

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

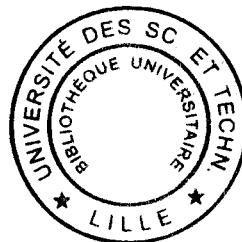
EN BIOCHIMIE

par

Sylvain STIEVENARD

HYDROLYSE INDUSTRIELLE DU LACTOSE

**MISE AU POINT AU STADE LABORATOIRE D'UN REACTEUR
A LACTASE IMMOBILISEE**



Présenté le 16 Juin 1986 devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL
Rapporteur :	S. BOUQUELET
Examineurs :	C. ROMOND
	A. TORDEUX

Je tiens à présenter mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire.

Je veux, aussi, exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Stéphane BOUQUELET qui, en enzymologiste averti, m'a pertinemment conseillé lors de ces travaux.

J'adresse, également, mes remerciements à toutes les personnes qui, de part leur bonne humeur et leur sympathie, ont rendu mon séjour au laboratoire agréable.

Enfin, ma gratitude est acquise à Monsieur le Professeur ROMOND de la Faculté de Pharmacie de LILLE qui a fourni et cultivé la souche de Bifidobacterium bifidum, à la Direction de la Valorisation à la Recherche qui a financé ce projet et à la Société GALLIA qui nous a procuré le lactosérum.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

I	LACTOSE ET LACTOLYSATS	p. 3
	A - <u>ASPECT NUTRITIONNEL</u>	
	1) <u>Absorption du galactose</u>	p. 5
	a) Ingestion du galactose	
	b) Ingestion simultanée de glucose et de galactose sous forme libre ou liée	
	2) <u>Pathologie</u>	p. 8
	B - <u>ASPECT ECONOMIQUE</u>	p. 12
	C - <u>LEGISLATION FRANCAISE</u>	p. 13
	D - <u>TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE ET LACTOSE HYDROLYSE</u>	p. 14
	E - <u>HYDROLYSE DU LACTOSE</u>	p. 15
	1) <u>Hydrolyse acide</u>	p. 16
	2) <u>Hydrolyse enzymatique</u>	p. 19
	a) Hydrolyse du lactose par les enzymes libres	p. 19
	b) Hydrolyse du lactose par les enzymes immobilisées	p. 23
II	IMMOBILISATION DE CELLULES ET D'ORGANITES SUBCELLULAIRES	p. 29
	A - <u>INTRODUCTION</u>	p. 30
	B - <u>TYPES D'IMMOBILISATION CELLULAIRE</u>	p. 30

1) <u>Inclusion</u>	
a) Inclusion par précipitation	
b) Inclusion dans un gel de polyélectrolyte	
c) Inclusion par copolymérisation	
d) Inclusion par polymérisation	
e) Microencapsulation	
2) <u>Adsorption</u>	p. 41
3) <u>Immobilisation covalentielle en surface d'un polymère</u>	p. 45
4) <u>Immobilisation par réticulation physique ou chimique</u>	p. 45
a) Réticulation chimique	
b) Réticulation physique	
C - <u>CONCLUSION</u>	p. 49
III <u>IMMOBILISATION DE CELLULES DANS UN GEL D'ALGINATE</u>	p. 53
A - <u>INTRODUCTION</u>	p. 54
B - <u>LES ALGINATES</u>	p. 54
1) <u>Structure</u>	p. 54
2) <u>Les sels de sodium d'acide alginique</u>	p. 62
3) <u>Les gels d'alginate</u>	p. 63
a) La gélification	p. 63
b) Stabilité des gels d'alginate	p. 66
c) Porosité et diffusion dans le gel	p. 68
d) Compressibilité des billes d'alginate en réacteur à lit fixe	p. 69

C - <u>ENROBAGE DES BILLES D'ALGINATE</u>	p. 74
D - <u>CONCLUSION</u>	p. 75
IV BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM	p. 78
A - <u>BIOLOGIE DES BIFIDOBACTERIES</u>	p. 79
1) <u>Classification</u>	p. 79
2) <u>Identification</u>	p. 83
a) Morphologie	
α) Caractéristiques générales	
β) Caractéristiques de la paroi	
γ) Composition en lipides et phospholipides	
δ) Composition en bases de l'ADN	
b) Physiologie	
α) Conditions atmosphériques de croissance	
β) Température et pH de croissance	
γ) Nutrition	
δ) Caractéristiques biochimiques	
B - <u>ISOLEMENT ET CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</u>	p. 90
1) <u>Isolement</u>	
2) <u>Culture</u>	
a) Aspect général	
b) Besoins en substances nutritives et en facteurs de croissance	
c) Potentiel d'oxydo-réduction et conditions d'anaérobie	
d) Pouvoir tampon et maintien du pH	

MATERIEL ET METHODES

I	CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM	p. 95
II	DOSAGES ET CARACTERISATION DU SUBSTRAT ET DES PRODUITS DE LA REACTION	p. 98
A	<u>DOSAGE DU LACTOSE DANS LE LAIT ET LES LACTOSERUMS</u>	p. 99
	1) <u>Principe</u>	
	2) <u>Réactifs</u>	
	3) <u>Mode opératoire</u>	
	a) Défécation	
	b) Dosage	
B	<u>DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLUCOSE</u>	p. 101
	1) <u>Principe</u>	
	2) <u>Réactifs</u>	
	3) <u>Mode opératoire</u>	
C	<u>CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE</u>	p. 104
III	ETUDES REALISEES SUR LES CELLULES LYOPHILISEES NON INCLUSES	p. 105
A	<u>INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION SUR L'ACTIVITE LACTASIQUE</u>	p. 106
B	<u>DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES ET CINETIQUES</u>	p. 106

1) <u>Principaux paramètres enzymatiques et cinétiques</u>	p. 106
a) Préparation de la solution tamponnée de lactose	
b) Mode opératoire	
2) <u>Action des effecteurs</u>	p. 107
a) Recherche des effecteurs	
b) Activation de la lactase par le magnésium	
IV INCLUSION DES CELLULES DANS L'ALGINATE DE CALCIUM	p. 111
A - <u>PROCEDE DE FABRICATION DES BILLES</u>	p. 112
1) <u>Préparation de la suspension</u>	
2) <u>Fabrication des billes</u>	
B - <u>ENROBAGE DES BILLES PAR LE POLYETHYLENIMINE</u>	p. 114
1) <u>Procédé d'enrobage</u>	
2) <u>Etude de l'enrobage des billes</u>	
C - <u>DETERMINATION DE LA QUANTITE MAXIMALE DE CELLULES QUI PEUT ETRE INCLUSE</u>	p. 115
V DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES ET CINETIQUES DE LA LACTASE DES CELLULES LYOPHILISEES INCLUSES	p. 116
VI HYDROLYSE EN CONTINU DU LACTOSE DE DIFFERENTES ORIGINES	p. 119

A - <u>SOLUTION TAMPONNEE DE LACTOSE</u>	p. 120
B - <u>LACTOSERUM DOUX DE FROMAGERIE</u>	p. 120
C - <u>LAIT ENTIER UHT</u>	p. 122

RESULTATS

I CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM	p. 124
II INCLUSION DES CELLULES DANS UN GEL D'ALGINATE	p. 126
A - <u>ASPECT DU SUPPORT</u>	p. 127
B - <u>DETERMINATION DE LA MASSE DE CELLULES POUVANT ETRE INCLUSE DANS LE SUPPORT</u>	p. 127
C - <u>ETUDE DE L'ENROBAGE DES BILLES D'ALGINATE PAR LE POLYETHYLENIMINE</u>	p. 132
III PARAMETRES ENZYMATIQUES	p. 135
A - <u>INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION DES CELLULES SUR L'ACTIVITE LACTASIQUE</u>	p. 136
B - <u>DETERMINATION DU pH OPTIMUM ET DE LA TEMPERATURE OPTIMALE</u>	p. 137
1) <u>pH optimum</u>	p. 136
2) <u>Température optimale</u>	p. 138
IV PARAMETRES CINETIQUES	p. 141
A - <u>CINETIQUE DE CONCENTRATION EN ENZYME</u>	p. 142
1) <u>Cellules lyophilisées non incluses</u>	
2) <u>Cellules lyophilisées incluses</u>	

B - <u>CINETIQUE EN FONCTION DU TEMPS</u>	p. 142
1) <u>Cellules lyophilisées non incluses</u>	
2) <u>Cellules lyophilisées incluses</u>	
C - <u>ACTION DES EFFECTEURS</u>	p. 145
D - <u>DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS</u>	p. 145
1) <u>Cellules lyophilisées non incluses</u>	p. 145
2) <u>Cellules lyophilisées incluses</u>	p. 148
E - <u>ETUDE DE L'ACTIVATION DE LA LACTASE PAR LE MAGNESIUM</u>	p. 149
1) <u>Cellules lyophilisées non incluses</u>	p. 149
a) Activation de la lactase par le magné- sium, dans un milieu à faible concentra- tion en substrat	p. 155
b) Activation de la lactase par le magné- sium, dans un milieu à forte concentra- tion en substrat	p. 157
c) Conclusion	p. 160
2) <u>Cellules lyophilisées incluses</u>	p. 160
V <u>HYDROLYSE EN CONTINU DU LACTOSE</u>	p. 163
A - <u>HYDROLYSE EN FONCTION DU DEBIT</u>	p. 164
B - <u>ROLE DU POLYETHYLENININE AU NIVEAU DE LA DUREE DE VIE DU REACTEUR</u>	p. 164
C - <u>HYDROLYSE EN CONTINU DU LACTOSE CONTENU DANS LE LAIT ET LE LACTOSERUM PAR DES CELLULES LYOPHILISEES INCLUSES</u>	p. 167

D - HYDROLYSE EN CONTINU DU LACTOSE PAR LES
CELLULES FRAICHES INCLUSES

p. 169

CONCLUSION

p. 173

Principales abréviations

<u>B. bifidum</u>	:	<u>Bifidobacterium bifidum</u>
EDTA	:	sel disodique d'acide ethylène diamine tetra acétique
EGTA	:	sel disodique d'acide ethylène bis- (oxy ethylènenitrilo)-tetra acétique
PEI	;	polyethylénimine
QPEI	:	polyethylénimine dont les fonctions amines sont quaternisées
PVA	:	polyvinylamine
NADP ⁺	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite : NADPH,H ⁺)
NAD ⁺	:	nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite : NADH,H ⁺)
ATP	:	adénosine 5'- triphosphate
ADP	:	adénosine 5'- diphosphate
UTP	:	uridine 5'- triphosphate
UDP	:	uridine 5'- diphosphate
Pi	:	ion phosphate
M	:	molaire
mM	:	millimolaire
Km	:	constante de Michaélis
Vm	:	vitesse maximale
cp	:	centipoise
(P/V)	:	poids / volume
MS	:	matière sèche (cellules lyophilisées)
PS	:	pouvoir sucrant

INTRODUCTION

Les études statistiques de GYORGY (57), font apparaître que les nourrissons alimentés au lait de femme ont une morbidité et une mortalité inférieures à celles des nouveaux-nés nourris au lait de vache. Notamment, ces nourrissons allaités au sein souffrent moins de troubles digestifs et de diarrhées infectieuses très préjudiciables dans les premiers mois qui suivent la naissance.

Cette protection fait intervenir deux types de facteurs. Les premiers qui sont apportés directement par le lait de femme sont les facteurs chimiques :

- les immunoglobulines A de sécrétion ;
- la lactotransferrine ;
- le lysozyme.

Ces facteurs agissent en synergie.

Les seconds, qui sont induits par le lait de femme, sont les facteurs microbiens de croissance.

En effet, la présence d'une souche de bifidobactérium : Bifidobacterium bifidum limite considérablement la morbidité chez ces derniers (GYORGY 57).

L'un des facteurs de croissance de cette souche est la N-acétyl-glucosamine qui se trouve sous forme liée dans les oligosaccharides du lait de femme : thème particulièrement étudié dans notre laboratoire.

L'hypothèse avait été émise que Bifidobacterium bifidum devait posséder un équipement enzymatique capable de libérer la N-acétyl-glucosamine indispensable à sa croissance.

En effet, Bifidobactérium bifidum constitue une source importante en exoglycosidases. Le microorganisme renferme

notamment une β -D-galactoside-galactohydrolase (EC 3.2.1.23) active sur le lactose : ou lactase, pouvant présenter un intérêt industriel et économique pour les industries agroalimentaires.

Dans ce but, nous avons envisagé l'immobilisation de l'activité lactasique de Bifidobactérium bifidum afin de pouvoir hydrolyser en continu le lactose contenu dans le lait et les lactosérums.

GENERALITES

I LACTOSE ET LACTOLYSATS

A - ASPECT NUTRITIONNEL

Le lait, principale source de lactose, est apparu il y a quelque cinq cent millions d'années avec les premiers mammifères.

L'homme qui est apparu il y a trois millions d'années consommait uniquement le lait maternel et c'est seulement récemment (dix mille ans) qu'il a appris à domestiquer les animaux.

La première indication historique de l'utilisation du lait de vache dans l'alimentation humaine apparaît sur un bas relief mésopotamien à Al-Ubaïd datant de trois mille deux cents ans avant Jésus Christ.

Alors que l'agriculture s'est étendue de par le monde, s'adaptant aux climats et aux conditions de culture, il est surprenant de noter que l'élevage pour la production du lait soit resté limité à certaines zones (DELMONT -35 -).

Les peuples d'Extrême Orient, les Indiens d'Amérique, les Noirs d'Afrique Equatoriale n'ont jamais utilisé les animaux pour la production laitière (PAIGE et al -129-).

Un grand nombre d'études ont clairement montré que corrélativement, ces populations ne possèdent plus de lactase intestinale. Celle-ci disparaît après la période de sevrage, comme chez de nombreux autres mammifères. La non consommation de lait par ces populations qui représentent 60 p. 100 de la population mondiale (SIMOONS -154-) est généralement attribuée à l'intolérance au lactose (PLIMMER -133-).

Aussi l'hydrolyse du lactose en galactose et glucose dans le lait permettrait d'équilibrer la ration alimentaire de ces populations intolérantes au lactose généralement déficientes en alimentation protéique.

1) Absorption du galactose

Le galactose partage avec le glucose, le système de transport actif à travers la membrane intestinale, il est par conséquent rapidement absorbé. Le taux de galactose sanguin, contrairement à celui du glucose, n'est pas constant. Il n'est pas sujet à une influence endocrine importante et immédiate comme l'est le glucose (Mc DONALD et WILLIAMS -114-).

L'accumulation de galactose sanguin conduit à la formation de galactitol qui provoque une opacification du cristallin ou cataracte (DAHLQVIST et al-32-).

a) Ingestion de galactose

La galactosémie est proportionnelle à la quantité de galactose ingérée. Au delà d'un certain seuil, le galactose se retrouve dans les urines et la galactosurie est proportionnelle à la quantité absorbée (STENSTAM -161-).

L'administration de galactose seul, est toujours suivi d'une augmentation de la concentration sérique en lactate et en acide urique (Mc DONALD et WILLIAMS -114-).

Des effets comparables sur les taux de lactate et d'acide urique ont été remarqués après l'ingestion de fructose (WOOD et ALBERTI -188-).

b) Ingestion simultanée de glucose et de galactose sous forme libre ou liée

La galactosémie varie très faiblement lorsque la quantité de glucose ingérée est identique à celle du galactose (fig 1 p. 7).

Ce fait peut prévenir l'apparition de lésions pathologiques qui apparaissent lors de galactosémies cliniques, quand les individus normaux ingèrent du lactose ou du lactose hydrolysé.

La réponse est identique chez les sujets intolérants au lactose -déficiência primaire ou secondaire en lactase- (STENSTAM -161- ; WILLIAMS et Mc DONALD -187-).

Des études plus récentes réalisées par LESTRADET et MONTREUIL en 1984 (104) montrent que l'ingestion de quantités importantes de galactose sous forme de lactolysat ou de lactose, en une prise unique de 25 g de galactose au cours d'un repas, n'entraîne pas l'apparition de galactose sanguin chez les sujets d'expérience. Par contre, une légère galactosurie apparaît six à douze heures après l'ingestion. Le taux de galactitol dans le sang reste faible et ne dépasse pas 0,5 mg par litre de sérum.

Le galactose seul ne stimule pas ou peu la sécrétion d'insuline. Lors de l'administration de galactose et de glucose, la régulation de la glycémie entraîne une augmentation de l'insulinémie accompagnée très certainement par une augmentation de l'utilisation du galactose. En effet, LESTRADET et COURPOTIN (103) démontrent qu'il n'y a pas de variation de la galactosémie.

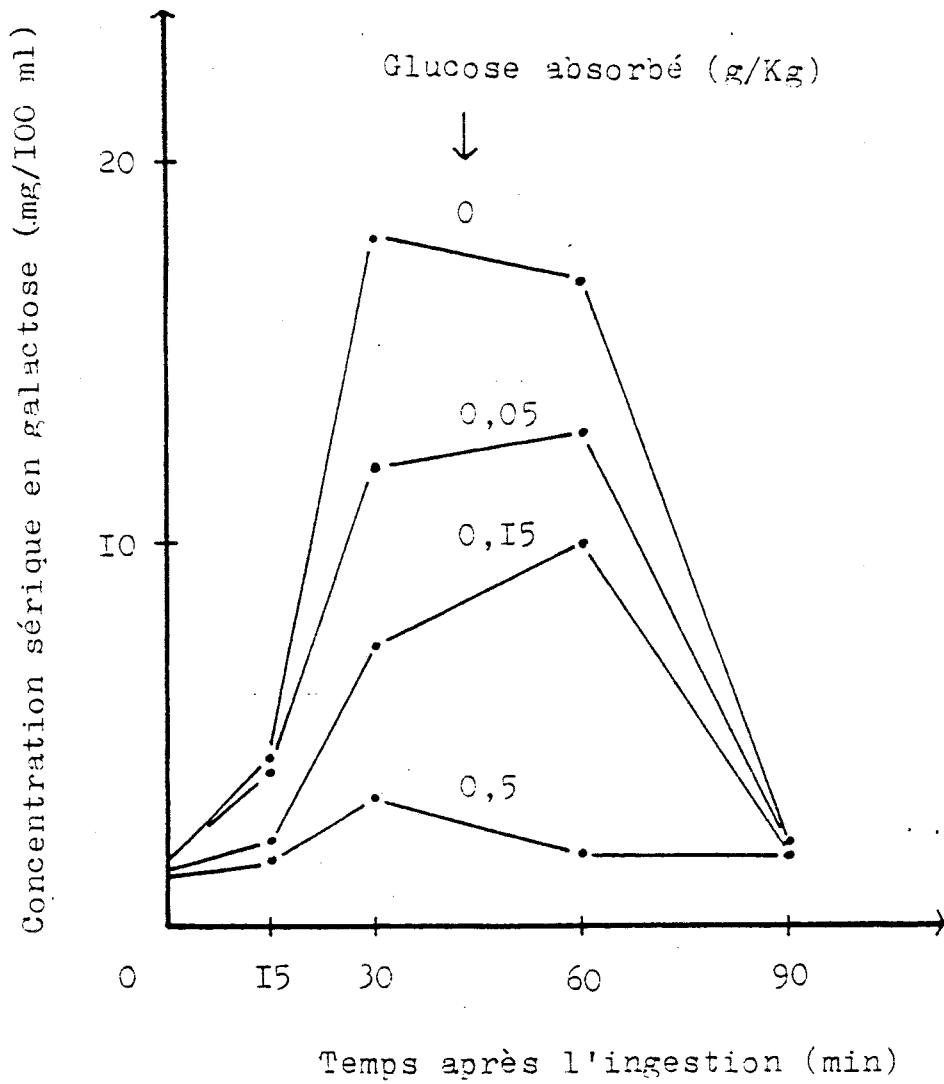


figure 1 : effet de l'ingestion du glucose d'après Mc DONALD et WILLIAMS (114) , sur la concentration sérique en galactose, après l'ingestion de celui-ci (0,5 g/Kg).

2) Pathologie

Il existe plusieurs formes d'intolérance au lactose et au galactose (DAHLQVIST - 31 -).

a) Déficience primaire en lactase intestinale

L'activité lactasique disparaît chez l'enfant vers l'âge de trois à six ans, alors que l'activité des autres saccharidases est conservée.

Ceci permet de définir deux types de population :

- LAD : lactase activity disappeared subjects ;
- LAP : lactase activity persistant subjects.

Les sujets LAD sont les plus nombreux (60 p. 100).

La persistance de l'activité lactasique chez l'adulte semblerait être due à une mutation qui s'est produite il y a quelques milliers d'années.

Cette mutation affecterait un gène de régulation qui supprimerait la production de lactase après un certain âge.

Ceci interviendrait à des âges différents suivant les populations (VARAVITHYA et al -171-).

b) Déficience secondaire en lactase intestinale

L'absence d'activité lactasique chez l'homme est due aux maladies entérocytaires (gastroentérites, agressions toxiques, déficience nutritionnelle).

Les autres activités saccharidasiques sont également affectées (DAHLQVIST -30 -).

Ces deux déficiences sont les plus répandues.

c) Déficiência congénitale en lactase intestinale

L'activité lactasique est absente dès la naissance (HOLZEL et al -72-).

d) Intolérance sévère au lactose

Il ne s'agit pas d'une déficiencia en lactase mais d'une maladie qui perméabilise la paroi stomacale.

Une lactosémie apparaît et dans ce cas le lactose semble avoir un effet toxique.

Si le lactose est introduit directement dans l'intestin grêle, au niveau du duodénum, il est digéré normalement (BERG et al - 7 - 8 -).

e) Absorption déféctueuse en glucose et en galactose

Le système de transport de ces sucres à travers la muqueuse intestinale est déféctueux (LINDQVIST et al -105- ; MEEUWISSE et al -115-)

f) Les galactosémies

Il y a blocage de l'anabolisme du galactose à différentes étapes (fig. 2 p. 11).

Les formes classiques de galactosémie sont :

- Le déficit héréditaire en galactokinase (GITZELMANN -49 - ; DAHLQVIST et al -32 -) :

Apparition d'une galactosurie, d'une cataracte provoquée par le galactitol formé à partir du galactose, accumulé et transformé par l'intermédiaire de l'aldose réductase en galactitol (figure 2 p. 11 , ①).

- La galactosémie congénitale (ISSELBACHER et al -76 -) :

Provoquée par un déficit en galactose-1-phosphate uridyl transférase, au niveau des cellules hépatiques et des hématies. Les symptômes sont identiques au déficit héréditaire en galactokinase (figure 2 p. 11 , ②).

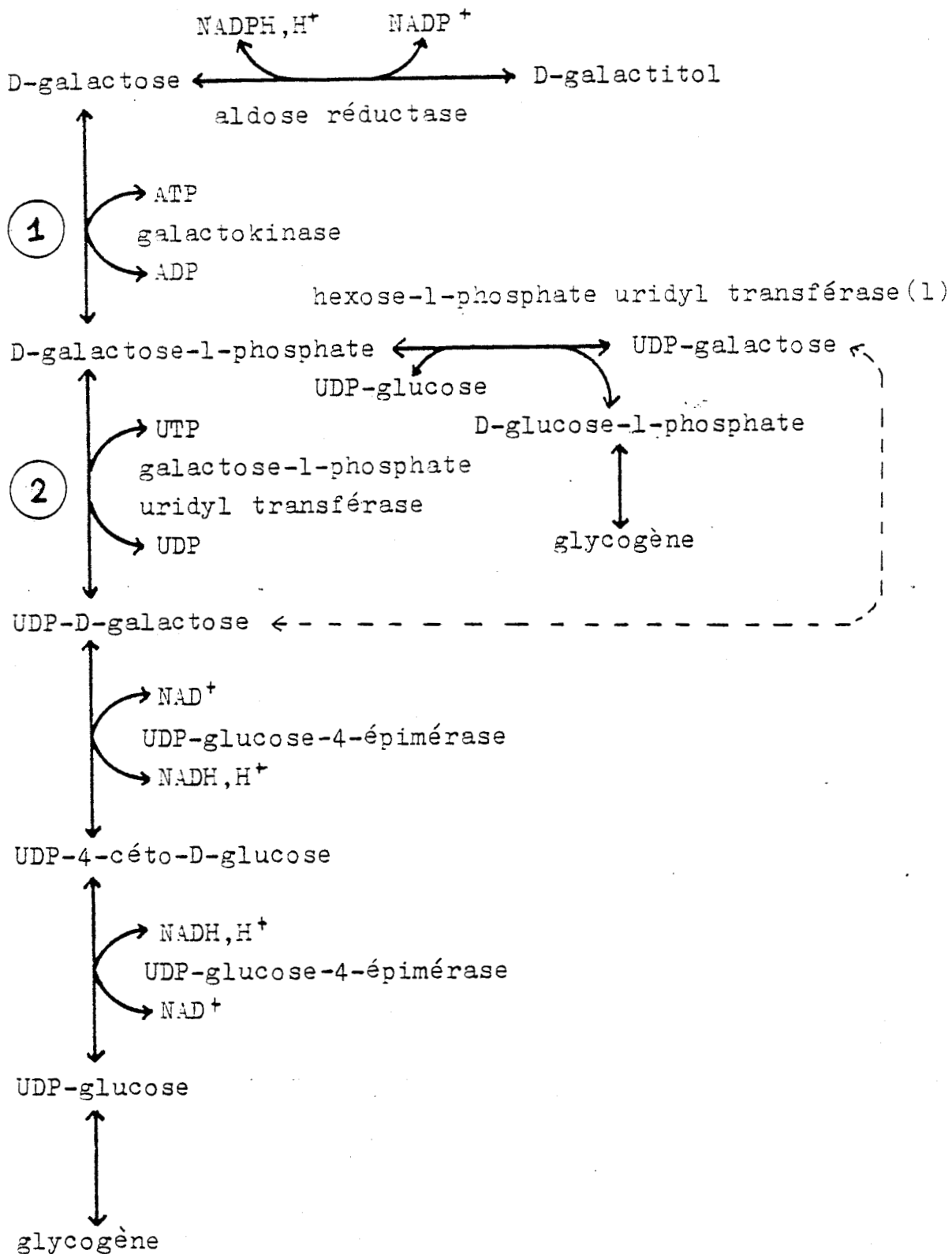


figure 2 : métabolisme du galactose (LEHNINGER -101-)
(1): présente dans le foie du fœtus

B - ASPECT ECONOMIQUE

La surproduction de lait et de produits secondaires comme les lactosérums conduisent à la recherche de nouveaux débouchés pour les produits de l'industrie laitière.

L'hydrolyse du lactose dans le lait permettrait le développement de nouveaux marchés notamment en ce qui concerne l'alimentation des populations intolérantes au lactose (ce qui correspond à 60 p. 100 de la population mondiale).

La quantité de lactosérum produite, que ce soit des lactosérums de fromagerie (lactosérum doux) ou de caséinerie (lactosérum acide), est de l'ordre de 1,5 millions de tonnes par an, ce qui correspond à 100 000 tonnes de lactose.

Le lactosérum, qui représente 90 p. 100 du volume du lait, a été jusqu'à présent inemployé et jeté après la fabrication du fromage. Une faible proportion de ces lactosérums servait après séchage, à l'alimentation animale. Récemment, toutefois, des procédés de filtration sur gel, d'ultrafiltration, d'osmose inverse, d'électrodialyse, de précipitation par des polyélectrolytes, ont été mis au point et permettent de récupérer les β -lactoglobuline et α -lactalbumine sans les dénaturer, ainsi que le lactose (CHEFTEL et al -24-).

Mais la quantité de lactosérum utilisé reste faible. L'hydrolyse du lactose peut conduire à la valorisation de ces sous-produits. De plus, le lactosérum rejeté est un facteur important de pollution, il correspond en France et par an à la pollution engendrée par une agglomération de 13 à 14 millions d'habitants (LENOIR -102-).

C - LEGISLATION FRANCAISE

Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique n'avait délivré qu'une autorisation provisoire d'addition de lactolysats et limitée à certains aliments (première autorisation le 16 janvier 1980 prolongée pour dix huit mois le 22 septembre 1981).

Cette réserve se justifiait par la toxicité bien connue du galactose qui possède un effet cataractogène lié à la formation du galactitol quand le galactose apparaît libre dans le sang.

Il a été démontré que la consommation de 50 g de lactolysat, ingéré au cours d'un repas et non pas à jeun, n'est suivi à aucun moment de l'apparition du galactose dans le plasma.

Aussi, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique a décidé d'autoriser le 27 mars 1984, l'emploi des lactolysats en concentration définie dans les produits suivants :

- biscotterie, panification fine	2 p.100
- salaisonnerie, charcuterie, plats cuisinés	2 p.100
- biscuiterie, pâtisserie industrielle	5 p.100
- desserts lactés	5 p.100
- crème glacée, glace alimentaire, sorbet	5 p.100

Il faut donc s'attendre à voir se développer en France, dans un avenir proche, l'industrie des lactolysats et il est hors de doute que les procédés d'hydrolyse du lactose par les lactases seront préférés à l'hydrolyse chimique qui est grande consommatrice d'énergie (BRADLEY et SMITH -15 - 16 -).

D - TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE ET LACTOSE HYDROLYSE

L'hydrolyse du lactose dans le lait ou les lactosérums permet d'augmenter le pouvoir sucrant (PS 0,3-0,4 pour le lactose à PS 0,7-0,8 pour le lactolysat) tout en conservant la même ration calorique (COUGHLIN et al -28- ; REPELIUS -141-).

Le sirop sucré, préparé à partir de lactosérum hydrolysé, peut être utilisé comme source de glucides et dans certains cas comme source de protéines dans les produits de boulangerie, de confiserie, dans les boissons sucrées non alcoolisées, dans les crèmes glacées, dans les desserts lactés et en alimentation animale à la place de la mélasse (ABRAHAMSEN - 2 - ; BARET - 5 - ; BONJEAN -13 - ; DICKER -36 - ; OLSON -126-).

Les lactosérums à lactose hydrolysé peuvent également servir de milieu de culture pour la production de levure de boulangerie (MAUGH -113-) ou servir de substrat pour la fabrication d'éthanol à l'aide de Saccharomyces cerevisiae (HAGERDAL -67-68-).

L'utilisation de lait à lactose hydrolysé augmente la rapidité d'action des présures et des ferments lactiques lors de la fabrication des fromages et des yaourts (SHUKLA -156- ; BODINE et al -11 - ; ABRAHAMSEN - 2 - ; GUNTHER et BURGER - 55 - ; RIDHA et al -143- ; GOODA et al -151-).

L'hydrolyse du lactose permet d'éviter le phénomène de la cristallisation du lactose observé en milieu concentré. La solubilité des produits d'hydrolyse est beaucoup plus élevée que celle du lactose ; elle passe de 18 p. 100 à 50 p. 100 de matière sèche.

Il est donc possible d'augmenter la quantité de matière sèche du produit, ce qui permet d'envisager le transport sur de longues distances (REPÉLIUS -141-).

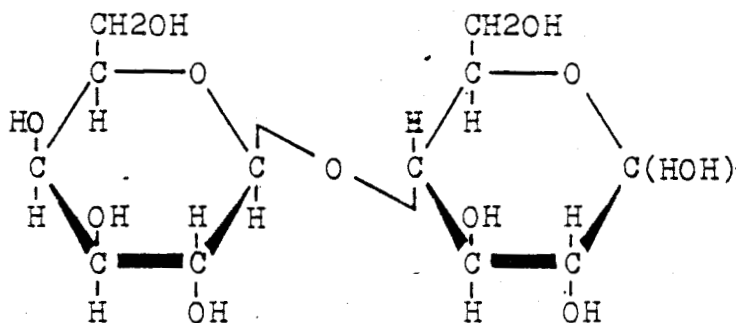
Le produit d'hydrolyse tend à être plus sensible aux réactions de MAILLARD (111). Un contrôle précis de la température durant l'évaporation, l'atomisation ou le transport est nécessaire pour éviter une perte importante de la valeur nutritionnelle du produit. Il a été montré que du lait UHT à lactose hydrolysé reste conforme à la législation en vigueur pendant une période de trois mois à température ambiante (ABDULINA et al - 1 -). Des précautions supplémentaires devront être prises pour les pays tropicaux.

E - HYDROLYSE DU LACTOSE

Introduction

Le lactose est un produit de la glande mammaire : c'est un disaccharide composé d'une molécule de D-glucose et d'une molécule de D-galactose.

Sa masse moléculaire est de 342 daltons.

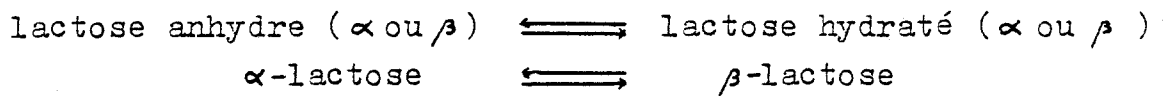


β -D-galactosyl-(1-4)- α / β -D-glucose ou lactose

Le lactose est soit sous la forme α , soit sous la forme β suivant la nature du glucose.

Ces deux isomères sont présents dans le lait et sont en équilibre ; il y a 62,2 p. 100 de β -lactose et 37,7 p. 100 d' α -lactose.

En fait, dans le lait, il y a un double équilibre :



Le lactose n'est pas entièrement libre dans le lait. Il se retrouve associé aux protéines dans une proportion voisine de 11 p. 100 (LUQUET et LINCOZWSKI - 110 -).

L'hydrolyse du lactose conduit à la formation de galactose et de glucose libre. Cette hydrolyse peut être réalisée par voie chimique ou enzymatique.

1) Hydrolyse acide

Sous l'action d'un acide fort, à chaud, le lactose est hydrolysé en galactose et glucose. La méthode ne peut être utilisée pour hydrolyser directement le lactose du lait ou du lactosérum, car, il y a dénaturation des protéines, brunissement non enzymatique d'où la nécessité d'utiliser des perméats d'ultrafiltration (ROBBERTSON et al -144-145-). Une teneur élevée en sels entraîne une perte de l'efficacité de l'acide.

Pour éviter ce problème, une déminéralisation préalable du lactosérum est nécessaire, généralement réalisée par électrodialyse ou sur résine échangeuse d'ions. (GOTTSCHICK -54 - ; LANGDON -96 -).

Après hydrolyse acide, la coloration brune et les saveurs désagréables qui apparaissent nécessitent une étape de décoloration sur charbon activé (BOER et ROBBERTSON - 12 - ; JOHANSSON - 78 - ; ROBBERTSON et al -145-) ou l'utilisation de bisulfite de sodium qui ralentit l'hydrolyse et affecte la saveur (GEKAS et LOPEZ - LEIVA - 48 -).

Le matériel utilisé est très coûteux car il doit pouvoir résister aux conditions de pression, d'acidité et de température élevée.

Les méthodes d'hydrolyse chimique du lactose se scindent en deux groupes (GEKAS et LOPEZ - LEIVA - 48 -) :

- l'hydrolyse acide homogène

Elle se fait de pH 1 à 2 à des températures de 100 à 150°C en "batch".

L'abaissement du pH se réalise généralement avec de l'acide sulfurique.

- l'hydrolyse acide hétérogène

Elle nécessite l'utilisation de résines fortement acides (sulfonées) très résistantes à la chaleur. L'hydrolyse peut se réaliser en continu.

Des exemples de procédés d'hydrolyse acide du lactose sont présentés dans le tableau I p. 18 .

Tableau I :

Exemples de procédés d'hydrolyse acide du lactose
(GEKAS et LOPEZ-LEIVA - 48 -)

substrat	méthode	pH	température (°C)	temps d'hydrolyse (h)	taux de conversion (p.100)
perméat de lactosérum ultrafiltré	résine échangeuse d'ions	1,2	150	0,05	80
perméat de lactosérum ultrafiltré	résine échangeuse d'ions	0,8	150	0,014	85
perméat de lactosérum déminéralisé et ultrafiltré	résine échangeuse d'ions	2,0	100	1	80
perméat de lactosérum ultrafiltré	procédé homogène (acide sulfurique)	1,35	140	0,18	50

2) Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse du lactose est catalysée par des enzymes appelées lactases qui coupent la liaison $\beta(1-4)$ du lactose. Elles sont très répandues dans le monde vivant et en particulier chez les microorganismes. Ce sont des β -D-galactoside-galactohydrolases (EC 3.2.1.23) ou β -D-galactosidases (cf. tableaux II p.20 et III p.21).

La stoechiométrie de la réaction est telle qu'une mole de lactose donne rarement une mole de glucose et de galactose.

En effet, le taux de conversion est très rarement de 100 p. 100 car des phénomènes d'inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction peuvent intervenir. L'enzyme peut parfois catalyser la réaction inverse. Ce sont des réactions dites de transglycosidations, le galactose peut se polymériser ou être greffé sur du lactose pour former des oligosaccharides (AUNSTRUP - 4 - ; SHUKLA -156-).

L'hydrolyse enzymatique du lactose peut s'effectuer de deux manières : par l'intermédiaire de lactases libres ou immobilisées.

a) Hydrolyse du lactose par des enzymes libres

Ces enzymes sont ajoutées dans le lait, les lactosérums, les jus lactosés et les perméats d'ultrafiltration. Elles hydrolysent le lactose dans des conditions précises.

Les principales lactases libres utilisées dans l'industrie sont regroupées dans le tableau IV p.22 .

Tableau II :

Sources possibles de β -D-galactosidases
(GEKAS et LOPEZ-LEIVA -48 -)

Plantes :

pêche
abricot
amande
grain de kéfir
bouton de rose sauvage
graine de luzerne
grain de café

Animaux :

intestin
cerveau et tissu non adipeu

Bactéries :

Escherichia coli
Bacillus megaterium
Thermus aquaticus
Streptococcus lactis
Streptococcus thermophilus
Lactobacillus bulgaricus
Lactobacillus helveticus
Bacillus sp.
Bacillus circulans
Bacillus stearothermophilus
Lactobacillus sporogenes

Levures :

Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis
Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis
Candida pseudotropicalis
Brettanomyces anomalus
Wingea roberstii

Champignons :

Neurospora crassa
Aspergillus foetidus
Aspergillus niger
Aspergillus flavus
Aspergillus oryzae
Aspergillus phoenicis
Mucor pucillus
Mucor micheli
Scopuloriopsis
Alternaria palmi
Curvularia inaequalis
Fusarium moniliforme
Alternaria alternata

Tableau III :

Préparations commerciales de lactases
(GEKAS et LOPEZ-LEIVA - 48 -)

Aspergillus niger

Baxter Laboratories, Chicago, Il., USA.
Dairyland Food Labs, Waukesha, Wi., USA.
Kyowa Hakko Kogyo Co., Japon.
Gist-Brocades, Seclin, France.
Wallerstein Co., Morton Grove, Il., USA.
GB Fermentation Industries, Inc., Il., USA.

Kluyveromyces lactis :

Gist-Brocades, Hollande, (Maxilact).
Nutritional Biochemicals Co.Ltd., Cleveland, USA.
Tokyo Tanabe Co.Ltd., Japon.

Kluyveromyces fragilis :

Kyowa Hakko Kogyo Co., Japon.
Sigma Chemicals Co., St.Louis, USA.
Novo A/S., Danemark, (Lactozym).

Escherichia coli :

CF Boeringer Gbmh, Mannheim, Allemagne de l'ouest.
Worthington Biochemical Corp., Freehold, USA.

Préparations à partir de levures :

British Drug House Ltd., Londres, Grande Bretagne.
DEBI, Cassina de Pecchi, Milan, Italie.
Sturges Enzymes Ltd., (Hydrolact.), Grande Bretagne.
Miles Laboratories, (Godo.), USA.

Préparation à partir de champignon :

Miles Laboratories, USA, (Takamine).

Tableau IV :

Principales lactases solubles utilisées dans l'industrie .

(GEKAS et LOPEZ-LEIVA -48-, SPROSSLER et PLAINER -160-, LUQUET et LINCZOWSKI -110-)

origine	société	conditionnement et dénomination commerciale	pH optimum	température optimale	effecteurs
<u>Kluyveromyces lactis</u>	Gist-Brocades (Hollande)	-poudre : Maxilact 20 000	7	35°C	activation par Mn ⁺⁺ , Na ⁺ .
		" " 40 000 -liquide : Maxilact L 2000 " " LX 5000	(5,5 à 7)	(4°C à 35°C)	inhibition par Ca ⁺⁺
<u>Kluyveromyces fragilis</u>	NOVO (Danemark)	-liquide Lactozym 750 L " " 1500 L	7,2 (6,5 à 7,2)	47°C mais utilisation à 40°C car la stabilité est plus grande.	activation par Mn ⁺⁺ , K ⁺ . inhibition par le galactose.
<u>Aspergillus niger</u>	Gist-Brocades (France)	-poudre Lactase LP (n'est plus commercialisée)	(3,5 à 4,5)	55°C (37°C à 55°C)	forte inhibition par le galactose.

Cette méthode difficilement contrôlable ne permet pas une hydrolyse en continu et nécessite des réacteurs de dimensions importantes.

Les enzymes ne peuvent être réutilisées et se retrouvent en quantité non négligeable dans le produit, ce qui leur laisse la possibilité de réagir ultérieurement.

L'arrêt de la réaction enzymatique se fait généralement par chauffage, cette opération peut être préjudiciable à la qualité du produit ainsi qu'à l'application de procédés ultérieurs de transformation (FINOCCHIARO et al - 42 -).

Les taux de conversion obtenus sont de l'ordre de 20 p. 100 pour la lactase d'Aspergillus niger et de 70 p. 100 à 90 p. 100 pour les lactases de Kluyveromyces fragilis et de Kluyveromyces lactis.

b) Hydrolyse du lactose par les enzymes immobilisées

Si de nombreux types de supports ont été utilisés pour l'immobilisation d'activités lactasiques, très peu de renseignements concernant les installations pilotes de ces réacteurs sont connus (tableau V p. 24).

Nous exposerons cependant brièvement deux procédés susceptibles d'être utilisés :

α) Le procédé d'hydrolyse CORNING

La lactase d'A. niger est fixée sur silice après silanisation et traitement à la glutaraldéhyde. Ce

Tableau V :

Lactases immobilisées commercialisées
(GEKAS et LOPEZ-LEIVA - 48 -)

société	système	application
Snamprogetti	Lactase de levure incluse dans des fibres de triacétate de cellulose. Hydrolyse en "batch" du lactose contenu dans le lait.	<u>Industrielle</u> Centrale latteria di Milano (Italie)
Corning Glass	Lactase d' <u>A. niger</u> immobilisée sur bille de silice. Hydrolyse en lit fixe d'un perméat d'ultrafiltration de lactosérum.	<u>Semi-industrielle</u> ULN Conde (France) Dairy Crest (UK) Kroger (USA)
Connecticut/Lehigh Universities	Lactase d' <u>A. niger</u> adsorbée sur alumine poreuse. Hydrolyse en lit fluidisé du perméat d'ultrafiltration de lactosérum.	<u>Installation pilote</u> (USA)
Valio Laboratories	Lactase d' <u>A. niger</u> adsorbée sur résine phénolique (Duolite ES 762). Hydrolyse du perméat d'ultrafiltration de lactosérum.	

Suite du Tableau V :

société	système	application
<p>Röhm GmbH (PLAINER <u>et al</u> -131-).</p>	<p>Lactase d'<u>A. oryzae</u> liée covalentiellement à des billes macropo- reuses de plexiglas (PLEKAZYM LAL). Hydrolyse en lit fixe du lactosérum acide.</p>	<p><u>Installation</u> <u>pilote</u> (Allemagne de l'ouest)</p>
<p>" "</p>	<p>Lactase de <u>K. lactis</u> immobilisée sur billes de plexiglas (PLEKAZYM LY). Hydrolyse en lit fixe du lactosérum doux et du lait.</p>	<p>" "</p>
<p>Sumimoto</p>	<p>Lactase d'<u>A. oryzae</u> liée covalentiellement sur des billes de rési- ne. Hydrolyse du lactosé- rum et du lait.</p>	<p><u>Installation</u> <u>pilote</u> (Japon)</p>
<p>Amerace Corp.</p>	<p>Lactase d'<u>A. oryzae</u> immobilisée covalen- tiellement sur feuilles de PVC-silice. Hydrolyse le lactosé- rum.</p>	

procédé en lit fixe s'applique au perméat d'ultra-filtration de lactosérum, la déminéralisation est conseillée à 50 p. 100.

Le perméat est ensuite acidifié à pH 3,5 - 3,8, la même charge d'enzyme peut opérer durant 500 jours en travaillant 20 h par jour. Pour un temps de contact de 5 à 10 min, le taux d'hydrolyse atteint 80 p. 100 (LUQUET et LINCZOWSKI -110-).

β) Le plexazym L A 1

La lactase d'Aspergillus oryzae est fixée sur billes de plexiglas (polymère méthacrylique avec des groupements époxy).

Ce procédé en lit fixe s'applique au lactosérum, acide de préférence, mais également au lactosérum doux et au lait.

Cette lactase immobilisée possède un pH optimum de 4,5, et à pH 6,5, elle ne perd que 60 p. 100 de son activité. La température d'utilisation peut être comprise entre 30°C et 40°C pour le lactosérum acide et 55°C pour le lait et les lactosérums doux, ce qui empêche la croissance microbienne.

Exemples d'utilisation :

Sur du lactosérum purifié (pH 4,5 ; lactose à 5 p. 100) à 35°C avec un nettoyage du réacteur par des sels d'ammonium quaternaire (0,1 p. 100) tous les trois jours.

70 tonnes de lactosérum, c'est à dire 3,5 tonnes de lactose seront hydrolysés à 90 p. 100 en moyenne

par kg de plexazym L A 1 en 60 jours.

Le temps de demi-vie du réacteur est, dans ces conditions, de 150 jours.

- L'hydrolyse du lactose contenu dans du lait pasteurisé ou stérilisé et non écrémé conduit au traitement de 12 tonnes de lait en 30 jours avec un taux d'hydrolyse moyen de 80 p. 100 et à une température de 50-55°C pour 1 kg de plexazym L A 1.

Le temps de demi-vie du réacteur est de l'ordre de 70 à 90 jours (PLAINER et al -132-).

γ) Le plexazym L Y

La lactase de K. lactis est immobilisée comme pour le plexazym L A 1.

Ce procédé en lit fixe s'applique au lait et au lactosérum doux, car cette lactase immobilisée possède un pH optimum de 6,5 et est complètement inactivée à pH 5,5. Sa température optimale d'activité est de 40°C et cette enzyme est sensible au calcium et à la chaleur.

Elle ne peut être employée qu'à des températures basses.

Exemple d'utilisation :

Sur du lait stérilisé à 1,5 p. cent de matière grasse grasse : en 30 jours, 13 tonnes de lait seront traitées par kg de plexazym L Y à un taux d'hydrolyse moyen de 85 p. 100 et à 7°C, un nettoyage du réacteur étant réalisé tous les jours par une solution d'eau oxygénée à 0,1 p. 100.

Dans ces conditions, le temps de demi-vie du réacteur est de 50 jours environ. Une baisse d'activité de l'enzyme doit être envisagée lorsque l'on utilise du lait pasteurisé en raison d'une teneur plus élevée en calcium (PLAINER et al -132-).

Avantages et inconvénients des enzymes immobilisées pour l'hydrolyse du lactose

L'utilisation de réacteurs à enzymes immobilisées permet une réutilisation de l'enzyme ainsi qu'une séparation facile entre le produit et le catalyseur biologique.

L'immobilisation permet une production en continu ou en "batch", une grande diversité existe quant à la taille des réacteurs. Dans ces conditions, un contrôle plus précis des conditions de travail de l'enzyme peut être effectué. Cependant, l'immobilisation entraîne une perte d'activité spécifique de l'enzyme, un encrassement du réacteur plus ou moins prononcé en fonction des substrats (lait entier, demi écrémé, lactosérum).

L'utilisation de lait ou de dérivés laitiers nécessite de travailler dans des conditions stériles ou voisines de la stérilité.

Les coûts du support et de l'immobilisation ne sont pas négligeables, surtout s'il est nécessaire d'effectuer un début de purification du système enzymatique.

II IMMOBILISATION DE CELLULES ET D'ORGANITES
SUBCELLULAIRES

A - INTRODUCTION

La transformation ou la synthèse de certaines substances par voie chimique nécessite généralement de nombreuses étapes réactionnelles, souvent difficiles à mettre en oeuvre industriellement et fort onéreuses. C'est pour cette raison que s'est développée depuis quelques années une technologie de transformation par voie biologique, à l'aide d'enzymes, de cellules bactériennes, végétales et même d'organites subcellulaires, immobilisés ou non.

En effet, toute une série d'étapes réactionnelles peut être effectuée par des cellules judicieusement choisies, à condition que celles-ci soient placées dans un milieu adéquat.

L'immobilisation de cellules ne nécessite pas l'extraction des enzymes intervenant dans la biotransformation et permet également une séparation entre la phase contenant le substrat, le produit et la phase solide au niveau de laquelle se trouve l'activité catalytique.

Les méthodes d'immobilisation cellulaire sont simples et facilement réalisables dans l'industrie.

B - TYPES D'IMMOBILISATION CELLULAIRE

1) Inclusion

L'immobilisation de cellules par inclusion se classe en cinq catégories : l'inclusion par précipitation, dans un gel de polyélectrolyte stabilisé par des ions multivalents, par copolymérisation, par polymérisation et par microencapsulation

Les produits et les substrats intervenant devront être de petite taille afin de pénétrer à travers la structure du support ou d'en sortir.

a) Inclusion par précipitation

La réticulation d'une solution de polymère contenant des cellules en suspension peut s'effectuer par précipitation du polymère en changeant les conditions du milieu (pH, température, salinité, solvant).

Les liaisons formées sont de type ionique, hydrogène, hydrophobe.

Les polymères les plus employés sont présentés dans le tableau VI p. 32 .

Cette réticulation est souvent réversible et nécessite parfois une opération de tannage par des agents bifonctionnels tel que la glutaraldéhyde.

Un des cas remarquable est l'immobilisation de cellules dans un gel de carraghénane qui se constitue en présence d'une forte concentration en chlorure de potassium.

Des zones de jonctions se forment entre les molécules de carraghénane provoquant ainsi la gélification selon le schéma suivant :

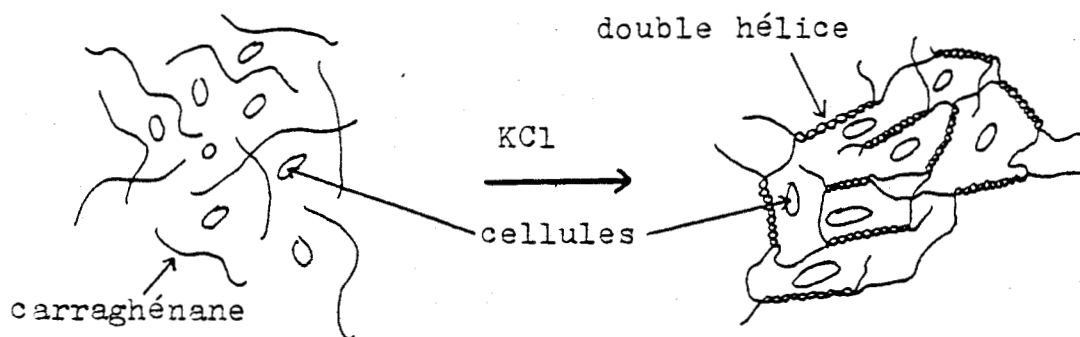


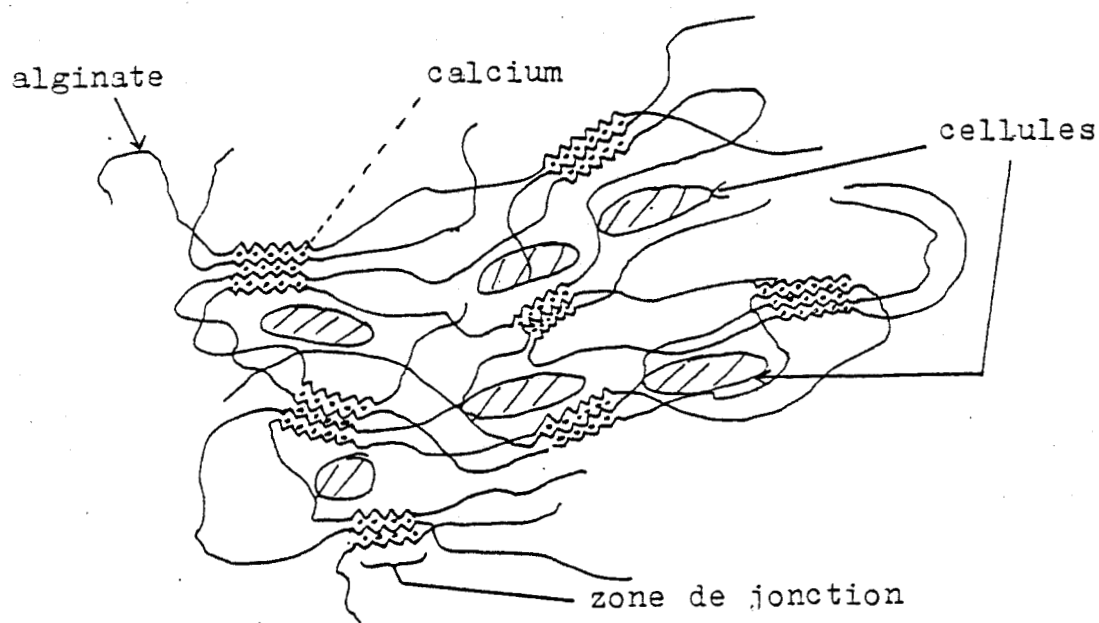
Tableau VI :
Exemples d'inclusions par précipitation de polymères.

polymère	agent précipitant	cellules	réaction (substrat/produit)	référence
carraghénane	refroidissement	<u>E. coli</u>	production d'acide aspartique	(170)
" "	KCl			
" "	KCl	<u>Saccharomyces phaeochromogenes</u>	glucose/fructose	(163)
" "	tannage par la gélatine-glutaral- déhyde			
agar	refroidissement	<u>Rhodopseudomonas</u>	production d'hydrogène	(43)
agarose	refroidissement	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	saccharose/glucose fructose	(37)
α -cellulose	passage d'une phase organique à une pha- se aqueuse	" "	saccharose/glucose fructose	(109)
gelatine	refroidissement et glutaraldéhyde	<u>Streptomyces violaceoniger</u>	glucose/fructose	(146)
polystyrène	passage d'une phase organique à une pha- se aqueuse	<u>Candida tropicalis</u>	dégradation du phénol	(65)

b) Inclusion dans un gel de polyélectrolyte

Des solutions de polyélectrolytes contenant des cellules en suspension sont gélifiées par contact avec une solution d'ions multivalents.

Les polyélectrolytes les plus largement utilisés (tableau VII p. 34) sont les alginates qui se gélifient en présence de calcium selon le schéma suivant :



Ce sont des méthodes douces qui ne provoquent pas de chutes importantes de l'activité enzymatique mais ne sont utilisables que lorsque le milieu contient suffisamment d'ions multivalents qui permettent d'éviter la déplétion en ions de la matrice.

En aucun cas le gel ne peut être mis en présence d'agents chélateurs.

Tableau VII :

Exemples d'inclusions dans un gel de polyélectrolyte.

polymère	contre ion	cellule	réaction	référence
alginate	Al ⁺⁺⁺	<u>Candida tropicalis</u>	dégradation du phénol	(65)
alginate (tannage par la glutaraldéhyde ou gelatine-glutaraldéhyde)	Ca ⁺⁺	<u>Saccharomyces phaechromogenes</u>	glucose/fructose	(163)
alginate enrobé par du PEI ou du PVA	Ca ⁺⁺	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	production d'éthanol	(180)
ethyl-succinyl cellulose	Mg ⁺⁺	<u>Saccharomyces phaechromogenes</u>	glucose/fructose	(163)
copolymère de 2-méthyl-5-vinylpyridine-méthyl acrylate et d'acide méthacrylique (MPM - 47)	Ca ⁺⁺ ou Mg ⁺⁺	" "	glucose/fructose	(163)

c) Inclusion par copolymérisation

C'est une réticulation chimique de polymères ou de prépolymères et de cellules.

Cette technique permet de former des particules très résistantes aux contraintes mécaniques, dotées d'une certaine élasticité, poreuses, inertes et contenant une grande quantité de cellules (KLEIN et WAGNER -89 -).

De nombreux polymères et agents pontants ont été utilisés (tableau VIII p.36).

La copolymérisation fait intervenir des composés qui diminuent les activités enzymatiques supportées par les cellules. Ce sont d'une part les agents bifonctionnels, d'autre part les radicaux libres formés lors de la réaction de copolymérisation.

Un exemple type de copolymérisation est l'inclusion dans un polymère de polyazétidine qui se forme par séchage, chauffage ou changement de pH d'une solution aqueuse de prépolymère de polyazétidine (PAP) contenant des cellules bactériennes en suspension.

Le PAP. peut réagir avec des fonctions amines primaires et secondaires (par exemple une autre molécule de PAP), carboxyliques, hydroxyles et thiols. Les réactions sont représentées dans la figure 3 p.37 .

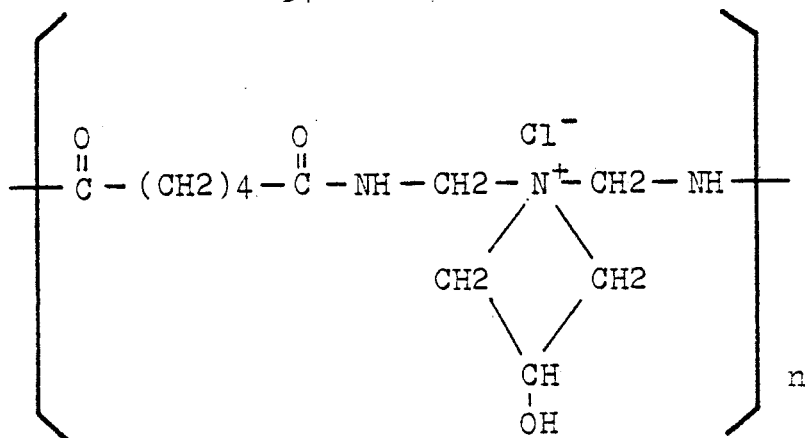
d) Inclusion par polymérisation

La polymérisation s'effectue en présence de cellules et de monomères précurseurs du polymère.

C'est une technique qui présente les avantages et les inconvénients de la copolymérisation et qui nécessite

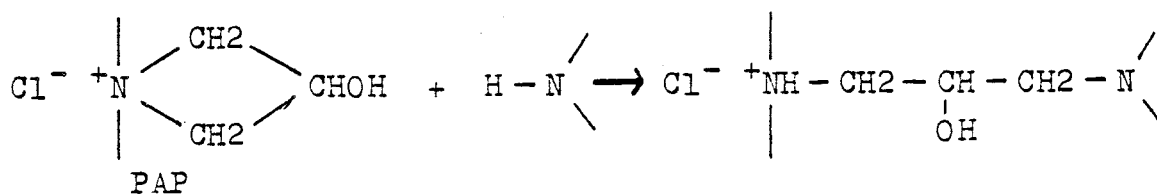
Tableau VIII :
Exemples d'inclusions par copolymérisation.

polymère	agent réticulant	cellule	réaction (substrat/produit)	référence
polyacrylamide hydrazide	-glyoxal -glutaraldéhyde -polyvinylalcool oxydé par le périodate	<u>Saccharomyces clavuligerus</u>	production d'anti- biotique	(44)
polyacrylamide hydrazide + alginate de calcium enlevé ensuite par une solution de sels de phosphate	-glyoxal	<u>Pseudomonas sp</u>	dégradation du phénol	(10)
polyuréthane	H2O à froid	<u>E. coli</u>	acylation de la pénicilline	(86)
résine époxy	polyamine	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	mélasse de sucre de cane/éthanol	(121)
polyéthylène glycol diméthacrylate	irradiation UV	<u>Arthrobacter simplex</u>	hydrocortisone/ prednilosone	(45)
polyvinyl alcool	-acide 3-mercapto propionique -acide acrylique et exposition à la lumière	" "	" "	(87)
polyéthylènimine	-glutaraldéhyde -polyacroléine en présence de bisulfite	" "	" "	(87)
polyazétidine	séchage	<u>E. coli</u>	production d'acide aspartique	(189)
collagène	glutaraldéhyde et séchage	<u>Saccharomyces phaeochromogenes</u>	glucose/fructose	(181)
fibrinogène	thrombine	K-562 (cellule animale)	?	(125)

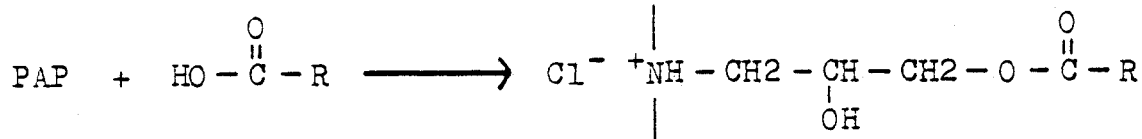


prépolymère de polyazétidine (PAP)

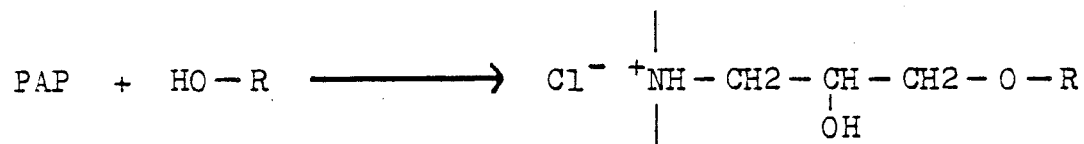
Réaction avec les fonctions amines : (Ex : autre PAP)



Réaction avec les fonctions carboxyliques :



Réaction avec les fonctions hydroxyles



Réaction avec les fonctions thiols

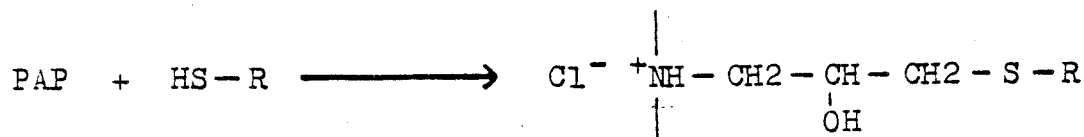


figure 3 : polymérisation du prépolymère de polyazétidine et réaction avec les autres fonctions chimiques (WOOD et CALTON -189-)

un contrôle rigoureux de la polymérisation afin d'éviter les pertes réactionnelles par empêchement diffusionnel.

L'inclusion de cellules dans un gel de polyacrylamide est l'une des méthodes les plus utilisées (figure 4 p.39).

La polymérisation de l'acrylamide et du N,N'-méthylènebisacrylamide s'effectue selon le schéma réactionnel représenté dans le tableau IX p.40, en présence de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et de persulfate d'ammonium comme catalyseurs de la réaction de polymérisation.

Lorsque la polymérisation est effectuée en présence d'une suspension de cellules celles-ci se retrouvent incluses dans un réseau extrêmement dense de polyacrylamide.

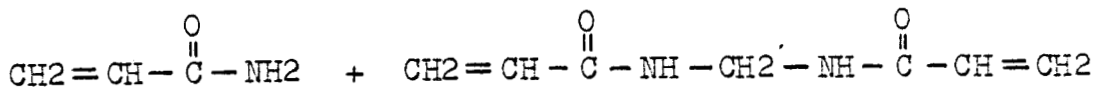
e) Microencapsulation

Une membrane semi-perméable entoure une microgoutte de suspension cellulaire. Les cellules ne peuvent s'échapper à travers la membrane mais celle-ci permet le passage de petites molécules (substrat et produit de la réaction enzymatique).

C'est une technique qui a été très peu développée car les particules formées sont très fragiles et le contact avec les solvants organiques provoque une baisse de l'activité enzymatique.

Différents polymères ont été utilisés (NAGASHIMA et al -121-) : le nylon, le polyester insaturé, l'acétyl-butyl cellulose, le polystyrène poreux.

Voici un exemple de microencapsulation de cellules par du nylon 6,10. Une suspension de cellules est formée dans une solution d'hexaméthylène diamine puis une goutte à goutte est réalisé dans une solution organique de chlorure



acrylamide

N,N'-méthylènebisacrylamide

TEMED
 et
 persulfate d'ammonium

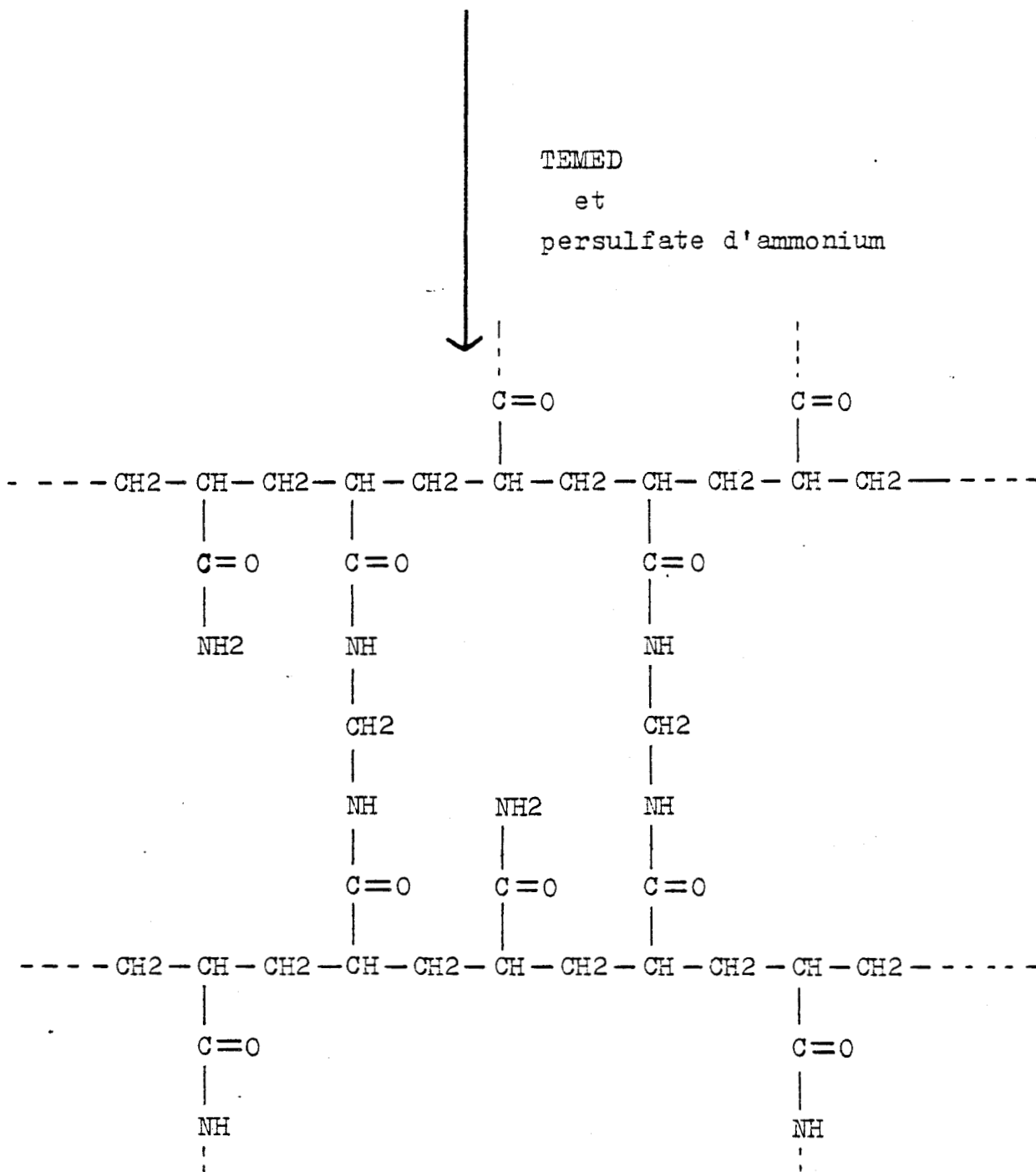


figure 4 : formation d'un gel de polyacrylamide .

Tableau IX :
Exemples d'inclusions par polymérisation.

prépolymère (catalyseur)	cellule	réaction (substrat/produit)	référence
acrylamide et bisacrylamide (TEMED, persulfate)	<u>Saccharomyces</u> <u>phaechromogenes</u>	glucose/fructose	(163)
acrylamide et bisacrylamide (irradiation γ)	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	saccharose/glucose fructose	(37)
acrylamide (irradiation γ)	" "	" "	(37)
acrylamide et bisacrylamide (TEMED, persulfate) en présence d'alginate	<u>Catharanthus</u> <u>roseus</u>	saccharose/ajmalicine	(95)
acrylamide et bisacrylamide (TEMED, persulfate) en présence de xanthane	" "	saccharose/serpentine	(95)

de sébacyle. En quelques minutes, il se forme une fine membrane de nylon autour de la goutte selon le schéma réactionnel représenté à la figure 5 p.42 .

2) Adsorption

Les cellules microbiennes existent dans leur environnement naturel à l'état adsorbé (DURAND et NAVARRO -38 -) et leur comportement physiologique se modifie lorsqu'elles sont désorbées.

L'immobilisation par adsorption permet de recréer en partie l'environnement de la cellule. Les supports utilisés sont d'origine organique, minérale ou naturelle (tableau X p.43).

Il est parfois difficile de définir la relation qui existe entre le support et les cellules (KLEIN et WAGNER -89 -). Ce sont souvent des interactions qui font intervenir conjointement plusieurs phénomènes physiques différents (liaisons électrostatiques, hydrophobes, de type hydrogène, etc...).

C'est pour cela que la quantité de cellules immobilisées dépend de la nature du support pour une cellule donnée (tableau XI p.44) et inversement.

La technique d'immobilisation par adsorption possède ces limites ; d'une part, les liaisons entre le support et les cellules ne sont pas suffisamment fortes, un relargage de cellules dans le milieu est toujours observé, d'autre part, les capacités des supports sont faibles.

Cependant cette méthode est simple. Il n'y a pas ou peu de pertes d'activité enzymatique au moment de l'immobilisation.

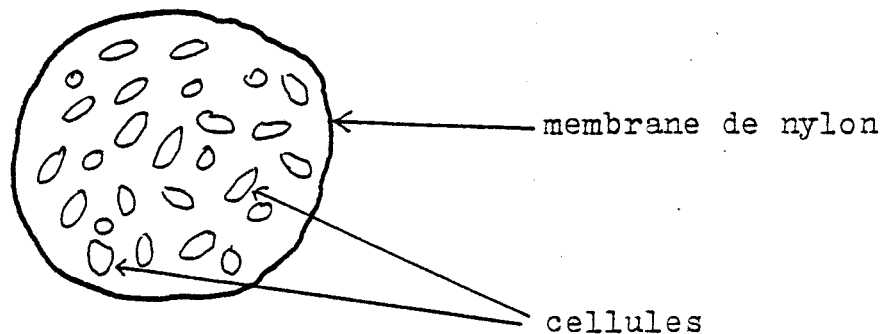
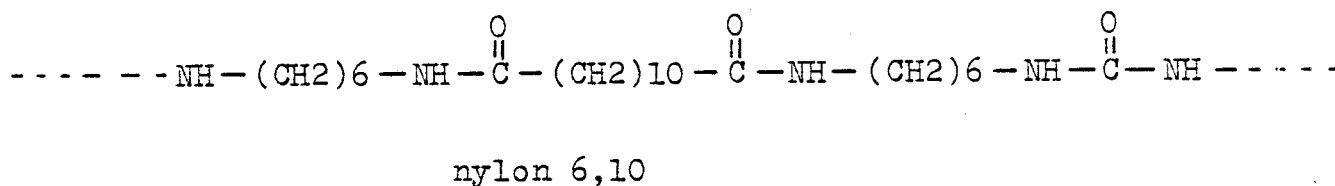


figure 5 : microencapsulation de cellules par une membrane de nylon 6,10 .

Tableau X :
Exemples d'immobilisations de cellules par adsorption.

support	cellule	réaction (substrat/produit)	référence
gélatine	<u>Lactobacillus</u> +levure	lactosérum/acide lactique	(26)
cellulose(modifiée)	<u>Aspergillus oryzae</u>	saccharose/glucose fructose	(79)
séphadex(modifiée)	<u>Streptomyces sp</u>	glucose/fructose	(155)
CM/DEAE/TEAE cellulose	<u>Achromobacter sp</u>	7-ADCA/céphaléxine	(166)
billes de verre	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	glucose/éthanol	(66 - 119)
silice	" " "	mélasse de sucre de cane /éthanol	(121)
brique pilée	" " "	mût/éthanol	(27)
charbon activé	<u>Pseudomonas sp</u>	dégradation du phénol	(151)
polychlorure de vinyl	<u>Saccharomyces carlsbergensis</u>	mût/éthanol	(27)
mousse macroporeuse de polyuréthane	<u>Capsicum frutescens</u>	saccharose/capsicum	(106)

Tableau XI :

Rétention de Saccharomyces carlsbergensis
sur différents supports (KLEIN et WAGNER - 89 -).

nature du support	masse sèche de microorganismes (mg) par gramme de support.
bois (copeaux)	248
polychlorure de vinyl	80
Dowex 1 × 8 (acétate)	21
Duolite A 162 (acétate)	9
Duolase SP3	2,5
Sphérosil XO B 015	1,7

3) Immobilisation covalentielle en surface d'un polymère

La fixation covalentielle de cellules sur des supports variés a été réalisée dans de nombreux cas (tableau XII p.46).

L'avantage d'une telle méthode est que les cellules sont très peu relarguées dans le milieu, d'ou une plus grande stabilité du réacteur. .

Toutefois, cette méthode conserve l'inconvénient d'un faible rapport activité/poids du support comme pour l'immobilisation par adsorption.

Les conditions auxquelles sont soumises les cellules sont souvent facteurs de perte d'activité enzymatique. Les contacts avec les solvants organiques, avec des réactifs chimiques qui interagissent parfois au niveau des sites actifs provoquent souvent des pertes importantes d'activité enzymatique.

Voici un exemple type d'une méthode utilisée pour fixer des cellules sur un support : DURAND et NAVARRO (38) ont immobilisé des cellules de Saccharomyces carlsbergensis sur billes de verre, selon le schéma réactionnel représenté à la figure 6 p.47 , pour produire de l'éthanol.

4) Immobilisation par réticulation chimique ou physique

Le tableau XIII p.48 montre quelques exemples de ce type d'immobilisation.

a) Réticulation chimique

Les cellules sont réticulées entre elles par l'inter-

Tableau XII :

Exemples d'immobilisations covalentiellles de cellules en surface d'un support.

support	agent de couplage	cellule	réaction (substrat/produit)	référence
fibres de cellulose	trichloro-S-triazine	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	glucose/éthanol	(46)
carboxyméthyl cellulose	carbodiimide en milieu aqueux	<u>Micrococcus luteus</u>	activité L-histidine ammoniolyasique	(77)
polymère de glycidyl-méthacrylate	glutaraldéhyde	<u>Aspergillus niger</u>	glucose/acide urocanique	(122)
billes de verre	silanisation et glutaraldéhyde	<u>Saccharomyces carlsbergensis</u>	production d'éthanol	(38)

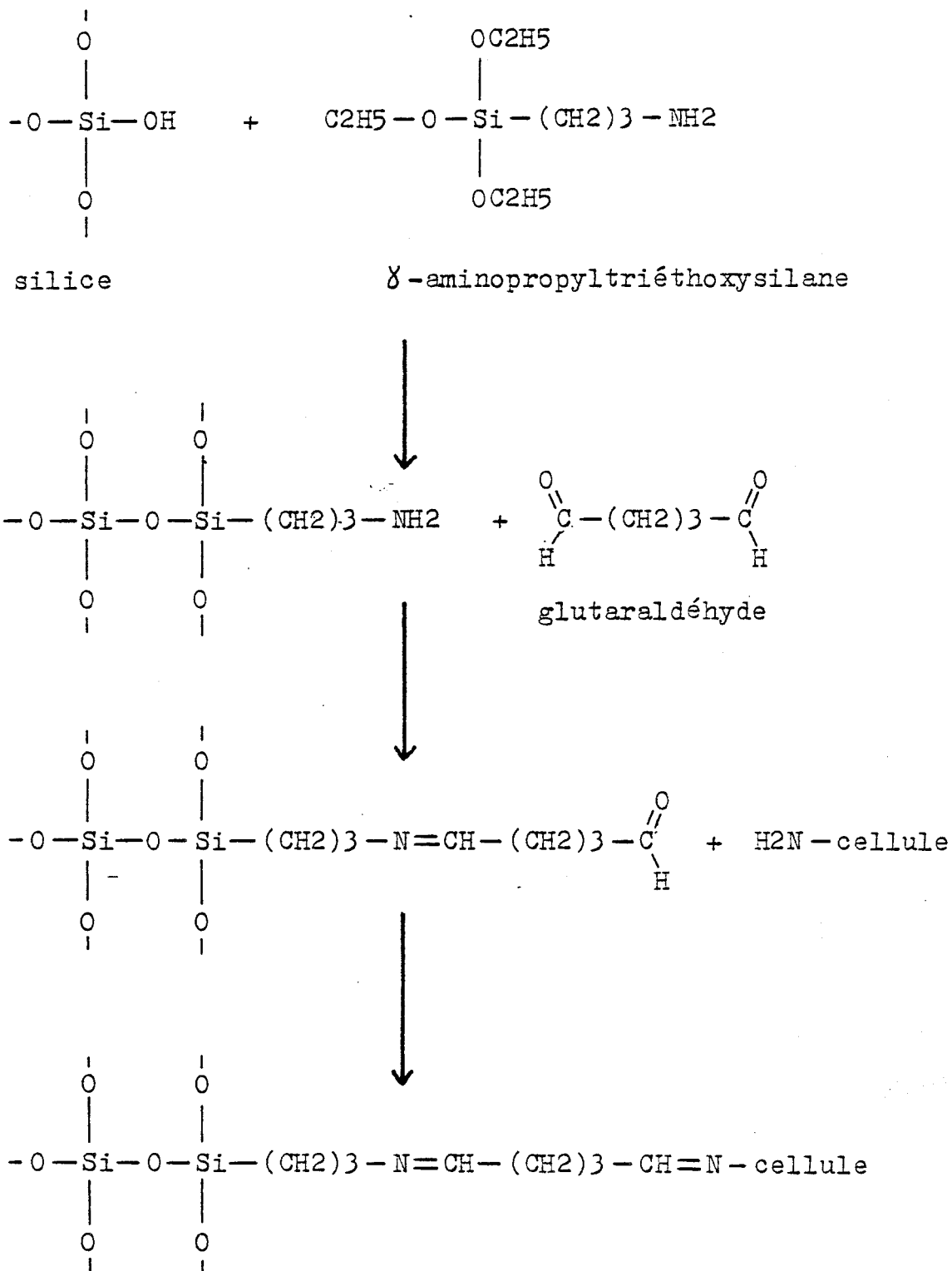


figure 6 : immobilisation de cellules sur billes de verre (DURAND et NAVARRO -38 -) .

Tableau XIII :

Exemples d'immobilisations par réticulation.

RETICULATION CHIMIQUE

cellule	réactif	réaction (substrat/produit)	référence
<u>E. coli</u>	glutaraldéhyde	NH ₄ ⁺ , fumarate/acide L-aspartique	(25)
<u>Streptomyces sp.</u>	composé possédant deux fonctions diazoiqes	glucose/fructose	(98)

RETICULATION PHYSIQUE

cellule	agent de flocculation	réaction (substrat/produit)	référence
<u>Aspergillus niger</u>	polyélectrolytes	sucres inverti/acide gluconique	(99)
<u>Lactobacillus brevis</u>	chitosan	glucose/fructose	(169)
<u>Mortierella vinacea</u>	formation de granulés	lactose/glucose, fructose	(117)

médiaire d'agents bifonctionnels (aldéhydes et composés diazoïques).

L'agent pontant le plus couramment utilisé est la glutaraldéhyde qui réagit avec les fonctions amines des cellules de manière à former un réseau tridimensionnel selon le schéma réactionnel représenté à la figure 7 p. 50 .

b) Réticulation physique

La réticulation se fait par floculation des cellules, cette technique nécessite de la part des cellules la capacité de former des agrégats en culture dont la formation peut être induite et stabilisée par l'adjonction de polymère dans le milieu.

La compaction de ces agrégats peut être réalisée et conduire ainsi à la formation de granulés (METZ et KOSSEN -116-).

L'importance de l'immobilisation par réticulation physique s'accroît au niveau des technologies industrielles "légères", car elle conduit à une forte concentration de cellules par unité de volume (KLEIN et WAGNER -89 -).

C - CONCLUSION

Lorsque l'on compare l'immobilisation d'enzymes à l'immobilisation cellulaire, cette dernière offre plusieurs avantages :

- Elle ne nécessite pas l'isolement et la purification des enzymes, ces deux opérations sont onéreuses et provoquent une perte importante

La glutaraldéhyde se trouve, en solution aqueuse, sous la forme d'un polymère qui réagit avec les fonctions amines se trouvant à la surface des cellules, de manière à former un réseau tridimensionnel .

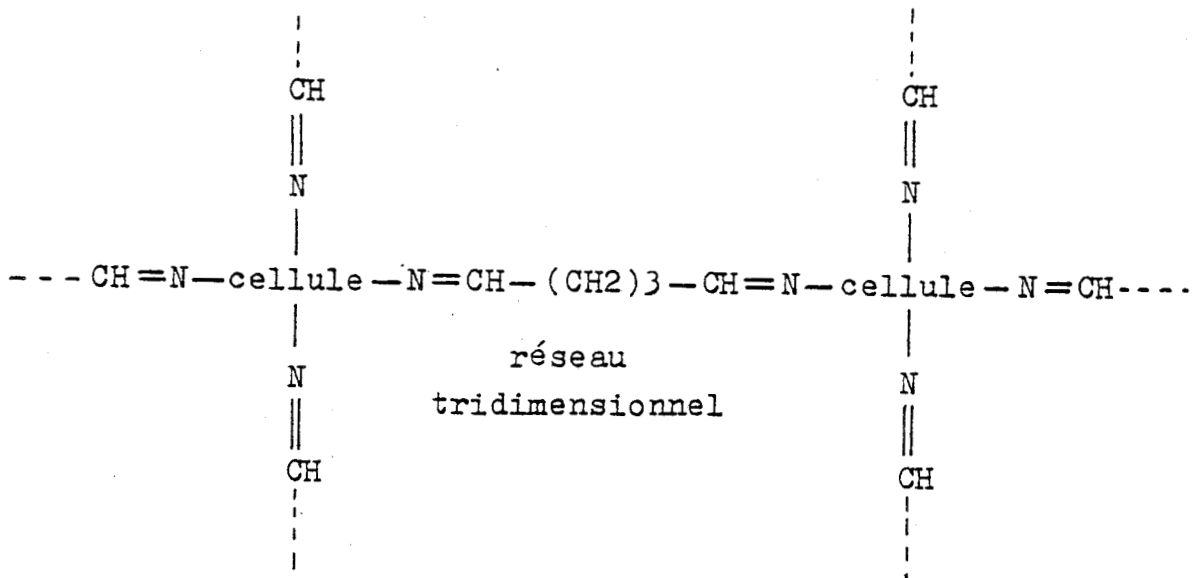
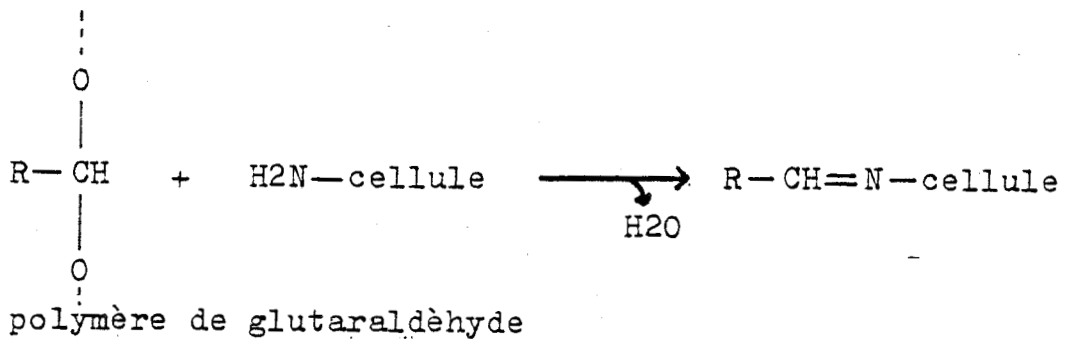
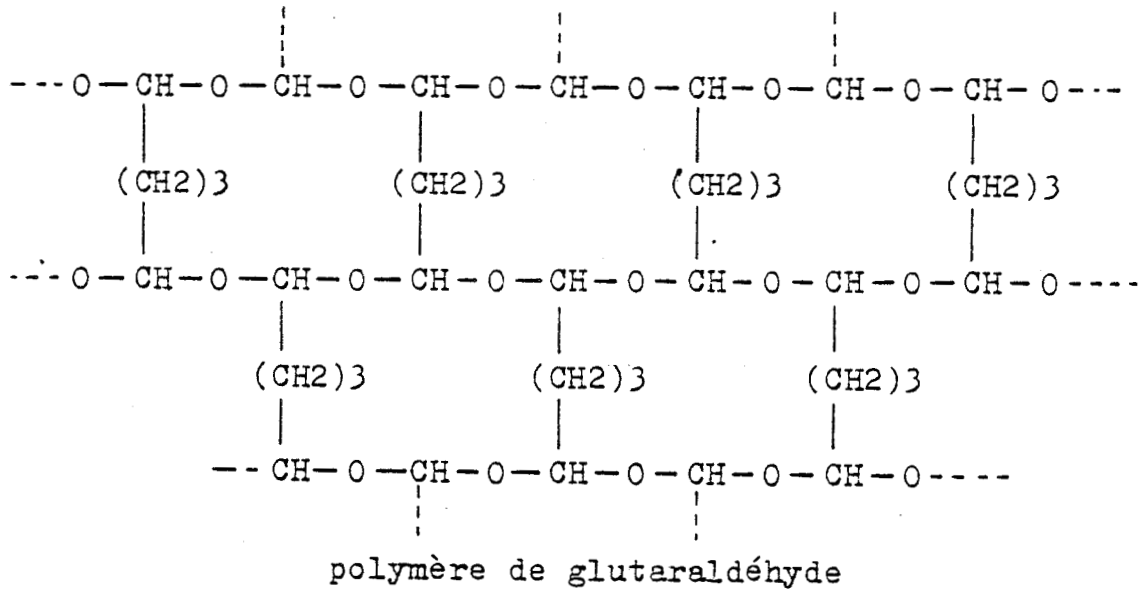


figure 7 : réticulation de cellules par la glutaraldéhyde .

d'activité enzymatique.

- L'activité enzymatique est souvent plus stable. Cependant, il est difficile de comparer l'activité de l'enzyme soluble ou fixée à celle localisée au niveau des cellules.

Toutefois, certaines limites s'imposent :

- Les cellules contiennent souvent d'autres activités enzymatiques qui peuvent provoquer des réactions secondaires nuisibles et pouvant modifier les substrats ou les produits de la réaction enzymatique principale.
- Des protéases internes aux cellules peuvent dénaturer les enzymes.

Comparée à l'utilisation de cellules libres, l'investissement nécessaire pour transformer un produit par des cellules immobilisées est beaucoup plus faible, car les volumes de réacteurs sont très réduits et l'absence de cellules dans le produit de la transformation ne nécessite pas d'étapes supplémentaires pour les enlever, ce qui dans le cas de la transformation de produits biologiques complexes (lait) est impossible.

La stabilité, dans les conditions optimales, des activités enzymatiques des cellules immobilisées est très variable (tableau XIV p. 52).

Chaque immobilisation cellulaire ou d'organites cellulaires est un cas particulier qui dépend, d'une part, de la nature de la cellule, d'autre part, de la biotransformation effectuée et des conditions dans lesquelles celle-ci doit être réalisée.

Tableau XIV :

Temps de demi-vie de quelques cellules immobilisées (DURAND et NAVARRO - 38 -).

microorganisme	immobilisation	produit de la réaction enzymatique	temps de demi-vie(J)
<u>Rhodospirillum rubrum</u>	gel d'agar	hydrogène	4,8
<u>Corynebacterium simplex</u>	collagène	stéroïdes	5,4
<u>Pseudomonas putida</u>	polyacrylamide	citrulline	120 à 37°C
<u>Achromobacter liquidum</u>	" "	acide urocannique	140 à 37°C
<u>Escherichia coli</u>	" "	acide 6-aminopénicillanique	17 à 40°C
<u>Streptomyces venezuelae</u>	collagène	glucose, fructose	50
<u>Bacillus coagulans</u>	" "	" "	75
<u>Actinomyces missouriensis</u>	cellulose	" "	45 à 60°C
<u>Brevibacterium ammoniagenes</u>	polyacrylamide	acide malique	60 à 37°C
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	" "	éthanol	10 à 25°C
<u>Kluyveromyces marxianus</u>	" "	éthanol	15 à 25°C
<u>Brevibacterium ammoniagenes</u>	" "	coenzyme A	5 à 37°C

III IMMOBILISATION DE CELLULES DANS UN GEL D'ALGINATE

A - INTRODUCTION

La première inclusion de cellules dans l'alginate fut effectuée par HACKEL et al en 1975 (65).

Une suspension de cellules dans une solution d'alginate de sodium est versée goutte à goutte dans une solution de contre-ions.

Depuis, de nombreuses inclusions cellulaires furent réalisées selon cette méthode (tableau XV p.55).

Le calcium est le contre-ion le plus utilisé mais on rencontre certaines techniques où le calcium est remplacé par des cations trivalents (HACKEL et al -65 - ; KLEIN et al -88 -).

Ces techniques permettent d'immobiliser des enzymes par liaison électrostatique, du fait de l'apparition de charges positives supplémentaires apportées par le contre-ion au niveau de la matrice.

D'autres recherches effectuées par VELIKY et WILLIAMS en 1981 (180) et par TANAKA et al en 1984 (164), conduisirent à enrober la bille d'alginate par des polymères aminés tel que le polyéthylènimine ou le polypropylènimine.

Ce polymère d'enrobage permet de stabiliser le gel d'alginate vis-à-vis des ions phosphates et d'imperméabiliser la bille aux grosses molécules telles que les protéines.

B - LES ALGINATES

1) Structure

L'acide alginique extrait des algues brunes est un

Tableau XV :

Immobilisations dans un gel d'alginate.

CELLULES MICROBIENNES	biotransformation effectuée	référence
<u>Aspergillus niger</u>	oxydation du glucose en acide gluconique	(88)
<u>Anabea</u> (cyanobactérie)	production de NH ₄ ⁺ à partir d'azote	(120)
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	production d'éthanol à partir de substrats divers	(22-82-97-... 108-121-180)
<u>Saccharomyces uvarum</u>	production d'éthanol à partir de saccharose	(23)
<u>Kluyveromyces fragilis</u>	hydrolyse du lactose en "batch"	(83)
<u>Lactobacillus bulgaricus</u>	fermentation en continu de lait	(136)
<u>Streptococcus thermophilus</u>	" "	(136)
<u>Pachysolen tannophilus</u>	production d'éthanol à partir de cellobiose	(112)
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	fabrication de la bière	(186)
<u>Aspergillus phoenicus</u>	(examen en microscopie électronique)	(93)
<u>Bacillus stearothermophilus</u>	(évaluation d'un procédé UHT grâce aux spores incluses)	(33)
<u>Kluyveromyces marxianus</u>	production d'éthanol à partir de l'inuline	(82)

suite du Tableau XV :

CELLULES MICROBIENNES	biotransformation effectuée	référence
<u>Pseudomonas</u> sp.	dégradation du phénol en CO ₂ et H ₂ O	(10)
<u>Candida</u> <u>tropicalis</u>	" "	(65)
bactéries nitrifiantes	production de NO ₃ ⁻ et de NO ₂ ⁻ à partir de NH ₄ ⁺	(168)
<u>Streptomyces</u> <u>phaechromogenes</u>	isomérisation du glucose	(163)

CELLULE MICROBIENNE + ENZYME	biotransformation effectuée	référence
<u>Zymomonas</u> <u>mobilis</u> co-inclus avec une β-D-gluco- sidase	production d'éthanol à partir de cellobiose	(100)

ENZYMES	biotransformation effectuée	référence
glucoamylase	hydrolyse du maltose	(164)
inulase	dégradation de l'inuline	(82)
glucose oxydase	transformation du glucose en acide gluconique	(82)
glucoamylase	hydrolyse de dextrans	(88)

suite du Tableau XV :

CELLULES VEGETALES	
production d'insecticides et de composés à valeur pharmaceutique (3 -17 -18 -19 -20 -21 -80 -125-179-180)	
ORGANITES CELLULAIRES	référence
mitochondries	(82)
chloroplastes	(82)
ilôts de Langerhans	(52)

copolymère d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique.

Sa structure est constituée d'éléments hétéropolymériques et homopolymériques représentés dans la figure 8 p. 59 (HAUG et al - 69 -).

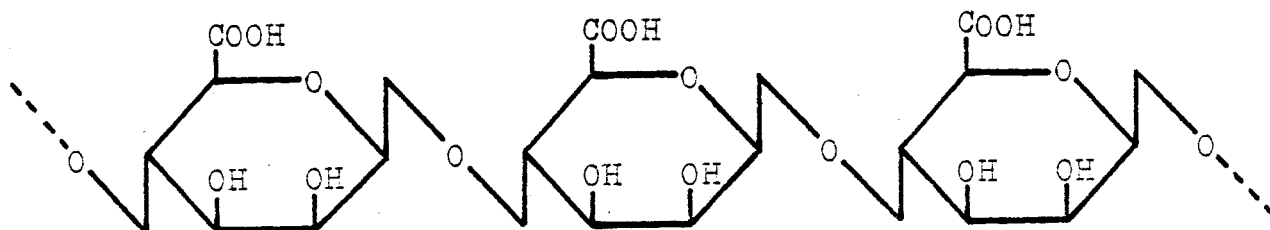
Les éléments homopolymériques sont de deux types : l'acide poly β (1-4)-D-mannuronique dont la proportion varie selon les espèces d'algues de 18 à 37 p. 100 (tableau XVI p. 60) et l'acide poly α (1-4)-L-guluronique dont la teneur varie de 13 à 60 p. 100, ce dernier intervient lors de la réticulation par la formation de zones de jonction en présence d'ions bivalents ou trivalents.

Les éléments homopolymériques ne sont pas solubles après traitement de l'alginate par l'HCl 0,3 M à 100°C pendant 2 heures et ceci contrairement aux éléments hétéropolymériques qui sont constitués d'une séquence alternée d'acide β -D-mannuronique et d'acide α -L-guluronique : -M-G-M-G-M-.

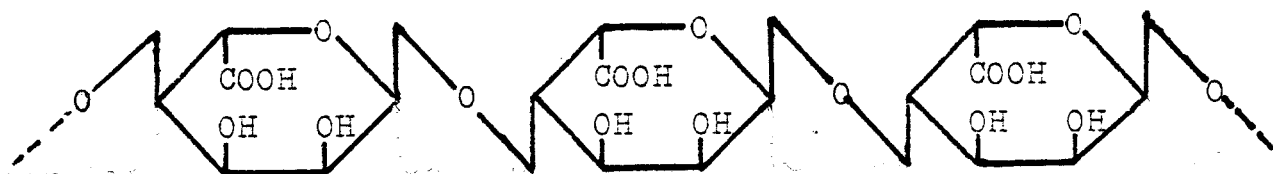
Ce type de structure hétéropolymérique existe chez les alginates provenant de Laminaria hyperborea, Ascophyllum nodosum, Laminaria digitata. Cependant, d'autres séquences hétéropolymériques ont été mises en évidence chez Cystoxira barbata : -M-M-G-M-M-G-, ainsi que des structures de type : -G-G-M-G-G-M- chez des alginates de différentes origines (PAINTEUR -130-).

Des études réalisées en RMN sur des alginates n'ont pas permis d'indiquer la présence d'autres types de de liaison (PAINTEUR -130-).

Eléments homopolymériques :

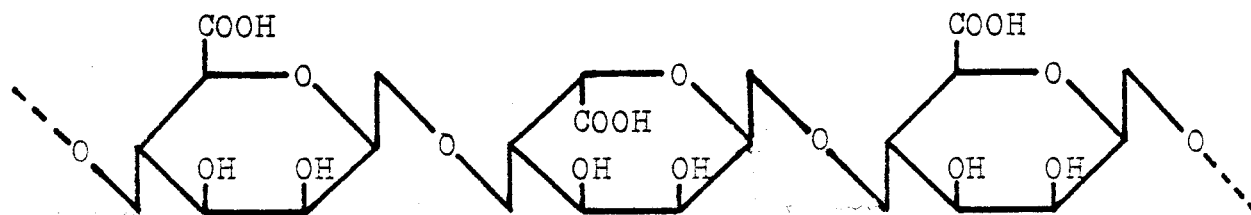


acide poly $\beta(1-4)$ -D-mannuronique : -M-M-M-M-M-M-M-



acide poly $\alpha(1-4)$ -L-guluronique : -G-G-G-G-G-G-G-

Elément hétéropolymérique :



polymère alterné d'acide β -D-mannuronique et d'acide
 α -L-guluronique : -M-G-M-G-M-G-M-G-M-

figure 8 : structure de l'alginate (HAUG et al -69 -).

Tableau XVI :

Distribution des différentes structures polymériques
provenant d'algues brunes d'origines diverses
(HAUG et al - 69-).

espèce (jour et mois de collecte)	rapport $\frac{M}{G}$ (1)	p.100 de structures hétéropoly- mériques	p.100 de structures homopolymériques	
			acide poly-D- mannuro- nique	acide poly-L- guluro- nique
<u>Pylaiella</u>	0,75	40	<u>18</u>	42
<u>Spermatochnus</u> <u>paradoxus</u> (15/8)	1,3	35	32	33
<u>Cordaria</u> <u>flagelliformis</u> (15/8)	0,9	21	28	51
<u>Dyctyosiphon</u> <u>foeniculaceus</u> (9/6)	0,85	25	25	50
<u>Scytosiphon</u> <u>lamentaria</u> (19/6)	1,15	25	35	40
<u>Desmaretia</u> <u>aculeata</u> (9/6)	0,85	27	23	50
<u>Pelvetia</u> <u>caniculata</u> (9/4)	1,5	38	<u>37</u>	25
<u>Fucus</u> <u>serratus</u> (26/6)	1,3	35	34	31
<u>Ascophyllum</u> <u>nodosum</u> (3/5)	1,85	52	35	<u>13</u>

suite du Tableau XVI :

espèce (jour et mois de collecte)	rapport $\frac{M}{G}$ (1)	p.100 de structures hétéropoly- mériques	p.100 de structures homopolymériques	
			acide poly-D- mannuro- nique	acide poly-L- guluro- nique
<u>Laminaria</u> <u>digitata</u> (15/1)	1,45	34	43	23
<u>Laminaria</u> <u>hyperborea</u> (16/2) -frondes-	1,35	26	43	31
<u>Laminaria</u> <u>hyperborea</u> (16/2) -vésicules-	0,65	25	15	<u>60</u>
<u>Macrocystis</u> <u>pyrifera</u>	1,56			

(1) : le rapport de la teneur en acide poly-D-mannuronique sur la teneur en acide poly-L-guluronique : $\frac{M}{G}$ varie également suivant, l'époque de l'année pendant laquelle sont récoltées les algues, leur localisation géographique et l'âge de ces algues.

L'alginate est un exemple d'hétéroglycane de structure très irrégulière qui peut être modifié lors de sa synthèse par l'environnement et par "l'information génétique" (PAINTEUR -130-).

2) Les sels de sodium d'acide alginique

Ils forment dans l'eau des solutions extrêmement visqueuses. La viscosité de ces solutions est fonction du type d'alginate utilisé, de sa concentration, du pH et de la température.

a) Origines des alginates et viscosité

La viscosité des solutions d'alginate de sodium varie fortement selon l'espèce, le lieu de récolte, l'âge des algues.

Cependant les alginates commercialisés répondent à des critères de viscosité et de pureté constants.

b) Masse moléculaire et viscosité

La masse moléculaire de ce polymère peut atteindre 150 000 daltons, ce qui correspond à un degré de polymérisation de 800.

Dans ce cas, une solution d'alginate de sodium (Satialgine SG 800, CECA SA) à 1 p. 100 possède une viscosité de 490 cp (+ ou - 90 cp) à 20 °C et à pH 7.

Les alginates de faibles masses moléculaires (15 000 daltons) ont une viscosité, en solution, beaucoup plus faible.

Dans ce dernier cas, une solution d'alginate de sodium (Satialgine SG 150, CECA SA, masse moléculaire : 28 000 daltons) à 1 p. 100 possède une viscosité de 80 cp (+ ou - 25 cp) à 25 °C et à pH 7.

c) Viscosité des solutions en fonction de la concentration en alginate de sodium et du pH de la solution

La viscosité augmente très fortement avec la concentration en alginate (figure 9 p. 64). Il est très difficile de réaliser des solutions aqueuses contenant plus de 5 p. 100 d'alginate (P/V).

La viscosité ne varie pas pour une concentration donnée dans les zones de pH allant de pH 5 à pH 9 (figure 10 p. 65).

3) Les gels d'alginate

a) la gélification

En présence d'une concentration suffisante en cations bivalents ou trivalents (Ca^{++} , Fe^{+++} , Al^{+++} , Pb^{++} , Cu^{++} , Ba^{++} , etc...), les sels sodiques d'acide alginique se gélifient (THIELE et HALLICH -166- ; PAUL et VIGNAIS -131-).

La formation de gels en présence d'ions calcium dépend principalement du taux de structures homopolymériques du type poly-L-guluronique (SMISROD et HAUG -157- ; SMISROD, HAUG et WHITTINGTON -158-).

En général, les alginates riches en acide poly-L-guluronique forment des gels fortement réticulés et cassants qui sont stables à la chaleur.

Par contre, les gels riches en acide poly-D-mannuronique sont plus élastiques, moins stables à la

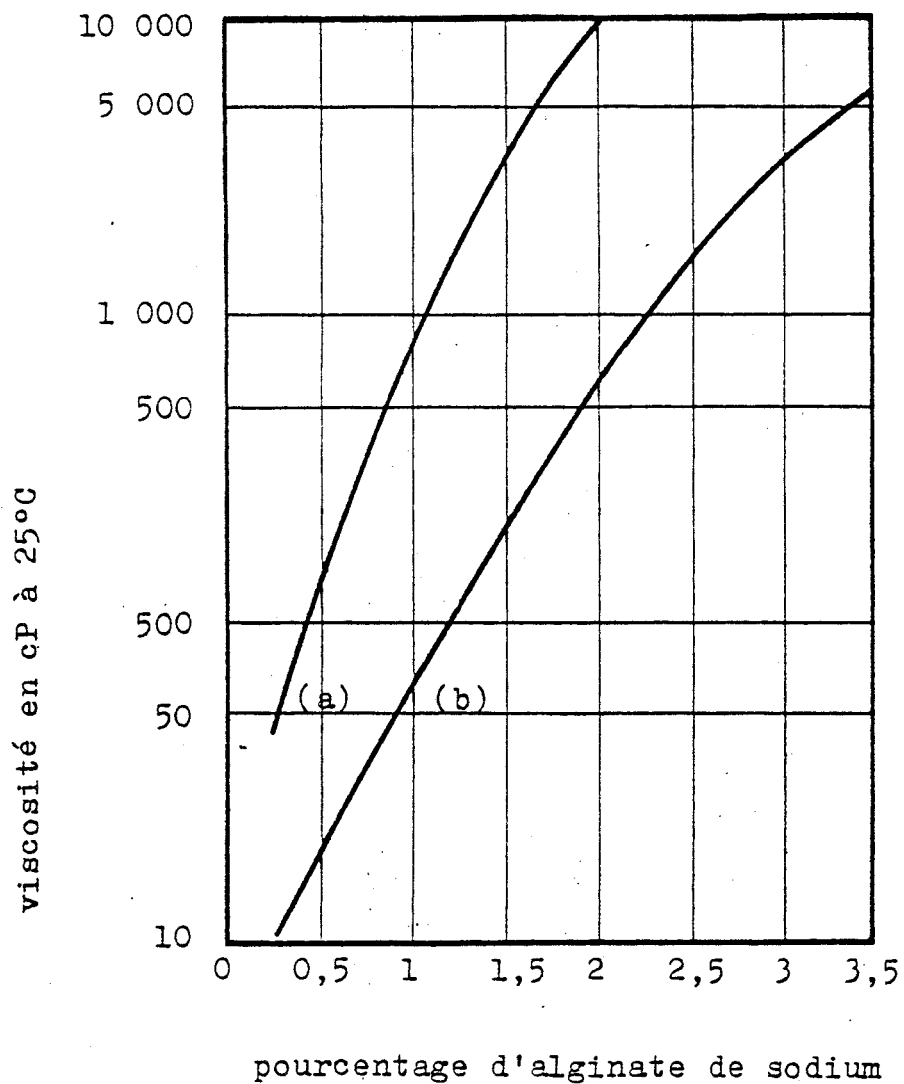


figure 9 : viscosité d'une solution en fonction de sa concentration en alginate de sodium (SANDFORD et BAIRD -147-).
(a) : alginate de sodium de forte viscosité
(b) : alginate de sodium de faible viscosité

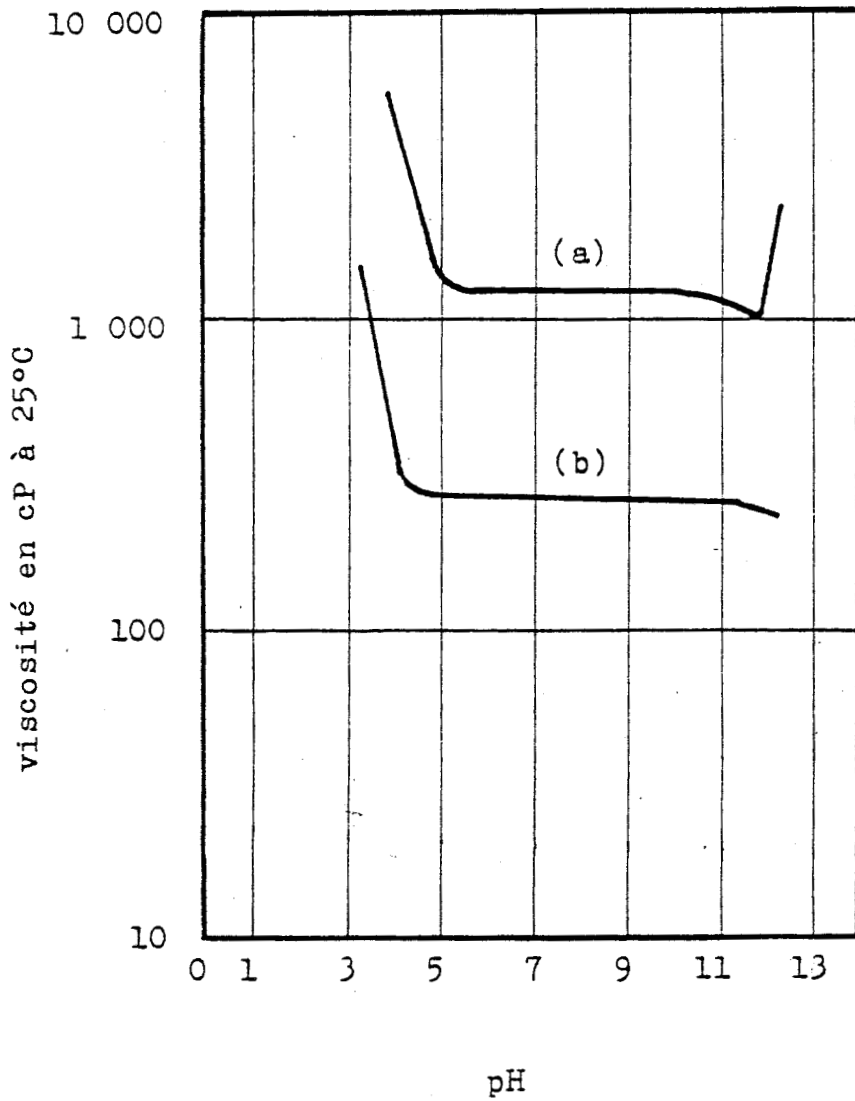


figure 10 : viscosité d'une solution d'alginate de sodium en fonction de son pH (SANDFORD et BAIRD -147-).
(a) : solution d'alginate de sodium de viscosité moyenne à 1,5 p.100 .
(b) : solution d'alginate de sodium de faible viscosité à 2 p.100 .

chaleur, mais résistent mieux à la congélation-décongélation.

Une faible concentration en calcium permet de stabiliser les gels d'alginate riches en structure poly-D-mannuronique.

L'alginate se lie avec un poids constant de contre-ion. Par exemple, l'alginate protanal LF 10/60 BDH se gélifie avec 0,065 g de calcium par gramme de gel sec quelle que soit la concentration en calcium de la solution utilisée, à condition que le calcium soit en excès (CHEETHAM et al -23 -).

Lorsque la solution de calcium est de faible concentration, la fixation du calcium sur l'alginate est fortement coopérative. Cela suggère qu'il se produit un réarrangement des molécules de manière à augmenter la fixation du calcium.

La micrographie électronique des gels d'alginate montre qu'il existe des zones de jonction. Ce sont des segments constitués de plusieurs chaînes parallèles de poly α -L-guluroniques maintenues par les ions calcium (figure 11 p. 67). Il y a une relation directe entre la rigidité du gel et l'affinité de l'alginate à fixer ces ions. Il semblerait que les gels rigides possèdent des zones de jonction importantes (PAINTER -130-).

b) Stabilité des gels d'alginate

Les billes d'alginate sont chimiquement et biologiquement inertes, des cellules peuvent être incluses à l'intérieur du gel (CHEETHAM et al -23 -).

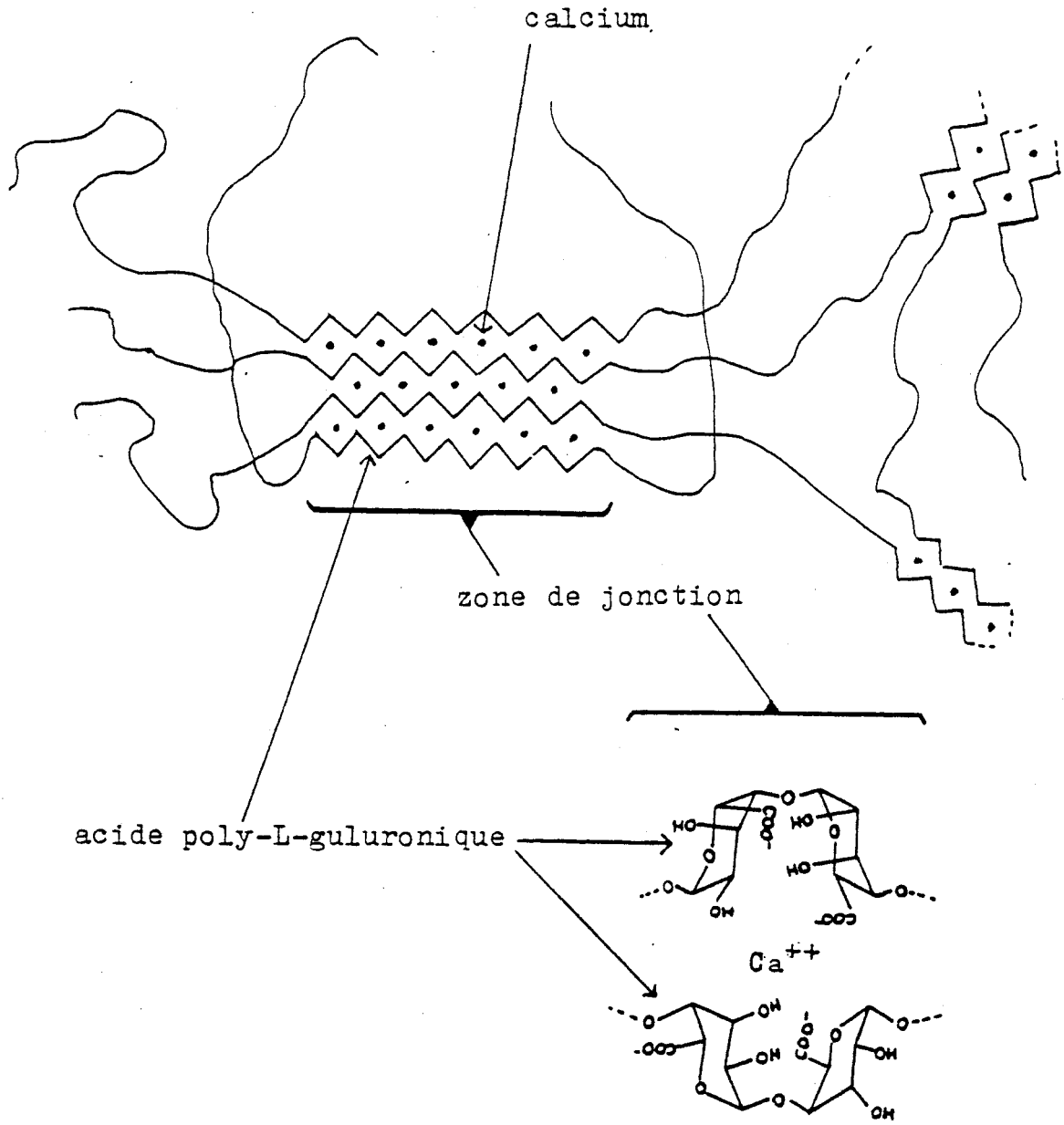


figure 11 : structure des gels d'alginate de calcium
(REES -140-)

Les billes d'alginate sont très résistantes à la chaleur et peuvent être facilement stérilisées, elles n'adhèrent pas entre elles et ne sont pas thermoréversibles. Elles sont très stables entre pH 2 et pH 12 à 30°C, entre 8°C et 95°C à pH 7, dans du NaCl 1 M et du triton X 100 à 1 p. 100 (P/V).

Après congélation, les billes gardent leur intégrité à condition de les décongeler lentement.

En aucun cas, il n'a été mentionné que des gels d'alginate aient été dégradés par des bactéries (CHEETHAM -22 -).

Certains ions ne permettent pas la formation et détruisent les gels d'alginate : c'est le cas du magnésium et du potassium qui se lient fortement à la matrice.

Les ions phosphates et les chélateurs (EDTA) détruisent le gel par décomplexation de l'alginate. Cependant, l'effet solubilisant de ces agents et de ces ions est réversible par addition d'ions calcium (CHEETHAM et al - 23 -).

Les gels d'alginate de calcium sont stables dans le lait (PREVOST et al - 136 -).

c) Porosité et diffusion dans le gel

La porosité des gels décroît lorsque l'on augmente la teneur en alginate ou en chlorure de calcium, mais elle n'est pas affectée par l'inclusion de cellules (CHEETHAM et al - 23 -).

Pour des billes contenant 5 p. 100 (P/V) d'alginat (protanal LF 10/60 BDH) 84 p. 100 du volume interne est accessible au saccharose pour des billes dont la teneur en alginat est de 1 p. 100 (P/V), 99 p. 100 du volume interne de la bille est accessible. Ceci montre qu'il existe un très petit nombre de pores ou d'espaces inaccessibles à l'intérieur du gel.

L'étude de la diffusion de substrats dans un gel d'alginat à différentes concentrations a été réalisée par TANAKA et al (165), les résultats sont présentés dans le tableau XVII p. 70 .

Elle montre que la diffusion de substrats de masse moléculaire 2×10^4 daltons est libre dans ce type de billes. Cependant, il est bien connu que la structure et la masse moléculaire des alginates sont différentes suivant la nature, l'âge, le lieu de collecte des algues ainsi que la méthode d'extraction des alginates.

Toutefois, ces résultats donnent de bonnes informations en ce qui concerne les possibilités d'une telle matrice vis-à-vis du substrat utilisé, du produit de la biotransformation et de la particule ou de l'enzyme à inclure.

La diffusion de l'hémoglobine et du NAD dans un gel d'alginat n'est en rien modifiée par des concentrations différentes en calcium ou en baryum allant de 0,125 M à 0,5 M (KIERSTAN et REILLY - 84 -).

d) Compressibilité des billes d'alginat en réacteur à lit fixe

La compaction des billes d'alginat, soumises à des pressions différentes, est mesurée par la proportion d'espace libre : ce qui est le rapport du volume mort

Tableau XVII :

Etude de la diffusion de substrats en fonction de leurs masses moléculaires,
de l'extérieur vers l'intérieur des billes d'alginate et inversement (TANAKA et al -165-).
(l'alginate utilisé provient de la société BDH chemicals Ltd)

substrat	masse moléculaire (dalton)	coefficient de diffusion ($\times 10^{-4}$ cm ² /min) à 30°C				
		dans l'eau	de l'extérieur vers l'intérieur		de l'intérieur vers l'extérieur	
			alginate 2 p.100	alginate 4 p.100	alginate 2 p.100	alginate 4 p.100
glucose	180	4,08	4,10	-	4,10	-
L-tryptophane	204	4,0	4,00	-	-	-
α -lactalbumine	15600	0,61	0,61	0,61	0,61	-
albumine	69000	0,42	pas de diffusion	-	0,21	0,054
β -globuline	156000	0,27	-	-	0,12	0,04
fibrinogène	341000	0,12	-	-	0,0	-

du réacteur par rapport au volume total du réacteur :

$$\frac{V_0}{V_t} = e .$$

Cette étude a été réalisée par CHEETHAM (22).
Les résultats sont présentés dans la figure 12 p. 72 .

Il apparait que les billes d'alginate se déforment lorsqu'on applique une pression suffisante sur le haut du réacteur.

Les teneurs importantes en cellules des billes d'alginate diminuent la résistance à la pression alors que l'élévation du pourcentage d'alginate l'augmente.

Le débit du solvant à travers le réacteur est constant jusqu'à une valeur de $e = 0,04$. Lorsque l'écoulement se fait du bas vers le haut, les billes sont moins sensibles à la pression que lorsque l'écoulement se fait dans l'autre sens ou lorsque le débit est nul.

Pour un réacteur de 7,5 cm de hauteur et de 2,2 cm de diamètre contenant des billes à 5 p. 100 (P/V) d'alginate et 20 p. 100 (P/V) de cellules de levure, ce réacteur est soumis à l'écoulement du bas vers le haut d'une solution de saccharose à 55 p. 100 (P/V) à un débit de 25 ml/ h. Dans ce cas, le débit restera constant ($e = 0,1$) pendant 110 jours et pour une pression mesurée en bas du réacteur de 300 Kg/m^2 . Ce qui correspond à la pression exercée par une colonne d'eau de 30 cm de hauteur.

La compressibilité des billes est modifiée par la température et la concentration en saccharose de la solution qui s'écoule (figures 13 et 14 p 73).

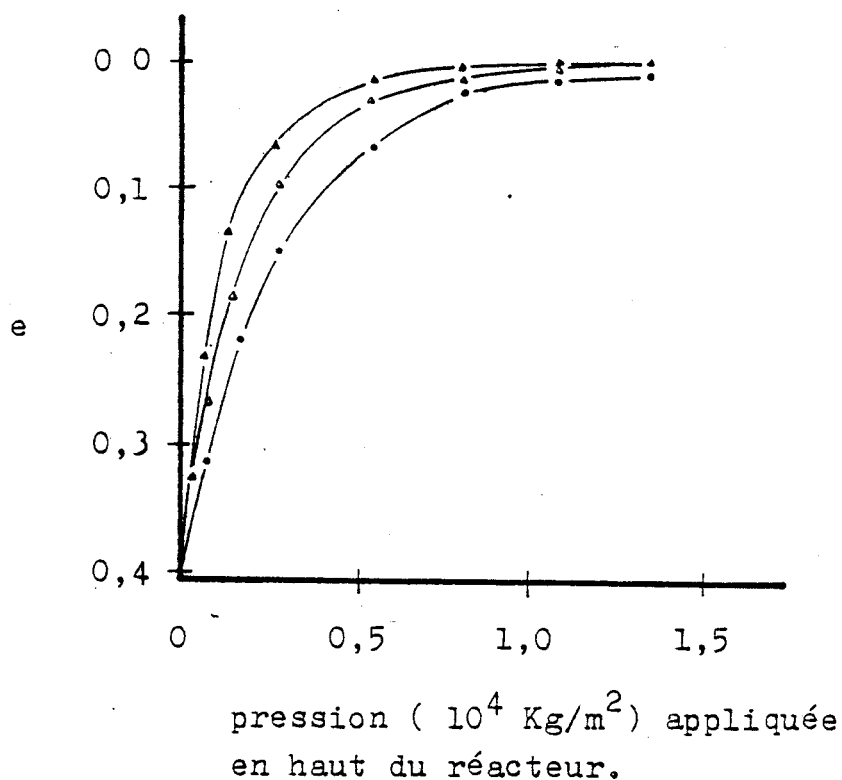


figure 12 : proportion d'espace libre entre les billes d'alginate de calcium en fonction des contraintes de pression exercées sur le haut d'un réacteur rempli de billes (CHEETHAM - 22 -).

courbe	dimensions du réacteur (h.D en cm)	pourcentage d'alginate (P.V)	pourcentage de cellules de levure (P.V)
•	7,5 . 2,2	5	20
▲	" "	5	50
△	" "	3,1	20

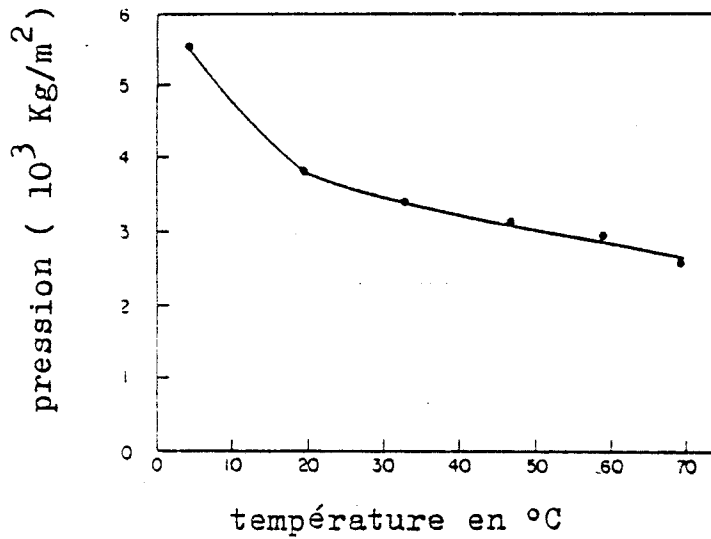


figure 13 : effet de la température sur la compressibilité des billes d'alginate de calcium en réacteur, les mesures sont réalisées pour $e = 0,1$ (CHEETHAM - 22 -).

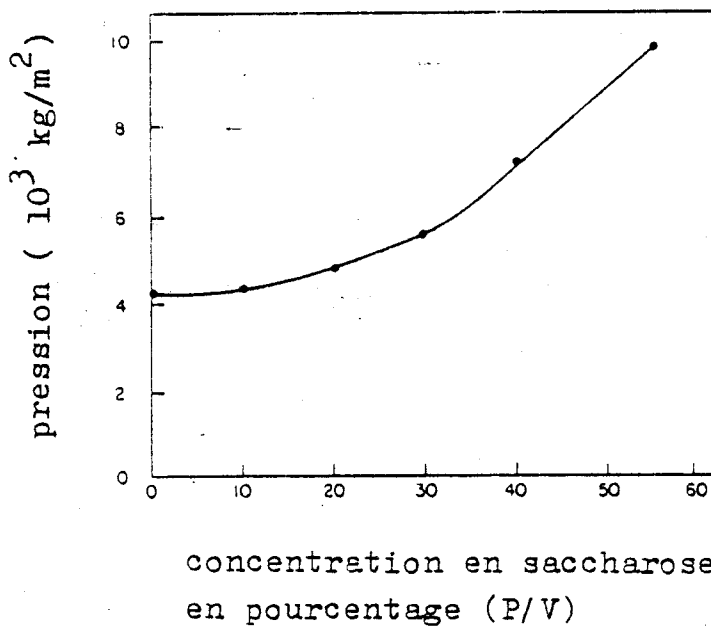


figure 14 : effet de la concentration en saccharose sur la compressibilité des billes d'alginate de calcium en réacteur, les mesures sont réalisées pour $e = 0,1$ (CHEETHAM - 22 -).

La température diminue la résistance à la compressibilité qui reste cependant stable entre 30°C et 70°C. Ceci n'entraînera donc pas de modifications majeures dans la tenue d'une colonne de billes d'alginate utilisée dans cette zone de température.

Les très fortes concentrations en saccharose augmentent la résistance à la compression des billes en colonne. La taille des billes n'a pas d'effet sur l'écoulement d'un réacteur.

La composition des gels n'est pas affectée par les forces de compression (CHEETHAM et al - 23 -).

C - ENROBAGE DES BILLES D'ALGINATE

L'enrobage s'effectue par agitation lente des billes dans une solution aqueuse de polymère basique ramenée au pH optimum de l'activité enzymatique immobilisée par inclusion dans l'alginate.

Les polymères qui ont été utilisés sont :

- polyéthylénimine (PEI)
- polypropylénimine (PPI)
- polyvinylamine (PVA)
- polyéthylénimine partiellement quaternisé (QPEI)
- poly-L-lysine

(VELIKY et WILLIAMS -180- ; TANAKA et al -164- ; GOOSEN et al - 52 -).

Un tel traitement conduit à un enrobage en surface de la bille par un polymère.

Le polyéthylènimine est le polymère obtenu à partir de l'éthylènimine (figure 15 p.76).

Le QPEI est obtenu en traitant le PEI par le bromure de méthyl, son degré de quaternisation est de 30 p.100.

L'enrobage des billes par le PEI permet de stabiliser partiellement la matrice d'alginate vis-à-vis des ions phosphate (VELIKY et WILLIAMS -180-) et de maintenir les protéines à l'intérieur de la bille.

Le QPEI permet grâce à ses charges positives de maintenir plus fermement les protéines à l'intérieur des billes d'alginate -figure 16 p. 76 - (TANAKA et al -164-).

D - CONCLUSION

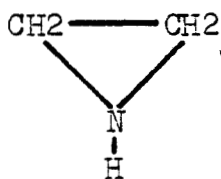
Les alginates d'ammonium, de calcium, de potassium, de sodium sont utilisés en France depuis de nombreuses années comme additifs alimentaires sous la référence E 401.

Le traitement des denrées alimentaires , telles que le lait et les lactosérums, par des cellules non pathogènes incluses dans l'alginate est donc possible et sans danger pour le consommateur.

L'immobilisation par inclusion dans l'alginate est une technique simple, facile à mettre en oeuvre, peu coûteuse, qui ne provoque pas de pertes d'activité enzymatique et est possible industriellement.

Cependant, l'utilisation de ce type d'immobilisation reste limitée par la taille du substrat et du produit. Ceux-ci doivent pouvoir pénétrer et sortir facilement du gel afin qu'il n'y ait pas de pertes d'activité par empêchement diffusionnel.

monomère:



éthylènimine

polymère:

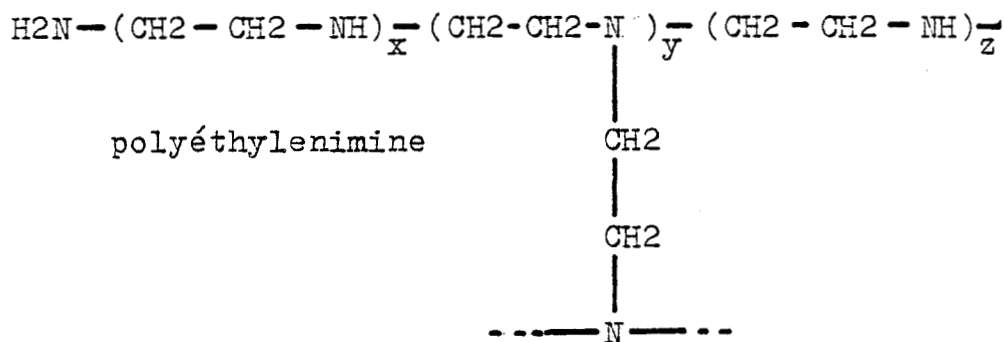


figure 15 : structure du polyéthylènimine et de l'éthylènimine son monomère.

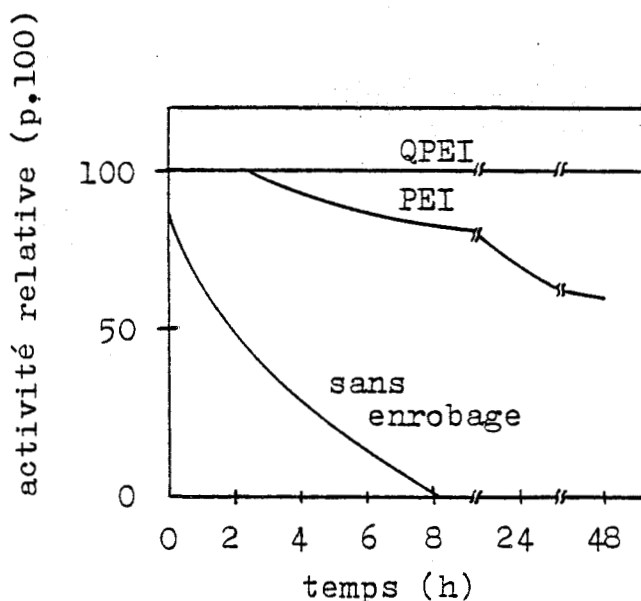


figure 16 : effet de l'enrobage des billes d'alginate par le PEI et le QPEI sur l'activité d'une glucoamylase incluse dans la matrice (TANAKA et al -164-).

L'enrobage par un polymère basique permet de stabiliser le gel d'alginate vis-à-vis des ions phosphates, de maintenir les protéines à l'intérieur du gel et par conséquent de limiter la diffusion de substances de masses moléculaires élevées vers l'intérieur des billes.

IV BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

A - BIOLOGIE DES BIFIDOBACTERIES

Les bifidobactéries ont une morphologie, une physiologie caractéristiques.

On les trouve, notamment Bifidobacterium bifidum, au niveau de l'intestin chez l'enfant et l'adulte, ils sont présents également dans le vagin et la bouche.

Certaines espèces ou certains biotypes sont spécifiques des animaux.

1) Classification

L'identification des bifidobactéries dans la littérature est souvent difficile car beaucoup d'entre elles se confondent avec les bâtonnets gram positif, bifides ou non et asporulés. On les retrouve notamment dans le genre Bacillus puis dans le genre Lactobacillus.

Durant la première moitié de ce siècle, l'intérêt des chercheurs se focalisa sur ces microorganismes trouvés chez l'homme et désignés sous les noms de Lactobacillus bifidus et Lactobacillus acidophilus, écartant momentanément les recherches sur la classification.

En 1957, DEHNERT (34) présente une classification (tableau XVIII p.80) basée sur la fermentation de vingt quatre glucides faisant apparaître cinq espèces de bifidobactéries. Cette classification fut étendue par REUTER (142), en 1964, par l'adjonction de trois autres espèces et d'un certain nombre de variants.

Tableau XVIII :

Principales classifications des Bifidobactéries

EGGERTH 1935	DEHNERT 1957 (34)	REUTER 1963 - 1964 (142)	MITSHOKA 1969 (118)	SCARDOVI et al 1971 (149)	HOLDEMAN et MOORE 1972 (70)
I	I, II III IV III	bifidum a, IIIa bifidum b, IIIb infantis V liberorum IX lactentis X breve a, VII breve b, VIII	bifidum a bifidum b infantis a infantis b liberorum lactentis breve a breve b breve c parvulorum a parvulorum b adolescentis a adolescentis b adolescentis c adolescentis d longum var. longum a longum var. longum b longum var. animalis a longum var. animalis b pseudolongum(a, b, c, d) thermophilum(a, b, c, d)	bifidum infantis breve adolescentis longum SS pseudolongum thermophilum ruménale astéroïdes "dentium" "angulatum" "catenulatum" suis globosum indicum corynéforme	bifidum infantis SS infantis SS liberorum infantis SS lactentis infantis-other breve adolescentis A adolescentis B adolescentis C adolescentis D longum SS longum pseudolongum thermophilum astéroïdes "dentium" corneum
II	V	parvulorum a, IV parvulorum b, VI adolescentis I a adolescentis I b adolescentis I c adolescentis I d longum a longum b longum II a longum II b			

Entre 1965 et 1968, SCARDOVI et TROVATELLI (148) d'une part, VRIES et al (182-183) d'autre part découvrent une nouvelle voie de fermentation des hexoses chez les bifidobactéries que l'on ne trouve pas dans le genre Lactobacillus. VEERKAMP (172) en 1969 démontre l'existence d'une même voie fermentaire chez Lactobacillus bifidus variété pennsylvanicus.

Durant cette période, l'étude de la composition en bases de l'ADN effectuée par SEBALD et al (152), GASSER et MANDEL (47), confirme les travaux effectués auparavant par WERNER et SEELIGER (185) ; c'est à dire que les membres du genre Bifidobacterium sont homogènes et bien distincts du genre Lactobacillus ou d'autres genres qui sembleraient apparentés.

EXTERKATE et VEERKAMP (39) notent que les bifidobactéries diffèrent également par leur composition en phospholipides.

SNYDER et al (159) examinant les types sérologiques des bifidobactéries, des actinomyces, des nocardias et d'autres genres, montrent que les bifidobactéries ont une identité sérologique bien distincte des actinomyces, des corynébactéries et des autres bactéries filamenteuses gram positives testées.

En 1969, MITSUOKA (118), après avoir étudié un grand nombre de bifidobactéries, propose une classification basée sur les caractères physiologiques et biochimiques, qu'il compare avec celle de REUTER (142). La dénomination faite par REUTER fut conservée par MITSUOKA. Il décrit aussi deux nouvelles espèces : B. pseudolongum et B. thermophilum.

KOCH et al (90), en 1970, étudient la composition de la paroi bactérienne et montrent l'existence d'un type particulier de muréine typique de B. bifidum et trouvé dans aucune autre espèce de bifidobactéries.

Par une approche différente, KANDLER (81) étudie les différents types de muréine des bifidobactéries et reste en accord avec la classification de REUTER (142). KANDLER (81) suggère que la distinction du genre Bifidobacterium se fasse sur le principe de la caractérisation de la muréine. EXTERKATE et al (41), en 1971, proposent que la caractérisation des différentes espèces se fasse sur le même principe, la fermentation des glucides restant la base de cette caractérisation.

En 1971, SCARDOVI et al (149) présentent une nouvelle classification des bifidobactéries qui inclut trente quatre espèces et biotypes. Les auteurs proposent que B. infantis, B. liberorum et B. lactentis soient fusionnés, sur la seule base de leurs caractéristiques fermentaires, en une seule espèce : B. infantis et que B. breve, B. ruminal et B. thermophilum le soient en B. breve. Ils remarquent des similitudes entre B. pseudolongum et B. globosum. Ils notent également la possibilité de l'existence de trois nouvelles espèces : B. dentium , B. catenulatum et B. angulatum. Mais des éléments leur manquent pour confirmer ces deux hypothèses.

En 1972, HOLDEMAN et MOORE (70) suivant toujours le même principe de classification que SCARDOVI et al (149), proposent les modifications suivantes :

- B. infantis est en fait composé de quatre sous-espèces : B. infantis ss infantis, B. infantis ss liberorum, B. infantis ss lactentis et "B. infantis other".

- B. adolescentis est divisé en quatre groupes : A, B, C, D sur la base des travaux de REUTER (142).

Plusieurs espèces d'origine animale désignées par SCARDOVI et al (149) ne sont pas incluses dans cette dernière classification. Par contre, B. dentium, B. conutum et B. eriksonii y apparaissent.

2) Identification

a) Morphologie

α) Caractéristiques générales

B. bifidum, d'après PREVOT (134), est un bâtonnet asporulé, immobile, dépourvu de cils et gram positif. D'une longueur de 2 à 5 μm , d'une épaisseur de 0,5 à 0,7 μm , ses contours sont irréguliers (figure 17 p.84).

Les bifidobactéries peuvent avoir des apparences variées en Y, en V ou en forme de spatule (RASIC et KURMANN -137-).

Le calcium joue un rôle important dans le pléomorphisme et la régulation de la division cellulaire (KOJIMA et al -91-92-).

GLICK et al (50) ont démontré que l'apparition de formes "anormales" chez B. bifidum var. penn., résultait d'une déficience en oligosaccharides N-acétylés qui sont essentiels pour la croissance et la synthèse de la paroi.



figure 17 : microscopie électronique de B. bifidum,
grossissement : x 36 000 .

β) Caractéristiques de la paroi

La paroi des bifidobactéries contient un peptidoglycane (muréine) composé d'acide muramique, de glucosamine, d'alanine, d'acide glutamique, d'ornithine ou de lysine et de deux autres acides aminés qui peuvent être la glycine, la sérine, l'acide aspartique ou la thréonine (CUMMINS et al -29-; VEERKAMP et al-177-).

Les peptidoglycane de B. bifidum contiennent un tétrapeptide constitué de L-alanine, d'acide D-glutamique, de L-ornithine et de D-alanine et d'un dipeptide constitué de L-sérine et d'acide aspartique (RASIC et KURMANN -137-).

γ) Composition en lipides et phospholipides

Des études sur B. bifidum var. penn. ont montré que l'absence de lait humain dans le milieu de culture entraînait une modification de la teneur en lipides et phospholipides ainsi qu'une modification morphologique des bactéries (EXTERKATE et VEERKAMP -39-, -41- ; VEERKAMP -173-, -174-, -175-, -176- ; VEERKAMP et SCHAIK -178-).

δ) Composition en bases de l'ADN

Le pourcentage de guanine et cytosine (G + C) varie de 57,2 à 64,5 p. 100 pour les espèces du genre Bifidobacterium et moins de 50 p. 100 pour les espèces du genre Lactobacillus (WERNER et SEELIGER -185- ; SEBALD et al -152- ; GASSER et MANDEL -47-).

La composition en bases de l'ADN ne peut cependant pas être utilisée comme critère pour la différenciation des espèces de bifidobactéries car l'écart du pourcentage de (G + C) est faible (SCARDOVI et al -149-).

b) Physiologie

α) Conditions atmosphériques de croissance

Les bifidobactéries sont anaérobies strictes mais peuvent toutefois tolérer l'oxygène en présence de gaz carbonique. La sensibilité à l'oxygène est très variable suivant les souches (VRIES et STOUTHAMER -184-).

Fraîchement isolées, des souches de B. bifidum sont anaérobies mais après plusieurs transferts dans le lait, elles peuvent montrer une certaine tolérance à l'oxygène (ORLA et JENSEN -128- ; HRABOVA -73-).

β) Température et pH de croissance

Les bifidobactéries d'origine humaine ont une température de croissance comprise entre 36 et 38 °C. Cependant quelques souches d'origine animale peuvent croître à des températures supérieures à 46°C.

Bifidobacterium bifidum a un pH optimal de croissance compris entre 6 et 7, à partir de pH 5,5 aucun développement ne se produit (RASIC et KURMANN -137-).

γ) Nutrition

D'un point de vue nutritionnel les bifidobactéries sont très hétérogènes. Certaines souches peuvent utiliser des sels d'ammonium comme source d'azote alors que d'autres nécessitent de l'azote organique.

B. bididum var. penn. nécessite pour sa croissance, des oligosaccharides N-acétylés et de l'acide panto-thénique alors que la souche Tissier n'en a pas besoin.

§) Caractéristiques biochimiques

Le genre Bifidobacterium est séparé en plusieurs espèces en fonction de leurs besoins nutritionnels et de leurs aptitudes à fermenter les oligosaccharides

- Fermentation des oligosaccharides

Les bifidobactéries sont des bactéries saccharolytiques, toutes les souches fermentent le glucose, le galactose et le fructose. Le glucose est fermenté via le fructose -6-phosphate en acide acétique et en acide L-lactique (figure 18 p. 88).

De petites quantités d'acide formique, d'éthanol et souvent d'acide succinique sont produites.

Les autres oligosaccharides (tableau XIX p. 89) et les alcools sont fermentés différemment suivant les espèces et les biotypes de bifidobactéries. La fermentation des oligosaccharides et des alcools a été étudiée par NEUT et al (123, 124) et BERGEY (9).

- Autres caractéristiques

Les bifidobactéries sont catalase négative sauf pour B. indicum, elles produisent de l'indole et ne liquéfient pas la gélatine (RASIC et KURMANN -137-).

Les bifidobactéries montrent en général une faible activité protéolytique vis-à-vis du lait, mais il y a des différences considérables selon la souche.

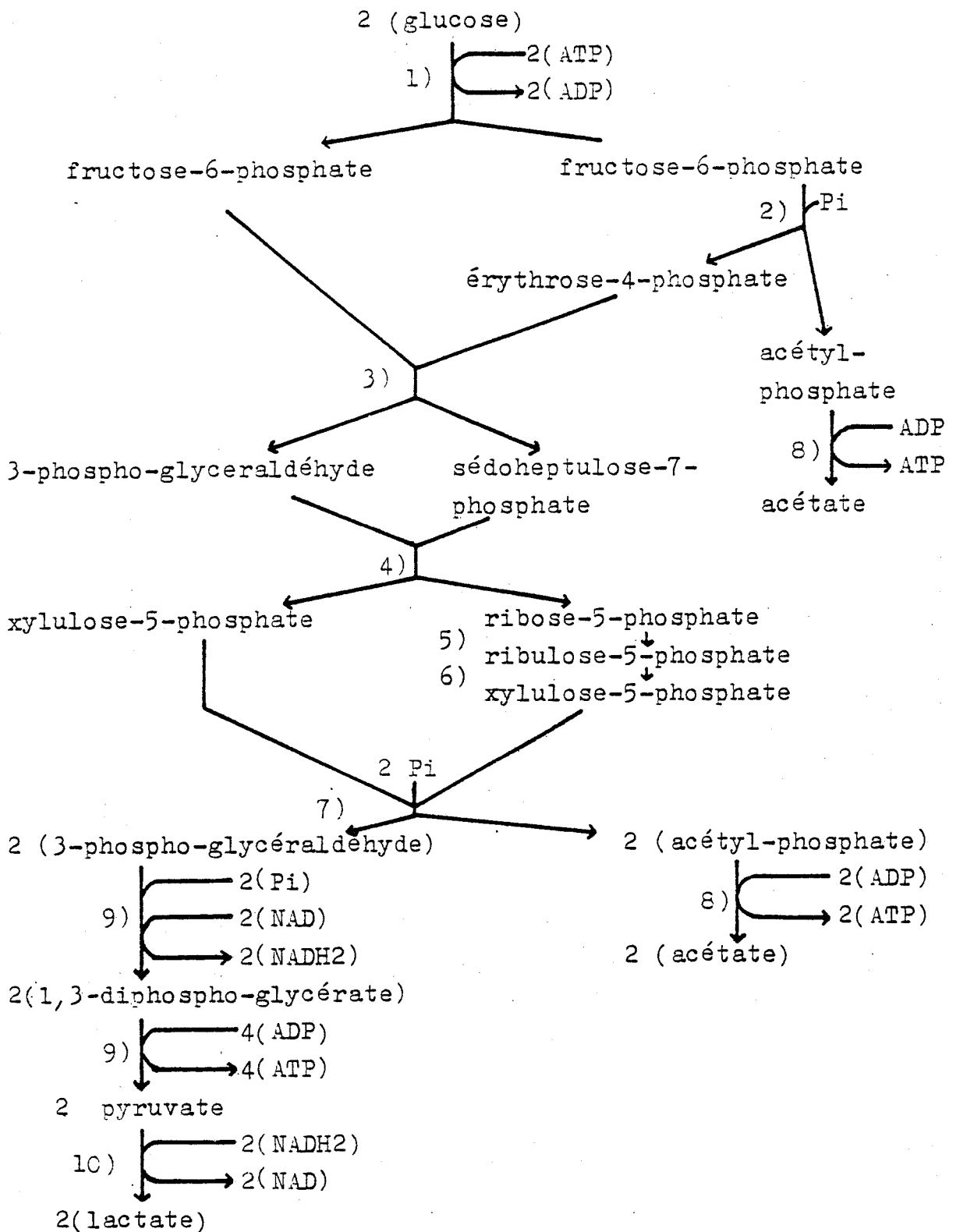


figure 18 : voie de fermentation du glucose chez les Bifidobactéries (GOTTSHALK - 53-).

- 1) hexokinase et glucose-6-phosphate deshydrogénase
- 2) fructose-6-phosphocétolase, 3) transaldolase
- 4) transcétolase, 5) ribose-5-phosphate isomérise
- 6) ribulose-5-phosphate-3-épimérise
- 7) xylulose-5-phosphate phosphocétolase
- 8) acétate kinase, 9) enzymes de la chaîne d'Embden Meyerhof
- 10) lactate déshydrogénase

Tableau XIX :

Caractères biochimiques des espèces du genre Bifidobacterium
d'après NEUT et al (123,124) et BERGEY (9).

Oligosaccharides	arabinose	xylose	ribose	cellobiose	lactose	mannitol	maltose	saccharose
<u>B. bifidum</u>	-	-	-	+	+	-	-	+ ou -
<u>B. infantis</u>	-	-	+	-	+	-	+	+
<u>B. longum</u>	+	+	+	-	+	-	+	+
<u>B. breve</u>	+	+	+	-	+	+	+	+
<u>B. adolescentis</u>	+	+	+	+	+	-	+	+

Six souches de bifidobactéries acidifiantes isolées de la bouche ou de l'intestin de l'homme montrent une activité protéolytique, vis-à-vis des protéines du lait, comparable à celle de Streptococcus lactis (BORISOVA et SLIVKO -14 -). Les autres caractéristiques biochimiques de B. bifidum sont présentées dans le tableau XX p.91 .

B - ISOLEMENT ET CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

1) Isolement

L'isolement de certaines souches de Bifidobacterium bifidum, à partir de fécès de nourrissons en bonne santé et alimentés au lait de femme est un important critère de sélection et fréquemment le seul possible (RASIC et KURMANN -137-).

2) Culture

a) Aspect général

Il est important que le milieu de culture ait la capacité de subvenir aux besoins nutritionnels des bactéries, qu'il possède un pouvoir tampon et un pH déterminé.

b) Besoins en substances nutritives et en facteurs de croissance

Les bifidobactéries sont nutritionnellement hétérogènes. Certaines souches nécessitent de l'azote organique alors que pour d'autres l'azote sous forme minérale leur suffit.

Tableau XX :

Caractères biochimiques de Bifidobacterium bifidum
d'après BEERENS et al (6) et PREVOT (135).

catalase	-
réduction des nitrates	+
production d'indole	+
fermentation du glycérol	+
coagulation des protéines	-
liquéfaction de la gélatine	-
coagulation des protéines du lait	+ (gaz -)
trouble de l'eau peptonée	+

Bifidobacterium bifidum requiert de l'azote organique. La présence de lait humain n'est pas nécessaire à sa croissance. Cependant son absence dans le milieu de culture entraîne chez B. bifidum des modifications morphologiques, une augmentation de la teneur en lipides et phospholipides, une augmentation du taux d'acides gras insaturés et à chaînes courtes, et une diminution de la quantité d'oligosaccharides. (GEKAS et LOPEZ-LEIVA - 48 -).

Les principaux facteurs de croissance utilisés sont, d'une part, l'acide pantothénique (précurseur du coenzyme A) que l'on apporte sous forme de peptone (GYORGY et ROSE - 62 - ; GYLLENBERG et NIEMELA - 56 - ; RAYNAUD - 138 -), d'autre part, les facteurs bifidigènes I qui sont les oligosaccharides contenant de la N-acétyl glucosamine que l'on trouve dans le lait de femme, (GYORGY et al - 58 -, - 59 -, - 60 -, - 61 -, - 63 -, - 64 - ; KUHN et al - 94 -).

Les facteurs bifidigènes II de nature peptidique, dont l'apport est réalisé par un hydrolysate protéique de caséine (RAYNAUD - 138 - ; RAYNAUD et BIZZINI - 139 -). ZYAJKA et al (190) et KISZA et al (85) ajoutent au milieu 20 p. 100 de lait dont les protéines ont été hydrolysées par la pepsine.

D'autres auteurs (SEMENIKHA et SUNDUKOVA - 153 -) utilisent de l'extrait de maïs au taux de 0,10 à 0,25 p. 100 dans le lait stérile. Dans ces conditions, le taux de multiplication des bifidobactéries est doublé ou triplé.

c) Potentiel d'oxydo-réduction et conditions d'anaérobie

La culture de Bifidobacterium bifidum nécessite un faible potentiel d'oxydo-réduction. L'addition de substances abaissant ce potentiel dans le milieu de culture, rend possible l'utilisation de techniques plus ou moins anaérobies en milieu liquide ou gélosé.

Les substances utilisées sont : l'acide ascorbique, le sulfure de calcium, le chlorhydrate de cystéine, le glucose qui en milieu alcalin et à chaud forme des réductones qui sont très réductrices, le glutathion, l'acide pyruvique, le sulfite de sodium, le thioglycolate de sodium et des fragments d'organes -infusions de cerveau de veau, mouton ou boeuf, de coeur de boeuf, de reins de lapin ou de foie de veau- (RASIC et KURMANN -137-).

La culture de Bifidobactérium bifidum peut être effectuée sous un flux continu de gaz carbonique exempt d'oxygène (HUNGATE -75 -) ou sous une atmosphère de gaz carbonique et d'azote (10/90 p. 100 en volume) (OP DEN CAMP et al -127-).

d) Pouvoir tampon et maintien du pH

Le maintien du pH lors de la culture est important pour la production d'acide par le microorganisme. Il est recommandé lors de la culture de ne pas descendre à des pH inférieurs à 5 afin de prévenir les dommages infligés aux cellules bactériennes et à la production d'acide.

L'effet destructif des acides sur les bactéries peut être évité par l'utilisation de substrats non fermentescibles, d'un milieu de culture contenant une quantité de

glucide juste nécessaire ou également par l'utilisation de carbonate de calcium pour neutraliser la production d'acides. L'addition de substances pour la neutralisation des acides peut être importante pour les milieux de culture contenant une forte concentration en glucide. Les acides produits peuvent être neutralisés par des sels de phosphate qui tamponnent le milieu (RASIC et KURMANN -137-).

MATERIEL ET METHODES

I CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

La souche de Bifidobacterium bifidum fraîchement isolée des selles de nourrisson alimenté au lait maternel, nous est fournie par Monsieur le professeur ROMOND (UER de pharmacie de l'université de LILLE II).

Elle est cultivée en bouillon cerveau-coeur (Institut Pasteur Production) complétement en chlorhydrate de cystéine (MERCK) et en extrait de levure (Institut Pasteur Production).

La composition du milieu de culture est la suivante :
(quantités exprimées en g par litre d'eau distillée)

- infusion de cervelle de veau déshydratée	12,5
- infusion de coeur de boeuf déshydratée	5
- peptone	10
- glucose	2
- chlorure de sodium	5
- phosphate disodique	2,5
- chlorhydrate de cystéine	0,3
- extrait de levure	5

Le pH du milieu est ramené à 7,2 avec de la soude concentrée, puis il est autoclavé à 125°C pendant 45 min etensemencé.

Bifidobacterium bifidum est une bactérie anaérobie, sa croissance est favorisée par un bas potentiel d'oxydo-réduction qui est obtenu d'une part grâce au chlorhydrate de cystéine et par la formation de réductones obtenues

à partir du glucose, lors de l'autoclavage du milieu d'autre part.

Une préculture est d'abord réalisée à 37 °C en flacon de 1 litre. Après 48 h d'incubation à 37 °C, la préculture est transférée stérilement dans un flacon de type erlenmeyer de 5 litres contenant 3,5 litres de milieu de culture tempéré à 37 °C. L'incubation est ensuite réalisée dans les mêmes conditions que la préculture.

Puis la culture est centrifugée à 15 000 g pendant 30 min à 4 °C, lorsqu'il s'agit de quantités qui n'excèdent pas 10 litres. Pour des volumes plus importants une centrifugation en continu est réalisée à 18 000 g à un débit de 10 litres par heure et à 4 °C.

Les cellules sont utilisées telles quelles ou après lyophilisation.

II DOSAGES ET CARACTERISATION DU SUBSTRAT ET
DES PRODUITS DE LA REACTION

A - DOSAGE DU LACTOSE DANS LE LAIT ET LES LACTOSERUMS

1) Principe

Dérivé de la méthode de SUMMER et HOWELL (162), l'acide 3,5-dinitrosalicylique est réduit à chaud et en milieu basique par le lactose, donnant une coloration brune qui est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm.

Le schéma réactionnel est présenté dans la figure 19 p.100.

2) Réactifs

a) Défécation

Solution 1 : solution aqueuse de ferrocyanure de potassium (Merck) à 15 g pour 100 ml.

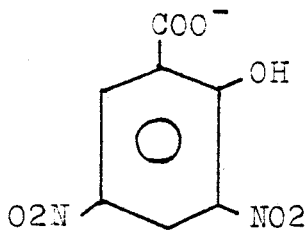
Solution 2 : solution aqueuse d'acétate de zinc (Merck) à 30 g pour 100 ml.

b) Solution de 3,5-dinitrosalicylate

5 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique sont dissous à chaud dans 100 ml de soude 2 M.

150 g de tartrate double de sodium et de potassium sont dissous à chaud dans 250 ml d'eau distillée.

Les deux solutions sont ensuite mélangées et complétées à 500 ml avec de l'eau distillée.



3,5-dinitrosalicylate

équation de la réaction

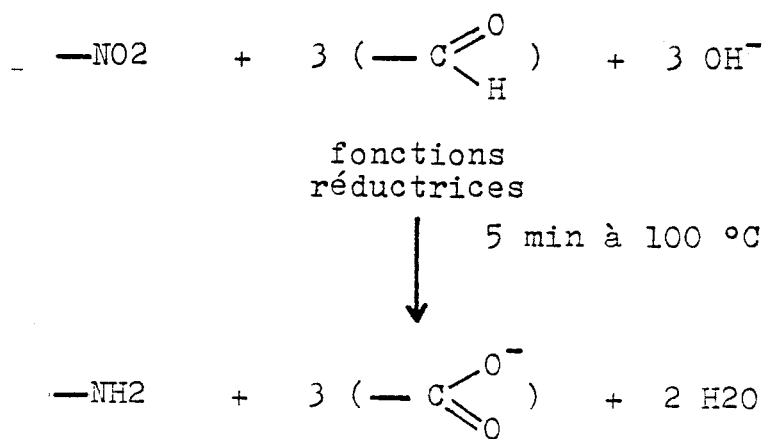


figure 19 : schéma réactionnel du dosage du lactose par la méthode au dinitrosalicylate (SUMMER et HOWELL - 162 -).

3) Mode opératoire

a) Défécation

Dans une fiole jaugée on introduit : 20 ml de lait ou de lactosérum, 2 ml de solution ① et 2 ml de solution ②. Le mélange est complété à 200 ml avec de l'eau distillée. 2 ml d'eau distillée sont rajoutés de manière à compenser le précipité obtenu.

Après agitation et repos de 10 à 15 min, le mélange est filtré sur papier whatman 3 de façon à obtenir un filtrat clair.

b) Dosage

3 ml de filtrat sont ajoutés et mélangés à 2 ml de la solution de 3,5-dinitrosalicylate, puis portés 5 min exactement au bain marie à 100 °C et refroidis sous eau courante . 15 ml d'eau distillée sont rajoutés.

La densité optique de la solution est mesurée à 540 nm.

La réponse est linéaire jusqu'à des concentrations en lactose de 4 mM. Le témoin utilisé est le lactose.

B - DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLUCOSE

1) Principe

La méthode utilisée est celle à l'hexokinase / glucose-6-phosphate deshydrogénase (Boehringer Mannheim).

Le glucose est transformé en présence d'ATP en glucose-6-phosphate, ce dernier est ensuite oxydé en présence de NADP^+ en acide 6-phosphogluconique avec production de NADPH, H^+ qui est mesuré par spectrophotométrie à 340 nm.

Le schéma réactionnel est présenté dans la figure 20 p. 103.

2) Réactifs

Solution ① : tampon triéthanolamine (17,7 g/100 ml) pH 7,6 (MERCK), contenant :

- NADP^+ , 237 mg/100 ml, (Boehringer)
- ATP , 592 mg/100 ml , (Boehringer)
- MgSO_4 , 100 mg/100 ml , (MERCK)

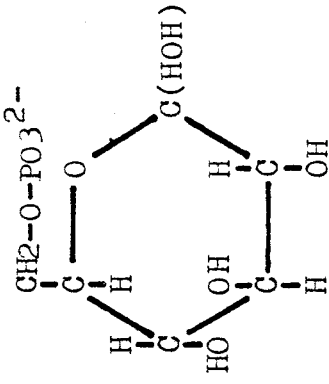
cette solution est stable 1 mois à 4 °C

Solution ② : hexokinase à 200 UI/0,7 ml et glucose-6-phosphate deshydrogénase à 100 UI/0,7 ml (Boehringer)

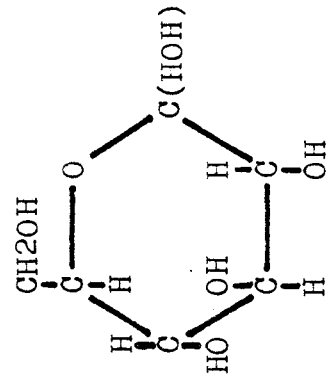
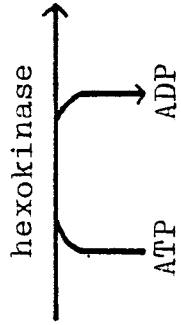
3) Mode opératoire

1 ml de solution ① est mélangé avec 1,9 ml d'eau distillée et 0,1 ml d'échantillon à analyser. Une première mesure de densité optique est réalisée à 340 nm, soit E1.

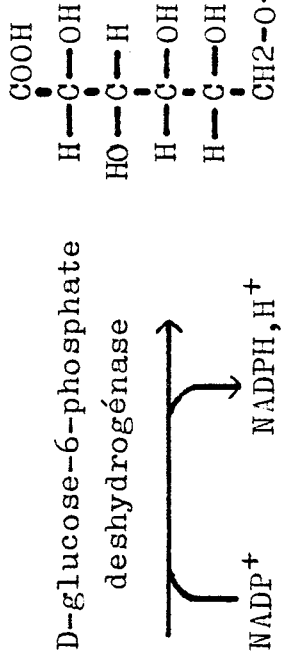
Après addition et mélange de 0,02 ml de solution ②, la réaction se déroule à 20 - 25 °C, elle est terminée en 10 min.



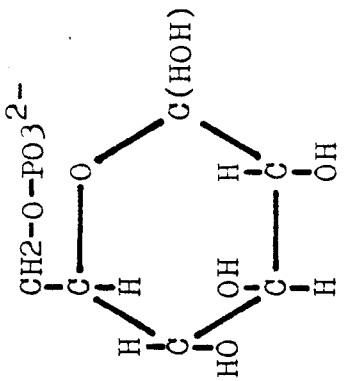
D-glucose-6-phosphate



D-glucose



acide 6-phospho-D-gluconique



D-glucose-6-phosphate

figure 20 : schéma réactionnel du dosage du glucose par la méthode à l'hexokinase / glucose-6-phosphate déshydrogénase

Une seconde mesure de densité optique est effectuée, soit E2.

La différence E2 - E1, soit ΔE , représente la quantité de NADPH, H⁺ formée au cours de la réaction. ΔE est proportionnelle à la concentration en glucose présent dans le milieu réactionnel.

C - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

5 μ l de lactosérum ou de lait sont déposés sur couche mince (MERCK, DC Alufolien Kieselgel 60).

La migration est effectuée pendant 12 h dans le système solvant : n butanol / acide acétique / eau dans les rapports (V/V) 2 / 1 / 1 (HUMBEL et COLLART - 74 -).

Une solution d'orcinol sulfurique (0,2 p.100 dans H2SO4 20 p.100) est pulvérisée sur le chromatogramme préalablement séché. La révélation est effectuée par chauffage 10 min à 120 °C.

III ETUDES REALISEES SUR LES CELLULES
LYOPHILISEES NON INCLUSES

A - INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION SUR L'ACTIVITE LACTASIQUE

0,3 ml d'une suspension aqueuse de cellules (10 mg de cellules fraîches) est soit lyophilisé, puis repris par 1,5 ml d'eau distillée, soit conservé à 4 °C et repris par 1,2 ml d'eau distillée.

La suspension (0,1 ml) est incubée 30 min à 37°C en présence de tampon phosphate disodique (0,2 M) - acide citrique (0,1 M) pH 5 (0,2 ml) et d'une solution de lactose 25 mM (0,1 ml).

L'arrêt de la réaction s'effectue par chauffage au bain marie 3 min à 100°C. Le glucose libéré est mesuré par dosage enzymatique. Des témoins cellules et substrat sont réalisés.

B - DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES ET CINETIQUES

Les conditions d'hydrolyse du lactose sont décrites dans le tableau XXI p.107.

1) Principaux paramètres enzymatiques et cinétiques

(sauf action des effecteurs enzymatiques)

a) Préparation de la solution tamponnée de lactose

Une solution d'acide maléique (LABOSI) 0,2 M est amenée au pH voulu par une solution de soude (PROLABO) 0,8 M.

Une solution de lactose à différentes concentrations, contenant du chlorure de calcium (PROLABO) 0,1 M et de l'azide de sodium (MERCK) 0,04 p. 100 (P/V) est préparée.

Tableau XXI :

Détermination des paramètres enzymatiques et cinétiques
de la lactase de cellules lyophilisées

paramètres étudiés	pH	température (°C)	masse de matière sèche (mg)	temps d'hydrolyse (min)	concentration en lactose (g.l ⁻¹)
pH optimum	4,9 à 6,75	45	0,928	30	45
température optimale	5,7 et 6,5	20 à 60	0,8	30	45
cinétique de concentration en enzyme	5,7	54	0,020 à 0,203	30	45
cinétique en fonction du temps	5,7	54	0,215	15 à 90	45
détermination du Km	5,7	54	0,112	30	6 à 90

Les deux solutions sont mélangées à volume égal et le pH est vérifié.

b) Mode opératoire

1 ml de solution de lactose est incubé à des températures et des temps variables avec 0,1 ml de suspension cellulaire homogénéisée (contenant une masse précise de matière sèche).

L'arrêt de la réaction se fait par chauffage au bain marie 3 min à 100°C. Des témoins enzyme et substrat sont réalisés.

Le glucose libéré est ensuite mesuré par dosage enzymatique à l'hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase.

2) Action des effecteurs.

a) Recherche des effecteurs

0,1 ml d'une suspension de cellules lyophilisées contenant 0,104 mg de matière sèche est préincubé 10 min à température du laboratoire en présence d'une solution (0,1 ml) d'effecteur à une concentration de 12 mM sauf pour l'azide de sodium qui est à 0,02 p. 100, l'eau de javel à 3,4°chloré et l'eau oxygénée à 10 volumes, le glucose et le galactose à une concentration de 1 M.

La réaction enzymatique est ensuite effectuée en présence d'une solution de lactose à 4,5 p. 100, tamponnée à pH 5,7, ne renfermant ni azide de sodium, ni chlorure de calcium.

L'ensemble est incubé pendant 30 min à 54°C, l'arrêt de la réaction s'effectue par un chauffage de 3 min au bain marie à 100°C. Des témoins enzymes et substrat sont réalisés. Le glucose libéré est dosé par la méthode enzymatique. La validité de cette méthode est vérifiée en utilisant une solution de glucose à 4 mM contenant l'effecteur à la même concentration que celle existant dans le milieu réactionnel utilisé pour l'hydrolyse du lactose.

b) Activation de la lactase par le magnésium

0,1 ml de suspension cellulaire contenant 0,107 mg de matière sèche est préincubé 10 min à température du laboratoire avec 0,1 ml de solution de MgCl₂ allant de 0,12 mM à 3 mM.

1 ml de solution tamponnée à pH 5,7 de lactose (6 à 90 g/l) ne contenant ni chlorure de calcium ni azide de sodium, est rajouté. L'ensemble est incubé 30 min à 54°C. L'arrêt de la réaction s'effectue comme précédemment et des témoins enzyme et substrat sont réalisés.

c) Influence de l'EDTA et de l'EGTA sur l'activité enzymatique en présence de magnésium et de calcium

0,1 ml d'une suspension de cellules lyophilisées contenant 0,2 mg de matière sèche est préincubé 15 min à température du laboratoire avec 0,1 ml d'EDTA 12 mM ou 0,1 ml d'EGTA 6 mM.

0,1 ml de solution de CaCl₂ ou MgCl₂ à différentes concentrations est rajouté dans le milieu qui est de nouveau préincubé à température du laboratoire pendant 15 min.

On ajoute ensuite 1 ml d'une solution tamponnée à pH 6 de lactose à 4,5 p. 100, ne contenant pas de chlorure de calcium ni d'azide de sodium, l'ensemble est incubé à 45°C pendant 60 min.

L'arrêt de la réaction s'effectue par chauffage de 3 min au bain marie à 100°C. Le glucose libéré est mesuré par dosage enzymatique. Des témoins cellules, substrat, sels de calcium ou de magnésium et de chélateurs sont réalisés.

IV INCLUSION DES CELLULES DANS L'ALGINATE DE CALCIUM

A - PROCEDE DE FABRICATION DES BILLES

1) Préparation de la suspension

100 ml d'une solution à 1 p. 100 (P/V) d'alginate de sodium SIGMA type IV, préalablement portés à ébullition et refroidis, sont mélangés de façon homogène avec 1,25 g de cellules lyophilisées ou 5,55 g de cellules fraîches (cellules conservées à 4 °C pendant moins de 48 h, non congelées et non lyophilisées).

La suspension est laissée au repos afin d'éliminer les bulles d'air formées au cours de l'homogénéisation.

2) Fabrication des billes

La suspension est poussée, par de l'air comprimé à une pression de 1 Kg/cm², à l'intérieur d'un tube de nylon relié à l'appareil présenté dans la figure 21 p.113 .

Au sortir de l'appareil , la suspension s'écoule goutte à goutte et celle-ci est chassée de l'extrémité du tube par un jet d'air comprimé à débit modulable, de manière à réduire le diamètre des gouttes formées. Celles-ci tombent dans une solution de CaCl₂ 0,5 M préalablement portée à ébullition, refroidie et agitée lentement.

Lorsque le débit d'air comprimé est nul, le diamètre des billes obtenues est de 2,5 mm. La taille des billes fabriquées à l'aide d'un tel système est fonction de l'inverse du débit d'air comprimé. Des billes de 1 mm de diamètre peuvent être obtenues lorsque le débit d'air comprimé est de 25 à 30 litres par minute.

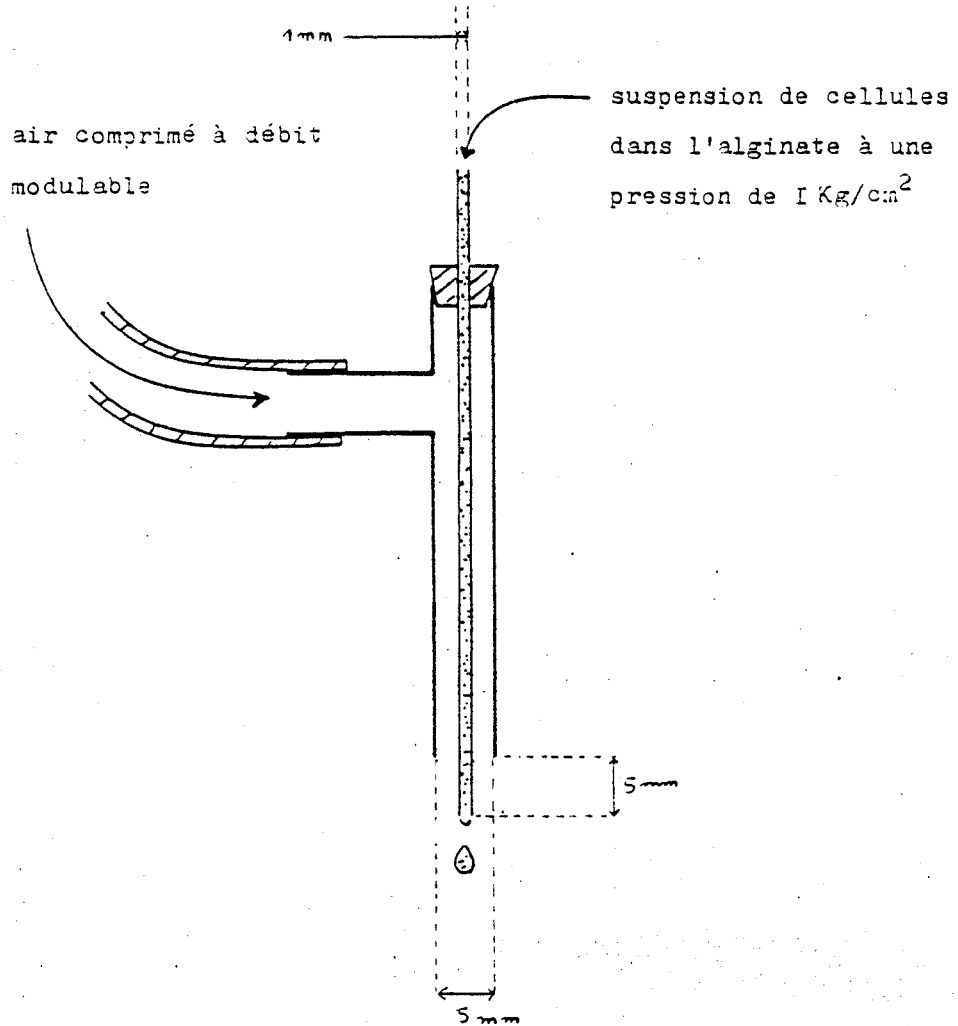


figure 21 : schéma de l'appareil, réalisé en verre, permettant de fabriquer des billes d'alginate de calcium de diamètre voulu.

Les billes sont maintenues 20 min dans la solution de chlorure de calcium 0,5 M.

B - ENROBAGE DES BILLES PAR LE POLYETHYLENIMINE

1) Procédé d'enrobage

Les billes sont rincées à l'eau courante puis introduites dans une solution de polyéthylèneimine (PEI) à 1 ou 2 p. 100 (BDH), ramenée à pH 6 par de l'acide chlorhydrique concentré. L'ensemble est maintenu sous agitation lente à température du laboratoire pendant 10 min (temps de contact).

Les billes sont ensuite rincées à l'eau courante et conservées dans une solution de CaCl_2 0,5 M contenant de l'azide de sodium à 0,02 p. 100.

2) Etude de l'enrobage des billes

Quatre billes d'alginate de diamètre 2,48 (+ ou - 0,10) mm sont enrobées de la même manière que précédemment, mais les concentrations des solutions de PEI varient de 1 à 4 p. 100 (P/V) et les temps de contact de 5 à 20 min.

L'activité résiduelle des billes est mesurée dans les conditions expérimentales décrites page 117. L'hydrolyse est effectuée à pH 6 et à 45 °C pendant une heure sur une solution de lactose à 4,5 p. 100.

La quantité de glucose libéré est mesurée par dosage enzymatique et la comparaison des activités résiduelles est effectuée par rapport à celle des billes non enrobées

C - DETERMINATION DE LA QUANTITE MAXIMALE DE CELLULES
QUI PEUT ETRE INCLUSE

La méthode utilisée est celle décrite p 120.

L'hydrolyse est effectuée à 45 °C et pH 6 avec des billes non enrobées et à concentrations croissantes en cellules lyophilisées exprimées en mg de matière sèche (MS) pour 10 ml de solution d'alginate de sodium à 1 p. 100.

Les dimensions du réacteur utilisé sont : hauteur 5,5 cm et diamètre 0,9 cm.

Le débit de la solution tamponnée de lactose au travers du réacteur est de 30 ml/h.

V DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES
ET CINETIQUES DE LA LACTASE DES CELLULES
LYOPHILISEES INCLUSES

Les conditions d'hydrolyse du lactose sont décrites dans le tableau XXII p. 118 .

1 ml d'une solution tamponnée (pH déterminé) de lactose à différentes concentrations est incubé à des températures et des temps variables avec un certain nombre de billes d'alginate de calcium enrobées ou non par du polyéthylènimine et fabriquées selon la méthode décrite précédemment.

L'arrêt de la réaction se fait par chauffage 3 min à 100 °C. Des témoins substrat et enzyme immobilisée sont réalisés. Le glucose libéré est dosé par voie enzymatique.

Les diamètres des billes utilisées sont de 2,48 (+ ou - 0,10) mm pour les billes non enrobées et de 2,50 (+ ou - 0,07) mm pour les billes enrobées par le polyéthylènimine.

Tableau XXII :

Détermination des paramètres enzymatiques et cinétiques
de la lactase de cellules lyophilisées incluses dans l'alginate de calcium

paramètres étudiés	enrobage des billes	pH	température (°C)	temps d'hydrolyse (min)	nombre de billes	concentration en lactose (g.l ⁻¹)
pH optimum	sans PEI	4,9 à 6,75	45	60	6	45
	PEI 1p.100	4,9 à 6,75	45	60	6	45
température optimale	sans PEI	6	25 à 60	60	4	45
	PEI 1p.100	6	25 à 60	60	4	45
cinétique de concentration en enzyme	sans PEI	6	45	60	2 à 8	45
	PEI 1p.100	6	45	60	2 à 8	45
cinétique en fonction du temps	sans PEI	6	45	30 à 150	4	45
	PEI 1p.100	6	45	30 à 150	4	45
détermination du Km	sans PEI	6	45	60	4	7,2 à 108
	PEI 1p.100	6	45	60	4	7,2 à 108

VI HYDROLYSE EN CONTINU DU LACTOSE DE DIFFERENTES
ORIGINES

A - SOLUTION TAMPONNEE DE LACTOSE

Les principales caractéristiques de ces manipulations sont rassemblées dans le tableau XXIII p. 121 .

Les billes d'alginate sont fabriquées selon la méthode décrite précédemment et introduites dans un réacteur. Une solution tamponnée de lactose est introduite par le haut du réacteur à des débits différents selon le cas.

La quantité de glucose libérée est déterminée par dosage enzymatique.

Il est à noter que les échantillons de glucose à analyser sont prélevés en sortie de réacteur après passage d'une quantité de solution de lactose correspondant à 10 fois le volume du réacteur, et ceci dans le cas d'études nécessitant l'équilibre de la réaction enzymatique.

L'activité du réacteur est exprimée en pourcentage d'hydrolyse du lactose ou taux de conversion.

B - LACTOSERUM DOUX DE FROMAGERIE

Le lactosérum doux à été fourni par la société GALLIA (Steenvoorde, France).

Les lactosérums, obtenus après action de présures sur le lait, sont utilisés tels quels ou après délipidation par centrifugation.

Au laboratoire, 0,02 p.100 d'azide de sodium sont rajoutés dans le lactosérum qui est ensuite ramené à pH 6 avec de l'acide chlorhydrique concentré, porté à ébullition et refroidi dans des conditions stériles.

Tableau XXIII :

Conditions d'hydrolyse en continu du lactose contenu dans une solution tamponnée

études réalisées	pH	température (°C)	débit (ml/h)	dimensions du réacteur (1) en mm	enrobage des billes	diamètre des billes (mm)
influence du débit sur le taux de conversion (cellules lyophilisées)	6	45	10 à 80	65 x 9	sans	1
hydrolyse par des billes non enrobées (cellules lyophilisées)	6	45	8,3	72 x 9	sans	1
hydrolyse par des billes enrobées (cellules lyophilisées)	6	45	8,3	72 x 9	PEI 1p.100	1
	6	45	8,3	78 x 8	PEI 2p.100	1
hydrolyse par des billes formées dans une solution de CaCl ₂ 0,5 M et MgCl ₂ 1 M, puis enrobées (cellules lyophilisées)	6	45	7,6	91 x 9	PEI 1p.100	1
hydrolyse par des billes enrobées (cellules fraîches)	6	45	8,7	65 x 8	PEI 1p.100	1

(1) : hauteur x diamètre

Le lactosérum ainsi préparé est ponctionné stérilement et introduit par l'extrémité inférieure d'un réacteur rempli de billes d'alginate.

Les conditions d'hydrolyse sont présentées dans le tableau XXIV p. 123 .

Le pH du lactosérum est vérifié en continu à la sortie du réacteur. La concentration initiale en lactose est déterminée par la méthode au dinitrosalicylate, celle du glucose libéré, par dosage enzymatique à l'hexokinase / glucose-6-phosphate deshydrogénase.

Les billes utilisées sont fabriquées à l'aide de cellules lyophilisées, et sont enrobées par du polyéthylènimine à partir d'une solution à 1 P. 100. Les billes ont un diamètre moyen de 1 mm.

C - LAIT ENTIER UHT

Le lait est transvasé stérilement dans un flacon pasteur contenant de l'azide de sodium (0,02 p. 100). Celui-ci est retourné et utilisé comme perfuseur pour alimenter le réacteur en substrat. Le pH du lait est vérifié en continu à la sortie du réacteur.

Les conditions d'hydrolyse sont présentées dans le tableau XXIV p. 123 .

La concentration initiale en lactose est déterminée par la méthode au dinitrosalicylate , celle du glucose libéré, par dosage enzymatique.

Les billes utilisées sont les mêmes que celles mentionnées dans le paragraphe VI, B, p. 120 .

Tableau XXIV :

Conditions d'hydrolyse en continu du lactose contenu dans le lactosérum et le lait

substrat	pH	température (°C)	débit (ml/h)	dimensions du réacteur (1) en mm	concentration en lactose du lacto- sérum (g.l ⁻¹)
lactosérum	6	45	8,7	30 x 15	47
lait entier UHT	6,3-6,4	45	8,2	40 x 15	42,8

(1) : hauteur x diamètre

RESULTATS

I CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

La culture réalisée en bouillon cerveau-coeur cystéiné est arrêtée 48 h après l'ensemencement. Le pH initial du milieu est de 7,2, en fin de culture le pH mesuré est de 4,7 à 4,8. Or, d'après RASIC et KURMANN (1977), la croissance de la souche et la capacité qu'a celle-ci de produire des acides organiques sont arrêtées lorsque le pH du milieu est inférieur ou égal à 5. Il apparait donc, que lorsque des cellules de B. bifidum sont dans un milieu de pH inférieur à 5, celles-ci ont leurs potentialités enzymatiques endommagées. Il serait souhaitable de réaliser les cultures en fermenteur de manière à pouvoir contrôler le pH du milieu de culture.

Dans les conditions de culture réalisée ici, la masse de cellules produite est de 3,3 g (+ ou - 0,5 g) par litre de culture. Le taux de matière sèche, déterminé après lyophilisation des cellules est de 0,78 g (+ ou - 0,12 g) par litre de culture.

Initialement, des mesures d'activité lactasique avaient été faites sur un culot de centrifugation d'une suspension de cellules après ultrasonage réfrigéré. Puis par la suite, des essais ont été réalisés sur des cellules lyophilisées et des cellules entières.

II INCLUSION DES CELLULES DANS UN GEL D'ALGINATE

A - ASPECT DU SUPPORT

Les particules d'alginate de calcium, contenant des cellules, ont une forme sphérique et une couleur blanchâtre. Elles sont lisses et d'aspect très homogène à l'oeil nu (figure 22 p.128).

La microscopie électronique d'une coupe de bille d'alginate (figures 23 et 24 p. 129) montre l'homogénéité du réseau constitué par le gel d'alginate de calcium ainsi que la densité importante de la surface de la bille constituée par du polyéthylènimine.

Dans le but d'augmenter la demi-vie du réacteur, des billes d'alginate ont été préparées par goutte à goutte dans une solution de CaCl_2 0,5 M et de MgCl_2 1 M.

La microscopie électronique de ces billes (figure 25 p. 130) fait apparaître une hétérogénéité de la matrice caractérisée par un tassement du gel d'alginate et l'apparition de faisceaux.

B - DETERMINATION DE LA MASSE DE CELLULES POUVANT ETRE INCLUSE DANS LE SUPPORT

Les résultats sont présentés dans la figure 26 p. 131.

Le taux de conversion du lactose en galactose et glucose est proportionnel à la masse de cellules utilisée pour l'inclusion.

Cette proportionnalité est vérifiée entre 0 et 125 mg de cellules lyophilisées pour 10 ml d'une préparation d'alginate à 1 p. 100. Au delà de cette concentration il n'y a plus d'inclusion.

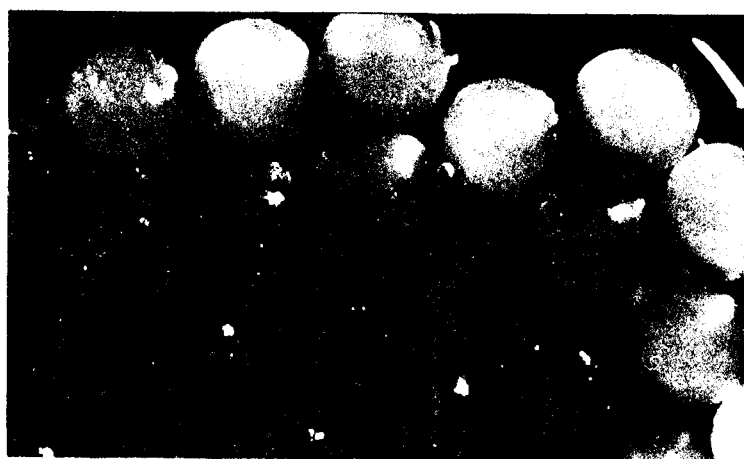
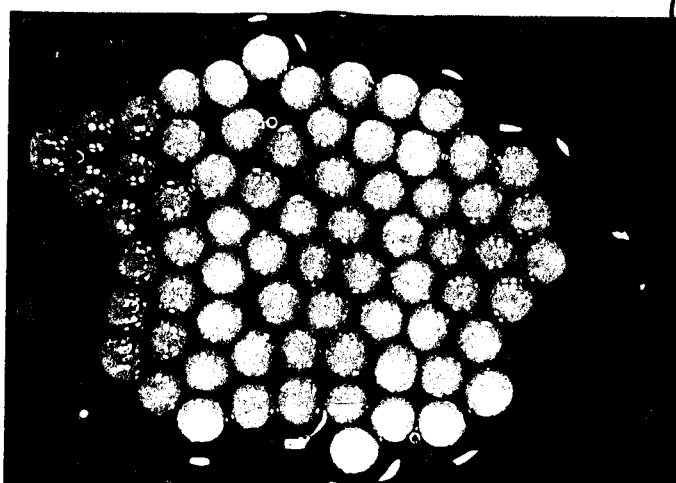
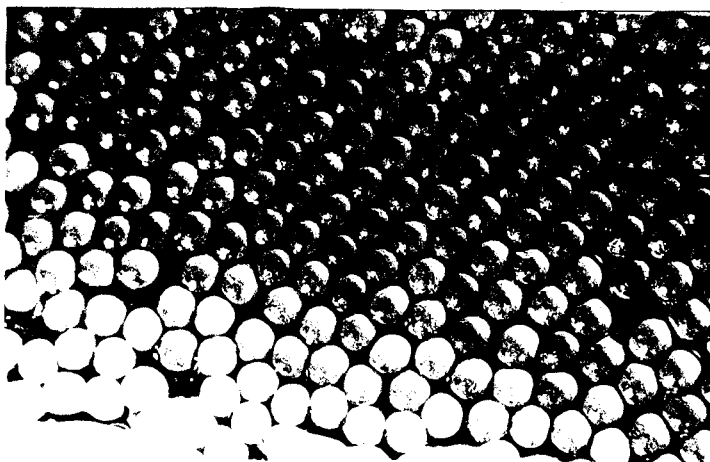


figure 22 : billes d'alginate enrobées par du PEI
(diamètre des billes : 1 mm).

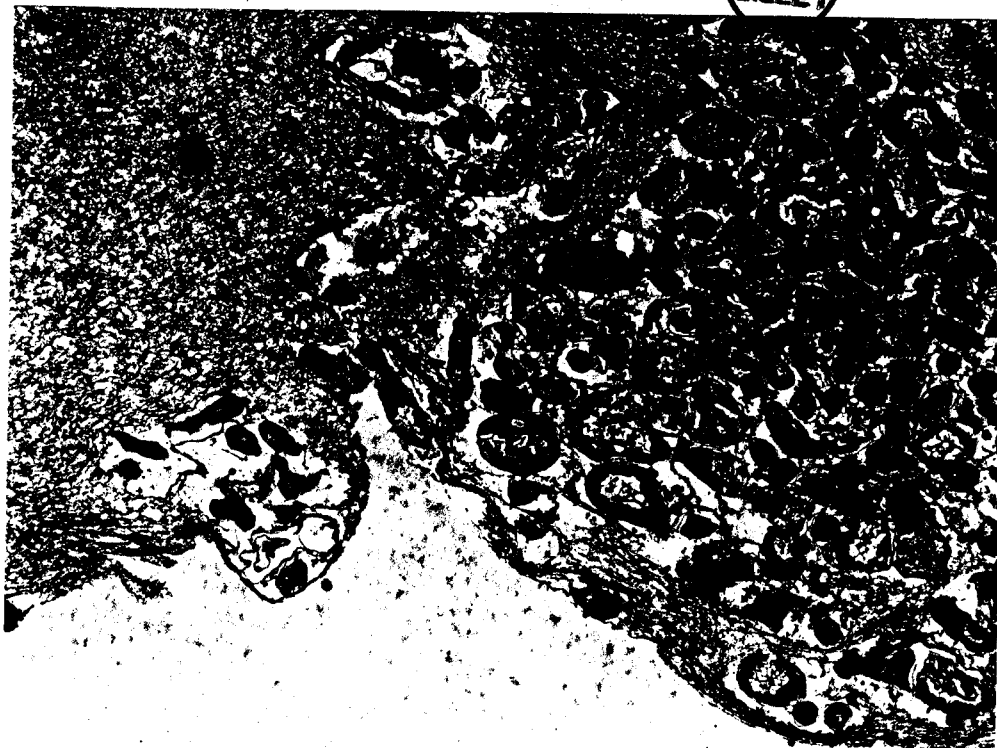


figure 23 : microscopie électronique d'une coupe de bille d'alginate de calcium non enrobée par du PEI (grossissement : x 4600).



figure 24 : microscopie électronique d'une coupe de bille d'alginate de calcium enrobée par du PEI (grossissement : x 9000).



figure 25 : microscopie électronique d'une coupe de bille d'alginate de calcium et de magnésium enrobée par du PEI (grossissement : x 9000).

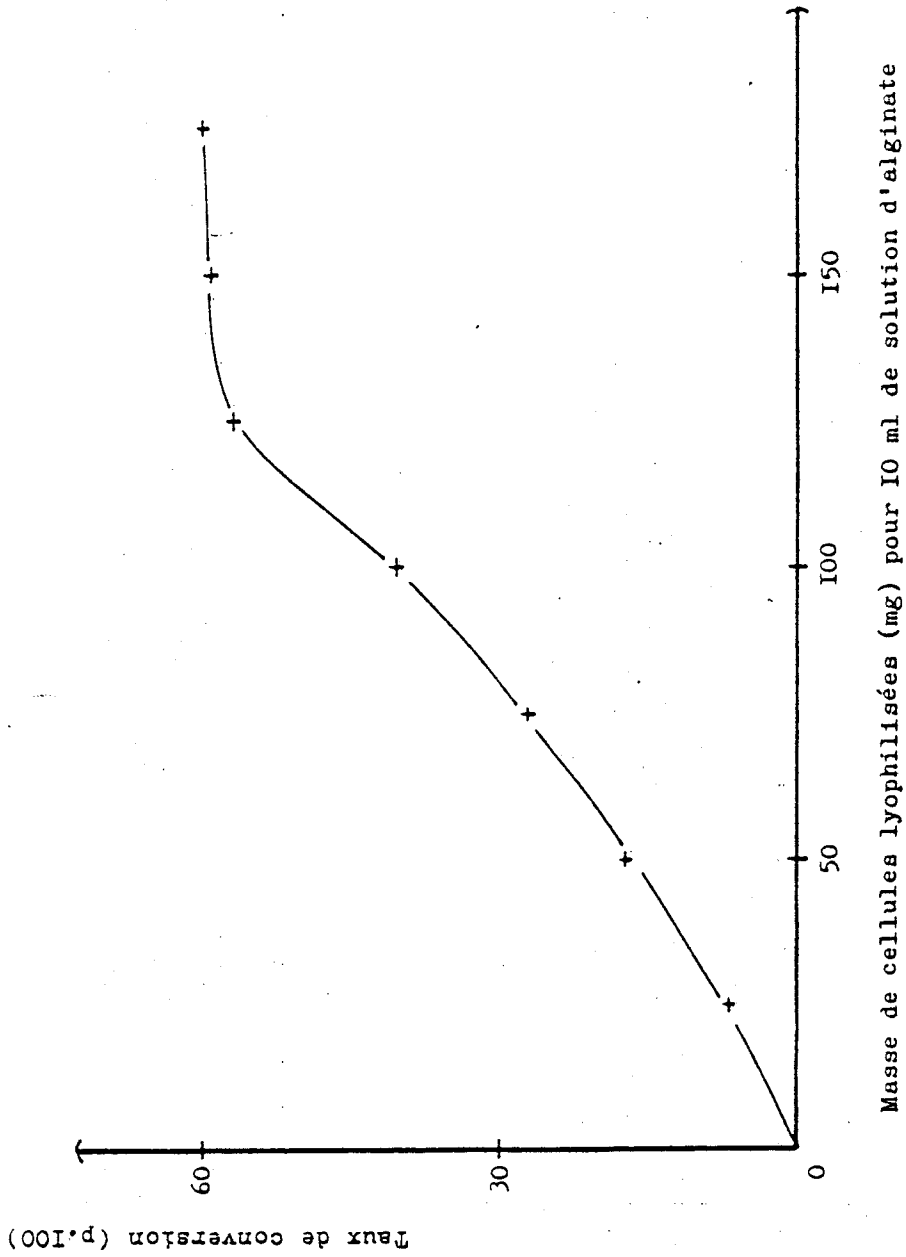


figure 26 : taux de conversion du lactose en fonction de la masse de cellules lyophilisées par unité de volume de la solution d'alginate 1 p. 100 utilisée pour l'inclusion.

C - ETUDE DE L'ENROBAGE DES BILLES D'ALGINATE PAR LE
POLYETHYLENIMINE

L'enrobage des billes d'alginate de calcium s'effectue par agitation lente des billes dans une solution aqueuse de polyéthylèneimine (PEI). Ce polymère s'adsorbe sur la surface de la bille de manière à former une couche dense que l'on peut visualiser par microscopie électronique (figure 25 p. 130).

L'enrobage des billes doit être réalisé dans des conditions telles que la couche de PEI formée permette encore l'expression d'une activité lactasique importante. La couche de PEI est un obstacle supplémentaire à la diffusion du lactose vers l'intérieur de la bille.

La figure 27 p. 133 montre que la teneur en PEI de la solution utilisée pour l'enrobage, ainsi que le temps de contact, doivent être rigoureusement contrôlés pour ne pas provoquer de chute importante de l'activité apparente de la lactase incluse.

Une activation de l'activité lactasique est à remarquer lorsque le temps de contact des billes avec la solution de PEI (1 et 2 p. 100) est de 5 minutes. Ceci est certainement dû, d'une part à l'adsorption du lactose au niveau du PEI, son hydrolyse est alors plus rapide et d'autre part à la diffusion plus facile du glucose et du galactose vers l'extérieur des billes, que lorsque la couche de PEI est plus épaisse.

Pour une solution de PEI plus concentrée (4 p. 100) et des temps de contact de 15 à 20 minutes, on observe une légère augmentation de l'activité lactasique apparente. L'hypothèse est qu'une compétition paraît s'instaurer entre l'augmentation de l'épaisseur de la couche de PEI, dû à des concentrations plus importantes de la solution, et à la dégradation de celle-ci lors d'une agitation prolongée des billes dans la solution de PEI.

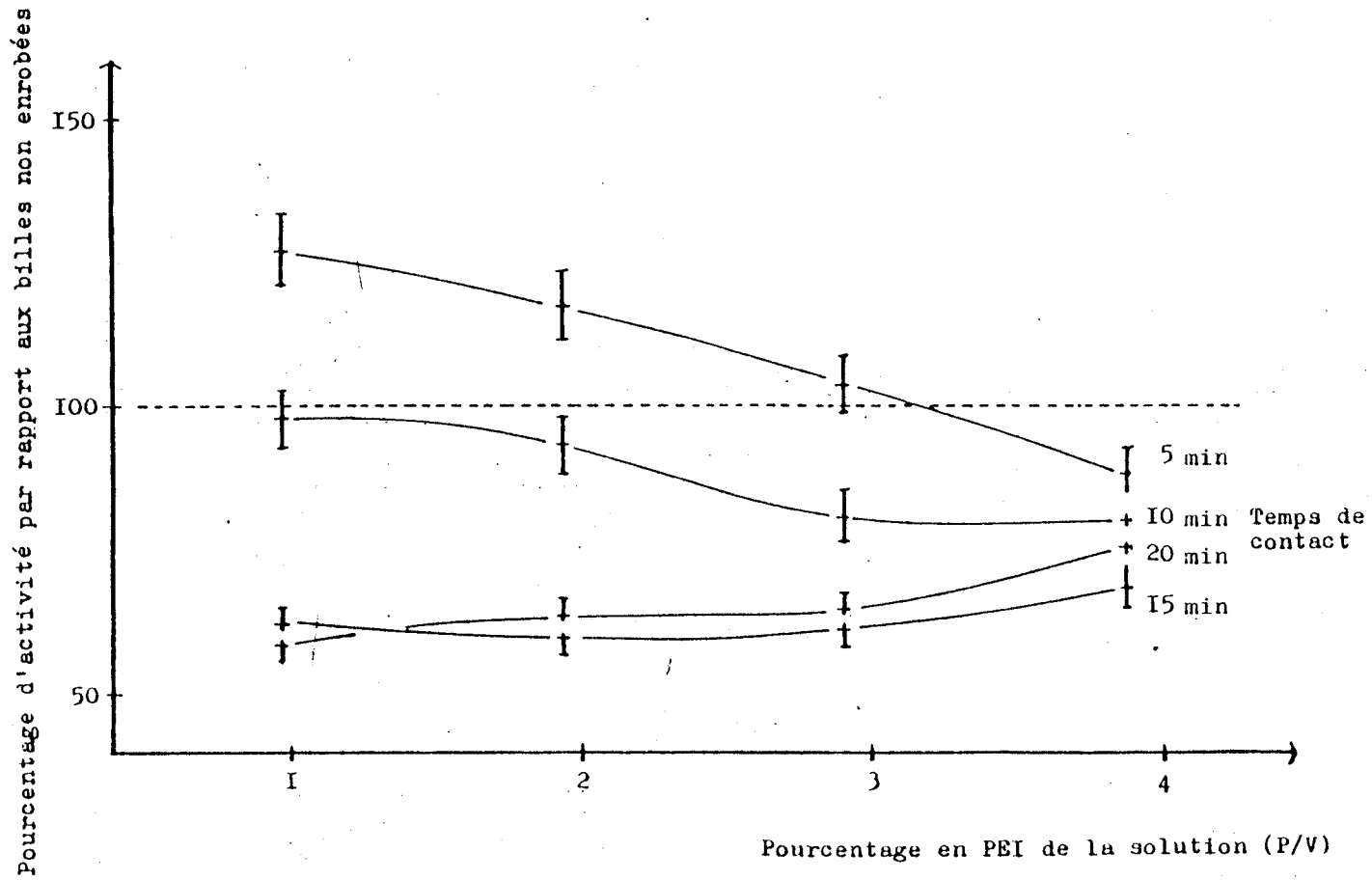


figure 27 : activité des cellules incluses dans des billes d'alginate enrobées par du PEI en fonction du pourcentage en PEI de la solution et du temps de contact avec les billes.

Lors de l'hydrolyse en continu du lactose (figure 47 p.166), on observe que le PEI permet d'augmenter le temps de demi-vie du réacteur (temps pour lequel le taux de conversion du lactose en glucose et galactose est de 50 p. 100) de dix jours, par rapport au temps de demi-vie d'un réacteur rempli de billes non enrobées et ceci quelque soit la concentration en PEI de la solution utilisée pour l'enrobage, à condition que la concentration soit supérieure à 1 p. 100 et pour un temps de contact de 10 minutes.

Il est à noter que l'enrobage des billes d'alginate par le PEI permet de limiter la diffusion des protéines de l'intérieur vers l'extérieur des billes (TANAKA et al 165) et par conséquent aux protéines d'y pénétrer. En effet, ceci est vérifié, car les temps de demi-vie de réacteurs contenant des billes d'alginate enrobées par le PEI sont pratiquement les mêmes lorsque l'on utilise comme substrat : une solution tamponnée de lactose, du lactosérum doux à pH 6 ou du lait entier (figure 48 p. 168).

Cela montre que l'enrobage des billes par le PEI permet d'éviter l'encrassement des billes par les protéines du lactosérum ou du lait.

Pour la détermination des paramètres enzymatiques ou cinétiques de la lactase des cellules incluses, nous avons choisi, pour l'enrobage des billes : un temps de contact de 10 minutes avec une solution de PEI à 1 p. 100.

III PARAMETRES ENZYMATIQUES

A - INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION DES CELLULES SUR L'ACTIVITE LACTASIQUE

L'activité lactasique est conservée après lyophilisation des cellules. La perte d'activité est de 2,5 p. 100.

La lyophilisation des cellules permettrait un stockage facile avant de les inclure dans les billes d'alginate.

B - DETERMINATION DU pH OPTIMUM ET DE LA TEMPERATURE OPTIMALE

1) pH optimum

Les résultats sont présentés dans les figures 28 et 29 p. 137 .

Il est à remarquer que l'activité lactasique des cellules lyophilisées présente deux optimums : l'un à pH 5,6 - 5,7 et l'autre à pH 6,5.

En ce qui concerne l'activité des cellules incluses, le pH optimum est de 6. L'inclusion des cellules a pour effet d'uniformiser la courbe de la vitesse d'hydrolyse du lactose en fonction du pH, les deux optimums observés pour l'activité lactasique des cellules lyophilisées non incluses disparaissent lorsque les cellules sont incluses. L'enrobage des billes par le PEI provoque un aplatissement de la courbe en comparaison avec celle réalisée à l'aide de billes non enrobées.

La lactase incluse perd 30 p. 100 de son activité à pH 5 par rapport à pH 6 (100 p. 100) et lorsque les cellules sont incluses dans des billes d'alginate enrobées par le PEI, la lactase ne perd que 10 p. 100 de son activité à pH 5 par rapport à l'activité à pH 6 (100 p. 100).

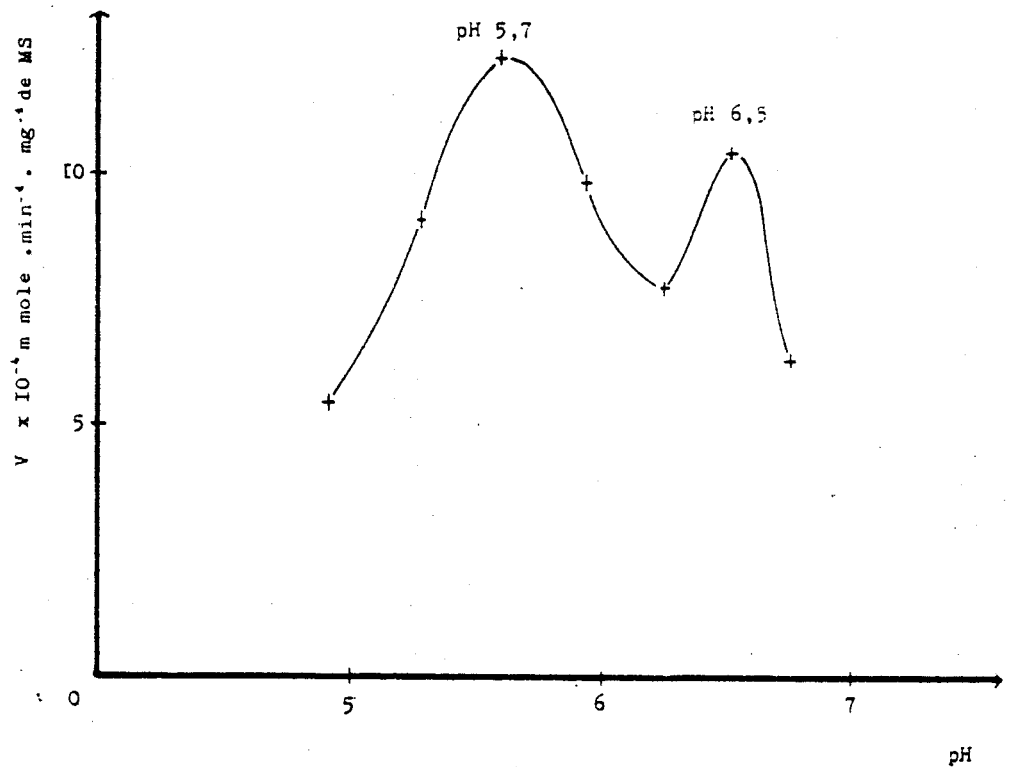


figure 28 : vitesse d'hydrolyse du lactose par les cellules lyophilisées non incluses, en fonction du pH.

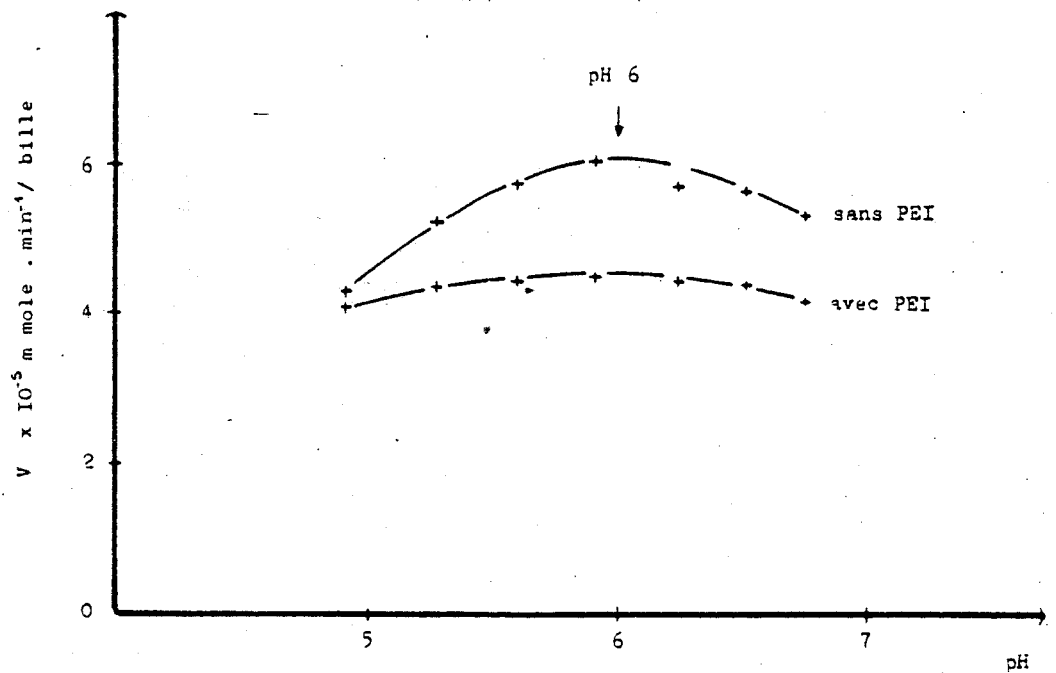


figure 29 : vitesse d'hydrolyse du lactose par les cellules lyophilisées incluses, en fonction du pH.

Ce qui permet, dans ce dernier cas, lors d'un processus industriel d'hydrolyse du lactose, de pallier aux variations de pH entre pH 5 et pH 7 sans perte importante d'activité.

Un tel procédé permet de traiter le lait (pH 6,3 - 6,4) sans en modifier le pH, comme pour le Plexazym LA1 et le Plexazym LY (Röhm).

Les pH utilisés pour la détermination des paramètres cinétiques de la lactase seront de 5,7 pour les cellules lyophilisées non incluses et de 6 pour les cellules lyophilisées incluses.

2) Température optimale

La lactase des cellules lyophilisées non incluses possède un optimum de température se situant dans une zone comprise entre 49 °C et 54 °C (figure 30 p. 139).

La température optimale du système lactasique inclus est dans une zone comprise entre 45 °C et 50 °C (figure 31 p. 139).

L'inclusion provoque un glissement de la zone de température optimale de l'ordre de 5 °C vers les températures plus basses. L'enrobage des billes par le PEI ne modifie pas la température optimale de la lactase des cellules incluses.

La température optimale de la lactase de B. bifidum incluse dans l'alginate, n'est pas très élevée, cette température ne permet pas d'éviter le développement de microorganismes dans le réacteur. Toutefois, une des caractéristiques intéressantes est que la lactase des cellules incluses dans les billes enrobées par du polyéthylènimine perd seulement 30 p. 100

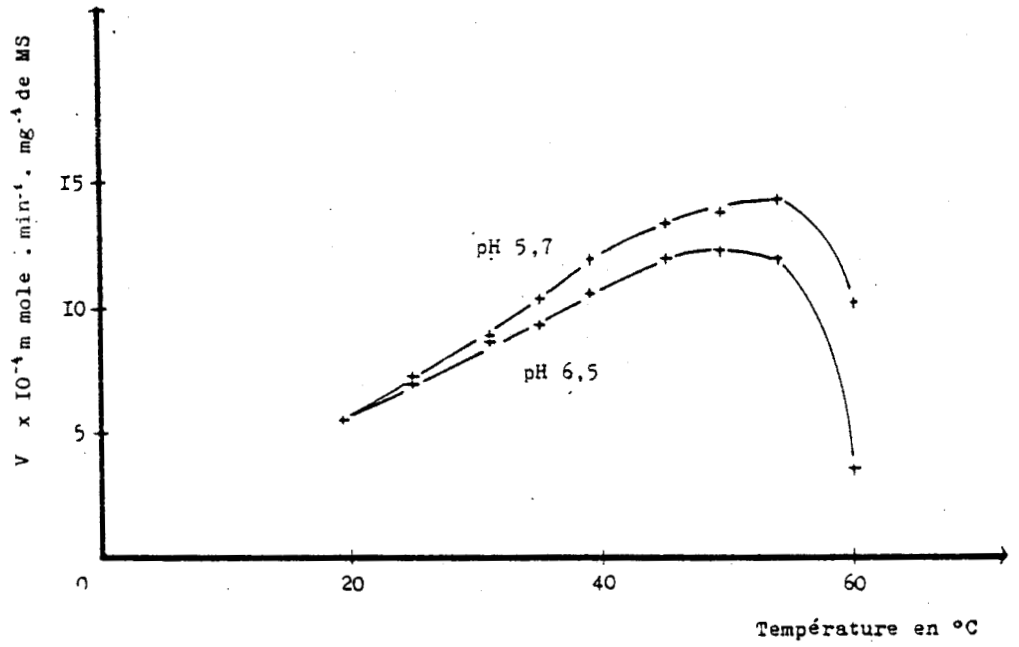


figure 30 : vitesse d'hydrolyse du lactose par les cellules lyophilisées non incluses, en fonction de la température.

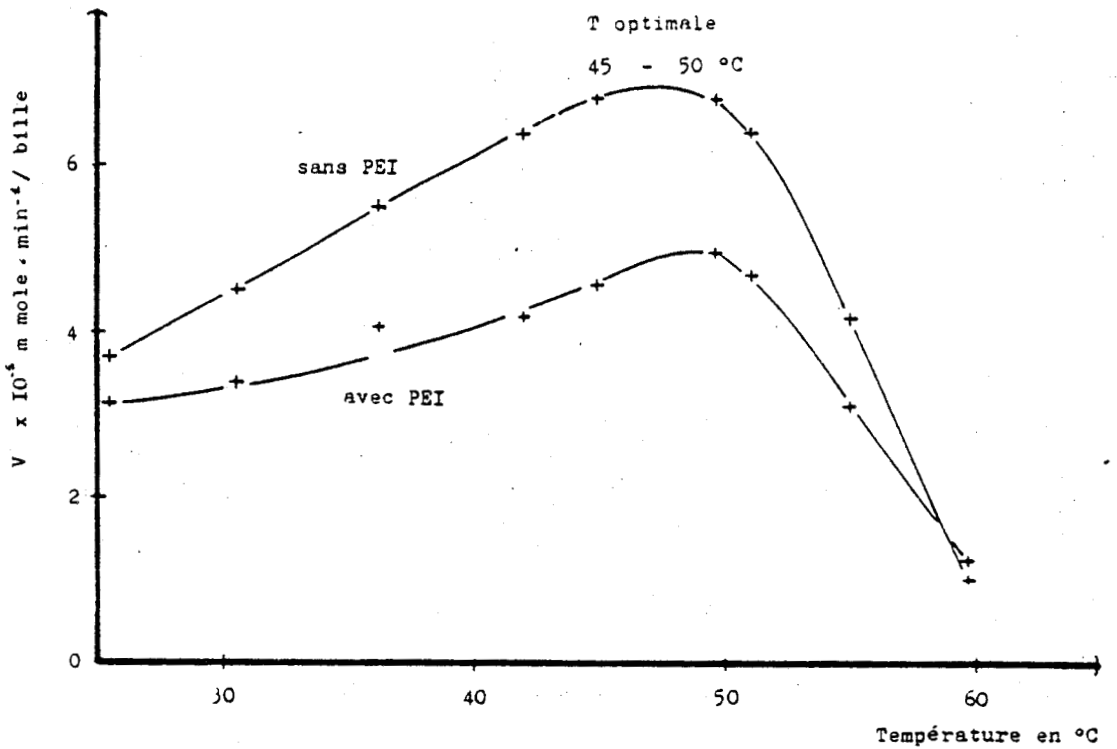


figure 31 : vitesse d'hydrolyse du lactose par les cellules lyophilisées incluses, en fonction de la température.

de son activité à 30 °C par rapport à l'activité lactasique à 50 °C (100 p. 100).

Les températures utilisées pour la détermination des paramètres cinétiques de la lactase seront de 54 °C pour les cellules lyophilisées non incluses et de 45 °C pour les cellules incluses.

IV PARAMETRE CINETIQUES

A - CINETIQUE DE CONCENTRATION EN ENZYME

1) Cellules lyophilisées non incluses

L'activité lactasique est proportionnelle à la concentration en matière sèche du milieu réactionnel comprise entre 0 et 0,15 mg pour 1,1 ml de milieu (figure 32 p. 143)

2) Cellules lyophilisées incluses

Les résultats sont présentés dans la figure 33 p. 143 , sous la forme de courbes de l'activité lactasique en fonction du nombre de billes introduites dans le milieu réactionnel.

L'activité de la lactase des cellules lyophilisées incluses, présente des courbes linéaires jusqu'à cinq billes pour celles qui ne sont pas enrobées et jusqu'à quatre billes pour celles qui sont enrobées par le PEI.

B - CINETIQUE EN FONCTION DU TEMPS

1) Cellules lyophilisées non incluses

Les résultats sont présentés dans la figure 34 p. 144 .

L'activité lactasique est proportionnelle au temps d'hydrolyse dans une zone allant de 0 à 60 minutes.

2) Cellules lyophilisées incluses

Les résultats sont rassemblés dans la figure 35 p. 144 .

L'hydrolyse du lactose par les cellules lyophilisées incluses est proportionnelle dans des intervalles de temps compris entre 0 et 120 minutes pour les billes non enrobées et entre 0 et 90 minutes pour les billes enrobées par le PEI.

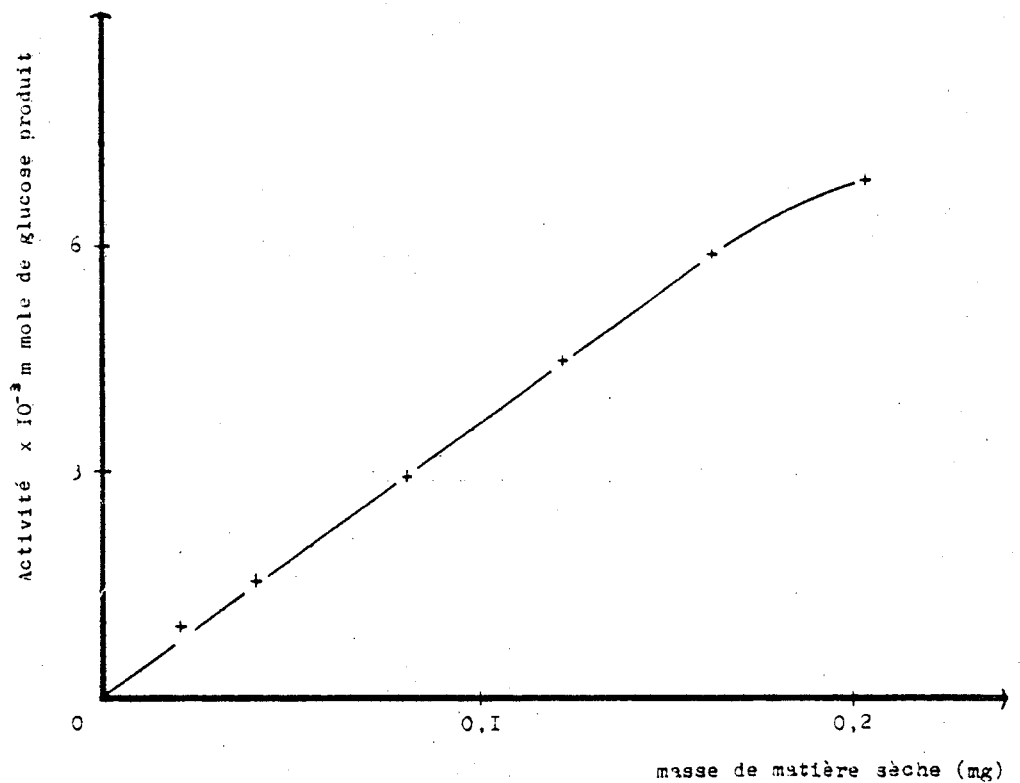


figure 32 : activité de la lactase des cellules lyophilisées en fonction de la masse de cellules exprimée en mg de matière sèche (MS).

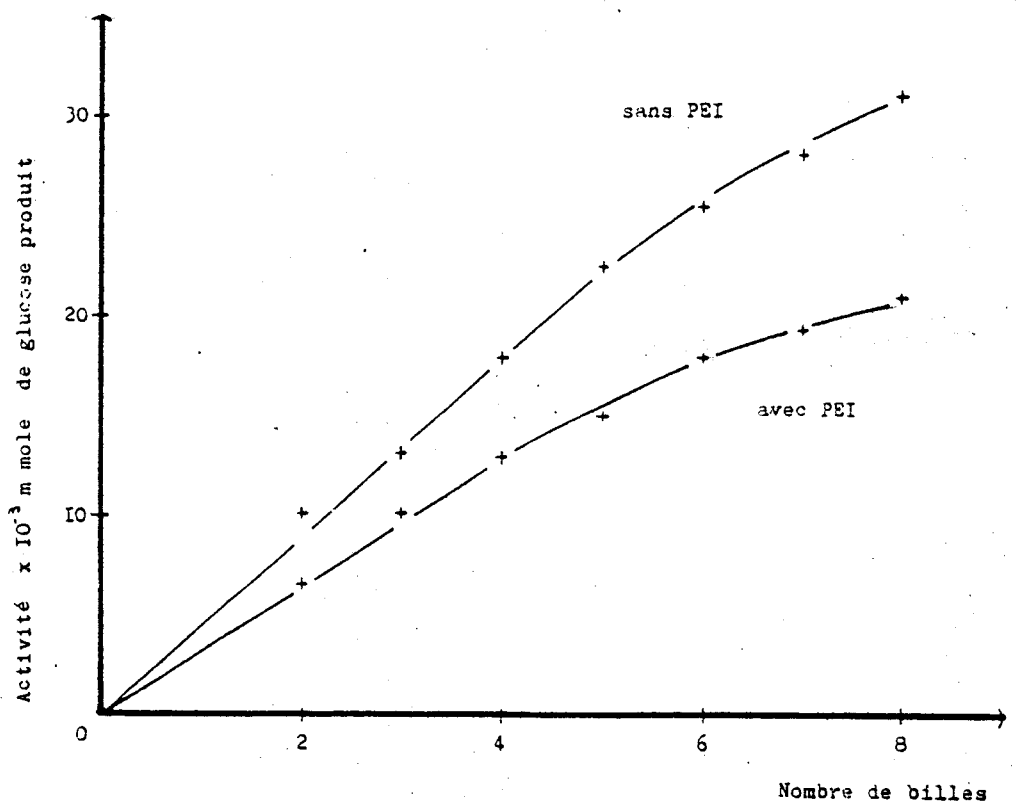


figure 33 : activité de la lactase des cellules lyophilisées incluses dans des billes d'alginate en fonction du nombre de billes présentes dans le milieu réactionnel.

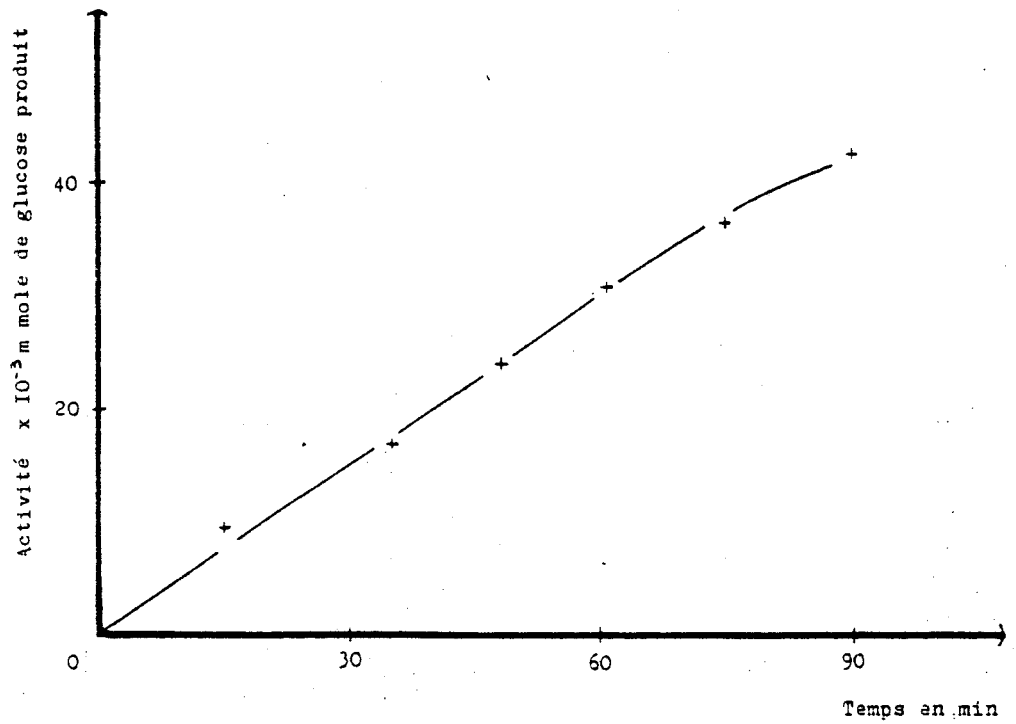


figure 34 : activité de la lactase des cellules lyophilisées non incluses, en fonction du temps d'incubation.

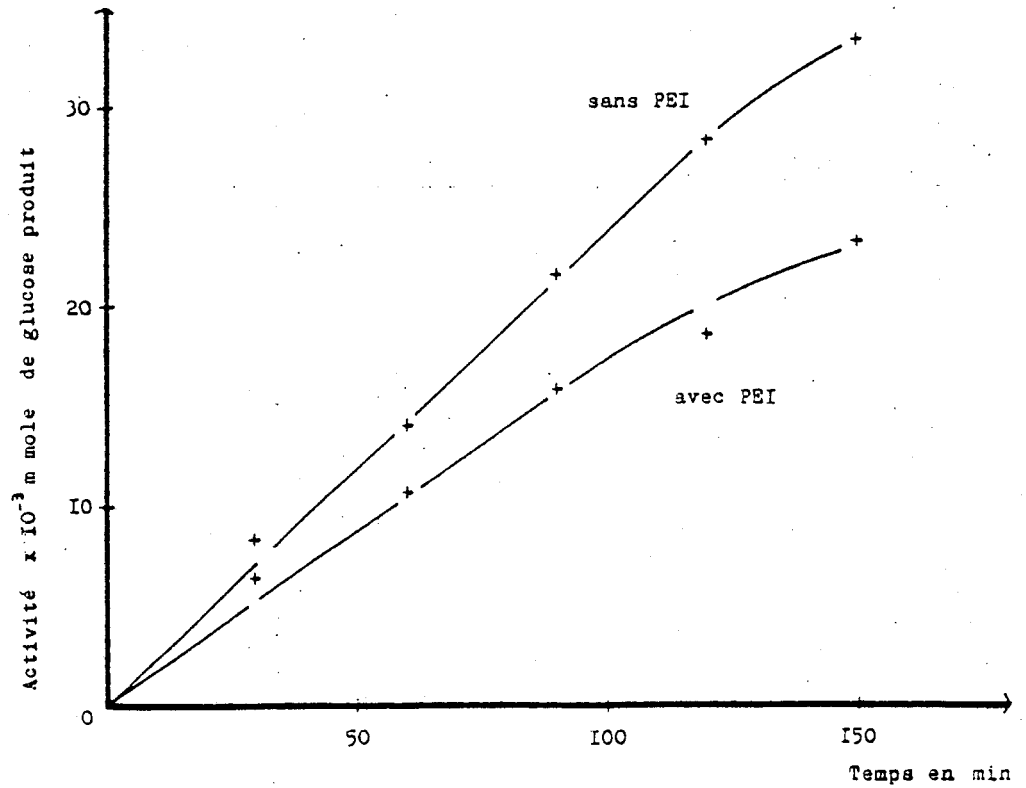


figure 35 : activité de la lactase des cellules lyophilisées incluses, en fonction du temps d'incubation.

C - ACTION DES EFFECTEURS

Les résultats sont présentés dans le tableau XXV p. 146.

L'activité enzymatique des cellules lyophilisées incluses est fortement activée par le magnésium, le cobalt et le manganèse. Il faut remarquer également que le calcium augmente très légèrement l'activité de la lactase.

Elle est fortement inhibée par l'étain, le cuivre, le fer ferrique, le zinc, le mercure, l'EDTA, l'eau oxygénée et l'eau de javel. Une légère inhibition par le glucose est à noter et le galactose ne modifie pas l'activité de l'enzyme. La lactase n'est pas inhibée par un excès de substrat, car la courbe de l'inverse de la vitesse d'hydrolyse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat (figure 36 p. 147) ne présente pas de fléchissement (vers des vitesses d'hydrolyse plus faibles), à forte concentration en lactose.

D - DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS

1) Cellules lyophilisées non incluses

Les résultats sont illustrés par la figure 36 p. 147.

La lactase des cellules lyophilisées possède un K_m apparent de 25 mM (+ ou - 5 mM) lorsque les concentrations en lactose sont inférieures à 42 mM et un K_m apparent de 78 mM (+ ou - 13 mM) pour des concentrations en lactose supérieures à 42 mM.

La rupture de pente observée peut s'expliquer soit par la présence de deux formes enzymatiques différentes, soit par l'existence d'une enzyme présentant deux cinétiques différentes vis-à-vis du lactose, soit encore par une enzyme qui ne fonctionne que sous la forme d'un complexe enzyme-métal activateur, le métal étant déjà présent au niveau des cellules.

Tableau XXV :

Action des effecteurs

effecteur	forme de l'effecteur	concentration dans le milieu réactionnel	pourcentage d'activité lactasique résiduelle
sans	-	-	100
Co ⁺⁺	CoCl ₂	1 mM	393
Mg ⁺⁺	MgCl ₂	"	383
Mn ⁺⁺	MnCl ₂	"	360
Fe ⁺⁺	FeSO ₄	"	145
Ca ⁺⁺	CaCl ₂	"	131
Li ⁺	LiCl	"	121
Zn ⁺⁺	ZnCl ₂	"	17
Cu ⁺⁺	CuCl ₂	"	4
Sn ⁺⁺	SnCl ₂	"	0
Fe ⁺⁺⁺	Fe ₂ (SO ₄) ₃	"	0
Hg ⁺⁺	HgCl ₂	"	0
EDTA	-	"	7,5
azide de sodium	-	0,02 p. 100	111
H ₂ O ₂	-	10 volumes	1,5
ClO ⁻	sel de sodium	3,4 °chloré	0
glucose	-	84 mM	70
galactose	-	"	115

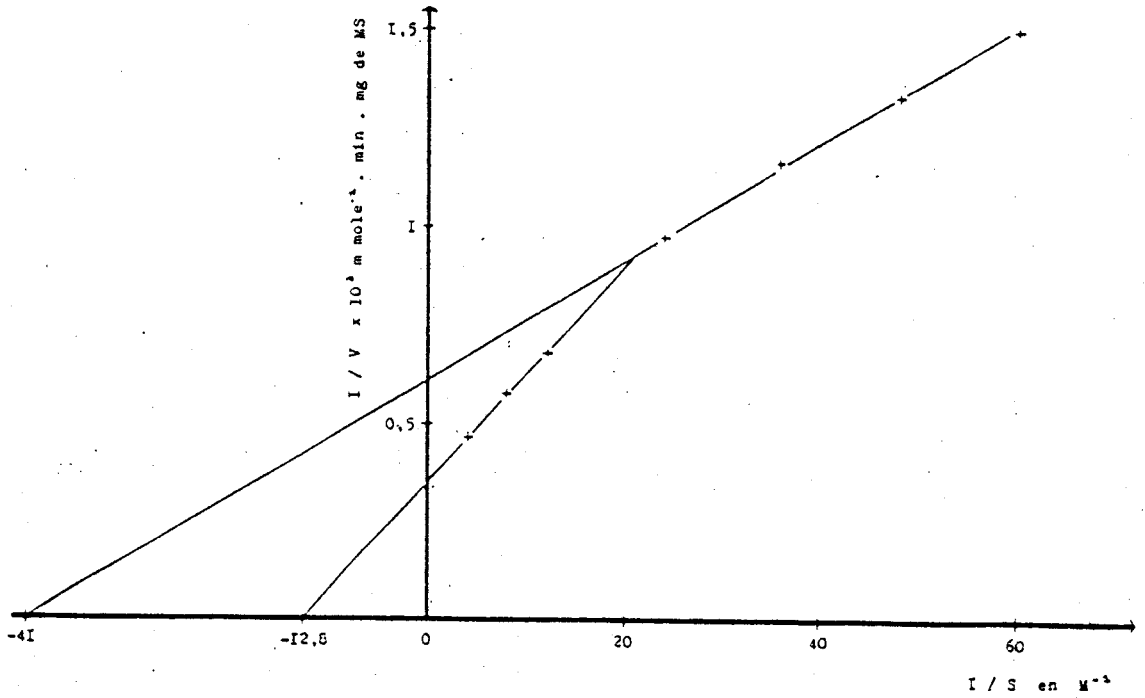


figure 36 : hydrolyse du lactose par les cellules lyophilisées non incluses, représentation de LINEWEAVER et BURCK (107) en fonction de l'inverse de la concentration en lactose.

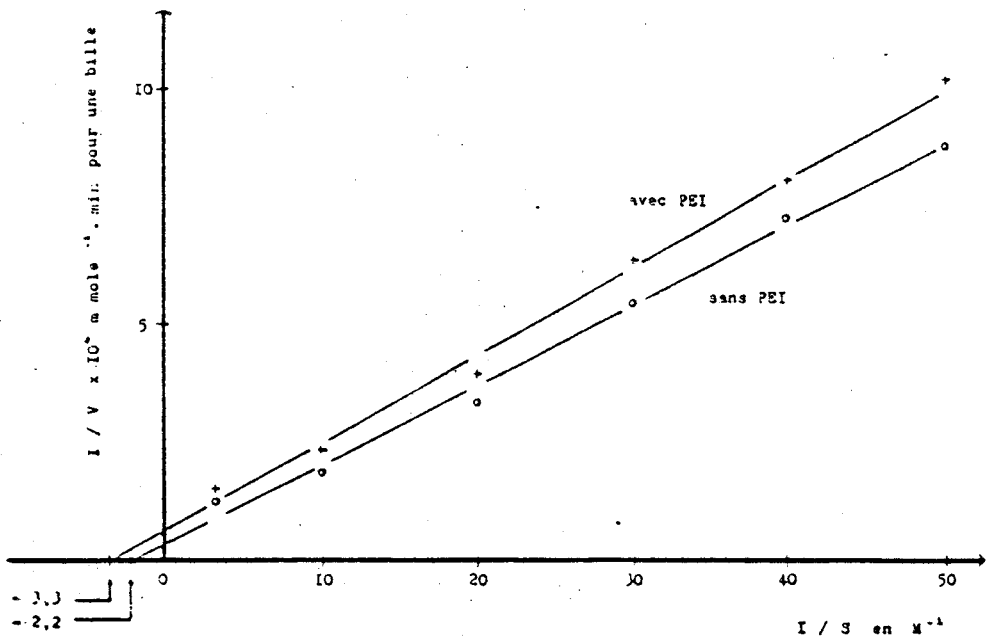


figure 37 : hydrolyse du lactose par les cellules lyophilisées incluses, représentation de LINEWEAVER et BURCK (107) en fonction de l'inverse de la concentration en lactose.

2) Cellules lyophilisées incluses

Les résultats sont présentés dans la figure 37 p.147 .

La lactase incluse répond à une cinétique michaelienne, les courbes sont linéaires et sans rupture de pente lorsque les billes sont placées dans un milieu à forte concentration en lactose.

La constante d'affinité de l'enzyme pour le lactose est de 300 mM (+ ou - 100 mM) pour la lactase des cellules lyophilisées incluses dans les billes d'alginate non enrobées et de 450 mM (+ ou - 200 mM) lorsque les billes sont enrobées par du PEI.

L'inclusion des cellules produit une perte d'affinité apparente de la lactase pour son substrat. Celle-ci s'explique par la différence de concentration en lactose entre le milieu d'incubation et l'intérieur des billes.

La diffusion du lactose vers l'intérieur des billes est ralentie par la matrice d'alginate de calcium et également par l'enveloppe de PEI. La concentration en lactose est plus faible à l'intérieur des billes que dans le milieu d'incubation, ce qui explique les valeurs élevées des K_m apparents de la lactase des cellules lyophilisées incluses. Mais aussi le fait que les courbes de l'inverse de la vitesse d'hydrolyse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat soient linéaires et sans rupture de pente, car la concentration en lactose à l'intérieur des billes est toujours trop faible pour que l'on puisse mettre en évidence la rupture de pente de la courbe observée à forte concentration en lactose, constatée lors de l'étude des cellules lyophilisées non incluses.

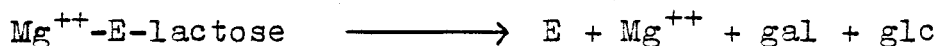
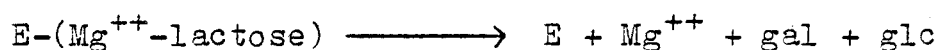
E - ETUDE DE L'ACTIVATION DE LA LACTASE PAR LE
MAGNESIUM

1) Cellules lyophilisées non incluses

Lors de la détermination de la constante de Michaelis, nous avons remarqué que la courbe de l'inverse de la vitesse d'hydrolyse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat possédait deux pentes. Des hypothèses ont été formulées, cette rupture de pente de la courbe est due, soit à l'existence de deux lactases, soit à la possibilité pour l'enzyme de réagir différemment vis-à-vis du lactose (deux sites actifs différents) soit que l'enzyme n'hydrolyse le lactose que sous la forme d'un complexe enzyme - métal activateur, le métal étant présent au niveau des cellules.

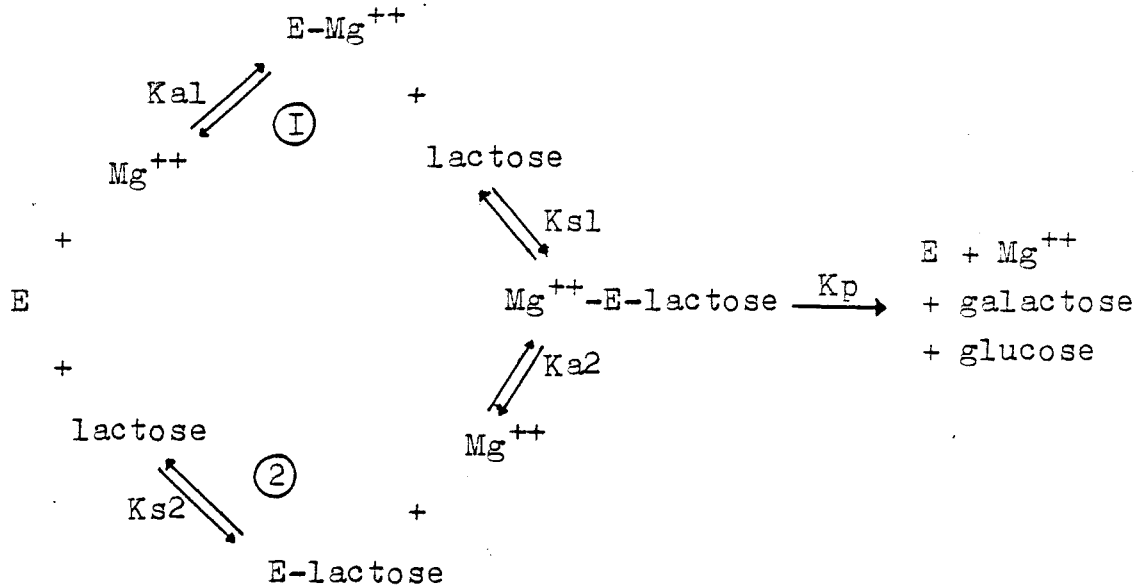
L'étude de l'activation par le magnésium va permettre de nous donner quelques éclaircissements à ce sujet.

Si nous considérons que la lactase n'hydrolyse le lactose que sous la forme d'un complexe enzyme-magnésium, comme le montre les schémas suivant :



Dans le premier cas, le substrat se fixe au métal activateur, mais ceci aurait pour conséquence d'épuiser le magnésium du milieu lorsque la concentration en lactose est élevée dans le milieu réactionnel. Par conséquent, la vitesse d'hydrolyse serait plus faible lorsque les concentrations en substrat seraient plus fortes, or c'est le phénomène inverse qui est observé dans la figure 36 p. 147.

Dans le second cas, le substrat se fixe sur le complexe enzyme-métal. Si cette dernière hypothèse est vérifiée, le système enzymatique est du type bi-bi aléatoire représenté dans le schéma suivant :



$$Ks2 = Ks1 \quad \text{et} \quad Ka2 = Ka1$$

Ce système justifierait la rupture de pente observée au niveau de la courbe de la représentation de Line-weaver et Burck (figure 36 p. 147).

A faible concentration en substrat, la voie réactionnelle $\textcircled{1}$ serait prédominante, le magnésium se comportant comme un activateur vrai.

A forte concentration en substrat, les voies $\textcircled{1}$ et $\textcircled{2}$ participeraient à la formation du complexe ternaire enzyme-métal-substrat.

La figure 38 p. 151, représente l'inverse de la vitesse d'hydrolyse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat pour différentes concentrations en magnésium, montre que la lactase hydrolyse plus rapidement le lactose à forte concentration (supérieure à 42 mM).

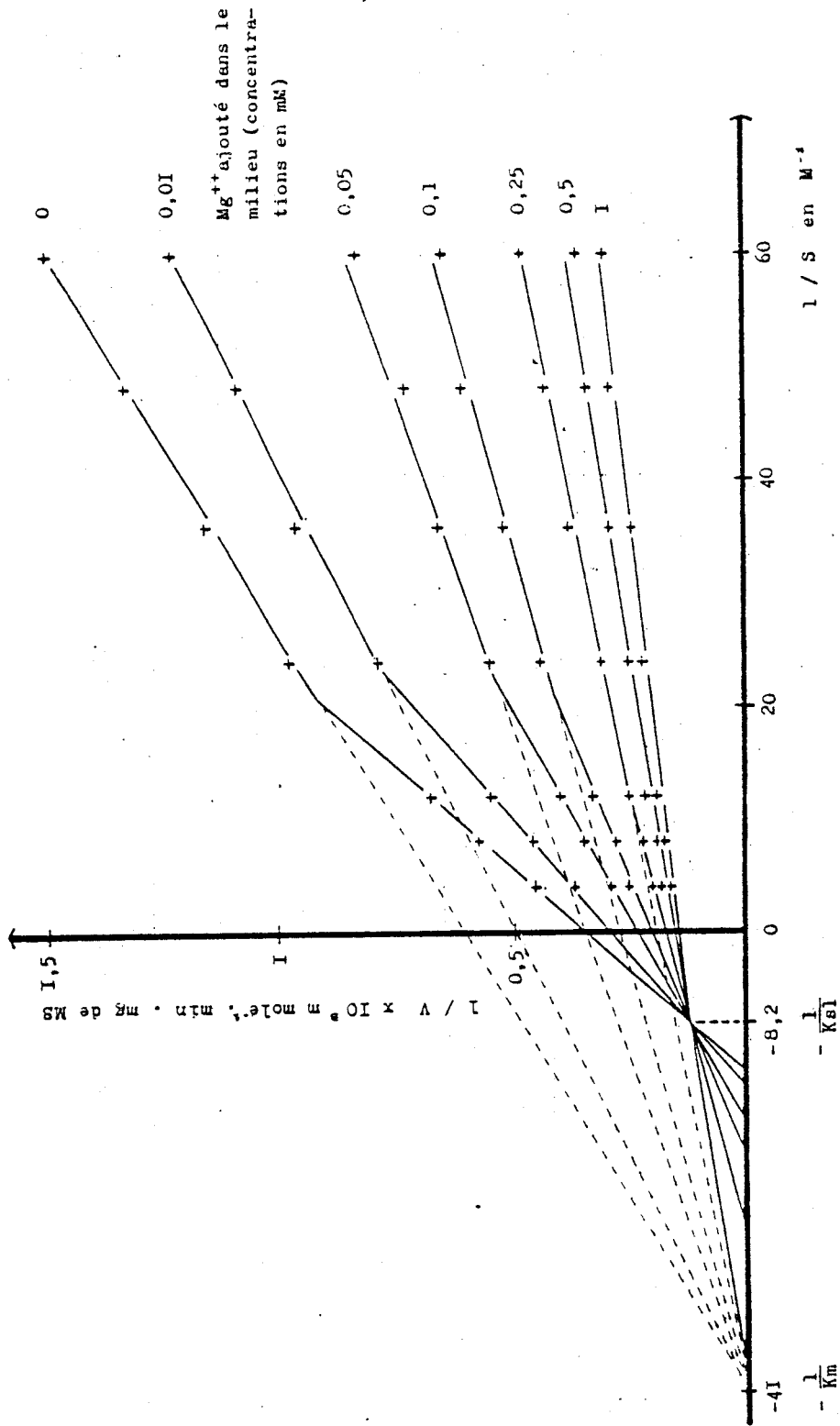


figure 38 : activation, par le magnésium, de la lactase des cellules lyophilisées non incluses, représentation de LINEWEAVER et BURCK (107) en fonction de l'inverse de la concentration en lactose.

Mais lorsque la concentration en magnésium est importante (supérieure ou égale à 0,5 mM), il n'y a pas de rupture de pente de la droite quelque soit la concentration en substrat.

La figure 39 p. 153 représente la vitesse d'hydrolyse du lactose en fonction de la concentration en magnésium et nous montre que la vitesse d'hydrolyse n'est pas nulle lorsque la concentration en magnésium l'est. Or, en présence d'EGTA (figure 40 p. 153), la vitesse d'hydrolyse est nulle.

Il apparaît donc, que les cellules possèdent une quantité intrinsèque de magnésium que l'on peut déterminer de la manière suivante :

Si l'on considère le magnésium comme un substrat agissant selon une cinétique michaélienne, la vitesse d'hydrolyse du lactose en fonction de la concentration réelle en magnésium est de type :

$$v = \frac{V_m \cdot x}{K + x}$$

x étant la concentration réelle en magnésium et est égale à $z + \epsilon$. z est la concentration en magnésium rajouté dans le milieu réactionnel et ϵ la concentration intrinsèque en magnésium. La vitesse d'hydrolyse peut donc s'exprimer de cette manière :

$$v = \frac{V_m \cdot (z + \epsilon)}{K + (z + \epsilon)}$$

La fonction inverse :

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V_m} \cdot \frac{1}{z + \epsilon} + \frac{1}{V_m}$$

est linéaire.

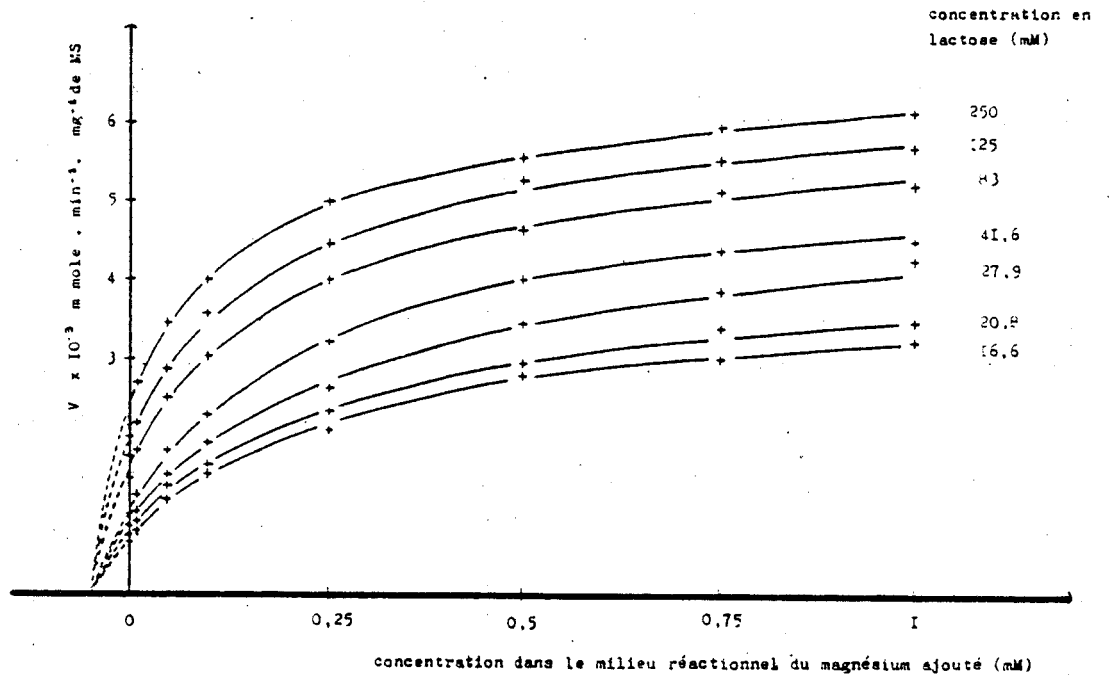


figure 39 : vitesse d'hydrolyse du lactose par les cellules lyophilisées non incluses en fonction de la concentration en magnésium ajouté dans le milieu.

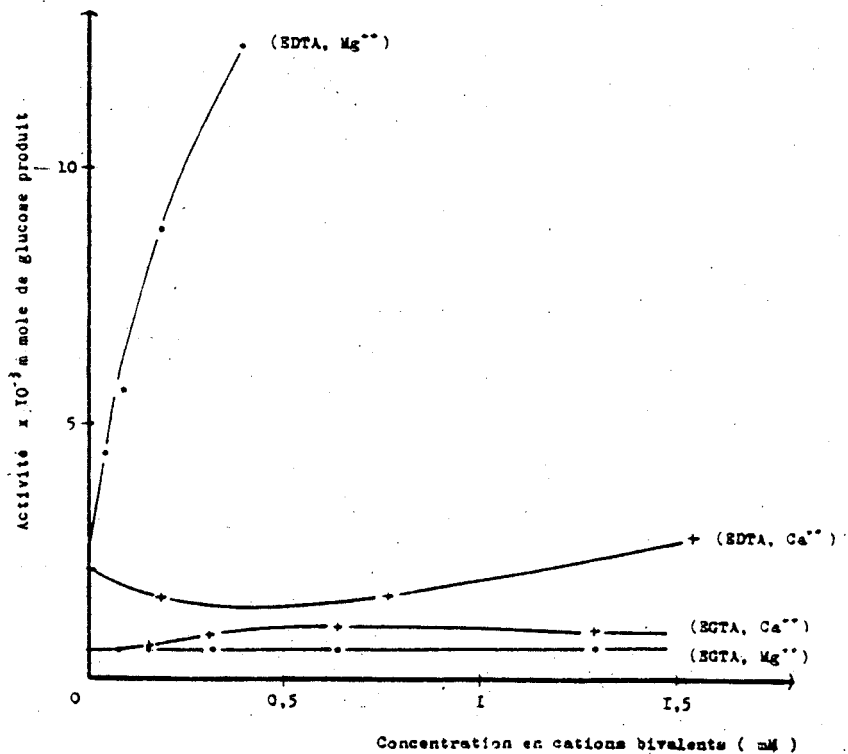
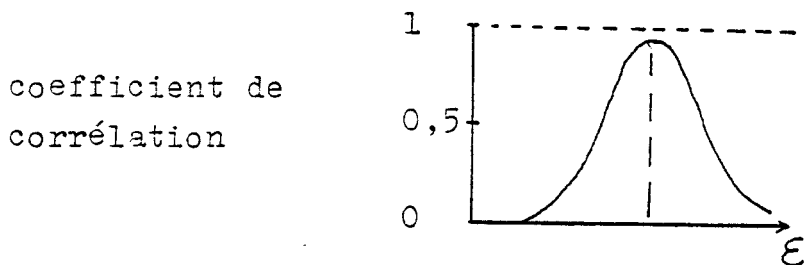


figure 40 : activité de la lactase des cellules lyophilisées (non incluses) traitées par l'EDTA et l'EGTA en fonction de la concentration en calcium et en magnésium ajouté dans le milieu.

Si nous traçons la courbe du coefficient de corrélation de la droite obtenue à partir des points expérimentaux de la courbe $\frac{1}{V}$ en fonction de l'inverse de $(z + \epsilon)$, et ceci en fonction de ϵ , nous obtenons une courbe de forme gaussienne comme le montre le schéma ci-dessous :



Le maximum du coefficient de corrélation correspond à une valeur de ϵ qui est la concentration intrinsèque en magnésium des cellules.

La valeur moyenne de ϵ obtenue à partir des courbes correspondant aux différentes concentrations en lactose est de 0,040 mM (+ ou - 0,003 mM).

La concentration réelle en magnésium est obtenue en faisant la somme de la concentration en magnésium ajoutée dans le milieu réactionnel et de la concentration intrinsèque en magnésium.

Remarque : dans cette étude, les coefficients de corrélation des droites sont calculés de la manière suivante :

$$R = m \cdot \frac{\sigma X}{\sigma Y}$$

ou m est la pente de la droite statistique, σX est l'écart type des valeurs de $\frac{1}{z+\epsilon}$ et σY est l'écart type des valeurs de $\frac{1}{V}$.

a) Activation de la lactase, par le magnésium, dans un milieu à faible concentration en substrat

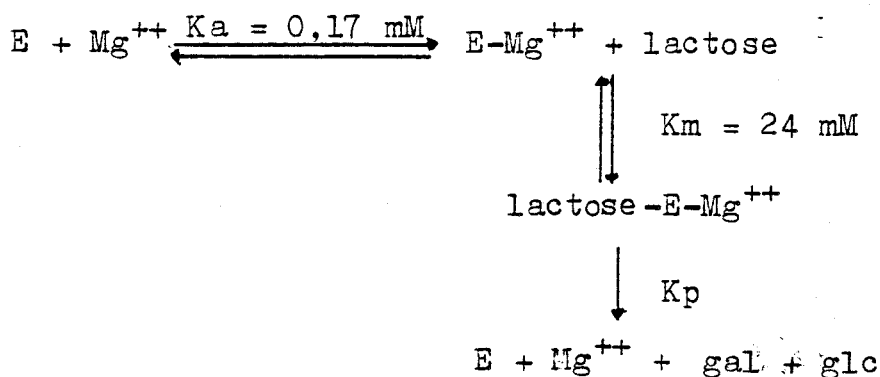
La concentration en lactose étant inférieure ou égale à 42 mM.

La constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat à faible concentration est : $K_m = 24 \text{ mM}$ (+ ou - 8 mM) (figure 38 p.151) et ne varie pas pour des concentrations en magnésium ajouté comprises entre 0 et 0,5 mM.

La représentation de l'inverse de la vitesse d'hydrolyse en fonction de l'inverse de la concentration réelle en Mg^{++} (figure 41 p.156) permet de déterminer, pour de faibles concentrations en lactose (inférieures ou égales à 42 mM), la constante de dissociation du complexe enzyme-magnésium : K_a est égale à 0,17 mM (+ ou - 0,03 mM) lorsque la concentration en substrat est nulle.

Dans ce cas précis, le magnésium se comporte comme un activateur vrai de la lactase, c'est à dire qu'à l'intérieur des zones de concentrations citées, l'enzyme garde la même affinité pour son substrat et la même constante de dissociation du complexe enzyme-magnésium.

La lactase est beaucoup plus affine pour le magnésium que pour le lactose et ne fonctionne pas en absence de magnésium. L'enzyme va donc fixer le magnésium, puis le substrat pour former un complexe ternaire selon le schéma représenté ci-dessous :



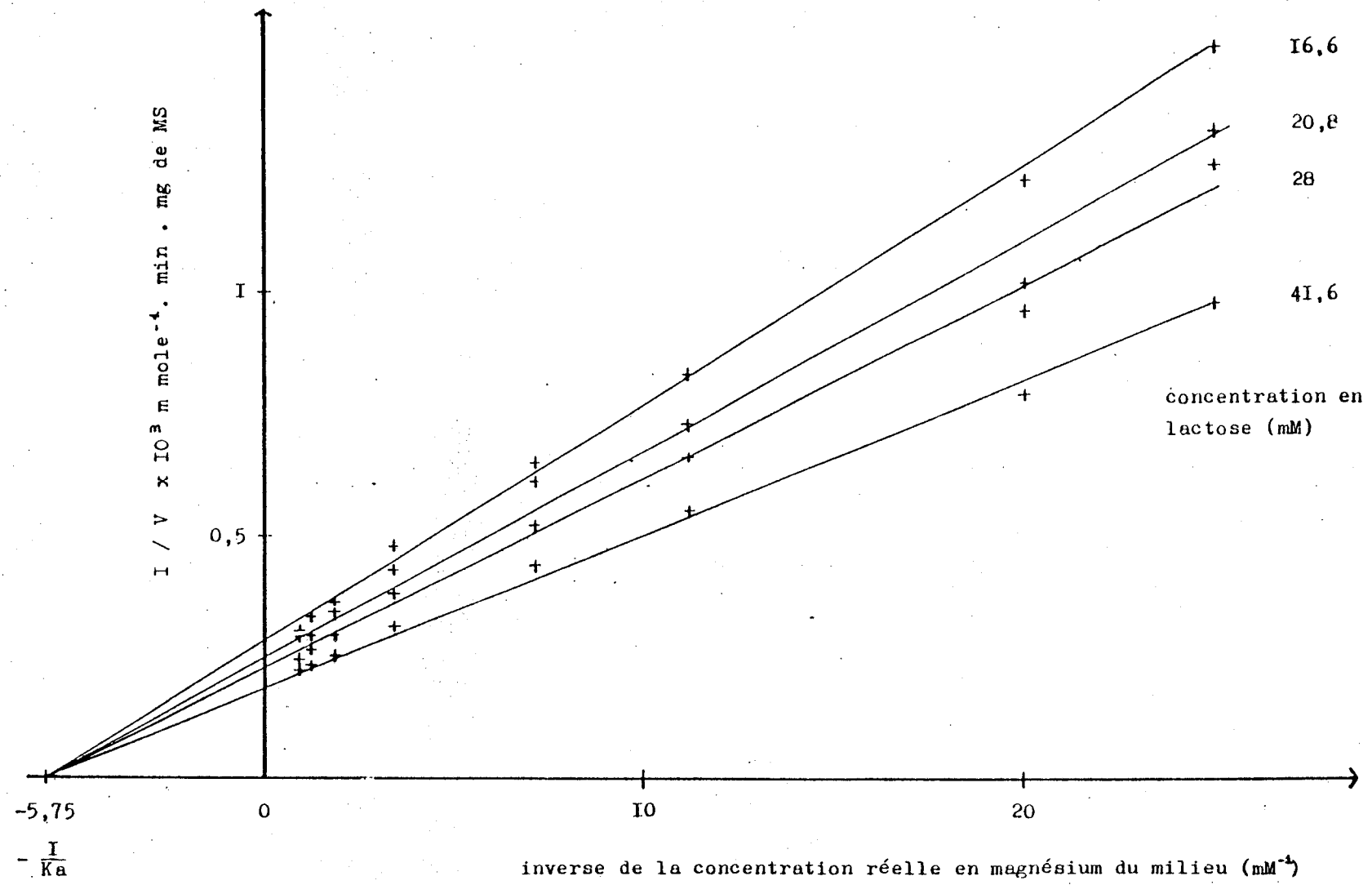


figure 41 : activation, par le magnésium, de la lactase des cellules lyophilisées non incluses, représentation de LINEWEAVER et BURCK (107) en fonction de l'inverse de la concentration réelle en magnésium (pour des concentrations en lactose inférieures à 42 mM).

b) Activation de la lactase par le magnésium dans un milieu à forte concentration en substrat

Lorsque l'on examine le fonctionnement de l'enzyme dans un milieu à forte concentration en lactose (supérieure ou égale à 42 mM), les courbes tracées permettent d'obtenir les valeurs de quatre constantes de dissociation :

$$- K_{s1} = \frac{(E) \cdot (\text{lactose})}{(E-\text{lactose})} = 120 \text{ mM } (\pm 30 \text{ mM})$$

lorsque la concentration réelle en magnésium est nulle (figure 38 p.151)

$$- K_{s2} = \frac{(E-Mg^{++}) \cdot (\text{lactose})}{(Mg^{++}-E-\text{lactose})} = 11,5 \text{ mM } (\pm 0,5 \text{ mM})$$

lorsque l'enzyme est saturée en magnésium (figure 44 p.159)

$$- K_{a1} = \frac{(E) \cdot (Mg^{++})}{(E-Mg^{++})} = 0,7 \text{ mM } (\pm 0,3 \text{ mM})$$

lorsque la concentration en substrat est nulle (figure 42 p.158)

$$- K_{a2} = \frac{(E-\text{lactose}) \cdot (Mg^{++})}{(Mg^{++}-E-\text{lactose})} = 0,055 \text{ mM } (\pm 0,003 \text{ mM})$$

lorsque l'enzyme est saturée en substrat (figure 43 p.159)

$$\text{Le rapport} \quad : \quad \frac{K_{s2}}{K_{s1}} * \frac{K_{a2}}{K_{a1}} \\ 0,09 * 0,08$$

Il apparaît donc qu'en présence de fortes concentrations en substrat, l'enzyme se comporte vis-à-vis du lactose et du magnésium, comme dans un système bi-bi aléatoire où les "substrats" s'associent au hasard avec l'enzyme et où le fonctionnement de celle-ci est subordonné à la formation d'un complexe ternaire magnésium-enzyme-substrat.

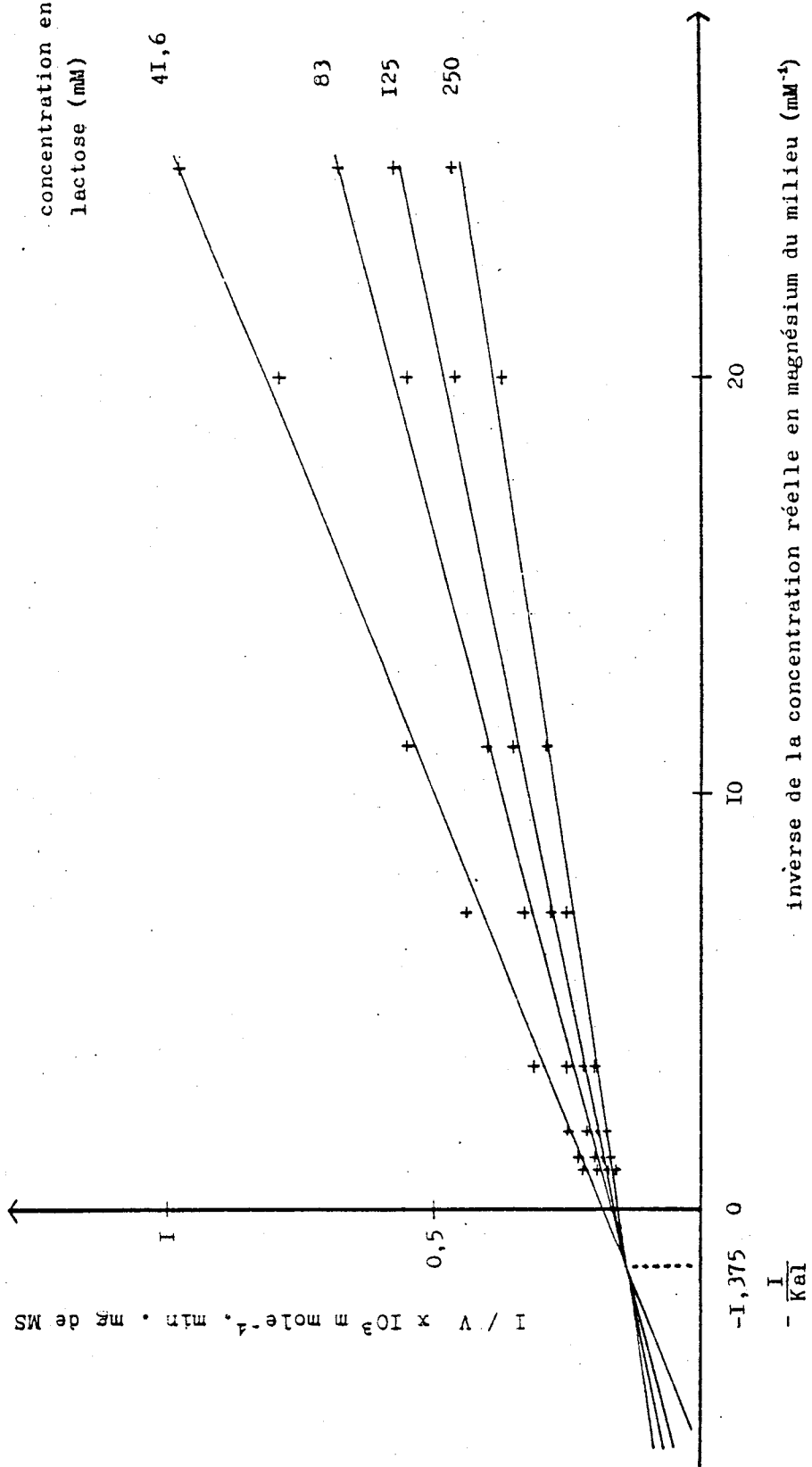


figure 42 : activation, par le magnésium, de la lactase des cellules lyophilisées non incluses, représentation de LINEWEAVER et BURCK (107) en fonction de l'inverse de la concentration réelle en magnésium (pour des concentrations en lactose supérieures à 42 mM).

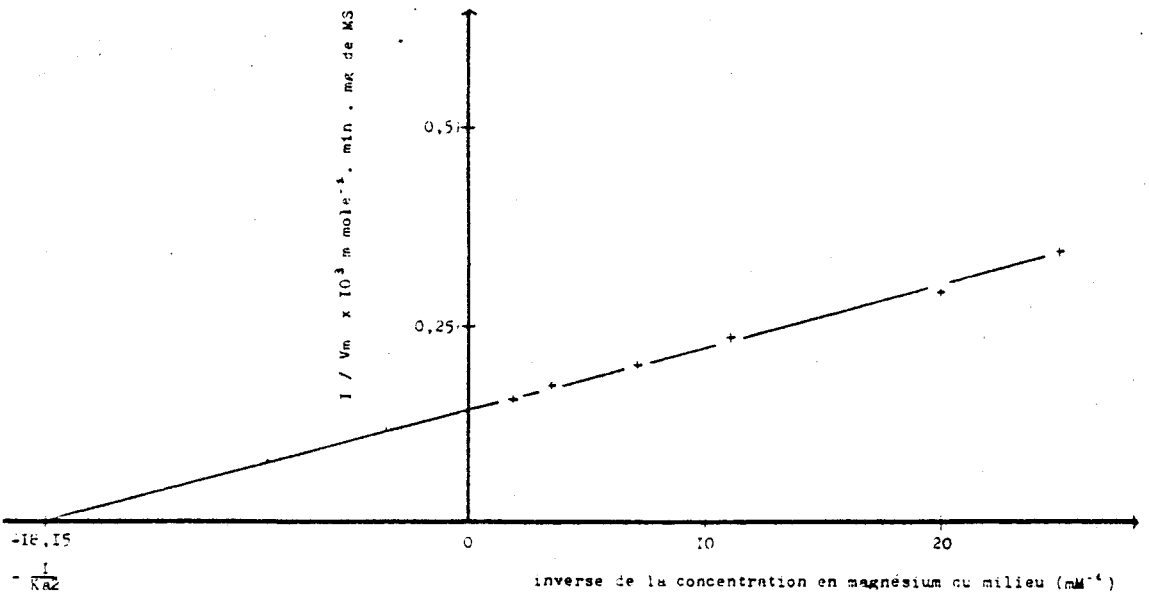


figure 43 : inverse de la vitesse maximale d'hydrolyse du lactose par la lactase des cellules lyophilisées non incluses, saturée en substrat, en fonction de l'inverse de la concentration réelle en magnésium.

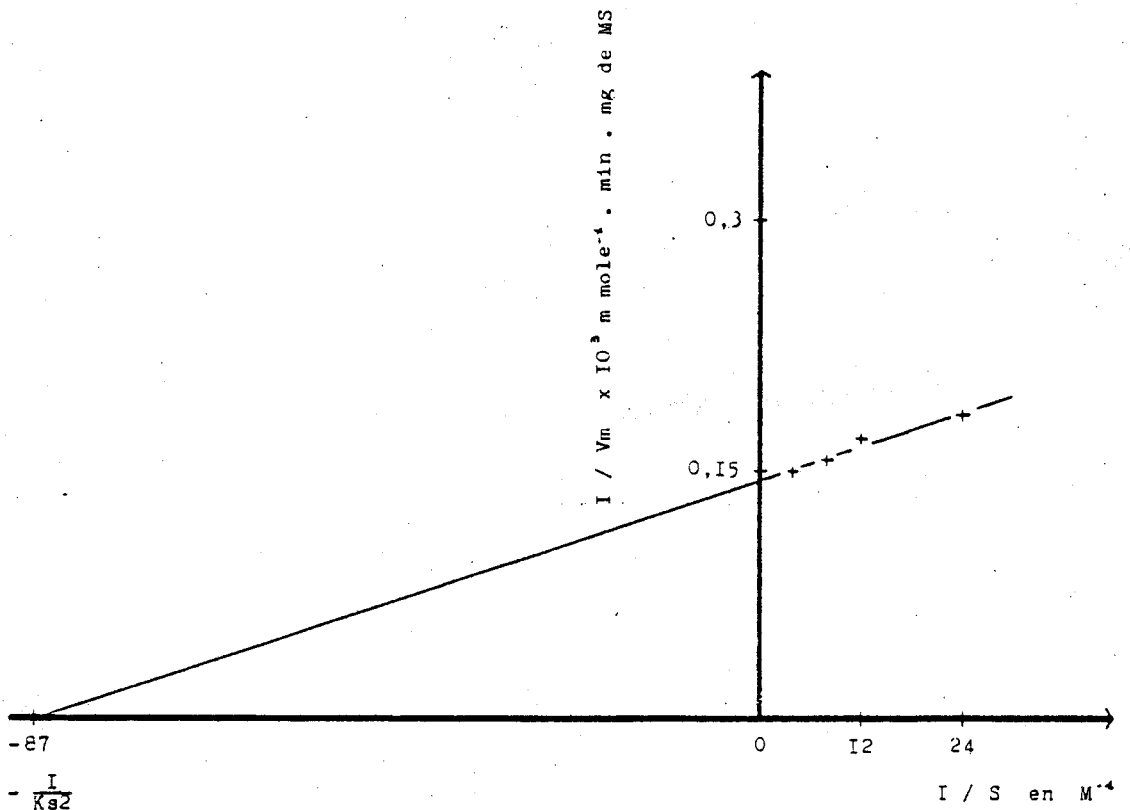


figure 44 : inverse de la vitesse maximale d'hydrolyse du lactose par la lactase des cellules lyophilisées non incluses, saturée en magnésium, en fonction de l'inverse de la concentration en lactose (supérieure à 42 mM).

c) Conclusion

Lorsque la concentration en lactose est faible, la lactase fixe le magnésium puis le lactose. Pour des fortes concentrations en lactose, une partie du "pool" enzymatique va fixer le substrat puis le magnésium, déplaçant ainsi l'équilibre réactionnel de la fixation du magnésium sur l'enzyme libre.

Cependant la présence de deux formes enzymatiques dans le milieu n'est pas une hypothèse à exclure totalement, car la courbe de l'activité en fonction du pH présente deux optimums bien distincts, mais les constantes d'affinité mesurées pour le substrat et le magnésium sont respectivement du même ordre dans tous les cas.

2) Cellules lyophilisées incluses

Nous avons tenté de deux manières différentes d'activer, par le magnésium, la lactase des cellules lyophilisées incluses.

La première a été d'injecter, dans un réacteur contenant des cellules lyophilisées incluses dans l'alginate et qui ont perdu 30 p. 100 de leur activité lors d'une hydrolyse en continu de lactosérum, deux volumes de réacteur d'une solution de chlorure de magnésium 0,1 M et 1 M, à température du laboratoire. Dans ce cas, nous n'avons pas observé d'augmentation du taux de conversion ni d'augmentation de la durée de vie du réacteur.

La deuxième a été de préparer des billes d'alginate par goutte à goutte dans une solution de CaCl_2 0,5 M et de MgCl_2 1 M, et de réaliser ensuite une hydrolyse en continu d'une solution tamponnée de lactose (figure 45 p.161).

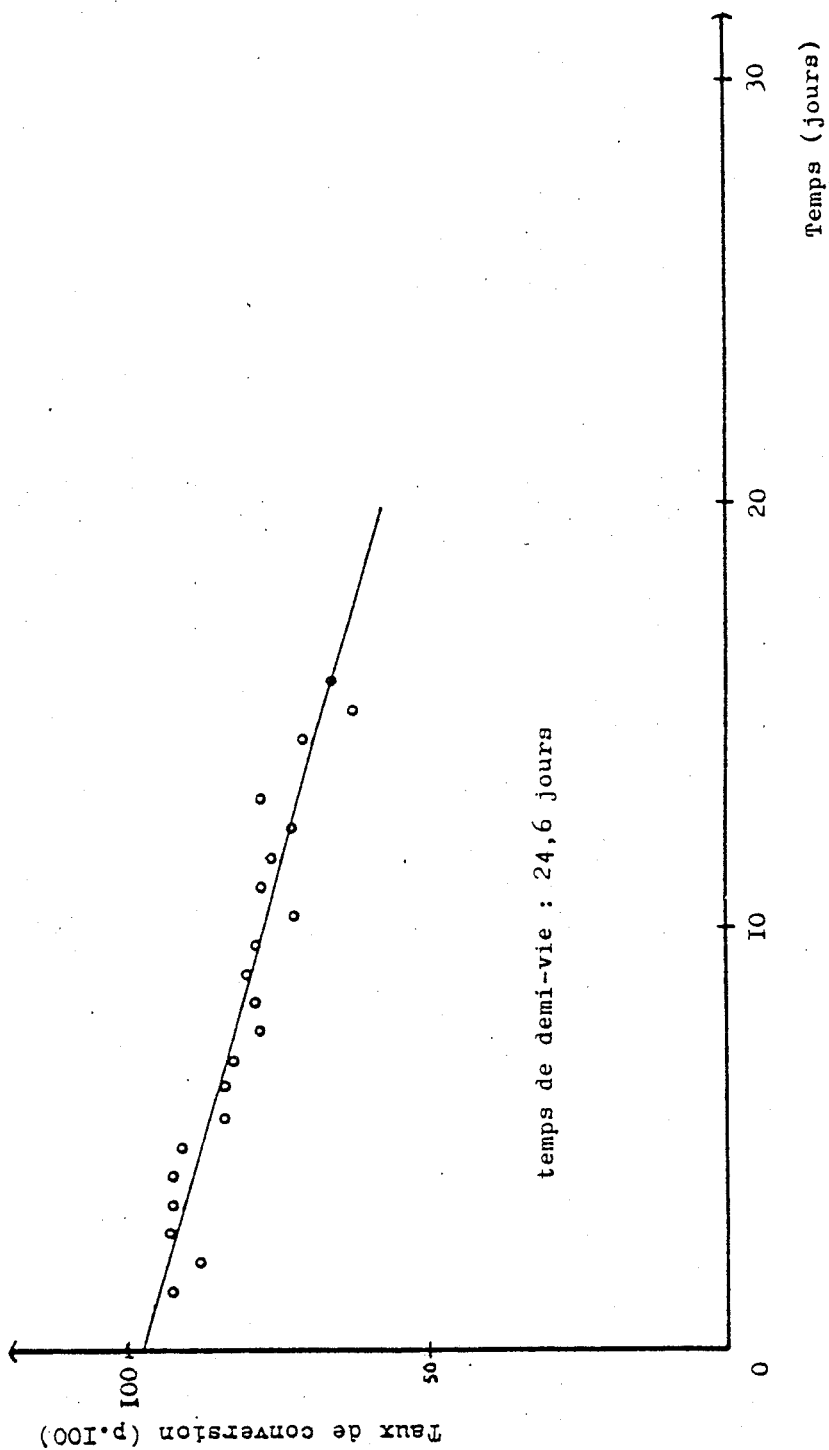


figure 45 : hydrolyse en continu, à 45 °C, d'une solution de lactose (4,5 p. 100), tamponnée à pH 6, par des billes préparées à l'aide d'une solution de CaCl_2 0,5 M et de MgCl_2 1 M, enrobées par du PEI (1 p. 100).

Dans ce dernier cas, le temps de demi-vie du réacteur n'augmente pas par rapport au temps de demi-vie d'un réacteur contenant des billes d'alginate préparées goutte à goutte dans une solution de CaCl_2 0,5 M (figure 47 B p. 166).

La figure 40 p.153 représente l'activité de la lactase des cellules lyophilisées inhibées par l'EDTA ou l'EGTA à concentration constante en fonction de la concentration en magnésium ou en calcium ajoutée dans le milieu.

Il est à noter que le magnésium active fortement la lactase et que le calcium provoque une très légère augmentation de l'activité. Il semblerait donc que le calcium soit capable de se placer au niveau du site de fixation du magnésium.

Dans les billes d'alginate, le calcium se trouve à forte concentration et est donc capable de masquer le site de fixation du magnésium. Ce fait est compréhensible dans la mesure où la structure électronique de la couche externe de l'ion calcium est identique à celle du magnésium, mais le volume de l'ion calcium est plus important que celui de l'ion magnésium.

V HYDROLYSE EN CONTINU DU LACTOSE

Ces expérimentations ont été réalisées en réacteur à lit fixe de petite dimension (volume maximum : 7 ml).

Le taux de conversion est exprimé en pourcentage d'hydrolyse du lactose.

A - HYDROLYSE EN FONCTION DU DEBIT

les résultats sont présentés dans la figure 46 p.165 , et sont exprimés sous la forme d'une courbe du logarithme du taux de conversion en fonction du débit.

Les dimensions du réacteur utilisé sont : 6,5 cm de hauteur et 0,9 cm de diamètre.

L'hydrolyse du lactose est totale jusqu'à des débits de 15 cm.h⁻¹ et à un débit de 60 cm.h⁻¹ le taux de conversion est de 50 p. 100. Pour des débits supérieurs à 110 cm.h⁻¹ , le taux de conversion chute brutalement.

B - ROLE DU POLYETHYLENIMINE AU NIVEAU DE LA DUREE DE VIE DU REACTEUR

Les résultats sont regroupés dans la figure 47 p.166 .

Le temps de demi-vie du réacteur est le temps a la suite duquel, le réacteur a perdu 50 p. 100 de son activité.

Les temps de demi-vie des réacteurs sont de 13,3 jours pour les billes d'alginate non enrobées et de 24 jours pour les billes d'alginate enrobées par du PEI, quel que soit la concentration de la solution de polymère basique utilisée lors de l'enrobage (pour un temps de contact de 10 min).

L'enrobage des billes par le PEI permet d'augmenter le temps de demi-vie du réacteur de 10 jours.

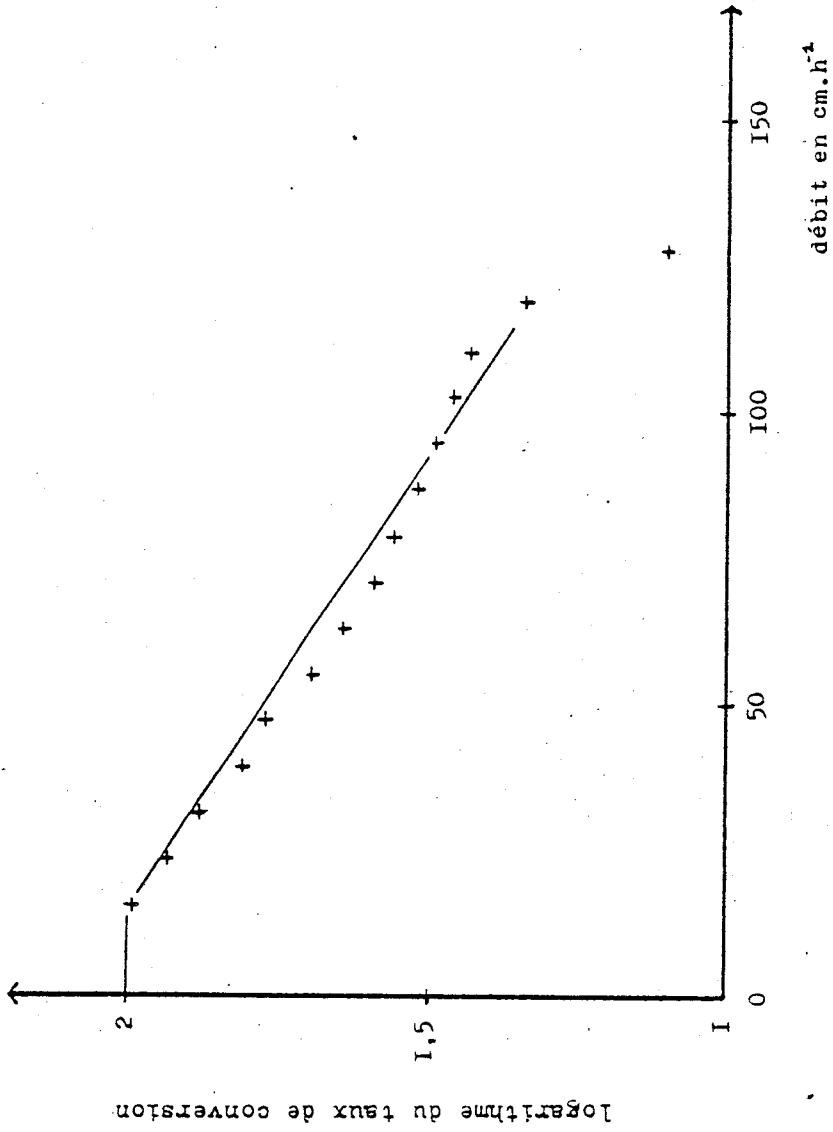


figure 46 : logarithme du taux de conversion du lactose en fonction du débit de percolation à travers un réacteur contenant des cellules lyophilisées incluses dans des billes d'alginate non enrobées.

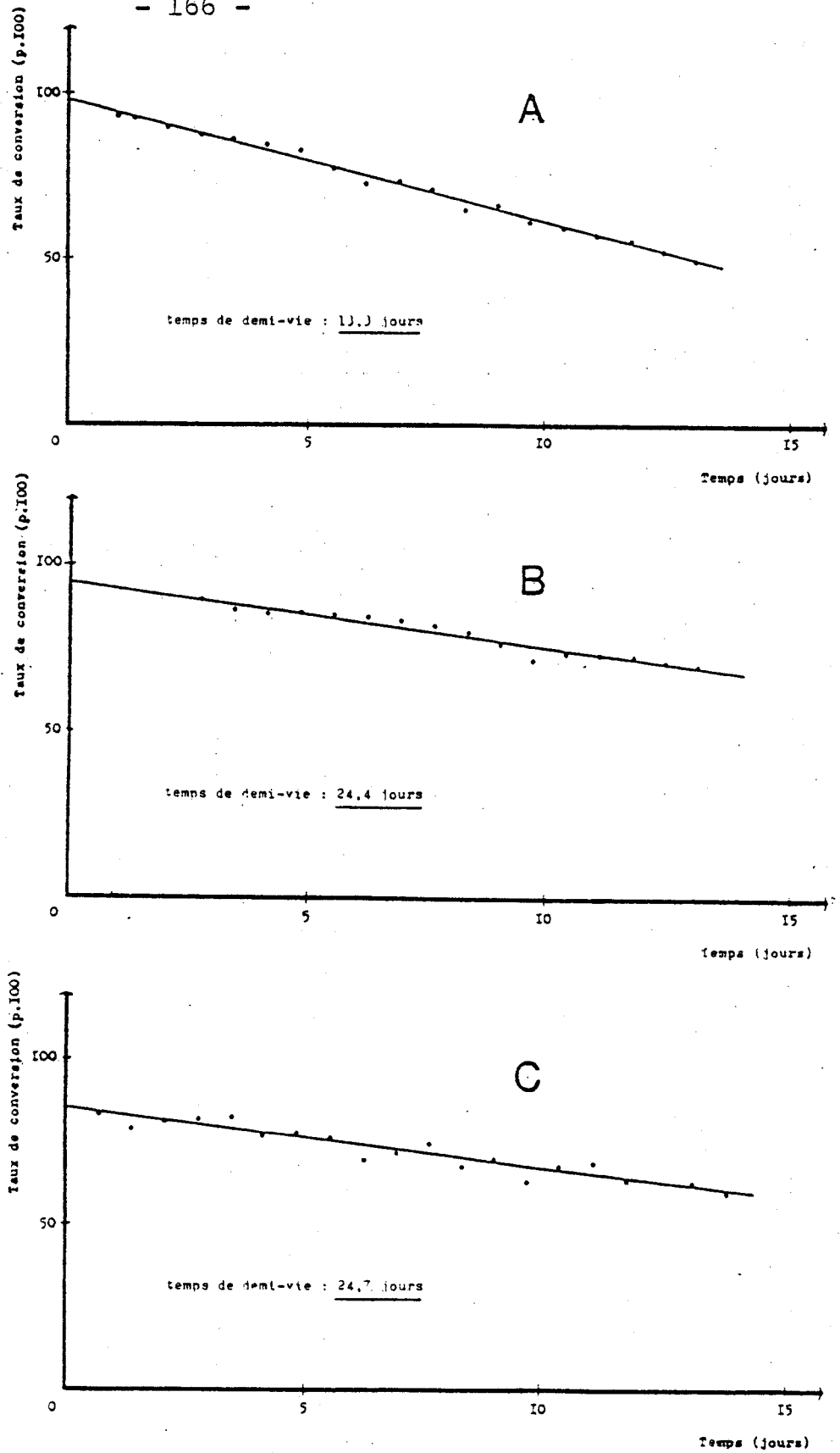


figure 47 : hydrolyse en continu d'une solution de lactose (4,5 p. 100) à pH 6, 45 °C, par des cellules lyophilisées incluses dans des billes d'alginate :

A - non enrobées

B - enrobées (PEI 1 p. 100)

C - enrobées (PEI 2 p. 100)

L'enrobage des billes par une solution de PEI à 1 p. 100 et un temps de contact de 10 minutes est suffisant, l'utilisation de solutions plus concentrées n'est pas nécessaire car quelque soit la concentration de la solution de PEI utilisée pour l'enrobage, le temps de demi-vie du réacteur n'augmente pas.

Cependant l'intérêt de cet enrobage ne sera effectif que dans la mesure où il sera autorisé par la législation comme auxiliaire de fabrication de denrées alimentaires.

C - HYDROLYSE EN CONTINU DU LACTOSE CONTENU DANS LE LAIT ET LE LACTOSERUM PAR DES CELLULES LYOPHILISEES INCLUSES

Les résultats sont présentés dans la figure 48 p. 168 .

Quelque soit le milieu utilisé, la durée de vie du réacteur varie peu. En effet, les temps de demi-vie sont respectivement de 24,7 jours, 23 jours, 32 jours lorsqu'on hydrolyse le lactose contenu dans une solution tamponnée de lactose ou dans le lactosérum ramené à pH 6 ou dans le lait entier.

Il est intéressant de noter que l'hydrolyse du lactose contenu dans un milieu aussi complexe que le lait ne provoque pas de diminution de la durée de vie du réacteur, le temps de demi-vie du réacteur est au contraire légèrement augmenté de 7 jours par rapport à l'hydrolyse d'une solution tamponnée de lactose.

Le système d'inclusion des cellules de B. bifidum dans des billes d'alginate enrobées par du PEI permet d'éviter les phénomènes d'encrassement du support par le lait ou les lactosérums, ce qui est rarement le cas des autres lactases immobilisées.

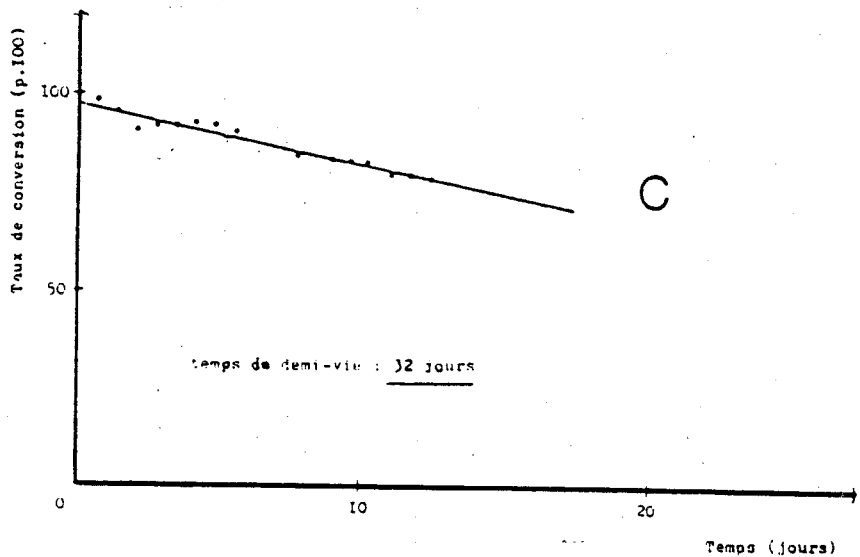
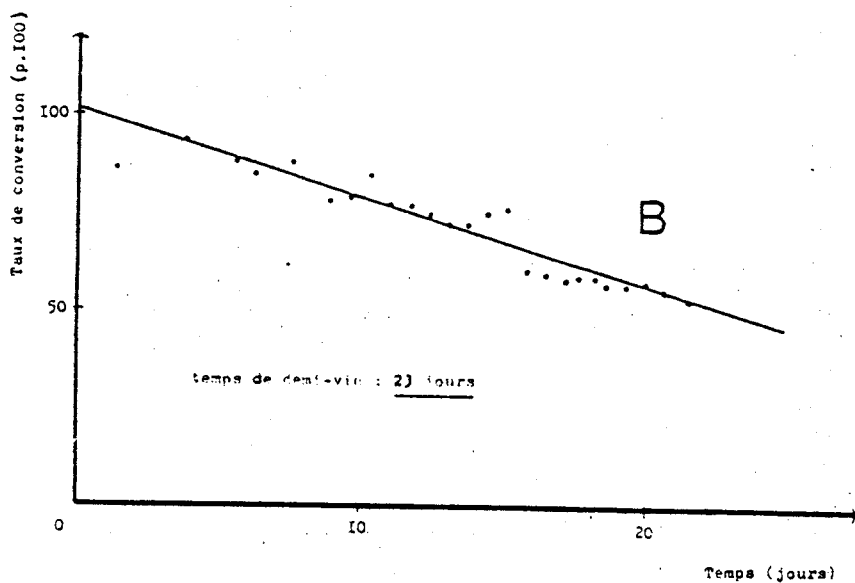
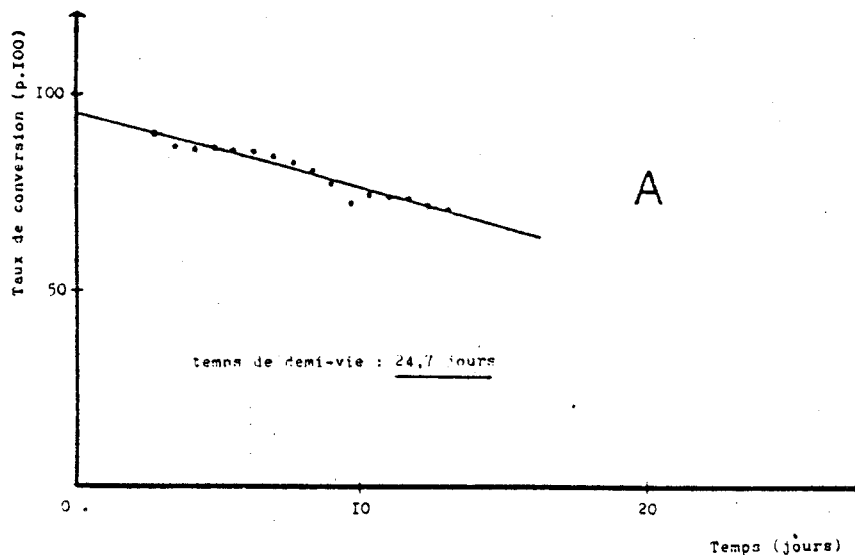


figure 48 : hydrolyse en continu, à 45 °C, par des cellules lyophilisées incluses dans des billes d'alginate enrobées par du PEI (1 p. 100) :

A - solution de lactose (4,5 p. 100, pH 6).

B - lactosérum à pH 6

C - lait entier stérilisé (pH 6,3 - 6,4).

En effet, si l'on considère les procédés Röhlm : Plexazym LAl et LY (procédés les plus performants actuellement sur le marché des lactases immobilisées), il est à remarquer que le temps de demi-vie d'un réacteur contenant du plexazym LAl est de 150 jours lorsque l'on hydrolyse le lactose du lactosérum purifié et de 70 à 80 jours lorsque l'on hydrolyse le lactose du lait entier.

La figure 49 p.170 représente la chromatographie en couche mince de lactosérum et de lait à lactose hydrolysé par des cellules incluses de B. bifidum .

Elle nous montre que la lactase immobilisée forme peu de composés de transglycosidation, ils ne sont pas visibles sur cette chromatographie. Ces composés apparaissent lorsque l'on effectue une chromatographie de filtration sur gel (P2, Biorad, zone de fractionnement 100 - 1800 daltons) d'une solution tamponnée de lactose et hydrolysée à 50 p. 100 à l'aide d'un réacteur, puis concentrée par évaporation sous vide. En chromatographie sur couche mince ces composés migrent moins rapidement que le lactose.

D - HYDROLYSE EN CONTINU DU LACTOSE PAR LES CELLULES FRAICHES INCLUSES

Les cellules dites "fraîches" sont des cellules conservées à 4 °C pendant moins de 48 h, elles ne sont ni congelées, ni lyophilisées.

Les résultats sont présentés dans la figure 50 p. 171 .

L'utilisation de cellules fraîches permet d'augmenter notablement le temps de demi-vie, par rapport à un réacteur contenant des cellules lyophilisées incluses.

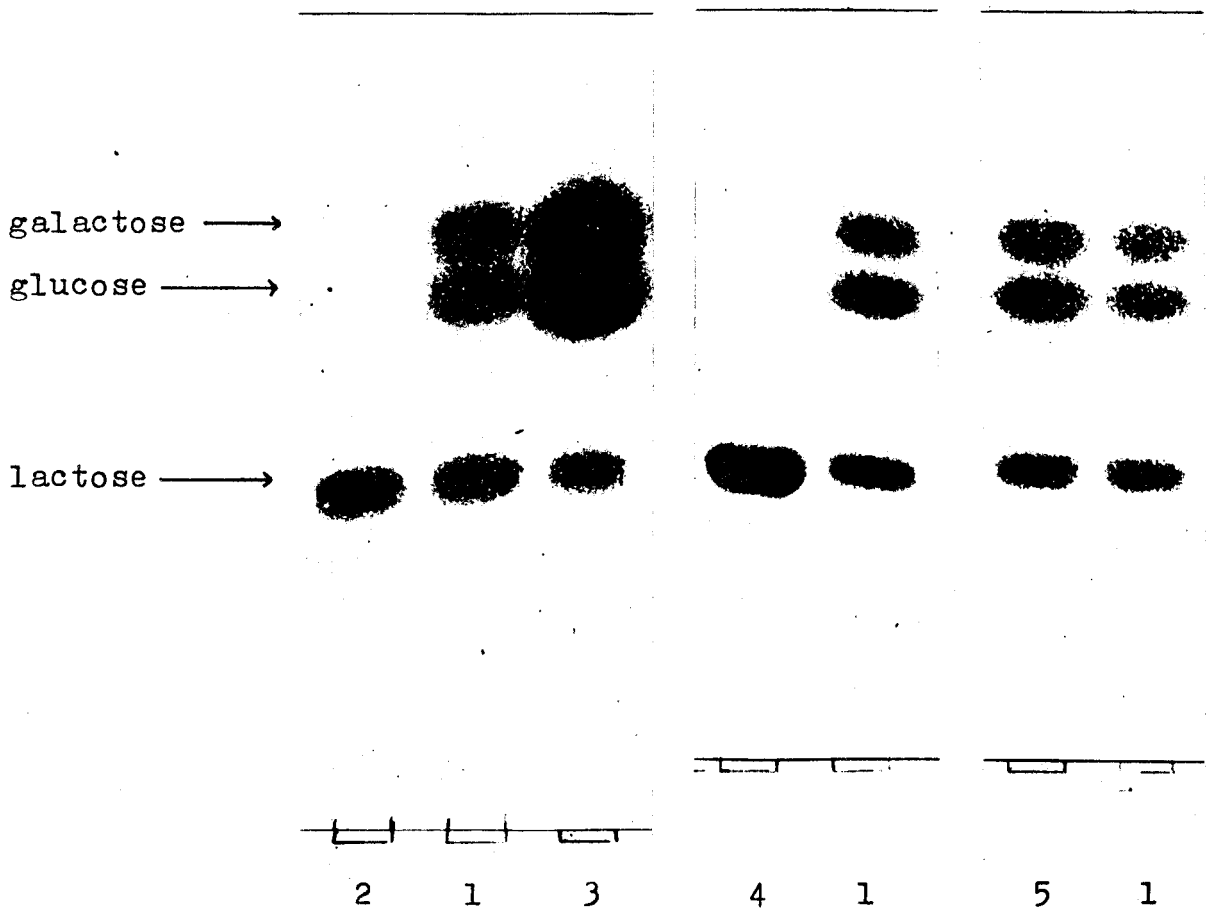


figure 49: chromatographie en couche mince de lactosérum et de lait à lactose hydrolysé.

- 1) témoins galactose, glucose, lactose à 0,1 p. 100
- 2) lactosérum témoin
- 3) lactosérum après hydrolyse partielle
- 4) lait entier témoin
- 5) lait entier après hydrolyse partielle

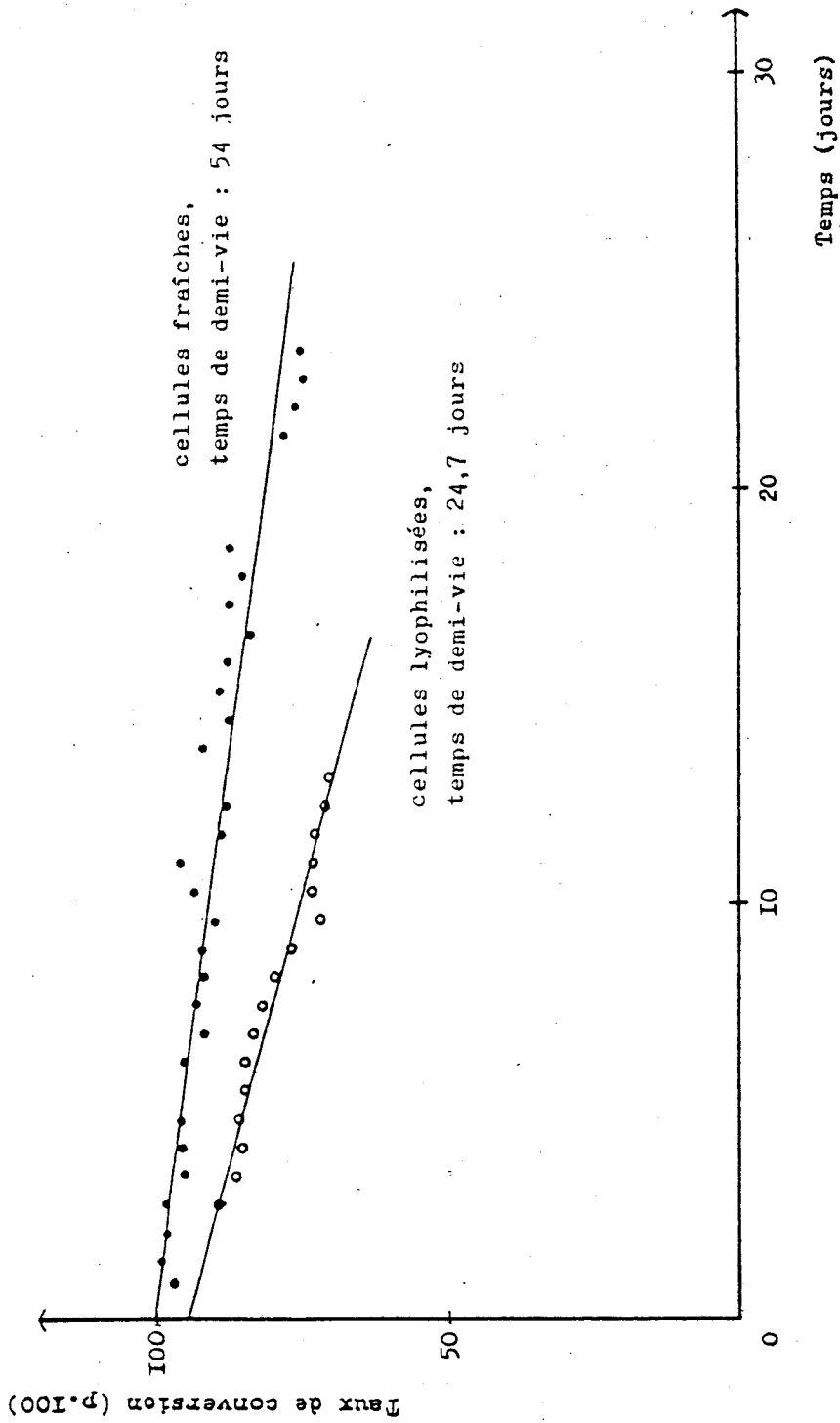


figure 50 : hydrolyse en continu, d'une solution tamponnée (pH 6) de lactose (4,5 p. 100), par des cellules fraîches ou lyophilisées incluses dans des billes d'alginate enrobées par du PÉI (1 p. 100).

Les temps de demi-vie sont de 24,7 jours pour le réacteur contenant des cellules lyophilisées incluses et de 54 jours pour le réacteur contenant des cellules fraîches incluses, lorsqu'une solution tamponnée de lactose est utilisée comme solution de substrat. La durée de vie d'un réacteur est fonction de l'état des cellules qui s'y trouvent. Il est donc logique de penser que les cellules, ayant séjourné en fin de culture, dans un milieu de culture de pH inférieur à 5, montrent une stabilité en réacteur plus faible que des cellules n'ayant pas séjourné dans de telles conditions.

Le contrôle du pH lors de la culture des cellules semble donc indispensable.

Dans les conditions actuelles, l'hydrolyse à 75 p.100 du lactose contenu dans 46 tonnes de solution de lactose peut être effectuée en 54 jours par un réacteur contenant 13 litres (10 Kg) de notre support dans lequel sont incluses des cellules fraîches.

L'extrapolation peut être également réalisée pour l'hydrolyse en continu du lactose contenu dans le lactosérum et le lait, car la durée de vie du réacteur varie très peu en fonction du type de solution de substrat utilisé.

Les performances, de la lactase des cellules de B. bifidum incluses dans des billes d'alginate enrobées par du PEI, permettent de la placer au même niveau que celles déjà commercialisées (procédés Röhm). En effet, le coût de fabrication du Plexazym est élevé et les enzymes utilisés subissent préalablement une purification, ce qui n'est pas le cas du procédé ici décrit.

CONCLUSION

Les difficultés rencontrées lors de la purification de la lactase de B. bifidum ne nous ont pas permis d'envisager l'immobilisation, à faible coût, de la lactase purifiée ou semi-purifiée. Nous nous sommes tournés logiquement vers l'immobilisation des cellules entières de B. bifidum, notamment vers l'inclusion "douce" dans un gel de polyélectrolytes, car l'enzyme étudiée est très sensible aux solvants organiques et aux agents bifonctionnels de couplage comme la glutaraldéhyde.

L'inclusion des cellules dans des billes de gel d'alginate de calcium s'est révélée intéressante. L'alginate est un polysaccharide extrait d'algues brunes, bon marché et déjà utilisé dans l'industrie alimentaire comme épaississant ou gélifiant sous la référence E 401. De plus la concentration en calcium du lait ou des lactosérums permet d'éviter la déplétion en calcium de la matrice d'alginate, donc de la stabiliser. B. bifidum est une bactérie non pathogène et connue comme telle, elle est isolée des fèces de nourrissons en bonne santé alimentés au lait de femme.

Tout semble donc être de nature à favoriser l'utilisation d'un tel système en industrie alimentaire. Cependant, l'immobilisation de cellules est confrontée à de nombreuses difficultés. Celles rencontrées lors de l'inclusion de B. bifidum sont de deux types. D'une part, la bactérie peut présenter une forte activité protéolytique vis-à-vis des protéines du lait, dans certains cas comparable à celle de S. lactis. D'autre part, le lait ou les lactosérums sont des produits naturels complexes, contenant des particules de tailles diverses (globules gras, micelles de caséine, protéines, peptides, etc...) susceptibles de colmater les pores du support.

pour laisser place à une très faible variation de l'activité lactasique entre pH 5 et pH 7 avec un optimum à pH 6. Ce qui correspond approximativement au pH du lait (6,3-6,4) et du lactosérum doux de fromagerie.

La lactase est activée par le magnésium, le manganèse et le cobalt. Elle est inhibée par l'EDTA et légèrement par le glucose. Elle n'est pas inhibée par le galactose ni par un excès de substrat, ce qui permet d'envisager l'hydrolyse en continu du lait concentré.

Le magnésium se comporte comme un activateur vrai à faible concentration en lactose. A forte concentration, l'association de l'enzyme avec le lactose et le magnésium se fait au hasard. Toutefois, l'hypothèse de l'existence de deux lactases ne peut être totalement exclue.

L'activation de la lactase des cellules incluse n'a pas pu être réalisée jusqu'à présent. Il est possible que le calcium masque le site de fixation du magnésium sur l'enzyme, car l'ion calcium est de dimension plus importante que l'ion magnésium et leurs couches électro-
niques externes sont identiques.

Les valeurs des différentes constantes d'affinité apparente de l'enzyme pour le lactose nous montrent que l'inclusion des cellules diminue l'affinité apparente de l'enzyme pour le lactose. Cela est encore plus accentué lorsque les billes sont enrobées. Ce phénomène s'explique par la limitation de la vitesse de diffusion du lactose à travers la membrane de polyéthylènimine et le réseau d'alginate de calcium.

La rupture de pente observée lors de la détermination du Km des cellules lyophilisées non incluses n'est plus constatée lorsque les cellules sont incluses, car la concentration en lactose à l'intérieur des billes

Ces différents problèmes ont été résolus par l'enrobage de la bille d'alginate par un film de polyéthylènimine, qui laisse pénétrer le lactose dans la bille tout en évitant le contact entre les protéases de B. bifidum et les protéines lactées. L'enrobage permet également d'éviter l'encrassement des billes d'alginate par colmatage de ses pores. Le polyéthylènimine n'a cependant pas encore été mentionné comme auxiliaire autorisé de fabrication dans l'industrie alimentaire. Il apparaît cependant que ce type de polymère n'est pas dégradé par voie digestive. Il est toutefois nécessaire de vérifier sa diffusion dans le milieu.

B. bifidum est une bactérie anaérobie qui nécessite des conditions particulières de culture pour la production de lactase : contrôle du pH afin d'éviter l'effet destructif des acides organiques produits lors de la culture, la présence de magnésium dans le milieu de culture pour activer la lactase et peut être l'adjonction de lait qui grâce à la présence de certains lipides permettrait de renforcer la structure de la paroi et par conséquent de stabiliser l'activité enzymatique.

L'inclusion des cellules dans des billes d'alginate enrobées ou non par du polyéthylènimine provoque une modification des paramètres enzymatiques et cinétiques.

La zone de température optimale des cellules lyophilisées incluses (45-50°C) est de 4°C inférieure à celle des cellules lyophilisées non incluses (49-54°C). La présence de calcium à forte concentration au niveau de l'alginate favorise certainement la dénaturation thermique de la lactase.

La lactase des cellules lyophilisées non incluses présente deux pH optimum (pH 5,7 et 6,5). Lorsque les cellules sont incluses, ces deux pH optimum disparaissent

reste certainement trop faible (par empêchement diffusionnel du lactose vers l'intérieur des billes) pour pouvoir visualiser le phénomène.

Le modèle d'immobilisation de l'activité lactasique, ici présenté, possède les caractéristiques suivantes : il permet d'hydrolyser le lactose contenu dans une solution tampon, dans du lactosérum doux ramené à pH 6, dans du lait entier et ceci sans diminution de la durée de vie du réacteur et avec la formation de très peu de composés de transglycosidation (études réalisées sur des cellules lyophilisées).

Avec l'intention de stocker les cellules de B. bifidum sous forme deshydratée (la possibilité d'un stockage aisé étant intéressante au niveau industriel), nous avons lyophilisé les cellules, car la perte d'activité enzymatique est insignifiante. Mais il s'est avéré que les réacteurs constitués de cellules fraîches incluses ont un temps de demi-vie de 20 jours supérieur à celui de réacteurs contenant des cellules lyophilisées incluses (24,7 jours pour l'hydrolyse en continu d'une solution tamponnée de lactose).

Les temps de demi-vie des réacteurs ne varient pas suivant le type de solution de lactose utilisé. Il est donc logique de penser que le temps de demi-vie d'un réacteur contenant des cellules "fraîches" incluses et hydrolysant le lactose contenu dans les lactosérums ou le lait sera identique à celui obtenu par hydrolyse d'une solution tamponnée de lactose.

Dans ces conditions, les possibilités d'un tel système non optimisé sont comparables avec celles d'autres types d'immobilisations d'activités lactasiques tels que les procédés Corning et Röhm dont les principales caractéristiques sont présentées dans le tableau XXVI p. 177 .

Tableau XXVI :

Comparaison des procédés d'hydrolyse du lactose par les lactases immobilisées.

Procédé CORNING (billes de silice)	Procédés RÖHM			
	Pléxazym (plexiglas)	LA 1 (plexiglas)	Pléxazym LY (plexiglas)	Alginate / PEI
<p><i>A . niger</i></p> <p>Lactosérum déméralisé et déprotéinisé</p> <p>pH 3,5-3,6 Température 35-60 °C</p> <p>Taux de conversion moyen 80 p 100</p> <p>La colonne est uti- sable 500 j à 20 h par jour</p> <p>Temps de contact 5 à 10 mn</p>	<p><i>A . oryzae</i></p> <p>Lactosérum purifié</p> <p>pH 4,5 Température 35 °C</p> <p>Taux de conversion moyen 90 p 100 en 60 j</p> <p>Temps de demi-vie 150 j</p> <p>70 t de LS hydrolysé en 60 j / Kg de sup- port</p>	<p><i>A . oryzae</i></p> <p>Lait entier stérilisé</p> <p>pH 6,3-6,4 Température 50-55 °C</p> <p>Taux de conversion moyen 80 p 100 en 30 j</p> <p>Temps de demi-vie 70 à 80 j</p> <p>12 t de lait hydroly- sé en 30 j / Kg de support</p>	<p><i>K . lactis</i></p> <p>Lait demi-écrémé stérilisé</p> <p>pH 6,3-6,4 Température 7 °C</p> <p>Taux de conversion moyen 85 p.100 en 30 j</p> <p>Temps de demi-vie 50 j</p> <p>13 t de lait hydroly- sé en 50 j / Kg de support</p>	<p><i>B . bifidum</i></p> <p>Solution de lactose lactosérum Lait entier stérilisé</p> <p>pH 6-6,4 Température 45°C</p> <p>Taux de conversion moyen 75 p 100 en 54 j</p> <p>Temps de demi-vie 54 j</p> <p>46 t hydrolysé en 54 j pour un réacteur de 13 l contenant 10 Kg de support</p>

Les procédés optimisés et déjà utilisés dans l'industrie (Corning et Röhm) permettent d'obtenir des réacteurs ayant des performances et des temps de demi-vie importants (150 jours pour l'hydrolyse du lactosérum purifié par le plexazym LAL et 50 jours pour l'hydrolyse du lait entier par le plexazym LY).

Mais il est à noter que dans tous les cas, ces procédés d'hydrolyse en continu du lactose nécessitent d'une part la purification des enzymes (coût élevé) et d'autre part des agents de couplages ou des supports onéreux.

Le procédé que nous avons mis au point ne requiert pas la purification de l'enzyme, la fabrication des billes ne rencontre pas de difficultés particulières. Il pourrait être facilement réalisé sur les lieux mêmes de son utilisation.

Il faut maintenant effectuer rapidement les premiers essais d'hydrolyse au stade pilote dans une chaîne continue afin d'étudier les modifications rhéologiques du système lorsque le réacteur est de taille plus importante. Les problèmes posés par la contamination du réacteur par des microorganismes, en absence d'azide de sodium, sont également à résoudre. Il faut tenir compte du fait que le polyéthylènimine n'est pas reconnu comme auxiliaire de fabrication dans l'industrie alimentaire française et envisager l'utilisation d'un autre polymère pour l'enrobage.

Les enjeux industriels et économiques étant importants, il est nécessaire de protéger le procédé et de permettre son développement au sein d'une entreprise laitière intéressée.

L'ouverture du marché alimentaire français au lactosérum à lactose hydrolysé permet déjà l'utilisation de ce sous produit pour la fabrication des denrées alimentaires suivantes :

- biscotterie, panification fine
- biscuiterie, pâtisserie industrielle
- dessert lacté
- crème glacée, glace alimentaire, sorbet
- salaisonnerie, charcuterie, plat cuisiné

L'autorisation d'utilisation du lait à lactose hydrolysé n'a pas encore été donnée dans notre pays. Elle est envisageable à court terme et pourrait permettre la commercialisation de denrées "diététiques" sucrées à faible teneur en oligosaccharides et fabriquées à partir de lait à lactose hydrolysé (yaourt, crème glacée, etc ...)

L'hydrolyse du lactose dans le lait permettra de palier aux difficultés technologiques dues à la cristallisation du lactose et notamment conduira à l'élaboration de laits très concentrés.

Cependant la perspective la plus importante semble être celle de l'alimentation des pays en voie de développement dont les populations sont déficientes en lactase intestinale. Dans cette optique, l'utilisation des excédents de lait de la communauté européenne est envisageable sous forme de lait entier ou de lait fermenté à faible teneur en lactose.

BIBLIOGRAPHIE

1. - ABDULINA I. N., SAFONOVA I. I., KULIKOVA A. K.,
TIKHOMIROVA A. S., Pischevaya Tekhnologiya, 1979,
3, 131
2. - ABRAHAMSEN R. K., Meieriposten. Meieritcknikk.,
1982, 71, 36
3. - ALFERMANN A. W., BERGMANN W., FIGUR C., HEMBOLD U.,
SCHWANTA D., SCHULLER I., REINHARD E., in Plant Bio-
technology, University Press, Cambridge, 1983,
série 18, p. 67 - 74
4. - AUNSTRUP K., Annual Rep. Ferment. Processes (NOVO
Industries), 1983, 6, 189
5. - BARET J. L., Industries Aliment. Agric., 1980, 97,
1051
6. - BEERENS H., GERARD A., GUILLAUME J., Ann. Inst. Pasteur
(Lille), 1957, 9, 77 - 85
7. - BERG N. O., DAHLQVIST A., LINDBERG T., VON STUDNITZ
W., Acta Paediat. Scand., 1969, 58, 525 - 527
8. - BERG N. O., DAHLQVIST A., LINDBERG T., Acta Paediat.
Scand., 1979, 68, 751 - 758
9. - BERGEY H., in manual of determinative bacteriology,
Williams and Wilkins Company, Baltimore (8 th edition),
1974, p. 1268
10. - BETTMANN H., REHM H. J., Appl. Microbiol. Biotechnol.,
1984, 20, 285 - 290
11. - BODINE A. B., SCHUMACKER D. J., MARTIN J. H., LAZAR
J. T., Cultured Dairy Prod. J., 1982, 17, 13
12. - BOER R. DE, ROBERTSON T. A., Netherlands Milk Dairy
J., 1981, 35, 95
13. - BONJEAN Y., Alimentation, 1979, 71, 47
14. - BORISOVA G. V., SLIVKO V. V., Molochnaya Promyshlen-
nost, 1973, 12, 13 - 15
15. - BRADLEY R., SMITH K. E., Dairy record, 1983, 84, 184
16. - BRADLEY R., SMITH K. E., Dairy Record, 1983, 84, 180
17. - BRODELIUS P., DEUS B., MOSBACH K., ZENK M. H.,
FEBS Lett., 1979, 103, 93 - 97
18. - BRODELIUS P., DEUS B., MOSBACH K., ZENK M. H., in
Enzyme Engineering, Weetall et Rogers, Ed. Plenum
Press N.Y., 1980, vol. 5, p. 373 - 381

19. - BRODELIUS P., DEUS B., MOSBACH K., ZENK M. H.,
Brevet européen n° 80850105.0., 1981
20. - BRODELIUS P., MOSBACH K., Adv. Appl. Microbiol.,
1982, 28, 1 - 26
21. - BRODELIUS P., NILSSON K., Eur. J. Appl. Microbiol.
Biotechnol., 1983, 17, 275 - 280
22. - CHEETHAM P. S. J., Enzyme Microb. Technol., 1979,
1, 183 - 188
23. - CHEETHAM P. S. J., BLUNT K. W., BUCKE W.,
Biotechnol. Bioeng ., 1979, 21, 2155 - 2168
24. - CHEFTEL J. C., CHEFTEL H., in introduction à la biochimie
et à la technologie des aliments, Ed. Technique et
Documentation - Lavoisier, 1977, vol. 1, p. 38 - 40
25. - CHIBATA I., TOSA T., SATO T., Appl. Microbiol.,
1974, 27, 878 - 885
26. - COMPERE A. L., GRIFFITH W. L., Dev. Industr. Microbiol.,
1976, 17, 247
27. - CORRIEU G., BLACHERE A., RAMIREZ A., NAVARRO J. M.,
DURAND G., DUTEURTE B., MOLL M., Communication au
5 ième Symposium International des Fermentations,
Berlin, 1976
28. - COUGHLIN R. W., CHARLES M., PITCHER W., in Immobilized
Enzymes for Food Processing, C.R.C. Press, Florida
U.S.A., 1980, p. 153
29. - CUMMINS C. S., GLENDENNING O. M., HARIS H.,
Nature, 1957, 180, 337 - 338
30. - DAHLQVIST A., in Biochemistry of Carbohydrates II,
University park press, Baltimore U.S.A., 1978,
p. 179 - 207
31. - DAHLQVIST A., in Milk Intolerances and Rejection, Ed.
Delmont (Nice), Karger Basel, 1983, p. 11 - 16
32. - DAHLQVIST A., GAMSTORP I., MADSEN H., Acta Paediat.
Scand., 1970, 59, 669 - 675
33. - DALLYN H., FALLOON W. C., BEAN P. G., Lab. Practise,
1977, 26, 773 - 775
34. - DEHNERT J., Zentrabl. Bakteriол. Parasitenk. Infek-
tionskr. Hyg. Abt. Orig., 1957, 169, 66 - 79
35. - DELMONT J., in Milk Intolerances and Rejection, Ed.
Delmont (Nice), Karger Basel, 1983, p. 1 - 10

36. - DICKER R., Food Trade Rev., 1982, 52, 295
37. - D'SOUZA S. F., NADKARNI G.B., Enzyme Microb. Technol., 1980, 2, 217 - 222
38. - DURAND G., NAVARRO J. M., Process Biochemistry, sept. 1978, p. 14 - 23
39. - EXTERKATE F. A., VEERKAMP J. H., Biochim. Biophys. Acta, 1969, 176, 65 - 77
40. - EXTERKATE F. A., VEERKAMP J. H., Biochim. Biophys. Acta, 1971, 231, 545 - 549
41. - EXTERKATE F. A., VEERKAMP J. H., J. Bacteriol., 1971, 106, 824 - 829
42. - FINOCCHIARO T., OLSSON N. F., RICHARDSON T., Adv. Biochem. Eng., 1980, 15, 71
43. - FRANCOU N., VIGNAIS P. M., Biotechnol. Lett., 1984, 10, 639 - 644
44. - FREEMAN A., AHARONOWITZ Y., Biotechnol. Bioeng., 1981, 23, 2747 - 2759
45. - FUKUI S., SONOMOTO K., ITOH N., TANAKA A., Biochimie, 1980, 62, 381 - 386
46. - GAINER J. L., KIRWAN D. J., FOSTER J. A., SEYHAN E., Biotechnol. Bioeng., 1980, 10, 35 - 42
47. - GASSER F., MANDEL M., J. Bacteriol., 1968, 96, 580-588
48. - GEKAS V., LOPEZ-LEIVA M., Process Biochemistry, Fevrier 1985, p. 2 - 12
49. - GITZELMANN R., Lancet ii, 1965, 670 - 671
50. - GLICK M. C., SALL T., ZILLIKEN F., MUDD S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 37, 361 - 363
51. - GOODA E., BEDNARSKY W., KUNCEWICZ A., POZNASKI S., KOWALEWSKA J., Lait, 1982, 62, 187
52. - GOOSEN M. F. A., O'SHEA G. M., CHARAPETIAN H. M., CHOU S., SUM A. M., Biotechnol. Bioeng., 1985, 27, 146 - 150
53. - GOTTSALK G., in Bacterial Metabolism, Ed. Springer N.Y. Heidelberg Berlin, 1979, p. 173 - 178
54. - GOTTSCHICK W., Untersuchungen zur entwicklung von enzymreaktionen für die kontinuierliche lactose spaltung, Dissertation à l'université Christian Albrecht (RFA), 1982

55. - GUNTHER E., BURGER E., in utilisation des enzymes en technologie alimentaire, Symposium International de Versailles, Ed. Dupuy, Technique et documentation - Lavoisier, 1982, p. 243 -248
56. - GYLLENBERG H., NIEMELA S., J. Sci. Agric. Soc. Finland, 1959, 31, 94 - 97
57. - GYORGY P., C. R. 3 ième Congrès Intern. Nutr., Amsterdam, 1964, p. 203
58. - GYORGY P., HOOVER J. R. E., KUHN R., ROSE C. S., Arch . Biochem. Biophys., 1954, 48, 209 - 213
59. - GYORGY P., KUHN R., ROSE C. S., ZILLIKEN F., Arch . Biochem. Biophys., 1954, 48, 202 - 208
60. - GYORGY P., KUHN R., ZILLIKEN F., Brevet U.S. n° 2.694.640, 1954
61. - GYORGY P., NORRIS R. F., ROSE C. S., Arch . Biochem. Biophys., 1954, 48, 193 - 201
62. - GYORGY P., ROSE C. S., J. Bacteriol., 1955, 69, 483-490
63. - GYORGY P., ROSE C. S., SPRINGER G. F., J. Lab. Clin. Med., 1954, 43, 543 - 552
64. - GYORGY P., TOCANTINS L. M., MILLER F. R., WEISS A., Trans. Ass. Amer. Physicians, Philadelphia, 1954, 67, 117 - 122
65. - HACKEL U., KLEIN J., MEGNET R., WAGNER F., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1975, 1, 291 - 293
66. - HAECHT J. L. Van, BOLPOMBO M., ROUXHET P. G., Biotechnol. Bioeng ., 1985, 27, 217 - 224
67. - HAGERDAL B., Acta Chim. Scand., 1981, 34, 611
68. - HAGERDAL B., Livsmedelsteknik, 1981, 5, 228
69. - HAUG A., LARSEN B., SMISROD O., Carbohydr. Res., 1974, 32, 217 - 225
70. - HOLDEMAN L. V., MOORE W. E. C., in anaeroby laboratory manual, Virginia polytechnic institute and state university, Blackburg, 1972
71. - HOLLEY W., Int. Zect. für Lebensmittel technol und verfahrenstechnik, 1983, 34, 413
72. - HOLZEL A., SCHWARZ V., SUTDIFFE K. W., Lancet *is*, 1959, 1126 - 1128

73. - HRABOVA H., Prumysl Protavin (CS), 1975, 26, 479 - 481
74. - HUMBEL R., COLLART M., Clin. Chim. Acta, 1975, 60, 143 - 145
75. - HUNGATE R. E., in the rumen and its microbes, Academic Press London N.Y. San Francisco, 1960
76. - ISSELBACHER K. J., ANDERSON K., KURAHASHI K., KALCHAR H. M., Science, 1956, 123, 635 - 636
77. - JACK T. R., ZAJIC J. E., Biotechnol. Bioeng., 1977, 19, 631 - 648
78. - JOHANSSON G., Nordisk Mejeriindustri, 1981, 8, 329
79. - JOHNSON D. E., CIEGLER A., Arch. Biochem. Biophys., 1969, 130, 384
80. - JONES A., VELIKY I. A., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1981, 13, 84 - 89
81. - KANDLER O., Int. J. Syst. Bacteriol., 1970, 20, 491 - 507
82. - KIERSTAN M., BUCKE C., Biotechnol. Bioeng., 1977, 11, 387 - 397
83. - KIERSTAN M., CORCORAN E., Biotechnol. Lett., 1984, 6, 813 - 814
84. - KIERSTAN M., REILLY J., Biotechnol. Bioeng., 1982, 24, 1507 - 1517
85. - KISZA J., ZIAJKA S., PANFIL H., in intensified growth of Bifidobacterium bifidum, XIX Int. Dairy Congr. IE, 1974, p. 578
86. - KLEIN J., KLUGE M., Biotechnol. Lett., 1981, 3, 65 - 70
87. - KLEIN J., MANECKE G., Enzyme Eng., 1982, 6, 181 - 189
88. - KLEIN J., STOCK J., VORLOP K. D., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1983, 18, 86 - 91
89. - KLEIN J., WAGNER F., Dechema. Monogr., 1978, 82, 142 - 164
90. - KOCH D., SCHLEIFER K. H., KANDLER O., Arch. Mikrobiol., 1970, 74, 315 - 325
91. - KOJIMA M., SUDA S., HOTTA S., HAMADA K., J. Bacteriol., 1970, 102, 217 - 220

92. - KOJIMA M., SUDA S., HOTTA S., HAMADA K., J. Bacteriol., 1970, 104, 1010 - 1013
93. - KUEK C., ARMITAGE T. M., Enzyme Microb. Technol., 1985, 7, 121 - 125
94. - KUHN R., TIEDERMANN H., Z. Naturforsch, 1953, 8B, 428 - 436
95. - LAMBE C. A., ROSEVAER A., Proc. Biotech., London, may 4 - 6, 1983, p. 565 - 576
96. - LANGDON I. A., in economies of whey utilisation by dairy cooperatives, occasional paper, school of management, Deakin University, Australia, 1980, 16, 19
97. - LARSSON P. O., MOSBACH K., Biotechnol. Lett., 1979, 1, 501 - 506
98. - LARTIGUE D. J., WEETALL H., Brevet U.S., n° 3.939.041, 1976
99. - LEE G. K., LONG M. E., Brevet U.S., n° 3.821.086, 1974
100. - LEE J. M., WOODWARD J., Biotechnol. Bioeng., 1983, 25, 2441 - 2451
101. - LEHNINGER A. L., Biochimie, 2 ième Ed. Flammarion Médecine-Sciences, 1975, p. 638 - 639
102. - LENOIR J., Lactoserum et source de lactose, rapport au conseil supérieur d'hygiène publique (France), 1984
103. - LESTRADET H., COURPOTIN C., rapport au conseil supérieur d'hygiène publique (France), 1984
104. - LESTRADET H., MONTREUIL J., rapport au conseil supérieur d'hygiène publique (France), 1984
105. - LINDQVIST B., MEEUWISSE G., Acta Paediat. Stöckh., 1962, 51, 674 - 685
106. - LINDSEY K., YEOMAN M. M., BLACK G. M., MAVITUNA F., FEBS Lett., 1983, 155, 143 - 149
107. - LINEWEAVER H., BURCK D., J. Amer. Chem. Soc., 1934, 56, 656 - 666
108. - LINKO Y., LINKO P., Biotechnol. Lett., 1981, 3, 21 - 26
109. - LINKO Y., POUTANEN K., WECKSTROM L., LINKO P., Enzyme Microb. Technol., 1979, 1, 26 - 30

110. - LUQUET F. M., LINCZOWSKI Y., Ann. Fals. Exp. Chim., 1981, 802, 619 - 635
111. - MAILLARD (1912)
cité dans : ELLIS G. P., Adv. Carbohydr. Chem., 1959, 14, 63
112. - MALESKA R., VELIKY I. A., SCHNEIDER H., Biotechnol. Lett., 1981, 3, 415 - 420
113. - MAUGH T. H., Science, 1984, 223, 474
114. - Mc DONALD I., WILLIAMS C. A., in Milk Intolerances and Rejection, Ed. Delmont (Nice), Karger Basel, 1983, p. 77 - 82
115. - MEEUWISSE G., DAHLQVIST A., Acta Paediat. Scand., 1968, 57, 273 - 280
116. - METZ B., KOSSEN N. W. F., Biotechnol. Bioeng., 1977, 19, 781 - 789
117. - Mc GINIS R., Sugar J., 1975, 38, 8
118. - MITSUOKA T., Zentrabl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig., 1969, 210, 52 - 64
119. - MOZES N., ROUXHET P. G., Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 22, 92 - 97
120. - MUSGRAVE S. C., KERBY N. W., CODD G. A., STEWART W. D. P., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1984, 17, 133 - 136
121. - NAGASHIMA M., AZUMA M., NOGUCHI S., INUZUKA K., SAMEJINA H., Biotechnol. Bioeng., 1984, 36, 992 - 997
122. - NELSON R. P., Brevet U.S. n° 3.957.580, 1976
123. - NEUT C., ROMOND C., BEERENS H., Reprod. Nutr. Developp., 1980, 20, 1679 - 1684
124. - NEUT C., ROMOND C., BEERENS H., Rev. Inst. Pasteur (Lyon), 1981, 14, 19 - 26
125. - NILSSON K., BIRNBAUM S., FLYGARE S., LINSE L., SCHRODER U., JEPPSSON U., LARSSON P. O., MOSBACH K., BRODELIUS P., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1983, 17, 319 - 326
126. - OLSON N. F., Dairy Ice Cream Field, 1979, 162, 55
127. - OP DEN CAMP H. J. M., VEERKAMP J. H., OOSTERHOF A., VAN HALBEEK H., Biochim. Biophys. Acta, 1984, 795, 301 - 313

128. - ORLA-JENSEN S., in the Lactic Acid Bacteria, Vol. 1, Ergänzungsband, Ejmar Munskgaard, Copenhagen, Denmark, 1943
129. - PAIGE D. M., BAYLESS T. M., in the Lactose Digestion, Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1981, p. 151
130. - PAINTEUR T. J., in the Polysaccharides, Ed. Aspinall, Academic Press, 1983, vol. 2, p. 263 - 273
131. - PAUL F., VIGNAIS P. M., Enzyme Microb. Technol., 1980, 2, 281
132. - PLAINER H., SPROSSLER B. G., UHLIG H., in Use of Enzyme in Food Technology, Symposium International, Versailles, les 5, 6 et 7 mai 1982, Ed. Dupuy, Technique et Documentation Lavoisier
133. - PLIMMER R. H. A., J. Physiol., London, 1907, 35, 20 - 31
134. - PREVOT A. R., Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, 229
135. - PREVOT A. R., in traité de systématique bacterienne, Ed. Dunod, 1961, vol. 2, p. 508
136. - PREVOST H., DIVIRS C., ROUSSEAU E., Biotechnol. Lett., 1985, 4, 247 - 252
137. - RASIC J. L., KURMANN J. A., in Bifidobacteria and their Role, Experientia Supplementum, Ed. Birkhäuser Verlag Basel Boston Stuttgart, 1983, vol 39
138. - RAYNAUD M., Ann. pediat., 1959, 35, 8 - 23
139. - RAYNAUD M., BIZZINI B., Ann. Nutrit. Alim., 1971, 25, 209 - 223
140. - REES D. A., Biochemistry, series one, vol. 5, M.T.P. Intern, R. of Sci., W.J. Whelan, Ed. Miami Butterworth (London), University park press Baltimore, 1975, p. 1 - 42
141. - REPELIUS C., in Milk Intolerances and Rejection, Ed. Delmont (Nice), Karger Basel, 1983, p. 57 - 62
142. - REUTER G., Zentrabl. Bakteriolog. Parasitenk. Hyg. Abt. Orig., 1964, 191, 486 - 507
143. - RIDHA S., GRAWFORD R., TAMINE A., Dairy Industries Int., 1983, 48, 1720
144. - ROBERTSON T., ROMIJN D. J., DE BOER R., HANEMAALIJER J., North European Dairy J., 1984, 3, 154
145. - ROBERTSON T., ROMIJN D. J., DE BOER R., HANEMAALIJER J., North European Dairy J., 1984, 4, 87

146. - ROQUETTES (Frères), Brevet n° 7 312 864 (France)
147. - SANDFORD A., BAIRD J., in the Polysaccharides. Ed. Aspinall, Academic Press, 1983. Vol. 2, p. 448 - 457
148. - SCARDOVI V., TROVATELLI L. D., Ann. Microbiol. Enzymol., 1965, 15, 19 - 29
149. - SCARDOVI V., TROVATELLI L. D., ZANI G., CROCIANI F., MATTEUZI D., Int. J. Syst. Bact., 1971, 21, 276 - 294
150. - SCHAIK F. W. Van, VEERKAMP J. H., Biochem. Biophys. Acta, 1975, 388, 213 - 225
151. - SCOTT C. D., HANCHER C. W., Biotechnol. Bioeng. ., 1976, 18, 1893
152. - SEBALD M., GASSER F., WERNER H., Ann. Inst. Pasteur (Paris), 1965, 109, 251 - 269
153. - SEMENIKHA V. F., SUNDUKOVA M. B., Mol. Prom., 1980, 3, 33 - 34
154. - SIMOONS F. J., Ann. J. Dig. Dis., 1978, 23, 963 - 980
155. - SHIGESADA S., ISHIMATSU Y., KIMURA S., Brevet Japonais n° 7 581 590, 1975
156. - SHUKLA T., C.R.C. Critical Reviews in Food Technologies, 1975, 1, 325
157. - SMISROD O., HAUG A., Acta Chem. Scand., 1972, 26, 2063
158. - SMISROD O., HAUG A., WHITTINGTON S. G., Acta Chem. Scand., 1972, 26, 2563
159. - SNYDER M. L., SLAWSON M. S., BULLOCK W., PARKER R. B., J. Infect. Dis., 1967, 117, 341 - 345
160. - SPROSSLER B., PLAINER H., Food Technology, oct. 1983, 37, 93 - 95
161. - STENSTAM T., Acta Med. Scand., suppl. 1946, p. 177
162. - SUMMER , HOWELL, J. Biol. Chem., 1935, 108, 51 - 54
163. - TAKATA I., TOSA T., CHIBATA J., J. Solid Phase Biochem., 1977, 2, 225 - 236
164. - TANAKA H., KUROSAWA H., KOKUFUTA E., VELIKY I. A., Biotechnol. Bioeng. ., 1984, 26, 1393 - 1394
165. - TANAKA H., MATSUMURA M., VELIKY I. A., Biotechnol. Bioeng. ., 1984, 26, 53 - 58
166. - THIELE H., HALLICH Z., Naturforsh, 1958, 13, 580 - 588

167. - TOYO JOSO Cie , Brevet (GB) n° 1 347 665, 1974
168. - TRAMPER J., SUWINSKA-BORDWIECK G., KLAPWIJK A.,
Enzyme Microb. Technol., 1985, 7, 155 - 160
169. - TSUMURA N., KASAMI T., 5 th Int. Ferment. Symp.,
Berlin 1976, Abstr. of papers
170. - UMEMURA I., TAKAMATSU S., SATO T., TOSA T., CHIBATA T.,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 1984, 20, 291 - 295
171. - VARAVITHYA W., VALYASEVI A., CHARUCHINDA S.,
J. Pediat, 1971, 78, 710 - 715
172. - VEERKAMP J. H., Arch. Biochem. Biophys., 1969, 129,
257 - 263
173. - VEERKAMP J. H., Biochim. Biophys. Acta, 1970, 210,
267 - 275
174. - VEERKAMP J. H., Biochim. Biophys. Acta, 1972, 273,
359 - 367
175. - VEERKAMP J. H., Biochim. Biophys. Acta, 1976, 441,
403 - 411
176. - VEERKAMP J. H., Biochim. Biophys. Acta, 1976, 450,
277 - 287
177. - VEERKAMP J. H., LAMBERT R., SAITO Y., Arch . Biochem.
Biophys., 1965, 112, 120 - 125
178. - VEERKAMP J. H., SCHAIK F. W. Van, Biochim. Biophys.
Acta, 1974, 348, 370 - 387
179. - VELIKY I. A., JONES A., Biotechnol. Lett., 1981,
3, 551 - 554
180. - VELIKY I. A., WILLIAMS R. E., Biotechnol. Lett.,
1981, 6, 275 - 280
181. - VIETH W. R., et al, Biotechnol. Bioeng ., 1973,
15, 565
182. - VRIES W. De, GERBRANDY J., STOUTHAMER A. H.,
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 136, 415 - 425
183. - VRIES W. De, STOUTHAMER A. H., J. Bacteriol., 1968,
96, 472 - 478
184. - VRIES W. De, STOUTHAMER A. H., Arch. Mikrobiol.,
1969, 65, 275 - 287

185. - WERNER H., SEELIGER H. P. R., Arztl. Lab., 1963,
9, 357 - 358
186. - WHITE F. H., PORTNO A. D., J. Inst. Brewing, 1978,
84, 228 - 230
187. - WILLIAMS C. A., Mc DONALD T., Clin. Nutr., 1982,
36 C, 149 - 153
188. - WOOD H. F., ALBERTI K. G. H. M., Lancet ii, 1972,
1354 - 1355
189. - WOOD L. L., CALTON G. J., Biotechnology, dec. 1984,
1081 - 1083
190. - ZIAJKA S., KISZA J., ROSKOSZ D., Zeszyty Naukow
Akademi Rolniczo - Techniczny W Olsztynie n° 121,
Technologia Zywnosci, 1974, 3, 171 - 178

