



N° D'ORDRE : D..... /2018

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES
OPTION : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Présentée par
Hadjer ZAAK

Thème

**Amélioration de la stabilité des enzymes par moyen
d'immobilisation : cas des hydrolases**

Soutenance le : 28 /06/ 2018

Devant le jury :

M. DELLAL.A	Professeur, U. Ibn Khaldoun Tiaret	Président
M.SASSIM	MCA, U. Ibn Khaldoun Tiaret	Directeur de Thèse
M. BEKKADA A.M. A.	Professeur, C. U. Tissemsilt	Examineur
M. BOUSALEM.S	Professeur, C.U. Temouchent	Examineur
M. AZIOUNE. A	MCA, CRBt. Constantine	Examineur
M. HADJ SAID.A	MCA, U. Ibn Khaldoun Tiaret	Examineur

RESUME

L'étude porte sur l'amélioration de la stabilité enzymatique, considérée comme un facteur majeur dans l'application des enzymes et leur réutilisation dans les processus industriels. Pour ce fait, des stratégies ont été développées dans ce travail en appliquant des techniques d'immobilisation et de post-immobilisation sur quelques hydrolases.

La lipase de *Thermomyces lanuginosus*(TLL) et la phospholipase Lecitase Ultra (LU) ont été immobilisée sur l'Octyl d'agarose (OC) par interaction hydrophobe à faible force ionique, puis des liaisons covalentes ont été employées pour renforcer d'une part l'attachement des molécules enzymatiques au support et limiter d'autre part leur désorption durant les inactivations thermiques. Le taux de chargement enzymatique et le type de liaisons employées ont été pris en considération durant l'immobilisation et leur effet sur l'activité et la stabilité des lipases a été étudié.

Une étude de réutilisation du biocatalyseur est faite sur trois cycles de réactions comprenant l'inactivation thermique/la désorption de la β -galactosidase co-immobilisée par échange ionique sur la lipase déjà adsorbée sur l'Octyl, modifiée et revêtue par PEI.

Les résultats de cette étude montrent que:

- L'activité enzymatique est significativement augmentée après l'immobilisation des lipases par simple adsorption hydrophobe grâce à leur capacité d'activation interfaciale.
- L'effet du chargement enzymatique est suggéré positif dans certains cas, et négatif dans d'autres, ce qui le rend une variable critique lors de l'utilisation de supports poreux.
- Les modifications chimiques ont produit des stabilisations importantes, notamment en utilisant des biocatalyseurs avec un chargement enzymatique élevé. Ainsi, l'utilisation de liaisons covalentes a confirmé que la principale différence entre les biocatalyseurs à haute et basse charge est le nombre de molécules impliquées dans la réticulation intermoléculaire.
- La double modification semble être utile pour améliorer la stabilité enzymatique, et peut donc être une option appropriée pour être utilisée dans la coimmobilisation enzymatique décrite comme moyen de réutilisation de support dans la troisième partie de la présente étude.
- L'activation du support par des groupes aldéhydes a permis de fixer de manière covalente les molécules du polyéthylèneimine PEI (environ 90%), en empêchant leur désorption des lipases même à force ionique élevée (6M) tout en permettant la réutilisation de LU et de TLL immobilisées pendant trois cycles d'inactivation/désorption de la β -galactosidase, avec une activité maintenue à 90 % après le troisième cycle de réaction.

Mots clés : Hydrolase, Octyl agarose, immobilisation, stabilisation, désorption, réutilisation, liaisons covalentes.

ABSTRACT

The study focuses on improving enzymatic stability, which is considered as a major factor in the application of enzymes and their reuse in industrial processes. For this reason, strategies have been developed in this work by applying immobilization and post-immobilization techniques on some hydrolases.

Thermomyces lanuginosus lipase (TLL) and Lecitase Ultra phospholipase (LU) were immobilized on Octyl agarose (OC) by a hydrophobic interaction at low ionic strength, followed by covalent bonds to enhance attachment of enzymatic molecules to the support and limit their desorption during thermal inactivations. The rate of enzymatic loading and the type of bonds used were considered during immobilization and their effect on the activity and stability of the lipases was studied.

A reuse study of the biocatalyst was carried out over three cycles of reactions including the thermal inactivation / desorption of the coimmobilized β -galactosidase by ionic exchange on the lipase already adsorbed on modified and coated Octyl support with PEI.

The results of this study show that:

- The enzymatic activity increased significantly after the immobilization of the lipases by simple hydrophobic adsorption thanks to their interfacial activation capacity. The effect of enzymatic loading has been suggested positive in some cases, and negative in others, which makes it a critical variable when using porous supports.
- The chemical modifications tested have produced significant stabilizations, in particular when using biocatalysts with a high loading. The use of covalent bonds confirmed that the main difference between high and low charge of biocatalysts is the amount of molecules involved in intermolecular cross-linking.
- The double modification seems to be useful to improve the enzymatic stability with a rare effect on catalytic activity and may therefore be an appropriate option for use in the enzymatic co-immobilization strategy described as a mean of reuse in the third section of the study.
- The activation of the support by aldehyde groups made it possible to fix covalently the polyethylenimine molecules PEI, preventing their desorption (about 90%) from the lipases even at high ionic strength (6M NaCl) while allowing the reuse of immobilized TLL and LU for three β -galactosidase inactivation / desorption cycles, with activity maintained at 80 %, after the third reaction cycle.

Key words: Hydrolase, Octyl agarose, immobilization, stabilization, desorption, reuse, covalent attachment.

AVANT-PROPOS

Je remercie du fond de moi-même Dieu tout puissant d'avoir facilité mes travaux de thèse et mes contacts avec des enseignants et des chercheurs algériens et étrangers, qui m'ont beaucoup aidé jusqu'à atteindre la fin de ce travail. A cet effet, mes vifs remerciements et ma sincère gratitude sont adressés à :

Monsieur Mohamed Sassi, Maître de conférences A à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie-Université de Tiaret, d'avoir accepté de diriger mes travaux de recherche avec la rigueur scientifique. Je vous remercie particulièrement pour vos encouragements, votre soutien constant, pour m'avoir laissé énormément d'autonomie, et m'avoir fait confiance quant à l'avancée de ma recherche. Votre gentillesse et votre pédagogie m'ont été d'un grand apport. Que vous trouvez ici, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur R. Fernandez-Lafuente, Directeur de recherche à l'Institut de Pétro-Chimie ICP-CSIC à Madrid qui, a répondu favorablement à ma demande de stage de formation où j'ai pu apprendre les différentes techniques d'immobilisation enzymatique. A cet effet, je lui remercie de tout mon cœur ainsi que son aimable équipe qui ont eu l'extrême gentillesse de m'accueillir au sein de leur laboratoire. Je leur exprime ma reconnaissance pour leur savoir scientifique qu'ils m'ont transmis, leurs critiques constructives et leurs encouragements.

Monsieur Abdelkader Dellal, Professeur à l'Université de Tiaret, qui nous a fait l'honneur d'avoir accepté la présidence de ce jury. Nous avons beaucoup admiré la profondeur de ses connaissances et sa modestie. Nous lui demandons de trouver ici, l'expression de notre profond respect et le témoignage de nos sincères remerciements

Monsieur Ammar Azioune, Directeur du Centre de recherche en Biotechnologie (CRBt) et Maître de recherche A à l'École nationale de Biotechnologie (ENSB) de Constantine et, qui a bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail. J'ai toujours admiré et apprécié son dévouement et sa compétence. Qu'il trouve dans ce présent travail, l'expression de ma considération respectueuse.

Monsieur Ahmed Ali Bekkada, Professeur au Centre Universitaire de Tissemsilt. Nous le remercions pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de notre jury de thèse, nous connaissons son savoir et son savoir-faire dans la matière.

Monsieur Smain Bousalem, Professeur au Centre universitaire d'Ain Temouchent. Nous sommes très honorés de le compter parmi nos examinateurs, nous le remercions pour l'intérêt qu'il porte à notre travail en acceptant de l'évaluer. Qu'il trouve ici l'expression de notre vive reconnaissance.

Monsieur Aissa Hadj Said, Maître de conférences A à l'Université de Tiaret. Nous le remercions vivement d'être parmi nos examinateurs. Nous connaissons sa compétence et sa patience. Qu'il trouve dans ce présent travail, l'expression de notre grand respect et notre profonde considération.

Je tiens à remercier Monsieur Abdenbi Mimouni, Professeur et Vice-Recteur de l'Université de Tiaret et à Monsieur Djillali Guemour, Maître de conférences A et Vice-Doyen de la faculté des Sciences et de la Nature, Université de Tiaret pour leur soutien et leur aide afin de mener à bien mon sujet de recherche. Pour cela ainsi que pour leur disponibilité, je leur exprime ma gratitude et mon respect.

Un immense merci à mes chers parents, notamment mon père qui m'a toujours soutenu et m'a beaucoup aidé afin d'accomplir tous mes travaux de recherche depuis la graduation, à mes chères sœurs et frères qui, à aucun moment n'ont cessé de m'encourager pour l'achèvement de ma thèse.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES ABREVIATIONS	
INTRODUCTION GENERALE	

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES HYDROLASES ET LEURS APPLICATIONS

I. Généralités sur les enzymes.....	1
I.1. Définition et source	1
I.2. Structure des enzymes	2
I.3. Propriétés des enzymes	3
I.4. Classification et nomenclature	3
II. Les enzymes hydrolytiques	4
II.1. Lipases	4
II.1.1. Propriétés des lipases et application.....	4
II.1.2. La lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	6
II.1.3. Les phospholipases.....	6
II.1.4. Mécanisme d'action des lipases	8
II.1.4.1. Réaction d'hydrolyse	8
II.1.4.2. Réaction de synthèse	8
II.1.4.2.1. Estérification	8
II.1.4.2.2. Transestérification.....	9
II.1.4.2.3. Interestérification	10
II.2. La β -galactosidase.....	11
II.2.1. Mécanisme d'action des β -galactosidases.....	12
II.2.1.1. Réaction d'hydrolyse	12
II.2.1.2. Réaction de synthèse	13
II.2.1.2.1. Transgalactosylation	13
III. Application industrielle des biocatalyseurs	14
III.1. Avantages et limites d'utilisation industrielle des enzymes	15

CHAPITRE II : STRATEGIES POUR LA STABILISATION DES ENZYMES

I. Stabilisation des biocatalyseurs	17
I.1. Définition de la stabilité enzymatique	17
I.2. Formes de stabilité.....	17
II. Stratégies de stabilisation des enzymes	18
II.1. Sources naturellement thermophiles	18
II.2. Stabilisation par modification chimique	19
II.3. Stabilisation contre les solvants organiques.....	19
II.4. Stabilisation par immobilisation enzymatique	20
II.4.1. Différentes techniques d'immobilisation	21
II.4.1.1. Méthodes réversibles	21
II.4.1.1.1. Adsorption	22
II.4.1.1.1.1. Interaction physique.....	22
II.4.1.1.1.2. Interaction hydrophobe	23
II.4.1.1.1.3. Interaction par affinité	24
II.4.1.1.1.4. Interaction ionique	24
II.4.1.2. Méthodes irréversibles	24
II.4.1.2.1. Inclusion.....	25
II.4.1.2.2. Liaisons covalentes	26
II.4.1.2.3. Réticulation (Cross-linking)	27
II.4.2. Avantages de la technologie d'immobilisation	29
II.4.3. Propriétés des enzymes immobilisées	29
II.4.4. Facteurs influençant l'immobilisation enzymatique	30
II.4.4.1. Force ionique	30
II.4.4.2. pH et temps de réaction	30
II.4.4.3. Chargement enzymatique	31
II.4.4.4. Nature du support.....	31
II.4.5. Supports d'immobilisation	31
II.4.5.1. Sélection des supports appropriés.....	32
II.4.5.2. Différents types de supports utilisés dans l'immobilisation	33
II.4.5.2.1. Supports inorganiques.....	33

II.4.5.2.2. Supports organiques.....	35
II.4.5.2.2.1. Polymères naturels.....	36
II.4.5.2.2.2. Polymères synthétiques.....	37
II.4.5. Stabilisation des enzymes multimériques par immobilisation.....	38
II.5. Stabilisation opérationnelle des enzymes par immobilisation	39
III. Application des enzymes immobilisées.....	39

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

I. Objectif du travail.....	42
II. Matériel et Méthodes.....	42
II.1. Matériel utilisé	42
II.2. Réactifs utilisés	42
II.3. Méthodes.....	43
II.3.1. Effet du chargement enzymatique sur la stabilité enzymatique.....	43
II.3.1.1. Préparation du support Octyl agarose (OC).....	43
II.3.1.2. Immobilisation de la lipase sur l'Octyl agarose.....	43
II.3.1.3. Détermination de l'activité enzymatique de lipase	44
II.3.1.4. Etude de la thermo-stabilité des dérivés enzymatiques	44
II.3.1.4.1. Effet de la température et du pH.....	44
II.3.1.4.2. Effet de la force ionique.....	44
II.3.1.4.3. Effet de la glycérine	45
II.3.2. Effet de la modification chimique de l'enzyme sur la stabilité enzymatique.....	45
II.3.2.1. Préparation des dérivés enzymatiques	45
II.3.2.2. Modification par un agent bifonctionnel	45
II.3.2.2.1. Réduction des liaisons	45
II.3.2.3. Modification par le polymère ionique	46
II.3.2.4. Etude de la thermo-stabilité des différentes préparations enzymatiques.....	46
II.3.2.4.1. Effet de la température et du pH.....	46
II.3.2.4.2. Effet du solvant organique	46
II.3.2.5. Analyse électrophorétique par SDS-PAGE	46

II.3.3. Etude de la stabilité opérationnelle des dérivés enzymatiques.....	47
II.3.3.1. Préparation du support Octyl glyoxyl agarose (OCGLX)	47
II. 3.3.2. Préparation des dérivés enzymatiques	48
II. 3.3.3. Modification par glutaraldehyde (OCGLX-E-GLU).....	48
II. 3.3.4. Revêtement ionique par PEI (OCGLX-E-GLU-PEI)	48
II. 3.3.5. Co-immobilisation de la β -galactosidase par échange d'ions	49
II. 3.3.6. Détermination de l'activité de la β -galactosidase	50
II. 3.3.7. Etude de la réutilisation du biocatalyseur	50
II. 3.3.7.1. Cycles d'inactivation de la β -galactosidase	50
II. 3.3.7.2. Désorption de la β -galactosidase à partir de l'OCGLX-Lipase-PEI	51
II. 3.3.7.3. Rechargement enzymatique	51
II. 3.3.7.4. Titration de groupes amines primaires par TNBS	51

CHAPITRE IV : RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Evaluation de l'effet de quelques paramètres sur la thermo-stabilité enzymatique	52
I.1. Effet du chargement enzymatique sur la stabilité enzymatique	52
I.1.1. Immobilisation de TLL sur l'Octyl agarose	52
I.1.2. Inactivation thermique des dérivés enzymatiques	54
I.1.2.1. Effet du pH et température	54
I.1.2.2. Effet de la force ionique	57
I.1.2.3. Effet de la glycérine.....	59
I.2. Effet de la modification chimique	61
I.2.1. Cinétique d'immobilisation sur l'OC	61
I.2.2. Effet de la modification par PEI et glutaraldehyde sur l'activité enzymatique.....	64
I.2.3. Effet de la modification sur la thermo-stabilité enzymatique.....	65
I.2.3.1. Effet du pH et de température	65
I.2.3.2. Effet des modifications en présence du solvant organique	69
I.2.4. Analyse électrophorétique par SDS-PAGE.....	72
I.3. Etude de la stabilité opérationnelle des préparations enzymatiques.....	75
I.3.1. Prévention de la désorption de PEI	75
I.3.2. Immobilisation de la β -galactosidase sur les différents composites PEI.....	76
I.3.3. Stabilité thermique des dérivés enzymatiques.....	78

I.3.4. Cycles de réutilisation des dérivés enzymatiques.....	79
--	----

CHAPITRE V : DISCUSSION

I. Evaluation de l'effet de quelques paramètres sur la thermo-stabilité enzymatique	82
I.1. Effet du chargement enzymatique sur la stabilité thermique	82
I.1.1. Immobilisation de TLL sur l'Octyl agarose.....	82
I.1.2. Stabilité thermique des différentes préparations TLL.....	82
I.1.2.1. Effet du pH et de température.....	82
I.1.2.2. Effet de la force ionique	83
I.1.2.3. Effet de la glycérine	84
I.2. Effet de la modification chimique	84
I.2.1. Effet des modifications sur l'activité des différentes préparations	84
I.2.2. Effet des modifications sur la thermo-stabilité enzymatique	85
I.2.3. Effet des modifications en présence du solvant organique	87
I.2.4. Analyse électrophorétique par SDS-PAGE.....	87
I.3. Etude de la stabilité opérationnelle des préparations enzymatiques.....	89
I.3.1. Prévention de la désorption du PEI	89
I.3.2. Immobilisation de la β -galactosidase sur les différents composites PEI	90
I.3.3. Stabilité thermique des dérivés enzymatiques	90
I.3.4. Cycles de réutilisation des dérivés enzymatiques	91

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES PUBLICATIONS

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Structure ouverte et fermée de la lipase	4
Figure 02: Les liaisons hydrolysées par les différentes phospholipases.....	7
Figure 03: Hydrolyse des triglycérides par la lipase.....	8
Figure 04: Schéma général de la réaction d'estérification.....	9
Figure 05: Réaction de transésterification des triglycérides	10
Figure 06: Schéma général de l'interésterification	10
Figure 07: Mécanisme d'action de la β -galactosidase dans l'hydrolyse du lactose.	12
Figure 08: Formation d'oligosaccharides par β -galactosidase	13
Figure 09: Différentes techniques d'immobilisation.	21
Figure 10: Méthodes d'immobilisation réversibles	22
Figure 11: Immobilisation de la lipase via activation interfaciale sur un support hydrophobe	23
Figure 12: Méthodes d'immobilisation irréversibles.....	25
Figure 13: Immobilisation des enzymes par attachement covalent sur un support activé....	26
Figure 14: Effet de l'immobilisation par liaison covalente sur la stabilité des enzymes.....	27
Figure 15: Formation d'agrégats d'enzymes réticulées (CLEAs) par différentes façons.....	29
Figure 16: Immobilisation des enzymes sur un polymère	38
Figure 17: Préparation du support OCGLX.....	48
Figure 18: Protocole d'immobilisation de lipase sur le support OC-GLX par liaisons covalentes.....	49
Figure 19: Protocole de co-immobilisation de la β -galactosidase sur les lipases après modification par un polymère ionique.....	50
Figure 20: Cinétique d'immobilisation de 1mg de TLL/g d'OC.	53
Figure 21: Cinétique d'immobilisation de 6 mg de TLL/ g d'OC.	54
Figure 22: Cinétique d'immobilisation de 30 mg de TLL/g d'OC.	54

Figure 23 : Cinétiques d'inactivation thermique des dérivés OC-TLL à pH 5,0 et T 70 °C.	56
Figure 24 : Cinétiques d'inactivation thermique des dérivés OC-TLL à pH 7,0 et T 70 °C.	56
Figure 25 : Cinétiques d'inactivation thermique des dérivés OC-TLL à pH 9,0 et T 60 °C.	57
Figure 26 : Effet de la force ionique sur la thermo-stabilité des préparations TLL	58
Figure 27 : Effet de la force ionique et de la glycérine sur la stabilité thermique de BrCN-agarose-TLL.....	58
Figure 28 : Effet de 30% de glycérine sur la stabilité des différents dérivés OC-TLL	60
Figure 29 : Effet 60% de glycérine sur la stabilité des différents dérivés OC-TLL	60
Figure 30 :Cinétique d'immobilisation de 2 mg TLL/g d'OC.....	62
Figure 31 : Cinétique d'immobilisation de 8 mg TLL/g d'OC.....	62
Figure 32 : Cinétique d'immobilisation de 2 mg LU/g d'OC.....	63
Figure 33 : Cinétique d'immobilisation de 8 mg LU/g d'OC.....	63
Figure 34 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-LU à pH 5,0 et T 52 °C.....	66
Figure 35 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-LU à pH 7,0 et T50°C.....	67
Figure 36 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-LU à pH 9,0 et T 50 °C	67
Figure 37 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-TLL à pH 5,0 et T 73 °C	68
Figure 38 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-TLL à pH 7,0et T 70.5°C	68
Figure 39 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-TLL à pH 9,0 et T 65°C	69
Figure 40 : Cinétiques d'inactivation d'OC-LU dans 30% d'acétonitrile à pH 7,0 et T 25°C.	71
Figure 41 : Cinétiques d'inactivation d'OC-TLL dans 60% de dioxane à pH 7,0 et T 40°C.	71
Figure 42 : Analyse SDS-PAGE d'OC-LU faiblement chargés.	73
Figure 43 : Analyse SDS-PAGE d'OC-LU fortement chargés.....	73
Figure 44 : Analyse SDS-PAGE d'OC-TLL faiblement chargés.	74
Figure 45 : Analyse SDS-PAGE d'OC-TLL fortement chargés.....	74
Figure 46 :Cinétique d'immobilisation de1 mg de β -galactosidase/g d'OCGLX-PEI.....	76
Figure 47 :Cinétique d'immobilisation de 1 mg de β -galactosidase/ g d'OCGLX-LU-GLU-PEI.....	77

Figure 48 : Cinétique d'immobilisation de 1 mg de β -galactosidase/ g d'OCGLX-TLL-GLU-PEI.....	77
Figure 49: Cinétiques d'inactivation d'OCGLX-LU-GLU-PEI- β -galactosidase	78
Figure 50: Cinétiques d'inactivation d'OCGLX-TLL-GLU-PEI- β -galactosidase	79
Figure 51: Cycles d'inactivation/désorption d'OCGLX-LU-GLU-PEI- β -galactosidase à pH 7,0 et T 50°C.....	81
Figure52 : Cycles d'inactivation/désorption d'OC-GLX-TLL-GLU-PEI- β -galactosidase à pH 7,0 et T 50°C.....	81
Figure 53: Courbe d'étalonnage des protéines (BSA)	Annexe 1
Figure 54: Courbe d'étalonnage du Para-nitrophénol (PNP)	Annexe 1
Figure 55 : Courbe d'étalonnage d'ortho-nitrophénol (ONP)	Annexe 1

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste de quelques enzymes industrielles importantes et leurs sources	1
Tableau 2 : Différentes formes de lipases commerciales et domaine d'application	5
Tableau 3 : Sources et propriétés de quelques lactases commercialisées.....	11
Tableau 4 : Les enzymes industrielles et secteurs d'utilisation.....	14
Tableau 5: Supports inorganiques utilisés pour l'immobilisation des enzymes.....	34
Tableau 6: Supports organiques utilisés pour l'immobilisation des enzymes.....	35
Tableau 7 : Activité relative (%) des différentes préparations TLL immobilisées.	52
Tableau 8 : Demi-vies (en minutes) des différents biocatalyseurs sous différentes conditions.....	59
Tableau 9: Activité relative (%) des différentes préparations TLL/LU immobilisées	61
Tableau 10 : Effet des différents traitements sur l'activité des biocatalyseurs	64
Tableau 11 : Absorbance relative (%) des différents supports analysés avec TNBS.....	70
Tableau 12: Demi-vies (en minutes) des différents biocatalyseurs sous différentes conditions.....	75
Tableau 13: Absorbance relative (%) des différents dérivés co-immobilisés testés à l'aide du TNBS.	80

LISTE DES ABREVIATIONS

A° : Ångström

Abs : Absorbance

ACN : Acétonitrile

ATP : Adénosine triphosphate

BCL : Beads Cross Linked

BrCN : Bromure de cyanogène

BSA : Bovine sérum albumine

C : Concentration

CALB : Lipase de *Candida antarctica*

-COOH : Groupe carboxyle

CLEA: Cross Linked Enzyme Aggregates

CLEC: Cross Linked Enzyme Cristals

DEAE : Diethylaminoethanol

fdil :Facteur de dilution

GOS : Galactose-oligosaccharides

GLU: Glutaraldehyde

GLX : Glyoxyl agarose

HCl : Acide hychloridrique

KDa : KiloDalton

LMW:Poids moléculaire faible (Low molecular weight)

LU : Lecitase Ultra

M : Molarité

mM : Millimolaire

MCE : Mércaptoethanol

MW :Poids moléculaire (molecular weight)

NaBH₄ : Borohydrure de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaIO₄ : Périodate de sodium

-NH₂ : Groupe amine

OC : Octyl sépharose

OCGLX: Octyl glyoxyl agarose

ONP :Ortho-nitrophénol

ONPG:Ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside

PEI: Polyethylenimine

PNP : Para-nitrophénol

p-NPB : Para-nitrophényl- β -D-butyrate

PSA : Persulfate d'ammonium

R : Radical

SDS-PAGE : Sigle anglophone de sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis

T : Température

t : Temps d'essai

T₅₀ : Temps de demi-vie

TEMED : Tétraméthyléthylénédiamine

TLL: Lipase de *Thermomyces lanuginosa*

TNBS:Acide 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonique

Tris : Trisma base

UI : Unité Internationale

V : Volt

v_e : Volume de l'enzyme

v_f : Volume final

v/v : volume/volume

w:v: masse/volume

ϵ : Coefficient d'extinction molaire

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation d'un catalyseur relativement coûteux comme les enzymes nécessite, dans de nombreux cas, sa récupération et sa réutilisation pour un processus économiquement réalisable. Cependant, l'idée de réutilisation enzymatique signifie que la stabilité de la préparation enzymatique finale doit être suffisamment élevée pour permettre son utilisation de nouveaux dans d'autres opérations d'hydrolyse ou de synthèse.

L'immobilisation est une ancienne technique qui a trouvé son application ces dernières années et qui est devenue une exigence pour l'utilisation de la plupart des enzymes en tant que biocatalyseurs dans les processus industriels, comme elle est considérée utile pour la séparation des enzymes du milieu réactionnel à la fin du processus et leur réutilisation de nouveau.

Les lipases sont parmi les hydrolases les plus utilisées en biocatalyse suite à leur grande spécificité à de nombreux substrats et à leur capacité de catalyser de nombreuses réactions différentes. Comme la plupart des enzymes, l'utilisation des lipases nécessite leur immobilisation afin d'assurer leur récupération u milieu réactionnel.

L'adsorption des enzymes est la méthode d'immobilisation la plus simple et la plus économique. Dans le cas des lipases, cet attachement se fait sur n'importe quelle surface hydrophobe, que se soit une protéine ou un support présentant ce caractère. De cette manière, les lipases sont immobilisées de façon sélective à faible force ionique grâce au phénomène d'activation interfaciale, qui les caractérise, avec la surface du support en passant de la forme fermée à une forme ouverte plus stable. A cet égard, l'immobilisation sur un support hydrophobe tel que l'Octyl agarose est un bon moyen pour la purification et l'hyper-activation de nombreuses lipases et par conséquent l'augmentation de leur stabilité.

Cette méthode d'immobilisation est donc efficace et très utile, mais la désorption des molécules enzymatiques depuis le support dans des conditions drastiques comme les températures élevées, la présence de concentrations élevées de solvants organiques constitue un inconvénient majeur faisant appel à l'emploi de techniques post-immobilisations.

En plus, de telles conditions peuvent affecter non seulement l'activité catalytique et même la stabilité enzymatique. Ce facteur qui présente un critère majeur au niveau fonctionnel et qui peut être, dans la plupart des cas, la cause dans la limite de l'application enzymatique dans différents processus. Pour ce fait, la méthode et le support d'immobilisation choisis et le protocole développé doivent être appropriés afin d'obtenir la stabilité désirée.

Dans ce contexte, l'amélioration de la stabilité (thermique et opérationnelle) des enzymes étudiées est l'objectif ciblé. Pour atteindre au résultat voulu, des techniques d'immobilisation et post-immobilisation sont employées tout en prenant en considération l'effet de certains paramètres pouvant affecter ce par ce facteur:

- Le taux de chargement enzymatique ;
- Force ionique ;
- Solvants organiques ;
- La modification chimique de l'enzyme et de support;

Cela aura un impact significatif dans le développement de toute préparation enzymatique immobilisée et sur la performance de cette dernière. En effet, de nombreux efforts sont faits pour maintenir les avantages du protocole d'immobilisation utilisé en limitant la désorption enzymatique dans le milieu réactionnel.

PARTIE I :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

**GENERALITES SUR LES HYDROLASES
ET LEURS APPLICATIONS**

I. Généralités sur les enzymes :

I.1. Définition et source :

Les enzymes sont des protéines dotées de capacités catalytiques leur permettant d'intervenir dans certaines réactions biochimiques en les accélérant sans affecter le produit final. Ces biocatalyseurs actuellement utilisés à des fins de recherche ou pour des applications industrielles proviennent de différentes origines végétale, animale ou microbienne (voir le tableau 1). En général, ceux d'origine microbienne sont les plus utilisés à l'échelle industrielle. Ils peuvent être dérivés de bactéries, de levures ou de moisissures, ce qui leur permet d'opérer dans différentes conditions de pH, de température ou de pression contrairement aux catalyseurs chimiques, avec une grande rentabilité d'une part, et une meilleure productivité d'autre part, notée dans le procédé biologique (**Schmid et al, 2001 ; Schmid et al, 2002**).

L'essor que connaît le secteur des enzymes industrielles s'appuie sur les progrès scientifiques obtenus notamment en biotechnologie et en ingénierie des protéines qui ont permis la création d'enzymes commerciales adaptées aux besoins industriels en termes de stabilité thermique, thermodynamique et sélectivité, le cas par exemple des enzymes appliquées dans les réactions de synthèse en milieu organique ce qui a obligé le développement de formes plus résistantes et plus robustes (**Fox et Huisman, 2008**).

Tableau 1: Liste de quelques enzymes industrielles importantes et leurs sources (**Kirk et al, 2002**).

Enzyme	EC nombre	Source	Mode de production
<i>Enzymes animales</i>			
Catalases	1.11.1.6	Foie	Intracellulaire
Chymotrypsine	3.4.21.1	Pancréas	Extracellulaire
Lipase	3.1.1.3	Pancréas	Extracellulaire
Trypsine	3.4.21.4	Pancréas	Extracellulaire
<i>Enzymes végétales</i>			
Actinidine	3.4.22.14	Kiwi	Extracellulaire
Alpha amylase	3.2.1.1	Orge	Extracellulaire
Beta amylase	3.2.1.2	Orge	Extracellulaire
Bromelain	3.4.22.4	Ananas	Extracellulaire
Beta glucanase	3.2.1.6	Orge	Extracellulaire
Ficine	3.4.22.3	Latex de figue	Extracellulaire
Lipoxygénase	1.13.11.12	Soja	Extracellulaire
Papaine	3.4.22.2	Papaye	Extracellulaire

<i>Enzymes bactériennes</i>			
Alpha amylase	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	Extracellulaire
Beta amylase	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	Extracellulaire
Asparaginase	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	Intracellulaire
Glucose isomérase	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	Intracellulaire
Penicilline amidase	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	Intracellulaire
Protéase	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	Extracellulaire
Pullulanase	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	Extracellulaire
<i>Enzymes fongiques</i>			
Alpha amylase	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	Extracellulaire
Aminoacylase	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	Intracellulaire
Glucoamylase	3.2.1.3	<i>Aspergillus</i>	Extracellulaire
Catalase	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	Intracellulaire
Cellulase	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	Extracellulaire
Dextranase	3.2.1.11	<i>Penicillium</i>	Extracellulaire
Glucose oxidase	1.1.3.4	<i>Aspergillus</i>	Intracellulaire
Lactase	3.2.1.23	<i>Aspergillus</i>	Extracellulaire
Lipase	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	Extracellulaire
Rennet	3.4.23.6	<i>Mucor miehei</i>	Extracellulaire
Pectinase	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	Extracellulaire
Pectine lyase	4.2.2.10	<i>Aspergillus</i>	Extracellulaire
Protease	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	Extracellulaire
Raffinase	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	Intracellulaire
<i>Enzymes levuriennes</i>			
Invertase	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	Intra/Extracellulaire
Lactase	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	Intra/Extracellulaire
Lipase	3.1.1.3	<i>Candida</i>	Extracellulaire
Raffinase	3.2.1.22	<i>Saccharomyces</i>	Intracellulaire

I.2. Structure des enzymes :

Les enzymes sont composées d'unités structurales. Ces unités de base sont donc des aminoacides unis par des liaisons peptidiques pour former des chaînes polypeptidiques.



Les groupements R possèdent des fonctions NH₂ ou COOH, ils permettent l'immobilisation de la molécule protéique par des liaisons covalentes sur des supports insolubles. La spécificité de l'enzyme est souvent attribuée à sa structure tridimensionnelle permettant la formation du site actif responsable de la catalyse enzymatique (Fabiano, 2002).

I.3. Propriétés des enzymes :

Les enzymes catalysent des réactions pour lesquelles elles sont spécifiques. Cette spécificité est une des propriétés catalytiques des biocatalyseurs et est due à la présence d'un site actif qui reconnaît et fixe le substrat.

La spécificité de ces catalyseurs biologiques sous différentes formes (énantio, stéro ou régio-sélectivité) constitue un des avantages de leur utilisation dans des procédés biologiques comme alternative aux procédés chimiques. Par conséquent, les produits obtenus par synthèse enzymatique sont de meilleure qualité et contiennent moins d'impuretés, ce qui permet de limiter voire d'éviter des étapes de purification souvent coûteuses (**Whitehurst et Oort, 2010**).

Une autre propriété physico-chimique importante est la stabilité thermique et la résistance contre la dénaturation. La stabilité de l'enzyme dépend beaucoup du microenvironnement imposé. Ce facteur peut être amélioré par plusieurs méthodes.

I.4. Classification et nomenclature :

On trouve à l'heure actuelle, la dénomination ancienne de certaines enzymes telle que la trypsine ou pepsine. Cependant, dans la mesure où on s'intéresse moins à la nature qu'à la fonction de l'enzyme, on utilise plutôt la nomenclature mise par l'Union Internationale de Biochimie qui recommande l'utilisation du suffixe « ase » couplé parfois avec le substrat (uréase, phosphatase...), mais généralement avec le type de réaction catalysée (hydrolase, oxydase, isomérase...).

Chaque enzyme porte ainsi un numéro dont le premier chiffre correspond à un certain type de réaction catalysée :

- Oxydoréductases (qui catalysent des réactions d'oxydoréduction) ;
- Transférases (qui catalysent le transfert de groupements fonctionnels) ;
- Lyases (qui catalysent des réactions d'addition sur une double liaison) ;
- Isomérases (qui catalysent des réactions d'isomérisation) ;
- Ligases ou synthétases (formation des liaisons avec clivage de l'ATP) ;
- Hydrolases (qui catalysent des réactions d'hydrolyse) ;

Le nom de l'enzyme ainsi que le numéro de sa classification ne sont pas toujours suffisants pour caractériser sa spécificité et son pouvoir catalytique. Selon la source dont elle est extraite, l'enzyme possède une séquence d'acides aminés et des propriétés différentes (**Fabiano, 2002**).

II. Les enzymes hydrolytiques :

II.1. Lipases :

Les lipases ou appelées encore les tri-acyl-glycérol-acyl-hydrolases (EC.3.1.1.3), sont des enzymes appartenant à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est important, il consiste à hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. Elles contiennent des séquences G-X₁-S-X₂-G comme partie catalytique de la particule, dont G : glycine, S : serine, X₁ : histidine, X₂ : acide glutamique ou aspartique. La connaissance de leur structure tridimensionnelle joue un rôle important dans la conception et la structuration des lipases à des fins précises (**Saxena et al, 2003**).

Comme toute enzyme, les lipases sont produites dans de nombreux organismes vivants. Cependant, la source la plus riche est celle microbienne (tableau 2) en particulier celles provenant de bactéries connues par leur qualité unique telles que la grande stabilité comme par exemple les thermophiles, leur permettant d'être utilisées à des fins industrielles (**Kojima et al, 2003; Salleh et al, 2006**).

II.1.1. Propriétés des lipases et application :

Les lipases sont uniques en termes d'hydrolyse des liaisons ester des substrats lipidiques solubles dans l'eau. Cette réaction se produit à l'interface entre le lipide et l'eau, et en termes de réaction inverse dans un milieu non aqueux où une modification de la conformation de l'enzyme se produit après contact avec un substrat insoluble dans l'eau. Ce phénomène d'activité interfaciale est aujourd'hui un domaine d'étude intensive réalisée par des cristallographes, des biochimistes et des ingénieurs en biologie moléculaire grâce à la structure fermée et ouverte (figure 01) que ces enzymes peuvent offrir (**Saxena et al, 2003**).

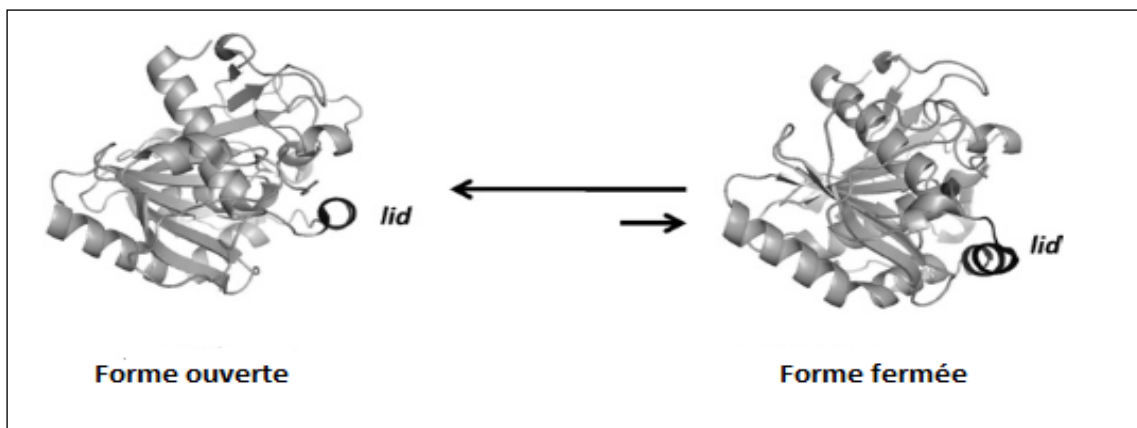


Figure 01 : Structure ouverte et fermée de la lipase (**Fernandez-Lafuente, 2010**).

Généralités sur les hydrolases et leurs applications

Une caractéristique souhaitable des lipases est la stabilité thermique de ces enzymes. La source de lipases les plus résistantes à la température est celle bactérienne dont la tolérance thermique est liée à leur structure (**Kojima et al, 2003**).

Les lipases sont couramment utilisées dans le traitement des graisses et des huiles en tant que détergent ou d'agent dégraissant, dans la transformation des aliments, les synthèses chimiques et pharmaceutiques et dans l'industrie cosmétique (**Sharma et al, 2001**). Leur application, présentée dans le tableau 2, permet la modification des propriétés lipidiques du produit par un changement de la position des chaînes d'acides gras dans les glycérides et la substitution d'un ou de plusieurs acides gras par d'autres (**Undurraga et al, 2001**).

Tableau 2 : Différentes formes commerciales de lipases et domaine d'application (**Alloue et al, 2008**).

Source de la lipase	Forme	Société	Rôle et application
<i>Candida rugosa</i>	Poudre	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma	Hydrolyse des lipides
<i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM60)	Immobilisée	Novo Nordisk	Synthèse des lipides et d'ester de sucres
<i>Pseudomonas mendocina</i> (Lumufats)	Poudre	Genencor	Hydrolyse (industries des détergents)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (Lipomax)	Poudre	Genencor	Hydrolyse (industries des détergents)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Liquide	Novo Nordisk	Hydrolyse
<i>Aspergillus oryzae</i>	Poudre	Novo Nordisk	Hydrolyse (industries des détergents et agroalimentaires)
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Poudre	Novo Nordisk	Hydrolyse (industries des détergents et agroalimentaires)
Lipase (E.C.3.1.1.3.) de <i>Yarrowia lipolytica</i>	Poudre	Artechno s.a.	Hydrolyse des graisses

II.1.2. La lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) :

La lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), est une enzyme basophile et sensiblement thermostable, disponible sous une forme commerciale soluble et immobilisée. Bien qu'initialement orientée vers l'industrie alimentaire, cette enzyme a trouvé des applications dans de nombreuses zones industrielles différentes, de la production de biodiesel aux produits chimiques finis (principalement dans les processus énantio, régio-sélectifs ou spécifiques).

Les lipases, en général, tendent à former des agrégats bi-moléculaires, confrontés à leurs centres actifs ouverts (**Palomo et al, 2003**). TLL est l'une des lipases avec une tendance plus forte à former ces agrégats bi-moléculaires (**Palomo et al, 2003**). Ce fait doit être pris en considération lors de l'évaluation des propriétés de cette enzyme, car le monomère et le dimère présentent différentes caractéristiques d'activité, de stabilité et de sélectivité (**Palomo et al, 2003**).

Un intérêt particulier a été donné pour sa grande stabilité. TLL semble offrir des avantages spécifiques pour la production de biodiesel et pour les processus régio-sélectifs impliquant des sucres (**Mateo et al, 2007**).

II.1.3. Les phospholipases :

Les phospholipases sont encore bien connues pour l'exploitation de leur activité lipolytique dans la synthèse d'une grande variété de produits allant des intermédiaires pharmaceutiques aux nutraceutiques. Ce sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons esters des phospholipides. Cela peut s'effectuer entre l'acide gras et le glycérol, entre le glycérol et le phosphate ou entre le phosphate et l'alcool (éthanolamine, sérine, glycérol...) (**Mishra et al, 2009**).

Selon leur mécanisme d'action, les phospholipases peuvent être classées comme suit (voir la figure 02):

- Les phospholipases A hydrolysent l'acide gras de la fonction alcool primaire en libérant un acide gras et un lysophospholipide ou bien secondaire en libérant deux acides gras et un lysophospholipide ;
- Les phospholipases B hydrolysent les deux acides gras des fonctions alcool en libérant un acide gras et un glycérophosphoryl-alcool ;
- Les phospholipases C hydrolysent le phosphate et l'alcool de la fonction alcool primaire en libérant un diglycéride et un phospho-alcool;

-Les phospholipases D hydrolysent l'alcool de la fonction acide du phosphate en libérant un acide phosphatidique et un alcool (Mishra *et al*, 2009).

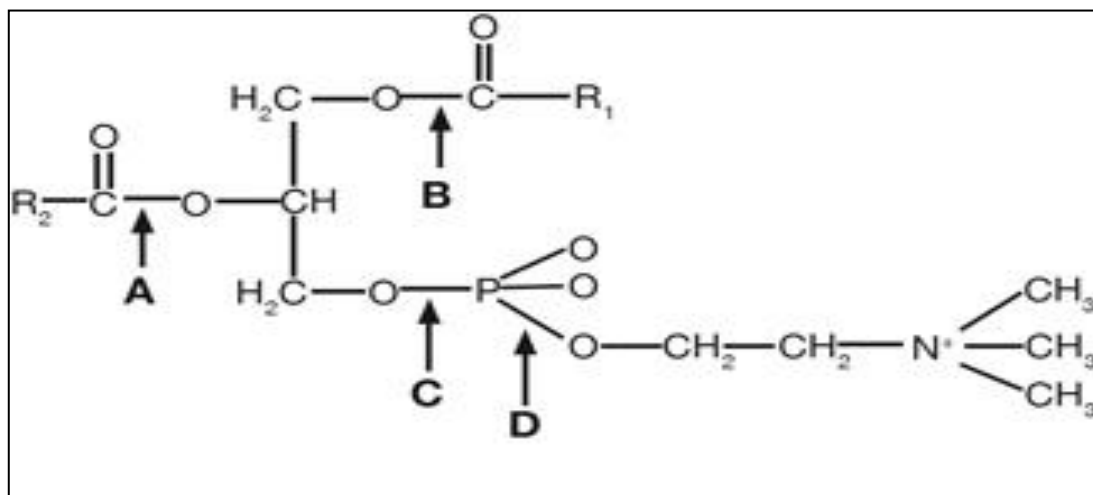


Figure 02: Les liaisons hydrolysées par les différentes phospholipases (Ayesta-Gutierrez *et al*, 2007)

Bien qu'il soit connu que la plupart des préparations de phospholipase commercialisées s'accompagnent d'une activité lipase (Ayesta-Gutierrez *et al*, 2007), on étudie rarement les applications de cette activité dans la synthèse organique (Fernandez-Lorente *et al*, 2008a). Le cas de la Lecitase Ultra, une phospholipase A transformée par Novozyme (Danemark), utilisée pour le dégraissage des huiles végétales, est très intéressante à cet égard. Au cours des dernières années, Guisan et ses collaborateurs, ont utilisé l'activité lipase de cette enzyme dans la résolution des esters de mandélate et l'hydrolyse régio-sélective des esters de glucides où ils ont remarqué des changements drastiques dans l'activité enzymatique et même l'énantio-sélectivité lorsque l'enzyme a été immobilisée sur différents supports. Cependant, il n'était pas clair si une enzyme unique présente à la fois des activités lipase et phospholipase, ou l'échantillon commercial contient un mélange d'enzymes différentes qui s'orientent de manière préférentielle en présentant différentes énantio-sélectivités (Fernandez-Lorente *et al*, 2007; Cabera *et al*, 2008 ; Fernandez-Lorente *et al*, 2008a; Fernandez-Lorente *et al*, 2008b).

II.1.4. Mécanisme d'action des lipases :

II.1.4.1. Réactions d'hydrolyse :

Les lipases permettent l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol (figure 03) qui constitue une réaction importante dans les processus industriels des huiles naturelles et des graisses (Balcao et al, 1998), cette action permet la production d'acides gras qui peuvent être convertis en alcool ou employés dans des réactions de synthèse d'une large gamme d'ester naturels et non naturels, tout en conservant une énantio ou une régio-sélectivité élevée (Sharma et al, 2001 ; Castro et al, 2004).

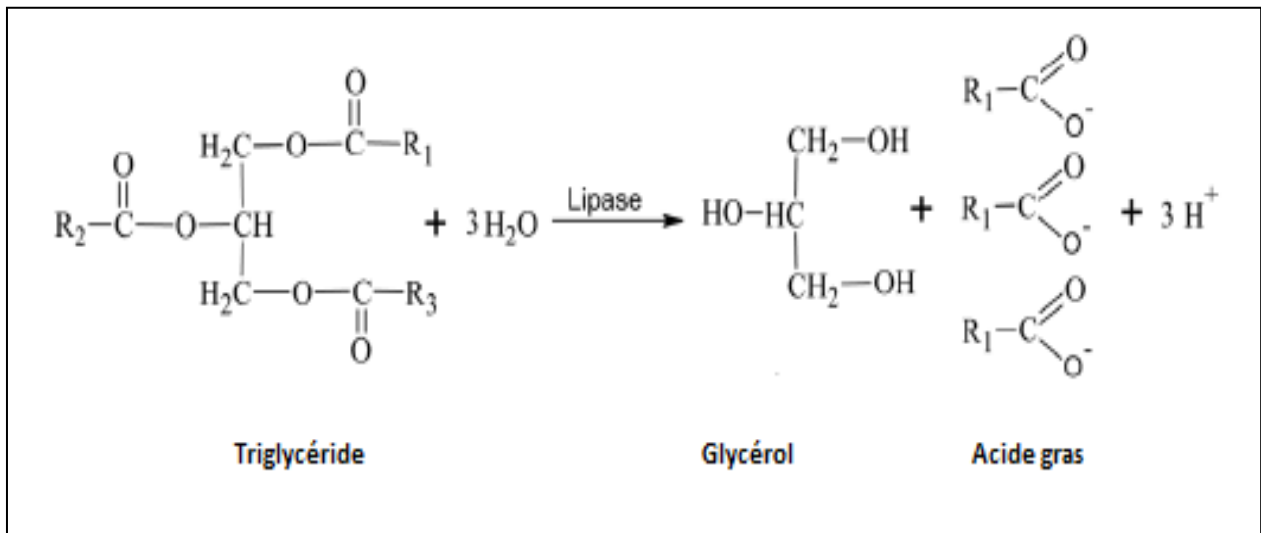
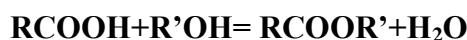


Figure 03: Hydrolyse des triglycérides par la lipase (Lason et Janogowski, 2010)

II.1.4.2. Réactions de synthèse :

II.1.4.2.1. Estérification :

Il y a eu au cours de ces dernières années un développement important dans l'application des lipases pour la production d'esters dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Cette synthèse dépend fortement de la quantité d'eau du milieu qui détermine le type de la réaction favorisée. A partir d'une certaine teneur d'eau, l'équilibre de la réaction est affectée ce qui peut entraîner une réaction inverse qui est l'hydrolyse.



Par conséquent, l'eau générée au cours de l'estérification enzymatique doit être éliminée afin de poursuivre la réaction (Chamouleau et al, 2001). L'eau joue également un rôle important dans la structure du biocatalyseur en conférant à l'enzyme la flexibilité nécessaire à la

catalyse (Blecker, 1993). Ainsi, une teneur en eau en dessous d'un certain seuil (0,5%) ne permet pas l'hydratation nécessaire de la lipase en entraînant une diminution du contrôle de cette dernière et constitue par conséquent un facteur important lors d'une réaction (Chowdary et al, 2002 ; Pirozzi et al, 2004) (voir figure 04).

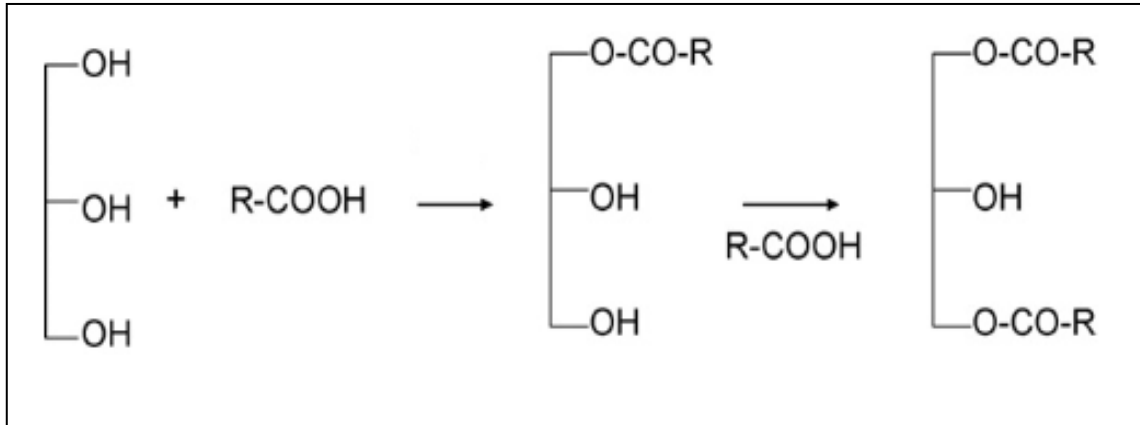


Figure 04 : Schéma général de la réaction d'estérification(Fernandez-Lafuente, 2010)

II.1.4.2.2. Transestérification :

La transestérification implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoololyse) ou avec un glycérol (glycérolyse) (figure 05). Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification faite par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras polyinsaturés, des substituants de matière grasse du lait et des huiles à basse valeur énergétique (Lancelot et al, 2002).

Les procédés de transestérification enzymatique permettent de produire un ester gras utilisé en industrie cosmétique ou de carburant obtenu à partir d'huile végétal ou animale (Xu et al, 2003 ; Nouredini et al, 2005). Le biodiesel est une alternative du diesel classique, sa production constitue un champ d'application potentiel des lipases.

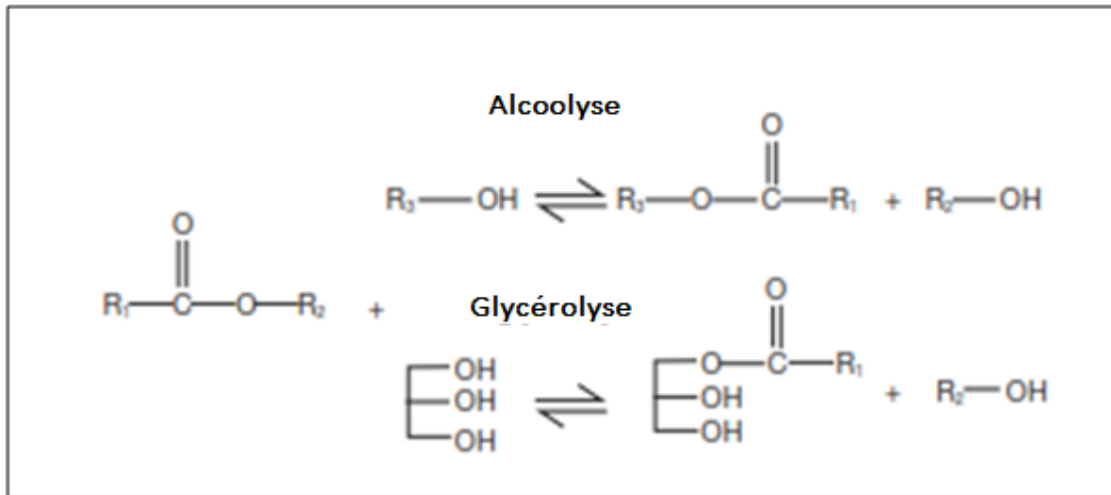


Figure 05: Réaction de transestérification des triglycérides (Alloue et al, 2008).

II.1.4.2.3. Interestérification :

Lors de la réaction d'interestérification, un groupe acyle est transféré à un acide gras ou à un ester d'acide gras (acidolyse) (figure 06)(Jaeger et al, 1994). Certaines huiles végétales, comme par exemple l'huile de palme et l'huile d'amande douce, présentent des limites d'application à cause de la teneur élevée en acides gras saturés qui sont associés aux maladies cardiovasculaires. Pour élargir leur utilisation commerciale, ces huiles végétales peuvent être modifiées physiquement par fractionnement ou chimiquement, par mélange avec d'autres huiles ou par traitement enzymatique. De telles modifications des huiles et des matières grasses permettent également aux industriels de répondre à la demande des consommateurs par des produits sains.

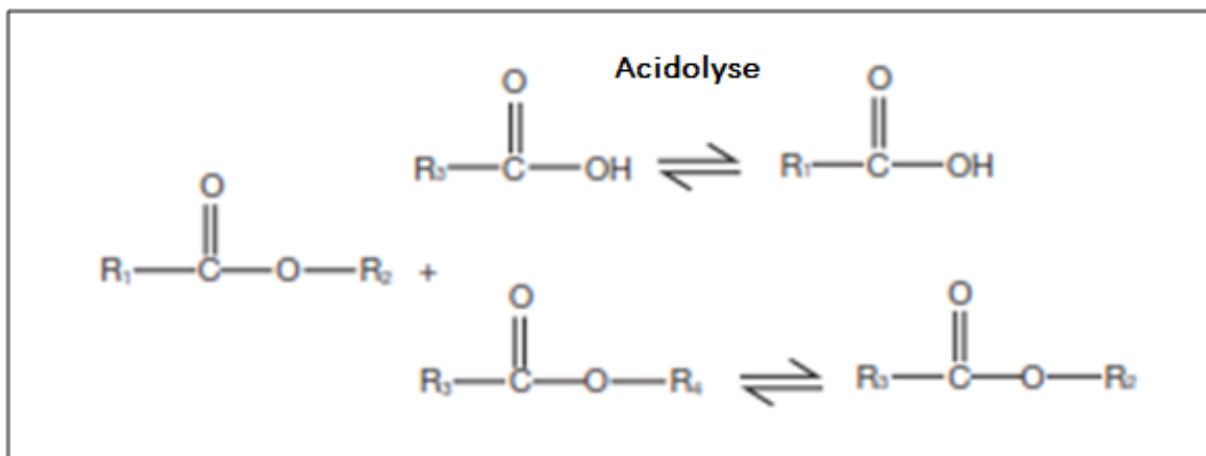


Figure 06: Schéma général de l'interestérification(Alloue et al, 2008)

L'utilisation des solvants en interestérisation nécessite la désodorisation du produit final, en revanche l'interestérisation enzymatique réalisée en l'absence de solvants organiques est une très bonne alternative, le cas des lipozymes de Novozyme sont des lipases immobilisées utilisées pour la production de triacylglycérols modifiés, dans des conditions qui ne demandent pas de solvants (Alloue et al, 2008).

Un autre exemple est celui du beurre de cacao qui est une matière première importante dans la fabrication du chocolat et pour les industries de confiserie. Sa consistance et ses qualités, dérivant de la composition en acides gras de ses triglycérides, sont très recherchées et très demandées. Un substituant de beurre de cacao avec une composition en triacylglycérol est préparé à partir des graisses et des huiles et des huiles de faible coût. Le biodiesel peut également être produits par interestérisation entre un triglycéride et l'acétate de méthyle, catalysée par la lipase de *candida antartica* immobilisée (Xu et al, 2005).

II.2. La β -galactosidase :

La β -galactosidase ou la galactoside galactohydrolase (EC 3.2.1.23) a été le sujet de la biochimie classique et des études génétiques depuis des années (Fowler et Zabin, 1978). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de résidus terminaux non réducteurs du β -galactose dans les β -D-galactosides comme le lactose du lait et du petit lait tout en améliorant la qualité et la digestibilité de ces produits chez les sujets intolérants au lactose (Fernandes et al, 2002).

En raison de leurs applications industrielles dans l'hydrolyse de ce saccharide, et de leurs utilisations dans des produits alimentaires et cliniques, les lactases de source diverses (voir tableau 3) ont été isolées et caractérisées et leurs propriétés telles que la stabilité, l'activité et la capacité d'immobilisation sur divers supports ont été étudiées (Adalberto et al, 2006).

Tableau 3 : Sources et propriétés de quelques lactases commercialisées (Mlichová et Rosenberg, 2006).

Microorganismes		Production d'enzyme	pH optimal	Température optimale (°C)
Moisissures	<i>Aspergillus niger</i>	Extracellulaire	3.0-4.0	55-60
	<i>Aspergillus oryzae</i>		5.0	50-55
Levures	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Intracellulaire	6.5-7.0	30-35
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>		6.6	30-35
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	Intracellulaire	7.2	40
	<i>Lactobacillus thermophilus</i>		6.2	55
	<i>Leuconostoc citrovorum</i>		6.5	66
	<i>Bacillus circulans</i>		6.0	65

II.2.1. Mécanisme d'action des β -galactosidases :

II.2.1.1. Réaction d'hydrolyse :

L'activité de la lactase est maximale immédiatement après la naissance dans le but de faciliter l'absorption des monosaccharides par l'intestin grêle chez l'être humain (Shukla, 1975 ; Chang et al, 2009). L'hydrolyse enzymatique du lactose est un procédé biotechnologique important facilitant la digestion des produits contenant du lactose par l'amélioration des caractéristiques technologiques et organoleptiques des produits contenant le lactose hydrolysé. Le mécanisme d'hydrolyse enzymatique du lactose par β -galactosidase appliqué à différents substrats (solution de lactose, petit lait, lait écrémé) dans différentes conditions expérimentales a été étudié par plusieurs auteurs (Giacomini et al, 1998 ; Pessela et al, 2003b ; Gaur et al, 2006 ; Neri et al, 2009 ; Klein et al, 2013 ; Rodriguez-Colinas et al, 2016), la figure 07 schématise l'hydrolyse du lactose par action d'une β -galactosidase (Jurado et al, 2004).

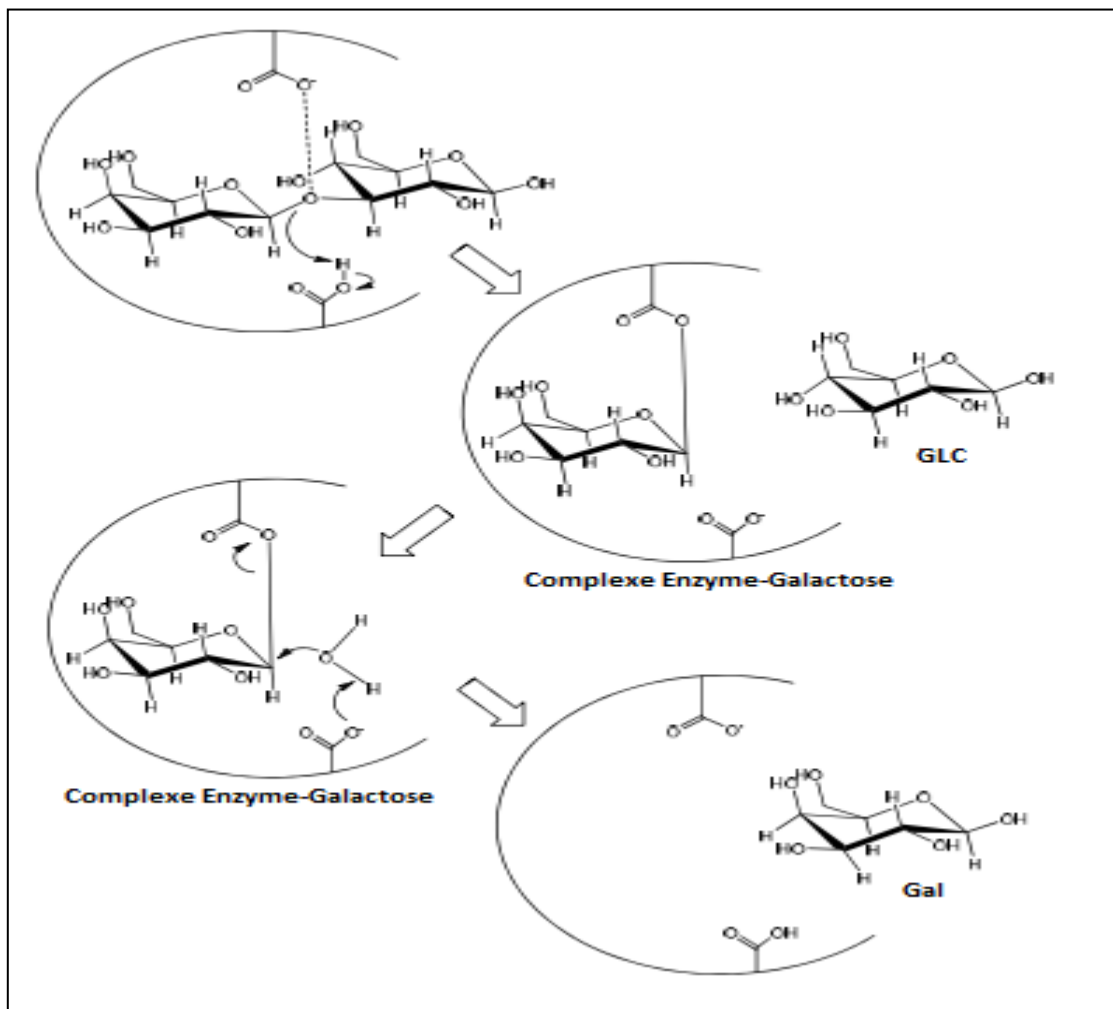


Figure 07: Mécanisme d'action de la β -galactosidase dans l'hydrolyse du lactose (Benjamins, 2014)

II.2.1.2. Réaction de synthèse :

II.2.1.2.1. Transgalactosylation :

Outre l'action hydrolytique des β -galactosidase, l'activité transgalactosyliques de ces enzymes a été reconnue depuis plusieurs années (Wallenfels et Malhotra, 1961). Cette action se produit par les mécanismes décrits dans la figure 08. Au lieu de la molécule d'eau étant le nucléophile (cas d'hydrolyse), une molécule de glycoside agit comme une molécule accepteur, produisant ainsi un oligosaccharide (Otieno, 2010 ; Ganzle, 2012). L'activité transgalactosyliques des β -galactosides a été étudiée assez largement et caractérisée pour leur capacité de synthétiser des galacto-oligosaccharides (GOS) présentant une fonctionnalité prébiotique bénéfique pour la santé (Boehm et Stahl, 2007).

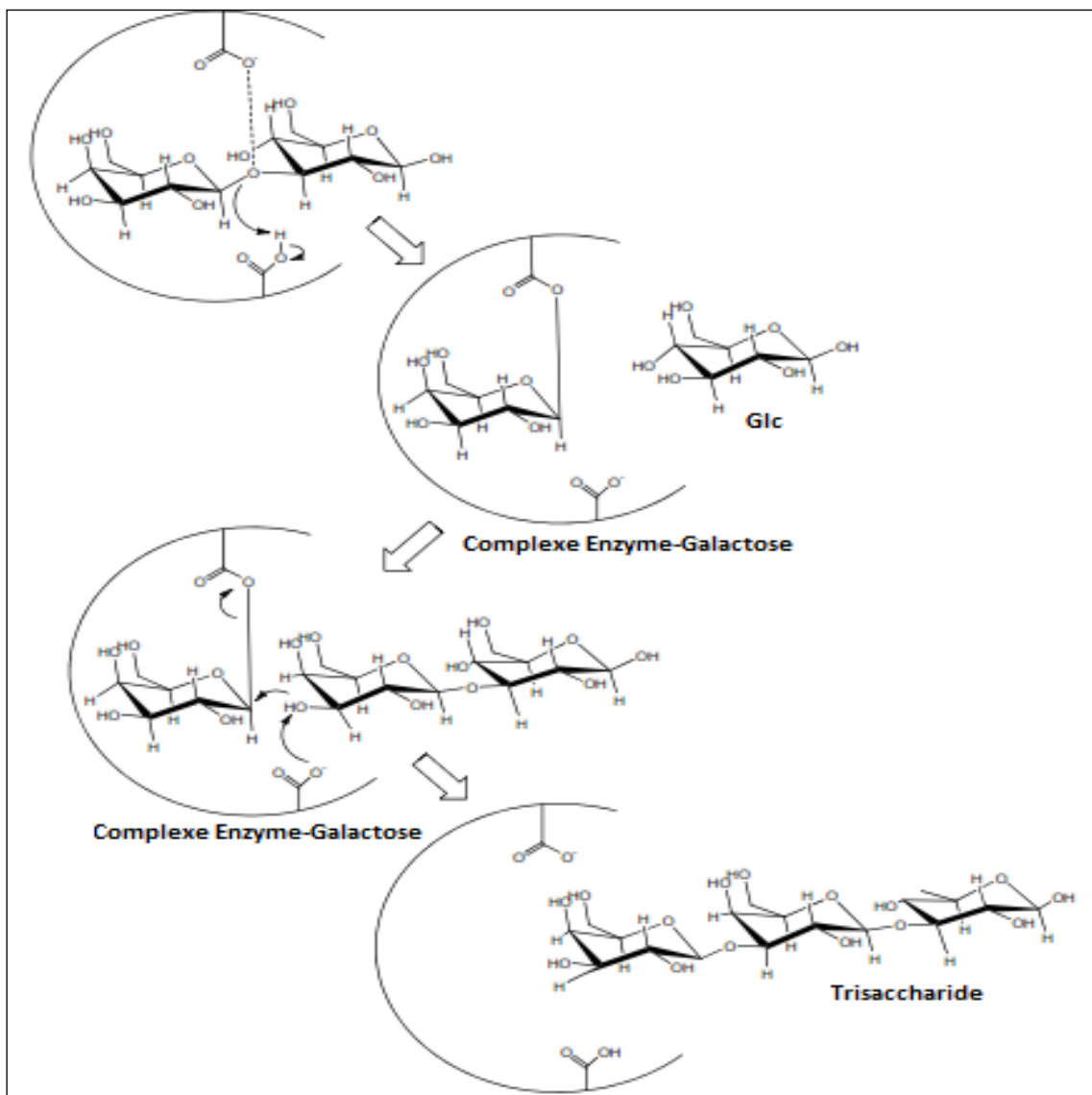


Figure 08: Formation d'oligosaccharides par β -galactosidase (Benjamins, 2014)

En réalité, les deux types de réactions, à savoir l'hydrolyse et la transgalactosylation peuvent se produire simultanément dans un mélange réactionnel. Outre le lactose, les galactose-oligosaccharides synthétisées peuvent également être hydrolysés.

Cependant, le rapport synthèse/hydrolyse dépend largement de l'enzyme utilisée et des conditions de réaction choisies. Ces propriétés enzymatiques ont d'une grande importance lors du choix de l'enzyme pour des réactions hydrolytiques ou synthétiques. Cependant, le rendement en produit de transgalactosylation désiré dans une réaction contrôlée cinétiquement est indépendant de la concentration enzymatique (**Kasche et al, 1984**).

III. Application industrielle des biocatalyseurs :

Les industriels se sont trouvés parmi les premiers à reconnaître et exploiter l'énorme potentiel des enzymes, car ils ont compris que s'il était possible d'accélérer les réactions, les procédés de production pourraient être réalisés en beaucoup moins de temps, à des températures et des pressions plus basses ou avec des matières premières moins chères. Dans d'autres situations, les enzymes ont rendu certaines réactions commercialement viables pour la première fois. Aujourd'hui le marché mondial des enzymes industrielles se développe rapidement, étant actuellement valorisé à plus de deux milliards d'euros par an (**Charnock et McCleary, 2005**). Les principaux secteurs utilisant les enzymes sont résumés dans le tableau 4, mais comme le tableau le montre, les enzymes sont désormais utilisées dans de nombreuses applications très diverses, allant du blanchiment biologique du papier jusqu'aux techniques plus efficaces pour l'extraction du pétrole et du gaz naturel. En général, l'utilisation des enzymes est très rentable, non toxique et reconnue comme une technologie verte ou écologique (**Mateo et al, 2007**).

Tableau4 : Les enzymes industrielles et secteurs d'utilisations (**Charnock et McCleary, 2005**)

Enzyme	Application	Secteur
Protéase	Dégradation des protéines	Détergents
Cellulase	Dégradation de la cellulose	Détergents
Lipase	Dégradation des lipides	Détergents
Amylase	Dégradation de l'amidon en glucose	Détergents
Amylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucoamylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucose isomérase	Production du sirop de glucose à haute teneur en	Traitement de l'amidon

Généralités sur les hydrolases et leurs applications

	fructose	
Xylanase	Améliorer l'assimilation des nutriments chez les volailles	Aliments pour animaux
Phytases	Améliorer la disponibilité des nutriments	Aliments pour animaux
Protéases	Améliorer la digestion des protéines	Aliments pour animaux
Xylanase	Élimination du lignine « blanchiment biologique »	Papeterie
Arabinanase	Élimination du trouble après macération	Traitement des fruits et légumes
Amylase	Élimination du trouble d'amidon dans les jus	Traitement des fruits et légumes
Polygalacturonanase	Augmenter le rendement en jus	Traitement des fruits et légumes
Hydrolases	Casser les gels de biopolymères	Gaz et pétrole
Chymosine	Caillage lors de la production du fromage	Produits laitiers
Uréase	Élimination de l'urée	Vin
Pectinase	Augmenter le rendement en jus	Vin
Protéase	Attendrissement des viandes	Boucherie
Amylase	Désencollage	Textile
Amylase	Contrôle de procédé	Boulangerie
β -glucanase	Éviter les problèmes de filtration	Bière
Protéase	Augmenter le rendement en surface	Tannerie

III.1. Avantages et limites d'utilisation industrielle des enzymes :

Les enzymes sont des biocatalyseurs présentant d'excellentes propriétés (activité élevée, sélectivité et spécificité) qui leur permettent d'effectuer des processus chimiques plus complexes dans des conditions extrêmes en produisant des molécules non toxiques et des produits sans impuretés (Wong et Whitesides, 1994 ; Koeller et Wong, 2001). Cependant parmi les facteurs les plus importants et qui doivent être pris en considération avant toute application industrielle est la stabilité thermique et opérationnelle de l'enzyme utilisée. Ce facteur peut limiter l'application des enzymes et par conséquent leur réutilisation si elles ne sont pas suffisamment stables.

Il existe de nombreuses techniques qui peuvent améliorer les caractéristiques de l'enzyme, en impliquant de nombreux domaines de la science et qui ont subi des développements impressionnants au cours des dernières années telles que la microbiologie, l'ingénierie des protéines, la chimie des protéines...etc. Certaines techniques anciennes comme l'immobilisation ont été révélées dans les derniers temps comme un outil très puissant pour améliorer presque toutes les propriétés enzymatiques si elles sont correctement appliquées comme la stabilité, l'activité, la spécificité, la sélectivité et la résistance aux inhibitions (**Mateo et al, 2007**).

Dans le chapitre suivant, nous avons essayé de décrire les différentes stratégies et les différentes méthodes d'immobilisation pouvant maintenir ou améliorer la stabilité des enzymes, et nous focalisons sur la façon dont l'immobilisation peut aider à résoudre certains problèmes comme la possibilité de recyclage de biocatalyseur développé par sa récupération et sa réutilisation dans de nouvelles réactions.

En général, l'utilisation de telles techniques permettant de contrôler l'interaction entre deux différentes structures (l'enzyme et le support) dans différentes conditions et par différentes orientations, est le point clé qui augmente considérablement les possibilités de succès du protocole appliqué (**Mateo et al, 2007**).

**STRATEGIES POUR LA STABILISATION
DES ENZYMES**

I. Stabilisation des biocatalyseurs :

I.1. Définition de la stabilité enzymatique :

La stabilité est une propriété fonctionnelle majeure de l'enzyme qui peut être la cause dans la limite de son application à l'échelle industrielle. C'est la résistance de l'enzyme et sa tolérance aux différentes conditions de dénaturation, son étude est un aspect important à prendre en compte dans les procédés biotechnologiques, comme cela peut fournir des informations sur la structure des enzymes et faciliter une conception économique des procédés continus dans les bioréacteurs. La stabilité thermique des enzymes est influencée par divers facteurs de l'environnement tels que le pH, la température et la présence des ions dans le milieu réactionnel, qui peuvent fortement affecter la structure tridimensionnelle spécifique ou la conformation spatiale de la protéine (**Zale et Klivanov, 1983; Henley et Sadana, 1984; Sadana et Henley, 1986; Klivanov et Ahern, 1987 ; Volkin et Klivanov, 1989**).

Plusieurs techniques modernes comme l'ingénierie des protéines peuvent constituer un outil utile pour augmenter la stabilité de certaines enzymes, le cas de la luciférase, des protéases bactériennes et les carbohydrases, notamment la glucosidase. Cependant, cela n'est possible que si les données structurelles sont disponibles pour l'enzyme en cours d'examen. L'ingénierie d'une structure enzymatique peut également conduire à une instabilité qui n'est pas toujours souhaitée et la modification de la structure enzymatique afin d'améliorer la stabilité reste endiscussion, où on peut générer, d'une part une enzyme avec toutes les propriétés requises pour son application, mais d'autre part, il sera impossible de prédire le résultat d'une mutation particulière (**Drago et Gibson, 2001**).

I.2. Formes de stabilité :

La stabilisation des enzymes a une grande importance dans de nombreuses applications industrielles. Les trois principales formes de stabilité peuvent être définies comme suit :

-Stabilité thermique consistant généralement à la rétention d'activité d'une enzyme dans les hautes températures. Cette rétention de l'activité est souvent mesurée en termes de demi-vie (T_{50}) ou le temps nécessaire pour l'enzyme perd les 50% de son activité initiale pendant les inactivations thermiques, en se référant à la valeur initiale de l'activité enzymatique mesurée à T_0 .

-Stabilité opérationnelle qui consiste généralement à la rétention d'activité au cours d'utilisation pour plusieurs cycles de réaction catalysée par le même biocatalyseur récupéré du milieu réactionnel et réutilisé de nouveau sans noter une perte significative de l'activité catalytique et de la stabilité thermique après chaque cycle.

-Stabilité du stockage qui concerne en particulier la rétention de l'activité au fil du temps des enzymes mises en stockage soit sous la forme d'une préparation déshydratée, soit en solution ou bien sous forme d'une préparation immobilisée. En fait, de telles considérations sont extrêmement pertinentes pour les producteurs d'enzymes depuis la fabrication de leurs produits jusqu'à la fourniture aux utilisateurs finaux. La durée de conservation des produits à base d'enzymes dépend généralement de la stabilité de l'enzyme dans ce contexte (**Drago et Gibson, 2001**).

II. Stratégies de stabilisation des enzymes :

La stabilité des enzymes est un facteur clé pour leur application à l'échelle industrielle. Pour ce fait, des techniques ont été développées pour améliorer ce paramètre mais afin de confirmer l'effet d'amélioration, il est important de montrer que l'amélioration des performances de l'enzyme elle-même est nécessaire.

Un certain degré d'amélioration de la stabilité serait attendu par l'ingénierie des protéines (**Xiong et al, 2007 ; Grassino et al, 2011**) mais les enzymes avec plus de stabilité ont été obtenues par modification chimique (**Bekhouché et al, 2011**) ou par immobilisation notamment par réticulation (**Roes-Hill et al, 2015**).

II.1. Sources naturellement thermophiles :

L'intérêt donné aux enzymes extrêmophiles est principalement dû au fait que la plupart des processus enzymatiques industriels sont réalisés dans des conditions extrêmes, telles que les températures élevées, les pressions élevées et les valeurs extrêmes de pH.

La façon la plus rapide pour obtenir des biocatalyseurs thermostables pour ce type de procédés consiste à isoler les enzymes des microorganismes existant dans des environnements extrêmes tels que les thermophiles (**Janeček, 1993 ; Cowan et Fernandez-Lafuente, 2011**) ayant de façon naturelle la capacité de se développer dans des températures élevées par rapport aux normales et de produire des enzymes possédant un niveau de tolérance aux températures naturellement plus élevé. En général, la température optimale pour les thermophiles modérés est de 60°C et elle est de 95°C pour les thermophiles extrêmes (**Yabuki, 2017**).

Cependant, un problème réside dans la faible activité à température ambiante contrairement à d'autres enzymes. En revanche, certains avantages majeurs sont offerts par les thermophiles où leurs enzymes sont appliquées dans des procédés industriels (**Brock, 1985 ; Ward et Moo-Young, 1988 ; Zamost et al, 1991**), y compris une augmentation du taux de réaction à des températures élevées, ce qui entraîne une diminution de la quantité d'enzyme requise.

De plus, les températures plus élevées peuvent réduire la possibilité de contamination microbienne, augmenter la solubilité des substrats et d'autres produits chimiques, et même diminuer la viscosité des liquides (**Brock, 1985**).

Parmi les enzymes thermostables caractérisées, seule l' α -amylase de *Bacillus licheniformis* est la plus thermostable de toutes les enzymes industrielles, capable de liquéfier l'amidon à une température qui peut atteindre les 110°C (**Saito, 1973**).

Cependant afin d'obtenir des enzymes thermostables dans les quantités requises pour les utiliser dans l'industrie, de nouveaux concepts de bioréacteurs et des protocoles de traitement doivent être développés pour fournir des conditions appropriées aux microorganismes provenant des environnements extrêmes.

II.2. Stabilisation par modification chimique :

Dans le même but d'améliorer la stabilité des enzymes, les recherches se sont tournées vers les techniques de l'ingénierie des protéines pour modifier la structure primaire des protéines ou pour améliorer la rigidification de leurs structures (**Drobecq et al, 2016 ; Liu et al, 2016 ; Moradpour et Ghasemian, 2016 ; Rathi et al, 2016**).

Ensuite, des techniques alternatives ont été développées pouvant être utilisées dans l'amélioration des propriétés des protéines. Une des techniques est la méthode de la modification chimique. Des chercheurs ont examiné les méthodes de modification chimique et d'immobilisation pouvant améliorer les propriétés des enzymes thermophiles, où ils ont constatés que les modifications chimiques limitent les changements structuraux et améliorent la thermo-tolérance (**Cowan et Fernandez-Lafuente, 2011**).

Mozhaev et al, 1990 ont recommandé la modification des enzymes à faible poids moléculaire comme méthode simple d'un point de vue méthodologique. Cela signifie que l'incubation de l'enzyme dans une solution contenant un agent modificateur est nécessaire, par la suite, l'enzyme modifiée est séparée du mélange réactionnel simplement par dialyse ou filtration sur gel. Les groupes fonctionnels externes situés à la surface de la molécule d'enzyme réagissent facilement avec le réactif de modification ajouté. D'autre part, la stabilité améliorée des enzymes modifiées a été comparées avec la modification de certains groupes fonctionnels internes appelés clés. Pour les modifier, un excès molaire du modificateur ou un temps d'incubation plus long devrait être utilisé (**Lundblad et Noyes, 1985**).

II.3. Stabilisation contre les solvants organiques :

Comme déjà décrit, la modification chimique maintient la structure de l'enzyme modifiée et améliore ses propriétés telles que l'activité enzymatique, la stabilité au pH, et aux

températures élevées (Mizutani *et al*, 1991 ; Yabuki *et al*, 1992 ; Yabuki *et al*, 1993 ; Yabuki *et al*, 1994 ; Mizutani *et al*, 1995 ; Saby *et al*, 1995 ; Yabuki *et al*, 1995 ; Pešić *et al*, 2014 ; Cipolatti *et al*, 2016 ; Pazhang *et al*, 2016 ; Wang *et al*, 2016). Dans les milieux aqueux, l'enzyme initiale et l'enzyme modifiée sont solubles et les deux sont actives. En revanche, dans les milieux organiques, l'enzyme modifiée conserve son activité contrairement à l'enzyme native qui perd son activité. Ceci est dû au fait que l'enzyme est déformée par le changement d'environnement hydrophile/hydrophobe, c'est-à-dire que la partie hydrophobe de l'enzyme, habituellement enterrée à l'intérieur, est forcée à l'extérieur et la partie hydrophile est forcée à l'intérieur (Mizutani *et al*, 1991 ; Yabuki *et al*, 1992 ; Yabuki *et al*, 1993 ; Yabuki *et al*, 1994 ; Mizutani *et al*, 1995 ; Saby *et al*, 1995 ; Yabuki *et al*, 1995). Cependant, dans le cas des milieux organiques hydrophobes, la méthode de modification est efficace pour protéger les enzymes de la dénaturation. En outre, de nouveaux exemples de la stabilité enzymatique dans des milieux pareils tels que les liquides ioniques ont été cités dans la littérature (Wang *et al*, 2016).

II.4. Stabilisation par immobilisation enzymatique :

L'une des propriétés qui ont été généralement considérées comme améliorées par l'immobilisation est la stabilité enzymatique. Toutefois, cela ne peut pas être totalement possible si l'immobilisation n'est pas correctement appliquée ou bien la méthode choisie n'est pas appropriée et même l'explication des stabilisations observées peut être diverse par la suite.

L'immobilisation aléatoire ne peut pas améliorer la rigidité de l'enzyme, même dans certains cas, la stabilité de l'enzyme peut diminuer après l'immobilisation si le support est capable d'établir des interactions indésirables avec l'enzyme (Mateo *et al*, 2007).

Cependant, afin d'avoir un biocatalyseur efficace et stable, quelques critères doivent se réunir, parmi lesquelles, la sélection de la méthode d'immobilisation et du support qui doit être basée sur les spécifications du biocatalyseur, y compris des paramètres tels que l'activité enzymatique globale, les conditions d'inactivation et de régénération le cout de la procédure d'immobilisation, la toxicité des réactifs et les propriétés finales souhaitées du dérivé immobilisé développé.

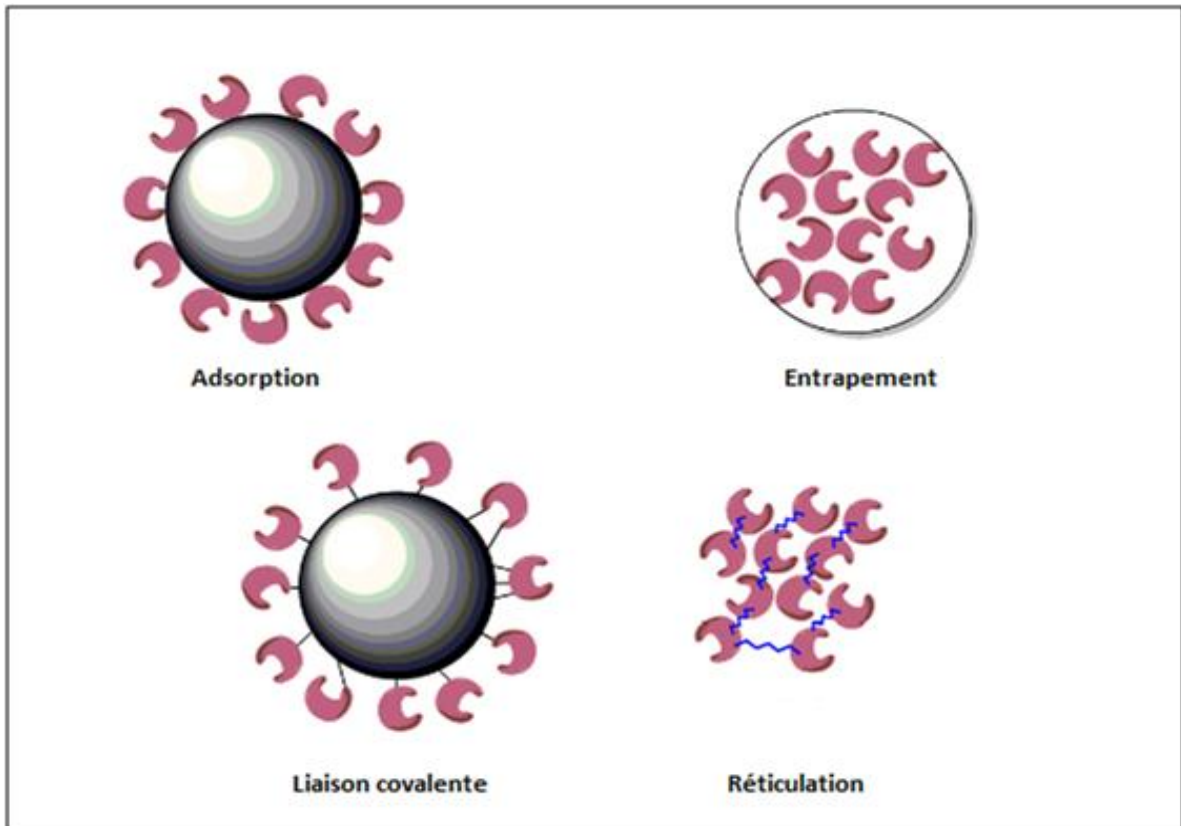


Figure 09: Différentes techniques d'immobilisation (**Benjamins, 2014**).

II.4.1. Différentes techniques d'immobilisation:

Il existe plusieurs méthodes d'immobilisation (figure 09) et différents types de matériaux utilisés comme support pour fixer les enzymes. Parmi ces techniques, nous citons les principales qui peuvent être divisées en méthodes réversibles et irréversibles:

II.4.1.1. Méthodes réversibles:

En raison du type de liaisons formées de manière réversible lors de l'immobilisation entre le support et les molécules enzymatiques, les enzymes peuvent être détachées de la matrice même dans des conditions normales.

L'utilisation de méthodes réversibles pour l'immobilisation enzymatique est très intéressante, principalement pour des raisons économiques, car l'enzyme se désorbe et donc le support peut être récupéré et rechargé avec une nouvelle molécule d'enzyme (figure 10). En effet, le coût du support est souvent un facteur primordial du coût global du catalyseur immobilisé. La méthode réversible est particulièrement importante pour l'immobilisation des enzymes destinées à des applications dans les systèmes bio-analytiques (**Gupta et Mattiasson, 1992**).

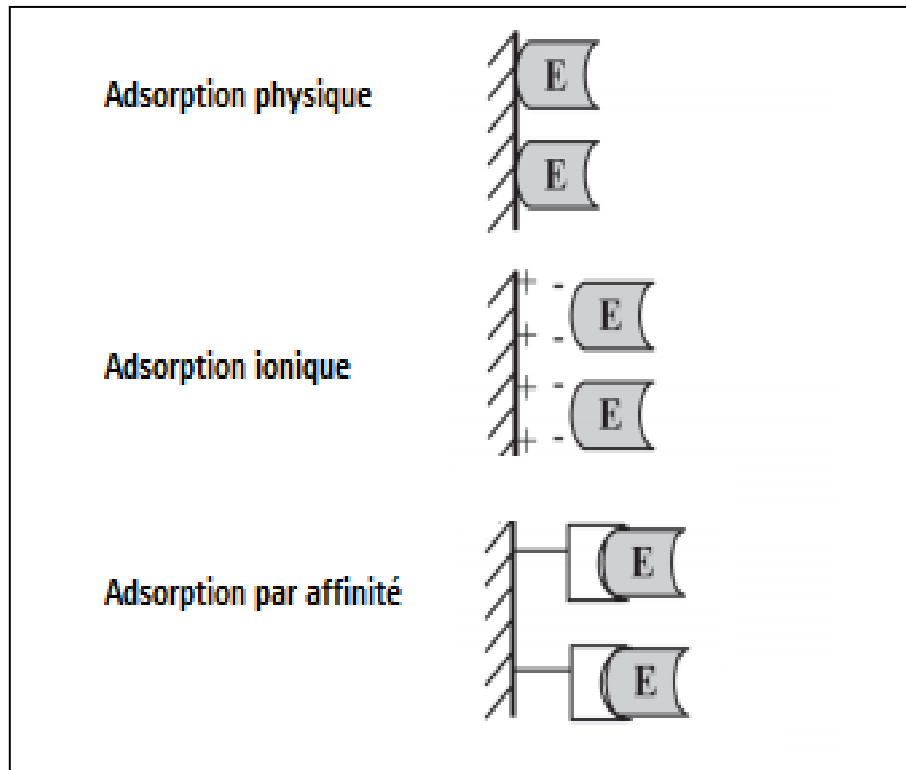


Figure 10: Méthodes d'immobilisation réversibles (Brena et Batista-Viera, 1997)

II.4.1.1.1. Adsorption:

L'adsorption des protéines en général, et des enzymes en particulier, a été l'une des premières méthodes d'immobilisation développées. On peut cependant distinguer les types d'interactions suivantes:

II.4.1.1.1.1. Interaction physique:

La méthode consiste à fixer l'enzyme sur le support par des liaisons physiques faibles. C'est la technique la plus simple à mettre en œuvre car une simple immersion du support dans la solution enzymatique permet d'obtenir une adsorption via des liaisons hydrogènes ou par des interactions faibles comme les forces de van der Waals (Messing, 1976 ; Woodward, 1985). Ces interactions sont réversibles et dépendent fortement du point isoélectrique de l'enzyme. Toutefois, le fait de s'adsorber, l'enzyme rend quelques sites actifs inaccessibles, suite à la formation soit d'une multicouche à la surface du support soit à la pénétration profonde dans les pores. L'idéal serait d'obtenir une monocouche de molécules d'enzymes adsorbées à la surface du support (Cao, 2006 ; Fernandez-Lafuente, 2010).

La nature des forces impliquées dans l'immobilisation non covalente conduit à un processus qui peut être inversé en modifiant les conditions qui influencent la force de l'interaction (par exemple, le pH, la force ionique, la température ou la polarité du solvant). L'immobilisation

par adsorption physique est un processus simple, facile à réaliser et qui préserve habituellement l'activité catalytique de l'enzyme. De telles méthodes sont donc économiquement intéressantes, mais peuvent présenter des problèmes tels que la désorption enzymatique de la matrice lorsque les interactions sont relativement faibles (**Brena et Batista-Viera, 1997**).

II.4.1.1.1.2. Interaction hydrophobe :

Cette méthode est basée sur l'affinité des domaines hydrophobes de la protéine au support solide ayant des propriétés similaires (**Cao, 2006**). Certains acides aminés, y compris la valine et la (iso) leucine, présentent un caractère hydrophobe en raison de leur faible teneur en substituant hydrogène. D'autres acides aminés comme le tryptophane et la phénylalanine contiennent des groupes aromatiques conduisant à une hydrophobicité élevée (**Betts et Russell, 2003**). Les zones qui présentent une densité d'acides aminés hydrophobes relativement élevée interagissent évidemment avec des supports présentant le même caractère. L'immobilisation d'une enzyme comprenant plusieurs sites hydrophobes au voisinage du site actif entraîne le risque de perte d'activité à cause d'une liaison mal orientée. Pour cette raison, la distribution des points hydrophiles et hydrophobes à la surface de la molécule d'enzyme doit être prise en considération lors du choix d'un support (**Brena et Batista-Viera, 1997**) (voir figure 11).

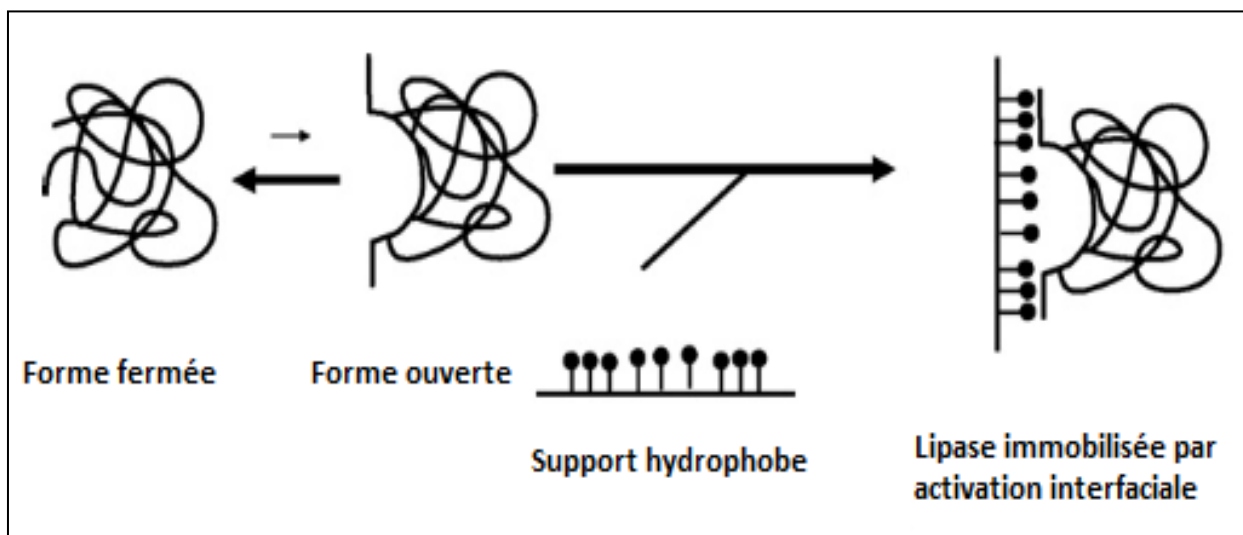


Figure 11: Immobilisation de la lipase via activation interfaciale sur un support hydrophobe (**Fernandez-Lafuente, 2010**)

I.4.1.1.1.3. Interaction par affinité:

Les protéines peuvent contenir des groupes qui présentent une affinité spécifique pour, par exemple, des structures saccharidiques (Carbohydrate Binding Domains). Cette affinité particulière peut être mise en œuvre lors de l'immobilisation de ces enzymes correspondantes. Les supports peuvent être fonctionnalisés avec des saccharides par couplage covalent et ensuite les enzymes peuvent être immobilisées par leur affinité spécifique avec la surface du support. Une étude a rapporté que l'enzyme immobilisée par telle interaction conservait 65% de son activité initiale après six fois de réutilisation (**Haider et Husain, 2009**).

Malgré la capacité de réutiliser l'enzyme et les propriétés enzymatiques améliorées obtenues après immobilisation par affinité, des coûts élevés pour le développement du ligand pourraient être un inconvénient (**Haider et Husain, 2009**).

II.4.1.1.1.4. Interaction ionique:

Outre les sites hydrophiles et hydrophobes, les acides aminés portent également des groupes chargés comme les acides carboxyliques. Le glutamate et l'aspartate sont des exemples d'acides aminés chargés négativement au pH physiologique, tandis que l'arginine et la lysine sont positives dans les mêmes conditions (**Betts et Russell, 2003**). En fonction du pH, ces groupes chargés peuvent être déployés pour immobiliser la protéine sur, par exemple, des résines échangeuses d'ions portant des groupes à contre-charge. L'immobilisation par cette méthode peut donner des liaisons fortes (**Pessela et al, 2003a ; Pessela et al, 2005**). Les deux méthodes d'adsorption et d'interaction ionique offrent l'avantage de réutiliser le support.

Fernandes et *al*, 2002 ont immobilisé une β -galactosidase sur une DEAE sépharose et une résine échangeuse d'ions, avec 60-70% de rétention d'activité. L'enzyme immobilisée a montré une stabilité accrue par rapport à l'enzyme libre. L'avantage évident de l'immobilisation par adsorption ionique est sa simplicité et la possibilité de réutilisation du support.

II.4.1.2. Méthodes irréversibles:

Le concept d'immobilisation irréversible signifie qu'une fois le biocatalyseur est attaché au support, son détachement ne peut se faire sans détruire l'activité de l'enzyme ou la structure du support. Les techniques irréversibles les plus couramment utilisées sont celles utilisant des liaisons covalentes, l'inclusion et la réticulation (figure 12).

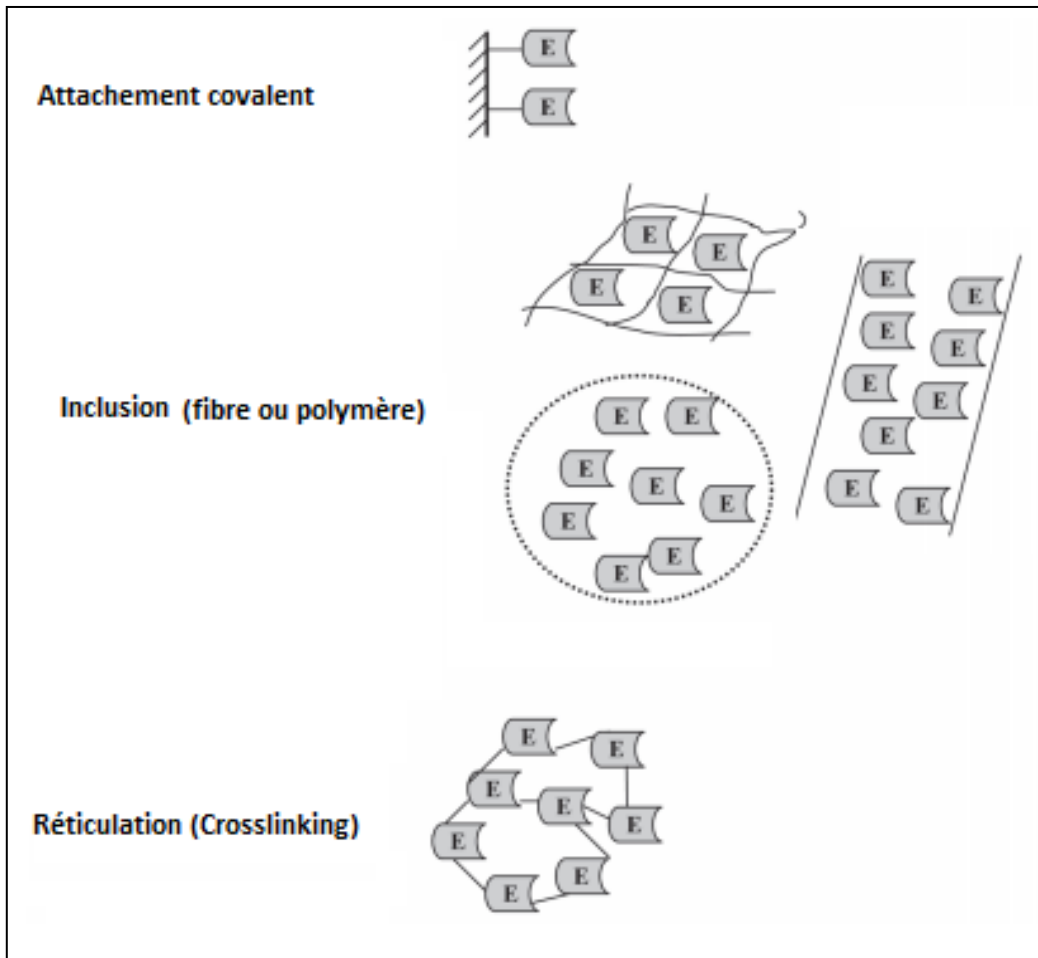


Figure 12: Méthodes d'immobilisation irréversibles (Brena et Batista-Viera, 1997).

II.4.1.2.1. Inclusion:

La méthode d'inclusion est basée sur le piégeage d'une enzyme dans un réseau polymère qui permet au substrat et aux produits de passer à travers mais qui conserve en même temps l'enzyme (O'Driscoll, 1976).

Dans cette méthode, la synthèse du matériau support est faite en présence de l'enzyme dans le milieu, contrairement à l'adsorption physique, où le support est préparé avant l'étape d'immobilisation. En général, les techniques d'immobilisation impliquant le piégeage sont simples et directes. D'autre part, ils peuvent avoir l'inconvénient de la limitation de diffusion du substrat et du produit à l'intérieur et à l'extérieur du support. Des tentatives récentes ont été rapportées qui réduisent cette limitation en produisant des particules en forme de lentille dans lesquelles les enzymes sont piégées (Hronska et al, 2009). Outre la limitation de la diffusion, la libération de l'enzyme peut également être notée, mais la réticulation de l'enzyme avant son immobilisation ou la fixation au polymère pourrait réduire ce problème.

II.4.1.2.2. Liaisons covalentes:

L'immobilisation des protéines par des méthodes basées sur la formation de liaisons covalentes est parmi les plus utilisées. Un avantage de ces méthodes est que, en raison de la nature stable des liaisons formées entre l'enzyme et le support, l'enzyme n'est pas libérée dans la solution ou le milieu réactionnel. Cependant, pour atteindre des niveaux élevés d'activité liée, les résidus d'acides aminés indispensables à l'activité catalytique ne doivent pas être impliqués dans la liaison covalente avec le support (**Mattiasson et Kaul, 1991**). Les méthodes covalentes sont employées en cas d'exigences strictes pour l'absence de l'enzyme dans le produit final comme les aliments. Les réactions les plus fréquemment utilisées impliquent les chaînes latérales suivantes des acides aminés: la lysine (groupe ϵ -amine), la cystéine (groupe thiol) et les acides aspartiques et glutamiques (groupe carboxylique) (**Scouten, 1987**).

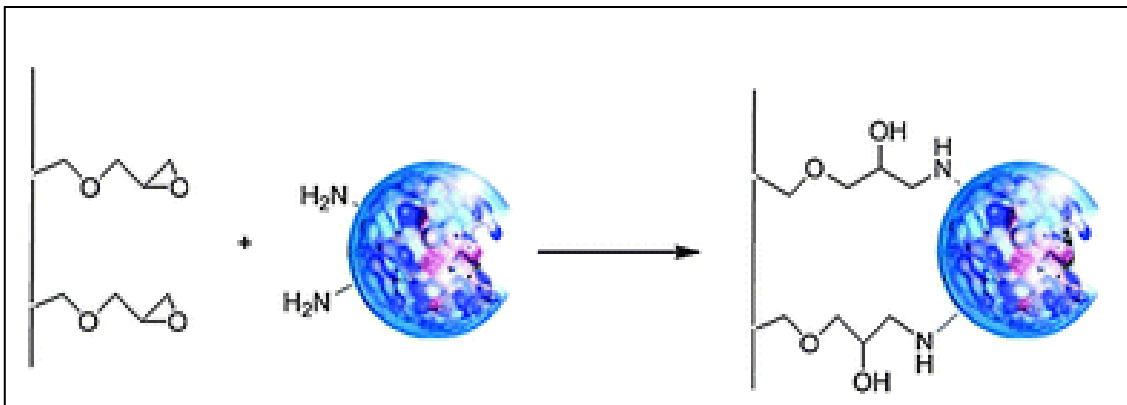


Figure 13: Immobilisation des enzymes par attachement covalent sur un support activé
(**Sheldon et Pelt, 2013**)

Il existe de nombreux supports commerciaux utilisés afin d'établir tels types de liaisons comme l'Eupergit C, les Sepabeads, la silice et les billes d'agarose fonctionnalisées (BCL). Le meilleur choix dans chaque cas nécessite la prise en compte de certaines propriétés pertinentes du biocatalyseur et de l'application. Cependant, il est généralement nécessaire d'essayer plus d'une approche et ensuite d'adapter une méthode aux circonstances spécifiques (**White et Kennedy, 1980 ; Lawson et al, 1983**). Ainsi, il faut prendre en considération que l'attachement covalent peut être réalisé en deux étapes : adsorption initiale sur la surface de support suivie de la formation d'une liaison covalente (**Mateo et al, 2003 ; Torres et al, 2003 ; Bolívar et al, 2009**).

Cependant, la fixation covalente des enzymes par points multiples sur des supports pré-activés fortement activés par des bras espaceurs courts, impliquant de nombreux résidus placés sur la surface de l'enzyme, favorise une rigidification de la structure de l'enzyme immobilisée (figure 14) (Martinek et al, 1977 ; Klibanov, 1979 ; Klibanov, 1982 ; Klibanov, 1983; Mozhaev et Siksnis, 1983 ; Mozhaev et al, 1990), et par conséquent sa stabilisation.

Cependant, les distances relatives entre tous les résidus impliqués dans l'immobilisation par points multiples ont pu être maintenues inchangées lors de tout changement de conformation induit par tout agent de dénaturation (chaleur, solvants organiques, valeurs élevées de pH). Cela devrait réduire tout changement de conformation impliqué dans l'inactivation de l'enzyme et augmenter considérablement la stabilité de l'enzyme (Gupta, 1991; Gianfreda et Scarfi, 1991).

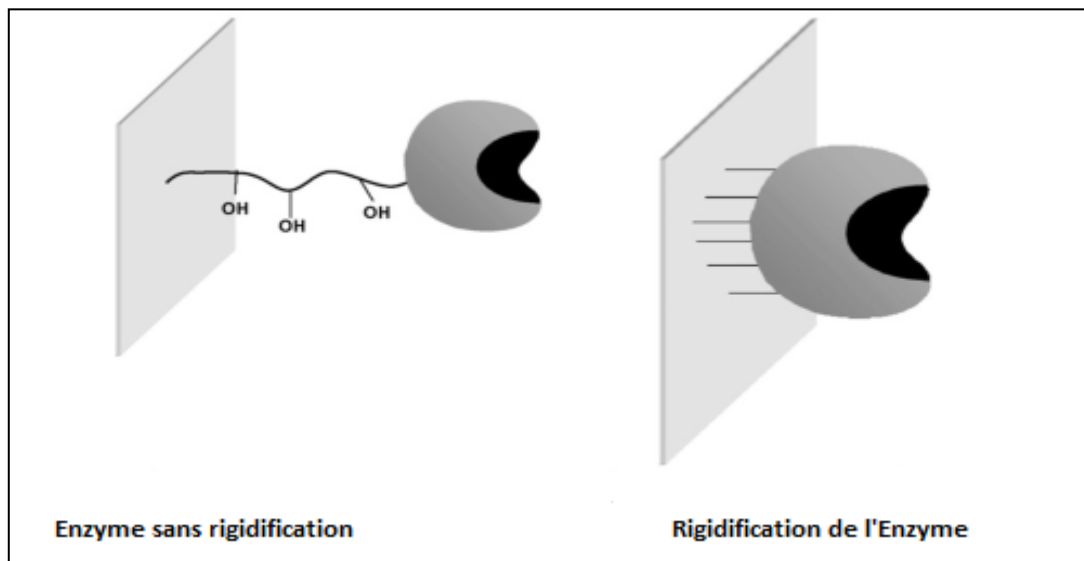


Figure 14: Effet de l'immobilisation par liaisons covalentes sur la stabilité des enzymes (Mateo et al, 2007)

II.4.1.2.3. Réticulation (Cross-linking) :

La réticulation des enzymes a été mentionnée comme étape supplémentaire pour renforcer l'attachement des enzymes déjà adsorbées. Elle consiste à lier les enzymes entre elles par leurs groupes terminaux et par des agents liants. Des agrégats et des cristaux sont ainsi formés par cette technique et sont appelés respectivement Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEA) et Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) (figure 15). Cette technique offre plusieurs avantages, plus la concentration d'enzyme dans le catalyseur est élevée, plus l'enzyme est bien protégée et le coût de la production, due à l'absence de support, est faible.

La réticulation peut également être très utile dans l'immobilisation d'enzymes multimériques pour empêcher la dissociation de la structure enzymatique et la perte d'activité (**Fernandez-Lafuente, 2009**). Cependant, il n'existe pas de protocoles standards pour former de tels agrégats. Le choix du protocole dépend de l'enzyme utilisée, du support et de l'objectif de l'immobilisation.

Le couplage de la réticulation avec plusieurs méthodes d'immobilisation peut donner lieu à de meilleurs résultats, ce qui peut maintenir l'activité du biocatalyseur jusqu'à six jours à 100% alors que pour une enzyme uniquement adsorbée, son activité est quasi nulle au bout de la même période (**Filho et al, 2008**).

Le glutaraldehyde est un agent bifonctionnel qui a donné de bons résultats de stabilisation dans le même contexte de réticulation (**Lopez-Gallego et al, 2005a; Alonso et al, 2005 ; Betancor et al, 2006a**). L'utilisation du glutaraldehyde est polyvalente et peut être employée dans des modes très différents (**Migneault, 2004a; Migneault et al, 2004b; Betancor et al, 2006b**). Cependant, en termes de stabilisation, le traitement avec le glutaraldehyde des protéines préalablement adsorbées sur le support portant des groupes amines primaires offre, dans de nombreux cas, une grande stabilité, car il permet la réticulation des molécules enzymes entre elles d'une part et entre les enzymes et le support d'autre part. Cela est expliqué par la modification chimique de la totalité de la surface enzymatique (**Lopez-Gallego et al, 2005b**).

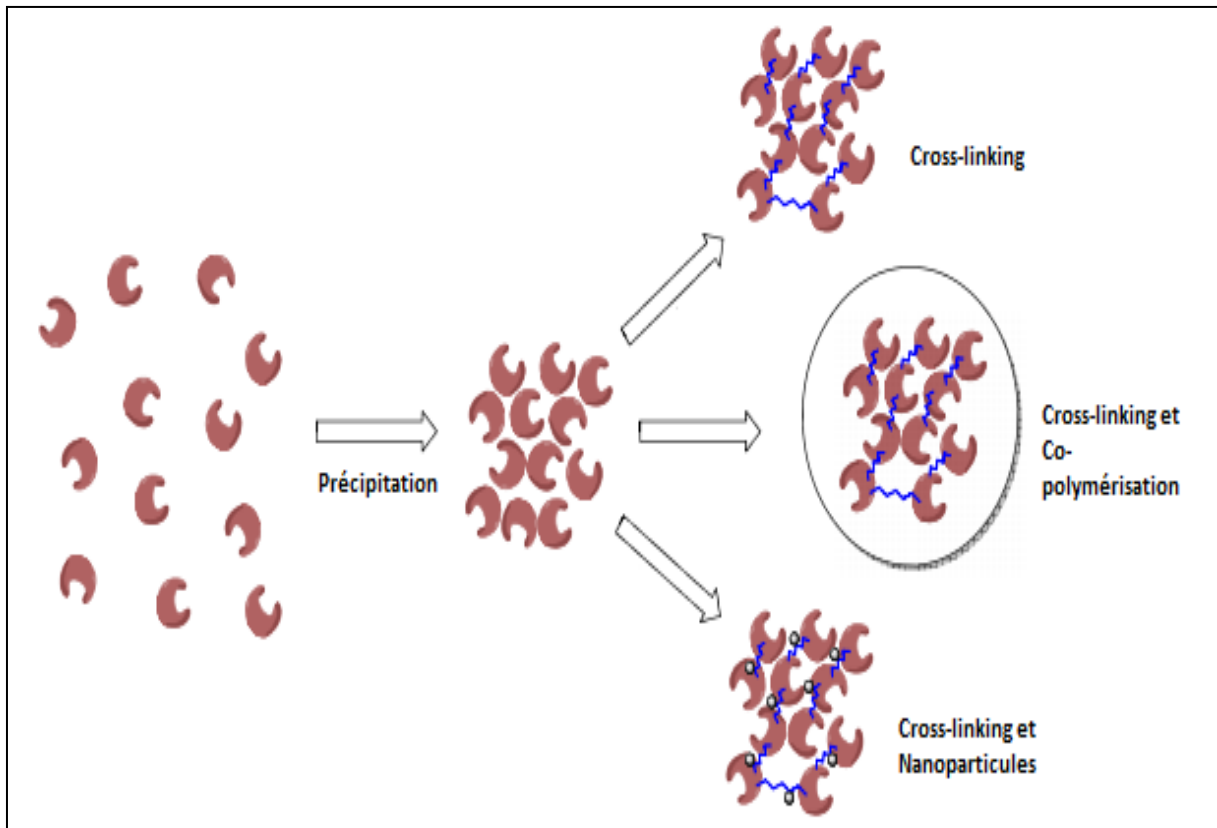


Figure 15: Formation d'agrégats d'enzymes réticulées (CLEAs) par différentes façons (Benjamins, 2014)

II.4.2. Avantages de la technologie d'immobilisation:

Il ya de nombreux avantages dans l'immobilisation des enzymes sur un support solide dont les principaux sont:

- La récupération de l'enzyme du milieu réactionnel et sa séparation du substrat ou du produit ;
- L'utilisation multiple ou répétitive de la même enzyme ;
- Lanon contamination du produit final, par l'enzyme, particulièrement exigée par les industries alimentaires et pharmaceutiques (Ghiaci et al, 2009)

Par ailleurs, l'immobilisation de l'enzyme sur le support qui peut s'effectuer de plusieurs façons, peut entraîner la modification de la structure de l'enzyme, ce qui affecte souvent son activité catalytique (Chellapandian, 1998).

II.4.3. Propriétés des enzymes immobilisées:

En raison de l'immobilisation, les propriétés des enzymes seront modifiées telles que l'activité catalytique et la stabilité. La modification des propriétés de l'enzyme après immobilisation est due au fait que l'enzyme et le substrat réagissent dans un microenvironnement différent de la réaction où l'enzyme est libre. Ces modifications sont dues aux changements de la

conformation tridimensionnelle des protéines lorsqu'elles sont liées au support. Ces changements conformationnels sont dans une moindre mesure produits dans les systèmes enzymatiques limités (**Sharma et al, 2008**). La stabilité est également due à l'augmentation de la charge enzymatique qui provoque la diffusion contrôlée et au nombre de liaisons formées entre l'enzyme et la matrice (**Trevan, 1980**).

II.4.4. Facteurs influençant l'immobilisation enzymatique:

L'immobilisation des enzymes a été rapportée par de nombreux auteurs en utilisant différents matériaux supports (**Sharp et al, 1969 ; Olson et Stanley, 1973 ; Bodalo et al, 1991 ; Caprio et al, 2000 ; Poletto et al, 2005 ; De Lathouder et al, 2006**) et est connue comme un des moyens de stabilisation d'enzyme en vue de leur utilisation dans les procédés industriels. Pour cette raison, des paramètres doivent être pris en considération lors de l'immobilisation afin de choisir la méthode appropriée et d'obtenir la stabilité souhaitée.

II.4.4.1. Force ionique:

Pendant l'immobilisation, la force ionique peut être d'une importance énorme. Les supports qui présentent un caractère plus hydrophobe peuvent influencer négativement la configuration du site actif des enzymes. Afin d'obtenir un chargement enzymatique élevé, la force ionique choisie devrait faciliter l'adsorption maximale, par échange d'ions, avant que les liaisons covalentes s'établissent, bien que cela puisse être désavantageux pour le rendement de l'activité enzymatique. L'effet négatif provoqué par le support hydrophobe peut être compensé par une étape supplémentaire après la fixation initiale de l'enzyme (**Mateo et al, 2002**).

Cependant, l'utilisation de certains composants hydrophiles comme la glycine ou l'éthanolamine est un procédé classique capable de bloquer les groupes fonctionnels n'ayant pas réagi dans le milieu réactionnel lors de la formation des liaisons covalentes. Ceci augmente l'hydrophilie de la surface du support et empêche une interaction supplémentaire entre l'enzyme et le support (**Mateo et al, 2000**).

II.4.4.2. pH et temps de réaction:

En plus de la force ionique, le pH d'immobilisation est également un facteur important. Selon le pH, les groupes réactifs enzymatiques peuvent être chargés ou non, ce qui détermine la réactivité de ces groupes. Il est donc évident que la valeur du pH pendant l'immobilisation peut avoir un impact important sur le rendement final d'immobilisation. Le temps de réaction peut ainsi avoir une influence considérable sur le développement de l'attachement par points

multiples, en particulier en combinaison avec des valeurs élevées de pH (Mateo et al, 2003 ; Torres et Batista-Viera, 2012).

II.4.4.3. Chargement enzymatique:

Le rapport enzyme/support est essentiel pour obtenir une rétention élevée de l'activité enzymatique et est différent d'une enzyme à l'autre et d'un support à l'autre. A faible charge enzymatique, les molécules d'enzyme ont tendance à maximiser le contact avec le support. En général, la formation d'une monocouche de molécules enzymatiques entraîne la plus grande rétention d'activité (Cao, 2006 ; Fernanadez-Lafuente, 2010).

Un ratio optimal de 1:20 (mg de protéine : mg de support) pour l'immobilisation d'une β -galactosidase dérivée de *Bacillus circulans* sur Eupergit C a été rapporté (Hernaiz et Crout, 2000). La même enzyme a été immobilisée sur Sepabeads, également un support acrylique avec fonctionnalité époxyde, et le rapport optimal trouvé était de 1:30 (mg de protéine : mg de support) (Torres et Batista-Viera, 2012).

II.4.4.5. Nature du support:

La nature du support peut influencer significativement l'immobilisation d'une enzyme. Récemment, des chercheurs ont démontré que l'immobilisation covalente par points multiples sur de la silice mésoporeuse améliore la stabilité thermique d'une β -galactosidase de *B. circulans* (la demi-vie augmente de 370 fois par rapport à l'enzyme soluble). Ceci a été expliqué par la morphologie des pores (Bernal et al, 2012). Certaines propriétés telles que l'hydrophobicité ou l'hydrophilie, sont également très importantes lors de l'immobilisation covalente.

La taille des pores du support utilisé a une grande influence sur la rétention d'activité et la performance des enzymes immobilisées. Des études comparatives ont été faites entre l'Eupergit C et Eupergit C250L où les tailles de pores sont respectivement de 10 nm et 100 nm. L'immobilisation de la pénicilline G acylase ayant un poids moléculaire de 80 kDa avec des dimensions de 70Å° x 50Å°x 55Å°, peut être facilement établie sur l'Eupergit C (Tishkov, et al, 2010). Cela n'est pas du tout le cas pour une β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* ayant des dimensions plus grandes 140Å° x 153Å°x 216Å° (Pereira-Rodriguez et al, 2012).

II.4.5. Supports d'immobilisation :

Bien que les enzymes fonctionnent dans des systèmes biologiques aqueux, des travaux ont démontré que l'activité catalytique peut être préservée dans des systèmes réactionnels organiques ou hétérogènes (Klibanov, 1983; Zaks et Klibanov, 1985). Par conséquent, les

techniques d'immobilisation ont été constamment améliorées et elles sont devenues une des questions les plus importantes pour l'application industrielle des réactions biocatalytiques (**Tischer et Kasche, 1999**). La disponibilité de nombreux matériaux pour effectuer l'immobilisation a conduit à un grand nombre de rapports sur ce sujet.

Pratiquement, toutes les enzymes utilisées dans les applications biocatalytiques ont été testées pour l'immobilisation dont la majeure partie des études expérimentales ont ciblé des méthodes impliquant la présence d'un matériau de support insoluble. Ainsi, les propriétés de l'enzyme immobilisée sont déterminées par les caractéristiques de l'enzyme et du matériau support. Pour cela, le choix et la sélection d'un support approprié est essentielle pour obtenir une enzyme immobilisée avec une rétention d'activité élevée et une stabilité accrue, dans des conditions économiquement viables (**Mateo et al, 2007**).

II.4.5.1. Sélection des supports appropriés :

Les caractéristiques physiques et chimiques des matériaux support sont toutes deux importantes pour permettre la sélection du support le plus approprié. Les principales caractéristiques chimiques sont la composition, les groupes fonctionnels responsables à l'interaction avec l'enzyme, et la stabilité chimique dans les conditions de réaction employées. Parmi les caractéristiques physiques, considérées comme importantes pour tout matériau utilisé comme support (**Kennedy et Cabral, 1987**), et afin de sélectionner le support conférant plus de stabilité à la molécule immobilisée, la surface spécifique appropriée, la perméabilité pour les substrats, la taille des particules et des pores sont bien requises. Pour ce fait, le matériau support doit présenter :

- Une grande surface interne pour avoir une bonne congruence géométrique avec la surface de l'enzyme. Si le support est formé de fibres très fines plus petites que la protéine, il sera difficile d'obtenir une interaction intense entre l'enzyme et le support.
- Une forte densité superficielle de groupes réactifs. Seulement s'il existe de nombreux groupes réactifs sur le support, partagés avec la surface de l'enzyme, une fixation covalente intense par points multiples peut s'établir.
- Les groupes réactifs du support doivent être suffisamment stables pour permettre de réactions de longues durées (**Fernandez-Lafuente, 2010**).

Parmi les protocoles d'immobilisation décrits dans la littérature, certains supports peuvent remplir la plupart de ces exigences telles que les billes d'agarose, les zéolites, le verre poreux, les résines époxydes qui peuvent offrir de grandes surfaces pour les interactions enzymatiques. Parmi les groupes réactifs, les groupes époxydes ou glyoxyl peuvent être

considérés comme très adéquats pour obtenir l'attachement covalent des molécules enzymatiques (**Katchalski-Katzir et Kraemer, 2000 ; Mateo et al, 2006**).

II.4.5.2. Différents types de supports utilisés dans l'immobilisation:

Pratiquement, il est impossible de trouver un support universel pour l'immobilisation enzymatique, puisque les exigences sont spécifiques et différentes pour chaque enzyme et application. En fonction de leur composition chimique, les supports d'immobilisation enzymatique sont habituellement classés en matériaux inorganiques et organiques (**Kennedy et Cabral, 1987; Peter, 2005**) (voir les tableaux 5 et 6). Au fil du temps, cette classification est devenue de plus en plus difficile, suite au développement de nouveaux supports hybrides organiques-inorganiques.

II.4.5.2.1. Supports inorganiques:

En particulier, les matériaux à base de silice sont largement utilisés pour l'immobilisation d'enzymes en raison de leur bon écoulement, leur résistance mécanique, la possibilité de leur régénération ainsi de leur résistance aux attaques microbiennes (**Pugniere et al, 1988; Wilso et al, 1994**). De nombreuses matrices inorganiques ont été testées comme supports pour l'immobilisation des enzymes, dont une partie était synthétique et autre naturelle, mais les produits synthétiques présentent toujours de nombreux avantages et sont actuellement utilisés dans la plupart des applications (**Ghiaci et al, 2009**). Quelques supports inorganiques sont présentés dans le tableau 5.

L'adsorption est la méthode la plus appliquée en utilisant un support inorganique vue sa simplicité pour avoir un biocatalyseur immobilisé, mais le degré élevé de la désorption qu'elle génère pendant le processus biocatalytique a mené à plusieurs études réalisées afin d'optimiser les meilleures combinaisons protéine-support, sur la base des propriétés physico-chimiques du support et des biomolécules (**Torres-Salas et al, 2011**).

Tableau 5: Supports inorganiques utilisés pour l'immobilisation des enzymes (Choi et Kim, 2015).

Type de support	Enzyme immobilisée	Méthode d'immobilisation
<i>Naturel</i>		
CaCO ₃	Lipase	Adsorption
kaolinite	Lipase	Adsorption
Argiles minérales	Cellulose	Adsorption
Montmorillonite	Lipase	Adsorption
Bentonite	Lipase	Adsorption
<i>Synthétique</i>		
Alumine	Pancréatine	Adsorption
Charbon actif	Pancréatine	Adsorption
ZrOCl ₂ actif	Cellulose	Adsorption
Molécules mésoporeuses	Peroxydase, trypsine	Adsorption
Céramique	Lipase, glucoamylase	Adsorption
Silice mésoporeuse	Peroxydase, catalase, protéase, trypsine	Adsorption suivie d'une encapsulation
Zirconie poreuse	Trypsine	Liaisons covalentes
3-isothiocyanato-propyl actif	Chymotrypsine, papaine, pepsine	Liaisons covalentes
Céramique	β-D-galactosidase	Liaisons covalentes, activation par glutaraldehyde
Fe ₃ O ₄ magnétique	Glucose oxydase, chymotrypsine	Liaisons covalentes, activation par carbo-di-imide
Silice	Penicilline G acylase	Liaisons covalentes, activation par glutaraldehyde

Parmi les matériaux inorganiques naturels, les particules de kaolinite poreuse ont été considérées comme appropriées pour l'immobilisation de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (Iso et al, 2011). Lorsqu'elle est utilisée pour la production de biodiesel, l'activité de la lipase immobilisée est fortement augmentée par rapport à l'enzyme libre, cela est dû au fait que les sites actifs de l'enzyme deviennent plus accessibles après immobilisation, suite à la dispersion des molécules enzymatiques à la surface de support.

Bien qu'ils soient peu coûteux et facilement disponibles, les matériaux inorganiques naturels ne sont pas couramment utilisés comme supports d'immobilisation, car leurs caractéristiques ne sont généralement pas constantes. Les matériaux synthétiques sont plus appropriés, car leurs caractéristiques telles que la surface spécifique, la morphologie de surface, la composition chimique, la porosité, la distribution des pores, peuvent être évaluées dans un but spécifique (Choix et kim, 2015).

II.4.5.2.2. Supports organiques:

Même avec certains inconvénients par rapport à des matrices inorganiques, comme la faible stabilité à des températures élevées, en présence de solvants organiques ou lors d'une attaque microbienne, la majeure partie des supports déjà utilisés pour des applications à grande échelle sont de nature organique. L'argument majeur pour l'utilisation de supports organiques dans l'immobilisation enzymatique est la variété de groupes organiques fonctionnels qui peuvent être attachés, permettant de nombreuses options pour lier l'enzyme, en particulier par les liaisons covalentes. Typiquement, les matériaux de support organiques sont de nature polymère et peuvent être classés en macromolécules naturelles ou en polymères synthétiques (tableau 6) (**Kennedy et Cabral, 1987**).

Tableau6: Supports organiques utilisés pour l'immobilisation des enzymes (**Choi et Kim, 2015**).

Type de support	Enzyme immobilisée	Méthode d'immobilisation
<i>Naturel</i>		
Alginate	Dextranucrase	Entrapment
Alginate	β -D-galactosidase	Entrapment
K-carragenane	Peroxydase	Entrapment
Chitosane	β -D-galactosidase	Liaisons covalentes, activation par glutaraldehyde, Entrapment
Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)	Lipase	Adsorption
Diethylaminoethyl (DEAE) cellulose	Peroxydase	Adsorption ionique
Glyoxyl agarose	Chymotrypsine, lipase	Liaisons covalentes
<i>Synthétique</i>		
Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate)	Lipase	adsorption
Polyethylene (Accurel EP-400)	Lipase	Adsorption
Poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) (Eupergit L-100)	Xylanase	Adsorption
Polyacrylamide réticulé	Glucose oxydase	Entrapment
Polytetrafluorethylene (Teflon)	A-chymotrypsine	Entrapment
Nitrocellulose magnétique	glucoamylase	Liaisons covalentes, activation par glutaraldehyde
Polyacroleine magnétique activé	Glucose oxydase	Liaisons covalentes

II.4.5.2.2.1. Polymères naturels:

Il faut souligner que les polymères naturels (alginate, carragénane, chitosane) sont rarement utilisés sous forme non modifiée pour l'immobilisation, principalement pour des techniques de piégeage. Les plus largement utilisés sont les polysaccharides dont les groupes fonctionnels principaux participant dans l'interaction avec l'enzyme sont des groupes hydroxyles, qui ont besoin d'une activation avant d'établir l'immobilisation.

Cependant, les supports organiques sont également appropriés pour l'immobilisation par adsorption, car ils peuvent avoir une porosité et des propriétés de surface adéquates pour permettre la liaison physique par des forces non spécifiques, comme des liaisons hydrogène ou celles de van der Waals (**Vieira et al, 2011**).

La cellulose est le polymère naturel qui a été l'un des premiers matériaux utilisés pour l'immobilisation des enzymes. Les groupes hydroxyles de la cellulose ne sont pas suffisamment réactifs pour former des liaisons covalentes avec l'enzyme, mais ils peuvent être soumis à des modifications chimiques différentes pour obtenir des celluloses modifiées (**Sharp et al, 1969 ; Benjamins, 2014**).

L'agarose, isolé à partir d'agar naturel, n'a pas tant d'applications pour l'immobilisation que d'autres polysaccharides, étant une matrice présentant une résistance mécanique et chimique plus faible. Cependant, l'agarose peut être activé comme la cellulose ou d'autres matériaux poly-hydroxyliques, pour obtenir un support d'immobilisation précieux. (**Fernandez-Lorente et al, 2011**), généralement commercialisé sous le nom de sépharose BCL ou agarose fonctionnalisé.

Ces dernières années, un nombre important de travaux a été publié par Guisan et ses collaborateurs, en utilisant le glyoxyl-agarose comme support d'immobilisation (**Palomo et al, 2004, Mateo et al, 2006; Mateo et al, 2007, Pedroche et al, 2007, Fernández-Lorente et al, 2011, Vieira et al, 2011**). L'étude avait comme objectif de lier les groupes aldéhydes du support à des bras espaceurs courts, cette opération est suivie d'une liaison covalente, par points multiples, des molécules d'enzyme à ce support activé. Les bases de Schiff formées avec les groupes amines des enzymes ont ensuite été réduites avec du borohydrure de sodium pour fixer l'enzyme au support par des liaisons amines secondaires très stables, tandis que les groupes aldéhydes résiduels ont été convertis en groupes hydroxyles inertes (**Mateo et al, 2005**).

II.4.5.2.2.2. Polymères synthétiques:

Un grand nombre de polymères synthétiques sont disponibles comme supports pour l'immobilisation d'enzymes (tableau 6). Bien que la liaison covalente soit la méthode d'immobilisation la plus appliquée sur les polymères synthétiques, l'adsorption et l'inclusion ont également été testées. La lipase de *Candida rugosa* a été immobilisée par adsorption sur un copolymère macroporeux, en obtenant 15.4 mg/g de protéines liées. L'activité enzymatique immobilisée, mesurée pour l'hydrolyse de l'huile de palme, était de 70% par rapport à celle de l'enzyme libre. La stabilité opérationnelle était plutôt faible, avec seulement 57% d'activité résiduelle obtenue après cinq cycles d'hydrolyse (**Mojovic et al, 1998**).

La même lipase a été adsorbée sur deux supports polymères différents : des microsphères de polystyrène non poreux et de la poudre de polyéthylène à basse densité poreuse où le premier a montré une affinité élevée pour l'adsorption de la lipase, mais l'activité hydrolytique de l'enzyme immobilisée était très faible. Par contre, le support poreux de polyéthylène a présenté une efficacité d'immobilisation acceptable seulement à forte charge enzymatique, mais la vitesse d'hydrolyse était comparable à celle obtenue avec la lipase libre et la possibilité de réutilisation de l'enzyme était considérée comme satisfaisante avec une diminution de 35% de l'activité initiale après cinq cycles d'hydrolyse (**Murray et al, 1997**).

La pectinase commerciale a été immobilisée par adsorption ionique sur un support d'échange d'anions faiblement basique (Dowex WRB). Une meilleure stabilité thermique et opérationnelle avec seulement 20% de perte d'activité après neuf cycles de réutilisation et une augmentation de 20% de productivité ont été rapportées pour l'enzyme immobilisée (**Demir et al, 2001**).

Les polymères à groupe époxyde (figure 16) offrent l'avantage d'une liaison d'enzyme en une seule étape. Ces groupes portent des bras espaceurs courts et peuvent réagir avec plusieurs groupes nucléophiles présents dans la structure enzymatique tels que les groupes amino-sulphydryle, imidazole, tyrosyle ou même avec des groupes carboxyliques à une vitesse plus lente (**Mateo et al, 2005**).

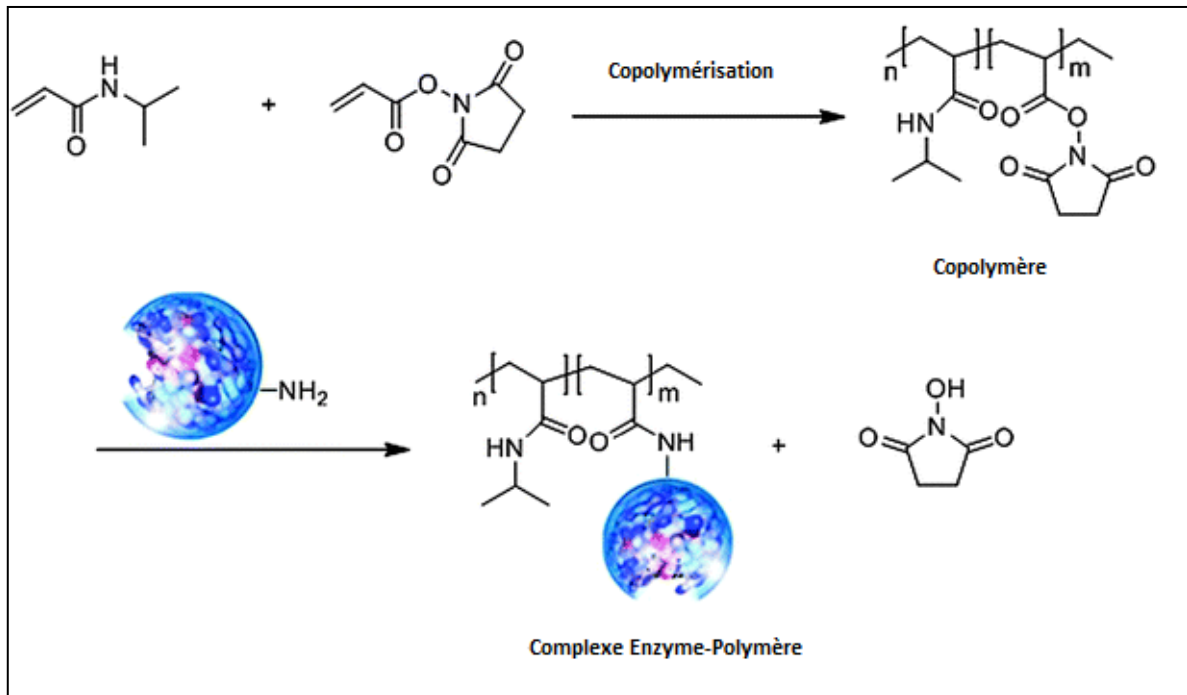


Figure 16: Immobilisation des enzymes sur un polymère (Sheldon et Pelt, 2013)

II.4.6. Stabilisation des enzymes multimériques par immobilisation :

Un problème spécifique dans la conception d'un biocatalyseur est rencontré si l'enzyme utilisée est multimère. L'inactivation de ces enzymes commence, dans de nombreux cas, par la dissociation des sous-unités (Poltorak et Torshin, 1998). Même si cela n'est pas pertinent pour la stabilité enzymatique, la libération de sous-unités enzymatiques peut contaminer le produit final (un aliment). La stabilisation des enzymes multimériques par moyen de génie génétique peut être trop complexe, mais l'immobilisation ou la modification chimique sont des stratégies les plus simples pour résoudre le problème de dissociation des protéines oligomères. Dans ce cas, la stratégie de stabilisation doit prendre en considération la nature oligo ou multimériques de l'enzyme. Ainsi, la structure multimère des enzymes dimériques peut être facilement stabilisée par immobilisation sur des supports hautement activés (Fernandez-Lafuente et al, 1999).

Cependant, si la structure enzymatique est plus complexe, il est fort possible que toutes les sous-unités de l'enzyme ne soient pas toutes attachées à la surface. Dans ce cas, l'immobilisation sur des supports solides peut être complétée par la réticulation de l'enzyme déjà immobilisée avec des agents polyfonctionnels (Fernandez-Lafuente et al, 1999).

II.5. Stabilisation opérationnelle des enzymes par immobilisation :

L'immobilisation d'enzyme à l'intérieur de la structure poreuse d'un solide permet la dispersion des molécules enzymatiques sans possibilité d'interagir avec une interface externe. Ainsi, cette immobilisation stabilisera l'enzyme et l'empêchera de l'interaction avec les molécules de l'extrait enzymatique, de l'agrégation, de l'autolyse ou de la protéolyse par des protéases présentes dans l'extrait qui seront également dispersées et immobilisées. En outre, les molécules enzymatiques immobilisées ne seront pas en contact avec la surface hydrophobe externe, telle que des bulles d'air générées par une forte agitation, nécessaires pour contrôler le pH et qui peuvent produire une inactivation enzymatique de protéines solubles (Caussette et al, 1998; Caussette et al, 1999; Colombie et al, 2001 ; Bommaris et Karau, 2005).

Ainsi, tout protocole d'immobilisation d'une enzyme à l'intérieur d'un solide poreux peut permettre une "stabilisation opérationnelle" de l'enzyme, même sans affecter réellement la stabilité structurelle de l'enzyme, simplement par les mécanismes décrits ci-dessus.

Cependant, cette stabilisation n'est pas universellement associée à l'immobilisation. Par exemple, les enzymes immobilisées sur les nanoparticules non poreuses (principalement des nanoparticules magnétiques) (Qiu et al, 2005 ; Tsang et al, 2006) peuvent interagir avec des interfaces externes, voire des molécules enzymatiques immobilisées sur d'autres particules. Cela peut être résolu en utilisant des stratégies appropriées (par exemple, couvrant les protéines immobilisées avec des polymères) (Betancor et al, 2005).

III. Application des enzymes immobilisées :

-Application biomédicale : les enzymes immobilisées sont utilisées en médecine depuis 1990 (Ofagain et Okennedy, 1992, Tischer et Wedekind, 1992) dans le diagnostic et le traitement des maladies. L'encapsulation enzymatique est le moyen d'immobilisation le plus facile dans le domaine biomédical et c'est un processus réversible dans lequel l'enzyme peut être récupérée (Lizano et al, 1998). Cependant, les enzymes combinées avec des biomatériaux offrent des propriétés biologiques et fonctionnelles importantes notamment dans l'application de l'ingénierie tissulaire pour la réparation des tissus. L'avantage de l'immobilisation enzymatique en biomédical est que les enzymes libres sont consommées par les cellules et ne sont pas actives pour une utilisation prolongée, par contre les enzymes immobilisées restent stables, stimulent la croissance et réparent les tissus endommagés (Johnson et al, 1998).

-Industrie alimentaire : Dans l'agro-alimentaire les enzymes interviennent dans de nombreux procédés de fabrication : produits laitiers, production d'alcool, d'amidon, élaboration des arômes, fabrication des jus de fruits et des boissons gazeuses..etc. Les β -galactosidases immobilisées, par différentes méthodes, sont utilisées pour l'hydrolyse du lactose dans le lait (**Grosova et al, 2008**) et constitue une solution pour les personnes incapables d'assimiler le lactose. L'immobilisation par des liaisons covalentes n'est pas fréquemment utilisée en raison de son coût élevé, alors que la réticulation est utilisée à des fins diverses telles que les confiseries et les glaces (**Bozoglu et al, 1984**).

*-Production de biodiesel:*le biodiesel est un ester mono-alkylique d'acides gras à longue chaîne, produit par des triglycérides d'origine végétale ou animale avec l'estérification de l'alcool (méthanol, éthanol) en présence du catalyseur. La production biologique de carburant liquide avec des lipases a une grande considération avec une amélioration rapide (**Fjerbaek et al, 2009**). La lipase catalyse la réaction avec moins d'exigences énergétiques, mais la production de lipase est coûteuse, d'où la nécessité d'une immobilisation permettant une utilisation répétée et une stabilité (**Cao, 2005; Salis et al, 2008**)

-Traitement des eaux usées : les traitements des eaux usées sont nécessaires à l'heure actuelle. Les sources d'effluents de colorants sont diverses (l'industrie textile, du papier, du cuir). Ces effluents menacent l'environnement et sont cancérigènes même en faible concentration. Les enzymes utilisées dans les traitements des eaux usées sont généralement les peroxydases, les laccases, les réductases mais les conditions extrêmes qu'exige le procédé du traitement, peuvent provoquer la perte d'activité. Pour résoudre ce problème, des enzymes immobilisées sont utilisées. Les peroxydases ont été immobilisées par piégeage dans des billes d'alginate (**Omar et Pak, 2008; Wu et al, 1998**). La méthode d'adsorption est largement utilisée en raison de sa régénération facile (**Watlington, 2005**).

-Industrie de textile : les enzymes d'origine microbienne présentent un grand intérêt pour l'industrie textile. Les enzymes telles que la cellulase, l'amylase, la pectinase, la cutinase...etc., sont utilisées pour diverses applications textiles telles que le décapage, le biopolissage, la déshydratation et le traitement des laines. Parmi ces enzymes, la cellulase a été largement utilisée. Les industries de textile se sont transformées en processus enzymatique au lieu d'utiliser un produit chimique sévère qui affecte la pollution et cause des dommages aux tissus (**Araujo et al, 2008**). Toutefois, le traitement des tissus avec des enzymes nécessite des températures et des valeurs de pH élevées, alors que les enzymes libres ne résistent pas aux

conditions extrêmes. Par conséquent, l'immobilisation enzymatique pour ce processus permet de résister à l'extrême valeur de pH et température et à conserver son activité pendant plus de cinq cycles (**Ramakrishnan et al, 2007**).

-Industrie des détergents :l'industrie des détergents utilise également des enzymes pour enlever les tâches. Les enzymes utilisées dans l'industrie des détergents sont : les protéases qui servent à éliminer les tâches du sang, d'œuf et d'herbe ; l'amylase utilisée pour éliminer les tâches à base d'amidon comme les pommes de terre, les sauces, le chocolat ; la lipase pour éliminer les tâches d'huile et de graisses;la cellulase est utilisée pour les tissus à base de coton afin d'améliorer l'adoucissement, l'éclaircissement de la couleur et l'élimination des tâches du sol (**Trevañ, 1980 ; Koch-Schmidt et Mosbach, 1997**). La protéase a été également immobilisée par un procédé de piégeage avec du gel de polyacrylamide. L'enzyme a conservé son activité pendant environ six cycles avec un temps d'incubation de 20min à 55°C pour chaque cycle, par ce procédé d'immobilisation, l'activité protéase est retenue pour environ 83% de l'activité initiale après six cycles (**Vasconcelos et al, 2006**).

PARTIE II:

ETUDE EXPERIMENTALE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Objectif du travail :

Ce travail s'inscrit dans la thématique « optimisation des biocatalyseurs et des bioprocédés ». Le principal matériau utilisé est l'agarose commercialisé sous le nom d'Octyl sépharose 4BCL, une matrice hydrophobe ayant des caractéristiques texturales et poreuses bien connues, capable d'immobiliser des lipases par simple adsorption ou par liaison covalente après sa modification.

Des travaux antérieurs réalisés au niveau du même laboratoire ont montré la performance catalytique de la lipase TLL et de la phospholipase Lecitase, immobilisées par hydrophobie sur l'Octyl agarose ou par liaisons covalentes sur l'Octyl glyoxyl agarose.

L'objectif de notre étude est l'amélioration de la stabilité de ces enzymes, en utilisant le même support puisque les résultats déjà obtenus sont très satisfaisants sur le plan activité. Ainsi, la limitation de la désorption des enzymes dans le milieu réactionnel ou durant les inactivations thermiques est prise en considération lors du développement d'un protocole d'immobilisation approprié.

L'effet de certains facteurs sur la thermo-stabilité des hydrolases étudiées est évalué. Ces facteurs sont le chargement enzymatique (faible et élevé), la modification chimique de l'enzyme par agent bifonctionnel, le revêtement ionique et la modification du support.

Une co-immobilisation est réalisée afin d'étudier la stabilité opérationnelle des lipases immobilisées et leur réutilisation sans avoir une perte significative d'activité et sans affecter la stabilité thermique.

II. Matériel et Méthodes:

II.1. Matériel utilisé:

Spectrophotomètre UV-visible (Jasco STR 773-V630), Bains marie (Grant JB Nova), agitateur à balancement (MX-T6-S), agitateur magnétique (AGIMATIC-S), agitateur orbital (Thermo Scientifique), pH mètre (CRISON Basic 20), électrophorèse (BIORAD Mini-PROTEAN-Tetra System), balance de précision (OHAUS-Pioneer), mini-centrifugeuse (Fisherbrand).

II.2. Réactifs utilisés:

Solutions de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (26 mg/ml) et de phospholipase Lecitase Ultra (17 mg/ml) offertes par Novozymes (Spain), la β -galactosidase

d'*Aspergillus oryzae* (20 unités ONPG/mg de protéines), O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), O-nitrophénol (ONP), *p*-nitrophényl butyrate (*p*-NPB), *P*-nitrophénol (*PNP*), polyéthylèneimine (PEI) (MW 25 000) périodate de sodium, borohydrure de sodium, glutaraldehyde et l'acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique (TNBS) de Sigma-Aldrich (St. Louis, Etats-Unis). Octyl sépharose CL-4B beads et l'Octyl sépharose activée avec du bromure de cyanogène BrCN sont de la société GE Healthcare. Les réactifs d'électrophorèse (Acrylamide et Bis-Acrylamide, TEMED) sont de Bio-Rad (Hercules, USA), un kit d'étalonnage par protéines marqueurs LMW de la société GE Healthcare (Amersham, UK). Le réactif de Bradford de Bio-Rad (Hercules, USA) et la Sérum Bovine Albumine (BSA) utilisée comme standard est de Thermo-scientifique, USA. Tout autre réactif utilisé dans cette étude dans la préparation des différentes solutions sont de grade analytique.

II.3. Méthodes :

Tous les dosages, de protéines ou d'activité, sont réalisés en trois répétitions et les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne des valeurs obtenues avec l'écart type.

II.3.1. Effet du chargement enzymatique sur la stabilité enzymatique :

II.3.1.1. Préparation du support Octyl agarose (OC):

Le matériau choisi dans cette étude pour être utilisé comme support d'immobilisation des hydrolases est bien l'Octyl agarose. Le support est préparé en éliminant totalement l'éthanol, contenu dans les pores des billes d'agarose par lavage excessif avec de l'eau distillée. Le support est ensuite filtré sous vide sans séchage total afin d'éviter la destruction des billes d'agarose, et puis stocké à 4°C jusqu'à l'utilisation.

II.3.1.2. Immobilisation de la lipase sur l'Octyl agarose :

L'expérimentation est effectuée en utilisant trois différentes concentrations enzymatiques (1, 6 et 30 mg de lipase *Thermomyces lanuginosus* TLL par gramme de support humide). L'objectif est d'avoir trois différents chargements enzymatiques afin de déterminer l'effet de ce paramètre sur la stabilité thermique des dérivés enzymatiques obtenus.

La solution enzymatique commerciale est diluée dans un volume de 100 ml de tampon phosphate de sodium d'une molarité de 5 mM, et un pH ajusté à 7,0 afin d'obtenir les différentes concentrations et par conséquent les chargements enzymatiques désirés.

Ensuite, 10 g du support est ajouté. L'activité dans le surnageant et la suspension est testée périodiquement en utilisant le substrat synthétique (*p*NPB). Les valeurs d'activités obtenues sont comparées à celles obtenues avec l'enzyme libre, considérée comme référence, préparée avec les mêmes concentrations et testée dans les mêmes conditions. Après immobilisation, la suspension est filtrée et l'enzyme adsorbée est lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée pour éliminer les enzymes non adsorbées et stockée à 4°C jusqu'à l'utilisation.

II.3.1.3. Détermination de l'activité enzymatique de lipase :

L'activité catalytique de la lipase est testée en mesurant l'augmentation de l'absorbance produite par le *p*-nitrophénol libéré durant l'hydrolyse de *p*-NPB (0,4 mM) préparé dans du tampon phosphate de sodium 25 mM à pH 7,0 et une température de 25°C. Ensuite, un volume de 50-100 µL de la solution de lipase ou de la suspension d'immobilisation, est ajouté à 2,5 ml de la solution de substrat pour déclencher la réaction. Une unité d'activité internationale (U) a été définie comme étant la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser 1 µmol de *p*-NPB par minute dans les conditions décrites. Les lectures sont faites par méthode colorimétrique en utilisant un spectrophotomètre UV visible muni d'une cellule thermostatée et d'une agitation réglable, à une longueur d'onde de 348 nm.

II.3.1.4. Etude de la thermo-stabilité des dérivés enzymatiques :

II.3.1.4.1. Effet de la température et du pH :

Un gramme d'enzyme immobilisée est mis en suspension dans 20 ml d'une concentration molaire de 25 mM des différents tampons : acétate de sodium à pH 5,0, phosphate de sodium à pH 7,0 ou carbonate de sodium à pH 9,0. L'inactivation a été faite à différentes valeurs de températures (70°C, 70°C et 65°C respectivement). Périodiquement, des échantillons ont été prélevés après homogénéisation par agitation et l'activité résiduelle est mesurée à l'aide de *p*NPB à 25 mM, pH 7,0 et 25°C, et les demi-vies sont calculées à partir des courbes d'inactivation obtenues.

II.3.1.4.2. Effet de la force ionique :

Les dérivés enzymatiques OC-TLL sont incubés dans une solution de chlorure de sodium d'une molarité élevée (3 M) préparée dans du tampon phosphate de sodium 5 mM, pH 7,0 et à une température de 70°C afin d'évaluer l'effet de la force ionique sur la stabilité de l'enzyme immobilisée à différentes charges.

Des échantillons similaires de référence, préparés à faible force ionique (25 mM), sont inactivés dans les mêmes conditions (pH 7,0 et température 70°C). Les activités résiduelles et les demi-vies obtenues sont comparées avec celles du blanc.

II.3.1.4.3. Effet de la glycérine :

Les dérivés enzymatiques sont incubés dans deux différentes concentrations de glycérines 30% et 60% (v/v) pH 7,0 à 30°C. Périodiquement, les échantillons sont prélevés et l'activité résiduelle est mesurée à l'aide de *p*NPB. Toutefois, les demi-vies sont calculées à partir des courbes d'inactivation tracées.

II.3.2. Effet de la modification chimique de l'enzyme sur la stabilité enzymatique :

II.3.2.1. Préparation des dérivés enzymatiques :

En plus de la lipase TLL, une phospholipase Lecitase Ultra, est utilisée dans cette partie d'étude afin de déterminer l'effet d'immobilisation, du chargement enzymatique ainsi que la modification chimique sur deux différentes structures et conformations.

Les dérivés enzymatiques sont préparés suivant le protocole d'immobilisation décrit précédemment en utilisant dans cette partie deux charges différentes, une minimale et l'autre maximale (2 et 8 mg de protéines/gramme de support humide). Les dilutions des solutions enzymatiques sont faites dans du tampon phosphate de sodium 5 mM à pH 7,0. Ensuite, le support est ajouté (1 :10) et l'activité dans le surnageant et la suspension est mesurée par *p*-NPB. Une fois adsorbés, les dérivés enzymatiques sont lavés et filtrés.

II.3.2.2. Modification avec un agent bifonctionnel :

Les dérivés OC-TLL/LU obtenus sur l'Octyl agarose sont incubés dans une solution de glutaraldehyde d'une concentration de 0,1% préparée dans du tampon phosphate de sodium 25 mM et pH 7,0 à 25°C. Ensuite, les suspensions sont soumises à une agitation modérée pendant 1 heure. Ces conditions permettent de modifier les groupes amines primaires de l'enzyme avec une seule molécule de glutaraldehyde (Monsan, 1978 ; Fernandez-Lafuente et al, 1995; López-Gallego et al, 2005 ; Betancor et al, 2006). Les dérivés modifiés sont ensuite filtrés et lavés avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de glutaraldehyde.

II.3.2.2.1. Réduction des liaisons :

Cinq cent milligrammes de lipases immobilisées et modifiées sont pesés puis ajoutés à 20 ml de tampon carbonate de sodium 0,1 M à pH 10,0 contenant 1 mg/ml de borohydrure de sodium (NaBH₄). Le mélange réactionnel est mis sous une agitation orbitale pendant 30 minutes à 4°C. Les biocatalyseurs réduits sont filtrés et lavés plusieurs fois avec de l'eau distillée.

II.3.2.3. Modification par le polymère ionique:

Une solution de 50 ml de polyéthylèneimine (PEI) d'une concentration de 10% (v/v) est préparée dans le tampon phosphate de sodium à 5 mM et le pH est ajusté à 7,0. Ensuite, cinq grammes des différents dérivés déjà modifiés et réduits sont mis en suspension puis soumis à une agitation modérée pendant 24 heures. Les enzymes modifiées sont lavées avec un excès d'eau distillée et filtrées sous vide.

II.3.2.4. Etude de la thermo-stabilité des dérivés enzymatiques :

II.3.2.4.1. Effet de la température et du pH :

Un gramme d'enzyme immobilisée est mis en suspension dans 30 ml des tampons acétate de sodium à pH 5,0 ; phosphate de sodium à pH 7,0 ou du carbonate de sodium à pH 9,0 à 25 mM puis incubé à différentes valeurs de températures (73°C, 70.5°C et 65°C respectivement). Périodiquement, les échantillons sont prélevés et l'activité résiduelle est mesurée à l'aide de *p*NPB et les demi-vies sont définies.

II.3.2.4.2. Effet du solvant organique :

Les dérivés enzymatiques sont incubés à 30°C dans des solvants organiques, avec un ratio 1:10, d'acétonitrile (ACN) ou de 1,4-dioxane préparés dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,0. Périodiquement, les échantillons ont été prélevés et l'activité ainsi que les demi-vies sont déterminées.

II.3.2.5. Analyse électrophorétique par SDS-PAGE :

L'électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) est réalisée selon la méthode de Laemmli 1970 (Laemmli, 1970), en utilisant un Miniprotean tetra-cell (Biorad), un gel de 12% dans une zone de séparation de 9 cm x 6 cm et une zone de concentration de 5% de polyacrylamide. La préparation des gels et des solutions est décrite dans l'annexe 2.

Pour cette analyse, cent milligrammes des différents dérivés sont mis en suspension dans 0,5 ml de tampon de rupture. Les échantillons sont incubés dans de l'eau bouillie pendant 8 minutes, ce traitement est capable de libérer toute enzyme attachée au support (Rueda *et al*, 2015). Ensuite un aliquote de 10-20 μ l du surnageant est déposé dans le puits d'échantillon respectif. Les échantillons sont analysés jusqu'à ce que le marqueur le plus bas atteigne le bord inférieur du gel. Les gels sont colorés avec du bleu brillant de Coomassie. Un kit d'étalonnage de faible poids moléculaire pour électrophorèse SDS (GE Healthcare) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire (14,4-97 kDa).

II.3.3. Etude de la stabilité opérationnelle des dérivés enzymatique:

En plus des interactions hydrophobes utilisées dans les expérimentations précédentes, des liaisons covalentes sont employées. Ces liaisons nécessitent l'activation du support Octyl par des groupes aldéhydes réactifs afin d'obtenir un support Octyl glyoxyl agarose. Ces groupes ont la capacité d'interagir avec les groupes amines primaires des enzymes en formant, dans les conditions alcalines, des liaisons plus fortes entre la protéine et le support.

II.3.3.1. Préparation du support Octyl glyoxyl agarose (OCGLX) :

La préparation du support d'Octyl-glyoxyl, activé avec 25 μ mol de groupes aldéhydes /g de support humide, nécessite une oxydation des groupes diols du support Octyl par le périodate de sodium NaIO₄ (1M, pH 8,0) suivant le protocole décrits ultérieurement (figure 17) (Guisan, 1988 ; Mateo *et al*, 2005 ; Mateo *et al*, 2006; Grazu *et al*, 2006). La suspension contenant le support et le périodate de sodium (1:5) est soumise à une agitation modérée pendant 3 h à 25°C, puis le support est lavé avec un excès d'eau distillée, filtré puis conservé à 4°C jusqu'à utilisation pour immobilisation.

II.3.3.2. Préparation des dérivés enzymatiques:

En suivant le même protocole d'immobilisation et en remplaçant l'Octyl agarose par l'Octyl glyoxyl agarose préparé, les deux lipases sont immobilisées dans les conditions expérimentales décrites précédemment (deux charges différentes, tampon phosphate de sodium 5 mM, pH 7,0 et 25°C). Après adsorption hydrophobe, les dérivés immobilisés sont suspendus dans un volume adéquat du tampon carbonate de sodium à pH 10,0 pendant 16 heures à 25°C, afin de favoriser l'attachement covalent entre le support et l'enzyme. Le protocole d'immobilisation par liaisons covalente des lipases sur l'Octyl glyoxyl est schématisé dans la figure 18 (Mateo *et al*, 2005).

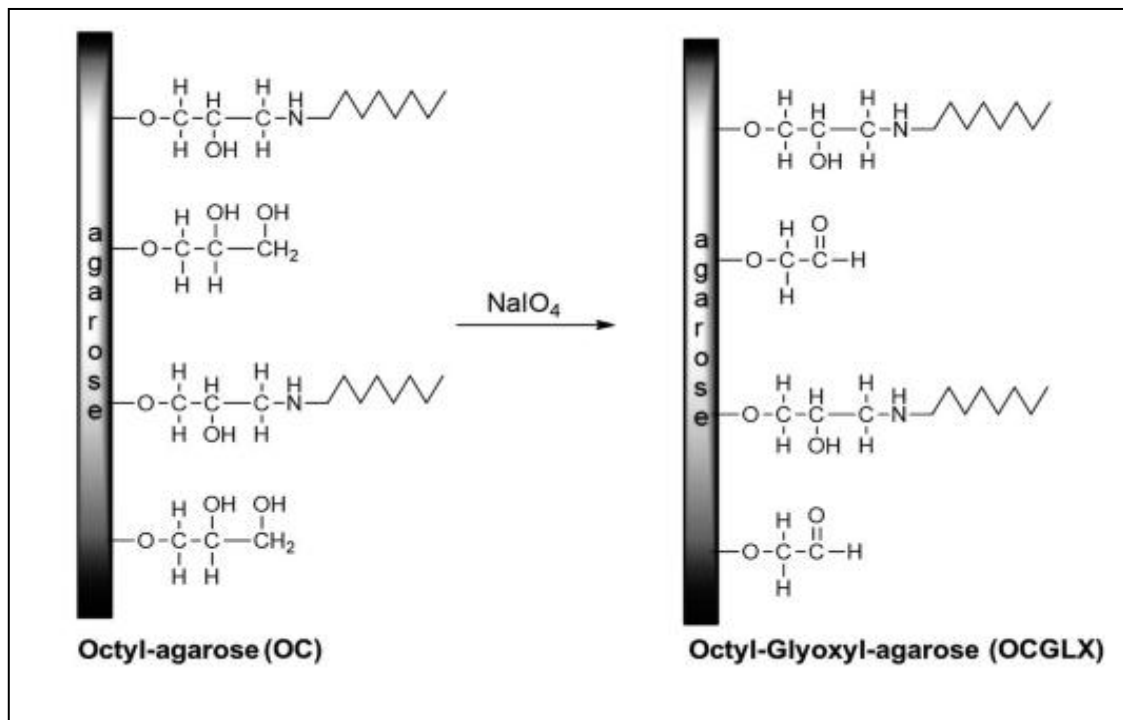


Figure 17: Préparation du support OCGLX (Rueda et al,2015)

II.3.3.3. Modification par glutaraldehyde (OCGLX-E-GLU) :

Les dérivés obtenues sur l'Octyl glyoxyl agarose sont incubés (1:10) dans une solution de glutaraldehyde d'une concentration de 0,1% (v/v) préparé dans du tampon phosphate de sodium 25 mM, pH 7,0 à 25°C. Ensuite, les suspensions sont soumises à une agitation modérée à 4°C (Monsan, 1978 ; Fernandez-Lafuente et al, 1995; López-Gallego et al, 2005 ; Betancor et al, 2006).

Après une heure d'agitation, les dérivés modifiés sont ensuite filtrés et lavés avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de glutaraldehyde. Les lipases immobilisées sont incubées dans le tampon carbonate de sodium 0,1 M à pH 10,0 contenant 1 mg/ml de borohydrure de sodium (NaBH_4) afin de stabiliser les liaisons par réduction, et soumises à une agitation de 30 minutes à 4°C puis lavées et filtrées.

II.3.3.4. Revêtement ionique par PEI (OCGLX-E-GLU-PEI) :

Une solution de 50 ml de polyéthylèneimine (PEI) d'une concentration de 10% (v/v) est préparée dans le tampon phosphate de sodium à 5 mM et le pH est ajusté à 7,0. Ensuite, cinq grammes des différents dérivés sont mis en suspension puis soumis à une agitation modérée pendant 24 heures. La préparation est achevée par lavage et filtration des dérivés enzymatiques.

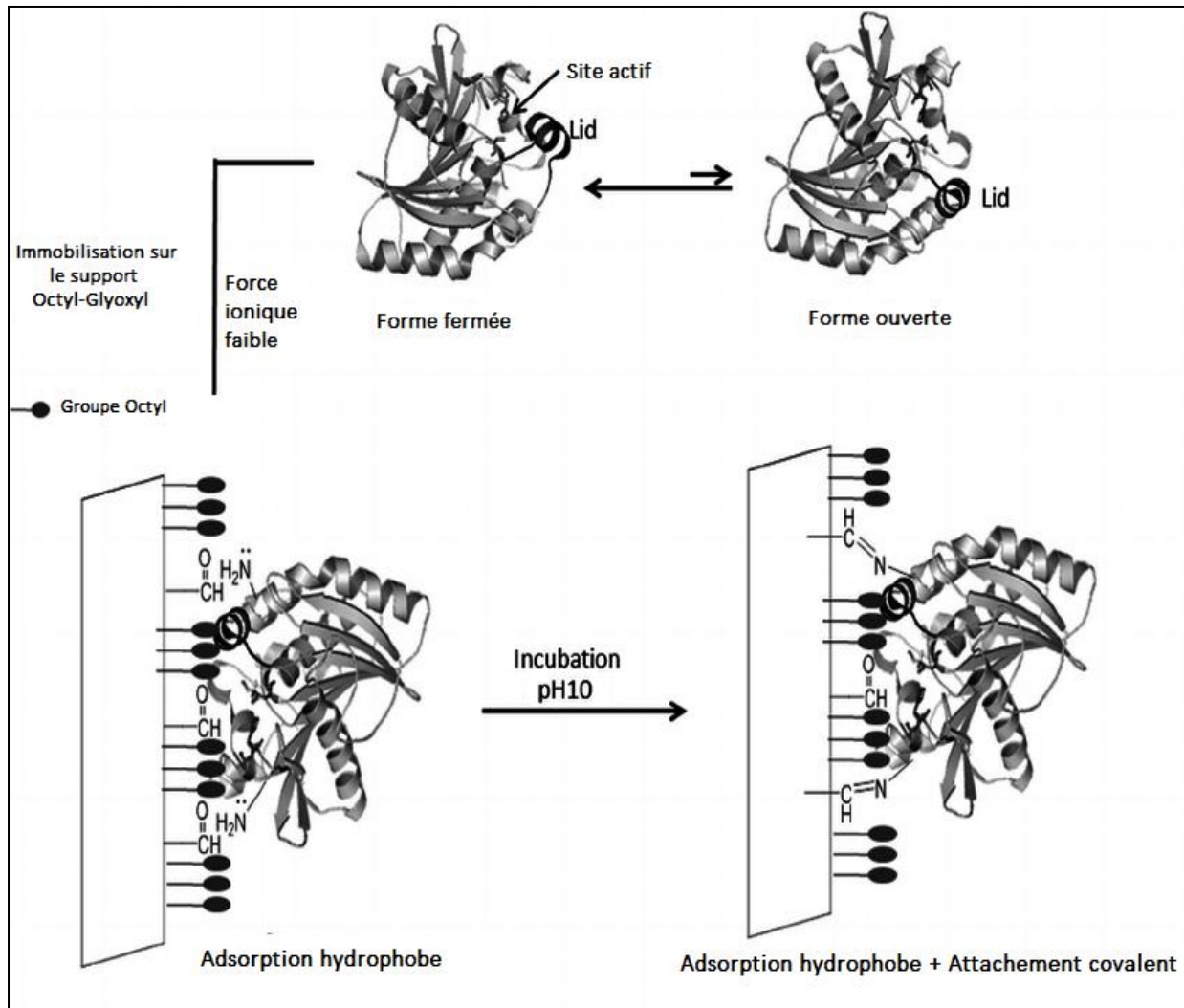


Figure 18: Protocole d'immobilisation de lipase sur le support OC-GLX par liaisons covalentes (Rueda et al, 2015)

II.3.3.5. Co-immobilisation de la β -galactosidase par échange d'ions :

L'immobilisation standard est effectuée en utilisant 20 unités d'activité libre de bêta-galactosidase par gramme de support humide (l'équivalent de 1 mg d'enzyme par gramme de support). Le support est l'OCGLX-PEI, OCGLX-LU-PEI ou l'OCGLX-TLL-PEI (figure 19). Ce faible chargement est utilisé pour prévenir la diffusion des enzymes et qui peut rendre plus complexe l'interprétation des résultats. L'enzyme lyophilisée est dissoute dans 5 ml du tampon phosphate de sodium à 5 mM, pH 7,0 à 25°C, puis un gramme des différents supports est ajouté pour atteindre le chargement enzymatique souhaité.

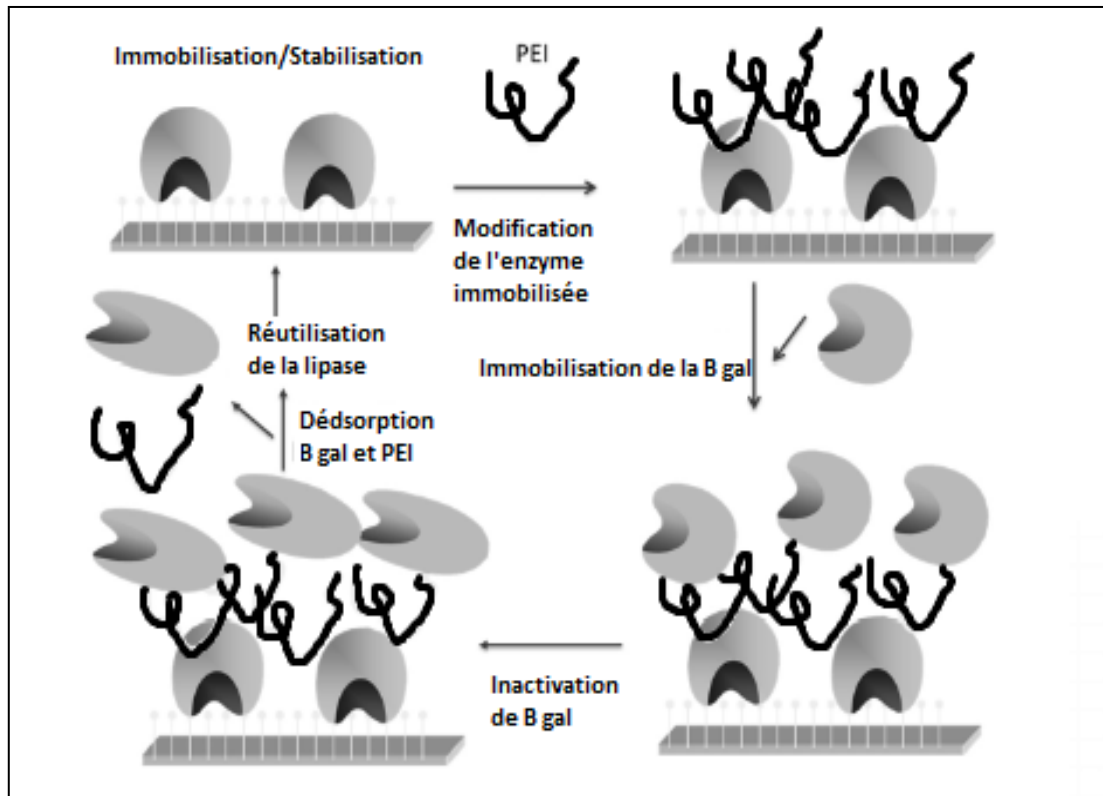


Figure 19: Protocole de co-immobilisation de la β -galactosidase sur les lipases après modification par un polymère ionique (Peirce et al, 2016)

II.3.3.6. Détermination de l'activité de la β -galactosidase :

L'essai est réalisé en mesurant l'augmentation de l'absorbance produite par la libération de l'O-nitrophénol durant l'hydrolyse d'ONPG (10 mM) préparé dans 25 mM du tampon acétate de sodium pH 4,5 et une température de 25°C. Le dosage est effectué à une longueur d'onde de 380 nm en utilisant un spectrophotomètre équipé d'une cellule thermostatée munie d'une agitation magnétique continue. Pour commencer la réaction, un volume de 50-100 μ l de la solution ou de la suspension enzymatique est ajoutée à 2,5 ml de solution de substrat. Une unité d'activité (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 μ mol d'ONPG par minute dans les conditions décrites précédemment.

II.3.3.7. Etude de la réutilisation du biocatalyseur :

II.3.3.7.1. Cycles d'inactivation de la β -galactosidase :

Le complexe co-immobilisé OCGLX lipase-PEI- β galactosidase est incubé à 50°C dans le tampon phosphate de sodium 25 mM, pH 7,0. Périodiquement, des échantillons ont été prélevés et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à l'aide d'ONPG et de *p*-

NPB, respectivement. Les demi-vies sont calculées à partir des courbes d'inactivation tracées.

Les conditions d'inactivation thermique citées précédemment, sont choisies après plusieurs tests afin d'assurer l'inactivation de la β -galactosidase dans un temps réduit sans affecter l'activité et la stabilité des lipases pour leur réutilisation.

II.3.3.7.2. Désorption de la β -galactosidase à partir de l'OCGLX-Lipase-PEI :

Après chaque cycle d'inactivation thermique à 50°C, une désorption de la β -galactosidase est effectuée en incubant les dérivés dans une solution de chlorure de sodium d'une molarité très élevée (6 M) à pH 7,0 et 25°C sous agitation pendant 60 minutes. Cette haute force ionique est nécessaire pour désorber toute molécule de β -galactosidase adsorbée sur le polyéthylèneimine. Toutefois, l'activité des différentes hydrolases, dans le surnageant ou dans la suspension sont suivies à l'aide d'ONPG et du *p*-NPB afin de confirmer la désorption totale de la lactase.

II.3.3.7.3. Rechargement enzymatique :

Après la désorption, le même support OCGLX-Lipase-PEI récupéré est rechargé de nouveau par une autre molécule de β -galactosidase immobilisée par adsorption ionique sur le PEI. Ce complexe co-immobilisé est soumis de nouveau à un cycle d'inactivation thermique, une désorption et puis un autre rechargement enzymatique. Cette opération est répétée trois fois successives afin d'évaluer la stabilité opérationnelle des lipases immobilisées.

II.3.3.7.4. Titration de groupes amines primaires par TNBS :

Cinq centmilligrammes des dérivés enzymatiques, prélevés après chaque cycle d'inactivation/désorption sont mis en suspension dans 5 ml du tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 8,0, puis 0,5 ml de solution TNBS est ajouté (**Fields, 1972**). Après 30 minutes d'agitation magnétique, le support coloré est lavé excessivement avec du tampon phosphate de sodium à pH 8,0. Enfin, 200 mg du support traité sont remis en suspension dans 5 ml de phosphate de sodium à pH 8,0 dans une cuvette (1 cm) et soumis à une agitation continue. Les absorbances sont mesurées à 420 nm, et les résultats obtenus sont comparés avec ceux du support non traité avec le TNBS.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Evaluation de l'effet des différents paramètres sur la thermo-stabilité enzymatique:

L'étude de la thermo-stabilité consiste en une série d'inactivation thermique avec un suivi périodique de l'activité résiduelle des biocatalyseurs immobilisés.

Pour cela et avant de mettre en contact l'enzyme avec le support, des dosages protéiques et enzymatiques doivent être réalisés dans les solutions commerciales afin de s'assurer des quantités de protéines appliquées dans le milieu réactionnel dans les différentes expérimentations.

Une démarche expérimentale est pratiquée, afin de déterminer les concentrations protéiques et les activités catalytiques dans les différentes préparations, depuis l'immobilisation jusqu'à la désorption, en se référant aux courbes d'étalonnage et en appliquant la loi de Beer-Lambert.

Le protocole de réalisation des courbes d'étalonnage en utilisant les différents standards BSA, PNP et ONP ainsi que la formule de calcul de l'activité enzymatique sont décrits dans l'annexe 1. Les coefficients d'extinction molaire (ϵ) calculés sont d'une valeur de $5,150 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et de $10,493 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour l'activité *P-NPB* et d'ONPG respectivement. Les activités sont présentées dans cette partie d'étude sous forme d'activité relative (%).

I.1. Effet du chargement enzymatique sur la stabilité thermique :

I.1.1. Immobilisation de TLL sur l'Octyl agarose :

Les figures 20-22 présentent les cinétiques d'immobilisation de la lipase TLL sur le support Octyl agarose effectuée uniquement par adsorption grâce au caractère hydrophobe des deux structures.

Sur le plan activité, le phénomène d'activation interfaciale que les lipases présentent lors de l'attachement hydrophobe est significativement clair. Les résultats obtenus (tableau 7) montrent que plus la charge appliquée est élevée plus l'hyperactivité diminue en allant de 180% (1mg/g) à 110% (30 mg/g).

Tableau 7 : Activité relative (%) des différentes préparations TLL immobilisées.

Biocatalyseur	Activité relative (%)
OC-TLL (1mg)	180±9
OC-TLL (6mg)	160±7
OC-TLL (30mg)	110±7

Sur le plan rendement, l'utilisation de chargements enzymatiques différents (1, 6 et 30 mg de TLL/ g d'OC) avec un rapport de 1:10 (w/v), montre que chaque charge a une cinétique différente. Les résultats montrent qu'en une durée de moins de 30 minutes, 100 % de la charge minimale appliquée est immobilisée (figure 20) alors que cela a nécessité 3 heures dans le cas de la préparation de 6 mg/g, afin que 75% de protéines soient adsorbées avec toujours une faible activité révélée dans le surnageant. Cette quantité d'enzyme est maintenue stable même après 3 heures d'agitation, ce qui signifie que la surface de support est saturée. Donc la capacité maximale d'adsorption de support est de 5 mg de protéines/g d'Octyl agarose.

En revanche, la surcharge enzymatique (30 mg/g) appliquée dans la troisième préparation, n'a pu atteindre que 20% de fixation au support (figure 22).

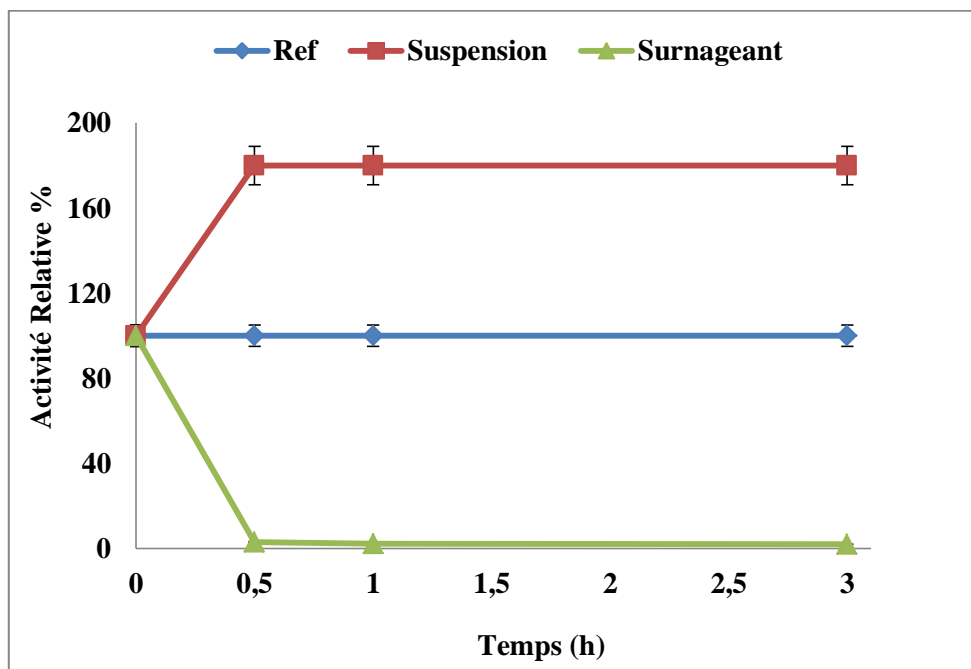


Figure 20: Cinétique d'immobilisation de 1 mg TLL / g OC.

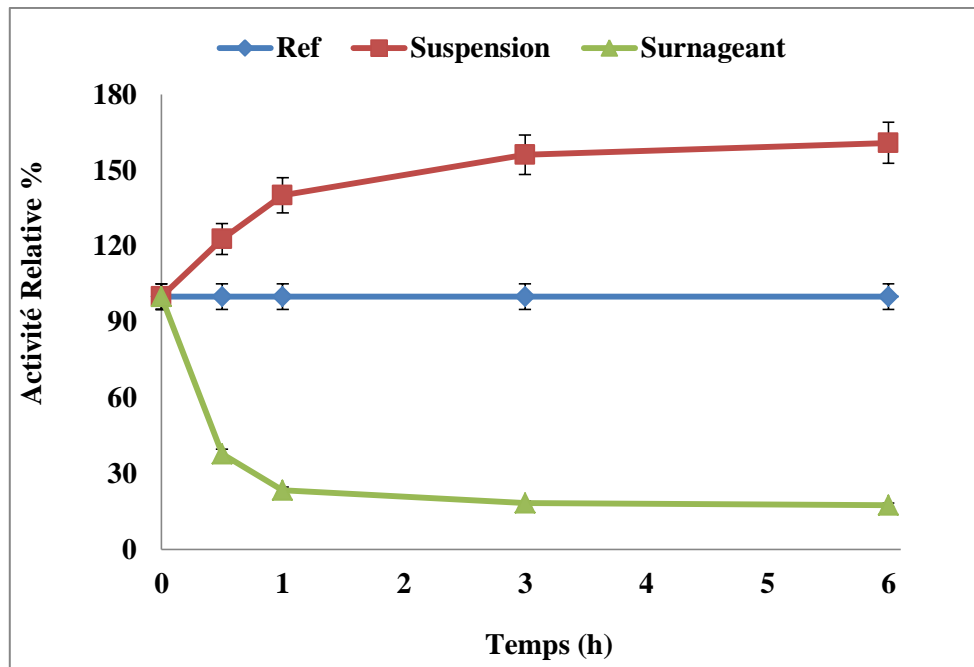


Figure 21: Cinétique d'immobilisation de 6 mg TLL / g OC.

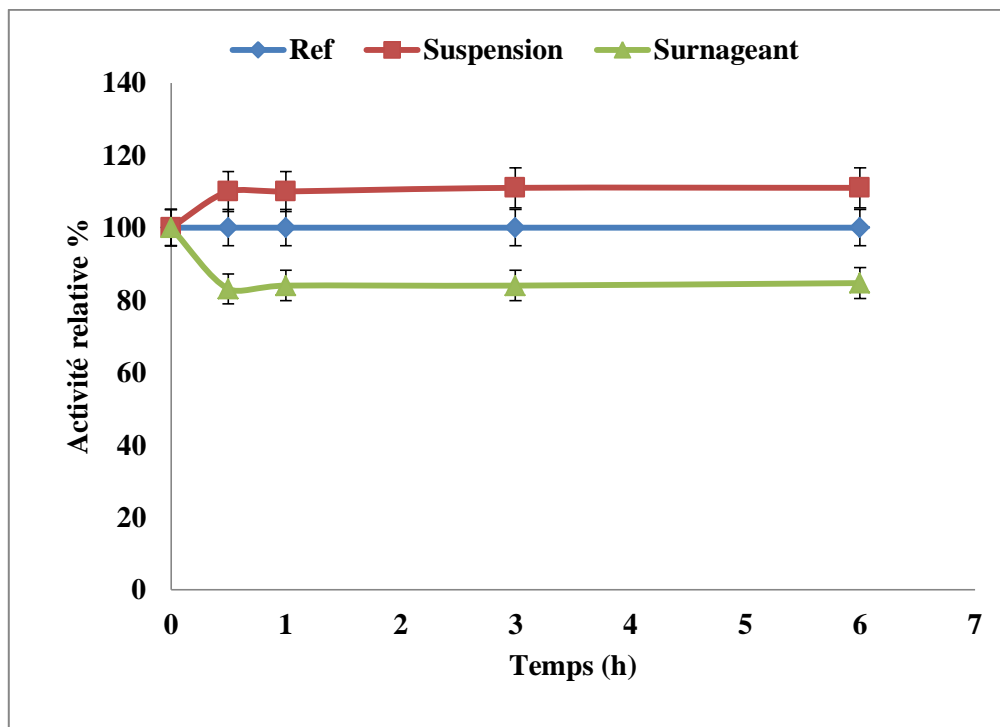


Figure 22: Cinétique d'immobilisation de 30 mg TLL / g OC.

I.1.2. Inactivation thermique des dérivés enzymatiques :

I.1.2.1. Effet du pH et température :

Les figures 23-25 présentent les cinétiques d'inactivation des trois dérivés OC-TLL à différentes valeurs de pH de température. Les demi-vies des différents biocatalyseurs sous les différentes conditions d'inactivation sont résumées dans le tableau 8.

À pH 5,0 le dérivé portant la plus faible charge enzymatique (1 mg/g) était moins stable en comparaison avec celui préparé en utilisant 6 mg/g de support (figure 23), avec des demi-vies de 90 min et 150 min respectivement. La différence est significativement remarquable pour le résultat obtenu avec le support surchargé (30 mg/g) qui a présenté une stabilité élevée par rapport aux autres préparations, avec une demi-vie de 5 heures.

À pH 7,0 la stabilité résultant des préparations de 1 et 6 mg de lipase coïncident avec les résultats obtenus à pH 5,0 même en termes de $\frac{1}{2}$ vies (90 et 120 min respectivement). Cependant, le dérivé préparé avec une surcharge enzymatique (30 mg/g) est significativement moins stable même que la préparation de 1 mg/g. Une perte de 50% de son activité initiale est mentionnée durant les 20 minutes d'incubation à 70°C (figure 24).

À pH 9,0 les cinétiques obtenues avec toutes les préparations OC-TLL sont similaires, ce qui signifie qu'à cette valeur de pH, la stabilité de la lipase TLL devient totalement indépendante du chargement enzymatique (figure 25).

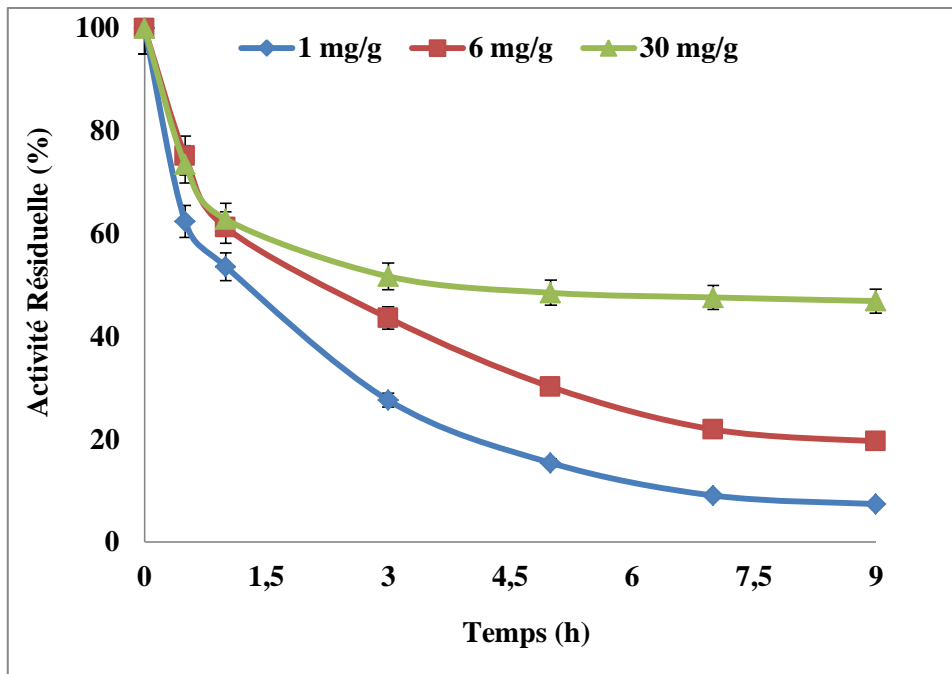


Figure 23 : Cinétiques d'inactivation thermique des dérivés OC-TLL à pH 5,0 et T 70°C.

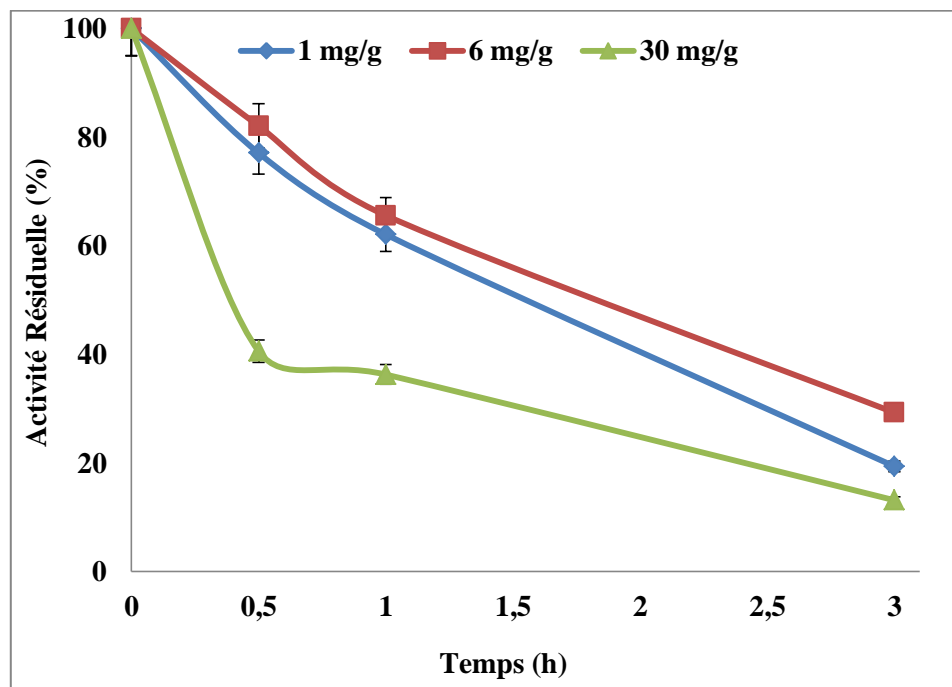


Figure 24 : Cinétiques d'inactivation thermique des dérivés OC-TLL à pH 7,0 et T 70°C.

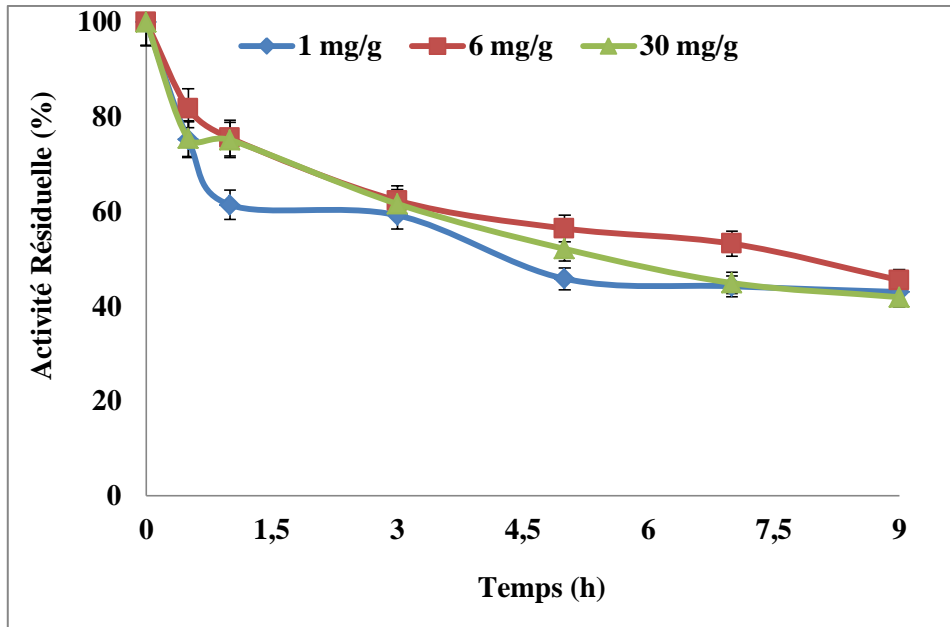


Figure 25 : Cinétiques d'inactivation thermique des dérivés OC-TLL à pH 9,0 et T 60°C.

I.2.2.2. Effet de la force ionique :

L'effet de la force ionique sur la stabilité thermique des dérivés OC-TLL est présenté dans les figures 26 et 27. L'inactivation est effectuée dans les conditions expérimentales (25 mM de tampon phosphate de sodium, pH 7,0, T 70°C) et les demi-vies sont présentées dans le tableau 8

Les résultats montrent que la stabilité des préparations faiblement chargées n'a pas eu d'amélioration même après incubation à une forte force ionique (3M) où la charge de 1 mg/g reste la moins stable avec une demi-vie de 60 min suivie de la charge 6 mg/g avec une demi-vie de 114 min.

Par contre, l'amélioration observée avec le dérivé surchargé est plus importante et en termes d'activité, le même dérivé a pu conserver environ 80% de son activité initiale. Cela est maintenu stable même après 24 heures d'incubation au moment où l'activité des autres dérivés est négligeable.

Un autre dérivé de référence est préparé en utilisant 1mg de TLL immobilisée sur l'agarose activé avec du bromure de cyanogène BrCN-agarose. Cette préparation covalente est incubée à pH 7,0 ; T 70°C afin de tester les deux forces ioniques (25mM et 3M). La figure 27 montre que les deux forces ioniques avaient un effet négatif sur l'activité de la préparation covalente avec une stabilité négligeable (une demi-vie de moins de 15 min).

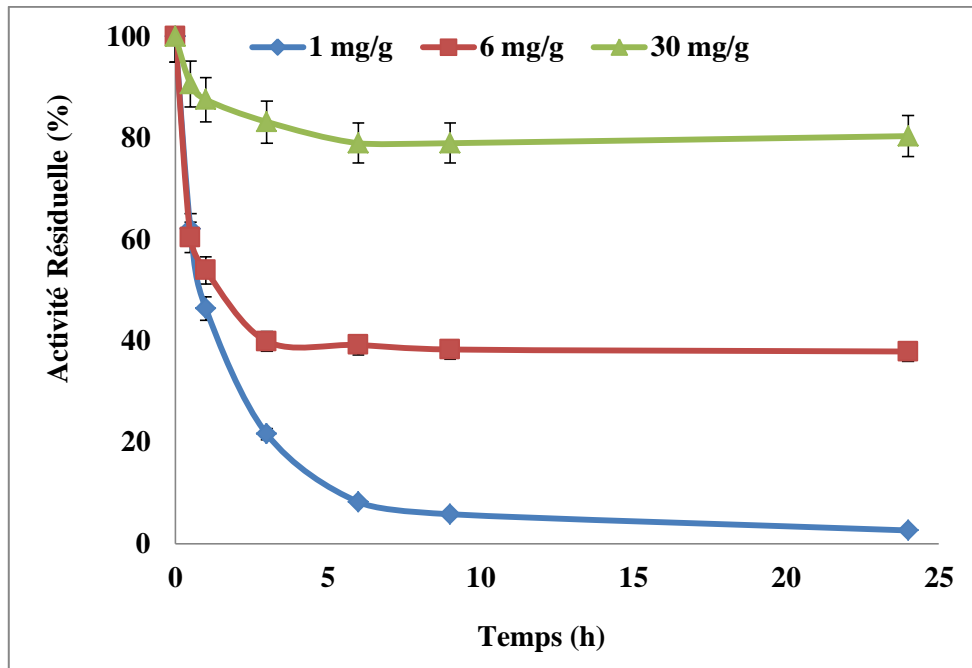


Figure 26: Effet de la force ionique sur la thermo-stabilité des préparations OC-TLL.

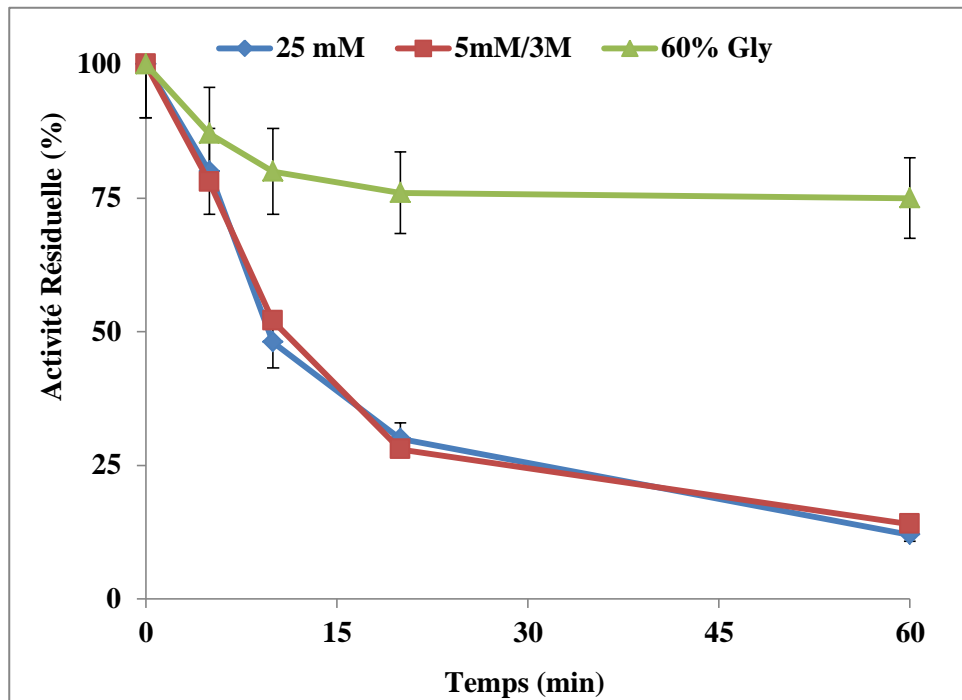


Figure 27: Effet de la force ionique et de la glycérine sur la thermo-stabilité de BrCN-agarose-TLL.

I.2.2.3. Effet de la glycérine :

Deux concentrations de glycérine sont utilisées dans cette expérimentation et les inactivations sont effectuées dans les conditions suivantes : 25 mM, pH 7,0 et une température de 70°C. Les cinétiques obtenues, avec les trois préparations, sont présentées dans les figures 27, 28 et 29.

En utilisant une concentration de 30% de glycérine (figure 28), les biocatalyseurs immobilisés sont rapidement inactivés dont la demi-vie est estimée à 30 minutes pour la forte charge (30 mg/g) et à environ 45 min pour les deux autres charges (1 et 6 mg/g) dans ces conditions.

Par contre, en utilisant 60% de glycérine, la stabilité de toutes les préparations est significativement améliorée (figure 29) et l'effet négatif de la surcharge enzymatique sur la stabilité enzymatique n'est plus remarquable, avec une activité résiduelle maintenue à 80% pour toutes les préparations jusqu'à 3 heures d'incubation. Après la troisième heure, l'activité commence à diminuer progressivement jusqu'à atteindre les 50% entre 7 et 9 heures d'incubation continue.

En ce qui concerne la préparation immobilisée par liaison covalente sur l'agarose activé avec du bromure de cyanogène, une concentration élevée de glycérine (60%) est ainsi testé sur la stabilité thermique. L'effet positif est nettement observé avec une activité résiduelle maintenue stable à 76% de l'activité initiale (figure 27).

Tableau 8 : Demi-vies (en minutes) des différents biocatalyseurs sous différentes conditions.

Biocatalyseur	Conditions expérimentales d'inactivation					
	25 mM			3M NaCl (pH 7.0)	30% glycérine (pH 7.0)	60% glycérine (pH 7.0)
pH	5.0	7.0	9.0			
OC-TLL (1mg)	90±5	90±2	270±18	60±3	44±5	390±12
OC-TLL (6mg)	150±7	120±5	510±45	114±4	46±3	450±33
OC-TLL (30mg)	300±9	30±2	360±21	1440 (80%)*	30±2	540 (52%)*
Br-CN-TLL	-	10±4	-	13±1	-	60 (76%)*

Les conditions sont l'acétate de sodium à pH 5,0 et 70°C; phosphate de sodium à pH 7,0 et 70°C; carbonate de sodium à pH 9,0 et 60°C. *L'activité enzymatique n'a pas atteint la demi-vie durant le test d'inactivation.

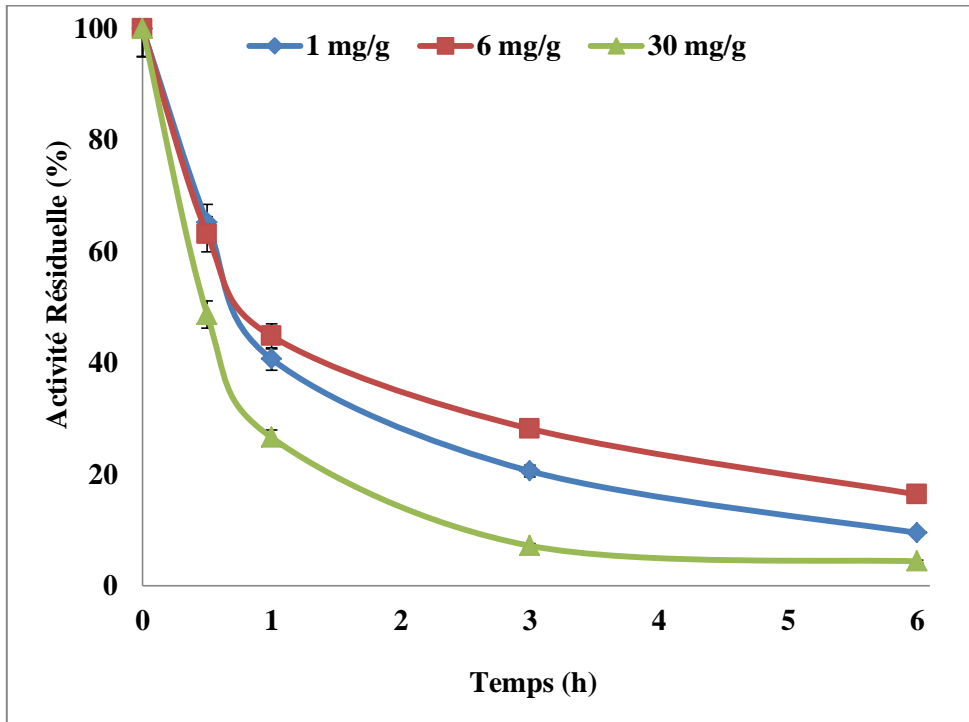


Figure 28: Effet de 30% de glycérine sur la stabilité des différents dérivés OC-TLL.

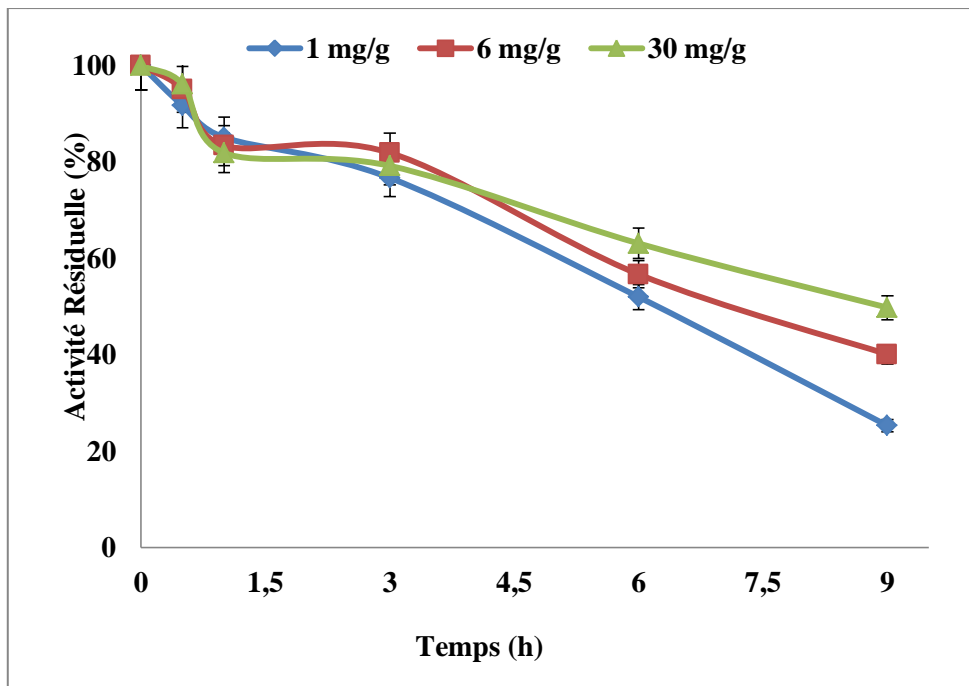


Figure 29: Effet de 60% de glycérine sur la stabilité des différents dérivés OC-TLL.

I.2. Effet de la modification chimique:

II.2.1. Cinétique d'immobilisation sur l'OC:

Dans cette partie d'étude, deux hydrolases (TLL et Lecitase) sont utilisées afin d'évaluer les différences dans les réponses aux différents paramètres employés sur leur stabilité et leur activité catalytique. Les dérivés sont préparés en utilisant deux différentes charges enzymatiques, une minimale (2 mg/g de support) et une autre maximale (8 mg/g de support).

Les figures 30-33 présentent les cinétiques d'immobilisation des deux lipases sur l'Octyl agarose et le tableau 9 présente l'activité relative obtenue durant l'immobilisation avec les différents dérivés enzymatiques au point de saturation du support.

Les résultats similairement obtenus pour les deux enzymes, confirment à chaque fois que le taux d'immobilisation dépend de la charge enzymatique appliquée. Plus la charge appliquée est élevée, plus le taux d'immobilisation diminue et plus l'adsorption est lente avec la révélation d'un excès d'enzyme dans les surnageants testés périodiquement. Une hyperactivité est encore observée dans le cas de la Lecitase, en utilisant les deux charges avec une diminution remarquable quand la charge appliquée est plus grande (figures 30, 31 pour les dérivés OC-TLL et 32, 33 pour les dérivés OC-LU).

Tableau 9 : Activité relative (%) des différentes préparations TLL/LU immobilisées.

Biocatalyseur	Activité relative (%)
OC-TLL (2mg)	230±9
OC-TLL (8mg)	140±2
OC-LU (2mg)	165±6
OC-LU (8mg)	123±3

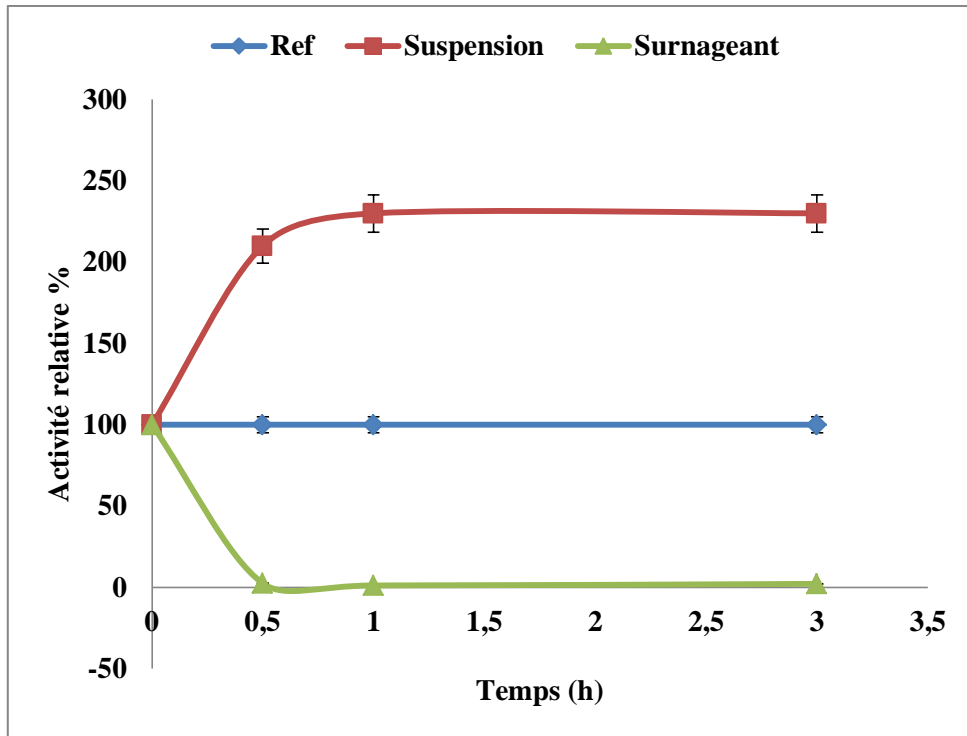


Figure 30 : Cinétique d'immobilisation de 2 mg TLL/g OC.

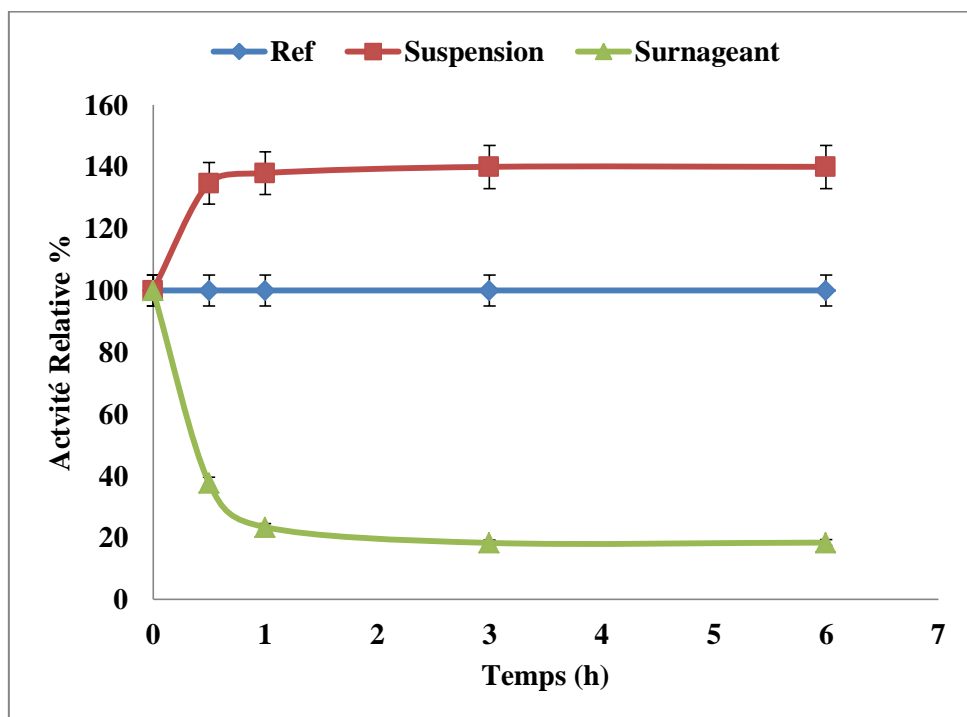


Figure 31: Cinétique d'immobilisation de 8 mg TLL/g OC.

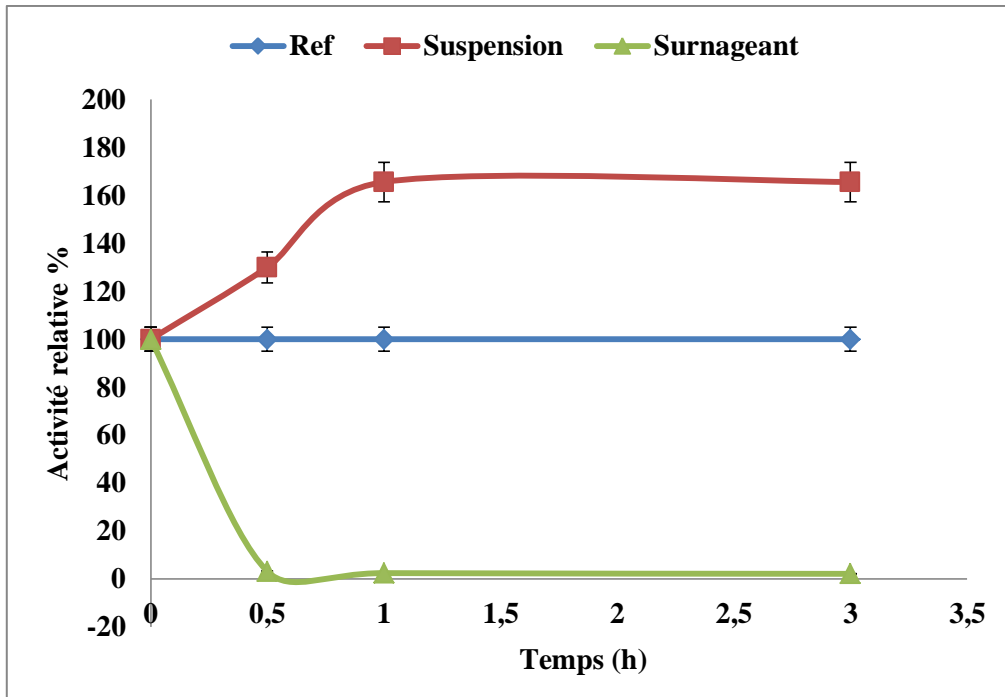


Figure 32: Cinétique d'immobilisation de 2 mg LU/g OC.

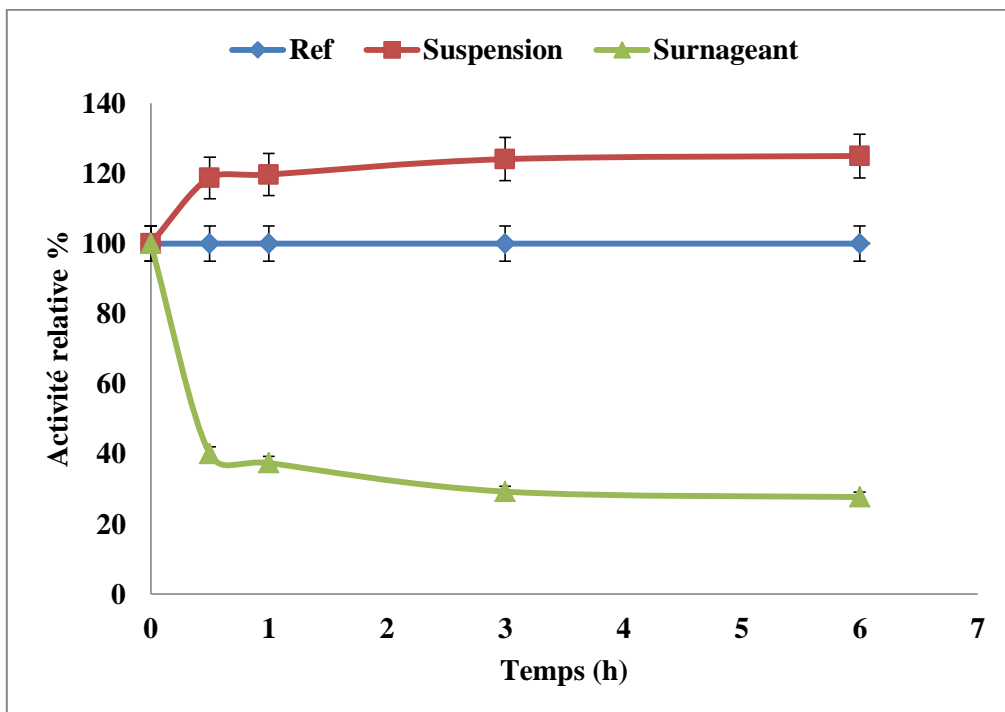


Figure 33: Cinétique d'immobilisation de 8 mg/g LU/g OC.

I.2.2. Effet de la modification par PEI et Glutaraldehyde sur l'activité enzymatique:

Une fois l'adsorption est achevée, les enzymes immobilisées subissent un traitement chimique par glutaraldehyde dans le but de renforcer les liaisons entre l'enzyme et le support par moyen de réticulation. Les liaisons ainsi formées sont réduites par incubation dans du tampon phosphate de sodium à pH 7,0 contenant 1 mg/ml de borohydrure de sodium. Ensuite, un revêtement ionique par polyéthylèneimine est réalisé afin de limiter la désorption des molécules enzymatiques pendant les inactivations. Les valeurs obtenues après chaque traitement sont présentées dans le tableau 10 sous forme d'activités relatives après comparaison avec les dérivés non modifiés, considérés comme références.

Tableau 10: Effet des différents traitements sur l'activité des biocatalyseurs.

		Traitement			
Enzyme	Charge	Référence	PEI	Glutaraldehyde	Glutaraldehyde plus PEI
LU	minimale	100±3	110±3	63±2	91±3
LU	maximale	100±4	102±2	80±3	90±4
TLL	minimale	100±4	104±3	97±3	110±4
TLL	maximale	100±3	100±5	80±4	100±3

Les résultats montrent que l'activité enzymatique de la Lecitase immobilisée OC-LU en utilisant un faible chargement, traitée avec du PEI augmente légèrement de 10%, alors qu'une heure de modification avec du glutaraldehyde génère une diminution d'environ 40% de l'activité initiale.

La situation est différente lorsque l'enzyme modifiée avec du glutaraldehyde est traitée avec du polyéthylèneimine où la diminution précédente est réduite à 10%. Les résultats obtenus avec la charge maximale de la LU, sont similaires mais avec une faible diminution d'activité (20%) avec le glutaraldehyde et un effet négligeable du PEI. L'amélioration du résultat en utilisant les deux traitements est ainsi observée (augmentation de 10%).

En ce qui concerne les dérivés de la lipase TLL, le traitement avec le PEI n'a pas produit un changement significatif dans l'activité pour les deux charges. Le traitement avec du glutaraldehyde a entraîné une très faible diminution de l'activité pour la charge

minimale mais cela était plus significatif pour la préparation fortement chargée (environ 20%). Alors que la double modification des deux dérivés OC-TLL est encore plus satisfaisante en préservant toute l'activité initiale sans aucune perte, avec une fraction d'amélioration d'activité (10%) observée dans le cas de la charge minimale.

I.2.3. Effet de la modification sur la thermo-stabilité enzymatique :

I.2.3.1. Effet du pH et température:

Les figures 34-39 présentent les cinétiques d'inactivation des préparations OC-LU/TLL faiblement et fortement chargées, avec et sans modifications, à différentes valeurs de pH et températures.

En inactivant les dérivés de la Lecitase LU, on peut remarquer que toutes les préparations hautement chargées sont beaucoup plus stables que celles moins chargées. En outre, il est également clair que la modification d'OC-LU/TLL avec du PEI et glutaraldehyde a des effets positifs sur leur stabilité, avec des différences observées en fonction de la charge du biocatalyseur. Les demi-vies sont présentées dans le tableau 11.

À pH 5,0 la préparation à faible charge maintient sa stabilité après la modification avec du polyéthylèneimine, avec une augmentation marginale, tandis que celle à forte charge présente une amélioration significative de sa stabilité (demi-vies de 42 à 150 min respectivement). La même amélioration est constatée avec la double modification (de 18 à plus de 300 min).

Les inactivations réalisées à pH 7,0 montrent que la modification des préparations à faible charge, avec glutaraldehyde, n'a pas d'effet clair par rapport à celui obtenu avec le polyéthylèneimine. Ainsi, et contrairement au résultat obtenu à pH 5, les dérivés OC-LU-PEI et OC-LU-GLU-PEI ont une stabilité similaire. Cela est remarqué pour les deux chargements.

À pH 9,0 les stabilités obtenues par les différents traitements sont courtes avec une situation tout à fait différente où les dérivés des deux charges, activés uniquement avec GLU sont les plus stables que les autres.

En étudiant les réponses de la lipase TLL, on peut constater que les dérivés modifiés avec PEI sans traitement préalable avec le GLU, présente la plus grande stabilité à pH 5,0 par rapport aux autres préparations, quel que soit le chargement enzymatique appliqué. Un prétraitement avec GLU suivi d'un revêtement PEI montre une stabilité

moins importante que le traitement uniquement avec PEI, cela dit que l'amélioration obtenue est offerte par le polymère ionique.

A pH 7,0 le glutaraldehyde et le PEI montrent un effet significativement positif sur la stabilité des préparations fortement et faiblement chargées, avec des cinétiques similaires et des demi-vies presque identiques.

Dans le cas du pH 9,0 les préparations à faible charge les plus stables sont les deux préparations traitées par le polyéthylèneimine avec ou sans traitement avec du GLU. Ces effets de stabilisation générés par le PEI sont plus élevés en utilisant les préparations fortement chargées, bien que le glutaraldehyde semble capable de maintenir la stabilité de ce dérivé jusqu'à 4 heures d'inactivation thermique à 65°C.

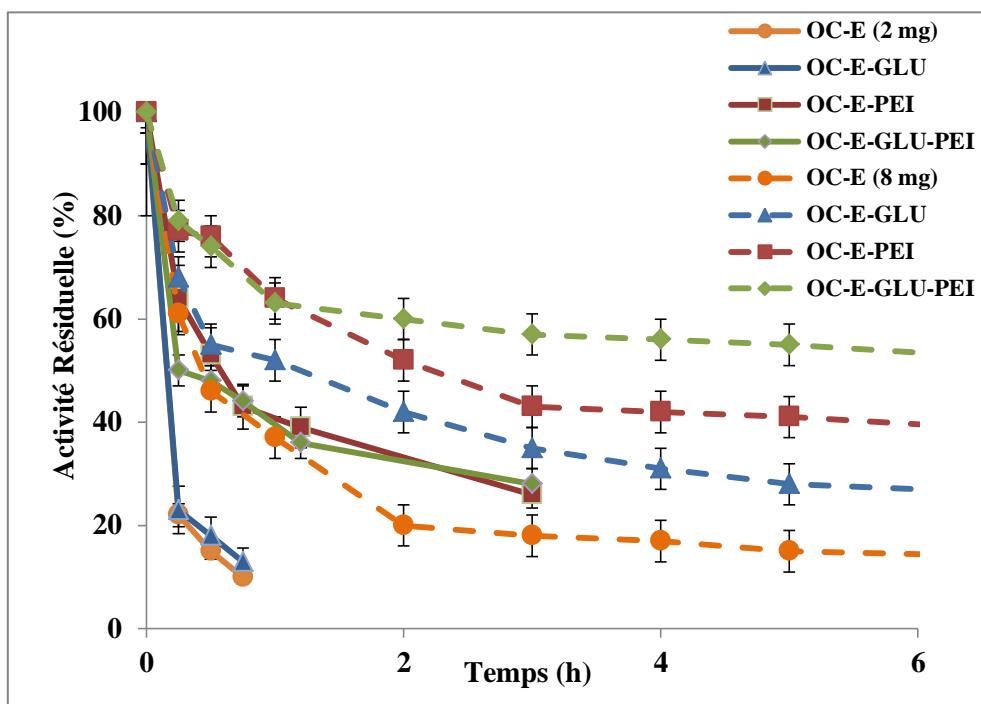


Figure 34 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-LU à pH 5,0 et T 52°C.

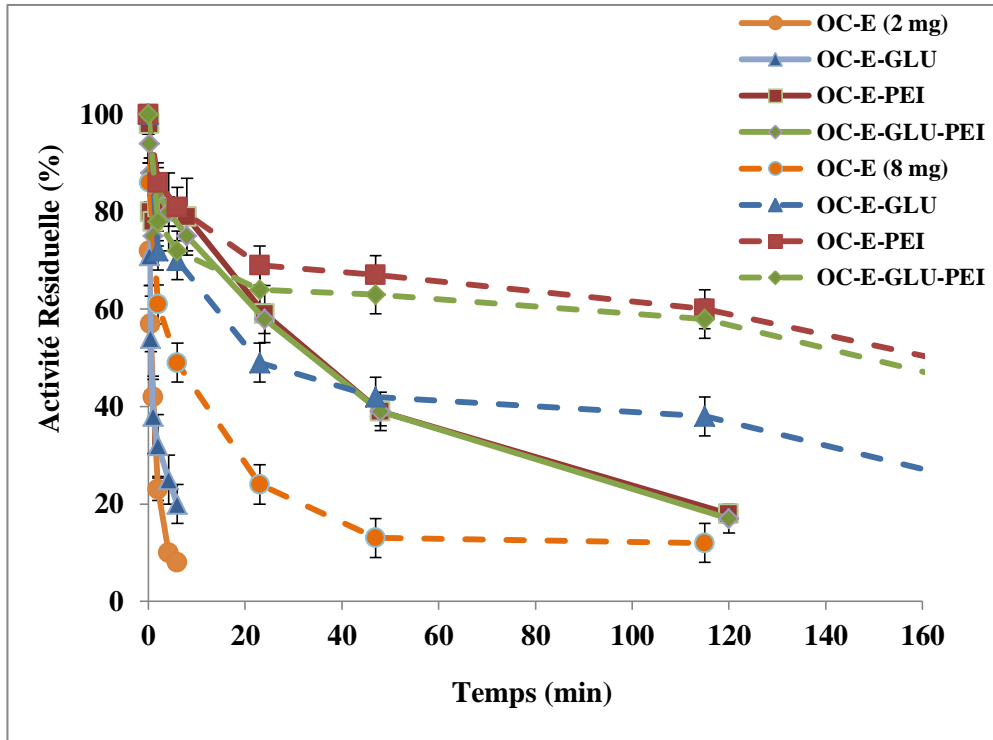


Figure 35 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-LU à pH 7,0 et T 50°C.

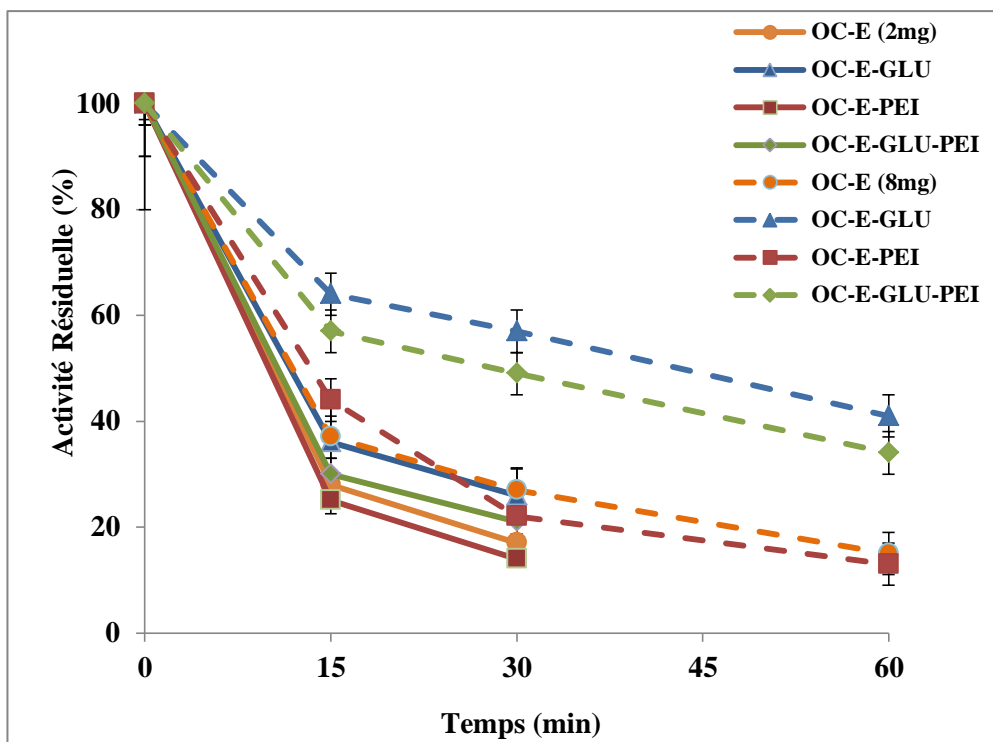


Figure 36 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-LU à pH 9,0 et T 50°C.

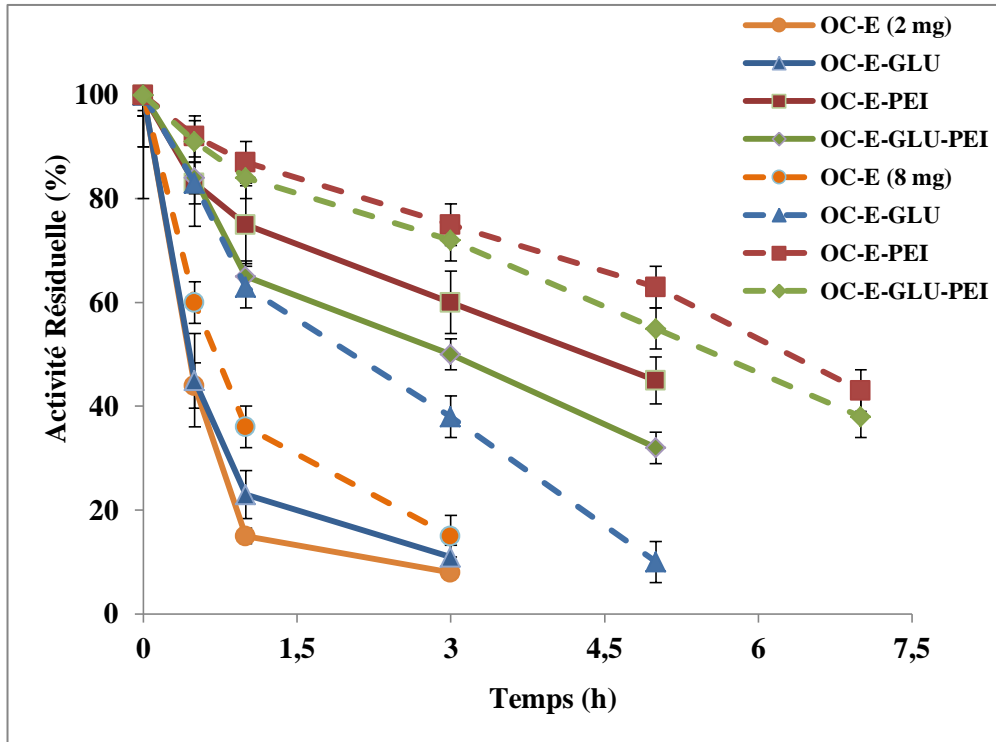


Figure 37 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-TLL à pH 5,0 et T 73°C.

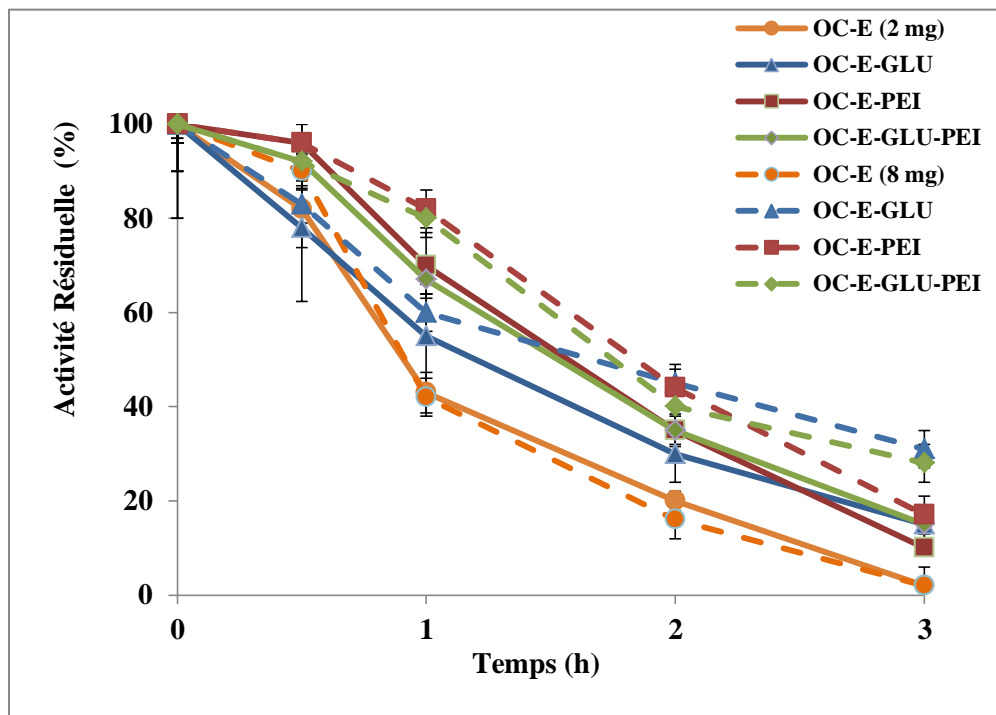


Figure 38 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-TLL à pH 7,0 et T 70.5°C.

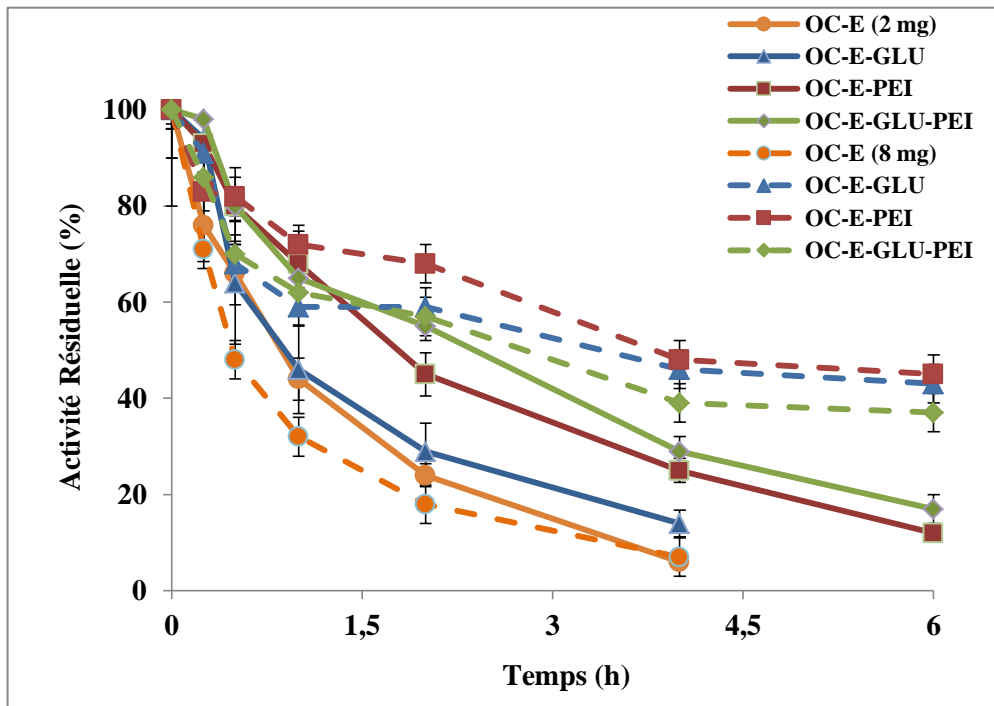


Figure 39 : Cinétiques d'inactivation thermique d'OC-TLL à pH 9,0 et T 65°C.

I.2.3.1. Effet des modifications en présence du solvant organique:

L'effet de deux solvants organiques, l'acétonitrile à 30% et le dioxane à 60%, est étudié. Ces solvants sont préparés dans du tampon Tris-HCl à pH 7,0 (voir annexe 3).

L'inactivation des différents dérivés d'OC-LU en présence d'acétonitrile à 25°C (figure 40) montre, encore une fois, que la stabilité des dérivés fortement chargés est la plus élevée. Ainsi, la stabilisation devient beaucoup plus importante après la double modification chimique (GLU plus PEI) avec une demi-vie d'environ 6 heures (voir tableau 11).

Le traitement avec le glutaraldehyde seul, n'a aucun effet sur la stabilité du dérivé faiblement chargé. Alors que son utilisation dans la préparation hautement chargée est bien remarquable et significative avec une demi-vie notée dans les 192 min. Cela coïncide avec la valeur obtenue avec le traitement par PEI seul.

Tableau 11 : Demi-vies (en minutes) des différents biocatalyseurs sous différentes conditions.

Biocatalyseur	Conditions expérimentales d'inactivation									
	Faible charge (2 mg/g OC)					Forte charge (8 mg/g OC)				
	5.0	7.0	9.0	30% ACN	60% Dioxane	5.0	7.0	9.0	30% ACN	60% Dioxane
OC-LU	12±1	1±1	11±3	12±3	-	30±2	15±5	12±1	60±6	-
OC-LU-GLU	12±2	2±1	12±5	12±3	-	84±9	22±7	50±7	192±17	-
OC-LU-PEI	42±4	38±2	10±2	48±11	-	150±13	164±16	15±1	192±13	-
OC-LU-GLU-PEI	18±2	38±3	11±2	60±15	-	300 (60%)*	160±12	34±5	360±10	-
OC-TLL	30±2	54±4	54±9	-	12±4	33±9	54±2	30±1	-	18±2
OC-TLL-GLU	24±3	78±7	55±7	-	12±3	135±11	108±9	240±25	-	54±13
OC-TLL-PEI	270±18	99±5	114±10	-	90±12	420±35	114±14	306±33	-	156±8
OC-TLL-GLU-PEI	192±11	99±3	156±14	-	75±10	333±24	108±12	195±8	-	114±8

*L'activité enzymatique n'a pas atteint la demi-vie durant le test d'inactivation.

L'incubation des préparations OC-TLL dans 60% de dioxane à T 40°C, donne un résultat presque similaire à celui de la Lecitase LU incubée dans de l'acétonitrile. Les préparations hautement chargées sont toujours les plus stables que celles à faible charge. Le revêtement PEI donne un effet positif sur la stabilité des dérivés enzymatiques, et le traitement avec du glutaraldéhyde n'est observée positif qu'avec les préparations fortement chargées, ou lorsqu'il est suivi du revêtement ionique dans les deux cas. La principale différence est que la modification d'OC-TLL-GLU avec PEI donne une stabilité un peu moins faible par rapport à celle modifiée seulement avec du PEI. Cela est obtenu avec les deux chargements enzymatiques.

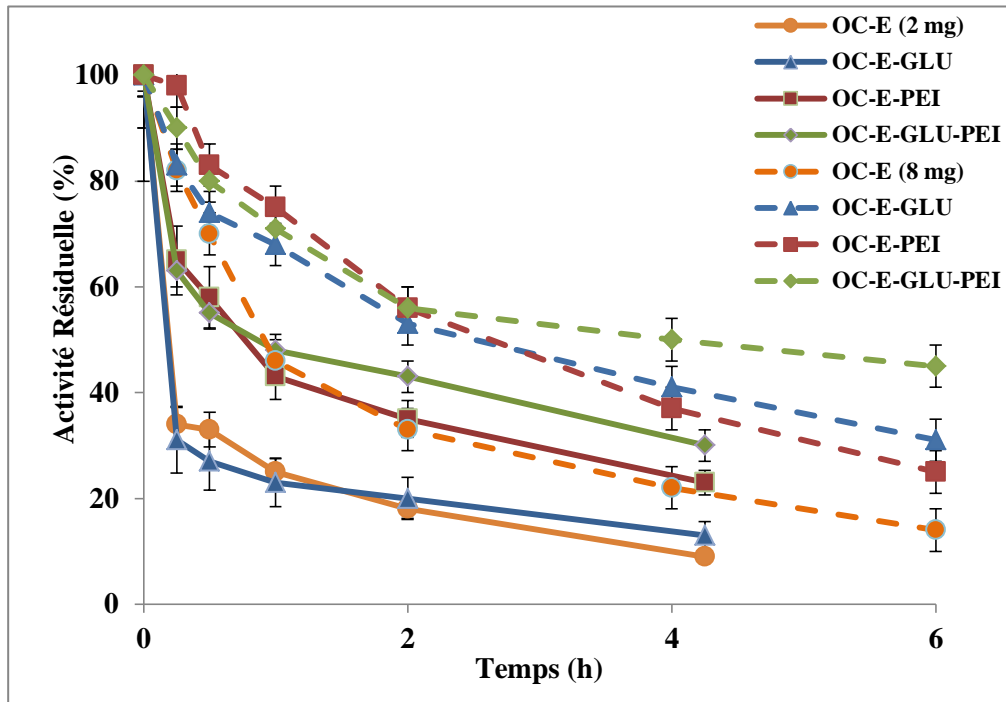


Figure 40 : Cinétiques d'inactivation d'OC-LU dans 30% d'acétonitrile à pH 7,0 et T 25°C.

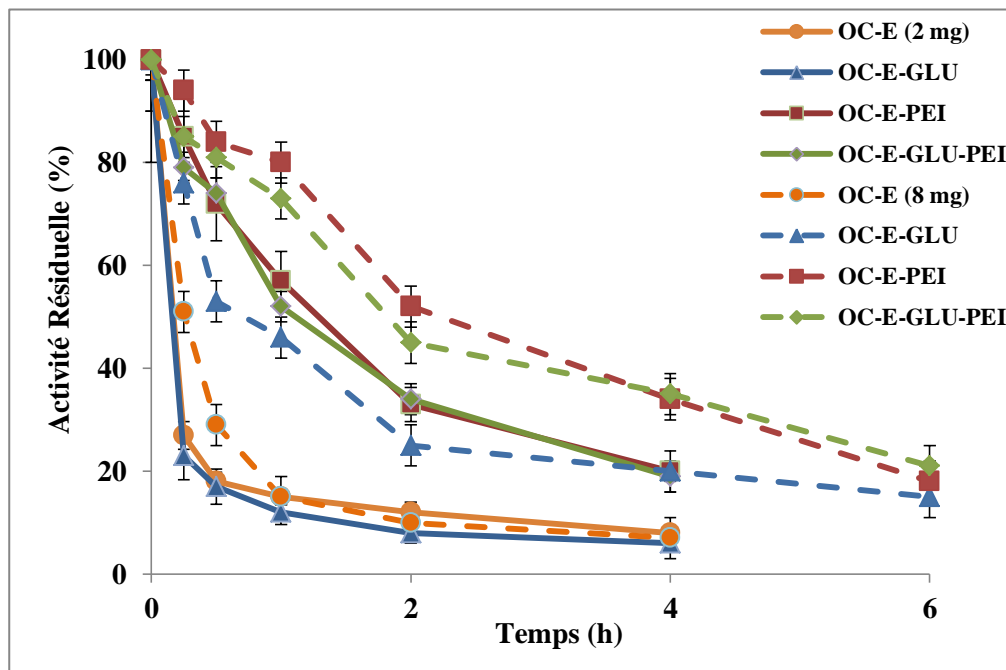


Figure 41 : Cinétiques d'inactivation d'OC-TLL dans 60% de dioxane à pH 7,0 et T 40°C.

I.2.4. Analyse électrophorétique par SDS-PAGE :

Les huit dérivés enzymatiques préparés avec les deux différentes charges, et ayant subies les trois modifications (GLU, PEI et GLU/PEI), plus les références OC-LU/TLL sont utilisées dans cette étude. Les figures 42-45 présentent les gels d'électrophorèse des différentes préparations enzymatiques. Les dérivés traités avec du glutaraldehyde sont réduites avec du borohydrure de sodium pour assurer la stabilité des liaisons glutaraldehyde-enzyme ou glutaraldehyde-PEI durant l'ébullition des échantillons.

Les résultats obtenus avec les dérivés OC-LU faiblement chargés, (figure 42) montrent que le traitement par glutaraldehyde réduit l'intensité de la bande de LU, tandis que le traitement par PEI donne une bande plus large avec un poids moléculaire légèrement plus apparent mais plus diffus. En utilisant la préparation fortement chargée (figure 43), on peut constater que l'effet du glutaraldehyde et de PEI est similaire à celui décrit précédemment. Par ailleurs, des agrégats larges sont apparus sur le gel durant la migration des particules de cette préparation enzymatique.

L'incubation des deux préparations d'OC-LU-GLU (faiblement et hautement chargées) dans le PEI entraîne une réduction supplémentaire de la bande de LU.

Les résultats obtenus avec la lipase TLL (Figure 44) sont assez similaires, sauf que les agrégats sont observés avec les dérivés traités avec glutaraldehyde, même en utilisant la préparation à faible charge. Le traitement par le glutaraldehyde plus PEI de la préparation de forte charge, donne une très faible bande de TLL.

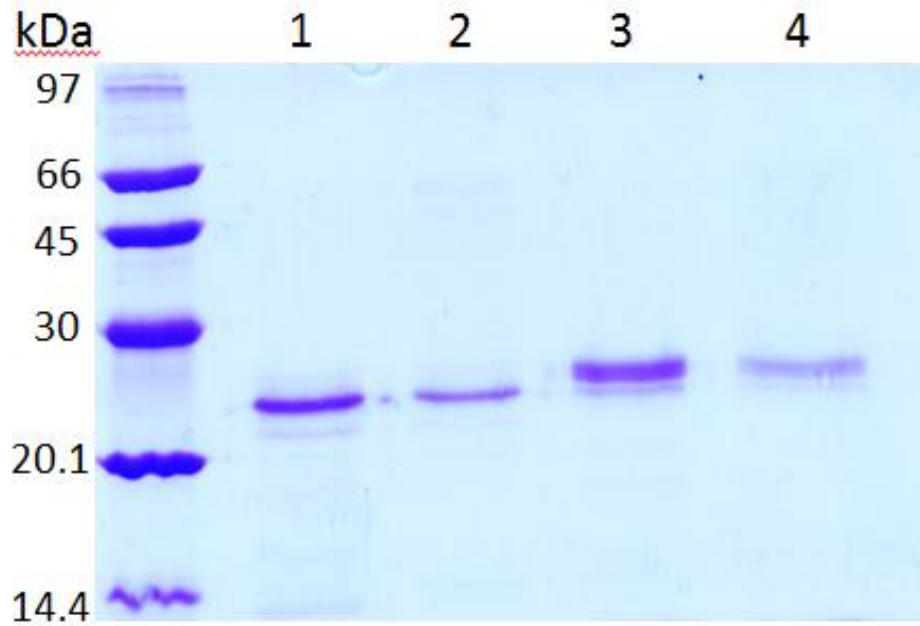


Figure 42 : Analyse SDS-PAGE d'OC-LU faiblement chargés.
(Voie 1: OC-LU. Voie 2: OC-LU-GLU. Voie 3: OC-LU-PEI.
Voie 4: OC-LU-GLU-PEI).

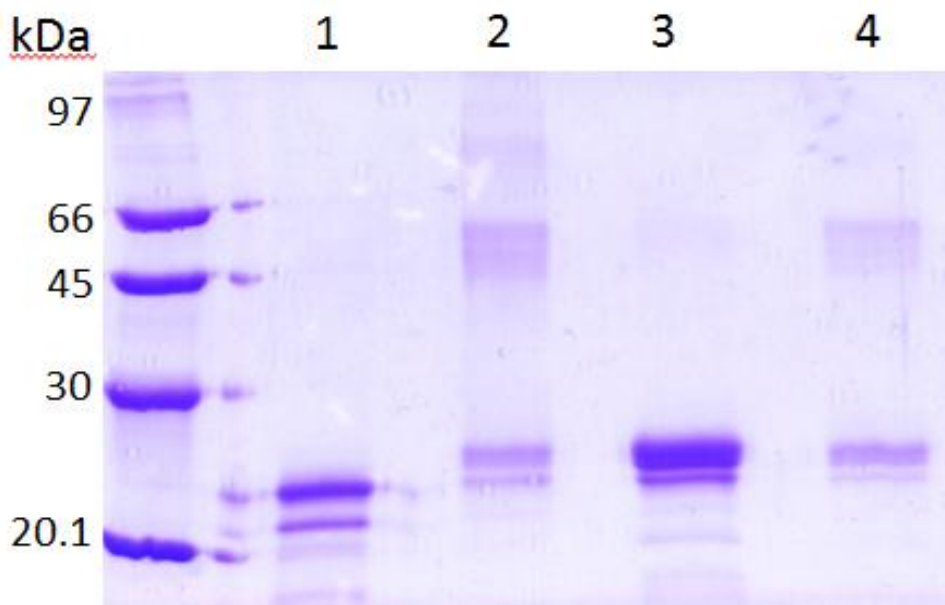


Figure 43 : Analyse SDS-PAGE d'OC-LU fortement chargés.
(Voie 1: OC-LU. Voie 2: OC-LU-GLU. Voie 3: OC-LU-PEI.
Voie 4: OC-LU-GLU-PEI).

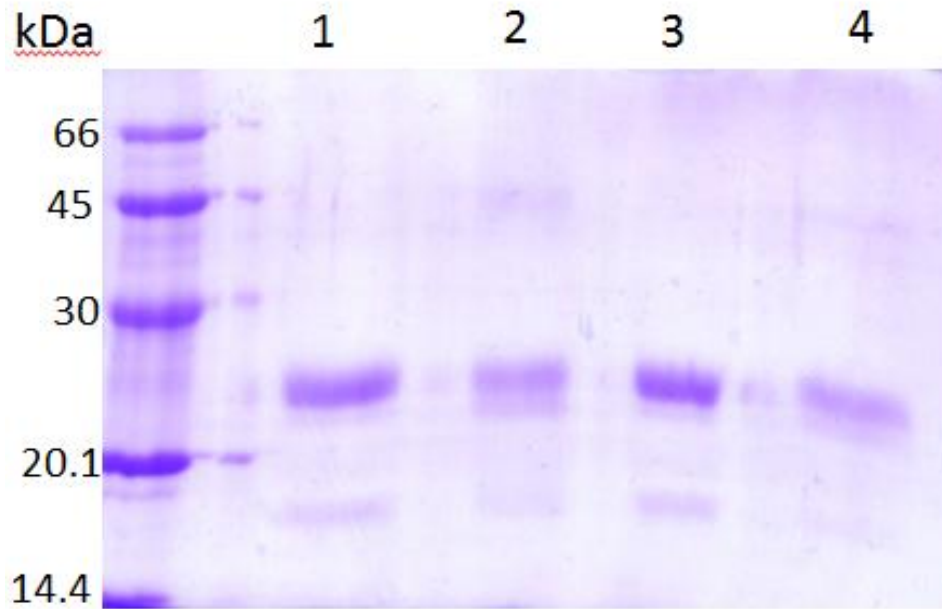


Figure 44 : Analyse SDS-PAGE d'OC-TLL faiblement chargés.
(Voie 1: OC-TLL. Voie 2: OC-TLL-GLU. Voie 3: OC-TLL-PEI.
Voie 4: OC-TLL-GLU-PEI).

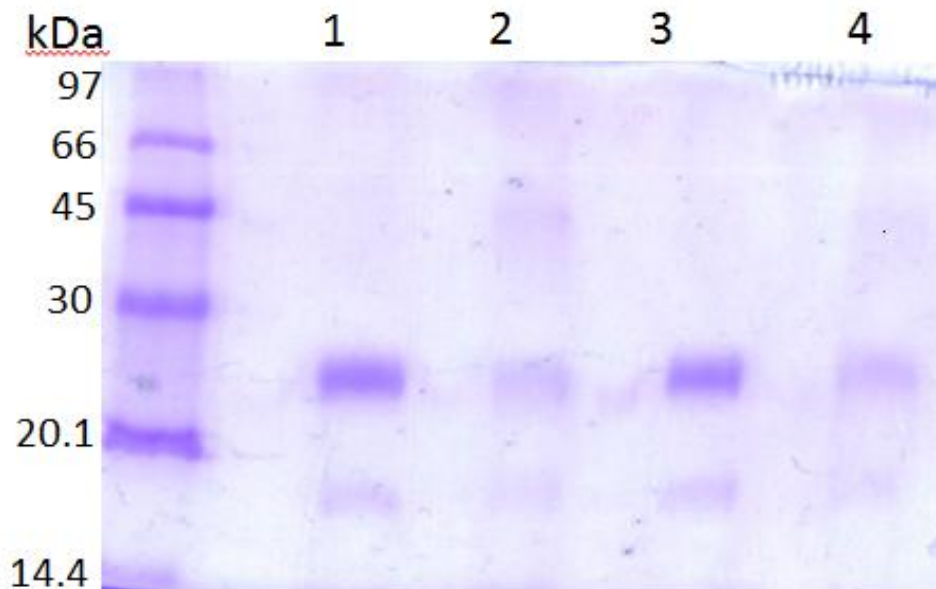


Figure 45 : Analyse SDS-PAGE d'OC-TLL fortement chargés.
(Voie 1: OC-TLL. Voie 2: OC-TLL-GLU. Voie 3: OC-TLL-PEI.
Voie 4: OC-TLL-GLU-PEI).

I.3. Etude de la stabilité opérationnelle des préparations enzymatiques:

I.3.1. Prévention de la désorption du PEI:

Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau 12. L'analyse par TNBS montre qu'environ 70% du PEI sont facilement désorbées depuis le support OC non modifié en utilisant seulement 1 M de chlorure de sodium et une perte de 40 à 50% si le support est recouvert d'une enzyme (LU et TLL respectivement) et du polymère ionique. En utilisant 6 M de chlorure de sodium, presque toutes molécules du PEI ont été désorbées. Les résultats sont assez similaires en utilisant les deux enzymes employées

Ensuite, LU et TLL sont immobilisées sur l'OC-GLX à une charge enzymatique maximale, incubées dans du PEI puis l'ensemble est réduit avec du borohydrure de sodium. Ce traitement a permis de diminuer considérablement la libération de PEI même en utilisant une solution concentrée de chlorure de sodium (6 M), avec toujours une faible partie du PEI (25 %) libérée dans le milieu.

Ainsi, une autre préparation est testée en traitant les enzymes immobilisées avec du glutaraldehyde puis en les incubant dans du PEI pendant 24 heures. Les dérivés obtenus sont incubés dans du chlorure de sodium (1 et 6 M) puis analysés par TNBS. Cette méthode donne de bons résultats, même à une très forte force ionique, les molécules du PEI ne sont pas largement libérées du support à cette concentration.

Tableau 12 : Absorbance relative (%) des différents supports analysés avec TNBS. * Référence (100±5).

Echantillon	Absorbance relative (%) mesurée après traitement avec du TNBS et incubation avec le chlorure de sodium	
	1M NaCl	6 M NaCl
OC-PEI*	34±4	≥5
OC-LU-PEI	62±5	≥10
OC-TLL-PEI	55±4	≥10
OC-GLX-PEI	88±5	85±5
OC-GLX-LU-PEI	85±5	75±6
OC-GLX-TLL-PEI	80±5	75±6
OC-LU-GLU-PEI	95±5	97±5
OC-TLL-GLU-PEI	90±6	85±6
OC-GLX-LU-GLU-PEI	93±5	93±5
OC-GLX-TLL-GLU-PEI	89±6	87±6

I.3.2. Immobilisation de la β -galactosidase sur les différents composites PEI :

Les figures 46-48 présentent les cinétiques d'immobilisation de 1 mg de β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* sur le support OCGLX-PEI et les dérivés OCGLX-LU/TLL-GLU-PEI respectivement.

Les cinétiques d'immobilisation montrent que la β -galactosidase est adsorbée rapidement sur tous les supports utilisés avec un temps inférieur à 20 minutes après le contact entre l'enzyme et le polymère et avec un rendement d'immobilisation de 100% et une activité récupérée de plus de 90%. Ces résultats sont similaires, exprimés sur OCGLX-PEI avec ou sans LU ou TLL immobilisées.

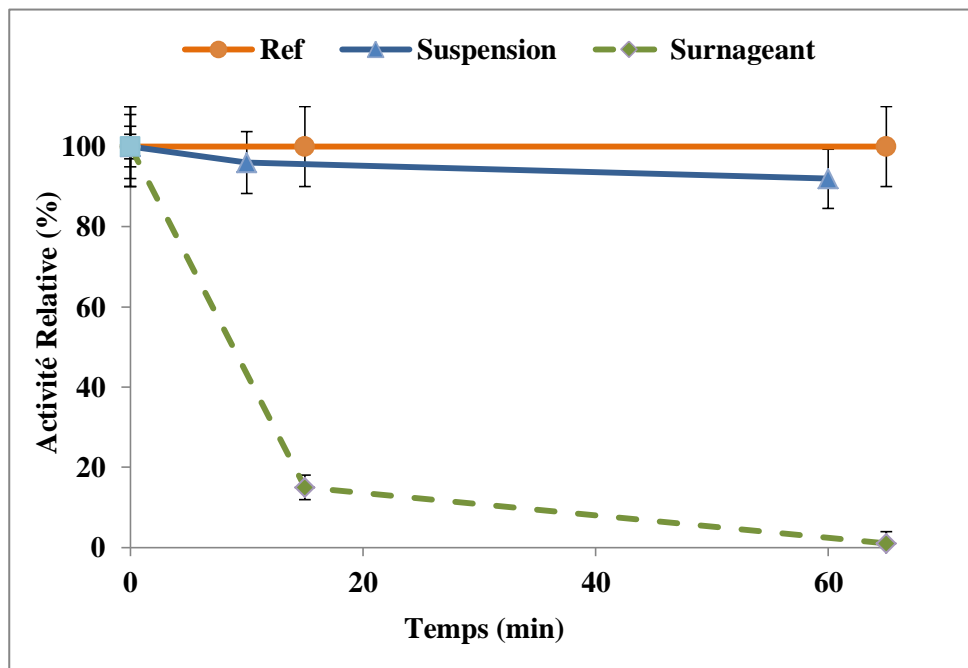


Figure 46 : Cinétique d'immobilisation de 1 mg de β -galactosidase/ g d'OCGLX- -PEI.

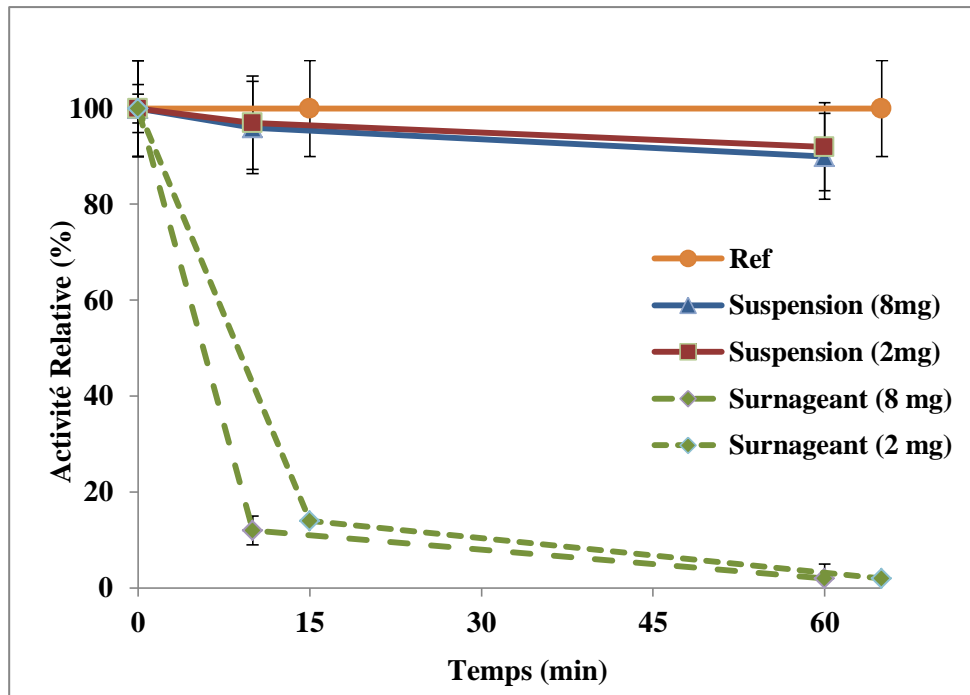


Figure 47 : Cinétique d'immobilisation de 1 mg de β -galactosidase/g d'OCGLX-LU-GLU-PEI.

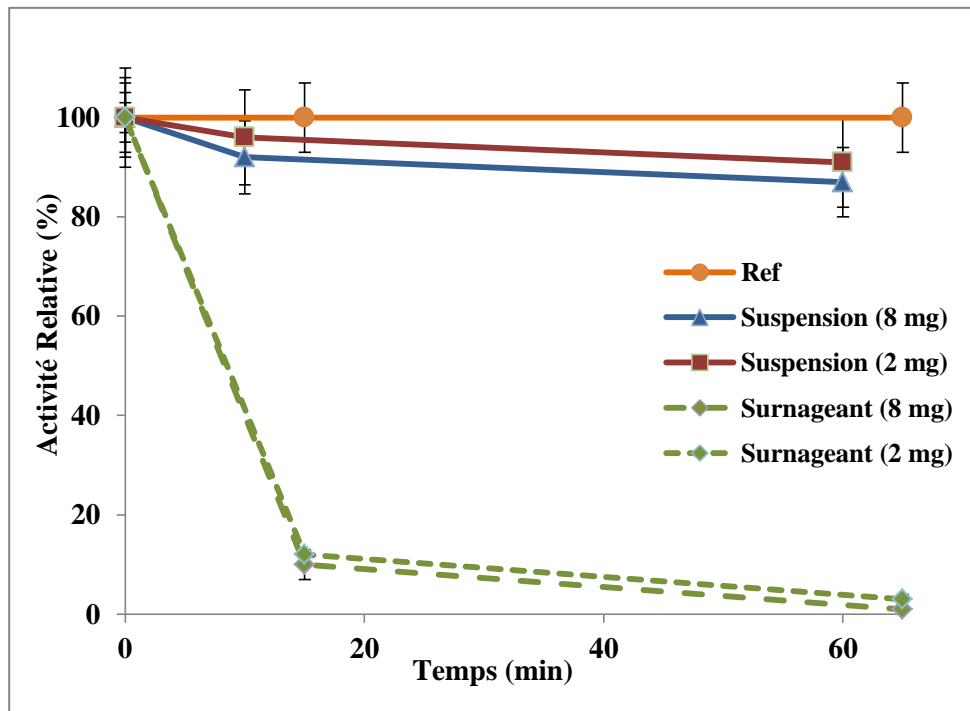


Figure 48 : Cinétique d'immobilisation de 1 mg de β -galactosidase/g d'OCGLX-TLL-GLU-PEI.

I.3.3. Stabilité thermique des dérivés enzymatiques :

Les dérivés OCGLX-LU/TLL-GLU-PEI- β -galactosidase préparés avec les deux charges différentes (2 mg/g et 8 mg/g) sont incubés à 50°C pour étudier leur thermo-stabilité (figures 49 et 50). Les deux préparations TLL ont conservé plus de 95% de l'activité après 4 h. Dans le cas de LU, seule la préparation fortement chargée est restée presque entièrement active après 4 heures (figure 50), par contre une faible diminution, d'environ 20%, est remarquée sur l'activité de la préparation faiblement chargée.

Les cinétiques d'inactivation de la β -galactosidase immobilisée sur différentes enzymes revêtues de PEI sont assez identiques, dont la β -galactosidase qui est presque entièrement inactivée dans les premières 30 minutes d'inactivation dans les mêmes conditions.

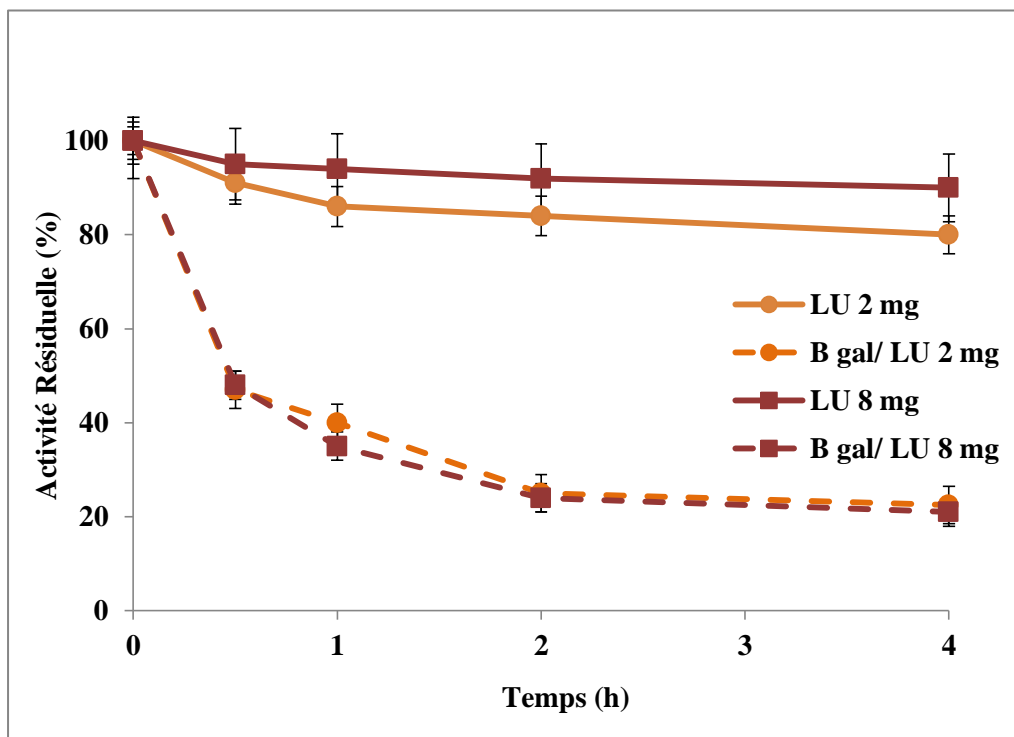


Figure 49 : Cinétiques d'inactivation d'OCGLX-LU-GLU-PEI- β -galactosidase à pH 7,0 et T 50°C.

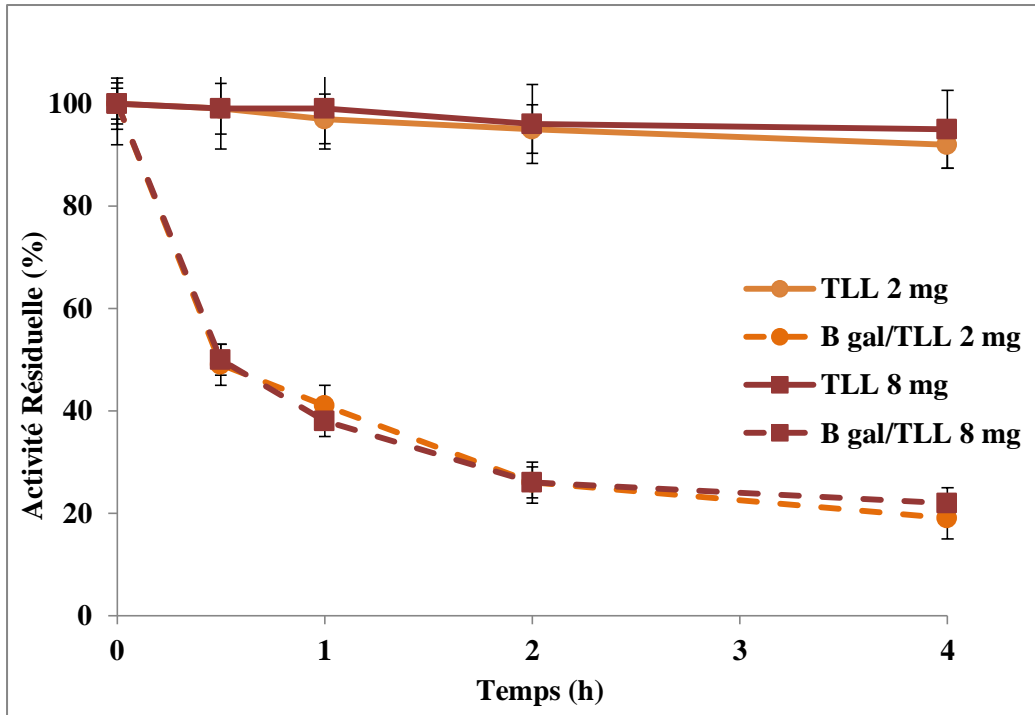


Figure 50 : Cinétiques d'inactivation d'OCGLX-TLL-GLU-PEI-β-galactosidase à pH 7,0 et T 50°C.

I.3.4. Cycles de réutilisation des dérivés enzymatiques :

Les figures 51 et 52 présentent les cycles de réutilisation des biocatalyseurs après inactivation thermique de la β-galactosidase à 50°C. La réutilisation des dérivés OCGLX-lipases-GLU-PEI, est précédée d'une désorption de la β-galactosidase inactivée en l'incubant dans une solution de chlorure de sodium de très forte force ionique (6 M) pendant 1 heure, suivie d'un rechargement d'une nouvelle molécule de β-galactosidase. Cette opération est répétée trois fois successives avec mesure de l'activité de toutes les enzymes.

Après le troisième cycle de réutilisation, la TLL immobilisée conserve plus que 80% de l'activité initiale, tandis que la LU peut maintenir plus de 90% d'activité après le toutes les réutilisations.

Tableau 13: Absorbance relative (%) des différents dérivés co-immobilisés testés à l'aide du TNBS.

Cycles Adsorption /Désorption	Biocatalyseur			
	LU (charge minimale)	LU (charge maximale)	TLL (charge minimale)	TLL (charge maximale)
0	100±5	100±6	100±5	100±4
1	85±5	89±4	84±4	90±6
2	75±4	77±3	73±5	81±5
3	65±4	63±4	67±6	67±3

Après chaque cycle d'inactivation/désorption, des échantillons sont prélevés des différents dérivés et analysés par TNBS. Le tableau 13 présente le pourcentage de PEI désorbé depuis les différents dérivés, sous l'effet de la force ionique élevée employée lors de la désorption de la β -galactosidase.

Les résultats montrent que la perte des molécules PEI, constatée après chaque traitement est de 10 à 15% pour les deux enzymes et les deux chargements. Après trois cycles de réutilisation, une libération d'environ 40% est constatée.

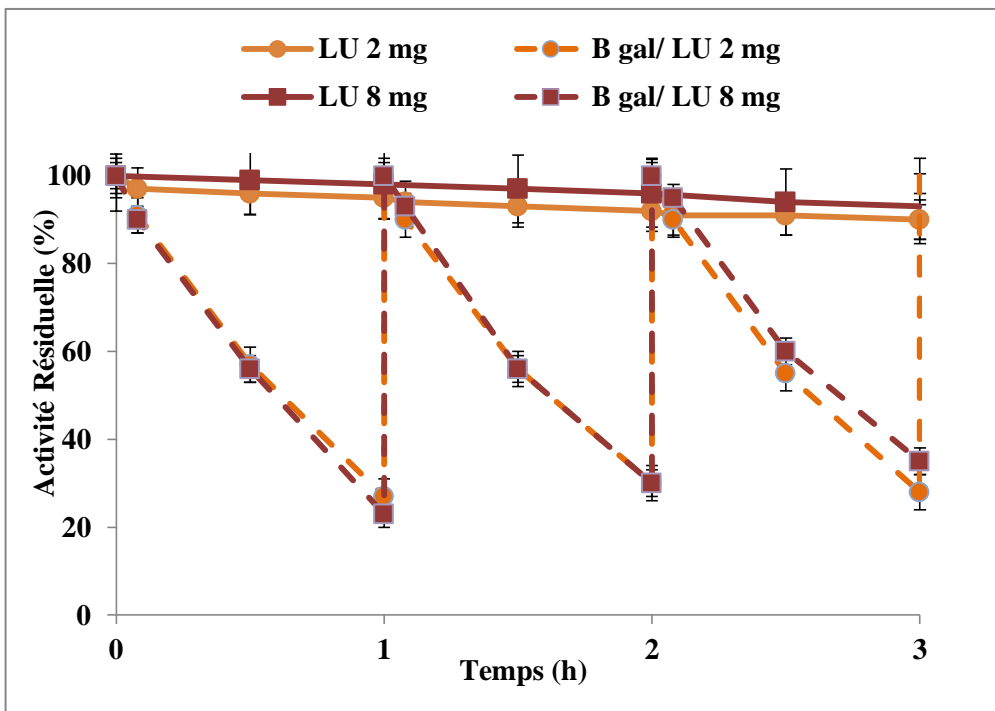


Figure 51:Cycles d'inactivation/désorption d'OCGLX-LU-GLU-PEI-β-galactosidase à pH 7,0 et T 50°C.

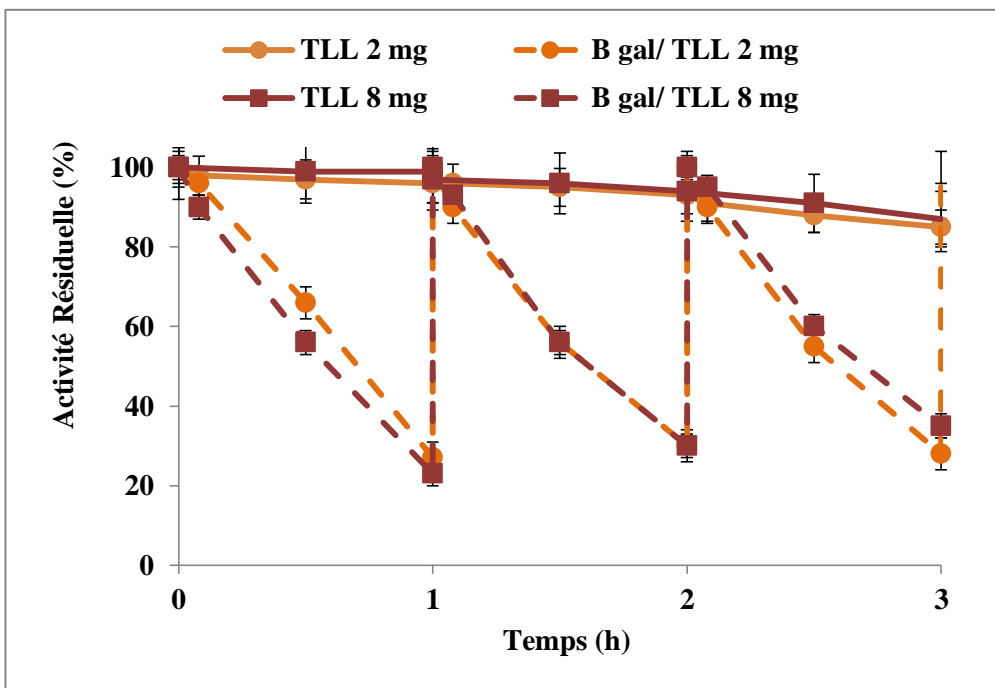


Figure 52:Cycles d'inactivation/désorption d'OCGLX-TLL-GLU-PEI-β-galactosidase à pH 7,0 et T 50°C.

DISCUSSION

I. Evaluation de l'effet de quelques paramètres sur la thermo-stabilité enzymatique:

I.1. Effet du chargement enzymatique sur la stabilité thermique :

I.1.1. Immobilisation de TLL sur l'Octyl agarose :

L'immobilisation de la lipase TLL en utilisant différents chargements enzymatiques sur le support hydrophobe, montre que le taux d'immobilisation dépend énormément de la charge enzymatique appliquée. La capacité d'adsorption maximale de support est estimée à environ 5 mg de lipases/g d'Octyl agarose. L'application d'une charge plus élevée que la capacité définie a favorisé un surpeuplement enzymatique, en augmentant le taux d'immobilisation par l'occupation de la surface et des pores tout en rendant les molécules enzymatiques étroitement proches les unes des autres (**Zaak et al, 2017a**). Cela a demandé un temps beaucoup plus long que celui nécessaire pour former une simple monocouche dans le cas où une faible charge est appliquée, afin d'assurer la fixation du maximum de molécules protéiques.

L'hyperactivité obtenue durant l'immobilisation est due à l'activation interfaciale qui caractérise les lipases au moment de l'adsorption hydrophobe en passant de la forme fermée à la forme ouverte (**Fernandez-Lafuente, 2010**). Cette activité est beaucoup plus élevée en utilisant les faibles charges, cela s'explique par l'accès facile du substrat au site actif contrairement observé avec les fortes charges, dont l'activité diminue suite au blocage des sites actifs, résultant de l'effet d'encombrement ou de surpeuplement enzymatique (**Zaak et al, 2017a**).

I.1.2. Stabilité thermique des différentes préparations TLL :

I.1.2.1. Effet du pH et de température :

À pH 7,0 la préparation de 6 mg/g présente une légère stabilité par rapport au dérivé préparé avec 1 mg/g, Cela est dûe à l'existence de certaines diffusions mineures en utilisant la préparation avec une charge enzymatique maximale (**Bolivar et al, 2016**). L'encombrement n'a pas d'effet significatif à cette valeur de pH sur la stabilité du dérivé préparé à très forte charge enzymatique. Par contre, à pH 5,0 le même dérivé montre une stabilité très claire par rapport aux deux autres préparations. Ces résultats suggèrent que lorsque les molécules enzymatiques sont très proches les unes des autres, certaines interactions indésirables entre-elles peuvent être formées dans les inactivations thermiques à pH 7,0. Une explication probable de cet effet négatif de la proximité très étroite des molécules enzymatiques est, peut-être, due à la stabilisation de certaines

conformations enzymatiques incorrectes, si certaines chaînes enzymatiques libres s'interagissent et se fixent à des chaînes d'autres molécules (**Romero et al, 2009**). Cependant, il est décrit que la surface inerte est la meilleure surface qui peut entourer une enzyme immobilisée pour éviter de telle interaction indésirable (**Dos Santos et al, 2015**).

Les résultats obtenus à pH 5,0 sont similaires avec ceux obtenus à pH 7.0 pour les dérivés préparés 1 mg/g et 6 mg/g à l'exception du dérivé entièrement surchargé (30 mg/g dont sa stabilité est beaucoup plus significative que les autres. Dans ce cas, il semble que la réduction de la mobilité de la chaîne enzymatique lorsqu'elle est entourée par d'autres molécules enzymatiques (un des effets attendus de l'encombrement enzymatique) est plus convenable en donnant un effet positif final sur la stabilité enzymatique (**Zaak et al, 2017a**).

Les mêmes stabilisations obtenues avec les faibles charges de lipases immobilisées à ces valeurs de pH (une demi-vie de 90 min), sont expliquées par la stabilité de la forme ouverte adsorbée au support (**Fernandez-Lafuente, 2010**).

Le cas contraire est constaté avec un pH alcalin (9,0) où aucune différence entre les trois préparations n'est observée, ce qui signifie qu'à cette valeur de pH, la stabilité de la lipase TLL devienne totalement indépendante du chargement enzymatique.

I.1.2.2.Effet de la force ionique :

La stabilité de la préparation hautement chargée (30 mg/g) est beaucoup plus importante à une force ionique élevée (3 M) que celle des deux autres préparations enzymatiques 1 et 6 mg/g). Cela suggère que la force ionique élimine les effets négatifs de l'encombrement enzymatique lors de l'inactivation à pH 7,0 tout en maximisant ses effets positifs (**Zaak et al, 2017a**).

Pour vérifier la pertinence d'un effet plus général de la force ionique sur la stabilité enzymatique, une préparation covalente de TLL sur le BrCN-agarose est inactivée en employant les mêmes conditions (25 mM et 3M à pH 7,0 et T 70°C).

Les résultats montrent que la préparation covalente n'a pas amélioré la stabilité dans une concentration de 3M de chlorure de sodium, ce qui suggère que les effets trouvés à l'aide de l'OC-TLL proviennent principalement du renforcement de l'adsorption enzymatique et de l'élimination des effets négatifs de l'encombrement des enzymes, en rendant plus difficile l'exposition de pores hydrophobes internes à ce milieu très

hydrophile (Somero, 1986 ; Jaenicke, 1991; De Cordt et al, 1994 ; Kamiyama et al, 1999 ; Chaniotakis, 2004 ; Zhi et al, 2007).

I.1.2.3. Effet de la glycérine :

Les résultats montrent que la glycérine a un effet remarquable sur la stabilité de toutes les charges enzymatique, notamment à forte concentration (60%) dont la stabilité est significativement améliorée. La préparation covalente connaît à son tour cette augmentation significative en présence de la même concentration de glycérine. Cela suggère que la présence de ce polyol présente un effet positif réel sur la stabilité du TLL. Les polyols se sont révélés être des agents stabilisants des enzymes via différents mécanismes (De Cordt et al, 1994 ; Lozano et al, 1994 ; Kamiyama et al, 1999; Haque et al, 2005; Tiwari et Bhat, 2006 ; Zhi et al, 2007), étant donné que l'effet observé dans cette étude est principalement produit à des concentrations très élevées, plus que par des interactions spécifiques entre la glycérine et les molécules enzymatiques, l'effet de la diminution de l'activité de l'eau à cette concentration peut être plus pertinente. Cette diminution de l'activité de l'eau diminuera également la mobilité de l'enzyme, ce qui pourrait diminuer l'effet des interactions indésirables résultants de l'encombrement des protéines à la surface du support.

Ainsi, la demi-vie des TLL immobilisées est significativement améliorée à l'aide de la glycérine, en augmentant de quelques minutes à plusieurs heures ce qui montre que ce réactif peut être un bon stabilisant de cette enzyme dans différentes conditions. Donc la glycérine peut être une bonne alternative pour stabiliser TLL pendant l'immobilisation sur différents types de supports (Rueda et al, 2015 ; Albuquerque et al, 2016; Fernandez-Lopez et al, 2016).

I.2. Effet de la modification chimique:

I.2.1.Effet des modifications sur l'activité des différentes préparations:

Une légère augmentation d'activité de l'ordre de 10% est observée après le traitement du dérivé OC-LU avec du polymère ionique, cela concorde avec les résultats obtenus dans une étude précédente (Dos Santos et al, 2014).

Le glutaraldehyde peut produire plusieurs types de modifications sur l'enzyme. Tout d'abord, les groupes amines primaires sont modifiés après la première incubation, en produisant une certaine hydrophobicité sur l'enzyme, qui peut avoir des effets positifs ou négatifs sur la stabilité et/ou sur l'activité enzymatique (Palomo et al, 2007; Deng et al, 2010; Barbosa et al, 2012; Wong et al, 2013). Après l'élimination de l'excès du

glutaraldehyde, une réticulation peut être obtenue (**Fernandez-Lafuente et al, 1995**). Cette réticulation pourrait être intramoléculaire si les deux groupes amines sont situés dans la même molécule, ou intermoléculaires s'ils sont situés dans deux molécules enzymatiques différentes. Cela devrait produire une certaine rigidification de la molécule d'enzyme, et par conséquent une certaine stabilisation.

Lorsque les dérivés OC-LU sont modifiés avec du GLU puis traités avec du PEI, une diminution moins faible de l'activité est observée. Après réticulation et lorsque le polyéthylèneimine est ajouté, une autre réaction se produit, ce qui réduit les effets négatifs de la réaction de glutaraldehyde sur l'activité enzymatique ou même dans certains cas, produire des effets légèrement positifs (**Garcia-Galan et al, 2014; Peirce et al, 2016; Virgen-Ortíz et al, 2016; Virgen-Ortíz et al, 2017**).

L'effet du polymère est clairement observé dans le cas de la lipase TLL, où le traitement séquentiel avec le GLU plus le PEI maintient stable l'activité initiale sans aucune diminution, alors que la modification par GLU produit comme s'est attendu, la diminution de l'activité des deux dérivés TLL.

Donc, la double modification avec du glutaraldehyde suivie du PEI peut être utilisée comme une méthode appropriée pour le développement d'un biocatalyseur plus performant en terme d'activité catalytique.

I.2.2. Effet des modifications sur la thermo-stabilité enzymatique:

Les cinétiques d'inactivations des deux enzymes immobilisées montrent que les dérivés OC-LU préparés avec une charge enzymatique maximale présentent une stabilité beaucoup plus élevée que ceux préparés avec une faible charge. Un effet de surpeuplement enzymatique sur la stabilité thermique est décrit précédemment en utilisant l'enzyme TLL (**Zaak et al, 2017a**). La différence dans les taux d'immobilisation de LU, en utilisant les deux chargements, sur OC permet d'avoir ces effets.

En outre, il est également clair que les différences de stabilité obtenues après modification du dérivé OC-LU avec le GLU et le PEI dépendent de la charge LU du biocatalyseur.

À pH 5,0 les préparations hautement chargées montrent une amélioration significative de leur stabilité notamment celles traitées par GLU plus PEI. Cela pourrait être dû à une réticulation intermoléculaire facilement réalisée quand les molécules enzymatiques sont

plus étroitement immobilisées dans la préparation fortement chargée (**Fernandez-Lafuente, 2010; Wong et al, 2013; Zaak et al, 2017a**).

Cette amélioration de stabilité est encore observée avec l'OC-LU à faible charge traitée par le PEI, ce qui confirme que ce polymère peut avoir des effets positifs directs sur la stabilité de l'enzyme et sa désorption. Le poids moléculaire élevé de ce polymère (25 KDa) peut permettre de réticuler des molécules enzymatiques relativement lointaines les unes des autres. (**Bryjak et al, 1995; Andersson et al, 1999; Andersson et al, 2000; Breccia et al, 2002; Mateo et Fernandes et al, 2006; Bolivar et al, 2009; Garcia-Galan et al, 2013; Peirce et al, 2016; Fernandez-Lopez et al, 2017a; Fernandez-Lopez et al, 2017b**).

Encore une fois et à pH différent (7,0), le traitement PEI prouve son pouvoir d'amélioration de la stabilité de l'OC-LU et celle de l'OC-LU-GLU, de différentes charges à des niveaux similaires. La stabilité finale du dérivé de haute charge modifié, reste plus élevée que celle du dérivé peu chargé et modifié. On peut conclure que la stabilisation est plus élevée en utilisant les surfaces hautement chargées.

L'effet du PEI n'est plus observé à pH 9,0 tandis que le traitement avec du glutaraldehyde produit une certaine stabilité sous ces conditions d'inactivation, à la fois avec des charges enzymatiques élevées et faibles. Comme tout pH utilisé, la stabilisation est beaucoup plus importante en utilisant les préparations enzymatiques hautement chargées que les préparations à charge faible.

L'effet négatif du PEI à cette valeur de pH, peut être expliqué par l'altération les interactions entre l'enzyme et le polymère. Dans un milieu alcalin, le polymère perd certains groupes cationiques ionisés et devient plus hydrophobe. On peut également considérer, que les groupes primaires du PEI peuvent être oxydés sous cette valeur de pH, en modifiant de nouveau les interactions enzyme-support (**Virgen-Ortiz et al, 2016**).

L'étude de la lipase TLL montre que l'effet de la charge enzymatique dépend du pH tel que décrit précédemment (**Sanchez et al, 2016**), même en utilisant des concentrations enzymatiques faibles. Les dérivés OC-TLL modifiés sont plus stable à pH 5,0 et similairement à pH 7,0 et pH 9,0. Le revêtement PEI montre un effet positif significatif en utilisant toutes les préparations OC-TLL. Cela est aussi constaté avec les différentes valeurs de pH utilisées dans les inactivations thermiques, contrairement à la lipase LU où le PEI a eu des effets différents en fonction du pH employé.

I.2.3. Effet des modifications en présence du solvant organique:

Les résultats montrent que même en présence d'acétonitrile, les dérivés OC-LU fortement chargés présentent une stabilité nettement supérieure. Cela signifie que l'agglomération des molécules enzymatiques sur la surface du support a un effet positif sur la stabilité enzymatique de la Lecitase dans toutes les conditions étudiées, différemment des résultats rapportés dans d'autres exemples (**Fernandez-Lafuente, 2010**).

Le traitement de la préparation de LU faiblement chargée avec du glutaraldehyde n'a pas d'effet significatif sur la stabilité enzymatique dans ces conditions, alors que cet effet est très important en utilisant la préparation enzymatique hautement chargée. Cela peut encore être lié aux possibilités plus élevées de réticulation intermoléculaire en utilisant les préparations fortement chargées (**Wong et al, 2013**). Le PEI offre une stabilisation importante pour les préparations des deux charges enzymatiques et cet effet est plus élevé en utilisant les préparations préalablement modifiées avec du glutaraldéhyde. Donc, la double modification est encore plus stabilisante offrant une fraction de stabilité aux bioréacteurs. Cela est lié au pouvoir réticulant du PEI qui peut apporter plus de stabilité et une rétention d'activité.

Pour la lipase TLL incubée dans 60% de dioxane, l'effet d'encombrement dans la préparation entièrement chargée offre une stabilité similaire à celle obtenue avec la lipase LU incubée dans de l'acétonitrile. Le revêtement PEI a donné, à son tour, plus de stabilité aux différentes préparations. L'effet du glutaraldehyde n'est observé positif que dans les préparations fortement chargées. Cela peut être expliqué par le fait que l'effet de glutaraldehyde n'est observé, que si des réticulations intramoléculaires ou intermoléculaires sont formées (**Virgen-Ortiz et al, 2016; Zaak et al, 2017b**).

Cependant, la stabilisation élevée observée avec la préparation LU de haute charge par rapport au TLL peut être liée au degré de réticulation intermoléculaire formée et/ou à l'effet de la réticulation intramoléculaire, faite par un seul point, sur les propriétés des deux lipases (**Zaak et al, 2017b**).

I.2.4. Analyse électrophorétique par SDS-PAGE :

Cette étude est réalisée afin de vérifier la formation des réticulations enzymatiques intramoléculaires et d'expliquer certains résultats rapportés dans l'étude de la thermostabilité.

Les résultats montrent que le traitement avec glutaraldehyde affecte l'intensité des bandes de LU en utilisant les deux charges, contrairement à l'effet remarqué lors de l'utilisation du PEI. Cela est dû à la libération du PEI depuis le support pendant l'ébullition, ce qui peut justifier la présence d'une large bande pendant l'analyse.

En utilisant la préparation à forte charge, des agrégats sont observés. Ces agrégats sont les dimères et les trimères enzymatiques formés sur le support (**Virgen-Ortiz et al, 2016**). La présence de ces grands agrégats affirme qu'il n'y a pas eu de liaisons covalentes entre l'enzyme et le support après traitement par le glutaraldehyde, ce qui est produit est principalement des liaisons protéiques intermoléculaires. Ce résultat confirme les bonnes propriétés du glutaraldehyde dans la production d'une réticulation intermoléculaire (**Uppenberg et al, 1994; Anderson et al, 1998; Dartiguenave et al, 2004; Gotor-Fernández et al, 2006**). Cependant, la grande partie des molécules LU est à l'état monomérique, même en utilisant cette préparation de surpeuplement. Ceci indique les difficultés d'obtenir une réticulation intermoléculaire complète en utilisant une faible concentration d'agents bifonctionnels (0,1% de glutaraldehyde).

L'incubation de cette préparation d'OC-LU-GLU dans le PEI entraîne une réduction supplémentaire de la bande de LU, ce qui peut expliquer la forme multiphasique de certaines cinétiques d'inactivation des dérivés OC-LU fortement chargés après la double modification chimique. Bien que de nombreuses molécules forment des agrégats plus volumineux qui ne sont pas libérés dans le milieu, il existe un nombre significatif de monomères, de dimères et de trimères qui peuvent avoir des stabilités différentes, en se libérant du support à haute température (**Rueda et al, 2015; Hirata et al, 2016a; Hirata et al, 2016b; Virgen-Ortiz et al, 2017**).

En ce qui concerne la lipase TLL, les résultats sont assez similaires, sauf que les agrégats peuvent être visualisés après le traitement au glutaraldehyde/PEI, même en utilisant la préparation à faible charge. Cela signifie que la réticulation dans le cas de la lipase TLL s'établit facilement contrairement à la lipase LU, ce qui suggère que les molécules d'enzyme pourraient être proches les unes des autres dans les préparations TLL.

Des agrégats plus grands de molécules d'enzyme réticulées par le glutaraldehyde sont obtenus en utilisant des dérivés à forte charge. Cependant, même en utilisant PEI et des préparations enzymatiques fortement chargées pour augmenter les possibilités d'une réticulation intermoléculaire massive, un certain pourcentage de molécules

enzymatiques n'est pas réticulé même en présence des molécules d'enzymes non liées(Zaak et al, 2017b).

I.3. Etude la stabilité opérationnelle:

I.3.1. Prévention de la désorption du PEI:

Le PEI est un polymère présentant des groupes anioniques à sa surface lui permettant de s'adsorber facilement sur les supports Octyl (Peirce et al, 2016; Virgen-Ortíz et al, 2017), ou sur les dérivés immobilisés sur le support tels que l'OC-LU ou l'OC-TLL (Zaak et al, 2017b). Cependant, les résultats obtenus, suite au test de TNBS, montrent que l'utilisation d'une concentration de 6 M de chlorure de sodium, provoque la désorption de toutes les molécules PEI. Il convient de noter que ces conditions peuvent être employées si une deuxième enzyme est fortement adsorbée au PEI après l'inactivation (Peirce et al, 2016 ; Virgen-Ortíz et al, 2016).

Le support OCGLX est encore testé. Il est remarqué qu'en utilisant le support sans ou avec immobilisation enzymatique, la teneur en PEI est maintenue presque intacte après incubation dans la solution de chlorure de sodium (6 M). Cela suggère que la plupart des molécules de PEI pourraient devenir attachées d'une façon covalente au support via des liaisons imines, ce qui a donné des liaisons amines secondaires très stables après réduction (Mateo et al, 2006). Une diminution insignifiante de PEI adsorbé est détectée après le traitement par TNBS, ce qui pourrait être dérivé de la libération de certaines molécules PEI adsorbées par échange ionique.

L'utilisation des supports OC-GLX peut devenir une stratégie appropriée pour empêcher la désorption du PEI et par conséquent des enzymes immobilisées. Si la préparation n'est pas réduite, une partie significative du PEI va être libérée du support (environ 50%). Un traitement additionnel par glutaraldehyde est réalisé afin d'améliorer les résultats précédents. Ce traitement a permis de diminuer considérablement la libération de PEI même en utilisant une grande force ionique (6 M).

L'étape de la réduction semble très importante afin d'éliminer toute possibilité de réaction covalente d'une autre enzyme avec la lipase immobilisée par l'intermédiaire de groupes glutaraldehyde résiduels. Cela a également permis d'avoir des dérivés enzymatiques stables où le PEI n'est pas désorbé même si c'était incubé dans 6 M de chlorure de sodium.

Pour assurer l'efficacité de cette stratégie, 2 mg de LU/TLL est utilisé pour couvrir partiellement le support avec l'enzyme (Tacias-Pascacio et al, 2016). De cette manière,

une partie des molécules du PEI pourra interagir avec l'enzyme et une partie avec le support. Dans ce cas, moins de 10% du PEI est libéré après l'incubation dans la solution de chlorure de sodium, ce qui suggère que cette méthode est appropriée, pour être utilisée dans l'étape de co-immobilisation de la β -galactosidase afin d'éviter la libération du PEI.

I.3.2. Immobilisation de la β -galactosidase sur les différents composites PEI :

Les trois cinétiques obtenues montrent que la β -galactosidase est adsorbée rapidement sur le polymère ionique, ce qui dit que l'immobilisation est faite par moyen d'adsorption ionique et qu'une forte force ionique appliquée dans le milieu réactionnel peut provoquer la désorption de l'enzyme depuis son support. Une étude similaire est faite en utilisant une force ionique de chlorure de sodium (300 mM), ou cela était suffisant pour désorber toutes les molécules de la β -galactosidase adsorbée par échange ionique sur le support (**Peirce et al, 2016**). Cela confirme qu'il n'y avait pas la formation de liaisons covalentes entre le glutaraldehyde et l'enzyme, ce qui signifie que toutes les molécules de β -galactosidase ne sont adsorbées que sur le polymère ionique et, par conséquent, pourraient être complètement et facilement désorbées du support, bien que la désorption des enzymes inactivées ne soit pas si simple (**Virgen-Ortíz et al, 2016; Virgen-Ortíz et al, 2017**).

I.3.3. Stabilité thermique des dérivés enzymatiques :

Les résultats obtenus avec les deux dérivés enzymatiques concordent avec les rapports ayant montré que le traitement par le glutaraldehyde et le PEI des enzymes immobilisées sur l'Octyl, améliore la stabilité enzymatique (**Fernandez-Lopez et al, 2016 ; Fernandez-Lopez et al, 2017; Zaak et al, 2017b**) et que les préparations enzymatiques hautement chargées sont beaucoup plus stables que les préparations faiblement chargées (**Fernandez-Lopez et al, 2017 ; Zaak et al, 2017a; Zaak et al, 2017b**).

La température choisie pour inactiver la β -galactosidase (50°C) semble convenable pour obtenir les 50 % d'activité dans les 30 minutes qui suivent l'incubation tout en conservant le maximum de stabilité des autres lipases ce qui peut permettre d'atteindre l'objectif de réutilisation de l'enzyme la plus stable (lipase) après l'inactivation de la deuxième enzyme (**Peirce et al, 2016**), car les différences dans les stabilités des enzymes sont vraiment significatives.

I.3.4. Cycles de réutilisation des dérivés enzymatiques :

L'objectif de cette partie de l'étude est de maintenir la réversibilité de l'immobilisation de l'enzyme sur des supports d'OC et minimiser la libération de l'enzyme pendant la réaction. Pour ce fait, il est nécessaire de déterminer les conditions dans lesquelles l'enzyme peut être libérée du support.

Bien qu'il est décrit qu'avec seulement une solution de chlorure de sodium de faible concentration (1M), la β -galactosidase inactivée pourrait être libérée du dérivé CALB-PEI (Peirce et al, 2016 ; Virgen-Ortíz et al, 2016), nous avons utilisé une solution de chlorure de sodium d'une concentration de 6 M, pour assurer la désorption dans le cas où la deuxième enzyme soit fortement adsorbée sur le PEI.

Après trois cycles d'immobilisation de la β -galactosidase sur le biocatalyseur de lipase, l'inactivation thermique à 50°C, de désorption et de rechargement d'une nouvelle molécule de β -galactosidase fraîche, les lipases LU et TLL immobilisées conservent 80 et 90% de leurs activités initiales respectivement. Une diminution, inattendue, de l'inactivation de TLL à 50°C, est peut être due suite à l'étape répétitive de chlorure de sodium 6 M qui a causée la libération de 40% de PEI. Cependant, il est constaté que la perte d'activité produite par l'incubation dans des concentrations élevées de chlorure de sodium peut être récupérée lors de l'incubation à faible concentration ionique pendant quelques heures (Zaak et al, 2017c). Donc, l'enzyme pourrait être réutilisée pendant trois cycles de réaction sans avoir une modification significative de sa performance.

Après ce nombre d'essai, environ 60% de PEI restent attachés aux enzymes et au support. Un résultat similaire est obtenu dans d'autres rapports où la β -galactosidase était totalement immobilisée avec un chargement maximal (4 mg/g de support) après le troisième cycle de réaction, ce qui suggère que le PEI reste intact après ces essais (De Albuquerque et al, 2016 ; Peirce et al, 2016). Ce qui suggère que la réutilisation des dérivés OCGLX-Lipases modifiés et revêtus développés dans ce travail, pour d'autres cycles de réaction sans avoir une perte significative d'activité et de molécules du PEI est possible.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Le but principal de cette étude est l'amélioration de la stabilité enzymatique en employant des méthodes d'immobilisation. Ainsi, la réutilisation des biocatalyseurs après plusieurs cycles de réaction a constitué un des objectifs de ce travail. Pour ce fait, plusieurs protocoles sont développés pour l'immobilisation des hydrolases choisies sur un support hydrophobe poreux, comme l'agarose capable d'offrir des augmentations significatives de la stabilité des enzymes, en allant de la méthode d'adsorption la plus simple jusqu'à la réticulation. Cette dernière est utilisée comme étape supplémentaire pour renforcer les liaisons entre les deux structures enzyme-support et afin d'obtenir des résultats satisfaisants en termes de robustesse de l'enzyme immobilisée.

Les techniques post-immobilisations faisant intervenir une composante bi-fonctionnelle, ou un polymère ionique peuvent contribuer à améliorer les propriétés fonctionnelles du biocatalyseur immobilisé, ce qui peut fournir une approche intéressante pour une immobilisation réussie et une utilisation industrielle.

Les résultats obtenus montrent que l'immobilisation des lipases sur des supports solides par adsorption hydrophobe est une méthode intéressante en termes d'activité et de stabilité.

Le surchargement enzymatique peut affecter à son tour les performances enzymatiques, à la fois de manière positive ou négative, en diminuant ou en augmentant sa stabilité thermique sous certaines conditions comme dans le cas de la lipase TLL décrit dans ce travail, ce qui le rend une variable critique lors de l'utilisation des supports poreux.

En outre, il est constaté que la glycérine testée a un effet stabilisant intéressant qui peut avoir des applications pratiques.

La combinaison de l'adsorption avec des liaisons covalentes supplémentaires, semble une des possibilités les plus prometteuses pour améliorer la stabilité enzymatique tous les groupes fonctionnels impliqués dans l'attachement sont maintenues stable pendant tout changement conformationnel.

Pour ce fait, des modifications chimiques par des agents réticulants sont testées avec les deux lipases, TLL et LU utilisées comme modèle, après leur adsorption sur l'Octyl. Cela a produit des stabilisations importantes, notamment lors de l'utilisation de dérivés enzymatiques hautement chargés. L'utilisation de liaisons covalentes confirme que la principale différence entre les biocatalyseurs de forte ou de faible charge réside dans le nombre de molécules

impliquées dans la réticulation intermoléculaire établie par le glutaraldehyde ou par le polyéthylèneimine comme le montre l'analyse électrophorétique par SDS-PAGE.

La co-immobilisation de la β -galactosidase sur les dérivés enzymatiques, développée dans cette étude était un moyen d'étudier la possibilité de réutilisation du biocatalyseur en utilisant le PEI comme couche intermédiaire. L'activation du support Octyl par des groupes glyoxyl, plus un traitement avec du glutaraldehyde a permis de fixer de manière covalente les molécules PEI, en empêchant leur désorption lors de l'incubation dans une concentration très élevée de chlorure de sodium (6M), décrite comme suffisante pour désorber toutes les protéines adsorbées ioniquement sur le revêtement PEI.

Il est constaté encore que grâce à la stabilité accrue obtenues avec les enzymes traitées par PEI et glutaraldehyde, il est possible de réutiliser les lipases LU et TLL immobilisées pendant trois cycles d'inactivation/désorption de la β -galactosidase avec une récupération du biocatalyseur immobilisé après chaque cycle, même si l'incubation dans une forte concentration de chlorure de sodium a produit une légère diminution de l'activité.

On peut conclure que le protocole utilisé dans cette étude pour immobiliser, de manière covalente, les molécules du PEI et par conséquent celles de l'enzyme semble être efficace pour résoudre le problème de leur libération pendant la désorption enzymatique même par incubation à forte force ionique.

Ainsi, la double modification chimique du biocatalyseur semble pertinente pour l'amélioration de la stabilité enzymatique avec un effet négligeable sur l'activité enzymatique, et peut donc être une méthode appropriée pour toute opération de co-immobilisation enzymatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Abian O, Wilson L, Mateo C, Fernández-Lorente G, Palomo J.M, Fernández-Lafuente R, Guisán J.M, Re D, Tam A, Daminatti M. 2002.**Preparation of artificial hyperhydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules: New enzyme derivatives to be used in any reaction medium, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 19-20: 295-303.
- [2] **Adalberto P.R, Massabni A.C, Goulart A.J, Contiero J, Carmona E.C, Cardello L, Monti R. 2006.** Production of β -galactosidase by *Trichoderma reesei* FTKO-39 in wheat bran. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 133(2) : 163–170.
- [3] **Albuquerque T.L.D, Rueda N, dos Santos J.C.S, Barbosa O, Ortiz C, Binay B, Özdemir E, Gonçalves L.R.B, Fernandez-Lafuente R. 2016a.**Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone-activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment, *Process Biochem.* 51: 865–874.
- [4] **Albuquerque T.L.D, Peirce S, Rueda N, Marzocchella A, Gonçalves L.R.B, Rocha M.V.P, Fernandez-Lafuente R. 2016b.** Ion exchange of β -galactosidase: the effect of the immobilization pH on enzyme stability, *Process Biochem.* 51: 875–880.
- [5] **Alonso N, Lopez-Gallego F, Betancor L, Hidalgo A, Mateo C, Guisan J.M, et al. 2005.** Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sepharose supports by the glutaraldehyde crosslinking method. *J Mol Catal B: Enzym.* 35:57–61.
- [6] **Alloue W.A.M, Aguedo M, Destain J, Ghalfi H, Blecker C, Wathelet J.P, Thonart P. 2008.** Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 (1) : 57-68.
- [7] **Anderson E.M, Larsson K.M, Kirk O. 1998.** One biocatalyst – many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal Biotrans.* 16:181–204.
- [8] **Andersson M.M, Hatti-Kaul R. 1999.** Protein stabilising effect of polyethyleneimine, *J. Biotechnol.* 72: 21-31.
- [9] **Andersson M.M, Breccia J.D, Hatti-Kaul R. 2000.** Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32: 145-153.
- [10] **Araujo R, Casal M, Cavaco-Paulo A. 2008.** Biocatalysis and Biotransformation. 26 (5): 332:349.
- [11] **Balcão V.M, Malcata F.X. 1998.** Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues. *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 511-519.

- [12] **Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. 2012.** The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde, *Process Biochem.* 47: 766-774.
- [13] **Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Rodrigues R.C, Fernandez-Lafuente R. 2014.** Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization, *RSC Adv.* 4 : 1583-1600.
- [14] **Bekhouche M, Blum L.J, Doumèche B. 2011.** Ionic liquid-inspired cations covalently bound to formate dehydrogenase improve its stability and activity in ionic liquids. *ChemCatChem.* 3, 875–882.
- [15] **Benjamins F. 2014.** Galacto-oligosaccharide synthesis using immobilized – galactosidase. *International Dairy Journal.* 38:160-168.
- [16] **Bernal C, Sierra L, Mesa M. 2012.** Improvement of thermal stability of β -galactosidase From *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 84: 166-172.
- [17] **Bes T, Gomez-Moreno C, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. 1995.** Selective enzymatic oxidations: stabilization by multipoint covalent attachment of ferredoxin NAD-reductase—an interesting cofactor recycling enzyme. *J Mol Catal.* 98:161–169.
- [18] **Betancor L, Fuentes M, Dellamora-Ortiz G, Lopez-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Klibanov A.M. 1983.** Approaches to enzyme stabilization. *Biochem Soc Trans.* 11:19–20.
- Betancor L, Lopez-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora Ortiz G, Mateo C, et al. 2006.** Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb Technol.* 39:877–882.
- [19] **Betts M. J, Russell R. B. 2003.** Amino acid properties and consequences of substitutions. In M. R. Barnes, I. C. Gray (Eds.), *Bioinformatics for Geneticists.* 291-314.
- [20] **Bódalo A, Gómez E, Máximo M. F, Gómez J. L, Bastida J. 1991.** Immobilization of β -galactosidase by physical adsorption on Chromosorb-W. *Biotechnology Techniques,* 5, 393-394.
- [21] **Boehm G, Stahl B. 2007.** Oligosaccharides from Milk. *The Journal of Nutrition.* 137: 847S-849S.
- [22] **Bolivar J.M, Wilson L, Ferrarotti S.A, Fernandez-Lafuente R, Guisan J.M, Mateo C. 2006.** Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Biomacromolecules.* 7:669–673.

- [23] **Bolivar J.M, Rocha-Martin J, Mateo C, Cava F, Berenguer J, Fernandez-Lafuente R, Guisan J.M. 2009.** Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: Full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes, *Biomacromolecules*, 10:742-747.
- [24] **Bolivar J.M, Eisl I, Nidetzky B. 2016.** Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts, *Catal.Today*. 259: 66–80.
- [25] **Bommarius AS, Karau A. 2005.** Deactivation of formate dehydrogenase (FDH) in solution and at gas–liquid interfaces. *Biotechnol Prog* .21:1663–1672.
- [26] **Bozoglu F, Swaisgood H.E, Adams D.M. 1984.** *J. of Agri, and Food Chem.*32, p.2-6.
- [27] **Blecker C. 1993.** La catalyse enzymatique en milieu organique : potentialités d'utilisation des lipases. *Bull. Rech.Agron.Gembloux*.28 : 51-85.
- [28] **Breccia J.D, Andersson M.M, Hatti-Kaul R. 2002.** The role of poly(ethyleneimine) in stabilization against metal-catalyzed oxidation of proteins: A case study with lactate dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 1570: 165-173.
- [29] **Brena B.M, Batista-Viera F.1997.** Immobilization of Enzymes A Literature Survey in From: **Guisan J.M.** *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition Humana Press Inc., Totowa.
- [30] **Brock T. D.1985.** Life at high temperatures. *Science*. 230: 132-138.
- [31] **Bryjak J. 1995.** Storage stabilization of enzyme activity by poly(ethyleneimine), *Bioprocess Eng.* 13 : 177-181.
- [32] **Cabera Z, Fernandez-Lorente G, Palomo J.M, Guisan J.M, Fernandez-Lafuente R. 2008.** *Enzyme Microb. Technol.* 43, 531–536.
- [33] **Cao L. 2005.** Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol* .9:217–226.
- [34] **Cao L. 2006.** *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design.* : John Wiley & Sons.
- [35] **Carpio C, Gonzalez P, Ruales J, Batista-Viera F. 2000.** Bone-bound enzymes for food industry application. *Food Chemistry*, 68, 403-409.
- [36] **Caussette M, Gaunand A, Planche H, Lindet B. 1998.** Enzyme inactivation by inert gas bubbling. *Proc Biotechnol.* 15:393–398.
- [37] **Caussette M, Gaunand A, Planche H, Colombie S, Monsan P, Lindet B. 1999.** Lysozyme inactivation by inert gas bubbling: kinetics in a bubble column reactor. *Enzyme Microb Technol.* 24:412–418.

- [38] Chamouleau F, Coulon D, Girardin M, Ghoul M. 2001. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalysed synthesis in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 11, 949-954.
- [39] Chang A, Scheer M, Grote A, Schomburg I, Schomburg D. 2009. Brenda, Amenda and Freneda the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research*. 37: D588-D592.
- [40] Chaniotakis N.A. 2004. Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 89–95.
- [41] Charnock S.J, McCleary B.V. 2005. Les enzymes: applications industrielle et analytique. Extrait de la revue des oenologues, n°116.
- [42] Chellapandian M. 1998. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. *Process Biochem.* 33, 169–173.
- [43] Chowdary G.V, Prapulla S.G. 2002. The influence of water activity on the lipase catalysed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochem.* 38: 393-397.
- [44] Cipolatti E.P, Valério A, Ninow J.L, De Oliveira D, Pessela B.C. 2016. Stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* by crosslinking in PEGylated polyurethane particles by polymerization: Application of fish oil ethanolysis. *Biochem. Eng. J.* 112: 54–60.
- [45] Colombie S, Gaunand A, Lindet B. 2001. Lysoenzyme inactivation and aggregation in stirred-reactor. *J Mol Catal B: Enzym.* 11:559–65.
- [46] Cowan D.A, Fernandez-Lafuente R. 2011. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzym. Microb. Technol.* 49: 326–346.
- [47] Dartiguenave C, Bertrand M.J, Waldron K.C. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechnology*. 37:790–802.
- [48] De Castro H.F, Mendes A.A, Santos J.C, Aguiar C.L ; 2004. Modification of oils and fats by biotransformation. *Quím.* 27 :146–156.
- [49] De Cordt S, Hendrickx M, Maesmans G, Tobback P. 1994. The influence of polyalcohols and carbohydrates on the thermostability of α -amylase, *Biotechnol. Bioeng.* 43: 107–114.
- [50] De Lathouder K. M, Lozano-Castello D, Linares-Solano A, Kapteijn F, Moulijn J. A. 2006. Carbon coated monoliths as support material for a lactase from *Aspergillus oryzae*. *Carbon*. 44: 3053-3063.

- [51] **Deng C, Chen J, Nie Z, Si S. 2010.** A sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the multiwall carbon nanotube-modified electrode, *Biosens. Bioelectron.* 26: 213-219.
- [52] **Derewenda U, Swenson L, Green R, Wei Y, Yamaguchi S, Joerger R, et al. 1994.** *Protein Eng.* 7 : 551–557.
- [53] **Dos Santos J.C.S, Garcia-Galan C, Rodrigues R.C, de Santana H.B, Gonçalves L.R.B, Fernandez-Lafuente R. 2014.** Improving the catalytic properties of immobilized Lecitase via physical coating with ionic polymers, *Enzyme Microb. Technol.* 60: 1-8.
- [54] **Dos Santos J.C.S, Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Rodrigues R.C, Fernandez-Lafuente R. 2015.** Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes, *ChemCatChem* 7 : 2413–2432.
- [55] **Drago A.G, Gibson T.D. 2001.** Enzyme stability and stabilisation: applications and case studies. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, 361–376.
- [56] **Drobecq H, Boll E, Sénéchal M, Desmet R, Saliou J.M, Lacapère J.J, Mougel A, Vicogne J, Melnyk O. 2016.** A central cysteine residue is essential for the thermal stability and function of SUMO-1 protein and SUMO-1 peptide-protein conjugates. *Bioconjug. Chem.* 27: 1540–1546.
- [57] **Fernandes S, Geueke B, Delgado O, Coleman J, Hatti-Kaul R. 2002.** β -galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58(3):313-21.
- [58] **Fernandez-Lafuente R, Rosell C.M, Rodriguez V, Guisan J.M. 1995.** Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents, *Enzyme Microb. Technol.* 17: 517-523.
- [59] **Fernandez-Lafuente R. 2009.** Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology.* 45: 405-418.
- [60] **Fernandez-Lafuente R. 2010.** Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 62: 197–212.
- [61] **Fernandez-Lopez L, Rueda N, Bartolome-Cabrero R, Rodriguez M.D, Albuquerque T.L, Dos Santos J.C.S, Barbosa O, Fernandez-Lafuente R. 2016a.** Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl_2 . *Process Biochem.* 51: 48–52.
- [62] **Fernandez-Lopez L, Pedrero S.G, Lopez-Carrobles N, Virgen-Ortíz J.J, Gorines B.C, Otero C, Fernandez-Lafuente R. 2016b.** Physical crosslinking of lipase from

Rhizomucormiehei immobilized on octyl agarose via coating with ionic polymers. Avoiding enzyme release from the support. *Process Biochem.*54: 21–28.

[63] **Fernandez-Lopez L, Virgen-Ortiz J.J, Pedrero S.G, Lopez-Carroble N, Gorines B.C, Otero C, Fernandez-Lafuente R. 2017a.** Optimization of the coating of octyl-CALB with ionic polymers to improve stability and decrease enzyme leakage. *Biocatal.Biotransform.*54: 21–28.

[64] **Fernandez-Lopez L, Pedrero S.G, Gorines B.C, Lopez-Carroble N, Virgen-Ortiz J.J, Fernandez-Lafuente R. 2017b.** Effect of protein load on stability of immobilized enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 98:18–25.

[65] **Fernández-Lorente G, Palomo J.M, Guisán J.M, Fernández-Lafuente R.2007.** Effect of the immobilization protocol in the activity, stability and enantioselectivity of Lecitase® Ultra. *J. Mol.Cat B: Enzym.* 47: 99-104.

[66] **Fernandez-Lorente G, Cabrera Z, Godoy C, Fernandez-Lafuente R, Palomo J.M, Guisan J.M.2008a.** Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties.*Process Biochem* 43:1061–1067.

[67] **Fernandez-Lorente G, Filice M, Terreni M, Guisan J.M, Fernandez-Lafuente R, Palomo J.M.2008b.** *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 51, 110–117.

[68] **Fernández-Lorente G, Betancor L, Carrascosa A.V, Guisán J.M. 2011.** Release of omega-3 fatty acids by the hydrolysis of fish oil catalyzed by lipases immobilized on hydrophobic supports. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 88, 1173-1178.

[69] **Fields R. 1972.** *Methods in Enzymology*, Academic Press, vol. 25, p. 464-468.

[70] **Filho M, Pessela B.C.C, Mateo C, Carrascosa A.V, Fernández-Lafuente R, Guisán J.M. 2008.** Immobilization–stabilization of an β -galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 265-271.

[71] **Fjerbaek L, Christensen K.V, Norddahl B. 2009.** *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 102.

[72] **Fox R.J, Huisman G.W. 2008.** Enzyme optimization: moving from blind evolution to statistical exploration of sequence-function space, *Trends in Biotechnology*, 26 :132-138.

[73] **Gänzle M.G. 2012.** Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal.* 22: 116-122.

[74] **Gaur R, Pant H, Jain R, Khare S.K. 2006.** Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry.* 97: 426–430.

- [75] **Garcia-Galan C, Barbosa O, Fernandez-Lafuente R. 2013.** Stabilization of the hexameric glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* by cations and polyethyleneimine, *Enzyme Microb. Technol.* 52: 211-217.
- [76] **Garcia-Galan C, Dos Santos J.C.S, Barbosa O, Torres R, Pereira E.B, Corberan V.C, Gonçalves L.R.B, Fernandez-Lafuente R. 2014.** Tuning of Lecitase features via solid phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol, *Process Biochem.* 49: 604-616.
- [77] **Ge J, Lei J, Zare R.N. 2012.** Protein-inorganic hybrid nanoflowers, *Nat. Nanotechnol.* 7 : 428-432.
- [78] **Ghiaci M, Aghaei H, Soleimani S, Sedaghat M.E. 2009.** Enzyme immobilization: Part 2 Immobilization of alkaline phosphatase on Na-bentonite and modified bentonite. *Applied Clay Science.* 43 :308–316.
- [79] **Gianfreda L, Scarfi M.R. 1991.** Enzyme stabilisation: state of the art. *Mol Cell Biochem.* 109:97–128.
- [79] **Giacomini C, Villarino A, Franco-Fraguas L, Batista-Viera F. 1998.** Immobilization of b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 4 :313–327.
- [80] **Gotor-Fernández V, Busto E, Gotor V. 2006.** Candida antarctica lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Adv Synth Catal.* 348:797–812.
- [81] **Grassino A.N, Milardović S, Grabaric Z, Grabaric B.S. 2011.** Amperometric assessment of glucose electrode behaviour in mixed solvents and determination of glucose in dairy products. *Food Chem.* 125, 1335–1339.
- [82] **Grazu V, Betancor L, Montes T, Lopez-Gallego F, Guisan J.M et Fernandez-Lafuente R. 2006.** *Enzyme Microb. Technol.* 38: 960-966.
- [83] **Guisan J.M. 1988.** *Enzyme Microb. Technol.* 10 : 375-382.
- [84] **Gupta M.N. 1991.** Thermostabilization of proteins. *Biotechnol Appl Biochem.* 14:1–11.
- [85] **Gupta M, Mattiasson B. 1992.** Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems. In: *Methods of Biochemical Analysis*, volume 36, (Suelter, C.H., ed.), Wiley, New York, NY, pp. 1–34
- [86] **Gutierrez-Ayesta C, Carelli A.A, Ferreira M.L. 2007.** Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzym Microb Technol* 41: 35–43.

- [87] Haider T, Husain Q. 2009. Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk. *International Dairy Journal*. 19: 172-177.
- [88] Haque I, Singh R, Moosavi-Movahedi A.A, Ahmad F. 2005. Effect of polyols on the Gibbs energy of stabilisation of proteins at different pH values, *Biophys. Chem.* 117: 1–12.
- [89] Hasan F, Shah A.A, Javed S, Hameed A. 2010. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9(31): 4836-4844.
- [90] Henley J.P, Sadana A. 1984. A mathematical analysis of enzyme stabilization by a series-type mechanism: influence of chemical modifiers. *Biotechnol Bioeng.* 26:959–969.
- [91] Hernaiz M. J, Crout D.H.G. 2000. Immobilization/stabilization on eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 26-32.
- [92] Hirata D.B, Albuquerque T.L, Rueda N, Virgen-Ortíz J.J, Tacias-Pascacio V.G, Fernandez-Lafuente R. 2016a. Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 133: 117-123.
- [93] Hirata D.B, Albuquerque T.L, Rueda N, Sánchez-Montero J.M, Garcia-Verdugo E, Porcar R, Fernandez-Lafuente R. 2016b. Production of 1,2 dibutyryl by specific and selective hydrolysis of tributyrin catalyzed by immobilized lipases, *ChemistrySelect* 1:3259-3270.
- [94] Hronska H, Grosová Z, Rosenberg M. 2009. Hydrolysis of lactose in milk by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized in polyvinylalcohol gel. *Journal of Food and Nutrition Research*. 48. 87-91.
- [95] Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 16, 5358.
- [96] Jaeger K.E et al. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.* 15: 29-63.
- [97] Janeček S. 1993. Strategies for Obtaining Stable Enzymes. *Process Biochemistry* 28 :435-445
- [98] Jaenicke R. 1991. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* 202: 715–728.
- [99] Jha B.K, Svensson M, Kronberg B, Holmberg K. 1999. *J. Colloid Interface Sci.* 213 : 262–264.
- [100] Johnson K.M, Tao J.Z, Kennan R.P, Gore J.C. 1998. *Magn Reson Med.* 40:133–142.

- [101] Jurado E, Camacho F, Luzon G, Vicaria J.M. 2004. Kinetic model for lactose hydrolysis in a reticulation hollow-fibre bioreactor. *Chemical Engineering Science*. 59:397-405.
- [102] Kamiyama T, Sadahide Y, Nogusa Y, Gekko K. 1999. Polyol-induced molten globule of cytochrome c: an evidence for stabilization by hydrophobic interaction, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1434: 44–57.
- [103] Kasche V, Haufler U, Riechmann L. 1984. Kinetically Controlled Semisynthesis of β -Lactam Antibiotics and Peptides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 434,99-105.
- [104] Katchalski-Katzir E, Kraemer D.M. 2000. Eupergit, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal B: Enzyme*. 10:157–76.
- [105] Kennedy J.F, Cabral J.M.S. 1987. Enzyme immobilisation. In *Biotechnology*, vol. 7a, *Enzyme Technology*, ed. J.F.Kennedy, pp 347-404.
- [106] Kirk O, Borchert T.V, Fuglsang C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*.13:345–351.
- [107] Klein M.P, Fallavena L.P, Schöffner J.N, Ayub M.A.Z., Rodrigues R.C, Ninow J.L, Hertz P.F. 2013. High stability of immobilized β -galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers* 95 :465–470.
- [108] Klibanov A.M. 1979. Enzyme stabilization by immobilization. *Anal Biochem* . 93:1–25.
- [109] Klibanov A.M. 1982. Stabilisation of enzymes against thermal inactivation. *Adv Appl Microbiol.*29:1–28.
- [110] Klibanov A.M, Ahern T.J. 1987. Thermal stability of proteins. In: Oxender DL, Fox CF, Editors. *Protein engineering*. Alan R. Liss, New York. 213–218.
- [111] Koeller K.M, Wong C.H. 2001. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*.409:232–240.
- [112] Kojima Y, Kobayashi M, Shimizu S. 2003. A Novel Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380: *Journal of Bioscience and Bioengineering* .96: 242-249.
- [113] Laemmli UK. 1970. Décollement des protéines structurales lors de l'assemblage de la tête de Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-5.
- [114] Lancelot W.K, Luke M, John S.R, Ignatious N. 2002. Characterisation of some underutilised vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase-catalysed production of cocoa butter equivalents. *Ind. Crops Prod.* 16: 237-244.
- [115] Lasoń E, Ogonowski J. 2010. Lipase – characterization, applications and methods of immobilization. *CHEMIK* .64, 2, 97-102.

- [116] **Lawson T.G, Regnier F.E, Wieth H.L. 1983.** Separation of synthetic oligonucleotides on columns of microparticulate silica coated with crosslinked polyethylene-imine. *Anal.Biochem.*133 : 85–93.
- [117] **Lawson D.M, Brzozowski A.M, Dodson G.G, Hubbard R.E, Høge-Jensen B, Boel E, et al. 1994.** in: **Woolley P, Petersen S.B.**(Eds.), *Lipases: Their Biochemistry, Structure and Application*, Cambridge University Press, Cambridge. 77–94.
- [118] **Liu T, Wang Y, Luo X, Li J, Reed S.A, Xiao H, Young T.S, Schltz P.G. 2016.** Enhancing protein stability with extended disulfide bonds.*Proc.Natl. Acad. Sci.* 113: 5910–5915.
- [119] **Lizano C, Sanz S, Luque J, Pinilla M. 1998.** *Biochem Biophys Acta.*1425:328–336.
- [120] **Lopez-Gallego F, Betancor L, Hidalgo A, Alonso N, Fernandez-Lorente G, Guisan J.M, et al. 2005a.**Preparation of a robust biocatalyst of d-amino acid oxidase on sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. *Enzyme Microb Technol.* 37:750–756.
- [121] **Lopez-Gallego F, Betancor L, Mateo C, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz G, et al. 2005b.** Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J Biotechnol.* 119:70–5
- [122]**López-GallegoF, BetancorL, HidalgoA, AlonsoN, Fernández-LafuenteR, GuisánJ.M. 2005c.** Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase, *Biomacromolecules*, 6: 1839-1842.
- [123] **Lozano P, Combes D, Iborra J. 1994.**Effect of polyols on chymotrypsinthermostability: a mechanistic analysis of the enzyme stabilization, *J.Biotechnol.* 35: 9–18.
- [124] **Lundblad R.L et Noyes C.M. 1985.***Chemical Reagents for Protein Modification.*CRC Press, Boca Raton.
- [125] **Martinek K, Klibanov A.M, Goldmacher V.S, Berezin I.V. 1977.**The principles of enzyme stabilisation. I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multi-point fashion. *Biochim Biophys Acta.* 485:1–12.
- [126] **Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan J.M. 2000.** Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology.*26 : 509-515.

- [127] **Mateo C, Abian O, Fernández-Lorente G, Pedroche J, Fernández-Lafuente R, Guisán J.M. 2002.** Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. *Biotechnology Progress*, 18: 629-634.
- [128] **Mateo C, Torres R, Fernández-Lorente G, Ortiz C, Fuentes M, Hidalgo A, López-Gallego F, Abian O, Palomo J.M, Betancor L, Pessela B.C.C, Guisán J.M, Fernández-Lafuente R. 2003.** Epoxy-Amino Groups: A New Tool for improved immobilization of proteins by the Epoxy Method. *Biomacromolecules*, 4, 772-777.
- [129] **Mateo C, Abian O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Palomo J.M, Grazu V, Pessela B.C, Giacomini C, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista-Viera F, Fernandez-Lafuente R et Guisan J.M. 2005.** Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb. Technol.* 3: 456-462.
- [130] **Mateo C, Palomo J.M, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, Lopez-Gallego F, et al. 2006a.** Glyoxyl-agarose: a fully inert hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol.* 39:274–280.
- [131] **Mateo C, Fernandes B, Van Rantwijk F, Stolz A, Sheldon R.A. 2006b.** Stabilisation of oxygen-labile nitrilases via co-aggregation with poly(ethyleneimine), *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 38: 154-157.
- [132] **Mateo C, Palomo J.M, Fernandez-Lorente G, Guisan J.M, Fernandez-Lafuente R. 2007.** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques *Enzyme and Microbial Technology* 40 : 1451–1463.
- [133] **Mattiasson B, Kaul R. 1991.** Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology. In: *Protein immobilization. Fundamentals and Applications* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York. 19: 161–179.
- [134] **Messing R. A. 1976.** Adsorption and inorganic bridge formations. In: *Methods in Enzymology*, volume XLIV, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, New York. 40: 148–169.
- [135] **Migneault I. 2004a.** Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. 37:790–802.
- [136] **Migneault I, Dartiguenave C, Vinh J, Bertrand M.J, Waldron K.C. 2004b.** Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*. 25:1367–78.

- [137] **Mishra M.K, Kumaraguru T, Sheelu G, Fadnavis N.W. 2009.** Lipase activity of Lecitase Ultra in enantioselective reactions: characterization and applications. *Tetrahedron: Asymmetry* 20 : 2854–2860.
- [138] **Mizutani F, Yabuki S, Okuda A, Katsura T. 1991.** Glucose-sensing electrode based on carbon paste containing ferrocene and polyethylene glycol-modified enzyme. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 64 : 2849–2851.
- [139] **Mizutani F, Yabuki S, Iijima S. 1995.** Amperometric Glucose-sensing electrode based on carbon paste containing polyethylene glycol-modified glucose oxidase and cobalt octaethoxyphthalocyanine. *Anal.Chim.Acta.* 300: 59–64.
- [140] **Mojovic L, Knezevic Z, Popadic R, Jovanovic S. 1998.** Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support. *Appl. Microbiol.Biotechnol.* 50 : 676-681.
- [141] **Monsan P.1978.** Optimisation de l'activation du glutaraldéhyde d'un support pour l'immobilisation enzymatique. *J Mol Catal.* 3: 371-84.
- [142] **Moradpour Z, Ghasemian A. 2016.** Protein engineering of microbial cholesterol oxidases: A molecular approach toward development of new enzymes with new properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 4323–4336.
- [143] **Morales N et al. 2005.** Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on agnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. *J Mol Catal B: Enzym.* 32:97–101.
- [144] **Mozhaev V.V, Siksnis V.A.1983.** Operational stability of copolymerized enzymes at elevated temperatures. *Biotechnol Bioeng.* 25:1937–1945.
- [145] **Mozhaev V.V, Melik-Nubarov N.S, Sergeeva M.V, Sikrnis V, Martinek K. 1990a.** Strategy for stabilising enzymes. Part I. Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support. *Biocatalysis.* 3:179–187.
- [146] **Mozhaev V.V, Melik-Nubarov N.S, SikBnis V, Martinek K. 1990b.** Strategy for stabilizing enzymes. Part II: Increasing enzyme stability by selective chemical modification. *Biocanalysis,* 3 : 189-196.
- [147] **Mlichová Z, Rosenberg M. 2006.** Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research.* 45 : 47-54.
- [148] **Murray M, Rooney D, Van Neikerk M, Montenegro A, Weatherley L.R. 1997.** Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. *Process Biochem.* 32, 479-486.
- [149] **Neri D.F.M, Balcão V.M, Costa R.S, Rocha C.A.P, Ferreira M.F.C, Torres D.P.M, Rodrigues L.R.M, Carvalho L.B, Teixeira J.A. 2009.** Galacto-oligosaccharides production

during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry* 115 (2009) 92–99.

[150] **Nevell T.P. 1963.** Oxydation, *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 3

[151] **Noureddini H, Gao X, Philkana R.S. 2005.** Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour. Technol.* 96 (7): 769-777.

[152] **Ocsoy I, Dogru E, Usta S. 2015.** A new generation of flowerlike horseradish peroxidases as a nanobiocatalyst for superior enzymatic activity, *Enzyme Microb. Technol.* 75-76: 25-29.

[153] **O'Driscoll K.F. 1976.** Techniques of enzyme entrapment in gels. In: *Methods in Enzymology*, volume XLIV, (Mosbach K., ed.), Academic Press, New York. 169–183.

[154] **Ofagain C, Okennedy R. 1992.** *Biotechnol Adv*, 1992, 9: 351–409.

[155] **Olson A.C, Stanley W.L. 1973.** Lactase and Other Enzymes Bound to a Phenol-Formaldehyde Resin with Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 440-445.

[156] **Omar H. Het Pak. J. 2008.** *Biol. Sci.* 11 (10): 1310-1316.

[157] **Otieno D.O. 2010.** Synthesis of β -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial β -Galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 471-482.

[158] **Palomo J.M, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Guisan J.M, Fernandez-Lafuente R. 2003.** *Biomacromolecules* 4 : 1–6.

[159] **Palomo J.M, Ortiz C, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Guisan J.M, Fernandez-Lafuente R. 2004.** *J. Chromatogr. A* 1038 : 267–273.

[160] **Palomo J.M, Segura R.L, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Guisán J.M. 2007.** Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst, *Enzyme Microb. Technol.* 40: 704-707.

[161] **Pazhang M, Mehrnejad F, Pazhang Y, Falahati H, Chaparzadeh N. 2016.** Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63: 206–213.

[162] **Pedroche J, Yust M.M, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Giron-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Guisán J.M, Millán F. 2007.** Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1160-1166.

- [163] **Pereira-Rodriguez A, Fernandez-Leiro R, Gonzalez Siso M.I, Cerdan M.E, Beccera M, Sanz-Aparicio J. 2012.** Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of Structural Biology*, 177: 392-401.
- [164] **Pešić M, Božić N, López C, Loncar N, Álvaro G, Vujčić Z . 2014.** Chemical modification of chloroperoxidase for enhanced stability and activity. *Proc. Biochem.* 49: 1472–1479.
- [165] **Pessela B.C.C, Fernández-Lafuente R, Fuentes M, Vián A, García J.L, Carrascosa A. V, Mateo C, Guisán J.M. 2003a.** Reversible immobilization of a thermophilic β galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 369-374.
- [166] **Pessela Benevides C.C, Mateo C, Fuentes M, Vian A, Garc J.L, Carrascosa A.V, Guisán J.M, Fernández-Lafuente R. 2003b.** The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition Complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial Technology*. 33 :199–205.
- [167] **Pessela B.C.C, Betancor L, Lopez-Gallego F, Torres R, Dellamora-Ortiz G.M, Alonso-Morales N, Fuentes M, Fernández-Lafuente R, Guisán J.M, Mateo C. 2005.** Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. *Enzyme and Microbial Technology*. 37: 295-299.
- [168] **Péter F, Poppe L, Kiss C, Biró E, Preda G, Zarcu C, Olteanu A. 2005.** Influence of precursors and additives on microbial lipases stabilized by sol-gel entrapment, *Biocatal. Biotransform.* 23 (3-4): 251-260.
- [169] **Peirce S, Virgen-Ortíz J.J, Tacias-Pascacio V.G, Rueda N, Bartolome-Cabrero R, Fernandez-Lopez L, Russo M.E, Marzocchella A, Fernandez-Lafuente R. 2016a.** Development of simple protocols to solve the problems of enzyme coimmobilization. Application to coimmobilize a lipase and a β -galactosidase, *RSC Adv.* 6: 61707–61715.
- [170] **Peirce S, Tacias-Pascacio V.G, Russo M.E, Marzocchella A, Virgen-Ortíz J.J, Fernandez-Lafuente R. 2016b.** Stabilization of *Candida antarctica* Lipase B (CALB) immobilized on octyl agarose by treatment with polyethyleneimine (PEI), *Molecules* 21: 751.
- [171] **Pirozzi D et Greco G. 2004.** Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. *Enzyme Microb. Technol.* 34: 94-100.
- [172] **Poletto M, Parascandola P, Saracino I, Cifarelli G. 2005.** Hydrolysis of Lactose in a fluidized bed of Zeolite pellets supporting adsorbed β -galactosidase. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, A43.

- [173] **Pugniere M, San Juan C, Coletti-Previero M.A, Previero A. 1988.** Immobilization of enzymes on alumina by means of pyridoxal 5'-phosphate. *Biosci.Rep.* 8: 263–269.
- [174] **Qiu G.M, Zhu B.K, Xu Y.Y. 2005.** Alpha-amylase immobilized by Fe₃O poly(styrene-co-maleic anhydride) magnetic composite microspheres: preparation and characterization. *J Appl Polym Sci.* 95:328–335.
- [175] **Ramakrishnan A, Pandit N, Badgujar M, Bhaskar C, Rao M. 2007.** Bioresource Technology. 98 : 368–372.
- [176] **Rathi P.C, Fulton A, Jaeger K.E, Gohlke H. 2016.** Application of rigidity to the thermostabilization of lipase A from *Bacillus subtilis*. 12 :4754.
- [177] **Roes-Hill M.L, Palmer Z, Rohland J, Kirby B.M, Burton S.G. 2015.** Partial purification and characterisation of two actinomycete tyrosinases and their application in cross-linking reactions. *J.Mol. Catal.* 122 : 353–364.
- [178] **Romero O, Vergara J, Fernández-Lafuente R, Guisán J.M, Illanes A, Wilson L. 2009.** Simple strategy of reactivation of a partially inactivated penicillin G acylase biocatalyst in organic solvent and its impact on the synthesis of β-lactam antibiotics, *Biotechnol. Bioeng.* 103 : 472–479.
- [179] **Rueda N, Dos Santos J.C.S, Torres R, Ortiz C, Barbosa O, Fernandez-Lafuente R. 2015.** Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads, *RSC Adv.* 5: 11212–11222.
- [180] **Saby C, Mizutani F, Yabuki S. 1995.** Glucose sensor based on carbon paste electrode incorporating poly(ethylene glycol)-modified glucose oxidase and various mediators. *Anal.Chim.Acta.* 304 : 33–39.
- [181] **Sadana A, Henley J.P. 1986.** Effect of chemical modification on enzymatic activities and stabilities. *Biotechnol Bioeng.* 28:256–68.
- Saito N. 1973.** A thermophilic extracellular α-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 155 : 848-52.
- [182] **Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V. 2008.** *J Mol Catal B Enzym* .54:19–26.
- [183] **Salleh A.B, Rahman R.N.Z.R.A, Basri M. 2006.** *New Lipases and Proteases*, Nova Science Publisher, Inc
- [184] **Sanchez A, Cruz J, Rueda N, Dos Santos J.C.S, Torres R, Ortiz C, Villalonga R, Fernandez-Lafuente R. 2016.** Inactivation of immobilized trypsin under dissimilar conditions produces trypsin molecules with different structures, *RSC Adv.* 6: 27329-27334.
- [185] **Saxena R.K, Sheoran A, Giri B, Davidson W.S. 2003.** Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods.* 52: 1-18.

- [186] **Schmidt A, and Mosbach, K. 1997.**Biochemistry.16: 2101-2105.
- [187] **Schmid A, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. 2001.** Industrial biocatalysis today and tomorrow, Nature, 409 : 258-266.
- [188] **Schmid A, Hollmann F, Park J.B, Bühler B. 2002.** The use of enzymes in the chemical industry in Europe, Current Opinion in Biotechnology, 13 : 359-366.
- [189] **Scouten W.H. 1987.**A Survey of Enzyme Coupling Techniques. In: Methods in enzymology, volume 135, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, London. 20: 30–65.
- [190] **Sharma R, Chisti Y, Banerjee U.H. 2001.**Production, purification, characterization, and applications of lipases: Biotechnology Advances. 19 : 627-662.
- [191] **SharmaM, Kumar V, Pundir C.S. 2008.**Indian journal of Biotechnology. 7: 328-332.
- [192] **Sharp A.K, Kay G, Lilly M.D. 1969.**Kinetics of β -galactosidase attached to porous cellulose sheets.Biotechnology and Bioengineering, 11, 363-380.
- [193] **Sheldon R.A et Pelt S.V. 2013.** Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chem. Soc. Rev., 2013, 42, 6223-6235.
- [194] **Shukla T.P. 1975.** β -galactosidase technology: a solution to the lactose problem. CriticalReviews in Food Technology, 5, 325-356.
- [195] **Silva C.J.S.M, Gubitz G, Cavaco-Paulo A. 2006.**J Chem Technol Biotechnol. 81:8–16.
- [196] **SomturkB, YilmazI, AltinkaynakC, KaratepeA, ÖzdemirN, OcoyI. 2016.**Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties Enzyme Microb.Technol. 86: 134-142.
- [197] **SomeroG.N. 1986.**Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for proteinfunction, Am. J. Physiol. Regul.Integr. Comp. Physiol. 251: R197–R213.
- [198] **Tacias-Pascacio V.G, Peirce S, Torrestiana-Sanchez B, Yates M, Rosales-Quintero A, Virgen-Ortiz J.J, Fernandez-Lafuente R. 2016.**Evaluation ofdifferent commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases:tuning their stability, activity and specificity, RSC Adv. 6 :100281–100294.
- [199] **Tischer W, Wedekind F. 1992.**Immobilized enzyme: Methods and applications. Biocatalysis- From Discovery to Application, 200:95–126.
- [200] **Tischer W, Kasche V. 1999.** Immobilized enzymes: crystals or carriers? Trends Biotechnol. 17(8):326-35.
- [201] **Tishkov V.I, Savin S.S, Yasnaya A.S. 2010.**Protein Engineering of Penicillin Acylase.Acta Naturae, 2, 47-61.

- [202] **Tiwari A, Bhat R. 2006.** Stabilization of yeast hexokinase A by polyol osmolytes: correlation with the physicochemical properties of aqueous solutions, *Biophys. Chem.* 124: 90–99.
- [203] **Torres-Salas P, del Monte-Martinez A, Cutiño-Avila B, Rodriguez-Colinas B, Alcalde M, Ballesteros A.O, Plou F.J. 2011.** Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Adv Mater.* 23(44):5275-82.
- [204] **Torres P, Batista-Viera F. 2012.** Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans* β -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 83, 57-64.
- [205] **Treva M. 1980.** Effect of immobilization of enzyme activity in *Immobilized enzymes, An introduction and application in biotechnology* Wiley Chichester-New York. 11-56.
- [206] **Tsang S.C, Yu C.H, Gao X, Tam K. 2006.** Silica-encapsulated nanomagnetic particle as a new recoverable biocatalyst carrier. *J Phys Chem B.* 110:16914–16922.
- [207] **Undurraga D, Markovits A, Erazo S. 2001.** Cocoa butter equivalents through enzymatic interesterification of palm oil midfraction: *Process Biochemistry.* 36 : 933-939.
- [208] **Uppenberg J, Patkar S, Bergfors T, Jones T.A. 1994.** Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J Mol Biol.* 235:790–792.
- [209] **Vasconcelos K.A, Silva J.S.M, Schroeder M, Guebitz G.M, Cavaco-Paulo A. 2006.** *Biotechnol Lett.* 28:725–73.
- [210] **Vieira M.F, Vieira A.M.S, Zanin G.M, Tardioli P.W, Mateo C, Guisán J.M. 2011.** β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 69: 47-53.
- [211] **Virgen-Ortíz J.J, Peirce S, Tacias-Pascacio V.G, Cortes-Corberan V, Marzocchella A, Russo M.E, Fernandez-Lafuente R. 2016.** Reuse of anion exchangers as supports for enzyme immobilization: Reinforcement of the enzyme-support multiinteraction after enzyme inactivation, *Process Biochem.* 51: 1391-1396.
- [212] **Virgen-Ortíz J.J, Tacias-Pascacio V.G, Hirata D.B, Torrestiana-Sanchez B, Rosales-Quintero A, Fernandez-Lafuente R. 2017a.** Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports, *Enzyme Microb. Technol.* 96: 30-35.
- [213] **Virgen-Ortíz J.J, Pedrero S.G, Fernandez-Lopez L, Lopez-Carrobles N, Gorines B.C, Otero C, Fernandez-Lafuente R. 2017b.** Desorption of lipases immobilized on octyl agarose beads and coated with ionic polymers after thermal inactivation. Stronger adsorption of polymers/unfolded protein composites, *Molecules.* 22: 91.

- [214] **Volkin D.B et Klibanov A.M. 1989.** Minimizing protein inactivation. In: Creighton TE, editor. Protein function: a practical approach. Oxford University Press. 1–24
- [215] **Wallenfels K et Weil R. 1972.** β -Galactosidase. In: Boyer PD (ed) The enzymes, 3rd edn. Academic, New York. 7: 617–663.
- [216] **Wang S, Meng X, Zhou H, Liu Y, Secundo F, Liu Y. 2016.** Enzyme stability and activity in non-aqueous reaction systems: A mini review. Catalysts. 6 : 32.
- [217] **Ward O. P et Moo-Young M. 1988.** Thermostable enzymes. Biotechnol. Adv. 6 : 39-69.
- [218] **Watlington K. 2005.** Emerging Nanotechnologies for Site Remediation and Wastewater Treatment, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- [219] **White, C. A. and Kennedy, J. F. 1980.** Popular matrices for enzyme and other immobilizations. Enzyme Microb. Technol. 2, 82–90. 21.
- [220] **Taylor R.F. 1991.** Commercially available supports for protein immobilization. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York. 22: 139–160.
- [221] **Whitehurst R.J, Oort M.V. 2010.** Enzymes in food technology, Wiley-Blackwell. 388.
- [222] **Wilso, S.A., Peek, K., Daniel, R.M., 1994.** Immobilization of a proteinase from the extremely thermophilic organism *Thermus Rt41A*. Biotechnol. Bioeng. 43: 225–231.
- [223] **Woodward, J. 1985.** Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling. In: Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach, (Woodward, J., ed.), IRL, Oxford, UK. 3–17.
- [224] **Wong C.H, Whitesides G.M. 1994.** Enzymes in synthetic organic chemistry. Oxford: Pergamon Press.
- [225] **Wong D.E, Talbert J.N, Goddard J.M. 2013.** Layer by Layer Assembly of a Biocatalytic Packaging Film: Lactase covalently Bound to Low-Density Polyethylene, J. Food Sci. 78 :E853-E860.
- [226] **Wu X, Chou N, Lupher D, Davis L.C. 1998.** Benzotriazoles: Toxicity and Degradation, Proceedings of the 1998 Conference on Hazardous Waste Research. 374-382.
- [227] **Xiong H.Y, Chen T, Zhang X.H, Wang S.F. 2007.** Electrochemical property and analysis application of biosensors in miscible nonaqueous media—Room-temperature ionic liquid. Electrochem. Commun. 9 : 1648–1654.
- [228] **Xu Y, Du W, Liu D, Zeng J. 2003.** A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. Biotechnol. Lett., 25(15): 1239-1241.

- [229] Xu Y, Du W, Liu D. 2005. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *J.Mol.Catal. B: Enzymatic*. 32(5-6): 241-245.
- [230] Yabuki S, Mizutani F, Katsura T. 1992. Glucose sensing carbon paste electrode containing polyethylene glycol-modified glucose oxidase. *Biosens.Bioelectron*. 7: 695–700.
- [231] Yabuki S, Mizutani F, Katsura T. 1993. Electrical communication of polyethylene glycol-modified glucose oxidase in carbon paste and its application to the assay of glucose. *Sens. Actuators*, 13: 166–168.
- [232] Yabuki S, Mizutani F, Katsura T. 1994. Choline sensing electrode based on polyethylene glycol-modified enzyme and mediator. *Sens. Actuators* 20: 159–162.
- [233] Yabuki S, Mizutani F. 1995. Modifications to a carbon paste glucose sensing enzyme electrode and a reduction in the electrochemical interference from L-ascorbate. *Biosens.Bioelectron*. 10: 353–358.
- [234] Yabuki S. 2017. How to Lengthen the Long-Term Stability of Enzyme, Membranes: Trends and Strategies. *Catalysts*. 7: 12-16
- [235] Zaak H, Siar E.H, Kornecki J.F, Fernandez-Lopez L, Pedrero S.G, Virgen- Ortíz J.J, Fernandez-Lafuente R. 2017a. Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads, *ProcessBiochem*. 56:117–123.
- [237] Zaak H, Fernandez-Lopez L, Otero C, Sassi M, Fernandez-Lafuente R. 2017b. Improved stability of lipases immobilized on octyl-agarose beads by modification with PEI and glutaraldehyde. *Enzyme Microb.Technol*.
- [238] Zaak H, Fernandez-Lopez L, Lopez-Gallego F, Velasco-Lozano S, Sassi M, Fernandez-Lafuente R. 2017c. Octyl-agarose immobilized lipases stability in highly concentrated salts solutions: Dramatic deleterious effects of phosphate anions, in preparation. *Process biochem*
- [239] Zabin I, Fowler A.V. 1978. β -galactosidase, the lactose permease protein, and thiogalactoside transacetylase. In: Miller JH and Reznikoff WS (eds) *The operon*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 89–109.
- [240] Zaks A et Klibanov A.M. 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci*. 82 : 3192-3196.
- [241] Zale S et Klibanov A.M. 1983. On the role of reversible denaturation (unfolding) in the irreversible thermal inactivation of enzymes. *Biotechnol Bioeng*. 25:2221–2230.

- [242] **Zamost B.L, Nielsen H.K, Starnes R. L. 1991.**Thermostable enzymes for industrial applications. 'J. Zndust. Micro 8 : 71-82.
- [243] **Zare D, Suffren Y, Guénée L, Eliseeva S.V, Nozary H, Aboshyan-Sorgho L, Petoud S, Hauser A, Piguet C. 2015.**Smaller than a nanoparticle with the design of discrete polynuclear molecular complexes displaying near-infrared to visible upconversion Dalton Trans. 44: 2529-2540.
- [244] **Zeng L, Luo K.K, Gong Y.F. 2006.**Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier.J Mol Catal B: Enzym. 38:24–30.
- [245] **Zhi L, Jiang Y, Wang Y, Hu M, Li S, Ma Y. 2007.** Effects of additives on the thermostability of chloroperoxidase, Biotechnol.Prog. 23: 729–733.
- [246] **Zhu K, Tuominen E.K.J, AnantPatkar S, Svendsen A, Kinnunen P.K.J. 2001.**Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability.Biochimica et Biophysica Acta 1547, 329-338.

ANNEXES

ANNEXE 1

Dosage des protéines

- Préparation d'une solution mère de BSA d'une concentration de 1 mg/ml dans de l'eau distillée.
- Préparer les tubes à essai contenant 1 ml de Réactif Bradford.
- Déposer 20 µl de la solution BSA, l'enzyme est remplacée dans le blanc par l'eau distillée.
- Agiter et mettre à l'abri de la lumière pendant 5 minutes.
- Lire l'absorbance à une longueur d'onde de 595 nm.

[BSA] µg/ml	0	50	100	200	500	1000
V_(BSA) µl	0	20	20	20	20	20
Réactif Bleu de coomassie ml	1	1	1	1	1	1

La figure suivante montre la courbe d'étalonnage obtenue en calculant la teneur en protéines à partir de la tangente extraite de la courbe ci-dessous.

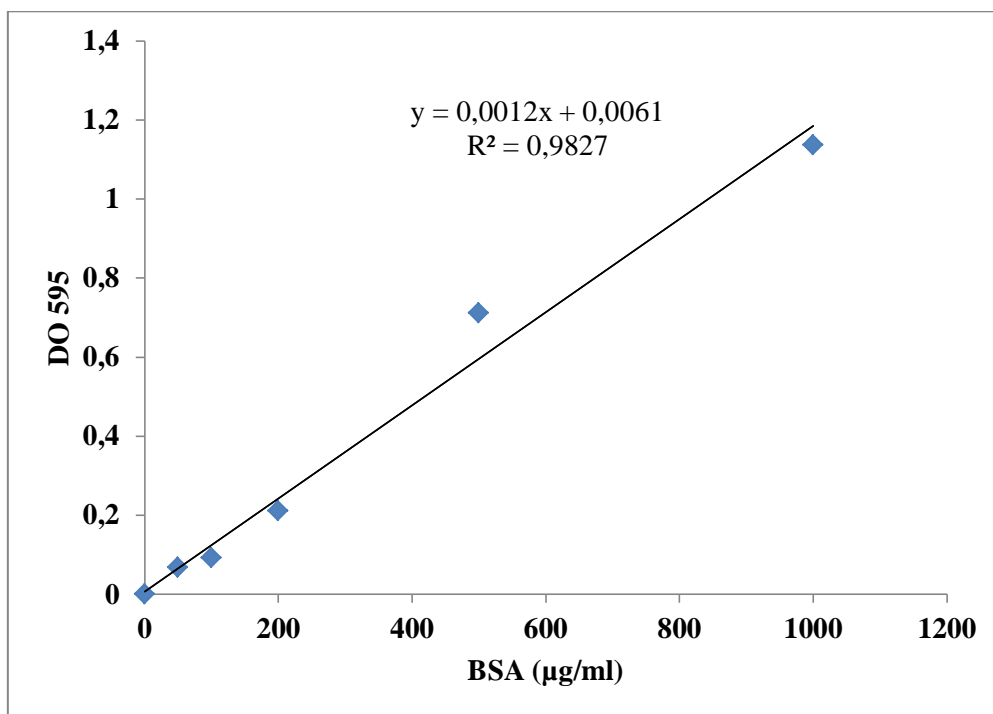


Figure 53: Courbe d'étalonnage des protéines (BSA).

Mesure de l'activité enzymatique

- Préparation d'une solution mère des produits PNP d'ONP [1 mmol/ml] à partir du 2-nitrophénol et 4-nitrophénol respectivement.
- Préparer les tubes à essai contenant letampon phosphate de sodium à pH 7,0avec les volumes indiqués dans le tableau ci-dessous.
- Agiter et lire l'absorbance à une longueur d'onde de 348 et 380 nm pour les deux étalons respectivement.
- Extraire le coefficient d'extinction de la tangente des courbes d'étalonnage obtenues.

[PNP/ONP] μmol/ml	0	50	100	150	200	250	300
V_(PNP/ONP) ml	0	0,15	0,3	0,45	0,6	0,75	0,9
Tampon phosphate de sodium ml	0	1,85	1,7	1,55	1,4	1,25	1,1

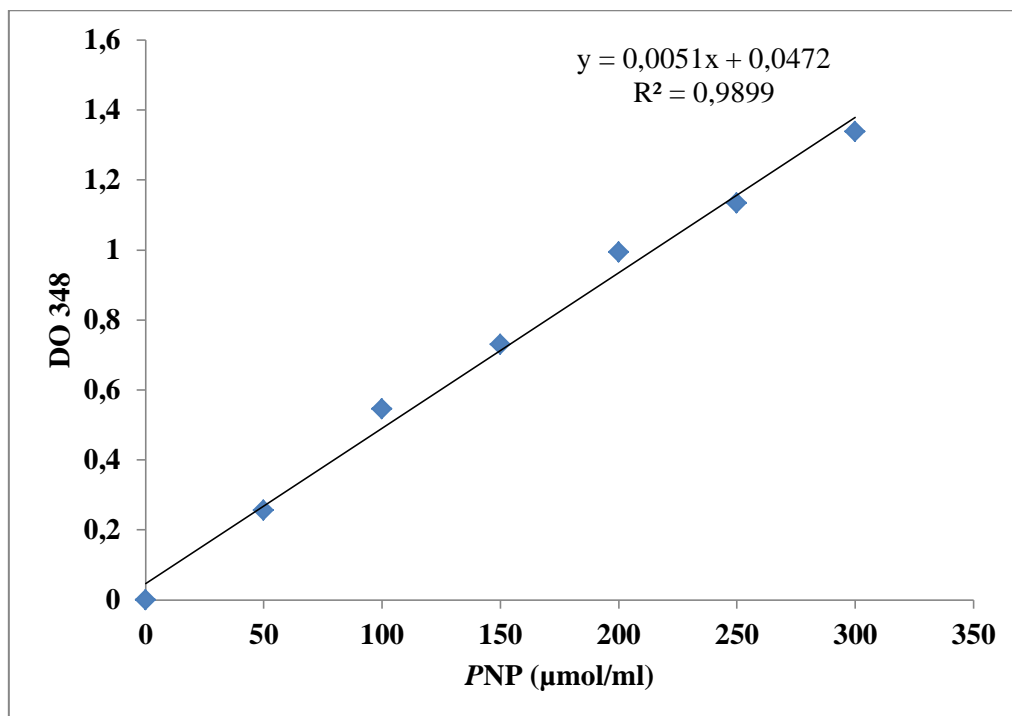


Figure 54: Courbe d'étalonnage du Para-nitrophénol (PNP).

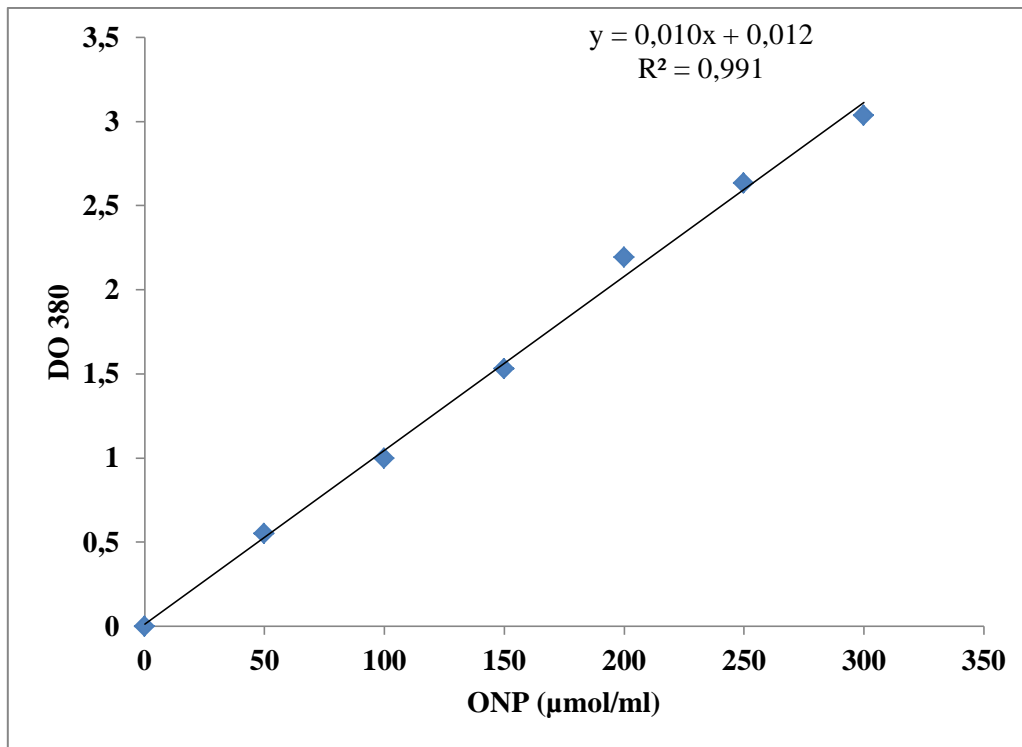


Figure 55 : Courbe d'étalonnage d'ortho-nitrophénol (ONP).

Expression des résultats :

L'activités enzymatique (U) est calculée en suivant la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot L \cdot C$$

$$C = \text{Abs} / L \cdot \epsilon = \text{Abs} \cdot v_f \cdot \text{fdil} / \epsilon \cdot L \cdot t \cdot v_e = \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{cm} = \mathbf{U/ml}$$

dont:

-C : l'activité enzymatique exprimée en U/ml

- Abs : absorbance

- v_f : volume final de l'essai en ml

-*fdil* :facteur de dilution

- ϵ : le coefficient d'extinction molaire en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

- L : la largeur de le cuve en cm

- t : temps d'essai en min

- v_e : volume de l'enzyme

ANNEXE 2

Analyse électrophorétique

Préparation des solutions mères :

Tampon de séparation S Tris 1.5 M pH 8.8

Tris-base	18.17 g
SDS (0.4%)	0.4 g
Mercaptoethanol MCE.....	0.8 ml
H ₂ O	100 ml
Ajustement de pH	

Tampon de concentration C Tris 0.5 M pH 6.8

Tris-base.....	6.06 g
SDS (0.4%)	0.4 g
H ₂ O	100 ml
Ajustement de pH	

Tampon de rupture

Tris (0.125 M).....	2.5 ml
SDS	1 g
Mercaptoethanol MCE.....	10%
Glycérol	5 ml
Bleu de bromophénol.....	0.003 g
Ajustement de pH à 6.8	

Solution électrolytique

Tris base	30.29 g
Glycine	144.4 g
SDS	10 g
H ₂ O	1000 ml
Ajustement de pH à 8.6	

Solutions de coloration

Blue de Coomassie.....	1.25 g
Acide acétique.....	46 ml
Méthanol.....	227 ml
H ₂ O.....	227 ml

-Agitation puis filtration sur papier

Solutions de décoloration

Acide acétique.....	75 ml
Méthanol.....	430 ml
H ₂ O.....	500 ml

Préparation des gels :

Gel de migration (Resolving) 12%

Tampon S.....	1.25 ml
Acrylamide/Bis Acrylamide.....	2.00 ml
H ₂ O.....	1.72 ml
PSA (10%).....	25 µl
TEMED.....	7 µl

Gel de concentration (Stacking) 5%

Tampon C.....	750 µl
Acrylamide/Bis Acrylamide.....	300 µl
H ₂ O.....	1.5 ml
Bis (2%).....	200 µl
PSA (10%).....	15 µl
TEMED.....	5 µl

Persulfate d'ammonium 10%

- Préparer un volume d'approximativement 0.5 ml d'eau Milli Q dans un tube eppendorf
- Ajouter 0.05 g de persulfate d'ammonium
- Conserver au congélateur pour une durée de 3-4 jours au maximum

Préparation des échantillons :

- Déposer 100 mg du dérivé enzymatique dans un tube eppendorf
- Ajouter 0.5 ml du tampon de rupture
- Chauffer dans un bain marie jusqu'à l'ébullition pendant 8 minutes

Mode opératoire :

- Monter les plaques en verre dans le support vertical en pastique
- Couler le gel de migration et recouvrir d'eau et d'alcool pour veiller les fuites
- Laisser polymériser
- Couler le gel de concentration
- Placer rapidement les peignes
- Laisser polymériser, démonter et retirer les peignes
- Placer 1 ou 2 plaques dans l'appareil à électrophorèse et remplir avec le tampon de migration
- Déposer 10-20 μ l de chaque échantillon déjà bouillie dans les puits
- Brancher le générateur et le régler 140-200 V et lancer l'analyse (durée de migration est d'environ 2 heures)
- Colorer puis décolorer les gels

ANNEXE 3

Solutions tampons:

Acétate de sodium 0.2 M:

Solutions mères **A**: 0.2 M solution d'acide acétique (11.55 g dans 1 L)

B: 0.2 M solution d'acétate de sodium (16.4 g $C_2H_3O_2Na$ ou bien 27.2 g de $C_2H_3O_2Na.3H_2O$ dans 1 L).

x ml de A+y ml de B dilué jusqu'à un total de 100 ml

x	y	pH
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

Phosphate de sodium 0.2 M:

Solutions mères **A**: 0.2 M solution de phosphate de sodium monobasique (27.8 g dans 1 L)

B: 0.2 M solution de phosphate de sodium dibasique (53.65 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$ ou bien 71.7 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$ dans 1 L).

x ml de A+y ml de B dilué jusqu'à un total de 200 ml

x	y	pH	x	y	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3

81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

Carbonate-Bicarbonate de sodium 0.2 M:

Solutions mères **A**: 0.2 M solution de carbonate de sodium anhydre(21.2 g dans 1 L)

B: 0.2 M solution de bicarbonate de sodium (16.8 g dans 1 L)

x ml de A+y ml de B dilué jusqu'à un total de 100 ml

x	y	pH
4.0	46.0	9.2
7.5	42.5	9.3
9.5	40.5	9.4
13.0	37.0	9.5
16.0	34.0	9.6
19.5	30.5	9.7
22.0	28.0	9.8
25.0	25.0	9.9
27.5	22.5	10.0
30.0	20.0	10.1
33.0	17.0	10.2
35.5	14.5	10.3
38.5	11.5	10.4
40.5	9.5	10.5
42.5	7.5	10.6
45.0	5.0	10.7

Tris-HCl 1M, pH 7:

-Dissoudre 121,14 g de Tris dans 800 ml de d'H₂O.

-Ajuster le pH à 7,0 avec le volume approprié d'acide chlorhydrique (37%).

-Apporter le volume final à 1000 ml avec de l'eau distillée.

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications :

Zaak H, SiarE.H, Kornecki J. F, Fernandez-Lopez L, Pedrero S. G, Virgen-Ortíz J.J, Fernandez-Lafuente R. 2017.Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads.Process Biochem.56: 117-123.

Zaak H, Fernandez-Lopez L, Otero C, Sassi M, Fernandez-Lafuente R. 2017.Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethyleneimine andglutaraldehyde.Enzyme and Microbial Technology. 106: 67-74.

Zaak H, Kornecki J.F, SiarE.H, Fernandez-Lopez L, Cortes-Corberan V, Sassi M, Fernandez-Lafuente R. 2017. Coimmobilization of enzymes in bilayers using PEI as a glue to reuse the most stable enzyme: preventing PEI release during inactivated enzyme desorption. Process Biochem.61 :95-101.

الملخص بالعربية

تركز الدراسة على تحسين الاستقرار الأنزيمي الذي يعتبر عاملاً رئيسياً في تطبيق الإنزيمات وإعادة استخدامها في العمليات الصناعية عن طريق تقنية التثبيت. لهذا الغرض، تم تطوير استراتيجيات في هذا العمل من خلال تطبيق تقنيات ما قبل وما بعد التثبيت على بعض الإنزيمات التحليلية.

تم تثبيت حركة الإنزيم الدهني (الليباز) و الفوسفوليپاز على الداعم اوكتيل اغاروز بواسطة تفاعل نافر للماء بقوة ايونية ضعيفة ومن ثم استخدام روابط تساهمية لتعزيز ربط الجزيئات الإنزيمية مع الداعم والحد من تحررها اثناء التعطيلات الحرارية. وقد تم اخذ معدل التحميل الأنزيمي و نوع الروابط المستخدمة في الاعتبار اثناء عملية التثبيت و كذا مدى تأثيرها على نشاط و استقرار الإنزيمات.

كما اجريت دراسة إعادة الداعم على مدى ثلاث دورات تفاعلية بما في ذلك التعطيل الحراري المتنوع بتحرر انزيم الغلاكتوزيداز المثبط بازواجية على الإنزيم الدهني (الليباز) المعدل و المعطى بالبوليمار الايوني.

وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن :

-نشاط الإنزيمي زاد بشكل ملحوظ بعد تثبيته عن طريق دعامة بسيطة نافرة للماء و ذلك نظراً لقدرته على التفاعل البين سطحي.

-تأثير التحميل الأنزيمي كان ايجابيا في بعض الحالات، وسلبيا في البعض الاخر، مما يجعله متغير حر عند استخدام الدعامة المسامية.

-أسفرت التعديلات الكيميائية المختبرة عن تحقيق استقرار كبير، لاسيما باستخدام التحميل الأنزيمي العالي. وأكدا استخدام الروابط التساهمية أن الفرق الرئيسي بين الشحنة العالية والمنخفضة هو عدد الجزيئات المشاركة في التشابك بين الجزيئات. – من الواضح ان التعديل الكيميائي المزدوج اثر ايجابي على الاستقرار الأنزيمي م عتأثير نادر على النشاط التحليلي و بالتالي يمكن أن يكون خيارا مناسباً لاستخدامه في استراتيجيات التثبيت الأنزيمي المزدوج الوارد وصفه في القسم الثالث من الدراسة باعتبارها واحدة من اهداف هذا العمل.

-تثبيت الداعم الاوكتيلي البحت باطراف الدهيدية قد سمح بتثبيت جزيئات البوليمار تساهميا و منع تحررها (90% تقريبا) عن الإنزيمات الدهنية حتى في قوة ايونية عالية (كلورير الصديوم بتركيز 6مولارات) مع السماح باستخدام الإنزيمات المثبطة لمدة ثلاث دورات متتالية من التعطيل و التحرير للغلاكتوزيداز و مع الحفاظ على 90 بالمئة من النشاط الأنزيمي على التوالي حتى بعد الدورة الثالثة من التفاعل.

الكلمات المفتاحية: إنزيمات تحليلية، اوكتيل اغاروز، تثبيت، استقرار، تحرر، إعادة استخدام، روابط تساهمية