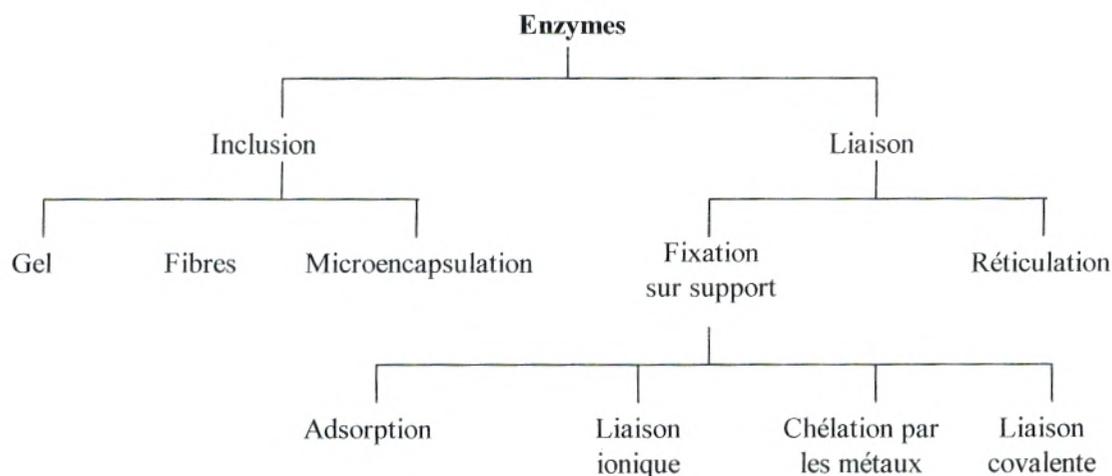


Figure n°1 : Les différentes méthodes d'immobilisation d'enzymes (Berset, 1993)

Nous donnerons dans ce qui suit, un aperçu des principales méthodes d'immobilisation actuellement utilisées.

I.2.1. Immobilisation par inclusion

Dans ce procédé, l'enzyme elle-même n'est pas liée au support, elle conserve donc son intégrité moléculaire.

Les molécules d'enzyme sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau, comme par exemple les gels de polyacrylamide, de polyvinyles, d'alginate, de carraghénanes, etc. il peut s'agir d'une inclusion dans une matrice de gel ou de fibre, ou alors les molécules d'enzyme peuvent être emprisonnées à l'intérieur de microcapsules délimitées par une membrane semi-perméable, dont les pores sont suffisamment petits pour empêcher la fuite d'enzymes ; mais suffisamment larges pour permettre le passage du substrat et des produits de la réaction.

Le cas particulier de l'immobilisation en gel d'alginate sera traité plus en détail ultérieurement.

1.2.2. Immobilisation par adsorption et liaisons ioniques

Cette méthode consiste à assurer la rétention de l'enzyme à la surface d'un support insoluble par l'établissement d'interactions de type secondaire entre les groupes fonctionnels des molécules enzymatiques et ceux du support.

L'immobilisation par adsorption met en jeu un grand nombre de forces d'interactions de faible énergie, entre le support et la protéine : interactions de Van Der Waals, liaisons hydrogènes ou liaisons hydrophobes. (Berset, 1993)

Si le support est porteur de charges électriques, les liaisons ioniques et les forces physiques d'adsorption qui s'établissent confèrent au complexe formé une stabilité plus grande.

Cette immobilisation est simple à réaliser puisqu'il suffit de mettre en contact l'enzyme et le support. Le support utilisé peut être : organique (charbon actif, cellulose, collagène) ; inorganique (silice, verre, oxyde métallique) ; échangeur d'ion (amberlite, sephadex) ; ou encore un polymère synthétique (polyamide, polyacrylamide, polystyrène).

Cette méthode n'est possible que s'il existe un domaine de pH non dénaturant où la molécule d'enzyme est convenablement ionisée. Le principal inconvénient est la fragilité de la fixation, ce qui peut être un avantage si l'on souhaite renouveler l'enzyme fixée.

1.2.3. Immobilisation par liaisons covalentes

Cette méthode est basée sur la formation de liaisons covalentes irréversibles, entre les molécules enzymatiques et les groupes réactifs du support, ces liaisons devant être aussi peu dénaturantes que possible pour la molécule biologique. Il est nécessaire alors de procéder à une activation préalable des groupes susceptibles d'entrer en réaction.

Les méthodes d'activation et de fixation sont nombreuses et fort variées ; dépendantes de la nature des groupements fonctionnels du support et de ceux situés à la surface de l'enzyme. Parmi les réactifs utilisés, l'on peut citer le glutaraldéhyde, l'azoture, le carbodiimide, le bromure de cyanogène, etc.

L'inconvénient de cette méthode, outre sa difficulté de mise en œuvre, est son caractère dénaturant par suite de la distorsion possible de la structure spatiale de la molécule enzymatique.

Un avantage, outre la solidité de la fixation, est la meilleure résistance de l'enzyme à la dénaturation thermique par suite de la rigidité de la conformation spatiale de la molécule. (Loncle, 1991)

1.2.4. Immobilisation par réticulation

Il est possible d'immobiliser les molécules d'enzymes sans utiliser de support solide préexistant. Cette méthode est basée sur la formation de liaisons covalentes entre les molécules d'enzymes, au moyen de réactifs bi ou multifonctionnels. Un réseau se forme, aboutissant à des agrégats tridimensionnels complètement insolubles sans avoir recours à un support. Le pontage covalent est réalisé, presque toujours, par le glutaraldéhyde ($\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$) : il s'agit d'un réactif bifonctionnel. Les liaisons covalentes se forment spontanément, à basse température et sont très stables. De plus, la polymérisation du glutaraldéhyde espace suffisamment les molécules protéiques pour que l'enzyme reste fonctionnelle. La figure n°2 donne la réaction de réticulation induite par le glutaraldéhyde.

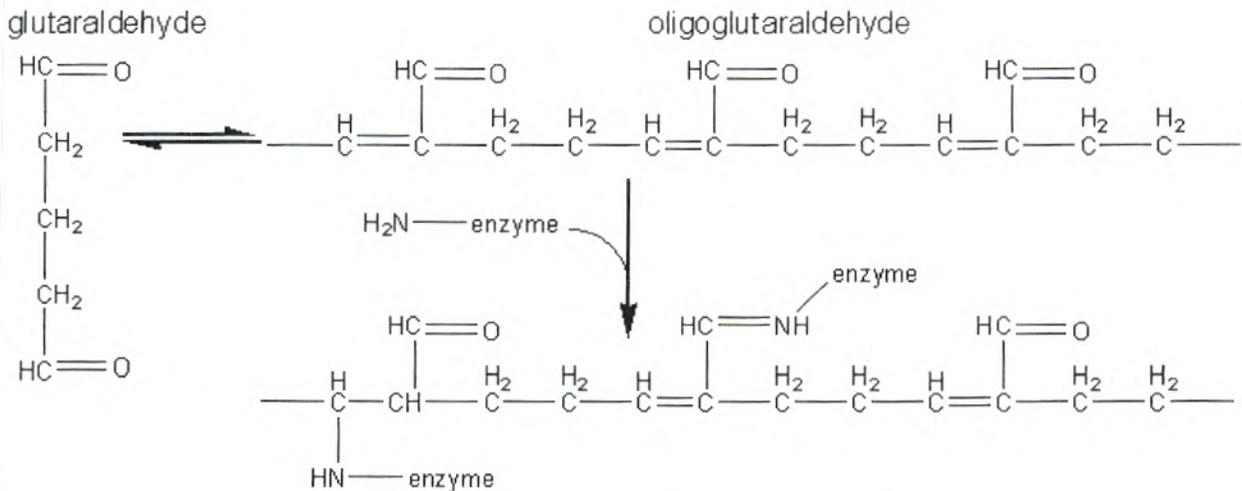


Figure n°2 : Réticulation par le glutaraldéhyde

En dépit des avantages incontestés, l'utilisation de quantités faibles d'enzymes et la résistance accrue aux températures dénaturantes : on relève d'importantes baisses d'activités enzymatiques, dues à l'établissement d'interactions entre macromolécules enzymatiques, du fait de leur proximité spatiale. Cet inconvénient peut être évité en diluant l'enzyme dans des molécules protéiques non actives comme par exemple l'albumine, ou le fibrinogène, qui évitent le contact trop étroit entre les molécules de biocatalyseur.

La méthode, très simple à mettre en œuvre, peut être utilisée en tant que telle ; par exemple pour former une membrane enzymatique ou utilisée en complément d'une autre technique d'immobilisation.

Monsan (1982) rappelle que la réticulation des molécules d'enzymes peut également être effectuée après inclusion ou après adsorption, afin de stabiliser l'enzyme immobilisée et de limiter les phénomènes de fuite ou de désorption.

I.3. Les réacteurs enzymatiques

A l'échelle de l'installation pilote ou de l'unité industrielle, plusieurs types de réacteurs enzymatiques sont mis au point. Il existe différents paramètres pouvant être pris en compte afin d'établir une classification des réacteurs enzymatiques : solubilité ou insolubilité des enzymes, mode d'alimentation, support, etc. Nous ne donnerons, dans le présent travail, qu'un aperçu des réacteurs classés suivant la technologie utilisée pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules.

I.3.1. Réacteur agité

L'enzyme est soluble ou fixée sur un support particulaire maintenu en suspension par agitation mécanique dans un milieu réactionnel homogénéisé.

Pouvant fonctionner en continu ou en discontinu, c'est le type de réacteur le plus simple à mettre en œuvre et à contrôler du point de vue des conditions opératoires (en particulier le pH et la température) durant le temps nécessaire pour que la réaction s'achève.

La cuve d'un réacteur étant en général cylindrique, afin d'éviter les volumes morts le rapport diamètre / hauteur est égale à 3 pour le réacteur continu parfaitement agité (RCPA).

I.3.1.1. Réacteur agité fermé « batch » (batch stirred tank reactor BSTR)

Malgré ses nombreux inconvénients, le réacteur fermé à enzymes solubles est encore utilisé dans la plupart des procédés industriels. Les problèmes généraux inhérents aux réacteurs discontinus sont pourtant bien connus : variation des résultats d'une réaction à l'autre, coûts élevés en main d'œuvre et en investissements (grands volumes d'appareils), nombreuses procédures de mise en route et d'arrêt. (Jean Jean Jean Jean Paolucci, 2000)

Pour la réutilisation de l'enzyme soluble, sa récupération est effectuée par centrifugation ou filtration, sans quoi son inactivation est nécessaire ce qui est un inconvénient majeur du fait du coût élevé du catalyseur. L'immobilisation de l'enzyme est une bonne solution à ce problème puisqu'elle facilite sa séparation du milieu réactionnel.

I.3.1.2. Réacteur agité continu (continuous stirred tank reactor CSTR)

Le milieu réactionnel est réalimenté en permanence par un débit constant. L'enzyme reste présente dans le réacteur grâce à un support ou à une membrane (système de microfiltration).

I.3.2. Réacteur à lit fixe

C'est actuellement le type de réacteur le plus répandu et, en général, le plus performant.

L'enzyme est fixée sur un support particulaire formant une phase stationnaire qui constitue le lit du réacteur. Cette phase est disposée dans une colonne percolée en continu par la solution à traiter. Le rapport diamètre / hauteur de cette colonne est supérieur à 3.

L'alimentation en substrat peut se faire de manière ascendante ou descendante, avec éventuellement un recyclage de la sortie vers l'entrée.

Le comportement hydrodynamique de ce type de réacteur présente l'avantage de se rapprocher d'un réacteur de type piston (plug flow reactor PFR), réacteur idéal, en minimisant le mélange axial dans la colonne.

L'absence de rétro-mélange dans le lit fixe conduit, à un volume de réacteur égal, à des performances supérieures à celles d'un réacteur continu bien mélangé. (Berset, 1993)

Ses avantages tiennent surtout à sa taille réduite, cependant il est important de disposer d'une enzyme fixée de manière stable sur un support peu compressible et ne peut être envisagé si le substrat est trop visqueux. De plus, il peut s'établir un chemin préférentiel du fluide à travers la colonne en raison du phénomène de compactage des particules, avec possibilité de fuites d'enzymes. En outre, il permet de traiter des volumes importants avec un réacteur de petites dimensions.

En raison de son application à l'échelle industrielle, le réacteur à lit fixe de particule sphérique, granulaire, ou autre, a été étudié pour mieux connaître ses propriétés.

La modélisation de ces réacteurs a été traitée dans différentes études telles que celles de Sabiri et Comiti (1997), Tiu *et al* (1997), Drazer *et al* (1999).

1.3.3. Réacteurs à lit fluidisé

Ce type de réacteur, peu utilisé, est surtout intéressant quand la solution de substrat est visqueuse, ou contient des particules en suspension, ou encore lorsque le produit est gazeux. (Loncle, 1991)

Le substrat à traiter circule du bas vers le haut ; la vitesse d'écoulement est ajustée pour maintenir une fluidisation des particules du garnissage, afin de maintenir ces particules en suspension sans les entraîner. Les vitesses d'écoulement sont supérieures à celles utilisées en lit fixe.

Le principal avantage du réacteur à lit fluidisé, par rapport au réacteur à lit fixe, est qu'il minimise les phénomènes de colmatage de colonne et d'emprisonnement des gaz produits. Il peut assurer de meilleurs transferts de chaleur et de matière à l'intérieur du garnissage. Evidemment, sa conduite est plus délicate que celle d'un lit fixe, et les phénomènes d'attrition des particules y sont plus prononcés, avec en plus une consommation accrue d'énergie.

C'est dans le secteur des traitements des effluents que les lits fluidisés semblent présenter le plus d'intérêt. (Hancz *et al*, 1999 ; Cervelli et Perret, 1998 ; DiFelice *et al*, 1997)

1.3.4. Réacteurs à membrane

L'intérêt des membranes d'ultrafiltration et de microfiltration, est de pouvoir retenir les enzymes et les cellules à l'intérieur d'un réacteur sans les attachées à un support solide. Cette approche permet dans certains cas de minimiser les problèmes de limitations diffusionnelles rencontrés avec les techniques classiques d'immobilisation. (Berset, 1993)

Braun (1989) précise que dans la pratique deux conceptions de ce type de réacteur peuvent être distinguées :

- ❖ Le réacteur de type convectif ou ultrafiltrant, utilise la membrane essentiellement comme filtre ;
- ❖ Le réacteur de type diffusionnel, utilise la membrane à la fois comme filtre et comme support de réaction comme c'est le cas par exemple des membranes capillaires sous forme de fibres creuses.

Les enzymes sont, généralement, présentes sous deux formes : soluble ou immobilisée (à la surface, dans les pores, voir dans le support de la membrane). L'utilisation des enzymes immobilisées entraîne de nombreuses limitations (perte d'activité enzymatique, limitations diffusionnelles, coût de l'immobilisation), les réacteurs à enzymes libres sont généralement préférés. (Jean Jean Paolucci, 2000)

Chapitre II :
Biotechnologie du Saccharose



II.1. Généralités

Le saccharose est un sucre extrêmement répandu dans le règne végétal. Produit intermédiaire de la photosynthèse, il est le vecteur glucidique de nombreuses plantes, il est mis en réserve dans des tiges (canne à sucre) ou dans des racines (betteraves).

C'est un aliment glucidique très important. C'est d'ailleurs, le seul aliment pur et cristallisé que l'homme consomme ; il est rapidement utilisé par l'organisme.

Connu généralement sous le terme de sucre de table, il occupe une position centrale dans l'alimentation humaine. Le saccharose est un glucide de base qui s'est affirmé comme étant la première réponse au besoin du sucré, dont la saveur est la seule pour laquelle le nouveau-né manifeste de l'attrance. Il contribue, en général, à une meilleure acceptabilité des aliments.

II.2. Structure et propriétés physico-chimiques

De formule chimique $C_{12}H_{22}O_{11}$ et avec un poids moléculaire de $342,30 \text{ g.mol}^{-1}$, le saccharose est un disaccharide composé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose. Il est classiquement représenté par la formule développée suivante (Figure n°3).

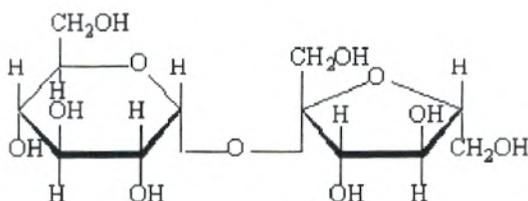


Figure n°3 : Structure chimique du saccharose

Sa nomenclature suivant l'I.U.P.A.C. est β -D- fructofuranosyl - α -D- glucopyranoside. (Anonyme, 1990)

Avec le tréhalose (formé de deux molécules de glucose), c'est le seul diholoside non réducteur trouvé à l'état naturel, les fonctions réductrices du fructose et du glucose sont bloquées dans la liaison osidique α (1 \rightarrow 2).

Le sucre de table est du saccharose cristallisé presque pur, c'est une matière cristalline, blanche et brillante, non hygroscopique., sa stabilité au stockage est très grande. Chauffé lentement à sec, le saccharose fond vers 160°C puis se transforme en caramel avant de « brûler » vers 190°C , il se décompose en produits bruns non sucrés.

Il est très soluble dans l'eau : à 0°C on peut dissoudre 180 g de sucre dans 100g d'eau (soit une solubilité 10 fois plus grande que celle du lactose).

Il est dextrogyre ; son pouvoir rotatoire est de + 66,5°.

II.3. Propriétés technologiques du saccharose

La fabrication du sucre de table à partir de canne à sucre ou de betterave sucrière ne fait appel qu'à des procédés d'extraction et de purification très simples, sans aucune utilisation d'additifs, ni de produits de synthèse.

Il faut relever que, c'est l'industrie du « sucre » qui produit dans le monde les plus forts tonnages de produits les plus purs, et que l'obtention de cette pureté du saccharose dépasse couramment les 99,9 %, ne fait pas appel à des processus chimiques très complexes. (Linden et Lorient, 1994)

Le saccharose est la référence absolue en matière de saveur sucrée. Son intensité, également appelée pouvoir sucrant (p.s.) est de 1 à 22°C. (voir tableau n°1)

Le pouvoir sucrant (p.s.) d'un sucre correspond au rapport entre la concentration du saccharose et celle du sucre donnant la même intensité sucrée. Cette notion résulte de tests en analyse sensorielle.

Tableau n°1 : Pouvoir Sucrant de quelques sucres donné relativement à une solution de saccharose dès l'apparition de la saveur sucrée (adapté de Godon, 1991)

Sucre	Pouvoir sucrant relatif (p.s.)	Seuil de concentration (% m/v)
Fructose	1,7	0,17
Saccharose	1,0	0,46
Glucose	0,61	0,75
Sorbitol	0,63	0,73
Maltose	0,43	1,07
Maltitol	0,68	0,68

D'après le tableau n°1, on remarque que le fructose possède un pouvoir sucrant égal à 1,7 plus élevé que celui du saccharose qui est de 1.

Le saccharose présente des qualités technologiques appréciables. Il est stable, stockable, peu cher, de qualité constante, son utilisation directe est fort variée, se situant exclusivement dans les domaines agroalimentaires.

C'est un ingrédient favorisant la texture et la structure de nombreux aliments. Il peut rehausser, masquer ou apporter certains arômes tout en donnant la saveur sucrée.

Le saccharose bénéficie des propriétés de texturation, de lubrification et de corps (facteur de viscosité), de modification et d'homogénéisation des arômes (et cela à des doses très faibles permettant de « gommer » des goûts acides, amers, ...), d'agent dispersant, de caramélisation. (Linden et Lorient, 1994)

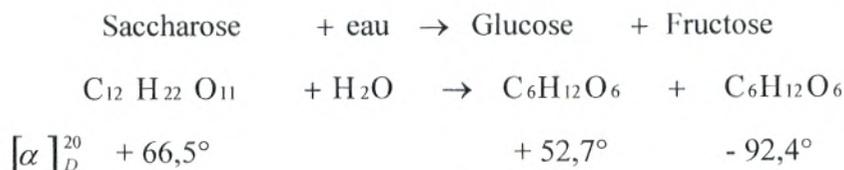
A l'inverse, il peut engendrer des effets indésirables lors de certains procédés tels que la cristallisation des sirops ou même la fermentation ; inconvénients qui peuvent être palliés par l'utilisation de dérivés de saccharose (sucre inverti) ou de dérivés d'amidon (sirop de glucose).

II.4. Produit d'hydrolyse : Le sucre inverti

II.4.1. Composition et mode d'obtention

L'hydrolyse du saccharose donne naissance à un produit constitué équimoléculairement de glucose et de fructose.

La libération du fructose (ou lévulose) à fort pouvoir rotatoire lévogyre provoque l'« inversion » de l'activité optique du mélange obtenu, d'où le nom de « sucre inverti » ou « interverti ».



Le saccharose peut être hydrolysé selon deux modes, soit en milieu acide, soit par des enzymes. Deux osidases peuvent intervenir, les α - glucosidases et les β - fructosidases (dont l'invertase). (Figure n°4)

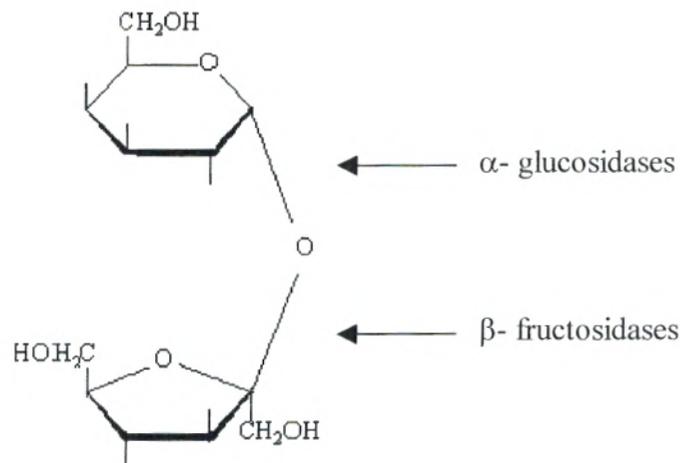


Figure n°4 : Hydrolyse enzymatique du saccharose (Durliat, 1997)

Sur le plan industriel, le sucre inverti est produit soit par catalyse enzymatique, soit par catalyse acide. La catalyse enzymatique est particulièrement adaptée à la production de sucre inverti à très haut degré d'hydrolyse. (Linden et Lorient, 1994)

D'un point de vue économique, l'hydrolyse enzymatique à l'échelle industrielle doit être réalisée avec des solutions très concentrées en saccharose pour éviter toute étape de dilution ou de concentration. (Monsan et Combes, 1984)

En ce qui concerne l'hydrolyse acide, le sucre inverti est obtenu par action de la chaleur sur une solution aqueuse de saccharose en présence d'un catalyseur (ordinairement un acide organique, tartrique ou citrique). Elle est multipliée par 5000 entre 20 et 90°C.

Cependant, cette hydrolyse conduit à des sirops fortement minéralisés (après neutralisation de l'acide), et très colorés (coloration due aux conditions drastiques du procédé). En plus du coût élevé du raffinage, le degré d'hydrolyse est bas et il est nécessaire d'utiliser des solutions très pures comme matière première.

Monsan *et al* (1984) précisent que les sirops produits par le procédé enzymatique montrent différents avantages, ils ne cristallisent pas, même à l'intérieur d'un mélange, et sont exempts des sous produits colorés générés par l'hydrolyse acide du saccharose.

II.4.2. Utilisations et principales propriétés

Grâce à la présence du fructose, le sucre inverti est un inhibiteur efficace de la cristallisation du saccharose. C'est également un réteneur d'eau. Il abaisse la viscosité des masses puisqu'il est, en solution, trois fois moins visqueux que le saccharose.

De plus, il a un pouvoir sucrant supérieur à celui du saccharose, soit 1,1. Il remplace avantageusement le sucre ; il faut 100 g de sucre inverti pour obtenir la même saveur sucrée qu'avec 120 g de sucre.

Le sucre inverti est employé dans la fabrication des confiseries dans lesquelles on désire conserver une certaine quantité d'eau (fondants, pâte de fruits, ...) ; ainsi qu'en pâtisserie industrielle (pains d'épices, madeleines, brioches, fourrage, ...).

Ses principaux avantages sont qu'il absorbe l'humidité, résiste à la dessiccation et qu'il reste mou et lisse. Ces propriétés permettent :

- D'obtenir des produits plus moelleux ;
- De réduire le temps de cuisson ;
- D'éviter le grainage ;
- D'éviter le dessèchement au congélateur ;
- De stabiliser les glaces et sorbets.

Chapitre III :
L'invertase de
Saccharomyces cerevisiae



III.1. Généralités sur *Saccharomyces cerevisiae*

Les levures, et en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, sont probablement les organismes vivants les mieux étudiés en biologie cellulaire.

Utilisée par l'Homme depuis fort longtemps, *Saccharomyces cerevisiae* fût communément appelé levure de bière ou levure de boulanger. Elle est prépondérante dans différents domaines qu'ils soient artisanaux ou industriels, tels que la boulangerie, la fromagerie...

La simplicité de son organisation unicellulaire, ainsi que sa croissance rapide font de cette levure un modèle expérimental des plus commodes.

III.1.1. Position taxonomique

Saccharomyces cerevisiae est répertoriée comme suit :

Classe :	Ascomycètes,
Sous-classe :	Hémiascomycètes,
Ordre :	Endomycétales,
Famille :	Saccharomycetaceae,
Sous-famille :	Saccharomycetoidaceae,
Genre :	<i>Saccharomyces</i>
Espèce :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .

En industrie, les souches les plus utilisées appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* qui regroupe les espèces *S. bayanus*, *S. carlsbergensis*, *S. oviformis*, et *S. uvarum*.

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* ont été sélectionnées pendant de nombreuses années pour leurs caractéristiques dans la levée de la pâte. La levure du boulanger produit le CO₂ dont résulte la levée de la pâte et contribue à la saveur et à la structure de la mie de pain. (Randez-Gil *et al*, 1999)

III.1.2. Critères d'identification

D'après Larpent (1990), cet organisme unicellulaire immobile dispose des principaux critères du genre *Saccharomyces*, à savoir :

- Un bourgeonnement multilatéral,
- Un pseudomycelium possible non conjugué : les cellules filles restent associées aux autres d'où l'apparition de chaînettes,
- Des ascospores sphériques ou ovales, lisses, non libérées,
- Pas de formation de pellicule en milieu liquide,
- Une fermentation rapide,
- Nitrate (-).

III.1.3. Caractères généraux

Saccharomyces cerevisiae est une cellule eucaryote de forme sphérique ; elle présente une ultrastructure plus complexe que celles des bactéries notamment par la présence, en plus de la membrane plasmique, d'une paroi riche en mannanes et glucanes.

En plus des organites usuels, elle possède un plasmide à ADN double brin cyclique très utilisé en tant que vecteur au cours de manipulations génétiques (mutagenèse).

Cette levure est anaérobie facultative, capable de métaboliser le glucose en anaérobiose et en aérobiose.

Lors d'une anaérobiose, le métabolisme énergétique est de type fermentaire ; il tend ensuite vers une fermentation alcoolique.

En présence d'oxygène, la grande majorité du glucose est fermentée (souvent à plus de 90 %). L'intensité respiratoire est faible, le glucose étant incomplètement oxydé lorsqu'il y a production d'éthanol ; le rendement énergétique est faible, la croissance est souvent moins rapide, beaucoup de glucose est utilisé. (Larpent, 1990)

Saccharomyces cerevisiae, grâce à un pool enzymatique adapté, est capable de cataboliser différents composés carbonés. Le tableau n°2 en donne les principaux.

Tableau n°2 : Principaux composés carbonés utilisables par *Saccharomyces cerevisiae*
(Leveau et Bouix, 1993)

D glucose	Tréhalose
D galactose	Raffinose
Mannose	Maltotriose
Fructose	Déoxyribose
Saccharose	D mannitol
Maltose	Ethanol
Melibiose	D glucitol
Melezitose	Acide lactique

Parmi ces enzymes, différentes glucosidases ont été identifiées, certaines pouvant hydrolyser plus d'un sucre. Elles ont diverses localisations au niveau de la cellule de levure : cytosolique, périplasmique ou extracellulaire.

A partir du tableau n°3, l'on remarque que *Saccharomyces cerevisiae* est capable de métaboliser le saccharose non seulement par l'invertase, enzyme considérée dans cette étude, mais aussi par d'autres enzymes telles que la maltase ou l'isomaltase. La synthèse de l'une ou l'autre de ces enzymes étant modulée par les conditions de culture c'est à dire par l'environnement (substrat, température, pH,...).

Tableau n°3 : Propriétés des principales glucosidases identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae* (adapté de Larpent, 1990)

Enzyme	Substrat	Localisation
Tréhalase	Tréhalose	Cytoplasmique, périplasmique
Glucoamylase ou amyloglucosidase	Amidon, dextrines α glucosides	Extracellulaire
Maltase ou α glucosidase	Maltose, saccharose, maltotriose, p-nitrophényl - α - glucoside, mélezitose	Cytosolique
Isomaltase ou oligo-1, 6- glucosidase	Isomaltose, saccharose, α méthyl glucoside, p-nitrophényl - α - glucoside	Cytosolique
Invertase ou β fructofuranosidase	Saccharose, raffinose	Périplasmique
Melibiose ou α galactosidase	Melibiose, raffinose, p-nitrophényl - α - glucoside	Périplasmique

III.2. Propriétés et caractéristiques de l'invertase

III.2.1. Généralités

L'invertase est une glycoprotéine enzymatique appartenant à la famille des hydrolases, plus précisément à celle des glucohydrolases.

L'invertase (ou β -D-fructofuranoside fructohydrolase E.C. 3.2.1.26) catalyse l'hydrolyse de sucres possédant un résidu β -D-fructofuranosyl non substitué, elle est la plus active avec le saccharose comme substrat. (Milling, 1993)

Appelée aussi β -fructofuranosidase, elle est responsable de l'hydrolyse des liaisons glycosidiques formées par les résidus β -fructofuranosides non réducteurs terminaux chez les β -fructofuranosides.

En industrie alimentaire, l'invertase est surtout utilisée pour la production de sucre inverti à partir du saccharose. Elle est généralement extraite de *Saccharomyces cerevisiae* ou *S. carlsbergensis*.

Cette enzyme catalyse la réaction suivante :

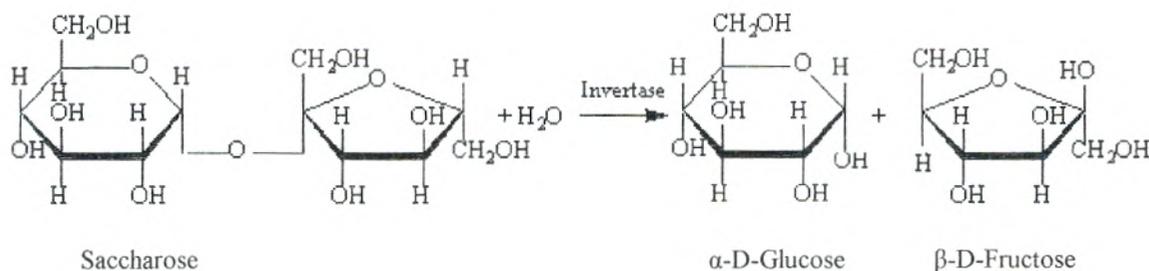


Figure n°5 : Hydrolyse du saccharose par l'invertase

L'enzyme se trouve sous forme endo ou exocellulaire, on peut l'utiliser sous forme de cellules séchées, de concentré liquide ou sous forme immobilisée. (Sicard, 1982)

L'invertase est également élaborée par d'autres organismes vivants dont ; d'autres levures par exemple celles de types méthylotrophiques (Acosta *et al*, 2000) ; des plantes telles que le riz (Hsaio *et al*, 2002 ; Lin *et al*, 1999 ; Lin *et al*, 1993) ; la pomme de terre (Isla *et al*, 1999) ; la carotte (Lee *et al*, 1996), le maïs (Goetz et Roitsh, 2000), la canne à sucre (Thavarungkul *et al*, 1999 ; Vorster *et al*, 1998), etc.

III.2.2. Localisation de l'invertase de levure

L'invertase est présente sous deux formes dans la cellule de levure ; une forme majeure glycosylée externe localisée dans l'espace périplasmique, et une forme mineure interne non glycosylée. (Reddy et Maley, 1990)

Les deux formes proviennent de la transcription d'un même gène structural, le gène SUC 2.

Selon De Alteris *et al* (1999), ce gène code pour les deux formes d'invertase à partir de deux ARN messagers différents ; un ARN_m de 1,9 kb dont l'expression est régulée par la répression métabolique du glucose, et qui code pour l'invertase externe ; et un second ARN_m de 1,8 kb qui code pour la forme intracellulaire constitutive, c'est l'invertase interne.

Naumoff (2001) rapporte que la préprotéine conduisant à l'invertase compte 532 acides aminés.

L'invertase interne a un poids moléculaire de 135 000 daltons, alors que l'invertase externe a un poids moléculaire de 270 000 daltons. (Wang, 1996)

La forme externe est transportée dans l'espace périplasmique du fait de la présence de deux acides aminés additionnels formant un peptide signal. Ce dernier est manquant dans la forme interne d'où la rétention de celle-ci dans le cytoplasme.

Pendant la sécrétion et le transport vers l'espace périplasmique *via* le réticulum endoplasmique, l'enzyme acquiert en moyenne 10 oligosaccharides de mannoses, qui représentent 50 % (p/p) de sa masse moléculaire. (Reddy et Maley, 1990)

Selon Kern *et al* (1992) et Kern *et al* (1993), la glycosylation a été trouvée stabilisant la protéine contre la dénaturation thermique et chimique, l'effet stabilisateur ne diffère pas pour les formes externes et glycosylées. À la différence de l'enzyme interne, les formes glycosylées sont protégées contre l'agrégation. L'invertase interne est un dimère (115 kDa) tandis que l'enzyme glycosylée est un mélange de dimère, de tétramère, et de octamère. Ceci implique que la glycosylation du noyau est nécessaire pour l'oligomérisation des tétramères et des octamères. Reddy et Maley (1999) confirment la glycosylation de différents composants de l'enzyme.

Selon Reddy et Maley (1996), ces oligosaccharides semblent aider l'autoassociation en homodimères fonctionnellement actifs à l'intérieur de tétramères, hexamères et octamères, qui ont tous la même activité spécifique. Il est à noter que l'enzyme retenue dans l'espace périplasmique est sous forme d'homooctamère.

III.2.3. Mécanisme d'action de l'invertase de levure

Le mécanisme catalytique des glycosyl hydrolases implique dans la plupart des cas deux résidus acides ; l'un agissant comme nucléophile et l'autre comme donneur de proton.

Reddy et Maley (1996) ont proposé le mécanisme catalytique schématisé dans la figure 6 : le glutamate Glu 204 sert de donneur de proton à l'oxygène de la liaison glycosidique du saccharose, alors que le nucléophile aspartate Asp 23 attaque le carbone C2 du résidu fructose ; ceci a pour résultat la formation d'un complexe covalent fructosyl-enzyme associé au dégagement du glucose. Ensuite, Glu 204 agit comme une base en soustrayant un proton d'une molécule d'eau, ce qui permet au groupe hydroxyl restant de déplacer le fructose et de reconstituer les résidus actifs originaux.

La figure n°6 illustre le mécanisme décrit en montrant la libération d'abord du glucose, ensuite du fructose grâce à l'intervention d'une molécule d'eau.

En résumé, Reddy et Maley (1996) expliquent que ces hydrolases, qui maintiennent une configuration anomérique suivent un mécanisme de double déplacement impliquant la formation transitoire d'un complexe intermédiaire enzyme-produit E-P, et l'intervention d'une molécule d'eau pour le dégagement final du produit.

Ce mécanisme catalytique s'effectue donc en deux étapes successives et obligatoires.

Kaplan *et al* (1997) indiquent également que le mécanisme d'action de l'invertase implique la protonation de l'oxygène glycosidique du saccharose et une attaque nucléophile du carbone anomérique du résidu fructosyl ; ce qui appuie le mécanisme proposé par Reddy et Maley (1996).

Naumoff (1999) précise que, pour *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré que le résidu glutamate sert de donneur de proton dans l'hydrolyse de la liaison glycosidique.

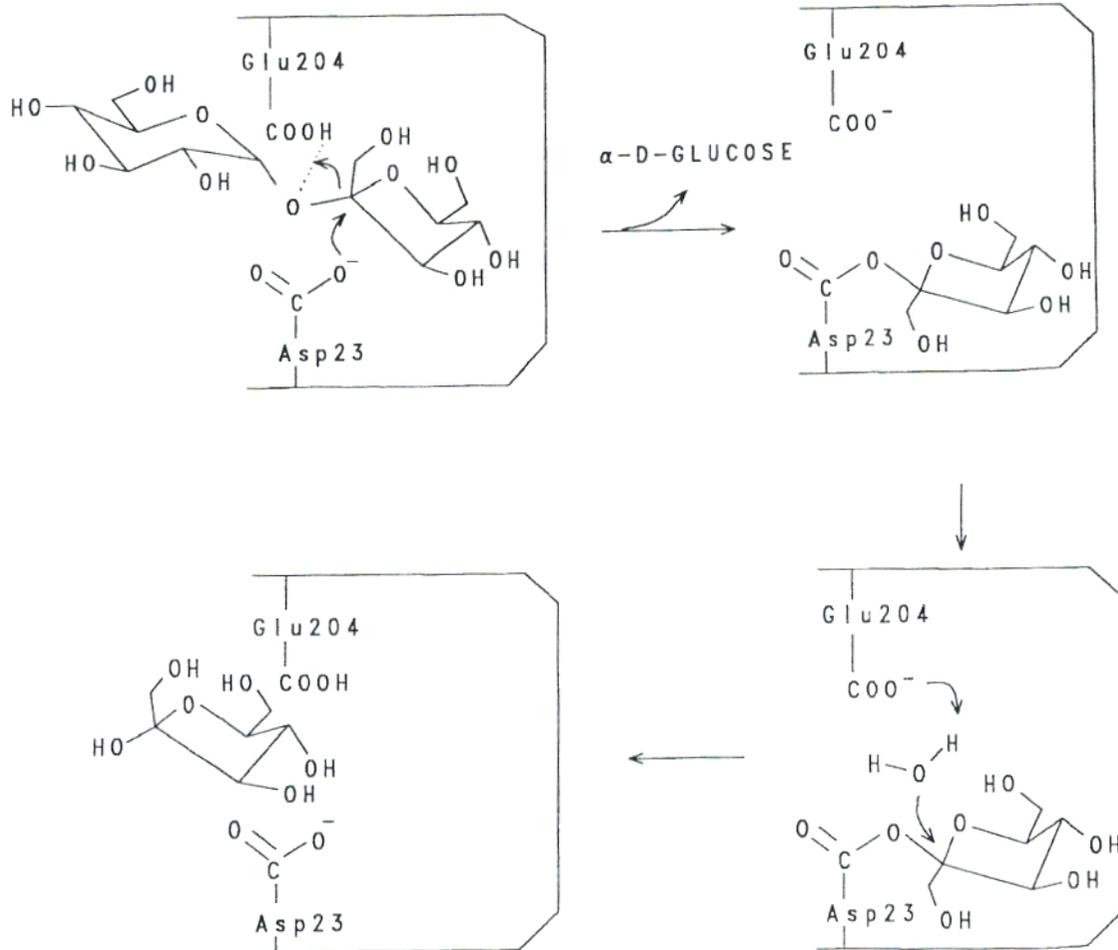


Figure 6 : Mécanisme catalytique de l'invertase de levure. (Reddy et Maley, 1996)

III.2.4. Propriétés de l'invertase

L'activité de l'invertase est influencée par les paramètres suivants :

a- La température

La température optimum d'une enzyme résulte d'un compromis entre l'augmentation d'activité accompagnant l'élévation de la température et la dénaturation ou l'inactivation de la protéine enzymatique par la chaleur.

Selon les travaux de Boudrant (1973) et Cojocar (1996), l'activité enzymatique de l'invertase de levure atteint un maximum à 60°C.

b- Le pH

Wang (1996) précise que le pH optimum de l'invertase se situe aux alentours de 4,5, même si cette enzyme reste relativement active dans une gamme de pH assez large allant d'un pH de 3,5 à un pH de 5,5.

c- Le substrat

L'invertase hydrolyse le saccharose et, à un moindre degré, le raffinose et l'inuline.

Suivant Farine *et al* (2001), l'invertase de levure a été trouvée catalysant les réactions de transfructosylation en milieu aqueux et anhydre avec le saccharose comme substrat conduisant à la formation de composés intermédiaires fructanes.

d- Les inhibiteurs

D'une manière générale, les métaux lourds sont de puissants inhibiteurs des enzymes.

Une concentration de 4 μ M d'AgI/kg de solution peut inhiber 50 % de l'activité de l'invertase de levure. (Huttl *et al*, 1999)

Par ailleurs, Filho (1999) indique que les produits et le substrat agissent comme des facteurs d'inhibition de la réaction d'hydrolyse.

Combes et Monsan (1984) ont montré que pour l'hydrolyse de solutions très concentrées de saccharose par l'invertase, le fructose est un inhibiteur compétitif et le glucose un inhibiteur non compétitif partiel. Ils ont remarqué que la diminution de l'activité pour des concentrations croissantes en saccharose ne dépend pas de la viscosité du milieu ou d'une modification des liaisons hydrogènes intra- et inter- moléculaires dans la structure du substrat.

III.3. Immobilisation de l'invertase de levure

Cette enzyme a été parmi les premières à être immobilisées et utilisées en biotechnologie, et ce dans différents domaines analytiques (électrode, thermistor) ou pratique (confiserie, etc.). Berset (1993) rapporte que dès 1916, Nelson et Griffin ont fixé l'invertase sur du charbon actif.

Chaplin (2002) rapporte que dans la période 1941–1946, l'acide utilisé pour l'hydrolyse du saccharose était indisponible, aussi l'invertase de levure a été employée à la place. L'autolysat de levure ajusté à pH 4.7 a été adsorbé sur du charbon. Un réacteur muni d'un lit invertase–charbon (60 cm de largeur sur 610 cm de profondeur) était utilisé ; l'ensemble était assez stable, les facteurs limitants étant principalement la prolifération microbienne.

Le processus était rentable mais pas de façon particulière et le processus d'immobilisation a été abandonné quand l'acide est devenu de nouveau disponible. Récemment, cependant, il a été relancé en utilisant le mélange invertase–charbon stabilisé par réticulation pour une demi-vie de 90 jours de fonctionnement (pH 5.5, 50°C).

L'inversion enzymatique évite des sirops fortement colorés et minéralisés, des conversions relativement basses, ainsi que les problèmes de variabilité en batch de l'hydrolyse acide.

Cet auteur précise aussi que bien que l'invertase libre puisse être employée (avec des temps de séjours d'environ un jour), l'utilisation des enzymes immobilisées en réacteur à lit fixe (avec des temps de séjour d'environ 15 minutes) rend le processus concurrentiel ; le coût de 95 % d'inversion (à 50 % (p/p)) n'étant pas plus élevé que le coût de l'évaporation finale (à 75 % (p/p)). Une productivité de 16 tonnes de sirop d'inverti (poids sec) peut être réalisée en utilisant un litre de l'enzyme granulaire.

L'invertase a été fixée sur différents supports, l'on cite :

- ✓ l'alumine (Geankopolis *et al*, 1987),
- ✓ la cellulose sous forme de billes (Popa *et al*, 1998 ; Stefuca *et al*, 1997 ; Docolomansky *et al*, 1993 ; Stefuca *et al*, 1988), sous forme de fibres (Ohmori *et al*, 1994), avec en plus une coréticulation par le glutaraldéhyde (Cojocar, 1995),
- ✓ sous forme de billes de gel de polyacrylamide (Kalentunç *et al*, 1983),
- ✓ co-immobilisée avec *Zymomonas mobilis* sur gel d'alginate (Kirk et Doelle, 1993),
- ✓ sur des rafles de maïs (Monsan et Combes, 1984 ; Monsan *et al*, 1984),
- ✓ avec la concanavaleine A (Gemeiner *et al*, 1998 ; Josic *et al*, 1998 ; Jafri *et al*, 1993),
- ✓ sur du chitosane (Hsieh *et al*, 2000),
- ✓ l'aminopropyl silice (Rosa *et al*, 2000),
- ✓ réticulée par différents réactifs dont le formaldéhyde (Kaplan *et al*, 1997) ;
- ✓ pour l'optimisation d'électrode à enzyme où l'invertase est fixée sur la membrane près l'électrode (Thavarungkul *et al*, 1999 ; Surareungchai *et al*, 1999 ; Bertocchi *et al*, 1999).

L'immobilisation de l'invertase a l'avantage d'éviter l'inhibition de celle-ci par ses produits d'hydrolyse du fait du gradient de diffusion réalisé ; de ce fait, la concentration du substrat à proximité de l'enzyme sont nettement inférieures à celle régnant dans le macroenvironnement.

L'application la plus intéressante est celle de Monsan *et al* (1983) avec la réalisation d'un réacteur agité de 100 litres à l'échelle pilote où l'invertase est fixée sur des rafles de maïs. Le réacteur à lit fixe, pour une conversion en continu du saccharose, montre une demi-vie de 365 jours à 40°C avec une concentration de saccharose 2 M à pH 4.5, ou de 90 jours à 45 – 55°C.

L'hydrolyse continue de solutions concentrées de saccharose pour la même méthode d'immobilisation, et ce pour un réacteur à lit fixe de 17.6 l construit dans une raffinerie de sucre de canne, avec une colonne métallique thermostatée de 15 cm de diamètre et 1 m de hauteur, conduit à une productivité égale à 9.1 kg de saccharose hydrolysé par heure pour une concentration initiale de saccharose de 69 % (p/p) avec un taux de conversion de 72 %. (Monsan et Combes, 1984)

Pour ce même réacteur de 17.6 l mais à température de 50°C, et alimenté avec un sirop de saccharose industriel (65 % (p/p)), Monsan et Combes (1984) ont obtenu une conversion de 93 % pour 450 g de saccharose hydrolysé/h/l.

III.4. L'immobilisation de l'invertase par l'alginate

III.4.1. Généralités

Les alginates sont des polysaccharides aux propriétés gélifiantes et épaississantes utilisés dans de nombreuses industries (agroalimentaire, textile, papier, pharmacie etc...).

Sous forme commerciale, on les retrouve classés comme étant des additifs alimentaires regroupés dans la catégorie des émulsifiants et stabilisants.

Suivant le guide pratique des additifs alimentaires, ils sont classés comme E 400 acide alginique ; de E 401 à E 405 respectivement alginate de sodium, de potassium, d'ammonium, de calcium, et enfin de propylène glycol. (Anonyme, 1987)

C'est le biopolymère marin le plus abondant et, après la cellulose, le biopolymère le plus abondant au monde.

C'est un des principaux constituants des algues brunes telle que *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, et *Laminaria hyperbora*, auxquelles il confère en même temps flexibilité et force nécessaire à leur croissance en mer.

Près de 25 000 tonnes d'alginate sont produites annuellement, dont 1/3 est utilisé en industrie alimentaire. (Wilcks, 2001)

Dans ce secteur, l'application des alginates est basée sur :

- 1) Leur potentiel pour former des solutions hautement visqueuses avec des propriétés stabilisantes – suspension correspondantes,
- 2) Leur stabilité à des températures et pH élevés,
- 3) Leur réactivité avec les ions Ca^{2+} , qui les transforment en gel,
- 4) La stabilité thermique de ces gels.

L'alginate est utilisé comme épaississant, stabilisateur, agent gélifiant et émulsifiant. Les principales caractéristiques des gels d'alginate peuvent être résumées comme suit : (Inukai *et al*, 1999)

- 1- La transition solution – gel se fait sans aucun changement de température et/ou sans aucun agent chimique réticulant,
- 2- Le gel d'alginate peut être facilement converti en solution par ajout de Na^+ , Mg^{2+} , et EDTA.
- 3- Le gel d'alginate a des densités de charges dues aux groupes carboxyliques,
- 4- L'alginate est non toxique et biodégradable.

III.4.2. Structure de l'alginate

L'alginate de sodium de formule chimique $(C_4H_7NaO_6)_n$ est le principal sel d'alginate utilisé.

La molécule d'alginate est composée de deux types de monomères, l'acide L- guluronique (G) et de son épimère C 5 l'acide D- mannuronique (M), liés entre eux suivant des séquences très variables (blocs homogènes ou alternés). La plupart des alginates sont composés de régions homopolymériques M et G (bloc M et bloc G), espacées par des régions hétéropolymériques (bloc MG). (Figure n°7)

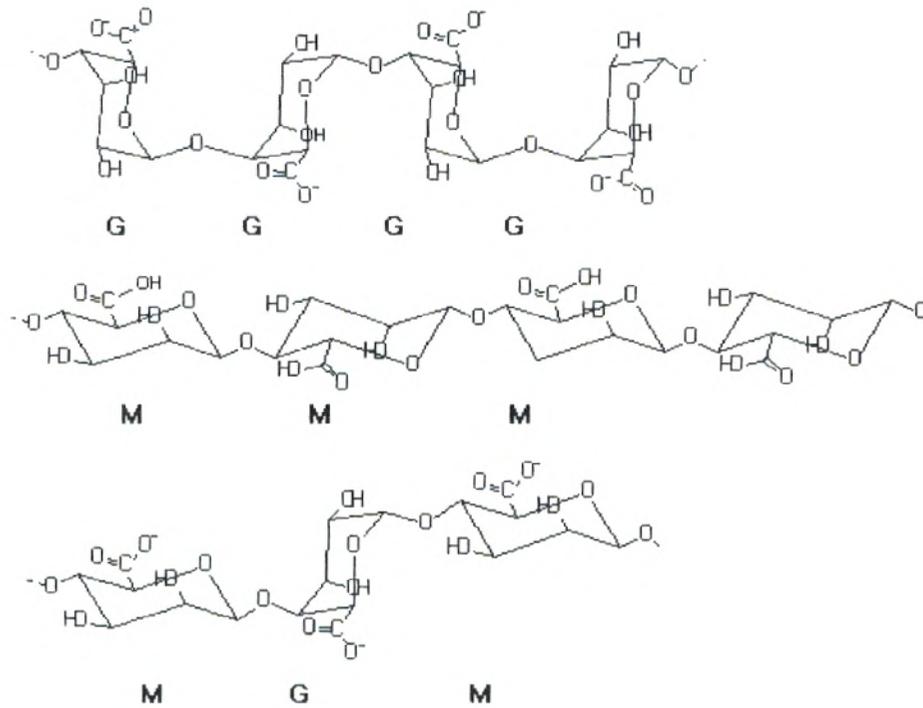


Figure n°7 : Structure de la molécule d'alginate

Les deux monomères M et G ne sont pas répartis au hasard dans les macromolécules, mais répartis en segments d'une vingtaine d'unités.

L'assemblage de ces segments en proportions variables dépend de l'espèce, de la partie d'algue considérée et à un degré moindre de l'âge de l'algue et du lieu de récolte. La répartition des monomères détermine les propriétés gélifiantes des alginates. (Linden et Lorient, 1994)

Serp *et al* (2000) estiment que l'ordre des résidus d'acide guluronique est responsable des propriétés de gélification de l'alginate avec les cations bivalents. Par conséquent, un alginate avec un haut niveau de séquences G va présenter une plus grande affinité aux agents réticulants qu'un alginate contenant peu de G.

III.4.3. Propriétés et caractéristiques de l'immobilisation par l'alginate

Les billes d'alginate représentent un des supports les plus largement utilisés pour l'immobilisation d'enzymes et de protéines ; aussi bien que pour le relargage contrôlé de médicaments. (Fundueanu, 1999)

Le succès de cette méthode simple d'encapsulation est largement dû aux conditions douces et au bas prix du procédé. Les alginates forment des hydrogels en présence d'ions métalliques tels que les ions Ca^{2+} , et des liaisons sont formées par complexation entre ions divalents et anions carboxyles des blocs G.

Il suffit de mélanger le matériel à immobiliser qu'il soit cellule, enzyme, protéine, ou médicament, avec une solution d'alginate ; et le mélange est dispersé goutte à goutte dans une solution contenant des ions bivalents Ca^{2+} , on observe la formation d'un réseau moléculaire en « boîte d'œufs » par association de séquences homopolymériques G par chélation de Ca^{2+} .

Les interactions ioniques entre blocs G et les ions Ca^{2+} causent la formation de gel thermostable fort, dont les propriétés dépendent largement des caractéristiques du polymère et de la méthode de préparation.

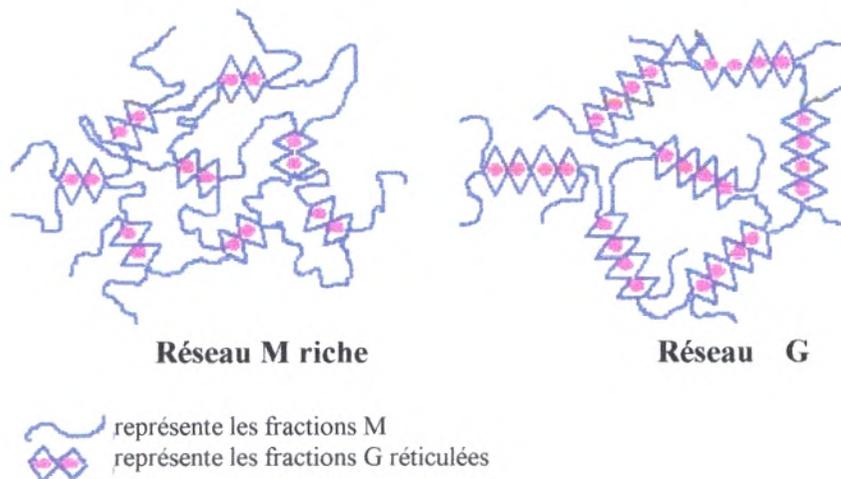


Figure n°8 : Modèle en « boîte d'œufs » du gel d'alginate

La conformation des séquences polyguluroniques est telles qu'elles peuvent présenter une succession de cavités électronégatives dont la taille et la géométrie permettent la fixation de Ca^{2+} au contraire des séquences mannuroniques. (Thibault et Colonna, 1988)

Différents systèmes et techniques ont été mis au point afin d'améliorer le procédé d'immobilisation et de fabrication de billes (Serp *et al*, 2000 ; Brandenberger *et al*, 1998), de microsphères (Mofidi *et al*, 2000 ; Fundueanu, 1999), de capsules (Dembczynski et Jankowski, 2000 ; Blandino *et al*, 2000), de liposomes (Westhaus et Messersmith, 2001), et de membrane (Inukai *et al*, 1999).

Le gel d'alginate de calcium est utilisé pour l'immobilisation sous forme de billes :

- ✓ de cellules de bactéries, exemple : *Pseudomona putida* (Bandhyopadhyay *et al*, 2001), *Bacillus subtilis* (Bregni *et al*, 2000), *Leuconostoc mesenteroides* (Quirasco *et al*, 1999),
- ✓ d'algues telles que *Phaffia rhodozyma* (Serp *et al*, 2000) ;
- ✓ de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* (Chang *et al*, 1996 ; De Alteris *et al*, 1998 ; Hulst *et al*, 1985) ;
- ✓ de moisissures telles que *Rhanochaete chrysosporium* (Kaçar *et al*, 2002),
- ✓ d'enzymes telles que la pullulanase (Ray et Gupta, 2002), la glucose oxydase (Blandino *et al*, 2000), l'uréase (Das *et al*, 1998), la lipase (Vermuri *et al*, 1998), la dextranase (Buchloz *et al*, 1998), l'amyloglucosidase (Ray et Mjumdar, 1994) ;
- ✓ et même de catalyseur chimique tel que l'oxyde de zinc ZnO (pour un photoréacteur) (Couto *et al*, 2002), de pesticide tel que le NSO (neem seed oil) (Kulkarni *et al*, 2000), ou encore de gènes de plantes (Sone *et al*, 2002), et de boues activées (Shishido *et al*, 1996).

Dans le domaine pharmaceutique, les billes d'alginate sont employées pour la libération de macromolécules dont des médicaments (Hermes et Narayani, 2002 ; Levinska *et al*, 2002 ; Giunchedi *et al*, 2000).

En thérapie médicale, différentes utilisations de l'alginate sont rapportées par la littérature. (Bau *et al*, 2001 ; Westhaus *et al*, 2001 ; Moon *et al*, 2000)

Matériel et Méthodes



1. Préparation de l'extrait d'invertase de levure

a. Matériel et produits utilisés

- Centrifugeuse,
- pH- mètre,
- Balance semi-analytique,
- Erlenmeyer, Becher ,
- Pipettes de 10 et 20 ml,
- Levure *Saccharomyces cerevisiae* sous forme sèche,
- Acide acétique,
- Bicarbonate de sodium,
- Acétate de sodium.

b. Méthode

La méthode utilisée, afin d'obtenir la préparation enzymatique, est une modification d'un protocole réalisé par Loncle (1992) et adapté par Alnadjar (2000). Elle consiste en la succession des étapes suivantes :

- Mettre en suspension 50 g de levure lyophilisée (en poudre) dans 100 ml de solution aqueuse contenant 0.1 M de bicarbonate de sodium et 0.01 M d'acétate de sodium.
- Couvrir et laisser 45 heures à température ambiante.
- Centrifuger 15 minutes à 2 000 g (4 000 t/min).
- Prélever le surnageant et y ajouter de l'acide acétique pur afin d'abaisser le pH du mélange jusqu'à 4.0.
- Centrifuger cette préparation pendant 15 minutes à 2 000 g (4 000 t/min).
- Prélever le surnageant. Ajuster son pH, si nécessaire, à 4.0.
- Mettre l'extrait de levure, ainsi préparé, dans un flacon et le placer au réfrigérateur.

Après que les cellules gonflent et se multiplient, la centrifugation provoque une plasmolyse des cellules qui libèrent leur contenu. L'acide acétique ajouté provoque la précipitation de la majorité des protéines et permet de purifier la préparation de ces impuretés. Le surnageant contient la plupart de l'activité β - fructosidase.

La préparation enzymatique utilisée, dans cette étude, a été obtenue réalisant la suspension de 400 g de levure dans 800 ml de la solutions aqueuse (bicarbonate de sodium 0.1 M et acétate de sodium 0.01 M) ; cette préparation a subi deux centrifugations successives dans des tubes en verre coniques.

Puis après l'avoir conservée toute une nuit au réfrigérateur, et ce afin de favoriser encore l'action de l'acide acétique, une troisième centrifugation était nécessaire du fait de l'apparition d'un dépôt.

La solution ainsi obtenue est limpide, de teinte jaune paille. Elle est mise dans une bouteille en verre brun.

Remarque : le dépôt formé au fil du temps est infime par rapport à celui des préparations réalisées dans les conditions citées par Alnadjar (2000).

2. Dosage des protéines totales

a. Principe

La détermination de l'activité spécifique d'un extrait enzymatique implique de doser les protéines présentes.

En milieu alcalin, les ions Cu^{2+} forment avec les liaisons peptidiques un complexe bleu violet, dont le pic d'absorption se situe à 540 nm. Les ions Cu^{2+} du réactif biuret étant en excès, l'absorbance du complexe est proportionnelle à la concentration protéique.

Les acides aminés simples et les dipeptides ne forment pas de composé coloré en présence de cuivre (CuSO_4), deux liaisons peptidiques adjacentes sont nécessaires. Le composé le plus simple qui possède cette structure est le réactif « biuret ».

Il apparaît une coloration violet - rose devenant de plus en plus bleue. Cette coloration est due à la formation au niveau des groupes aminés libres, de complexes amino cuivriques.

L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en protéines.

L'avantage de la méthode réside dans la non influence de la nature des protéines, mais l'inconvénient majeur est la faible sensibilité. (Coutouly, 1992)

b. Matériel et produits utilisés

- Réactif biuret : Dissoudre 3 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) et 9 g de tartrate de sodium et de potassium dans 250 ml d'eau distillée. Ajouter ensuite 5 g d'iodure de potassium (KI) puis ajouter la solution de soude (NaOH) préalablement préparée (8 g dans 100 ml d'eau distillée) ; compléter à 1 litre.
- Tubes à essais,
- Pipettes de 1, 5, et 10 ml,
- Spectrophotomètre.

c. Gamme d'étalonnage des protéines

Préparer différentes solutions de gélatine afin d'avoir des concentrations allant de 1 à 10 g/l. Puis introduire, dans des séries de tubes à essai, 2 ml de chaque solution, ajouter 3 ml de réactif biuret et laisser 30 minutes à l'obscurité (chaque mesure est répétée trois fois).

Lire l'absorbance contre un blanc sans gélatine, afin de réaliser la droite d'étalonnage.(voir figure n°8)

d. Dosage des protéines de la préparation enzymatique

- Dans des tubes à essais, réaliser des dilutions de la préparation enzymatique à raison de 1/2, 1/4, 1/6,1/8.
- Mettre 2 ml de solution de chaque dilution dans trois tubes à essais et y ajouter 3 ml de réactif du biuret, bien homogénéiser.
- Laisser 30 minutes à l'obscurité, à température ambiante.
- Lire l'absorbance de chaque échantillon contre un blanc réactif à 540 nm, et en déduire la concentration en protéines à partir de la droite d'étalonnage réalisée avec la gélatine.

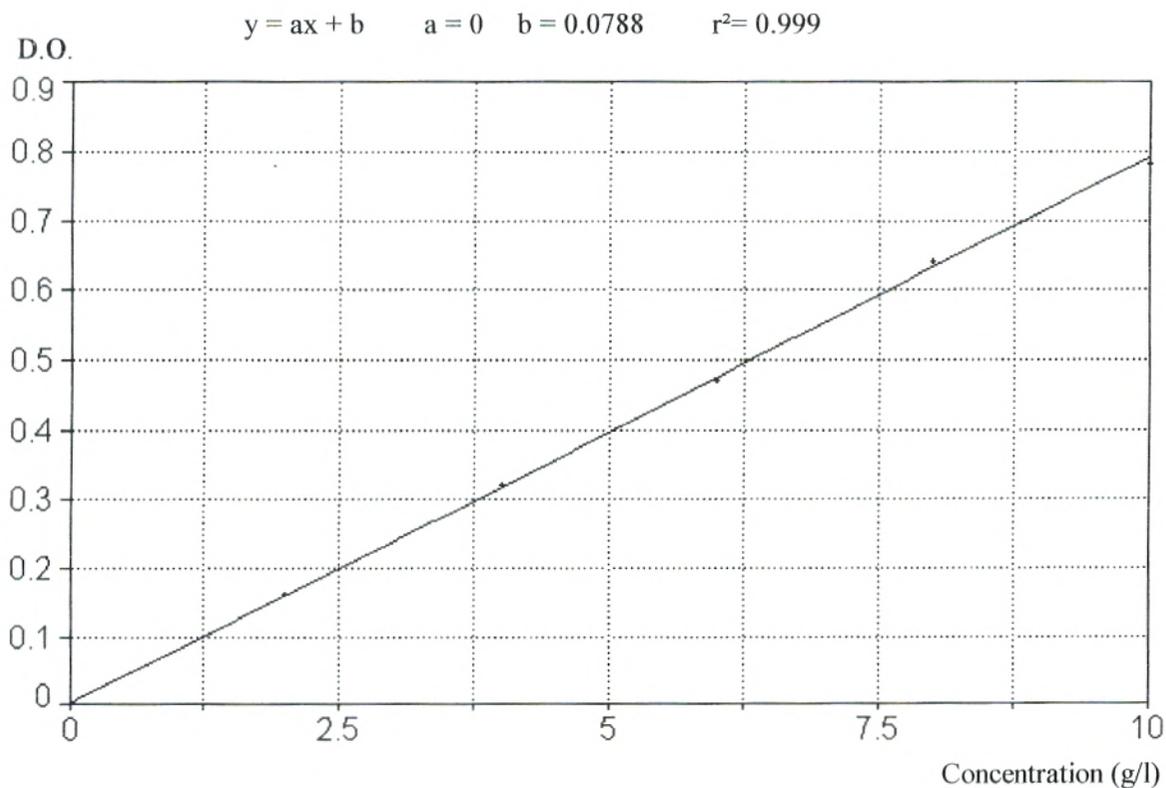
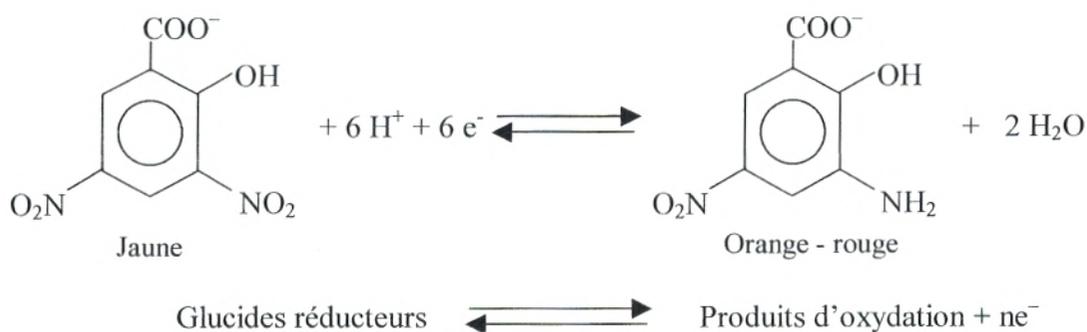


Figure n°8 : Droite d'étalonnage pour la méthode biuret

3. Dosage des sucres réducteurs

a. Principe

En milieu alcalin, à chaud et en présence de sucres réducteurs, l'acide 3,5 dinitrosalicylique (3,5 -DNS) est réduit en acide 3- amino 5- nitrosalicylique, produit de couleur jaune orange.



Ce dosage mis au point par Bernfeld (1955) donne une idée globale de la quantité de sucres réducteurs présents dans la solution dosée.

b. Matériel et produits utilisés

- Réactif DNS : Dissoudre 1g d'acide dinitrosalicylique dans environ 40 ml d'eau distillée, ajouter 30 g de tartrate de sodium et de potassium puis 20 ml de soude 2 N. Compléter à 100 ml (Il est possible de chauffer légèrement le DNS afin de faciliter sa dissolution complète dans l'eau distillée)

- Tampon acétate 0,1 M pH 4,8 : (mélanger extemporanément 30.0 ml d'acétate de sodium 0.1 M et 20.0 ml d'acide acétique 0.1M)

- Tubes à vis,
- Micropipettes de 0,25 et 0,75 ml,
- Pipettes de 1 ml, 10 ml,
- Bain marie,
- Spectrophotomètre.

c. Gamme d'étalonnage

Dans une série de tubes, introduire, à raison de 0.75 ml par tube, des dilutions d'une solution mère de sucre inverti 0.5 mM (solution équimolaire de glucose et fructose 0.25 mM chacune) ; les dilutions sont 1, 2, 3, 4, 5 mM. Ajouter 0.25 ml de tampon acétate, 0.1 M pH 4.8, puis 1 ml de réactif DNS, agiter.

Après fermeture des tubes, les mettre dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes exactement. Ensuite, les tubes sont refroidis dans la glace fondante. Additionner 10 ml d'eau distillée dans chaque tube, agiter.

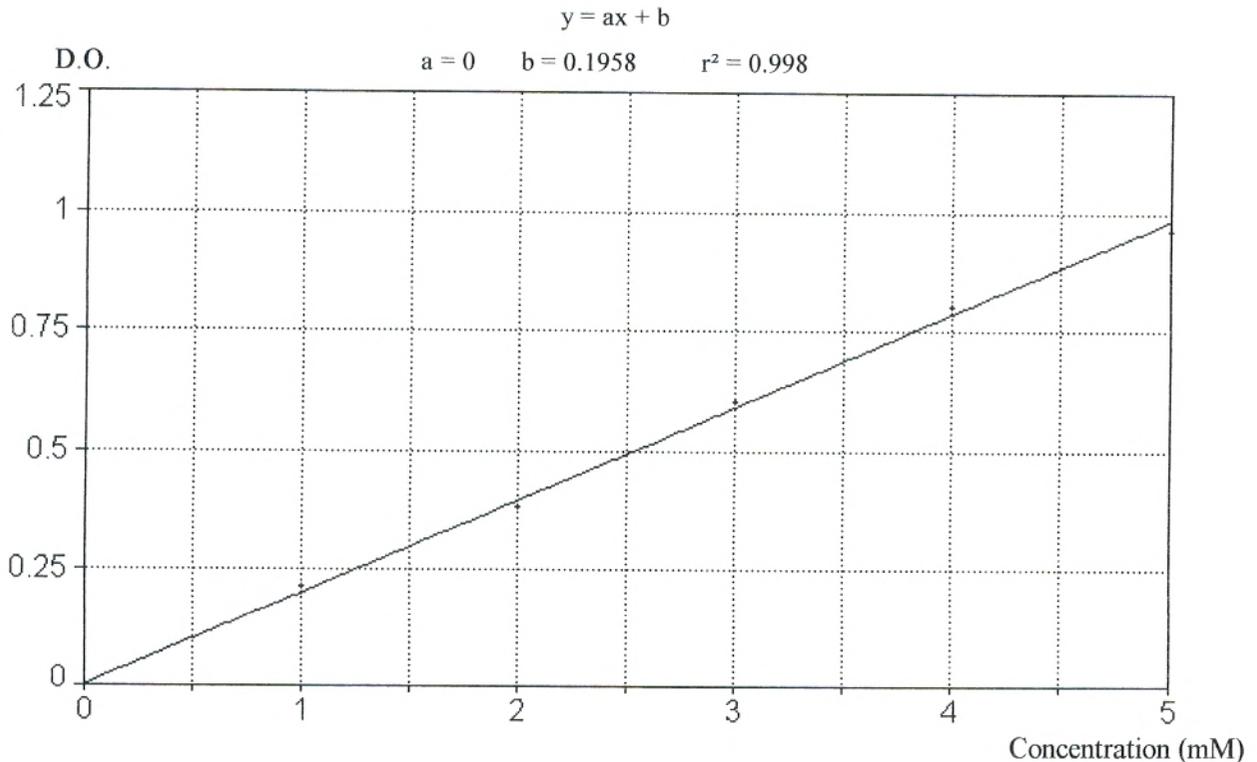
Lire l'absorbance des dilutions de sucres invertis contre un blanc réactif contenant 1 ml de tampon acétate 0.1 M pH 4.8, à 530 nm. La figure n° 9 donne un exemple de droite d'étalonnage obtenue expérimentalement.

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.

On peut procéder soit graphiquement, soit en utilisant l'équation de correspondance entre absorbance et quantité de sucre inverti par tube déduite de la courbe.

Cette courbe permet également de préciser la limite supérieure de proportionnalité entre l'absorbance et la quantité par tube. (Loncle, 1992)

N.B. : la droite ne passe pas toujours par l'origine.



**Figure n°9 : Droite d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs
par la méthode de Bernfeld**

4. Détermination de l'activité enzymatique

4.1. Mesure de l'activité de l'invertase libre

a- Matériel et produits utilisés

- Tampon acétate 0.1 M pH 4.8,
- Réactif DNS,
- Tubes à vis,
- Pipette 1 ml, 10 ml.
- Micropipette 0.75 ml, 0.25 ml,

b- Méthode

A température ambiante, la mesure est effectuée en faisant réagir une dilution de la préparation enzymatique au $1/300^{\text{ième}}$ et une solution de saccharose 0.5 M dans du tampon acétate 0.1 M pH 4.8.

Dans une série de tubes à vis, trois pour chaque temps, mélanger 0.75 ml de substrat et 0.25 ml de la solution d'enzyme. Les temps choisis après vérification sont de 1 min et 1.5 min (méthode des deux points).

Le réactif d'arrêt de la réaction est le réactif DNS à raison de 1 ml par tube. Pour le temps 0 (blanc réactif), mettre dans l'ordre le substrat, le réactif DNS, puis la solution d'enzyme.

Boucher les tubes, les mettre au bain-marie bouillant pendant 5 minutes, puis les refroidir à l'eau glacée.

La lecture de la densité optique (D.O.) se fait contre le blanc réactif correspondant au temps 0.

Remarque : Chaque mesure est répétée 3 fois.

4.1.1. Calcul de la vitesse initiale

Après avoir fait la lecture des densités optiques (D.O.), le calcul de la vitesse initiale V_{in} se fait à partir de la formule suivante :

$$V_m = \frac{b \times 10^3}{2 \times b'} \quad (\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1})$$

b : pente de la droite "absorbance du milieu réactionnel en fonction du temps", $D.O. = f(t)$

b' : pente de la droite d'étalonnage.

Une unité β - fructosidase (UI) sera définie comme la quantité d'enzyme susceptible d'hydrolyser une micromole de saccharose par minute dans les conditions opératoires. (Loncle, 1992)

4.1.2. Calcul de l'activité volumique

L'activité volumique de la préparation enzymatique est calculée par la formule suivante :

$$AV = \frac{V_m \times V_r \times F}{10^3 \times V_e} \quad (\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1})$$

V_{in} : vitesse initiale ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$),

V_r : volume du milieu réactionnel (1 ml),

V_e : volume de la dilution enzymatique (0.25 ml),

F : facteur de dilution de la préparation enzymatique.

4.1.3. Calcul de l'activité spécifique

Il est nécessaire d'abord de connaître la concentration en protéines afin d'appliquer la formule suivante :

$$AS = \frac{AV}{[protéines]} \quad (\text{UI} \cdot \text{mg}^{-1})$$

La concentration en protéines de la préparation enzymatique est obtenue par :

$$[protéines] = \frac{DO \times F}{b} \quad (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})$$

DO : densité optique de la dilution d'enzyme dosée par la méthode du biuret,

F : facteur de dilution de la préparation d'enzyme,

b : pente de la droite d'étalonnage réalisée pour le dosage des protéines.

4.2. Mesure de l'activité de l'invertase immobilisée

4.2.1. Inclusion dans l'alginate avec réticulation par le glutaraldéhyde

a- Matériel et produits utilisés

- Tampon acétate 0.1 M pH 4.8,
- Alginate de sodium,
- Glutaraldéhyde 25 % (v/v),
- Solution de Ca Cl₂ 0.2M,
- Seringue de 10ml,
- Pipette 1 ml.
- Pompe à piston,
- Agitateur magnétique.

b- Méthode

Après avoir pesé 0.3 g d'alginate de sodium, verser petit à petit sur un volume de 10 ml d'eau distillée maintenu sous agitation continue. Après dissolution complète de la poudre, ajouter le volume adéquat de la préparation enzymatique, laisser dégazer complètement, puis verser le gel obtenu dans une seringue de 10 ml que l'on place ensuite dans un appareil correspondant à une pompe à piston réglable. La seringue est comprimée grâce au piston de façon constante et continue avec une pression égale (Figure n°10).

Les billes formées tombent goutte à goutte dans une solution de bichlorure de calcium CaCl_2 0.2 M légèrement agitée, où est ajouté du glutaraldéhyde, elles sont maintenues 30 minutes dans cette solution après épuisement du gel à l'intérieur de la seringue.

Les billes récupérées sont égouttées puis lavées à l'eau distillée. Elles sont alors prêtes à l'emploi pour la mesure de leur activité et pour le garnissage du réacteur.

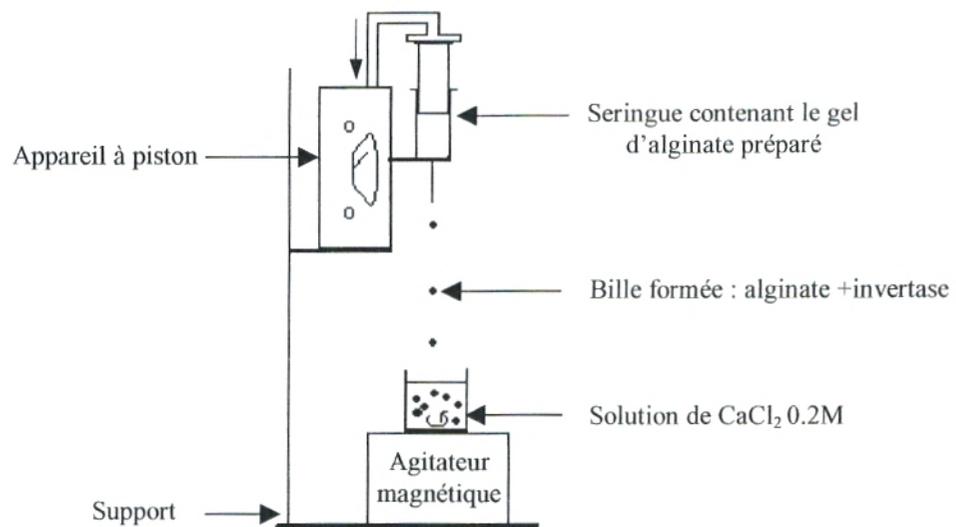


Figure n°10: Dispositif utilisé pour l'obtention des billes d'alginate de calcium contenant l'invertase immobilisée

4.2.2. Mesure et calcul de la vitesse initiale d'une bille d'alginate

a- Matériel et produits utilisés

- Tampon acétate 0.1 M pH 4.8,
- Réactif DNS,
- Tubes à vis,
- Pipettes de 1ml, 10 ml,
- Micropipette 0.75 ml, 0.25 ml,
- Bain-marie,
- Spectrophotomètre.

b- Méthode

Prendre 6 tubes à vis et placer dans chacun d'eux une bille de gel d'alginate. Y ajouter 0.25 ml de tampon acétate 0.1 M pH 4.8. Le blanc réactif (7^{ième} tube) contient uniquement le volume correspondant de tampon acétate.

Les temps d'incubation étant fixés à 2.5 min et 4 min, on procède à l'addition dans chaque tube de 0.75 ml d'une solution de saccharose 0.5 M préparée dans du tampon acétate 0.1 M, pH4.8. La réaction est arrêtée par le réactif DNS.

Les tubes sont ensuite bouchés et plongés dans un bain-marie bouillant pendant exactement 5 minutes. Ils sont ensuite refroidis dans un bain d'eau glacée puis on y ajoute 10 ml d'eau distillée. L'absorbance est lue à 530 nm.

La vitesse initiale d'une bille correspond à

$$V_m = \frac{b \times 10^3}{2 \times b'} \quad (\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1})$$

b : pente de la droite "absorbance du milieu réactionnel en fonction du temps" D.O. = f(t)

b' : pente de la droite d'étalonnage.

4.2.3. Calcul de l'activité volumique des billes d'alginate

L'activité volumique des billes est calculée comme suit :

$$AV = \frac{V_m \times N \times V_r \times F}{10^3 \times V_e} \quad (\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1})$$

V_m : vitesse initiale ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$),

V_r : volume du milieu réactionnel (1 ml),

V_e : volume de la dilution enzymatique (0.25 ml),

N : nombre de billes obtenues (en moyenne 600),

F : facteur de dilution de la préparation enzymatique.

5. Hydrolyse continue du saccharose par l'invertase immobilisée dans des billes d'alginate

5.1. Réalisation du réacteur à lit fixe

Le système consiste en un réfrigérant droit en verre, de 1 cm de diamètre et 20 cm de hauteur, muni d'une double paroi, surmonté d'une ampoule à décanter servant de réservoir de percolation de la solution de substrat de concentration fixée.

La figure n°11 est un schéma représentant le réacteur enzymatique à lit fixe réalisé au laboratoire.

La colonne est garnie de billes d'alginate contenant l'invertase immobilisée ; le diamètre des billes utilisées est en moyenne de $0.2 \text{ cm} \pm 0.02$.

Après garnissage, le réacteur est d'abord percolé 15 minutes avec une solution de tampon acétate 0.1 M, pH 4.8, avant d'être alimenté par la solution de saccharose. Cette opération a pour but de stabiliser le débit de sortie et d'entrée.

Pour les températures de 40 °C et de 50°C, une circulation d'eau chaude est maintenue constante dans la double paroi du réfrigérant.

5.2. Détermination des taux de conversion des réacteurs réalisés

a- Matériel et produits utilisés

- Tampon acétate 0.1 M pH 4.8,
- Réactif DNS,
- Tubes à vis,
- Pipettes de 1ml, 10 ml,
- Micropipette 0.75 ml, 0.25 ml,
- Bain-marie,
- Spectrophotomètre.

b- Méthode

Pour qu'elle puisse être dosée, la solution de sortie du réacteur est d'abord diluée suivant les cas 100, 200, voire 300 fois.

Dans trois tube à essais, on verse 0.75 ml de la dilution à 0.25 ml de tampon acétate 0.1 M, pH 4.8, et 1 ml de réactif DNS préalablement préparé. Le blanc réactif contient 1 ml de tampon acétate 0.1 M, pH 4.8, et 1 ml de réactif DNS.

Les tubes sont mis à chauffer 5 minutes au bain-marie ; puis refroidis dans un bain d'eau glacée. La lecture au spectrophotomètre est à 530 nm, la moyenne des trois densités optiques enregistrés est utilisée pour le calcul de la concentration du produit.

La concentration de produit dosé est calculée par la relation :

$$P = \frac{D.O. \times V_r \times F}{2 \times b}$$

D.O. : moyenne de trois densités optiques enregistrées,

V_r : Volume réactionnel (1 ml),

F : Facteur de dilution de la solution à doser,

b: pente de la droite d'étalonnage.

La concentration en substrat à la sortie du réacteur (S') correspond à la différence :

$$S' = S - P$$

où S est la concentration en substrat à l'entrée du réacteur et P est la concentration en sucre inverti à la sortie du réacteur.

Le taux de conversion (X) est alors égal à :

$$X = \frac{S - S'}{S}$$

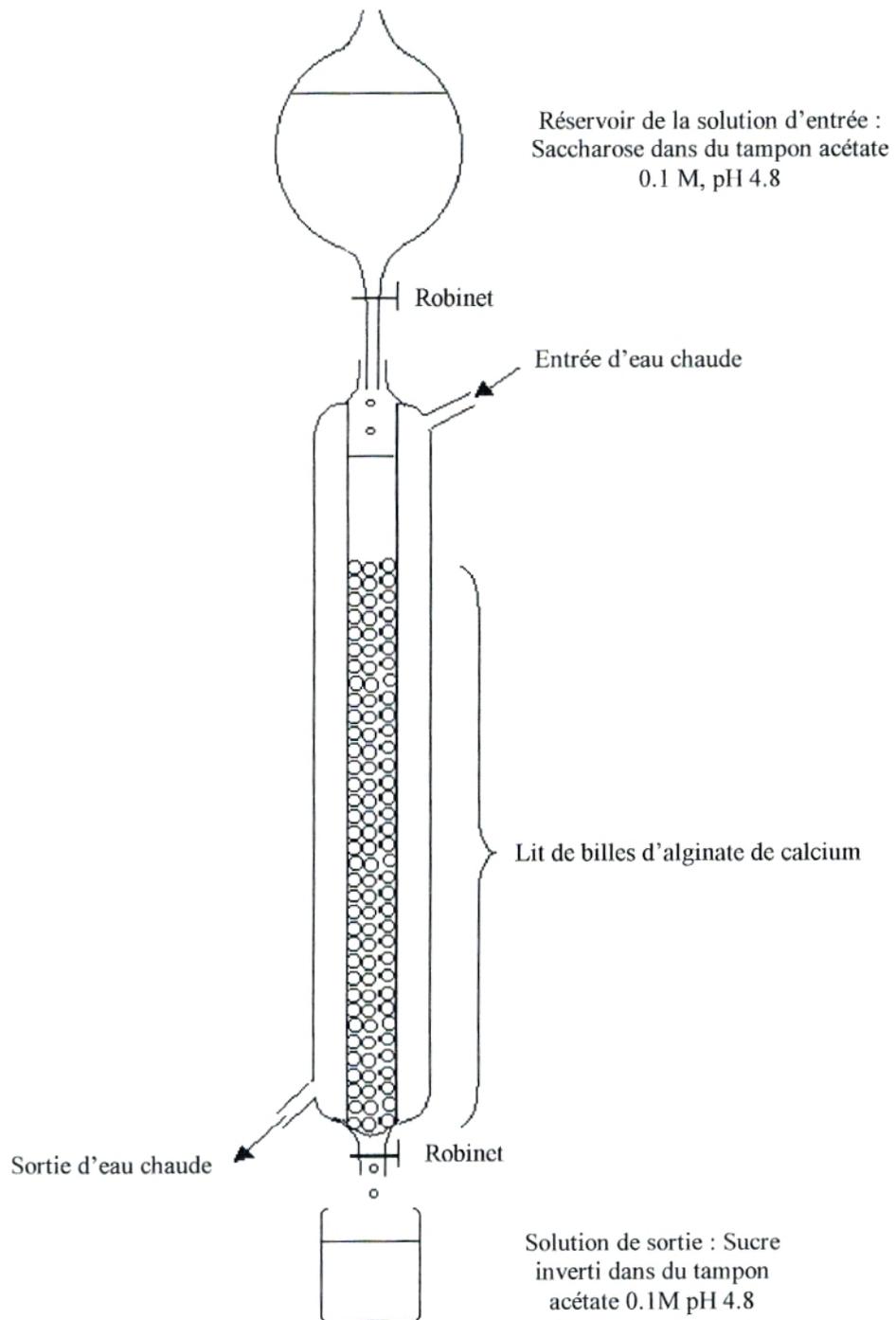


Figure n°11 : Schéma du dispositif du réacteur enzymatique à lit fixe

Résultats et Discussion



I. Etude de l'enzyme soluble

I. 1. Détermination du pH optimum de l'enzyme

En général, une enzyme possède un pH optimum où son activité catalytique est maximale. Il est important de connaître ce paramètre afin de mieux comprendre la réaction.

Le pH optimum de l'invertase de levure se situe entre 4.4 et 5.5. (Durand et Monsan, 1982)

Une gamme de solutions de saccharose est préparée, en utilisant comme solvant du tampon acétate 0.1 M, à différents pH allant de 3.6 à 5.6. La préparation enzymatique est diluée 200 fois dans du tampon acétate au mêmes pH que la solution de saccharose. La réaction se déroule à 25°C.

L'effet du pH est présenté dans la figure n°12.

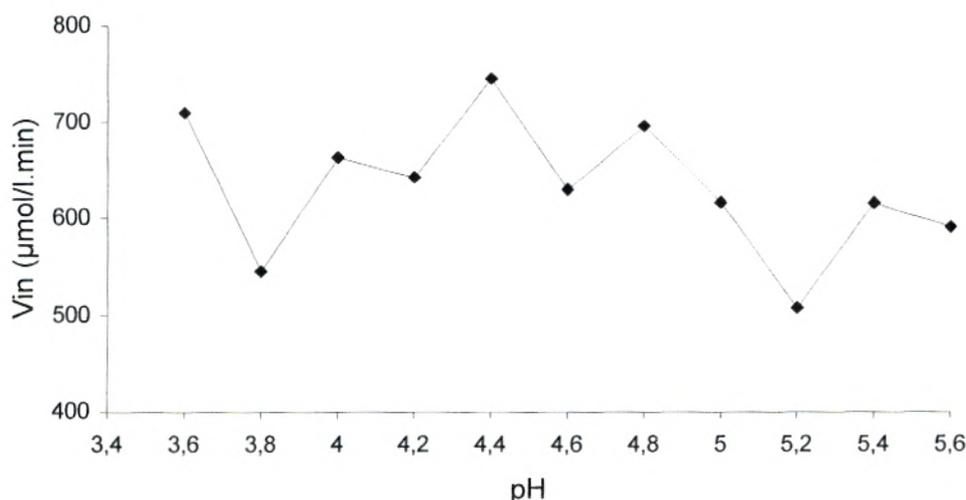


Figure n°12 : Effet du pH sur l'activité de l'enzyme soluble

L'effet du pH est souvent complexe : on peut ainsi avoir une modification de l'ionisation de groupements intervenant dans la catalyse ou dans la fixation du substrat, ou encore dans le maintien de la conformation native ; l'ionisation du substrat lui-même peut éventuellement être modifiée. (Coutouly, 1992)

On constate trois pics d'activité caractérisés par des vitesses initiales comparables. Les pH correspondants sont de 3.6, 4.4, et 4.8. Pour cela, on a choisi de travailler avec une solution tampon acétate 0.1 M de pH 4.8.

1.2. Evolution de la préparation enzymatique

Ayant utilisé l'extrait d'invertase pendant une assez longue période, nous avons tenu à vérifier la stabilité de cette préparation et la persistance de son intégrité au cours du temps.

Nous n'avons constaté aucun changement dans son aspect, dans sa couleur, ou dans son odeur, premiers indices révélateurs d'une quelconque contamination par des germes (il convient de noter que le pH acide de l'extrait invertase est un inhibiteur majeur pour une prolifération microbienne).

Un suivi de l'activité enzymatique a été réalisé dans les conditions opératoires standards ; à savoir une température de 25°C, une solution de saccharose 0.5 M dans du tampon acétate 0.1 M, pH 4.8, et une solution d'enzyme diluée 200 fois dans du tampon acétate 0.1 M, pH 4.8.

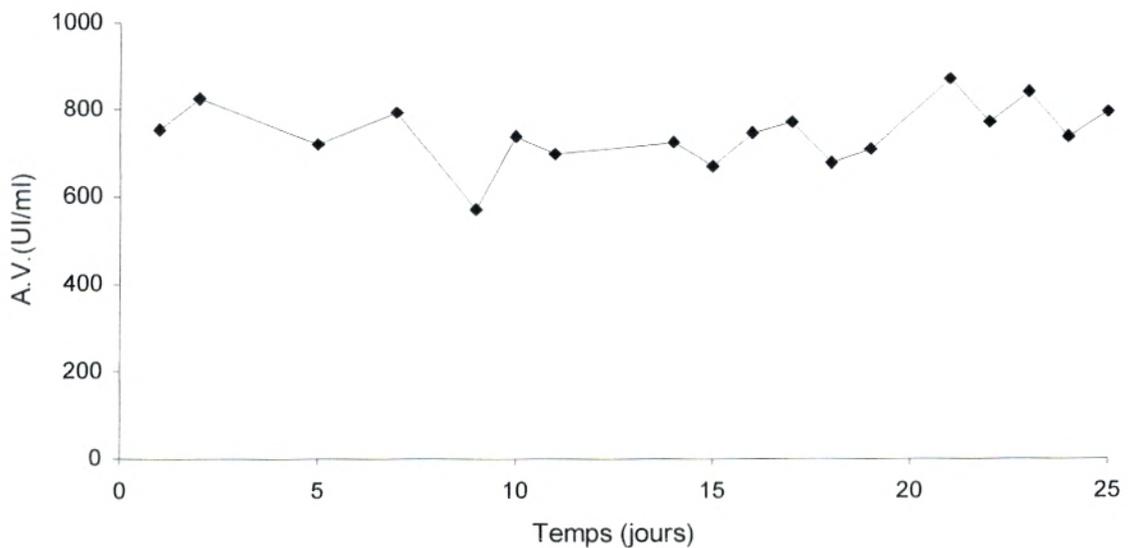


Figure n°13 : Activité volumique de l'enzyme au cours du 1^{er} mois

La figure n°13 représente l'activité de la préparation enzymatique au cours du 1^{er} mois de stockage. On remarque des fluctuations mais elles sont moins marquées que celles enregistrées par Alnadjar (2000).

Suivant les recommandations d'Alnadjar (2000), nous avons préféré laisser la préparation se stabiliser durant un mois avant de l'utiliser.

L'activité volumique moyenne de l'extrait d'invertase au cours du premier mois est de 745 UI.ml⁻¹ avec un écart type de 70.

La figure n°14 représente l'activité volumique de la préparation enzymatique au cours de huit mois de conservation.

Sur cette période, l'activité volumique moyenne est de 724 UI.ml⁻¹ avec un écart type de 85.

On peut en déduire que la préparation enzymatique est suffisamment stable tout au long de la réalisation de ce travail.

Ainsi, tout au long de ce travail, les conditions opératoires ont été maintenues homogènes, surtout lors de l'immobilisation de l'enzyme en billes d'alginate et de la réalisation des réacteurs enzymatiques.

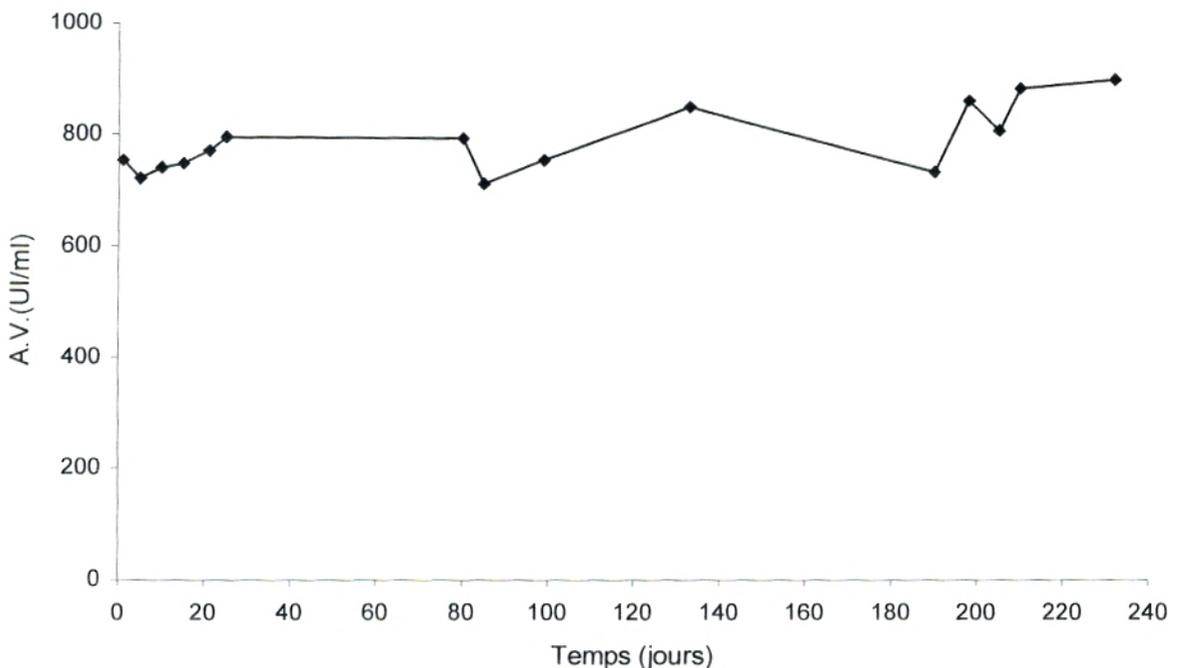


Figure n°14 : Activité volumique de l'enzyme au cours du temps

I. 3. Détermination des paramètres cinétiques

Afin de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'invertase, nous avons fait varier la concentration du substrat soumis à l'enzyme.

Les vitesses initiales (V_{in}) des réactions ont été évaluées par la méthode des deux points, aux temps choisis de 1 min et 1.5 min, à 25°C.

La préparation d'enzyme diluée 200 fois est mise en présence de différentes concentrations de saccharose dissous dans du tampon acétate 0.1 M pH 4.8 (ces concentrations variant de 0.02 à 1 mol.l⁻¹).

En premier lieu, nous avons utilisé l'équation de Michaelis – Menten (éq. n°1) pour évaluer les constantes cinétiques K_m et V_{max} .

$$V_{in} = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (\text{équation n°1})$$

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

V_{max} : Vitesse maximale d'hydrolyse ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$),

S : Concentration en substrat ($\mu\text{mol.l}^{-1}$),

K_M : Constante de Michaelis ($\mu\text{mol.l}^{-1}$), correspond à la valeur de S pour laquelle $V_{in} = V_{max}/2$.

La figure n°15 présente la courbe obtenue.

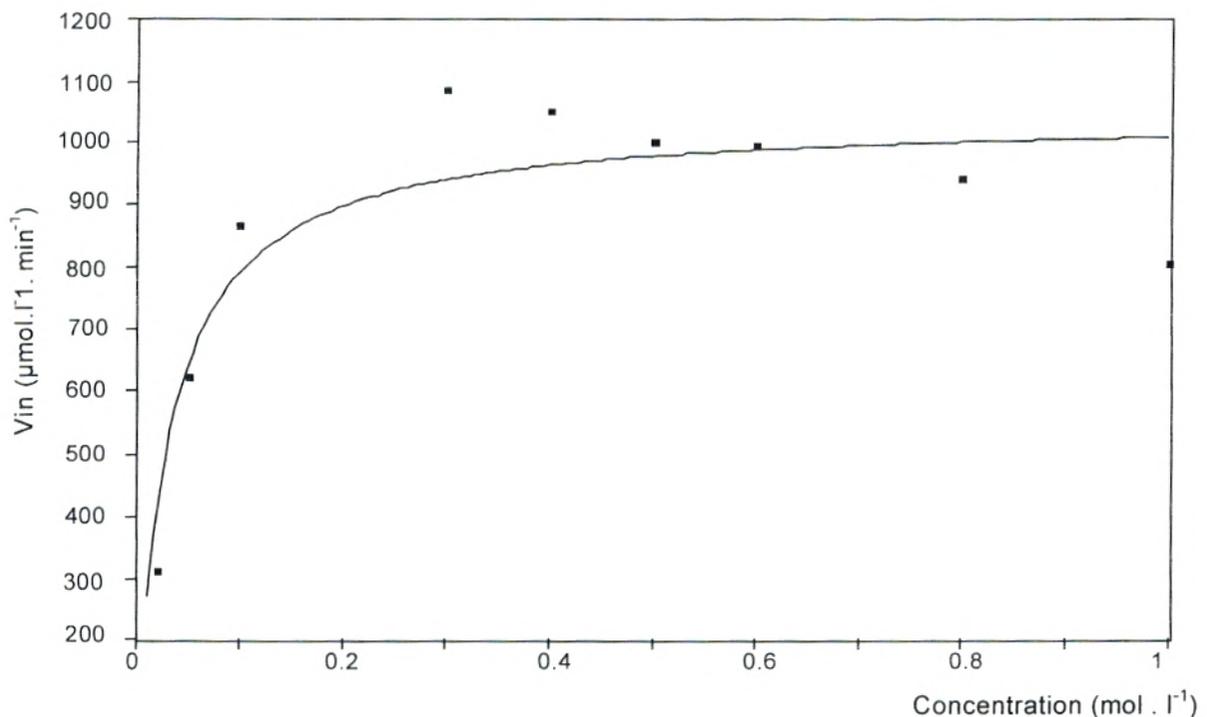


Figure n°15 : Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat suivant l'équation de Michaelis – Menten

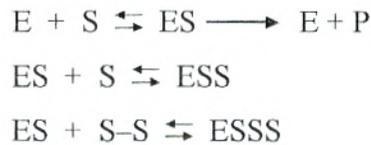
A partir de cette courbe, on a obtenu :

$$\begin{aligned} V_{\max} &= 1034.86 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1} \\ K_m &= 0.0314 \text{ mol.l}^{-1} \\ r^2 &= 0.819 \end{aligned}$$

Un coefficient de corrélation (r^2) aussi faible indique que l'équation choisie n'est pas adéquate, ce qui était prévisible puisqu'elle est valable pour une enzyme ne subissant pas d'inhibition ; or l'on sait que l'invertase est inhibée par son substrat et par ses produits.

Lors de la mesure des vitesses initiales d'hydrolyse, l'on peut considérer que seule l'inhibition par le substrat se manifeste.

Combes et Monsan (1984) considèrent que, quand la concentration en saccharose augmente, des liaisons hydrogènes intermoléculaire apparaissent ayant pour résultat une agrégation du substrat. Le schéma de la réaction est alors le suivant :



Aux concentrations élevées en saccharose, des liaisons hydrogène intermoléculaire apparaissent ; cela aboutit à une agrégation du saccharose, et à la formation de différents complexes enzyme – substrat (ES, ESS et ESSS).

Pour prendre en compte ces phénomènes, deux nouvelles constantes sont introduites dans l'équation n°1. Ces constantes (K_s et K'_s) sont définies par les équations n°2 et n°3.

$$K_s = \frac{[ES] \times [S]}{[ESS]} \quad (\text{éq. n}^\circ 2)$$

$$K'_s = \frac{[ES] \times [S-S]}{[ESSS]} \quad (\text{éq. n}^\circ 3)$$

Où S-S est un dimère résultant de l'agrégation de deux molécules de saccharose, et ESS et ESSS sont des formes inactives de l'enzyme. On obtient l'équation n°4 que l'on a utilisée afin d'obtenir le graphe de la figure n°16.

$$V_{in} = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S] + [S]^2 / K_s + [S]^3 / K'_s} \quad (\text{éq. n}^\circ 4)$$

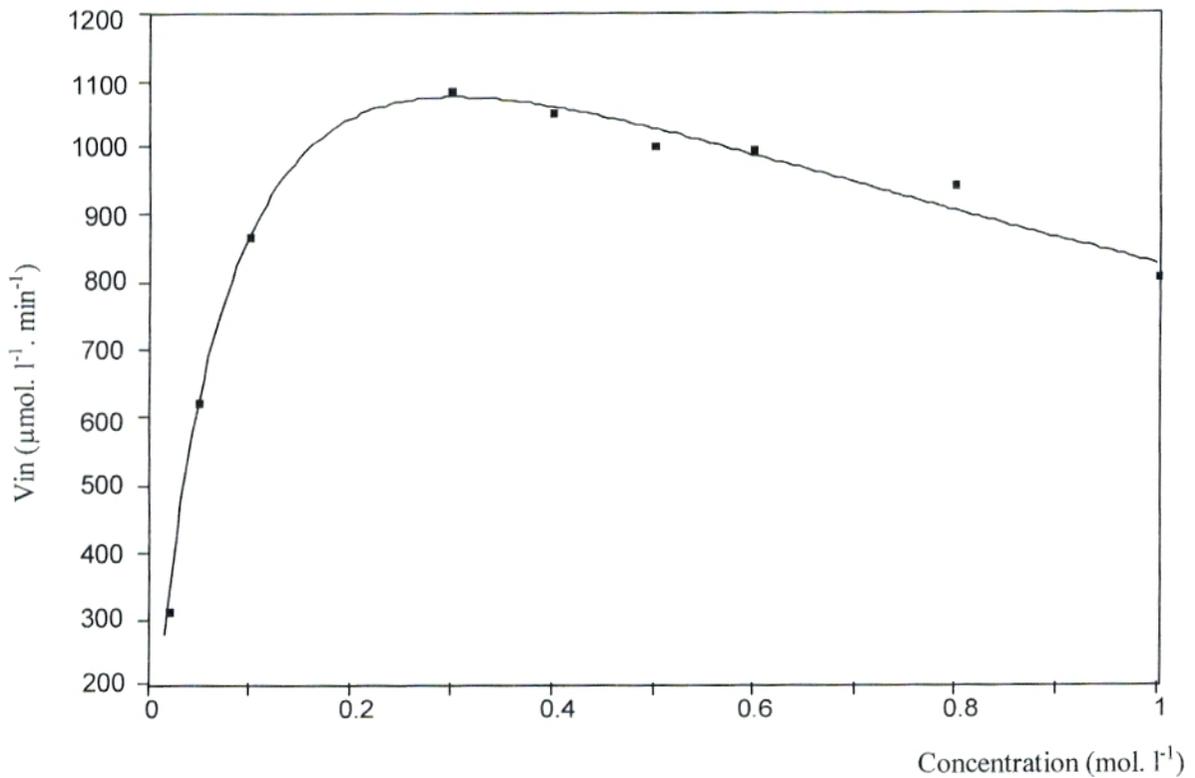


Figure n°16 : Mise en évidence de l'inhibition de l'invertase par le saccharose

Avec un r^2 égal à 0.993, ce graphe rend compte avec plus de justesse des données expérimentales obtenues. On en déduit :

$$V_{\max} = 1640.15 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

$$K_m = 0.081 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$K_S = 1.18 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$K'_S = 15.15 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$r^2 = 0.993$$

I. 4. Effet de la température

L'activité de l'enzyme est fonction de la température à laquelle la réaction est effectuée.

Berset (1993) indique que l'activité catalytique augmente avec l'élévation de la température comme avec un catalyseur chimique. Toutefois, à partir d'une température critique, il y a perte d'activité due à la dénaturation de l'enzyme. L'activité est maximale à la température optimale, celle-ci est proche de la température critique.

C'est pourquoi lors d'une détermination d'activité, il est souhaitable de travailler à une température inférieure à cette température optimale. (Coutouly, 1991)

L'étude de l'effet de la température sur l'activité est effectuée avec une solution de saccharose 0.5 M, le tampon acétate 0.1M, pH 4.8 comme solvant, une préparation enzymatique diluée 300 fois pour les températures allant de 25 °C à 45°C, et 600 fois de 50°C à 75°C. La figure n°17 présente les résultats obtenus.

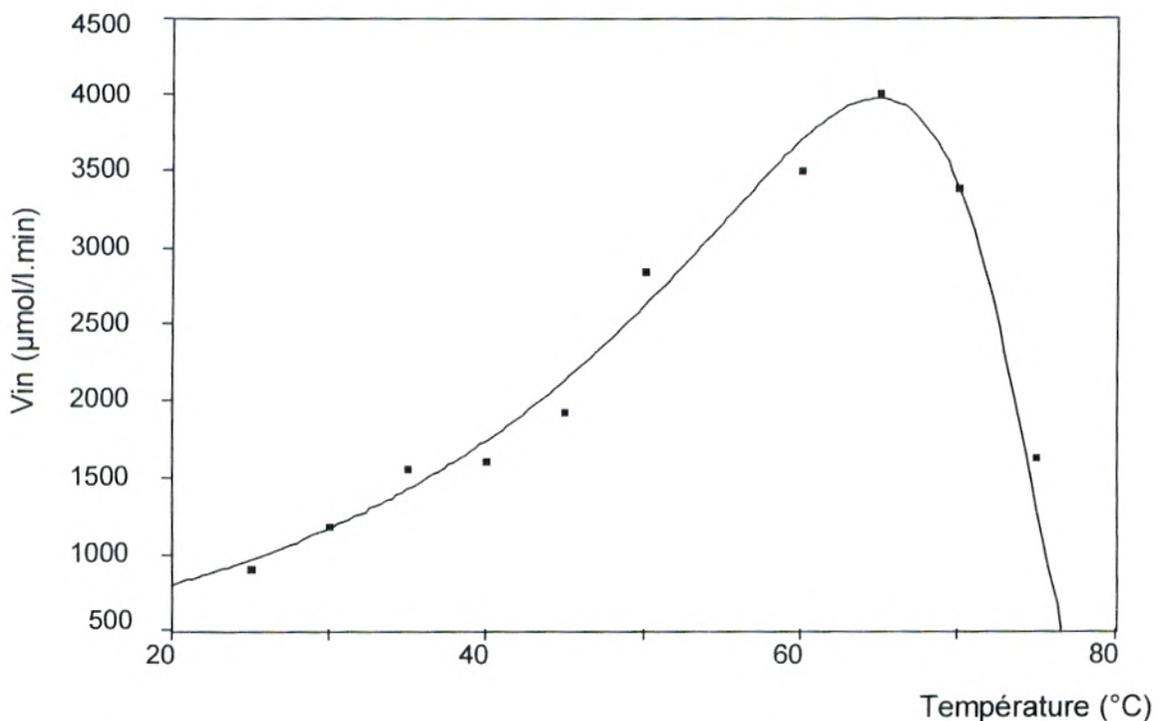


Figure n°17 : Effet de la température sur l'activité de l'enzyme libre

On remarque que la température à laquelle la préparation enzymatique montre l'activité la plus élevée est 65°C. L'activité chute ensuite pour ne représenter à 75°C que 40 % de l'activité maximale. L'enzyme est alors exposée à des températures supérieures à sa température critique, auxquelles l'effet de son inactivation devient visible.

II. Etude de l'enzyme immobilisée dans des billes d'alginate de calcium

II. 1. Optimisation des paramètres d'immobilisation

II. 1. 1. Volume d'enzyme immobilisée

Pour des billes à 3 % d'alginate (p/v), nous avons fait varier le volume de la préparation enzymatique confinée dans ces billes afin de rechercher le meilleur rendement d'immobilisation.

Le volume final du gel d'alginate est de 10 ml pour 0.3 g de poudre d'alginate de sodium, et le volume d'enzyme représente entre 0.5 et 4 ml de ces 10 ml.

Pour chaque volume d'enzyme testé, l'activité est dosée en incubant une bille avec du saccharose 0.5 M, dans du tampon acétate 0.1 M pH 4.8, dans des conditions opératoires standards ; les concentrations en produits d'hydrolyse formés sont ensuite déterminées.

La figure n°18 présente les résultats obtenus.

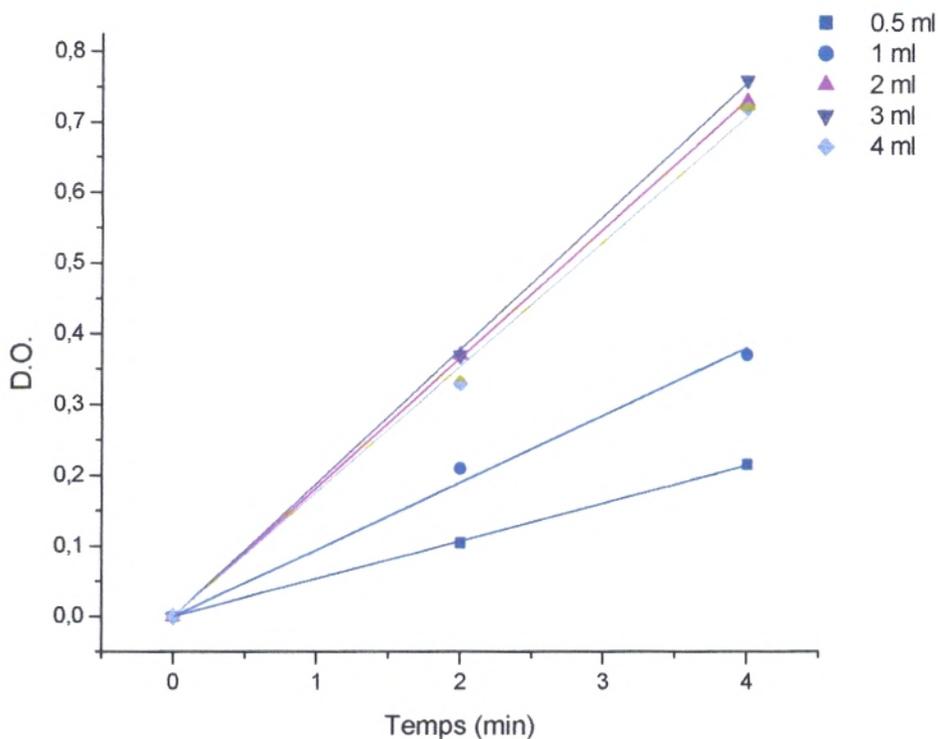


Figure n°18 : Evaluation de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction du volume d'enzyme immobilisé

On remarque que les billes formées avec 3 ml d'enzyme sont celles ayant la vitesse initiale la plus élevée (elles permettent d'atteindre les D.O. les plus élevées). Cependant, en termes d'activité volumique, ce ne sont pas les plus efficaces.

Les billes contenant 0.5 ml d'enzyme présentent en fait l'activité volumique la plus élevée ; celles formées avec 1 ml et 2 ml d'enzyme ont des activités comparables, alors que les billes formées avec 3 ml ou 4 ml d'enzyme ont les activités les plus faibles. Le tableau n°4 récapitule les résultats obtenus.

La figure n°19 représente l'activité relative des billes (activité volumique rapportée à la plus grande activité volumique obtenue) en fonction du volume d'enzyme utilisé.

Le plus haut pourcentage de l'activité correspond à 0.5 ml d'enzyme immobilisée, mais aussi à une vitesse initiale faible (une quantité relativement faible de saccharose est hydrolysée par unité de temps) ; cette concentration est donc inadaptée à une application en réacteur continu, ce dernier nécessitant un rendement d'hydrolyse important.

Pour les volumes d'enzyme de 3 et 4 ml, la baisse d'activité peut être due à un encombrement au sein de la bille, ou alors à une mauvaise orientation des molécules enzymatiques (site actif masqué).

Afin d'avoir le meilleur compromis entre activité volumique et vitesse initiale d'hydrolyse, nous avons choisi d'utiliser des billes d'alginate de calcium avec 2 ml d'enzyme immobilisée. Ces billes conduisent à la deuxième vitesse initiale la plus élevée et n'ont que 16 % d'activité volumique en moins par rapport aux billes contenant 0.5 ml d'enzyme (les billes contenant 3 ml et 4 ml d'enzyme ont respectivement 40 % et 60 % d'activité en moins par rapport aux billes contenant 0.5 ml d'enzyme).

Tableau n°4 : Activités des billes selon le volume d'enzyme immobilisée

	Volume d'enzyme (ml) + Volume de solvant (ml)				
	0.5 + 9.5	1 + 9	2 + 8	3 + 7	4 + 6
Pente (D.O. min⁻¹)	0.0535	0.0955	0.18	0.19	0.175
Vin (μmol. l⁻¹. min⁻¹)	174.83	312.09	588.23	620.91	571.89
AV (UI ml⁻¹)	209.796	187.25	176.47	124.18	85.78

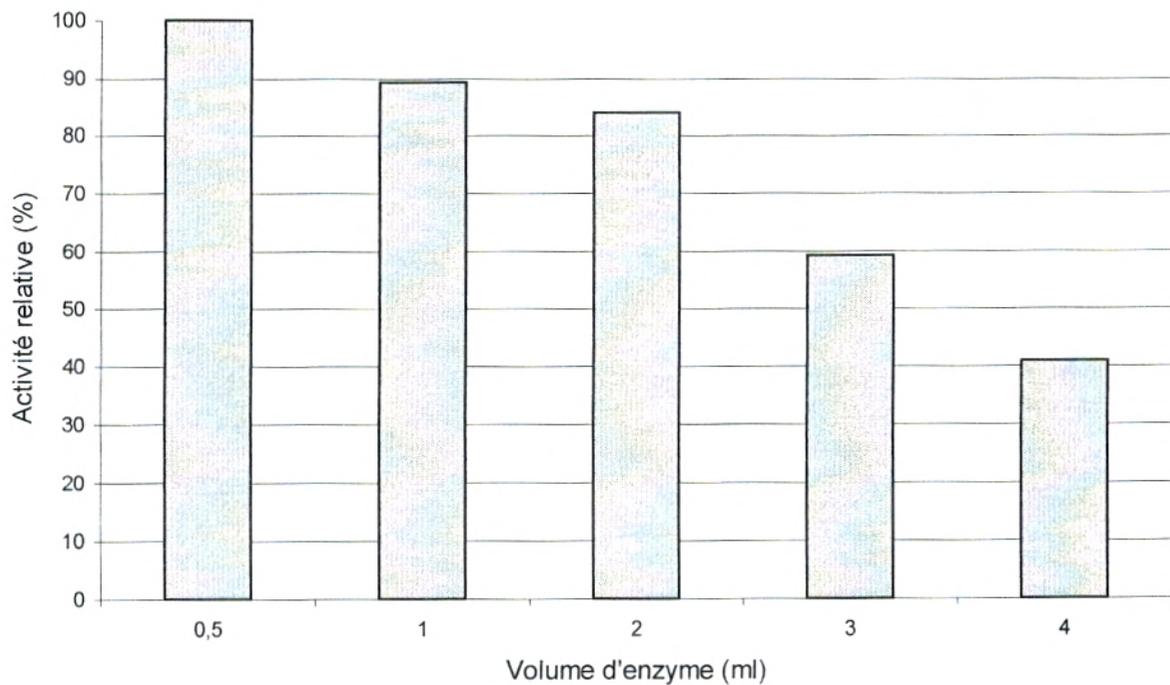


Figure n°19 : Activités volumiques en fonction de la quantité d'enzyme immobilisée

II. 1. 2. Réticulation par le glutaraldéhyde

Sachant que le glutaraldéhyde est un réactif très utilisé pour la réticulation d'enzymes incluses dans des billes de gel, nous avons testé l'ajout de différents volumes de ce réactif au gel d'alginate.

Nous avons réalisé des immobilisations sans réticulation puis avec, mais lorsque l'on ajoutait directement le glutaraldéhyde (1 ml) dans le gel en cours de préparation, les activités obtenues étaient faibles. Nous avons alors ajouté le glutaraldéhyde (2 ml puis 1 ml) dans la solution de CaCl_2 , c'est à dire dans la dernière étape de la formation des billes. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°5.

Tableau n°5 : Comparaison entre les différentes préparations de billes d'enzyme immobilisée

Billes d'alginate	Sans glutaraldéhyde	Avec glutaraldéhyde (25%)			
		Dans le gel 2.5 %	Dans la solution de CaCl_2		
			0.5 %	0.25%	
V_{in} ($\mu\text{mol. l}^{-1}. \text{min}^{-1}$)	757.77	436.31	672.2	1152.54	1477.4
AV (UI ml^{-1})	227.33	130.89	201.81	345.76	443.22
r^2	0.998	0.998	0.998	0.998	0.997
Activité relative (%)	100	57.6	88.8	152.1	194.4

Compte tenu de ces résultats, nous avons utilisé pour le reste du travail des billes d'alginate préparées avec 2 ml d'enzyme, et polymérisées dans une solution de CaCl_2 contenant de glutaraldéhyde 0.25 % (v/v) (soit 1 ml de glutaraldéhyde 25 % dans 100 ml de CaCl_2).

Les activités volumiques obtenues, grâce à ce dernier procédé, sont 1.5 à 2 fois supérieures à celles des billes non réticulées.

Ce résultat peut être expliqué par des conditions plus douces d'immobilisation ayant pour conséquence une disposition plus favorable des enzymes à l'intérieur du réseau formé par le gel, et un masquage moins important des sites actifs.

II. 2. Effet du pH sur l'enzyme immobilisée

De la même façon que pour l'enzyme soluble, une gamme de solutions de saccharose 0.5 M dans du tampon acétate 0.1M est préparée à des pH allant de 3.6 à 5.6.

A 25 °C et pour chaque pH étudié, une bille d'enzyme immobilisée est incubée dans un mélange formé de 0.75 ml de solution tamponnée de saccharose 0.5 M et de 0.25 ml de solution tampon acétate 0.1 M. Afin d'utiliser la méthode des deux points, l'incubation se fait durant 2.5 min et 4 min.

La figure n°20 donne ses activités relative pour l'enzyme soluble et pour l'enzyme immobilisée en fonction du pH.

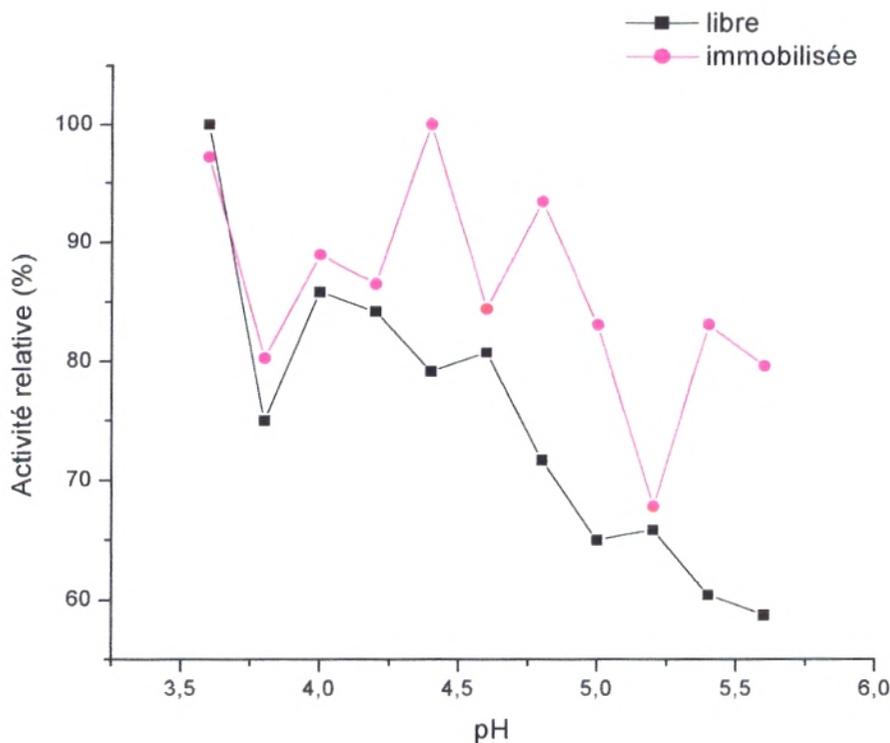


Figure n°20 : Comparaison de l'effet du pH sur les activités de l'enzyme soluble et de l'enzyme immobilisée dans des billes d'alginate de calcium

À l'inverse de l'enzyme soluble pour laquelle l'activité ne présente pas de variations notables hormis trois pics de pH, pour l'enzyme immobilisée l'activité maximale est enregistrée au pH 3.6, puis l'activité diminue pour ne représenter que 71 % de la valeur maximum à pH 4.8 et 58 % de cette valeur à pH 5.6.

Berset (1993) signale que de nombreux chercheurs ont observé une différence de pH optimal, pouvant aller jusqu'à deux unités, selon que l'enzyme étudiée était immobilisée ou en solution. Elle ajoute qu'un tel phénomène peut s'expliquer aisément lorsque le support solide comporte de nombreux groupes dissociés.

II. 3. Effet de la concentration de substrat

Des solutions de saccharose, dans du tampon acétate 0.1 M pH 4.8, sont préparées pour des concentrations allant de 0.1 M à 1 M. L'activité d'une bille d'alginate est dosée dans les conditions opératoires standards, à 25°C.

Nous avons d'abord testé l'équation de Michaelis – Menten, comme pour la figure n° 15 le résultat est peu représentatif des données expérimentales obtenues. (Figure n°21)

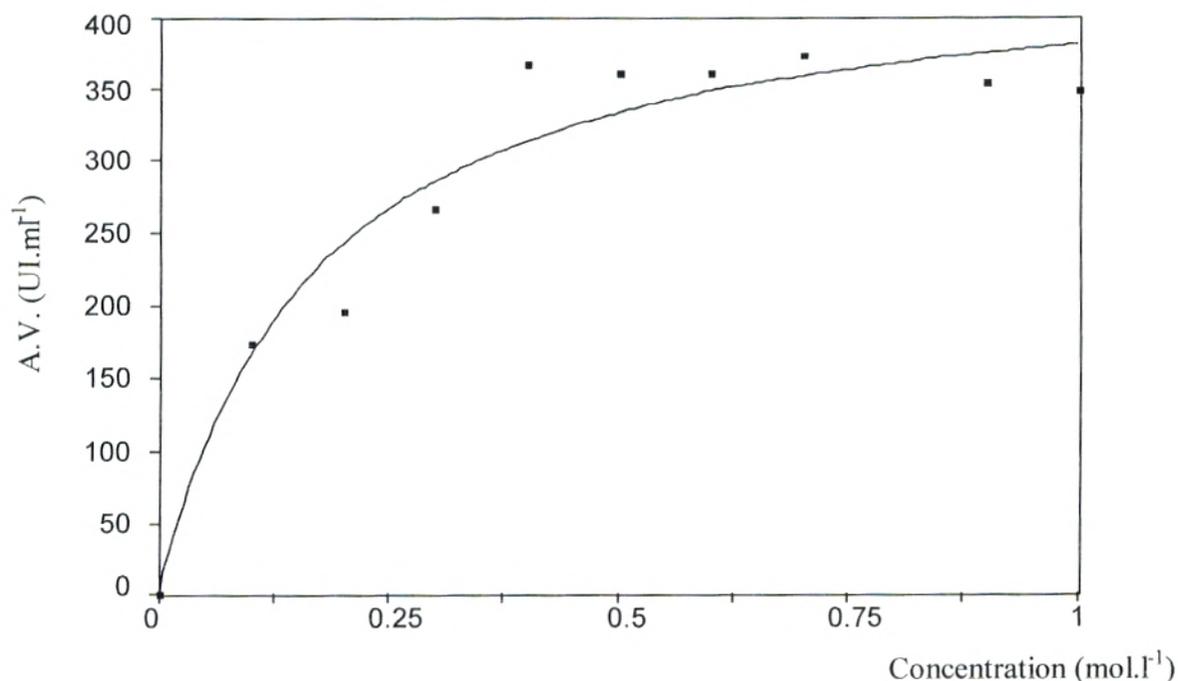


Figure n°21 : Représentation de Michaelis Menten appliquée à l'enzyme immobilisée dans des billes d'alginate de calcium

Avec un r^2 égal à 0.939, on obtient les valeurs suivantes :

$$\begin{aligned}
 V_{\max} &= 445.56 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1} \\
 K_m &= 0.169 \text{ mol.l}^{-1} \\
 r^2 &= 0.939
 \end{aligned}$$

Nous avons choisi de tester l'équation n°5 qui ne comporte qu'une seule constante d'inhibition puisque l'enzyme est confinée dans le gel d'alginate et que le substrat se concentre relativement difficilement dans ce support.

$$V_m = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S] + [S]^2 / K_s} \quad (\text{éq. n}^\circ 5)$$

On obtient alors le graphe de la figure n°22.

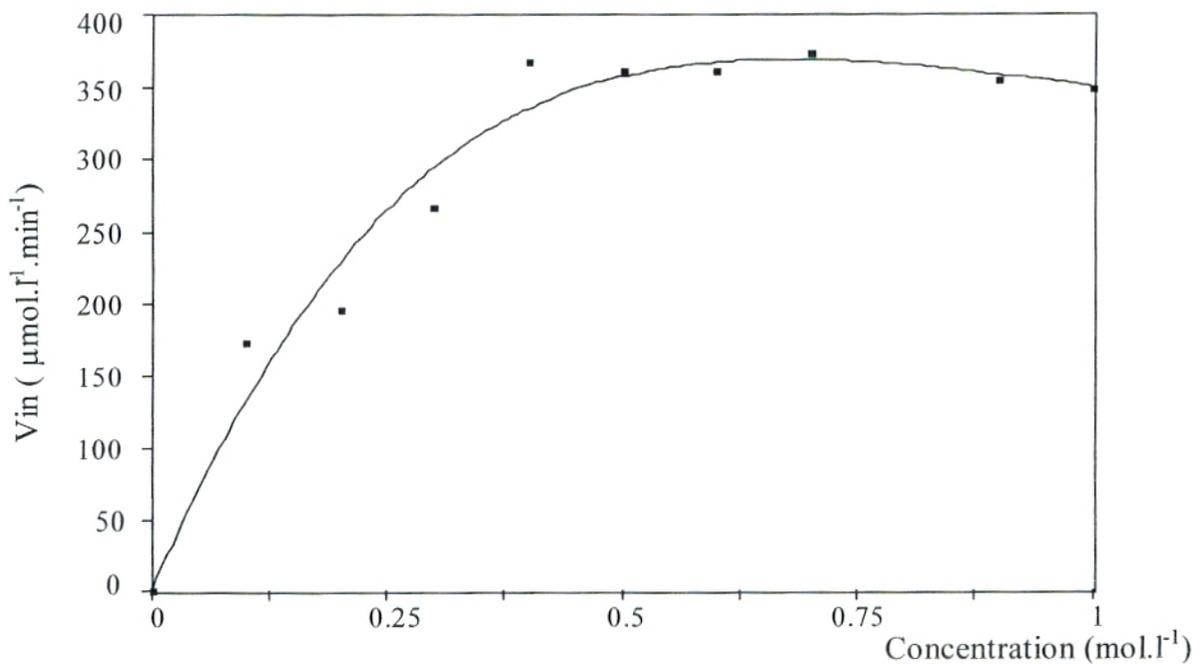


Figure n°22 : Effet de la concentration en substrat sur l'enzyme immobilisée

Le r^2 pour cette représentation est supérieur à celui obtenu précédemment, il est égal à 0.965 ; les constantes cinétiques sont :

$$\begin{aligned} V_{\max} &= 1399.11 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1} \\ K_m &= 0.946 \text{ mol.l}^{-1} \\ K_s &= 0.485 \text{ mol.l}^{-1} \\ r^2 &= 0.965 \end{aligned}$$

On remarque que le V_{\max} de l'enzyme immobilisée est proche du V_{\max} de l'enzyme libre qui est de 1640 $\mu\text{mol/l. min}$, le V_{\max} n'a donc pas subi de variations importantes.

En revanche, le K_m de l'enzyme immobilisée est 30 fois supérieur au K_m de l'enzyme soluble. Ainsi, pour atteindre une vitesse d'hydrolyse donnée, l'enzyme immobilisée devra être placée dans un milieu beaucoup plus riche en saccharose que le milieu dans lequel sera placée l'enzyme soluble.

On sait que l'affinité du substrat pour le support va conditionner la valeur du K_m de l'enzyme.

Lorsque le support et le substrat sont chargés électriquement, il se crée dans l'environnement immédiat de l'enzyme des interactions électrostatiques, attractives ou répulsives, avec pour conséquence l'établissement d'un gradient de concentration du substrat et une variation de l'affinité apparente de l'enzyme pour son substrat ; alors, K_m augmente si les charges du substrat et du support sont de même signe ; ou K_m diminue si les charges sont de signes opposés.

Par ailleurs, il faut aussi tenir compte des limitations diffusionnelles qui peuvent ralentir la pénétration du substrat dans les particules de gel contenant l'enzyme immobilisée.

II. 4. Effet de la température

On détermine l'activité d'une bille d'alginate contenant l'enzyme immobilisée placée dans une solution de saccharose 0.5 M, dans du tampon acétate 0.1 M pH 4.8, et ce à différentes températures, comprises entre 25 °C et 75 °C.

Cette expérience a pour but de déterminer la température la plus élevée à laquelle la préparation d'enzyme immobilisée pourrait être utilisée dans un bioréacteur.

Berset (1993) précise que la résistance accrue à la chaleur d'une préparation enzymatique peut avoir des répercussions technologiques importantes, en permettant de travailler à des températures où les développements bactériens sont freinés ou stoppés, ce qui améliore la qualité sanitaire du produit et prolonge la vie des réacteurs.

La figure n°23 compare les effets de la température sur l'activité de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée.

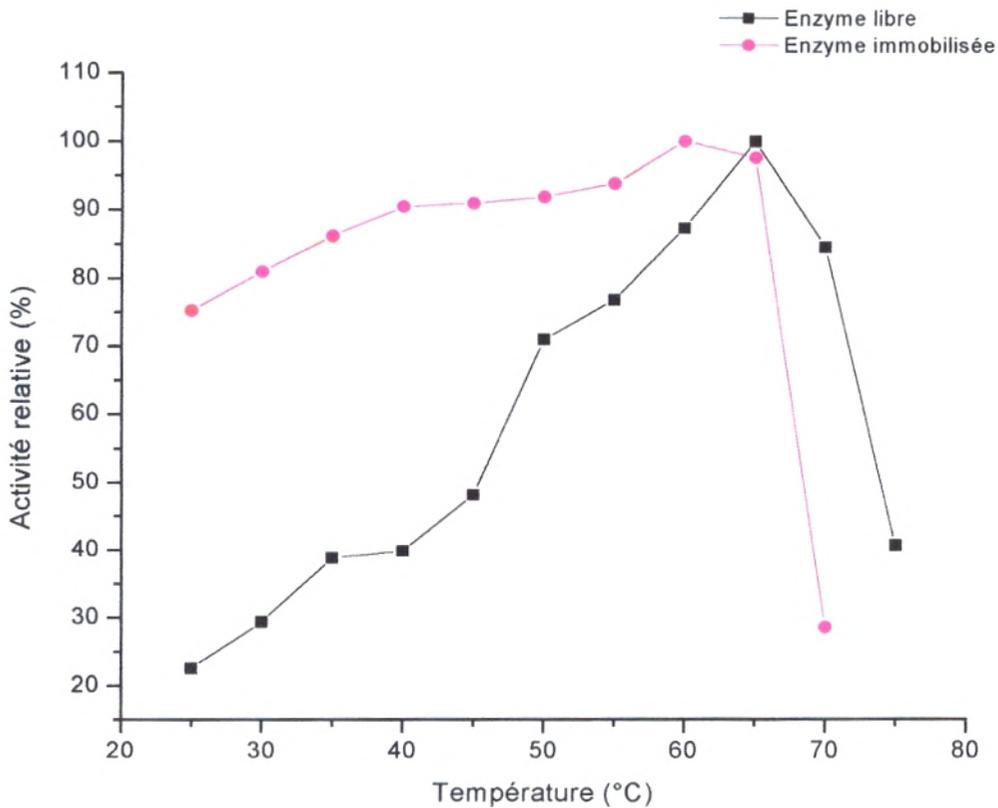


Figure n°23 : Comparaison de l'effet de la température sur les activités de l'enzyme soluble et l'enzyme immobilisée en gel d'alginate de calcium

On note, de prime abord, que les comportements des deux formes d'enzymes sont différents. L'allure de la courbe correspondant à l'enzyme libre est progressive surtout dans sa partie ascendante ; alors que la courbe correspondant à l'enzyme immobilisée accède rapidement à un palier puis chute brusquement après 65°C.

On remarque que l'activité maximale de l'enzyme immobilisée est atteinte dès 60°C et reste pratiquement inchangée à 65°C où l'activité de l'enzyme soluble est maximale.

Les deux formes d'enzymes ont donc des températures optimales analogues.

L'on note aussi que l'activité de l'enzyme immobilisée n'augmente que de 25 % entre 25°C et 60°C ; alors que pour l'enzyme libre, elle augmente de 77.5 % entre 25°C et 65°C. Après 65°C, l'activité de l'enzyme immobilisée chute brusquement et ne conserve que 28 % de son activité maximale à 70 °C.

III. Etude du réacteur enzymatique à lit fixe

III. 1. Etude de la distribution des temps de séjours

Pour un réacteur continu de volume V , parcouru par un débit D , le temps de passage τ est défini comme étant le temps nécessaire à un volume V de fluide pour sortir du réacteur.

On a :

$$\tau = \frac{V}{D}$$

Soit un réacteur continu de volume V , parcouru par un débit D ; un volume de fluide entrant dans le réacteur à un instant t donné séjourne en moyenne pendant le temps τ dans le réacteur. En fait, le fluide entré à l'instant t dans le réacteur se mélange avec le liquide en amont et en aval et donc il ne quitte pas le réacteur en une seule fois au temps $t + \tau$.

La sortie du fluide entré à l'instant t dans le réacteur se fait progressivement et on parle d'une distribution des temps de séjour (DTS) des différentes fractions de ce fluide dans le réacteur. On définit la fonction DTS notée $E(t_s)$ qui est telle que $E(t_s).dt_s$ est la fraction du débit de sortie contenant des molécules d'âge compris entre t_s et $t_s + dt_s$. On a aussi

$$\int_0^{\infty} E(t_s).dt_s = 1$$

Cette fonction DTS renseigne sur la manière dont s'effectue l'écoulement des fluides dans le réacteur, et permet d'évaluer l'écart de comportement d'un réacteur réel à un réacteur idéal. La procédure, permettant de tracer la courbe de distribution des temps de séjour du fluide dans le réacteur, consiste à injecter un traceur à l'entrée du réacteur fonctionnant en régime stationnaire et à mesurer la concentration en traceur à la sortie du réacteur en fonction du temps de séjour.

Nous avons utilisé un colorant chimique le méthyle orange. Il suffit d'une poussière de ce colorant pour avoir une solution orange lisible à 530 nm.

A un instant donné (temps 0), on a injecté un volume donné de traceur dans la solution qui alimentait le réacteur, puis mesuré la coloration de la solution à la sortie du réacteur.

Après différents essais, nous avons obtenu les graphes de la figure n°24 pour une température de 40 °C, pour les trois concentrations en saccharose 0.2 M (graphe a), 0.5 M (graphe b), et 0.8 M (graphe c). On constate que les trois graphes indiquent la présence d'un volume mort dans le réacteur puisque les trois courbes présentent une traînée à la fin. Il en résulte que le flux à l'intérieur de la colonne n'est pas réparti de manière homogène puisqu'il ne peut accéder à toutes les parties du lit fixe.

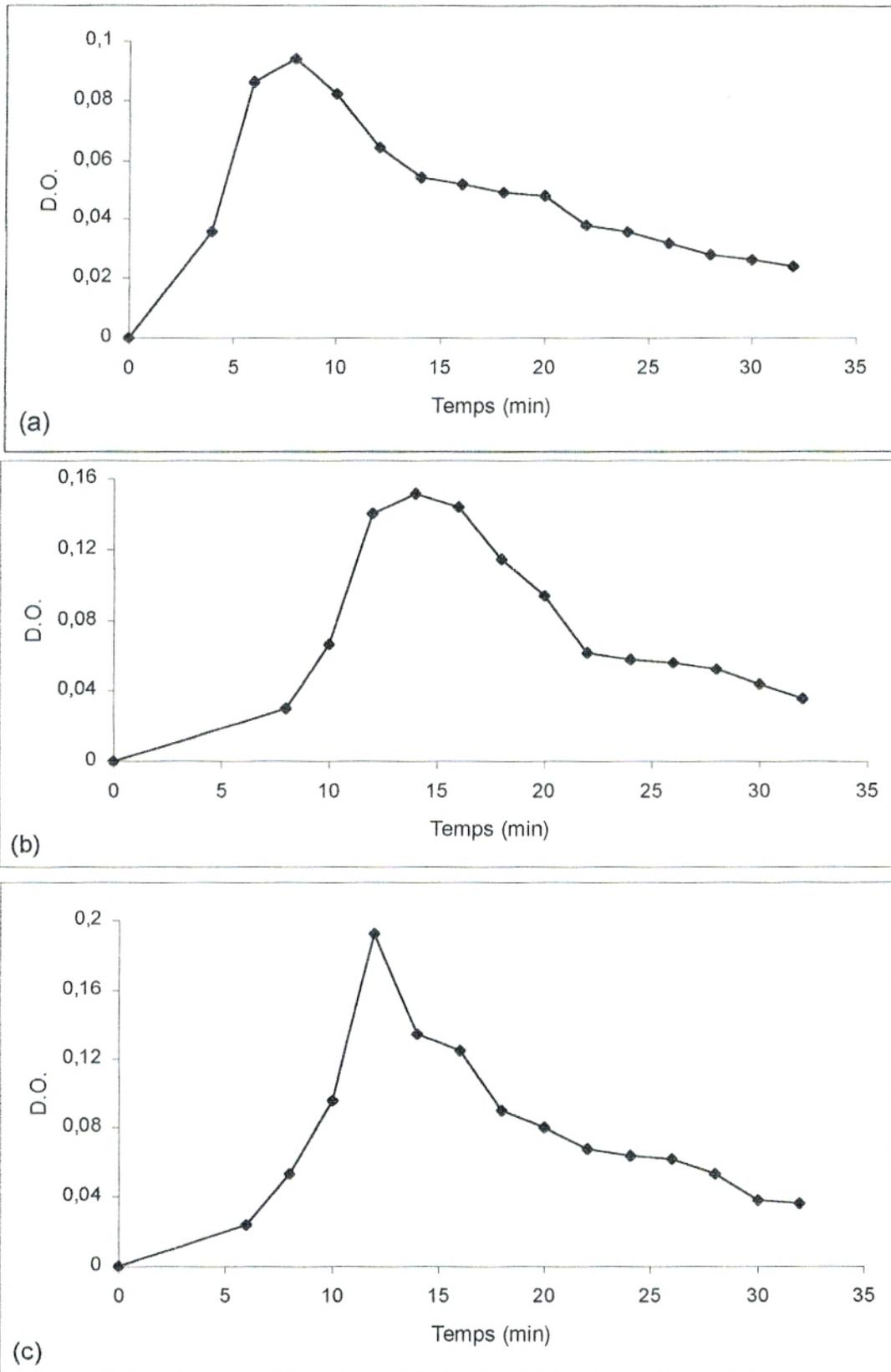


Figure n°24 : Evolution au cours du temps de la concentration en traceur à la sortie du réacteur . Débit d'alimentation du réacteur 0.86 ml/min, Température : 40 °C, Concentration en saccharose : (a) 0.2M ; (b) 0.5 M ; (c) 0.8 M.

La courbe D.T.S. permet de modéliser le fonctionnement du réacteur réel. Le modèle de la cascade de réacteurs parfaitement agités de même volume s'adapte bien aux réacteurs à lit fixe. Ce modèle assimile les vides entre les grains de particules du garnissage à une série de petits réacteurs successifs où la turbulence réalise un mélange uniforme. Le paramètre de ce modèle est le nombre N de réacteurs idéaux en série.

Levenspiel (1972) a proposé l'équation suivante (eq. n°6),

$$E_{\theta} = (N\bar{t})E = \frac{N(N\theta)^{N-1}}{(N-1)!} e^{-N\theta} \quad (\text{équation n°6})$$

où N est le nombre de réacteurs en série

$$\theta = \frac{t}{\bar{t}}$$

θ est un nombre adimensionnel utilisé dans le but de normer le temps.

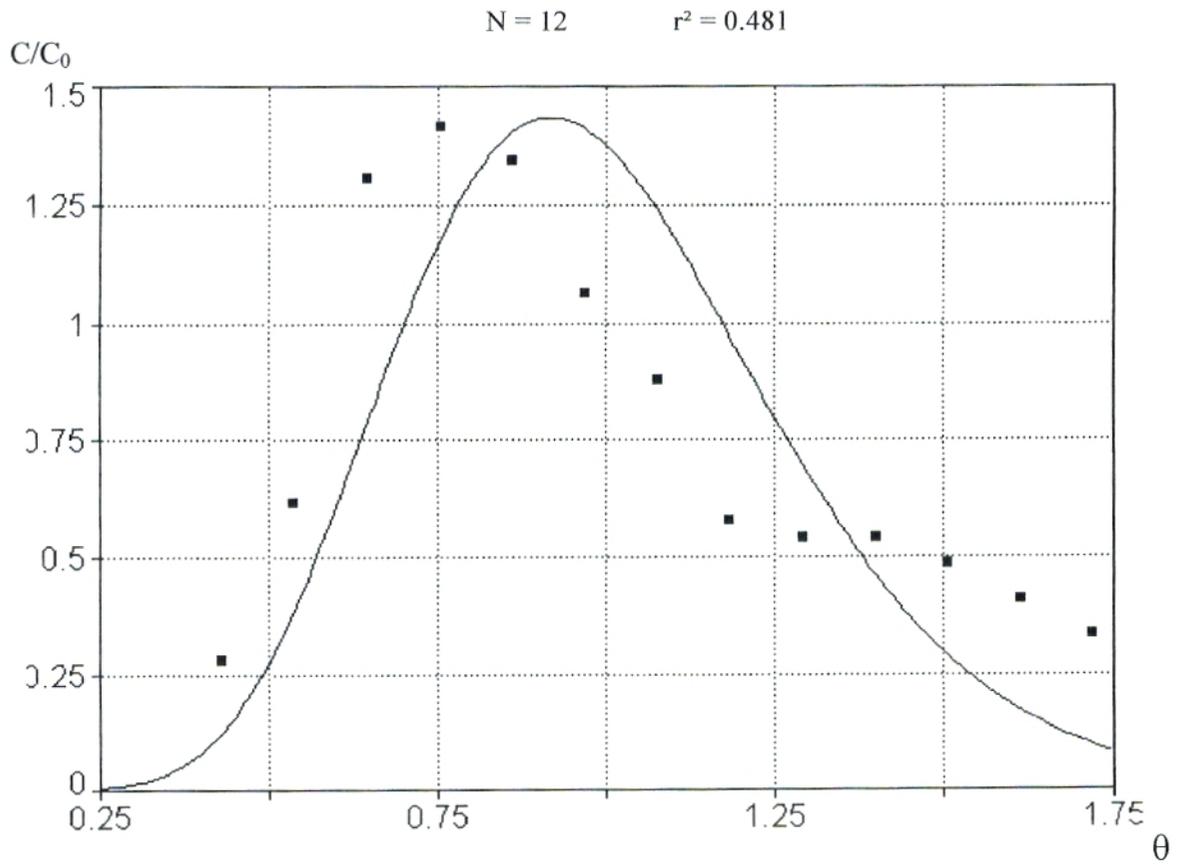
\bar{t} : est le temps de séjour moyen, défini comme étant le temps réel moyen passé par le substrat dans le réacteur ; c'est un paramètre expérimental déterminé à partir de la distribution des temps de séjour.

L'application de l'équation n°6 à nos données expérimentales a conduit aux résultats présentés dans les figures n° 25, 26, 27.

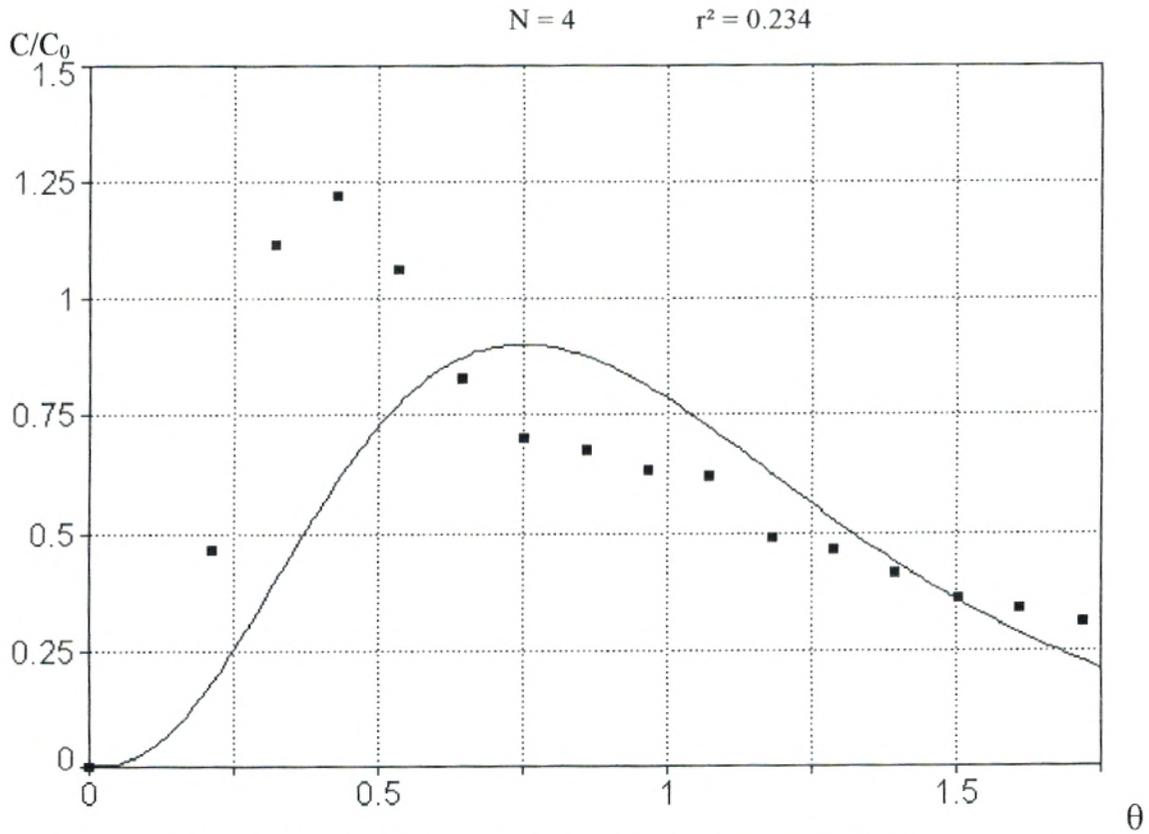
Les figures n° 25, 26, et 27 permettent de constater que l'équation testée n'ajuste pas correctement nos données expérimentales.

Compte tenu des r^2 assez faibles, on peut juste dire que le nombre de réacteurs pourrait atteindre 4 pour 0.2 M, 12 pour 0.5 M, et 10 pour 0.8 M et ce pour un débit de 0.86 ml/min.

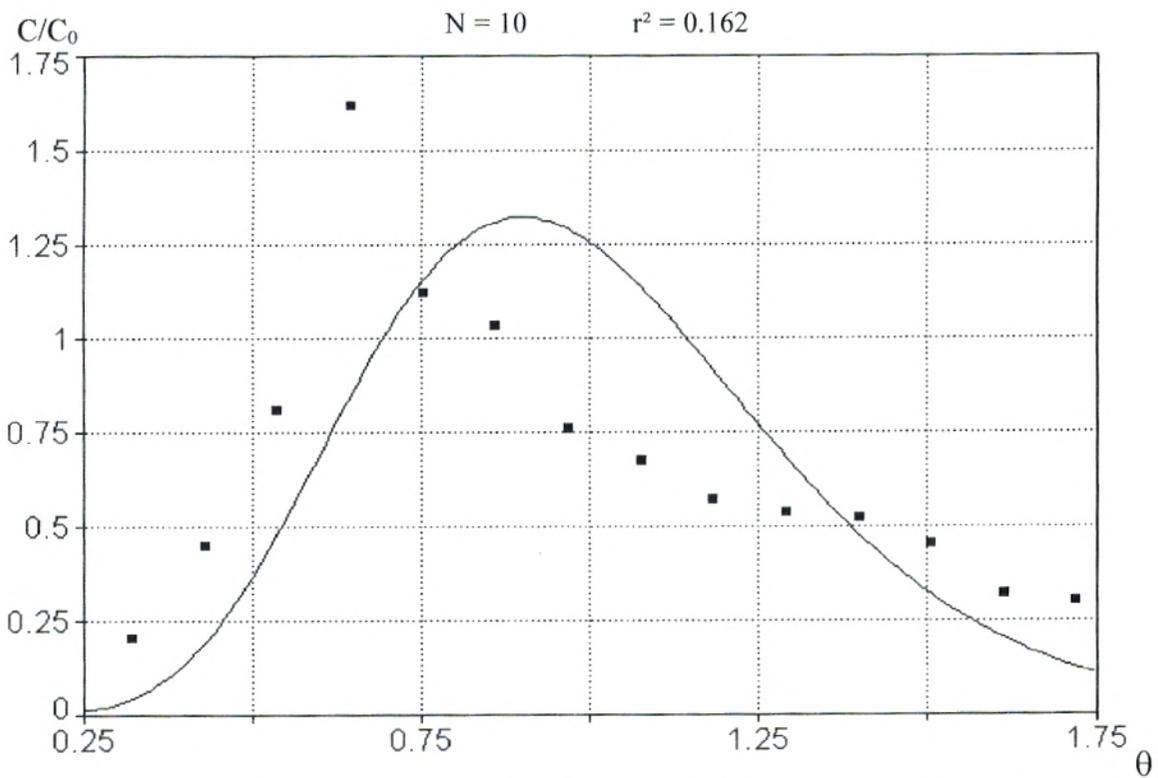
En fin de compte, ce test avec le méthyle orange s'est révélé peu concluant, un autre traceur permettrait peut être d'obtenir de meilleurs résultats.



**Figure n°25 : D.T.S. du réacteur à lit fixe. Débit d'alimentation 0.86 ml/min.
Température : 40 °C, Concentration: 0.5 M.**



**Figure n°26 : D.T.S. du réacteur à lit fixe. Débit d'alimentation 0.86 ml/min.
Température : 40 °C, Concentration: 0.2 M.**



**Figure n°27 : D.T.S. du réacteur à lit fixe. Débit d'alimentation 0.86 ml/min.
Température : 40 °C, Concentration: 0.8 M.**

III.2. Hydrolyse continue du saccharose en réacteur à lit fixe

Différents réacteurs sont réalisés pour trois concentrations en substrat 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M, et avec la quantité de billes d'enzymes immobilisées correspondant à 10 ml de gel d'alginate. Pour chaque concentration en substrat, les réacteurs sont soumis à différentes conditions de fonctionnement. On a testé deux températures 25°C et 40°C, et deux, voire trois débits d'alimentation : 0.86 ml/min, 1.6 ml/min, et 0.3 ml/min. Chaque essai se déroulait sur deux jours consécutifs mais était interrompu en fin de la première journée et repris le lendemain. Durant cette interruption, le réacteur n'était plus alimenté en substrat.

On a constaté dès les premiers essais en continu qu'après quelques heures d'écoulement de la solution de saccharose préparée dans du tampon acétate 0.1 M, pH 4.8, les billes d'alginate gonflent, probablement en raison d'un échange entre les ions sodium du tampon et les ions calcium des billes. Afin d'éviter cet inconvénient, on rajoute à la solution de saccharose qui alimente le réacteur du CaCl₂ à 1% (p/v).

Nous avons aussi noté un rétrécissement du garnissage (hauteur initiale de 14 cm passant à 12 cm) après quelques minutes d'écoulement du substrat, ceci est peut être due à la viscosité du saccharose ainsi qu'au débit constant exercé.

III. 2. 1. Essais à 25°C

a) Résultats pour le débit de 0.86 ml/min

Les courbes enregistrées montrent une ascension rapide vers un plateau indiquant une phase stationnaire. (voir graphes a, b, c de la figure n°28)

Les conversions maximales, pour ce débit, sont données dans le tableau n°6.

Tableau n°6 : Conversions maximales à 25 °C pour un débit de 0.86 ml/min

Concentration (M)	Jour	Conversion (%)
0.2	1 ^e	98.9
	2 ^e	98.8
0.5	1 ^e	88.5
	2 ^e	75.5
0.8	1 ^e	27.3
	2 ^e	24.1

On remarque que les conversions les plus élevées correspondent à la concentration en substrat de 0.2 M. Elles restent à peu près inchangées durant deux jours consécutifs de manipulation ; même si l'état stationnaire n'est atteint qu'après 2.5 heures pour le premier jour et après 3 heures pour le deuxième.

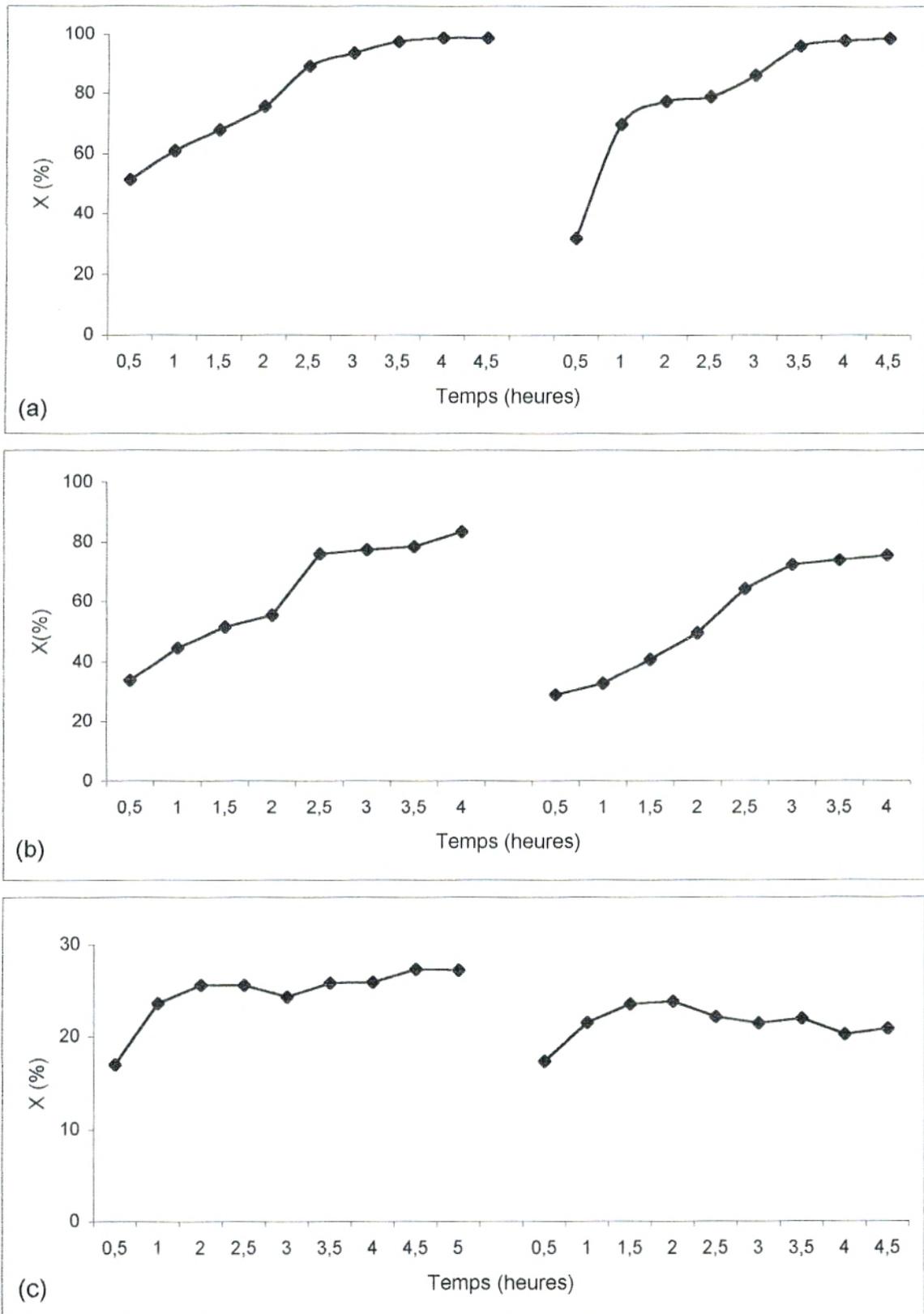


Figure n° 28 : Taux de conversion du substrat en fonction du temps.
 Température : 25 °C – Débit d'alimentation : 0.86 ml/min –
 Concentration en substrat : (a) 0.2 M ; (b) 0.5 M ; (c) 0.8 M.

Pour 0.5 M, les taux de conversion atteignent un plateau de la même façon, mais la diminution du taux de conversion est évidente ; ce taux passe de 88.5 % le premier jour à 75.5 % pour le deuxième jour. A 0.8 M, le plateau est plus vite atteint (dès la première heure), les conversions sont relativement stables, mais ce sont également les plus basses enregistrées.

b) Résultats pour le débit de 1.6 ml/min

On remarque que plus la concentration en substrat est élevée plus la phase stationnaire tarde à s’installer. Elle est apparue à 0.2 M dans l’heure qui suit le début de l’application ; mais pour 0.8 M, la phase stationnaire ne débute qu’après 3 heures d’écoulement du substrat. (graphe a, b, c de la figure n°29)

On remarque que pour le débit de 1.6 ml/min, les conversions sont plus faibles que pour le débit 0.86 ml/min. Les conversions maximales (au débit de 1.6 ml/min) sont données dans le tableau n°7.

Tableau n °7 : Conversions maximales à 25 °C pour un débit de 1.6 ml/min

Concentration (M)	Jour	Conversion (%)
0.2	1 ^e	61.1
	2 ^e	54.8
0.5	1 ^e	26.5
	2 ^e	18.5
0.8	1 ^e	15.8
	2 ^e	13.8

Sauf pour 0.2 M, l’apparition de la phase stationnaire est retardée de plus d’une heure lorsqu’on passe du débit de 0.86 ml/min au débit de 1.6 ml/min. Pour ce dernier débit, les conversions fluctuent beaucoup d’un jour au suivant.

c) Comparaison des résultats obtenus à 25 °C aux deux débits testés

On a constaté une diminution des conversions en relation avec l’augmentation du débit. A 25 °C, il est donc préférable d’utiliser non seulement un débit faible, mais aussi une concentration faible, de préférence 0.2 M, afin d’obtenir les plus hauts rendements dans des délais suffisants.

La diminution des taux de conversions entre le premier et le deuxième jour d’utilisation est manifeste ; elle est probablement due à l’accumulation du substrat et des produits provoquant une perturbation du microenvironnement à l’intérieur et autour des billes d’alginate.

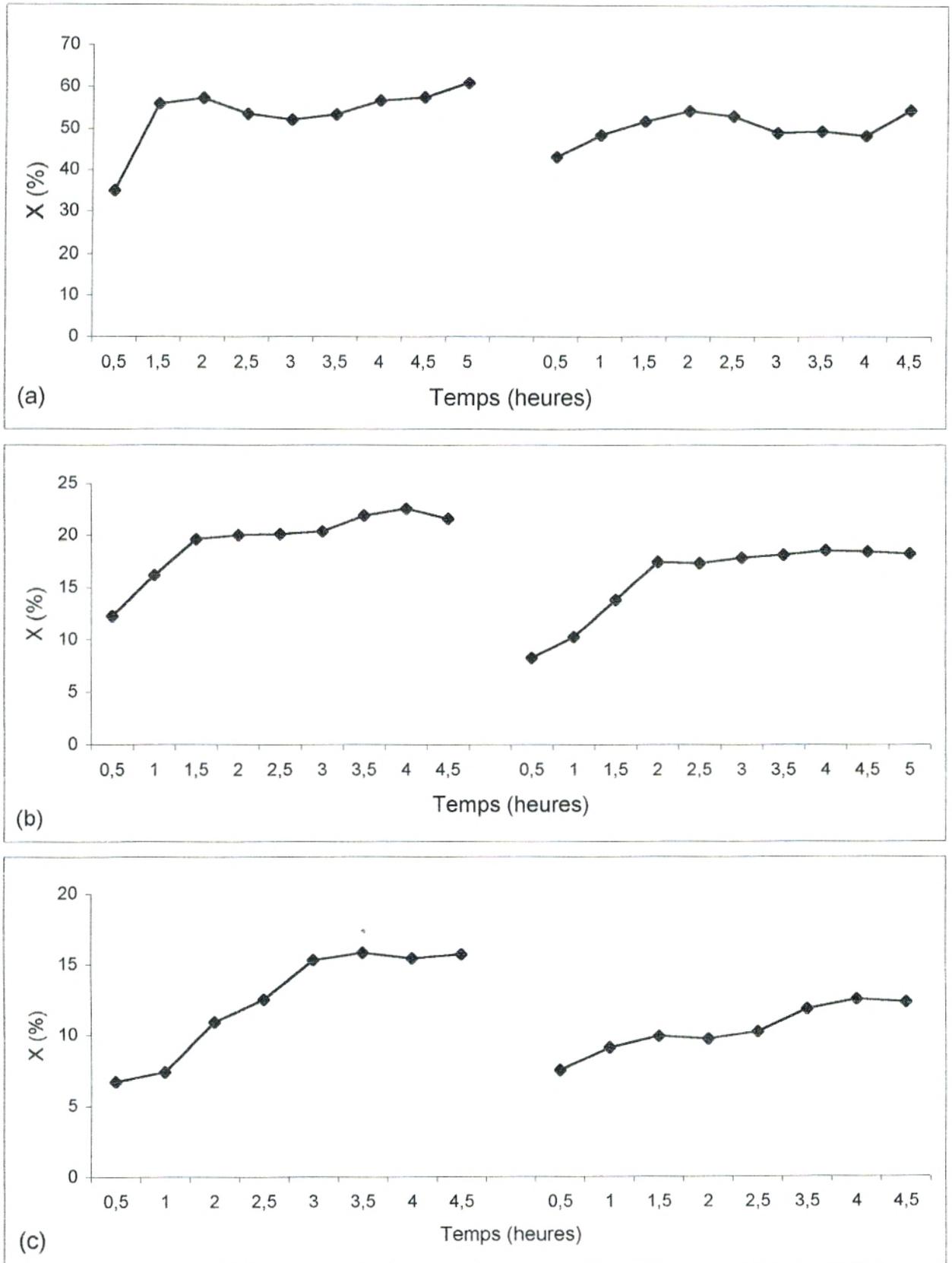


Figure n°29 : Taux de conversion du substrat en fonction du temps.

Température : 25 °C – Débit d'alimentation : 1.6 ml/min –

Concentration en substrat : (a) 0.2 M ; (b) 0.5 M ; (c) 0.8 M.

III. 2. 2. Essais à 40°C

Etant donné que la température est un paramètre important dans la réalisation de réacteurs enzymatiques performants, nous avons testé le fonctionnement de notre réacteur à 40°C. Différentes études portant sur des réacteurs à invertase ont utilisé cette température (exemple : Combes et Monsan, 1984 ; Geankopolis *et al*, 1987).

a) Résultats pour le débit de 0.86 ml/min

Les conversions maximales obtenues à ce débit sont rapportées dans le tableau n°8.

Les conversions les plus élevées sont celles obtenues lorsque le réacteur est alimenté par une solution de substrat 0.2 M. Dans ce cas, les conversions moyennes pour le premier et le deuxième jour de fonctionnement du réacteur sont respectivement 88.8 % et 80.9 %.

Pour 0.8 M, on constate une augmentation significative des conversions par rapport à celles enregistrées à 25°C, au débit 0.86 ml/min.

Tableau n°8 : Conversions maximales à 40°C pour un débit de 0.86 ml/min

Concentration (M)	Jour	Conversion (%)
0.2	1 ^e	88.8
	2 ^e	80.9
0.5	1 ^e	65.5
	2 ^e	64.9
0.8	1 ^e	48.3
	2 ^e	42.6

L'allure des courbes est similaire pour les trois concentrations même si celles relatives 0.2 M sont différentes d'un jour à l'autre (Figure n°30).

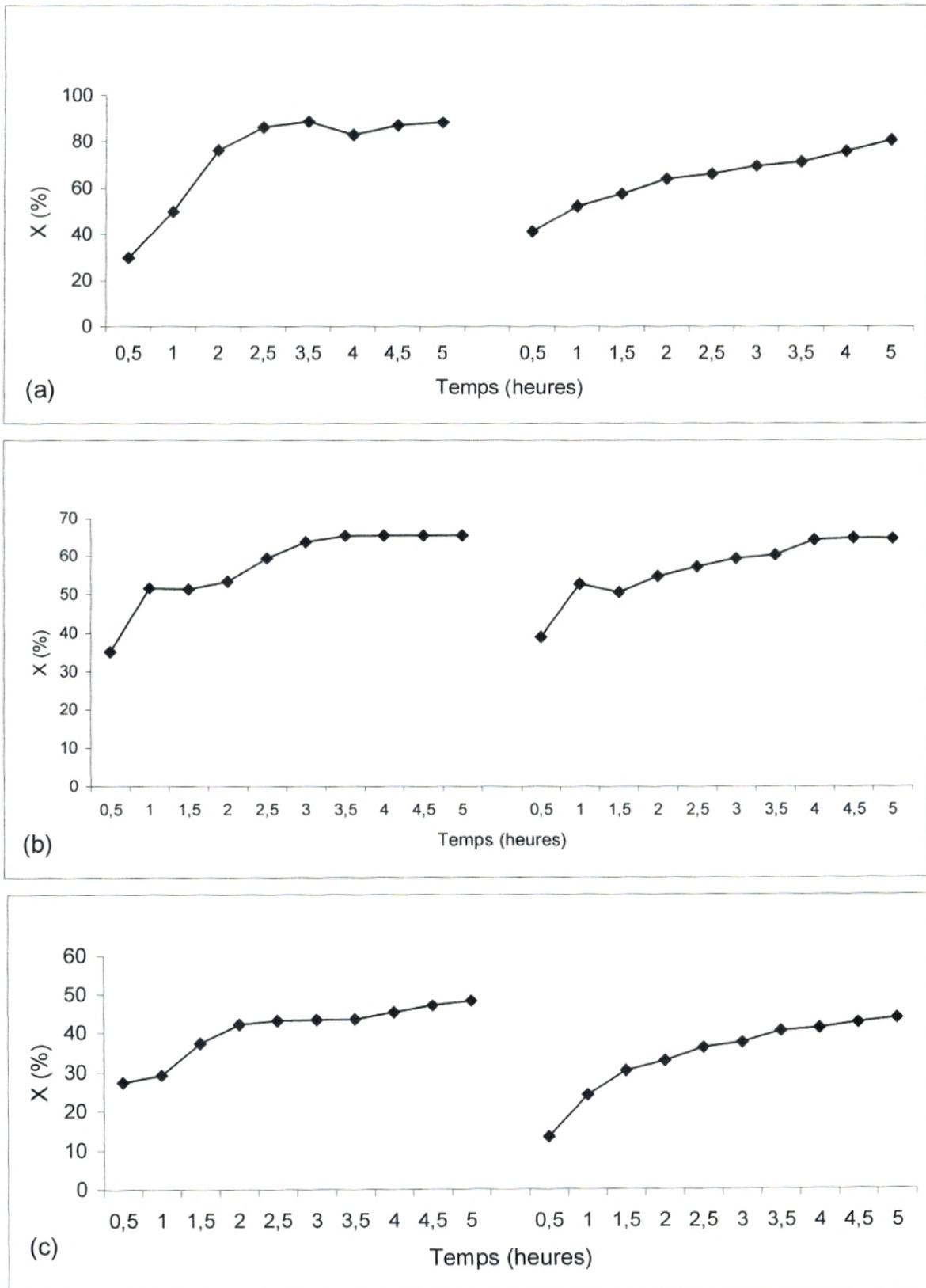


Figure n° 30 : Taux de conversion du substrat en fonction du temps.

Température : 40 °C – Débit d'alimentation : 0.86 ml/min –

Concentration en substrat : (a) 0.2 M ; (b) 0.5 M ; (c) 0.8 M.

b) Résultats pour le débit de 1.6 ml/min

La figure n° 31 montre que plus la concentration en substrat augmente plus la durée d'établissement de la phase stationnaire s'allonge ; indiquant un retard dans la stabilisation du gradient de concentrations, cette phase transitoire est de 1 heure pour 0.2 M, de 2 heures pour 0.5 M, et de 3 heures pour 0.8 M.

Les conversions obtenues sont plus basses que celles obtenues pour le débit 0.86 ml/min. De plus, les taux obtenus pour le substrat 0.5 M sont les plus élevés même s'ils restent proches de ceux obtenus pour le substrat 0.2 M.

Tableau n°9 : Conversions maximales à 40°C pour un débit de 1.6 ml/min

Concentration (M)	Jour	Conversion (%)
0.2	1 ^e	58.4
	2 ^e	60.8
0.5	1 ^e	62.4
	2 ^e	65.8
0.8	1 ^e	30.9
	2 ^e	34.5

c) Comparaison des résultats obtenus à 40 °C aux deux débits testés

On remarque que les conversions obtenues au débit 0.86 ml/min sont supérieures à celles obtenues au débit 1.6 ml/min quelle que soit la concentration en substrat testée.

Cependant, on constate qu'avec un substrat 0.5 M, les conversions sont similaires pour les deux débits (aux environs de 60 – 65 %) même si la phase stationnaire est atteinte plus rapidement pour le débit de 1.6 ml/min (1.5 heure pour le premier jour et 2 heures pour le second) que pour 0.86 ml/min (2.5 heures pour le premier jour et 3 heures pour le second).

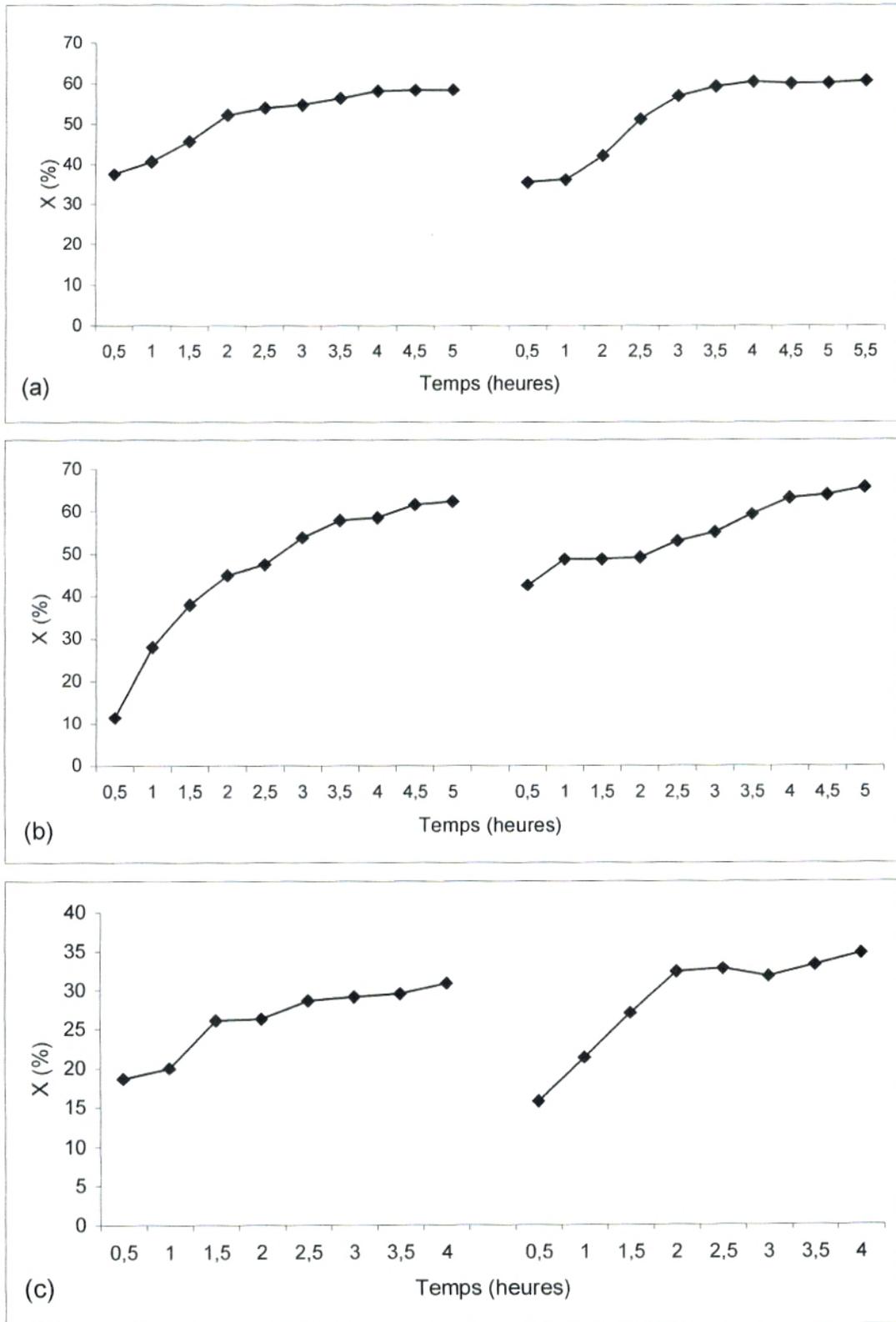


Figure n° 31 : Taux de conversion du substrat en fonction du temps.

Température : 40 °C – Débit d'alimentation : 1.6 ml/min –

Concentration en substrat : (a) 0.2 M ; (b) 0.5 M ; (c) 0.8 M.

III. 2. 3. Interprétation des résultats obtenus aux deux débits et températures testés

Pour les réacteurs fonctionnant durant deux jours à 40 °C, au débit de 0.86 ml/min, les taux de conversion obtenus à partir de solutions de substrat 0.2 M et 0.5 M restent intéressants (88.8 % et 80.9 % pour 0.2 M, 65.5 % et 64.9 % pour 0.5 M), même s'ils sont inférieurs à ceux obtenus à 25°C (98.8 % et 98.9 % pour 0.2 M et 88.5 % et 75.5 % pour 0.5 M). Cependant, pour la concentration 0.8M, on remarque que le passage de la température de 25°C à 40 °C s'accompagne d'une augmentation (presque un doublement) des conversions qui passent de 27.3 % à 48.3 % pour le premier jour, et de 24.1 % à 42.6 % pour le deuxième jour de fonctionnement du réacteur.

Pour les essais de deux jours au débit de 1.6 ml/min, on remarque pour la concentration en substrat 0.2 M, des conversions maximales comparables à 25°C et 40°C.

Pour le substrat 0.5 M, les conversions sont nettement améliorées, lorsque la température passe de 25 °C à 40 °C. Le taux de conversion passent pour le premier jour de 26.5 % à 62.4% et de 18.5 % à 65.8 % pour le deuxième jour ; les conversions ont presque triplé.

Le même effet s'observe avec le substrat 0.8 M. Le taux de conversion passe de 15.8 % à 30.9% pour le premier jour et de 13.8 % à 34.5 % pour le deuxième jour ; pour cette concentration, les conversions ont doublé sous l'effet de l'augmentation de la température.

On constate aussi que l'allure des courbes, quelle que soit la concentration en substrat testée est pratiquement constante pour une même température, mais la phase stationnaire est plus rapidement atteinte à 40°C qu'à 25°C.

Ces constatations peuvent être expliquées par le fait que l'augmentation de la température et du débit pourrait entraîner l'établissement d'un gradient de concentrations plus favorable à la réaction que celui qui s'établit au même débit mais à une température inférieure c'est à dire à 25°C.

III. 2. 4. Essais supplémentaires à d'autres débit et température

Suite aux constatations précédentes, nous avons testé pour une température de 40°C un débit plus faible, soit 0.3 ml/min, mais seulement pour les concentrations 0.5 M et 0.8 M afin de vérifier la possibilité d'améliorer les rendements. (figure n°32)

Les conversions relatives aux trois débits testés (c'est à dire 0.3 ml/min ; 0.86 ml/min et 1.6 ml/min) sont données dans le tableau n°10.

Tableau n°10 : Comparaison entre les conversions maximales à 40°C pour les trois débits 0.3, 0.86, et 1.6 ml/min

Concentration (M)	Jour	Conversion (%)		
		0.3 ml/min	0.86 ml/min	1.6 ml/min
0.5	1 ^e	85.2	88.8	58.4
	2 ^e	72.3	80.9	60.8
0.8	1 ^e	78.5	65.5	62.4
	2 ^e	73.5	64.9	65.8

Pour le substrat 0.8 M, on relève que les conversions maximales sont améliorées par la diminution du débit ce qui était prévisible.

En revanche, pour le substrat 0.5 M, les plus hautes conversions sont obtenues au débit de 0.86 ml/min et non à celui de 0.3 ml/min vraisemblablement en raison des limitations diffusionnelles qui tendent à devenir plus importantes lorsque le débit d'écoulement du fluide dans le réacteur diminue.

Par conséquent, pour une concentration en substrat élevée, soit 0.8 M, un débit faible est préféré.

Afin de voir l'effet de la température sur l'hydrolyse continue, nous avons essayé de faire fonctionner le réacteur à la température de 50 °C pour une concentration en substrat de 0.5 M et un débit de 0.86 ml/min (Figure n°32).

Les conversions obtenues (voir tableau n°11) sont légèrement supérieures à celles obtenues à 40°C, mais sont nettement inférieures à celles obtenues à 25°C même si les différences entre le premier et le deuxième jour de fonctionnement sont moins accentuées : de 88.5 % à 75.5% pour 25°C, et de 67.7 % à 66.7 % pour 50°C.

Tableau n°11 : Conversions maximales à 25 °C, 40 °C, et 50 °C pour 0.5 M, Débit 0.86 ml/min.

Jours	Conversion (%)		
	25°C	40°C	50°C°
1 ^e	88.5	65.5	67.7
2 ^e	75.5	64.9	66.7

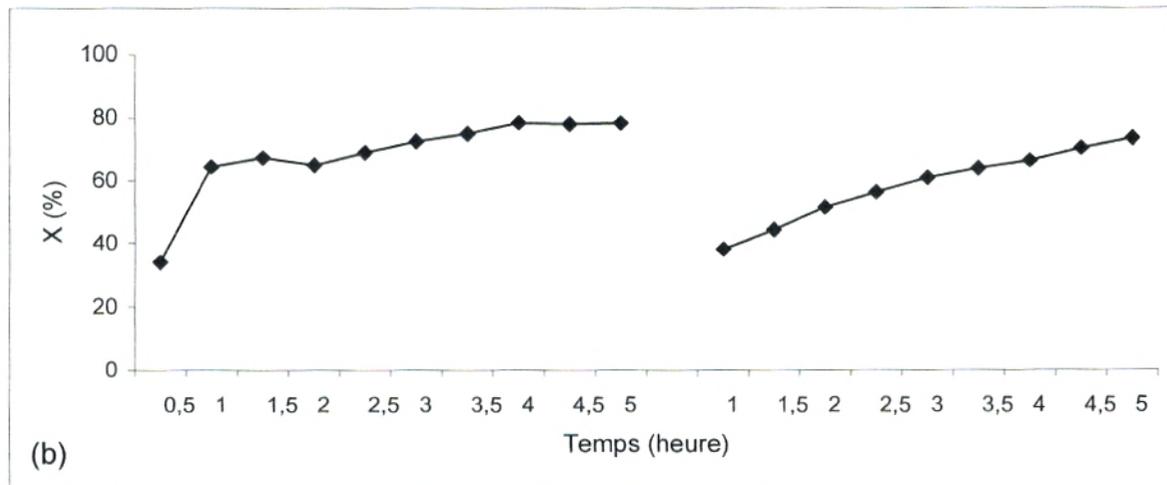
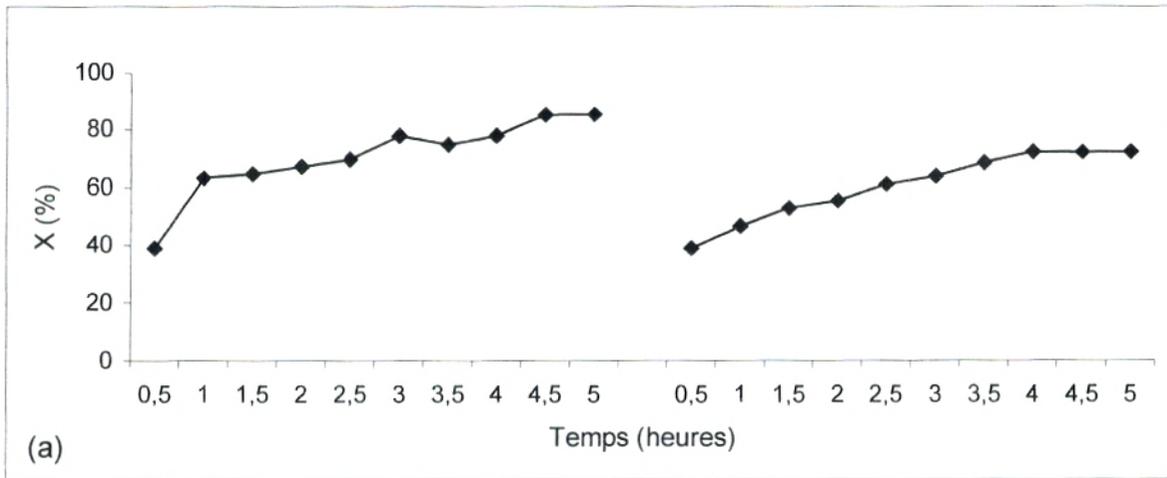


Figure n° 32 : Essai du réacteur à lit fixe avec le débit d'alimentation de 0.3 ml/min, Température : 40 °C, Concentration : (a) 0.5 M – (b) 0.8M.

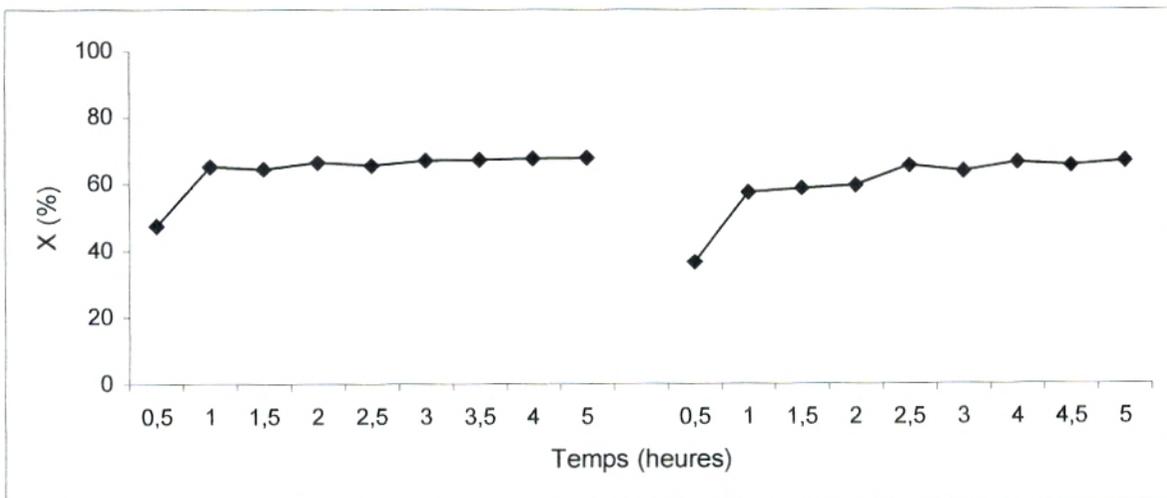


Figure n° 33 : Essai du réacteur à lit fixe à température de 50°C. Débit d'alimentation : 0.86 ml/min, Température : 40 °C, Concentration : 0.5 M.

III. 3. Etude des phénomènes de transfert de matière dans le réacteur à lit fixe

Engasser (1993) rapporte que lorsqu'un biocatalyseur est immobilisé dans ou sur un support, la vitesse de réaction est souvent limitée par des transferts de matière à l'intérieur ou à la périphérie de ce support.

Le processus global de la transformation du substrat met en jeu plusieurs étapes : le transport du ou des substrats de la solution jusqu'au niveau de l'enzyme ; la transformation des substrats en produits au niveau du catalyseur ; le transport en sens inverse du ou des produits du catalyseur jusque dans la solution.

Si avec les enzymes solubles, l'étape de réaction est généralement la seule limitante ; par contre avec des enzymes immobilisées, les étapes de transfert des substrats et des produits peuvent aussi devenir limitantes. Ceci résulte à la fois des fortes concentrations locales de biocatalyseurs et des vitesses relativement faibles de transport des différents solutés. Il en résulte l'établissement de gradients de concentrations du substrat et du produit à l'intérieur ou à l'extérieur des supports. En présence de limitations diffusionnelles, la concentration du substrat diminue progressivement de la solution vers le support à l'inverse du produit qui tend vers une accumulation avec augmentation de sa concentration de la solution vers l'intérieur du support.

Engasser (1993) stipule aussi que, la plupart du temps, ces phénomènes de limitations diffusionnelles résultent en une baisse de l'activité apparente de l'enzyme et, par conséquent, en une moins bonne performance de l'ensemble du réacteur.

La performance d'un réacteur continu, exprimée en taux de conversion du substrat à la sortie du réacteur, en plus de la cinétique de la réaction mise en œuvre dépend aussi de l'hydrodynamique de la phase liquide à l'intérieur du réacteur. (Levenspiel, 1972 ; Villermaux, 1982)

Nous avons assimilé notre réacteur à lit fixe à un réacteur piston considéré comme un réacteur idéal. Le débit d'alimentation et le volume du réacteur étaient maintenus constants. Nous avons supposé qu'il n'y avait pas d'accumulation.

Nous résumons dans ce qui suit l'étude du phénomène de transfert de matière pour les différents réacteurs à lit fixe réalisés.

III. 3. 1. Paramètres cinétiques de la réaction

Dans nos conditions expérimentales, l'hydrolyse du saccharose par l'invertase est une réaction totale étant donné que le substrat saccharose est totalement transformé en fructose et glucose. Cette hydrolyse suit une cinétique michaélienne qui peut être approximée par une cinétique d'ordre un.

La vitesse r est donc proportionnelle à la concentration du substrat S .

$$r = k \cdot [S]$$

D'où le bilan de matière du réacteur : $\ln(1 - X) = -k \tau$

On obtient
$$k = -\frac{\ln(1-X)}{\tau}$$

Les valeurs de k obtenues sont la résultante de l'application de cette formule à la moyenne des trois derniers taux de conversions enregistrés en phase stationnaire pour chaque réacteur enzymatique réalisé.

Le tableau n°12 donne les constantes k correspondant aux concentrations 0.2 M, 0.5 M, et 0.8 M ; pour les débits 0.86 ml/min et 1.6 ml/min et à la température de 25 °C.

Tableau n°12 : Constante de vitesse k à 25 °C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	k (min ⁻¹)
0.86	0.2	1	0.222
		2	0.202
	0.5	1	0.086
		2	0.074
	0.8	1	0.017
		2	0.015
1.6	0.2	1	0.088
		2	0.071
	0.5	1	0.025
		2	0.020
	0.8	1	0.017
		2	0.013

Le tableau n°13 donne les constantes k pour la température de 40 °C.

Tableau n°13 : Constante de vitesse k à 40 °C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	k (min ⁻¹)
0.86	0.2	1	0.114
		2	0.082
	0.5	1	0.057
		2	0.056
	0.8	1	0.034
		2	0.029
1.6	0.2	1	0.087
		2	0.091
	0.5	1	0.094
		2	0.078
	0.8	1	0.035
		2	0.040

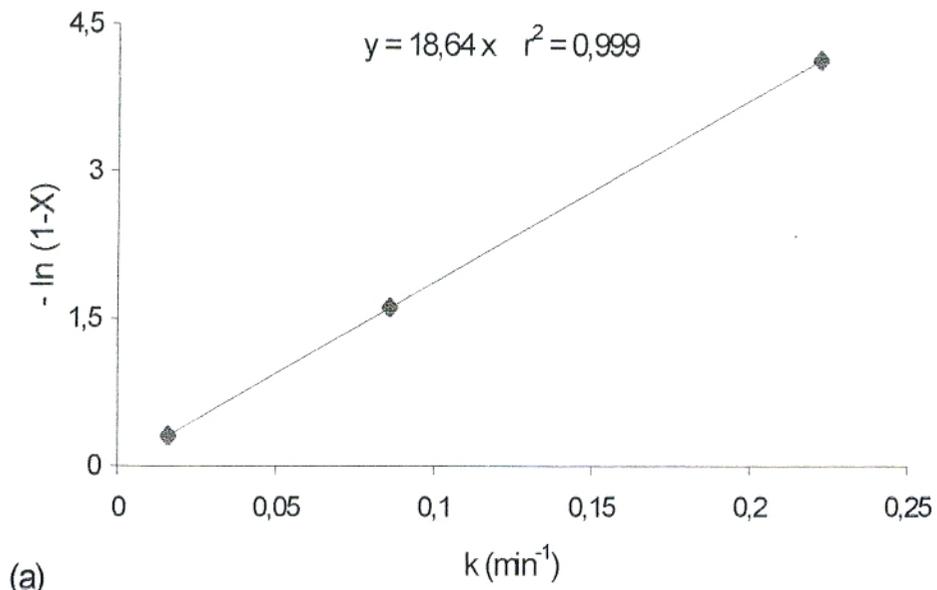
On remarque que, pour un même réacteur, les constantes k diminuent souvent en cours de fonctionnement.

Les figures n°34, 35, 36 et 37 permettent de vérifier graphiquement que la cinétique enzymatique peut être approximée par une cinétique d'ordre un.

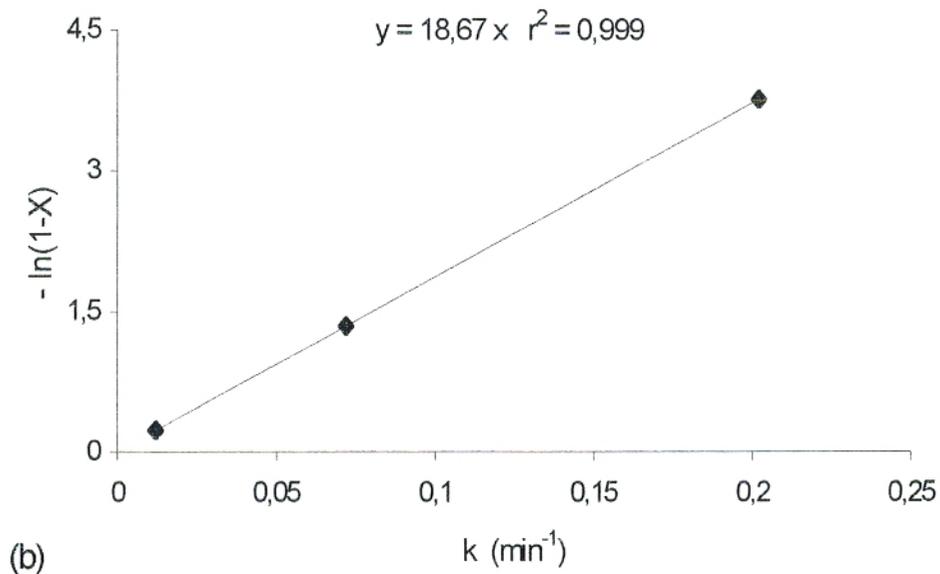
En effet, la trace de $-\ln(1-X)$ en fonction de k est bien linéaire (comme le confirme les r^2 très élevés).

Dans ce cas, l'équation s'écrit sous la forme

$$r = k \cdot S \quad \text{avec} \quad k = \frac{V'_{\max}}{K'_M}$$

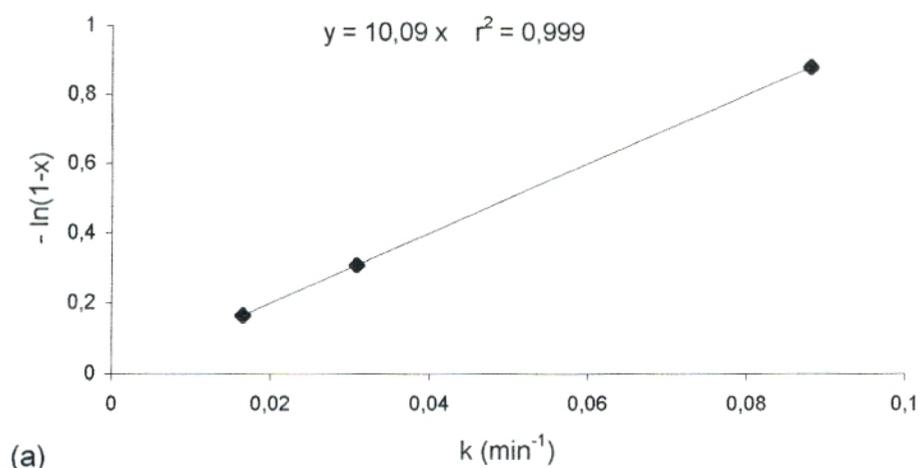


(a)

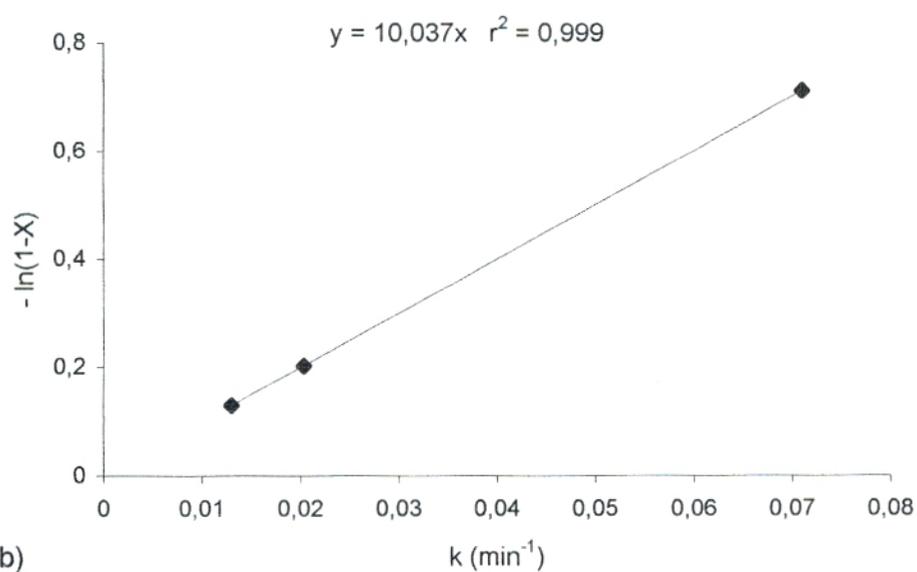


(b)

**Figure n°34 : Validation de l'hypothèse de la cinétique d'ordre un ;
Débit d'alimentation : 0.86 ml/min, Température : 25°C
(a) 1^{er} jour ; (b) 2^e jour de fonctionnement**



(a)



(b)

Figure n°35 : Validation de l'hypothèse de la cinétique d'ordre un ;

Débit d'alimentation : 1.6 ml/min, Température : 25°C

(a) 1^{er} jour ; (b) 2^e jour de fonctionnement

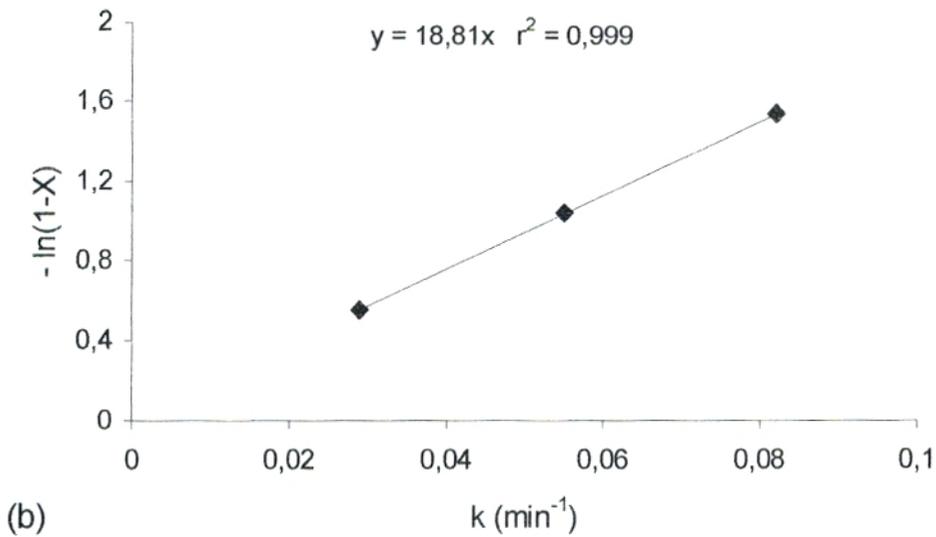
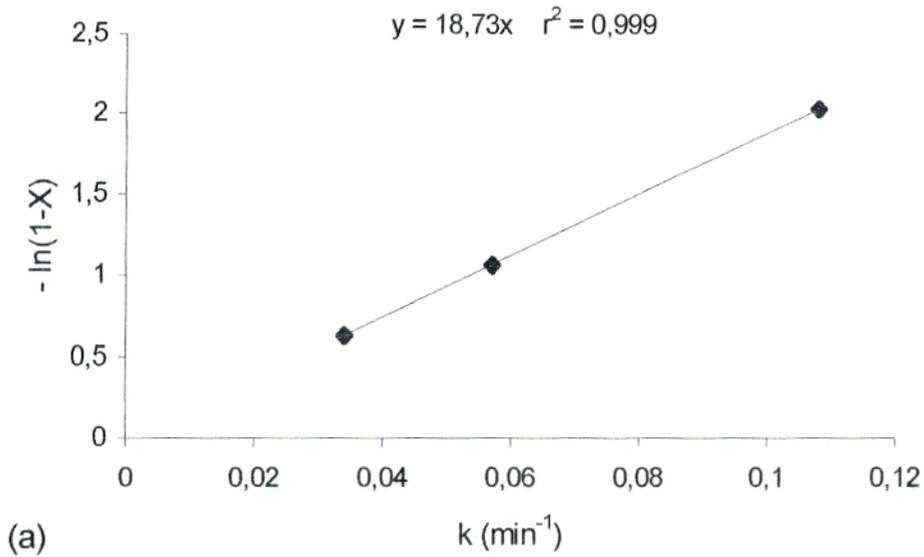
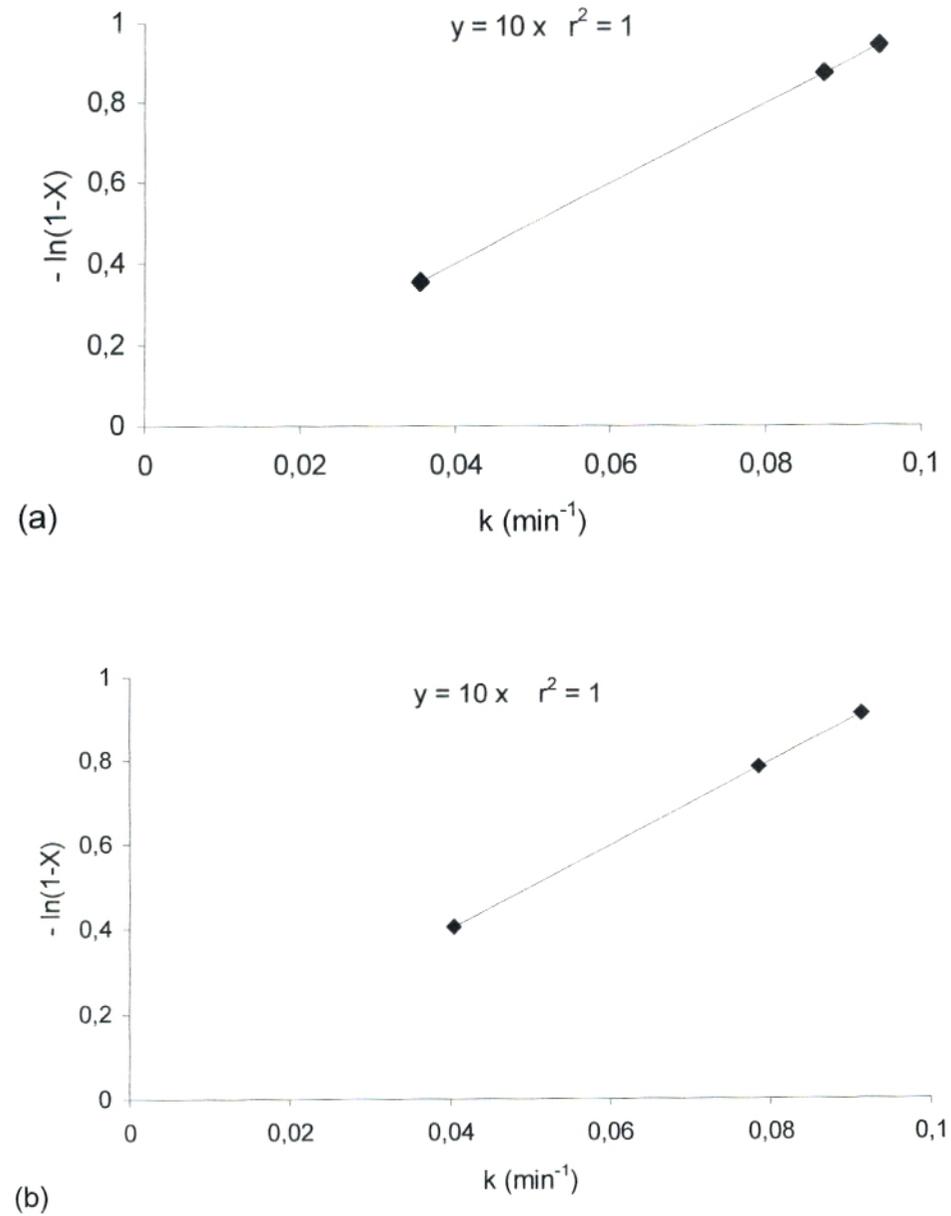


Figure n°36 : Validation de l'hypothèse de la cinétique d'ordre un ;

Débit d'alimentation : 0.86 ml/min, Température : 40°C

(a) 1^{er} jour ; (b) 2^e jour de fonctionnement



**Figure n°37 : Validation de l'hypothèse de la cinétique d'ordre un ;
Débit d'alimentation : 1.6 ml/min, Température : 40°C
(a) 1^{er} jour ; (b) 2^e jour de fonctionnement**

III. 3. 2. Evaluation du gradient de concentration à l'intérieur de la bille d'alginate

III. 3. 2. 1. Calcul du module de Thiele (Φ)

Afin de déterminer le profil de concentration du substrat à l'intérieur de la particule sphérique d'alginate de calcium, on évalue l'importance des limitations diffusionnelles en calculant le module de Thiele (Φ).

$$\phi = \frac{R}{3} \sqrt{k/D_e}$$

avec R : rayon de la bille, R = 0.1 cm

D_e : diffusivité effective (diffusivité du substrat à l'intérieur de la bille).

Φ est un nombre adimensionnel, sa valeur détermine le gradient de concentration à l'intérieur du support. Aux faibles valeurs de Φ ($\Phi \ll 1$), lorsque l'activité catalytique du support est très faible, la diffusion du substrat n'est pas limitante et les concentrations sont pratiquement uniformes. Par contre aux fortes valeurs de Φ ($\Phi \gg 1$), lorsque la concentration du catalyseur immobilisé est élevée, la diffusion interne devient limitante et on obtient des gradients de concentrations de substrat très prononcés dans le support.

La diffusivité effective d'un substrat est calculée à partir de la formule suivante :

$$D_e = \frac{\varepsilon_p D}{\tau_p}$$

ε_p : porosité interne correspondant au rapport du volume des pores sur le volume total des particules ; selon Engasser (1993), ε_p est voisine de 0.4 pour les billes d'alginate de calcium.

τ_p : tortuosité des pores correspondant au rapport longueur du pore sur sa profondeur ; τ_p vaut approximativement 1.44 d'après Sabiri *et al* (1999).

D : est la diffusivité du saccharose en solution.

Dans le macroenvironnement, elle est égale à $5.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ à 25°C, et à $6.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ à 40°C.

Les tableaux n°14, 15 et 16 donnent les estimations des modules de Thiele des différents réacteurs réalisés.

On remarque que les valeurs de Φ sont élevées, ce qui signifie que le gradient de concentration du substrat à l'intérieur d'une bille est très prononcé, le saccharose n'étant accessible qu'à une faible couche d'enzymes proche de la surface externe de la bille.

Tableau n°14: Valeurs du module de Thiele Φ pour les concentrations 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M ; Température : 25°C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	k (min ⁻¹)	Φ
0.86	0.2	1	0.222	103.2
		2	0.202	98.6
	0.5	1	0.086	64.2
		2	0.074	59.7
	0.8	1	0.017	28.8
		2	0.015	26.9
1.6	0.2	1	0.088	64.9
		2	0.071	58.5
	0.5	1	0.025	34.5
		2	0.020	30.9
	0.8	1	0.017	28.5
		2	0.013	24.9

Tableau n°15: Valeurs du module de Thiele Φ pour les concentrations 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M ; Température : 40°C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	k (min ⁻¹)	Φ
0.3	0.5	1	0.033	36.2
		2	0.024	33.9
	0.8	1	0.028	33.7
		2	0.022	30.1
0.86	0.2	1	0.114	67.5
		2	0.082	53.4
	0.5	1	0.057	47.7
		2	0.056	47.3
	0.8	1	0.034	36.8
		2	0.029	34.4
1.6	0.2	1	0.087	59.0
		2	0.091	60.4
	0.5	1	0.094	60.4
		2	0.078	61.3
	0.8	1	0.035	56.0
		2	0.040	37.6

Tableau n°16: Valeurs des constantes k et du module de Thiele Φ pour la concentration 0.5 M ; Température : 50°C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	k (min ⁻¹)	Φ
0.86	0.5	1	0.060	49.0
		2	0.058	48.2

III. 3. 2. 2. Calcul des facteurs d'efficacité (η)

A partir des valeurs de Φ obtenues, nous avons ensuite calculé les valeurs du facteur d'efficacité (η). Ce paramètre est défini comme étant le rapport de la vitesse de la réaction dans le support et de la vitesse de la réaction avec la concentration en substrat régnant à la surface de la bille.

Il peut être obtenu grâce à la relation suivante :

$$\eta = \frac{1}{\phi} \left(\frac{1}{\tanh 3\phi} - \frac{1}{3\phi} \right)$$

Pour $\Phi \ll 1$, $\eta = 1$, cette situation correspond à un régime chimique,

Pour $\Phi \gg 1$, $\eta = 1/\Phi$, cette situation correspond à un régime diffusionnel.

Les tableaux n°17, 18 et 19 répertorient les facteurs d'efficacité η des réacteurs, on remarque que tous les facteurs d'efficacité η sont similaires à l'inverse du module de Thiele Φ ; ce qui correspond à un régime diffusionnel quel que soit le réacteur considéré.

Le tableau n° 17 indique qu'à la température de 25 °C, les facteurs d'efficacité les plus élevés correspondent à la concentration 0.8 M. Pour les deux débits (0.86 ml/min et 1.6 ml/min), il est compris entre 3.3 % et 3.9 %. Les facteurs d'efficacité les plus faibles sont observés pour 0.2 M ; ils sont compris entre 0.9 % et 1 % pour les deux débits.

Pour la concentration de 0.5 M, le facteur d'efficacité est compris entre 1.5 % et 1.6 % pour le premier débit et entre 2.9 % et 3.2 % pour le deuxième. On constate une élévation notable de ce facteur.

A 0.2 M, ce facteur est de 0.9 % le premier jour et 1 % le deuxième jour au débit de 0.86 ml/min ; et de 1.5 % et 1.7 % pour le débit de 1.6 ml/min ; à cette température, ce sont les facteurs d'efficacité les plus bas observés, même si les taux de conversions enregistrés sont les plus élevés.

A la température de 40 °C, le tableau n°18 montre que c'est au plus faible débit, soit 0.3 ml/min que les efficacités sont les plus élevées ; η varie entre 2.7 % et 2.9 % pour le substrat 0.5 M ; alors que pour 0.8 M, η est compris entre 2.9 % et 3.2 %.

Au débit de 0.86 ml/min, les facteurs d'efficacité sont pour 0.2 M compris entre 1.5 et 1.7 % pour ; pour 0.5 M, il est entre 2.1 et 2 % ; et pour 0.8 M, entre 2 et 2.6 %. Au deuxième débit (1.6 ml/min), pour 0.2 M et 0.5 M, η est entre 1.6 et 1.7 %, et pour 0.8 M, il est entre 2.5 et 2.6 %. On remarque, qu'à cette température, les facteurs d'efficacité sont similaires entre les deux débits et pour une même concentration, sauf pour 0.5 M où on a noté une diminution des valeurs obtenues.

Le tableau n°19 donne une comparaison entre les facteurs d'efficacité pour une concentration de 0.5 M aux trois températures testées soit 25°C, 40°C, et 50°C. En ce qui concerne le passage de 40°C à 50°C, on constate que malgré une élévation de la température de 10 °C, les efficacités obtenues sont toutes proches de 2 %.

De manière générale, on constate que les valeurs des facteurs d'efficacité sont très faibles, et que les valeurs les plus élevées correspondent à une concentration de substrat de 0.8 M et avoisinent les 3 %.

Ainsi, à cause des limitations diffusionnelles, dans les meilleurs des cas 3 % du potentiel des enzymes immobilisées est réellement exprimé.

Tableau n°17: Facteurs d'efficacité pour les concentrations 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M ;
Température : 25°C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	Φ	$1/\Phi$	η
0.86	0.2	1	103.2	0.009	0.009
		2	98.6	0.010	0.010
	0.5	1	64.2	0.015	0.015
		2	59.7	0.016	0.016
	0.8	1	28.8	0.034	0.033
		2	26.9	0.037	0.036
1.6	0.2	1	64.9	0.015	0.015
		2	58.5	0.017	0.017
	0.5	1	34.5	0.029	0.029
		2	30.9	0.032	0.032
	0.8	1	28.5	0.035	0.034
		2	24.9	0.040	0.039

Tableau n°18: Facteurs d'efficacité pour les concentrations 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M ;
Température : 40°C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	Φ	$1/\Phi$	η
0.3	0.5	1	36.2	0.027	0.027
		2	33.9	0.029	0.029
	0.8	1	33.7	0.029	0.029
		2	30.1	0.033	0.032
0.86	0.2	1	67.5	0.015	0.015
		2	53.4	0.017	0.017
	0.5	1	47.7	0.021	0.021
		2	47.3	0.021	0.020
	0.8	1	36.8	0.027	0.026
		2	34.4	0.029	0.028
1.6	0.2	1	59.0	0.017	0.017
		2	60.4	0.016	0.016
	0.5	1	60.4	0.016	0.016
		2	61.3	0.017	0.017
	0.8	1	56.0	0.026	0.026
		2	37.6	0.025	0.025

Tableau n°19: Comparaison entre les facteurs d'efficacité pour la concentration 0.5 M
aux températures de 25°C, 40°C et 50°C; Débit d'alimentation : 0.86 ml/min.

Température (°C)	Jour	Φ	$1/\Phi$	η
25	1	64.2	0.015	0.015
	2	59.7	0.016	0.016
40	1	47.7	0.021	0.021
	2	47.3	0.021	0.020
50	1	49.0	0.020	0.020
	2	48.2	0.021	0.021

III. 3. 2. 3. Evaluation de la concentration en substrat à l'intérieur des pores

Le facteur d'efficacité correspond au rapport de deux vitesses celle de la réaction dans le support sur celle de la réaction avec la concentration en substrat régnant à la surface de la bille.

$$\eta = \frac{r \text{ (dans le support)}}{r' \text{ (à la surface de la bille)}}$$

Etant donné que la cinétique est d'ordre 1, le facteur d'efficacité correspond simplement au rapport :

$$\eta = \frac{C_{\text{pores}}}{C_{\text{surface}}}$$

C_{pores} : concentration du substrat à l'intérieur des pores,

C_{surface} : concentration du substrat à la surface de la bille.

On peut donc déduire des valeurs de η calculées précédemment, des valeurs moyennes de la concentration en substrat dans les pores. Ces valeurs sont présentées dans les tableaux n°20, 21 et 22.

On remarque que ces valeurs sont nettement plus basses que celles régnant à la surface des particules sphériques.

Le tableau n°20 donne les concentrations à l'intérieur des pores pour les concentrations en surface de 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M à la température de 25°C. Il est intéressant de remarquer que la concentration interne la plus élevée vaut 0.031 M et qu'elle correspond à une concentration de surface de 0.8 M.

Le tableau n°21 indique que le passage de la température de 25°C à 40°C ne conduit généralement pas à une augmentation des concentrations à l'intérieur des pores aux débits de 0.86 ml/min et 1.6 ml/min. Néanmoins, à 40°C les concentrations internes mesurées au débit de 0.3 ml/min sont supérieures à celles mesurées aux débits plus élevés (0.86 ml/min et 1.6 ml/min).

Le tableau n°22 montre que pour une concentration de surface de 0.5 M, l'élévation de la température de 25°C à 40°C ou à 50°C mène à une très légère augmentation des concentrations de substrat à l'intérieur du pore.

Tableau n°20: Concentrations à l'intérieur des pores pour les concentrations en surface de 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M ; Température : 25°C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	η	C_{pores} (M)
0.86	0.2	1	0.009	0.002
		2	0.010	0.002
	0.5	1	0.015	0.007
		2	0.016	0.008
	0.8	1	0.033	0.026
		2	0.036	0.028
1.6	0.2	1	0.015	0.003
		2	0.017	0.003
	0.5	1	0.029	0.014
		2	0.032	0.016
	0.8	1	0.034	0.027
		2	0.039	0.031

Tableau n°21 : Concentrations à l'intérieur des pores pour les concentrations en surface de 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M ; Température : 40°C

Débit (ml/min)	Concentration (M)	Jour	η	C_{pores} (M)
0.3	0.5	1	0.027	0.013
		2	0.029	0.014
	0.8	1	0.029	0.023
		2	0.032	0.025
0.86	0.2	1	0.015	0.003
		2	0.017	0.003
	0.5	1	0.021	0.010
		2	0.020	0.010
	0.8	1	0.026	0.020
		2	0.028	0.022
1.6	0.2	1	0.017	0.003
		2	0.016	0.003
	0.5	1	0.016	0.008
		2	0.017	0.008
	0.8	1	0.026	0.021
		2	0.025	0.020

Tableau n°22 : Concentrations à l'intérieur des pores pour la concentrations en surface de 0.5 M à différentes températures ; Débit : 0.86 ml/min.

Température (°C)	Jour	η	C_{pores} (M)
25	1	0.015	0.007
	2	0.016	0.008
40	1	0.021	0.010
	2	0.020	0.010
50	1	0.020	0.010
	2	0.021	0.010

Conclusion



Cette étude avait pour but de quantifier les phénomènes de transfert de matière régissant le comportement cinétique d'une enzyme immobilisée dans un gel. L'hydrolyse du saccharose par l'invertase immobilisée dans des billes de gel d'alginate a servi de réaction modèle.

Les essais d'hydrolyse ont été menés dans des réacteurs continus à lit fixe.

Nous avons tout d'abord vérifié la stabilité de l'enzyme soluble que nous avons extraite de cellules de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*). Nous avons ensuite mesuré l'activité de cette enzyme soluble dans diverses conditions et nous avons en particulier opté pour l'utilisation du pH 4.8 tout au long de cette étude afin de maximiser cette activité.

Les courbes « vitesses initiale en fonction de la concentration en substrat » ont été décrites en utilisant une équation incluant deux constantes d'inhibition. On sait en effet que non seulement le substrat mais aussi les produits de l'hydrolyse sont des inhibiteurs de l'invertase. Nous avons obtenu, pour l'enzyme soluble, les paramètres cinétiques suivants (à 25°C et pH 4.8) :

$$V_{\max} = 1640 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}, K_M = 0.081 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1},$$

$$K_S = 1.18 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}, K'_S = 15.15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}, r^2 = 0.993.$$

Pour l'enzyme immobilisée, la méthode d'immobilisation a consisté à piéger 2 ml d'enzyme diluée dans un volume final de gel d'alginate de 10 ml (3 % (p/v)) puis à réticuler les billes formées en ajoutant dans la solution de polymérisation du gel (CaCl_2 0.2 M) du glutaraldéhyde 0.25 % (v/v). Les billes ainsi formées ont des activités volumiques 1.5 à 2 fois supérieures à celles de billes préparées sans réticulation.

Pour l'enzyme confinée dans le réseau du gel d'alginate, nous avons obtenu les paramètres cinétiques suivants, calculés avec une équation comportant une seule constante d'inhibition (à 25°C et pH 4.8) :

$$V_{\max} = 1399.4 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}, K_M = 0.946 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1},$$

$$K_S = 0.485 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}, r^2 = 0.965.$$

Le V_{\max} de l'enzyme immobilisée n'étant pas éloigné de celui de l'enzyme libre, nous avons constaté que l'activité catalytique était maintenue même si le K_M augmente considérablement du fait de l'établissement d'un gradient de concentration en substrat à l'intérieur de la bille.

Concernant l'étude des réacteurs à invertase immobilisée en billes d'alginate de calcium, des essais ont été réalisés à différentes températures et à différents débits et cela pour trois concentrations de saccharose 0.2 M, 0.5 M et 0.8 M (en solution dans du tampon acétate 0.1 M, pH 4.8). La manipulation se déroulait durant deux jours consécutifs. Le diamètre des billes utilisées était de 2 mm.

A 25°C, nous avons constaté que l'augmentation du débit (de 0.86 ml/min à 1.6 ml/min) s'accompagnait d'une diminution des conversions quelles que soit la concentration en substrat considérée. La différence la plus marquée a été observée pour la concentration en saccharose de 0.5 M où les conversions maximales passaient de 88.5 % à 26.5 % le premier jour et de 75.5 % à 18.5 % le deuxième jour. Les conversions les plus élevées correspondent au substrat 0.2 M (98.9 % le premier jour et 98.8 % le second jour, au débit 0.86 ml/min) et les plus basses au substrat 0.8 M (27.3 % le premier jour et 24.7 % le deuxième jour, au débit 0.86 ml/min).

A 40°C, pour les concentrations en substrat expérimentées (0.2 M, 0.5 M et 0.8 M) et aux deux débits testés (0.86 ml/min et 1.6 ml/min), les plus hauts taux de conversion sont encore obtenus à partir du substrat 0.2 M, même si ceux correspondant au saccharose 0.5 M restent intéressants et sont moins influencés par l'élévation de la température.

Ainsi à 0.86 ml/min, les conversions maximales obtenues pour le substrat 0.2 M sont 88.8 % le premier jour et 80.9 % le second jour. Pour le substrat 0.5 M, les conversions sont 65.5 % le premier jour et 64.9 % le second jour.

Des essais supplémentaires montrent que pour le substrat 0.8 M, la conversion peut être améliorée en abaissant le débit à 0.3 ml/min. on obtient ainsi des conversions maximales comprises entre 78.5 % et 73.5 % à 40°C. Ce même débit appliqué à la solution de substrat 0.5 M donne des conversions comprises entre 85.2 % et 72.3 % à 40°C.

Pour le substrat 0.5 M au débit 0.86 ml/min, les conversions maximales mesurées à 50°C sont similaires à celles obtenues à 40°C.

L'étude des phénomènes de transfert de matières appliquée aux réacteurs réalisés indique qu'ils sont tous en régime diffusionnel, les modules de Thiele calculés sont compris entre 3.098 et 13.321.

Les facteurs d'efficacité les plus élevés sont, à la température de 25°C, pour le substrat 0.8 M, de 25.3 % le premier jour et 28.7 % le second jour pour le premier débit, et de 25.3 % et 27.7 % pour le deuxième débit.

A 40°C, les facteurs d'efficacité les plus appréciables sont toujours à 0.8 M même si, au débit de 0.3 ml/min, les efficacités obtenues à 0.5 M (20 % - 22.9 %) et à 0.8 M (21.3 % - 23.8 %) sont proches.

De manière générale, les réacteurs réalisés ont donné des conversions satisfaisantes. Toutefois pour une application industrielle, il faudrait tester des concentrations en substrat plus élevées ou encore utiliser un réacteur à lit fixe avec une boucle de recyclage de la solution de sortie.

Pour des études ultérieures, nous recommandons :

- ✓ L'utilisation d'invertase purifiée afin d'éviter les aléas d'une préparation enzymatique. Même si la préparation que nous avons utilisée est restée assez stable, une enzyme purifiée, ayant une activité catalytique standardisée conduira à des résultats plus précis.
- ✓ L'hydrolyse continue de concentrations plus élevées de saccharose pour se rapprocher des conditions industrielles.
- ✓ L'essai de réacteurs à lit fixe avec différentes tailles de billes d'alginate réticulées éventuellement avec des réactifs autres que le glutaraldéhyde.
- ✓ L'essai de réacteurs à lit fluidisé ou encore à membrane en utilisant toujours l'alginate de calcium comme support d'immobilisation.
- ✓ L'utilisation d'autres enzymes pour des applications du même type que celle développée dans la présente étude.

Références
Bibliographiques



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Acosta N., Bedarrain A., Rodriguez L., Alonso Y. 2000. Characterization of recombinant invertases expressed in methylotrophic yeasts. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32, 179-187.
- 2- Alnadjar A.R.M. Préparation et études cinétiques de la β -fructosidase de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) soluble et immobilisée. 145 pages. Mémoire de Magister, Biologie Moléculaire et Cellulaire, Tlemcen, 2000.
- 3- Anonyme, 1987. Guide pratique des additifs alimentaires européens. Centre de Documentation du Laboratoire Marcel Violet. 36 pages.
- 4- Anonyme, 1992. Le sucre, applications alimentaires. CEDUS (Centre d'Etudes et de Documentation du Sucre). Paris, 32 pages.
- 5- Augère B., Les enzymes Biocatalyseurs protéiques. Paris, Ellipse, 2001, 224 pages.
- 6- Baer A.E., Wang J.Y., Setton L.A., 2001. The mechanical properties of matrix synthesized by intervertebral disc cells in alginate culture system. *Cell and Tissue Engineering II.*, 1-3.
- 7- Bernfeld P., 1955. Amylases α et β methods. *Methods in Enzymology*, 1, 149-150.
- 8- Berset C., Enzymes immobilisées. *In: Biotechnologie.* Scriban R., Paris, Techniques & Documentation – Lavoisier, 1993, 904 pages.
- 9- Bertocchi P., Ciranni E., Compagnone D., Magearu V., Paleschi G., Pirvutoiu S., Valvo L., 1999. Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 263-269.
- 10- Blandino A., Macias M., Cantero D., 2000. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsule. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 319-324.
- 11- Boudrant J. 1973. Etude de quelques modèles de réacteurs enzymatiques continus. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 85 pages.
- 12- Bradenberger H., Widmer F., 1998. A new multinozzle encapsulation/immobilization system to produce uniform beads of alginate. *Journal of Biotechnology*, 63, 73-80.
- 13- Bregni C., Degross J., Garcia R., Lamas M.C., Firenstein R., D'aquino M., 2000. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. *Ass. Pharmaceutica*, 41:3, 245-248
- 14- Brun J.P., Procédés de séparation par membrane Transport, techniques membranaires, applications. Paris, Polytechnica, 1989, pages 219-224.

- 15- Bucholz K., Noll-Borchers M., Schwengers D., 1998. Production of leucrose by dextransucrase. *Starch/ Stärk*, 50, No 4, 164-172.
- 16- Burnstein C., *Biotechnologie enzymatique: Mode d'emploi – Industrie alimentaire – Environnement – Médical*, Paris, Masson, 2000, 90 pages.
- 17- Cervelli S., Perret D., 1998. The immobilized enzyme as biotechnological suggestion for soil Decontamination. *Annali Di Chimica*. 88, 509-515.
- 18- Chang H.N., Seong G.H., Yoo I., Park J.K., Seo J., 1996. Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 157-162.
- 19- Chaplin M., 2002. Use of immobilized invertase.
<http://www.sbu.ac.uk/biology/enztech/invertase.html> site basé sur: Chaplin M., Bucke C., 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University Press.
- 20- Cojocar D.C., 1995. Some properties of invertase immobilized through the covalent binding. *Analele Stiintifice ale Universitatii. AI. I Cuza din Iasi, Tomul XLI, s. II, a. Biologie vegetală*, 109-111.
- 21- Combes D., Monsan P., 1983. Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition. *Carbohydrate Research*, 117, 215-228.
- 22- Couto S.R., Domínguez A., Sanromán A., 2002. Photocatalytic degradation of dyes in aqueous solution operating in a fluidized bed reactor. *Chemosphere*, 46, 83-86.
- 23- Coutouly G., *Génie enzymatique*. Paris, Doin & Masson, 1991. 245 pages
- 24- Das N., Nayastha A.M., Machotra O.P., 1998. Immobilization of urease from pigeon pea (*Cajanus cajan L.*) in polyamide gels and calcium alginate beads. *Biotechnology Appl. Biochim.*, 27, 25-29.
- 25- De Alteriis E., Alepuz P.M., Estruch F., Parascandola P., 1999. Clues to the origin of high external invertase activity in immobilized growing yeast: prolonged SUC2 transcription and less susceptibility of the enzyme to endogenous proteolysis. *Can. J. Microbiol.*, 45, 413-417.
- 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 & Bioeng.*, 1, 65-70.
- 27- Di Felice R., Nicoella C., Rovatti M., 1997. Mixing and segregation in water fluidized-bed bioreactors. *Wat. Res.*, 31, No 9, 2392-2396.
- 28- Dočolomansky P., Gemeiner P., Mislovicova D., Štefuca V., Danielsson B., 1993. Screening of Concanavalin A-Bead cellulose conjugates using an enzyme thermistor with immobilized invertase as the reporter catalyst. *Biotechnology and bioengineering*, 43, 286-292.
- 29- Durand G., Monsan P., *Les enzymes: Production et Utilisations industrielles*. Paris, Bordas, 1982, 532 pages.

- 30- Durliat G., Biochimie structurale. Paris, Masson , 1997, 553 pages.
- 31- Dynsen J., Smits H.P., 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.
- 32- Engasser, Réacteurs à enzymes et cellules immobilisées. In: Biotechnologie. Scriban R., Paris, Techniques & Documentation – Lavoisier, 1993, 904 pages.
- 33- Farine S., Verluis C., Bonnici P.J., Heck A., L'homme C., Puigserver A., Biagini A., 2001. Application of high performance anion exchange chromatography to study invertase-catalysed hydrolysis of sucrose and formation of intermediate fructan products. Appl. Microbiol. Biotechnol., 55, 55-60.
- 34- Filho U.C., Hori C.E., Ribeiro E.J., 1999. Influence of the reaction products in the inversion of sucrose by invertase. Braz. J. Chem. Eng., 16, No 2, 1-7.
- 35- Fundueneanu G., Nastruzzi C., Carpov A., Desbrieres J., Rinaudo M., 1999. Physical -chemical characterization of Ca – alginate microparticles produced with different methods. Biomaterials, 20, 1427-1435.
- 36- Geankopolis C.J., Haering E.R., Hu M.C., 1987. Reaction kinetics and mass-transfer effects in a fixed-bed biochemical reactor with invertase immobilized on alumina. Ind. Eng. Chem. Res., 26, No 9, 1810-1817.
- 37- Gemeiner P., Dočolomanský P., Vikartovská A., Štefuca V., 1998. Amplification of flow-microcalorimetry by means of multiple bioaffinity layering of lectin and glycoenzyme. Biotechnol. Appl. Biochem., 28, 155-161.
- 38- Giunchedi P., Gavini E., Moretti M.D.L., Pirisino G., 2000. Evaluation of alginate compressed matrices as prolonged drug delivery systems. AAPS Pharm. Sci. Tech., 1(3), article 19.
- 39- Godon B., Biotransformation des produits céréaliers. Paris, Techniques & Documentation – Lavoisier, 1991, 322 pages.
- 40- Goetz M., Roitsh T., 2000. Identification of amino acids essential for enzymatic activity of plant invertases. J. Plant Physiol., 157, 581-585.
- 41- Gouda M.D., Kumar M.A., Thakur M.S., Karanth N.G., 2002. Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents. Biosensor and Bioelectronics, 17, 503-507.
- 42- Graebner H., Georgi U., Hüttl R., Wolf G., 1997. Immobilized enzymes- A simple calorimetric method for the determination of the catalytic activity. Thermochemica Acta, 310, 101-105.
- 43- Hancz P., Miháltz P., Csicor Z.S., Czakó L., Holló J., 1999. Optimisation expérimentale de la performance des bioréacteurs à biofilm pour la dénitrification des eaux. Industries Alimentaires et Agricoles, 115, 21-26.

- 44- Hermes R.S., Narayani R., 2002. Polymeric alginate films and alginate bead for the controlled delivery of macromolecules. *Trends Biomater. Artif. Organs.*, 15 (2), 54-56.
- 45- Hsiao C.C., Fu R.H., Sung H.Y., 2002. A novel bound form of plant invertase in rice suspension cells. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 43, 115-122.
- 46- Hsu A., Wu E., Shen S., Foglia T.A., Jones K., 1999. Immobilized lipoxygenase in a packed-bed column bioreactor : continuous oxygenation of linoleic acid. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 245-250.
- 47- Hulst A.C., Tramper J., Riet K., Westerbeek J.M., 1984. A new technique for the production of immobilized biocatalyst in large quantities. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 870-876.
- 48- Hüttl R., Oehl schläger K., Wolf G., 1998. Calorimetric investigations of the enzyme catalyzed sucrose hydrolysis. *Thermochimica Acta*, 325, 1-4.
- 49- Inukai M., Yonese M., 1999. Effects of charge density on drug permeability through alginate gel membranes. *Chem. Pharm. Bull.* 47 (8), 1059-1063.
- 50- Isla M.I., Vattuone M.A., Ordoñez R.M., Sampietro A.R., 1999. Invertase activity associated with walls of *Solanum tuberosum* tubers. *Phytochemistry*, 50 (4), 525-534.
- 51- Jafri F., Husain S., Saleemuddin M., 1993. Immobilization and stabilization of invertase using specific polyclonal antibodies. *Biotechnol, Appl, Biochem*, 18, 401-408.
- 52- Jean Jean Paolucci D.,. Hydrolyse enzymatique d'amidon de manioc en réacteur à membrane. Conception et étude d'un nouveau procédé. Modélisation cinétique. 184 pages. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II – Sciences et Technique du Languedoc, 2000.
- 53- Josic D., Schiwinn H., Strancar A., Podgornika A., Barut M., Lim Y.P., 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.
- 54- Kaçar Y., Ayn C., Sema T., Aenizli A., Genç O, Arica M.Y., 2002. Biosorption of Hg(II) and Cd(II) for aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Rhanochoetes chryso sporium*. *Process Biochemistry*, 37, 601-610.
- 55- Kalentuç G., Doğu T., 1983. Immobilization of invertase and the kinetic modeling of sucrose inversion reaction in fluidized bed reactor. 33rd Canadian Chemical Engineering Conference Proceeding, 2, 436-440.
- 56- Kaplan O., Bakir U., Erarslan A., 1997. Thermal inactivation of native and crosslinked invertases. *Biotechnology Techniques*, 11, No 9, 621-623.

- 57- Kern G., Schulke N., Schmid F.X., Jaenicke R., 1992. Stability, quaternary structure, and folding of internal, external, and core-glycosylated invertase from yeast. *Protein Science*, 1, No 1, 120-131.
- 58- Kern G., Kern D., Jaenicke R., Seckler R., 1993. Kinetics of folding and association of differently glycosylated variants of invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Science*, 2, No 1, 1862-1868.
- 59- Kirk L.A., Doelle H.W., 1993. Rapid ethanol production from sucrose without by-product formation. *Biotechnology Letters*, 15, No 9, 985-990.
- 60- Kulkarni A.R., Soppimath K.S., Aminadhavi T.M., Dave A.M., Mehta M.H., 2000. Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *Journal of Controlled Release*, 63, 97-105.
- 61- Lalitagauri R., Majumdar S.K., 1994. Enzymatic hydrolysis of starch to glucose, and immobilization of amyloglucosidase in calcium alginate gel. *Research and Industry*, 39, 109-112.
- 62- Larpent J.P., *Biotechnologie des levures*. Paris, Masson, 426 pages, 1990.
- 63- Lee H.S., Strum A., 1996. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiol.*, 112: 4, 1513-1522.
- 64- Leveau J.Y., Bouix M; 1993. *Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel*. Paris, Tec. et Doc., 612 pages.
- 65- Levenspiel O. *Chemical reaction engineering*. 2^e ed. John Wiley & sons. 1972. p. 253-325.
- 66- Lewinska D., Rosinski S., Hukeler D., Poncelet D., Werynski A., 2002. Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules. *Journal of Membrane Science*, 209, 533-540.
- 67- Lin C., Lin H., Wung A., Sung H., 1999. Purification and characterization of an alkaline invertase from shoots of etiolated rice seedlings. *New Phytol*, 142, 427-434.
- 68- Linden G., Lorient D., 1994. *Biochimie agro- industrielle: Valorisation alimentaire de la production agricole*. Paris, Masson, 367 pages.
- 69- Lin S.S., Sung H.S., 1993. Partial purification and characterization of soluble acid invertases from rice (*Oryza sativa*) leaves. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 31, No 5, 945-953.
- 70- Loncle D., *Génie enzymatique*. Paris, Doin éditeurs, 1992, 392 pages.
- 71- Milling R.J., Hall J.L., Leigh R.A., 1993. Purification of an acid invertase from washed discs of storage roots of red beet (*Beta vulgaris L.*). *Journal of experimental botany*, 44, No 268, 1679-1686.
- 72- Mofidi N., Aghai-moghadam M;, Sarbolouki M.N., Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, 35, 885-888.

- 73- Monsan P., Les réacteurs enzymatiques. In. Durant P., Monsan P., Les enzymes. Paris, Doin. 1982. p. 81-118.
- 74- Monsan P., Combes D., 1984. Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, XXVI, 347-351.
- 75- Monsan P., Combes D., Alemzadeh I., 1983. Invertase covalent grafting onto corn stover. *Biotechnology and Bioengineering*, XXVI, 658-664.
- 76- Moon S., Nishida K., Gilbertson L.G., Robbins P.D., Evans C.H., Kang J.D., 2000. Gene delivery to human cells in alginate beads. 46th annual meeting Orthopaedic Research Society, 1066.
- 77- Naumoff D.G., 1999. Conserved sequence motifs in levansucrases and bifunctional β -xylosidases and α -L- arabinases. *F.E.B.S. Letters*, 488, 177-179.
- 78- Naumoff D.G., 2001. β - Fructofuranosidase superfamily: homology with some α -L- arabinases and β -D- xylosidases. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 42, 66-71.
- 79- Ohmori Y., Kurokawa Y., 1994. Preparation of fibre – entrapped enzyme using cellulose acetate- titanium – isopropoxide composite as gel matrix. *Journal of Biotechnology*, 33, 205-209.
- 80- Oliveira S.C., De Castro H.F., Visconti AE.S., Giudici R., 1999. Continuous ethanol fermentation in a tower reactor with flocculating yeast recycle : scale up effects on process performance, kinetics parameters and model predictions. *Bioprocess Engineering*, 20, 525-530.
- 81- Popa M.I., Dumitriu S., Caja G., Aelenei N., Ionescu G., 1998. Catalytic behaviour of immobilized enzymes on natural polymers. *Prog. Catal.*, 7, 25-30.
- 82- Quirasco M., Remaud-Simeon M., Monsan P., Lopez-Munguia A.. 1999. Experimental behavior of whole cell immobilized dextranase biocatalyst in batch and packed bed reactors. *Bioprocess Engineering*, 20, 289-295.
- 83- Randez-Gil F., Sanz P., Prieto J.A., 1999. Engineering baker's yeast: room for improvement. *Tibtech reviews*, 17, 237-244.
- 84- Ravindran V., Kim S.M., Badriyha B.N., Pirbazari M., 1997. Predictive modeling for bioactive fluidized bed and stationary bed reactors: application to dairy wastewater. *Environmental Technology*, 18, 861-881.
- 85- Ray L., Majumdar S.K., 1994. Enzymatic hydrolysis of starch to glucose and immobilization of amyloglucosidase in calcium alginate gel. *Research and Industry*. 39, 109-112.
- 86- Reddy A., Gibbs B.S., Liu Y.L., Coward J.K., Changchien L.M., 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, No 6, 547-555.

- 87- 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, No 19, 10817-10820.
- 88- 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, No 24, 13953-13958.
- 89- Roukas T., 1994. Ethanol production from non-sterilized carob pod extract by free and immobilized *S. cerevisiae* using fed batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 189-194.
- 90- Rosa A.H., Vicente A.A., Rocha J.C., Trevisan H.C., 2000. A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 368, No 7, 730-733.
- 91- Roy I., Gupta M.N., 2002. Purification of bacterial pullulanase on a fluidized bed of calcium alginate beads. *Journal of Chromatography A.*, 950, 131-137.
- 92- Sabiri N.E., Comiti J., 1997. Ecoulement de fluides newtoniens et non newtoniens a travers des lits fixes stratifiés. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 75, 1030-1037.
- 93- Saito T., Yoshida Y., Kawashima K., Lin K.H., Ingaki 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, C.5*, 149-152.
- 94- Sarareungcha W., Worasing S., Sritongkum P., Tanticharoen M., Kirtikara K., 1999. Dual electrode signal-substrated biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose. *Analytica Chimica Acta*, 380, 7-15.
- 95- Serp D., Cantana E., Heinzen C., Stockar U., Marison I.W., 2000. Characterization of encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, No 1, 41-53.
- 96- Sicard P., 1982. *In*. Durand G., Monsan P., *Les enzymes: Production et Utilisations industrielles*. Paris, Bordas, 1982, p. 138-139.
- 97- Sone T., Nagamori E., Ikeuchi T., Mizukami A., Takakure Y., Kajiyama S., Fukusaki E., Harashima S., Kobayashi A, Fukui K., 2002. A novel gene delivery system in plants with calcium alginate micro-beads. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, No1, 87-92.
- 98- Ștefuca V., Gemeiner P., Bales V., 1988. Study of porous cellulose beads as an enzyme carrier via simple mathematical models for the hydrolysis of saccharose using immobilized invertase reactors. *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 306-310.

- 99- Štefuca V., Welwardová A., Gemeiner P., 1997. Flow microcalorimeter auto-calibration for the analysis of immobilized enzyme kinetics. *Analytica Chimica Acta*, 355, 63-67.
- 100- Shishido M., Toda M., 1996. Simulation of oxygen concentration profile in calcium alginate gel beads entrapping during biological phenol degradation. *Chemical Engineering Science*, 1, No 6, 859-872.
- 101- Tata M., Bower P., Brombers S., Duncombe D., Fehrline J., Lau V., Ryder D., Stass P., 1999. Immobilized yeast bioreactor systems for continuous beer fermentation. *Biotechnol. Prog.*, 15, 105-113.
- 102- Tharavangul P., Suppakitkarm P., Kanatharana P., Mattiasson B., 1999. Batch injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 19-25.
- 103- Thibault J.F., Colonna P., Propriétés fonctionnelles : pectine et amidon. In Lorient D., Colas B., Le Mesle M., Propriétés fonctionnelles des macromolécules alimentaires. *Les Cahiers de l'ENS BANA*. Paris, Tech. & Doc. – Lavoisier, pages 157-171, 1988.
- 104- Tiu C., Zhou J.Z.Q., Nicolae G., Fang T.N., Chhabra R.P., 1997. Flow of viscoelastic polymer solutions in mixed bed particles. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 75, 843-850.
- 105- Vermuri G., Barnerjee R., Bahttacharyya B.C., 1998. Immobilization of lipase using egg shell and alginate as carriers: optimization of reaction conditions. *Bioprocess Engineering*, 19, 111-114.
- 106- Villiermaux J., Génie de la réaction chimique, conception et fonctionnement des réacteurs. Paris, Tech.& Doc.- Lavoisier, 448 pages, 1993.
- 107- Vorster D.J., Botha F.C., 1998. Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase. *Phytochemistry*, 49, No 3, 651-655.
- 108- Vrabel P., Polakovič M., Godo Š., Báles V., Dočolomanský P., Gemeiner P., 1997. Influence of immobilization on the thermal inactivation of yeast invertase. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 196-202.
- 109- Wang N.S., 1996. Experiment No7b: Enzyme immobilization protocol entrapment in alginate gel. *Protocole de travaux pratiques*, Université du Maryland, Etats-Unis.
- 110- Westhaus E., Messersmith P.B., 2001. Triggered release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogels. *Biomaterials*, 22, 453-462.
- 111- Wilks E., *Industrial polymers handbook: Production, Processes, Application Vol.3*. New York, Wiley – VCH, p. 3160-3162, 2001.