

# Hydrolyse Enzymatique du Lactose dans un Réacteur Type Réservoir Agité

HUNG MA, P. MONSAN<sup>1</sup>, R. MAYER et D. ROULEAU

Département de Génie chimique, Ecole Polytechnique, C.P. 6079, Succ. "A", Montréal, Québec H3C 3A7

L'étude cinétique de l'hydrolyse enzymatique du lactose a été réalisée dans un réacteur agité de type réservoir en écoulement continu, dans des conditions isothermes pour des températures comprises entre 30° et 50°C pour un pH égal à 4.5. L'utilisation d'un panier contenant l'enzyme immobilisée, permet de réduire considérablement les résistances de transfert externe. L'enzyme utilisée provenant d'une souche d'*Aspergillus Niger* a été immobilisée sur des billes de silice. Les caractéristiques de mixtion parfaite du réacteur ont été confirmées par une étude hydrodynamique pour les mêmes conditions opératoires. Une analyse statistique a été effectuée afin de différencier les modèles possibles et celui qui s'ajuste le mieux aux données expérimentales correspond au modèle de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive par le produit, le galactose:

$$v = \frac{V_{\max}(S)}{(S) + K_s \left(1 + \frac{(P)}{K_{P_1}}\right)}$$

The kinetic study of the lactose enzymatic hydrolysis has been achieved in a continuous stirred tank reactor under isothermic conditions, at temperatures varying between 30° and 50°C and at a pH of 4.5. The use of a spinning basket containing the immobilized enzyme permits to cut in a large way the external transfer resistances. The enzyme originating from the *Aspergillus Niger* species has been immobilized on SiO<sub>2</sub> balls. The characteristics of a perfect mixing in the reactor have been confirmed in a hydrodynamic study carried out under the same operating conditions. A statistical analysis has been made in order to identify the possible models; it has been found that the Michaelis-Menten model, with a competitive inhibition by the galactose product, adapts itself the best to the experimental data:

$$v = \frac{V_{\max}(S)}{(S) + K_s \left(1 + \frac{(P)}{K_{P_1}}\right)}$$

Le concept d'utilisation d'enzymes pour hydrolyser le lactose n'est pas nouveau. L'enzyme, la  $\beta$ -galactosidase (communément appelée lactase) a été identifiée et caractérisée la première fois en 1883 (Roberts et Pellenati, 1957). Depuis lors, beaucoup de travaux ont été accomplis concernant l'hydrolyse du lactose, d'abord avec de l'enzyme soluble (ou libre), puis à partir des années 70, avec de l'enzyme immobilisée (Weetall, 1976).

Les études antérieures sur la cinétique de l'hydrolyse enzymatique du lactose ont fourni bon nombre de données sur les paramètres cinétiques tels que  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten),  $K_i$  (constante d'inhibition du produit, le galactose précisément) et  $V_{\max}$  (vitesse maximum de réaction) (Woychik et al., 1974, Hinberg et al., 1974, Weetall et al., 1974a, Woychik et Wondolowski, 1972, Hourigan, 1976, Paruchuri, 1976). Mais on peut difficilement comparer les résultats étant donné que les conditions opératoires sont différentes (pH, composition des réactifs, source d'enzymes). D'autre part, ces chercheurs n'ont utilisé que des réacteurs fermés (Okos, 1975) ou des réacteurs à lit fixe de type tubulaire (Weetall et al., 1979b) mais pratiquement aucun n'a étudié la cinétique de cette réaction en écoulement continu dans un réacteur agité de type réservoir. Pourtant, ce

type de réacteur offre plusieurs avantages pour une étude cinétique:

— en utilisant un panier contenant l'enzyme immobilisée, on peut réduire considérablement les résistances de transfert externe, en augmentant la vitesse de rotation du panier;

— on n'a pas besoin d'intégrer le modèle cinétique comme dans le cas d'un réacteur tubulaire et les données peuvent être insérées directement dans le modèle et traitées par les méthodes de régression linéaire.

Le principal but de cette étude est de trouver un modèle qui permette de représenter de façon satisfaisante la cinétique de l'hydrolyse du lactose en utilisant comme catalyseur une enzyme provenant d'une souche d'*Aspergillus Niger* immobilisée sur de la silice poreuse. La réaction a été réalisée en écoulement continu dans un réacteur agité de type réservoir pour une plage de température variant de 30° à 50°C et pour une gamme de concentrations variant de 1% à 10% (poids/volume) en lactose.

## Matériaux et méthodes opératoires

L'enzyme, la lactase L.P. (identique à la lactase de Wallerstein), provenant d'une souche d'*Aspergillus Niger*, a été obtenue de la société Rapidase. Le support catalytique, constitué de billes de silice poreuses, a été fourni par Rhône

<sup>1</sup>Institut National des Sciences Appliquées, Laboratoire de génie biochimique, Avenue de Rangueil - 31077 Toulouse, Cedex, France.

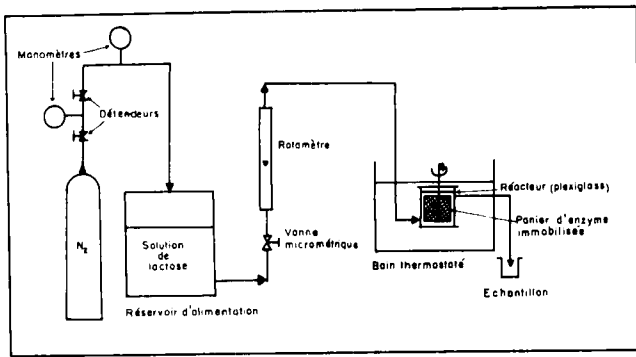


Figure 1 — Montage expérimental.

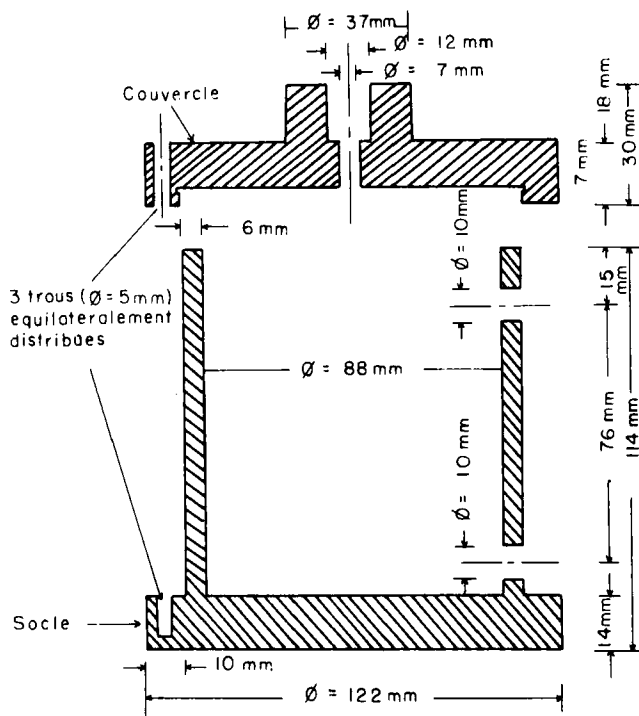


Figure 2 — Détails du réacteur.

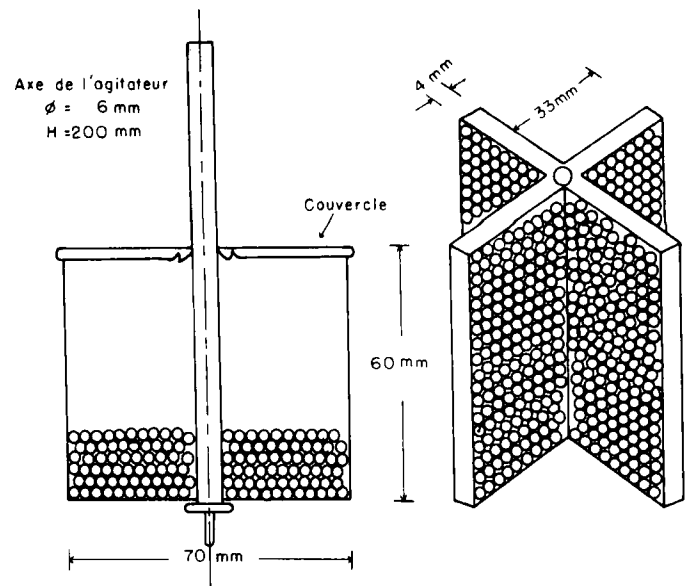


Figure 3 — Détails de l'agitateur.

Poulenc Industrie (SIGELAC). Le  $\beta$ -D-lactose venait de la société Eastman.

#### 1. PRÉPARATION DE LA LACTASE IMMOBILISÉE

Les particules d'enzyme ont été immobilisées sur des billes de silice poreuses, de 0.8 à 1.2 mm de diamètre, d'une porosité de 1050 Å. Tout le support catalytique a été aminé avec du  $\gamma$ -aminopropyl-triméthoxysilane par une méthode similaire à celle déjà décrite (Weetall et Havewala, 1972). L'enzyme a été ensuite fixée, par voie covalente, à l'aide du glutaraldéhyde, sur ces billes aminées, méthode aussi décrite dans le même article.

TABLEAU I  
Expressions des Inverses des Equations de Vitesse

Modèle 1	$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$
Modèle 2	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{K_s}{V_{\max} K_{p_1}} \frac{[P]}{[S]}$
Modèle 3	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{K_s}{K_{p_2} V_{\max}} \frac{[P]}{[S]} + \frac{[P]}{K_{p_2} V_{\max}}$
Modèle 4	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \left[ \frac{K_s}{K_{p_1} V_{\max}} + \frac{K_s}{K_{p_2} V_{\max}} \right] \frac{[P]}{[S]} + \frac{[P]}{K_{p_2} V_{\max}}$
Modèle 5	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{K'_s V_{\max}}$
Modèle 6	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{K'_s V_{\max}} + \frac{K_s}{K_{p_1} V_{\max}} \frac{[P]}{[S]}$
Modèle 7	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{K'_s V_{\max}} + \frac{[P]}{K_{p_2} V_{\max}} + \left[ \frac{K_s}{K_{p_1} V_{\max}} + \frac{K_s}{K_{p_2} V_{\max}} \right] \frac{[P]}{[S]}$
Modèle 8	$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{K'_s V_{\max}} + \frac{[P]}{K_{p_2} V_{\max}} + \left[ \frac{K_s}{K_{p_1} V_{\max}} + \frac{K_s}{K_{p_2} V_{\max}} \right] \frac{[P]}{[S]} + \frac{K_s}{K_{p_1} K_{p_2}} \frac{[P]^2}{[S]}$

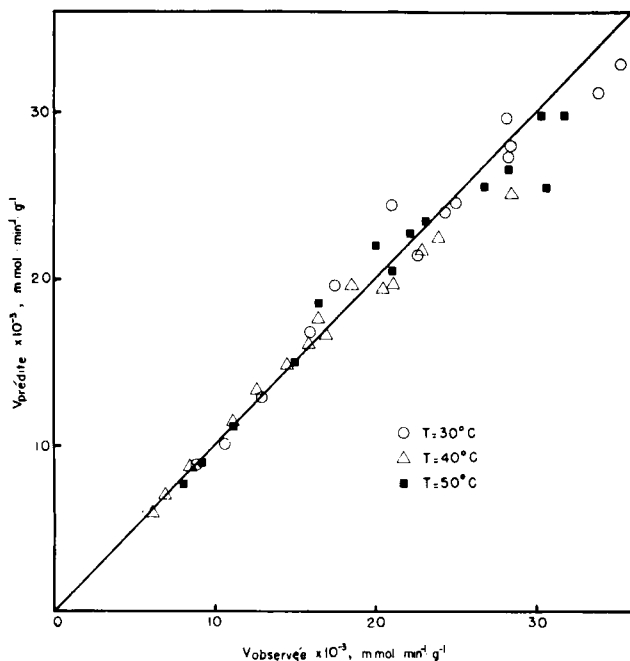


Figure 4 — Comparaison des vitesses prédites et expérimentales.

## 2. MÉTHODE D'ANALYSE

Les réactifs utilisés pour analyser le glucose provenaient de la compagnie Worthington (Statzyme 500). Le principe d'analyse consiste à employer un système d'enzymes couplées faisant intervenir l'oxydase et la peroxydase de glucose pour la détermination du glucose (Trinder, 1969). Le peroxyde ainsi obtenu par la décomposition du glucose par l'oxydase de glucose est ensuite uni à un chromophore. Le colorant ainsi formé a une absorbance maximum à 500 nm, éliminant ainsi la nécessité d'une mesure dans les fréquences U.V..

Le lactose a été déterminé par chromatographie en phase liquide à haute pression. L'acétonitrile et l'eau déminéralisée ont été les solvants utilisés, dans des proportions respectives de 80/20 (en % volume).

## 3. MONTAGE EXPÉRIMENTAL ET MODE OPÉRATOIRE

Le schéma du montage expérimental est présenté à la Figure 1. Le réacteur en plexiglas, de forme cylindrique, d'un volume de 450 cm<sup>3</sup> a été usiné d'un seul bloc pour assurer l'étanchéité. L'entrée de l'alimentation se fait au bas

du réacteur, tandis que la sortie est située en haut. Toutes les parties qui sont susceptibles d'entrer en contact avec le liquide sont soit en téflon, soit en acier inoxydable. L'agitation dans le réacteur est assurée par un panier grillagé en forme de croix dont l'axe est fixé à un moteur suspendu au-dessus du couvercle du réacteur. Le catalyseur est contenu dans les cages du panier. Ceci est illustré dans les Figures 2 et 3.

Sous une pression d'azote d'environ 1.5 atmosphère, le lactose préalablement préparé sort du réservoir d'alimentation, passe à travers un rotamètre pour entrer dans le réacteur plongé dans un bain thermostaté. Une vanne micro-métrique permet de régler le débit et on recueille l'échantillon hydrolysé à la sortie du réacteur, une fois que les conditions opératoires deviennent stables.

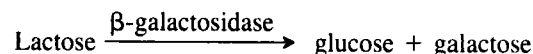
## 4. ETUDE HYDRODYNAMIQUE

Une étude hydrodynamique a d'abord été réalisée pour évaluer les caractéristiques de mixtion du réacteur. Le colorant, la rhodamine B, a été choisi comme traceur à cause de sa couleur intense et sa passivité biologique. A une vitesse optimale de rotation de 125 rpm, le réacteur possède un comportement très proche du cas d'un mélange parfait.

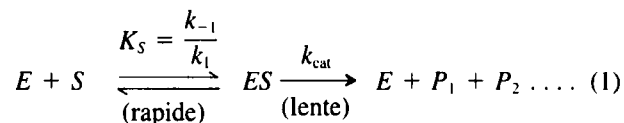
### Etude cinétique

#### 1. ETABLISSEMENT DU MÉCANISME GÉNÉRALISÉ

L'enzyme  $\beta$ -galactosidase catalyse l'hydrolyse de la liaison  $\beta$ -glycopyranosique du lactose pour libérer du glucose et du galactose.



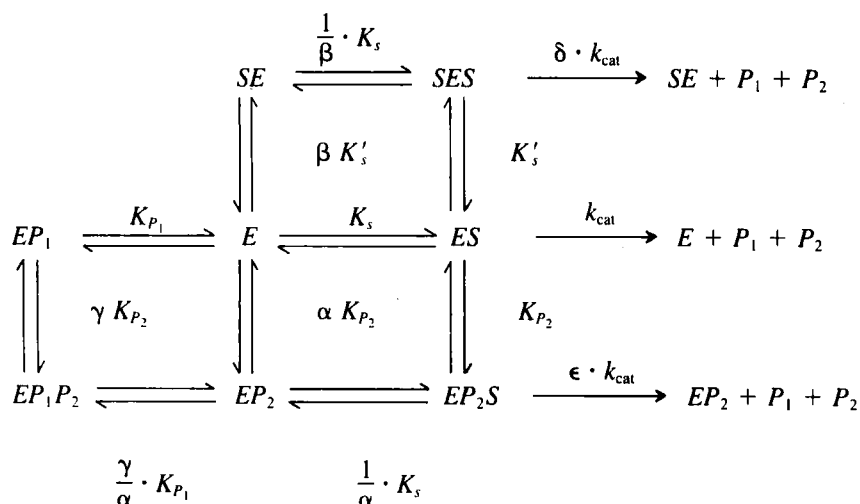
Cette réaction est généralement considérée comme une réaction en deux étapes ayant une constante de vitesse catalytique  $k_{\text{cat}}$ :



avec

$$[P_1] = [P_2] = [P]$$

Si on considère que le substrat  $S$  et les produits  $P_1$  et  $P_2$  peuvent inhiber la réaction, le schéma suivant d'un mécanisme généralisé peut être constitué (Siimer, 1978):



$$\begin{aligned}
K_s &= \frac{[E][S]}{[ES]} & \left(\frac{1}{\alpha}\right) \cdot K_s &= [EP_2][S]/[EP_2S] \\
K'_s &= [ES][S]/[SES] & \beta \cdot K'_s &= [E][S]/[SE] \\
\left(\frac{1}{\beta}\right) \cdot K_s &= [SE][S]/[SES] & K_{P_1} &= [E][P_1]/[EP_1] \\
\alpha \cdot K_{P_2} &= [E][P_2]/[EP_2] & K_{P_2} &= [ES][P_2]/[EP_2S] \\
\gamma \cdot K_{P_2} &= [EP_1][P_2]/[EP_1P_2] & \left(\frac{\gamma}{\alpha}\right) \cdot K_{P_1} &= [EP_2][P_1]/[EP_1P_2]
\end{aligned}$$

Suivant ce schéma, les complexes  $SES$  et  $EP_2S$  sont supposés être productifs. Les hypothèses qui permettent d'élaborer ce mécanisme généralisé sont:

1. le produit  $P_1$  inhibe de façon compétitive;
2. l'autre produit  $P_2$  inhibe de façon non compétitive;
3. le complexe  $EP_1P_2$  peut être formé à partir des complexes  $EP_1$  et  $EP_2$ ;
4. le substrat  $S$  peut jouer aussi un rôle d'inhibiteur; l'existence d'un complexe non productif,  $SE$ , est aussi prise en considération;
5. les équations sont correctes si  $k_{-1} \gg k_{cat}$ ; autrement la valeur de  $K_s$  doit être remplacée par la valeur de  $K_m$

$$K_m = \frac{k_{cat} + k_{-1}}{k_1} = K_s + \frac{k_{cat}}{k_1} \dots \dots \dots (2)$$

Les dix constantes d'équilibre sont définies comme des constantes de dissociation:

(see above)

## 2. MODÈLES CINÉTIQUES

Huit modèles ont été tirés du mécanisme généralisé. Seules les expressions finales des équations de vitesse sont données:

### 1) Pas d'inhibition

C'est le modèle le plus simple de Michaelis-Menten. L'équation de vitesse s'écrit:

$$v = \frac{k_{cat}[E_0][S]}{[S] + K_s} = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s} \dots \dots \dots (3)$$

### 2) Inhibition compétitive par le produit $P_1$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s \left[1 + \frac{[P]}{K_{P_1}}\right]} \dots \dots \dots (4)$$

### 3) Inhibition non compétitive par le produit $P_2$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s \left[1 + \frac{[P]}{K_{P_2}}\right] + \frac{[P][S]}{K_{P_2}}} \dots \dots \dots (5)$$

4) Inhibition compétitive par le produit  $P_1$ , inhibition non compétitive par le produit  $P_2$ , le complexe  $EP_1P_2$  n'est pas formé:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s \left[1 + \frac{[P]}{K_{P_1}} + \frac{[P]}{K_{P_2}}\right] + \frac{[P][S]}{K_{P_2}}} \dots \dots \dots (6)$$

### 5) Inhibition "incompétitive" par le substrat $S$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s + \frac{[S]^2}{K'_s}} \dots \dots \dots (7)$$

### 6) Inhibition "incompétitive" par le substrat $S$ , inhibition compétitive par le produit $P_1$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s \left[1 + \frac{[P]}{K_{P_1}}\right] + \frac{[S]^2}{K'_s}} \dots \dots \dots (8)$$

### 7) Inhibition par le substrat, inhibition compétitive par le produit $P_1$ inhibition non compétitive par le produit $P_2$

Pas de complexe  $EP_1P_2$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s \left[1 + \frac{[P]}{K_{P_1}} + \frac{[P]}{K_{P_2}}\right] + \frac{[S]^2}{K'_s} + \frac{[P][S]}{K_{P_2}}} \dots \dots (9)$$

### 8) Même type que dans le cas 7, mais le complexe $EP_1P_2$ est aussi formé:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s \left[1 + \frac{[P]}{K_{P_1}} + \frac{[P]}{K_{P_2}} + \frac{[P]^2}{K_{P_1}K_{P_2}}\right] + \frac{[S]^2}{K'_s} + \frac{[P][S]}{K_{P_2}}} \dots \dots \dots (10)$$

Les expressions des inverses des équations de vitesse sont regroupées dans le Tableau 1.

## 3. CORRÉLATION DES DONNÉES

Un programme de régression linéaire multiple qui existe dans la bibliothèque des programmes SPSS a été utilisé pour déterminer le mécanisme de l'hydrolyse du lactose. Chacune des équations hypothétiques de vitesse a été linéarisée par rapport aux paramètres cinétiques; on en vérifie ensuite l'ajustement par rapport aux données expérimentales à chaque température.

Pour être retenus tous les paramètres cinétiques du modèle doivent être positifs et ce, après avoir tenu compte de la déviation standard. Le manque d'ajustement du modèle aux

TABLEAU 2  
Discrimination des Modèles Suivant les Signes des Paramètres  $\beta_i$

T°C	B <sub>0</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	Modèle	Remarque
30	+	+						1	Accepté
40	+	+							
50	+	+							
30	+	+	+					2	Accepté
40	+	+	+						
50	+	+	+						
30	+	+		-	+			3	Rejeté
40	+	+		-	+				
50	+	+		-	+				
30	+	+	+	-	+			4	Rejeté
40	+	+	+	-	+				
50	+	+	+	-	+				
30	+	+				-		5	Rejeté
40	+	+				-			
50	+	+				-			
30	+	+	+			-		6	Rejeté
40	+	+	+			-			
50	+	+	+			-			
30	+	+	+	-	+	-		7	Rejeté
40	+	+	+	+	+	-			
50	+	+	+	+	+	-			
30	+	+	+	+	+	-	-	8	Rejeté
40	+	+	+	+	+	-	-		
50	+	+	+	+	+	-	-		

TABLEAU 3  
Estimation des Paramètres  
Modèle 1

Température °C	Paramètre $\beta_i$	Déviations standard
30	B <sub>0</sub> = 53.8	302.5
	B <sub>1</sub> = 3421.8	
40	B <sub>0</sub> = 41.6	130.4
	B <sub>1</sub> = 2303.4	
50	B <sub>0</sub> = 29.7	115.0
	B <sub>1</sub> = 1724.9	

TABLEAU 4  
Estimation des Paramètres  
Modèle 2

Température °C	Paramètre $\beta_i$	Déviations standard
30	B <sub>0</sub> = 29.8	275.8
	B <sub>1</sub> = 1598.4	
	B <sub>2</sub> = 498.3	
40	B <sub>0</sub> = 27.5	98.0
	B <sub>1</sub> = 1258.5	
	B <sub>2</sub> = 207.0	
50	B <sub>0</sub> = 19.1	119.4
	B <sub>1</sub> = 1021.2	
	B <sub>2</sub> = 108.0	

données (test F), sera une condition de rejet.

Une équation linéaire généralisée a pu être déduite du Tableau 1:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{K_s}{K_{P_1} V_{\max}} \frac{[P]}{[S]} + \frac{[P]}{K_{P_2} V_{\max}} + \frac{K_s}{K_{P_2} V_{\max}} \frac{[P]}{[S]} + \frac{[S]}{K_s' V_{\max}} + \frac{K_s}{K_{P_1} K_{P_2}} \frac{[P]^2}{[S]} \dots \dots (11)$$

dont la forme est:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 \dots \dots \dots (12)$$

avec

$$\beta_0 = \frac{1}{V_{\max}} \quad \beta_4 = \frac{K_s}{K_{P_2} V_{\max}}$$

$$\beta_1 = \frac{K_s}{V_{\max}} \quad \beta_5 = \frac{1}{K_s' V_{\max}}$$

$$\beta_2 = \frac{K_s}{K_{P_1} V_{\max}} \quad \beta_6 = \frac{K_s}{K_{P_1} K_{P_2}}$$

$$\beta_3 = \frac{1}{K_{P_2} V_{\max}}$$

Ce qui nous permet, d'après les résultats du programme de régression linéaire multiple, de discriminer les modèles cinétiques suivant les signes des paramètres  $\beta_i$  ainsi que l'amplitude de la déviation standard (Cf. Tableaux 2 à 4).

#### 4. ANALYSE DES RÉSULTATS

D'après l'analyse des résultats par la méthode de régression linéaire, l'ajustement des huit modèles résulte par une ou plusieurs constantes négatives excepté dans les deux premiers modèles (modèles 1 et 2). Les intervalles de confiance estimée pour chaque paramètre cinétique des modèles 3, 4, 5, 6, 7 et 8 n'incluent pas le zéro au niveau des 95% ( $\pm 2 \times$  déviation standard) aux trois températures. Ainsi, on peut conclure que les constantes négatives estimées sont différentes de zéro de façon significative. Ce qui nous a conduit à rejeter ces six derniers modèles.

Pour les modèles 1 et 2, deux critères permettent de déterminer les qualités d'ajustement.

i) Le degré de corrélation des paramètres,  $R^2$ , qui représente la précision de la prédiction.

$$R^2 = \frac{SC_{\text{rég}}}{SC_{\text{exp}}} = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}$$

D'après les résultats obtenus, le degré de corrélation du modèle 2 a toujours été supérieur à celui du modèle 1 à toutes les températures.

ii) Le manque d'ajustement (test F). Un test du manque d'ajustement pour les deux modèles 1 et 2 a été mené en comparant le carré moyen du manque d'ajustement  $S_i^2$  avec la variance de l'erreur pure  $Se^2$ . D'après l'analyse de la variance, le test F a montré qu'il existe un manque d'ajustement très significatif pour le modèle 1 au niveau de 95%.

Par conséquent, à partir de l'analyse statistique des données, on peut conclure que le modèle 2 est le modèle le plus probable pour représenter la réaction d'hydrolyse du lactose en glucose et galactose par de la  $\beta$  — galactosidase fixée sur de la silice dans la gamme de température comprise entre 30° et 50°C.

Les valeurs des paramètres cinétiques déduites du modèle 2 sont compilées dans le Tableau 5.

Les vitesses calculées à partir du modèle 2 sont ensuite comparées avec les valeurs expérimentales et portées sur les graphiques (Cf. Figure 4) pour différentes températures. La constante de vitesse  $k_{\text{cat}}$  semble obéir à la loi d'Arrhénius et s'exprime en fonction de la température par la relation:

TABLEAU 5  
Estimation des Paramètres Cinétiques du Modèle 2

T°C	$K_s$ mmol/L	$K_{P_1}$ mmol/L	$K_s/K_{P_1}$	$V_{max}$ mmol · min <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> (support)	$V_{max}^*$ mmol · min <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> (enzyme)
30	53.576	3.207	16.70	0.03352	1.926
40	51.918	5.53	9.39	0.04205	2.417
50	53.344	9.457	5.64	0.0522	3.00

\* Valeurs calculées en se basant sur la quantité d'enzyme fixée par gramme de support: 0.0174 g enzyme/g support.

$$\ln k_{cat} = -\frac{E_a}{RT} = -\frac{17.98}{RT} \dots \dots \dots (14)$$

avec

$$E_a = 17.98 \text{ kJ/mol}$$

### 5. Discussion

Si on compare les modèles 1 et 2, on peut constater que la constante de dissociation  $K_s$  dans le cas du modèle 2 est apparemment augmentée d'un facteur de  $(1 + [P]/K_{P_1})$ .

A partir du Tableau 5, il apparaît que:

— la constante de dissociation  $K_s$  reste pratiquement constante lorsque la température varie,  $K_s$  étant la mesure de la quantité d'enzyme liée au substrat  $S$  sous une forme ou une autre. Cette quantité d'enzyme reste fixe quelles que soient les conditions de température.

— la constante d'inhibition  $K_{P_1}$  semble augmenter avec la température selon la loi d'Arrhénus. Elle s'exprime en fonction de la température par la relation:

$$\ln K_{P_1} = f\left(\frac{1}{T}\right) \dots \dots \dots (15)$$

— la vitesse maximale,  $V_{max}$ , augmente aussi avec la température. Autrement dit, l'activité enzymatique varie avec la température.

On peut voir que lorsque la température augmente, l'inhibition par le galactose devient moins importante. Une façon de montrer l'importance de l'inhibition est de comparer les rapports  $K_s/K_{P_1}$ . A 30°C, ce rapport  $K_s/K_{P_1}$  a pour valeur 16.70, alors qu'à 40°C,  $K_s/K_{P_1}$  passe à 9.39 et enfin à 50°C,  $K_s/K_{P_1} = 5.64$ . Par conséquent, plus la température augmente, plus le rapport  $K_s/K_{P_1}$  diminue et moins l'inhibition est grande.

A titre de comparaison, (Hourigan, 1976) a trouvé un rapport  $K_s/K_{P_1} = 13.5$  en utilisant du lait écrémé comme substrat (50°C, pH 6.5). Pour une même température (50°C, pH 4.5), nous arrivons à un  $K_s/K_{P_1} = 5.64$ . D'un autre côté, (Paruchuri, 1976) obtient une valeur de  $K_s/K_{P_1} = 22.65$  à 30°C, pH 4.3 avec du lactose reconstitué comme substrat, l'enzyme utilisée étant la lactase d'une souche d'*Aspergillus niger*, immobilisée sur de l'alumine. Avec des conditions similaires, sauf que le support dans notre cas a été de la

silice, nous sommes arrivés à un rapport  $K_s/K_{P_1} = 16.70$ . Quoique l'inhibition par le galactose soit un peu moins importante dans la présente étude, nous pouvons constater qu'en dépit de conditions différentes (lactose soluble ou immobilisée, différents tampons, différents substrats, différents types de réacteurs), si nous utilisons la même souche de lactase et si nous travaillons au même pH, nous devrions arriver à des résultats comparables.

— la linéarité de la droite d'Arrhénus montre que la constante de vitesse  $k_{cat}$  obéit à la loi d'Arrhénus et confirme encore une fois la cinétique de la réaction.

— l'activité enzymatique a été préservée après 80 jours de fonctionnement. Une expérience témoin a été réalisée à intervalle régulier durant cette période pour vérifier ce fait. Okos (1975) a démontré que l'enzyme immobilisée pouvait retenir pratiquement toute son activité après 120 jours de fonctionnement continu.

### Conclusions

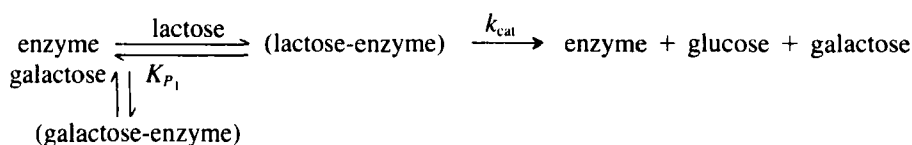
1) La cinétique de l'hydrolyse du lactose par la lactase, provenant d'une souche d'*Aspergillus Niger*, immobilisée sur de la silice peut être représentée par l'équation de vitesse suivante:

(see below)

Cette réaction qui est fortement inhibée par un des deux produits formés, la galactose, obéit à l'équation de Michaelis-Menten.

2) Les méthodes expérimentales utilisées dans cette étude permettent de travailler dans des conditions pratiquement isothermiques. L'utilisation combinée des techniques de chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et enzymatique (Statzyme 500) rendent possible une analyse précise des produits de la réaction. L'utilisation d'un réacteur agité de type réservoir muni d'un agitateur à panier permet d'éliminer les effets de transfert de masse et de gradient de température. L'utilisation d'un support relativement peu poreux minimise les effets de diffusion interne qui autrement pourraient masquer la cinétique réelle de la réaction.

3) Les techniques de régression linéaire s'avèrent suffisantes pour analyser les résultats expérimentaux et permettent de déduire tous les paramètres cinétiques.



## Nomenclature

$[E_0]$  = concentration totale de l'enzyme, g(enzyme)/g(support)  
 $[E]$  = concentration de l'enzyme, g(enzyme)/g(support)  
 $E_a$  = énergie d'activation, kJ/mol  
 $k_1$  = constante de vitesse de réaction,  $\text{min}^{-1}$   
 $k_{-1}$  = constante de vitesse de la réaction inverse,  $\text{min}^{-1}$   
 $k_{cat}$  = constante de vitesse catalytique,  $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  (enzyme)  
 $K_m$  = constante de Michaelis-Menten, mmol/L  
 $K_{P_1}$  = constante d'inhibition du produit  $P_1$ , mmol/L  
 $K_{P_2}$  = constante d'inhibition du produit  $P_2$ , mmol/L  
 $K_s$  = constante d'association du substrat, mmol/L  
 $K'_s$  = constante d'association du complexe  $ES$ , mmol/L  
 $[S]$  = concentration du substrat, mmol/L  
 $SC_{reg}$  = somme des carrés des résidus prédits par le modèle  
 $SC_{exp}$  = somme des carrés des résidus observés  
 $S_i^2$  = carré moyen du manque d'ajustement  
 $S_e^2$  = variance de l'erreur pure  
 $v$  = vitesse de réaction,  $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  (catalyseur)  
 $V_{max}$  = vitesse maximum de réaction,  $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  (catalyseur)

## Bibliographie

- Hinberg, I., Korus, R., et O'Driscoll, K. F., *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 943 (1974).  
Hourigan, J. A., "Kinetic Studies of the Enzymic Hydrolysis of Lactose", Thèse Ph.D. (1976), Zerox University Microfilms: No. 77-13, 478.  
Okos, M., Thèse Ph.D., "Reactor Design for the Hydrolysis of Lactose in Acid Milk Whey Using  $\beta$ -Galactosidase Immobilized on a Porous Phenol-Formaldehyde Resin" (1975), University Microfilm International, Order No. 76-3513.  
Paruchuri, E., Thèse Ph.D., "Hydrolysis of Lactose in Acid Whey Using Immobilized Lactose", (1976), University Microfilms International, Order No. 76-21826.  
Roberts, H. R. et Pellenati, I. D., *J. Agric. Food Chem.* **5**, 130 (1957).  
Siimer, E., *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1853 (1978).  
Trinder, P., *Ann. Clin. Biochem.* **6**, 24 (1969).  
Weetall, H. H. et Havewala, N. B., *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **3**, 241, (1972).  
Weetall, H. H. et al., *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 689 (1974a).  
Weetall, H. H., Havewala, N. B., Pitcher, W. H., Detar, C. C., Vann, N. P., Yaverbawm, S., *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 295 (1974b).  
Weetall, H. H., *Cereal Foods World* **21**, 581 (1976).  
Woychik, I. H. et Wondolowski, M. V., *Biochim. et Biophys. Acta* **289**, 347 (1972).  
Woychik, I. H., Wondolowski, M. V. et Dahl, K. J., (1974), "Preparation and Application of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase of *Saccharomyces Lactis*" dans "Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes", Ed. Olson, A. C. et Cooney, C. L., p. 41, Plenum Publishing Corp., New York.

Manuscript received April 6, 1982; revised manuscript received September 3, 1982; accepted for publication November 5, 1982.