



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريش

Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

Intitulé :

**Immobilisation enzymatique : une étude
bibliographique basée sur les techniques et les supports**

Présenté par :

ARIBI Hadjer & ROUABEH Hanan & ZAIDI Ikram

: Soutenu le 24 /06/2023, Devant le Jury

	Nom & Prénom	Grade	Affiliation / institution
Président :	Mme. MEZITI Asma	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrant :	Mme. BOUTANA Wissem	MAA	Université de Bordj Bou Arreridj
Examineur :	Mme. HIHAT Soraya	MAA	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2022/2023

Remerciement

Avant toute chose, nous remercions ﷻ Le tout-puissant, l'omniscient et le miséricordieux, de nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude envers toutes les personnes qui nous ont aidés dans la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord, nous remercions notre encadrante, **BOUTANA Wissem**, pour sa précieuse orientation et ses conseils avisés tout au long de ce projet. Ses commentaires et son expertise ont grandement contribué à l'amélioration de ce travail.

Nous tenons également à remercier **les membres de notre jury**, pour leur temps, leurs commentaires constructifs et leur soutien durant l'évaluation de ce mémoire.

Nous voudrions également remercier notre famille et nos amis pour leur encouragement et leur soutien tout au long de nos études supérieures. Leurs encouragements ont été une source d'inspiration constante. Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Votre aide a été très appréciée. Sincèrement.

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance... que j'ai pour mon entourage

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A mes chers frères Oussama, Mohamed, Younes, et **mes chères sœurs** Asma, Chaïma, et Lina. Lumière de ma vie et **la famille Zaidi**.

Mes sœurs et mes collègues de travail : **hadjer et hanan**.

A mes amis

Asma Messadi, Assia Amara, Houda Mabrek, Khaoula Samai, Fadila Akli, Sara Far, Chaïma Ben Ali, Mahdi, Badr el Dinne Azib. Vos encouragements et votre soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance.

Ce mémoire est donc dédié à toutes les personnes qui ont joué un rôle dans mon parcours académique et qui ont contribué à ma réussite.

Ikram.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mon père, pour son soutien. Son affection et la confiance qu'il m'a accordé (chabroutti)

A ma mère, pour son amour. Ses encouragements et ses sacrifices

A mes grands-parents et à ma **tante**, que Dieu ait leur âme.

A mes **frères Akram** et **Adel** qui m'ont apporté leur soutien.

A mes collègues avec lesquelles j'ai partagé le travail et les efforts. **Hadjer et Ikram.**

A notre encadrante qui nous a prodigué des conseils et des orientations précieux tout au long de cette période. **BOUTANA WISSEM.**

HANAN.

Dédicace

A ma chère famille

Je vous dédie tout mon amour et ma gratitude pour votre soutien et votre présence dans ma vie. Vous êtes ma source d'inspiration et de motivation, et je suis reconnaissant(e) pour chaque moment passé ensemble. Merci d'être là pour moi et de m'aimer inconditionnellement.

À ma chère encadrante,

Je tiens à vous remercier pour votre précieuse guidance tout au long de ce projet. Votre expertise, vos conseils avisés et votre disponibilité ont été inestimables pour moi. Merci infiniment pour votre soutien et votre encouragement.

À mes chers binômes,

Merci pour cette collaboration fructueuse et agréable. Votre contribution a été inestimable.

HADJER.

Table des Matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumés	
Introduction générale	1

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES ENZYMES

1.1. Historique des enzymes	3
1.2. Définition	3
1.3. Structures	4
1.4. Nomenclature	5
1.5. Classification des enzymes	6
1.6. Application des enzymes	7
1.7. Problèmes relevés concernant l'utilisation des enzymes	8

CHAPITRE II : LES ENZYMES IMMOBILISEES

2.1. Historique des enzymes immobilisées	10
2.2. Définition	11
2.3. Objectif et principe de l'immobilisation	12
2.4. Méthodes d'immobilisations	13
2.4.1. Méthodes chimiques	14
2.4.1.1 Immobilisation par liaison covalente avec le support	14
2.4.1.2 Immobilisation par réticulation	15
2.4.1.3 Immobilisation par liaison ionique	18
2.4.2 Méthodes physiques	20
2.4.2.1 Immobilisation par adsorption physique	20
2.4.2.2 Immobilisation par inclusion	23
2.5. Comparaison entre les différentes méthodes d'immobilisation	26
2.6. Le choix de type d'immobilisation	27

2.7.	Propriétés des enzymes immobilisées	27
2.7.1	Propriétés des enzymes immobilisées physiquement	27
2.7.2	Propriétés des enzymes immobilisées chimiquement	28
2.8.	Effet de l'immobilisation de l'enzyme sur leur activité	28
2.9.	Facteurs influençant sur l'immobilisation enzymatique	29
2.10.	Les type de supports utilisés pour l'immobilisation enzymatique	30
2.10.1	Les supports organiques	30
2.10.2	Les supports inorganiques	31

CHAPITRE III : EXEMPLE D'ENZYME IMMOBILISEE (Trypsine)

3.1.	Généralité sur la trypsine	32
3.2.	L'importance de trypsine	33
3.3.	L'activité catalytique de l'enzyme libre	33
3.4.	Effet du pH sur l'activité enzymatique de trypsine	34
3.5.	Les Techniques d'immobilisation de la trypsine	35
3.5.1	Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre avec le glutaraldéhyde.....	35
3.5.2	Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre via DITC	36
3.5.3	Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre via le carbodiimide soluble dans l'eau	37
3.6.	Étude de la variation du pH sur l'activité de l'enzyme immobilisée	38
3.7.	Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique de trypsine	39
	Conclusion générale	40
	Références bibliographiques	

Liste des abréviations

ACS: American Chemical Society.

ARN: Acide ribonucléique.

ATP: Adénosine triphosphate.

BSA: Bovine Sérum Albumine.

DITC: N, N-ditio-carboamoyl-2-iodo-Salicyle.

EC : Classe de l'enzyme.

EDC : Éthylène Diamine Citrate.

IUBMB : L'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire.

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Coenzyme).

PBS: Phosphate Buffered Salin (tampon).

PEI : PolyÉthylène Imine.

UniProt : Universal Protein Resource (Base de données de séquences de protéines).

Liste Des Figures

Figure 1 :	Présentation des différentes structures de l'enzyme	4
Figure 2 :	Les techniques de l'immobilisation des enzymes	11
Figure 3 :	Technique d'immobilisation par liaison covalente	14
Figure 4 :	Technique d'immobilisation des enzymes par réticulation	15
Figure 5 :	Technique d'immobilisation des enzymes par liaison ionique	18
Figure 6 :	Technique d'immobilisation des enzymes par adsorption	20
Figure 7 :	Technique d'immobilisation des enzymes par inclusion (encapsulation)	23
Figure 8 :	La structure du trypsinogène	31

Liste Des Tableaux

Tableau I :	Différentes classes d'enzyme et leurs réactions	7
Tableau II :	Les méthodes d'immobilisation des enzymes (inconvenients et avantages) ...	26

Résumé

L'immobilisation des enzymes est une approche largement utilisée pour améliorer la stabilité et l'efficacité des enzymes dans diverses applications biotechnologiques et industrielles. Plusieurs techniques d'immobilisation sont étudiées, notamment l'adsorption physique, la covalence et l'encapsulation. Différents supports sont utilisés pour l'immobilisation des enzymes, tels que les supports inorganiques (oxydes métalliques, verres, céramiques), les supports organiques (résines, polymères) et les supports hybrides (combinant matériaux inorganiques et organiques). Ces supports peuvent être adaptés en fonction des exigences de l'enzyme et de l'application. Chaque technique et chaque support présentent des avantages et des inconvénients spécifiques, qui doivent être pris en compte lors de la sélection d'une méthode d'immobilisation. Ce travail met également en évidence quelques exemples d'applications de l'immobilisation des enzymes, notamment dans les domaines de la biocatalyse et de la biotransformation. La dernière partie du mémoire est consacré pour la présentation d'un exemple d'utilisation de la trypsine avec trois méthodes d'immobilisation possibles.

Mots-clés : enzymes, immobilisation, supports, encapsulation, trypsine.

Abstract

Enzyme immobilization is an approach widely used to enhance the stability and efficiency of enzymes in various biotechnological and industrial applications. Several immobilization techniques are being studied, including physical adsorption, covalence, and encapsulation. Different supports are employed for enzyme immobilization, such as inorganic supports (metal oxides, glasses, ceramics), organic supports (resins, polymers), and hybrid supports (combining inorganic and organic materials). These supports can be tailored according to the enzyme and application requirements. Each technique and support have specific advantages and disadvantages that need to be considered when selecting an immobilization method. This work also highlights some examples of enzyme immobilization applications, particularly in the fields of biocatalysis and biotransformation. The last part of the study focuses on presenting an example of trypsin utilization with three possible immobilization methods.

Keywords : enzyme, immobilization, supports, encapsulation, trypsin.

ملخص

يعتبر تثبيت الإنزيمات نهجاً يستخدم على نطاق واسع لتحسين استقرار وكفاءة الإنزيمات في مجموعة متنوعة من التطبيقات البيوتكنولوجية والصناعية. يتم دراسة عدة تقنيات لتثبيت الإنزيمات، بما في ذلك الامتصاص الفيزيائي، والروابط الكوفالنتية، والتجليد. يتم استخدام أنواع مختلفة من الدعائم لتثبيت الإنزيمات، مثل الدعائم غير العضوية (أكاسيد المعادن، الزجاج، السيراميك)، والدعائم العضوية (الراتنجات، البوليمرات)، والدعائم المختلطة (تجمع مواد غير عضوية وعضوية). يمكن تعديل هذه الدعائم وفقاً لمتطلبات الإنزيم والتطبيق. تحتوي كل تقنية ودعم على مزايا وعيوب محددة يجب مراعاتها عند اختيار طريقة التثبيت. يسلط هذا العمل الضوء أيضاً على بعض أمثلة تطبيقات تثبيت الإنزيمات، ولا سيما في مجالات التحفيز الحيوي والتحويل الحيوي. تتركز الجزء الأخير من الدراسة على تقديم مثال لاستخدام الإنزيم "تريسين" باستخدام ثلاث طرق ممكنة للتثبيت.

الكلمات المفتاحية: إنزيمات، تثبيت، دعائم، تغليف، تريسين.

Introduction générale

L'unité fonctionnelle en biologie est la cellule. Chaque cellule animale, végétale ou bactérienne est un être organisé et très finement structuré. Dans cette organisation, les enzymes jouent un rôle essentiel, en catalysant pratiquement toutes les réactions biochimiques de la cellule (**Silman et Katchlski, 1966**).

Les enzymes sont des systèmes complexes dans la fonction et intrinsèquement liée à leur structure et forme (**Silman et Katchlski, 1966**). Leur rôle spécifique étant réalisable uniquement à cause d'une architecture adéquate à cet effet comme les enzymes. Au cours de ces dernières années, la demande en produits d'intérêt thérapeutiques, agroalimentaires ou cosmétiques s'est fortement accrue, de même que les exigences en matière de procédés de synthèse respectueux de l'environnement. Dans ce contexte, l'utilisation des enzymes s'est fortement développée (**Naidja et al., 1997**).

Au niveau industriel, les avantages de l'utilisation des enzymes sont principalement leurs dépenses énergétiques faibles, des étapes de purification simplifiées, des conditions expérimentales douces, évitant la dégradation des substrats et des produits. Leur récupération et réutilisation pour un processus économiquement réalisable. Cependant, 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 (**Francesco, 2013**).

L'amélioration de la stabilité enzymatique, considérée comme un facteur majeur dans l'application des enzymes et leur réutilisation dans tous les processus industriels et thérapeutiques, a conduit au développement de stratégies en appliquant des techniques qui permettent de stabiliser les enzymes contre leur dénaturation naturelle.

L'immobilisation est une technologie ancienne qui a trouvé une application ces dernières années, elle est devenue une nécessité pour la plupart des enzymes à utiliser comme biocatalyseurs dans les processus industriels, car elle est utile pour séparer les enzymes du milieu réactionnel à la fin du processus et les réutiliser à nouveau (**Mateo et al., 2002**).

Dans ce contexte, l'objectif de ce présent travail a été focalisé sur l'étude bibliographique des différentes techniques et supports utilisés dans le domaine de l'immobilisation des enzymes.

Le mémoire est subdivisé en trois chapitres ; le premier chapitre présente des généralités sur la structure, le principe et la classification des enzymes ; le deuxième chapitre est réservé aux enzymes immobilisées et les différentes techniques et supports utilisés ; le dernier chapitre représente une étude sur un exemple d'enzyme immobilisé ; la trypsine.

CHAPITRE I : GENERALITES

SUR LES ENZYMES

1.1 Historique sur les enzymes

Les enzymes ont été découvertes pour la première fois par Louis Pasteur, un chimiste français, dans les années 1850. Pasteur a montré que certaines réactions chimiques ne pouvaient avoir lieu qu'en présence de cellules vivantes, ce qui a conduit à l'idée que les cellules contiennent une substance nécessaire pour que les réactions aient lieu (**Pasteur, 1862**). En 1878, un chimiste allemand, Eduard Buchner, a isolé la substance responsable de la fermentation alcoolique dans les cellules de levure. Il a découvert que cette substance était en fait un composé chimique plutôt qu'un organisme vivant, ce qui a conduit à la découverte d'enzymes. Buchner a nommé ce composé « zymase », qui signifie « levure » en grec (**Buchner, 1897**).

Le terme « enzyme » a été proposé pour la première fois en 1878 par le physiologiste allemand Wilhelm Kühn, qui a reconnu que les enzymes sont responsables de la dégradation des aliments dans le tube digestif (**Kühne, 1877**).

Pendant des décennies, les scientifiques ont continué à étudier les enzymes et leur rôle dans les processus biologiques. En 1926, James Sumner fut le premier à isoler et à purifier une enzyme « l'uréase » d'un organisme vivant. Dans les années 1930, Northrop et Stanley ont découvert que les enzymes sont constituées de molécules de protéines (**Sumner, 1926 ; Northrop et Stanley, 1931**). Depuis ces premières découvertes, les enzymes ont été largement utilisées dans l'industrie, la médecine et la recherche. Elles sont utilisées dans la production d'aliments, de textiles, de papier et de produits pharmaceutiques, et sont essentielles pour le diagnostic et le traitement médical (**Fessner et Arroyo, 2010**).

1.2 Définition

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique, qui agissent sur des substrats de manière spécifique. Ils sont capables de décomposer et de transformer divers composés présents dans le milieu vivant. Les catalyseurs augmentent la vitesse d'une réaction lente ou imperceptible, en abaissant l'énergie d'activation sans qu'elle rentre dans la réaction (enzyme régénérée) (**Fersht, 1985 ; Piccolino, 2000 ; Aldridge, 2013**). Elles peuvent provenir de différentes origines mais les enzymes d'origine microbiennes sont les plus produites. Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale (**Bennour, 2022**).

1.3 Structure

Les enzymes sont constituées d'une chaîne polypeptidique repliée dans une structure tridimensionnelle spécifique, qui leur confère l'activité catalytique. La structure des enzymes est donc essentielle pour comprendre leur fonctionnement (**Berg et al., 2002**).

Il existe plusieurs niveaux de structure dans les enzymes, qui sont les suivants :

1. Structure primaire : C'est la séquence d'acides aminés qui composent la chaîne polypeptidique de l'enzyme. Cette structure est déterminée par la séquence d'ARN messager qui code pour l'enzyme (**Berg et al., 2002 ; Voet et Voet, 2011**).

$$\text{H3N}^+\text{-CHR1-CO-NH-CHR2-CO-NH-CHR3-CO-}\dots\dots\dots\text{-NH-CHR}_n\text{COO}^-$$
2. Structure secondaire : La chaîne polypeptidique s'enroule autour d'elle-même pour former des motifs réguliers comme des hélices alpha et des feuillets bêta (**Branden et Tooze, 1999 ; Alberts, 2002**).
3. Structure tertiaire : C'est la structure tridimensionnelle complète d'une enzyme, résultant de l'interaction entre différents résidus d'acides aminés de la chaîne polypeptidique (**Berg et al., 2002 ; Voet et Voet, 2011**).
4. Structure quaternaire : Certaines enzymes sont constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques qui se rejoignent pour former une structure fonctionnelle. Cette structure s'appelle la structure quadrilatère (**Lehninger et al., 2005**).

La spécificité de l'enzyme est souvent attribuée à sa structure tridimensionnelle permettant la formation du site actif responsable de la catalyse enzymatique (**Fernandes et al., 2002**).

Les enzymes sont étudiées par plusieurs techniques, dont la cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire et la microscopie électronique. Ces techniques ont permis de déterminer la structure de nombreuses enzymes et de comprendre leur action au niveau moléculaire (**Lehninger et al., 2005**) (figure1) :

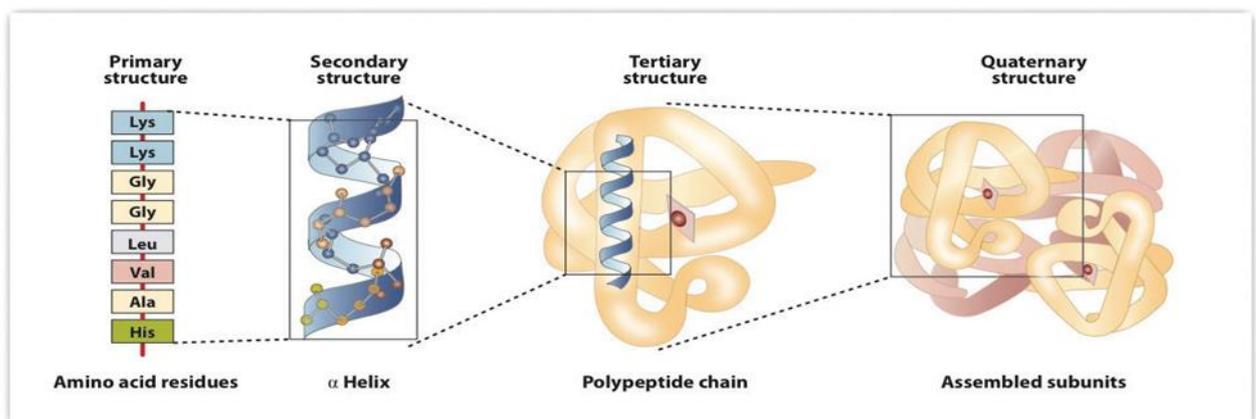


Figure 1 : Présentation des différentes structures de l'enzyme (**Kidd et al., 2001**).

1.4 Nomenclature

La nomenclature des enzymes est un système de classification basé sur les réactions qu'elles catalysent. Développé par le Comité de nomenclature des enzymes de L'Union Internationale De Biochimie et De Biologie Moléculaire (IUBMB). La nomenclature de l'enzyme se compose d'un numéro à quatre chiffres précédés par l'abréviation EC, qui correspondent à la classe de l'enzyme, à sa sous-classe, à son groupe fonctionnel et à son numéro de séquence dans la nomenclature (**Cornish-Bowden, 2014**).

Par exemple, la lactase, qui catalyse la dégradation du lactose en glucose et galactose, est une hydrolase de liaison β -galactosidique avec le numéro EC 3.2.1.108 (**Cornish-Bowden, 2014**).

Les enzymes sont souvent nommées en fonction de leurs substrats ou de leur fonction, comme la pepsine, une enzyme digestive produite dans l'estomac, ou la catalase, une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (**Webb, 1992**).

Le suffixe "ase" est utilisé pour décrire l'enzyme, il est parfois associé au substrat (uréase, phosphatase, etc.), mais généralement lié au type de réaction catalysée (hydrolase, oxydase, isomérase, etc.) (**Georges 1986 ; Fernandes et al., 2002**). Par exemple, l'enzyme qui catalyse la conversion du glucose en fructose est appelée glucose isomérase (**Webb, 1992**).

La nomenclature des enzymes est régulièrement mise à jour et révisée pour refléter les dernières découvertes dans le domaine de la biochimie. En outre, la base de données UniProt fournit une importante source d'informations sur les enzymes, y compris leurs noms, numéros EC, séquences et structures. La connaissance de la nomenclature des enzymes est essentielle pour comprendre la biochimie et trouver de nouveaux médicaments et thérapies à base d'enzymes (**Rawlings et al., 2010**).

1.5 Classification des enzymes

La classification des enzymes dépend principalement du type de réaction catalysée et de la nature de la molécule réactive. Il existe sept grandes classes d'enzymes, chacune correspondant à un type de réaction catalytique (**Berg et al., 2002**) :

- ❖ Oxydoréductases : elles catalysent les réactions d'oxydoréductions, y compris le transfert d'électrons entre deux molécules. Par exemple, la lactate déshydrogénase est une oxydoréductase qui catalyse la conversion du lactate en pyruvate en transférant des électrons du lactate à une coenzyme appelée NAD⁺.
- ❖ Transférases : elles catalysent le transfert d'un groupement chimique d'une molécule à une autre. Par exemple, une kinase est une transférase qui catalyse le transfert d'un

groupe phosphate d'une molécule donneuse d'énergie, telle que l'ATP, vers une protéine cible (**Berg et al., 2002**).

- ❖ Hydrolases : c'est de loin le groupe le plus important, car il ne nécessite pas de coenzyme. Cette classe permet l'hydrolyse d'esters, d'anhydrides, de glycosides, d'amides et permet aussi la transestérification des alcools. Cette classe d'enzyme est la plus utilisée (**Danieli et al., 1994**).
- ❖ Lyases : elles catalysent les réactions de clivage de liaisons covalentes sans l'addition d'eau ou d'autres groupes fonctionnels. Par exemple, la pyruvate décarboxylase est une lyase qui catalyse la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde et dioxyde de carbone (**Berg et al., 2002**).
- ❖ Isoméras : elles catalysent les réactions d'isomérisation, c'est-à-dire le changement de configuration moléculaire d'un isomère à un autre. Par exemple, la triosephosphate isomérase est une isomérase qui catalyse la conversion de la dihydroxyacétone phosphate en glycéraldéhyde 3-phosphate.
- ❖ Ligases : elles catalysent la formation de liaisons covalentes entre deux molécules en utilisant de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Par exemple, la synthétase d'acides gras est une ligase qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre des acides gras et des molécules de coenzyme A (**Berg et al., 2002**).
- ❖ Translocase : Ces enzymes sont responsables du transport actif de substances à travers les membranes cellulaires.

Ces classes peuvent être subdivisées en sous-classes et sous-sous-classes en fonction de la nature des groupes chimiques impliqués dans la réaction catalysée.

Les enzymes peuvent être classées en fonction de leur localisation dans la cellule ou dans l'organisme, en plus de leur classification basée sur la réaction catalysée. Par exemple, les enzymes cytoplasmiques se trouvent dans le cytoplasme des cellules, tandis que les enzymes mitochondriales sont présentes dans les mitochondries (**Alberts et al., 2002**).

Enfin les enzymes peuvent aussi être classées selon leur structure tridimensionnelle. Par exemple, elles peuvent être classées comme enzymes à feuillet β , à hélice α ou comme enzymes contenant des motifs structuraux particuliers (**Fersht, 1999**).

Dans le tableau suivant, nous avons résumé les classifications des enzymes et les réactions spécifiques associées à chaque classification

Tableau I : Différentes classes d'enzyme et leurs réactions (**Lehninger et al., 2017**).

Classe	Réactions catalysée
EC 1 Oxydo-réductases	Oxydo-réduction
EC 2 Transférases	Transfert de groupes fonctionnels
EC 3 Hydrolases	Coupure une molécule avec fixation d'eau
EC 4 Lyases	Coupure autre que l'hydrolyse
EC 5 Isomérasés	Remaniement interne d'une molécule
EC 6 Ligases	Formation de liaisons covalentes entre deux molécules
EC 7 Translocase	catalysent le mouvement des ions ou des molécules à travers les membranes (Transport membranaire)

1.6 Application des enzymes

Les enzymes sont largement utilisées dans de nombreuses applications industrielles, telles que la production de biocarburants, de médicaments, de produits alimentaires et chimiques. De manière concrète, voici quelques exemples d'applications spécifiques des enzymes :

- a) Production de biocarburants : Les enzymes ont pour fonction de convertir les matières premières renouvelables, telles que les huiles végétales et les sucres, en biocarburants tels que l'éthanol et le biodiesel, ce qui en fait un outil indispensable dans la production de ces derniers (**Zhang et Lynd, 2005**).
- b) Fabrication de médicaments : Tels que les antibiotiques et les hormones, les enzymes jouent également un rôle important. En effet, la production de la pénicilline, un antibiotique, implique la fermentation d'une souche de *Penicillium chrysogenum* à partir de laquelle les enzymes sont utilisées pour sa synthèse (**Chopra et Harwood, 2003**).
- c) Production de produits alimentaires : L'industrie alimentaire utilise également les enzymes pour améliorer la texture, la saveur et la durée de conservation des aliments. À titre d'exemple, la chymosine, une enzyme très courante, est utilisée pour la fabrication du fromage (**Fox et McSweeney, 2013**).
- d) Production de produits chimiques : Les enzymes trouvent également une utilisation dans la production de divers produits chimiques, tels que les colorants, les polymères et les produits pharmaceutiques. À titre d'exemple, la lipase est une enzyme qui joue un rôle

important dans la production de biodégradables et de plastiques (**Torres-Salas et al., 2015**).

En somme, les enzymes sont largement utilisées dans diverses applications industrielles et revêtent une importance cruciale dans la production de produits énergétiques, alimentaires, pharmaceutiques et chimiques.

1.7. Problèmes relevés concernant l'utilisation des enzymes

Lors de l'utilisation des enzymes dans différents domaines, les chercheurs peuvent rencontrer plusieurs problèmes, notamment :

- Les coûts : La production et la purification des enzymes peuvent être coûteuses, ce qui peut restreindre leur utilisation dans diverses applications. Des avancées ont été réalisées dans les techniques de production et de purification des enzymes, mais selon une étude publiée par Hong et Lee en 2020 les coûts de production demeurent élevés (**Hong et Lee., 2020**).
- La stabilité : La stabilité et l'efficacité des enzymes peuvent être impactées par diverses conditions environnementales telles que le pH, la température, etc. Cependant, une étude récente publiée en 2021 dans ACS Catalysis a mis en lumière que l'ingénierie des enzymes peut améliorer leur stabilité et leur efficacité dans les réactions catalytiques. (**Gao et al., 2021**).
- La sélection : En raison de la grande diversité et de la complexité des enzymes disponibles, il peut être difficile de sélectionner celle qui convient le mieux à une application donnée. Toutefois, une étude parue en 2019 dans Trends in Biotechnology indique que les progrès dans les techniques de criblage peuvent faciliter l'identification rapide des enzymes appropriées pour une application donnée (**Chakraborty et Makhija, 2019**).
- La récupération : La récupération des enzymes après leur utilisation peut s'avérer coûteuse et difficile, ce qui a un impact sur leur durabilité en termes d'utilisation. Néanmoins, une étude publiée en 2018 dans Biotechnology Advances a révélé que l'utilisation de techniques de séparation, comme la chromatographie, peut permettre le développement de méthodes de récupération plus efficaces (**Bhatia et al., 2018**).
- La réglementation : Les enzymes employées dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques et industriels sont soumises à des réglementations rigoureuses quant à leur sécurité et leur efficacité, ce qui peut entraver leur utilisation dans certains cas. Pourtant, une étude de 2019 parue dans Regulatory Toxicology and Pharmacology a

souligné qu'une évaluation minutieuse de la sécurité des enzymes est impérative avant leur emploi dans les produits alimentaires et pharmaceutiques **(Gao et Hua, 2019)**.

En conclusion, malgré le potentiel important des enzymes dans de nombreuses applications, leur utilisation est confrontée à des défis significatifs. Les scientifiques doivent donc continuer à rechercher des moyens d'améliorer de la production, la sélection, la stabilité et la récupération des enzymes tout en assurant leur sécurité et leur efficacité dans diverses applications **(Gao et Hua, 2019)**.

CHAPITRE II : LES ENZYMES IMMOBILISEES

2.1 Historique des enzymes immobilisées

Les enzymes immobilisées ont une longue histoire et ont été largement étudiées dans le domaine de la biotechnologie : Au début du XXe siècle, les scientifiques ont commencé à explorer l'immobilisation des enzymes. En 1916, Kastle et Loevenhart ont expérimenté avec l'immobilisation de la pepsine, une enzyme digestive, en utilisant de l'oxyde de fer. Ils ont constaté que l'activité enzymatique était supérieure à celle de la pepsine non immobilisée (**Kastle et Loevenhart, 1916**).

Au fil des décennies suivantes, de multiples techniques d'immobilisation ont vu le jour, telles que l'adsorption sur des supports solides, la covalence avec des agents de couplage, l'encapsulation dans des polymères ou encore la liaison covalente sur des matrices poreuses. Chaque méthode a fait l'objet d'études minutieuses portant sur ses avantages et ses limites (**Sheldon, 2007**).

À partir des années 1970, l'utilisation industrielle des enzymes immobilisées s'est généralisée, notamment dans l'industrie alimentaire. Cette technique a été largement employée pour la fabrication d'édulcorants artificiels tels que l'aspartame (**Gainer, 1982**).

Au fil du temps, de nouvelles applications ont été découvertes pour les enzymes immobilisées, notamment dans la production de biocarburants, la dépollution des eaux usées, la synthèse de médicaments, et la fabrication de biopolymères (**Mateo et al., 2007**).

Plus récemment, les scientifiques se sont intéressés à l'utilisation de nanomatériaux, tels que les nanoparticules métalliques, les nanotubes de carbone et les graphènes, pour l'immobilisation des enzymes. Ces nouveaux matériaux présentent des avantages tels qu'une plus grande surface de contact et une plus grande stabilité de l'enzyme (**Li et al., 2019**).

En somme, l'immobilisation des enzymes est un domaine de recherche dynamique qui a considérablement évolué au cours des dernières décennies. Les enzymes immobilisées sont devenues incontournables dans diverses applications industrielles et présentent un potentiel pour résoudre des problèmes environnementaux (**Li et al., 2019**).

2.2 Définition

Les enzymes immobilisées sont des enzymes qui ont été liées à un support insoluble, comme des billes de gel ou des membranes, dans le but de faciliter leur utilisation dans des processus industriels ou biologiques. En immobilisant l'enzyme, on améliore sa stabilité et sa capacité de réutilisation, ainsi que sa séparation des autres composants du mélange réactionnel. Cette

technique permet également de maintenir une activité enzymatique élevée, tout en réduisant la perte d'enzyme et en diminuant les coûts de production. **(Ulijn, 2006)**.

D'après une étude réalisée par DeMoss et ses collaborateurs en 1977, il existe plusieurs méthodes pour immobiliser des enzymes, comme la liaison covalente, l'adsorption, l'encapsulation et l'inclusion. Chacune de ces techniques comporte des avantages et des inconvénients, mais elles ont toutes pour but de fixer l'enzyme sur un support solide de manière réversible ou irréversible. En choisissant la méthode d'immobilisation la plus appropriée, on peut optimiser les performances de l'enzyme dans le contexte spécifique de son application. **(DeMoss et al, 1977)**.

Selon les conclusions de l'étude réalisée par Mateo et son équipe en 2007, l'immobilisation des enzymes est capable d'améliorer leur stabilité et leur activité, même dans des conditions extrêmes telles que les variations de température, les pH acides ou basiques, ainsi que la présence de solvants organiques. Cette caractéristique rend les enzymes immobilisées très avantageuses pour les processus de bioconversion et de biocatalyse industrielle, car elles offrent une plus grande efficacité et une durée de vie prolongée dans des conditions difficiles **(Mateo et al., 2007)**.

En somme, les enzymes immobilisées sont des enzymes qui ont été fixées à un support solide, ce qui leur permet de bénéficier d'une stabilité accrue et facilite leur utilisation dans divers processus biologiques et industriels. Il existe plusieurs méthodes d'immobilisation qui peuvent être choisies en fonction de leurs avantages et inconvénients respectifs. Les enzymes immobilisées sont largement utilisées dans plusieurs domaines tels que l'industrie alimentaire, la médecine et la biotechnologie et peuvent être particulièrement bénéfiques dans des conditions extrêmes telles que des températures élevées ou basses, des pH acides ou basiques et en présence de solvants organiques **(Mateo et al., 2007)** (figure2).

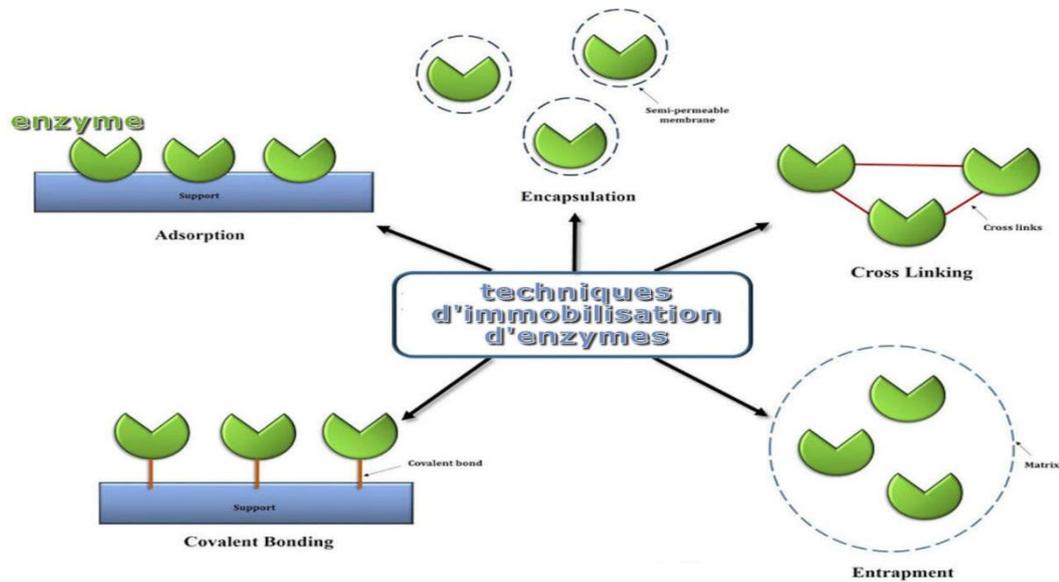


Figure 2 : Les techniques de l'immobilisation des enzymes (**Brena et Batista-Viera, 2006**).

2.3 Objectif et principe de l'immobilisation des enzymes

L'immobilisation des enzymes est une méthode qui consiste à fixer les enzymes sur une surface solide ou un support, pour améliorer leur stabilité et leur capacité catalytique. Les enzymes immobilisées sont utilisées dans diverses applications industrielles et médicales telles que la production d'aliments, de médicaments et de biocarburants (**Katchalski et Wilchek, 1976**).

Le principe fondamental de l'immobilisation des enzymes est que ces dernières sont capables de maintenir leur activité catalytique même lorsqu'elles sont fixées sur une surface solide ou un support. Cette fixation peut être réalisée selon différentes méthodes, telles que l'adsorption, la covalence, le piégeage et la micro encapsulation (**Sheldon et van, 2013**).

Dans ce contexte, les objectifs principaux de l'immobilisation des enzymes sont les suivants :

- ✓ Améliorer la stabilité des enzymes : Les enzymes immobilisées sont généralement plus stables que les enzymes solubles équivalentes. L'immobilisation protège en effet l'enzyme contre les conditions environnementales défavorables telles que les variations de pH, les températures élevées et les solvants organiques, ce qui permet d'allonger sa durée de vie et, par conséquent, de réduire les coûts de production. (**Sheldon, 2007**).
- ✓ Permettre la réutilisation des enzymes : Il est possible de récupérer les enzymes immobilisées après leur utilisation dans un processus industriel, ce qui permet de les

réutiliser économiquement et réduit la quantité d'enzyme nécessaire pour la production **(Mateo et al., 2007)**.

- ✓ Améliorer la sélectivité des enzymes : Altérer les propriétés de l'enzyme, telles que son affinité pour le substrat, sa stéréosélectivité et sa régiosélectivité, ce qui peut améliorer la sélectivité de l'enzyme pour un substrat ou un produit spécifique **(Torres et al., 2015)**.
- ✓ Augmenter la cinétique des réactions enzymatiques : Augmenter la vitesse des réactions enzymatiques en favorisant la concentration d'enzyme active près du substrat, en minimisant les effets de diffusion et en optimisant les conditions de réaction **(Hanefeld et al., 2009)**.
- ✓ Améliorer la résistance aux inhibiteurs et aux toxines : Protéger ces dernières contre les inhibiteurs et les toxines présents dans le milieu réactionnel, améliorant ainsi leur stabilité et leur durée de vie **(Betancor et al., 2015)**.
- ✓ Permettre l'utilisation d'enzymes dans des environnements non aqueux : Permet leur utilisation dans des environnements non aqueux, comme les solvants organiques, élargissant ainsi leur champ d'application dans les processus industriels **(Mateo et al., 2007)**.

En conclusion, l'immobilisation des enzymes présente de multiples avantages et peut être employée pour accroître l'efficacité des processus industriels **(Sheldon, 2014)**.

2.4 Méthodes d'immobilisations

L'immobilisation malgré leurs nombreux avantages, leur utilisation à grande échelle peut être entravée par leur instabilité et leur coût élevé. Afin de pallier ces limitations, des scientifiques ont développé des méthodes d'immobilisation des enzymes, qui consistent à les fixer à un support solide tel qu'une membrane ou des billes de gel. Cette technique offre de nombreux avantages, notamment la possibilité de réutiliser les enzymes, de stabiliser leur structure et d'améliorer leur résistance dans des conditions extrêmes, comme nous l'avons précédemment mentionné **(Katti et al., 2004)**.

En somme, les méthodes d'immobilisation des enzymes sont un domaine de recherche en constante évolution, offrant de nombreuses opportunités pour l'industrie et la recherche scientifique. Des recherches sont actuellement en cours pour développer de nouvelles techniques d'immobilisation des enzymes physiques et chimiques qui présentent une efficacité accrue, une durée de réutilisation prolongée et une performance améliorée dans des conditions extrêmes **(Mahajan et al., 2016)**.

2.4.1. Méthodes chimiques

2.4.1.1. Immobilisation par liaison covalente avec le support

L'immobilisation enzymatique par liaison covalente implique la fixation d'une enzyme sur un support solide par une liaison chimique stable. Cette méthode offre plusieurs avantages, notamment la stabilité de l'enzyme, la réutilisation du support et l'amélioration des performances enzymatiques.

Les étapes de l'immobilisation enzymatique par liaison covalente incluent la préparation du support, l'activation chimique du support, la fixation de l'enzyme sur celui-ci, et la purification du produit immobilisé (**Brady et Jordaan, 2009**).

- Préparation du support : La sélection d'un support approprié est essentielle, car il doit être compatible avec l'enzyme et avoir des propriétés physiques et chimiques adaptées à l'application visée. Les supports les plus fréquemment employés sont les résines échange d'ions, les supports à base de polysaccharides et les supports à base de polymères synthétiques (**Mateo et al., 2019**).
- Activation chimique du support : le support est ensuite activé chimiquement pour permettre la formation de liaisons covalentes avec l'enzyme. Les méthodes fréquemment utilisées comprennent l'emploi de réactifs comme *le glutaraldéhyde*, *le carbodiimide* ou *le cyanogène bromure*. Ces réactifs permettent de créer des groupes réactifs à la surface du support pour la fixation de l'enzyme (**Sheldon, 2016**).
- Fixation de l'enzyme : Après activation chimique du support, l'enzyme est fixée par une réaction de liaison covalente. Les méthodes les plus fréquentes sont l'adsorption physique, la liaison covalente directe et la liaison covalente indirecte. Bien que l'adsorption physique soit la méthode la plus simple, elle n'assure pas une fixation stable de l'enzyme. La liaison covalente directe implique une liaison covalente directe entre l'enzyme et le support activé chimiquement. En revanche, la liaison covalente indirecte utilise des agents de couplage, comme le glutaraldéhyde, pour créer une liaison covalente entre l'enzyme et le support. Après fixation de l'enzyme sur le support, il est nécessaire de purifier le produit immobilisé afin d'éliminer les enzymes non fixées ainsi que les impuretés. Les méthodes fréquemment employées pour cela sont la dialyse, la filtration et la centrifugation (**Wang et Lu, 2004**) (figure3).

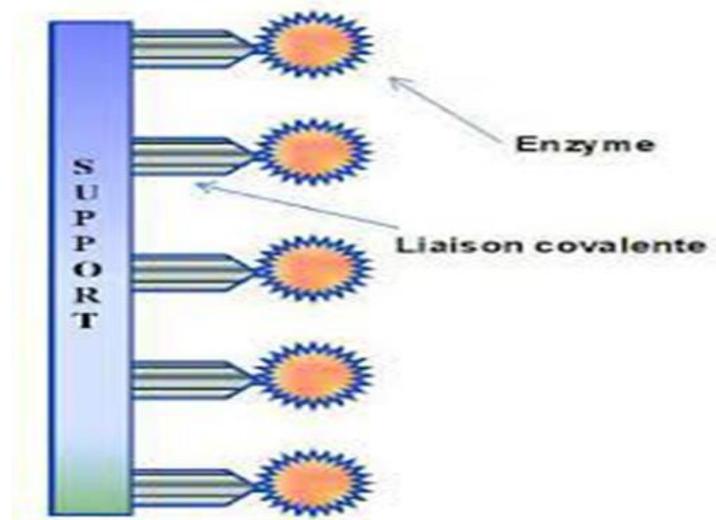


Figure 3 : Technique d'immobilisation par liaison covalente (**Brena et Batista-Viera, 2006**).

Avantages :

L'immobilisation par liaison covalente offre plusieurs avantages par rapport à d'autres méthodes d'immobilisation. Elle permet souvent une plus grande stabilité de l'enzyme et une meilleure réutilisation, car l'enzyme est liée de manière permanente au support. De plus, la liaison covalente peut être utilisée pour orienter l'enzyme de manière spécifique sur le support, ce qui peut améliorer son activité (**Brady et al, 2004**).

Inconvénients :

Cependant, il convient de noter que l'immobilisation par liaison covalente peut également présenter des inconvénients. Par exemple, l'enzyme peut perdre une partie de son activité après l'immobilisation en raison de changements conformationnels. De plus, la liaison covalente peut être difficile à réaliser et peut nécessiter des conditions de réaction spécifiques (**Wang et al., 2016**).

2.4.1.2. Immobilisation par réticulation (Cross-Linking) :

La méthode d'immobilisation enzymatique par réticulation est une méthode couramment utilisée pour fixer des enzymes sur des supports insolubles. Cette technique présente plusieurs avantages, notamment une amélioration de la stabilité de l'enzyme ainsi que sa réutilisation facile (figure4).

- Choix du support : Pour choisir le support de réticulation, il est important de prendre en compte les propriétés de l'enzyme à immobiliser ainsi que les conditions de réaction.

Les supports les plus fréquemment utilisés pour l'immobilisation enzymatique par réticulation sont *les résines acryliques*, les supports *d'agarose* et les supports de *silice*, etc. (Li *et al.*, 2018).

- Activation du support : Pour activer le support, on ajoute des groupes fonctionnels réactifs tels que des groupes époxy ou des groupes aldéhydes. Cette étape permet de former des liaisons covalentes entre l'enzyme et le support, facilitant ainsi l'immobilisation enzymatique par réticulation (Sheldon, 2011).
- Immobilisation de l'enzyme : Une fois que le support est activé, l'enzyme est ajoutée et la réaction de réticulation est initiée en présence d'un agent réticulant tel que *le glutaraldéhyde*. Cette étape permet de former des liaisons covalentes entre l'enzyme et le support, fixant ainsi de manière stable l'enzyme sur le support (Sheldon, 2011).
- Élimination des impuretés : Une fois que l'enzyme est immobilisée, les impuretés sont éliminées par lavage répété du support immobilisé. Cette étape est importante pour éliminer tout composant indésirable qui pourrait affecter la performance de l'enzyme immobilisée (Li *et al.*, 2018).
- Caractérisation de l'enzyme immobilisée : Il est essentiel de caractériser l'enzyme immobilisée pour évaluer ses propriétés enzymatiques, notamment son activité, sa cinétique de réaction, sa stabilité thermique et sa réutilisabilité. Les techniques courantes utilisées pour caractériser l'enzyme immobilisée incluent la spectrophotométrie, la chromatographie et la microscopie électronique (Sheldon, 2011).

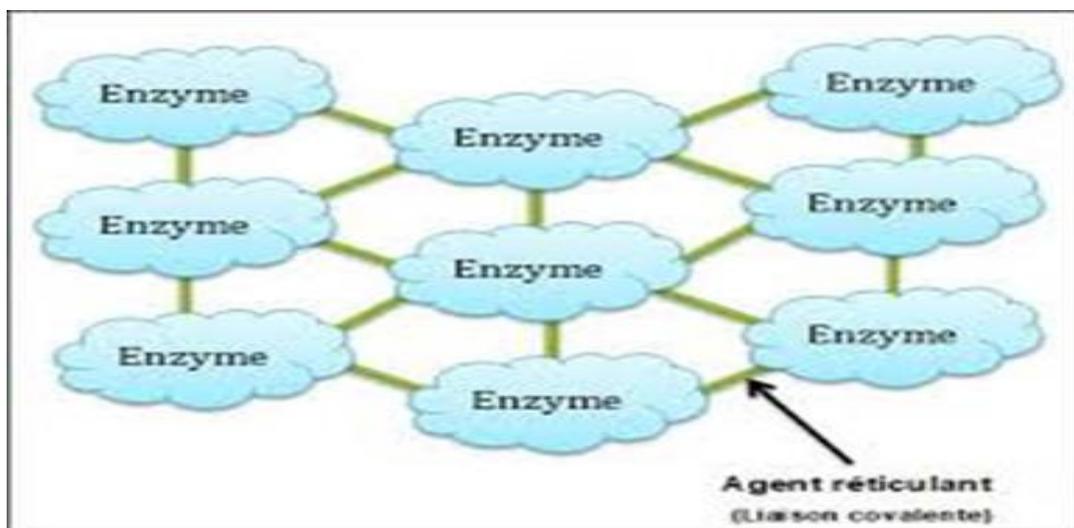


Figure 4 : Technique d'immobilisation des enzymes par réticulation (Cross-Linking) (Brena et Batista-Viera, 2006).

Avantages :

-Stabilité accrue : Les enzymes immobilisées par réticulation présentent une plus grande stabilité en comparaison aux enzymes libres, car elles sont fixées dans une matrice et protégées contre les conditions environnementales défavorables. De plus, les enzymes immobilisées par réticulation ont une plus grande résistance aux pH extrêmes et à la température élevée, ce qui en fait des candidats pour les applications industrielles (**Jia et al., 2018**).

-Réutilisation : Les enzymes immobilisées par réticulation peuvent être réutilisées plusieurs fois sans perdre leur activité enzymatique. Cela réduit les coûts de production et augmente l'efficacité de la réaction enzymatique (**Sheldon., 2011**).

-Facilité de séparation : La méthode d'immobilisation par réticulation permet de facilement séparer l'enzyme de la solution réactionnelle, ce qui facilite la purification du produit final (**Guo et al., 2013**).

Inconvénients :

-Coût élevé : La méthode d'immobilisation par réticulation est plus coûteuse que d'autres méthodes d'immobilisation, car elle nécessite l'utilisation d'agents de réticulation tels que le glutaraldéhyde, qui sont coûteux. De plus, la réticulation peut également altérer la structure et l'activité enzymatique, ce qui peut entraîner une perte d'activité enzymatique (**Singh et al., 2016**).

-Faible capacité d'immobilisation : La méthode d'immobilisation par réticulation a une faible capacité d'immobilisation par rapport à d'autres méthodes d'immobilisation telles que l'adsorption. Cela signifie qu'elle ne peut pas être utilisée pour immobiliser des quantités importantes d'enzymes pour des réactions à grande échelle (**Krajewska, 2004**).

-Limitations liées à la matrice de support : La matrice de support utilisée pour immobiliser les enzymes peut affecter l'activité enzymatique et la stabilité. Par exemple, si la matrice de support n'est pas compatible avec l'enzyme, cela peut entraîner une perte d'activité enzymatique (**Mateo et al., 2007**).

2.4.1.3. Immobilisation par liaison ionique :

La méthode d'immobilisation des enzymes par liaison ionique est une technique qui consiste à lier des enzymes à un support solide, tel que des billes de résine, en utilisant des interactions électrostatiques entre des groupes chargés de l'enzyme et des groupes opposés chargés sur le support. Cette méthode est souvent utilisée pour améliorer la stabilité et la

réutilisabilité des enzymes dans des applications industrielles et biotechnologiques (**Mateo et al., 2007**). Les étapes de cette technique sont les suivantes :

- Préparation de la surface de support : La première étape du processus implique la préparation de la surface de support. Cette étape nécessite le nettoyage et la modification de la surface pour qu'elle soit compatible avec la liaison ionique. Afin d'optimiser la liaison ionique, diverses techniques peuvent être utilisées, notamment la salinisation, qui permet de modifier la surface et de la rendre plus propice à la liaison ionique (**John, 2013**).
- Sélection de l'enzyme : Le choix de l'enzyme à immobiliser dépend de son activité et de sa stabilité dans les conditions de la réaction. Cette sélection est cruciale pour assurer l'efficacité du processus. L'enzyme peut être obtenue en purifiant des sources naturelles ou en la produisant par génie génétique en laboratoire (**Mateo et al., 2013**).
- Préparation de la solution d'immobilisation : La préparation de la solution d'immobilisation implique la dissolution de l'enzyme dans un tampon approprié, suivi de l'ajout d'ions chargés pour faciliter la liaison ionique. Les ions métalliques, tels que le cuivre, le fer ou le nickel, sont couramment utilisés à cette fin (**Chen et al., 2015**).
- Immobilisation de l'enzyme : Après préparation de la surface de support, la solution d'immobilisation est appliquée sur celle-ci. Les ions chargés présents dans la solution se lient à la fois à la surface de support et à l'enzyme, permettant ainsi l'immobilisation de cette dernière sur la surface de support. Une fois cette étape terminée, un rinçage est effectué pour éliminer toute trace d'enzyme qui ne serait pas immobilisée (**Azmi et al., 2013**).
- Caractérisation de biocatalyseur immobilisé : Il est crucial de caractériser l'enzyme immobilisée afin d'évaluer son activité et sa stabilité. Pour cela, diverses techniques peuvent être utilisées, telles que la spectroscopie UV-visible ou encore l'analyse de la cinétique enzymatique. Ces méthodes permettent d'obtenir des données précises sur l'enzyme immobilisée (**Rezaei et Mohammadi, 2016**) (figure5).

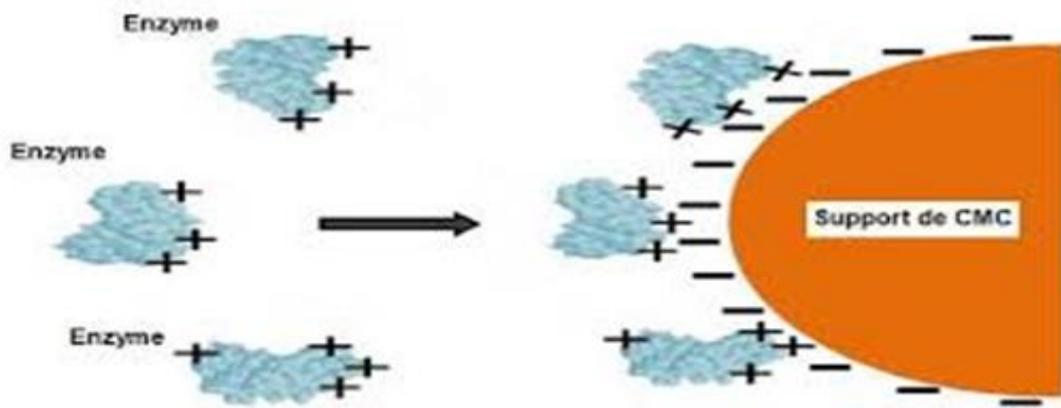


Figure 5 : Technique d'immobilisation des enzymes par liaison ionique (**Brena et Batista-Viera, 2006**).

Avantages :

-Facilité de fabrication : La méthode d'immobilisation par liaison ionique est relativement simple à réaliser, et ne nécessite pas d'agents de réticulation coûteux comme dans le cas de la réticulation. De plus, la technique peut être réalisée à température ambiante, ce qui permet d'économiser de l'énergie par rapport aux méthodes d'immobilisation nécessitant des conditions de température élevées (**Ma et al., 2017**).

-Sélectivité améliorée : Les groupes fonctionnels spécifiques présents sur la surface de l'enzyme peuvent être utilisés pour former des liaisons ioniques avec des charges opposées sur la surface du support, ce qui permet une immobilisation sélective de l'enzyme. Cela peut permettre de conserver l'activité enzymatique et de limiter les réactions secondaires indésirables (**Roy et al., 2003**).

-Capacité d'immobilisation élevée : La méthode d'immobilisation par liaison ionique permet d'obtenir une capacité d'immobilisation élevée, ce qui permet d'immobiliser des quantités importantes d'enzymes pour les réactions à grande échelle (**Bornscheuer, 2013**).

Inconvénients :

-Stabilité limitée : Les enzymes immobilisées par liaison ionique sont moins stables que les enzymes immobilisées par réticulation. Elles sont plus susceptibles de se désintégrer en raison de la force de liaison relativement faible entre l'enzyme et le support (**Brady et Jordaan, 2009**).

-Faible réutilisabilité : Les enzymes immobilisées par liaison ionique ont une faible réutilisabilité en comparaison aux enzymes immobilisées par réticulation, car les liaisons ioniques peuvent être rompues facilement au cours des cycles de réutilisation. Cela peut

entraîner une perte d'activité enzymatique au fil du temps et augmenter les coûts de production (**Guzik et Hupert, 2013**).

-Perte d'activité enzymatique : Les conditions de l'immobilisation par liaison ionique peuvent entraîner une perte d'activité enzymatique en raison de l'interaction électrostatique entre l'enzyme et le support, ce qui peut modifier la conformation de l'enzyme et réduire son activité enzymatique (**Garcia et al., 2011**).

2.4.2. Méthodes physiques

2.4.2.1. Immobilisation par adsorption

L'adsorption est une technique d'immobilisation enzymatique qui utilise des forces d'interaction physiques ou chimiques pour lier des enzymes à des supports solides. Comparée à d'autres méthodes d'immobilisation enzymatique, cette méthode présente de nombreux avantages tels que la simplicité, la rapidité, la réversibilité et le faible coût. Dans ce document, nous allons examiner en détail cette méthode d'immobilisation étape par étape et fournir des références pour chaque étape (**John Brady, 2009**) (figure6).

- Choix du support solide : La sélection du support solide est une étape cruciale lors de l'immobilisation enzymatique par adsorption, car le support doit répondre à des critères spécifiques, tels que la porosité, l'inertie, la stabilité, la non-toxicité et la disponibilité en grandes quantités. Les résines échangeuses d'ions, les polymères, les nanoparticules, les membranes, les fibres et les billes magnétiques sont les supports les plus couramment utilisés. Pour faciliter l'adsorption des enzymes, la plupart de ces supports sont fonctionnalisés avec des groupes chimiques, tels que les groupes amine, carboxyle, hydroxyle ou sulfonate. Des références bibliographiques seront fournies pour chaque type de support (**Brady, 2009 ; Zhang et al., 2014**).
- Préparation de l'enzyme : Afin d'améliorer l'efficacité de l'immobilisation, l'enzyme doit être préalablement purifiée et concentrée avant l'adsorption. Les méthodes courantes de purification comprennent la chromatographie d'exclusion, la chromatographie d'affinité et la dialyse. Afin d'améliorer l'efficacité de l'immobilisation, l'enzyme doit être préalablement purifiée et concentrée avant l'adsorption. Les méthodes courantes de purification comprennent la chromatographie d'exclusion, la chromatographie d'affinité et la dialyse. Suite à la purification, l'enzyme est souvent lyophilisée ou congelée pour une utilisation ultérieure. Des références bibliographiques pour chaque méthode de purification seront également fournies. Suite à la purification, l'enzyme est souvent lyophilisée ou congelée pour une utilisation ultérieure. Des références bibliographiques

pour chaque méthode de purification seront également fournies (**Hodge et Cukier, 1990**).

- Adsorption de l'enzyme sur le support solide : Lorsqu'on souhaite fixer une enzyme sur un support solide, il est possible de procéder de deux manières : soit en plongeant le support dans une solution contenant l'enzyme, soit en versant la solution contenant l'enzyme sur le support. Pour faciliter l'adsorption de l'enzyme sur le support, il est recommandé de l'agiter, de maintenir un pH optimal et une température optimale. Une fois que l'enzyme est adsorbée sur le support, il est nécessaire de laver ce dernier afin d'éliminer toute enzyme qui n'a pas été fixée (**Roussos et Velonia, 2013 ; Baharifar et al., 2018**).
- Caractérisation du biocatalyseur immobilisé : Une fois que l'enzyme est immobilisée, il est important de caractériser le biocatalyseur afin d'évaluer son activité enzymatique, sa stabilité, sa réutilisabilité et sa cinétique. Les méthodes de caractérisation les plus courantes incluent la spectrophotométrie, la chromatographie, l'électrophorèse, la microscopie et la mesure de l'activité enzymatique (**Saxena et al., 1999 ; Xie et Lu., 2014**).
- Applications de l'immobilisation enzymatique par adsorption : L'adsorption pour immobiliser les enzymes est une technique couramment utilisée dans différents domaines tels que la production d'enzymes, la catalyse enzymatique, la biosynthèse, la biotransformation et la dégradation des polluants. Cette méthode est utilisée pour diverses applications, notamment dans la production de biocarburants, la fabrication de produits pharmaceutiques, la synthèse de polymères et la dégradation des colorants (**Zhou et al., 2010 ; Balaji et al., 2015**).



Figure 6 : Technique d'immobilisation des enzymes par adsorption (**Brena et Batista-Viera, 2006**).

Avantages :

-Facilité d'utilisation : La méthode d'absorption est accessible aux chercheurs et aux ingénieurs qui n'ont pas une expertise spécialisée en immobilisation d'enzymes, car elle est simple et facile à utiliser. En outre, elle est économiquement avantageuse par rapport à d'autres méthodes car elle ne nécessite ni équipement coûteux ni réactifs spécifiques (**Olajuyigbe et Fatokun, 2018**).

-Conservation de l'activité enzymatique : Les enzymes qui sont immobilisées par absorption ont souvent une activité enzymatique élevée car leur structure et leur fonction ne subissent pas de modifications chimiques ou physiques qui pourraient les altérer (**Sheldon, 2007**).

-Flexibilité : Grâce à la méthode d'absorption, les enzymes peuvent être immobilisées sur divers supports, tels que des billes, des membranes ou des fibres, ce qui donne aux chercheurs la possibilité de choisir le support le mieux adapté à leur application spécifique (**Olajuyigbe et Fatokun, 2018**).

-Réversibilité : La méthode d'absorption est souvent réversible, ce qui implique que les enzymes peuvent être facilement retirées du support, si besoin est. Cette caractéristique peut s'avérer bénéfique pour les applications qui nécessitent le recyclage ou la récupération des enzymes (**Sheldon, 2007**).

Inconvénients :

-Faible stabilité : La méthode d'absorption physique peut entraîner une stabilité relativement faible pour les enzymes immobilisées en raison des forces de liaison peu fortes. Cette faible stabilité peut entraîner la libération de l'enzyme dans le milieu réactionnel, ce qui peut réduire son efficacité catalytique. De plus, il existe un risque que l'enzyme se détache complètement de la matrice, limitant ainsi sa capacité à être réutilisée (**Krajewska, 2004**).

-Perte d'activité : L'immobilisation par absorption peut causer une diminution d'activité de l'enzyme immobilisée. Cette diminution peut être attribuée aux changements conformationnels subis par l'enzyme pendant l'immobilisation ou aux interactions défavorables entre l'enzyme et la matrice d'immobilisation (**Tischer et Wedekind, 2002**).

-Difficulté à contrôler la densité d'enzyme : Il est difficile de contrôler précisément la densité d'enzyme immobilisée sur la matrice lors de l'immobilisation par absorption. Cette densité peut varier considérablement d'un lot à l'autre, ce qui peut avoir un impact sur les performances de l'enzyme immobilisée (**Polakovič et Švitel, 2002**).

4-Sensibilité aux conditions environnementales : Les enzymes immobilisées par absorption peuvent être influencées par les conditions environnementales telles que la température, le pH

et la force ionique. Ces facteurs peuvent impacter la stabilité et l'activité de l'enzyme immobilisée (**Sheldon, 2007**).

2.4.2.2. Immobilisation par inclusion (encapsulation)

La technique d'immobilisation enzymatique par inclusion est fréquemment employée et implique l'encapsulation des enzymes dans une matrice support. Cette méthode présente plusieurs avantages, tels que la stabilité enzymatique accrue, la résistance aux conditions environnementales et la possibilité de réutiliser facilement les enzymes (figure7).

Le processus d'immobilisation enzymatique par inclusion peut être divisé en trois étapes : la préparation de la matrice, l'encapsulation de l'enzyme et la caractérisation de la biocatalyse (**Carrier, 2017**).

- Préparation de la matrice : Il convient de choisir une matrice de support adaptée aux caractéristiques physico-chimiques de l'enzyme, aux conditions de réaction ainsi qu'aux besoins du système de réaction. Les matériaux les plus fréquemment employés pour immobiliser les enzymes par inclusion sont les polymères, qu'ils soient naturels ou synthétiques, les hydrogels ainsi que les sols minéraux (**Hwang et Shim, 2004**).

- Encapsulation de l'enzyme : Plusieurs méthodes permettent d'encapsuler les enzymes dans une matrice, notamment en les incorporant directement dans la matrice support ou en ayant recours à des techniques d'encapsulation telles que la micro encapsulation, la coacervation ou la gélification. Il convient d'optimiser les conditions de réaction, telles que la température, le pH et la concentration en enzyme, afin d'obtenir une encapsulation homogène et efficace (**Wang et al., 2013**).

- Caractérisation du biocatalyseur : Il est essentiel de caractériser le biocatalyseur immobilisé par inclusion pour évaluer sa stabilité et son efficacité. Diverses techniques, notamment la spectroscopie, la microscopie et la mesure de l'activité enzymatique, sont mises en œuvre pour évaluer les propriétés physiques et chimiques du biocatalyseur (**Sheldon, 2007**).

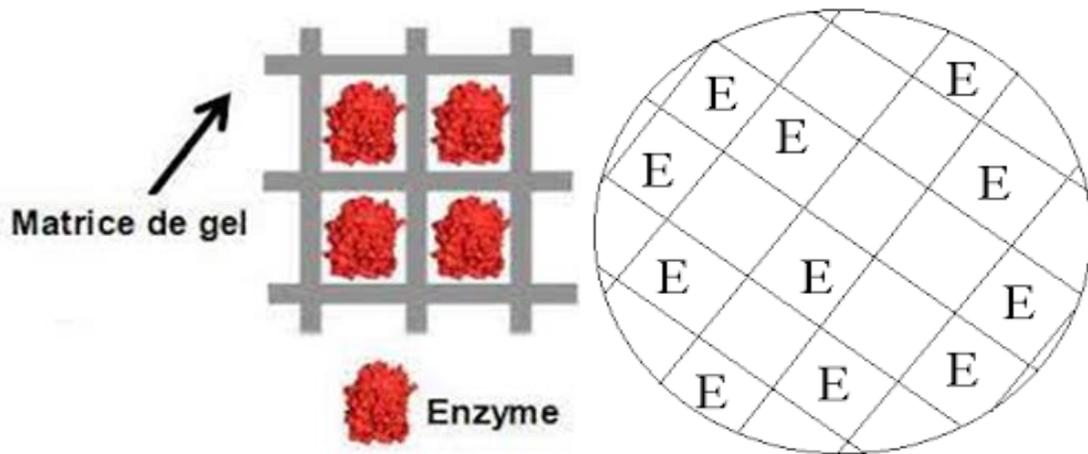


Figure 7 : technique d'immobilisation des enzymes par inclusion (encapsulation) (**Brena et Batista-Viera, 2006**).

Avantages :

-Meilleure stabilité : Les enzymes peuvent être immobilisées en les incluant dans des matériaux poreux, ce qui présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes d'immobilisation. En effet, cette méthode offre une meilleure stabilité thermique à ces enzymes et les rend plus résistantes aux conditions environnementales extrêmes telles que les pH élevés ou bas (**Wei et Li, 2017**).

-Meilleure réutilisation : Il est possible de réutiliser les enzymes immobilisées par inclusion plusieurs fois sans observer de diminution significative de leur activité enzymatique (**Mateo et al., 2002**).

-Facilité de préparation : La méthode d'immobilisation d'enzymes par inclusion est simple à utiliser et ne requiert pas de conditions ou de traitements chimiques particuliers (**Cao et al., 1990**).

-Possibilité de contrôler l'immobilisation : elle permet de contrôler précisément la quantité d'enzyme immobilisée et sa répartition à l'intérieur du matériau (**Ferrer et al., 2001**).

-Meilleure rétention de l'activité enzymatique : Comparées à d'autres méthodes d'immobilisation d'enzymes, celles qui sont immobilisées par inclusion dans des matériaux poreux présentent une meilleure rétention de leur activité enzymatique (**Wei et al., 2017**).

Inconvénients :

-Perte d'activité enzymatique : Lorsqu'on inclut une enzyme dans une matrice, il peut y avoir une diminution de son activité enzymatique en raison des interactions avec la matrice ou de

modifications de la conformation de l'enzyme. Cette perte d'activité peut avoir un impact sur la performance globale de la réaction enzymatique (**Rathi et al., 2013**).

-Faible stabilité à long terme : Au fil du temps, les enzymes incluses dans une matrice peuvent perdre leur activité enzymatique en raison de leur interaction avec la matrice ou de la dégradation de cette dernière. Cette perte d'activité peut rendre la méthode d'inclusion moins adaptée pour une utilisation à long terme (**Sheldon, 2007**).

-Difficulté de régénération : La régénération de la matrice peut se révéler ardue, ce qui peut conduire à une diminution de l'activité enzymatique et une instabilité à long terme de l'enzyme (**Sheldon, 2007**).

-Faible contrôle du microenvironnement : L'inclusion d'une enzyme dans une matrice peut restreindre le contrôle du microenvironnement de l'enzyme, ce qui peut altérer la spécificité et la sélectivité de la réaction enzymatique. De plus, les conditions de la réaction peuvent être difficiles à optimiser en raison de la complexité de l'environnement dans lequel l'enzyme est incluse (**Rathi et al., 2013**).

-Coût élevé : L'inclusion d'une enzyme dans une matrice peut être coûteuse, surtout si l'utilisation de matériaux particuliers est nécessaire pour la matrice. Par ailleurs, le coût de la régénération de la matrice peut également s'avérer élevé (**Sheldon, 2007**).

2.5 Comparaison entre les différentes méthodes d'immobilisation :

Le tableau 2 représente une comparaison entre les différentes méthodes d'immobilisation des enzymes en soulignant les avantages et les inconvénients de chaque une d'entre eux.

Tableau II : Les avantages et les inconvénients de chaque méthodes (**Sangeetha et Abraham, 2014 ; Wang et al., 2016 ; Nadar et al., 2018**).

Méthode d'immobilisation	Avantages	Inconvénients	Références
1-Adsorption physique	Simple, rapide, faible coût.	Faible stabilité et reproductibilité, faible capacité d'immobilisation	(Sangeetha et Abraham, 2014 ; Nadar et al., 2018).
2-Liaison Covalent	Stabilité, reproductibilité, haute capacité d'immobilisation.	Complexité, coûts élevés, risques de dénaturation et d'inactivation.	(Sangeetha et Abraham, 2014 ; Wang et al., 2016).
3-Inclusion	Stabilité, protection contre les conditions de réaction défavorables.	Faible perméabilité et activité de l'enzyme, coûts élevés.	(Sangeetha et Abraham, 2014 ; Nadar et al., 2018).
4-Liaison ionique	Simple, rapide, faible coût.	Faible stabilité et reproductibilité, faible capacité d'immobilisation.	(Sangeetha et Abraham, 2014 ; Nadar et al., 2018).
5-Cross-linking	Stabilité, reproductibilité, haute capacité d'immobilisation.	Complexité, coûts élevés, risques de dénaturation et d'inactivation.	(Sangeetha et Abraham, 2014 ; Wang et al., 2016).

2.6 Le choix de type d'immobilisation des enzymes

Plusieurs facteurs sont à prendre en compte pour choisir le type d'immobilisation d'enzymes, tels que la nature de l'enzyme, le support utilisé, les conditions de réaction, les exigences industrielles et les coûts associés à chaque méthode (**Sheldon, 2007**).

Les techniques d'immobilisation d'enzymes les plus fréquemment employées sont la liaison covalente, l'adsorption physique, l'encapsulation, l'inclusion et la formation de films minces. La méthode de liaison covalente est généralement considérée comme la plus fiable et la plus performante pour immobiliser des enzymes, car elle est stable, réutilisable et permet de maintenir l'activité enzymatique (**Cao et al., 2003**).

Dans certains cas, l'adsorption physique peut être une option privilégiée, surtout si la réutilisation de l'enzyme n'est pas considérée comme prioritaire et si une immobilisation rapide et facile est souhaitée. Les techniques courantes d'immobilisation des enzymes comprennent également l'encapsulation et l'inclusion, qui sont particulièrement adaptées aux enzymes sensibles aux conditions de réaction (**Mateo et al., 2019**).

Les techniques de formation de films minces sont relativement récentes et continuent d'être développées pour l'immobilisation d'enzymes. Cette méthode est fréquemment employée pour immobiliser des enzymes sur des substrats souples tels que des textiles et des polymères (**Singh et al., 2013**).

2.7 Propriétés des enzymes immobilisées :

Il existe plusieurs méthodes pour obtenir des enzymes immobilisées, notamment l'adsorption physique ou la formation de liens chimiques. Les propriétés des enzymes immobilisées peuvent différer selon la méthode d'immobilisation employée. Voici un aperçu des propriétés courantes des enzymes immobilisées obtenues par des méthodes physiques et chimiques (**Sheldon et Van, 2013**).

2.7.1 Propriétés des enzymes immobilisées physiquement :

L'immobilisation physique des enzymes peut entraîner une amélioration de leur stabilité thermique et de leur résistance aux conditions de pH extrêmes. Les enzymes immobilisées par adsorption physique ont également tendance à présenter une activité spécifique plus élevée par unité de masse d'enzyme que les enzymes libres. Toutefois, il convient de noter que l'adsorption physique peut être réversible et peut causer une diminution progressive de l'activité enzymatique au fil du temps (**Zhou et al., 2012 ; Malaekhe et Morshedi, 2013**).

2.7.2 Propriétés des enzymes immobilisées chimiquement :

L'immobilisation chimique peut contribuer à renforcer la stabilité de l'enzyme et à augmenter son activité en conditions extrêmes de pH et de température. En outre, les enzymes immobilisées par cette méthode sont souvent plus stables sur le plan opérationnel, plus réutilisables et plus résistantes aux inhibiteurs. Toutefois, il convient de souligner que l'utilisation de réactifs chimiques peut influencer la conformation de l'enzyme et réduire son activité catalytique (**Tischer et Wedeking, 1991 ; Cao, 2005 ; Sheldon et Van, 2013**).

Il existe d'autres techniques d'immobilisation, telles que l'encapsulation et l'inclusion, qui présentent des avantages tels qu'une stabilité accrue de l'enzyme et une plus grande capacité de réutilisation. Toutefois, il convient de noter que ces méthodes peuvent avoir un impact sur l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée et peuvent nécessiter des conditions de réaction particulières (**Singh et Kumar, 2007 ; Mateo et al., 2007 ; Sheldon et Van, 2013**).

2.8 Effet de l'immobilisation de l'enzyme sur leur activité :

L'activité enzymatique peut être affectée de manière significative par l'immobilisation de l'enzyme, qui varie en fonction de la méthode d'immobilisation choisie. Certaines méthodes peuvent entraîner une diminution de l'activité enzymatique, tandis que d'autres peuvent mener à une augmentation de cette activité (**Liu, 2019**).

Zhang *et al.* (2018) ont mené une étude comparative de l'activité enzymatique de la lipase immobilisée par deux méthodes : l'adsorption physique et la liaison covalente. Les résultats ont indiqué que la méthode de liaison covalente a entraîné une diminution de l'activité enzymatique, tandis que la méthode d'adsorption physique a conduit à une augmentation de l'activité enzymatique (**Zhang *et al.*, 2018**). Des résultats similaires ont été observés dans d'autres études. Par exemple, Liu *et al.* (2019) ont comparé l'activité enzymatique de la glucose oxydase immobilisée par covalent bonding et adsorption physique. Les résultats ont montré que la méthode d'adsorption physique a produit une activité enzymatique supérieure à celle de la méthode de covalent bonding (**Liu *et al.*, 2019**).

Cependant, il est à noter que certaines méthodes d'immobilisation peuvent augmenter la stabilité de l'enzyme, même si cela peut entraîner une légère diminution de son activité enzymatique. Par exemple, une étude menée par Zang *et al.* (2017) a révélé que l'immobilisation de la lactase par covalent bonding a entraîné une diminution de l'activité enzymatique, mais a amélioré la stabilité thermique de l'enzyme (**Zang *et al.*, 2017**).

En résumé, l'impact de l'immobilisation sur l'activité enzymatique dépend de nombreux facteurs, notamment la méthode d'immobilisation, les conditions de réaction et les propriétés du support. Pour maximiser l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée pour une application donnée, les chercheurs doivent donc considérer ces facteurs de manière appropriée (**Zang *et al.*, 2017**).

2.9 Factures influençant l'immobilisation enzymatique

Plusieurs facteurs influencent l'efficacité de l'immobilisation enzymatique. Tout d'abord, il est important de prendre en compte la nature de l'enzyme et du support utilisé. Les enzymes sont des molécules complexes avec une structure tridimensionnelle spécifique qui peut être altérée lorsqu'elles sont immobilisées. De plus, la surface du support doit être compatible avec l'enzyme pour favoriser son immobilisation. En outre, l'activité enzymatique peut être affectée par des paramètres tels que le pH, la température et la concentration des réactifs lors de l'immobilisation (**Chen *et al.*, 2013**).

Outre les facteurs précédemment évoqués, d'autres éléments tels que le mode d'immobilisation, la densité d'enzyme immobilisée, la taille et la forme des particules, ainsi que la durée d'immobilisation peuvent influencer l'efficacité de l'immobilisation enzymatique. En effet, pour une utilisation industrielle efficace, il est crucial que l'enzyme immobilisée soit stable. Cela implique qu'elle doit être capable de conserver son activité catalytique pendant une longue période et de résister aux conditions de réaction défavorables (**Krajewska, 2004**).

Afin d'optimiser l'immobilisation enzymatique en fonction de l'application spécifique, il est essentiel de bien comprendre ces facteurs. Des études ont été menées pour évaluer l'impact de ces facteurs sur l'immobilisation enzymatique, ainsi que sur les propriétés des enzymes immobilisées (**Krajewska, 2004 ; Sheldon, 2007 ; Chen et al., 2013**).

2.10. Supports utilisés pour l'immobilisation enzymatique

2.10.1. Les supports organiques

Les propriétés des supports organiques tels que la compatibilité avec les organismes vivants, la stabilité chimique et mécanique, ainsi que la perméabilité aux réactifs, en font un choix populaire pour l'immobilisation d'enzymes. Les types les plus répandus de supports organiques utilisés pour cette application sont les polymères synthétiques, les polymères naturels et les hydrogels (**Liu et al., 2019**).

✓ Supports à base de polymères synthétiques :

En raison de leur capacité à offrir une grande stabilité, une résistance élevée à la dégradation et une grande flexibilité, les polymères synthétiques tels que *le polyacrylamide*, *le polyuréthane*, *le polystyrène*, *le polyvinyle alcool* et *le polyacrylonitrile* ont été abondamment utilisés comme supports pour l'immobilisation enzymatique (**Dwevedi et Kayastha, 2019**).

✓ Supports à base de polysaccharides :

L'immobilisation enzymatique utilise également des polysaccharides naturels tels que l'alginate, la *chitosane*, la cellulose, la gomme arabique et le carraghénane. Ces matériaux sont appréciés pour leur biocompatibilité, leur faible toxicité et leur capacité à former des gels (**Ramanathan et al., 2017**).

✓ Supports à base de protéines :

Des protéines naturelles telles que la gélatine, le collagène, l'albumine sérique bovine et la caséine peuvent également servir de supports pour l'immobilisation enzymatique en raison de leur biocompatibilité et de leur capacité à former des gels (**Guo et al., 2019**).

✓ Supports à base de lipides :

Les lipides naturels tels que la lécithine, le cholestérol et les acides gras sont également utilisés comme supports pour l'immobilisation enzymatique en raison de leur capacité à former des membranes lipidiques et leur biocompatibilité (**Li et al.,2018**).

✓ Supports à base de nanoparticules :

En raison de leur capacité à stabiliser les enzymes et leur grande surface spécifique, les nanoparticules métalliques telles que l'or, l'argent, le cuivre et le platine, ainsi que les nanoparticules de *silice*, sont utilisées comme supports pour l'immobilisation enzymatique (**Wei et al.,2020**).

2.10.1. Les supports inorganiques

Les supports inorganiques sont couramment utilisés pour l'immobilisation enzymatique en raison de leur stabilité, de leur capacité à résister à la dégradation et de leur aptitude à favoriser l'interaction enzymatique avec le substrat. Les types de supports inorganiques suivants sont présentés ci-dessous (**Liu et al., 2019**).

✓ Supports minéraux :

Les supports minéraux sont des matériaux inorganiques d'origine naturelle ou synthétique, tels que les argiles, la silice, le verre et les zéolithes, qui sont utilisés pour l'immobilisation enzymatique. Ils offrent une grande surface spécifique pour l'immobilisation des enzymes et peuvent être modifiés chimiquement pour améliorer leur interaction avec ces dernières. Les argiles, qui présentent une grande surface spécifique et une porosité intéressante, sont couramment utilisées comme supports minéraux pour l'immobilisation enzymatique (**Liu et al., 2019**).

✓ Supports métalliques :

Les supports métalliques sont constitués de métaux tels que le fer, l'aluminium et le titane, ainsi que d'oxydes métalliques tels que l'oxyde de zinc et l'oxyde de titane. Ces supports sont utilisés pour l'immobilisation enzymatique en raison de leur grande stabilité et de leur surface spécifique élevée. Les oxydes métalliques sont particulièrement utiles pour l'immobilisation enzymatique, comme l'illustre l'exemple de l'oxyde de zinc, qui a été utilisé comme support pour immobiliser la lipase (**Azmi et al., 2020**).

✓ Supports en verre :

Les supports en verre sont des matériaux inorganiques transparents qui offrent une surface plane et lisse pour l'immobilisation enzymatique. Ils peuvent être modifiés chimiquement pour améliorer leur interaction avec les enzymes. Le verre de silice a été utilisé comme

support pour immobiliser la glucose oxydase, illustrant l'utilité des supports en verre pour l'immobilisation enzymatique (**Zhang et al., 2015**).

✓ Supports de carbones :

Les supports carbonés incluent le charbon actif et les nanotubes de carbone. En raison de leur surface spécifique élevée, ils sont utilisés pour l'immobilisation enzymatique et peuvent être modifiés chimiquement pour améliorer leur interaction avec les enzymes. Pour l'immobilisation de la lipase, le charbon actif a été utilisé comme support (**Arumugam et al., 2018**).

**CHAPITRE III : EXEMPLE
D'ENZYME IMMOBILISEE
(Trypsine).**

CHAPITRE III : EXEMPLE D'ENZYME IMMOBILISÉE (Trypsine).

3.1 Généralité sur la trypsine :

L'enzyme trypsine est une enzyme protéolytique cruciale dans la digestion des protéines dans l'intestin grêle chez les mammifères. Elle est initialement produite sous forme inactive, connue sous le nom de *trypsinogène*, par les cellules acineuses du pancréas. Pour devenir active, elle est ensuite activée par une protéase pancréatique appelée *entérokinase*, une fois dans l'intestin grêle (**Polgar, 2005**).

La trypsine est une endopeptidase qui a la capacité de couper les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des chaînes polypeptidiques (**Laskowski et Kato, 1980**). Elle est spécifiquement conçue pour reconnaître et couper les liaisons contenant des résidus d'acides aminés basiques, tels que l'arginine ou la lysine. En biochimie, la trypsine est également utilisée pour cliver les protéines afin d'analyser leur structure et leur fonction (**Deryugina et Quigley, 2006**) (figure8).

La trypsine peut être impliquée dans d'autres processus physiologiques tels que la signalisation cellulaire et la migration cellulaire. En outre, des recherches ont démontré que la trypsine pourrait être impliquée dans la progression de certains types de cancers, ce qui en fait une cible prometteuse pour le développement de thérapies anticancéreuses (**Kouno et al., 2019**).

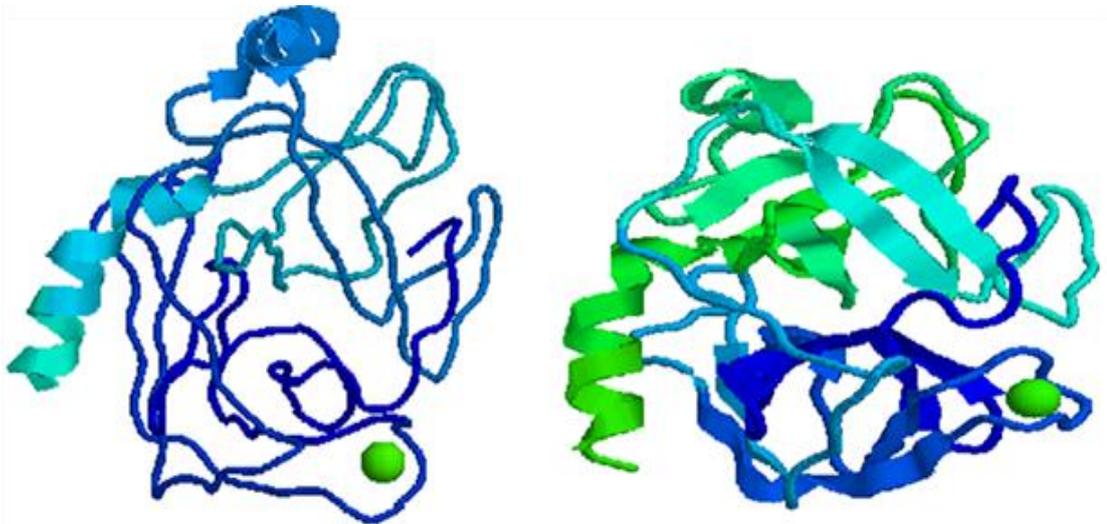


Figure 8 : La structure du trypsinogène (à gauche) et de la trypsine (à droite) (**Elgendy, 2016**).

3.2 Importance de la trypsine :

L'enzyme trypsine est une enzyme digestive produite dans le pancréas qui joue un rôle crucial dans la digestion des protéines. Les principales importances de l'enzyme trypsine sont :

-Digestion des protéines : la trypsine joue un rôle clé dans la digestion des protéines en décomposant les liaisons peptidiques et en fragmentant les protéines en peptides et en acides aminés. Cette décomposition permet une absorption optimale par l'organisme. Cette fonction est essentielle car les protéines sont nécessaires pour la croissance et la réparation des tissus corporels **(Walsh et Neurath, 1971)**.

-Contrôle de la digestion : Outre son rôle clé dans la digestion des protéines, la trypsine joue un rôle important dans la régulation de la digestion. Elle participe notamment à la libération d'autres enzymes digestives, notamment la chymotrypsine, l'élastase et la carboxypeptidase **(Laskowski, 1971)**.

-Utilisation dans la recherche scientifique : Enfin, la trypsine trouve également des applications en laboratoire pour des recherches scientifiques, notamment la purification des protéines, la détermination de la séquence des acides aminés et la production de peptides **(Jankowski et al., 2004)**.

3.3. Activité catalytique de l'enzyme libre :

La trypsine est une enzyme digestive synthétisée par le pancréas et qui joue un rôle clé dans la décomposition des protéines en acides aminés dans l'intestin grêle. Cette activité catalytique est vitale pour la digestion des protéines et la nutrition des organismes. Dans les prochaines lignes, je vais vous expliquer plus en détail l'activité catalytique de la trypsine :

C'est une enzyme qui agit en coupant les liaisons peptidiques voisines de la lysine et de l'arginine dans les chaînes polypeptidiques. Elle fragmente les protéines en peptides plus petits qui seront ensuite décomposés en acides aminés par d'autres enzymes. La trypsine est hautement spécifique pour ces acides aminés grâce à la présence d'un site actif contenant une triade catalytique composée d'histidine, d'aspartate et de sérine. Cette triade est responsable de l'activité protéolytique de la trypsine **(Hedstrom, 2002)**.

Avant d'être fonctionnelle, la trypsine est produite sous forme de *trypsinogène*, son précurseur inactif. *L'entérokinase*, une protéase pancréatique, est responsable de l'activation du *trypsinogène*. Ce processus d'activation nécessite la coupure d'un peptide spécifique, ce qui permet l'exposition du site actif de la trypsine **(Salvesen et Nagase, 1987)**.

L'activité catalytique de la trypsine est régulée par plusieurs mécanismes. L'un de ces mécanismes est l'inhibition, qui peut être exercée par des inhibiteurs spécifiques de la trypsine tels que *l'aprotinine*, *le benzamidine* et le soja trypsine inhibiteur. Ces inhibiteurs se lient au site actif de la trypsine et empêchent son activité catalytique (**Bode et Huber, 1992**).

Outre l'inhibition par des inhibiteurs spécifiques, la trypsine est également régulée par l'inhibition allostérique. Un exemple de régulation positive est l'ion calcium, qui peut se lier à la trypsine et stimuler son activité catalytique (**Lin et Tang, 2003**).

3.4. Effet du pH sur l'activité enzymatique de trypsine :

Le pH est un facteur important qui peut influencer l'activité enzymatique de la trypsine. La trypsine est une enzyme protéolytique qui décompose les protéines en peptides plus petits en clivant les liaisons peptidiques C-terminal des acides aminés arginine et lysine (**Polgár, 2005**).

Plusieurs études ont été menées pour évaluer l'impact du pH sur l'activité enzymatique de la trypsine, et il a été établi que la trypsine a une activité maximale lorsque le pH est compris entre 7,5 et 8,5. En dehors de cette plage de pH, l'activité enzymatique de la trypsine diminue considérablement. Lorsque le pH est inférieur à 7,5, la structure de l'enzyme se dénature, ce qui entraîne une diminution rapide de son activité enzymatique. De même, lorsque le pH est supérieur à 8,5, la charge de surface de l'enzyme est modifiée, affectant ainsi l'interaction entre l'enzyme et le substrat et entraînant une diminution de l'activité enzymatique. Ces résultats soulignent l'importance du pH optimal pour la trypsine et son rôle clé dans le maintien de son activité enzymatique. Il a été observé que des variations de pH peuvent non seulement affecter l'activité enzymatique de la trypsine, mais aussi réguler son activité (**Dubois et al., 1956**).

En effet, plusieurs études ont montré que la trypsine peut être activée ou inhibée en fonction des variations de pH. Par exemple, lorsque le pH est inférieur à 7,5, des ions H⁺ se lient aux résidus d'histidine présents dans la structure de l'enzyme, ce qui peut entraîner une inhibition de l'activité enzymatique de la trypsine. En revanche, lorsque le pH est supérieur à 8,5, des ions OH⁻ peuvent augmenter la réactivité des résidus d'histidine dans la structure de l'enzyme, ce qui conduit à l'activation de l'activité enzymatique de la trypsine. Ces résultats démontrent l'importance de la régulation du pH pour maintenir l'activité enzymatique optimale de la trypsine (**Dubois et al., 1956**). Il est important de noter que la trypsine est sensible aux variations de pH dans son environnement de travail. La présence de substances acides ou basiques dans l'échantillon peut modifier le pH, ce qui peut avoir un impact significatif sur l'activité enzymatique de la trypsine. Par conséquent, il est crucial de maintenir un pH stable et

optimal pour assurer une activité enzymatique maximale de la trypsine. Ce facteur doit être pris en compte lors de l'utilisation de la trypsine en laboratoire pour éviter les erreurs expérimentales et obtenir des résultats précis et fiables (**Boyer, 1971**).

3.5. Les Techniques d'immobilisation de la trypsine

Les techniques d'immobilisation de la trypsine peuvent être réalisées à l'aide de différents supports, tels que les supports inorganiques et organiques. Les supports inorganiques incluent des matériaux comme la silice, l'alumine, le verre et les nanoparticules métalliques, tandis que les supports organiques comprennent les polymères synthétiques et naturels (**Adhav et Singhal., 2016**).

Plusieurs méthodes ont été développées pour immobiliser la trypsine, notamment l'immobilisation physique, l'immobilisation chimique. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients en termes d'efficacité, de stabilité et de réutilisation de l'enzyme immobilisée (**Alves et al., 2011**). Ces dernières années, des recherches ont été menées pour améliorer les performances des enzymes immobilisées, notamment en combinant différentes techniques d'immobilisation pour produire des supports hybrides. Ces derniers peuvent améliorer la stabilité, l'activité et la réutilisation de la trypsine immobilisée (**Chibata et Tosa, 2013**).

3.5.1. Immobilisation sur les billes de verre avec le glutaraldéhyde

L'immobilisation de la trypsine sur des billes de verre avec du glutaraldéhyde est une méthode fréquemment utilisée pour augmenter la stabilité de l'enzyme et améliorer sa réutilisabilité dans les réactions enzymatiques. Les étapes clés de la technique d'immobilisation de la trypsine sur des billes de verre avec du glutaraldéhyde sont les suivantes :

- ❖ Préparation des billes de verre : Les billes de verre sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer les impuretés. Ensuite, elles sont activées avec de l'acide chlorhydrique et traitées avec une solution de polyéthylène imine (PEI) pour fournir des groupes amine pour la liaison avec la trypsine (**Chakraborty et Srinivasan, 2012**).
- ❖ Traitement avec le glutaraldéhyde : Les billes de verre sont traitées avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % pour former des ponts de liaison entre les groupes amine de la PEI et la trypsine. La concentration optimale de glutaraldéhyde varie en fonction de la taille et du type de la bille de verre utilisée (**Kim et Lee, 2001**).
- ❖ Liaison de la trypsine : La trypsine est ajoutée à la solution de billes de verre traitée avec le glutaraldéhyde et incubée pendant une période de temps déterminée pour permettre la formation de liaisons covalentes entre les groupes amine de la PEI et la trypsine. La quantité

de trypsine à ajouter dépend du volume de la solution de billes de verre et de la concentration de trypsine (**Li et al., 2011**).

- ❖ Lavage des billes de verre : Les billes de verre sont lavées avec une solution tampon pour éliminer les résidus de glutaraldéhyde et de trypsine non liée. Ce processus est répété plusieurs fois pour éliminer toutes les impuretés potentielles (**Li et al., 2011**).
- ❖ Stockage et utilisation : Les billes de verre immobilisées avec de la trypsine peuvent être stockées à des températures appropriées et utilisées dans diverses réactions enzymatiques. Les billes de verre peuvent être réutilisées plusieurs fois pour la digestion des protéines, ce qui augmente l'efficacité de l'immobilisation de la trypsine (**Kim et Lee.,2001 ; Li et al., 2011**).

3.5.2. Immobilisation sur les billes de verre via DITC :

L'immobilisation de la trypsine sur les billes de verre peut être réalisée à l'aide du DITC (N,N'-ditio-carbamoyl-2-iodo-salicycle) (**Karami et al.,2017**). Le DITC est utilisé pour introduire des groupes *thiocarbamoyl* sur les billes de verre, qui peuvent ensuite réagir avec les groupes amine de la trypsine, formant ainsi une liaison covalente stable entre la trypsine et les billes de verre (**Lu Y et al., 2009**).

Le processus d'immobilisation de la trypsine sur les billes de verre via le DITC peut être divisé en plusieurs étapes. Tout d'abord, les billes de verre sont traitées avec du DITC pour introduire les groupes thiocarbamoyl sur leur surface. Ensuite, la trypsine est ajoutée aux billes de verre fonctionnalisées, et les groupes amine de la trypsine réagissent avec les groupes thiocarbamoyl des billes de verre pour former une liaison covalente stable (**Yu et al., 2011**).

Le processus d'immobilisation peut être optimisé en ajustant les conditions de réaction, telles que la concentration de DITC, la durée de la réaction, la température, le pH, etc. Des études ont montré que des conditions optimales peuvent augmenter l'efficacité d'immobilisation et améliorer la stabilité de l'enzyme immobilisée (**Yu et al., 2011**).

L'immobilisation de la trypsine sur les billes de verre via le DITC présente plusieurs avantages par rapport à l'immobilisation sur d'autres supports. Les billes de verre ont une grande surface spécifique et une bonne stabilité mécanique, ce qui permet une forte densité d'immobilisation de l'enzyme et une longue durée de vie de l'immobilisation (**Cui et al., 2011**). De plus, la trypsine immobilisée sur les billes de verre via le DITC peut être facilement récupérée et réutilisée, ce qui permet une économie de coûts et une amélioration de l'efficacité du processus (**Li et al., 2004**).

3.5.3. Immobilisation sur les billes de verre avec le carbodiimide

L'immobilisation de la trypsine sur les billes de verre peut être réalisée via la méthode du carbodiimide. Cette méthode implique l'utilisation d'un agent de couplage pour former une liaison covalente entre la trypsine et les billes de verre (**Kohn et al., 2011**). Les étapes de l'immobilisation sont :

-Activation des billes de verre : Les billes de verre sont d'abord activées en les incubant dans une solution de carbodiimide, comme le N-(3-diméthylaminopropyl) -N'-éthylcarbodiimide (EDC), pendant une période de temps déterminée. L'activation des billes de verre permet de créer des sites réactifs sur leur surface (**Kohn et al., 2011**).

-Préparation de la solution de trypsine : La trypsine est préparée sous forme de solution dans un tampon approprié, tel que le tampon phosphate salin (PBS) (**Hwang et al., 2013**).

-Couplage de la trypsine aux billes de verre : La solution de trypsine est ajoutée aux billes de verre activées et incubée pendant une période de temps déterminée. Pendant cette période, la trypsine se lie covalentement aux sites réactifs sur les billes de verre via l'agent de couplage EDC (**Hwang et al., 2013**).

-Blocage des sites réactifs restants : Les sites réactifs restants sur les billes de verre sont bloqués avec une solution de bloqueur, comme la solution de bovin sérique albumine (BSA), pour éviter la liaison non spécifique de protéines ultérieures (**Hwang et al., 2013 ; Ouyang et al., 2014**).

-Lavage des billes de verre : Les billes de verre sont lavées plusieurs fois avec un tampon approprié pour éliminer les résidus non liés de trypsine et d'autres réactifs (**Ouyang et al., 2014**).

-Stockage des billes de verre : Les billes de verre immobilisées sont stockées dans une solution tampon appropriée, telle que le PBS, à une température appropriée jusqu'à leur utilisation ultérieure (**Ouyang et al., 2014**).

3.6. Étude de la variation du pH sur l'activité de l'enzyme immobilisée :

La trypsine est une enzyme dont l'activité est affectée par plusieurs facteurs, notamment la concentration de l'enzyme, la température et le pH. Afin d'étudier l'impact de la variation du pH sur l'activité de la trypsine immobilisée, il est possible de mesurer son activité enzymatique à différents pH (**Hussain et Ahmad, 2018**), vu que la variation du pH peut avoir un effet particulièrement important sur l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée (**Roberts, 1975**). Selon plusieurs études, la trypsine a une activité optimale dans des conditions de pH alcalines, qui se situent généralement entre 7,5 et 9 (**Roberts, 1975**). En dehors de cette plage de pH, son activité enzymatique diminue rapidement. Si le pH descend en dessous de cette

plage, la trypsine devient inactive, et elle se dénature complètement à un pH de 2 (**Khan et Khan, 2016**).

Le pH influence l'activité enzymatique de la trypsine en affectant sa structure et sa charge électrique. À un pH bas, la trypsine est protonée et les charges électriques sur les résidus d'acides aminés clés sont modifiées, ce qui affecte la conformation de l'enzyme et réduit son activité. À un pH élevé, la trypsine est déprotonée et adopte une conformation plus ouverte et plus active (**Pan et Wu, 2019**).

Choi *et al* (2015) ont étudié l'effet de différents pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, et 10) sur l'activité et la stabilité de l'enzyme immobilisée trypsine dans des solvants organiques. Les résultats ont montré que l'activité maximale a été atteinte à pH 7 et que l'enzyme immobilisée était plus stable dans des solvants organiques à pH acide (3-5) (**Choi et al., 2015**).

Une autre étude de Mousavi *et al* (2019) a testé l'effet de différents pH (4, 7, et 10) et de températures (30, 40, et 50°C) sur l'activité de la trypsine immobilisée sur des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées. Les résultats ont montré que l'activité maximale a été atteinte à pH 7 et une température de 40°C (**Mousavi et al., 2019**).

Cependant, il est important de noter que l'impact du pH sur l'activité enzymatique de la trypsine peut dépendre des conditions spécifiques de l'expérience, telles que la concentration en substrat et la présence de cofacteurs. Par conséquent, l'optimisation du pH pour l'activité enzymatique de la trypsine doit être effectuée pour chaque application spécifique (**Roberts, 1975 ; Pan et Wu., 2019**).

3.7. Effet de l'immobilisation sur l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la trypsine peut être significativement altérée par son immobilisation. Cette enzyme protéolytique est impliquée dans l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines et trouve des applications dans divers domaines industriels tels que la production d'acides aminés et de peptides, la préparation de protéines purifiées et la digestion des protéines dans les aliments. Toutefois, son utilisation en tant qu'enzyme libre peut présenter certaines limitations en raison de sa faible stabilité et de sa dégradation facile (**Cao, 2003**).

L'immobilisation de la trypsine peut avoir des avantages tels que l'amélioration de sa stabilité et l'augmentation de sa durée de vie, en plus d'améliorer son rendement et son efficacité dans les applications industrielles. Les méthodes d'immobilisation couramment utilisées pour la trypsine comprennent l'immobilisation sur support solide, l'immobilisation en gel et l'immobilisation en phase liquide (**Li, 2017**).

Chapitre 3 : Exemple d'enzyme immobilisée (Trypsine)

L'immobilisation de la trypsine peut impacter ses propriétés catalytiques, notamment son activité enzymatique. Des études ont mis en évidence que l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée peut différer de celle de l'enzyme libre en raison de modifications de sa conformation et de son environnement micro-environnemental **(Li et Wang, 2016)**.

Malgré les effets potentiels sur l'activité enzymatique de la trypsine immobilisée, des études ont montré que cette dernière peut également être améliorée en utilisant des supports adaptés et des méthodes d'immobilisation efficaces **(Li et Wang, 2016)**.

En somme, l'immobilisation de la trypsine peut avoir des conséquences significatives sur son activité enzymatique, mais elle peut également améliorer sa stabilité et son rendement dans les applications industrielles. Cependant, pour optimiser les méthodes d'immobilisation de la trypsine pour des applications spécifiques, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-jacents de ces effets **(Guo et al., 2019)**.

Conclusion générale

En conclusion, l'immobilisation enzymatique est une technique importante pour améliorer la stabilité, l'efficacité et la durée de vie des enzymes dans les applications industrielles. Toutefois, il est important de choisir une méthode d'immobilisation et un support adapté en fonction de l'enzyme et de l'application spécifiques. Les effets de l'immobilisation sur l'activité enzymatique peuvent varier et ont été étudiés en détail pour plusieurs enzymes, y compris la trypsine. Des études ont montré que l'activité enzymatique peut être altérée en raison de changements de conformation et de microenvironnement, mais des améliorations ont également été observées en utilisant des supports adaptés et des méthodes d'immobilisation efficaces (**Amaral et al., 2017**).

Parmi les supports les plus couramment utilisés figurent les supports solides, les gels et les phases liquides. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-jacents de ces effets et pour optimiser les méthodes d'immobilisation de manière à maximiser l'activité enzymatique pour des applications spécifiques (**Zanetti-Ramos et al., 2015**).

Les différentes techniques d'immobilisation de la trypsine comprennent l'immobilisation sur un support solide, l'immobilisation dans un gel et l'immobilisation en phase liquide. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients en termes de coût, de stabilité, d'efficacité et de facilité d'utilisation. D'autres approches, comme l'encapsulation des enzymes dans des nanoparticules biocompatibles, peuvent également être utilisées pour réduire leur toxicité potentielle (**Singh et al., 2014**).

Les recherches futures devraient se concentrer sur l'optimisation des méthodes d'immobilisation pour des applications spécifiques, ainsi que sur l'amélioration de la compréhension des mécanismes sous-jacents des effets de l'immobilisation sur l'activité enzymatique. Les avancées dans la conception et la synthèse de supports innovants pourraient également conduire à des améliorations significatives de la performance enzymatique (**Torres et al., 2019**).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Aldridge S. (2013).** Industry backs biocatalysis for greener manufacturing. *Nature Biotechnology*, **31**, 95-96.
- **Alves C. S., Prazeres D. M. & Coelho M. A. (2011).** Immobilization of trypsin on magnetic particles: optimization of the immobilization step. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **71**, 29-35.
- **Amaral. (2021).** "Immobilization of trypsin on silica-based materials: effect of support functionalization on enzyme activity," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. **141**.
- **Arumugam M., Venuvanalingam P., Ramu A., Jeyadevan S., Shanmugam G. & Chinnathambi S. (2018).** Immobilization of lipase on activated.
- **Assamoi A.A., Destain J. & Thonart P. (2009).** *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**, 281–294.
- **Azmi W. H., Sulaiman S. A. & Ibrahim N. A. (2020).** Immobilization of lipase on inorganic oxide supports: A review. *Catalysts*, **10**, 531.
- **Barrett A.J., Bateman A. & Rawlings N.D. (2010).** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **38**(Database issue), D227-D233. doi:10.1093/nar/gkp971.
- **Berg J.M., Tymoczko J.L. & Stryer L. (2002).** *Biochemistry*. 5th edition. W H Freeman.
- **Bhatia S.K., Kim Y.-H. & Kim H.-J. (2018).** Recovery of enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, **36**, 1584-1598.
- **Bornscheuer, U. T. (2013).** Immobilizing enzymes: how, why and which? In *Immobilization of enzymes and cells* (pp. 1-22). Springer, Berlin, Heidelberg.
- **Branden C., & Tooze J. (1999).** *Introduction to Protein Structure*, 2nd edition. Garland Publishing.
- **Brady, D., & Jordaan, J. (2009).** Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, **31(11)**, 1639-1650.
- **Brady D., Jordaan J. & Granger M. (2004).** A review of cell immobilization technology for enzyme immobilization. *Critical Reviews in Biotechnology*, **24(2-3)**, 1-17.
- **Brena B. M. & Batista-Viera F. (2006).** Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobilization of enzymes and cells*, 15-30.
- **Buchner E. (1897).** Alcoholic fermentation without yeast cells. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **30**, 117-124.
- **Betancor L., López-Gallego F. & Hidalgo A. (2015).** The quest for an efficient biocatalyst: A booming industry.
- **Cao L. & Carrier R. L. (2017).** Advances in the design of solid oral dosage forms for targeted delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **116**, 168-186.
- **Cao L., van Langen L. M., & Sheldon R. A. (2003).** Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology*, **14(4)**, 387-394. doi: 10.1016/s0958-1669(03)00087-1 (les etapes de reticulation).

- **Cao L., van Langen L. M., Sheldon R. A. & van Rantwijk F. (2003).** Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, **32(1)**, 405-417.
- **Chen J., Wang J., Zhang Y., Zhou X. & Zhou Y. (2013).** Immobilization of α -amylase on modified magnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **92**, 15-20.
- **Choi J. H., Jung S. J., Lee J. H., Park C. S. & Kim H. S. (2015).** pH-Dependent activity and stability of immobilized trypsin in organic solvents. *Process Biochemistry*, **50(3)**, 443-450.
- **Chakraborty S., Makhija U. (2019).** Recent advances in screening methods for enzyme identification and engineering. *Trends in Biotechnology*, **37(9)**, 981-994.
- **Chakraborty S., Srinivasan M. (2012).** Immobilization of trypsin onto glass beads for proteolysis of proteins. *Analytical biochemistry*, **426(1)**, 33-37.
- **Chopra S., Harwood C.R. (2003).** Biotechnology in pharmaceutical manufacturing. *Biotechnology Annual Review*, **9**, 131-166.
- **Cornish-Bowden A. (2014).** Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *Pure and Applied Chemistry*, **86(7)**, 1429-1439.
- **Cui M., Zhang Y. & Zhang. (2014).** Immobilization of trypsin on glass beads via a two-step method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 951-952:84-90.
- **Dahlbäck B., Villoutreix B. O. (2005).** Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **25(7)**, 1311-1320. doi: 10.1161/01.ATV.0000168415.99457.52.
- **Deryugina E. I., Quigley J. P. (2006).** Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-7.
- **DeMoss R. D., Yocum C. F. & Kretsinger R. H. (1977).** Immobilized enzymes: methods and applications. Academic Press.
- **Dwevedi A., Kayastha A. M. (2019).** Immobilization of enzymes on synthetic polymers and their applications in food processing industries: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, **126**, 915-925.
- **D. B. Hodge., R. A. Cukier. (1990).** "Immobilization of Enzymes for Industrial Applications", *Critical Reviews in Biotechnology*, **vol. 10**, no. **3**, pp. 243-267.
- **Fersht A. (1999).** Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. W H Freeman.
- **Fessner W.D., Arroyo M. (Eds.). (2010).** Modern biocatalysis: Stereoselective and environmentally friendly reactions. John Wiley & Sons.
- **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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**, 313-321.

- **Francesco Secundo**, Cite this: *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6250). This journal is c The Royal Society of Chemistry 2013.
- **Fox P.F., McSweeney P.L. (2013)**. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects* (4th ed.). Springer Science & Business Media.
- **Fresht A. (1985)**. Enzyme structure and mechanism. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 13, 149-14.
- **Gao X., Wang Y., Liu D., Li Z. (2021)**. Enzyme engineering for enhanced stability and catalytic performance. *ACS Catalysis*, **11**(7), 3893-3911.
- **Gao Y., Hua S. (2019)**. Safety assessment of enzymes used in food and pharmaceutical applications: a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **107**, 104423.
- **Garcia-Galan C., Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R., & Rodrigues R. C. (2011)**. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance.
- **Gainer J. L. (1982)**. Immobilized enzymes in food processing. *Journal of Chemical Education*, **59**(1), 30-34.
- **Guo J., Liu Y., Huo D., & Lu Z. (2019)**. Recent advances in protein-based materials for immobilization of enzymes and their applications. *Journal of Materials Chemistry B*, **7**(21), 3277-3296.
- **Guo L., Wang Y., & Wang W. (2013)**. Immobilization of enzymes on porous materials: from fundamentals to applications. *ChemCatChem*, **5**(6), 1360-1381.
- **Ghouzlan BENNOUR. (2022)**. Les enzymes d'origines fongiques et leurs emplois dans la biotechnologie - université center of abdalhafid boussouf – MILA Mémoires Maste.
- **G. Xie., W. Lu. (2014)**. Characterization of immobilized enzymes: A review", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. **105**, pp. 76-94.
- **Guzik U., Hupert-Kocurek K. (2013)**. Overview of commonly used methods in enzyme immobilization. In *Immobilization of enzymes and cells*.
- **Guo Y., Tang H., Li X., & Zhou P. (2019)**. Immobilization of trypsin on a magnetic metal-organic framework for efficient protein digestion. *Analytical Methods*, **11**(1), 43-49.
- **Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009)**. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, **38**(2), 453-468.
- **H. Baharifar., M. R. Mehrasbi, & M. Nasrollahzadeh. (2018)**. "Recent advances in enzyme immobilization on nanomaterials for biomedical applications", *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol.**46**, no. 2, pp. 321-331.
- **Heldon R. A. (2007)**. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **349**(8-9), 1289-1307.
- **Hong C., Lee J. (2020)**. Cost-effective strategies for industrial enzyme production. *Enzyme and Microbial Technology*, **135**, 109488.

- **Hwang BH., Kim KJ., Kim CH., Lee KW., Park JK. & Park KD. (2013).** Immobilization of trypsin on poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres using carbodiimide chemistry for protein digestion. *Analyst*. **138(23)**,7262-70. doi: 10.1039/c3an01331a.
- **Hwang E. T., Gu M. B. & Shim W. G. (2004).** Immobilization of enzymes for biosensor applications. *Biochip Journal*, **5(2)**, 109-120.
- **Kastle J. H., Loevenhart A. S. (1916).** Immobilized enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, **27(1)**, 255-269.
- **Jadhav S. B., Singhal R. S. (2016).** Immobilization of trypsin: a review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **126**, 1-16.
- **Jankowski M. D., Henry C. S. & Broadbelt L. J. (2004).** Challenges in the high-throughput discovery of kinetic mechanisms of biocatalysts. *Current opinion in biotechnology*, **15(4)**, 314-324. doi: 10.1016/j.copbio.2004.06.004.
- **Jia F., Narinesingh D. & Penicaut J. P. (2018).** Immobilization of enzymes by cross-linking. In *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 499-510). Elsevier.
- **John Brady. (2009).** "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance Continues", *Chemical Engineering Progress*, vol. **105**, no. 7, pp. 44-50.
- **John P., Pezacki. (2013).**"Surface Modification for Immobilization," in *Enzyme Immobilization: Methods and Protocols*, ed. Mohammed Bouzidi and Hafida Cherkaoui Malki (New York, NY: Springer New York, 13-24.
- **J. Zhou W. Li. & Q. Zhang, (2010)**"Immobilized enzyme technologies for industrial wastewater treatment: A review", *Bioresource Technology*, vol. **101**, no. 10, pp. 3249-3260. (Les etapes d'adsorption)
- **Karami A., Fathinia M. & Sedaghat F. (2017).** Immobilization of trypsin on glass beads via DITC. *Int J Pept Res Ther.*; **23(1)**,33-39.
- **Khan R., Khan M. H. (2016).** Effect of pH on enzyme activity: An overview. *International Journal of Bioassays*, **5(5)**, 4939-4942.
- **Kim B., Lee K. Y. (2001).** Immobilization of trypsin onto porous glass beads using glutaraldehyde as a coupling agent. *Journal of microbiology and biotechnology*, **11(2)**, 270-277.
- **Kohn DH., Sarmadi M., Helman JD., Krebsbach. PH.** Effects of using various modes of trypsin digestion on the osteogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part C*.
- **Krajewska B. (2004).** Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, **35(2-3)**, 126-139.
- **Laskowski Jr, M. (1971).** Serine proteinase inhibitors. *Methods in enzymology*, **19**, 826-841. doi: 10.1016/S0076-6879(71)19062-3.
- **Li J., Cheng Z. & Zhu Y. A. (2004).** novel trypsin immobilization method for protein digestion in proteome analysis. *J Chromatogr A.* ;1058(1-2).

- **Li J., Liang R., Liu Y. & Zhang, X. (2018).** Recent advances in liposome-based enzymatic catalysis. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **34**, 25-34.
- **Li W., Li X., Liu Q., Li R. & Li C. (2011).** Immobilization of trypsin on magnetic silica microspheres using glutaraldehyde as a coupling agent. *Journal of Chromatography B*, **879**.
- **Li Y., Li L., Li G., Li X. & Li Y. (2019).** Recent advances in enzyme immobilization techniques: Metal-organic frameworks as novel substrates. *Coordination Chemistry Reviews*, **378**, 476-498.
- **Li Z., Wang X. (2016).** Immobilization of trypsin on chitosan microspheres for efficient protein digestion. *Journal of Separation Science*, **39(14)**, 2745-2753.
- **Li Z., Zhang X., Wang X. & Wang X. (2017).** Immobilization of trypsin onto a magnetic nanoparticle carrier for efficient protein digestion. *Analytical Methods*, **9(11)**, 1842-1848.
- **Liu J., Yang Y., Jiang Y., Zhang H., Xie S. & Zhou Y. (2019).** Comparative study of glucose oxidase immobilized on three-dimensional graphene oxide via physical adsorption and covalent binding. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **162**, 212-219.
- **Liu X., Wang X., Yang H., He M. & Chen J. (2019).** Immobilization of enzymes on inorganic materials for biocatalysis: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **162**, 158-174.
- **Lu Y., Lin B., Li Y. (2009);** Immobilization of trypsin on magnetic silica microspheres via a DITC linker for protein digestion. *Anal Bioanal Chem.* **395(5)**,1463-1471.
- **Lu Y., Wang G., Gao J. & Xue S. (2013).** Immobilization of enzymes on magnetic nanoparticles for biocatalysis. *Methods in Molecular Biology*, **1051**, 181-190.
- **M. P. Ferrer., A. M. Fuentes., R. M. Blanco., J. M. Grazu. & J. M. Guisan. (2001).** Inclusion of enzymes in macromolecular networks: from statistical effects to the controlled immobilization of enzymes as biomacromolecular conjugates, " *Process Biochem.*, **vol. 36**, no. 6, pp. 547-555.
- **Mamo G., Gessesse A. (1999).** Purification and characterization of two raw-starchdigesting thermostable α -amylase from a thermophilic Bacillus. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**.
- **Mateo C., Abian O., Bernardo A. & amp Cuenca E. (2019).** Strategies for enzyme immobilization and stabilization. *In Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 329-348). Elsevier.
- **Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan R. & Guisan J. M. (2002).** Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins.
- **Mateo C., Abian O., Bernardo A., Cuenca E. & Fuentes M. (2019).** Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *In Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 1-22). Humana, New York, NY.
- **Mateo C., Abian O. & Fernández-Lafuente R. (2007).** Preparation of enzyme–biopolymer conjugates for biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **18(3)**, 213-219.
- **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(6)**, 1451-1463. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018

- **M. V. D. Zanetti-Ramos. (2015).** "Immobilization of trypsin on mesoporous silica: influence of pore size, texture, and surface chemistry on enzyme activity and stability," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. **114**, pp. 79-87.
- **Malaekheh-Nikouei B., Morshedi D. (2013).** Immobilization of lipase enzyme on multi-walled carbon nanotubes.
- **Mousavi S. M., Fathi A., Amiri A. & Tavakoli A. (2019).** Immobilization of trypsin on functionalized magnetic nanoparticles: Effects of pH and temperature on enzymatic activity.
- **Naidja A., Huang P.M. & Bollag J.M. (1997).** *Molecular catalysis A: Chemical*, **115**,1997, 305-316.
- **Ouedraogo G.A. (1986).** CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES VALEURS SERIQUES DES ENZYMES DU ZEBU GOBRA (PAL, TGP, TGO, GGT ET LDH). Thesis, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar. (2018). *Review on immobilization of enzymes by adsorption. Bioengineering*, **5(3)**, 48. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5030048>.
- **Ouyang P., Li X., Xu Y., Wang Z., Cai R. & Chen H. (2014).** Immobilization of trypsin on magnetic nanoparticles via the carbodiimide activation method for proteomic analysis. *J Sep Sci.* ;**37(3)**, 277-84. Doi : 10.1002/jssc.201300771.
- **Pasteur L. (1862).** Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Annales de Chimie et de Physique*, **3(24)**, 25-58.
- **Piccolino M. (2000).** Biological machines: From mills to molecules. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 149-152.
- **P. G. Roussos., E. B. Velonia. (2013).** Adsorption-based immobilization of enzymes: A critical review; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. **87**, pp. 56-67.
- **Polakovič M., Švitel J. (2002).** Biocatalytic membrane reactors: a review. *Chemical papers*, **56(1)**, 1-14.
- **Polgar L. (2005).** The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62(17)**, 2161-2172.
- **Ramanathan S., Rajendran A. & Thangavelu V. (2017).** A comprehensive review on immobilized enzyme: Effect of immobilization techniques and support materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, **103**, 1196-1207.
- **Rathi P., Bradoo S. & Saxena R. K. (2013).** Immobilization of enzymes: A literature survey. *Chemical Engineering Communications*, **200(3)**, 311-347.
- **R.D. Kidd., H.M. Baker., A.J. Mathews., T. Brittain. & E.N. Baker. (2001).** the RCSB PDB (www.pdb.org) of PDB ID 1I3D.
- **R. K. Saxena., P. Anand, & R. K. Saran. (1999).** Characterization of immobilized enzymes; *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. **19**, no. 2, pp. 139-179.
- **Rawlings ND., Barrett AJ. & Bateman A. (2010).** the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*;38(Database issue): D227-D233. doi:10.1093/nar/gkp971.
- **Roberts G. C. K. (1975).** The trypsin problem. *Methods in Enzymology*, **47**, 25-38.

- **Riva S., Danieli B. (1994).** Pure & Appl. Chem, **66**(10/11), 2215-2218.
- **Sheldon R. A. (2007).** Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced Synthesis & Catalysis, **349**(8-9), 1289-1307.
- **Sheldon R. A. (2011).** Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced Synthesis & Catalysis, **353**(7), 1223-1246.
- **Sheldon R. A. (2014).** Enzyme immobilization: an overview. Methods in molecular biology (Clifton, NJ), **1051**, 3-10.
- **Sheldon R. A. (2016).** Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced Synthesis & Catalysis, **358**(3), 389-403.
- **Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013).** Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, **42**(15), 6223-6235.
- **Pourmadadi, M., Soleimani Dinani, H., Saeidi Tabar, F., Khassi, K., Janfaza, S., Tasnim, N., & Hoorfar, M. (2022).** Properties and applications of graphene and its derivatives in biosensors for cancer detection: a comprehensive review. *Biosensors*, **12**(5), 269.
- **Singh R., Kumar R. (2007).** Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, **7**(4), 355-369.
- **Singh R., Kumar M., Mittal A. & Mehta P. K. (2016).** Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, **6**(2), 174.
- **Singh R., Tiwari M. K., Singh R., Lee J. K. & Kim I. H. (2013).** Immobilization of enzymes: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(19), 7919-7933.
- **S. Rezaei., S. Mohammadi. (2016).**"Enzyme immobilization: an update," *Journal of Chemical Biology* **9**, no.1: 1-20. (Les étapes de liaison ionique)
- **Sumner J.B. (1926).** The isolation and crystallization of the enzyme urease. *Journal of Biological Chemistry*, **69**, 435-441.
- **S. S. Azmi. (2013),** "Chapiter 2 - Preparation and Evaluation of Immobilized Enzymes," in *Methods in Molecular Biology Enzyme Immobilization: Methods and Protocols*, ed. Mohammed Bouzidi and Hafida Cherkaoui Malki (New York, NY: Springer New York, 11-21.
- **Singh R. P., Singh P. & Singh R. L. (2014).** Immobilization of enzymes: an *overview of different approaches*. *Biotechnology*, **4**(3), 283-289.
- **Eric HUSSO. (2021).** THESE Présentée à l'INPL, L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires.
- **T. Wei., X. He., J. Li., Y. Li. & Y. Li. (2017).** "Enzyme immobilization: an update," *Chem. Soc.Rev.*, **vol. 46**, no. **24**, pp. 7275-7339.
- **Tischer, W., & Wedekind, F. (2002).** *Immobilized in biotechnology*, **20**(8), 376-382.

- **Tischer W., & Wedeking T. (1991).** Immobilized enzymes: methods and applications. *Topics in catalysis*, **4(1-2)**, 133-143.
- **Torres R., Mateo C., & Fernández-Lafuente R. (2019).** Enzyme immobilization: an update. *Methods in molecular biology*, **1885**, 15-30.
- **Torres R., Mateo C., & Fernandez-Lafuente R. (2015).** Improvement of enzyme properties by immobilization. In *Methods in molecular biology* (Vol. **1200**, pp. 231-254). Humana Press, New York, NY.
- **Torres-Salas P., Jiménez A., Segura R.L. (2015).** Industrial applications of lipases: a review.
- **Ulijn R. V. (2006).** Enzyme immobilization: *An overview*. In *Methods in biotechnology* (Vol. **22**, pp. 1-15). Humana Press. **132**.
- **Verma M. L., Barrow C. J., & Puri M. (2013).** Nanofiber-based immobilization strategies for enzyme stabilization. *Biotechnology Advances*, **31(7)**, 1085-1099. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.03.011.
- **Wang D., Li D., Li J., & Liu H. (2016).** Recent advances in immobilized enzyme technologies for biodiesel production and its current status and future prospects. *Bioresource Technology*, **200**, 1054-1066. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.058.
- **Wang D.I., Lu Y. (2004).** Immobilization of enzymes by metal binding. In *Methods in enzymology* (Vol. **388**, pp. 312-324). Academic Press.
- **Wang X., Li Z. & Yang H. (2016).** Enzyme immobilization: an update. *Advanced Materials Research*, **1133**, 202-206.
- **Walsh K.A., Neurath H. (1971).** Trypsin and chymotrypsin. *Methods in enzymology*, **19**, 41-74. doi: 10.1016/S0076-6879(71)19009-6.
- **Webb E.C. (1992).** Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. Academic Press.
- **Wei W., Wang J., Wang J., Yuan Y. & Zhang X. (2020).** Recent progress in nanomaterial-based immobilized enzymes for biomedical applications. *Journal of Nanobiotechnology*, **18(1)**, 1-15.
- **Yu H., Liu Y. & Lu Y. (2011).** Optimization of trypsin immobilization on magnetic silica microspheres via a DITC linker for protein digestion. *J Sep Sci.*, **34(7)**, 807-813.
- **Zhang H., Zhang Y., Wang X., Liu C., Liu Y. & Zhao Y. (2018).** Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles by covalent bonding, adsorption and entrapment: A comparison study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **146**, 77-85.
- **Zhang J., Zhang J., Fang Z., & Wang X. (2015).** Immobilization of glucose oxidase onto silica-coated magnetic nanoparticles for glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **209**, 649-656.
- **Zhang Y.-H.P., Lynd L.R. (2005).** Ethanol production from lignocellulosic biomass. In *Biofuels* (pp. 323-342). Springer, Dordrecht.

- **Zhou C., Wang R., & Wu Z. (2012).** Recent advances in immobilized enzyme technologies for biofuels production. *Energy & Environmental Science*, **5(10)**, 9758-9776.
- **Zang Y., Cui X., Wang J., & Wang X. (2017).** Covalent immobilization of lactase on the epoxy-functionalized magnetic nanoparticles with improved stability and reusability. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatique*, **136**.