

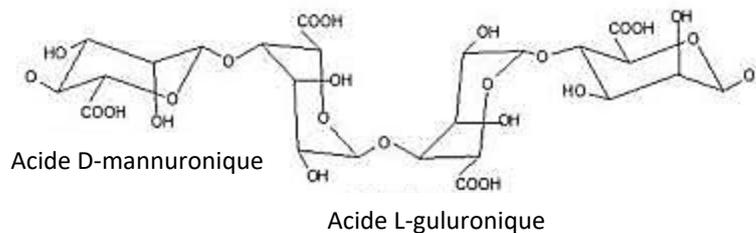
T.P. n°2 : réacteur à invertase immobilisée dans les billes d'alginate

Principe :

L'extrait brut obtenu à partir des cellules de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*), contenant de l'invertase, est immobilisé par rétention physique : il s'agit d'une inclusion dans des billes d'alginate.

L'alginate de sodium

L'alginate de sodium est un composé extrait de certaines algues brunes, tel que *Macrocystis pyrifera* et autres *Laminaria*. L'acide alginique est un polymère linéaire, entièrement constitué d'acide α D-mannuronique et d'acide β L-guluronique en proportions variables. La liaison se fait via β -1-4.



Matériel :

- ✓ Erlen + béchers ;
- ✓ Tubes à essai ;
- ✓ Pipettes et micropipette ;
- ✓ Eprouvette ;
- ✓ Seringue de 5ml ;
- ✓ Support ;
- ✓ Balance de précision, spatule et verre de montre,
- ✓ Agitateur plaque chauffante ;
- ✓ Etuve réglée à 40°C ;
- ✓ Bain-marie bouillant (95°C) ;
- ✓ Agitateur vortex ;
- ✓ Spectrophotomètre et cuves.

Réactifs :

- ✓ Extrait de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) ;
- ✓ Tampon acétate de sodium pH 4,7 ;
- ✓ Alginate de sodium ;
- ✓ Réactif au DNS ;
- ✓ Saccharose à 0,1 M (sucre de table) ;
- ✓ Sel de chlorure de calcium à 0.15 M ;

Mode opératoire :

1. Préparation d'une solution de saccharose à 0,1 M :

Dissoudre 3,42 g de saccharose dans 100 ml d'eau distillée.

2. Préparation d'une solution de chlorure de calcium à 0,15 M :

Dissoudre 16,65 g de CaCl₂ dans 100 ml d'eau distillée.

3. Préparation d'un gel d'alginate à 2 % :

- ✓ Dissoudre 1 g d'une poudre d'alginate de sodium dans 50 ml d'eau distillée.
- ✓ Chauffer le mélange à 45°C.

4. Immobilisation de l'extrait de levure dans le gel d'alginate :

- ✓ Mettre en contact 2,5 ml de la solution d'alginate et 0,5 ml de l'extrait de levure à une température de 45°C dans une seringue tiédie ;
- ✓ Faire tomber des gouttes de ce mélange dans 100 ml de la solution de CaCl₂, légèrement agitée, à température de 0°C à 20°C (pour cela, mettre le bécher contenant la solution du sel dans la glace). Ceci aboutit à la formation des billes contenant l'extrait de levure ;
- ✓ Laisser reposer les billes 30 minutes dans la solution de CaCl₂ ;
- ✓ Filtrer les billes, les rincer à l'eau distillée et les égoutter ;

5. Etude de l'activité enzymatique de l'invertase immobilisée en bioréacteur :

- ✓ Préparer un mélange de : 50 mL saccharose + 100 mL tampon acétate ;
- ✓ Préincuber le mélange à 40°C pendant 5 minutes.

Montage avec un bécher :

- ✓ Dans un bécher, mettre 100 mL du mélange préparé précédemment ;
- ✓ Placer le bécher sur un agitateur magnétique ;
- ✓ Mettre les billes d'alginate dans le bécher sous agitation modérée ;
- ✓ Prélever 2 ml du mélange après 3, 6, 9 et 12 minutes.
- ✓ Ajouter 1 ml du réactif au DNS ;
- ✓ Bien agiter et chauffer au bain-marie bouillant (95°C) pendant 5 minutes ;
- ✓ Laisser refroidir puis ajouter 6 ml d'eau distillé,
- ✓ Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes à température ambiante ;
- ✓ Lire les absorbances (DO) à 540 nm contre le blanc (tube 0)

Travail à faire :

Calculer la vitesse initiale de la réaction (Vi) en μmol de saccharose hydrolysé.L⁻¹.min⁻¹ (L = litre de milieu réactionnel)).