

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat - Mention Sciences

TECHNOLOGIE ENZYMATIQUE :
ETUDE DE REACTEURS ENZYMATIQUES CONTINUS.
APPLICATION AU TRAITEMENT DE LIQUIDES ALIMENTAIRES

par

Joseph BOUDRANT

Bou / 330

Soutenu le 16 Juillet 1976 devant la Commission d'Examen.

JURY :	Mme	H. COLSON - GUASTALLA	Président
	Mlle	D. GAUTHERON	}
	M.	G. DURAND	
	M.	D. THOMAS	
	M.	C. CHEFTEL	
			Assesseurs

LISTE DES PROFESSEURS

Président : J. ROUZAUD

Vice-Présidents : B. CHARLES - G. SAUMADE

Doyens Honoraires à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :

P. MATHIAS
B. CHARLES
A. CASADEVALL

Président Honoraire : P. DUMONTET

Professeurs Honoraires de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :

R. JACQUES	G. DENIZOT	P. CHATELAIN
M. CASTERAS	J. GRANIER	A.M. VERGNOUX
E. CARRIERE	Ch. BOUHET	E. KAHANE
E. TURRIERE	J. SALVINIEN	P. VIELES
C. CAUQUIL	M. MOUSSERON	

Secrétaire Général : E. SIAU

Professeurs titulaires :

- M.	J.P. ROIG	Physique
- M.	G. COUCHET	Mécanique supérieure
- M.	J. AVIAS	Géologie
- M.	R. MAURY (I.P.A.)	Droit
- M.	J.J. MOREAU	Mécanique rationnelle
- M.	B. CHARLES	Mathématiques pures
- M.	R. JOUTY	Physique
- M.	R. LEGENDRE	Zoologie
- M.	I. ASSENMACHER	Physiologie animale
- M.	B. PISTOULET	Physique
- M.	Ch. ROUMIEU	Analyse supérieure
- M.	J. ROBIN	Physique
- M.	A. POTIER	Chimie minérale

- M. G. LECOY E. E. A.
- M. R. GAUFRES Chimie
- M. J.V. ZANCHETTA Chimie

Professeurs sans chaire :

- M. G. TOURNE Chimie
- M. J. REMY Géologie
- M. P. DEMANGEON Géologie
- Mme H. GUASTALLA Biologie Physico-Chimique
- M. R. LENEL Biologie animale
- M. A. BASSOMPIERRE Physique
- M. N. ROBY Mathématiques
- M. P. MOLINO Mathématiques
- M. J. LEGRAND Physiologie animale
- M. R. JONARD Botanique
- M. R. CANO (I.U.T.) Mesures physiques
- M. J.P. FILLARD (I.U.T. NIMES) Génie électrique
- M. J.L. IMBACH Chimie
- M. J. D'AUZAC Physiologie végétale
- M. G. BOUX Zoologie
- M. L. GIRAL Chimie organique
- M. M. AMANIEU (Sciences et Techniques) Hydrologie et mariculture
- M. M. DENIZOT Biologie végétale
- M. B. BRUN Chimie physique
- M. J.D. BAYLE Physiologie animale
- M. J.P. QUIGNARD Biologie animale
- M. Ph. VIALLEFONT Chimie
- M. J. GARCIA (I.U.T. NIMES) Génie mécanique
- M. P. LOUIS Géophysique appliquée
- M. M. LEFRANC Mathématiques
- M. G. MASCHERPA Chimie
- M. C. GOUT Physique
- M. J.P. TRILLES Biologie appliquée
- M. F. HALLE Biologie végétale
- M. G. BORDURE Génie électrique
- M. A. DONNADIEU Physique
- M. Cl. BOCQUILLON Hydrologie
- M. A. RAIBAUT Biologie animale
- M. J.P. NOUGIER Electronique

- M.	R. LAFONT	Physique
- M.	R. JACQUIER	Chimie
- M.	J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
- M.	J. REGNIER	Chimie
- Mme	J. CHARLES	Mathématiques
- M.	P. CAILLON	Physique
- M.	J. ROUZAUD	Chimie
- M.	Ch. SAUVAGE	Botanique
- M.	H. CHRISTOL (E.N.S.C.M.)	Chimie
- Mme	G. VERNET	Biologie animale
- M.	L. CECCHI	Physique
- M.	H. ANDRILLAT	Astronomie
- M.	M. SAVELLI	Physique
- M.	M. MATTAUER	Géologie
- M.	L. EUZET	Zoologie
- M.	C. DELOUPY	Physique
- M.	L. GRAMBAST	Botanique
- M.	A. BONNET	Botanique
- M.	G. LAMATY	Chimie
- M.	R. MARTY	Psychophysiologie
- Mme	S. ROBIN	Physique
- M.	R. CORRIU (I.U.T.).....	Chimie
- Mme	N. PARIS	Physiologie végétale
- M.	J. ZARZYCKI	Sciences des matériaux
- M.	S. GROMB	Chimie Physique
- M.	F. SCHUE	Chimie organique
- M.	M. MAURIN	Chimie minérale
- M.	P. SABATIER	Mathématiques
- M.	L. THALER	Paléontologie
- M.	E. GROUBERT	Physique
- M.	M. ROUZEYRE	Physique
- M.	Ch. CASTAING	Mathématiques
- M.	F. PROUST	Géologie
- M.	J.M. MORETTI	Biochimie
- M.	J. PARIS	Biologie animale
- M.	A. GROTHENDIECK	Mathématiques
- M.	C. DURANTE	Physique
- M.	G. BOUGNOT	Physique

Professeurs associés :

- M.	E. AKUTOWICZ	Mathématiques
- M.	A. MICALI	Mathématiques
- M.	C. VAGO	Biologie animale
- M.	L. DAUZIER	Physiologie animale
- M.	F. WINTERNITZ	Chimie organique
- M.	R. SENOUILLET	Economie et Gestion
- M.	C. MAURIN	Biologie animale
- Mme	M. VAN CAMPO	Biologie végétale
- M.	P. GALZY	Biochimie
- M.	E. VERDIER	Chimie générale
- M.	E. SERVAT	Géologie
- M.	K. RUSTAGI	Physique

Maîtres de conférences :

- M.	G. LOUPIAS	Mathématiques
- M.	R. HAKIM	Mathématiques
- M.	F. LAPSCHER	Mathématiques
- M.	L. LASSABATERE (I.U.T.)	Mesures physiques
- M.	Y. PIETRASANTA (E.N.S.C.M.)	Chimie appliquée
- M.	J. CROUZET (Sciences et Techniques)	Biochimie appliquée
- M.	A. COMMEYRAS	Chimie organique
- M.	P. MATHIEU	E.E.A.
- M.	J.L. ROBERT (I.U.T. NIMES)	Génie électrique
- Mlle	M. LEVY (I.U.T.)	Chimie
- M.	J. LAGARRIGUE (I.U.T.)	Biologie appliquée
- M.	Cl. DROGUE (Sciences et Techniques)	Hydrogéologie
- M.	P. GENESTE (E.N.S.C.M.)	Chimie physique appliquée
- M.	J.C. CHEFTEL (Sciences et Techniques)	Biochimie appliquée à l'alimentation
- M.	M. AVEROUS (I.U.T. NIMES)	Génie électrique
- M.	B. LEMAIRE (Sciences et Techniques)	Mathématiques appliquée - Informatique
- M.	M. VALADIER	Mathématiques
- M.	O. MAISONNEUVE (I.U.T.)	Informatique
- M.	J.P. BARD	Géologie

- M.	A. SANS	Psychophysologie
- M.	Y. ESCOUFIER	Informatique
- M.	L. COT (E.N.S.C.M.)	Chimie
- M.	R. BRUNEL	Physique
- M.	C. BENOIT	Physique
- M.	P. DELORD	Physique
- M.	P. JOUANNA (I.U.T. NIMES)	Génie civil
- M.	M. GODRON	Ecologie végétale
- M.	R. BEN AIM	Génie chimique et traitement des eaux
- M.	P. BESANCON	Physiologie de la nutrition appliquée à l'alimentation
- M.	J. PETRISSANS	Chimie
- M.	J.Y. GAL	Chimie analytique appliquée
- M.	Ph. JEANTEUR	Biochimie
- M.	H. GIBERT (Sciences et Techniques)	Génie alimentaire
- M.	A. LIEGEOIS	Automatique
- M.	B. TARODO DE LA FUENTE	Biochimie appliquée et techniques des matières alimentai- res
- M.	A. PAVIA	Chimie
- M.	Y. NOUAZE	Mathématiques

Maître de conférences associés :

- M.	I. FREIBERGS	Informatiques
------	--------------------	---------------

Chargés d'enseignement :

M.	B. FILLIATRE	Informatique
M.	J. FERRIE	Informatique
M.	P. HINZELIN	Génie civil

Chargés des fonctions de maître de conférences :

- M.	G. SAUMADE (I.U.T.)	G.E.A. (Economie des entreprises)
------	---------------------------	--------------------------------------

Chargés de cours :

- M.	J. GUIN (I.P.A.)
- M.	M. MOUTON (I.U.T.)

à ma femme,
à mes enfants,
à mes parents,
à mes amis.

à ma femme,
à mes enfants,
à mes parents,
à mes amis.

La plus grande partie des travaux qui sont présentés ici a été réalisée dans le laboratoire de Biochimie et Technologie Alimentaires que dirige Monsieur C. CHEFTEL, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Montpellier. Je désire lui exprimer, très personnellement, ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire, m'avoir proposé ce sujet de recherche et en avoir guidé la progression. Qu'il soit assuré que son dynamisme, sa rigueur scientifique et sa cordialité resteront gravés très longtemps dans ma mémoire.

Madame H. COLSON-GUASTALLA, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Montpellier a bien voulu accepter la présidence de ce jury de thèse. Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de ma très vive reconnaissance.

Je tiens à remercier très vivement Mademoiselle D. GAUTHERON, Professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon. En dépit de ses très lourdes tâches, elle a bien voulu se déplacer pour juger ce travail.

Je désire exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur G. DURAND, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Il a accepté, malgré toutes ses occupations, de venir à Montpellier pour être membre de ce jury.

J'exprime aussi, pour la même raison, ma gratitude à Monsieur D. THOMAS, Maître de Conférences à l'Université de Technologie de Compiègne. Ses travaux ont apporté une très importante contribution en ce domaine.

Je tiens à remercier le mieux possible mes camarades de laboratoire, tout spécialement M. BELLAL, H. CRETIN, J.P. GIRARDET et M. MATRAT, qui m'ont aidé ou cotoyé dans la réalisation de ce

.../...

travail. Tous ont toujours su faire régner le meilleur climat de sympathie, de bonne entente et aussi de discussions fructueuses.

Je veux remercier encore J.L. CUQ, je n'oublie pas ce que m'a apporté sa présence lorsque nous avons débuté ensemble dans ce laboratoire.

Ma reconnaissance s'adresse enfin à la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique et à l'Agence Nationale pour la Valorisation de la Recherche pour leurs appuis financiers.

J. B.

PLAN

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 - REACTEURS HOMOGENES	8
1.1 - Réacteurs homogènes limités par une membrane d'ultra- filtration	9
1.1.1.- Hydrolyse continue de saccharose par de l'inver- tase immobilisée sous forme soluble	10
1.1.2 - Préparation continue d'hydrolysats protéiques à l'aide d'une protéase stabilisée immobilisée sous forme soluble	18
1.1.2.1 - Stabilisation chimique d'une protéase alcaline	19
1.1.2.2 - Protéolyses continues	46
1.2 - Réacteur homogène sans rétention d'enzyme : Cas parti- culier de l'oxydation du glucose	73
1.2.1 - Etude cinétique préalable de réactions dis- continues. Application de la théorie du trans- fert d'oxygène : détermination de la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène	74
1.2.2 - Oxydation continue du glucose en réacteur homogène	80
CHAPITRE 2 - REACTEURS TUBULAIRES	84
2.1 - Réacteurs tubulaires avec rétention d'enzymes par adsorption	85
2.1.1 - Hydrolyse continue du saccharose	85
2.1.1.1 - Essais avec une invertase pour usages biochimiques	86

2.1.1.2 - Essais avec une invertase pour usages industriels	104
2.1.2 - Essais d'application à d'autres réactions d'intérêt industriel	120
2.1.2.1 - Essais d'adsorption de pectinases ...	120
2.1.2.2 - Essais d'adsorption de protéases	125
2.2 - Réacteurs en lit fluidisé où l'enzyme est fixée de façon covalente sur un support dense	128
2.2.1 - Etude préliminaire ; papaïne fixée sur un support magnétique	129
2.2.2 - Performances du réacteur en lit fluidisé	133
2.2.2.1 - Comparaison des efficacités des réacteurs à lit fixe et fluidisé	133
2.2.2.2 - Influence de la masse volumique apparente des particules et de la viscosité de la solution de substrat sur les performances du réacteur à lit fluidisé	138
2.2.2.3 - Essai de réalisation pratique . Application à la protéolyse	141
 CONCLUSION GENERALE - RESUME	 153
 BIBLIOGRAPHIE	 159

I N T R O D U C T I O N

G E N E R A L E

L'utilisation d'enzymes pour catalyser des réactions d'intérêt industriel présente certains avantages par rapport aux procédés relevant de la chimie organique et de la microbiologie appliquée :

- simplicité de l'équipement et des opérations qui peuvent éventuellement être faites en milieu stérile, après filtration des solutions enzymatiques,
- spécificité de la catalyse,
- rapidité, même dans des conditions modérées,
- possibilité de réactions continues, en plusieurs étapes, si nécessaire.

Les désavantages principaux des enzymes sont liés à leur instabilité et à leur prix. L'éventuelle nécessité de coenzyme et le caractère réversible des réactions catalysées par les enzymes peuvent aussi présenter des problèmes.

L'amélioration des techniques de production économique de diverses enzymes microbiennes par fermentation (DEMAIN, 1971 - CHARM et MATTEO, 1971), la découverte des méthodes de purification par chromatographie d'affinité (CUATRECASAS, 1971), la possibilité de fixer les enzymes par différents procédés (GRYSKIEWICZ, 1971) et de les réutiliser ou de les stabiliser marquent la naissance de la technologie enzymatique. Dès lors, il est possible d'envisager l'emploi industriel des enzymes pour la catalyse de nombreuses réactions (FAITH et al., 1971). Ces catalyseurs biologiques peuvent être utilisés dans divers types de réacteurs discontinus ou continus que l'on qualifie de "biologiques" (LILLY et DUNNILL, 1971).

Les applications potentielles vont du traitement des maladies héréditaires à l'épuration d'effluents industriels. La majeure partie des applications actuelles concerne la technologie alimentaire (WIELAND, 1972 - REED, 1966).

Les revues bibliographiques concernant ce sujet sont nombreuses et l'on peut citer celles de SILMAN et KATCHALSKI (1966), de Mc LAREN et PACKER (1970), GRYSKIEWICZ (1971), ZABORSKY (1973), et plus récemment et en français celle de DURAND et MONSAN (1975). Tous ces auteurs s'accordent pour classer les divers modes de fixation d'enzymes utilisés. Il y en a quatre principaux :

1) *Adsorption physique :*

La liaison ainsi formée entre l'enzyme et le support est réversible. En conséquence, la perte d'activité enzymatique par désorption peut être importante. Lorsque le support est une résine échangeuse d'ions, les propriétés polyélectrolytiques des protéines peuvent renforcer l'adsorption entre l'enzyme et le support. L'adsorption n'est cependant efficace que dans certains intervalles de pH et de force ionique.

2) *Formation de liaisons covalentes entre enzyme et support :*

Le support est activé par introduction d'un groupement chimique capable de réagir avec les groupements aminés, hydroxyles ou carboxyliques libres des enzymes. Le groupe actif fixé sur le support peut être soit un groupement azide (MITZ et SUMMARIA, 1961), diazo (ENZACRYL), isothiocyanate (AXEN et PORATH, 1966) et triazinyl (KAY et CROOK, 1967) etc ...

3) *Réticulation des molécules d'enzyme :*

Les molécules d'enzyme sont réticulées entre elles par des liaisons covalentes transversales réalisées à l'aide de réactifs multifonctionnels. Il y a alors formation d'un réseau tridimensionnel. Les agents multifonctionnels utilisés peuvent être le glutaraldéhyde (AVRAMEAS et al., 1968), l'acide bis-diazobenzidine-2,2'-disulphonique (GOLDMAN et al., 1968). SILMAN et KATCHALSKI (1966) mentionnent d'autres réactifs qui peuvent être également utilisés.

4) *Inclusion de l'enzyme dans un support réticulé :*

Les molécules d'enzyme peuvent être immobilisées de façon irréversible par inclusion dans un gel fortement réticulé. Celui-ci peut être un gel de polyacrylamide (HICKS et UPDIKE, 1966), de dextrans (CHAPPELLE et al., 1967)

ou d'amidon (GUILBAULT et KRAMER, 1965), ou encore des membranes semi-perméables (CHANG, 1964).

La fixation d'une enzyme sur un support insoluble peut lui faire perdre une partie de son activité (GOLDSTEIN et KATCHALSKI, 1968) probablement dans la mesure où la fixation modifie parfois le centre actif, et en raison de l'encombrement stérique dû au support. Dans certains cas, la fixation peut cependant conférer à l'enzyme l'avantage d'une plus grande stabilité vis à vis des agents dénaturants (chaleur en particulier) (BROUN et al., 1969) ou protéolytiques (VERAGUD et CHRISTENSEN, 1975).

Mais c'est surtout la facilité de la séparation enzyme-produits en fin de réaction ou lors d'opérations continues, qui constitue l'intérêt des enzymes fixées, puisqu'elle permet la réutilisation prolongée de ces dernières (LACHMANN, 1972).

Signalons également les études assez récentes concernant la stabilisation des enzymes vis à vis de la dénaturation thermique. Deux procédés sont actuellement utilisés. Le premier est génétique : une culture à température élevée de micro-organismes thermophiles permet d'isoler des enzymes plus thermorésistantes (DOIG, 1975). Le second est chimique : l'addition d'inhibiteurs, d'agents réducteurs, de réactifs multifonctionnels et d'hydrates de carbone permet également de diminuer la dénaturation thermique (WISEMAN, 1973). Ces dernières études restent cependant inexplicables dans la mesure où les mécanismes de dénaturation le sont aussi.

D'autres méthodes de fixation d'enzymes, physiques ou chimiques, autres que celles précédemment citées ont été mises au point. Certaines font d'ailleurs simultanément appel à plusieurs des modes de fixation mentionnés ci-dessus (ZABORSKY, 1972). En ce qui concerne les enzymes, les travaux ont essentiellement porté sur l'immobilisation des hydrolases et enzymes ne nécessitant pas de cofacteurs.

Signalons cependant que des études récentes ont apporté des résultats intéressants en ce qui concerne l'immobilisation de coenzymes (CHIBATA et al., 1975 - WEIBEL et al., 1975 - MOSBACH et al., 1975) et d'enzymes capables de régénérer des cofacteurs (JULLIARD et al., 1971 - CHAMBERS et al., 1975 - WHITESIDES et al., 1975).

Dans le cas de la fixation d'une enzyme sur un support insoluble le choix de celui-ci est important. Une grande variété de supports a été utilisée. (VIETH et VENKATASUBRAMANIAN, 1973) ; les principaux critères de choix sont les caractères physiques du matériau, la capacité de liaison, l'activité de l'enzyme après immobilisation, le type de réacteur envisagé, le coût ainsi que la possibilité de régénération.

En ce qui concerne les réacteurs, les divers types pouvant être utilisés de façon continue sont bien connus (LILLY et SHARP, 1967 - VIETH et VENKATASUBRAMANIAN, 1974 b). Il existe deux catégories principales : les réacteurs homogènes et les réacteurs tubulaires.

Dans les réacteurs homogènes, l'enzyme peut être utilisée soit sous forme soluble, soit immobilisée sur un support insoluble. Dans le premier cas, le procédé de rétention de l'enzyme est une membrane d'ultrafiltration ; celle-ci permet le passage des produits de la réaction tout en assurant la rétention de l'enzyme (BUTTERWORTH et al., 1970). Dans le second cas un moyen de séparation du support, tel que filtration à la sortie du réacteur est utilisé (SMILEY, 1971 - O'NEILL et al., 1971 a). Signalons également que des réacteurs homogènes avec séparation et recyclage du support enzymatiquement actif ont été étudiés (KINGMA, 1966 - HORWATH et al., 1973).

Le réacteur continu le plus fréquemment utilisé est probablement le réacteur tubulaire à lit fixe ; son comportement a en effet été décrit par de nombreux auteurs (BAR ELI et KATCHALSKI, 1966 - ARNOLD, 1966 - LILLY et al., 1966 - MONSAN, 1971 - GELLF et al., 1973 a et 1973 b - MARRAZZO et al., 1975). Un autre type de réacteur tubulaire est le réacteur à lit fluidisé, particulièrement intéressant pour le traitement de solutions troubles (CHERYAN et al., 1975). Il faut alors immobiliser l'enzyme sur un support dense (HASSELBERGER et al., 1974). D'autres types de réacteurs enzymatiques continus ont été mis au point. Ainsi des éléments biocatalytiques tubulaires assurant un contact étroit entre l'enzyme et la solution de substrat ont été réalisés (VIETH et al., 1972).

Les diverses études effectuées sur ces réacteurs ont portées d'une part sur le calcul de leurs performances en fonction de la réaction qui s'y déroule (LILLY et SHARP, 1967 - VIETH et VENKATASUBRAMANIAN, 1974 b) et d'autre part sur la comparaison de l'efficacité des divers types de réacteurs vis à vis d'une réaction donnée. Ainsi lors de l'hydrolyse du maltose par l'amyloglucosidase, un réacteur tubulaire semble plus efficace qu'un réacteur continu homogène (O'NEILL et al., 1971 b). On peut remarquer que, si la plupart des systèmes

ont été étudiés avec de faibles concentrations de substrat, certains auteurs (SMILEY, 1971 - WEETALL et al., 1974 - WIERZBICKI, 1974 - CHERYAN et al., 1975) ont cependant essayé de travailler dans des conditions plus proches des exigences industrielles.

Si une quantité importante de travaux (voir compte-rendus de réunions scientifiques : WINGARD, 1972 - PYE et WINGARD, 1974 - OLSON et COONEY, 1974) a été publiée, beaucoup de problèmes pratiques ne sont pas résolus. (Citons, par exemple, ceux de l'instabilité de l'activité enzymatique et du développement microbien lors d'une expérimentation de longue durée. La résolution de ces problèmes techniques, peut être plus difficile et moins spectaculaire que la découverte d'un procédé d'immobilisation d'enzyme et est fondamentale pour l'application de procédés à la technologie enzymatique. C'est la raison principale pour laquelle les diverses revues bibliographiques mentionnent plus les applications potentielles - qu'elles soient industrielles (DURAND et BAUDRAS, 1975), analytiques (GUILBAULT, 1972), ou médicales (CHANG, 1969) - que les réalisations déjà mises en oeuvre dans l'industrie. De telles réalisations semblent être actuellement limitées à trois opérations :

1) Aux Etats-Unis et en Grande Bretagne, la pénicilline amidase immobilisée sur cellulose, dans un réacteur à lit fixe, permet l'hydrolyse de la benzyl-pénicilline en acide 6-aminopénicillanique, précurseur d'une variété de pénicillines semisynthétiques (WEETALL, 1973).

2) Au Japon, l'aminocyclase adsorbée sur D E A E cellulose est utilisée pour la transformation de mélanges d'acides aminés D et L en la forme L physiologiquement active (CHIBATA et al., 1972).

3) Aux Etats-Unis, la glucose isomérase adsorbée sur D E A E-cellulose permet de transformer en continu le glucose en fructose (MERMELSTEIN, 1975).

L'utilisation d'un nouveau procédé fait appel aux processus de développement et d'extrapolation des expérimentations effectuées à l'échelle du laboratoire. Il nécessite en général un passage à une échelle intermédiaire (atelier pilote) où interviennent les mêmes phénomènes que ceux étudiés au laboratoire, phénomènes de cinétique notamment. Le passage à l'échelle industrielle fait appel à d'autres bilans dans lesquels interviennent des facteurs économiques. Ainsi dans le cas de la production des acides aminés de la forme L à l'aide de l'aminocyclase adsorbée sur D E A E cellulose, le coût de production

serait inférieur de 40% à celui du procédé utilisant l'enzyme soluble non récupérée (VIETH et VENKATASUBRAMANIAN, 1973).

L'ensemble des notions concernant la technologie enzymatique ne recouvre qu'une partie du génie biochimique dont AIBA et al. (1965) ont donné la définition suivante : *"Le génie biochimique est l'étude de procédés économiques utilisant des matériaux d'origine ou de caractère biologique à des fins préparatives. La fonction de l'ingénieur biochimiste est d'utiliser les connaissances du microbiologiste et du biochimiste pour des opérations d'intérêt industriel. Pour ce faire, celui-ci doit non seulement avoir de solides bases en sciences biologiques mais également en génie chimique"*.



Au cours du présent travail, nous avons étudié diverses réactions enzymatiques d'intérêt industriel. L'hydrolyse du saccharose, la transformation du glucose en acide gluconique, la préparation d'hydrolysats protéiques et l'hydrolyse des pectines en vue de la clarification des jus de fruits ont été choisies comme modèles de ces réactions et étudiées dans des réacteurs permettant une réaction continue.

Nous présentons le développement expérimental de ce travail en tenant compte du type de réacteur employé. Dans chacun des cas nous avons tenté d'analyser certains phénomènes se rapportant aux systèmes étudiés, que ces phénomènes constituent un avantage ou une limitation pour les applications ultérieures de ces systèmes.

Le premier chapitre se rapporte aux utilisations du réacteur homogène agité. L'hydrolyse du saccharose et la préparation d'hydrolysats protéiques ont été étudiées dans un réacteur de ce type, les enzymes étant retenues sous forme soluble à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration. Dans le deuxième cas, la stabilité de l'activité enzymatique dans le réacteur a été améliorée à l'aide d'un traitement chimique préalable de l'enzyme. L'oxydation continue du glucose, dans un réacteur homogène agité ne retenant pas l'enzyme, a également été étudiée. Des expériences préliminaires réalisées de manière discontinue ont permis de déceler que le transfert d'oxygène est le facteur limitant de la réaction. Le deuxième chapitre concerne les utilisations du réacteur tubulaire. L'hydrolyse du saccharose y a également été étudiée ; le réacteur est à lit fixe et l'enzyme retenue par adsorption sur une résine échangeuse d'ions. Des essais en vue de l'hydrolyse des pectines et des protéines ont été réalisés dans ce même type de réacteur. La réaction de protéolyse a aussi été étudiée dans un réacteur tubulaire à lit fluidisé. Dans ce cas l'enzyme est immobilisée par réticulation sur des particules magnétiques ou par fixation covalente sur du verre poreux. L'efficacité de ce dernier type de réacteur a été comparée à celle d'un réacteur à lit fixe et étudiée en fonction de la masse volumique apparente des particules porteuses d'enzyme et de la viscosité de la solution à traiter.

C H A P I T R E 1

REACTEURS HOMOGENES

1.1.1 - Hydrolyse continue du saccharose par de l'invertase immobilisée sous forme soluble.

Joseph BOUDRANT et Claude CHEFTEL.

*Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Université des Sciences et Techniques,
34 - Montpellier, France.*

(27/3/1972).

Summary. — Continuous hydrolysis of sucrose solutions by yeast invertase has been studied in a continuous stirred tank reactor (C.S.T.R.) limited by an ultrafiltration membrane capable of selectively retaining the enzyme.

1. Initially, studies were made of the kinetics of batch sucrose hydrolysis and of invertase stability, under conditions applicable to a continuous process, in particular at high sucrose concentrations.

2. Ultrafiltration studies showed that various membranes retain invertase selectively and remain permeable to solutions of hydrolysed sucrose. The flux of the products of hydrolysis was found to be maximum when the concentration of the solution was close to 50 p. cent.

3. Studies of continuous hydrolysis without enzyme retention showed that the steady state ratio of sucrose hydrolysis may be predicted from the kinetics of the batch enzymatic reaction and from the substrate material balance in a C.S.T.R.

4. Studies of continuous hydrolysis with enzyme retention through ultrafiltration showed that invertase reutilisation for 5 days, at 50°C, does not lead to any detectable loss of enzyme activity. Under the conditions adopted, the ratio of sucrose hydrolysis remained constant, and close to 90 p. cent.

L'hydrolyse du saccharose par de l'invertase de levure a été choisie comme modèle de réaction enzymatique d'intérêt industriel et étudiée dans un système permettant l'hydrolyse continue du substrat par une quantité fixe et continuellement réutilisée d'enzyme en solution.

Ce système consiste principalement en un réacteur homogène limité par une membrane d'ultrafiltration. Le réacteur, qui contient une solution d'enzyme, est alimenté de façon continue en substrat. Le milieu réactionnel à l'intérieur est dans un état stationnaire et réparti de façon homogène grâce à l'agitation. La membrane d'ultrafiltration retient sélectivement les molécules d'enzyme mais laisse passer les molécules de faibles poids moléculaires, eau, produits de la réaction et substrat. Le temps de résidence nominal de la solution de saccharose à l'intérieur du réacteur est établi de façon à ce que le taux de conversion (d'hydrolyse) à la sortie du réacteur soit de l'ordre de 90 p. cent. De tels réacteurs enzymatiques à membrane ont été étudiés par Wang et al. [1].

L'invertase extracellulaire de levure (EC 3.2.1.26) est une glycoprotéine contenant environ 50 p. cent d'hydrates de carbone [2, 3, 4, 5]; son poids moléculaire est proche de 270 000 [3, 4]. L'invertase

catalyse l'hydrolyse de sucres possédant un résidu terminal non substitué β -D-fructofuranosyl. La cinétique de l'hydrolyse du saccharose, ainsi que l'effet inhibiteur du substrat et des produits de réaction ont été étudiés [6, 7, 8]. Une activité transférasiqne de l'invertase a été mise en évidence [9, 10, 11]. Un mécanisme d'action de l'enzyme a été récemment proposé [12].

On peut mentionner que les solutions de sucre inverti préparées dans l'industrie sont obtenues par hydrolyse en présence soit d'acide chlorhydrique, soit de résines échangeuses de cations [13]. Des essais d'utilisation d'invertase fixée sur divers supports ont été publiés [14, 15, 16].

MATERIELS ET METHODES.

L'invertase de levure (extrait lyophilisé) et le saccharose « pour usages biochimiques » proviennent de Merck. Les expériences continues ont été faites avec du saccharose « très pur » Merck. La glucose oxydase provient de Worthington Biochemical Corp. L'azote provient de l'Air liquide (qualité U, 99,9 p. cent de N₂).

Les concentrations de sucre sont exprimées en gramme pour 100 millilitres (p. cent).

Appareillage.

Les hydrolyses discontinues ont été faites dans un réacteur à double enveloppe Radiometer (50 ml).

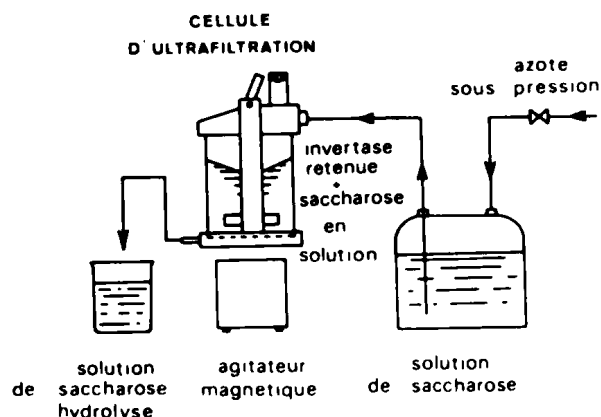


FIG. 1. Principe du montage utilisé lors de l'hydrolyse continue du saccharose avec réutilisation de l'invertase.

Les hydrolyses continues avec rétention d'enzyme ont été faites à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration Amicon, modèle 52, de capacité 65 ml, munie d'un barreau aimanté (figure 1). Les membranes Amicon type Diaflo ont une surface de 12,5 cm². La solution stock de saccharose est placée dans un réservoir inox Amicon type RS de capacité 4 litres. Cette solution pénètre de

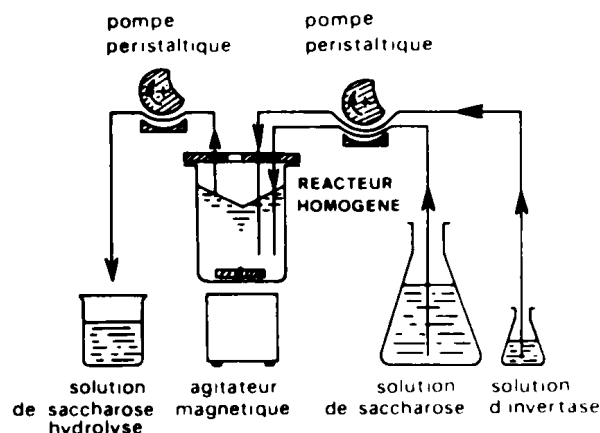


FIG. 2. — Principe du montage utilisé lors de l'hydrolyse continue du saccharose sans réutilisation de l'invertase.

façon continue dans la cellule du fait de la pression d'azote (3 bars), et au fur et à mesure que la solution de substrat plus ou moins hydrolysé présente dans la cellule passe au travers de la membrane d'ultrafiltration. La thermostatisation

est assurée en plaçant la cellule dans un bain d'eau.

Des hydrolyses continues et discontinues sans rétention d'enzyme ont été réalisées avec le réacteur Radiometer. Une pompe péristaltique Sigma-motor permet de faire varier le débit (figure 2).

Méthodes.

L'hydrolyse est faite en solution tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5.

L'hydrolyse est suivie soit par dosage des groupements réducteurs libérés [17], soit par dosage du glucose à l'aide de la glucose oxydase.

Pour les études cinétiques, l'hydrolyse est arrêtée par addition de soude 0,01 N et refroidissement à 0°C. Afin d'exprimer l'activité enzymatique en tant que vitesse initiale d'hydrolyse du

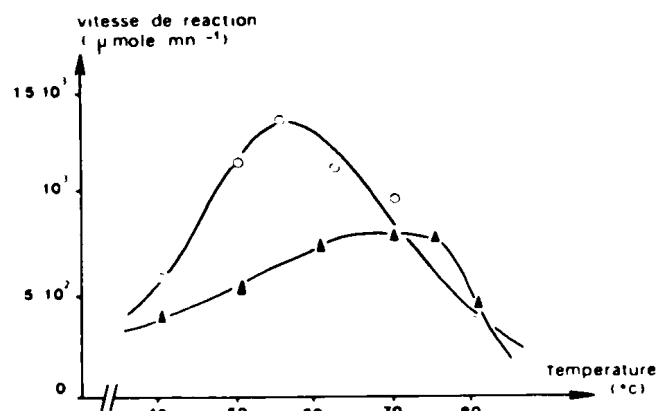


FIG. 3. — Influence de la température sur l'activité enzymatique initiale de l'invertase de levure. Les vitesses d'hydrolyse sont déterminées et exprimées comme indiqué dans « Matériel et Méthodes ». Concentrations en saccharose : 10 % (○-○) et 60 % (▲-▲). tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 ; concentration en invertase : 0,04 mg/ml.

saccharose (micromoles de saccharose hydrolysées par minute et dans les conditions expérimentales adoptées), nous avons tracé la courbe de début d'hydrolyse et déterminé la valeur de la pente à l'origine.

Afin d'évaluer la stabilité de l'invertase en présence des produits d'hydrolyse et également afin d'exprimer la rétention de l'invertase par les membranes d'ultrafiltration, une méthode de dosage de cette enzyme a été mise au point. Un aliquot convenable de solution enzymatique est mélangé à 4 ml d'une solution de saccharose à 15 p. cent dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5. Après 4 minutes de réaction à 22°C, le taux d'hydrolyse doit être au maximum d'environ 20 p. cent. Dans ces conditions, la

Hydrolyse enzymatique continue du saccharose.

quantité de sucres réducteurs formés est proportionnelle à la concentration d'enzyme. Lorsque la solution enzymatique contient déjà du glucose et du fructose, un témoin doit être effectué. L'activité enzymatique est exprimée comme indiqué précédemment.

Les mesures de viscosité sont faites à l'aide d'un viscosimètre à écoulement plongé dans un bain thermostaté. Le calcul des viscosités est fait par rapport à une solution de saccharose de viscosité connue.

RESULTATS ET DISCUSSION.

1°) *Influence des conditions de réaction sur la cinétique d'hydrolyse et sur la stabilité de l'enzyme.*

Des expériences d'hydrolyse discontinue du saccharose ont été faites pour caractériser la préparation d'invertase utilisée.

pH.

Une zone de pH optimum comprise entre 4,2 et 4,8 est observée et un pH de 4,5 retenu pour la suite de cette étude.

Température.

L'influence de la température sur l'activité enzymatique initiale a été étudiée à des concentrations de saccharose de 10 et 60 p. cent (figure 3). On observe une inhibition de l'activité enzymatique à la plus forte concentration en saccharose utilisée, ainsi qu'un effet protecteur de cette concentration de saccharose vis-à-vis de l'inactivation thermique de l'enzyme [cf. 18]; la tempé-

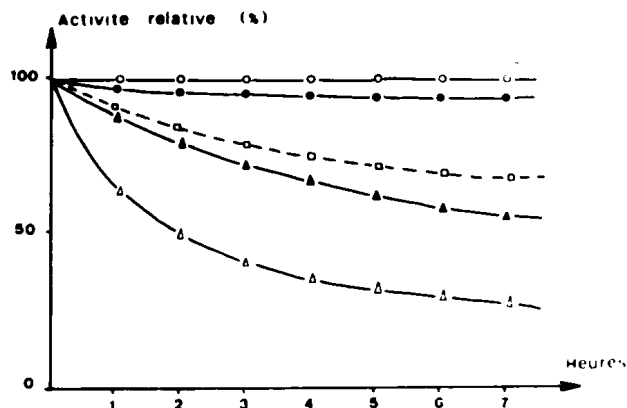


FIG. 4. — Inactivation de l'invertase de levure par la chaleur. Les solutions d'enzyme (1 mg/ml) sont incubées à diverses températures pendant des durées déterminées. Les activités enzymatiques résiduelles sont alors déterminées comme indiqué dans « Matériels et Méthodes » et exprimées par rapport à l'activité présente au temps zéro de l'incubation. Incubation dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5, à 50°C (○-○), 53,5°C (●-●), 56°C (▲-▲), 60°C (△-△) et dans le même tampon contenant du glucose (5%) et du fructose (5%), à 60°C (□-□).

ture optimale d'activité apparaît alors plus élevée. On sait que les courbes d'activité en fonction de la température résultent de deux phénomènes : l'activation thermique de la réaction d'hydrolyse et celle de la dénaturation thermique de l'enzyme. Ainsi la température optimale peut dépendre du temps de réaction, qui est ici de 5 minutes.

La température optimale d'opération d'un réacteur à membrane retenant l'enzyme est la température la plus élevée possible ne provoquant aucune perte d'activité enzymatique. La stabilité de l'invertase a donc été étudiée dans le tampon

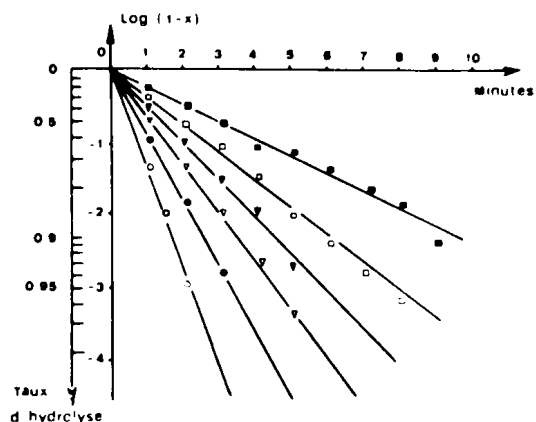


FIG. 5. — Cinétique de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase de levure. Représentation de $\text{Log} (1-X)$ en fonction du temps. Les valeurs correspondant au taux d'hydrolyse X figurent sur le deuxième axe d'ordonnée. 50°C; tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5; concentration en invertase : 2 mg/ml; concentration en saccharose : 10% (○-○), 20% (●-●), 30% (△-△), 40% (▲-▲), 50% (□-□), 60% (■-■).

Le taux d'hydrolyse est la fraction du saccharose initial qui a été hydrolysé.

acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5, ainsi que dans une solution de glucose (5 p. cent) et fructose (5 p. cent) dans ce même tampon.

La figure 4 montre qu'il n'y a pas de perte d'activité enzymatique après 7 heures à 50°C, et que la présence de glucose et de fructose ralentit la dégradation de l'invertase à 60°C. En raison de difficultés analytiques, il n'a pas été possible d'étudier la stabilité de l'invertase en présence de concentrations plus élevées de glucose et de fructose, telles qu'elles seraient trouvées dans un réacteur avec alimentation continue en saccharose.

Concentration initiale en saccharose.

La vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose a été déterminée en fonction de la concentration initiale en saccharose, en opérant dans un volume de 30 ml, avec une concentration d'invertase de 0,08 mg/ml et à une température de 20 ou 60°C.

On observe un maximum de vitesse entre 10 et 15 p. cent de saccharose, qui correspondrait à la saturation de l'enzyme [6]. Au delà de 15 p. cent de saccharose, la vitesse initiale d'hydrolyse décroît [6]; pour une concentration en saccharose de 60 p. cent, elle n'est plus que la moitié de l'activité maximum. Ces phénomènes sont connus et ont été commentés par Mac Laren [7] et Bowski et al. [19]. La baisse d'activité enzymatique aux concentrations initiales élevées de saccharose serait due aux effets combinés d'une inhibition compétitive par le substrat et d'une faible activité physico-chimique de l'eau. La viscosité élevée du milieu provoque peut-être également un ralentissement des phénomènes de diffusion [cf. 8].

Activité transférasique de l'invertase.

L'hydrolyse du saccharose par l'invertase s'est révélée complète dans les conditions expérimen-

vertase par le fructose est compétitive, tandis que l'inhibition par le glucose ne l'est pas [5].

Cinétique de réaction.

Pour des concentrations initiales en saccharose comprises entre 10 et 60 p. cent, la réaction d'hydrolyse du saccharose suit approximativement une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat, pendant la quasi-totalité de l'hydrolyse (figure 5). Ce comportement particulier est la résultante de plusieurs effets, y compris de l'inhibition par le substrat et les produits de réaction [cf. 6]. Il est difficile de lui donner une explication biochimique précise; il a cependant facilité la prévision des performances d'un réacteur continu.

Concentration en enzyme.

La constante de vitesse de réaction de premier ordre a été mesurée pour des concentrations

TABLEAU I.

Rétention de l'invertase par divers types de membranes d'ultrafiltration. 50°C, 3 bars; tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5; concentration en invertase: 2 mg/ml.

Type de membrane	Débit (ml.mn ⁻¹ .cm ⁻²)	Seuil d'arrêt théorique (Dalton)	P. cent d'invertase retenu	P. cent d'invertase dans le filtrat	P. cent d'enzyme non retrouvé
PM 30	0,108	30 000	97	0	3
XM 100 A	0,151	100 000	95,1	2,6	2,3
XM 300	0,176	300 000	93,7	2,8	3,5

tales adoptées: avec une solution de 50 p. cent de saccharose (50°C; 1,5 mg d'invertase/ml) le glucose libéré après une heure correspond à la quantité théorique introduite sous forme de saccharose. Afin de déterminer si l'invertase exerce une activité transférasique au cours de l'hydrolyse, nous avons recherché la présence de polysaccharides de fructose et glucose par chromatographie en couche mince selon Collins et Chandorkar [20]. Des traces de composés autres que saccharose, fructose et glucose ont été observées.

Inhibition par les produits d'hydrolyse.

Nous avons vérifié que l'activité hydrolytique de l'invertase est partiellement inhibée par le fructose et, à un moindre degré, par le glucose. La vitesse initiale d'hydrolyse d'une solution de saccharose 0,1 M est abaissée de 80 p. cent en présence de fructose 0,1 M et de 35 p. cent en présence de glucose 0,1 M (22°C; pH 4,5; 2 mg d'invertase/ml). On sait que l'inhibition de l'in-

d'invertase comprises entre 0,1 et 2 mg/ml. Elle répond à la relation suivante: $K = 2.10^{-1} (E)$, où K représente la constante de vitesse de réaction de premier ordre (mn⁻¹) et (E) la concentration en invertase (mg/ml).

2°) Ultrafiltration de solutions d'invertase et de solutions de saccharose hydrolysé.

Invertase.

La rétention de l'invertase par divers types de membranes d'ultrafiltration a été étudiée. 50 ml d'une solution d'invertase (2 mg/ml) dans le tampon acétate de sodium sont placés dans la cellule d'ultrafiltration et diafiltrés en continu avec du tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5, pendant 8 heures, à 50°C, sous une pression de 3 bars.

La rétention est exprimée selon l'équation: Rétention = $100 \left(1 - \frac{Af}{Ao} \right)$ où Af représente l'activité enzymatique retrouvée dans le filtrat et Ao

Hydrolyse enzymatique continue du saccharose.

l'activité enzymatique initiale de la solution d'enzyme.

Les données de la figure 6 montrent que la membrane de type PM 30 ne laisse pas passer d'enzyme. Les membranes XM-100 A et XM-300 ne laissent passer l'invertase que dans les premiers 30 ml de filtrat, et le total de l'activité enzyma-

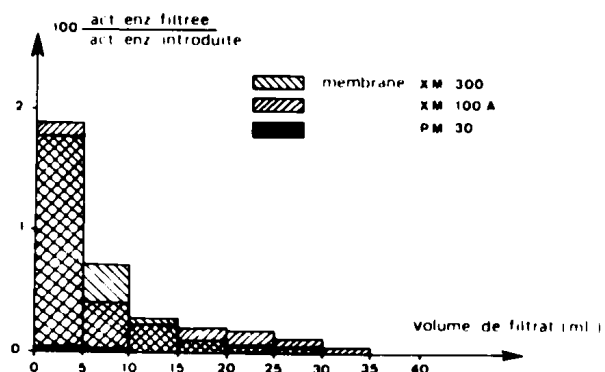


FIG. 6. Ultrafiltration de l'invertase de levure. Diafiltration avec du tampon acétate 0,01 M, pH 4,5 ; 50°C. Membranes Amicon Diaflo.

tique traversant la membrane n'excède pas 3 p. cent. Ces résultats excluent la filtration préférentielle totale d'une classe de molécules d'invertase de poids moléculaire inférieur ; ils s'expliquent vraisemblablement par la formation d'une couche dite de « polarisation de concentration » qui modifie la sélectivité de la membrane.

Le seuil d'arrêt théorique des membranes, le débit mesuré pour chaque membrane et le bilan des activités enzymatiques sont portés sur le tableau I.

La membrane XM-300, qui permet le débit le plus élevé, a été adoptée pour la suite de cette étude.

Solution de saccharose hydrolysé.

La viscosité d'une solution de 50 p. cent de saccharose baisse d'environ 10 p. cent après hydrolyse.

Nous avons préparé des solutions de glucose, fructose et saccharose correspondant à des solutions de concentrations diverses de saccharose hydrolysé à 90 p. cent (analogue à l'effluent d'un réacteur continu).

Les débits d'ultrafiltration de ces solutions (en $\text{ml} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) à travers la membrane XM-300 ont été mesurés après la période de baisse initiale rapide de débit correspondant probablement à un

tassement de la membrane. Une augmentation du débit a été observée en fonction de la pression ainsi qu'en fonction de la température, les intervalles de mesure étant respectivement de 1 à 3 bars et de 40°C à 70°C. L'effet de la température est relié à une modification de la viscosité des solutions.

Les débits d'ultrafiltration exprimés en grammes de saccharose équivalent sont portés sur la figure 7, pour diverses concentrations de saccharose équivalent, à diverses températures, et à une pression constante de 3 bars. Un débit maximum de sucres est observé pour une concentration de saccharose équivalent de 50 p. cent. C'est la concentration que nous avons utilisée pour les expériences continues.

Les débits volume correspondant à tous les points de la figure 7 répondent à la relation empirique suivante :

$$\phi = 0,08 + 0,05 \log \frac{1}{\eta}$$

où ϕ est le débit en $\text{ml} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ et η la viscosité des solutions, en centipoise.

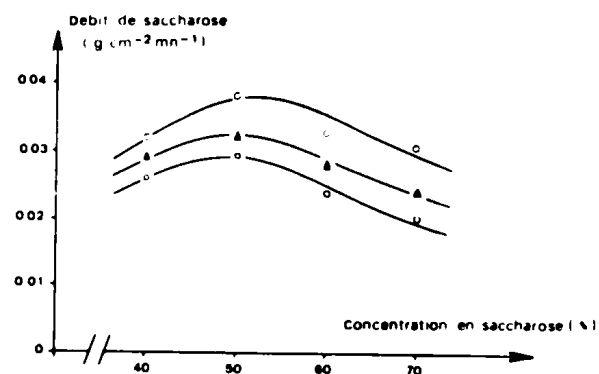


FIG. 7. Influence de la concentration de sucre inverti sur le débit matière à travers la membrane d'ultrafiltration. Membrane Amicon Diaflo XM 300 ; 3 bars ; solutions de glucose, fructose et saccharose correspondant à du saccharose hydrolysé à 90 p. cent, dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5. Les débits et les concentrations sont exprimés en gramme de saccharose équivalent.

70°C (○-○) ; 60°C (▲ ▲) ; 50°C (□ □).

3°) Hydrolyses continues.

Calcul des performances d'un réacteur continu homogène et vérification expérimentale.

Nous avons d'abord vérifié avec une solution d'hélianthine que le réacteur Radiometer se comportait bien comme un réacteur homogène [21].

Le système utilisé pour l'hydrolyse continue sans réutilisation d'enzyme est celui présenté sur

la figure 2. Le réacteur agité est alimenté en continu avec des solutions de saccharose et d'invertase. La concentration de saccharose équivalent dans le réacteur est toujours de 50 p. cent. La concentration d'invertase et le temps de résidence nominale θ (égal au rapport $\frac{\text{volume du mélange réactionnel}}{\text{débit à travers le réacteur}}$)

sont variables d'une expérience à l'autre. Le volume du mélange réactionnel est maintenu constant à l'aide d'un trop plein.

La variation instantanée de concentration (S) du saccharose par unité de temps à l'intérieur du

$\left(\frac{d(S)}{dt}\right)$ hydrolyse est ici égal à $-K(S)$ où K est la constante de vitesse de réaction de premier ordre par rapport à la concentration en substrat.

La relation précédente s'écrit alors :

$$\frac{v}{V} \cdot (S_0) - \frac{v}{V} \cdot (S) - K(S) = 0$$

Le calcul aboutit à la relation suivante [22] :

$$\frac{X}{1-X} = K\theta$$

où X est le taux de conversion ($0 \leq X < 1$), c'est-

TABLEAU II.

Performances du réacteur continu homogène en fonction de la concentration en invertase, et du temps de résidence nominal. Le montage utilisé est celui de la figure 2. 50°C ; tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5 ; concentration en saccharose équivalent dans le réacteur : 50 p. 100. K, constante de vitesse de réaction de premier ordre ; θ , temps de résidence nominal ; X, taux d'hydrolyse (p. 100).

Concentration en invertase (mg/ml)	0,1	0,2	0,5	0,8	0,94
K correspondant (*) (mn ⁻¹)	2.10 ⁻²	4.10 ⁻²	10 ⁻¹	1,6.10 ⁻¹	1,88.10 ⁻¹
$\theta = \frac{\text{volume}}{\text{débit}}$ (mn)	60	30	30	30	60
K. θ	1,2	1,2	3	4,8	11,3
X théorique (p. cent)	54,3	54,3	75	82,7	91
X expérimental (p. cent)	54	50,3	75	84	92

(*) Les valeurs de K proviennent de déterminations expérimentales (Cf. paragraphe « Concentration en enzyme »).

réacteur est égale à la somme algébrique des variations de concentrations dues à l'entrée de saccharose, à la sortie de saccharose et à la réaction d'hydrolyse.

$$\left(\frac{d(S)}{dt}\right)_{\text{réacteur}} = \left(\frac{d(S)}{dt}\right)_{\text{entrée}} + \left(\frac{d(S)}{dt}\right)_{\text{sortie}} + \left(\frac{d(S)}{dt}\right)_{\text{hydrolyse}}$$

$\left(\frac{d(S)}{dt}\right)_{\text{réacteur}}$ est nul lorsque l'état d'équilibre est atteint.

$$\left(\frac{d(S)}{dt}\right)_{\text{entrée}} = \frac{v}{V} \cdot (S_0)$$

$$\left(\frac{d(S)}{dt}\right)_{\text{sortie}} = -\frac{v}{V} \cdot (S)$$

où v est le débit à travers le réacteur, et V le volume de mélange réactionnel.

à-dire la fraction du saccharose initial qui a été hydrolysé.

La relation précédente permet de calculer le taux d'hydrolyse théorique d'une opération continue à partir de θ , et de K précédemment déterminée lors d'expériences discontinues. Ces taux d'hydrolyse théoriques peuvent être comparés aux taux d'hydrolyse expérimentaux d'essais continus (tableau II et figure 8). L'accord observé entre ces valeurs montre que la relation $\frac{X}{1-X} = K\theta$ per-

met de prévoir l'influence du temps de résidence nominal et de la concentration en enzyme sur le taux d'hydrolyse continu. Ce type de calcul de réacteur est fréquemment utilisé en génie chimique [21, 23, 22].

On peut faire remarquer que si la réaction avait suivi une cinétique différente, il aurait été sans doute plus difficile, mais néanmoins possible,

Hydrolyse enzymatique continue du saccharose.

d'obtenir une équation empirique reliant la vitesse de réaction à la concentration de substrat, et d'introduire cette équation dans le bilan de matière du réacteur chimique.

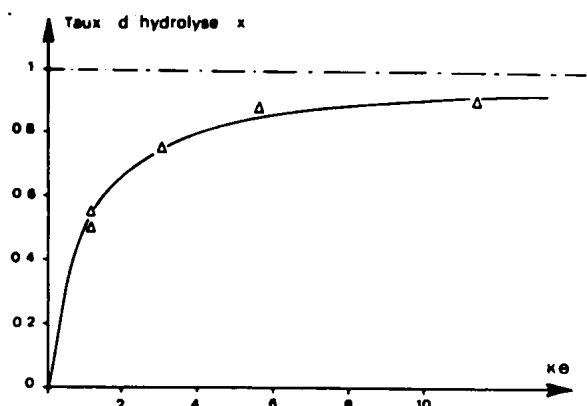


FIG. 8. — Représentation du taux d'hydrolyse continue du saccharose en fonction du produit $K.\theta$. Le montage utilisé est celui de la figure 2. K , constante de vitesse de réaction de premier ordre (mn^{-1}); θ , temps de résidence nominal (mn). 50°C ; tampon acétate de sodium $0,01\text{ M}$, $\text{pH } 4,5$; concentration en saccharose équivalent dans le réacteur: 50% . Courbe théorique répondant à la relation $\frac{X}{1-X} = K.\theta$ (—). Points expérimentaux (Δ).

Hydrolyse continue avec rétention d'enzyme par la membrane d'ultrafiltration.

Le système utilisé est celui représenté sur la figure 1. L'invertase est retenue par la membrane d'ultrafiltration et donc réutilisée. Le saccharose est introduit de façon continue. Le taux d'hydrolyse du mélange sortant est égal à celui du mélange réactionnel dans le réacteur. La cellule d'ultrafiltration se comporte comme un réacteur homogène dans les conditions expérimentales utilisées [21].

Nous avons constaté, au cours d'opérations prolongées, que le débit à travers la membrane baissait d'environ 15 p. cent par jour. Cette baisse peut être évitée si la solution de saccharose utilisée est préalablement filtrée à travers une membrane d'ultrafiltration analogue. Dans ces conditions, le débit et le temps de résidence sont restés constants au cours d'une hydrolyse continue de 120 heures. Pour cette expérience, la température était 50°C , la concentration en saccharose du liquide d'alimentation 50 p. cent, la quantité d'invertase dans la cellule d'ultrafiltration 20 mg et le temps de résidence nominal 90 minutes. Le volume du mélange réactionnel dans la cellule est resté égal à 50 ml pendant toute l'hydrolyse. Aucun développement de micro-organisme n'a été observé.

La figure 9 indique le volume de solution recueilli en fonction du temps, et le taux d'hydrolyse de cette solution. On voit que ce taux d'hydrolyse, une fois l'équilibre atteint, est resté constant et égal à 87 p. cent, pendant 120 heures. Ceci montre que l'invertase n'est que très peu ou pas dégradée au cours de cette opération avec rétention d'enzyme à 50°C . Le taux d'hydrolyse mesuré de 87 p. cent peut être comparé au taux d'hydrolyse théorique de 88 p. cent. Une expérience effectuée à $53,5^{\circ}\text{C}$ révèle une baisse assez rapide du taux d'hydrolyse (figure 9).

Du fait de la réutilisation sans perte de l'invertase à 50°C , il semble que l'efficacité du réacteur à membrane d'ultrafiltration peut être augmentée en opérant à une concentration plus élevée en enzyme. Des essais ont cependant montré que le débit de sucre inverti à travers la membrane d'ultrafiltration baisse rapidement lorsque la con-

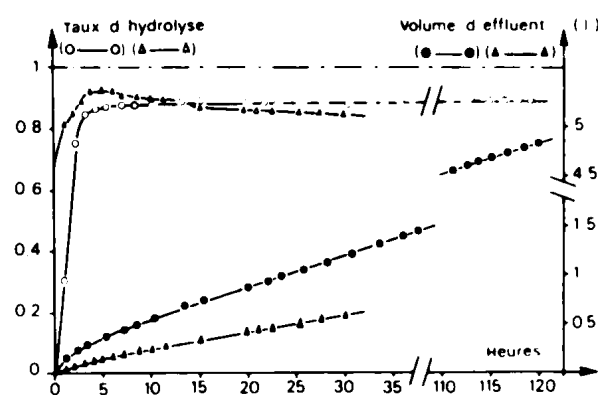


FIG. 9. — Variation du taux d'hydrolyse lors d'hydrolyses continues du saccharose avec réutilisation de l'invertase par ultrafiltration. Le montage utilisé est celui de la figure 1. Tampon acétate de sodium $0,01\text{ M}$, $\text{pH } 4,5$; concentration en saccharose: 50% ; membrane Amicon Diaflo XM 300.

Expérience à 50°C (\circ — \circ , \bullet — \bullet): volume réactionnel: 50 ml; concentration en invertase: $0,4\text{ mg/ml}$; temps de résidence nominal: 90 minutes; taux d'hydrolyse initial du saccharose dans le réacteur: 0.

Expérience à $53,5^{\circ}\text{C}$ (Δ — Δ , \blacktriangle — \blacktriangle): volume réactionnel: 60 ml; concentration en invertase $0,36\text{ mg/ml}$; temps de résidence nominal: 180 minutes; taux d'hydrolyse initial du saccharose dans le réacteur: 67 p. 100.

centration d'invertase dépasse $1,5\text{ mg/ml}$ (baisse de débit de 40 p. cent pour $1,8\text{ mg}$ d'invertase par ml).

Dans les conditions d'opération continue avec rétention d'enzyme (figure 9, 50°C), 20 mg d'invertase ont permis d'hydrolyser $2,1\text{ kg}$ de saccharose en 120 heures. Dans des conditions d'opération discontinue sans rétention d'enzyme, la même quantité d'invertase, en présence d'une solution de 50 p. cent de saccharose, à 50°C , permet

d'hydrolyser 2,1 kg de saccharose en 35 heures. La capacité de réacteur nécessaire est cependant près de 100 fois plus élevée. L'avantage du réacteur continu à membrane d'ultrafiltration est d'autant plus grand que la réutilisation de l'enzyme est prolongée.

Cette étude constitue un essai d'optimisation d'un modèle de réacteur biochimique : les conditions optimales d'opération d'un réacteur à membrane d'ultrafiltration en vue de l'hydrolyse du saccharose par de l'invertase ont été approximativement déterminées. Ces données ne permettent cependant pas d'affirmer l'intérêt industriel d'un tel réacteur.

Résumé.

L'hydrolyse continue de solutions de saccharose par de l'invertase de levure a été étudiée dans un réacteur chimique homogène limité par une membrane d'ultrafiltration capable de retenir sélectivement l'enzyme.

1. Une étude préalable de la cinétique d'hydrolyse discontinue du saccharose et de la stabilité de l'invertase a été faite dans des conditions applicables à un procédé continu, en particulier à concentration élevée en saccharose.

2. Des essais d'ultrafiltration ont indiqué que diverses membranes retiennent sélectivement l'invertase et laissent passer librement le reste des solutions de saccharose hydrolysé. Un débit maximum de produits d'hydrolyse est obtenu avec une solution de concentration proche de 50 %.

3. Des essais d'hydrolyse continue sans rétention d'enzyme ont montré que le taux stationnaire d'hydrolyse du mélange réactionnel peut être calculé à partir de l'expression cinétique de la réaction enzymatique discontinue et du bilan d'un réacteur chimique continu.

4. Les essais d'hydrolyse continue avec rétention d'enzyme par ultrafiltration ont montré que la réuti-

lisation de l'invertase, pendant 5 jours, à 50°C, ne provoque pas de perte notable de l'activité enzymatique. Dans les conditions adoptées, le taux d'hydrolyse reste constant, et proche de 90 %.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Wang, D. I. C., Sinskey, A. J. & Butterworth, J. A. (1970) *Membrane Science and Technology*, pp. 98-119, Plenum Press, New York.
2. Gascon, S., Neuman, N. P. & Lampen, J. O. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 1573-1577.
3. Neumann, N. P. & Lampen, J. O. (1967) *Biochemistry*, **6**, 468-475.
4. Gascon, S., Lampen, J. O. & Neumann, N. P. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 1567-1572.
5. Waheed, A. & Shall, S. (1971) *Enzymologia*, **41**, 291-303.
6. Nelson, J. M. (1933) *Chemical Reviews*, **12**, 1-39.
7. Mac Laren, A. D. (1963) *Enzymologia*, **26**, 1-11.
8. Ruetli, J. & Mac Laren, A. D. (1964) *Enzymologia*, **27**, 185-198.
9. Edelman, J. (1954) *Biochem. J.*, **57**, 320-328.
10. Andersen, B. (1967) *Acta Chem. Scand.*, **21**, 828-832.
11. Baseer, A. & Shall, S. (1971) *Int. J. Biochem.*, **2**, 503-506.
12. Waheed, A. & Shall, S. (1971) *Biochem. Biophys. Acta*, **242**, 172-186.
13. Schneider, H. G. (1971) *International Sugar J.*, **73**, 69-71 et 100-104.
14. Fillippuson, H. & Hornby, W. E. (1970) *Biochem. J.*, **120**, 215-219.
15. Negoro, H. (1970) *J. Fermentation Technol.*, **48**, 689-697.
16. Monsau, P. & Durand, G. (1971) *C. R. Acad. Sc. Paris*, **273**, 33-36.
17. Fischer, E. H. & Kothès, L. (1951) *Helv. Clin. Acta*, **136**, 1123-1131.
18. Reed, G. (1966) *Enzymes in Food Processing*, 2^e Ed., pp. 105-108, Academic Press, New York.
19. Bowski, L., Saini, R., Ryu, D. Y. & Vieth, W. A. (1971) *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 641-656.
20. Collins, F. W. & Chandorkar, K. R. (1971) *J. Chromatogr.*, **56**, 163-167.
21. Levenspiel, O. (1967) *Chemical Reaction Engineering*, 5^e Ed., pp. 242-308, John Wiley and sons, Inc., New York.
22. Mac Mullin, R. B. & Weber, M. (1935) *Trans. Amer. Inst. Chem. Eng.*, **31**, 409-457.
23. Kladko, M. (1971) *Chem. Tech.*, **3**, 141-147.

1.1.2 -

PREPARATION CONTINUE D'HYDROLYSAT PROTEIQUE A
L'AIDE D'UNE PROTEASE STABILISEE IMMOBILISEE
SOUS FORME SOLUBLE

1.1.2.1 - CONTINUOUS PROTEOLYSIS WITH A STABILIZED PROTEASE.

I. CHEMICAL STABILIZATION OF AN ALKALINE PROTEASE.

J. BOUDRANT, J.L. CUQ and C. CHEFTEL

Laboratoire de Biochimie et Technologie Alimentaires, Université
des Sciences et Techniques, 34060 Montpellier, France.

SUMMARY

Due to the important loss of enzymatic activity as a function of time, an alkaline protease, selected for the continuous preparation of protein hydrolysates (see following paper, ref.1) was chemically stabilized by a simple treatment with glutaraldehyde . Two fractions, soluble and insoluble, were obtained . The activities of these two fractions were measured with casein and BAEE as a function of glutaraldehyde concentration used . It was noted that the insoluble fraction was practically inactive with the first substrate, and that the heat stability of the soluble form was likewise enhanced . Molecular weights of these two forms were unchanged, but the UV spectrum of the soluble form was modified . From amino acid analysis, it appears that this treatment provokes mainly a decrease in lysine content .

INTRODUCTION

It is known that protease preparations are rather unstable at high temperatures. This is mainly due to both heat denaturation and self digestion. Having selected an alkaline protease (Alcalase) for the continuous preparation of proteolysate (1), we attempted to modified the enzyme chemically in order to improve its heat stability. Such a treatment is known as reducing self digestion and increasing heat stability (2). Compound such as diamines or polyamines (3) hexamethylenediisocyanate, N-bromosuccinimide and iodine (4) are known to act as protease stabilizers as a result of a chemical reaction. "Immobilisation" on a macromolecular support by means of reagent is also known to confer increased enzymatic stability (5). However it is difficult to state if increased heat stability^{is} due to physical immobilisation or chemical modification of the enzyme. We have used glutaraldehyde, a bifunctional reagent already used for many methods of enzyme immo'ilisation (6). We have treated Alcalase according to a method used by several investigators (7-10), using low glutaraldehyde concentrations and high p'rotein concentrations. We have verified the the improved heat stability of glutaraldehyde treated enzyme, a phenomenon that has already be noted (9), and analysed some of the modifications occurring in the protein as a result of the glutaraldehyde treatment.

MATERIAL and METHODS

CHEMICALS

Casein Hammarsten type was obtained from Merck (Darmstadt, West Germany) and N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) from Sigma (St Louis USA).

The proteolytic enzyme Alcalase is from Novo (Copenhagen, Denmark), glutaraldehyde (concentration 50 %, w/v) from Eastman Kodak (Rochester, USA), Folin-ciocalteus reagent from Merck, nitrogen (U quality, 99,9 p. cent N₂) from L'Air Liquide (France), Sephadex G 200 and Sepharose 28 from Pharmacia (Uppsala, Sweden).

EQUIPEMENT

Batch hydrolysis experiments were carried out in a jacketted 50 ml glass reactor with stirrer, maintained at a constant temperature. The pH control was performed using 2M ammonium hydroxide with an automatic pH-stat (Biolafitte, Maison-Lafitte, France). The rate of addition of alkali was recorded.

METHODS

Protein determinations

Protein determination was done using Gornall's photometric biuret method according to Fleury and Eberhard (11), or using the Kjeldahl method (12).

Determination of initial proteolytic activity with casein substrate

Initial proteolytic activity was determined by method adapted from Keay and Wildi (13):

2 g casein were dissolved in 20 ml N sodium hydroxide solution. 50 ml distilled water were then added and the solution stirred while the pH was adjusted to pH 7 by addition of a dilute phosphoric acid solution.

Abbreviation used : BAEE, N-benzoyl-arginine ethyl ester

After equilibration the solution was made up to 100 ml with distilled water. Suitably diluted enzyme solutions were preincubated at 37°C for 5 min. . 1 ml prewarmed (37°C) casein solution was added to 1 ml enzyme solution and the reaction mixture was incubated at 37°C for 10 min. The reaction was then stopped by the addition of 2 ml of a 30 % (v/v) trichloroacetic acid solution. After mixing, the reaction mixture was incubated at 37°C for 20 min., and then centrifuged for 10 min. at 2800 g. 1 ml supernatant was transferred to a test tube, 5 ml of a 0,5 M sodium carbonate solution was added, then 1 ml diluted (1/4) Folin-ciocalteus reagent. After mixing, the contents of the test tube were incubated at 37°C for 20 min. and the absorbance then measured at 660 nm. A "blank" was prepared by the same procedure, the trichloroacetic acid being added at time zero and the casein after 10 min. incubation. A calibration curve was set up with a tyrosine solution (0 to 100 µg/ml) in 0.2 N hydrochloric acid solution. One unit of protease activity was defined as that quantity of enzyme which produces TCA soluble peptides or amino acids giving a blue color equivalent to that of 0.5 µg tyrosine under the conditions of the assay. The proteolytic activity of Alcalase was found to be equal to 2200 units per mg. (1).

Determination of initial esterolytic activity with BAEE

Initial esterolytic activity was also measured using BAEE as a substrate. The degree of proteolysis was followed by the increase in absorbance at 254 nm. Assays were performed with 0.5 ml samples of protease solution and 2.5 ml of a $1.2 \cdot 10^{-3}$ M BAEE solution (both in a pH 7.5, 0.1 M sodium phosphate buffer).

Chemical stabilization

In order to stabilize the enzyme selected for the continuous experiments (Alcalase, see ref. 1) the following procedure was used :

500 mg of Alcalase were suspended at 4°C in 9 ml of a pH 7.5 0.1 M sodium phosphate buffer. After stirring the insoluble fraction verified as being inactive was removed by centrifugation at 14,000 g for 10 min. ; 1 ml of a glutaraldehyde solution in the same buffer was added to the supernatant. The final concentration of glutaraldehyde varied between 0.025 % t 0.5 % (w/v). The mixture was then incubated for 12 hours at 40°C.

Gel filtration

The molecular weights of proteases (Alcalase and soluble fraction of this glutaraldehyde treated enzyme) were determined by chromatography on a Sephadex G 200 column of 0.5 ml of a 25 mg/ml solution. The column was equilibrated with a 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.1 M in NaCl. It is calibrated with chymotrypsin, ovalbumin, serum albumin and γ -globulins. 3 ml fractions were collected, and 280 nm absorbances and enzymatic activities were determined. The column size was 1.5 x 90 cm with a void volume of 45 ml (determined with a dextran blue solution). The flow rate was maintained at 6 ml per hour, and the temperature at 4°C.

The molecular weight of the insoluble fraction of glutaraldehyde treated Alcalase was estimated by chromatography on a Sephadex 2B column equilibrated with a pH 7.5, 0.1 M sodium phosphate, 6 M urea buffer. The sample was 1 ml of a 10 mg/ml of the freeze-dried precipitate solubilized in the same buffer. The column size was 2.2 x 62 cm with a void volume of 90 ml. 4.3 ml fractions were collected and their 280 nm absorbances determined. The flow rate was maintained at 4 ml per hour, and the temperature at 22°C.

Acid hydrolysis

Acid hydrolysis was carried out in a 180 mm long, 18 mm diameter pyrex test tube according to the technique described by Gundlach et al. (14). 250 μ l of proteic solution (6 to 8 mg of protein), 500 μ l of a 2.5 mM norleucine solution (Technicon T 23-0118-14), 1250 μ l hydrochloric acid (Soprapur Merck, d=1,15) made up to 2 ml with distilled water were introduced into the tube previously washed and treated with boiling hydrochloric acid. The mixture was frozen in a dry ice-acetone bath under a 60 μ Hg pressure. The test tube was slowly warmed to room temperature over several minutes. Then the pressure was reduced to 50 μ Hg; the tube was sealed under nitrogen and placed in a ventilated oven at 110°C \pm 2°C for 24 hours. After cooling, the tube was opened by thermic shock, evaporated under vacuum at 40°C. The dry matter was dissolved up in 2 ml of N/100 hydrochloric acid; the chromatographic analysis was performed on an aliquot usually between 100 and 500 μ l.

RESULTS AND DISCUSSION

Enzyme precipitation

After adding glutaraldehyde in the enzyme solution (see "Material and methods"), a haze forms during the incubation ; it can be followed by measurement of the absorbance at 560 nm of the solution . This absorbance was found to increase as a function of time, after a lag period of about 10 min. . For given conditions, (0.1 % final concentration in glutaraldehyde) absorbance was found to be 0.38, 0.64 and 0.85 after 30 min., 45 min. and 60 min. respectively. A precipitate then formed. It was removed by centrifugation (14,000 g x 10 min.) after 12 hours incubation at 4°C. The absorbance of the supernatant remained constant upon further incubation at 4°C. The distribution of protein material (Gornall biuret method, 11) in the supernatant and the centrifugation pellet was determined as a function of the final concentration of glutaraldehyde. 76%, 60 %, 51 % and 42 % of the protein material remained soluble for glutaraldehyde concentration of 0.1 %, 0.2 %, 0.3 % and 0.5 % respectively. The protein recovery in the two fractions was close to 100 % of initial. The precipitation appears not to be linear with respect to glutaraldehyde concentration.

The effect of the pH on the precipitation reaction was studied by measuring the time required for the formation of a visual precipitate as a function of the pH of the reaction mixture (pH range 11 - 4.1). For this purpose the Alcalase-glutaraldehyde reaction was carried out at 4°C and glutaraldehyde concentration, chosen to give a visual precipitation within a reasonable time, was 0.5 %. The results indicate that this reaction is pH dependant : the pH for most rapid insolubilisation was found to be about 8.7, and no precipitation occurred at pH 4.1 and 11. Such observations have already been noted by Jansen et al. (8). These investigators showed that pH optimum for glutaraldehyde precipitation of protein varies from protein to protein and generally seems to correspond to the isoelectric point of the molecule. In fact this pH dependance probably results from two reactions :

on the one hand, assuming as other investigators (7 - 10) that glutaraldehyde is reacting with ϵ -NH₂ free groups, a chemical modification that could result in a precipitation (this reaction is probably more important with increasing pH - ϵ -NH₂ group on its free form -) ; on the other hand, a reaction of solubilisation of the proteic precipitate that may increase with pH. These two coupled reactions would probably imply the optimum pH observed for the precipitation reaction.

Enzymatic activity of soluble and precipitated enzyme fractions

The esterolytic and proteolytic activities of soluble and precipitated enzyme fractions obtained after glutaraldehyde treatment at pH 7.5 were measured as a function of the final glutaraldehyde concentration used . The activities were measured with BAEE (esterolytic activity) and casein (proteolytic activity) solutions as indicated in "Material and method".

The precipitated fractions were washed with 10 ml buffer solution in order to eliminate the remaining soluble enzyme, centrifuged and re-suspended in 10 ml of the buffer solution before being tested. The results show non linear decreases in both enzymatic activities as a function of the final glutaraldehyde concentration used, for the soluble and precipitated fractions (figures 1 and 2). But these decreases are much more pronounced when the activity is tested against casein rather than against BAEE. If such a difference between the residual proteolytic and esterolytic activities has already been noted by Gaffield et al. (9), these results does not seem to be in total agreement with those noted by Jansen et al. (8). These last investigators found a decrease of the proteolytic activity after glutaraldehyde treatment but a similar esterolytic activity for the untreated and treated α -chymotrypsine (in these experiments, glutaraldehyde concentration was 3 %). As for the results obtained with Alcalase, it appears that severe glutaraldehyde treatments must be avoided in order to keep a significant soluble residual proteolytic activity (figure 2, curve A). It may be also noted, that the total proteolytic activity of the precipitated fractions is always very low. These precipitated fractions,

Figure 1 :

Relative enzymatic activity of Alcalase for BAEE
as a function of the final concentration glutaraldehyde.

Soluble fraction (●), insoluble fraction (○).

Alcalase was treated as indicated in "glutaraldehyde
treatment of Alcalase", the enzymatic activities were
measured as indicated in "Material and methods".

Relative enzymatic activity

100

50

0

(Glutaraldehyde) %

1.25

1

0.75

0.5

0.25

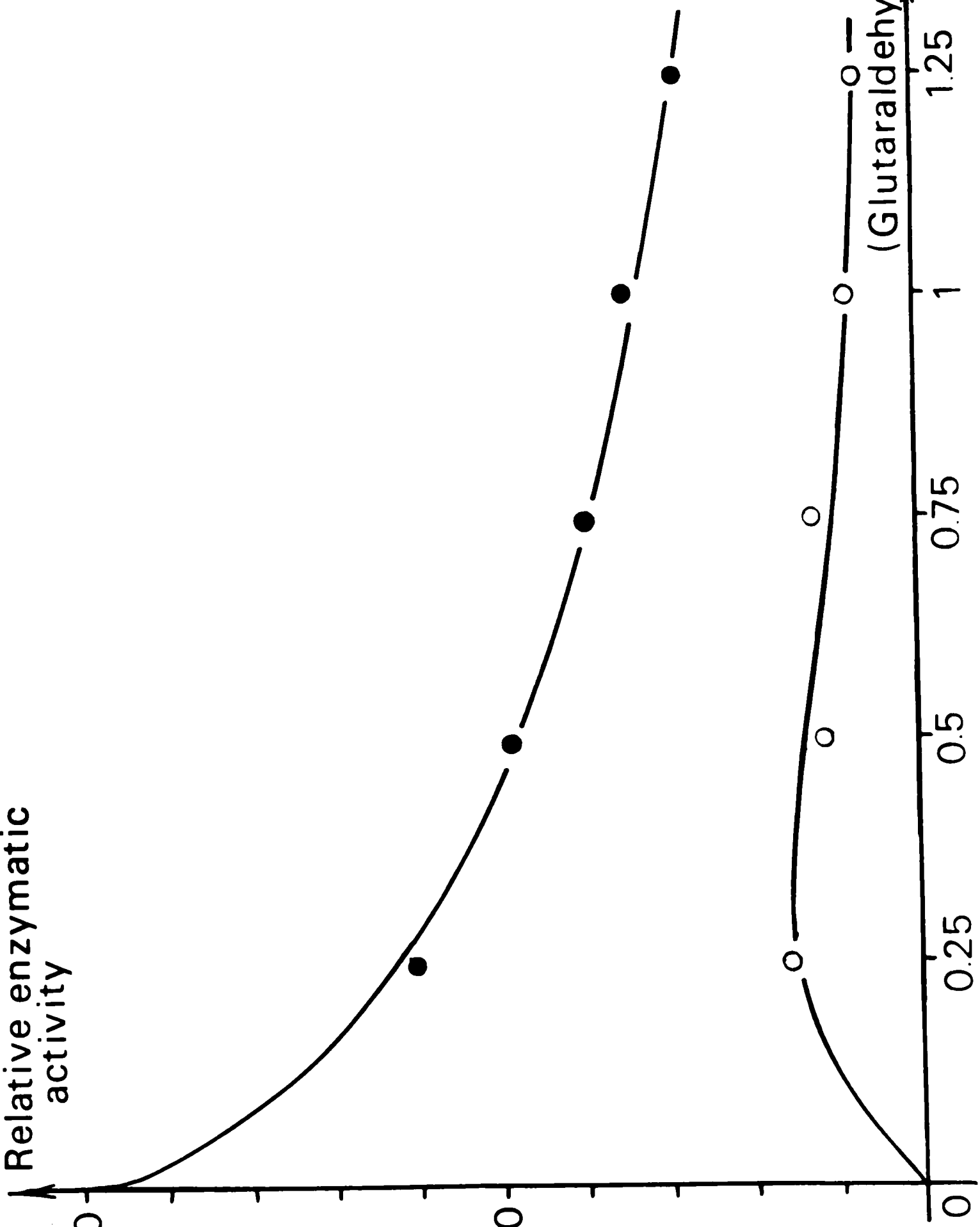


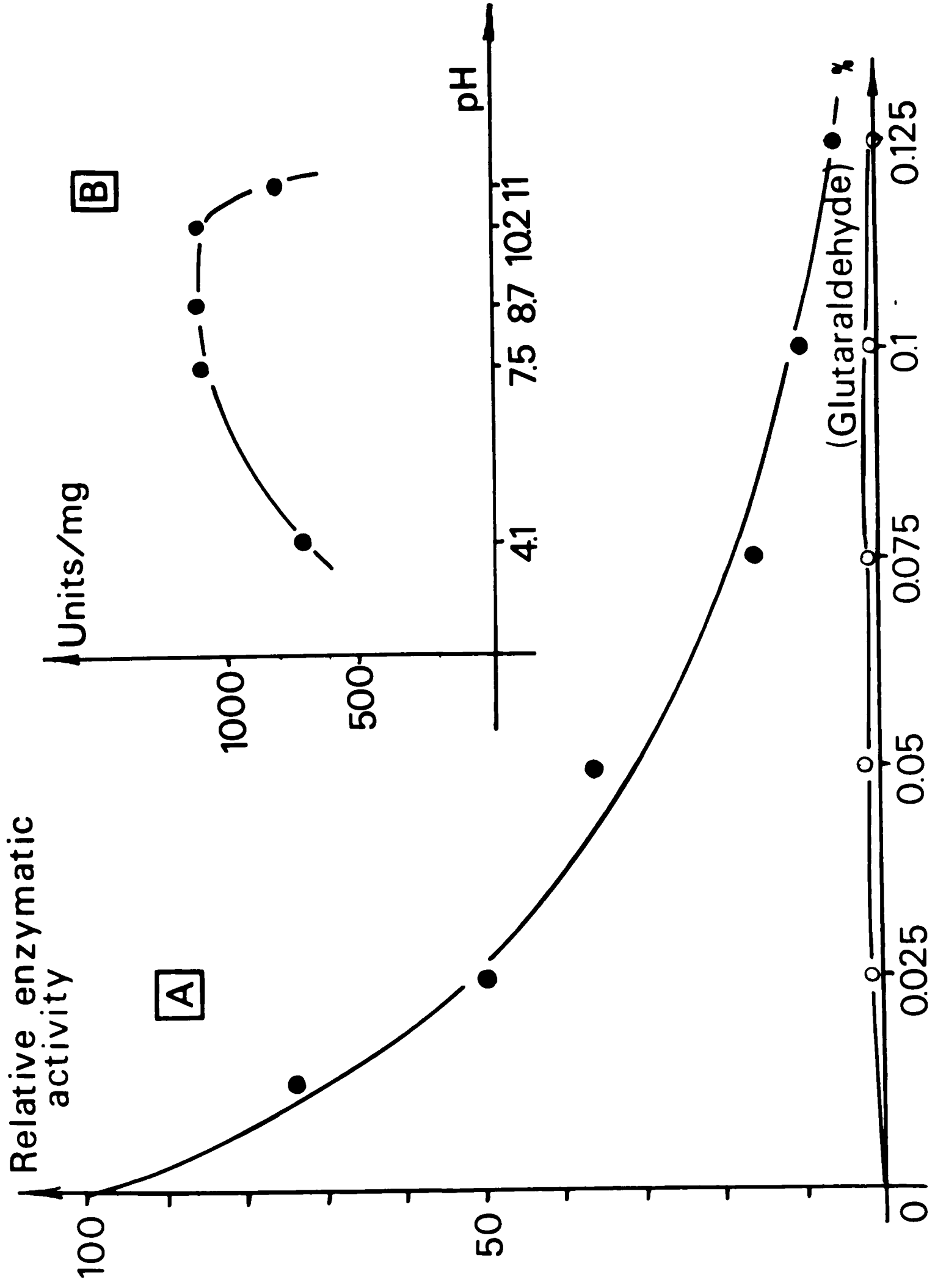
Figure 2 :

Curve A : Relative enzymatic activity of Alcalase for casein as a function of the final concentration of glutaraldehyde.

Curve B : Enzymatic activity of glutaraldehyde treated Alcalase for casein as a function of the pH of treatment (final glutaraldehyde concentration 0.025 %).

Soluble fraction (●), insoluble fraction (○).

Alcalase was treated as indicated in "Material and methods".



that may be considered as insoluble aggregated forms of the enzyme (see later and ref. 7 - 10), are more active against small molecular weight substrates than against proteins : this result may probably be related to those noted in the case of proteases immobilised on insoluble supports (19 - 22).

The proteolytic activity of the soluble fractions of glutaraldehyde treated Alcalase was measured for different pH of incubation : 4.1 and 11, where no precipitate forms; 7.5 and 10.2, characterised by the same required time for precipitation ; and 8.7, pH value for most rapid precipitation .For these experiments, glutaraldehyde concentration was 0.025 %. Figure 2, curve B shows the results, where the enzymatic activity is expressed in units per mg of the native enzymatic preparation. A decrease of the enzymatic activity was noted for the two extreme pH tested (4.1 and 11). This phenomenon has not been further investigated, it may result either from the glutaraldehyde reaction which seems to be pH dependant or from enzyme denaturation that may be more important at these pH.

Thermal stability of glutaraldehyde treated Alcalase

The thermal stability of soluble fractions obtained with various glutaraldehyde concentrations (0.005 to 0.05 %) was studied after incubation of these fractions at 50°C in pH 7.5, 0.1 M sodium phosphate buffer . Enzymatic activity was measured against casein. The results are shown on figure 3. An increase of the thermal stability of the enzymatic activity of the soluble fractions is observed. This increase is found to be larger for higher glutaraldehyde concentrations ; it may be due to a reduction in self digestion or to a true increase in thermal stability.

Similar results were observed in the case of chymotrypsin (9) (esterolytic activity) and of glucose oxydase (23) . It may be noted that Morikawa et al. (24) were able to show that treatment of an alkaline protease with hexamethylenediisocyanate or N-bromosuccinimide protected specifically the enzyme against self digestion. Also, in the present case, the same phenomenon seems to be predominant: in fact, an experiment that is reported in the following paper (1) allowed to show the better retention in a reactor limited by an ultrafiltration membrane (Amicon PM 30), (during a continuous proteolysis at 40°C) of the glutaraldehyde treated enzyme, compared to that of the native enzyme.

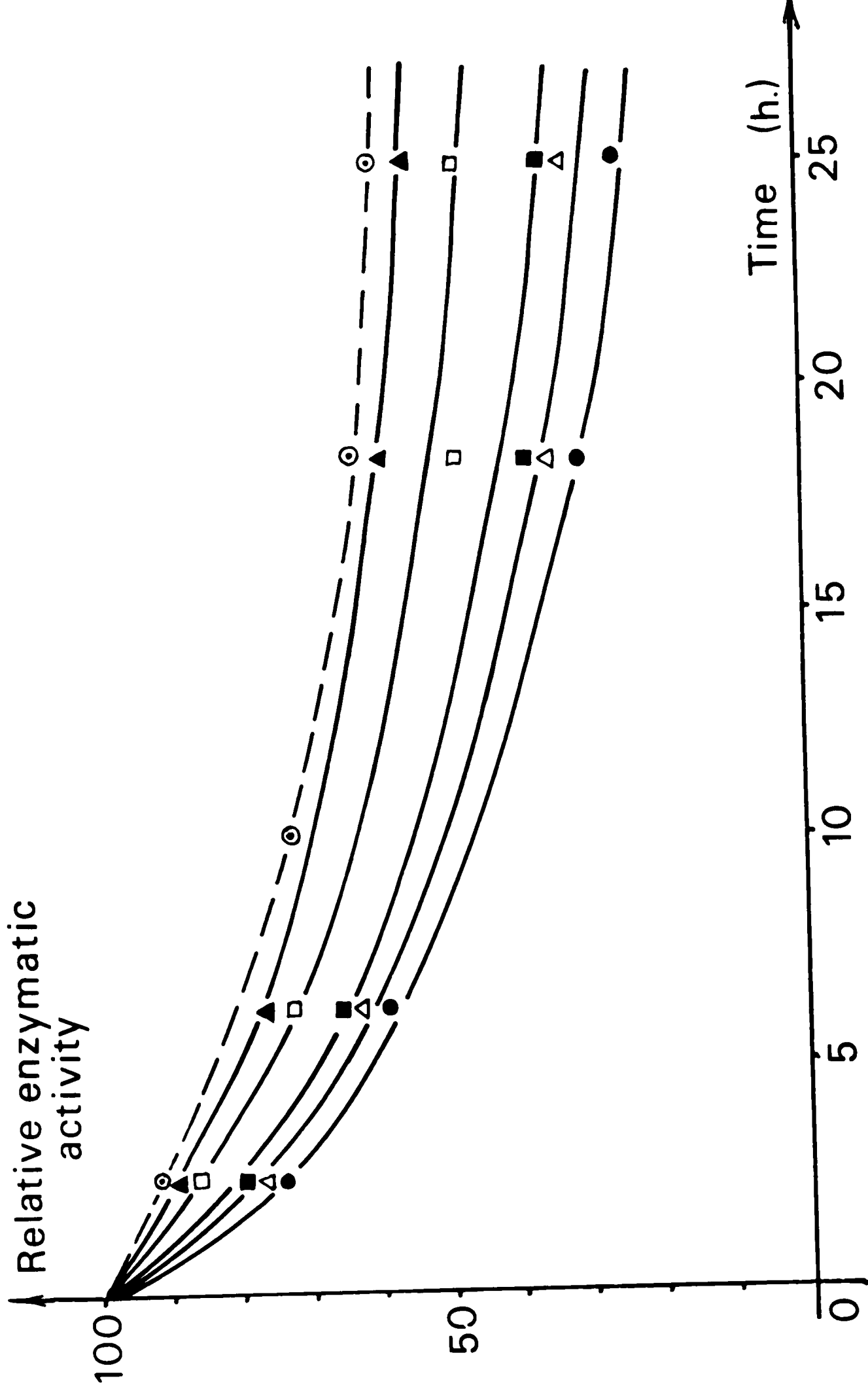
Calculation combining the results of figure 2 (soluble enzyme losses as a function of glutaraldehyde concentration) and figure 3, show that glutaraldehyde treatments are advantageous if the enzyme is to be reuti-

Figure 3 :

Decrease of relative enzymatic activity as a function of time of Alcalase at 40°C (⊙—⊙) and 50°C (●—●), and glutaraldehyde-treated Alcalase at 50°C.

pH 8, 0.1 M sodium phosphate buffer.

Native enzyme (⊙ , ●) ; enzyme treated with a final glutaraldehyde concentration of 0.005 % (△), 0.01 % (■), 0.025 % (□) or 0.05 % (▲).



lised for a sufficient length of time. For example, residual enzyme activities of 0.025 % glutaraldehyde treated Alcalase reacted with casein for 5 and 25 hours are 60 and 110 % respectively, as compared with those of a non treated Alcalase reacted in the same conditions. Approximative calculations also show, that, within the experimental range selected, the longer the reaction time, the higher the optimal glutaraldehyde concentration. This reason led us to carry out experiments in order to prepare proteolysates continuously. For these experiments which are reported in the following paper (1) a glutaraldehyde concentration of 0.025 % was chosen in order to treat Alcalase.

Chemical modification of Alcalase

Some experiments were carried out as an attempt to correlate the changes observed in the enzymatic activity of glutaraldehyde-treated Alcalase with chemical modification of the enzyme.

Molecular weights determinations

The molecular weights of the soluble fraction of native Alcalase and of the soluble and insoluble fractions of the glutaraldehyde treated Alcalase (final glutaraldehyde concentration 0.025 %) were determined and compared.

The molecular weight of the soluble fraction of the native enzyme was determined by gel filtration on a Sephadex G 200 column at 4°C. The same determination was also performed after heat inactivation at 100°C for 5 min. of the enzymatic preparation, the precipitate being eliminated after centrifugation (14,000 g x 10 min.). In each case the enzyme sample deposited on the column consisted of 1 ml of an initial 10 mg/ml solution. In the first case two absorbance peaks were observed, one in the 19th fraction and the other in the 28th fraction (after the void volume). Enzymatic activity was found in the first peak. In the second experiment only one absorbance peak was found (19th fraction). The protein material in the 28th fraction probably results from a thermocoagulable fraction of the preparation. The apparent molecular weight of the enzyme fraction was found to be close to 43,000 (figure 3) according to the method of Andrews (24). This value agrees with those indicated by Keay and Wildi for neutral protease extracted from the genus Bacillus (13) but is larger than those found by these same authors for alkaline proteases (28,000) (25).

In the case of the soluble fraction of the glutaraldehyde treated Alcalase the determination of the molecular weight was done with the same Sephadex G 200 column at 4°C and without heat inactivation. The same two

Figure 4 :

Determination of the molecular weight of Alcalase by gel filtration (see "Material and methods").

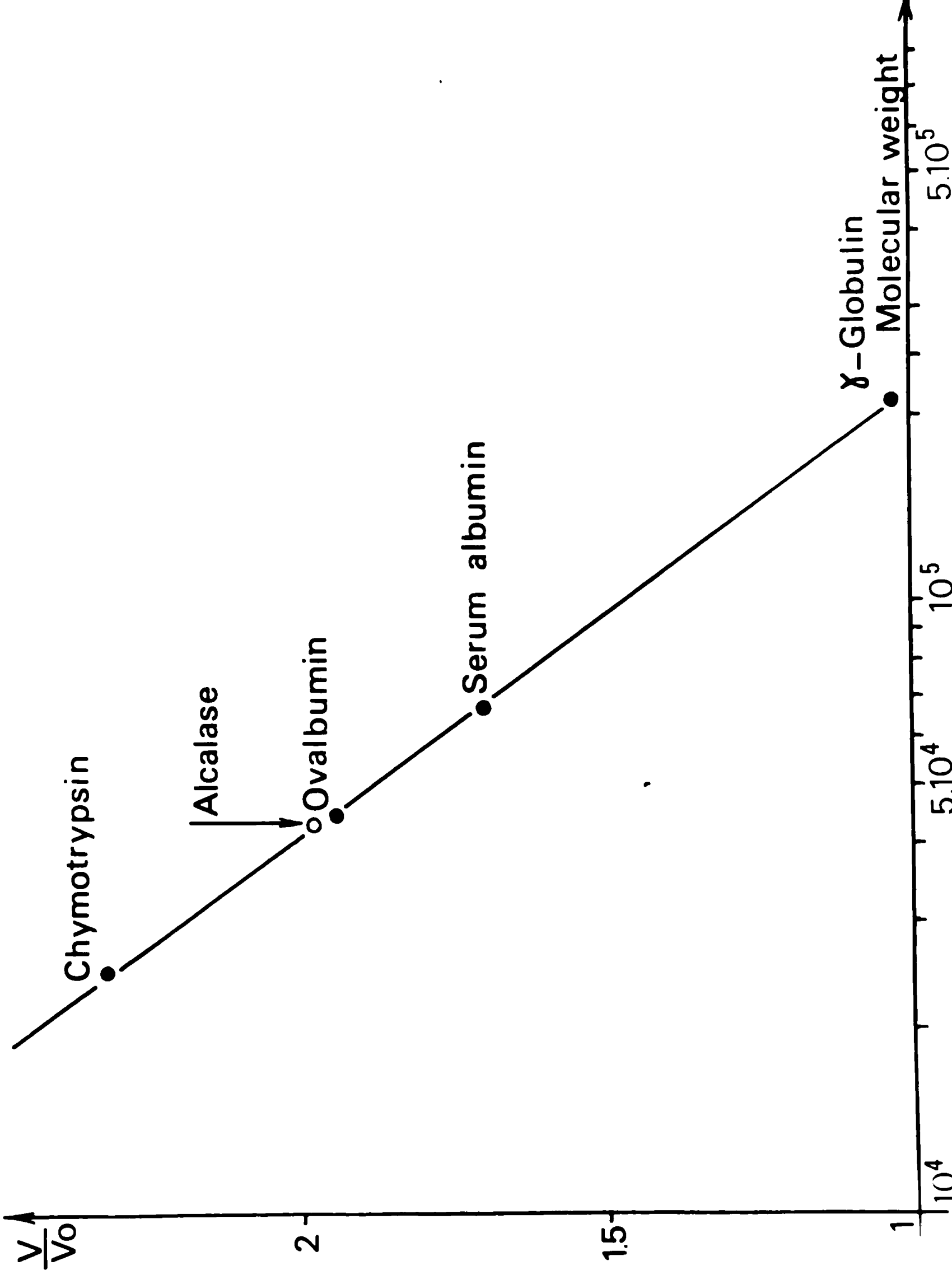
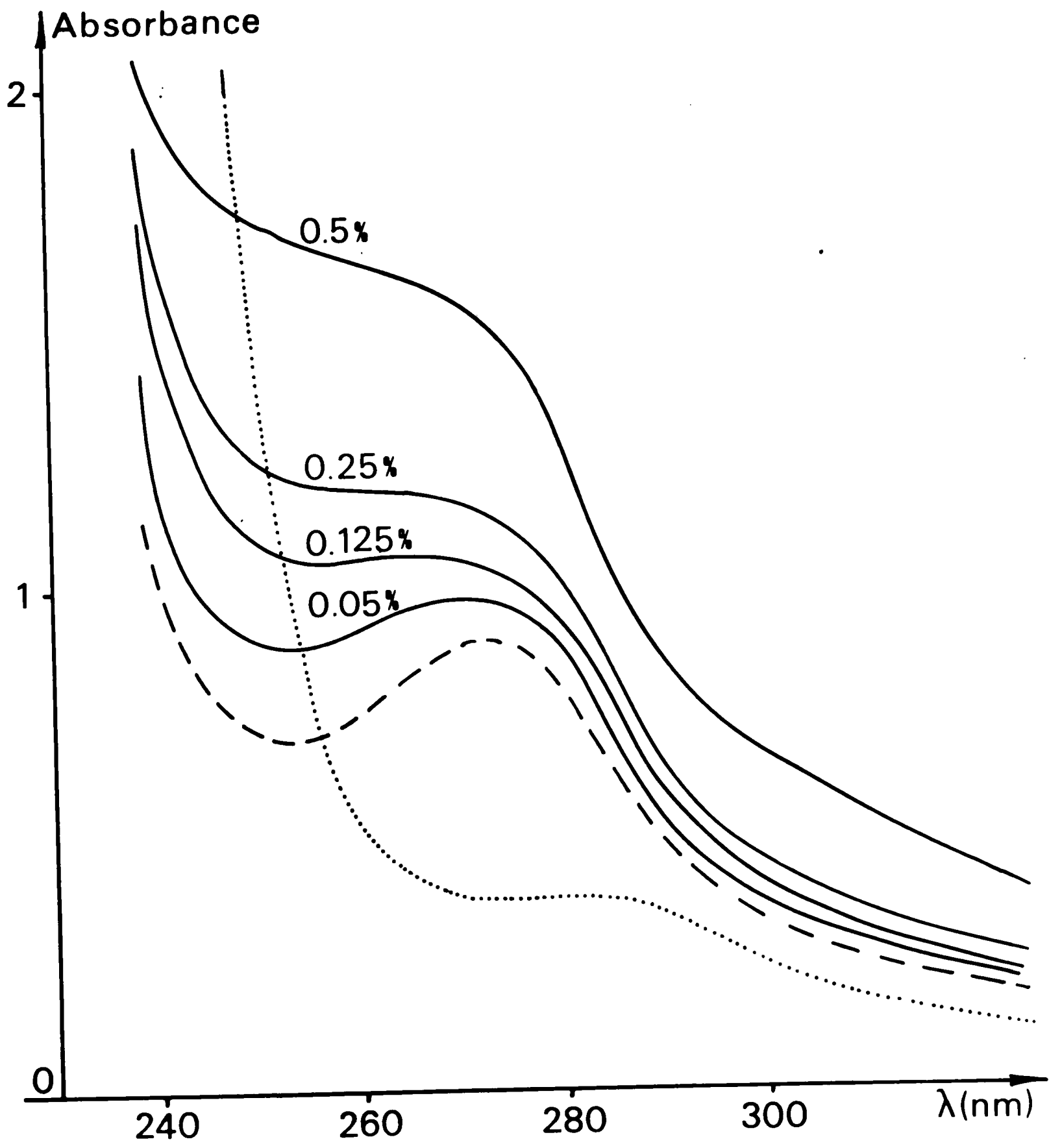


Figure 5 :

Absorption spectra of native Alcalase and soluble fraction of glutaraldehyde-treated Alcalase (corrected for losses in insoluble fraction).

pH 8, 0.01 M sodium phosphate buffer.

Native enzyme (— — —) ; glutaraldehyde-treated enzyme (——), (final glutaraldehyde concentrations, % as indicated above each curve) glutaraldehyde solution 1 % (.....).



absorbance peaks at 280 nm were also observed (19th and 28th fractions), and enzymatic activity occurred in the first peak. The same gel filtration was also performed with the glutaraldehyde treated Alcalase, initially heat denatured in order to eliminate the thermocoagulable fraction. As for the soluble fraction of the native enzyme, one absorbance peak at 280 nm was observed and the elution volume was found to be the same (19th fraction).

The determination of the molecular weight of the insoluble fraction of the glutaraldehyde treated Alcalase (also initially heat denatured) was performed on a Sephadex 2B column in the presence of 6 M urea. Similarly for the soluble fraction of the native enzyme, one absorbance peak was observed and their elution volumes were found to be the same.

From these experiments it can be said that, glutaraldehyde treatment of Alcalase does not change the molecular weight of the enzyme, and that, the precipitated fraction is probably only an aggregated form of the enzyme, without covalent linkage between molecules. These results do not corroborate those of Payne (7). In fact with similar experimental conditions this investigator obtained soluble polymerized oligomers in the molecular weight range $3 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^7$ with proteins such as lysozyme, haemoglobin, serum albumin and asparaginase.

U.V. absorbance spectra determinations

The U.V. absorbance spectra of the soluble fraction of several glutaraldehyde treated Alcalase samples (final glutaraldehyde concentrations varying between 0.05 % and 0.5 %) versus the sodium phosphate buffer showed an increase of absorbance in the range 235 -270 nm. Such a phenomenon has also been reported in the case of an other alkaline protease modified by iodine, treatment which also enhances its heat stability (4), and in the case of ovalbumine and bovin serum ovalbumine (7). In the present case U.V. spectra of the stabilized enzyme versus the native enzyme exhibited a maximum at about 240 nm. This probably corresponds to the chemical modification of the molecule, due to the reactivity of glutaraldehyde with basic amino acids.

Amino acids analysis

In order to relate the previous observations (enhancement of the heat stability, modification of the U.V. spectra), to a chemical modification

of the enzyme, amino acids analysis were performed. These experiments were carried out with heat denatured enzyme samples, and the amino acids composition expressed in m moles per 100 g of protein, the protein being estimated with the Kjeldahl method (12).

The amino acids compositions of native Alcalase and of soluble and insoluble fractions of this glutaraldehyde treated enzyme at pH 7.5 (final glutaraldehyde concentration 0.025 %) are indicated in the table I (column 1, 2, 3). A good agreement is noted between these compositions. The only change in amino acids composition observed upon reacting glutaraldehyde with Alcalase is a decrease in lysine content. This phenomenon has already previously observed with other proteins (8, 9, 10). The decrease of lysine liberated after acid hydrolysis could be due to the formation of an acid stable lysyl-glutaraldehyde compound. It could also be due to the formation, after acid hydrolysis, of degradation products from the eventual lysyl-glutaraldehyde compound, these products being different from lysine. The pH dependance of the glutaraldehyde-Alcalase reaction on the amino acids composition was verified : the amino acids analysis were performed on the products obtained after reaction at pH 4.2 and 10.9, pH values where no precipitation occurred. As previously noted, the results show that the quantity of the majority of the amino acids is not affected by glutaraldehyde treatment (table I , column 4 and 5). The most important differences concern essentially lysine. At pH 4.2 lysine does not seem to be implied in the reaction (column 4) but a diminution of about 20 % of this amino acid is observed when the reaction pH is equal to 7.5 and 10.9 (column 2, 3 and 5). This result is in agreement with the fact that ϵ -NH₂ group is ^{un-}reactive in its salt form. It may be noted that, in the experimental conditions used, the number of glutaraldehyde molecules is 2.5 times greater than the number lysine molecules.

The amount of unavailable lysine, determined after dinitrophenylation and acid hydrolysis (table II), is the most elevated for the insoluble fraction. This result may perhaps be correlated with ^{the} previous observations involving the activity of these two fractions. Some of the lysyl residues seem to be concerned with a chemical reaction with glutaraldehyde by their ϵ -NH₂. But the proportion of reacted lysine, assuming that there is no cross-linking between molecules, is not in opposition with the previous result about the non variation of the molecular weight of the treated Alcalase.

As for the tyrosyl residues, they do not seem to be concerned with the chemical reaction with glutaraldehyde : in fact they are found as traces after dinitrophenylation and acid hydrolysis. If at pH 7.5, the amount of histidyl

	Native Alcalase pH 7,5	Soluble fraction of glutaraldehyde treated Alcalase pH 7,5	Insoluble fraction of glutaraldehyde treated Alcalase, pH 7,5	Glutaraldehyde treated Alcalase, pH 4,2	glutaraldehyde treated Alcalase pH 10,9
Methionine sulfoxide	1,3	0,9	0,7	2,9	3,2
Aspartic acid	25,5	27	26,5	26	24,5
Threonine	16,5	17	17	15,5	16
Serine	23	23	22	23	23,5
Glutamic acid	12,5	13,5	12,5	12	14
Proline	10,5	11	10,5	10,5	11
Glycine	33	32	33	31	30
Alanine	36	37,5	38	34	33,5
Valine	27	27	27	26,5	23,5
$\frac{1}{2}$ Cystine	0	0	0	0	0
Methionine	3,2	3,2	3,4	1,1	0,4
Isoleucine	10	6,8	5,4	10	9,8
Leucine	15	15	15	15	15
Tyrosine	10	9,7	11	8,4	8,4
Phenylalanine	4,7	5,1	4,1	4,7	4,2
Ornithine	traces	traces	2,4	0,5	traces
Lysine	9,6	6,8	7,3	10,5	8,0
Histidine	5,1	5,1	5,2	4,6	4,9
Arginine	4,7	4,8	5,2	4,3	4,7

TABLE I : Amino acid composition of native and glutaraldehyde treated Alcalase at different pH (m moles p. 100g of protein) after acid hydrolysis.

	Total Lysine (1)	Unavailable Lysine (2)	Available Lysine (3)	Total Histidine (1)	Unavailable Histidine (2)	Available Histidine (3)
Native Alcalase	9,6	0,5	9,1	5,1	traces	5,1
Soluble fraction of glutaraldehyde treated Alcalase, pH 7,5	6,8	0,6	6,2	5,1	traces	5,1
Precipitated fraction of glutaraldehyde treated Alcalase, pH 7,5	7,3	1,2	6,1	5,2	traces	5,2
Glutaraldehyde treated Alcalase, pH 4,2	10,5	0,6	9,9	4,6	2	2,6
Glutaraldehyde treated Alcalase, pH 10,9	8,0	0,8	7,2	4,9	2,1	2,8

TABLE II : Available lysine and histidine of native and glutaraldehyde treated Alcalase (m moles p. 100 g of protein).

(1) measured after acid hydrolysis

(2) measured after dinitrophenylation and acid hydrolysis

(3) corresponds to the difference between (1) and (2)

residues, determined under the same conditions, are found only as traces; at pH 4.2 and 10.9 they are found equal to 2 and 2.1 m moles/100 g (table II). This result may imply that histidyl-glutaraldehyde links exist when the reaction is performed at pH 4.2 and 10.9, and that these links are partially hydrolysed in 6 N HCl. This last result may perhaps be related to the decrease of proteolytic activity, previously observed after reaction with glutaraldehyde, at these extremes of pH.

REFERENCES

1. J. Boudrant and C. Cheftel, *Biotechnol. Bioeng.*, (1976), following paper in this issue.
2. A. Wiseman, *Process Biochem.*, 8, 14 (1973).
3. W. Schreiber, *Ger. Offen.*, 2,058,826 (1972).
4. Y. Morikawa, M Shimizu and K. Kimura, *Agr. Biol. Chem.*, 48, 105 (1974)
5. G. Broun, E. Selegny, S. Avrameas and D. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta*, 185, 260 (1969).
6. A. Olson and W.L. Stanley, in *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes*, Plenum Press, New York, pp. 52-54 (1974).
7. A.F. Habeeb and R. Hiramoto, *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 16 (1968).
8. E.F. Jansen, Y. Tomimatsu and A.C. Olson, *Arch. Biochem. Biophys.*, 144, 394 (1971).
9. W. Gaffield, Y. Tomimatsu, A.C. Olson and E.F. Jansen, *Arch. Biochem. Biophys.*, 157, 405 (1973).
10. J. W. Payne, *Biochem. J.*, 135, 867 (1973).
11. R.F. Fleury and R. Eberhard, *Ann. Biol. Clin.*, 9, 453 (1951).
12. *Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.*, W. Horwitz ed., 12th edition, New York, pp. 15-16 (1975).
13. L. Keay and B.S. Wildi, *Biotechnol. bioeng.*, 16, 179 (1970).
14. H.G. Gunlach, S. Moore and W.J. Stein, *J. Biol. Chem.*, 234, 1754, (1959).
15. S. Moore, D.H. Spackmann and W.J. Stein, *Anal. Chem.*, 30, 1185 (1958).
16. D.H. Spackmann, W.J. Stein and S. Moore, *Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958).
17. E.A. Paterson and H.A. Sober, *Anal. Chem.*, 31, 857 (1959).
18. K.J. Carpenter, *Biochem. J.*, 77, 604 (1960).
19. S.P. O'Neill, J.R. Wykes, P. Dunnill and M.D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 319 (1971).
20. R. Axen and S. Ernback, *Eur. J. Biochem.*, 18, 351 (1971).
21. P. Johnson and T.L. Whateley, *J. Coll. Inter. Sci.*, 37, 557 (1971).
22. R.J. Knights and A. Light, *Arch. Biochem. Biophys.*, 160, 377 (1974).
23. H.O. Hultin, personal communication (1975).
24. P. Andrews, *Biochem. J.*, 96, 595 (1965).
25. L. Keay, P.W. Moser and B.S. Wildi, *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 231 (1972).

1.1.2.2 - CONTINUOUS PROTEOLYSIS WITH A STABILIZED PROTEASE .

II. CONTINUOUS EXPERIMENTS.

J. BOUDRANT and C. CHEFTEL

Laboratoire de Biochimie et Technologie Alimentaire, Université
des Sciences et Techniques, 34060 Montpellier, France.

SUMMARY

Batch proteolysis experiments were performed in order to choose a protein-protease system to prepare a correct hydrolysate suitable for the enrichment of soft drinks. The system eventually studied was casein-Alcalase.

Comparative batch and continuous proteolysis of casein by Alcalase showed that the reaction, which does not exactly follow first order kinetics with respect to the substrate concentration is inhibited by the reaction products. Furthermore, experiments were done in order to determine the reaction conditions (pH 8.8 in the reactor, casein concentration 5%, 40°C). The determination of the molecular weight of Alcalase (43,000) permitted the choice of the ultrafiltration membrane PM 30.

Studies of continuous proteolysis with the chemically stabilized enzyme retained by the ultrafiltration reactor, showed that protease reutilisation for 7 days at 40°C is possible and that the growth of microorganisms is practically inhibited under these conditions. Gel chromatography showed the molecular weight range of the peptides to be less than 2,000. Triangular taste tests showed that the threshold identification concentration of the dry hydrolysate in an orange juice is about 0.65 %.

INTRODUCTION

Protein hydrolysates can be used for the nutritional enrichment of various liquid food such as soups, soft and fruit drink (1-4). Contrary to proteins, small peptides remain soluble at low pH and heat processing temperatures. Protein hydrolysates can be obtained by acid, alkaline or enzymatic hydrolysis. The latter procedure best retains the nutritional value ; it is however slower and most costly ; moreover it increases the risk of microbial growth and often leads to the formation of bitter-tasting peptides (5-8).

In a previous paper (9), we have described a simple treatment using glutaraldehyde that allows to stabilize an alkaline protease. This enzymatic preparation seeming suitable for the preparation of a protein hydrolysates from casein, experiments were carried out for this purpose.

Various systems or reactors have been devised for the continuous enzymatic hydrolysis of proteins such as fish protein concentrate , soy proteins and casein(10 - 15). Some of these systems permitted partial anzyme reutilization, by means of ultrafiltration membranes or of enzyme fixation (11, 15, 16).

In the present study, an ultrafiltration membrane enzyme reactor has been used for the continuous production of soluble peptides from casein. The membrane selectively retains the enzyme and allows the reaction products to pass through.

MATERIAL AND METHODS

CHEMICALS

Casein Hammarsten type was obtained from Merck (Darmstadt, West Germany), Promine D, a soya protein isolate, from Central Soya (Chicago, USA).

The following commercial enzyme preparations were used : Proteases A₁ ref. 4339 and V200 ref. 4333 from Rapidase-Wallerstein (Seclin, France), papaïne from Calbiochem (Los Angeles, USA), proteases from Streptomyces griseus from Sigma (St. Louis, USA), proteases from Streptomyces species, ref. 496, from CEPA (Aranjuez, Madrid, Spain), bacterial proteinase, Alcalase and Esperase from Novo (Copenhagen, Denmark), protease from Seishin Seiyaku (Chiba, Japan).

Glutaraldehyde (concentration 50 % w/v) was obtained from Eastman Kodak (Rochester, USA); Biogel P 10 from Bio-Rad (Richmond, USA) and nitrogen (U quality, 99.9 p. cent N₂) from L'Air Liquide (France).

EQUIPMENT

Batch hydrolysis experiments were carried out in a jacketted 50 ml glass reactor with stirrer, maintained at constant temperature. The pH control was performed using 2M ammonium hydroxyde with an automatic pH-stat (Bio-lafitte, Maisons-Lafitte, France). The rate of addition of alkali was recorded.

Continuous proteolysis with enzyme retention were performed using an ultrafiltration cell Amicon (Lexington, USA) type TCF 10). Continuous recirculation of the liquid at the membrane surface is obtained by the means of a peristaltic pump (Amicon LP 1A). the volume in the ultrafiltration reactor was 300ml. PM 30 Amicon Diaflo membranes (diameter 90 mm, area 40 cm²) were used. The stock casein solution was placed in a stainless steel tank (Amicon, RS type, 4 liter). Under a nitrogen pressure of 2 bars, this solution flowed continuously into the reactor , while the hydrolysed substrate solution passed continuously through the ultrafiltration membrane. The constant temperature was maintained by placing the reactor in a thermostated water bath.

Continuous hydrolysis experiments without enzyme retention were also performed in a glass reactor (continuous stirred tank reactor, CSTR).

Abbreviation used : CSTR, continuous stirred tank reactor.

Two peristaltic pumps were used to obtain given flow rates of reactants and products, and therefore given residence times of the reactants in the reactor (17). ApH-stat was also used.

METHODS

Determination of the initial proteolytic activity with casein substrate

Initial proteolytic activity was determined by the method adapted from Keay and Wildi (18) as previously described (9).

Estimation of the extent and of the rate of proteolysis

The extent of proteolysis was estimated in two ways.

One is derived from the previously described method (9) : 1 ml of the solution of partially hydrolysed protein is adjusted to 2 ml with a 30 % trichloroacetic acid solution. After mixing, incubating and centrifuging, the supernatant was reacted with Folin's reagent and the absorbance of the mixture determined at 560 nm. A "blank", D_0 , was prepared by adding the trichloroacetic acid to the solution of unhydrolysed protein. Another "blank", D_{max} , corresponding to the maximum extent of proteolysis was determined after hydrolysis of the protein solution by HCl 6N for 24 hours at 110°C. In this case, the extent of proteolysis is defined by the ratio

$$\frac{D \text{ at time } t - D_0}{D_{max} - D_0}$$

The second method of estimation was by measuring the amount of ammonium hydroxyde solution added during proteolysis. It was assumed that, during proteolysis at constant pH, the equivalent of ammonium hydroxyde solution added are proportional to the number of peptide bonds cleaved. The extent of proteolysis is then defined as the ratio

$$\frac{\text{ml NH}_4\text{OH at time } t}{\text{ml NH}_4\text{OH max}}$$

Estimation of protease degradation during continuous proteolysis

The following procedure was adopted in order to measure the residual enzymatic activity in the reaction medium : to 1.75 ml of a 1.14 % casein solution (pH 7) was added 0.25 ml of the enzymatic reaction medium (containing partially hydrolysed proteins). The mixture is treated as indicated preceding paper (9); 2 ml of a 15 % trichloroacetic acid solution are added after a 10 min. time reaction. A "blank" was prepared by the same procedure, trichloroacetic acid being added at time zero.

Chemical stabilization

In order to stabilize the enzyme selected for the continuous experiments (Alcalase), the following procedure was used (9) : 500 mg of the enzymatic preparation were suspended at 4°C in 9 ml of a pH 7.5, 0.1 M sodium phosphate buffer. After stirring the insoluble fraction was removed by centrifugation (14,000 g x 10 min.). 1 ml of a 0.25 % glutaraldehyde solution in the same buffer was added to the supernatant. The mixture was incubated for 12 hours at 4°C.

Gel filtration

Freeze-dried proteolysates were dissolved and the molecular weights distribution of the peptides was estimated by chromatography of 2 ml samples (concentration 5 %) on a Biogel P 10 column, 200 to 400 mesh. The samples were dissolved and the column equilibrated in a pH 6.5, 0.1 M sodium phosphate buffer. The absorbance at 280 nm were read on the 3 ml fractions. The column size was 1.5 x 90 cm with a void volume (determined with a dextran blue solution) of 37 ml. The flow rate was maintained at 12 ml per hour, and the temperature at 22°C.

Determination of microbial counts

The determination of the microbial count in the reaction medium was done using a duplicate 1 in 10 serial dilution method, and Mac Crady's tables. The culture medium consisted of a solution of yeast extract(5 o/oo), proteose peptone (0.5 o/oo), glucose (5 o/oo), NaCl (1 o/oo), pH 7. Presence or absence of microorganisms in the dilution tubes were determined after an incubation time of 4 days at 37°C.

Apparent viscosity

A Brookfield (model RVT) viscosimeter was used in order to measure the apparent viscosity of casein solutions during hydrolysis. The determinations were performed at 40°C with 500 ml of casein solution.

RESULTS AND DISCUSSION

Choice of the enzyme-substrate system

Before ^{having} performed the chemical stabilization experiments, with glutaraldehyde, and that are reported in the preceding paper (9), some preliminary experiments were carried out in order to select a protein-protease system a priori suitable for a protein hydrolysate preparation.

In each of these experiments, the pH of the reaction mixture was maintained at 8.8 by the addition of ammonium hydroxide.

The activity of the enzyme preparations was measured on casein (see "Material and method"). The results are presented in table I. On a weight basis, Alcalase, Esperase and CEPA preparations appeared to be the most effective with respect to the rate of solubilisation. The assays further showed that Alcalase gave the highest extent of proteolysis with both casein and Promine D.

Figure 1 shows the pH dependence of the enzymatic activity for the various protease preparations : Alcalase and Esperase are alkaline proteases whereas the others are neutral. Alkaline proteases may be preferred in a continuous enzyme reactor because the growth of microorganisms is inhibited when the pH is high (12).

The proteolysates from casein and Promine D obtained batch-wise with Alcalase and Esperase (5 % protein, 0,5 % enzyme, 8 hours, 40°C, pH 8) were found to have about the same degree of bitterness (as a 1 % solution in water). Promine D proteolysates had a very unpleasant raspy taste ; furthermore they did not dissolve entirely at 1 % concentration in a citric acid (0.4 %), sucrose (12 %), pH 3.8 solution according to Holsinger et al. (2).

For these reasons, the casein-Alcalase system was chosen. It may be noted that, when Alcalase (enzymatic preparation extracted from the genus Bacillus) is suspended in sodium phosphate buffer at 4°C, a non enzymatically active part of the enzyme preparation remains insoluble. This insoluble part may be removed by centrifugation (14,000 g x 10 min.).

Proteases	initial enzymatic activity U/mg	extent of hydrolysis			
		casein		Promine D	
		(a)	(b)	(a)	(b)
Rapidase A1 ref.4339	240				
Rapidase V200 ref. 4333	160				
Papaine (Calbiochem)	200				
Pronase (Sigma)	360				
C.E.P.A. ref. 496	400	95	100	93	80
Bacterial proteinase (Novo)	550				
Alcalase (Novo)	2200	100	100	93	90
Esperase (Novo)	1800	81	90	82	85
Protease (Seishin Seiyaku)	260				

TABLE I : Enzymatic activities and extent of hydrolysis with the different proteases tested.

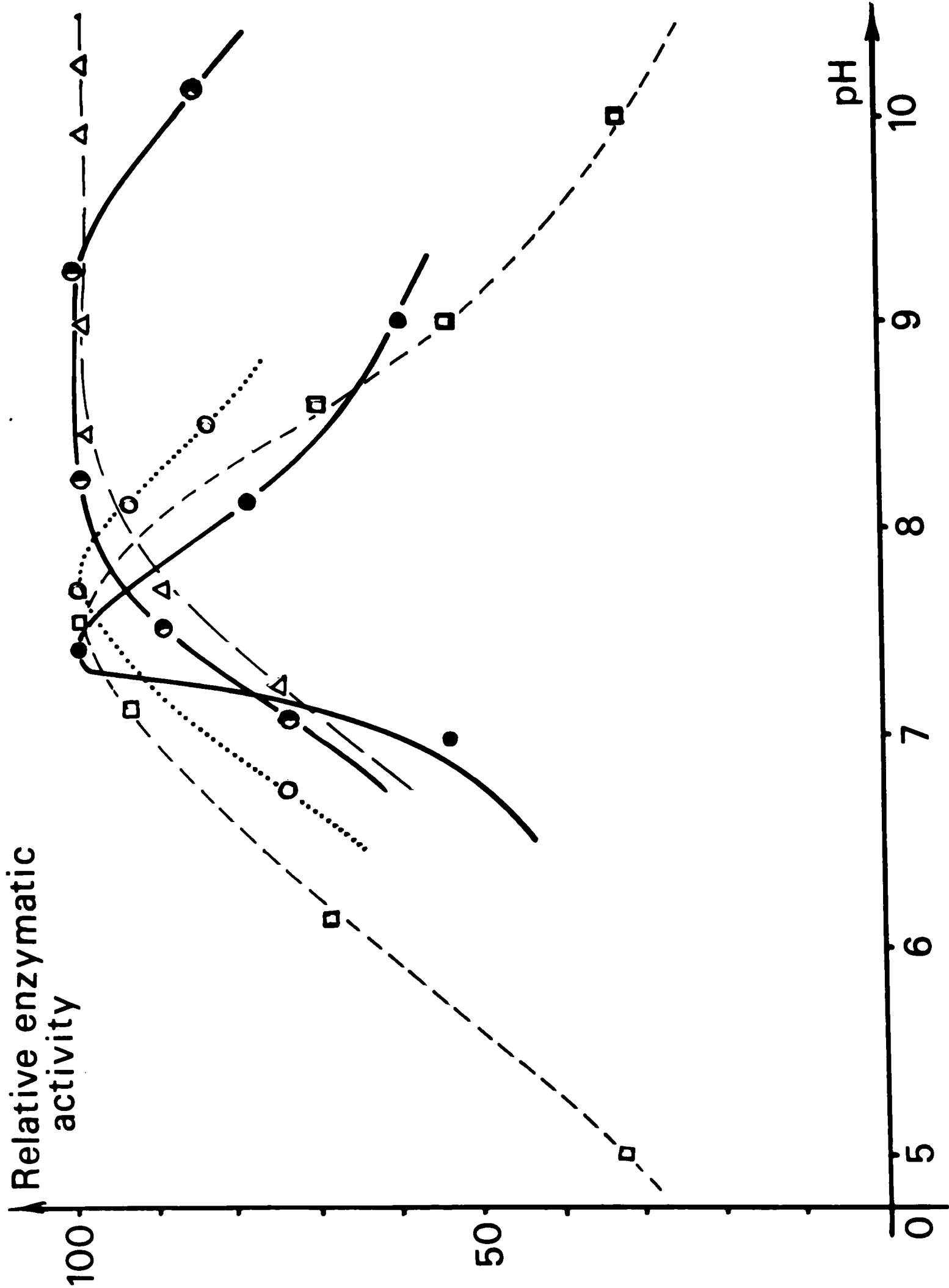
The enzymatic activity was measured with a 1 % (w/v) casein solution and is expressed in proteolytic units (see "Materials and methods") per mg of enzyme preparation.

The extent of proteolysis was measured with a 5 % protein solution after incubation for 8 hours at 40°C and pH 8 with a 0.05 % enzyme concentration. It is expressed as the percentage of the maximum value obtained (a) with Folin's reagent or (b) with ammonium hydroxide neutralisation.

Figure 1 :

pH-activity curves of various protease preparations.
Pronase (Sigma) (● — ●), protease CEPA (○ ····· ○),
bacterial proteinase (Novo) (□ - - - □), Alcalase
(Novo) (● — ●), Esperase (Novo) (△ — — △).

The proteolytic activities are measured with 1 % (w/v)
casein at 40°C.



Reaction kinetics

Reaction kinetics were followed in batch and continuous experiments, with a 5 % casein solution at pH 8.8, 40°C and enzyme/casein ratio 1 %. As recorded previously, in each experiments, the pH of the reaction mixture was maintained at 8.8 by the addition of ammonium hydroxyde. This procedure is suitable in practice, since neutralization of the product may be achieved by simply removing the alkali as ammonia gas : after drying in a rotary evaporator and freeze drying, the final pH of the solids dissolved in distilled water (2 %) was found to be 7.2. The dehydration process alone is therefore sufficient to neutralize the product.

Figure 1, curve A shows the results of the batch experiments (circles), figure 1, curve B shows the results of the continuous experiments (triangles). A good agreement may be noted between the two determinations of the extent of hydrolysis, by trichloroacetic soluble peptides (white points) or by the amount of ammonium hydroxide (shaded points). This figure (curve A) shows also that the reaction is not exactly first order with respect to the substrate concentration. The curve obtained by plotting $\ln(1-X)$ versus time (where X is the ratio of proteolysis) is not a straight line, and the slope value of this curve is increasing with X. The value of the first order constant kinetic initially equal to 1.3 hr^{-1} is equal to 0.9 hr^{-1} and 0.3 hr^{-1} when X is 0.5 and 0.9 respectively. The value of the first order constant K has also been determined with experiments performed in a CSTR under similar conditions of temperature, pH, enzyme concentration and protein concentration. The extent of proteolysis X was plotted as a function of the residence time of the solution in the reactor (figure 2, curve B).

The values of K were calculated from the experimental data and from formula :

$$\frac{X}{1-X} = K \cdot \theta$$

corresponding to a first order kinetic in steady state during a continuous reaction (19), where θ is the residence time of the solution in the reactor. These values were found to be less than 1.3 hr^{-1} and varying from 0.65 hr^{-1} to 0.46 hr^{-1} . The reaction kinetic of which the order is greater than one (curve A), the difference between the theoretical initial value of K (1.3 hr^{-1}), and the values obtained continuously (CSTR) lead us to the conclusion that the reaction is probably inhibited by the reaction products. Such a phenomenon has already been noted by Cheftel et al. (11). Besides, on batch experiments, it has been found that the initial value of K remains linear

Figure 2 :

Reaction kinetics of casein hydrolysis with Alcalase.

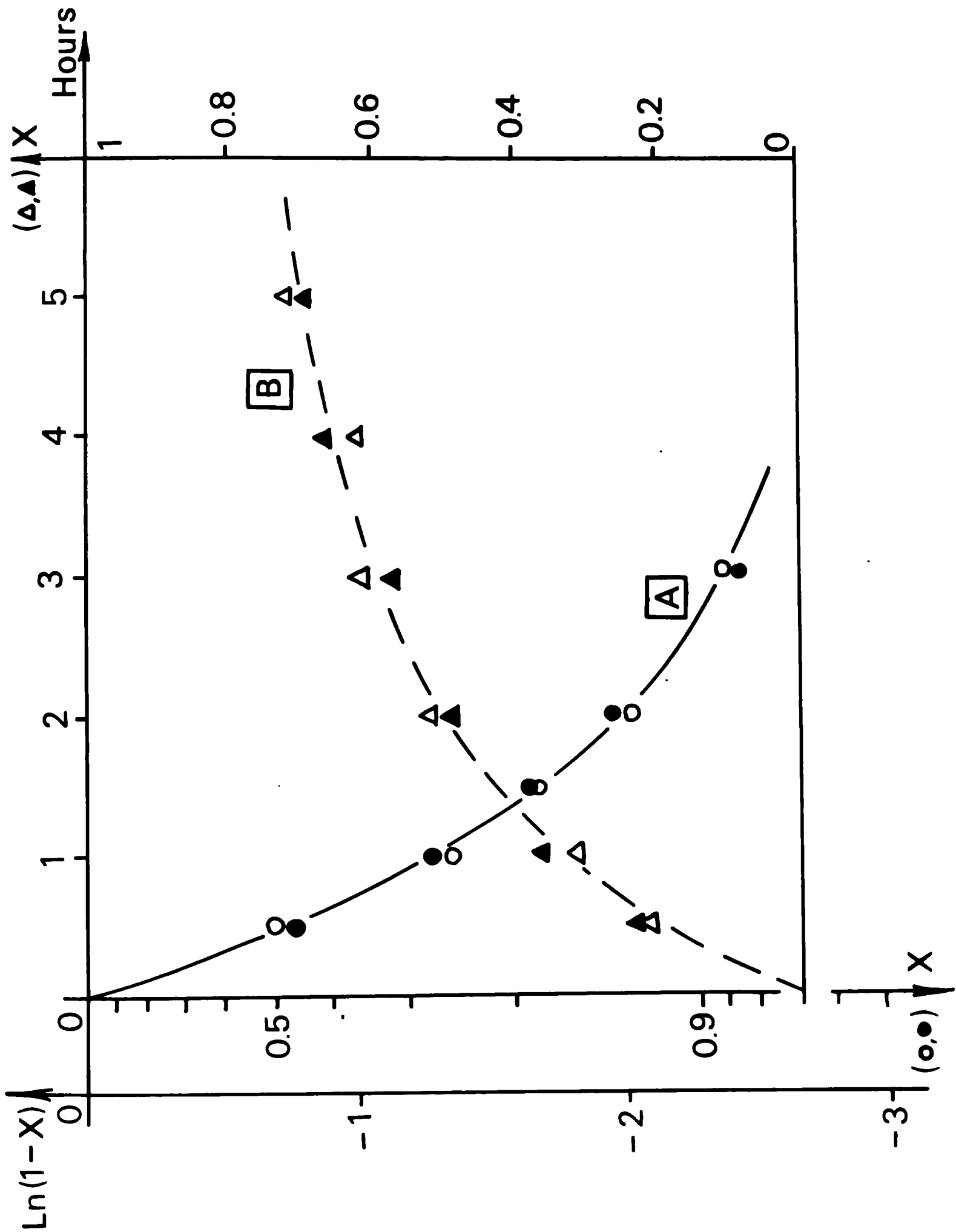
Curve (A) : batch experiments ; $\ln(1 - x)$ is plotted as a function of time, the corresponding value of the extent of hydrolysis x are on second right axis.

Curve (B) : continuous experiments : extent of hydrolysis as a function of the residence time of the solution in the reactor (C S T R)

(\circ , \triangle) : Folin determination after trichloroacetic acid precipitation

(\bullet , \blacktriangle) : measurement of NH_4OH added

Casein 5 % (w/v), enzyme/substrate = 1 %, pH 8.8, 40°C.



with enzyme concentration until the enzyme/substrate ratio reaches 2 % (for a 5 % casein solution).

Ultrafiltration of Alcalase solutions

Because of the modification of the pH in the reaction medium during proteolysis, the reactor type chosen for the continuous preparation of proteolysate, was a continuous stirred tank reactor. In fact, in this reactor type, the pH of the reaction medium may be maintained at the desired value by continuous adding a neutralizing solution.

In order to retain the enzymatic activity in the reactor, we deliberately chose a reactor that is limited by an ultrafiltration membrane (see "Material and methods"). Also as a result of the determination of the molecular weight of Alcalase (9), an ultrafiltration membrane Amicon Diaflo PM 30 was selected for enzyme retention. The experimental retention of Alcalase with the PM 30 membrane was studied with 300 ml of an Alcalase solution (0.5 mg/ml) in a pH 8, 0.05 M sodium phosphate buffer introduced into the ultrafiltration cell, and continuously diafiltered with the same buffer (nitrogen pressure : 2 bars). The enzymatic activity, with casein as a substrate, was measured in 600 ml of filtrate, collected as 10 or 50 ml fractions. The results are summarized in table II. If diafiltration is performed at 3°C, no activity is detected in the ultrafiltrate : this shows that Alcalase is retained by the PM 30 membrane. At higher temperatures (40°C and 50°C), no enzyme leaks out in the first milliliters of filtrate : this is in agreement with the previous statement. However enzyme leakage becomes appreciable with time, filtration volume and temperature ; this probably corresponds to self digestion of enzyme into smaller, but still enzymatically active, molecules. When continuous diafiltration is performed at 40°C with a 5 % casein solution instead of phosphate buffer, only 16 % of the initial enzymatic activity is found in the total filtrate and the percentage of lost enzymatic activity is 52 %. These values compared with those found with the phosphate buffer diafiltration - 40 % and 53 % respectively - suggest that casein acts as a protecting agent against self digestion, but not against heat denaturation of the enzyme. A continuous diafiltration performed with the stabilized Alcalase showed a better retention of the enzyme : no activity was detected in the ultrafiltrate, and only 8 % of the initial enzymatic activity were not recovered in the reactor after 600 ml ultrafiltrate have been collected. This last experiment shows the efficiency of the glutaraldehyde treatment of the enzyme in stabilizing its activity. The comparison of the percentages of the enzymatic activity found in the 600 ml ultrafiltrate, during the experiments performed at 40°C (table II), with native and stabilized Alcalase, suggests that the glutaraldehyde treatment protects the enzyme against self digestion.

Temperature °C	percentage (%) of enzymatic activity		
	in the 600 ml filtrate	retained above the membrane	unaccounted for
3 (a)	0	98	2
40 (a)	40	7	53
50 (a)	30	3	67
40 (b)	16	32	52
40 (b,c)	0	92	8

TABLE II : Ultrafiltration of Alcalase at different temperatures with the PM 30 membrane.

(a) pH 8, 0.05 M sodium phosphate buffer

(b) casein solution, concentration 5 %, enzyme concentration 0.5 mg/ml, 2 bars.

(c) stabilized Alcalase.

Ultrafiltration of partially hydrolysed casein solutions

Casein molecules (M.W. ca 25,000) may be supposed to be retained by PM 30 membranes until they are split into small peptides.

The initial apparent viscosities of 5 %, 10 % and 15 % casein solutions were found to be 3, 6 and 35 cp respectively at 40°C. After hydrolysis (100 min. at 40°C, enzyme/casein 1 %, pH 8,8) the viscosity was considerably lowered : 0.66, 0.9 and 1.22 cp, respectively. The flow rates of these hydrolysed solutions, through PM 30 membranes, were measured at 40°C under a nitrogen pressure of 2 bars. There was no appreciable influence of the initial concentration of casein on the flow rate ; the latter was found to be close to 0.025 ml/min. cm². The 5 % casein concentration was selected for the major part of the continuous experiments. It may be noted that Alcalase relative activities were 100 %, 70 %, 40 %, 36 % and 30 % with casein solutions of concentrations 1 %, 2,5 %, 5 %, 10 % and 15 % respectively.

Continuous hydrolysis experiments

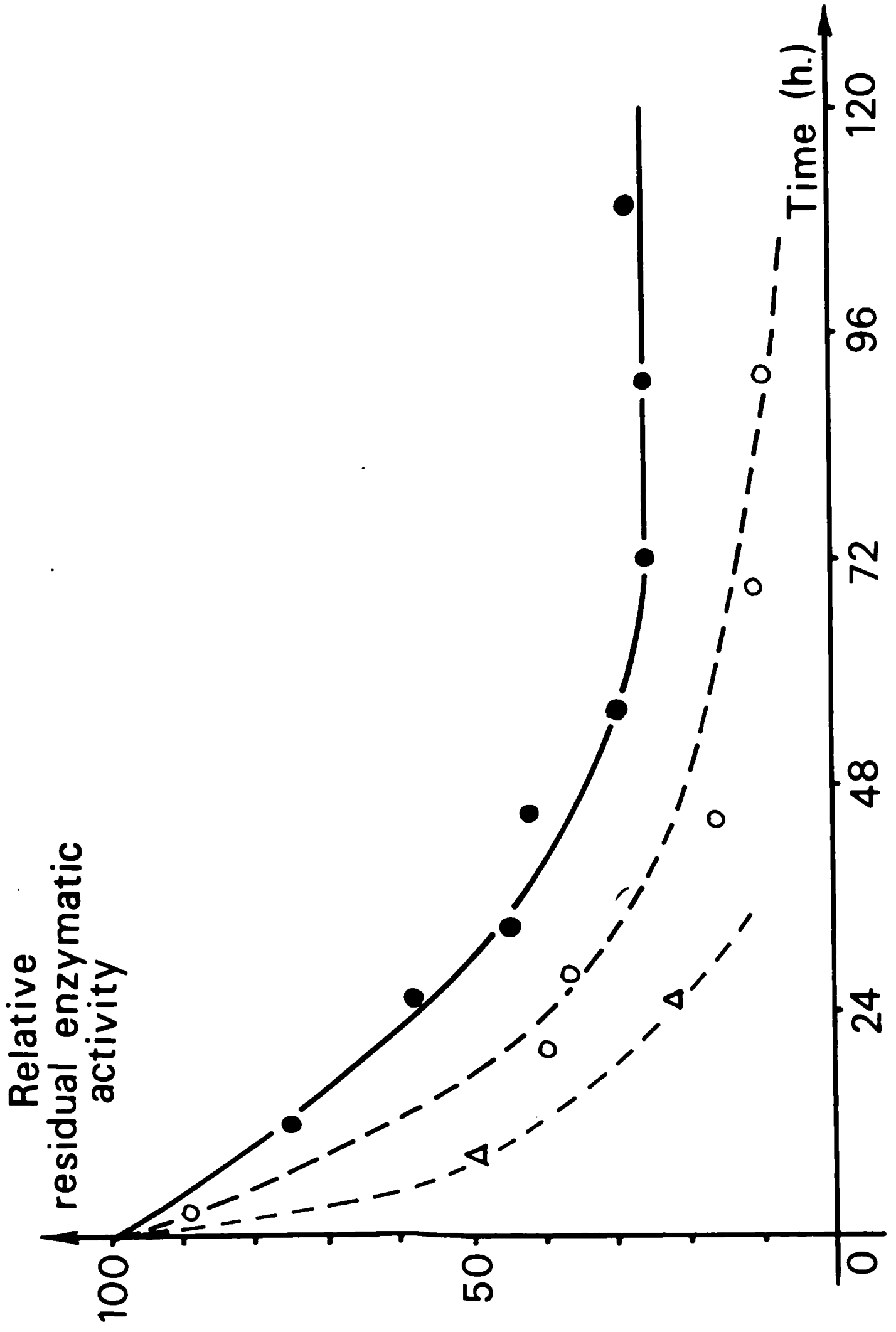
Two preliminary experiments were performed at 40°C and 50°C for 120 hours with a 5 % casein solution, pH 8,8, 0.2 M in ammonium ions and native Alcalase. The enzyme concentration was 0.5 mg/ml. 300 ml of a 5 hours batch hydrolysate, pH 8,8 were placed in the ultrafiltration cell before continuously feeding the casein solution. Nitrogen pressure of 2 bars was maintained. The reaction volumes in the ultrafiltration cell remained close to 300 ml, the flow rates through the membrane close to 0.022 ml/min. cm² and the pH close to 8.8 during the whole experiments. For these experiments, residual enzymatic activities and the total number of microorganisms were evaluated in the reactor. Figure 3 shows the decrease of enzymatic activity : after 72 hours of continuous processing, 30 % and 12 % of the initial enzymatic activity remained in the reactor at 40°C and 50°C respectively. When comparing this 50°C curve, with that showing the decrease of activity of Alcalase in a pH 8, 0.1 M sodium phosphate buffer at the same temperature, it appears that the presence of casein protects the enzyme against inactivation. This correlates with the results of table II . The number of total microorganisms per milliliter of reaction mixture in the reactor as a function of time was found to be constant and of about 10² microorganisms. The microscopic analysis showed that it was a gram negative bacteria of which optimal pH and temperature growing rate were found to be about 7.5 and 35°C. This microorganism may be regarded as a contaminant because the enzymatic preparation was verified to be sterile. Furthermore, it may be noted that a recontamination with a mixture of microorganisms did not change this result. Because of the less significant heat inactivation of Alcalase at 40°C than at 50°C (5), 40°C was chosen for the continuous reactions.

Figure 3 :

Remaining enzymatic activity of Alcalase in the ultrafiltration reactor as a function of time of continuous hydrolysis.

The casein solution, 5 % (w/v) is continuously hydrolysed ; pH in the ultrafiltration reactor was 8.8 ; 150 mg Alcalase in a reaction volume of 300 ml ; 40°C (● — ●) and 50°C (○ --- ○). Relative enzyme activities.

The curve (Δ----Δ) represents the decrease of relative enzymatic activity of Alcalase in a pH 8, 0.1 M sodium phosphate buffer at 50°C.



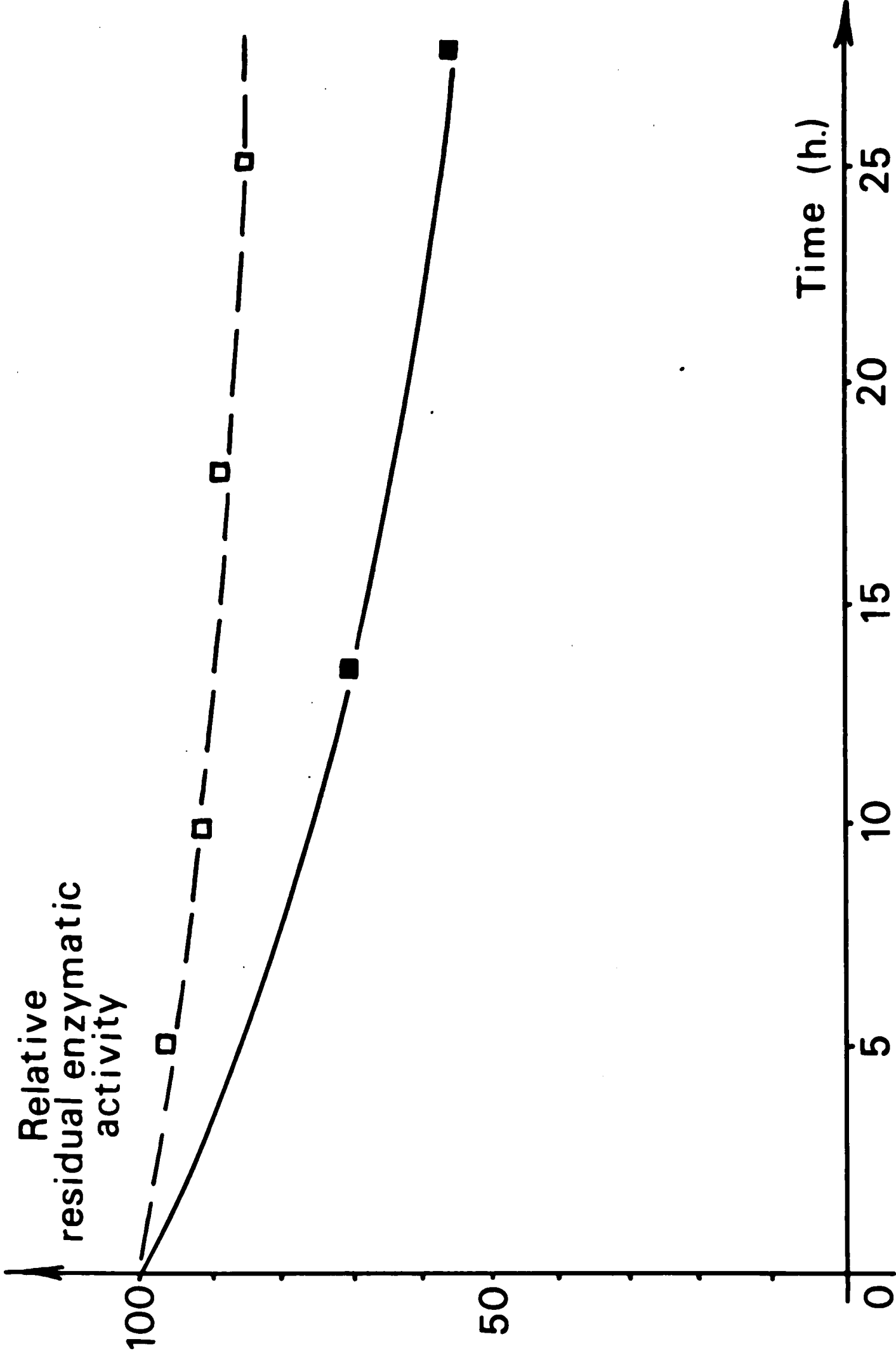
Another continuous hydrolysis, with the same casein solution, was performed at 40°C with the glutaraldehyde treated Alcalase. 300 ml of the casein solution containing 300 mg of Alcalase treated with glutaraldehyde at a final concentration of 0.025 % (see "Material and methods" and ref. 9), were hydrolysed for 5 hours (pH 8.8) and placed in the ultrafiltration cell before continuously feeding in the casein solution. The continuous experiment was maintained for 150 hours. During this period of time the flow rate remained constant at 0.02 ml/min.cm^2 , corresponding to a nominal residence time of 6.25 hours. The extent of proteolysis, determined with the Folin reaction as trichloroacetic acid soluble material remained constant and equal to 90 %. During the experiment, residual enzymatic activity in the reactor was measured as a function of time. It was found to be 75, 60 and 50 % after 50, 100 and 150 hours of operation respectively. These values, compared with those of the continuous proteolysis performed previously with native Alcalase (figure 3), at 40°C, show that the glutaraldehyde treatment efficiently stabilizes the enzyme. The results of the first 25 hours of both these experiments are plotted on figure 4.

Two other continuous experiments were performed at 40°C: the first one with a 10 % casein solution (0.4 M ammonium ions, initial pH 10.2) and the second one with a 15 % casein solution (0.6 M ammonium ions, initial pH 10.1). The concentrations of glutaraldehyde treated Alcalase used in the ultrafiltration reactor (reaction volumes : 300 ml), were respectively 1.1 mg/ml and 2.0 mg/ml. These values were calculated taking account of both the increase of casein concentration and the decrease of enzymatic activity as a function of substrate concentration. As for the second experiment, the temperature of the initial casein solution was maintained at 50°C in order to decrease its viscosity (11 cp) and so, to facilitate the flow of the solution into the reactor. These two continuous experiments were each maintained for 5 days and the residual enzymatic activity in the reactor was measured after 25 and 150 hours. It was found to be 85 % and 52 % for the 10 % casein solution and 81 % and 48 % for the 15 % casein solution. These results agree with the previously found with the 5 % casein solution. Moreover, the flow rates were found to be approximatively the same ($0.024 \text{ ml/min.cm}^2$ as for the 10 % casein solution and 0.02 ml/min.cm^2 as for the 15 % casein solution) and the extent of both hydrolysis of about 90 %. The microbial counts performed after 5 days gave similar results to those found previously (about 10^2 microorganisms per milliliter).

Experiments with higher casein concentrations were not performed because of the difficulty in entirely solubilizing the casein in the initial solution.

Figure 4 :

Remaining enzymatic activity of native Alcalase (■—■) and glutaraldehyde (final concentration 0.025 %)-treated Alcalase (□—□) in the ultrafiltration reactor during a continuous hydrolysis of a 5 % casein solution at 40°C.



Products analysis

Casein solutions, submitted to various durations of continuous or batch proteolysis (similarly with glutaraldehyde treated Alcalase) were concentrated in a rotary evaporator and then freeze-dried. The dried solids obtained from the continuous hydrolysis were fully soluble in distilled water, and the pH of this solution close to 7.






The molecular weight distribution of the products of proteolysis has been evaluated by gel filtration on a Biogel P 10 column and by measuring absorbance of the fractions at 280 nm (figure 5). The results indicate that the hydrolysates contain a major part of low molecular weight peptides or of amino acids. However no free amino acids were found in the hydrolysate from the continuous experiment (as shown by an automatic amino acid analyser).

The molecular weight distribution of the peptides of the continuous hydrolysate (nominal residence time 6.25 hours) is similar to that of a 5 hours batch hydrolysate obtained under identical experimental conditions (temperature, pH, concentration of glutaraldehyde treated Alcalase and of casein).

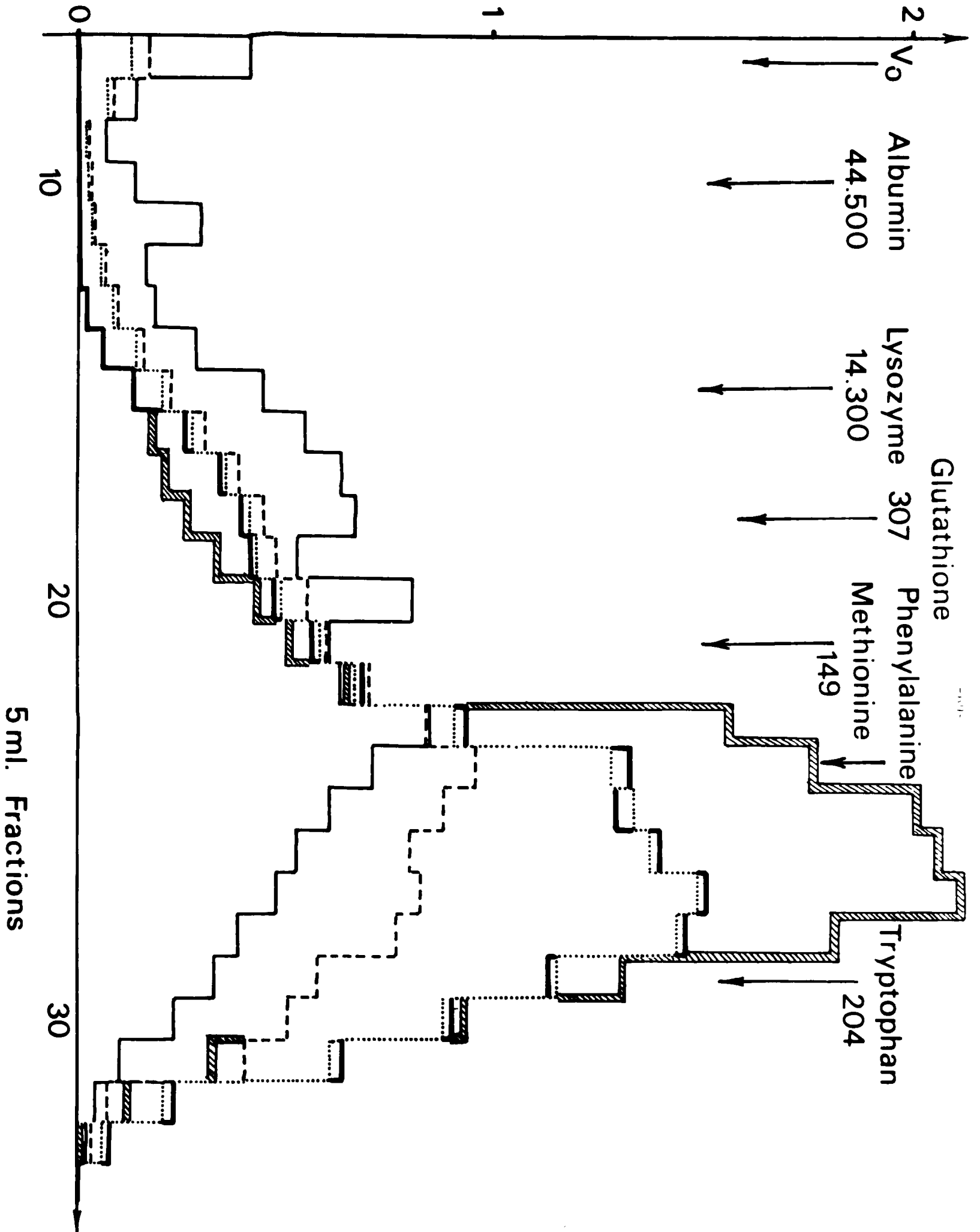
About 1 kg of peptides was prepared by continuous proteolysis in order to assess their value as a means of protein enrichment for fruit drinks. The peptides were fully soluble, at a 1 % concentration, in the 12 % sucrose-0.4 % citric acid, pH 3.8, 22°C solution used by Holsinger et al. (2). No precipitate was observed after pasteurisation at 80°C for 2 min. ; sterilisation at 120°C for 20 min. caused a very slight precipitation.

Triangular taste tests according to Roessler et al. (20) were performed with 18 tasters in order to detect the difference between a normal non carbonated beverage with orange extracts and the same beverage enriched with the casein peptides. A significant difference was found between the two beverages for peptides concentrations of 0.5 % (safety limit 0.9) , 0.75 % (safety limit 0.95) and 1 % (safety limit 0.999). Bitterness was detected at a 0.65 % concentration of peptides in 50 % of cases.

Figure 5 :

Chromatography of casein hydrolysates on Biogel P 10. The hydrolysates (100 mg dry solids) are those from continuous () and from 20 min. (), 1 hour (), 5 hours () and 24 hours () batch experiments. Conditions of chromatography are given in "Material and methods".

280 nm. Absorbance



REFERENCES

1. D.K. Salunke and H.R. Bolin, *Food Product Dev.*, 6, 84 (1972).
2. V.H. Holsinger, L.P. Posati, D.D. De Vilbiss and M.J. Pallansch, *Food Technol.*, 27 (2), 59 (1973).
3. S. Badui and A.C. Peng, *Ohio Report*, 59 (2), 37 (1974).
4. K. Predergast, *Food Trade Review*, 1, 14 (1974).
5. K. Ichikawa, T. Yamamoto and J. Fukumoto, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 33, 1044, (1959).
6. K. Ichikawa, T. Yamamoto, A. Nishio and J. Fukumoto, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 34, 448 (1960).
7. J. Kirimura, A. Shimizu, A. Kimizuca, T. Ninomiya and N. Katsuya, *J. Agr. Food Chem.*, 17 (4), 689 (1969).
8. J.J. Sullivan and G.R. Jago, *Aust. J. Dairy Technol.*, 27, 98 (1972).
9. J. Boudrant and C. Cheftel, *Biotechnol. Bioeng.*, (1976), preceding paper in this issue.
10. D.I.C. Wang, A.J. Sinskey and J.A. Butterworth, in *Membrane Science and Technology*, Plenum Press, New York, pp. 98-119 (1970).
11. C. Cheftel, M. Ahern, D.I.C. Wang and S.R. Tannenbaum, *Agr. Food Chem.*, 19 (1), 155 (1971).
12. C. Cheftel, *Ann. Technol. Agric.*, 21 (3), 423, (1972).
13. J.P. Roozen and W. Pilnik, *Process Biochem.*, 8 (7), 24 (1973).
14. G.A. Jacobucci, M.J. Myers, S. Emi and D.V. Myers, *IVth International Congress of Food Science and Technology*, Madrid (1974).
15. S.P. O'Neill, J.R. Wykes, P. Dunnill and M.D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 319 (1971).
16. R.D. Mason, C.C. Detar and H.H. Weetall, *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1019 (1975).
17. J. Boudrant and C. Cheftel, *Biochimie*, 55 (4), 413 (1973).
18. L. Keay and B.S. Wildi, *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 179 (1970).
19. R.B. MacMullin and M. Weber, *Trans. Amer. Inst. Chem. Eng.*, 31, 409 (1935).
20. E.B. Roessler, J. Warren and J.F. Guymon, *Food Research*, 13, 503 (1948).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the participation of J.P. Girardet in the early stages of this work.

This study has been supported in part by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Paris (contract n° 72.7.0851).

CONCLUSION

L'utilisation de cellules d'ultrafiltration se révèle être un procédé simple et efficace pour l'immobilisation des enzymes. L'avantage de ce système est la conservation prolongée de l'activité enzymatique et le maintien d'un contact étroit entre l'enzyme soluble et le substrat. On sait en effet, et ceci sera développé plus en détail dans le second chapitre, que l'immobilisation d'enzymes sur des supports insolubles entraîne fréquemment une modification défavorable de l'activité enzymatique due principalement aux phénomènes de diffusion des substrats et produits de réaction. Cet effet est particulièrement marqué lorsque le substrat est de poids moléculaire élevé en raison de l'encombrement stérique.

Dans les réacteurs enzymatiques à membrane d'ultrafiltration que nous avons étudiés, trois problèmes essentiels ont retenu l'attention :

1) Le premier concerne la stabilité de l'activité enzymatique ; il a été observé qu'une concentration suffisamment élevée en substrat peut améliorer la stabilité de l'invertase et limiter l'autodigestion de l'Alcalase.

2) Le second concerne la stabilité microbiologique du milieu réactionnel. L'action de la concentration en substrat peut être utile afin d'empêcher le développement de micro-organismes. Bien que ceci n'ait pas été étudié ici dans le cas de l'hydrolyse du saccharose, des expériences analogues quant au pH et la concentration en substrat, réalisées dans un réacteur tubulaire et à 22°C, ont permis de montrer que le développement des micro-organismes totaux était inhibé (voir Chapitre 2, paragraphe 2.2.1, Hydrolyse continue du saccharose). Lorsque l'action de la concentration en substrat n'est pas utilisable, on peut avoir recours à une action combinée du pH et de la température. Ceci a été vu lors de la préparation continue de protéalysats à l'aide de la protéase alcaline Alcalase (pH 8,8 et 40°C).

3) Le troisième problème concerne la faible valeur des débits obtenus au travers des membranes d'ultrafiltration (environ 0,01 ml/cm².mn). Ce dernier facteur est probablement celui qui limitera le plus l'utilisation des appareils d'ultrafiltration pour la réalisation de réacteurs enzymatiques continus.

1.2 -

**REACTEUR HOMOGENE SANS RETENTION
D'ENZYME : CAS PARTICULIER DE
L'OXYDATION DU GLUCOSE**

L'oxydation du glucose en acide gluconique semble, à priori, une réaction intéressante. On sait en effet que l'acide gluconique, plus onéreux que le glucose, sert à la préparation de produits pharmaceutiques. La littérature comprend de nombreux travaux relatifs à la fixation de la glucose oxydase par les diverses techniques d'immobilisation mises au point ces dernières années (ZABORSKY, 1973). Cet intérêt est probablement dû à l'ubiquité de l'enzyme et à la bonne connaissance de son mécanisme d'action. Cependant peu d'essais ont été faits en vue de la réalisation d'un réacteur enzymatique transformant le glucose en acide gluconique de manière continue (CAILLEAU, 1974). La fixation de la glucose oxydase a surtout été pratiquée pour expliquer certains phénomènes réactionnels (WEIBEL et BRIGHT, 1971 - THOMAS, 1971 - GREENFIELD et al., 1974 - MESSING, 1974) ou dans un but analytique (GUILBAULT, 1970). Nous nous sommes proposés d'étudier cette réaction dans le but de réaliser un réacteur continu agité dans lequel l'enzyme, immobilisée sur un support insoluble, aurait été retenue à l'intérieur du réacteur. Si les expériences effectuées nous ont montré qu'une telle réaction était inapplicable, la vitesse de réaction étant limitée par l'oxygène, celles-ci nous ont néanmoins permis d'appliquer la théorie du transfert de l'oxygène en vue de déterminer la constante de Michaelis de la glucose-oxydase par rapport à l'oxygène.

Application de la théorie du transfert d'oxygène : Détermination de la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène.

Joseph BOUDRANT et Claude CHEFTEL.

*Laboratoire de Biochimie et Technologie Alimentaires,
Université des Sciences et Techniques, 34060 Montpellier Cedex.
(14-10-1974).*

Summary. — The oxidation of β -D-glucose with glucose oxidase generally requires oxygen, which, under normal conditions is present at low concentrations in the reaction medium. Experiments show that glucose oxidase is no longer saturated by oxygen at enzyme concentrations greater than 0.4 mg. ml^{-1} . This is due to the decrease in the oxygen concentration of the solution. The value of the oxygen mass transfer coefficients and dissolved oxygen concentrations are determined. These dissolved oxygen concentrations are found to correlate with direct measurements with an oxygen electrode. From this, the Michaelis constant of glucose oxidase for oxygen is calculated. These experiments also show that oxygen is a limiting factor for this reaction.

INTRODUCTION.

La glucose oxydase (E.C.1.1.3.4) est une glycoprotéine [1] qui catalyse l'oxydation du β -D-glucose à l'aide de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel. L'enzyme y est réduite par le glucose puis régénérée par l'oxygène avec formation de peroxyde d'hydrogène [2, 3]. Il y a libération de gluconolactone qui est hydrolysée en acide gluconique [4]. La réaction ne se poursuit que grâce au renouvellement de l'oxygène dissous dont la concentration dépend de l'activité enzymatique présente dans le milieu réactionnel. L'application de la théorie des transferts de matière à cette réaction — activités enzymatiques mesurées en fonction de la concentration en glucose oxydase — permet de déterminer la valeur de la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène.

MATERIEL ET METHODES.

Réactifs.

Le D(+)glucose « pour usage biochimique » provient de Merck, et la D-glucono- δ -lactone de Fluka.

La glucose oxydase purifiée d'*Aspergillus niger* (type II) et la catalase de foie de bœuf (type C 10) proviennent de Sigma.

Le réactif « glucostat » (glucose oxydase, peroxydase, orthodiansidine) provient de Worthington Biochemical Corporation.

◊ A qui toute correspondance doit être adressée.

Appareillage.

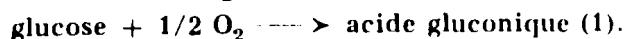
Les expériences sont faites dans un récipient thermostaté, à double enveloppe, Radiometer (50 ml). L'apport d'oxygène est assuré par barbotage : le débit d'oxygène pur (mesuré à 20°C) est de 1 litre par minute. Le pH est maintenu constant à l'aide d'un pH-mètre Radiometer type TT2 muni d'une autoburette type ABU 11.

Méthodes analytiques.

Une série d'expériences préliminaires avec des solutions de concentration initiale en glucose 0,1 M, 0,15 M et 0,2 M a permis de vérifier la concordance entre deux méthodes de mesure des activités enzymatiques : dosage du glucose résiduel à l'aide du réactif « glucostat » et mesure du volume d'hydroxyde de sodium (1 N) ajouté pour maintenir le pH. Cette dernière méthode a été adoptée. L'activité enzymatique est exprimée en tant que vitesse de début d'oxydation du glucose (micromoles de glucose oxydées par minute). Pour cela la courbe expérimentale des 20 premières minutes de la réaction est tracée et la valeur de la pente déterminée.

L'oxydation du glucose est faite en solution tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,6. La concentration initiale en glucose est 0,2 M. Ainsi la glucose oxydase reste saturée par le glucose pendant toute la durée des mesures (20 minutes). En effet la constante de Michaelis par rapport au glucose ($1,15 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) est négligeable par rapport à sa concentration initiale et la cinétique de réaction est bien d'ordre zéro [5].

De la catalase, dont l'activité est souvent présente [6], est ajoutée au milieu réactionnel (0,1 mg.ml⁻¹), ceci évite l'inactivation de la glucose oxydase par le peroxyde d'hydrogène [7] et permet une meilleure utilisation de l'oxygène dissous. Le bilan global de la réaction s'écrit :



Certaines déterminations d'oxygène dissous ont été effectuées à l'aide d'une électrode galvanométrique de mesure de pression d'oxygène et d'une unité de contrôle Biolafitte « Oxycontrôle 2 ».

RESULTATS ET DISCUSSION.

La vitesse de réaction de la cinétique d'ordre zéro a été mesurée à pH constant et pour des concentrations en glucose oxydase comprises entre 0,1 et 2,5 mg.ml⁻¹.

La figure 1 indique les courbes obtenues à différentes températures : les activités enzymatiques ne varient pas de la même manière. En effet les activités sont la résultante de deux phénomènes variant en sens inverse avec la température : la concentration de l'oxygène dissous et la vitesse

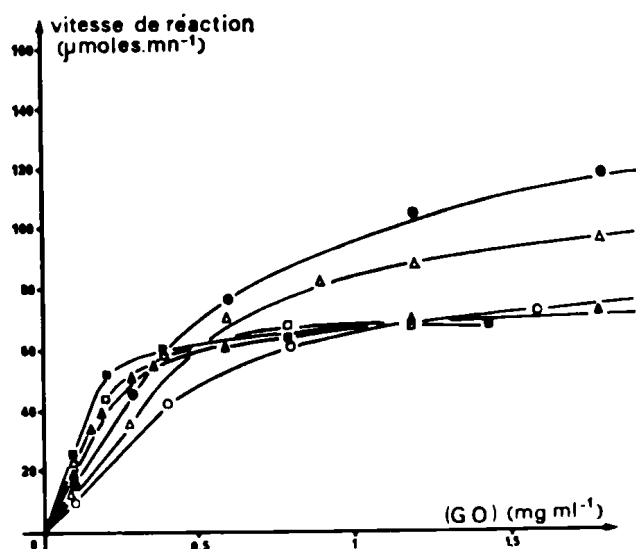


FIG. 1. — Activité enzymatique en fonction de la concentration en glucose oxydase.

Tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,6 ; solution de glucose 0,2 M ; volume réactionnel : 50 ml.

Températures : 3°C (○—○) ; 12°C (●—●) ; 25°C (△—△) ; 40°C (▲—▲) ; 50°C (□—□) ; 65°C (■—■).

de réaction. Cette figure indique aussi qu'à des concentrations en glucose oxydase inférieures à 0,4 mg.ml⁻¹, l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en enzyme. Au-delà

de ce seuil l'activité enzymatique croît moins vite que la concentration en glucose oxydase. En conséquence, une augmentation de cette concentration augmente l'activité totale du milieu réactionnel, mais diminue l'activité par unité de poids de l'enzyme. Ceci peut s'expliquer par un abaissement rapide de la concentration en oxygène dissous de la solution, jusqu'à une valeur d'équilibre maintenue grâce au transfert d'oxygène de la phase gazeuse vers la phase liquide, laquelle serait une fonction décroissante de l'activité enzymatique effectivement présente dans la solution.

Considérons un élément de l'interface oxygène-milieu réactionnel. Le transfert d'oxygène se fait de la phase gazeuse vers la phase liquide et la vitesse du transfert est exprimée par la formule suivante [8] :

$$\left(\frac{d \text{O}_2}{dt} \right)_{\text{transfert}} = K_L \cdot a \cdot (n^* - n) \quad (2)$$

où K_L est le coefficient de facilité de transfert de l'oxygène (dm.mn⁻¹),

a est la surface de contact entre les phases gazeuses et liquides (dm²),

n^* est la concentration de l'oxygène de la phase liquide, en équilibre avec la phase gazeuse considérée (Mole-Litre⁻¹),

n est la concentration de l'oxygène au sein de la phase liquide dans les conditions de la réaction enzymatique (Mole-Litre⁻¹).

Schématiquement la réaction se déroule en deux étapes :

a) une première, très rapide, pendant laquelle la concentration n de l'oxygène dissous dans la solution diminue jusqu'à la valeur d'équilibre et à laquelle correspond une augmentation de la vitesse du transfert d'oxygène.

b) une seconde, pendant laquelle la vitesse de réaction et la concentration de l'oxygène dissous sont constantes dans le temps, qui correspond à la phase « stationnaire » de la réaction et qui dure tant que l'enzyme est saturée en glucose. Cette étape est caractérisée par la relation suivante :

$$\left(\frac{d \text{O}_2}{dt} \right)_{\text{transfert}} = \left(\frac{d \text{O}_2}{dt} \right)_{\text{réaction}} = \text{constante} \quad (3)$$

La combinaison des relations (2) et (3) donne

$$\left(\frac{d \text{O}_2}{dt} \right)_{\text{réaction}} = K_L \cdot a \cdot (n^* - n)$$

$\left(\frac{d \text{O}_2}{dt} \right)_{\text{réaction}}$ est déterminé expérimentalement.

La connaissance de n se ramène donc à celle de $K_L \cdot a$, coefficient global de transfert d'oxygène et n^* , concentration en oxygène dissous de solutions

viennent alignés. Ceci permet de calculer la vitesse de réaction enzymatique à une concentration en glucose oxydase théoriquement infinie en extrapolant les droites obtenues aux ordonnées correspondant à une abscisse nulle. A cette concentration stationnaire en oxygène dissous du milieu réactionnel est supposée nulle. La relation (4) écrite précédemment devient alors :

$$\left(\frac{d O_2}{dt}\right)_{\text{transfert}} = K_{L,a} n^*$$

Cette dernière relation peut être exprimée sous la forme

$$\left(\frac{d O_2}{dt}\right)_{\text{transfert}} = (K_{L,a})' c^*, \text{ ou } c^* \text{ est l'oxygène dissous dans la solution exprimée en pourcentage de saturation.}$$

Dans cette expression $(K_{L,a})'$ a la dimension mole.litre⁻¹.minute⁻¹ et pour chacune des températures choisies c^* est égal à 1 (100 p. cent de saturation). La détermination des valeurs du coefficient $(K_{L,a})'$ est alors immédiate. Les valeurs

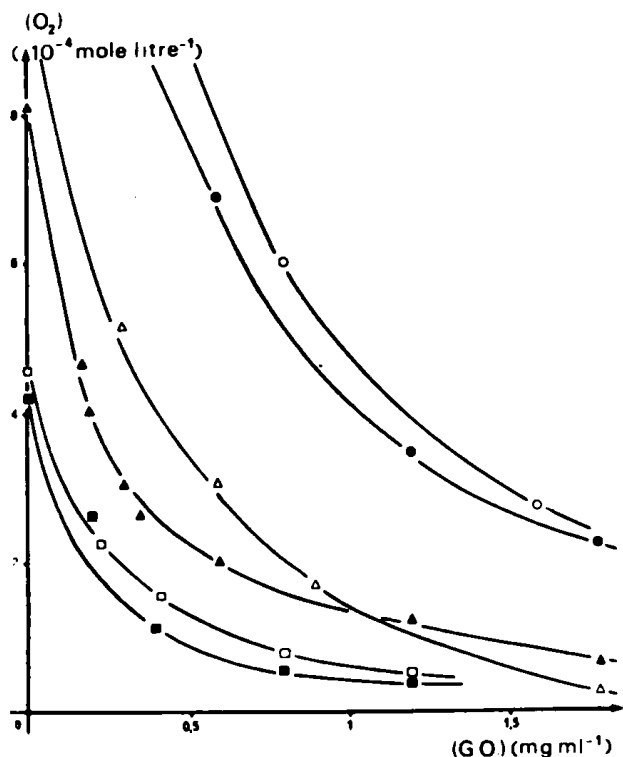


FIG. 2. — Détermination des concentrations en oxygène (n) correspondant à chacun des états d'équilibre. Les points représentés sur la figure ont été calculés à l'aide de la relation (5) :

$$\left(\frac{d O_2}{dt}\right)_{\text{réaction}} = (K_{L,a})' (c^* - c)$$

Températures : 3°C (○—○) ; 12°C (●—●) ;
25°C (△—△) ; 40°C (▲—▲) ;
50°C (□—□) ; 65°C (■—■).

rassemblées dans le tableau II montrent que le coefficient $(K_{L,a})'$ diminue lorsque la température augmente.

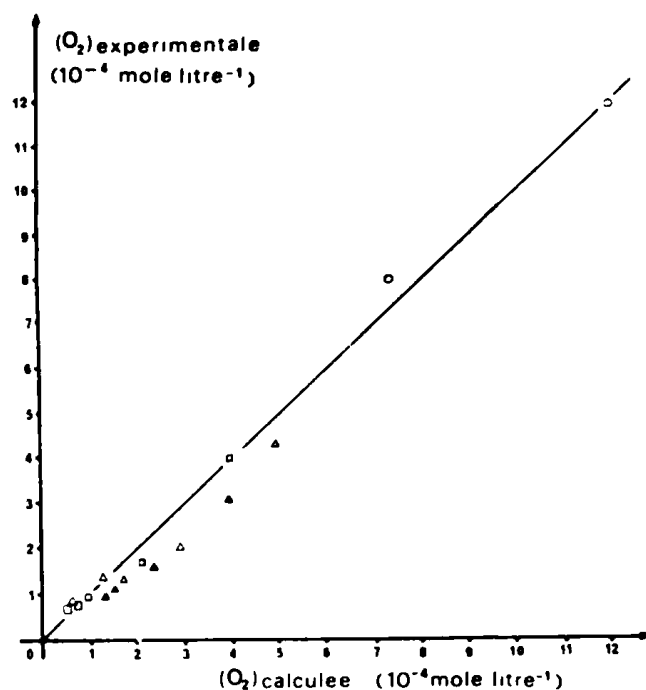


FIG. 3. — Correspondance entre les concentrations d'oxygène dissous calculées et déterminées expérimentalement.

Déterminations expérimentales à l'aide d'une électrode de mesure d'oxygène dissous. Les concentrations calculées sont celles de la figure 2.

Températures : 3°C (○) ; 25°C (△) ; 40°C (▲) ; 50°C (□).

3. Détermination des concentrations en oxygène dissous correspondant à chacun des états d'équilibre.

Les déterminations des activités enzymatiques « stationnaires » $\left(\frac{d O_2}{dt}\right)_{\text{réaction}}$ des concentrations saturantes en oxygène (n^*) des solutions et des coefficients $(K_{L,a})'$ permettent de calculer les concentrations d'oxygène dissous correspondant à chacun des états « stationnaires », à l'aide de la relation (4) mise sous la forme

$$\left(\frac{d O_2}{dt}\right)_{\text{réaction}} = (K_{L,a})' (c^* - c) \quad (5)$$

avec $c^* = 1$ et $c = \frac{n}{n^*}$

La figure 2 indique que pour des concentrations en glucose oxydase de plus en plus élevées, la concentration en oxygène dissous du milieu réactionnel à l'état stationnaire diminue. Ces valeurs

Constante de Michaelis de la glucose oxydase.

ont été comparées avec celles déterminées à l'aide d'une électrode de mesure de la concentration d'oxygène dissous. Pour ces mesures, des solutions de glucose oxydase à diverses concentrations sont préparées (tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 6,6, concentration en glucose 0,2 M). Ces solutions sont initialement saturées en oxygène. On observe une baisse très rapide, puis une stabilisation, de la concentration en oxygène dissous. Les valeurs d'équilibre relevées correspondent aux valeurs données par le calcul (figure 3).

4. Détermination de la constante de Michaelis par rapport à l'oxygène.

A chacun des états d'équilibre caractérisé par une concentration en oxygène dissous, la valeur de l'activité enzymatique est calculée pour une concentration de 0,2 mg.ml⁻¹ de glucose oxydase ; on peut alors porter $\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{S}$ selon

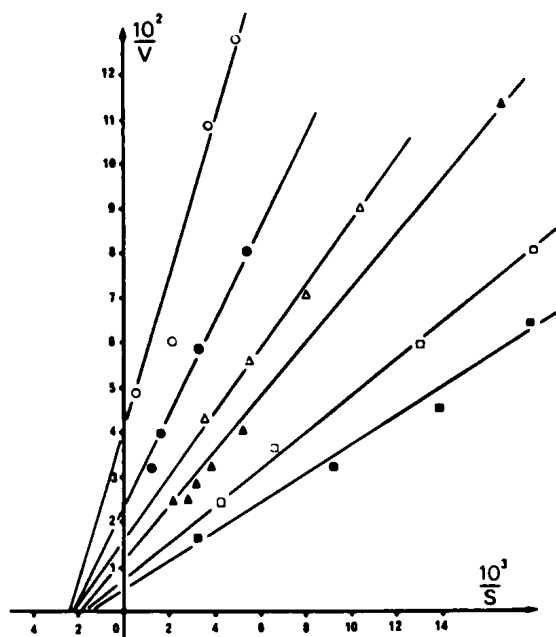


FIG. 4. — Détermination à l'aide de la représentation de Lineweaver et Burk [12] de la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène $K_m(O_2)$.

Tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,6 ; concentration en glucose 0,2 M.

Températures : 3°C (○—○) ; 12°C (●—●) ;
25°C (△—△) ; 40°C (▲—▲) ;
50°C (□—□) ; 65°C (■—■).

Lineweaver et Burk [12]. Les points correspondant aux différentes températures sont alignés (figure 4). La détermination des constantes de Michaelis est immédiate : dans l'intervalle de

température considéré (3°-65°) celles-ci sont voisines de $K_m(O_2) = 5 \cdot 10^{-4}$ M, valeur comparable à celle indiquée par Gibson *et al.* ($2,0 \cdot 10^{-4}$ M) [3]. Ces auteurs ont fait varier la concentration de l'oxygène dans l'atmosphère au-dessus du milieu réactionnel et utilisé l'appareil de Warburg.

La détermination de $K_m(O_2)$ indique la valeur de la concentration en oxygène dissous pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum. Or d'après les données de la figure 2 les valeurs des concentrations en oxygène dissous correspondant à la phase « stationnaire » sont dans la plupart des cas inférieures à la valeur de $K_m(O_2)$: la vitesse de réaction mesurée n'est pas la vitesse de réaction maximum et l'oxygène dissous constitue donc le facteur limitant de la réaction.

*
**

La méthode proposée de détermination de la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène permet de se passer de mesures directes de concentration d'oxygène dissous. Elle peut vraisemblablement aussi être appliquée à d'autres réactions enzymatiques où l'un des substrats provient d'une phase distincte de celle de l'enzyme.

Remerciements.

Les déterminations expérimentales de concentration en oxygène dissous ont été réalisées aux Laboratoires de Recherche Clin-Midy, 34-Montpellier.

RÉSUMÉ.

L'oxydation du β -D-glucose par la glucose oxydase nécessite la présence d'oxygène. Dans des conditions normales celui-ci est présent à faible concentration dans le milieu réactionnel. Des essais montrent que la glucose oxydase n'est plus saturée par l'oxygène au-delà d'une concentration de 0,4 mg.ml⁻¹ en enzyme. Ceci est dû à la diminution de la concentration de l'oxygène au sein de la solution. La valeur des coefficients de facilité de transfert et des concentrations d'oxygène dissous sont déterminées pour chacune des conditions utilisées. Ces dernières sont vérifiées expérimentalement. Ceci permet de trouver la valeur de la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène. Ces essais montrent également que l'oxygène est un facteur limitant de la réaction.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Pazur, J. H., Kleppe, K. & Ball, E. M. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 515-516.
2. Nakamura, S. & Ogura, Y. (1962) *J. Biochem.*, **52**, 214-220.
3. Gibson, Q. H., Swoboda, B. E. D. & Massey, V. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 3927-3934.

J. Boudrant et C. Cheftel.

4. Mitchell, R. E. & Duke, F. R. (1970) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **172**, 129-135.
 5. Boudrant, J., Thèse de Docteur Ingénieur, Montpellier (1979), numéro d'ordre CNRS A.O. 8648.
 6. *Biochemical and Organic Compounds*, Sigma Chemical Company, Catalogue 1974, p. 179.
 7. Kleppe, K. (1966) *Biochemistry*, **5**, 141-143.
 8. Tsao, G. T. (1968) *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 765-785.
 9. Ghosh, A., Janic, V. & Sloviter, H. A. (1970) *Anal. Biochem.*, **38**, 270-276.
 10. Okuda, J., Inoue, T. & Miwa, I. (1971) *Analyst*, **96**, 858-864.
 11. Hodgmann, E. G., Weast, R. C. & Selby, S. M. (1957) *Handbook of Chemistry and Physics*, 39th ed., p. 1607, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, USA.
 12. Lineweaver, M. & Burk, D. (1934) *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658-666.
-

1.2.2 - OXYDATION CONTINUE DU GLUCOSE
EN REACTEUR HOMOGENE

L'oxydation continue du glucose par la glucose oxydase a été étudiée en réacteur continu homogène. Ce type de réacteur permet une régulation de pH et un apport constant d'oxygène par barbotage. La réaction a été réalisée soit à pH constant, soit sans régulation de pH. Une solution de glucose 0,35 M a été utilisée afin de comparer les résultats de ces deux séries d'expériences. En effet il a été préalablement vérifié que sans régulation de pH une solution de glucose à cette concentration peut être oxydée à 100 % par la glucose oxydase. Les autres conditions expérimentales retenues sont les suivantes : 40°C, concentration en glucose oxydase de 0,2 mg/ml. A pH 6,6 l'activité enzymatique est $8 \cdot 10^{-3}$ V moles/min., V étant le volume réactionnel exprimé en litre.

1.2.2.1 - OXYDATIONS CONTINUES

Le système utilisé est celui des expériences continues sans réutilisation d'enzyme précédemment décrit (voir paragraphe 1.1.1, Hydrolyse continue du saccharose par de l'invertase retenue sous forme soluble). En plus de l'alimentation de glucose et de glucose oxydase, une solution d'hydroxyde de sodium (2 N) est ajoutée automatiquement à l'aide d'un pH-stat afin de maintenir le pH constant et égal à 6,6.

De la même manière que précédemment, un bilan de matière effectué sur l'ensemble du réacteur permet d'établir la relation suivante :

$$K \cdot \theta = [G_0] \cdot X \cdot (1 - \beta X)$$

où K est la constante de vitesse de réaction,

G_0 est la concentration initiale du glucose,

θ est le temps de résidence,

et X est le taux de conversion.

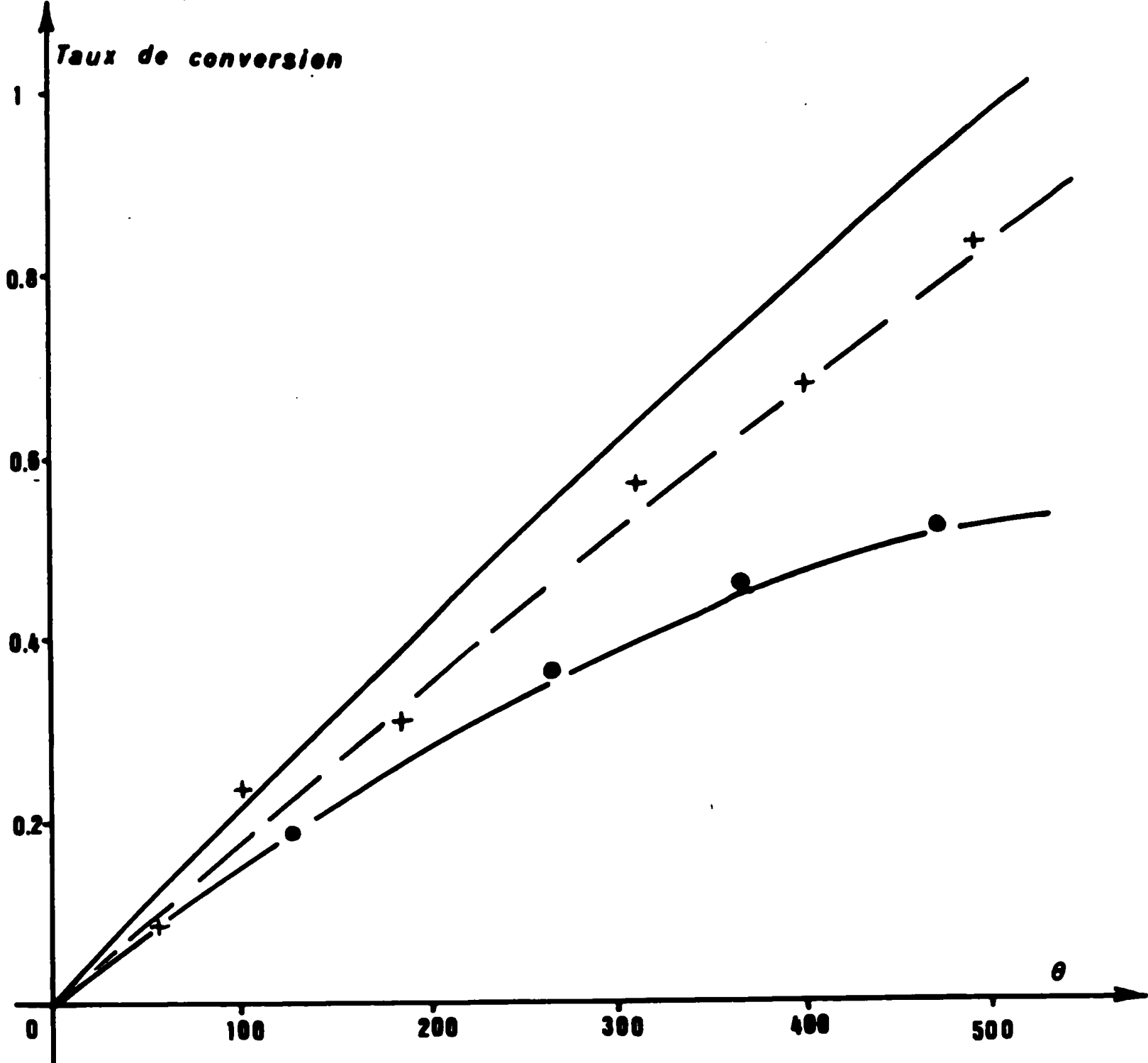


FIGURE 1

Représentation du taux d'oxydation continue du glucose en fonction du temps de résidence θ .

Concentration de glucose oxydase : $0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$, tampon phosphate de potassium $0,01 \text{ M}$, pH 6,7.

La courbe (—) répond à l'équation $8 \cdot 10^{-4} \theta = 0,35 X (1 + 0,175 X)$

(+) : points expérimentaux, le pH étant maintenu à 6,6.

(•) : points expérimentaux, le pH n'étant pas maintenu.

02

Cette relation tient compte du fait que le volume du réacteur maintenu constant entraîne une dilution du milieu initial dans le rapport $\frac{1}{1 + \beta X}$, β étant le rapport des molarités des solutions initiales de glucose et d'hydroxyde de sodium.

La figure 1 compare les résultats expérimentaux à la théorie. La courbe en trait continu est la courbe théorique répondant à l'équation :

$$8.10^{-4} \theta = 0,35 X (1 + 0,175 X)$$

Les résultats expérimentaux sont proches de ceux calculés théoriquement : en effet les points obtenus s'alignent sur une droite de pente légèrement inférieure à la courbe théorique. Ces résultats montrent également que le temps de résidence de la solution dans le réacteur, pour avoir un taux de conversion proche de 95 %, est long et proche de 500 minutes. Ainsi qu'il a été vu précédemment, une augmentation de la concentration en glucose oxydase ne provoquerait pas une augmentation de l'activité enzymatique suffisante afin de diminuer le temps de résidence.

Des oxydations continues ont été réalisées le pH n'étant pas maintenu constant, et ceci avec les mêmes conditions expérimentales. La figure 1 rassemble également les résultats. Ceux-ci comparés aux précédents montrent que les taux de conversion mesurés en sortie de réacteur sont inférieurs. Ceci n'est pas étonnant dans la mesure où l'acide gluconique formé au dépend du glucose diminue le pH de la solution initialement à pH 6,6 (optimum d'activité enzymatique de la glucose oxydase).

CONCLUSION

Ainsi afin d'oxyder à 95 % une solution de glucose 0,35 M (6,5 %, P/V) à 40°C, la concentration en glucose oxydase étant 0,2 mg.ml⁻¹, un temps de résidence de l'ordre de 500 minutes est nécessaire. Afin d'oxyder une solution 2 M (36 %), le calcul montre qu'il faudrait un temps de résidence de 30.000 minutes environ (500 heures). A l'appui de ces résultats il semble donc que ce type de réaction se prête mal à une opération continue conforme aux exigences industrielles : ceci est dû à ce que ce type d'enzyme nécessite deux substrats dont l'un est en concentration faible dans le milieu réactionnel. Bien qu'ayant immobilisé cette enzyme de façon covalente sur du verre poreux spherosyl XOC 005 provenant de Rhône-Progil (Neuilley), diamètre moyen des pores 3000 Å, surface 10 m²/g, volume poreux 1 cm³/g, granulométrie 100-200 microns) en suivant la méthode mise au point par CAILLEAU (1974) - silanisation avec du γ -aminopropyltriéthoxysilane puis activation au glutaraldéhyde - les essais en continu avec ce support enzymatiquement actif n'ont pas été réalisés. Les rendements de fixation et d'activité étaient cependant de 40 % et 11 % et l'activité stable pendant 1 mois à 22°C. Nous avons préféré utiliser cette enzyme à des fins analytiques pour le dosage du glucose, et couplée avec de l'invertase pour le dosage du saccharose.

Ces études ont été réalisées par LOUSSAN (1973) en utilisant le principe de l'électrode à enzymes (GUILBAULT, 1972) le système utilisé lors de cette étude était celui précédemment étudié par CANH et al. (1972), dans lequel une mesure de la variation de potentiel électrochimique est effectuée à l'aide d'une électrode de verre à l'extrémité de laquelle est appliquée une membrane enzymatiquement active (AVRAMEAS et al., 1968). Les résultats ont montré que la zone de linéarité entre la différence de potentiel mesurée et le logarithme de la concentration en glucose est étroite ($3 \cdot 10^{-3}$ M à 10^{-2} M). Cette zone est en effet limitée dans sa partie supérieure par la valeur de la constante de Michaelis de l'enzyme (en effet la cinétique de la réaction doit alors être de premier ordre par rapport à la concentration en substrat) et dans sa partie inférieure par l'importance des phénomènes de diffusion dans la membrane (CANH et al., 1972). Les résultats ont d'autre part montré la difficulté de reproductibilité des mesures d'une membrane à une autre.

CHAPITRE 2

REACTEURS TUBULAIRES

2.1 - REACTEURS TUBULAIRES AVEC RETENTION D'ENZYME PAR ADSORPTION

Un des procédés les plus simples d'immobilisation des enzymes consiste en leur adsorption sur un support insoluble. Dans ce cas, il est nécessaire de trouver un adsorbant convenable ayant une affinité élevée pour l'enzyme (GOLDMAN et al., 1971). Une telle démarche, si elle est souvent hasardeuse, peut néanmoins faire appel à la bibliographie afin de connaître les divers supports adsorbants efficaces, utilisés lors de la purification de l'enzyme que l'on désire immobiliser par ce procédé.

Dans l'étude qui suit, nous avons choisi comme supports adsorbants des résines échangeuses d'ions dont on sait que le caractère de polyélectrolyte peut renforcer les liaisons d'adsorption purement physique entre enzyme et support. En effet l'adsorption d'enzymes par des résines échangeuses d'ions a déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux et dans quelques cas les auteurs de ces travaux ont observé la conservation de l'activité enzymatique à l'état adsorbé (MITZ, 1956 - BARNETT et BULL, 1959 - MITZ et SCHLUETER, 1959 - MIYAMOTO et al., 1972) ainsi que la stabilité de cette adsorption (MIYAMOTO et al., 1971 - SUZUKI et al., 1966 - EMERY et al., 1974 - SOLOMON et LEVIN, 1974).

2.1.1 - HYDROLYSE CONTINUE DU SACCHAROSE

Deux préparations d'invertase, l'une purifiée et l'autre pour usage industriel, ont été immobilisées sur une phase insoluble adaptée au fonctionnement en réacteur tubulaire : pour cela les enzymes ont été adsorbées sur des résines échangeuses d'ions de type Amberlite. Les particules enzymatiquement actives obtenues ont été utilisées dans un réacteur tubulaire à lit fixe. La littérature contient de nombreux essais de fixation de l'invertase sur des supports insolubles. Les méthodes utilisées sont variées : adsorption physique (NELSON, 1933 - FISHER et KOHTES, 1951 - REESE et MANDELS, 1958 - ARNOLD, 1966 - VIETH et al., 1972), formation de liaison covalente (FILIPPUSON et HORNBY, 1970 - MONSAN et DURAND, 1971 - MASON et WEETALL, 1972), soit par inclusion dans des gels d'acide tannique (NEGORO, 1970) ou d'acrylamide (MAEDA et al., 1973 - USAMI et KURATSU, 1973) ou dans des fibres (MARCONI et al., 1974). Signalons également que des cellules entières de Saccharomyces pastorianus ont été réticulées dans des billes d'agar et utilisées en continu dans un lit fluidisé pour l'inversion du saccharose (TODA et SHODA, 1975).

2.1.1.1 - ESSAIS AVEC UNE INVERTASE POUR USAGES BIOCHIMIQUES

BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING,
VOL. XVII, PAGES 827-844 (1975)

**Continuous Hydrolysis of Sucrose by Invertase
Adsorbed in a Tubular Reactor***

JOSEPH BOUDRANT and CLAUDE CHEFTEL, *Laboratoire
de Biochimie et Technologie Alimentaires, Université des Sciences et
Techniques, 34060 Montpellier, France*

Summary

Studies were made of invertase adsorption on Amberlite ion exchange resins. Up to 4000 units of adsorbed enzymatic activity (aea) were obtained per g of IRA 93 resin; for an aea of 1600 units, the maximum ratio of aea over units of soluble enzyme used for adsorption was close to 50%. No desorption occurred during extensive washing at 30°C with 0.01M sodium acetate buffer at pH 5. Progressive desorption of aea from the invertase-IRA 93 complex occurred when buffer molarity and temperature were increased. Desorption differed only slightly when the buffer pH was 3 or 5. The optimum pH of aea was 3.2 with IRA 93 resin, and varied between 3.2 and 5.1 with other resins, depending on their anionic or cationic nature. Batch hydrolysis of sucrose by IRA 93-adsorbed invertase followed 1st order kinetics with respect to the substrate concentration, as in the case of soluble invertase.

Continuous sucrose hydrolysis with IRA 93-adsorbed invertase was performed in a tubular reactor, and the percent conversion was experimentally determined as a function of the flow rate. The reaction was carried out for 8 days with a 50% (w/v) sucrose solution, at pH 4 and 30°C; at the selected flow rate, the ratio of sucrose hydrolysis remained constant and close to 76%. This shows that invertase was not desorbed from the tubular reactor. Some continuous hydrolyses were performed with an industrial sucrose solution: enzymatic activity seemed to be stable for an extended period for time (1 month) at 30°C and pH 3 or 4.

INTRODUCTION

Sucrose hydrolysis by yeast invertase has been selected as an enzymatic model reaction of industrial interest, and studies in a system permitting continuous substrate hydrolysis by a given amount of continuously reutilized adsorbed enzyme.

A previous paper described a system based on an ultrafiltration membrane reactor.¹

* This paper was presented in part at the International Symposium on Insolubilized Enzymes, Milan, Italy, June 15 and 16, 1973.

BOUDRANT AND CHEFTEL

The system described in the present paper consists of a tubular flow reactor packed with an Amberlite ion exchange resin. Invertase is adsorbed on the resin before being introduced into the column reactor.

Conditions of enzyme adsorption and desorption are described together with the characteristics of the adsorbed enzymatic activity. Continuous substrate hydrolysis of industrial sucrose solutions has been performed for up to one month without loss of enzymatic activity.

Previous studies by other investigators have shown that it is possible to immobilize invertase by adsorption on different supports such as aluminum hydroxide² and DEAE-cellulose.³ Generally desorption is not negligible when high salt concentrations are used, but Usami et al.⁴ found an insoluble complex of invertase adsorbed on DEAE-cellulose to be stable. Adsorption processes may, therefore, be of particular interest when suitable adsorbents with a high affinity for an enzyme can be obtained.⁵

The fixation of invertase by covalent linkage,⁶⁻⁸ by coprecipitation with tannic acid,⁹ and by electrocodeposition on collagen¹⁰ has also been reported.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Yeast invertase (freeze-dried extract) and sucrose (biochemical grade) were obtained from Merck, Darmstadt. Continuous hydrolysis experiments were performed either with pure grade sucrose from Merck, or industrial "Clairee" syrup from "La Générale Sucrière," Marseille, France.

Amberlite resins were obtained from Rohm and Haas, Philadelphia. They are made of polystyrene reticulated with divinylbenzene. According to the manufacturer, there are porous versions with an average pore diameter of 1300 Å, and gel versions. Sepharose 6B was from Pharmacia, Uppsala.

Equipment

Batch hydrolysis experiments were done in a jacketted 50 ml Radiometer cell with stirrer. Continuous hydrolysis was performed in a K 9/30 Pharmacia chromatographic column with a jacket added. Sucrose solutions were brought to the column temperature before

ADSORBED INVERTASE TUBULAR REACTOR

entering the column. The column packed bed consisted of 6 g of Amberlite resin with adsorbed invertase. The flow rate of sucrose solutions varied over 3, 8, and 50 ml/min, corresponding to a residence time of 0.15 to 2 min. A Sigma motor peristaltic pump was used.

The ratio of hydrolysis was evaluated at the end of the column when a steady state was established (generally after an outflow of 100 ml of solution, i.e., about 13 reactor volumes).

Methods

Analytical methods

Sucrose hydrolysis was carried out in 0.01M sodium acetate buffer, and was evaluated by measuring reducing sugars liberated, according to the method of Fisher and Kohtes.²

For kinetic studies, sucrose hydrolysis, by free or adsorbed invertase, was stopped by adding 0.01M sodium hydroxide solution and cooling to 0°C. In order to evaluate the enzymatic activity as the initial rate of sucrose hydrolysis (μmol of sucrose hydrolyzed per min in the experimental conditions adopted) the hydrolysis curve was plotted and the slope value measured at the origin.

In order to determine amounts of invertase in solutions, 275 nm absorbances were measured: the preparation of invertase used has one absorption peak at this wavelength. The purity of the preparation was verified by gel filtration on Sepharose 6 B: the absorbance at 275 nm, evaluated on the different eluate fractions correlated well with the enzymatic activity.

Adsorption methods

The resins were first washed with distilled water, then equilibrated in a 0.01M sodium acetate buffer. The buffer pH's were 5 for the anionic resins and 4 for the cationic resins. After filtration the resins were vacuum dried (17.5 mmHg) and invertase was adsorbed from solutions in the sodium acetate buffers mentioned previously (2 ml per g of resin). Adsorption was carried out at 4°C for 12 hr. The resins were then washed with the corresponding sodium acetate buffers (20 ml per g of resin at 20°C with stirring for 30 min). Washing was continued until the buffer gave no absorbance reading at 275 nm. The absorbance at 275 nm of the total washings gave an indication of the unadsorbed invertase, since the invertase preparation appeared pure when gel filtered on Sepharose 6 B.

BOUDRANT AND CHEFTEL

RESULTS AND DISCUSSION

Adsorption Conditions

Adsorption on the macroreticular anionic IRA 93 Amberlite resin was studied as a function of pH and of adsorption time. Preliminary experiments showed that contact with this resin did not bring about sucrose hydrolysis.

Adsorption pH

Several resin samples were equilibrated at pH values between 4 and 6.4. Adsorption was performed according to the procedure described above (see Materials and Methods). The quantity of enzyme used was 40 mg per g of resin.

The results showed that about 56% of the enzyme was retained after washing, when the pH was equal to or greater than 5, and 50% was retained when the pH was below 4.5. An ionic attraction phenomenon seems to be added to the physical adsorption phenomenon. In fact the isoelectric point of invertase¹¹ is at pH 4.5 and at a higher pH, the electric charges of the invertase and of the resin are opposed. Conversely at a lower pH, both resin and enzyme have similar electric charges.

Later in this study, adsorption pH's were chosen so that the charges on enzyme and resins were opposed, pH 4 for cationic resins and pH 5 for anionic resins.

Adsorption time

The kinetics of adsorption were evaluated with the same IRA 93 resin. The adsorption pH was 5 and the quantity of invertase used was 30 mg per g of resin.

The results show that 50% of the adsorbed enzyme was fixed after 30 min. Adsorption appeared to be rapid. This agrees with the observations of Usami et al.⁴ However 10 hr contact time was necessary to obtain maximum enzyme fixation. An adsorption time of 12 hr was chosen for the continuation of this study.

Yield of Adsorbed Enzyme Activity

For each resin the overall yield of adsorbed enzymatic activity is defined as the percent of the enzymatic activity immobilized on the resin, measured at its optimum pH (see above) in comparison to the enzymatic activity of the total amount of invertase used for the adsorption, measured at pH 4.5.

ADSORBED INVERTASE TUBULAR REACTOR

The important factor is the yield of enzymatic activity conserved on the resin and not the invertase adsorption yield. The former is the product of two ratios:

$$\frac{\text{quantity of adsorbed invertase}}{\text{quantity of used invertase}} \times \frac{\text{enzymatic activity of adsorbed invertase}}{\text{enzymatic activity of the same free quantity of invertase}}$$

Results obtained with the different supports are shown in Table I. During adsorption each resin had an opposite electric charge to that of the invertase but IRC 80 resin, which is weakly acidic, is not charged at pH 4 because its pK is equal to 6.1. The pK values of the weakly basic resins (IR 45, IRA 93), are greater than 7, so they are positively charged at pH 5.

The results show that an important fraction of the enzymatic activity (10–50%) was adsorbed on the resins. The yield of adsorbed enzyme activity on the IRC 50 resin (28%) shows that adsorption is not only due to the attraction between opposed electrostatic charges.

Table I also shows that macroreticular resins have a greater yield of enzymatic activity than "gel" type resins. This difference is

TABLE I
Invertase Adsorption on Ion Exchange Amberlite Resins^a

Resin type	Amberlite resin denomination	Functional group	Adsorption pH used	Yield of adsorbed enzymatic activity (%)
Gel	IR 120	sulfonic	4	21
	IRC 50	carboxylic	4	28
	IRA 410	quaternary amine	5	13
	IR 45	tertiary amine	5	20
Macroreticular	200	sulfonic	4	32
	IRA 900	quaternary amine	5	53
	IRA 93	tertiary amine	5	50

^a Overall yield of adsorbed enzymatic activity was measured in a 10% sucrose solution, sodium acetate buffer, 0.01M; 22°C; contact period 12 hr (4°C); 2 ml of a 1.5 mg/ml solution per g of resin.

BOUDRANT AND CHEFTEL

probably due to the porous structure of these resins, so that invertase adsorption is higher.

The yield of invertase adsorption

$$\frac{\text{quantity of adsorbed invertase}}{\text{quantity of invertase used}}$$

was studied as a function of the invertase concentration used during adsorption. Macroreticular Amberlite resins IRA 93, IRA 900 (cationic) and 200 (anionic) were used for this study. Adsorption was performed with invertase solutions of increasing concentrations so that the ratio mg invertase per g resin varied between 3 and 60.

After adsorption, the resin was washed as previously indicated. The results show that about 83% and 87% of invertase was desorbed when adsorption assays were done with IRA 900 and 200 resins, respectively, and about 42% desorbed when assays were done with IRA 93 resin. So the adsorption capacity of this last resin appears to be higher.

After washing, the resin enzymatic activity was measured. Figure 1 shows this activity as a function of the ratio (mg invertase)/(g resin).

The maximum activity was obtained with IRA 93 resin, for a ratio (mg invertase)/(g resin) equal or greater than 40. With IRA 900

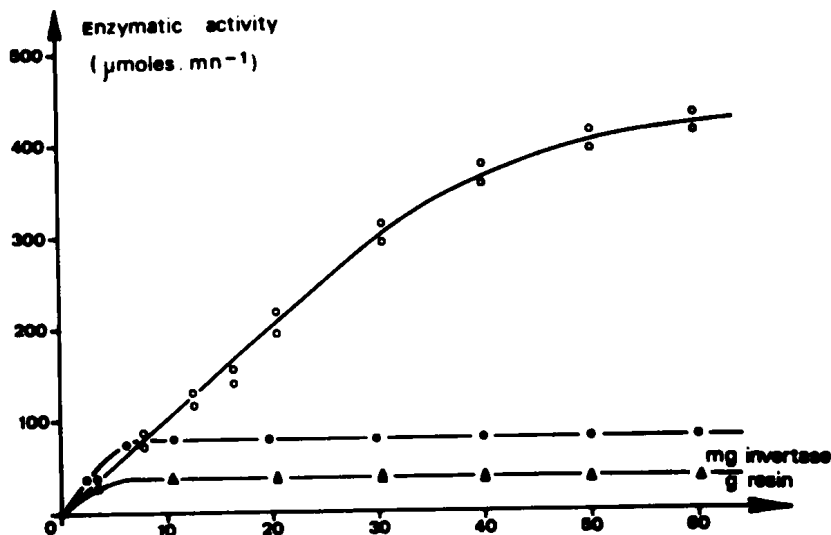


Fig. 1. Activities of macroreticular Amberlite resin-invertase complexes as a function of the quantity of invertase used for adsorption. Activities are measured with 0.1 g of resin in 50 ml of a 10% sucrose solution; 0.01M sodium acetate buffer, pH 4; 22°C; Amberlite resin IRA 93 (○), IRA 900 (●), and 200 (▲).

ADSORBED INVERTASE TUBULAR REACTOR

and 200 resins the maximum activities were obtained at ratios 8 and 5, respectively.

Properties of Adsorbed Invertase

Batch sucrose hydrolysis experiments were done in order to study the properties of the different invertase-resin complexes.

Stability of invertase adsorption as a function of ionic strength and pH

First the adsorbed enzyme activities on IRA 93, IRA 900, and 200 resins were verified to be constant after a further washing in 0.01M sodium acetate buffer at pH 4. Then desorption of adsorbed invertase from macroreticular resins was measured as a function of the molarity and pH of washing solutions.

Table II shows the enzymatic activities remaining after washing. The washing was continued until desorption ceased, as measured by absorbance at 275 nm. These results show that protein desorption from an ionic support is significant. Similar observations were made by Lilly et al.¹² However desorption seemed to be more dependent on salt concentration than on pH.

pH dependence of the adsorbed invertase activity

The results, indicated in Figure 2, show a shift of the optimum pH of the adsorbed enzyme in comparison to that of the free enzyme.

TABLE II
Invertase Desorption as a Function of Molarity and pH; Temperature 22°C*

	Resin Amberlite type											
	IRA 93				IRA 900				200			
Sodium acetate buffer molarity	0.1	1			0.1	1			0.1	1		
pH	3	5.9	2.4	6.3	3	5.9	2.4	6.3	3	5.8	2.4	6.3
Activity remaining on the resin (%)	85	85	55	43	90	84	73	63	92	93	75	64

* Conservation of activity is evaluated by comparison with activity measured before desorption.

BOUDRANT AND CHEFTEL

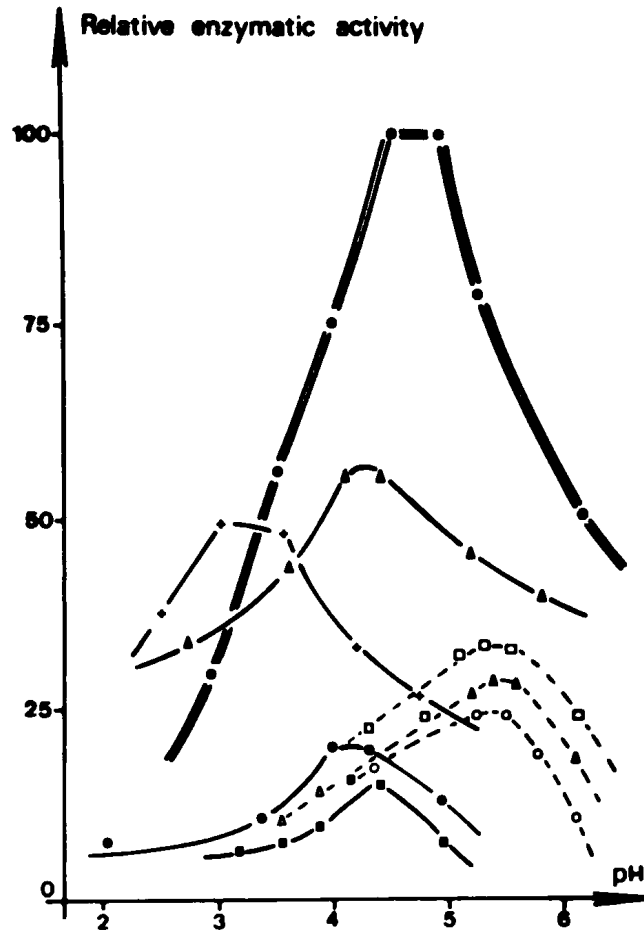


Fig. 2. pH dependence curves for different Amberlite resins-invertase complexes. Sodium acetate buffer 0.01M; pH adjusted either with sodium hydroxide or with hydrochloric acid solutions; 22°C. Free invertase(○). Invertase-resins complexes: IRA 93 (+), IRA 900 (▲), IRA 45 (●), IRA 410 (■), 200 (□), IRA 50 (△), IRA 120 (○).

Similar results were already obtained by Katchalski et al.¹³ and Suzuki et al.³ This shift may be due to a pH difference between the solution and the close proximity of the resins.

Figure 2 also shows that optimum pH's of cationic resin-invertase complexes are shifted toward more basic pH's (0.5 to 1 unit); on the other hand, the pH optimum of anionic resin-invertase complexes is shifted towards a more acidic pH (0.5 to 1.5 units).

This phenomenon is well known. Goldstein et al.¹⁴ have shown that it is due to a different distribution of hydrogen and hydroxyl ions between the "ionic phase" (on which the enzyme is immobilized) and

ADSORBED INVERTASE TUBULAR REACTOR

the external solution. This phenomenon is also responsible for the modifications of the pH dependence curves. Thus, if the pH of an ionic support cannot be measured directly it can be deduced by comparing the pH optima of the free and fixed enzymes.

The influence of buffer molarity on the optimum pH shift of the IRA 93 resin-invertase complex was also investigated. Figure 3 shows that there is no shift attenuation with increasing buffer molarity. Such an attenuation has been noticed by Goldstein et al.¹⁴ using an ethylene-maleic acid copolymer-trypsin complex. In this case, the synthetic substrate distribution between the insoluble phase and the solution is a function of the ionic strength. Goldstein et al.¹⁴ used the ion distribution law of Maxwell-Boltzmann in order to explain this phenomenon. In our experiments, sucrose and the reaction products have no electric charges. Figure 3 also indicates the existence of an optimal molarity of the sodium acetate buffer (0.1M) for the enzymatic activity. This phenomenon is not explained, but it should be noted that under the present experimental conditions (reaction time, 6 min) desorption is negligible: otherwise a change in the optimum pH would be observed. Moreover, enzymatic activity of free invertase at pH 4-5 was shown to decrease by 15% and 22%

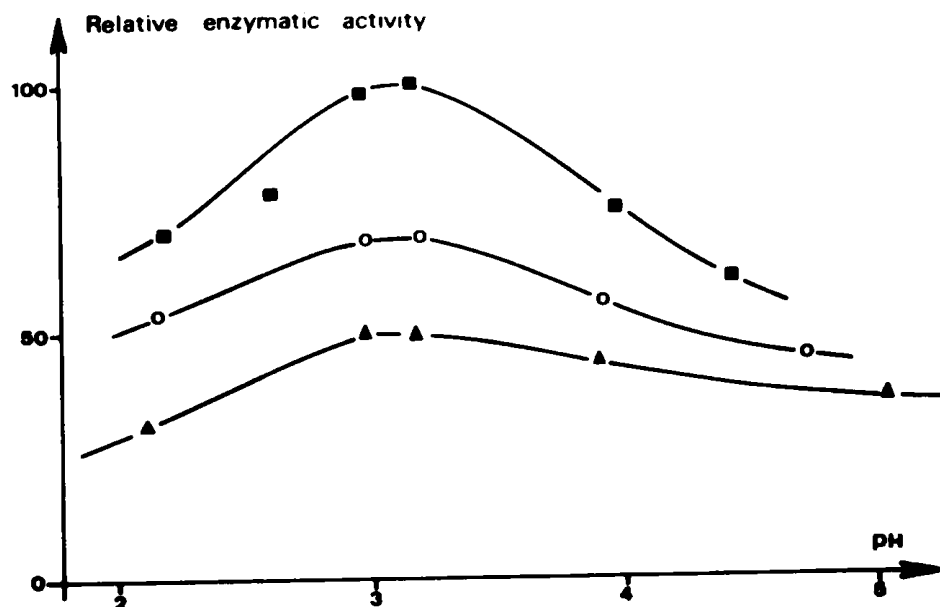


Fig. 3. Influence of buffer molarity on the pH activity curve of the IRA 93 resin-invertase complex. Sodium acetate buffer 0.01M (○), 0.1M (■), 1M (▲): 22°C.

BOUDRANT AND CHEFTEL

when buffer molarity was raised from 0.01M to 0.1M and 1M, respectively.

Influence of temperature on the adsorbed invertase activity

The influence of temperature on the enzymatic activity of the IRA 93 resin-invertase complex was studied in 0.01M pH 4 sodium acetate buffer-60% sucrose solution. Preliminary experiments showed negligible acid hydrolysis of sucrose at this pH compared with the enzymatic hydrolysis (about 1%).

The results are shown in Figure 4. An optimum activity temperature shift of about 10°C and a modification of the temperature dependence curve were observed. Immobilized enzymatic activity is less thermoactivated than free enzymatic activity. The immobilization procedure could provoke a diminution of the relative thermal agitations (invertase-sucrose). In the descending part of the curve, the adsorbed enzymatic activity seems to be more thermosensitive than free enzymatic activity. But high temperatures could result in invertase desorption.

In order to verify if the shift in the optimum activity temperature is connected to an increase in thermal stability, the IRA 93 resin-invertase complex was incubated at different temperatures for 8 hr in

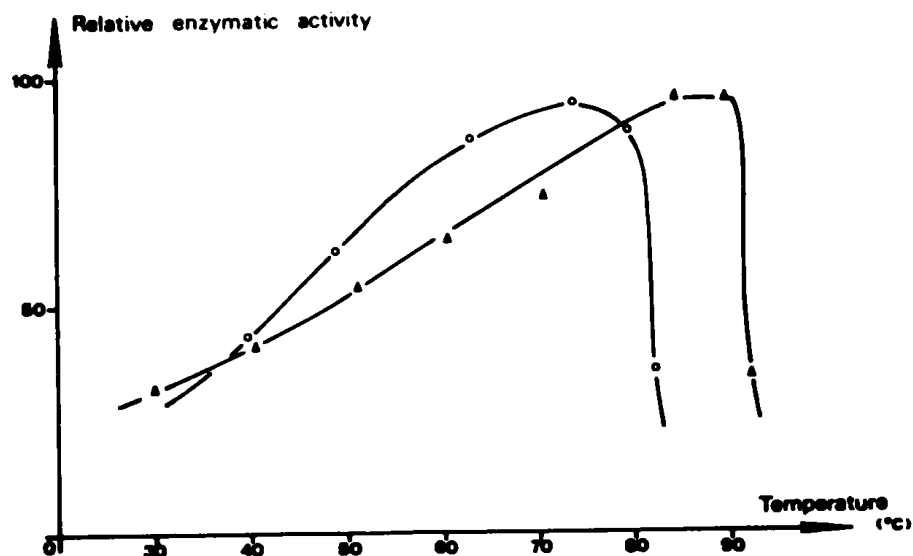


Fig. 4. Temperature influence on the enzymatic activity of IRA 93 resin-invertase complex. Sucrose concentration 60%; 22°C. Free invertase: (O); 0.01M, pH 4.5 sodium acetate buffer. Adsorbed invertase: (▲); 0.01M, pH 4.5 sodium acetate buffer.

ADSORBED INVERTASE TUBULAR REACTOR

0.01M pH 4 sodium acetate buffer. It is known that the covalent fixation of enzymes on an insoluble support can result in stabilization against thermal denaturation.⁵ After incubation, the resin was filtered and its activity measured: Figure 5 shows that the adsorbed activity seems to be stable at 30°C for 8 hr. At higher temperatures loss of activity was observed. This activity decreases linearly with time and increases with temperature: thus inactivation was nearly complete after 8 hr at 50°C. Because of the thermal stability of free invertase under such conditions,¹ higher temperatures probably result in invertase desorption from the resin. Further incubation in the same buffer at 30°C, for 8 days did not decrease enzymatic activity of the IRA 93 resin-invertase complex. This temperature was chosen for the experiments with the continuous tubular reactor (see below).

Influence of the initial sucrose concentration on the adsorbed invertase enzymatic activity

The initial velocity of sucrose hydrolysis was determined as a function of the initial sucrose concentration in a volume of 50 ml with 0.5 g enzymatically active resin at 30°C. A shift in optimum activity

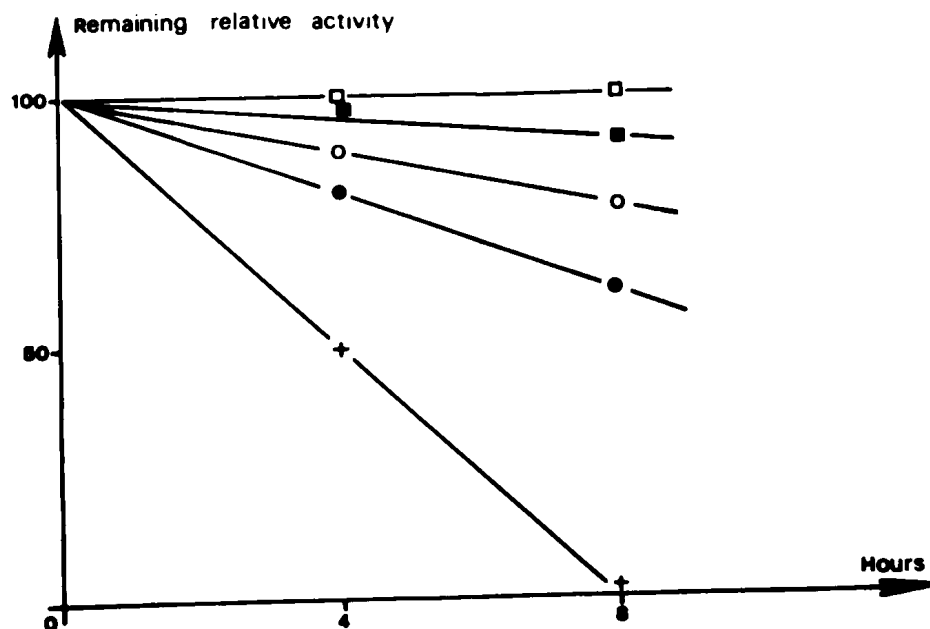


Fig. 5. Desorption of invertase adsorbed on IRA 93 resin as a function of both time and temperature. 0.01M, pH 4 sodium acetate buffer. Temperatures: 30°C (□), 35°C (■), 40°C (○), 45°C (●), 50°C (+).

BOUDRANT AND CHEFTEL

of the immobilized enzyme (15% sucrose, w/v) compared to that of the free invertase (10% sucrose, w/v) was observed. At larger sucrose concentrations the relative enzymatic activity of the adsorbed invertase was more sucrose dependent than that of free invertase. This may be due to a decrease of the sucrose concentration at the resin surface because of the localized enzymatic activity. The substrate cannot be renewed immediately, therefore, the existence of a stationary layer could significantly influence sucrose transfer at the enzymatically active support.

Reaction kinetics

As Figure 6 shows, sucrose hydrolysis with adsorbed invertase was first order with respect to substrate concentration. Adsorption does not seem to change the hydrolysis kinetics.¹ This compares favorably with observations by Vieth et al.,¹⁵ sucrose hydrolysis with invertase fixed on collagen was also first order. Figure 6 also shows that the straight lines obtained experimentally do not pass through the origin: a lag period is necessary in order to start the reaction. This period increases with the substrate concentration. Access of sucrose to the active site of the adsorbed enzyme becomes more difficult with increasing viscosity of the solution.

Continuous Hydrolysis in a Tubular Reactor

In the system used invertase was immobilized by adsorption on the IRA 93 Amberlite resin, which was then placed in a tubular reactor. The substrate solution was continuously fed in by means of a peristaltic pump. This system was initially used by Bar Eli and Katchalski¹⁶ and Lilly et al.¹⁷ Sucrose hydrolysis in dilute solutions with immobilized invertase has been studied by Monsan.¹⁸ More recently Gelf et al.¹⁹ have studied, with the help of numerical analysis, the variations of the apparent kinetic constants of an immobilized enzyme in this type of reactor.

Continuous hydrolysis

With a mass balance performed on an element of the reactor and integrated over the whole volume it is possible to relate mathematically the ratio of hydrolysis and the residence time of the solution in the reactor. For a first order reaction, the calculation gives the following relationship:²⁰

$$\ln \frac{1}{1-x} = K\theta$$

ADSORBED INVERTASE TUBULAR REACTOR

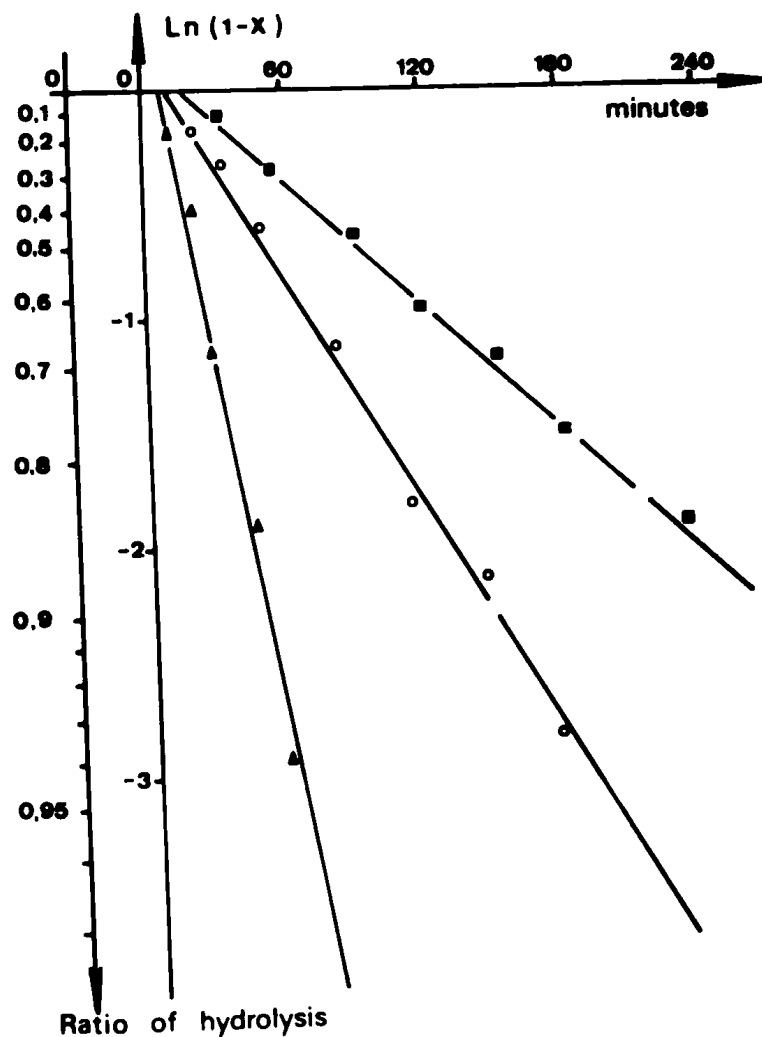


Fig. 6. Kinetics of sucrose hydrolysis by the IRA 93 resin-invertase complex. Quantity of resin used 1 g; reaction volume 50 ml; 0.01M, pH 4 sodium acetate buffer; 30°C. Sucrose concentration 10%, mg invertase/g resin = 5: (▲). Sucrose concentration 30%, mg invertase/g resin = 10: (○). Sucrose concentration 50%, mg invertase/g resin = 20: (■).

where θ = residence time of the solution in the reactor and x = ratio of hydrolysis.

Two series of experiments were performed, at two different enzyme concentrations.

In the first series, the quantity of invertase used for the adsorption procedure was 3 mg per g of resin, and the sucrose concentrations used for continuous hydrolysis were 10% and 20%. In the

BOUDRANT AND CHEFTEL

second series, 40 mg of invertase per g of resin were used for the adsorption procedure, and the sucrose concentrations used for continuous hydrolysis were 40% and 50%. In both cases, ratios of hydrolysis at the reactor outlet were measured as a function of the residence time.

The following two observations can be made.

1) The curves do not pass through the axis origin (Figs. 7 and 8): there is therefore a lower limit of residence time of the solution in the reactor under which the enzymatic activity would be zero. This lower limit appears to increase with the sucrose concentration. These results correspond to the lag periods observed with batch hydrolysis (see above).

2) Figure 8 shows that the variation of $\ln [1/(1-x)]$ as a function of residence time is nonlinear. The slopes of the curves are greater

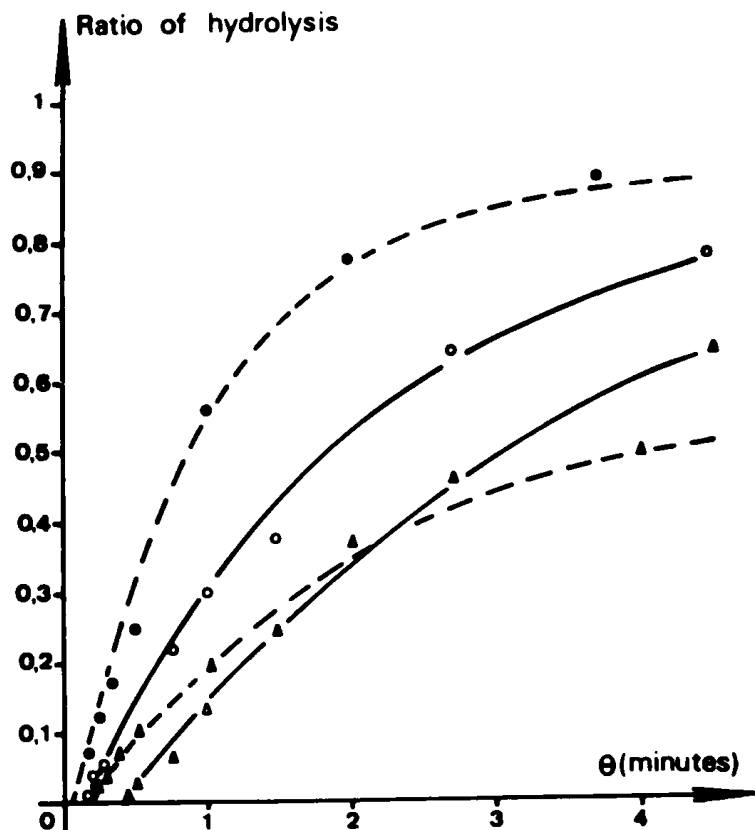


Fig. 7. Continuous hydrolysis of sucrose solutions by IRA 93 resin-invertase complex packed in a tubular reactor; ratio of hydrolysis variation as a function of the residence time. 0.01M, pH 4 sodium acetate buffer; 30°C. mg invertase/g resin = 3, sucrose concentration: 10% (●) and 20% (▲). mg invertase/g resin = 40, sucrose concentration: 40% (○) and 50% (△).

ADSORBED INVERTASE TUBULAR REACTOR

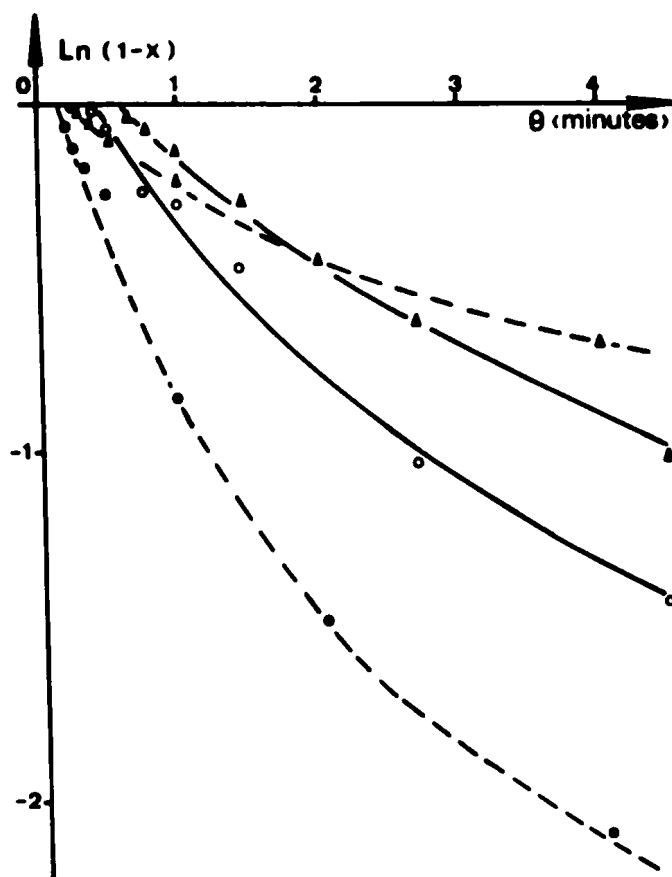


Fig. 8. Continuous hydrolysis of sucrose solutions by IRA 93 resin-invertase complex packed in a tubular reactor; plotting of $\ln(1-x)$ as a function of the residence time (x is ratio of hydrolysis). The plotted values are from Fig. 7. 0.01M, pH 4 sodium acetate buffer; 30°C. mg invertase/g resin = 3, sucrose concentration 10% (●) and 20% (▲). mg invertase/g resin = 40, sucrose concentration 40% (○) and 50% (△).

for short residence times (high flow rates) than they are for long residence times (low flow rates). This phenomenon is probably dependent on the catalysis type which is, in this case, heterogeneous: sucrose mass transfer to the enzyme would be more efficient at high flow rates than at low flow rates.

The explanation of this phenomenon is complex and related to the effects of convection, diffusion, and reaction phenomena at the support surface. It is most probable that the effects of each of these factors upon the overall reaction is a function of the circulation feature of the solution in the reactor. This feature is in fact related to the solution viscosity and its interstitial speed close to the enzymatically active support. Similar studies have been performed by Kobayashi

BOUDRANT AND CHEFTEL

and Moo-Young²¹ using dilute solutions (Michaelian kinetics). It may be noted that some investigators²² explain the same phenomenon in terms of the influence of electrostatic effects on the kinetic modifications of immobilized enzymes.

Extended use of the tubular reactor

Continuous hydrolysis of a 50% (w/v) sucrose solution was carried out over a long period of time. The invertase quantity used for adsorption was 40 mg per g of resin. The packed bed of the column was made of 6 g of resin. The flow rate of the 50% sucrose solution (0.01M pH 4, sodium acetate buffer) was 1 ml/min.

Figure 9 shows the volume of solution obtained as a function of time and the ratio of hydrolysis of this solution. At steady state, this ratio remained constant and equal to 76% for 190 hr, showing that desorption of invertase activity was only very slow or absent during this experiment.

Continuous hydrolysis of an industrial sucrose solution

Continuous hydrolysis of an industrial sucrose solution from "La Générale Sucrière" (Marseille-France) reference "Sirop Clairece" was

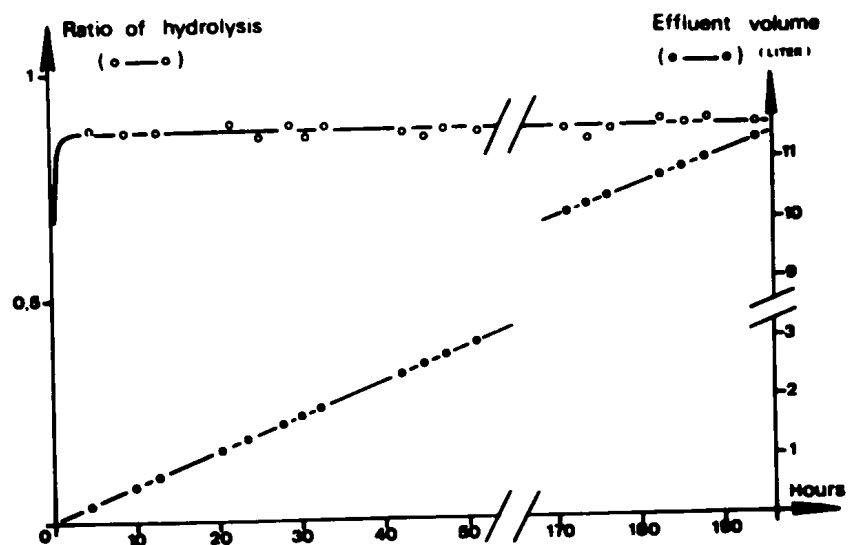


Fig. 9. Continuous hydrolysis of sucrose solution by IRA 93 resin-invertase packed in a tubular reactor; ratio of hydrolysis and effluent volume as a function of time. 0.01M, pH 4 sodium acetate buffer; sucrose concentration 50%; 30°C. The packed bed is made of 6 g IRA 93 resin on which 240 mg invertase was adsorbed. Flow rate: 1 ml/min. Ratios of hydrolysis (○), volume of effluent (●).

ADSORBED INVERTASE TUBULAR REACTOR

performed. The invertase quantity used for the adsorption procedure was 40 mg per g of resin, the packed bed was made of 6 g of resin. Once a steady state was reached, the ratio of hydrolysis remained constant throughout the time periods chosen. These results are summarized in Table III.

TABLE III
Continuous Hydrolysis of Industrial Sucrose Solutions at 30°C*

Concentration (w/v) (%)	pH adjusted with H ₂ SO ₄	Ratios of hydrolysis at steady state and at 30°C	Flow rate (ml/min)	Extent of use (days)
50	4	73	1	8
50	3	80	1	7
80	4	25	0.5	8
80	3	29	0.5	4
80	3	35	0.33	2

* The original solution is a "Clairce" syrup from "La Générale Sucrière:" 87% (w/v), pH 7.7.

The latter shows that this immobilization procedure, involving adsorption of invertase on an Amberlite resin, IRA 93, may have interesting applications. The procedure has been patented.²³

Continuous hydrolysis of a sucrose solution in a stirred tank reactor closed by an ultrafiltration membrane was reported in a previous study.¹ The membrane selectively retained invertase molecules, while the substrate and reaction products passed through. Twenty milligrams of invertase were allowed to hydrolyze 2.1 kg of sucrose in 120 hr, the ratio of hydrolysis being 90%, and the reaction volume 50 ml. In the present study 240 mg of invertase were allowed to hydrolyze 5.7 kg of sucrose in the same length of time, and the ratio of hydrolysis was 76%. The reaction volume was 16 ml.

It is possible to compare these results on the basis of the reaction volume, which may be chosen as a reference if enzymatic activity is assumed to be constant with time. Taking into account the first order kinetics of the reaction, the calculation shows that the nearer the ratio of hydrolysis is to one, the more efficient is the tubular flow reactor as compared to the stirred reactor.²⁴

This study has been supported in part by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Paris (contract no. 72.7.0851).

BOUDRANT AND CHEFTEL

References

1. J. Boudrant and C. Cheftel, *Biochimie*, **55**, 413 (1973).
2. E. H. Fischer and L. Kohtes, *Helv. Clin. Acta*, **135**, 1123 (1951).
3. H. Suzuki, Y. Ozawa, and H. Maeda, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 807 (1966).
4. S. Usami, J. Noda, and K. Goto, *J. Ferment Technol.*, **49**, 598 (1971).
5. R. Goldman, L. Goldstein, and E. Katchalski, in *Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports*, G. R. Stark, Ed., Academic Press, New York, 1971, pp. 1-78.
6. P. Monsan and G. Durand, *FEBS Letters*, **16**, 39 (1971).
7. H. Filippuson and W. E. Hornby, *Biochem. J.*, **120**, 215 (1970).
8. R. D. Mason and H. H. Weetall, *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 637 (1972).
9. H. Negoro, *J. Ferment. Technol.*, **48**, 689 (1970).
10. R. Saini, W. R. Vieth, and S. S. Wang, *Trans. N.Y. Acad. Sci. Ser. II*, **34**, 664 (1972).
11. J. M. Nelson, *Chem. Rev.*, **12**, 1 (1933).
12. M. D. Lilly, S. P. O'Neill, and P. Dunnill, *Biochimie*, **55**, 985 (1973).
13. E. Katchalski, I. Silman, and R. Goldman, in *Advances in Enzymology*, Vol. 34, Wiley, New York, 1971, pp. 445-536.
14. L. Goldstein, Y. Levin, and E. Katchalski, *Biochemistry*, **3**, 1913 (1964).
15. W. R. Vieth, S. G. Gilbert, and S. S. Wang, *Trans. N.Y. Acad. Sci., Ser. II*, **34**, 454 (1972).
16. A. Bar Eli and E. Katchalski, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1690 (1963).
17. M. D. Lilly, W. E. Hornby, and E. M. Crook, *Biochem. J.*, **100**, 718 (1966).
18. P. Monsan, Thesis of Docteur-Ingenieur, Toulouse, 1971.
19. G. Gellf, J. Henry, J. P. Kernevez, and D. Thomas, *C. R. Acad. Sci.*, **277**, 2265 (1973).
20. R. B. MacMullin and M. Weber, *Trans. Amer. Inst. Chem. Eng.*, **31**, 409 (1935).
21. T. Koboyashi and M. Moo-Young, *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 893 (1971).
22. M. L. Shuler, R. Aris, and H. M. Tsuchiya, *J. Theor. Biol.*, **35**, 67 (1972).
23. J. Boudrant and C. Cheftel, French Patent, no. 73.21.933 (1973).
24. J. Boudrant, Thesis of Docteur-Ingenieur, no. CNRS A.O. 8648, 1973.

Accepted for Publication January 10, 1975

2.1.1.2 - ESSAIS AVEC UNE INVERTASE POUR USAGES INDUSTRIELS

Compte tenu du prix élevé des enzymes purifiées, un système tel que le précédent (enzyme adsorbée) s'avère peu compétitif par rapport à un procédé d'hydrolyse enzymatique discontinu à l'aide d'une préparation d'invertase à usages industriels (enzyme en solution, non réutilisée). C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé un réacteur à enzyme adsorbée avec de l'invertase non purifiée, La Fermvertase XX dont le prix est environ 100 fois moins élevé. (Contrat ANVAR n° 74.1760.00)*

(*) Ce travail a été réalisé avec la collaboration de Hervé Crétin.

INTRODUCTION

L'hydrolyse du saccharose par une solution d'invertase industrielle (Fermvertase XX) a été étudiée dans un réacteur tubulaire où l'enzyme est adsorbée sur une résine échangeuse d'ions, système qui permet une hydrolyse continue du substrat par une quantité fixe et continuellement réutilisée d'enzyme immobilisée. Cette étude fait suite à un travail similaire effectué avec une enzyme purifiée pour usage biochimique et qui avait donné des résultats satisfaisants quant au rendement d'activité enzymatique et à la stabilité de cette activité dans un même réacteur lors d'une utilisation continue pendant une période prolongée de temps (BOUDRANT et CHEFTEL, 1975).

MATERIELS ET METHODES

Réactifs :

La préparation industrielle d'invertase "Fermvertase XX" provient de Sempa Chimie.

Le saccharose "pour usages biochimiques" provient de Merck (Darmstadt).

Les expériences continues d'hydrolyse ont été faites avec du sucre raffiné Saint-Louis pure canne provenant de la Générale Sucrière (Paris).

L'acide dinitro-3,5 salicylique pour synthèse provient de Merck (Darmstadt).

La résine échangeuse d'ions Amberlite IRA 93 provient de Rohm and Haas (Philadelphia, USA). C'est une résine de type macroréticulé dont les pores ont un diamètre moyen de 1300 \AA .

Appareillage :

Les expériences discontinues avec l'enzyme soluble et adsorbée ont été faites dans un réacteur à double enveloppe Radiometer (50 ml). L'agitation y est faite à l'aide d'un barreau magnétique recouvert de teflon. Lors des expériences avec invertase adsorbée sur la résine, l'agitation est telle que la répartition du catalyseur peut être considérée comme homogène.

Les hydrolyses continues de solutions de saccharose avec rétention d'enzyme fixée sur support insoluble ont été faites à l'aide d'un réacteur tubulaire constitué par une colonne chromatographique Pharmacia (Uppsala), type K S/30. Une double enveloppe a été ajoutée afin de pouvoir effectuer une régulation de température. Le lit fixe de la colonne est constitué avec 6 grammes de résine Amberlite IRA 93 sur laquelle l'enzyme est adsorbée.

Une pompe péristaltique Sigmamotor permet de faire varier le débit des solutions de saccharose entre 3 et $0,7 \text{ ml} \cdot \text{mn}^{-1}$ ce qui correspond à une variation du temps de résidence de 0,15 à 2 minutes.

Le taux d'hydrolyse est évalué à la sortie de la colonne. Dans le cas d'expériences de courte durée la mesure est faite après avoir atteint l'état stationnaire (généralement après la sortie de 100 ml de solution, ce qui correspond à environ 13 volumes réactionnels).

Méthodes analytiques :

L'hydrolyse du saccharose est faite dans un tampon acétate de sodium 0,01 M.

L'hydrolyse est suivie par le dosage des groupements réducteurs libérés (FISCHER et KOTHEs, 1951).

Pour les études cinétiques, l'hydrolyse est arrêtée par addition de soude 0,01 N et refroidissement à 0°C. Afin d'exprimer l'activité enzymatique en tant que vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose (micromoles de saccharose hydrolysées par minute et dans les conditions expérimentales adoptées : pH 4,5, 30°C, concentration en saccharose 10 %) la courbe de début d'hydrolyse a été tracée et la valeur de la pente à l'origine déterminée.

Afin d'évaluer la quantité d'invertase présente dans certains tampons de lavage la densité optique a été mesurée à 280 nm.

Méthode d'adsorption

Les résines sont préalablement lavées avec de l'eau distillée et équilibrées dans un tampon acétate 0,01 M pH 5. Après filtration les résines sont séchées sous vide (17.5 mm Hg) et mise en contact avec une solution d'invertase dans le même tampon (2 ml par gramme de résine). L'adsorption est effectuée pendant 12 heures à 4°C sous la même pression. Les résines sont alors lavées avec le même tampon acétate (20 ml par gramme de résine agités à 20°C pendant 30 minutes). Le lavage est continué jusqu'à ce que l'adsorption à 280 nm soit nulle.

Dénombrement de microorganismes

Le nombre des microorganismes totaux présent dans les solutions de saccharose hydrolysées ou non a été déterminé à l'aide de la méthode des dilutions successives en utilisant les tables statistiques de Mac Crady. Le milieu de dilution est une solution d'extrait de levure (0,5 %), de glucose (0,5 %), de protéase peptone (0,1 %), de chlorure de sodium (0,1 %), de carbonate de calcium (0,01 %) à pH 6,8.

Des numérations de levures et de moisissures ont été réalisées par étalement suivant la méthode préconisée par HARRIGAN et McCANCE (1966). Les évaluations ont été faites à l'aide de dilutions successives dans du tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 7 et étalement immédiat sur des boîtes de Pétri

contenant un milieu extrait de malt 3 %, peptone 0,5 %, gélose 1,5 %, pH 5,4.

Les tubes et boîtes de Petri sont mis à incuber à 37°C pendant 48 heures.

L'observation microscopique a permis de différencier bactéries, levures et moisissures.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Etude préalable de la Fermvertase XX en solution

Des expériences d'hydrolyse discontinues de saccharose ont été faites afin de caractériser la préparation d'invertase utilisée.

L'activité enzymatique de la solution est de 6250 unités par millilitre, l'unité d'activité enzymatique étant la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser une micromole de saccharose par minute à 30°C, pH 4,5 à une concentration de saccharose de 10 % (P/V).

Une zone de pH optimum de 4,5 - 5 est observée (cf. figure 3).

La stabilité thermique de l'invertase a été étudiée : il n'y a pas de perte d'activité après huit heures d'incubation dans le tampon acétate de sodium 0,01 M pH 4,5 à 40°C et 50°C.

La vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose a été déterminée en fonction de la concentration initiale en saccharose (tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5, 30°C). Un maximum de vitesse de réaction est observé vers 10 % de saccharose (P/V) ce qui correspondrait à la saturation de l'enzyme. Au delà de 15 % (P/V) de saccharose, la vitesse initiale d'hydrolyse décroît : pour une concentration de 60 % ^(P/V) elle n'est plus que le tiers de l'activité maximum.

Il a été vérifié que la cinétique d'hydrolyse du saccharose à des concentrations de 50 et 70 % (P/V) suit approximativement une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat. Ceci rejoint les observations précédemment faites (BOUDRANT et CHEFTEL, 1973).

II. Rendement d'activité enzymatique adsorbée

Ainsi qu'il a été fait précédemment (BOUDRANT et CHEFTEL, 1975) l'adsorption de l'enzyme est réalisée pendant 12 heures à 4°C sous un vide de 17,5 mm de mercure, l'enzyme étant dissoute dans un tampon acétate 0,01 M pH 5.

Le rendement global d'activité enzymatique adsorbé a été déterminé en calculant le pourcentage de l'activité enzymatique immobilisée sur la résine,

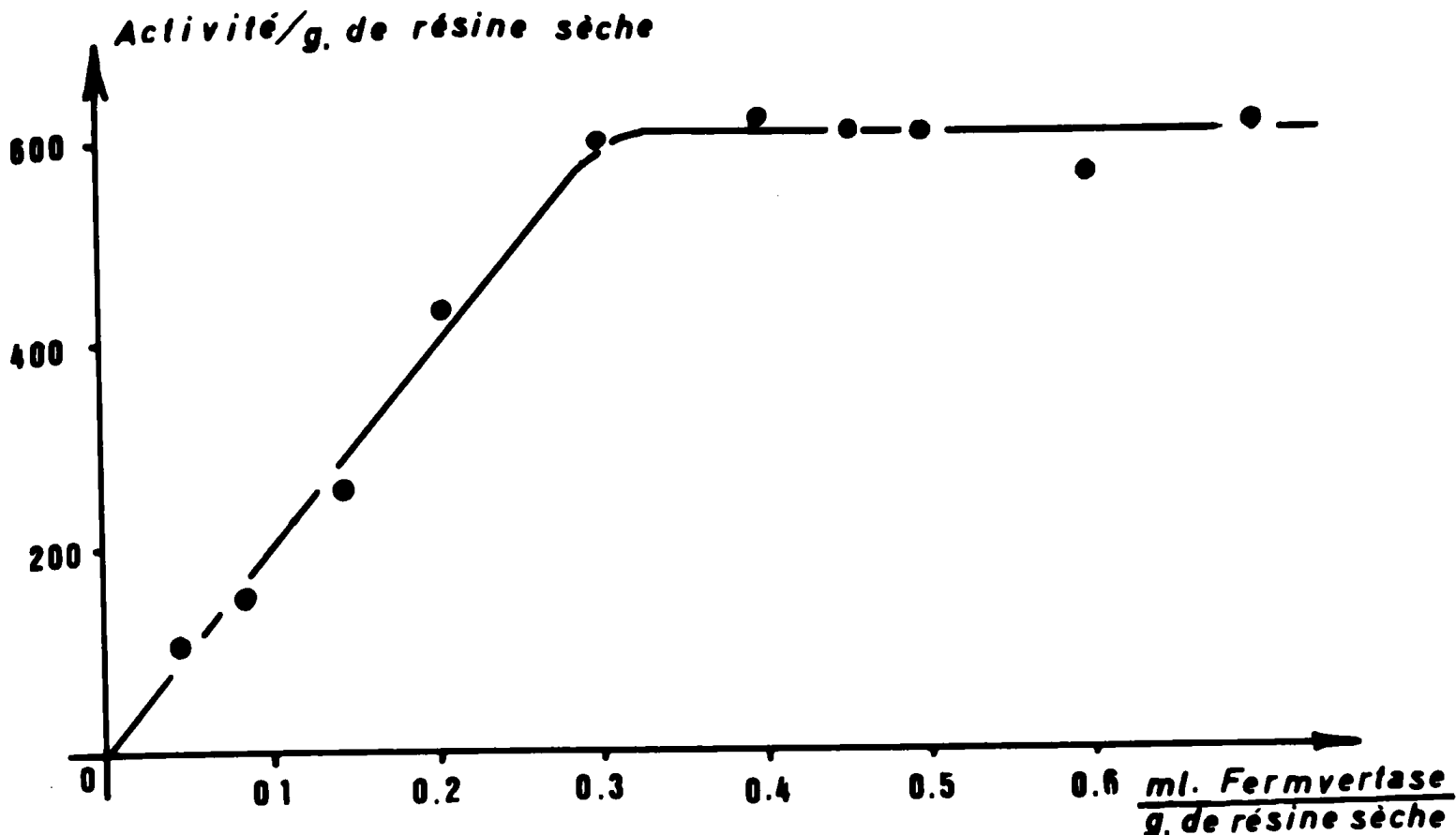


Fig. 1 - Influence du rapport $\frac{\text{ml Fermvertase XX}}{\text{g Résine}}$ sur l'activité de la

résine IRA 93. Solution de saccharose 10 %, tampon acétate de sodium 0,01M, pH 3, 30°C.

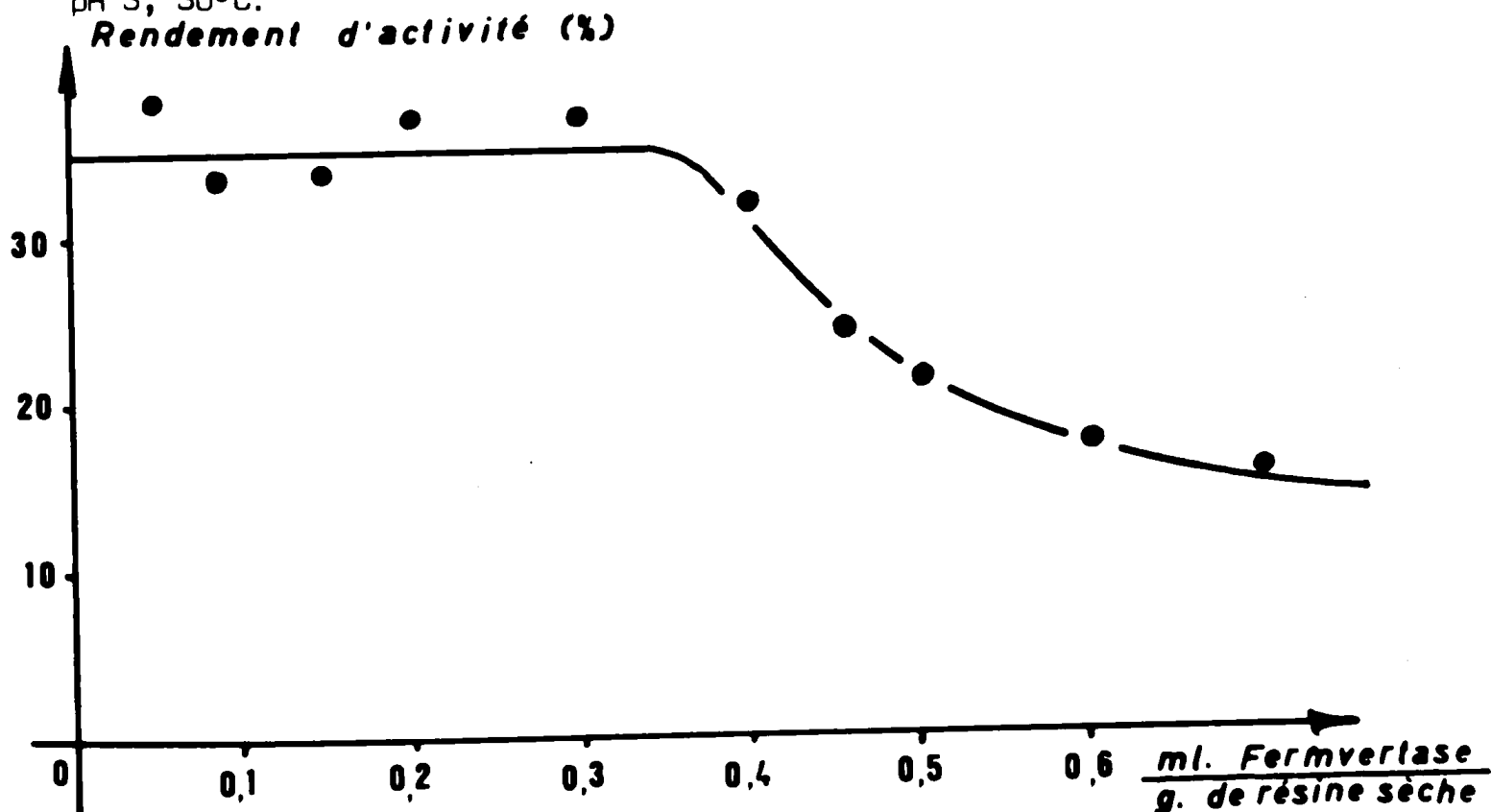


Fig. 2 - Influence du rapport $\frac{\text{ml Fermvertase XX}}{\text{g Résine}}$ sur le rendement d'activité

de la résine IRA 93. Solution de saccharose 10 %, tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 3, 30°C.

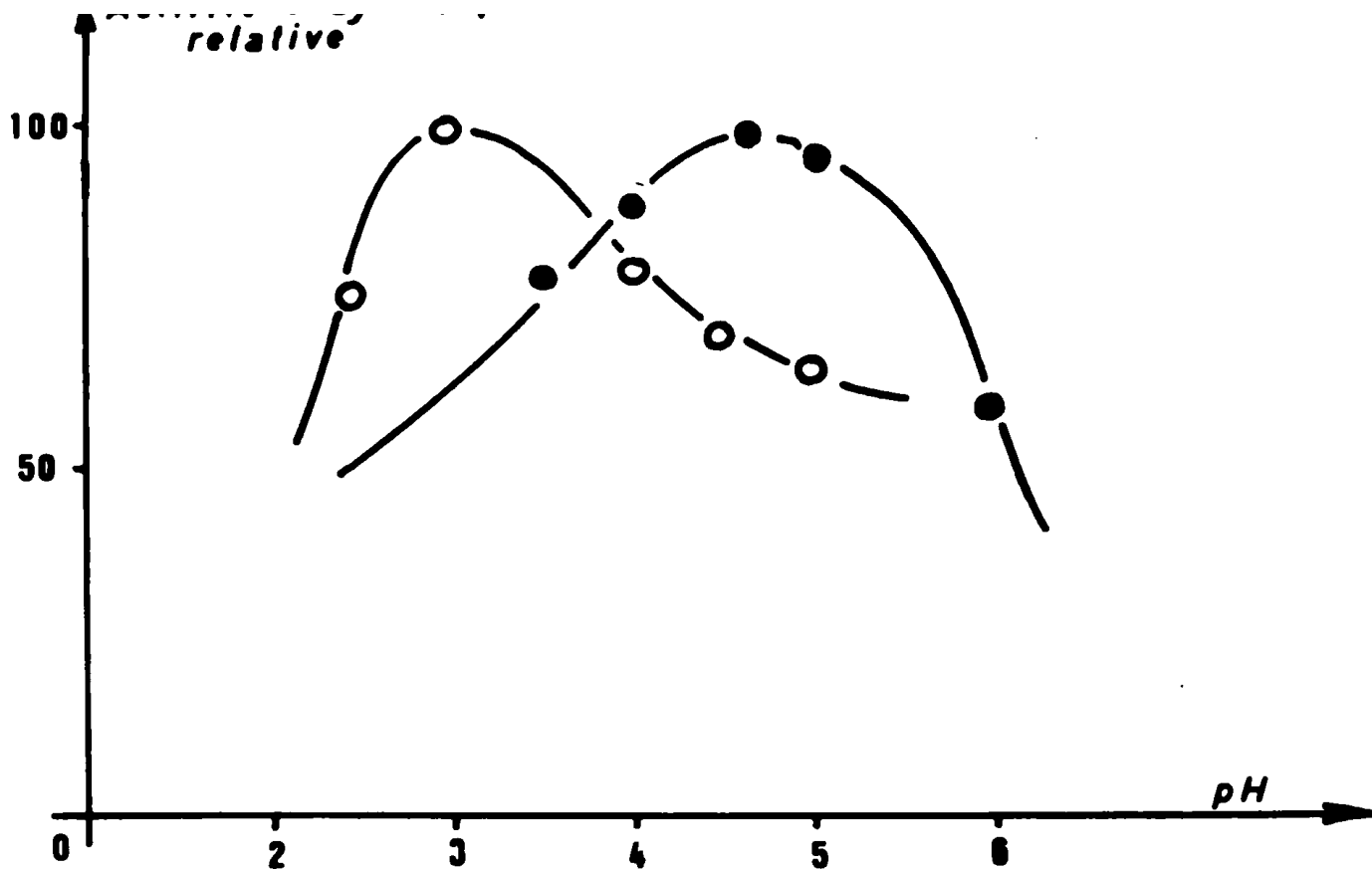


Fig. 3 - Influence du pH sur l'activité enzymatique relative de la Fervertase XX libre (●) et adsorbée (○).

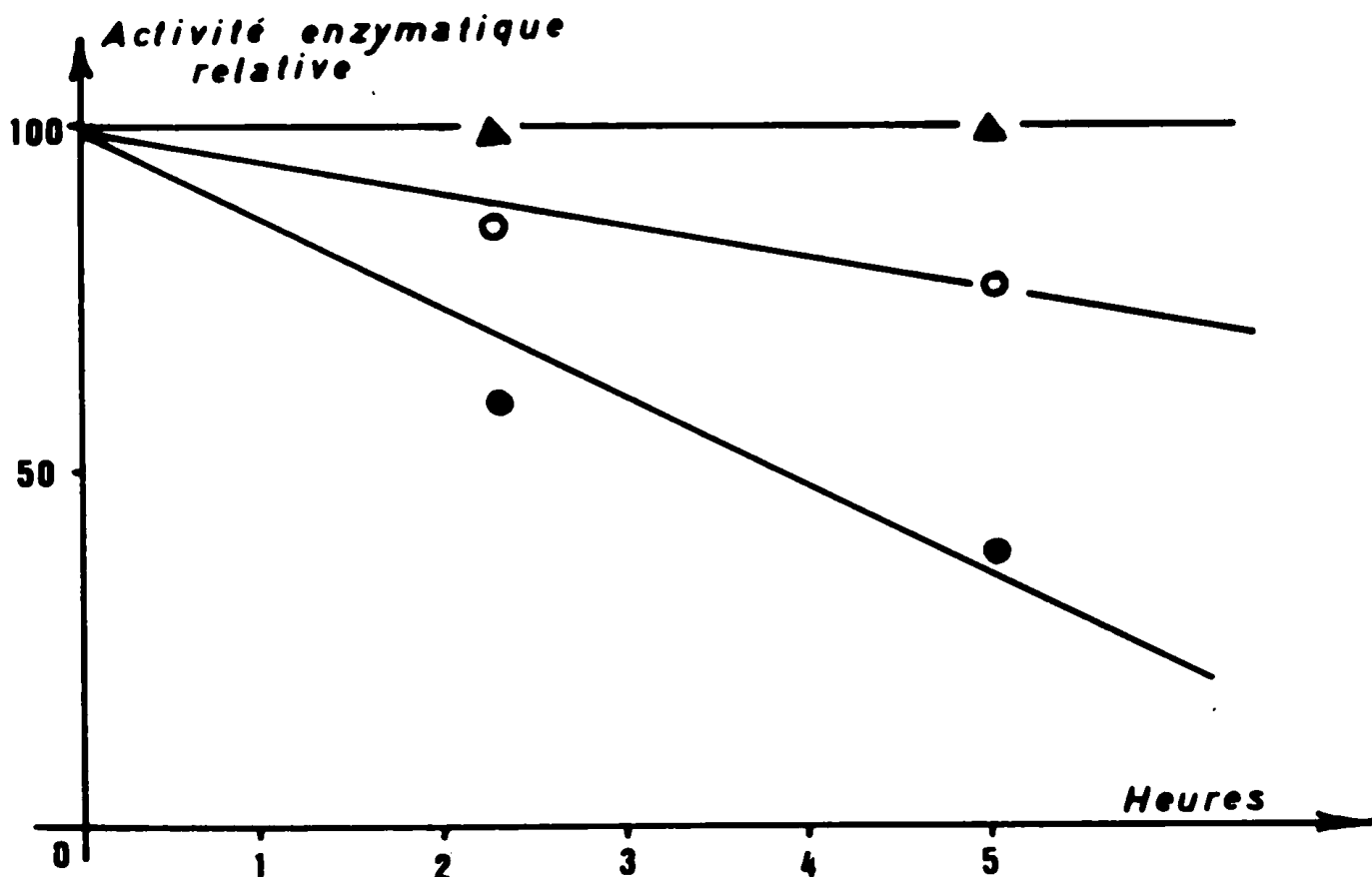


Fig. 4 - Cinétique de désorption de la Fervertase XX adsorbée sur la résine IRA 93. Tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4, 30°C (Δ), 40°C (○), 50°C (●).

mesurée à son pH optimum, par rapport à l'activité enzymatique mesurée à pH 4,5 de la totalité de l'invertase utilisée lors de l'adsorption. Lors de cette expérience la quantité d'invertase mise en contact avec la résine est de 0,2 millilitre par gramme de résine sèche (complété à 2 ml avec du tampon) et l'activité mesurée avec 1,5 gramme de résine humide (1,5 gramme de résine humide correspond à 0,7 gramme de résine sèche).

Dans ces conditions le rendement global d'activité a été trouvé égal à 36 %, ce qui montre qu'une proportion importante de l'activité enzymatique est retrouvée sur la résine.

L'activité enzymatique de la résine a été mesurée, et le rendement d'activité calculé en fonction du rapport ml d'invertase/g de résine sèche (figures 1 et 2). L'activité maximum est obtenue pour une valeur de ce rapport égale ou supérieure à 0,3. L'activité enzymatique est alors de 600 unités par gramme de résine sèche.

III. Propriétés de l'invertase adsorbée

Des expériences d'hydrolyse discontinues ont été faites afin d'étudier les propriétés du complexe invertase-résine IRA 93.

La désorption de l'activité enzymatique a été étudiée en fonction de la molarité du tampon de lavage utilisé. Il reste respectivement 100 %, 90 % et 84 % de l'activité lorsque les molarités du tampon sont respectivement de 0,01 M, 0,05 M et 0,1 M. La précédente étude (BOUDRANT et CHEFTEL, 1975) ayant montré le peu d'influence de la variation du pH sur la désorption celle-ci n'a pas été étudiée.

La figure 3 indique l'influence du pH sur l'activité de l'enzyme adsorbée : il y a un déplacement du pH optimum de l'enzyme adsorbée (pH = 3) par rapport au pH optimum de l'enzyme libre (pH = 4,5) : ce phénomène est dû à une distribution inégale des ions hydrogènes et hydroxyles entre la "phase ionique" où l'enzyme est immobilisée et la solution extérieure (GOLDSTEIN et al., 1964).

La température optimale d'opération d'un réacteur tubulaire où l'enzyme est retenue est, vis à vis de l'activité enzymatique, la température la plus élevée possible ne provoquant aucune perte d'activité enzymatique. La stabilité du complexe a été étudiée dans le tampon acétate de sodium 0,01 M, pH 4,5. La figure 4 montre qu'il n'y a pas de perte d'activité enzymatique après 7 heures d'incubation de la résine à une température inférieure ou

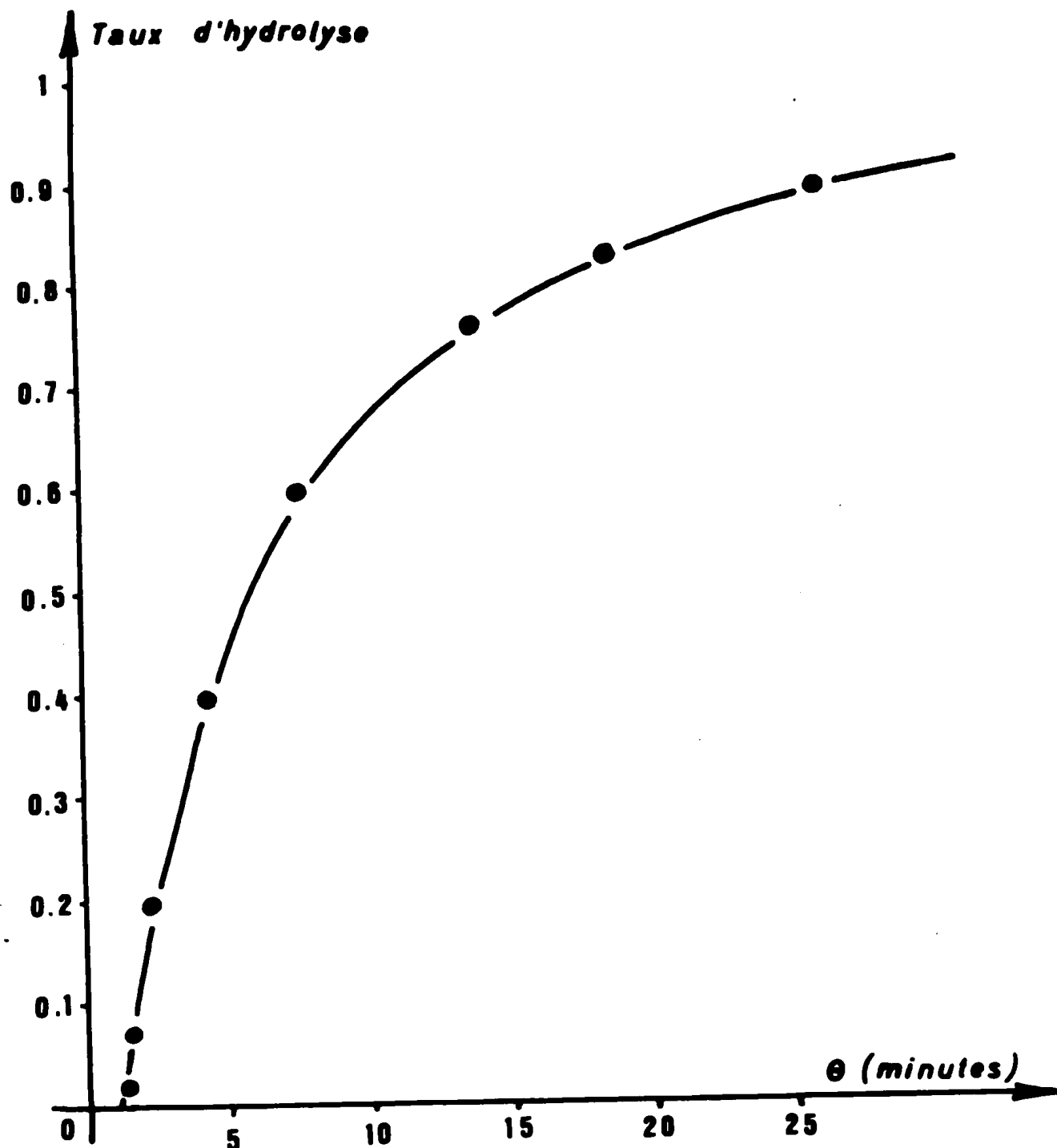


Fig 5. - Cinétique de réaction de l'hydrolyse du saccharose par de la Fermvertase XX adsorbée sur la résine IRA 93.

Quantité de résine utilisée 3 g de résine sèche, adsorption avec 1 ml de Fermvertase XX, volume réactionnel 50 ml, solution de saccharose à 70 % (P/V) dans du tampon acétate de sodium 0,01M pH 4, 30°C.

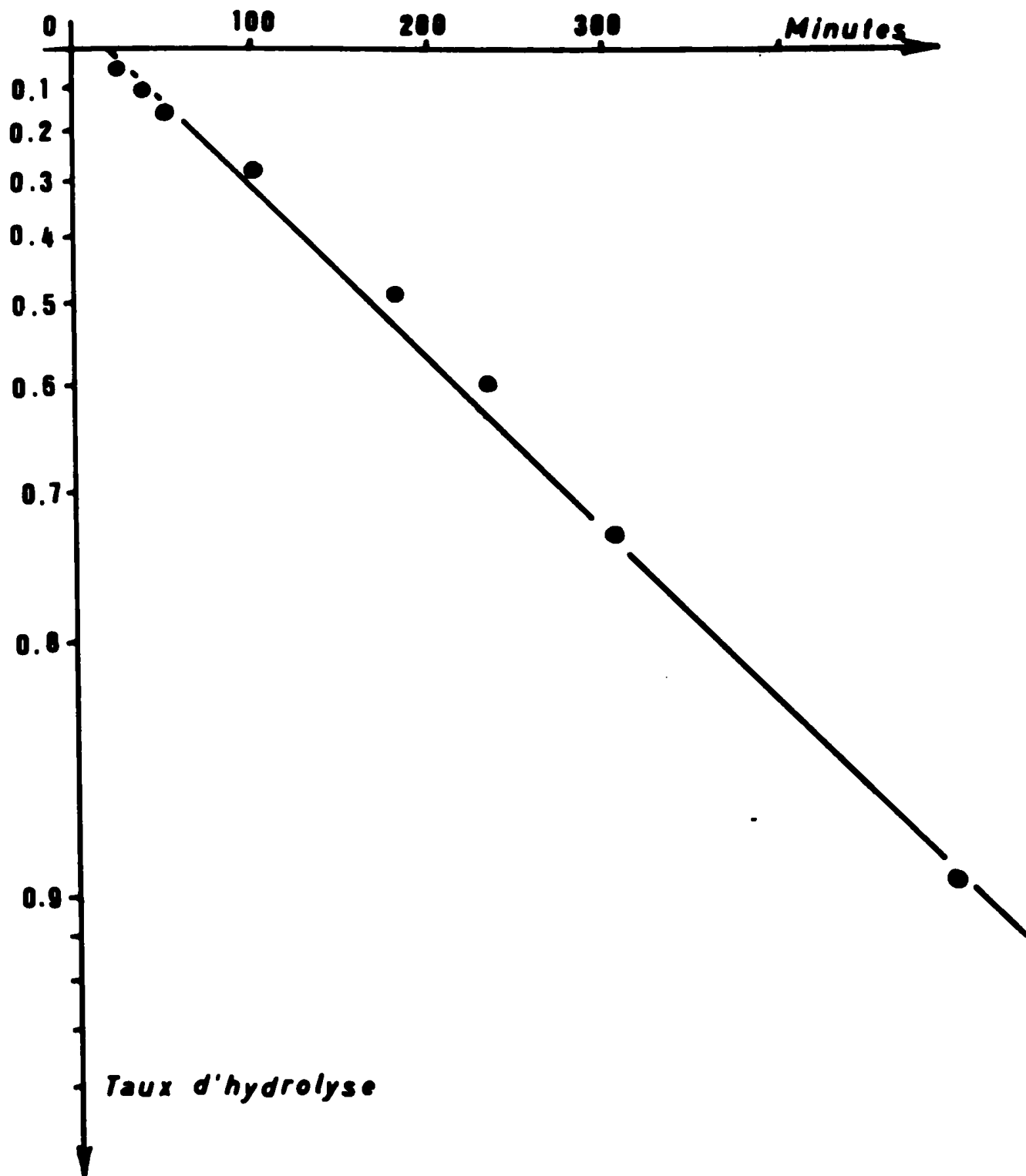


Fig. 6 - Cinétique de réaction de l'hydrolyse du saccharose par la Fermvertase adsorbée sur la résine IRA 93. Représentation semi-logarithmique de la courbe tracée sur la figure 5.

égale à 30°C. Par contre une baisse d'activité est observée à 40°C et à 50°C. Ceci rejoint les résultats précédents (BOUDRANT et CHEFTEL, 1975) où il avait été montré que cette baisse d'activité était dû à une désorption et non à une inactivation.

La vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose a été déterminée en fonction de la concentration initiale en saccharose : un optimum d'activité est observé pour une concentration de l'ordre de 20 % et à 70 % l'activité est la moitié de l'activité maximale.

Comme le montre la figure 5 des taux d'hydrolyse d'une solution de saccharose à 70 % proche de l'unité peuvent être obtenus si le temps de réaction est suffisant. La figure 6 montre que la cinétique de la réaction d'hydrolyse du saccharose par de l'invertase adsorbée suit une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat. Il n'y a donc pas de modification de la cinétique de réaction si ce n'est le temps de latence nécessaire observé sur ces deux figures, pour que la réaction se fasse.

IV. Hydrolyses continues en réacteur tubulaire

Dans le système utilisé la Fermvertase XX est retenue par adsorption sur de la résine Amberlite IRA 93 contenue dans un réacteur tubulaire. La solution de substrat est introduite de façon continue à l'aide d'une pompe péristaltique.

Plusieurs séries d'expériences ont été faites et ceci dans des conditions différentes de concentration en saccharose, de pH et de température.

Dans chacune de ces expériences la quantité d'invertase utilisée lors de l'adsorption était de 0,3 ml de "Fermvertase XX" (valeur qui correspond à la quantité de préparation enzymatique la plus faible pour avoir le maximum d'activité enzymatique adsorbée) complétée à 2 ml avec du tampon acétate de sodium 0,01 M pH 5 par gramme de résine sèche. La quantité de résine introduite dans la colonne correspond à 6 grammes de résine sèche.

Le volume total de la colonne enzymatiquement active est égal à 19 ml. Le volume mort de la colonne déterminé à l'aide d'une solution de Blue Dextran 2000 est de 8,5 ml.

Le débit réglé à l'aide d'une pompe péristaltique varie entre 30 ml/mn et 0,6 ml/mn, ce qui correspond à un temps de résidence variant entre 0,35 mn et 17,5 mn.

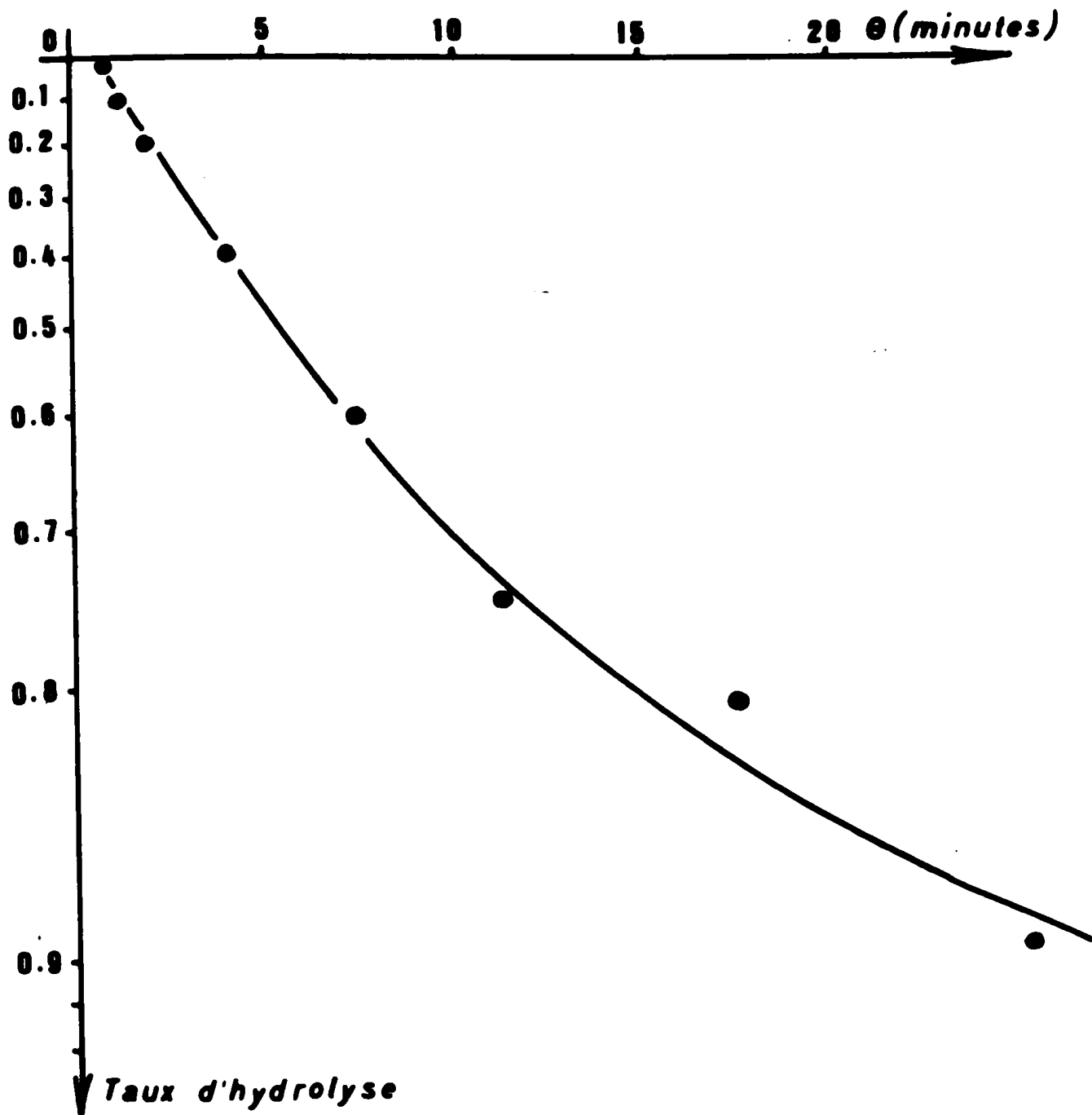


Fig. 7 - Représentation logarithmique de la variation du taux d'hydrolyse à la sortie du réacteur en fonction du temps de résidence de la solution dans le réacteur. Solution de saccharose 70 % (P/V), pH 4, 22°C. Le lit fixe du réacteur tubulaire est constitué par 6 g de résines sèches et l'adsorption a été faite avec 2 ml de Fermvertase XX.

Expériences préliminaires

Afin de mesurer l'influence du temps de résidence de la solution sur le taux d'hydrolyse à la sortie du réacteur une première série d'expériences a été faite avec une solution de saccharose de concentration 70 % (P/V) pH 4 à 22°C. La figure 7 montre les variations du taux d'hydrolyse en fonction du temps de résidence : des taux d'hydrolyse proche de l'unité peuvent être obtenus.

La figure 7 montre que la variation du $\log (1-x)$ ne varie pas linéairement avec le temps de résidence, ce qui devrait être le cas puisque la cinétique d'hydrolyse est de premier ordre par rapport à la concentration en substrat : ce phénomène résulte très probablement de la nature hétérogène de la catalyse. L'observation de ces deux dernières figures montre également que ces courbes ne passent pas par l'origine : ce type de catalyse implique un temps de latence avant que la réaction d'hydrolyse démarre.

Utilisation prolongée du réacteur tubulaire

Des hydrolyses continues de longue durée (1 mois) ont été réalisées dans ce réacteur et ceci dans des conditions différentes de concentrations en saccharose, de pH et de température afin de mesurer l'influence de ces divers facteurs sur la stabilité du réacteur. Les conditions de réalisations du réacteur sont identiques (0,3 ml de Fermvertase XX par gramme de résine sèche, et le lit fixe constitué par 6 grammes de résine sèche).

Les résultats sont indiqués sur le tableau I. Les taux d'hydrolyse en sortie de réacteur sont restés constants pour chacun des réacteurs pendant toute la durée des expériences (1 mois). Ceci montre que l'activité enzymatique n'est pas ou pratiquement pas désorbée pendant cette période de temps. Signalons que les expériences ont alors été arrêtées mais qu'elles auraient pu être continuées. Les résultats montrent également que le nombre de microorganismes dans les éluats est d'autant plus important que le pH est plus proche de la neutralité et que la concentration en saccharose est faible. Il semble cependant que la croissance se fasse surtout dans les premiers jours de fonctionnement et que la période de stabilisation est atteinte au bout de 10 jours.

Par contre le nombre de microorganismes (identifiés comme des levures et moisissures après examen microscopique) semble être plus sensible à une variation de concentration de la solution de saccharose qu'à une variation de pH : remarquons également qu'il ne semble pas y avoir de phénomènes de

TABEAU I

Concentration en saccharose	50 %	50 %	70 %	70 %	70 %
température	30°	22°	22°	22°	22°
pH	4	4	3	4	7
débit (ml.mn ⁻¹)	0,98	0,76	0,69	0,7	0,7
taux d'hydrolyse	1	1	0,8	0,75	0,75
nombres totaux de microorganismes dans la solution en sortie de réacteur (ml ⁻¹)	après 0 jours	6.10 ²	6.10 ²	6.10 ²	13.10 ²
	10 "	6.10 ⁵	6.10 ²	6.10 ³	13.10 ³
	30 "	-	3.10 ²	8.10 ³	13.10 ³
nombre de microorganismes dans le réacteur (ml ⁻¹) (après 1 mois de fonctionnement)*	levures	3.10 ⁵	5.10 ³	3.10 ⁴	7.10 ³
	moisissures	-	10 ²	10 ³	5.10 ²

* le nombre initial de microorganismes est pratiquement nul

EXPERIENCES D'HYDROLYSE CONTINUES DE SOLUTION DE SACCAROSE DANS UN REACTEUR TUBULAIRE OU LA FERMVERTASE XX EST ADSORBEE SUR LA RESINE AMBERLITE IRA 93.

croissance exagérée de microorganismes dans le réacteur (un millilitre d'eau potable contient généralement jusqu'à 10^4 microorganismes par millilitre).

L'ensemble de ces résultats montrent les stabilités de l'activité enzymatique et microbiologique d'un tel réacteur.

Compte tenu du rendement d'activité enzymatique qui a été trouvé égal à 40 %, il semble que ce système pourrait être intéressant pour l'hydrolyse industrielle de solutions de saccharose concentrées.

BIBLIOGRAPHIE

- J. BOUDRANT et C. CHEFTEL, Biochimie, (1973), 55, 413-420.
- J. BOUDRANT et C. CHEFTEL, Brevet d'invention n° 73.2.933, déposé
le 15 juin 1973.
- J. BOUDRANT et C. CHEFTEL, Biotechnol. Bioeng. (1975), 17, sous presse.
- E.H. FISCHER et L. KOHNES, Helv. Chim. Acta, (1951), 34, 1123-1131.
- R. GOLDMAN, L. GOLDSTEIN and E. KATCHALSKI (1971), in Biochemical
Aspects of Reactions on solid supports, G.R. stark ed., Academic
Press, pp. 1-78.
- W.F. HARRINGTON et M.E. McCANCE, (1966), in Methods in Microbiology,
Academic Press, p. 290.

2.1.2 -

ESSAIS D'APPLICATIONS A D'AUTRES REACTIONS D'INTERET INDUSTRIEL

Deux autres réactions enzymatiques d'intérêt industriel, l'hydrolyse de pectines d'une part et hydrolyse de protéines d'autre part, ont été étudiées dans un réacteur tubulaire à enzyme adsorbée sur une résine échangeuse d'ions.

2.1.2.1 - ESSAIS D'ADSORPTION DE PECTINASES

L'adsorption de préparations enzymatiques pectinolytiques a été étudiée dans le but de réaliser un réacteur pour la clarification des jus de fruit. On sait en effet que le traitement de certains jus par des enzymes pectinolytiques permet de diminuer leur viscosité et d'améliorer leur filtration (REED, 1966 - MARTEAU et al., 1963). Ces enzymes dégradent les pectines, polymères de molécules d'acide galacturonique reliées par des liaisons α -1,4 et partiellement estérifiées par le méthanol (PILNIK et VORAGEN, 1970). La classification des pectinases généralement adoptée est celle proposée par DEMAIN et PHAFF (1967). Ces auteurs distinguent :

- les pectine esterases, responsables de la déméthylation,
- les polygalacturonases, responsables de la coupure des liaisons α -1,4. Les attaques se font soit au hasard (endo), soit en bout de chaîne (exo). Les premières provoquent un abaissement rapide de la viscosité ; les secondes achèvent la dégradation de la chaîne polygalacturonique en acide galacturonique,
- les transéliminases également responsables de la coupure de liaisons α -1,4 et qui donnent des galacturonides méthylés ayant une liaison insaturée entre les carbones 4 et 5.

Aucune corrélation précise n'a pu être établie entre le phénomène de la clarification des jus de fruit et l'activité spécifique de l'un ou l'autre de ces types d'enzyme. Ainsi ENDO (1965) et YAMASAKI et al. (1967) ont montré que la conjugaison d'activités pectine estérase et endopolygalacturonase était nécessaire pour la clarification, une seule de ces deux activités étant insuffisante.

ISHII et YOKOTSUKA (1971) ont d'autre part mis en évidence le rôle de l'activité transéliminase vis à vis de la clarification des jus de fruit.

Matériel et Méthodes

Les préparations enzymatiques industrielles de pectinases RC10, RC 20, RC X proviennent de Rapidase-Wallerstein. Deux préparations purifiées provenant de Serlabo et Sigma (Réf. P. 4625) ont été utilisées. La pectine "Ruban rouge 3 G" provient de Unipeptine (Paris).

Pour les mesures d'activité enzymatique, la méthode viscosimétrique, traduisant surtout une activité endo-polygalacturonique, a été retenue. En effet on sait que cette activité est un facteur limitant de l'activité pectine esterase (MARTEAU, 1963), et que l'activité exo-polygalacturonique se traduit plus par une augmentation du pouvoir réducteur que par une baisse de viscosité. De plus il semble plus vraisemblable de relier un phénomène de clarification de jus de fruit à une diminution de viscosité qu'à une augmentation du pouvoir réducteur ou de densité optique à 235 nm (méthode de mesure de l'activité trans éliminase).

Les activités enzymatiques ont été mesurées par la baisse de viscosité (mesurée à l'aide d'un viscosimètre à écoulement) relative d'une solution de pectine de concentration 1 % (P/V) dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5 après des temps de réaction de 5 minutes et 10 minutes. L'activité enzymatique des échantillons est préalablement inactivée à la chaleur (2 minutes à 100°C). Il a été vérifié que ce traitement ne modifiait pas la viscosité des solutions. L'unité d'activité enzymatique est la quantité d'enzyme qui fait baisser de 1 % en une minute la viscosité d'une solution de pectine de concentration 1 % (P/V).

Résultats et discussion

Choix de l'enzyme

Les activités de diverses préparations enzymatiques, d'application industrielle (les pectinases RC 10, RC 20 et RC X, la pectinase de Serlabo) ont été mesurées et comparées. (Tableau 1). La pectinase RC 20, la plus active a été retenue et certaines de ses caractéristiques déterminées.

Enzyme	Activité enzymatique U/mg
RC 10	4,1
RC 20	8,2
RC X	5,2
Serlabo	6,3
Sigma	7,1

Tableau 1

Activité enzymatique des différentes préparations de pectinases utilisées. Les activités ont été mesurées comme indiqué dans "Matériel et Méthodes".

La zone de pH optimum d'activité enzymatique est située entre 4,9 et 5,1. Ceci correspond aux pectinases d'origine fongique dont la zone de pH optimum est proche de celui des fruits (MUKHERVEE et MAJUMDAR, 1971). Si la pectinase RC 20 est stable à 22°C, une incubation à des températures supérieures provoque une inactivation thermique. Ainsi il reste 80 % et 60 % de l'activité enzymatique initiale après un séjour de 4 heures à 30°C et 40°C.

Choix du support

Divers types de résines ont été essayés :

- les résines Amberlite macroréticulées IRA 93 et 900, précédemment utilisées,
- les résines Amberlite macroréticulées XAD 7 et XAD 9 utilisées pour la purification ou l'adsorption de protéines et d'enzymes (voir notice Amberlite, Rohm and Haas),
- les résines Dudite A 30B et A 368PR échangeuses d'anions moyennement basiques dont la structure poreuse permet la fixation de matières organiques (voir notice Dudite, Dia-prosim) et la résine Duolite S 30, à base de phénol et de formaldéhyde. Cette dernière résine a déjà été utilisée pour la fixation d'enzyme à l'aide de glutaraldéhyde (OLSON et STANLEY, 1973), ainsi que pour la purification d'enzymes.

Ces résines ont été lavées dans de l'eau distillée et équilibrées dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 5. Après séchage sous vide l'adsorption de l'enzyme a été réalisée comme indiqué précédemment par imbibition avec une solution d'enzyme dans le même tampon.

Comportement des particules enzymatiquement actives

Certaines résines ont montré une bonne capacité d'adsorption. Ainsi avec une quantité d'enzyme égale à 3 mg par gramme de résine XAD 7 et XAD 9, les rendements d'adsorption sont égaux à 50 % et 40 %. Par contre les rendements d'activité enzymatique ont été trouvés peu élevés et de l'ordre de 5 %. La liaison entre le support et l'enzyme est assez faible, en effet dans ces deux cas la désorption est pratiquement totale après une première mesure à 40°C. Si la désorption est plus faible à 22°C, celle-ci reste néanmoins élevée : 30 % et 20 %, respectivement, de l'activité initiale de la résine restent présents après quatre essais. Avec la résine S 30, le rendement d'activité est de 1,5 % et la diminution d'activité est de 20 % d'une mesure à la suivante (22°C). Notons également qu'un excès d'enzyme n'améliore pas la qualité de l'adsorption. Les autres résines n'ont pas donné de résultats intéressants. Ces essais ne semblent pas corroborer ceux indiqués par DURAND (1973) : en effet cet auteur a trouvé des rendements d'activité enzymatique de l'ordre de 25 % avec les résines Amberlite IRA 904 et IRA 45 et de l'ordre de 75 % avec les résines Duolite S 30 et S 37 (pectinase Rapidase USK 5937). Notons cependant que dans ce cas, les activités enzymatiques étaient mesurées à l'aide des sucres réducteurs libérés.

A l'écart de la méthode d'adsorption proprement dite, l'utilisation de la résine IRA 45 nous a suggéré d'appliquer la méthode de GLASSMEYER et OGLE (1971). Cette résine possède des groupements NH_2 libres et l'utilisation de glutaraldéhyde permet de réaliser des liens covalents entre l'enzyme et le support. Les essais ont été faits avec la préparation de pectinase purifiée provenant de Sigma (7,1 U/mg). Aucune activité n'a été retrouvée sur cette résine. Ceci pourrait être dû à une inactivation de l'enzyme par le glutaraldéhyde. En effet la préparation enzymatique utilisée perd 15 % et 55 % de son activité après des incubations de 1 et 4 jours respectivement dans une solution de glutaraldéhyde de concentration 2 % (P/V). Un autre essai de fixation covalente sur verre poreux a été fait, il sera signalé à la fin du paragraphe 2.2.2.3, Essai de réalisation pratique d'un réacteur en lit fluidisé.

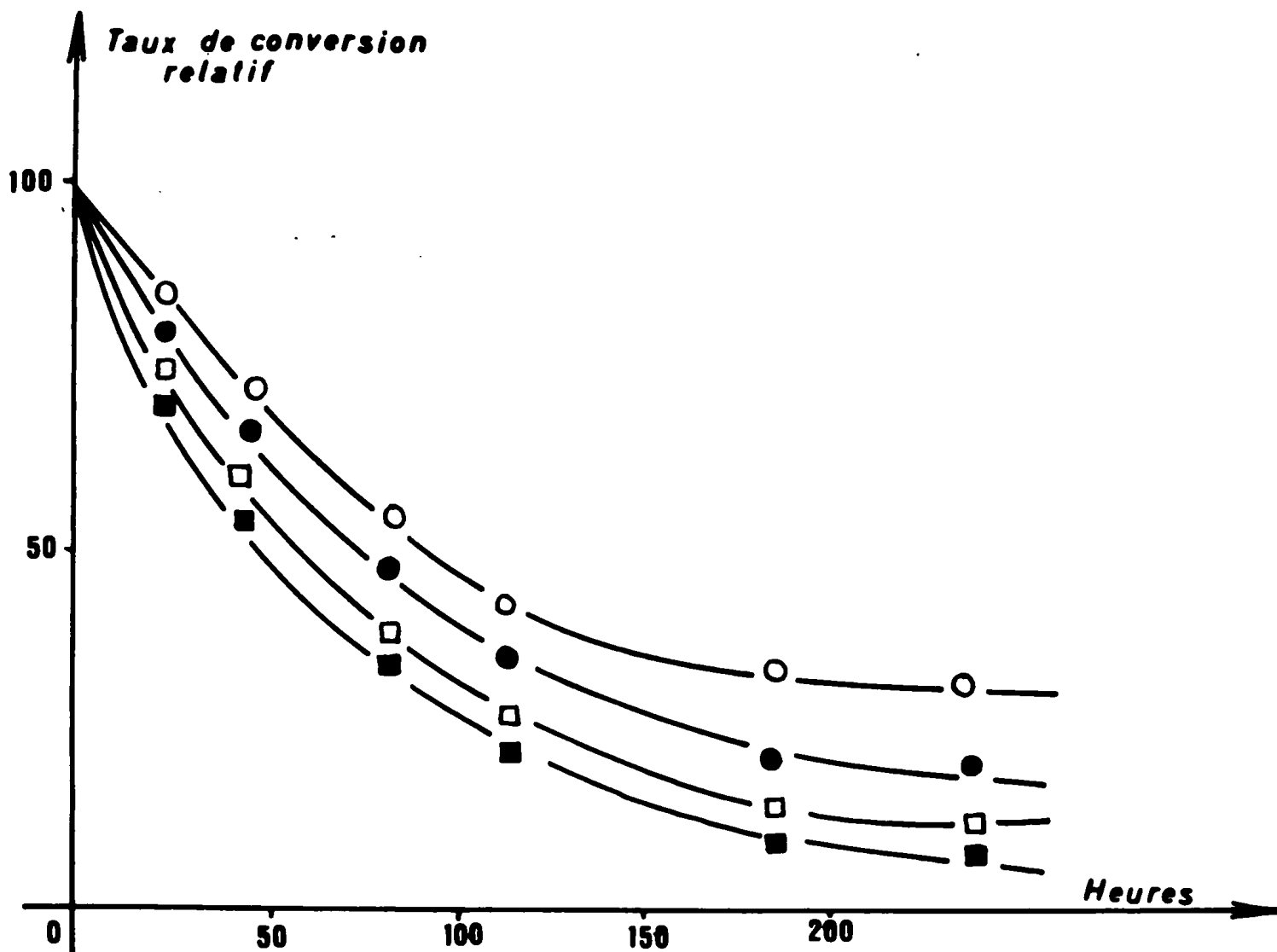


Figure 1

Evolution du taux de conversion relatif d'une solution de pectine, dans un réacteur tubulaire où de la pectinase est adsorbée sur les résines IRA 900 (○ — ○), A 368PR (● — ●), S 30 (□ — □), IRA 93 (■ — ■) ;
22°C, solution de pectine 1% (P/V), tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5.

Essais continus en réacteur tubulaire

Des essais continus en réacteur tubulaire ont permis de vérifier que l'agitation n'est pas la seule cause de la désorption. Ces essais ont été réalisés à 22°C avec les résines IRA 93, IRA 900, A 368PR et S 30 sur lesquelles ont été adsorbées 3 mg d'enzyme par gramme de résine. La figure 1 montre l'évolution du taux de conversion relatif, de la solution, mesuré en sortie de colonne (et exprimé par rapport aux taux de conversion obtenu initialement), le liquide circulant entre les mesures étant la solution tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5. Après 200 heures d'utilisation, les taux de conversion relatifs sont respectivement égaux à 18 %, 30 %, 10 % et 8 %. Ces expériences ont été arrêtées après 10 jours de fonctionnement. Les allures décroissantes de ces courbes ne semblent pas permettre de dire que l'activité reste stable après une période de désorption, phénomène qui a été signalé par DURAND (1973). Avec la résine S 37 (Duolite) cet auteur a en effet observé une baisse d'activité pendant les 8 premiers jours d'utilisation puis une stabilisation. Signalons que dans le cas de la résine IRA 900, l'activité est immédiatement et totalement désorbée à 22°C dans une solution de chlorure de sodium 2N. Notons également que des expériences continues effectuées à 4°C avec les résines Amberlite 200 (anionique) et IRA 93 (cationique) ou avec un mélange des deux n'ont pas révélé d'amélioration de la stabilité du réacteur enzymatique.

2.1.2.2 - ESSAIS D'ADSORPTION DE PROTEASES

La littérature indique divers essais d'immobilisation de protéases par adsorption sur des supports insolubles. Ainsi la pepsine a été adsorbée sur des particules métalliques traitées au stéarate de baryum (LANGMUIR et SCHAEFFER, 1938), l' α -chymotrypsine sur kaolinite (Mc LAREN et ESTERMAN, 1956), la pepsine sur DEAE-cellulose et la trypsine sur carboxyméthyl-cellulose (MITZ et SCHLUETER, 1959), la leucine aminopeptidase sur des gels de phosphate de calcium (KOELSCH et al., 1970) et la papaïne sur verre poreux (MESSING, 1970). Si des rendements d'activité assez élevés, de l'ordre de 70 % pour des substrats de petits poids moléculaires (Mc LAREN et ESTERMAN, 1956 - KOELSCH et al., 1970) et de l'ordre de 50 % pour des substrats de gros poids moléculaires (LANGMUIR et SCHAEFFER, 1938) ont été observés, une désorption de l'activité enzymatique l'a été également. Cette désorption serait induite soit par des variations de pH ou de force ionique, soit par la présence de substances présentes dans la solution de substrat.

Matériel et Méthodes

Les essais ont été faits avec une préparation de protéases extraites de *Streptomyces griseus* (Sigma) et les deux résines Amberlite IRA 93 et Duolite S 30.

Les activités enzymatiques ont été mesurées avec de la caséine comme substrat en suivant la méthode précédemment décrite (voir paragraphe 1.1.2, Préparation continue d'hydrolysats protéiques à l'aide d'une protéase alcaline stabilisée et retenue sous forme soluble). L'activité enzymatique de la préparation enzymatique a été trouvée égale à 360 U/mg.

Les méthodes d'adsorption étaient identiques à celles précédemment décrites (voir paragraphe 2.1.2.1, Essais d'adsorption des pectinases) et les expériences ont été faites à 22°C.

Résultats et discussion

Avec une quantité d'enzyme égale à 3 mg/g de résine les rendements d'activité enzymatique ont été trouvés égaux à 1 % pour la résine IRA 93 et à 0,5 % pour la résine S 30. La désorption a été trouvée plus importante que dans le cas de la pectinase. En effet la perte d'activité est de 50 % entre chaque essai discontinu. Compte tenu de ces résultats et de ceux des expériences continues obtenues avec les pectinases, les expériences n'ont pas été poursuivies.

Egalement à l'écart de la méthode d'adsorption proprement dite la rétention de l'enzyme sur la résine Duolite S 30 a été étudiée en suivant la méthode indiquée par OLSON et STANLEY (1973). Ces auteurs avaient utilisé le glutaraldéhyde après adsorption afin de maintenir l'enzyme sur la résine. Avec une quantité d'enzyme de 7,5 mg par gramme de résine le rendement d'activité enzymatique a été trouvé égal à 0,2 %. Ce rendement a été amélioré en réticulant l'enzyme en présence d'une protéine enzymatiquement inactive, l'albumine : le rendement d'activité était alors de 10 %, mais lors d'une deuxième utilisation celui-ci n'était plus que de 2,5 %.

De la même façon que précédemment des essais de fixation par lien covalent sur la résine IRA 45 ont été faits en suivant la méthode de GLASSMEYER et OGLE (1971) Avec une quantité d'enzyme de 20 mg par gramme de résine, le rendement de fixation a été trouvé égal à 90 %, et les rendements d'activité égaux à 37 % avec le B A E E et à 4,5 % avec la caséine. Avec ce dernier substrat une utilisation continue en réacteur tubulaire à 22°C indique une baisse d'activité de l'ordre de 50 % en 48 heures.

CONCLUSION

D'autres essais sont actuellement en cours au laboratoire, notamment en ce qui concerne l'adsorption d'amylases. Des résultats positifs ont été obtenus tant en ce qui concerne l'activité de certaines enzymes une fois adsorbées, vis à vis de l'amidon ou de substrats de plus petits poids moléculaires, qu'en ce qui concerne la stabilité de l'adsorption (BELLAL et al., 1976).

L'ensemble de ces résultats montre que certaines enzymes se prêtent d'avantage à une immobilisation par adsorption que d'autres. Il n'est pas possible de prévoir le succès ou l'insuccès de la méthode. Ceci dépend de la liaison physique créée, c'est à dire de sa nature, de sa force et de sa réversibilité. S'il n'y a pas de loi générale, il apparaît cependant, à la lueur de la littérature, que certaines enzymes sont plus efficacement adsorbables que d'autres. Dans certains cas des modifications moléculaires, afin de modifier la charge électrique des molécules ont été proposées (SOLOMON et LEVIN, 1975). En ce qui concerne la réversibilité de la liaison, certains cas d'irréversibilité de l'adsorption ont été observés, notamment l'uréase sur kaolinite (SUNDARAM et CROOK, 1971) et la lactate deshydrogénase sur nitrocellulose (THANG et al., 1971). Remarquons que ce phénomène n'est pas un problème dans les cas où l'enzyme immobilisée est encore active et où elle peut être utilisée en continue. Ceci n'est un problème que lorsque se pose celui de la régénération et de la réutilisation du support. Cet aspect particulier a été étudié par TOSA et al. (1969) dans le cas de l'acylase adsorbée sur D E A E-Sephalex.

2.2 - REACTEURS EN LIT FLUIDISE OU L'ENZYME EST
FIXEE DE FACON COVALENTE SUR SUPPORT DENSE

La fluidisation est l'opération par laquelle de fines particules sont suspendues dans un fluide en circulation. Cette suspension est en général réalisée dans un réacteur vertical, le fluide y circulant de bas en haut (KUNII et LEVENSPIEL, 1969). Un tel type de réacteur semble intéressant dans le contexte de la technologie enzymatique. En effet il est permis de supposer que celui-ci, du fait du lavage permanent au cours d'une opération continue, de l'absence de zone morte dans le réacteur, et de la possibilité d'écartement des diverses particules les unes entre elles, permet de limiter la prolifération des micro-organismes et de traiter des liquides troubles. Ce type de réacteur impose cependant de trouver un support dense sur lequel une activité enzymatique suffisante soit retrouvée. La littérature indique quelques essais dans ce sens (ROBINSON et al., 1973 - HASSELBERGER et al., 1974 - CHERYAN et al., 1975). Nous avons étudié ce type de réacteur dans le but initial de réaliser de façon continue des protéolysats. En fait celui-ci s'est révélé peu efficace vis à vis de cette réaction, mais les expériences effectuées nous ont permis de mettre en évidence l'influence de certains paramètres du support (masse volumique apparente) et de la solution (viscosité) sur ses performances. Dans cette étude deux supports ont été utilisés : de la ferrite magnétique et du verre poreux sur lesquels ont été fixé respectivement de la papaïne par réticulation et de la pepsine par lien strictement covalent.

2.2.1 - **ETUDE PRELIMINAIRE : PAPAINE FIXEE
SUR UN SUPPORT MAGNETIQUE**

Reprinted from

Biochimica et Biophysica Acta, 334 (1974) 467-470

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Printed in The Netherlands

BBA Report

BBA 61286

ENZYMES IMMOBILIZED ON A MAGNETIC SUPPORT

PRELIMINARY STUDY OF A FLUIDIZED BED ENZYME REACTOR

GERARD GELLF^{a,*} and JOSEPH BOUDRANT^b

^a L.R.E.M., E.R.A. du C.N.R.S. No. 338, Hôtel Dieu, 76000 Rouen and ^b Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Université des Sciences et Techniques, 34060 Montpellier (France)

(Received November 23rd, 1973)

Summary

Enzymes were immobilized on a magnetic support by a cocross-linking method with an inactive protein. Active porous particles obtained were used in a fluidized bed reactor. Outlet product concentration was measured as a function of flow rate and inlet substrate concentration. No enzyme leakage was observed and a circular magnet surrounding the column was shown to be an efficient device for the retention of fine particles.

A large number of physical and chemical procedures for enzyme insolubilization have been performed and have recently been reviewed [1-3]. In practice, the immobilized enzyme is suited for repetitive or continuous use of its catalytic function, and may be used for multiple analytical and preparative applications.

For these purposes, continuous stirred tank reactors and packed beds were the most commonly used devices [4-5]. In this field, Robinson et al. [7] recently described immobilization of α -chymotrypsin and β -galactosidase on a modified cellulose with magnetic properties. They reported preliminary results for a continuous stirred tank reactor. New methods for binding enzyme molecules into a water insoluble matrix were recently described [6]. About thirty enzymes were efficiently immobilized, and enzyme-porous particles obtained by these methods were packed into a column and the kinetic

Abbreviation: BAEE, N-benzoyl-L-arginine ethyl ester.

*Present address for reprint requests: Université de Technologie de Compiègne, Laboratoire de Technologie Enzymatique, 60206 Compiègne, France.

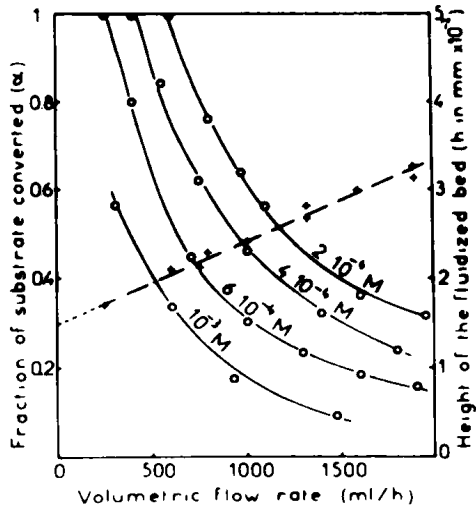


Fig. 1. Fraction of substrate converted (○) and height of the fluidized bed (+ - - - +) vs volumetric flow rate. Molarities of inlet substrate concentrations are indicated on the curves.

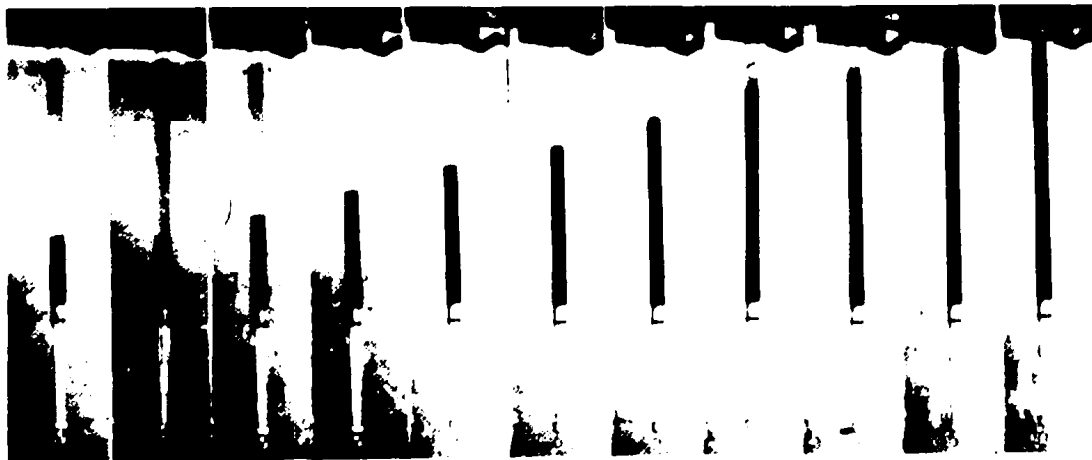


Fig. 2. Photos of the fluidized bed taken at different flow rate values, increasing from 200 ml · h⁻¹ to 2500 ml · h⁻¹ (from left to right)

behaviour of such a reactor was studied for both stationary state and transient conditions [4]. This paper describes the preparation of enzyme immobilized on a magnetic support and the preliminary results obtained when using these particles in a fluidized bed reactor.

Preparation of the immobilized enzymes: the method used is a cocross-linking between the enzyme and an inactive protein (human plasma albumin) with glutaraldehyde. Magnetic iron oxide particles (100–200 μm in diameter and purchased from La Radiotechnique, Evreux-France) are added as an inert charge before polymerization occurs. The procedure for the production of papain (EC 3.4.4.10) active particles is given as an example: 30 g of magnetic

iron oxide are impregnated with 25 ml of 0.02 M phosphate buffer, pH 6.8, containing 8% plasma albumin, 0.4% glutaraldehyde and 100 mg crystalline papain (Miles-Yeda Ltd). A thick suspension was obtained which was frozen at -30°C for several hours, then slowly warmed overnight in a refrigerator at 4°C . The proteinic copolymer formed was thoroughly rinsed, then freeze-dried, ground and sieved to obtain a given range of particle sizes (170–250 microns in diameter).

Measurement of enzyme activities: hydrolysis of *N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) was followed by the absorbance increase at 254 nm, using a thermostated double beam spectrophotometer. For the reactor experiments a continuous flow cell (1-cm light path) was used.

Free enzyme: 10 mg of papain (twice crystallized, purified by affinity chromatography and purchased from Miles-Yeda Ltd) were dissolved in 10 ml 10^{-3} M HCl to avoid proteolysis. BAEE at various concentrations (10^{-3} to 10^{-4} M) was dissolved in pH 6.0, phosphate citrate buffer (0.05 M of each and 10^{-3} M in both cysteine and EDTA). The activity of 50- μl samples of papain solution was measured at various BAEE concentrations. For the free enzyme a maximal activity of 19 I.U. ($\mu\text{moles BAEE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ at pH 6.0 and 20°C) and a $K_m = 5 \cdot 10^{-3}$ M were found.

Bound enzyme: in a thermostated beaker, fitted with a little turbine impeller, 100 mg samples of enzyme particles were suspended in 100 ml phosphate citrate buffer (0.05 M, pH 6.0 and 10^{-3} M in both cysteine and EDTA), containing BAEE at various concentrations. 254 nm absorbance of the solution (pumped through a sintered glass disk) was continuously recorded by using the flow-through spectrophotometric cell. The total circulating volume was 5 ml. For the bound papain a maximal activity of 0.05 I.U. ($\mu\text{moles BAEE} \cdot \text{min}^{-1}$ per mg of support at pH 6.0 and 20°C) and an apparent Michaelis constant $K'_m = 1.2 \cdot 10^{-2}$ M were found. Identical values were found for proteinic copolymers (bearing papain activity) prepared without magnetic particles.

Fluidized bed reactor: 10 g of active porous particles suspended in phosphate citrate buffer were poured in a thermostated chromatographic column (Whatman P.C. 1050: 10 mm internal diameter, 50 cm length). In order to retain particles, the top of the column was surrounded by a circular magnet. Substrate solutions at various concentrations ($2 \cdot 10^{-4}$ M to 10^{-3} M) were made to flow through the column by a peristaltic pump (Desaga A.G. Heidelberg). 254 nm absorbance of the outlet solution was continuously recorded. Precise determination of flow rates was made by collection of the column effluent. Water circulation thermostated the whole system at $20 \pm 0.05^{\circ}\text{C}$. The fraction of substrate converted (α) as a function of the flow rate is presented in Fig. 1. α (dimensionless) is defined as:

$$\alpha = \frac{S_1 - S_0}{S_1}$$

where S_i and S_o are, respectively, the inlet and outlet substrate concentrations. In the experimental conditions selected here, the conversion ratio remains equal to 100% for small flow rates, and decreases with increasing flow rates, the shape of the experimental curve results from various phenomena: related variations of the reaction volume and of the residence time; variation of the concentration of the enzyme particles in the reaction volume; variations in the movement of the particles (with diffusion and backmix effects).

The height of the fluidized bed varied linearly with flow rate (Fig. 1) and the minimum fluidizing velocity [8] was found to be about $250 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Photos of the fluidized bed (without the thermostated jacket) were taken at different flow rates (Fig. 2). A carry over of fine particles occurred at high flow rates but was efficiently stopped by the magnet. The absence of iron and enzyme leakage was checked in the outlet solution. Further work along this line is in progress, including long term assays, kinetic modeling and applications.

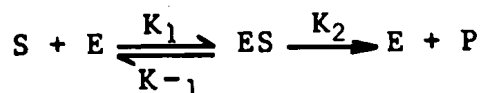
References

- 1 Gryskiewicz, J. (1971) *Folia Biol.* 19, 119-150
- 2 Silman, M.I. and Katchalski, E. (1966) *Annu. Rev. Biochem.* 35, 873-908
- 3 Melrose, G.J. (1971) *Rev. Pure Appl. Chem.* 21, 83-119
- 4 Gelf, G., Kernevez, J.-P., Thomas, D. and Broun, G. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* In the press
- 5 Wingard, L.B. (1972) *Adv. Biochem. Eng.* 2, 1-48
- 6 Broun, G., Thomas, D., Gelf, G., Domurado, D., Berjonneau, A.M. and Guillon, C. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* 15, 359-375
- 7 Robinson, P.J., Dunnill, P. and Lilly, M.D. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* 15, 603-606
- 8 Denbigh, K.G. and Turner, J.C.R. (1971) *Chemical Reactor Theory*, pp. 155-163, Cambridge University Press

2.2.2 - PERFORMANCES DU REACTEUR A LIT FLUIDISE

2.2.2.1 - COMPARAISON DES EFFICACITES DES REACTEURS A LITS FIXE ET FLUIDISE

Les expériences précédentes permettent de comparer les performances de deux réacteurs tubulaires supposés identiques à la seule différence que l'un est à lit fixe et l'autre à lit fluidisé. Dans le cas d'une cinétique michaélienne, cas de la réaction étudiée, hydrolyse du BAEE par la papaïne, la transformation d'un substrat S en produit P par une enzyme E est classiquement représentée par l'équation suivante :



La vitesse de réaction r est donnée par l'expression :

$$r = - \frac{d(S)}{dt} = k_2 \frac{E_0}{V} \frac{1}{1 - \frac{K_m}{(S)}}$$

où E_0 est la quantité d'enzyme introduite dans le volume V du réacteur et (S) la concentration du substrat au temps t.

Cette expression combinée avec celle du bilan de matière d'un réacteur tubulaire à lit fixe (établie sur un élément de volume) aboutit à la relation suivante (LILLY et SHARP, 1968) :

$$x \frac{(S_0)}{K_m} - \text{Log} (1 - x) = \frac{K_2 E_0}{K_m Q} \quad (1)$$

où X est le taux de conversion, et Q le débit dans le réacteur.

En ce qui concerne le lit fluidisé, une variation du volume réactionnel en fonction du débit est observée.

L'explication de cette variation nécessite de considérer le phénomène de la décantation d'une particule de diamètre D, de masse volumique ρ_2 se déplaçant à la vitesse v dans un fluide de masse volumique ρ_1 et de viscosité η . Cette particule est soumise à une force F_1 due à la différence entre l'action de la

pesanteur sur elle et sur le fluide (LONCIN, 1961) :

$$F = \frac{1}{6} \pi D^3 (\rho_2 - \rho_1) g$$

Lorsque cette particule se déplace, le fluide oppose à ce mouvement une force F_2 qui augmente en valeur absolue avec la vitesse de déplacement (loi de Stokes) :

$$F_2 = 3 \pi \eta D v$$

La résultante des forces agissant sur la particule est égale à tout moment à $F_1 - F_2$ et provoque une accélération $\frac{dv}{d\theta}$ telle que :

$$\frac{dv}{d\theta} = \frac{F_1 - F_2}{\frac{1}{6} \pi D^3 \rho_2}$$

c'est-à-dire :

$$\frac{dv}{d\theta} = \left(\frac{\rho_2 - \rho_1}{\rho_2} \cdot \frac{18 \eta v}{D^2 g \rho_2} \right) g$$

Cette relation permet de déterminer la valeur de la vitesse limite de décantation v_ℓ de la particule dans le liquide $\left(\frac{dv}{d\theta} = 0 \right)$, c'est-à-dire la vitesse intersticielle moyenne du fluide autour des particules :

$$v_\ell = (\rho_2 - \rho_1) \frac{D^2 g}{18 \eta} \quad (2)$$

La comparaison de cette valeur avec la vitesse d'élévation du liquide dans le réacteur (de section s) permet de déterminer si la particule reste ou non dans celui-ci.

Considérons le premier cas, seul intéressant. La quantité de particule introduite (volume V_0) entraîne une diminution de la section occupée par le fluide et une augmentation de sa vitesse intersticielle. Et la suspension des particules se réalise d'une façon telle que cette vitesse soit égale à la vitesse limite de sédimentation v_ℓ . Ce phénomène se traduit par une augmentation du volume du milieu réactionnel V telle que :

$$V = \frac{V_0}{1 - \frac{Q}{Q_0}} \quad (3)$$

Dans le cas présent (voir paragraphe 2.2.1, Etude préliminaire ; papaïne fixée sur un support magnétique) la Figure 1 montre la variation du volume du réacteur en fonction du débit. Celle-ci semble linéaire. En fait ceci n'est qu'une apparence et la zone indiquée correspond à la branche inférieure de l'hyperbole représentant la variation de V en fonction de Q (faibles valeurs de $\frac{Q}{v_l s}$).

La relation précédente (3) permet de modifier la formule du volume élémentaire intervenant dans le bilan du réacteur tubulaire en lit fluidisé. L'intégration de l'équation obtenue en combinant ce bilan et l'expression de la vitesse de réaction aboutit à la relation suivante :

$$X \frac{(S_0)}{K_m} - \text{Log} (1 - X) = \frac{K_2 E_0}{K_m Q} \left(1 - \frac{Q}{v_l s} \right) \quad (4)$$

La comparaison des relations (1) et (4) permet dès à présent de dire que le taux d'hydrolyse mesuré en sortie du réacteur à lit fluidisé est plus faible que celui mesuré en sortie du réacteur à lit fixe. Tout se passe comme si, dans le cas du réacteur à lit fluidisé, la constante K_2 était multipliée par $(1 - \frac{Q}{v_l s})$ grandeur inférieure à l'unité. Afin de visualiser plus précisément cette comparaison d'efficacité des deux réacteurs, la fonction implicite suivante

$$\left[X \frac{(S_0)}{K_m} - \text{Log} (1 - X) \right] = \left[Y \frac{(S_0)}{K_m} - \text{Log} (1 - Y) \right] \left(1 - \frac{Q}{v_l s} \right) \quad (5)$$

obtenue à partir des équations (1) et (2) a été résolue. X est le taux d'hydrolyse mesuré à la sortie du lit fluidisé et Y celui mesuré à la sortie du lit fixe.

Les courbes obtenues par les valeurs de $\frac{(S_0)}{K_m}$ égales à $0,83 \cdot 10^{-1}$ et $1,66 \cdot 10^{-2}$, correspondantes aux valeurs expérimentales de concentration de BAEE précédemment utilisées (voir paragraphe 2.2.1) 10^{-3} M et $2 \cdot 10^{-4}$ M sont indiquées sur les Figures 3 et 4. La Figure 3 indique la variation des taux d'hydrolyse en fonction du débit de la solution dans les réacteurs : plus celui-ci est élevé, plus le réacteur à lit fixe comparé au réacteur à lit fluidisé est efficace. La Figure 4 schématise la comparaison des performances des deux réacteurs : le réacteur à lit fixe est d'autant plus avantageux que la concentration en substrat est plus faible. Mais les efficacités sont comparables lorsque la concentration initiale en substrat est importante par rapport au K_m .

Dans le cas présent (voir paragraphe 2.2.1, Etude préliminaire ; papaïne fixée sur un support magnétique) la Figure 1 montre la variation du volume du réacteur en fonction du débit. Celle-ci semble linéaire. En fait ceci n'est qu'une apparence et la zone indiquée correspond à la branche inférieure de l'hyperbole représentant la variation de V en fonction de Q (faibles valeurs de $\frac{Q}{v_l s}$).

La relation précédente (3) permet de modifier la formule du volume élémentaire intervenant dans le bilan du réacteur tubulaire en lit fluidisé. L'intégration de l'équation obtenue en combinant ce bilan et l'expression de la vitesse de réaction aboutit à la relation suivante :

$$X \frac{(S_0)}{K_m} - \text{Log} (1 - X) = \frac{K_2 E_0}{K_m Q} \left(1 - \frac{Q}{v_l s} \right) \quad (4)$$

La comparaison des relations (1) et (4) permet dès à présent de dire que le taux d'hydrolyse mesuré en sortie du réacteur à lit fluidisé est plus faible que celui mesuré en sortie du réacteur à lit fixe. Tout se passe comme si, dans le cas du réacteur à lit fluidisé, la constante K_2 était multipliée par $(1 - \frac{Q}{v_l s})$ grandeur inférieure à l'unité. Afin de visualiser plus précisément cette comparaison d'efficacité des deux réacteurs, la fonction implicite suivante

$$\left[X \frac{(S_0)}{K_m} - \text{Log} (1 - X) \right] = \left[Y \frac{(S_0)}{K_m} - \text{Log} (1 - Y) \right] \left(1 - \frac{Q}{v_l s} \right) \quad (5)$$

obtenue à partir des équations (1) et (2) a été résolue. X est le taux d'hydrolyse mesuré à la sortie du lit fluidisé et Y celui mesuré à la sortie du lit fixe.

Les courbes obtenues par les valeurs de $\frac{(S_0)}{K_m}$ égales à $0,83 \cdot 10^{-1}$ et $1,66 \cdot 10^{-2}$, correspondantes aux valeurs expérimentales de concentration de BAEE précédemment utilisées (voir paragraphe 2.2.1) 10^{-3} M et $2 \cdot 10^{-4}$ M sont indiquées sur les Figures 3 et 4. La Figure 3 indique la variation des taux d'hydrolyse en fonction du débit de la solution dans les réacteurs : plus celui-ci est élevé, plus le réacteur à lit fixe comparé au réacteur à lit fluidisé est efficace. La Figure 4 schématise la comparaison des performances des deux réacteurs : le réacteur à lit fixe est d'autant plus avantageux que la concentration en substrat est plus faible. Mais les efficacités sont comparables lorsque la concentration initiale en substrat est importante par rapport au K_m .

Y, lit fluidisé

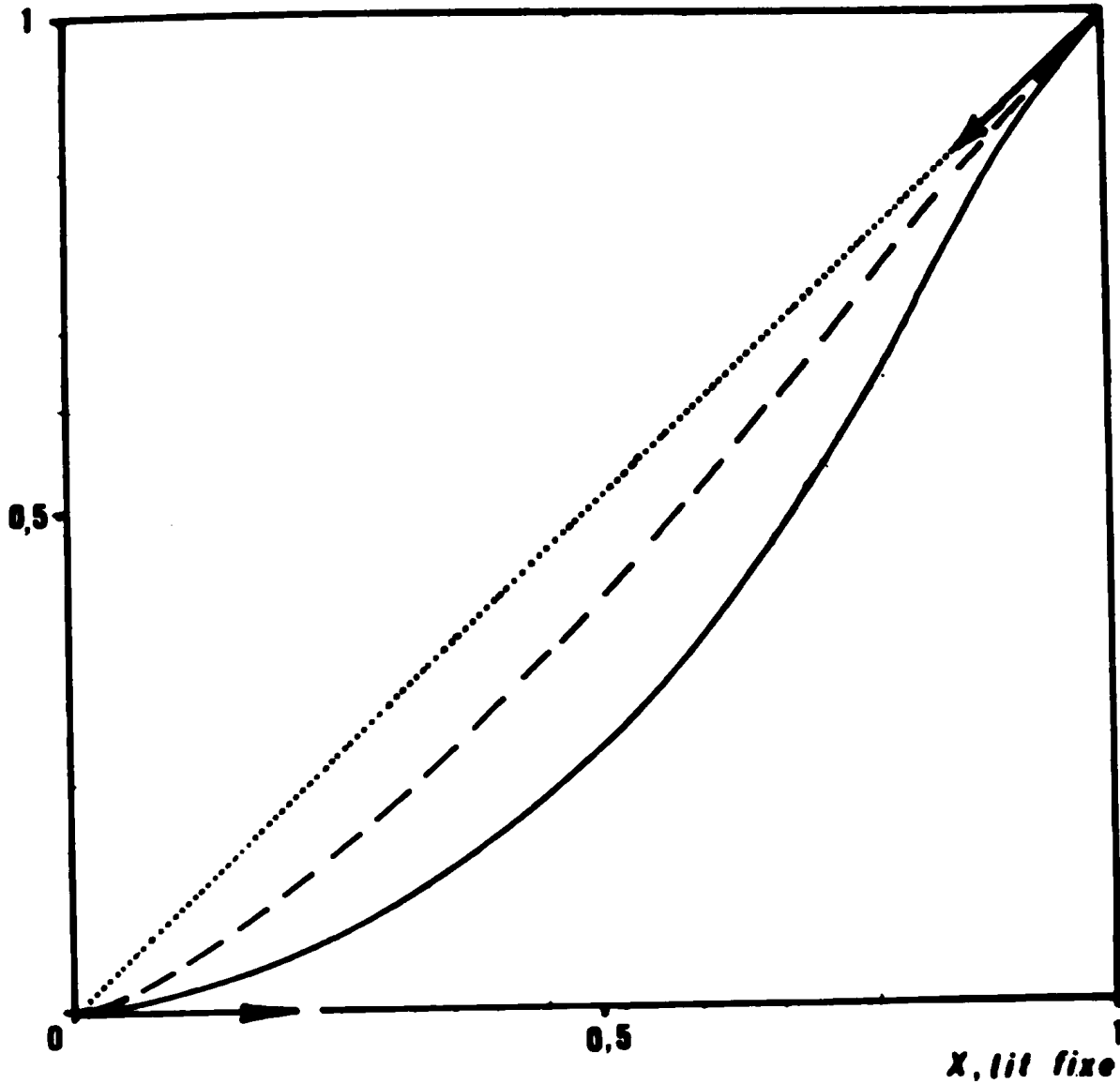


FIGURE 4

Comparaison des performances entre réacteur à lit fixe et réacteur à lit fluidisé.

$$\frac{(So)}{Km} = 1,66 \cdot 10^{-2} \text{ (---)}, \quad \frac{(So)}{Km} = 0,83 \cdot 10^{-1}$$

2.2.2.2 - INFLUENCE DE LA MASSE VOLUMIQUE APPARENTE DES PARTICULES ET DE LA VISCOSITE DE LA SOLUTION DE SUESTRAT SUR LES PERFORMANCES DU REACTEUR EN LIT FLUIDISE

Ainsi qu'il vient d'être vu les efficacités des deux

types de réacteur (à lit fixe et à lit fluidisé) sont équivalentes lorsque la concentration du substrat est élevée. Ceci appelle cependant quelques remarques dans la mesure où une augmentation de la concentration en substrat entraîne une augmentation de la viscosité et de la densité de la solution, c'est-à-dire, dans ce dernier cas une diminution de la masse volumique apparente des particules. Si l'on fait abstraction de la modification possible du régime d'écoulement de la solution autour de la particule, ceci se traduira dans le seul cas du réacteur à lit fluidisé par une modification de l'équilibre de la suspension des particules et de la valeur du taux d'hydrolyse mesuré en sortie du réacteur. Aussi l'influence des deux paramètres, densité apparente des particules ($\rho_2 - \rho_1$) et de la viscosité (η) sur le taux d'hydrolyse en sortie de réacteur a-t-elle été étudiée à l'aide de la fonction obtenue en remplaçant dans la relation (4), la vitesse limite de sédimentation v_{ℓ} par son expression analytique (relation 2). La Figure 5 visualise les variations de la fonction $X = f(\rho_2 - \rho_1)$ pour les valeurs de $\frac{(S_0)}{K_m}$ égales à $0,83 \cdot 10^{-1}$ et $1,66 \cdot 10^{-2}$ et des débits égaux à 250, 500, 1000 et 1500 ml/h. Les courbes obtenues passent par l'axe des abscisses en des valeurs de la masse volumique apparente ($0,32 ; 0,75 ; 1,5 ; 2,25 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$) correspondantes à une hauteur de réacteur théoriquement infinie, et en deçà desquelles le support est exclu du réacteur. En delà de ces valeurs (proportionnelles au débit) les particules restent et s'équilibrent dans le réacteur en une position déterminée par la relation (3). Cette même figure montre que le taux d'hydrolyse mesuré en sortie de réacteur est, dans des conditions données, une fonction croissante de la masse volumique apparente des particules, que cette croissance est d'autant plus importante que la masse volumique est plus faible, et que ce taux d'hydrolyse tend vers une limite supérieure égale à celui de la solution sortant du réacteur à lit fixe correspondant.

La Figure 6 représente les courbes de variation du taux d'hydrolyse mesuré en sortie de colonne en fonction de la viscosité de la solution pour des valeurs de $\frac{(S_0)}{K_m}$ égales à $0,83 \cdot 10^{-1}$ et $1,66 \cdot 10^{-2}$ et des débits égaux à 250, 500, 1000 et 1500 ml/h. Ces courbes coupent l'axe des abscisses en des valeurs de la viscosité de la solution de substrat au delà desquelles le support est exclu du réacteur. Elles coupent l'axe des ordonnées en des valeurs de taux d'hydrolyse égales à celui des solutions sortant du réacteur à lit fixe correspondant.

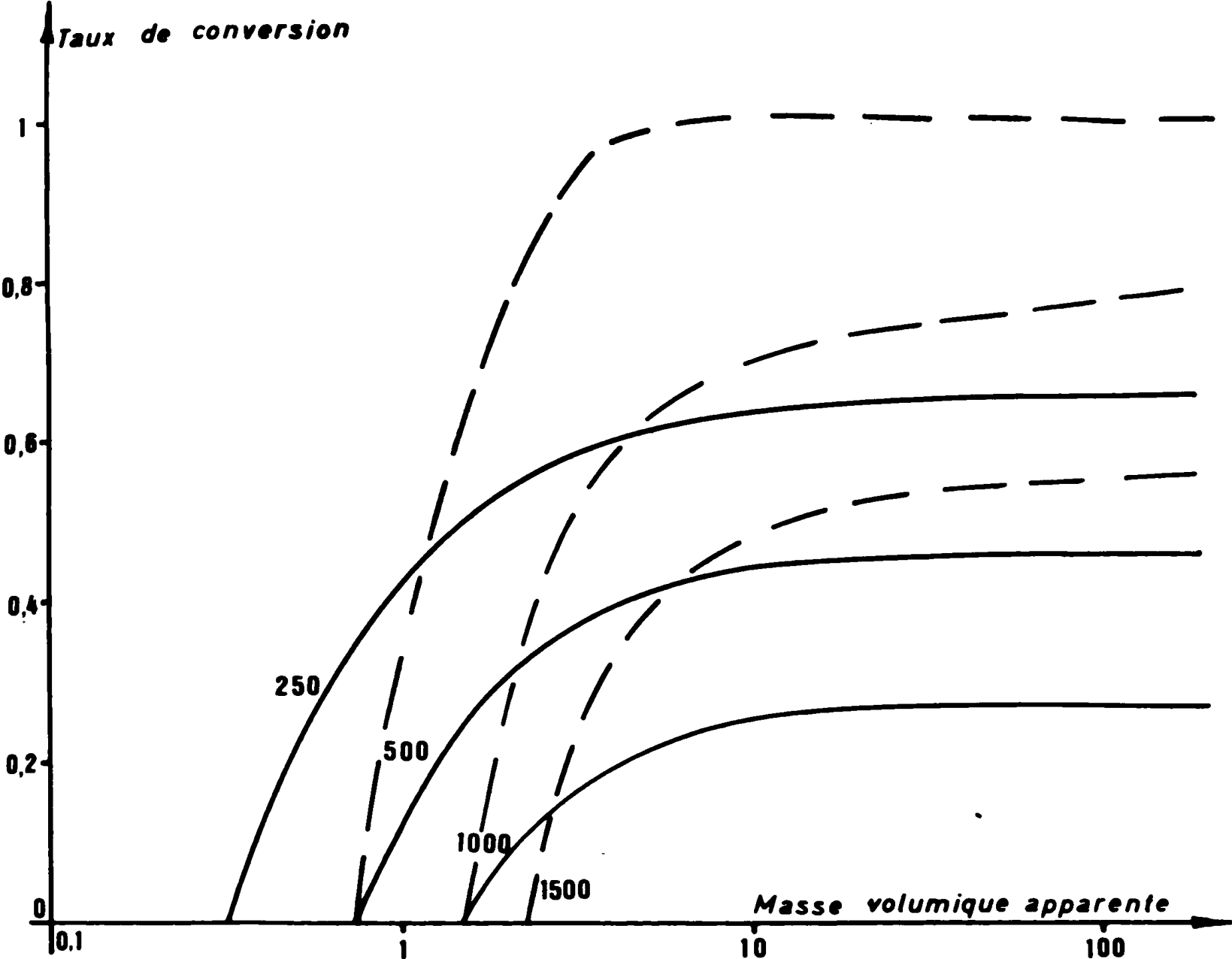


FIGURE 5

Variation théorique du taux d'hydrolyse mesuré en sortie du réacteur à lit fluidisé en fonction de la masse volumique apparente des particules.

$$\frac{(S_0)}{K_m} = 1,66 \cdot 10^{-2} \quad (- - -)$$

$$\frac{(S_0)}{K_m} = 0,83 \cdot 10^{-1} \quad (—)$$

Les valeurs des débits (ml/h) sont indiquées sur les courbes.

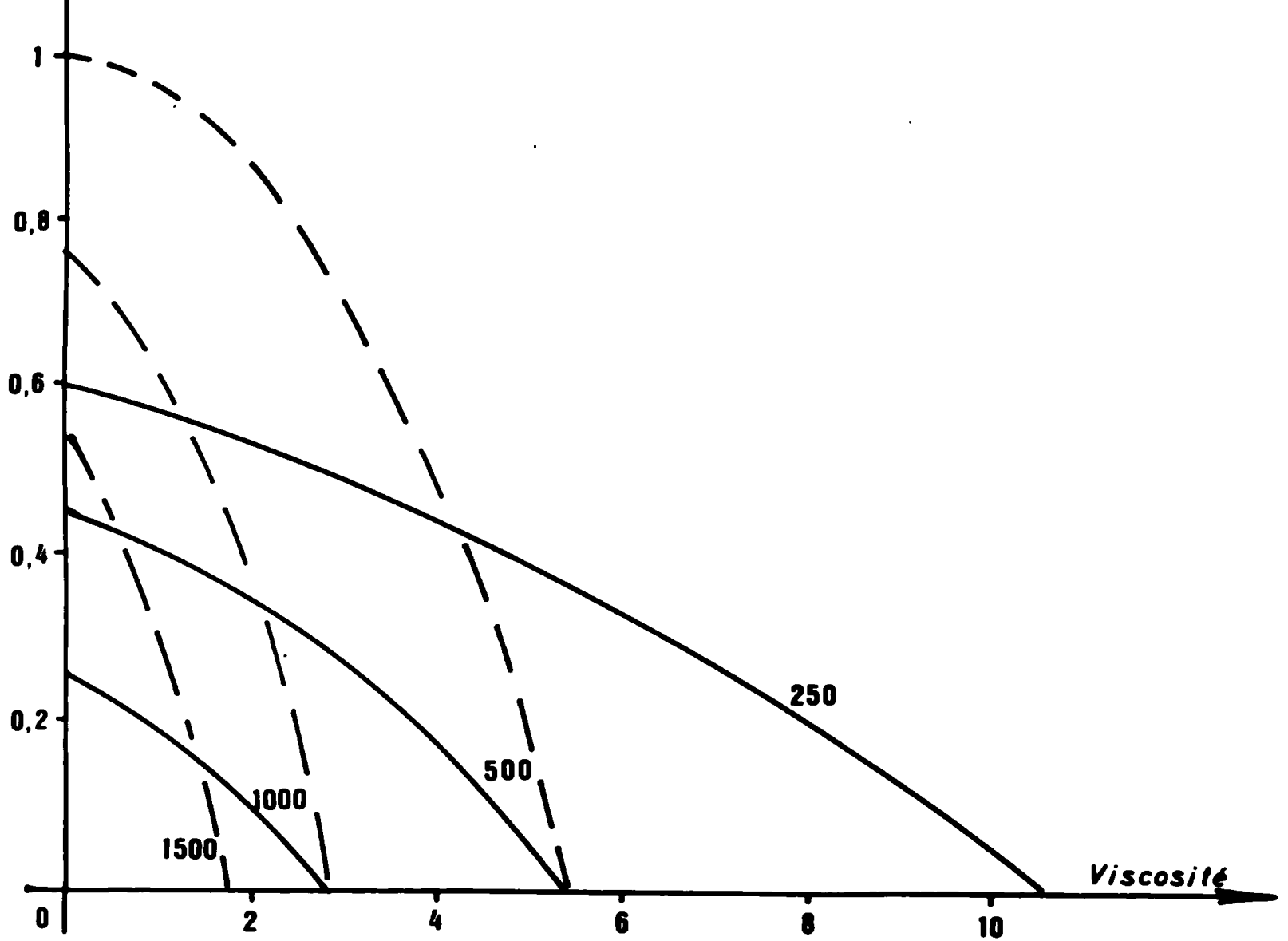


FIGURE 6

Variations théoriques du taux d'hydrolyse mesuré en sortie du réacteur à lit fluidisé en fonction de la viscosité du liquide circulant dans le réacteur.

$$\frac{(So)}{Km} = 1,66 \cdot 10^{-2} \quad (---)$$

$$\frac{(So)}{Km} = 0,83 \cdot 10^{-1} \quad (—)$$

Les valeurs des débits (ml/h) sont indiquées sur les courbes.

2.2.2.3 - ESSAI DE REALISATION PRATIQUE, APPLICATION A LA PROTEOLYSE

Choix du support, de l'enzyme et de la méthode de fixation

Afin de tester l'efficacité pratique du réacteur à lit fluidisé deux essais ont été faits en utilisant la méthode précédemment décrite (voir paragraphe 2.2.1, Réticulation à l'aide de glutaraldéhyde) et en vue d'hydrolyser une solution de caséine de concentration 1% (P/V) à pH 7 et 25°C. 100 mg de papaïne puis 100 mg de protéases extraites de Streptomyces griseus ont été réticulées avec 30 g de particule magnétique. Dans ces deux cas les particules enzymatiques obtenues ont été trouvées pratiquement inactives vis à vis de ce substrat. En ce qui concerne la papaïne une telle observation a déjà été faite par BROUN (1973).

La perte d'activité enzymatique après fixation est un phénomène important et ceci a déjà été signalé par de nombreux auteurs, notamment en ce qui concerne les protéases. Ainsi AXEN et ERNBACK (1971) ont observé que la fixation de la chymotrypsine et de la trypsine à l'aide de la méthode utilisant le bromure de cyanogène sur de la cellulose mercerisée et du Sephalex G 200, entraînait une perte de l'activité enzymatique vis à vis de la caséine mais non vis à vis de substrats de petits poids moléculaires. Par contre d'autres supports tels que Sépharose et Agarose ont donné des activités non négligeables avec ces deux substrats. Ces résultats variables pourraient être dûs à des changements de conformation des molécules enzymatiques. GABEL et al. (1971) ont en effet mis en évidence une modification du spectre de fluorescence des enzymes après fixation lorsqu'il y a une perte notable de l'activité vis à vis de substrats de gros poids moléculaires. Des modifications chimiques de l'enzyme peuvent en être également la cause. Un tel phénomène a déjà été observé par BAR ELI et KATCHALSKI (1963) lors de la fixation de la trypsine sur un sel insoluble de polydiazonium et par nous même (voir paragraphe 1.1.2, Préparation continue d'hydrolysats protéiques à l'aide d'une protéase alcaline stabilisée et retenue sous forme soluble).

Le désir d'obtenir une activité enzymatique immobilisée suffisamment élevée nous a suggéré le choix d'une enzyme et d'une méthode de fixation dont on sait qu'elle donne des résultats satisfaisants en ce qui concerne les rendements d'activité mesurés avec des substrats protéiques et également en ce qui concerne la stabi-

lité de l'activité enzymatique immobilisée, et ceci avec un support suffisamment dense afin de pouvoir réaliser un réacteur en lit fluidisé. Nous avons retenu la technique d'immobilisation faisant appel à un carbodiimide comme réactif de liaison, le support étant préalablement activé avec du α -aminopropyltriéthoxysilane, selon la méthode mise au point par LINE et al. (1971) et reprise plus récemment par CHERYAN et al (1975). Comme pour ces auteurs l'enzyme et le support étaient respectivement la pepsine et le verre poreux.

Matériels et Méthodes

Réactifs et produits

La pepsine (E.C. 3.4.4.1.) provient de Worthington Biochemical corp, la caséine selon Hammarsten et le tetrahydrofumane de Merck, le γ -aminopropyltriéthoxysilane et le 1-cyclohexy-3-2 (morpholinoethyl) carbodiimide métho-p-toluène sulfonate (C.M.C.) de Aldrich.

Le verre poreux Spherosyl XOC 005 provient de Rhône-Progil. Sa masse volumique est égale à 5 g/cm^3 , et la taille des particules comprise entre 100 et 200 μ .

Matériels

Le réacteur tubulaire utilisé pour la réalisation du lit fluidisé a une section interne égale à 2 cm^2 , sa hauteur est de 150 cm. L'introduction continue de liquide dans le réacteur est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique Biolafitte.

Méthodes

L'unité d'activité enzymatique est la quantité d'enzyme qui provoque par minute, à 22°C , une augmentation de 10^{-3} unité de densité optique à 280 nm sur le surnageant d'une solution de caséine 1% (P/V), ajustée à pH 2 (avec de l'acide chlorhydrique) soumise à une précipitation, volume à volume, avec une solution d'acide trichloracétique à 30% (P/V), puis à une centrifugation (2800 g x 10 mm).

Certaines réactions de protéolyse ont été suivies au cours du temps. La méthode utilisée est identique à la précédente, les dilutions du surnageant étant faites de façon à ce que leur densité optique soit inférieure à 1. Les taux de protéo-

lyse ont été calculés à l'aide des densités optiques obtenues dans les mêmes conditions après hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 6N à 80°C pendant 6 heures.

Immobilisation de l'enzyme

Ainsi qu'il a été dit précédemment, la méthode de fixation utilisée est celle mise au point par LINE et al. (1971).

Un échantillon de 100 g de verre poreux Spherosyl XOC 005 a été lavé pendant 3 heures dans de l'acide nitrique 0,2 N à 80°C. Après lavage à l'eau distillée, ce verre poreux a été chauffé à 300°C pendant 12 heures. Après refroidissement, 1 litre d'une solution à 10 % (V/V) de l' γ -aminopropyltriéthoxysilane dans du toluène a été ajouté à 25 g de verre. Le mélange a été bouilli sous reflux pendant 24 heures, puis lavé avec de l'acétone et séché. Cette activation a donc été faite en 4 fois (4 x 25 g). Les échantillons obtenus ont été mélangés et introduits dans 500 ml d'eau distillée contenant 5 g de pepsine. 50 mg du carbodiimide C.M.C. ont alors été ajoutés. Le pH a été ajusté à 4 avec de l'acide chlorhydrique pendant 30 minutes à température ordinaire puis une nuit à 4°C. Le produit a été lavé avec de l'eau distillée puis stocké à 4°C dans de l'acide chlorhydrique 0,001 M.

Viscosité

Les mesures de viscosité sont faites à l'aide d'un viscosimètre à écoulement (22°C). Le calcul des viscosités est fait par rapport à l'eau.

Résultats et discussion

Expériences préliminaires

L'activité enzymatique de la pepsine a été trouvée égale à 350 unités/mg.

Lorsque la quantité d'enzyme utilisée lors de la fixation est de 50 mg/g de support le rendement d'activité vis à vis de la caséine a été trouvé égal à 20 % et un maximum de 4200 unités par g de support a pu être retrouvé (quantités d'enzyme utilisées supérieures ou égales à 100 mg/g de support).

Les zones de pH optimum de l'enzyme libre et de l'enzyme fixée ont été trouvées identiques et égales à 2 ce qui est conforme aux résultats indiqués par LINE et al. (1971).

Si des essais discontinus ont provoqué une baisse d'activité de l'ordre de 10 % entre chaque utilisation d'un même échantillon de support enzymatiquement actif, cette diminution ne semble cependant pas devoir être imputée à la désorption d'une partie de l'enzyme qui serait non fixée. En effet la stabilité de l'activité enzymatique du support a été vérifiée en réacteur tubulaire sur une période de 15 jours (22°C, pH 2). Il est plus vraisemblable que cette baisse soit due à un phénomène d'attrition des particules lors de leur utilisation en réacteur agité. En effet il a été observé qu'une telle agitation provoquait une diminution rapide de leur taille. De plus ce type de support, utilisé tel quel, ne semble pas convenir pour la réalisation d'un réacteur tubulaire en lit fixe : des phénomènes de colmatage interviennent lorsque la concentration des solutions de caséine est supérieure à 1 %.

Protéolyses discontinues

Lors des essais discontinus et continus réalisés dans le réacteur tubulaire, la quantité d'enzyme utilisée lors de la fixation était égale à 50 mg/g de support et 3500 unités ont été retrouvées par gramme de support.

Des expériences discontinues effectuées à 22°C avec des solutions de caséine de concentration 1 %, 2 %, 3 %, 4 % et 5 % (P/V) à pH 2 (maintenues avec de l'acide chlorhydrique 4 N) avec le support enzymatiquement actif, 400 ml de solution de caséine et 10 g de verre poreux) ont permis de constater que la réaction de protéolyse peut être considérée comme suivant approximativement une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat, lorsque le taux d'hydrolyse est inférieur à 0,8 (voir Figure 7). Au delà de cette valeur un phénomène de ralentissement de la réaction est observé. Ce phénomène pourrait être dû à une inhibition par les produits de la réaction (voir paragraphe 1.1.2, Préparation continue d'hydrolysats protéiques à l'aide d'une protéase stabilisée retenue sous forme soluble).

Ce résultat, c'est-à-dire que la réaction de protéolyse puisse être assimilée à une réaction de premier ordre jusqu'à un taux d'hydrolyse d'environ 0,8, a permis de vérifier expérimentalement l'influence de la viscosité de la solution de substrat sur le taux de conversion obtenu en sortie de réacteur, phénomène qui a été préalablement exposé théoriquement dans le cas d'une cinétique michaé-

lienne. On sait en effet que la viscosité d'une solution de caséine varie de façon importante en fonction de la concentration. Ainsi les solutions de caséine précédentes et non hydrolysées ont à 22°C des viscosités (mesurées à l'aide du viscosimètre à écoulement) égales à 2,87 ; 6,86 ; 16,6 ; 31,2 et 71,3 cp. La variation de viscosité de ces différentes solutions a été évaluée en fonction du temps de réaction et exprimée en fonction du taux de protéolyse après avoir séparé par centrifugation (2800 g x 10 mm), les particules de verre poreux contenues dans les diverses parties aliquotes prélevées (50 ml) et sur lesquelles les mesures ont été faites. La Figure 8 indique les résultats obtenus. Une diminution approximativement linéaire de la viscosité en fonction du temps est observée : ceci se traduit par une variation relativement faible de la viscosité lors du début de la réaction (exprimé en taux de protéolyse). Il semble ainsi que la pepsine ait un comportement vis à vis de la viscosité de ces solutions différent de celui observé avec d'autres protéases que nous avons utilisées (voir paragraphe 1.1.2, Préparation continue d'hydrolysats protéiques). Ce phénomène n'a pas été approfondi mais il pourrait être dû à une spécificité plus étroite de cette enzyme (BARMAN, 1969).

Protéolyses continues en réacteur à lit fluidisé

Dans le cas présent où l'on peut supposer que la réaction suit approximativement une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat la relation indiquant l'influence des divers paramètres du système sur le taux d'hydrolyse mesuré en sortie de colonne (analogue à la relation 4) peut se mettre sous la forme :

$$\text{Log} \frac{1}{1 - X} = K.V_o.V. \frac{(1 - A\eta)}{Q} \quad (6)$$

ou K est la constante de vitesse de réaction (h⁻¹) par ml de support enzymatiquement actif (0,5 g),

V_o est le volume (ml) de support enzymatiquement actif introduit dans le réacteur,

V est le volume (ml) de la suspension des particules pendant la réaction continue,

A est une constante obtenue en combinant les relations (2) et (3) (cp⁻¹).

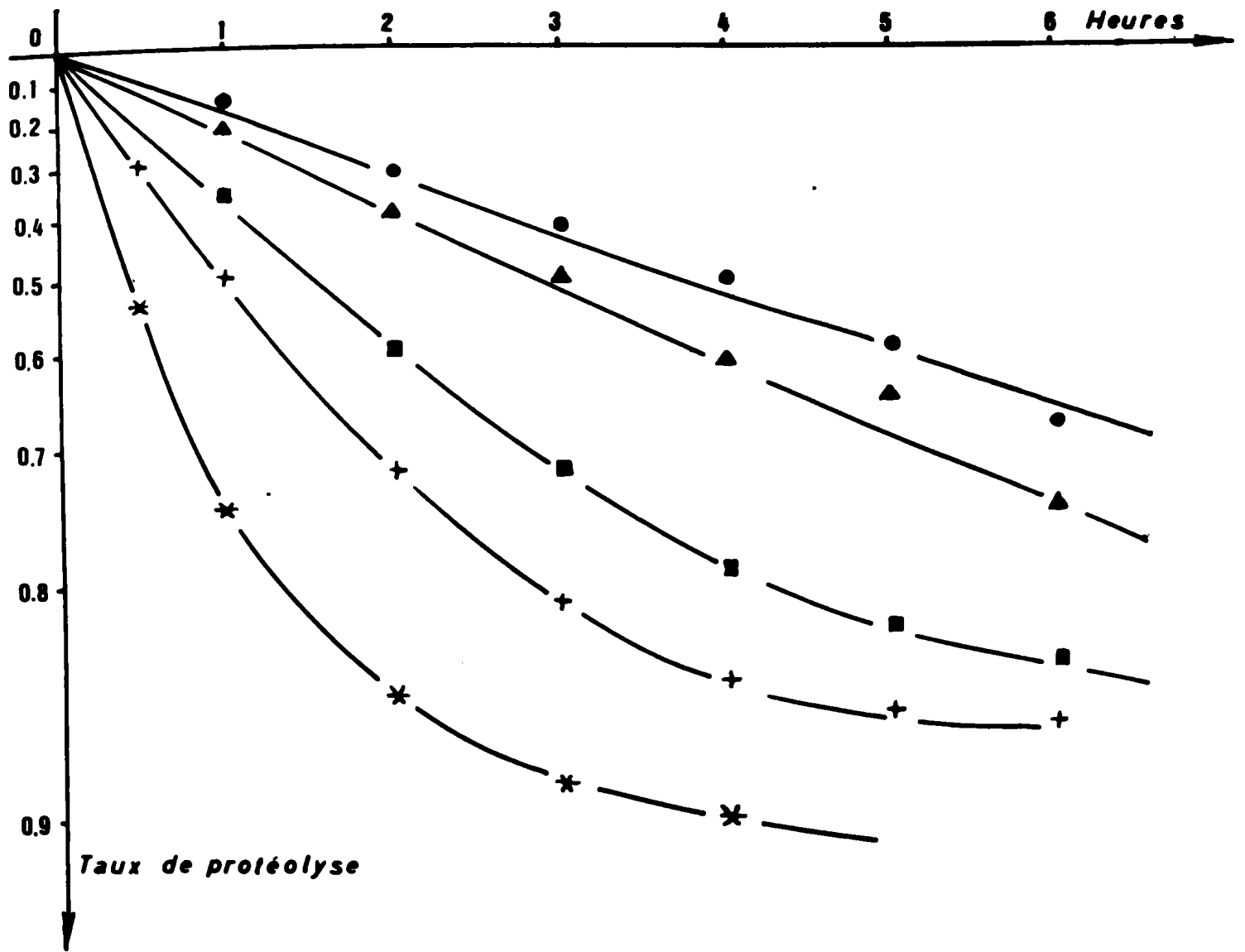


FIGURE 7

Cinétique de la réaction de protéolyse de solutions de caséine par de la pepsine immobilisée sur du verre poreux. Représentation de $\text{Log}(1 - X)$ en fonction du temps. 22°C ; pH 2 ; 10 g de support enzymatiquement actif dans 400 ml de solution ; concentration de caséine 1 % (* — *), 2 % (+ — +), 3 % (■ — ■), 4 % (▲ — ▲), 5 % (● — ●).

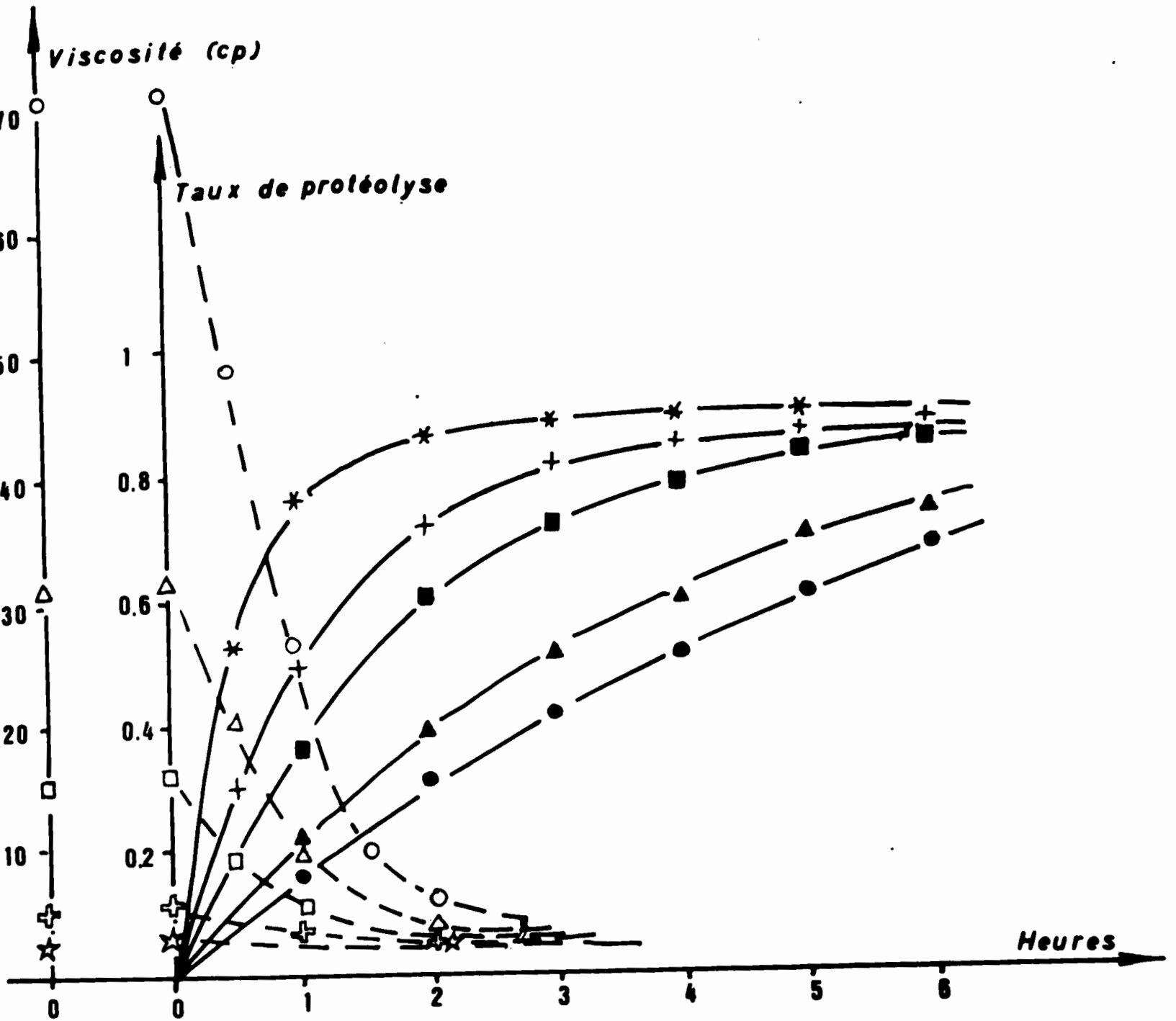


FIGURE 8

Evolution du taux de protéolyse et de la viscosité de solutions de caséine lors de la protéolyse par de la pepsine immobilisée sur verre poreux.
 22°C ; pH 2 ; 10 g de support enzymatiquement actif dans 400 ml de solution.

Concentration de caséine	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %
Taux de protéolyse	★	+	■	▲	●
Viscosité	☆	⊕	□	△	○

Les courbes de la Figure 8 ont permis de calculer la valeur de la constante de vitesse de réaction pour 1 ml (0,5 g) de support enzymatiquement actif et pour les différentes concentrations de caséine utilisées (Tableau 1).

Le débit des solutions dans le réacteur a été fixé à 200 ml/h, valeur telle que des différences significatives dans l'écartement des billes puissent être observées.

Les valeurs de la constante A ont été préalablement déterminées avec les solutions de caséine non hydrolysées et 10 ml de support inactif. Une décroissance de cette constante en fonction de la viscosité est observée (Tableau 1) : ceci laisse supposer que la sédimentation des particules ne suit pas exactement la loi de Stokes. Ce phénomène n'a pas été expliqué. La détermination des valeurs de A a permis de choisir des quantités V_0 de support enzymatiquement actif de façon à obtenir un produit $K.V_0.V$ compris entre 190 et 213 $\text{ml}^2 \cdot \text{h}^{-1}$. La constance de ce facteur, ainsi que l'indique la relation (6), permet en effet de vérifier l'influence de la viscosité sur le taux de conversion en sortie de réacteur.

Après équilibration des diverses solutions avec les quantités correspondantes de support enzymatiquement actif, des prises d'échantillon (3 par essais) ont été faites à des intervalles de 3 heures. Sur chacun de ces échantillons ont été effectuées les mesures de viscosité et de taux de protéolyse. Les volumes du milieu réactionnel correspondant à la fluidisation des particules ont été notés. Les valeurs indiquées sur le Tableau 1 correspondent à la moyenne des trois mesures. Les constantes A ont été recalculées en prenant comme viscosité la moyenne arithmétique des viscosités des solutions entrante et sortante du réacteur. [Ceci en application de la diminution linéaire de viscosité qui a été préalablement observée (cf. Figure 8)]. Elles ont été trouvées légèrement inférieures aux précédentes.

En ce qui concerne les taux de protéolyse, ceux ci sont indiqués sur le Tableau 1 et rassemblés sur la Figure 9. Dans cette dernière représentation les résultats sont indiqués par des barres horizontales limitant des intervalles de viscosité correspondants aux valeurs à l'entrée et à la sortie du réacteur, pour chacune des solutions. Si les taux de protéolyse expérimentale sont légèrement inférieurs aux valeurs théoriques obtenues à l'aide de la relation (6), les allures de décroissance du taux de protéolyse en fonction de la viscosité sont identiques.

Concentration des solutions de caséine % (P/V)	Viscosité initiale (c _p)	Constante de vitesse de réaction K par ml de support ou 0,5 g (h ⁻¹)	Volume de support utilisé V ₀ (ml)	Volume occupé par le support V (ml)	Viscosité finale (c _p)	Viscosité moyenne	A (c _p ⁻¹)	Taux de protéolyse	
								X théorique	X mesuré
1 (*)	2,87	0	10	15			0,120 (*)		
1	2,87	1,45	10	14	2,12	2,49	0,114	0,51	0,45
2 (*)	6,86	0	10	22,8			0,082 (*)		
2	6,86	0,7	12	22,6	4,23	5,54	0,085	0,43	0,2
3 (*)	16,6	0	10	40			0,045 (*)		
3	16,6	0,45	13	33	6,16	11,4	0,053	0,32	0,12
4 (*)	31,2	0	10	70			0,027 (*)		
4	31,2	0,25	13,5	63	10,2	20,7	0,039	0,165	0,04
5 (*)	71,3	0	-	exclusion			-	-	-
5	71,3	0,2	-	exclusion			-	-	-

TABLEAU 1 : Protéolyses continues de solutions de caséine dans le réacteur en lit fluidisé. Performance du réacteur en fonction de la viscosité de la solution à hydrolyser. Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte.

(*) valeurs déterminées avec des solutions de caséine non hydrolysées. Les valeurs de A sont calculées à l'aide de l'expression $V_0 = V(1 - An)$. Les taux d'hydrolyse théoriques sont calculés à l'aide de l'expression

$$\log \frac{1}{1 - X} = \frac{K \cdot V_0 \cdot V}{Q} (1 - An)$$

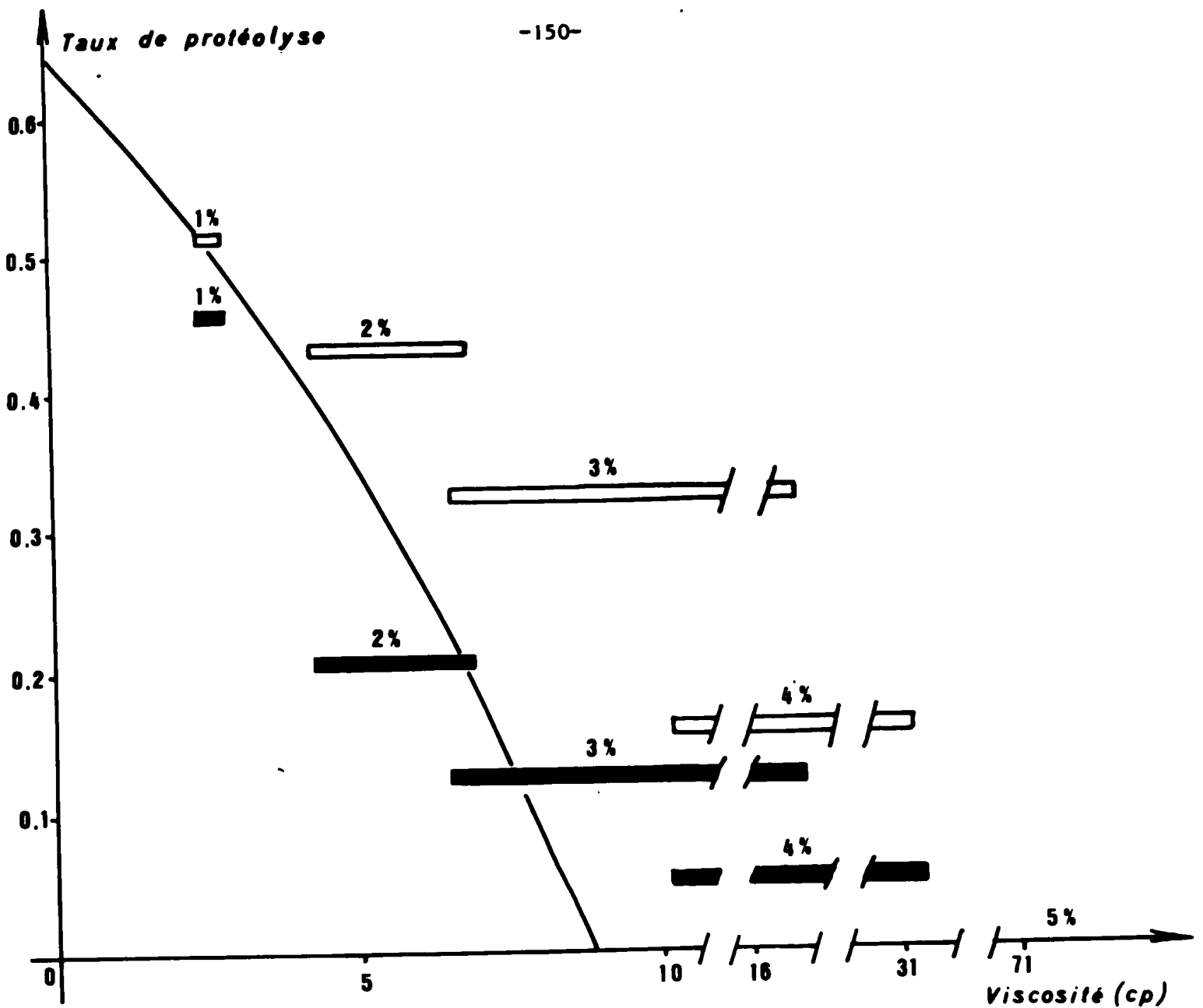


FIGURE 9

Protéolyses continues de solutions de caséine dans le réacteur en lit fluidisé. Performance du réacteur en fonction de la viscosité de la solution à hydrolyser. Les conditions expérimentales sont indiquées dans le texte. Les concentrations des solutions de caséine sont indiquées sur les barres horizontales théoriques (□) et expérimentales (■). La courbe (—) correspond à la fonction

$$\text{Log} \frac{1}{1 - X} = 1,015 (1 - 0,114 n)$$

Sur cette figure est également indiquée la courbe théorique également décroissante $X = f(\eta)$ représentative de la fonction

$$\text{Log} \frac{1}{1 - X} = K.V_0 (1 - 0,114 \eta) \frac{V}{Q}$$

C'est-à-dire :

$$\text{Log} \frac{1}{1 - X} = 1,015 (1 - 0,114 \eta)$$

correspondant au cas où la sédimentation des particules obéirait à la loi de Stokes. Les particules devraient alors être exclues lorsque la viscosité de la solution est supérieure à 8,8 cp, c'est-à-dire lorsque la concentration de caséine est supérieure à 3%. En fait une telle exclusion n'a été observée que lors du passage d'une solution de caséine de concentration 5% et de viscosité 71 cp (Tableau 1).

L'ensemble de ces expériences permet ainsi de dire que les performances d'un tel réacteur, ou plutôt d'un tel support, sont limitées. Et du fait de cette observation l'analyse des hydrolysats obtenus n'a pas été poursuivie.

CONCLUSION

L'aspect important des dernières expériences présentées ici est la baisse importante du taux de réaction lorsque la viscosité des solutions utilisées est élevée.

Il aurait été intéressant d'étudier de la même façon l'influence des deux autres facteurs (taille et masse volumique des particules) sur les performances de ce même réacteur. Cette étude semble cependant délicate dans la mesure où l'utilisation de supports de structure différente ne doit pas permettre d'obtenir d'une façon aisée des constantes de vitesse de réaction identiques. Mais une telle étude permettrait de déterminer les valeurs optimales des paramètres d'un support pour son utilisation dans un réacteur en lit fluidisé et ceci en relation avec la viscosité de la solution que l'on désire transformer.

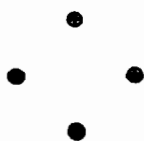
Un autre type de liquide alimentaire qu'il serait intéressant de traiter dans ce type de réacteur est le jus de fruit, ceci afin d'hydrolyser les pectines. La méthode précédemment utilisée a été essayée sur le même support avec la pectinase purifiée provenant de Sigma (réf. 4625). Aucune activité n'a été retrouvée sur le support. La fixation de la pectinase entraîne son inactivation, non pas à cause de la présence des divers réactifs mis en jeu mais probablement par l'inaccessibilité du substrat au site actif qu'entraîne l'immobilisation. Remarquons également que d'autres méthodes qui font appel au glutaraldéhyde comme réactif de liaison (ZABORSKY, 1973) ne semble pas pouvoir s'appliquer dans la mesure où le glutaraldéhyde inactive cette enzyme. En effet il a été constaté que la préparation enzymatique utilisée perdait 20 % et 80 % de son activité après des séjours de 1 et 4 jours dans une solution de glutaraldéhyde à 2 %. Cette observation nous ramène aux précédentes qui avaient été faites lors de l'étude de la modification chimique (stabilisation) d'une protéase par le glutaraldéhyde (voir paragraphe 1.1.2, Préparation continue d'hydrolysats protéiques - 1ère partie), et au délicat problème de l'obtention d'une activité enzymatique significative après fixation, problème dont nous avons essayé de souligner l'importance lors du choix de la dernière méthode de fixation utilisée dans cette étude.

CONCLUSION GENERALE

ET RESUME

Ce travail avait comme objectif de trouver une application industrielle des enzymes à l'aide des techniques et des méthodes mises en oeuvre par la technologie enzymatique. Une vue d'ensemble sur celui ci permet de dire que la mise au point d'un procédé de ce type n'est pas simple. Chacun des réacteurs envisagés, des modes de retention enzymatique utilisés, des systèmes enzymes-substrats étudiés, que nous avons essayé de rendre le plus cohérent possible lors de leur mise en oeuvre, présentent des problèmes particuliers dont certains sont des obstacles réels en vue de leur développement en un procédé d'application industriel intéressant.

Au cours de ce travail nous avons étudié les deux grands types de réacteurs, homogène et tubulaire, le premier avec ou sans retention d'enzyme, le second en lit fixe et en lit fluidisé. Les réactions étaient avec ou sans régulation de pH et dans un cas il y avait deux substrats dont l'un limitant. L'activité enzymatique a été retenue sous forme soluble, avec ou sans stabilisation, par adsorption, réticulation et lien strictement covalent. Ainsi l'ensemble de ce travail semble couvrir une grande partie des procédés de la technologie enzymatique. En fait les enseignements que l'on peut retirer d'une telle étude et des résultats obtenus sont très ponctuels et limités. En effet le nombre des systèmes "enzyme-substrat-support-réacteur" envisageables est très important et les conclusions auxquelles nous avons abouti dans l'étude de ces quelques réacteurs ne suffisent pas pour résoudre ou simplement poser l'ensemble des divers problèmes qui peuvent être rencontrés, aussi nous bornerons nous à rappeler brièvement les principaux résultats obtenus.



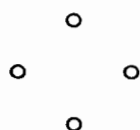
L'hydrolyse continue de solutions de saccharose par de l'invertase de levure a été étudiée dans un réacteur homogène limité par une membrane d'ultrafiltration capable de retenir sélectivement l'enzyme.

Une étude préalable de la cinétique d'hydrolyse discontinue du saccharose et de la stabilité de l'invertase a été faite dans des conditions applicables à un procédé continu, et à concentration élevée en saccharose.

Des essais d'ultrafiltration ont indiqué que diverses membranes retiennent sélectivement l'invertase et laissent passer librement le reste des solutions de saccharose hydrolysé. Un débit maximum de produits d'hydrolyse est obtenu avec une solution de concentration proche de 50 %.

Des essais d'hydrolyse continue sans rétention d'enzyme ont montré que le taux stationnaire d'hydrolyse de mélange réactionnel peut être calculé à partir de l'expression cinétique de la réaction enzymatique discontinue et du bilan de matière d'un réacteur chimique continu.

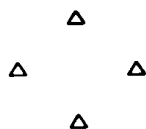
Les essais d'hydrolyse continue avec rétention d'enzyme par ultrafiltration ont montré que la réutilisation de l'invertase, pendant 5 jours, à 50°C, ne provoque pas de perte notable de l'activité enzymatique. Dans les conditions adoptées, le taux d'hydrolyse reste constant, et proche de 90 %.



La préparation continue d'hydrolysats protéiques a été étudiée dans un réacteur homogène limité par une membrane d'ultrafiltration et retenant une préparation de protéase alcaline chimiquement stabilisée.

Des expériences discontinues d'hydrolyse ont été réalisées afin de choisir un système protéine-protéase dans le but de préparer des hydrolysats convenables pour l'enrichissement de boissons. Le système caséine-Alcalase a été retenu. Des expériences comparatives d'hydrolyse continues et discontinues ont montré que la réaction, qui ne suit pas exactement une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat, est inhibée par les produits de réaction. De plus, des expériences ont été réalisées afin de déterminer les conditions de réaction (pH 8,8 dans le réacteur, concentration de caséine 5 %, 40°C). La détermination du poids moléculaire de l'Alcalase a permis le choix de la membrane d'ultrafiltration PM 30.

Du fait des pertes importantes d'activité enzymatique dans le réacteur pendant la réaction continue, l'enzyme a été chimiquement stabilisée à l'aide de glutaraldéhyde. Deux fractions, soluble et insoluble, ont été obtenues. Les activités de ces fractions ont été mesurées avec de la caséine et du BAE E en fonction de la concentration de glutaraldéhyde utilisée. Il a été noté que la fraction insoluble est pratiquement inactive avec le premier substrat et que la stabilité thermique de la forme soluble est améliorée. Les poids moléculaires de ces deux formes ont été trouvés inchangés, mais le spectre UV de la forme soluble modifié. Des analyses d'acides aminés ont révélé que ce traitement provoque principalement une baisse de la teneur en lysine. Des expériences continues de protéolyse avec l'enzyme chimiquement stabilisée et retenue dans le réacteur à ultrafiltration, ont montré que la réutilisation pendant 7 jours à 40°C est possible et que la croissance des micro-organismes est pratiquement inhibée dans ces conditions. Une filtration sur gel a montré que le poids moléculaire des peptides obtenus était inférieur à 2000. Des tests triangulaires de dégustation ont montré que la concentration d'identification de l'hydrolysat sec dans un jus d'orange est d'environ 0,65 %.



L'oxydation continue du glucose par la glucose oxydase et la catalase a été étudiée dans un réacteur homogène.

La cinétique et les conditions optimales d'oxydation du glucose ont été étudiées comme dans le cas de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase. L'oxydation du glucose par la glucose oxydase nécessite la présence d'oxygène. Dans des conditions normales celui-ci est présent à faible concentration dans le milieu réactionnel. Des essais ont montré que la glucose oxydase n'est plus saturée par l'oxygène au delà d'une concentration de 0,4 mg/ml en enzyme. Ceci est dû à la diminution de la concentration de l'oxygène au sein de la solution. La valeur des coefficients de facilité de transfert et des concentrations d'oxygène dissous ont été déterminées pour chacune des conditions utilisées. Ceci a permis de trouver la valeur de la constante de Michaelis de la glucose oxydase par rapport à l'oxygène. Ces essais montrent que l'oxygène est un facteur limitant de la réaction et ainsi que l'ont montré des réactions continues des temps de résidence très longs doivent être pratiqués si un taux de conversion suffisant veut être obtenu.

L'hydrolyse continue de solutions de saccharose par de l'invertase de levure a ensuite été étudiée dans un réacteur tubulaire dans lequel l'enzyme est retenue par adsorption sur une résine échangeuse d'ions.

Des essais d'adsorption de l'invertase ont montré qu'un maximum de 2000 unités d'activité enzymatique peut être adsorbé/gramme sur la résine Amberlite IRA 93 - et que le rendement d'activité (unités d'activité enzymatique adsorbée par rapport aux unités d'activité enzymatique utilisées lors de l'adsorption) peut atteindre 50 % lorsque l'activité enzymatique adsorbée est égale à 1600 unités/g. Aucune désorption n'est observée lors de lavages prolongés à 30°C avec du tampon acétate de sodium 0,01 M pH 5 ; la désorption devient progressivement plus importante lorsque la température et la molarité du tampon s'élèvent ; la désorption n'est que peu modifiée lorsque le pH du tampon est égal à 3 ou à 5. Le pH optimum d'activité des complexes invertase résine varie entre 3,2 (IRA 93) et 5,1 en fonction du caractère anionique ou cationique de la résine.

La cinétique d'hydrolyse du saccharose par le complexe invertase-résine IRA 93 suit une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat, comme dans le cas de l'invertase soluble, le taux d'hydrolyse à la sortie du réacteur tubulaire a été déterminé expérimentalement en fonction du temps de résidence. Il n'a pas été possible de prévoir ce taux d'hydrolyse par le calcul faisant intervenir l'expression cinétique de la réaction et le bilan matière du réacteur continu. Ceci s'explique probablement par l'hétérogénéité de la catalyse et l'influence des phénomènes de diffusion sur la vitesse de réaction. Les essais d'hydrolyse continue de saccharose avec rétention d'enzyme par adsorption ont montré qu'à 30°, la réutilisation de l'invertase ne provoque pas de perte notable d'activité enzymatique. Dans les conditions adoptées (notamment concentration en saccharose de 50 %) le taux d'hydrolyse reste constant pendant 8 jours et proche de 76 %. Ceci montre que l'invertase n'est pas désorbée. Des hydrolyses continues ont été réalisées avec une solution industrielle de saccharose, l'activité enzymatique est restée stable pendant un mois à 30°C et pH 3 et 4.

Des expériences complémentaires ont été faites avec une préparation industrielle d'invertase et la résine IRA 93. Des résultats analogues aux précédents ont été obtenus. Un maximum de 600 unités par gramme peut être retrouvé sur la résine et le rendement d'activité peut atteindre 40 %. Les mêmes remarques que celles précédemment faites en ce qui concerne l'influence de la température sur la désorption et la cinétique de réaction ont été mises en évidence.

Des expériences continues d'hydrolyse de solutions de saccharose, pendant des périodes de un mois à 30°C à pH 3, 4 ou 7 ont permis de vérifier la stabilité microbiologique et enzymatique du réacteur.

L'extension de ce procédé à d'autres systèmes enzymatiques industriellement intéressants nous a conduit à tester l'efficacité du réacteur à enzyme adsorbée vis à vis de protéases et de pectinase. Les résultats se sont révélés être négatifs. Des essais sont actuellement en cours au Laboratoire en vue de l'hydrolyse continue de l'amidon.

*
* *
*

La réaction de protéolyse a été testée dans un réacteur en lit fluidisé où l'enzyme est fixée de façon covalente sur un support insoluble dense. Des expériences préliminaires, effectuées avec une solution de B A E E comme substrat ont permis de vérifier l'efficacité d'une préparation de papaïne fixée par réticulation à l'aide de glutaraldéhyde sur des particules de céramique magnétique. Un réacteur en lit fluidisé utilisant de façon continue ces particules a permis d'obtenir des taux de conversion proches de l'unité. L'utilisation d'un substrat protéique (caséine) a montré l'inaptitude de cette méthode de fixation couplée à cette enzyme vis à vis de la protéolyse. Les expériences précédentes effectuées avec la solution de B A E E et dans les conditions d'une cinétique michaélienne ont permis de comparer d'une façon théorique les performances de deux réacteurs identiques dont l'un est à lit fixe et l'autre à lit fluidisé. Les taux de conversion mesurés en sortie du premier sont supérieurs à ceux mesurés en sortie du second. Les influences de la masse volumique apparente des particules et de la viscosité de la solution de substrat sur les performances du réacteur en lit fluidisé ont été étudiées d'une façon théorique à partir de ces mêmes expériences, c'est-à-dire dans le cas d'une cinétique michaélienne.

Afin de tester l'efficacité pratique de ce réacteur des essais ont été faits en immobilisant de la pepsine sur du verre poreux. Lorsque l'activité enzymatique est mesurée avec une solution de caséine, 3500 unités sont retrouvées par gramme de support. Le rendement d'activité est alors de 20 %.

Des expériences préliminaires ont permis de vérifier que la cinétique de réaction pouvait être assimilée à une cinétique de premier ordre par rapport à la concentration en substrat lorsque le taux de protéolyse est inférieur à 0.8. Des expériences de protéolyse continue réalisées en réacteur ont permis d'estimer les possibilités de ce type de support fonctionnant dans un tel réacteur : le taux de conversion mesuré en sortie de réacteur est considérablement affecté par la viscosité des solutions de caséine c'est-à-dire par leur concentration ; et les résultats expérimentaux correspondent approximativement aux résultats théoriques. Le réacteur étudié n'est plus opérationnel au delà d'une concentration de caséine égale à 4 %.

SUMMARY

"ENZYMATE TECHNOLOGY : STUDY OF CONTINUOUS ENZYMATIIC REACTORS. APPLICATION TO THE TREATMENT OF LIQUID FOODS"

Some enzymatic reactions of industrial interest (sucrose hydrolysis, transformation of glucose to gluconic acid, preparation of proteolysates, pectin hydrolysis) were studied in reactors allowing a continuous reaction.

The first chapter concerns the use of the continuous stirred tank reactor. Sucrose hydrolysis and the preparation of proteolysates were studied in this type of reactor, the enzyme being retained in the soluble form using an ultrafiltration membrane. In the second case the stabilization of the enzymatic activity in the reactor was improved by the use of an initial chemical treatment of the enzyme. The continuous oxydation of glucose oxydase in a continuous stirred tank reactor not retaining the enzyme was also studied. Some preliminary batch experiments allowed to show that oxygen transfert is the limiting factor for the reaction.

The second chapter concerns the use of the tubular reactor. Sucrose hydrolysis was also studied ; the reactor is a fixed bed and the enzyme is retained by adsorption on an ions exchange resin. Some assays in order to hydrolyse pectins and proteins were carried out in this type of reactor. The proteolysis reaction was also studied in a fluidized bed tubular reactor. In this case the enzyme is stabilized by reticulation on magnetic particles or by covalent linkage onto porous glass. The performances of this latter type of reactor were compared to that of a fixed bed reactor and were studied as a function of the apparent volumetric weight of carrier particles of the enzyme and of the viscosity of the solution treated.

B I B L I O G R A P H I E (*)

AIBA, S., HUMPREY, A.E. et MILLIS, N.F.,
(1965), Biochemical Engineering, Academic Press, N.Y.

AMBERLITE XAD Macroreticular Adsorbents,
Rohms and Haas company, Philadelphia, USA.

ARNOLD, W.N., (1966) A Column Method for enzymic Characterisation of coarse
groupe cellular fractions : Application to insoluble β -fructofuranosidase .
Arch. Biochem. Biophys., 113, 451-456.

AVRAMEAS, S., BROUN, G., SELEGNY, E. et THOMAS, D., (1968), Procédés de fabri-
cation d'articles à base de substances protéiniques actives, Brevet français,
CNRS, n° 146.205.

AXEN, R. et ERNBACK, S., (1971), Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide
activated polysaccharides carriers, Eur. J. Biochem., 18, 351-360.

AXEN, R. et PORATH, J., (1966), Chemical coupling of enzymes to cross-linked
dextran (Sephadex), Nature, 210, 367-369.

BARMAN, T.E., (1969), Enzyme Handbook, p. 615, Springer Verlag Ed, N.Y.

BARNETT, L.B. et BULL, H.B., (1959), The optimum pH of adsorbed ribonuclease,
Biochim. Biophys. Acta, 36, 244-245.

BAR ELI, A. et KATCHALSKI, E., (1963), Preparation and properties of water-
insoluble derivatives of trypsin, J. Biol. Chem., 238, 1690-1698.

BELLAL, M., BOUDRANT, J. et CHEFTEL, C., (1976), Résultats non publiés.

BROUN, G., (1973), Traitements de liquides alimentaires par des enzymes inso-
lubilisées. Contrat D.G.R.S.T. T.A.A. n° 72.7.0274.

BROUN, G., SELEGNY, E., AVRAMEAS, S. et THOMAS, D., (1969), Enzymatically active
membrane : Some properties of cellophane membranes supporting cross-linked
enzymes. Biochim. Biophys. Acta, 185, 260-262.

(*) Bibliographie des parties extérieures aux publications.

BUTTERWORTH, T.A., WANG, D.I.C. et SINSKEY, A.J., (1970) Application of ultrafiltration for enzyme retention during continuous enzymatic reaction. *Biotechnol Bioeng.*, 12, 615-623.

CAILLEAU, M., (1974), Dérivés insolubles de la glucoamylase et de la glucose-oxydase, *Thèse de Docteur-Ingénieur, Toulouse.*

CANH, T.M., SELEGNY, E. et BROUN, G., (1972), Réalisation et étude du comportement d'une électrode à uréase réticulée, *C.R. Acad. Sci.*, 275, 309-312.

CHAMBERS, R.P., FORD, J.R., ALLENDER, J.H., BARICOS, W.H., et COHEN, W., (1975), Continuous processing with cofactor requiring enzymes : Coenzyme retention and regeneration, in *Enzyme Engineering*, E.K. Pye et L.B. Wingard Ed., Plenum Press, N.Y., p. 195-202.

CHANG, T.M.S., (1964), Semipermeable microcapsules, *Science*, 146, 524-525.

CHANG, T.M.S., (1969), Clinical potential of enzyme technology, *Science Tools*, 16 (3), 33-39.

CHAPPELLE, E.W., RICH, E. et MAC LEOD, N.H., (1967), Prevention of protein denaturation during exposure to sterilization temperatures, *Science*, 155, 1287-1288.

CHARM, S.E. et MATTEO, C.C., (1971), Scale-up of protein isolation, *Methods in Enzymology*, 22, 476-556.

CHERYAN, M., VAN WYK, P.J., OLSON, N.F. et RIDCHARSON, T., (1975), Continuous coagulation of milk using immobilized enzymes in a fluidized-bed reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 585-598.

CHIBATA, I., TOSA, T., SATO, T., MORI, T. et MATSUO, Y., (1972), Continuous production of L. amino acid by immobilized microbial cells, In *Fermentation Technology Today*, G. Terui Ed., Society of Fermentation Technology, Japan, p. 383.

CUATRECASAS, P. et ANFINSEN, C.B., (1971), Affinity chromatography, *Methods in Enzymology*, 22, 345-385.

DEMAIN, A.L., (1971), Over production of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation, In *Advances in Biochemical Engineering*, Springer-Verlag, p. 113-142.

DEMAIN, A.L. et PHAFF, H.J., (1957), Pectinolytic enzymes. Wallerstein Lab. Comm., 20, 119-124.

DOIG, R.A. (1975), Stability of enzymes from thermophilic microorganisms. In Enzyme Engineering, E.K. Pye et L.B. Wingard Ed., Plenum Press, N.Y., p. 17-22.

DUOLITE, catalogue
Dia-Prosim, Vitry s/seine.

DURAND, G., (1973), Utilisation des enzymes fixées dans l'élaboration des boissons, Contrat D.G.R.S.T. T.A.A. n° 72.7.0324.

DURAND, G. et BAUDRAS, A., (1975), Les enzymes immobilisées. La Recherche, 56, 437-446.

DURAND, G. et MONSAN, P., (1975), Les enzymes immobilisées et leurs applications. Ed. C.D.I.U.P.A., Paris.

EMERY, A., SORENSON, J., KOLARIK, M., SWANSON, S. et LIM, H., (1974), An annular bound-enzyme reactor. Biotechnol. Bioeng., 16, 1359-1373.

ENDO, A., (1965), Studies on pectolytic enzymes of mold. Clarification of apple juice by the joint action of purified pectolytic enzymes. Agr. Biol. Chem., 29, 129-136.

FAITH, W.T., NEUBECK, C.E. et REESE, E.T., (1971), Production and applications of enzymes. Adv. Biochem. Eng., 1, 77-111.

FILIPPUSON, H. et HORNBY, W.E., (1970), Preparation and properties of β -fructofuranosidase chemically attached to polystyrene. Biochem. J., 120, 215-219.

FISCHER, E.H. et KOHTES, L., (1951), Purification de l'invertase de levure. Helv. Clin. Acta, 136, 1123-1131.

GABEL, D., STEINBERG, I.Z. et KATCHALSKI, E., (1971), Changes in conformation of insolubilized trypsin and chymotrypsin, followed by fluorescence. Biochemistry, 10 (25), 4661-4669.

GELLF, G., HENRY, J., KERNEVEZ, J.P. et THOMAS, D., (1973), Résolution à l'aide de l'analyse numérique du problème de la variation des constantes cinétiques apparentes d'une enzyme immobilisée dans un réacteur tubulaire à lit fixe. C.R. Acad. Sci., 277, 2265-2268.

- GELLF, G., THOMAS, D., BROUN, G. et KERNEVEZ, J.P., (1974), Water-insoluble enzyme columns : Kinetic study on steady state and transient conditions. Biotechnol. Bioeng. 16, 315-332.
- GHOSH, A., JANIC, V. et SLOVITER, H.A., (1970), Enzymic method for measuring dissolved oxygen in non aqueous materials. Anal. Biochem., 38, 270-276.
- GLASSMEYER, C.K. et OGLE, J.D., (1971), Properties of an insoluble form of trypsin. Biochemistry, 10, (5), 786-792.
- GOLDMAN, R., GOLDSTEIN, L. et KATCHALSKI, E., (1971), Water-insoluble enzyme derivatives and artificial enzyme membranes. In Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports, G.R. Stark, Ed., Academic Press, N.Y., pp. 1-78.
- GOLDMAN, R., KEDEM, O., SILMAN, I.H., CAPLAN, S.R. et KATCHALSKI, E., (1968), Papain collodion membranes : Preparation and properties. Biochemistry, 7, 486-500.
- GOLDSTEIN, L. et KATCHALSKI, E., (1968), Use of water insoluble enzyme derivatives in biochemical and analysis. Z. Anal. Chem., 234, 375-396.
- GREENFIELD, P.F., KITTRELL, J.R. et LAURENCE, R.L., (1975), Inactivation of immobilized glucose oxydase by hydrogen peroxyde. Anal. Biochem., 65, 109-124.
- GRYSKIEWICZ, J., (1971), Insoluble enzymes, a review. Folia Biologica, 19 (1), 119-150.
- GUILBAULT, G.G., (1972), Analytical uses of immobilized enzymes. Biotechnol. Bioeng. Symp., 3, 361-376.
- GUILBAULT, G.G., (1970), Enzymatic Methods of Analysis, Pergamon Press, N.Y.
- GUILBAULT, G.G. et KRAMER, D.N., (1965), Specific detection and determination of cyanide using various quinone derivatives. Anal. Chem., 37, 1395-1399.
- HASSELBERGER, F.X., ALLEN, B., PARUCHURI, E.K., CHARLES, M. et COUGHLIN, R.W. (1974), Immobilized enzymes : lactase bounded to stainless steel and other dense carriers for use in fluidized bed reactors. Biochem. Biophys. Res. Comm., 57 (4), 1054-1062.
- HICKS et UPDIKE, S.J., (1966), The preparation and characterization of lyophilized polyacrylamide enzyme gels for chemical analysis. Anal. Chem., 38 726-730.

- HORVATH, C., SARDI, A. et WOODS, J.S., (1973), L-Asparaginase tubes. Kinetic behavior and application in physiological studies. *J. Appl. Physiol.*, 34 181-187.
- ISHII, S. et YOKOTSUKA, T., (1971), Pectin trans-eliminase with fruit juice clarifying activity. *Agr. Food. Chem.*, 19, 958-961.
- JULLIARD, J.H., GODINOT, C. et GAUTHERON, D.C., (1971), Some modifications of the kinetic properties of bovine liver glutamate deshydrogenase (NAD (P)) covalently bound to a solid matrix of collagen. *FEBS Letters*, 14 (3), 185-188.
- KAY, G. et CROOK, E.M., (1967), Coupling of enzymes to cellulose using chloro-5-triazines. *Nature*, 216, 514-515.
- KINGMA, W.G., (1966), Starch conversion processes. *Process Biochem.*, 1 (1), 49-52.
- KOELSCH, R., LASCH, J. et HANSON, H., (1970), *Acta Biol. Med. Ger.*, 24, 833.
- KUNII, D. et LEVENSPIEL, O., (1969), *Fluidization engineering*, John Wiley Ed., New York.
- LACHMANN, A., (1972), *Food Engineering*, 44, 74.
- LANGMUIR, I. et SCHAEFFER, V.J., (1938), Activities of urease and pepsin monolayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 1351-1360.
- LILLY, M.D. et SHARP, B.E. (1968), The kinetics of enzymes attached to water-insoluble polymers. *Chem. Eng.*, 1, 12-18.
- LILLY, M.D. et DUNNILL, P., (1971), Biochemical reactors. *Process Biochem.*, 6 (8), 29-32.
- LINE, W.F., KWONG, A. et WEETALL, H.H., (1971), Pepsin insolubilized by covalent attachment to glass : preparation and characterization. *Biochem. Biophys. Acta* 4, 242, 194-202.
- LONCIN, M., (1961), *Les Opérations Unitaires du Génie Chimique*, Dunod Ed., Paris.
- LOUSSAN, E., (1973), *Enzymologie appliquée : Réalisation et étude d'électrodes enzymatiques à glucose et à saccharose*. Diplôme d'Etudes Approfondies, Montpellier.

- Mc LAREN, A.D. et ESTERMANN, E.F., (1956), The adsorption and reactions of enzymes and proteins on kaolinite. Arch. Biochem. Biophys., 61, 158-173.
- Mc LAREN, A.D. et PACKER, L., (1970), Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems. Advances in Enzymol, 33, 245-308.
- MACIAG, T., WEIBEL, M.K. et PYE, E.K., (1975), Purification of urokinase by affinity chromatography. In Enzyme Engineering, E.K. Pye et L.B. Wingard, Ed., Plenum Press, N.Y., p. 55-62.
- MAEDA, H., YAMAUCHI, A. et SUZUKI, H., (1973), Preparation of immobilized enzymes by γ -ray irradiation. Biochim. Biophys. Acta, 315, 18-21.
- MARCONI, W., GULINELLI, S. et MORISI, F., (1974), Properties and use of invertase entrapped in fibers. Biotechnol. Bioeng., 16, 501-511.
- MARRAZZO, W.M., MERSON, R.L. et Mc COY, B.J., (1975), Enzyme immobilized in a packed-bed reactor : Kinetic parameters and mass transfert effects. Biotechnol. Bioeng., 17, 1515-1528.
- MARTEAU, G., SCHEUR, J. et OLIVIERI, C., (1963), Le rôle des enzymes pectinolytiques dans le processus de la clarification des jus. Ann. Technol. agric., 12 (3), 155-176.
- MASON, R.D. et WEETALL, H.H., (1972), Invertase covalently coupled to porous glass : Preparation and characterization. Biotechnol. Bioeng., 16, 637-645.
- MERMELSTEIN, N.H., (1975), Immobilized enzymes produce : High-fructose corn syrup. Food Technol., 29 (6), 20-26.
- MESSING, R.A., (1974), Simultaneously immobilized glucose oxydase and catalase in controled pore titania. Biotechnol. Bioeng., 16, 897-908.
- MITZ, M.A., (1956), Insoluble active derivative of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. Science, 123, 1076-1077.
- MITZ, M.A. et SCHLUETER, R.J., (1959), Isolation of proteolytic enzymes from solution as dry stable derivatives of cellulosic ions exchangers. J. Am. Chem. Soc., 81, 4024-4028.
- MITZ, M.A. et SUMMARIA, L.J., (1961), Synthesis of biologically active cellulose derivatives of enzymes. Nature, 189, 576-577.

- MIYAMOTO, K., FUJII, T. et MIURA, Y., (1971), Insolubilized enzyme activities studied using adsorbents and ion exchangers. *J. Ferment. Technol.*, 49 (6), 565-573.
- MONSAN, P. et DURAND, G., (1971), Preparation d'invertase insolubilisée par fixation sur bentonite. *FEBS Letter*, 16 (1), 39-42.
- MONSAN, P. (1971), Préparation, propriétés et utilisation en continu de dérivés insolubles de l'invertase. Thèse de Docteur-Ingénieur. Toulouse.
- MOSBACH, K., LARSSON, P.O., BRODELIUS, P., GUILFORD, H. et LINBERG, M. (1975), Synthesis and application of matrix bound AMP, NAD⁺ and other adenine nucleotides. In *Enzyme Engineering*, E.K. Pye et L.P. Wingard Ed., Plenum Press, N.Y., p. 237-244.
- MUKHERJEE, S.K. et MAJUMDAR, S.K., (1971), Fermentative production of pectinases by Fungi : Screening of organisms and production of the enzymes by *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.*, 49, (9), 759-770.
- NEGORO, H., (1970), Continuous inversion of sucrose by using insoluble saccharose. *J. Ferment. Technol.*, 48, 689-697.
- NELSON, J.M. (1933), Enzymes from the standpoint of the chemistry of invertase *Chemical Reviews*, 12, 1-43.
- O'NEILL, S.P., DUNNILL, P. et LILLY, M.D., (1971)a, Comparative study of immobilized amyloglucosidase in packed bed reactor and a continuous feed stirred tank reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 337-352.
- O'NEILL, S.P., WYKES, J.R., DUNNILL, P. et LILLY, M.D., (1971)b, An ultrafiltration-reactor system using a soluble immobilized enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 319-322.
- OLSON, A.C. et STANLEY, W.L., (1973), Lactase and other enzymes bound to a phenol-formaldehyde resin with glutaraldehyde. *J. Agr. Food Chem.*, 21 (3), 440-445.
- OLSON, A.C., et COONEY, C.L., (1974), *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes*. Plenum Press, N.Y.
- PILNIK, W. et VORAGEN, A.G.J., (1970), Pectic substances and other uronides. *Chem. Fruit Prod.*, 1, 53-87.

- PYE, E.K. et WINGARD, L.B., (1975), *Enzyme Engineering*, Plenum Press, N.Y.
- REED, G., (1966), *Enzymes in Food Processing*, 2ème Ed., Acad. Press, N.Y.
- REESE, E.T. et MANDELS, M., (1958), Enzyme action on partition chromatographic columns. *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 4625-4627.
- SILMAN, I.H. et KATCHALSKI, E., (1966), Water insoluble derivatives of enzymes, antigens and antibodies. *Ann. Rev. Biochem.*, 35 (11), 873-907.
- SMILEY, K.L., (1971), Continuous conversion of starch to glucose with immobilized glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 309-317.
- SOLOMON, B. et LEVIN, Y., (1974), Studies on adsorption of amyloglucosidase on ion-exchange resins. *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1161-1177.
- SUNDARAM, P.V. et CROOK, E.M., (1971), Preparation and properties of solid-supported urease. *Can. J. Biochem.*, 49, 1388-1394.
- SUZUKI, H., OZAWA, Y. et MAEDA, H., (1966), Studies on the water-insoluble enzyme, Hydrolysis of sucrose by insoluble yeast invertase. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, 30, 807-812.
- THANG, M.N., GRAFFE, M. et GRUNBERG-MANAGO, M., (1968), Observations on the activity of enzymes after filtration on (and through) a nitrocellulose membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 1-8.
- THOMAS, D., (1971), Elaboration de modèles biologiques structurés à l'aide de membranes porteuses d'enzymes réticulées. Thèse de Doctorat d'Etat, Rouen, n° CNRS AO 5407.
- TODA, K. et SHODA, M., (1975), Sucrose inversion by immobilized yeast cells in a complete mixing reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 481-497.
- TOSA, T., MORI, T., FUSE, N. et CHIBATA, I., (1969), Studies on continuous enzyme reactions. *Agr. Biol. Chem.*, 33, 1047-1054.
- USAMI, S. et KURATSU, Y. (1973), Preparation and properties of water-insoluble saccharose with a polyacrylamide gel. *J. Ferment. Technol.*, 51, 789-794.
- VEGARUD, G. et CHRISTENSEN, T.B., (1975), Glycosylation of proteins : A new method of enzyme stabilization. *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1391-1397.

VIETH, W.R., GILBERT, S.G. et WANG, S.S., (1972), Performance of collagen invertase complex membrane in a biocatalytic module. Trans. N.Y. Acad. Sci., 34, 454-465.

VIETH, W.R. et VENKATASUBRAMANIAN, K., (1973), Enzyme engineering : The utility of supported enzyme systems. Chem. Tech., 11, 677-684.

VIETH, W.R. et VENKATASUBRAMANIAN, K., (1974)a, Enzyme engineering : Materials for immobilized enzyme reactors. Chem. Tech., 1, 47-54.

VIETH, W.R. et VENKATASUBRAMANIAN, K., (1974)b, Enzyme engineering : Properties of immobilized enzyme systems. Chem. Tech., 5, 309-320.

WALLIANDER, P., LINKO, M. et LINKO, Y.Y., (1975), Application of ultrafiltration for the purification of enzymes. *Kepria Kemi*, 2 (8), 373-379.

WANG, D.I.C., SINSKEY, A.J. et BUTTERWORTH, J.A., (1970), Application of ultrafiltration for enzyme retention during continuous enzymatic reaction. In *Membrane Science and Technology*, p.p. 98-119, Plenum Press, N.Y.

WEETALL, H.H., (1973), Immobilized enzymes : Some applications to food and beverages. *Food Product Develop.*, 1, 46-49.

WEETALL, H.H., HAVEWALA, N.B., PITCHER, W.H., DETAR, C.C., VANN, W.P. et YAUVERBAUM, S., (1974), The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 295-313.

WEIBEL, M.K. et BRIGHT, H.J., (1971), The glucose oxidase mechanism, interpretation of the pH dependence. *J. Biol. Chem.*, 246 (9), 2734-2744.

WEIBEL, M.K., FULLER, C.W., STADEL, J.M., BUCKMANN, A.F., DOYLE, T. et BRIGHT, H.J., (1975), NADH coupled to soluble dextran : synthesis and properties. In *Enzyme Engineering*, E.K. Pye et L.P. Wingard. Ed., Plenum Press, N.Y., p. 203-208.

WHITESIDES, G.M., CHMURNY, A., GARRETT, D., LAMOTTE, J. et COLTON, C.K., (1975), Enzymatic regeneration of ATP from AMP and ADP : Immobilisation and reactor development. In *Enzyme Engineering*, E.K. Pye et L.B. Wingard Ed., Plenum Press, N.Y. p. 217.

WIERZBICKI, L.E., EDWARDS, V.H. et KOSIKOWSKI, F.V., (1974), Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase immobilized on porous glass particles Preparation and characterisation of a reusable catalyst for the production of low-lactose dairy product. *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 397-411.

WINGARD, L.B., (1972), *Enzyme Engineering*, Wiley , N.Y.

WISEMAN, A., (1973), Industrial enzyme stabilization. *Process Biochem.*, 8, 14-17.

YAMASAKI, M., KATO, A., CHU, S. et ARIMA, K., (1967), Pectic enzymes in the clarification of apple juice : Mecanism of clarification. *Agr. Biol. Chem.*, 31, 552-560.

ZABORSKY, O., (1973), *Immobilized Enzymes*, C.R.C. Press, Cleveland, USA.