

Bioréacteurs et enzymes immobilisées

Hydrolyse du saccharose en réacteur tubulaire par de l'invertase immobilisée par adsorption

Il est possible d'immobiliser l'invertase (β -fructosidase) de *Saccharomyces cerevisiae* par adsorption sur résine échangeuse d'anions. L'adsorption est forte et la désorption très faible même après de nombreuses heures d'utilisation en réacteur tubulaire (Packed Bed Reactor, PBR).

Travail à réaliser :

Immobiliser de l'invertase sur billes poreuses à matrice styrène-divinylbenzène macroréticulé et groupement actif échangeur d'anions. Mesurer le rendement de l'immobilisation. Les modes opératoires sont présentés en annexe 1.

Construire un petit réacteur tubulaire à invertase immobilisée selon les instructions fournies dans le document annexe 2. Faire fonctionner le réacteur jusqu'à obtention d'un régime stationnaire qui sera précisément décrit grâce à l'analyse de l'effluent de sortie. (voir aussi le document annexe 2).

Dans le compte-rendu, prendre soin de justifier tous les calculs réalisés.

Document annexe 1

Immobilisation d'invertase sur résine amberlite™ échangeuse d'anions

Résine proposée

	IRA 96
limit	100 °C max. temp.
moisture	~60%
matrix	styrene-divinylbenzene (macroreticular)
matrix active group	polyamine functional group
operating pH	0 - 7
capacity	1.25 meq/mL by wetted bed volume 4.7 meq/g by dry weight
particle size	16-50 mesh (Wet mesh)

Mode opératoire d'immobilisation pour la réalisation d'un petit réacteur tubulaire

- 2,5 g de résine équilibrée en tampon acétate de sodium 0,01 mol/L pH 4,5. Reprise et séchage doux (24 heures à température du laboratoire).
- 5 mL de solution d'invertase à 1000 U/mL en tampon acétate de sodium 0,01 mol/L pH 4,5.
Invertase Unit Definition : One unit will hydrolyze 1.0 μ mole of sucrose to invert sugar per min at pH 4.5 at 55°C. Km vers 25 mmol/L pour l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Remettre en suspension les 2,5 g de résine dans la solution enzymatique et laisser sous agitation douce pendant 30 minutes.
- Recueillir la résine, mesurer l'absorbance de la phase aqueuse à 280 nm avant de rejeter, laver avec 10 mL de tampon tampon acétate de sodium 0,01 mol/L pH 4,5 et 5 minutes d'agitation douce. Répéter 2 fois le lavage. L'absorbance à 280 nm des phases aqueuses rejetées doit tendre vers 0 (toutes les protéines non adsorbées sont alors éliminées ...)

Mesure du rendement d'immobilisation

Réaliser une immobilisation témoin avec 0,2 g de résine et 0,4 mL d'invertase à 1000 u/mL en microtube à centrifugation. 30 minutes d'agitation douce sur table vibrante. 5 Lavages de 5 minutes sous agitation douce avec 1 mL de tampon (décantation de la résine par centrifugation douce).

Dans un Becher à double enveloppe thermostaté à 55°C et contenant 100 mL de saccharose à 80 g/L tampon acétate de sodium 0,01 mol/L pH 4,5 à 55°C et sous agitation, introduire l'enzyme immobilisée. Prélever 20µL de milieu réactionnel aux temps 1, 2, 3 et 4 minutes exactement et doser extemporanément le glucose formé selon le mode opératoire du tableau ci-dessous (adaptation d'un kit de dosage du glucose GOD/PAP pour biologie médicale. Voir aussi les documents de cours et de TP de première année concernant ce kit.)

	Témoin réactifs	Etalon 1g/L	Essai 1 ou 4 minutes
Eau	E = 20 µL		
solution étalon		E = 20µL	
Échantillon à mesurer			E = 20 µL
solution de travail	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
<p><u>Homogénéiser</u> puis lire l'absorbance de l'étalon ($A_{\text{étalon}}$) et de l'essai (A_{essai}) contre le témoin réactif à 505 nm quand la réaction est terminée. Il faut 10 minutes à 37°C et 20 minutes à 20°C. Linéarité jusqu'à 5g/L dans l'échantillon dans les conditions proposées.</p>			

Tracer la courbe [glucose] dans le milieu réactionnel en fonction du temps. Analyser. En déduire l'activité immobilisée et le rendement d'immobilisation.

Document annexe 2

Petit réacteur tubulaire à invertase immobilisée

Mettre en suspension la résine à invertase immobilisée (les 2,5 g réalisés avant) en tampon acétate de sodium 0,01 mol/L pH 4,5.

Construire un petit réacteur tubulaire selon le schéma ci-dessous.

Alimenter en saccharose à 80 g/L (glucose non détecté). Débits proposés à tester : 0,2 à 1 mL/min. Analyse d'effluent aux temps : 0, 2, 4, 6, 8 minutes (valable pour des volumes morts de tuyauterie de sortie < 1mL)

Analyse de l'effluent : dosage du glucose avec le kit GOD/PAP, cf. mode opératoire du document annexe 1. Attention à la limite de praticabilité. Il faudra certainement diluer les essais effluent.

Rappel :

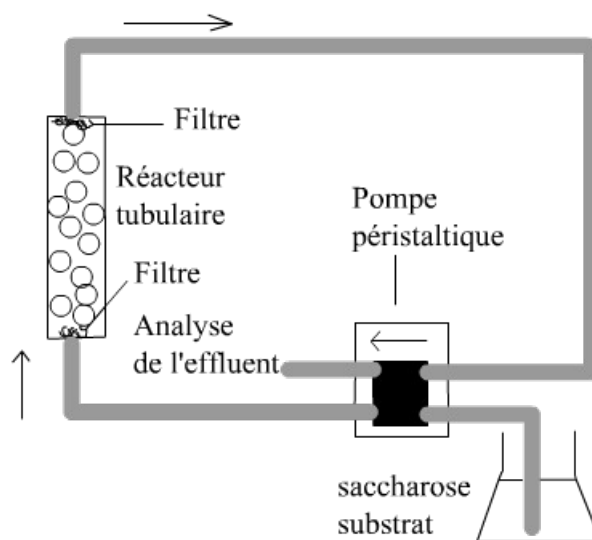
saccharose + eau \rightarrow glucose + fructose ;

réaction irréversible totale ;

$M_{\text{saccharose}} = 342 \text{ g/mol}$;

$M_{\text{glucose}} = 180 \text{ g/mol}$.

On aura donc intérêt à calculer la concentration théorique en glucose dans l'effluent pour une réacteur d'efficacité 100% pour prévoir les dilutions pour les dosages.



Bibliographie :

- J. Boudrant, C. Cheftel : Continuous hydrolysis of sucrose by invertase adsorbed in a tubular reactor, Biotech. And Bioengineering (1975) 17:827-844.

- Immobilized biocatalysts : an introduction / by Winfried Hartmeier; tr. by Joy Wieser , Berlin : Springer-Verlag, 1988 .