

TP15 Immobilisation de la β -Fructosidase en bille d'alginate utilisation en bioréacteur

1. Organigramme et rappels théoriques

Organigramme :

Gamme d'étalonnage du sucre inverti par le 3-5 DNS

β -fructosidase soluble

↓
(1) inclusion dans l'alginate

↓
(2) réalisation des billes

↓
(5) cycles en bioréacteur

↘
(1') détermination de l'activité libre mise en jeu

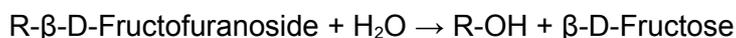
→ (3) déterminations des activités immobilisées

↘ (4) tests des fuites éventuelles d'enzyme

→ études de stabilité de l'enzyme inclus

L'invertase :

La β -Fructosidase ou "invertase" ou β -D-Fructofuranoside Fructohydrolase (E.C. 3.2.1.26) catalyse la réaction :



Sa masse molaire varie de 135 kDa (partie protéique seule) à 270 kDa. Le K_M pour le saccharose est de 25 mmol/L, son pH optimum se situe entre 3,5 et 5,0. Elle est assez stable thermiquement (plus de 2h à 30°C entre pH 3 à 7 ; 15 min à 56°C à pH 4,9).

L'alginate :

L'alginate est extrait d'algues brunes; ce sel de l'acide alginique est un polymère de 2 acides hexuroniques : l'acide β -D mannuronique et l'acide α -L-guluronique, liés par des liaisons 1-4-glycosidiques (100 à 1000 unités). Le sel de sodium de l'acide alginique est hydrosoluble mais le remplacement des ions Na^+ par des cations divalents Ca^{2+} , permet le pontage des segments homogènes par leurs groupements carboxyliques surtout d'acide α -L-guluronique (gélification ionotropique).

Le bioréacteur :

Par réacteur on entend tout récipient dans lequel se déroule une réaction chimique. Les réacteurs biologiques (ou bioréacteurs) peuvent renfermer des enzymes ou des cellules sous forme libre ou immobilisée.

Le mode de fonctionnement du réacteur utilisé ici, sera le batch : il comportera une succession de cycles. Le réacteur est chargé en enzyme immobilisée sur une phase stationnaire (réacteur à lit fixe) et en substrat au début du cycle ; à la fin du cycle, le produit est recueilli et l'enzyme peut être utilisée dans le cycle suivant.

2. Réactifs

β -fructosidase à 0,3 mg/mL dans Tp4,7

Tp4,7 tampon acétate pH 4,7 à 50 mmol/L

Saccharose 1,2mol/L

Sucre inverti à 5 mmol/L (glucose à 5 mmol/L + fructose à 5 mmol/L)

Alginate à 2% "viscosité moyenne SIGMA" , dégazé (et placé à 45°C)

CaCl_2 0,15 mol/L

DNS réactif alcalin au 3-5 DNS

3. Protocole

3.1. Gamme d'étalonnage du sucre inverti parla méthode au 3-5 DNS

Remarque : réaction colorimétrique identique pour la gamme et les essais « enzymes »

On appelle sucre inverti le produit de la réaction catalysée par l'invertase, mélange équimolaire de glucose et de fructose.

Dans une série de tubes à essai, verser :

x mL de "sucre inverti" à 5 mmol/L

(1-x) mL d'eau déminéralisée

0,5 mL de saccharose à 1,2 mol/L

0,5 mL de Tp4,7

1 mL de DNS

avec x = 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 mL de glucose

Boucher les tubes avec du papier d'aluminium et les porter à **100°C** pendant **5 minutes exactement** : refroidir dans un bain (ou sous courant) d'eau froide (remarque : la conduite du refroidissement est aussi importante que la conduite du chauffage dans la reproductibilité de la coloration). Après refroidissement, ajouter 7,0 mL d'eau déminéralisée.

Lire l'absorbance à 530 nm contre le tube 0 ; tracer la droite d'étalonnage (Absorbance = f(μ mol de sucre inverti / tube)) et déterminer la zone de linéarité. D'après cet étalonnage au DNS, trouver, pour les calculs ultérieurs d'activité enzymatique, la relation : μ mol de sucre inverti / tube = f (Absorbance).

3.2. Détermination des activités libres mises en jeu

Réaction enzymatique :

Déterminer l'activité volumique de la β -fructosidase selon le protocole suivant :

0,5 mL de saccharose 1,2 mol/L (préchauffés 10 minutes à 40°C)

+ 1,45 mL de Tp4,7 (préchauffés 10 minutes à 40°C)

+ 0,05 mL de β -fructosidase diluée au 1/25 dans Tp4,7

5 minutes à 40°C

+ 1 mL de 3-5 DNS (réactif d'arrêt et de coloration)

Réaction colorimétrique :

5 minutes à 100°C (inactivation thermique + coloration)

Après refroidissement, ajouter 7,0 mL d'eau déminéralisée.

lecture à 530 nm contre un blanc-réactifs

Déterminer l'activité volumique de la β -fructosidase libre en U/mL d'enzyme diluée et d'enzyme non diluée.

3.3. Inclusion dans l'alginat

Bien mélanger

Dans une seringue sans aiguille mais avec le petit orifice bouché au parafilm préalablement pesée (parfois il est préférable de la préchauffer à 45°C) :

0,5 mL de β -fructosidase diluée au 1/25 dans Tp4,7

2,5 mL d'alginat à 2% (\Rightarrow 1,67 % final), (parfois : préalablement préchauffée à 45°C)

Peser la seringue remplie et calculer la masse du mélange. Laisser tomber le mélange goutte à goutte, dans 100mL d'une solution de CaCl_2 0,15 mol/L légèrement agitée ; utiliser le piston de la seringue pour finir de chasser l'excédent de mélange.

Laisser séjourner les billes formées, 30 minutes dans le chlorure de calcium sous agitation très modérée (pendant ce temps mort tarer 4 tubes à hémolyse), puis les rincer à l'eau déminéralisée et les égoutter sur papier filtre. Évaluer le nombre total de billes obtenues (une grosse = deux moyennes...): les répartir en quatre lots égaux en sélectionnant les billes de taille moyenne pour les manipulations 3.4 . Placer les billes dans les tube à hémolyse, les peser. Garder les billes non utilisées immédiatement en tube fermé dans la glace.

3.4. Détermination des activités immobilisées

Réaction enzymatique : (2 essais décalés de 1 min)

Discuter le problème du réactif déclenchant !

Pour chaque essai : dans un tube :

- + 1,5mL de Tp4,7 (préchauffés)
 - + 0,5mL de saccharose 1,2 mol/L
 - + environ 1/4 des billes d'alginate contenant l'enzyme à t = 0
- } ou préparer un mélange(1v +3v) de saccharose et de Tp 4,7 et en prélever 2 mL

10 minutes à 40°C, agiter régulièrement

verser la phase liquide (sans les billes) dans un tube contenant 1mL de 3-5 DNS

Réaction colorimétrique :

5 minutes à 100°C, refroidir (mêmes remarques qu'en 3.1 et 3.2)

+ 7 mL d'eau déminéralisée

lecture à 530 nm contre un blanc-réactifs

Déterminer l'activité de la β -fructosidase immobilisée en U pour ~1/4 des billes (ou calcul précis avec rapport des masses) puis en U/mL d'invertase diluée.

3.5. Test des fuites éventuelles d'enzyme (ne sera pas réalisé...)

Procéder exactement comme en 3.4, mais en versant le liquide surnageant dans un tube vide après les 10 min d'incubation. Incuber ce tube contenant ce surnageant, de nouveau 10 minutes à 40°C, avant d'ajouter 1 mL 3-5 DNS (+ chauffage à 100°C etc.).

Comprendre et expliquer le principe de ce test dans le compte rendu.

(On peut réaliser ce test avec des billes de différentes concentrations d'alginate et trouver le meilleur compromis "rétention de l'enzyme / activité = f (densité du gel)")

3.6. Étude de l'activité de l'enzyme immobilisé en "Bioréacteur fermé ou discontinu"

Raccorder une cuve à circulation au bain thermostaté à 40°C. La placer sur un agitateur magnétique.

Placer 1/4 des billes d'alginate dans la cuve à circulation agitée. Y verser 2 mL de mélange préincubé : "1 volume de saccharose 1,2M + 3 volumes de Tp 4,7", placer 5 minutes à 40°C sous agitation modérée. Prélever la phase liquide et la verser dans un tube à essais contenant 1 mL de 3-5 DNS. Réaliser 5 cycles successifs selon le même protocole, avec toujours la même partie aliquote d'enzyme immobilisée et mesurer l'activité à chaque cycle, (réaction colorimétrique identique au 3.4).

4. Exploitation des résultats

L'immobilisation d'une enzyme entraîne généralement une diminution de l'efficacité catalytique. Le rendement d'immobilisation permettra d'exprimer l'efficacité catalytique de l'enzyme immobilisée.

D'après l'activité volumique déterminée en 3.2, calculer les activités libres totales, mises en jeu dans l'immobilisation. Calculer l'activité totale immobilisée (3.4) ; en déduire le pourcentage d'activité immobilisée (ou rendement d'immobilisation):

$$\% \text{ d'activité immobilisée} = \frac{\text{unités immobilisées}}{\text{unités solubles mises en jeu (dans l'immobilisation)}} \times 100$$

Le fonctionnement du bioréacteur :

Tracer la courbe $\Delta A_{530nm}/5min = f(\text{numéro du cycle})$.

Commenter, analyser, discuter, conclure, (en 5 lignes maxi ...),

Le fonctionnement du bioréacteur peut être quantifié par plusieurs paramètres.

- **taux de conversion "T"** : c'est le rapport des concentration de substrat transformé au substrat initial :

$$T = \frac{S_0 - S_t}{S_0}$$

S_0 concentration initiale en substrat et S_t concentration à l'instant t ou en fin de réaction (si 1 mole de Substrat donne 1 mole de Produit alors " $S_0 - S_t = P_t$ ").