REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie macromoléculaire

Par :

ZERROUKI Zakarya

SALHI Fatiha

Thème :

Optimisation de l'immobilisation d'une enzyme Dans un complexe de biopolymères

Soutenu publiquement le : 30/06/2019, Devant le jury composé de:

GASMI Sara Nawel	MCB	Université de Médéa	Présidente
EULDJI Amel	MAB	Université de Médéa	Examinatrice
KIRDI Rachida	MAB	Université de Médéa	Encadreur

Année universitaire : 2018/2019.

ملخص

في هذه الدراسة ، قمنا باختيار صيغة ALG-GLT الجديدة التي سيتم من خلالها تثبيت الإنزيم، حيث أظهرنا أن التركيز الأمثل كان ALG 2٪ وGLT 2٪ وبالتالي، حصلنا على كريات صغيرة تتراوح بين 2.9 و 3.5 ملم حسب نسبة الجيلاتين في الخليط.

بعد ذلك ، تم تجميد إنزيم (α-amylase) عن طريق التضمين في كريات من نظامين مختلفين من البوليمار الحيوي (الجينات الصوديوم (ALG) والجينات الصوديوم + الجيلاتين ((ALG-GLT). هو أفضل نسبة تثبيت لأن نظام-ALG GLTكان 54 ٪ مقارنة بالنظام العادي (ALG) 35 ٪. تمت دراسة امتصاص هذا الإنزيم من كلا النظامين. نسبة الامتصاص سجلت الحد الأدنى باستعمال نظام ALG-GLT بنسبة 5٪.

أعقبت هذه الدراسة تحديد الخصائص الحركية ودراسة إعادة تدوير الخرزات ، ويعطي نظام 2٪ ALG و 2٪ GLT تقاربًا مهمًا مقارنة نظام ALG والإنزيم الحر ب k_m يقدر ب$2.16*10^{-3}$.يمكن إعادة استخدام نفس الكريات (ALG-GLT)ستة مرات مع الحفاظ على 55 ٪ من نشاطها الأولي

الكلمات المفتاحية :ألفا أميلاز ، ألجينات الصوديوم ، الامتصاص ، الجيلاتين ، الدمج.

.RÉSUMÉ

Dans cette étude, nous avons sélectionné la formule optimale pour le support ALG-GLT sur lequel l'α-amylase serait immobilisée, où nous avons montré que la bonne composition utilisée était de 2% ALG et 2% GLT. Nous avons donc obtenu des billes de taille macrométriques qui vari entre 2.9 et 3.5 mm selon la proportion de GLT dans le mélange.

Par la suite, l'enzyme (α-amylase) a été immobilisée par inclusion dans des billes de deux systèmes différents de biopolymères (ALG) et (ALG-GLT)). Le meilleur pourcentage d'immobilisation est celui du système ALG-GLT qui est de 54% par rapport au système ordinaire (ALG) (Pourcentage de 35%). La désorption de cette enzyme à partir des deux systèmes a été étudié. Le pourcentage de désorption est minimum pour le système ALG-GLT avec un pourcentage de 5%.

Cette étude a été suivie par la détermination des paramètres cinétiques et l'étude de recyclage des billes, le système de 2% ALG et de 2% GLT donne une affinité importante comparant avec le système ALG et l'enzyme libre avec une K_m de 2,16 $.10^{-3}$. Les mêmes billes (ALG-GLT) peuvent être réutilisées six foies avec conservation de 55% de son activité initiale.

Mots clés: α-amylase, Alginate de sodium, Désorption, Gélatine, Inclusion, immobilisation.

ABSTRACT

In this study, we selected the optimal formula for our new ALG-GLT support on which the enzyme would be immobilized, where we showed that the right concentration used was 2% ALG and 2% GLT. So we got the beads of macrometric size which varies between 2.9 and 3.5 mm depending on the proportion of gelatin in the mixture.

Subsequently, an enzyme (α-amylase) was immobilized by inclusion in beads of two different systems of biopolymer (sodium alginate (ALG) and sodium alginate + gelatin (ALG-GLT)). The best percentage of immobilization is that of ALG-GLT system with 54% compared to the regular system (ALG) (35% percentage). The desorption of this enzyme from both systems has been studied. The desorption percentage is minimum for the ALG-GLT system with a percentage of 5%.

This study was followed by the determination of the kinetic parameters and the recycling study of the beads, the system of 2% ALG and 2% GLT gives an important affinity comparing the ALG system and the free enzyme with a Km of 2,16 $.10^{-3}$. The same beads (ALG-GLT) can be reused six times with conservation of 55% of its initial activity.

Key words : α-amylase, Sodium alginate, Desorption, Gelatin, Inclusion, immobilisation.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier en premier lieu ALLAH, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail (ELHAMDOU LILLAH).

Nos vifs remerciements et notre grand respect s'adresse à madame KIRDI Rachida pour son encadrement; ses efforts, son aide constante et ses précieux conseils.

Nos remerciements sont adressés aux membres de Jury madame GASMI Sara Nawel (présidente) et madame EULDJI Amal (examinatrice) qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à l'égard de madame GASMI Sarah Nawel pour ses conseils utiles et leur encouragement.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Au cours de nos travaux, nous avons eu le plaisir de travailler avec tous nos collègues du laboratoire de biologie de la Faculté des sciences. Nous leur exprimons nos remerciements pour l'intérêt qu'ils ont portent à notre travail et de nous aider toujours.et spécialement pour les ingénieurs de laboratoire de biologie BELKHOUS Imane, TIFOURA Amina, MEZAAD Faiza Pour tout le soutien et l'assistance qu'ils nous ont donnés.

Enfin, nous remercions tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail à:

Mon professeurs qui était avec moi dans tous les degrés de succès Mon père

A qui le paradis sera-t-il sous ses pieds Ma mère

Le petit Luqman et mes sœurs et leurs belles familles

Tous mes camarades de spécialité

Tous mes amis et tous ceux que je connais

Sans oublier les compagnons du chemin: Adel, Amin, Bilal et Islam.

Zakarya

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents

A mon frère Ryad et sa famille

A mes sœurs : Ferial et sa belles famille, Souad et sa belles famille

A toute la famille Salhi, Nassima, Khawla, Oussama

A mes amies : Malika, Khaira, Ferial, Wahiba, Souad , Amina , Asma et Karima

A toute mes camarades de 2èmes années master chimie macromoléculaire 2018/2019.

Fatiha

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre I: Enzymes	
I.1. Les enzymes.....	3
I.1.1. Classification des enzymes.....	4
I.1.2. Source d'enzyme.....	4
I.1.2. 1 Source microbienne.....	5
I.1.2.2 Source Végétale.....	5
I.1.2.3 Source Animale.....	5
I.2. Application des enzymes.....	5
I.3. α-amylase.....	6
I.3.1. Nomenclature.....	7
I.3.2. Structure.....	7
I.3.3. Les différentes sources et origines de l'α-amylase	7
I.3.4. Mécanisme d'action.....	9
I.3.5. Hydrolyse de l'amidon.....	10
I.3.6. Hydrolyse enzymatique de l'amidon.....	11
I.3.7. Propriétés de l'α-amylase.....	12
I.3.8. Applications industrielles.....	13
I.4. Immobilisation d'enzymes.....	14
I.4. 1. Immobilisation par adsorption ou par liaison ionique.....	15
I.4. 2. Immobilisation par réticulation.....	16
I.4. 3. Immobilisation par encapsulation.....	16
I.4. 4. Immobilisation par inclusion.....	16
Chapitre II: Systèmes polyélectrolytes.	
II.1. Polyélectrolytes.....	18
II.1. 1. Polysaccharides polyélectrolytes.....	18
II.1. 1. 1. Polysaccharides cationiques.....	18
II.1.1.2. Polysaccharides anioniques.....	19
II.1. 2. Polyélectrolytes amphiphiles.....	21
II.1. 2. 1. Balance entre les forces répulsives et attractives.....	22
II.1. 2. 2. Influence de la concentration en polymère.....	22

II.2. Complexes Polyélectrolytes en solution.....	24
Chapitre III: Systèmes étudiés (ALG/GLT)	
III.1. Alginate de sodium.....	27
III.1. 1. Structure de la chaîne.....	27
III.1.2. Source de l'alginate.....	29
III.1.3. Caractéristiques de l'alginate.....	29
III.1.4. Propriétés Physiques.....	31
III.2. La gélatine.....	32
III.2.1. Procédé de fabrication de la gélatine.....	32
III.2.2. Structure et composition.....	33
Chapitre IV: partie expérimentale.	
Introduction	34
IV.1. Matériel et produits.....	35
IV.1.1. Matériel.....	35
IV.1.2. Produits chimiques.....	35
IV.1.3. Biopolymère étudie.....	36
IV.1.3.1. Alginate de sodium.....	36
IV.1.3.2. Gélatine.	36
IV.1.4. L'α-amylase.....	36
IV.2. Principe de la formation des billes	37
IV.2.1. Principe de la formation des billes à base de mélange (ALG-GLT).....	37
IV.2.1.1. Mode opératoire.....	37
IV.3. Étude de la désorption de gélatine.....	39
IV.4. Observation microscopiques des billes	40
IV.5. Immobilisation de l'α-amylase.....	41
IV.5.1. Inclusion d'enzymes dans les billes de mélange de biopolymères.....	42
IV.6. Étude de la désorption de l'enzyme.....	44
IV.7. Dosage de l'activité enzymatique.....	45
IV.8. Réutilisation de l'enzyme immobilisée.....	47
IV.9. Détermination des constantes cinétiques de l'α-amylase immobilisée.....	47
Conclusion générale.....	50
Annexe.....	54
Références bibliographique.....	57

LISTE DES FIGURES

Chapitre I: Enzymes

Figure 01. Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine..... 03

Figure 02. Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine..... 04

Figure 03. Action de l' α-amylase sur l'amidon..... 09

Figure 04. Structure de l'amylose et l'amylopectine..... 10

Chapitre II: Polyélectrolytes.

Figure 05. Représentation schématique du DEAE-Dextrane..... 19

Figure 06. Structure chimique de l'acide hyaluronique..... 20

Figure 07. Structure du carboxyméthylpullane (CMP) issu de la carboxyméthylation du pullulane. R=H ou R=CH3(COO^- Na^+)..... 20

Figure 08. Représentation schématique polyélectrolytes amphiphiles :Copolymères à blocs (A) et polyélectrolytes en peigne (B)..... 21

Figure 09. Concentration critique(Ccr) et paramètre Ccr[η] en fonction du taux de greffage en C8 à partir du CMP (Mw= 320000 g/mol), NaCl 0,1 mol/L..... 23

Figure 10. Représentation schématique de la complexation entre un polyanion et une polybase faible..... 24

Figure 11.Représentation schématique de l'agrégation des complexes polyélectrolytes. 25

Chapitre III: Systèmes étudiés (ALG/GLT)

Figure 12. Monomères de la chaîne alginate..... 27

Figure 13. Présentation d'une structure d'alginate..... 28

Figure 14. Interactions entre les unités M..... 28

Figure 15. Mise en évidence des différents blocs d'alginates: spectrométrie RMN du proton 31

Figure 16. Structure fibreuse du collagène 63 constituant de base de la gélatine..... 32

Chapitre IV: Partie expérimentale.

Figure 17. ALG; GLT et l'α-amylase..... 36

Figure 18. Pied à coulisse digital..... 38

Figure 19. Formes et aspect des billes..... 38

Figure 20. Taille des billes..... 39

Figure 21. Pourcentage de désorptions(%) de gélatine..... 40

Figure 22. Microscope optique..... 41

Figure 23. Observation microscopiques des billes..... 41

Figure 24. Immobilisation de l'enzymes par inclusion dans un biopolymère..... 42
Figure 25. Pourcentage d'immobilisation (%) pour deux système ALG et ALG+GLT..... 43
Figure 26. Pourcentage de désorption d'enzyme (%) pour les deux systèmes (ALG et ALG-GLT)..... 44
Figure 27. La cinétique enzymatique. a : ALG- GLT, b : ALG, c : enzyme libre..... 46
Figure 28. Étude de la réutilisation de l'enzyme immobilisée dans l'hydrolyse de l'amidon..... 47
Figure 29. Représentation de Lineweaver-Burk. a: ALG- GLT, b: ALG, c: enzyme libre..... 49
Figure 30. Gamme étalon de l'absorbance en fonction de la concentration d'enzyme..... 55
Figure 31.Gamme étalon de l'absorbance en fonction de la concentration de gélatine..... 56

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I: Enzymes

Tableau 01. Applications industrielles des enzymes..... 6
Tableau 02. Différentes nomenclatures d'α-amylase..... 7
Tableau 03. Différentes α-amylases microbiennes et leur action..... 8
Tableau 04. Rapporte en bref les divers domaines d'application des α-amylases..... 13
Tableau 05. Principales méthodes d'immobilisation d'enzymes..... 14

Chapitre IV: Partie expérimentale.

Tableau 06. Matériel utilisés..... 35
Tableau 07. Produit chimique utilisés..... 35
Tableau 08. Ration des deux biopolymères dans différentes formules..... 37
Tableau 09. Résultat du K_m et V_m 48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

ALG: Alginate de sodium

Ccr: Concentration critique

CMP: Carboxyméthylpullane

CMC: Carboxyméthylcellulose

DP: Degrés de polymérisation moyenne.

DP_n: Degrés de polymérisation en nombre.

DP_W: Degrés de Polymérisation

DE: Équivalent dextrose

DO: Densité Optique

F_G, F_M: Les fractions en monomères

F_{GG}; F_{MM}; F_{MG}: Les fractions en dimère

G: α-L-guluronate

GLT: Gélatine

GOD-POD: Glucose-Oxydase-peroxydase

Gul A: Acide Guluronique

I_P: Indice de polydispersité.

M/G: Rapport nombre de monomères mannuronate sur le nombre de monomères guluronate.

K_M: Constante de Michaelis

M_W: Masse molaire moyenne en poids.

M_n: Masse Molaire moyenne en nombre en poids.

M: β-d-mannuronique

Man A: Acide Mannuronique

Ni: Nombre de chaînes de masse molaire Mi.

PEC: Polyélectrolytes complexes

pH: Potentiel d'hydrogène

PM: Poids Moléculaire

PIe: Point Isoélectrique

RMN: Résonance magnétique nucléaire

T: Température

V_M: Vitesse de Michaelis

UV-VIS: Ultra violet visible

UNITÉS ET SYMBOLES

ºC: Degré celsius

g/mol: Gramme par mole

g cm^{-3}: Gramme par centimètre cup

KNU: Kilo Novo Units alpha-amylase

M: Molaire

mm: Millimètre

mg /L: Milligramme/ Litre

λ: Longueur d'onde

mL: Millilitre

µmol/mL: Micromole/Millimètre

µL: Microlitre

g/L: Mramme par Litre

min: Minute

kDa: kilo Dalton

Introduction générale

Introduction générale

Les amylases sont parmi les enzymes celles qui occupent une place de choix, ce sont les plus importantes et sont d'une grande importance en biotechnologie, ce qui constitue une classe d'enzymes industrielles ayant approximativement 25-30% du marché des enzymes **(Rajagopalan and Krishnan, 2008).**

L'application industrielle d'enzymes est souvent entravée par un manque de disponibilité, des prix élevés et stabilité limitée en conditions opérationnelles. L'utilisation d'enzymes dans une forme libre est très peu économique parce que les enzymes en général ne peuvent pas être récupérés à la fin de la réaction. Ces inconvénients peut être surmonté par l'immobilisation de l'enzyme rendant ainsi plus stable et plus facile à récupérer et à recycler **(Talekar and Chavare, 2012).**

Plusieurs techniques d'immobilisation d'enzyme ont été utilisé telles que la réticulation, l'adsorption, l'inclusion et l'encapsulation.

L'inclusion de l'enzyme dans les billes d'alginate est l'une des méthodes les plus utilisées.**(Ates et al., 2007, Zhang et al., 2013)** Cette méthode consiste à retenir une enzyme et l'enfermer à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une manière purement physique. L'alginate est le copolymère le plus utilisé car c'est un polymère anionique, biocompatible, léger et non toxique et son procède de gélification est facile **(Won et al., 2005, Zhang et al., 2013, Vu and Le, 2008)** Mais parmi les inconvénients de cette méthode c'est les fuites d'enzyme à travers les pores. Afin de pallier ce problème un nouveau système (polyélectrolytes) de l'immobilisation a été utilisé dans notre étude.

Les systèmes impliquant des interactions entre polyélectrolytes et sphères de charges opposées sont rencontrés dans de multiples domaines et champs d'applications. Les polyélectrolytes permettent par exemple de stabiliser des particules minérales en solution ou encore de les encapsuler pour les délivrer ultérieurement. Ces capacités d'encapsulation sont également utiles en agroalimentaire où les particules chargées sont cette fois des macromolécules biologiques, essentiellement des protéines. Donc une étude de comparaison de l'immobilisation d'une enzyme (protéine) dans deux matrices différentes à base de deux biopolymère de nature polysaccharidique et protéine à savoir l'alginate de sodium (ALG) et gélatine (GEL) a été effectuée.

La présente étude est divisée en deux parties, dont la première partie fait l'objet d'une synthèse bibliographique décrivant les enzymes, leurs classification leurs différentes source.

Puis, nous présentons le système choisi pour réaliser cette étude. Notre choix s'est porté sur un système à basse de biopolymères de natures différentes : le premier est un polysaccharide anionique, linéaire et largement étudié: l'alginate de sodium (ALG) qui présente aussi l'avantage de pouvoir décliner ces systèmes au sein d'hydrogels physiques obtenus par complexation ionotropique avec des cations divalents tels que le calcium. Le deuxième est une protéine qui est la gélatine (GLT) qui est connue par sa thermoreversibilité et qui est très utilisée dans le domaine agroalimentaire.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous décrivons les méthodes expérimentales et les techniques utilisées pour l'immobilisation d'enzyme dans deux systèmes différents (Alginate et alginate + gélatine) suivi par les résultats et la discussion.

Chapitre I:
Enzymes

I- 1. Les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques intervenant dans diverses réactions. **(Sankaralingam et al., 2012),** dont leurs production est une poursuite centrale au domaine de l'industrie et en biotechnologie. Le marché des enzymes industriel actuel continue à croître de Plus en plus avec une demande accrue sur l'avancement des procédés biotechnologiques qui Restent en déficit face à la demande en augmentant de nombre de biocatalyseurs **(Fossi et al., 2005).**

Les enzymes peuvent être obtenus à partir de plusieurs sources, telles que les plantes, les animaux et les microorganismes **(Headon and Walsh, 1994).**

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique. Elles sont constituées de plusieurs acides *α*-aminés de la série *L* unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des protéines **(Marks, 1996)** (Fig.01).

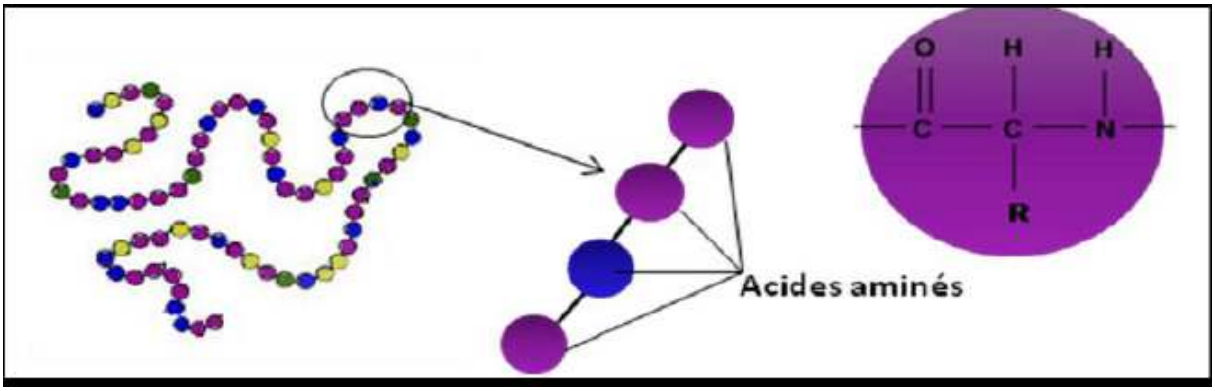


Figure 01. *Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine****(Marks, 1996).***

Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices α et en feuillets β, cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes. L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une Structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures.

Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes (Fig.02). Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier *via* une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif.

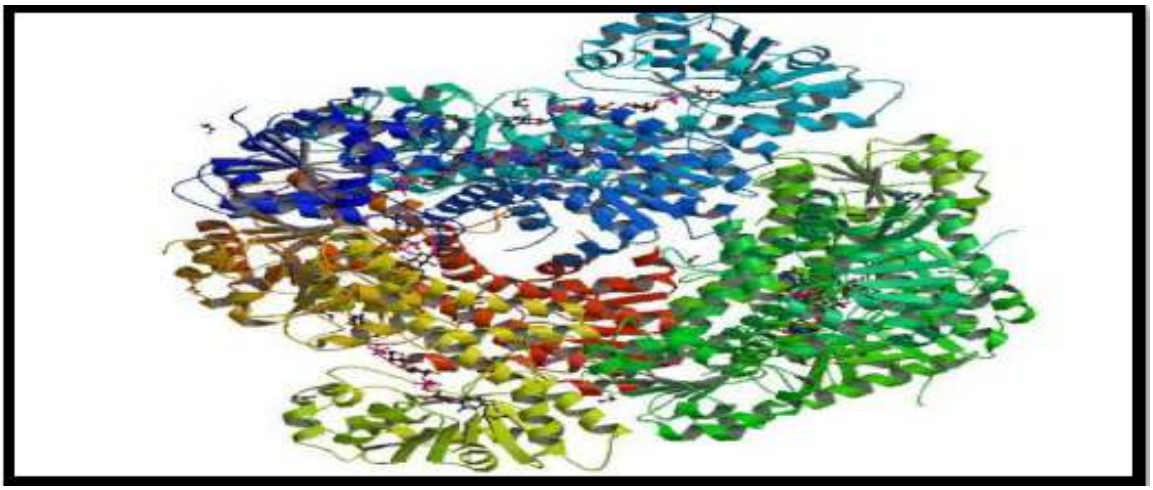


Figure 02.*Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine* ***(Marks, 1996)****.*

I- 1.1. Classification des enzymes

Selon les réactions catalysées, les enzymes peuvent être classées en six grandes Catégories :

- ✓ **Oxydoréductases :** qui catalysent des transferts d'électrons et de protons d'un Donneur à un accepteur
- ✓ **Transférases :** qui catalysent les transferts des groupements.
- ✓ **Hydrolases :** qui catalysent les réactions d'hydrolyse (coupure des liens C-C, C-O, C-N et autres par de l'eau).
- ✓ **Lyases :** qui catalysent l'addition de groupes à des liens doubles.
- ✓ **Isomérases :** qui catalysent le transfert de groupes dans une même molécule pour Produire des formes isomères (ex : conversion d'un acide aminé L en acide aminé D).
- ✓ **Ligases :** qui forment des liens C-C, C-S, C-O et C-N lors de réactions de Condensation couplées à l'utilisation d'ATP.

I- 1.2. Source d'enzyme

L'étape initiale de la production de toute enzyme concerne le choix de la source. Dans certains cas où l'activité catalytique souhaitée n'est disponible que dans une source unique, bien que dans la plupart des cas où l'activité souhaitée peut être obtenue à partir de plusieurs sources **(Headon and Walsh, 1994).**

I- 1.21. Source microbienne

De nombreuses protéines sont obtenues à partir de microorganismes. Un nombre limité de microorganismes sont considérés comme des producteurs appropriés des protéines destinées à des fins appliquées. Les microorganismes les plus fréquemment utilisés comme producteurs d'enzyme comprennent des bactéries et des champignons, Les microorganismes représentent une source attrayante d'enzymes car ils peuvent être cultivés en grande quantité dans un délai relativement court selon les méthodes de fermentation **(Headon and Walsh, 1994).**

I- 1.2.2 Source Végétal

Les plantes ne sont généralement pas considérées comme des sources attrayantes d'enzymes d'importance industrielle. La nature saisonnière et la géographie de la croissance des plantes et le fait que la plupart des protéines végétales sont intracellulaires milite également contre leur utilisation généralisée comme sources d'enzymes **(Headon and Walsh, 1994).**

I- 1.2.3 Source Animal

Un nombre d'enzymes d'une importance considérable ont été traditionnellement obtenus d'animaux les plus importantes sur le plan industriel, également connu sous le nom de Chymosine cette protéase aspartique trouve une application industrielle principalement
dans la production de fromages, bien qu'il ait également été utilisé thérapie en tant que aide digestive **(Headon and Walsh, 1994).**

I- 2. Application des enzymes

Jusqu'aux années 1960, les enzymes industrielles restent donc un créneau très étroit. De nouvelles applications ont permis les plus récents développements; protéases dans les détergents, enzymes coagulante substituâtes de la présure animale, glucose isomérase et amyloglucosidase en glucoserie **(Aviron-Violet et al., 1982).** Le Tableau 01 illustre quelques exemples d'enzymes, et sons applications industrielles.

Tableau 01. *Applications industrielles des enzymes.*

Enzyme	Application
Amylases bactérienne et fongique	Hydrolyse de l'amidon en dextrines. maltose et glucose
Protéases bactérienne et fongiques	Attendrissement de la viande et préparation du fromage
Présure fongique	Caillage du lait
Lipase	Activation digestive
Patinasse fongique	Clarification du jus et de vins
Hémicellulose fongique	Hydrolyse des hémicellulose des céréales et légumes
Cellulase fongique	Hydrolyse de la cellulose en glucose
Inulase bactérienne et fongique	Hydrolyse de l'inuline en glucose
Invertase	Production de sucre inverti à partir du saccharose
Glucose isomérase bactérienne	Fabrication du sirop de fructose

Les α-amylases sont parmi les hydrolases les plus importantes pour toutes les industries à base d'amidon. L'α-amylase comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon. De type de la classe des hydrolases qui agit sur les liaisons α (1-4) de l'amidon. Elle est largement représentée chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes. L'α-amylase et les protéases sont les plus utilisés en bio-industrie **(Scriban, 1993 ; Wallach, 1997)** .par ailleurs, la part du marché mondial prise par les enzymes est de 59% pour les protéases et 28 % pour les glucanases dont 13% pours l'α-amylase **(larpent_Gourgaud et sanglier 1992)**.

I- 3. α-amylase

L'α-amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie **(Janeček, 1994)**. Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases nommé GH13; regroupant maintenant plus de 1700 enzymes. Elle hydrolyse, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α(1-4) D-glucose **(Dauter et al., 1999)**. En effet, elle attaque les chaînes de l'amylose en coupant les liaisons α(1-4) tous les 6 glucoses, maltose et surtout d'α-dextrines **(Franco et al., 2000)**.

I- 3.1. Nomenclature

Le tableau 2 récapitule les différentes nomenclatures d' α-amylase.

Tableau 02. *Différentes nomenclatures d'α-amylase* ***(Mercier, 1985)***.

Nom Systématique	**α(1-4) D-glucane glucanohydrolase**
Non codifié	E.C .3.2.1.1
Nom Recommandé	α-amylase.
Synonymes	glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin

I- 3.2. Structure

L'α-amylase à une structure tridimensionnelle capable de se lier au substrat, et par l'action des groupes catalytiques hautement spécifiques, favorise la rupture des liaisons glycosidiques.

Ce sont des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés repartis en deux domaines Globulaires appelés A (1 à 380 résidus) et B (381 à 478 résidus) ; ces domaines sont associés par une chaîne polypeptides constitué principalement de résidus hydrophobe.

La partie glucidique est formée essentiellement de mannose, le résidu constituant le site de fixation du substrat. Ce sont des métallos enzyme à calcium (un ion calcium par molécule) **(Chiba, 1988)**. Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la Structure en acides aminés de l'enzyme qui varie d'une souche à l'autre **(Fogarty and Kelly, 1980)**.

I- 3.3. Les différentes sources et origines de l'α-amylase

Les α-amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes.

- ✓ ***L'origine animale***

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères **(French, 1975)**.

✓ ***L'origine végétale***

Les α-amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapables d'hydrolyser le maltose **(Fogarty and kelly,1994).**

✓ ***L'origine microbienne***

- ***L' α-amylase fongique***

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques, parmi les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps du fait que la première production d'α-amylase a été réussie par Takamine en 1894. L'α-amylase fongique est d'une thermo stabilité assez faible, son optimum d'action se situe entre 50°C et 55°C **(Milner et al., 1997)**.

- ***L' α-amylase bactérienne***

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de Bacillacées **(Bousseboua, 2002)**.Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens, B. licheniformis* **(Mc Tigue et al., 1995)** ou *B. subtilis*fermentant en surface **(Zoubiri, 2012)**.

Le tableau 03 récapitule les différentes α-amylases microbiennes et leur action.

Tableau 03.*Différentes α-amylases microbiennes et leur action****(Park et al., 1997).***

Enzyme	Source	Action
α-amylase	*Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus lichenformis* *Aspegillus* *Saccharomyces*	Hydrolyse des liaisons α(1-4) au hasard à l'intérieur de la chaine, en donnant de l'α-dextrine, de maltose et de glucose
α-amylase saccharifiant	*Bacillus subtilis*	Comme la précédente, sauf qu'elle produit jusqu'à 50% du glucose

I- 3.4. Mécanisme d'action

L'α-amylase d'origine végétale, animale ou microbienne agit sur les polysaccharides (Amidon, glycogène).

L'α-amylase appartient à la famille des endo-amylases qui catalyse l'hydrolyse initiale de l'amidon en oligosaccharides plus courts (résidus glucose terminaux), les liaisons α (1-6) ne peuvent être clivées par l'α-amylase.

Les α-amylases présentent la possibilité d'attaquer les chaînes d'amylopectine de deux façons différentes: soit en se fixant sur une chaîne et effectuer plusieurs cycles de coupures (attaque multienzymatique) c'est le cas de l'amylase pancréatique; soit en se fixant
Sur une chaîne pour effectuer une coupure puis après libération des produits, se détacher de la chaîne pour attaquer une autre chaîne (attaque préférentielle) c'est le cas des amylases de *Bacillus subtilis*ou d'*Aspergillus oryzae*.

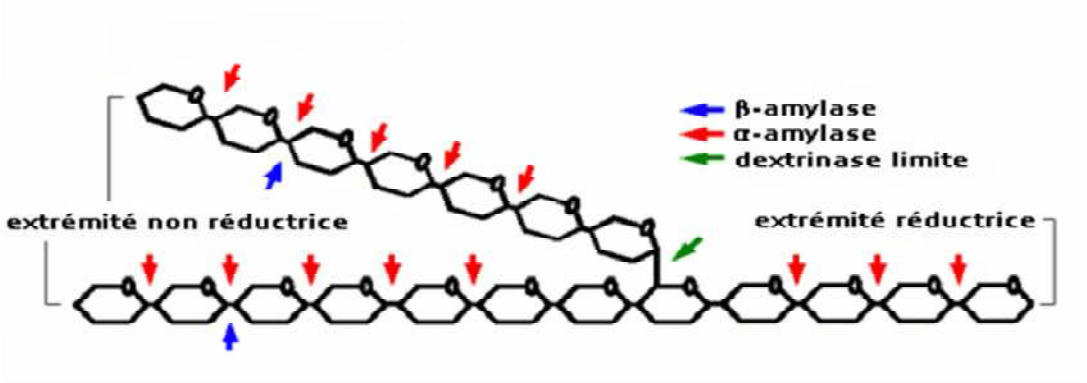


Figure 03. *Action de l' α-amylase sur l'amidon.*

Le mécanisme d'action de l'α-amylase nécessite la participation de trois fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé; ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acides carboxyliques et un noyau imidazole **(Mazur and Nakatani, 1993)**.

Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme et selon les conditions expérimentales (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes **(Nielsen et al., 2001, Berry and Paterson, 1990)**.

-Attaque aléatoire: l'α-amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glycosidiques, libérant deux fragments, qui seront séparément attaqués.

-**Attaque préférée:** l'α-amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat.

-**Attaque répétitive ou multiple:** elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glycosidiques sans se dissocier du substrat **(Scriban, 1999, Van Der Maarel et al., 2002).**

(Park et al., 1997), signalent que les α-amylases sont des métallo-enzymes à calcium, vu la nécessité des ions calcium à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de ces enzymes.

I- 3.5. Hydrolyse de l'amidon

L'amidon est après la cellulose la principale substance glucidique présente dans le monde végétale, il est synthétisé sous forme de réserve, par les végétaux supérieur à partir de l'énergie solaire, il constitue une source énergétique indispensable à l'alimentation des êtres vivants et de l'homme en particulier.

Il est composé de deux composants principaux; l'amylose et l'amylopectine dans les proportions 20 et 80%.

De sa polyvalence et de sa disponibilité, l'amidon natif ou modifié est probablement le polysaccharide le plus important dans l'industrie alimentaire, il est constitué de petits grains ou granules dont la taille et la forme dépendent de l'origine végétale.

Le grain de l'amidon à une structure macromoléculaire comportant des zones cristallines et des zones amorphe, lorsque le granule d'amidon est visualisé au microscope sous la lumière polarisé, une croix noire est visible, ce phénomène est appelé biréfringence et s'explique par la nature cristalline des granules

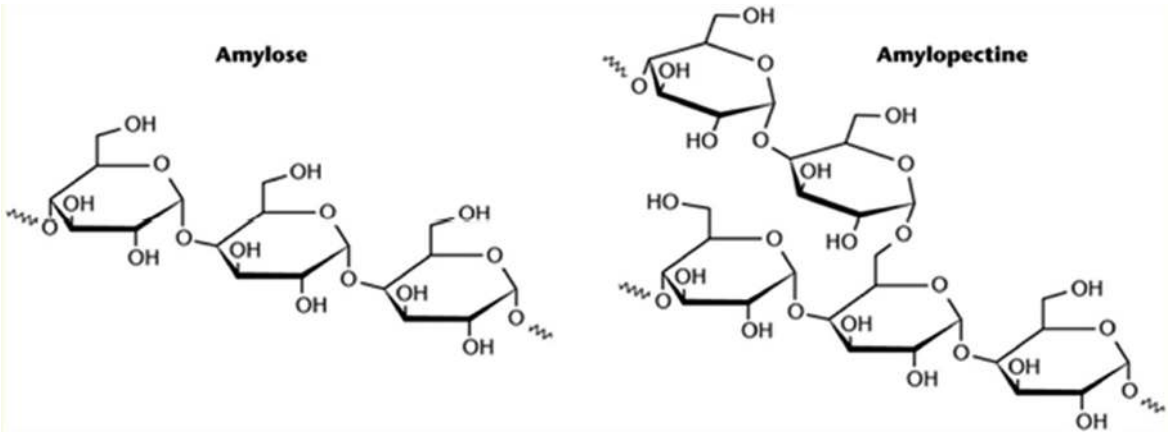


Figure 04.*Structure de l'amylose et l'amylopectine.*

L'amylose est une macromolécule linaire constitué de résidus D glucose relié entre eux par des liaisons α(1-4), une extrémité porte un groupement réducteur, l'autre un groupement non réducteur.

L'amylose est une molécule de haut poids moléculaire ; de 150 - 600 kDa suivant l'origine botanique.

La teneur en amylose de l'amidon varie entre 15 et 30%. La structure de l'amylose est hélicoïdale et l'intérieur de l'hélice est hydrophobe et lipophile ce qui permet à l'amylose de former des complexes hydrophobes avec d'autres éléments tel que l'iode, dont sa complexation avec l'iode est utilisée pour détecter l'amidon.

L'hélice est formée de 6 résidus et stabilisé par des fortes liaisons hydrogène intermoléculaire.

L'amylopectine est une macromolécule fortement ramifié ; il formé de résidu de D-glucose qui sont reliés entre elles par des liaisons α(1-4), ces chaînes linaires sont reliées entre elle par des ramifications α(1-6). Son poids moléculaire est de 10000 à 500000 DA. La capacité de fixation de l'iode de l'amylopectine est quasiment nulle.

I- 3.6. Hydrolyse enzymatique de l'amidon

L'hydrolyse de l'amylose abouti à la formation du maltose puis ce dernier sera hydrolysé à son tour.

L'hydrolyse de l'amylopectine se déroule en deux étapes; La formation du glucose, maltose, et α-dextrine, ces dernières possèdent au minimum 4 molécules de glucose et présentent des liaisons glycosidiques α(1-6) ensuite l'hydrolyse lente des dextrines **(Park et al., 1997)**.

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon permet non seulement d'avoir des composés purs mais aussi par un choix judicieux de l'enzyme; une gamme de produits aux propriétés physico-chimique bien caractérisées.

L'α-amylase est une endo-amylase qui hydrolyse spécifiquement les liaisons glycosidiques α(1-4) de l'amylose et l'amylopectine, elle n'est pas capable de dégrader les liaisons α(1-6) et s'arrête jusqu' où elle rencontre une ramification. Les produits finaux de l'action des α-amylases sont des oligosaccharides qui constituent un mélange de maltose, et oligosaccharides ramifiée de 6 - 8 unités de glucose qui contiennent à la fois des liaisons α(1-4) et α(1-6) **(larpent_Gourgaud et sanglier 1992)**.

L'action conduit à une diminution de la viscosité de la solution. Elles sont utilisées dans la phase initiale de l'hydrolyse ou liquéfaction.

I- 3.7. Propriétés de l'α-amylase

Le choix du pH optimum est très important pour la production de l'α-amylase car cette dernière est très sensible au pH. Le pH optimum des α-amylases est entre 4 et 8 et celui de l'α-amylase bactérien est supérieur à la neutralité **(Prakash et al., 2009).**

Selon **(Prakash et al., 2009).** Les α-amylases d'origine microbienne présente une thermo stabilité de (70°C – 90°C), et une température optimale plus élevée se situant entre (40°C et 70°C)**.**

La température optimale des amylases fongique varie selon leur origine de (30°C à 40°C) **(Mazur and Nakatani, 1993).**

Les enzymes thermostables isolées à partir d'organismes thermophiles ont trouvé un certain nombre d'applications commerciales en raison de leur stabilité. Comme la liquéfaction enzymatique et la saccharification de l'amidon sont effectuées à des températures élevées *Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Bacillus licheniformis, Bacillus amylolique faciens*sont connus pour être de bons producteurs d'α-amylase thermostable.

Aujourd'hui, le marché annuel des enzymes thermostables représente environ 250 millions de dollars et les α-amylases thermostables en occupent une bonne part **(Ahlawat et al., 2009)**.

L'hydrolyse de l'amidon est surtout réalisée au niveau industriel par l'utilisation des amylases de *B. amyloliquefasciens*et *B. licheniformis*. Dans ce dernier cas, l'enzyme présenteune stabilité plus grande en présence d'empois d'amidon, son activité résiduelle est importante même à 110°C et surtout si le milieu renferme du calcium (20 à 80 ppm) qui stabilise la structure. L'enzyme de *B. licheniformis*est utilisée car elle permet d'obtenir la liquéfaction de l'amidon.

Dans le cas de l'enzyme de *Bacillus amylolique faciens*; on ne peut pas dépasser la température de 95 °C. L'action des amylases se traduit par des hydrolysats qui présentent généralement des DE compris entre 8 à 12 ce qui correspond à la liquéfaction de l'empois d'amidon.

Les enzymes produites par certains micro-organismes halophiles ont une activité optimale à fortes salinités et peuvent donc être utilisés dans de nombreux procédés industriels difficiles où les solutions salines concentrées utilisées autrement pour inhiber de nombreuses conversions enzymatiques **(Vetriani et al., 1998)**.

1- 3.8. Applications industrielles

Les α-amylases sont parmi les hydrolases les plus importantes pour toutes les industries à base d'amidon, et leur commercialisation est la plus ancienne, avec première utilisation en 1984, comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs. Aujourd'hui, les α-amylases trouvent l'application dans tous les processus industriels, avec une dominance des α-amylases microbiennes qui ont complètement remplacé, non seulement l'hydrolyse chimique dans les industries de transformation d'amidon, mais également dans les industries chimiques pharmaceutiques et autres **(Zoubiri, 2012)**.

Actuellement, les α-amylases ont la part principale du marché mondial d'enzymes, dont plusieurs différentes préparations d'α-amylase sont disponibles avec de divers fabricants d'enzymes pour utilisation spécifique dans diverses industries **(Alais et al., 2008)**.

Tableau 04. *Rapporte en bref les divers domaines d'application des α-amylases.*

Industries	Applications
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction) **(Pandey et al., 2000).**
Sucrerie	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylacés pour assurer la réussite de processus de cristallisation **(larpent_Gourgaud et sanglier 1992).**
Biscuiterie et Panification	Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte**(Hendriksen et al., 1999).**
Industrie textile	Désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage **(Tolan, 1996).**
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon, pour préparer des sauces de couchage permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille **(Kottwitz et al., 1994)**.
Détergent	Dégradation des taches à base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytique sont solubles, ce qui facilite le découpage physique de la tache**(Kottwitz et al., 1994).**
Industrie pharmaceutique	Traitement de diabète et de l'obésité **(Nielsen et al., 2001).**

I- 4. Immobilisation d'enzymes

L'une des voies importantes et prometteuses de la bio-ingénierie dans l'industrie agro-alimentaire est l'emploi d'enzymes immobilisées **(Shimizu et al., 1979)**. L'immobilisation des enzymes est l'une des technologies la plus importante utilisée dans l'alimentation, la production pharmaceutiques et la biotechnologie. L'immobilisation d'une enzyme consiste en sa rétention dans une phase insoluble, par liaison chimique ou rétention physique **(Siso et al., 1988).**

L'intérêt d'utiliser des enzymes immobilisées dans des bioréacteurs tient essentiellement à leur récupération plus facile que celle des enzymes solubles, dans le cas d'un fonctionnement par cycles ou la possibilité de leur utilisation en continu. Toutefois, dans la plupart des procédés industriels et d'après **(Teotia and Gupta, 2001)** les enzymes sont mélangées dans une solution avec des substrats et ne peut être économiquement récupéré qu'après l'épuisement des substrats **(Hamilton et al., 1999)**. Cet usage unique est évidemment tout à fait inutile lorsque le coût des enzymes est considéré. Ainsi, il ya une incitation à utiliser des enzymes sous forme immobilisée ou insoluble, de sorte qu''elles peuvent être conservées dans un réacteur biochimique pour catalyser d'autres flux ultérieurs. L'exploitation d'une enzyme immobilisée dans un procédé enzymatique en mode continu rend son utilisation plus favorable **(Wu et al., 1998)**.

En milieu organique les protéines peuvent, en général, avoir un changement de la conformation spatiale qui cause l'agrégation des enzymes et parfois leur inactivation. L'immobilisation des enzymes sur des supports est souvent considérée comme la méthode la plus efficace permettant d'avoir des enzymes plus stables pour une longue période lors de la réutilisation et sous les conditions opérationnelles utilisées.

Actuellement, de très nombreuses méthodes d'immobilisation intéressant plus de 100 enzymes ont été développées dans le but d'étendre le champ d'applications industrielles de ces catalyseurs, pour leurs utilisation en continu ou pour en assurant leurs réutilisation et l'augmentation de leur stabilité, en facilitant le contrôle de l'action des enzymes **(Tee and Kaletunç, 2009, Hernaiz and Crout, 2000)** et permet également de les séparer a partir le milieu réactionnelle **(Sharma and Kanwar, 2014)**. En outre, l'immobilisation des enzymes utilisées en milieu organique empêche les protéines de s'unir et de précipiter. En général, l'efficacité d'un procédé d'immobilisation doit répondre à quatre critères:

- un rendement d'immobilisation élevé,
- une préservation de l'activité enzymatique,
- une bonne stabilité du complexe enzyme-support,

- une bonne rétention de l'activité enzymatique (affinité enzyme- support).

L'immobilisation, d'une manière générale, permet d'avoir une meilleure stabilité des enzymes, mais peut induire des problèmes de diffusion et d'accessibilité au substrat contrairement aux enzymes libres. L'immobilisation peut être réalisée sur différents types de support, mais la plupart des supports présentent l'inconvénient d'être chers.

De nombreuses méthodes existent pour l'immobilisation des enzymes, parfois appelée insolubilisation d'enzyme **(Wu et al., 1998)**. La majorité des méthodes peuvent être classées en quatre catégories principales : l'adsorption, l'inclusion, la liaison covalente et l'encapsulation (Tableau 05).

Tableau 05. *Principales méthodes d'immobilisation d'enzymes* ***(Tümtürk et al., 2007).***

Immobilisation par rétention physique	**Inclusion**	**Dans une matrice constituée par le réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère**
Immobilisation par rétention physique	Confinement	-Dans une microcapsule délimitée par une membrane semi- perméable (micro encapsulation). -Dans une fibre creuse.
Immobilisation par liaison chimique	Fixation sur un support	-Par adsorption par des liaisons faibles (Inter actions ioniques) -Par liaisons covalente
Immobilisation par liaison chimique	Réticulation	Etablissement d'un réseau par liaisons covalentes Intermoléculaires

I- 4.1. Immobilisation par adsorption ou par liaison ionique

C'est une méthode très simple pour l'application nécessitant seulement de mettre en contact le support et l'enzyme dans des conditions de pH, température et de force ionique données. Dans cette méthode, l'immobilisation est due à des interactions de type Van der Waals, liaisons hydrogène, transfert de charges ou liaisons ioniques. L'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite aucun réactif chimique. L'inconvénient majeur de cette technique est, cependant, la désorption rapide des enzymes immobilisées au moindre

changement des conditions car ce système est peu stable vu la nature des interactions mises en jeu dans l'immobilisation. De plus, il arrive dans certains cas de procéder à des modifications sur la surface du support afin d'améliorer l'adsorption.

Plusieurs supports d'immobilisation peuvent être utilisés pour effectuer l'adsorption telles que la silice alumine, la cellulose ou les résines échangeuses d'ions (Amberlite). Cette technique d'immobilisation est la méthode la plus utilisée à l'échelle industrielle grâce a au moindre prix d'application **(Balcão et al., 1996)**.

I- 4.2. Immobilisation par réticulation

Dans cette technique, l'immobilisation est effectuée par liaison covalente sans recours à un support. Cette technique nécessite la présence d'un réticulant (agent bifonctionnel) qui permet de lier les enzymes. Cet agent réagit avec les protéines et les groupements réactifs, ce qui permet de lier les unes aux autres. A la fin de l'immobilisation, on obtient une structure en réseau purement protéique et contenant l'activité enzymatique. **(Boros et al., 2013).**ont trouvé que l'immobilisation de la lipase de *Candida antractica* sur un phényl/aminoalkyl-gel de silice traité par glutaraldéhyde améliore la stabilité thermique de l'enzyme et la résistance aux détergents de lessives.

I- 4.3. Immobilisation par encapsulation

Cette technique consiste à fixer les enzymes dans une matrice d'une manière physique pas d'une manière chimique contrairement à l'adsorption et la réticulation qui altèrent les propriétés catalytiques de l'enzyme immobilisée **(Rosen-Margalit and Rishpon, 1993, Eş et al., 2015).** La matrice utilisée dans cette technique doit être un matériau flexible et perméable qui isole les enzymes partiellement du milieu extérieur et les protège **(Eş et al., 2015)**. Cette matrice peut être organique (nafion) **(Deng et al., 2008)**, inorganiques (gels de silice) **(Zhang et al., 2016)**, composites (pâte de carbone) **(Shu et al., 2011).** ou un polymère (polyacrylamide, polyuréthanes...) **(Cano et al., 2008).** La lipase de *Candida rugosa* encapsulée dans des matrices sol-gel a été utilisée pour la résolution de mélanges racémiques avec un rendement de production de 98% de l'acide S-naproxéne **(Ozyilmaz et al., 2014).**

I- 4.4. Immobilisation par inclusion

Cette technique est une méthode d'immobilisation physique simple qui conserve la conformation de l'enzyme sans la modifier mais le principal inconvénient est le risque de fuite des enzymes. Les gels les plus utilisés sont ceux de polysaccharides, de polyacrylamide,

l'alginate, le chitosan et le carraghénane **(Jegannathan et al., 2010, Kovalenko et al., 2013)**.L'alginate est fréquemment utilisé grâce à ses propriétés de gélification et à sa non-toxicité. Cette technique d'immobilisation a été appliquée sur plusieurs types d'enzymes comme par exemple la lipase de *Candida rugosa* et la lipase pancréatique porcine qui ont été encapsulées dans un gel d'alginate pour la synthèse d'esters **(Ozyilmaz and Gezer, 2010, Betigeri and Neau, 2002)**ou encore les lipases de *Pachiraaquatica* incluses dans des billes l'alginate **(Bonine et al., 2014)**.

Chapitre II:
Systèmes polyélectrolytes

II- 1. Polyélectrolytes

Les polyélectrolytes sont des polymères caractérisés par des fonctions ionisées et/ou ionisables qui peuvent se dissocier pour former des polyions. Ils sont hydrosolubles pour la plupart. Les charges électrostatiques se trouvant le long des chaînes macromoléculaires sont accompagnées d'un cortège de contre-ions de signes opposés. Ces charges sur les polymères sont à l'origine d'interactions à courte portée de type van der Waals et des interactions répulsives de plus longues portées de nature électrostatique ce qui leurs confèrent des propriétés physico-chimiques spécifiques et notamment une grande rigidité.

Les polyélectrolytes sont très nombreux et variés. Ils peuvent être cationiques (polycations), anioniques (polyanions) ou les deux, on parle de polyampholytes ou polymères zwitterionique **(Combellas et al., 2000)**. Ils peuvent être à charges modulables et pH dépendant (polyélectrolytes faibles), ou présenter uniquement des groupements ionisés (dissociés) dans le solvant indépendamment du pH acide ou basique du milieu (polyélectrolytes forts).

Il existe des polyélectrolytes synthétiques ou artificiels qui sont obtenus principalement par polycondensation ou par polymérisation en chaine. On peut citer :

- Le polyacrylate (PA)
- Le poly (styrène) sulfonate (PA)
- Le poly (styrène)sulfonate (PSS),
- Le poly (diallyldiméthylammonium) (PDADMA)
- Le poly (vinylbenzyltriméthylammonium) (PVBMA).

En relation avec notre sujet, nous nous intéresserons particulièrement dans cette partie bibliographique aux polysaccharides polyélectrolytes.

II- 1. 1. Polysaccharides polyélectrolytes

Les polysaccharides constituent les polyélectrolytes naturels les plus connus. Ils sont pour la plupart d'origine animale, bactérienne, végétale ou fongique.

II- 1. 1. 1. Polysaccharides cationiques

La plupart des polysaccharides cationiques sont des biopolymères ayant subi des modifications chimiques leur apportant des groupements positivement chargés. Nous pouvons citer le chitosane qui est un polysaccharide issu de la chitine, par désacétylation en présence d'une solution concentrée de soude **(Desbrieres, 2002)**. Il est souvent utilisé dans les

domaines agro-alimentaire et cosmétique par exemple, pour ses propriétés antimicrobiennes et antioxydants **(Kumar, 2000, Wang et al., 2005)**. On peut également citer les polysaccharides cationiques obtenus par quaternisation comme le Polyquaternium-10, Polyquaternium-4 **(Rodríguez et al., 2003, Pal et al., 2005)**, utilisés comme bactéricides dans l'industrie du papier. Les polysaccharides potentiellement cationiques comme le DEAED extrane **(Huguet et al., 1996, Eshita et al., 2012)**, DEAE-Pullulane **(Souguir et al., 2007, Souguir et al., 2010)**, peuvent être utilisés pour les résines échangeuses d'anions ou pour la vectorisation ou la transfection d'ADN dans le domains biomedical **(Mack et al., 1998)**.

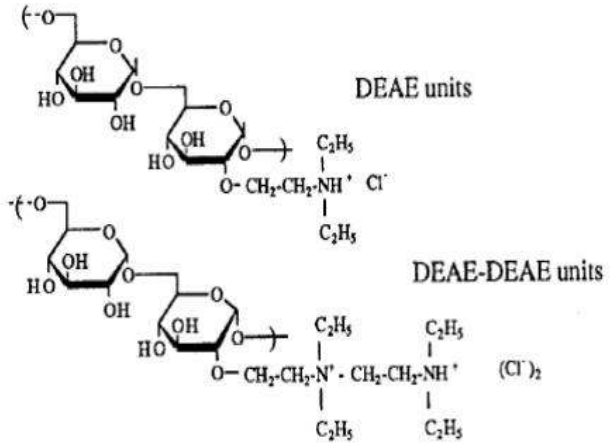


Figure 05. *Représentation schématique du DEAE-Dextrane,* ***(Huguet et al., 1996)****.*

I- 1.1.2. Polysaccharides anioniques

Les polysaccharides naturellement ioniques sont majoritairement anioniques. On peut citer l'acide hyaluronique ou plus précisément le hyaluronate (de sodium par exemple) qui est un polysaccharide linéaire composé d'un enchainement d'unités disaccharides d'acide glucuronique et de N-acetylglucosamine reliées par une liaison ß(1-4) **(Durrani et al., 1995, Alauzun et al., 2010)**. C'est l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire ou du liquide synovial des articulations par exemple. L'immuno-neutralité de cet acide fait de lui un excellent polysaccharide de construction des biomatériaux employés dans la médecine des tissus et dans les systèmes de libération des médicaments.

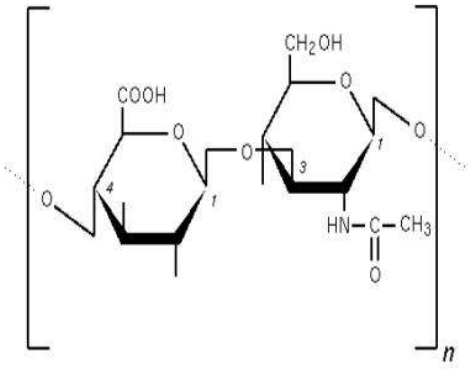


Figure 06. *Structure chimique de l'acide hyaluronique.*

La gomme arabique est un polysaccharide acide fortement ramifié qui existe à l'état natif sous forme de sel (calcium, magnésium, potassium), composé de D-galactose, L-arabinose, acide D-glucuronique, et du L-rhamnose, mais aussi de glycoprotéines (arabinogalactane protéines) **(Idris et al., 1998, Cozic et al., 2009)**. Dans l'industrie agroalimentaire, elle est utilisée en tant que stabilisant, émulsionnant totalement atoxique. On peut citer également d'autres polysaccharides naturellement anioniques comme la gomme de Xanthane **(Dhami et al., 1995)**, gomme d'agar agar **(Phan et al., 2005)**, les pectines **(Mesbahi et al., 2005)**, l'héparine **(Sisu et al., 2003)**. Des polysaccharides neutres sont également modifiés pour obtenir des polyélectrolytes anioniques. Nous pouvons citer le pullulane qui est un exopolysaccharide neutre hydrosoluble produit par la levure *AureobasidiumPullulans* à partir de source d'amidon. Sa chaine flexible est composée d'unité maltotriose reliées par des liaisons α(1-6) **(Leathers, 2003)**. Sa modification chimique par carboxyméthylation va apporter des charges négatives via des fonctions carboxylate pour donner le carboxyméthylpullane (CMP) un polyanion **(Picton et al., 1995, Dulong et al., 2012)**. Nous pouvons citer aussi la carboxyméthylcellulose **(Kulicke et al., 1996)**, et d'autres polysaccharides sulfatés **(Vogt et al., 1995)**.

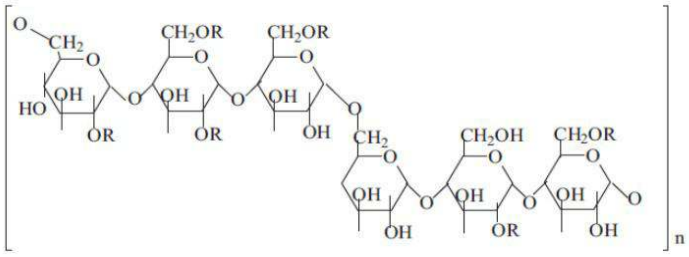


Figure .07 *Structure du carboxyméthylpullane (CMP) issu de la carboxyméthylation du pullulane. R=H ou R=CH3COO⁻ Na⁺* ***(Mocanu et al., 2011)***.

II- 1. 2. Polyélectrolytes amphiphiles

Nous abordons dans cette partie les polyélectrolytes constitués d'un squelette hydrophile sur lequel sont incorporés de façon covalente, des blocs ou des greffons hydrophobes **(Sarrazin-Cartalas et al., 1994, Pelletier et al., 2000)**. Ces polymères dits « associatifs » présentent des similitudes avec nos systèmes complexes. En effet, nous pouvons faire une comparaison entre ces polymères modifiés et le comportement thermo associatif des systèmes alginate/Jeffamine® électro-associé.

Ces polymères associatifs peuvent se présenter sous la forme de structure bloc ou peigne (Figure I ,(4-mais les systèmes peigne sont plus proches des structures que nous attendons dans cette étude. Les chaînes hydrophobes sont alors latérales et obtenues par copolymérisation de monomère hydrophile et hydrophobe ou bien par greffage chimique de groupement hydrophobe sur un polyélectrolyte existant.

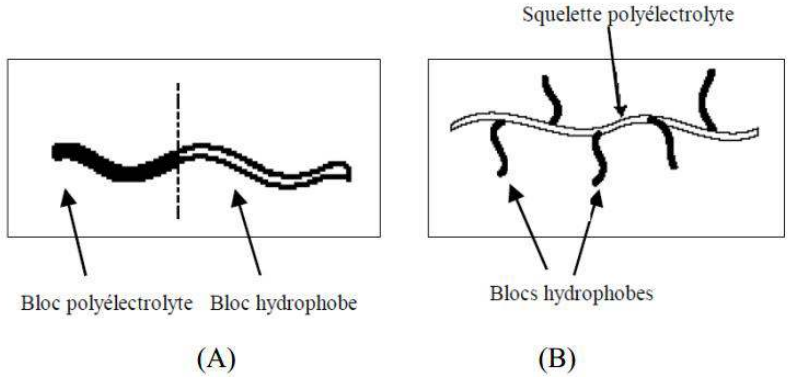


Figure 08. *Représentation schématique polyélectrolytes amphiphiles : Copolymères à blocs (A) et polyélectrolytes en peigne (B).*

L'incorporation de groupements hydrophobes va conférer des propriétés physico-chimiques nouvelles. Le comportement de ces polyélectrolytes présente alors une forte tendance à l'association ce qui les différencie des polyélectrolytes hydrophiles aux propriétés viscosifiantes déjà remarquables. En solution aqueuse, les segments hydrophobes vont s'auto associer de façon intra ou intermoléculaire selon le domaine de concentration en polymères, la force ionique, le pH mais aussi selon les propriétés intrinsèques du polymère (masses molaires; taux de charge; rigidité ; nature, longueur et/ou taux d'incorporation des chaînons hydrophobes…). Dans certaines conditions, il est alors possible d'obtenir la formation d'un réseau physique réversible qui s'accompagne d'une forte augmentation de la viscosité voir de l'apparition de propriétés viscoélastiques à élastiques (liquide organisé ou pseudo gel). Ces systèmes avec des propriétés rhéologiques intéressantes peuvent être envisagés dans des

applications industrielles notamment (peintures, cosmétiques…). Les applications médicales sont aussi importantes et vont de la vectorisation à la fabrication de substituts biocompatibles.

II- 1. 2. 1. Balance entre les forces répulsives et attractives

La présence de charge va améliorer la solubilité donc le caractère hydrophile des chaînes macromoléculaires, ce qui va permettre d'envisager des taux de greffage de chaînes alkyles plus importants par rapport aux polymères neutres **(McCormick et al., 1988, Senan et al., 1994)**. En absence de force ionique, les polyélectrolytes associatifs vont avoir un comportement particulier. En effet, les charges électrostatiques vont rentrer en compétition avec les associations hydrophobes et la balance répulsion/association sera dépendante des paramètres intrinsèques, des caractéristiques structurales telles que (la densité de charge, le taux de greffons hydrophobes, la rigidité...) et des paramètres extrinsèques (force ionique, pH, température.)

A faible force ionique, les forces répulsives électrostatiques vont généralement l'emporter sur les associations hydrophobes. Le polyélectrolyte associatif a un comportement alors sensiblement similaire à celui du précurseur non modifié **(Magny et al., 1991)**. Pour des forces ioniques plus élevées ou une variation du pH entraînant une diminution du taux de charges, les répulsions électrostatiques supprimées ou écrantées ne s'opposent plus à l'association des groupes hydrophobes et le polymère amphiphile tend à adopter un comportement proche d'un polymère neutre hydrophobiquement modifié **(Wang et al., 1988)**.

II- 1. 2. 2. Influence de la concentration en polymère

En présence de force ionique suffisante et en régime dilué, les associations de type hydrophobe sont le plus souvent majoritairement intramoléculaires. La viscosité intrinsèque des polymères est alors inférieure à celle de leurs précurseurs **(Volpert et al., 1998, Simon et al., 2003)**. Cela est dû à la faible probabilité de rencontre des chaînes macromoléculaires aux faibles concentrations. Les macromolécules adoptent une conformation compacte. Lorsque la concentration en polymère augmente, les associations intermoléculaires apparaissent au-delà d'une concentration critique **(SCHULZ et al., 1991)**. Il se forme des agrégats de grand volume hydrodynamique qui s'accompagnent d'une forte augmentation de la viscosité des solutions pouvant conduire à la formation d'une structure tridimensionnelle avec des propriétés rhéologiques intéressantes. Une étude menée au laboratoire **(Simon et al., 2003)**. a montré qu'une concentration critique (Ccr) était obtenue pour des dérivés amphiphiles du

carboxyméthylpullulane (CMP) greffé avec des taux variables de chaînons alkyle en C8. Ccr ne correspond plus à une concentration critique d'enchevêtrement classique. La transition d'associations intramoléculaires vers des associations intermoléculaires dépend du taux de C8 sur le CMP et traduit une compétition entre contrainte stérique au sein de la molécule isolée (intramoléculaire) et connexion inter chaînes des pelotes amphiphiles selon le degré de promiscuité (i.e. la concentration en polymère) et le taux de greffons. La (Fig.9) traduit l'évolution de la concentration critique (Ccr) en fonction du taux de greffage en chaînons alkyl en C8 sur un CMP **(Simon et al., 2003)**.

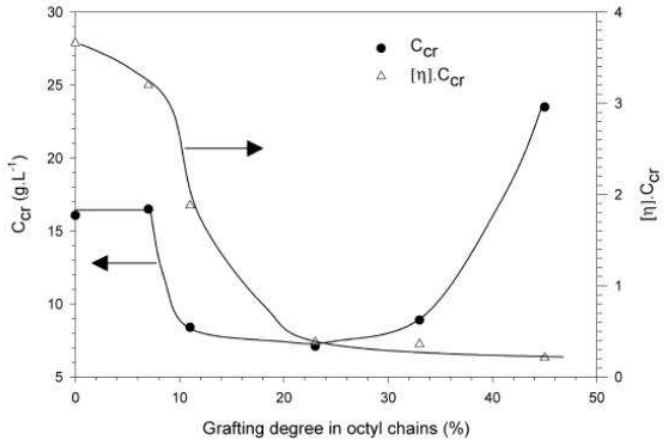


Figure 09. *Concentration critique (Ccr) et paramètre Ccr[η] en fonction du taux de greffage en C8 à partir du CMP (Mw= 320000 g.mol^{-1}), NaCl 0,1 mol.L^{-1}.*

Le produit Ccr[η] devrait être constant dans le cas d'une occupation purement stérique du volume de la solution par les pelotes de polymères. **(Simon et al., 2003).** montrent qu'ici ce paramètre adimensionnel diminue avec l'augmentation du taux de greffage. Selon les auteurs, ce phénomène observé traduit la formation d'associations intermoléculaires des chaînes alkyl. Jusqu' à 30% de chaînons C8, la baisse de Ccr pourrait être expliquée par une augmentation des interactions intermoléculaires. Les greffons interconnectés facilitent l'occupation de l'espace. Alors qu'au dessus de 30%

de greffage, Ccr augmente avec une faible viscosité. Les auteurs expliquent que pour des taux de greffage élevés en chaînons alkyl C8, les associations intramoléculaires prédominent conduisant toutefois à une transition intra vers intermoléculaire pour de plus fortes concentrations en polymères.

II- 2. Complexes Polyélectrolytes en solution

Les complexes polyélectrolytes (PEC : Polyélectrolytes complexes) sont issus de l'auto-association de polyélectrolytes de charges opposées principalement gouvernée par des interactions électrostatiques. D'autres forces motrices hydrophobes et les liaisons hydrogènes peuvent contribuer à ce processus. Les liaisons hydrogènes ne sont pas majoritaires du fait de la prépondérance des forces électrostatiques mais cependant on peut penser que de telles liaisons sont présentes lorsque le polyélectrolyte possède un squelette polysaccharide par exemple. Les forces attractives coulombiennes étant les forces d'interactions principales, les paramètres influençant la complexation sont souvent le pH, la force ionique mais également des paramètres internes tels que la structure et les propriétés des polyélectrolytes impliqués.

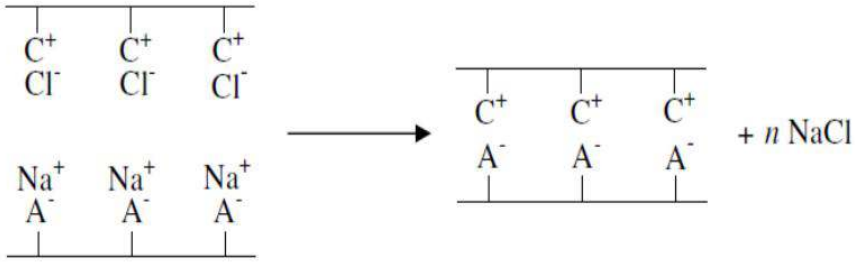


Figure 10. *Représentation schématique de la complexation entre un polyanion et une polybase faible.*

Dans un premier temps, nous nous intéresserons brièvement aux processus théoriques d'association des PEC.

✓ Processus théoriques d'association

Les systèmes présentant des séparations de phase associatives ont été à l'origine de l'étude de la formation de complexes macromoléculaires, notamment les travaux concernant la coacervation complexe menés sur les mélanges de macromolécules biologiques entrepris par Tiebackx (1911). Cet auteur avait constaté qu'un mélange de gélatine et de gomme d'acacia en milieu aqueux pouvait conduire, selon les conditions expérimentales, à la formation d'une phase concentrée. Ces travaux ont été relayés par le chercheur hollandais Bungenberg de Jong et ses collègues à partir des années 20 **(Bungenberg de Jong, 1936)**.

C'est d'ailleurs lui qui donna le nom de coacervation complexe (du latin *acervus* qui signifie entassé, lié) au phénomène de séparation de phase qu'il avait mis en évidence dans des mélanges composés de solutions aqueuses de gélatine et de gomme d'acacia. Depuis, de

nombreux modèles théoriques ont été développés pour mieux appréhender les phénomènes de complexation. Les interactions électrostatiques sont les interactions principales de ce processus de complexation que l'on peut aussi expliquer d'un point de vue entropique **(Thünemann et al., 2004, Ou and Muthukumar, 2006)**. Lors du mélange de deux polyélectrolytes de charges opposées, l'association des deux polymères va libérer un grand nombre de contre-ions en solution ce qui représente un gain d'entropie (augmentation du désordre en solution) thermodynamiquement favorable à la formation des PEC.

La formation des PEC peut être structurée en 3 étapes **(Tsuchida, 1994).** Une étape de formation du complexe proprement dite, suivie d'une réorganisation interne du complexe et enfin l'agrégation de ce complexe avec d'autres. En d'autres termes, le mélange d'un polyanion et d'un polycation aboutit dans un premier temps à un complexe primaire aléatoire, la deuxième étape se déroule dans l'heure qui suit le mélange et implique la formation de nouvelles liaisons et / ou la correction de distorsions dans les chaines du complexe.

Enfin, l'agrégation de complexes secondaires peut se produire également avec l'établissement d'autres types d'interactions (par exemple de type hydrophobe).

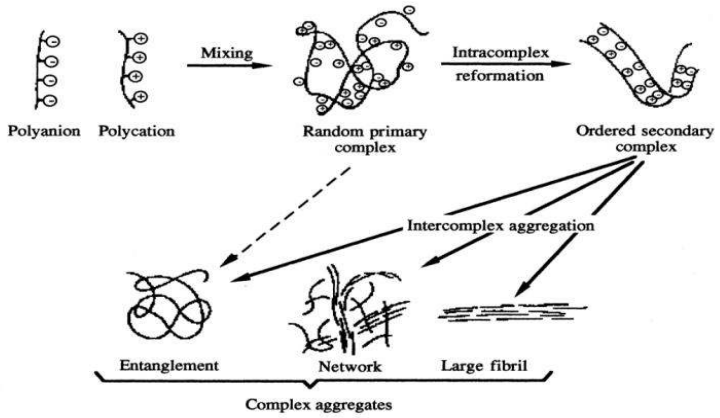


Figure 11. *Représentation schématique de l'agrégation des complexes polyélectrolytes* ***(Dumitriu and Chornet, 1998)***.

C'est la nature de ces agrégats qui va en grande partie déterminer le comportement des PEC en solution. Les propriétés des PEC obtenus vont être influencées par les caractéristiques physico-chimiques des polyélectrolytes (masses molaires, taux d'ionisation, rigidité des chaînes en solution...), mais aussi par des paramètres de composition du mélange (ratio de charges, ratio molaire) ou de protocole de mélange **(Pépin, 2010)**.

D'un point de vue macroscopique, les interactions polyanion/polycation permettent d'obtenir trois types de PEC différents **(Philipp et al., 1989)**.

- Des systèmes solubles, les PEC sont alors des agrégats de petites tailles répartis de façon homogène en solution.
- Des systèmes turbides, les agrégats en suspension sont à la limite de la séparation de phase.
- Des systèmes insolubles, les agrégats de fortes tailles précipitent.

Chapitre III: Systèmes étudiés (ALG/GLT)

III- 1. L'alginate de sodium

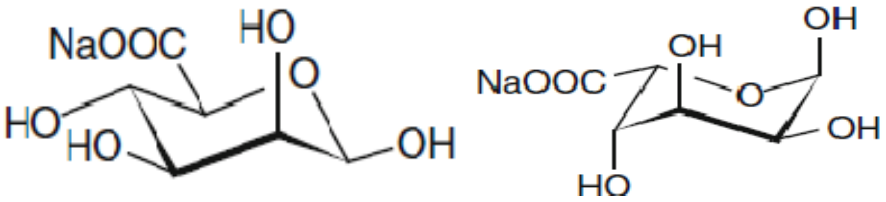
Les premières expériences sur l'extraction des alginates à partir d'algue brune, ont été réalisées par le chimiste anglais E. C. Stanford à la fin du 19ème siècle. En 1883, il découvrit une substance aux nombreuses et intéressantes propriétés, qu'il appela «algine». Son brevet explique que l'alginate peut être obtenu en immergeant les algues dans de l'eau ou dans un acide dilué, puis extrait avec du carbonate de sodium et précipité à l'aide d'une solution acide **(Stanford, 1886).** Plus tard, en 1886, il l'identifie comme acide et la rebaptisa acide alginique. Il en conçut quelques applications industrielles, notamment dans le domaine alimentaire pour épaissir et gélifier des solutions : soupes, gelées … etc. Ce n'est qu'à partir des années 1930 que la première structure d'acide alginique fut proposée par Nelson **(Nelson and Cretcher, 1930)**.

La production industrielle des alginates s'est développée ensuite aux États Unis USA dans les années 1930. La seconde guerre mondiale a largement favorisé le développement et l'utilisation des alginates dans divers domaines.

Aujourd'hui, l'alginate est reconnu comme un des polymères les plus variés pour son exploitation industrielle **(Delpech et al.,2000).** Ce polysaccharide est utilisé dans le secteur agroalimentaire et l'industrie pharmaceutique car il possède de nombreuses propriétés intéressantes: épaississant, stabilisant, gélifiant.

III- 1. 1. Structure de la chaîne

Les alginates sont constitués d'unités acides β-d-mannuronique (M) et acide α-l-guluronique (G) dont la séquence varie (Fig.12).



β-D-mannuronate (M)α-L-guluronate (G).

Figure 12. *Monomères de la chaîne alginate.*

L'acide alginique est un polymère naturel, linéaire, de structure hétérogène, constitué de deux unités monosaccharidiques : l'acide ß-D-mannuronique et l'acide α-L-guluronique. Ces acides sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques du type β-(1-4). Il est important de noter que la proportion en acide mannuronique (Man A) et en acide guluronique (Gul A) varie

d'une espèce à l'autre. L'acide alginique comporte une fraction riche en Man A appelée bloc M, une fraction riche en Gul A appelée bloc G, et une fraction ou les deux unités d'acides uroniques sont liées alternativement entre elles, appelée bloc MG ou GM (Fig.13). Les alginates possèdent les quatre types de liaisons glycosidiques possibles: diéquatorial(GG), diaxial (MM), équatorial-axial (MG) et axial-équatorial (GM)

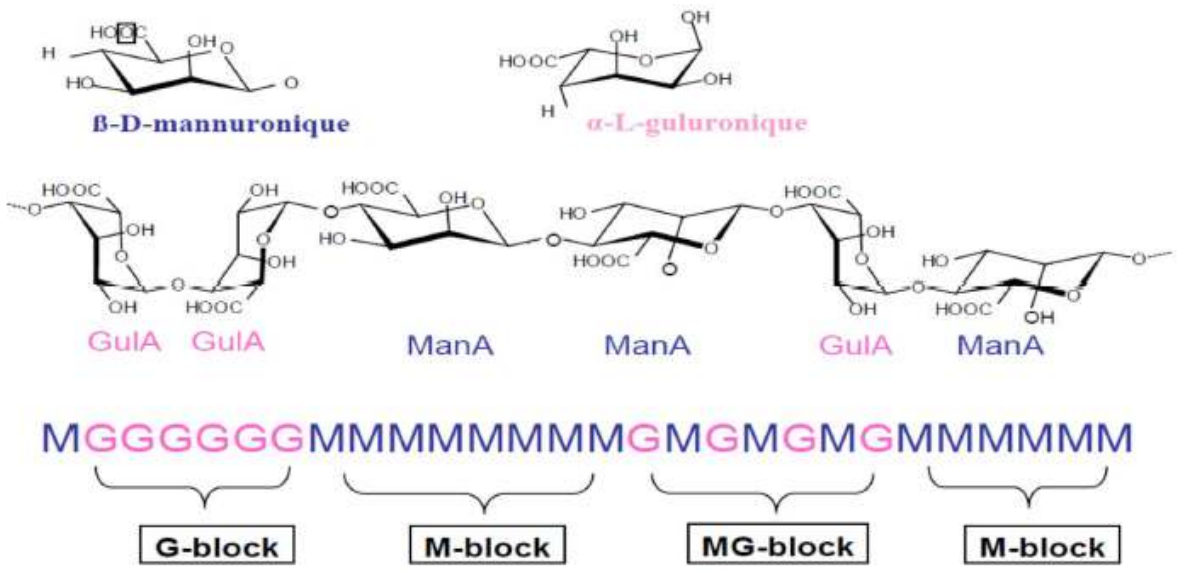


Figure 13. *Présentation d'une structure d'alginate.*

La structure des segments polyacide mannuronique est très proche de celle de la cellulose. Les liaisons diéquatoriales entre unités M donnent à ces segments une structure aplatie, de type ruban. Cette structure est stabilisée grâce à des liaisons hydrogène (Fig.14). Par exemple, le groupement hydroxyle en C3 du monomère M^{+1} interagit avec l'atome d'oxygène du cycle du monomère M.

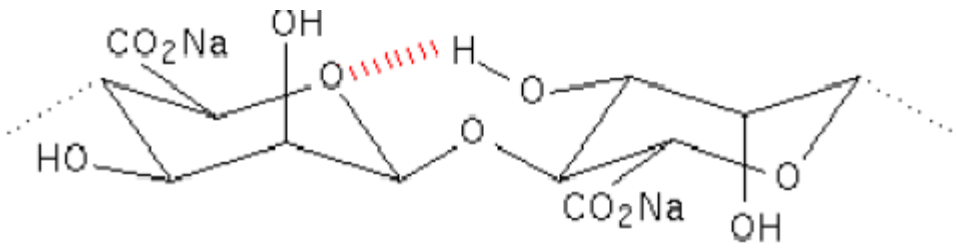


Figure 14. *Interactions entre les unités M.*

III- 1.2. Source de l'alginate

L'alginate naturel est produit presque uniquement par les algues brunes des espèces*Laminaria, Macrocystis, Fucus, Phaeophyceae, Ascophyllum, Ecklonie, Nereocystis, Durvillia, Chnoospora, Cystoseira*et *Turbinaria*. Celles-ci sont récoltées dans quelques unes des eaux les plus froides et les plus claires du monde : les mers arctiques au large des cotes norvégiennes et canadiennes et dans l'atlantique nord principalement : aux U.S.A, en Grande Bretagne, France et en Norvège. Cependant, certaines bactéries telles que *Azotobactervinelandii*et plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont susceptibles de produire l'alginate par des processus de fermentation microbienne suivis d'une polymérisation **(Rocher, 2008).**

L'extraction de l'alginate des algues repose sur la solubilité dans l'eau de ce polymère. L'acide alginique est insoluble dans l'eau, mais les sels de cations monovalents tels que le sodium Na^+ ou le potassium K^+ sont solubles. Ainsi, des changements de pH permettent sa purification et la séparation d'avec les autres composants. Les principales étapes du processus d'extraction de l'alginate sont :

- **Prétraitement :** les algues sont lavées plusieurs fois à l'eau puis rincées à l'eau distillée, de façon à retirer d'éventuelles impuretés. Les algues sont ensuite séchées et broyées finement.
- **Purification :** la poudre d'algue est traitée avec une solution diluée d'acide, capable de dissoudre les sucres autres que l'alginate.
- **Extraction :** l'acide alginique est redis sous dans une solution légèrement basique de $NaHCO_3$ sous forme d'alginate de sodium alors que les protéines encore présentes en solution sont hydrolysées.
- **Récupération :** la solution est alors filtrée et un ajout d'éthanol permet de précipiter spécifiquement l'alginate, celui-ci étant insoluble dans ce solvant contrairement aux acides aminés issus des protéines précédemment hydrolysées **(Atkins et al., 1973).**

III- 1.3. Caractéristiques de l'alginate

Comme tous les polymères, l'alginate est caractérisé par différents paramètres tels que : les masses molaires moyennes en poids $\overline{M_w}$ en nombre $\overline{M_n}$, l'indice de polydispersité (Ip) ou encore les degrés moyens de polymérisation en nombre $\overline{DP_n}$ et en poids $\overline{DP_w}$.

D'autres facteurs sont propres à l'alginate donc utiles pour l'appréciation de ses propriétés. Ce sont le rapport *M/G*, les fractions en monomères f_G, f_M et en dimère f_{GG}; f_{MM}; f_{MG} ou encore la longueur moyenne des chaînes d'alginate **(Pérez, 1997).**

- ✓ **Masses molaires moyennes**

La masse molaire moyenne en nombre $\overline{M_n}$, est définie comme la masse totale de toutes les macromolécules dans un échantillon divisée par le nombre total de macromolécules de l'échantillon (équation.1) **(Melvik et al., 1998).**

$$\overline{\mathbf{M_n}} = \frac{\sum_i \mathbf{N_i} * \mathbf{M_i}}{\sum_i \mathbf{N_i}} \qquad \textbf{Équation.1}$$

N_i : est le nombre de chaînes de masse molaire M_i.

La masse molaire moyenne en poids (M_w), est définie comme le rapport entre la somme des produits de la masse d'une chaîne *i* par sa masse molaire sur la masse totale des chaînes. (équation.2).

$$\overline{\mathbf{M_w}} = \frac{\sum_i \mathbf{m_i} * \mathbf{M_i}}{\sum_i \mathbf{m_i}} = \frac{\sum_i \mathbf{N_i} * \mathbf{M_i^2}}{\sum_i \mathbf{N_i} * \mathbf{M_i}} \qquad \textbf{Équation.2}$$

Elle permet de prendre en compte le fait que les molécules de polymère les plus grosses contribuent plus à la masse totale de l'échantillon que les molécules plus petites **(Melvik et al., 1998).**

- ✓ **Degrés de polymérisation moyens**

À partir de ces masses molaires moyennes, on définit les degrés de polymérisation moyens en masse et en nombre comme le rapport entre la masse molaire moyenne correspondante et la masse molaire du monomère, notée M_0 **(Melvik et al., 1998).**

- ✓ **Rapport M/G**

La structure des alginates dépend fortement du rapport M/G, c'est-à-dire le rapport du nombre de monomères mannuronate sur le nombre de monomères guluronate. Celui-ci varie selon l'origine de l'alginate et les traitements effectués sur celui-ci, mais se situe en majorité entre 0.25 et 2.25. Il peut être déterminé de la même façon que les fractions de dimères par RMN (Fig.15) ou par chromatographie liquide échangeuse d'ions **(Rocher et al., 2008).**

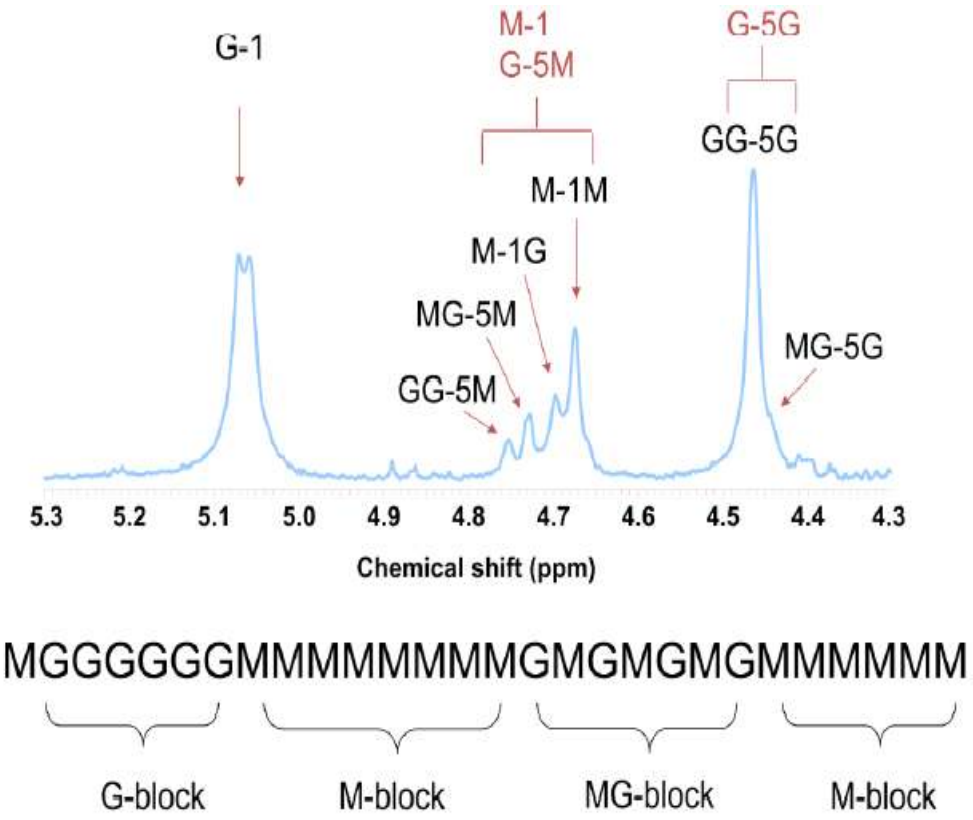


Figure 15. *Mise en évidence des différents blocs d'alginates: spectrométrie RMN du proton* **(Hamimed, 2016).**

III- 1.4. Propriétés Physiques

- **Solubilité et viscosité :**

L'acide alginique pur est insoluble dans l'eau. Sa solubilité ou non dans l'eau dépend du type de sels qui lui sont associés. Les sels de sodium, d'ammonium, de potassium et d'autres métaux alcalins se dissolvent parfaitement en solution aqueuse, en donnant dissolutions à haute viscosité. Exemple: pour une dilution de 1% d'alginate à 20°C, la viscosité est de 1500 à 3000 centpoises, alors que la gomme arabique à la même dilution donne moins de 30 centpoises. Les sels de cations polyvalents, tel le Ca^{2+} sont insolubles en solution aqueuse, à l'exception de celui de Mg^{2+} **(Bruneton, 1987).**

- **Stabilité :**

L'alginate de sodium sec, en poudre et pur peut avoir une stabilité de plusieurs mois et peut être stocké dans un endroit sec et frais loin de toute lumière du soleil. A basse température, l'alginate de sodium peut être gardé pendant plusieurs années sans réduction significative de son poids moléculaire. En revanche, l'acide alginique sec a une stabilité très

limitée aux températures ordinaires dues à la dégradation intramoléculaire **(Smidsrod et al., 1966).**

Vu leurs usages multiples, il est important de se rendre compte des facteurs qui déterminent et limitent la stabilité des solutions aqueuses d'alginate et des réactions chimiques responsables de la dégradation.

III- 2. La gélatine

La gélatine est une substance protéique pure. Elle est obtenue généralement par hydrolyse acide partielle (type A) ou hydrolyse alcaline partielle (type B) des fibres du collagène 63 représenté par la figure suivante **(**Fig.16**) (Galaev and Mattiasson, 2007).** Comme elle peut être constituée par un mélange des deux types **.(Hermans, 1949)**

La gélatine peut couvrir une gamme de produits possédant des propriétés différentes

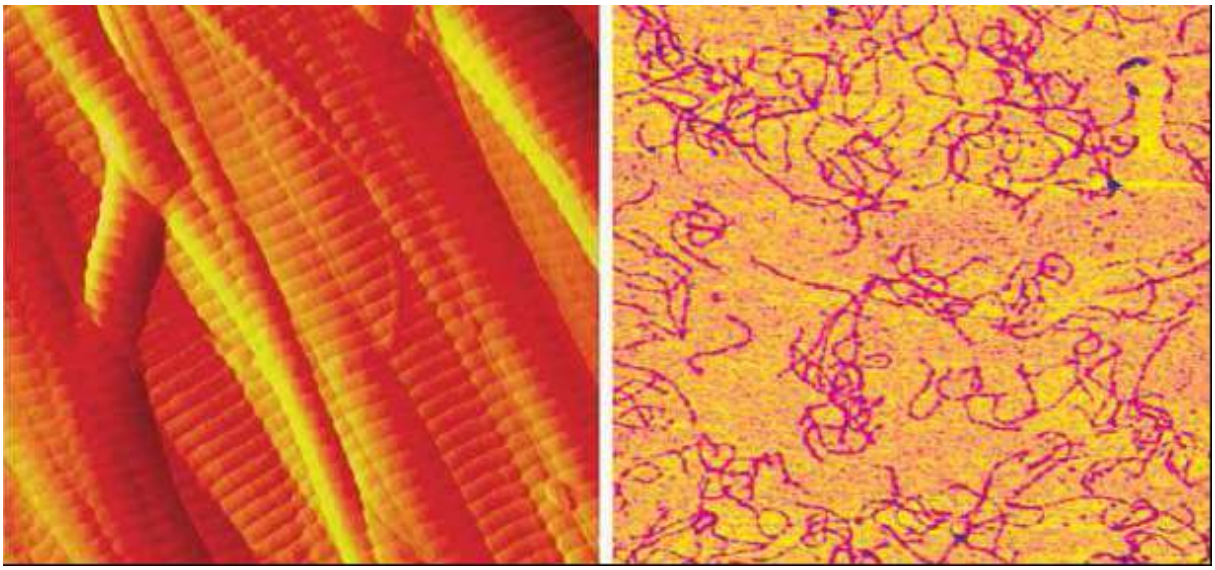


Figure 16. *Structure fibreuse du collagène 63 constituant de base de la gélatine* ***(Galaev and Mattiasson, 2007).***

III- **2.1.** Procédé de fabrication de la gélatine

La conversion du collagène en gélatine a été longuement étudiée **(Harding, 1965)**. Elle se réalise en deux étapes: la solubilisation du collagène (soit en milieu acide, soit en milieu basique) et sa conversion en gélatine. Cette dernière est le résultat de la dénaturation de la structure tertiaire de la triple hélice de tropocollagène. Les chaînes se dissocient et adoptent alors une configuration pelote statistique.**(Jones, 1987)**La

fabrication industrielle de la gélatine consiste principalement à contrôler l'hydrolyse du collagène et à convertir le produit en un matériel soluble avec des propriétés physico-chimiques souhaitées, telles que la force en gel, la viscosité, le point isoélectrique (pIE) etc.

III- 2.2. Structure et composition

La gélatine contient un total de 18 acides aminés en différentes concentrations. La liaison de ces acides aminés forme des chaînes polypeptidiques. Chaque chaîne contient environ mille acides aminés. La structure globale de la gélatine est une molécule en forme de baguette se composant des structures hélicoïdales primaire, secondaire et tertiaire **(Karim and Bhat, 2008).**

La chaîne macromoléculaire contient environ 27% de glycine et environ 27% de proline et d'hydroxproline. La représentation monomérique de ce biopolymère est (Gly - X - Y) n. L'encombrement stérique des noyaux pyrrolidone de la proline et de d'hydroxproline impose à la chaîne polypeptidique une structure hélicoïdale de type polyproline dans laquelle il n'existe pas de pont hydrogène interne .Trois chaînes de ce type peuvent s'enrouler en triple hélice et établir entre elles de nombreuses liaisons hydrogène qui assurent la stabilité de l'ensemble.

La gélatine est un exemple de polymère amphotère, présentant des propriétés cationiques en milieu acide et des propriétés anioniques dans un environnement alcalin. Une valeur du point isoélectrique peut ainsi être trouvée, correspondant au pH pour lequel le polymère a un nombre égal de groupes chargés positivement et négativement.

Chapitre IV:
Partie expérimentale

L'objectif de ce chapitre est de présenter en détail, le matériel et les produits utilisés et les différents modes opératoires suivis pour immobilisé une enzyme modèle (α-amylase) dans des matrices à base de deux biopolymères de nature polysaccharidique et protéique à savoir (ALG) et (GLT).

Ainsi, ce projet s'est découpé en différentes parties, nous avons d'abord procédé à la formation de billes de (ALG) et de (GLT) à différents pourcentages et étudier la désorption d'enzymes à partir ces billes.

Une fois le pourcentage de désorption de gélatine à partir des billes a été déterminé, nous avons travaillé sur l'encapsulation de l'enzyme (α-amylase) dans deux systèmes différents :

1. Système choisi : l'alginate de sodium (ALG) et l'alginate de sodium (ALG) et gélatine (ALG-GLT).
2. Système standard : l'alginate de sodium (ALG).

Après la formation des billes (système 1 et système 2), les paramètres cinétiques K_M et V_M ont été étudiés, l'étude de désorption de l'enzyme et la réutilisation des billes ont été également effectué.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de biologie de la faculté des sciences à l'université de Médéa durant ces trois mois.

IV- 1. Matériel et produits

IV- 1.1. Matériel

Durant ce travail nous avons employé les matériels ayons des numéros dans le tableau06:

Tableau 06. *Matériel utilisés.*

Matériels	Marque
Balance électronique	KERN ALS 220-4N
Agitateur magnétique	AGIMATIC - N SELCTA
pH-mètre	pH -2005 PH METER SELECTA
Spectrophotomètre UV-Vis	ETER UV 2005 SELICTA
Microscope optique	OPTIKA
Incubateur termo agitador	TR100-G IVYMEN
Pied à coulisse digital	LUTRON

IV- 1.2. Produits chimiques:

Le tableau 07 représente l'ensemble des produit chimiques utilisé au cours ce travail.

Tableau 07. *Produits chimiques utilisés.*

Réactifs	Marque
NaOH	SIGMA-ALDRICH
HCl	HONEYWELL/FLUKA
éthanol	SIGMA-ALDRICH
acide phosphorique	SIGMA-ALDRICH
Acétate de sodium	ANALAR NORMAPUR
Acide acétique	CHEM-LAB
réactif glycose	SPINE
bleu de comassie	FLUKA CHIMIKA
Glycose	PA PANREAC
Amidon de pommes de terre	VWR PROLABO chemicalis
Phosphate de sodium dibasic	SIGMA-ALDRICH
Phosphate de potassium monobasic	SIGMA-ALDRICH
Chlorure de calcium	HONEYWELL/FLUKA

IV- 1.3. Biopolymére étudie.

IV- 1.3.1. Alginate de sodium.

- Formule chimique : $(C_6H_7NaO_6)_n$
- Synonyme : polymannuronate sodique.
- Masse molaire (M_w) : 380 000 g mol^{-1}
- Point de fusion : > 300°C.
- Aspect : poudre blanche légèrement jaunâtre, pratiquement iodure, sans goût.
- Solubilité : pratiquement insoluble dans l'éthanol, l'éther, le chloroforme, les solvants organiques. En présence d'eau il forme une solution colloïdale.

IV- 1.3.2. Gélatine

- Structure : trois chaînes différentes des acides aminés
- Masse volumique : 0.68 g cm^{-3} (20°C)
- Aspect : est une substance solide translucide, transparente ou légèrement jaune, presque sans goût et sans odeur, obtenue par l'ébullition prolongée de tissus conjonctif (peaux) ou d'os d'animaux (principalement porc, bœuf, poisson).
- Solubilité : soluble dans l'eau chaude, le glycérol, l'acide acétique, insoluble dans les solvants organiques, l'éthanol, le chloroforme, l'éther.
- Gélatine de type B

IV- 1.4. L'α-amylase

Dans ce travail, l'enzyme utilisé c'est une α-amylase microbienne de *Bacillus subtilis*. Elle est fournie par Novozyme Industrie .Cette enzyme est liquide lmpide brunâtre leur densité est de 1.2 g/ml et son activité spécifique est de 531 KNU-B/g.

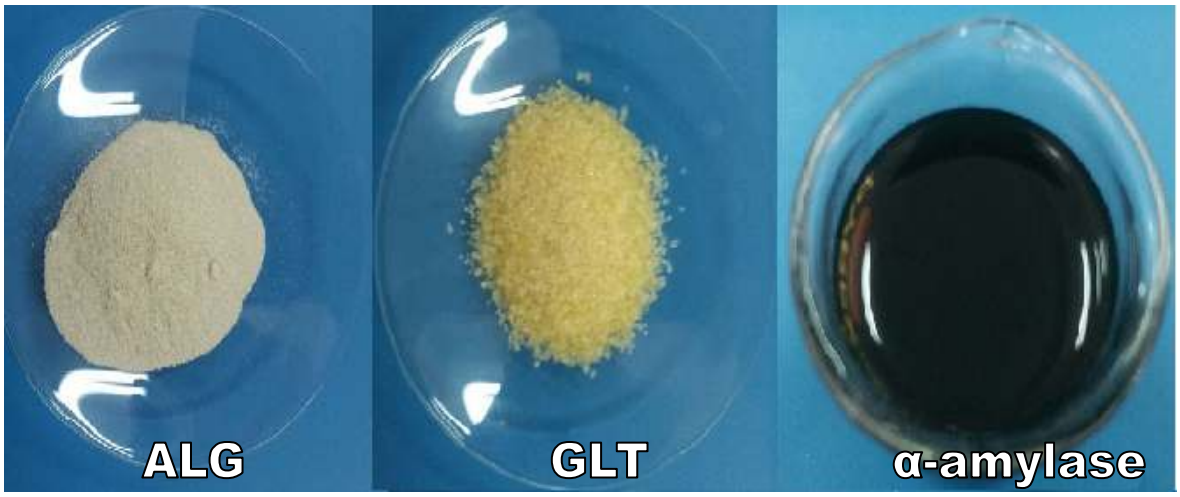


Figure 17. Aspect de trois produits : ALG (Alginate); GLT (Gélatine) et l'*α-amylase*

IV- 2. Principe de la formation des billes

IV- 2.1. Principe de la formation des billes à base de mélange (ALG-GLT)

Le principe: En solubilisant séparément sous faible agitation afin d'éviter la formation des bulles d'air l'alginate de sodium à T = 60°C et la gélatine à T= 40 °C dans le tampon acétate pH 4,7. Le mélange de deux biopolymères est se fait par différente proportions de concentrations de gélatine dans l'alginate (six formulation de différentes concentration), les billes on été formé par couplexation avec les ions de Ca^{+2}.

IV- 2.1.1. Mode opératoire

Pour élaborer nos systèmes, nous avons d'abord préparé deux solutions différentes d'alginate et de gélatine à 4 % dans le tampon acétate pH 4.7. Les deux solutions ont été laissées sous agitation magnétique jusqu'à la dissolution complète des deux biopolymères.

Plusieurs mélanges ALG-GLT ont été envisagés pour réaliser notre étude. Les ratios des deux solutions préalablement obtenues dans les différentes formules réalisées sont données le tableau 08:

Tableau 08. *Ratio des deux biopolymères dans différentes formules.*

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
ALG (%)	2	2	2	2	2	2
GEL (%)	0	1	1.25	1.5	1,75	2

Cette expérience a été répétée trois fois. Ce mélange a été solidifié sous forme de sphères à l'aide d'une seringue stérile dans une solution de $CaCl_2$ (0.1M). Cette dernière aboutit à la formation rapide des billes sphériques et rigides ayant un diamètre approximatif de 2-3.5mm. La formation des billes a été achevée après 15 min à température ambiante

Les billes d'alginate formées sont rincées avec de l'eau distillée, puis avec du tampon acétate de sodium (pH 4.7).

La mesure de taille de trois (06) séries de billes contenant 20 billes choisies aux hazard a été effectuée par une Pied de coulisse digital (Fig.18), les résultats obtenus sont montré dans la (Fig. 20).



Figure 18. *Pied à coulisse digital.*

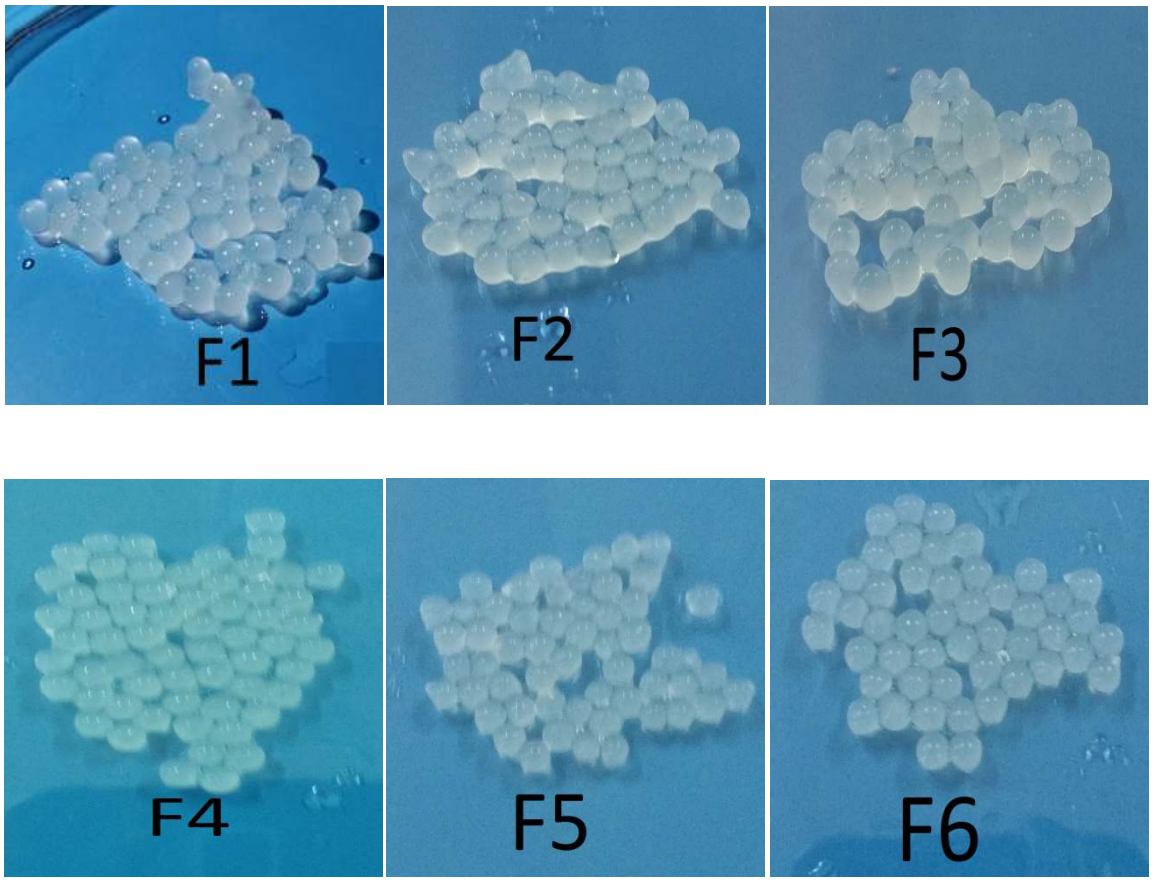


Figure 19. *Formes et aspect des billes.*

Les billes obtenues en F2, F3, F4, F5, F6 ont montrés une forme sphérique, homogène et avec un aspect blanchâtre. Les billes obtenues en F1 montrés une forme sphérique, homogène et avec un aspect translucide (Fig.19).

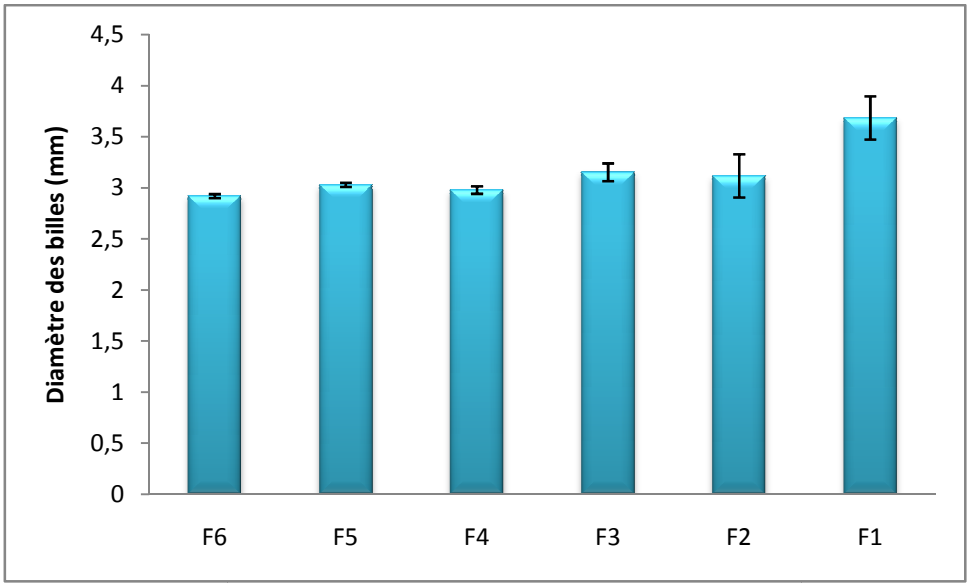


Figure 20. *Taille des billes.*

Les résultats obtenus montrent bien que la taille des billes formées varie selon les proportions des deux biopolymères (ALG-GEL) dans le milieu. En effet, après formation, le diamètre des capsules est à 3,5 mm pour la formule F1 (2%ALG) et qui diminue à 2,9 mm pour la formule F6 (2%ALG+2%ALG). Cela montre que les billes d'alginate possèdent une taille importante par rapporte aux autres billes ALG-GEL (Taille identique). Nous pouvons expliquer ce phénomène par le fait que le pH du milieu est supérieur à la pKa de l'alginate qui est autour de 3,5, et les fonctions carboxyliques sur la chaine du polymère sont en forme ionique ($-COO^-$) ce qui entraine une répulsion statique des chaines, et en augmentant la concentration de l'alginate ce phénomène est accentué en provoquent l'augmentation de la taille des billes.

IV- 3. Étude de la désorption de gélatine

La désorption de la gélatine à partir les billes d'alginate dans un temps déterminé. Les billes formées pour chaque formule précédente, ont été suspendue dans une solution de $CaCl_2$ à (0.1M) sous faible agitation pendant 2 heures, le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford **(Bradford, 1976)**. Le blanc c'est la solution de $CaCl_2$ pur. Le pourcentage de désorption de gélatine à partir des billes d'alginate vers la solution de $CaCl_2$ a été calculé selon l'équation .3 ; (voir Annexe 3)

$$DE\ (\%) = \frac{Cd}{Ci} * 100 \qquad \textbf{Équation .3}$$

C_d est la concentration de gélatine dans le milieu extérieur (mg /L);

C_i est la concentration de gélatine dans les billes (mg /L).

L'absorbance a été Mesuré à λ= 590nm et les résultats de manipulation permettent de tracer l'histogramme de pourcentage de désorption (%) pour les différents formules.

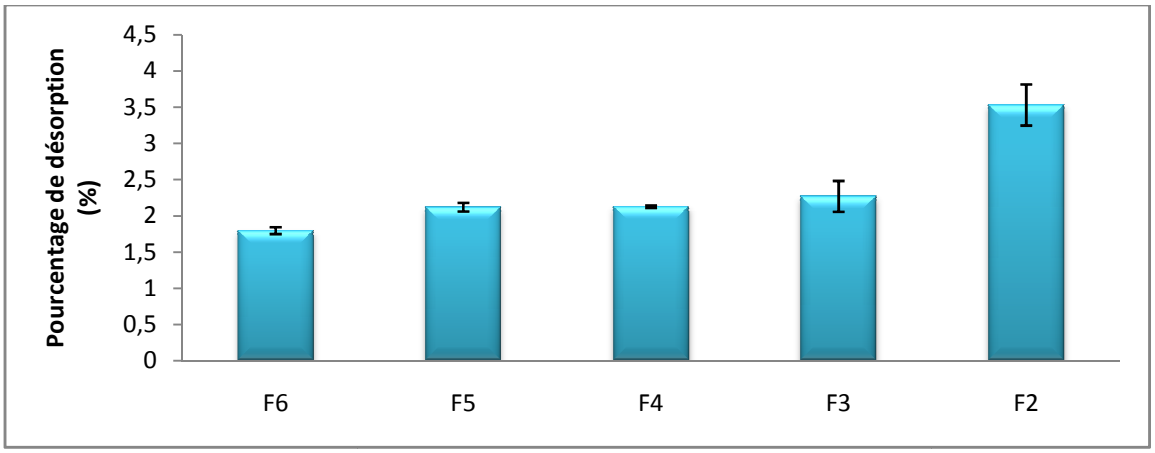


Figure 21. *Pourcentage de désorptions(%) de gélatine.*

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de désorption de gélatine varie entre 1.7% et 3.7% selon les formules étudiées. Nous pouvons aussi remarquer l'augmentation de pourcentage de désorption en diminuant la concentration de gélatine dans la formule. Effectivement, pour la formule F6 avec 2% d'GEL présente le minimum de désorption qui est de 1.7%. Ce pourcentage a été importante pour la formule F2 est de 3.7 %. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que le pourcentage d'ALG-GEL dans la formule donne une bonne conformation entre les deux biopolymère utilisées, ce qui limite la diffusion de la gélatine à travers cette matrice (billes). Même la (Fig.21) montre également une porosité (pour les formules : F2, F3, F4, F5, F6) uniforme et de taille inférieure a celle de la formule F1.

IV- 4. Observation microscopiques des billes

Le microscope optique est une technique pertinente pour l'étude de la surface des biopolymère. L'aspect microscopique des billes formées, ont été observé via un microscope optique immédiatement après coloration afin de déterminer la porosité de chaque formule de ces billes.



Figure 22. *Microscope optique à 40 zoom*

Les résultats de mesure microscopique sont représentes dans la (Fig.23)

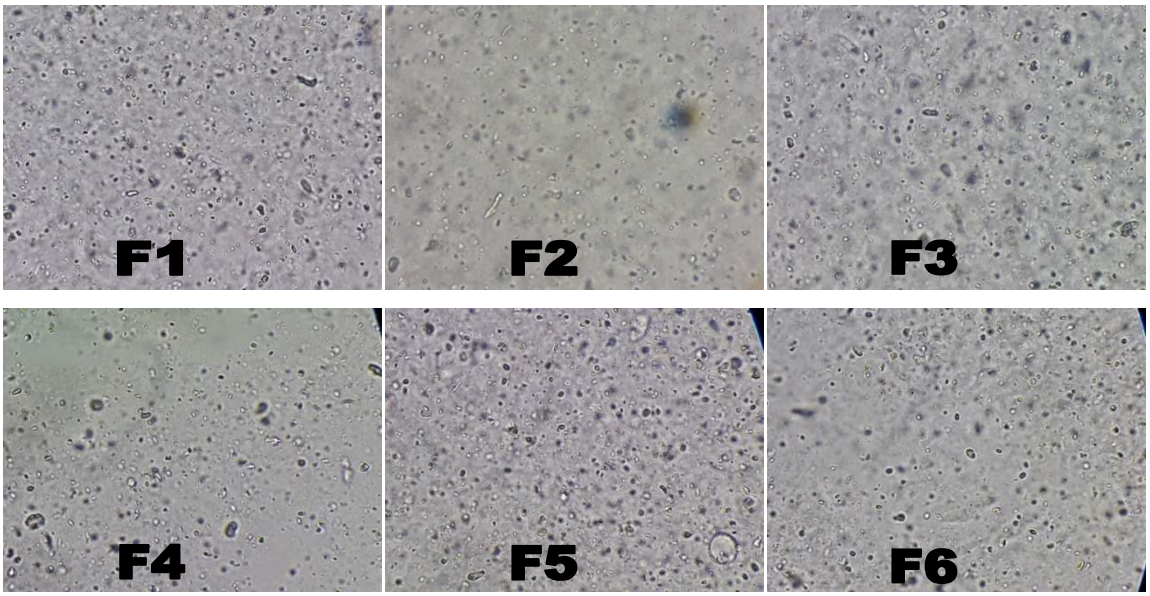


Figure 23. *Observation microscopiques des billes.*

L'observation microscopique dans la figure 23 pour les formules F2, F3, F4, F5, F6 montre un aspect homogène et des tailles des pores moyenne par rapport aux billes de la formule F1 qui possèdent des pores volumineux et non homogène.

Les formules F1 et F6 sont les deux formules choisies par la suite pour compléter notre étude.

IV- 5. Immobilisation de l'α-amylase

L'α-amylase a été immobilisé par inclusion dans deux supportes différentes l'alginate (2%) et dans le mélange ALG-GEL (2%, 2%).

Le choix d'une méthode pour lier chimiquement ou physiquement une enzyme repose sur son efficacité, sa stabilité et sa résistance à différentes conditions suite à son immobilisation. Plusieurs méthodes pour l'immobilisation de l'α-amylase sont possibles et décrites dans la littérature. L'inclusion de l'enzyme dans les billes d'alginate est l'une des méthodes les plus utilisées **(Ates et al., 2007 ; Zhang et al., 2013)**. Cette méthode consiste à retenir une enzyme et l'enfermer à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une manière purement physique. L'alginate est le copolymère le plus utilisé car c'est un polymère anionique, biocompatible, léger et non toxique et son procède de gélification est facile (**Won et al., 2005 ; Zhang et al., 2013 ; Vu et Le, 2008).**

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme dans la matrice d'un polymère ou dans une microcapsule. Plusieurs polymères, entre autres l'alginate, le chitosan **(Ueda et al., 1985).**

Les réactions de gélification sont bien maîtrisées et l'inclusion permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de la masse d'enzyme **(Ahmad et al., 2010)**. Il n'existe aucun lien entre l'enzyme α-amylase et le gel des billes d'alginate ce qui diminue le risque de dénaturation. Quant aux inconvénients de cette méthode, on trouve la mauvaise tenue mécanique des gels, problème de diffusion de substrat à travers le gel et les fuites d'enzyme ainsi que les problèmes d'encombrement stérique **(Stewart and Swaisgood, 1993).**

IV- 5.1. Inclusion de l'enzymes dans les billes de mélange de biopolymères

Des solutions de biopolymère à des concentrations fixes [solution d'ALG (2%) et le mélange de biopolymère ALG-GEL (2%, 2%)] ont été chauffées à 40 °C (Won et al., 2005)**.** Après refroidissement à température ambiante, 5 % de la solution enzymatique (1.2 g/ ml) ont été ajoutés à 2 ml de biopolymère [ALG (2%) ou mélange de biopolymère ALG-GEL (2%, 2%)]



Figure 24. *Immobilisation de l'enzyme par inclusion dans un biopolymère.*

Le mélange a été solidifié sous forme de sphères à l'aide d'une seringue stérile dans une solution de $CaCl_2$ Cette dernière aboutit à la formation rapide des billes sphériques et rigides. La formation des billes a été achevée après 5 min à température ambiante (Fig.24).

Les billes formées sont rincées avec de l'eau distillée, puis avec du tampon phosphate (pH6.3) et sont ensuite conservées à 4°C dans une solution tampon phosphate (pH6.3).

$$\text{Rendement d'immobilisation} = \frac{activité\ enzymatique\ total - activité\ non\ immobilisé}{activité\ enzymatique\ totale} * 100$$

L'activité de l'enzyme totale correspond à l'activité totale qui a été immobilisée dans le support;

L'activité non immobilisée est celle qui a été contenue dans le volume du lavage;

Les résultats de l'immobilisation (%) sont représentes graphiquement dans la (Fig.25)

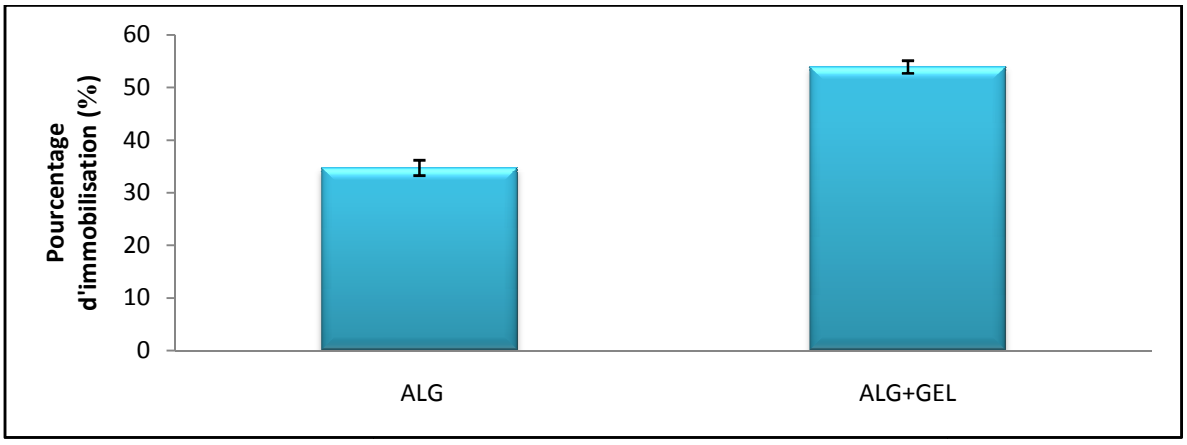


Figure 25. *Pourcentage d'immobilisation (%) pour deux système ALG et ALG+GLT.*

D'après le résultat montré dans la (Fig.25), nous pouvons observes une variation significative du pourcentage pour les deux systèmes étudies. Le meilleur pourcentage est celui du système ALG-GLT a été de 54% par rapport le système ordinaire (ALG) (pourcentage de 35%). Une amélioration de 19% a été apportée par le système ALG-GLT. Cette amélioration peut être expliquée par la capacité de rétention de ce système due principalement à la diminution de la taille des pores empêchant l'enzyme de ressortir et d'être expulser vers le milieu extérieur au cours de l'immobilisation.

IV- 6. Étude de la désorption de l'enzyme

La désorption de l'enzyme c'est la concentration d'enzyme désorber à partir les billes formées (billes d'ALG et les billes de mélange de biopolymère ALG-GLT) dans un temps déterminé. L'activité enzymatique d'enzymes immobilisée dans les billes d'alginate a été suspendue dans la solution de tampon phosphate (pH6.3), et après 120 min, le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford **(Bradford, 1976)**

Le pourcentage de la désorption de l'enzyme à partir des billes d'alginate vers la solution C_aCl_2 a été calculé selon l'équation 3:

$$DE(\%) = \frac{CL*VE}{mL} * 100 \qquad \textbf{Équation.3}$$

C_L est la concentration en protéines dans la solution tampon phosphate (pH6.3);

V_E est le volume de la solution tampon phosphate (pH6.3);

m_L est la quantité des protéines retenues dans les billes d'alginate.

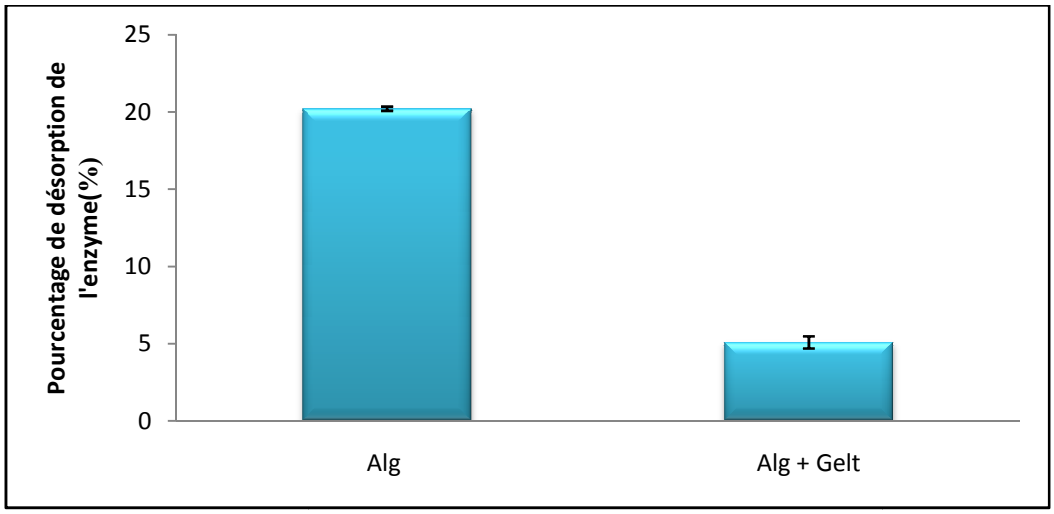


Figure 26. *Pourcentage de désorption d'enzyme (%) pour les deux systèmes (ALG et ALG-GLT).*

La (Fig.26) représente le pourcentage de désorption d'enzyme (%) pour les deux systèmes (ALG et ALG-GLT), cette figure montre une grande proportion désorption (20%) d'enzymes lors de l'utilisation du support ordinaire (alginate) par rapport le système ALG-GLT qui donne un pourcentage de désorption d'enzyme de 5%. Cette amélioration dans la capacité de rétention de l'enzyme à l'intérieure du support est due principalement aux nouvelle caractéristiques apporté par ce nouveau système ALG-GLT.

IV- 7. Dosage de l'activité enzymatique

L'amidon (polysaccharides de réserve chez les végétaux) est une macromolécule constituée de deux polymères de D-glucose: Amylose et amylopectine. Ces deux polymères peuvent être hydrolysés par les amylases enzymes spécifiques des liaisons α(1-4), les glucosidases, l'amidon phosphorylases, la pullulanse, l'amyloglucidase ...etc.

L'activité enzymatique a été estimée à partir du suivi de la concentration du glucose formé par méthode enzymatique (GOD-POD). Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du pouvoir réducteur du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon.

La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du glucose libérée. Ce principe est détaillé en annexe 1.

L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale (µmol/ml), correspondant à une µmole du glucose libéré par millilitre du milieu à 37°C et à pH 6.3.

- Protocole expérimental

100µl de l'enzyme est ajouté à 5 ml de la solution du substrat (amidon 5g/L dans le tampon phosphate pH 6.3), après agitation le mélange est incubé à 37°C en fonction du temps avec un tube témoin représenté par le blanc. A la fin de la réaction 10 µl de milieu ont été prélevé et ajouté à 1 ml de réactif du glucose suivi d'une incubation à 37°C pendant 10 minutes pour le développement de la couleur. L'absorbance est déterminé à 505 nm contre le blanc. La concentration du sucre réducteur correspondant est déterminée à partir d'un étalon établie de concentrations du glucose de 1 mg/ml.

Les résultats de ce suivie sont représente graphiquement dans la (Fig.27) :

La (Fig.27) montré la cinétique enzymatique de l'enzyme libre et les deux systèmes étudies (ALG , ALG-GLT). L'étude montre une augmentation linéaire de la concentration du glucose formé pendant les premières minutes de la réaction. Pour l'enzyme libre, après 20 min de la réaction, la concentration du glucose formé est de 9.82 µmol/l par rapport de 9.60 µmol/l et 15.96 µmol/l pour l'ALG et ALG-GEL respectivement. Mais après une 50 min cette concentration a été stabilisée pour l'enzyme libre et système ALG et de 11.82 µmol/l et 11.6 µmol/l respectivement. Mais pour le nouveau système (ALG-GEL) cette concentration est de stabilité est obtenu après 120 min est de 23.01µmol/l

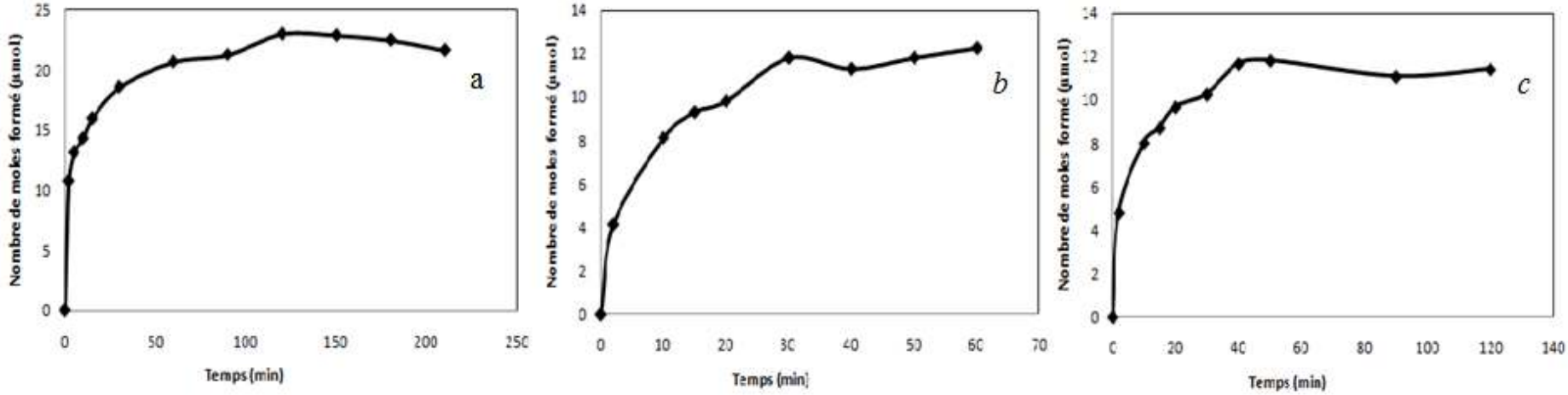


Figure 27*. Cinétique enzymatique. a : ALG- GLT, b : ALG, c :* Enzyme libre.

VI- 8. Réutilisation de l'enzyme immobilisée

La réutilisation de l'enzyme immobilisé dans le deux système étudies (ALG, ALG-GLT) dans d'autres cycles d'hydrolyse de l'amidon a été testée. L'hydrolyse de l'amidon a été réalisée dans les conditions précédentes. Après chaque essai, les billes ont été lavée avec le tampon phosphate (pH 6.3) puis réutilisé dans un autres cycle (Fig. 28).

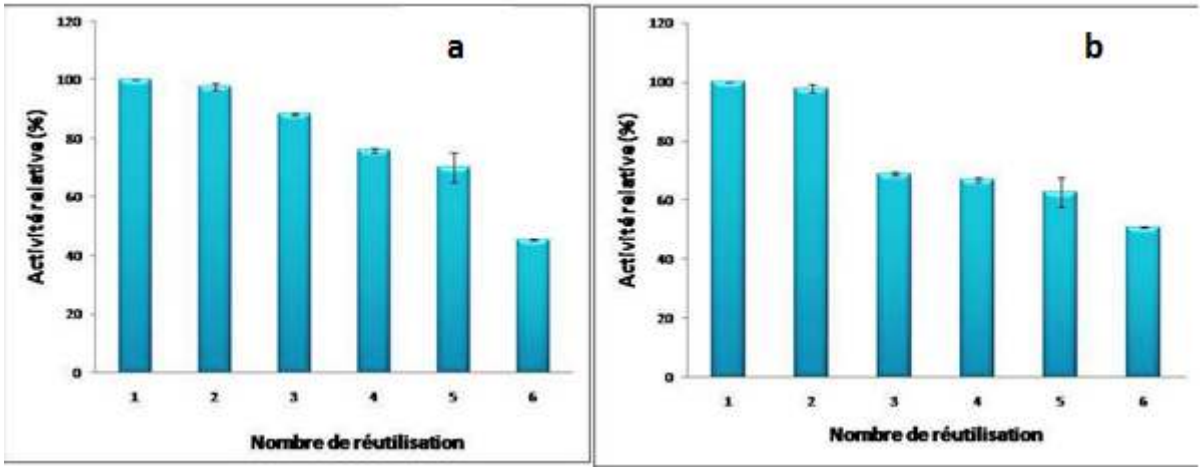


Figure 28. *Étude de la réutilisation de l'enzyme immobilisée dans l'hydrolyse de l'amidon (a: ALG b: ALG-GLT).*

La variation de l'activité relative (%) en fonction de nombre de réutilisation est montrée dans la (Fig.28). Nous pouvons observer dans le cas des billes d'ALG que l'activité de l'enzyme immobilisée est optimale pour le 1er cycle et par la suite on observe une diminution légère pour le 2eme cycle par contre l'activité enzymatique est optimale pour les deux premiers cycles dans le cas de système ALG-GLT.

La (fig. 28) montre également que l'activité enzymatique dans le système ordinaire ALG, donne une chute d'activité de 55%. Par contre, le système ALG-GEL conserve 55% de son activité initiale. Ce système étudié conserve une activité implorante par rapport le système ordinaire (ALG).

IV- 9. Détermination des constantes cinétiques de l'α-amylase immobilisée

Ce travail consiste à étudier la cinétique d'hydrolyse de l'amidon de pomme de terre par α-amylase microbienne de *Bacillus subtilis*. L'étude cinétique en fonction de la concentration en substrat nous permettra d'estimer les paramètres cinétiques (K_m et V_m) de l'*α*-amylase libre et immobilisée par la représentation de Lineweaver-Burk. L'amidon soluble

avec différentes concentrations de 100 à 600 mg/L est utilisé comme substrat naturel de l'enzyme immobilisée.

Les paramètres cinétiques sont représentés dans le tableau 9. Il est connu que l'affinité de l'enzyme vers le substrat est inversement proportionnelle à la valeur de Km obtenu. Cette affinité deviente plus implorante pour les deux systèmes étudies (ALG et d'ALG-GLT) ($2.25*10^{-3}$ mol/l à $2,16*10^{-3}$ mol/l) par rapport a l'enzyme libre qui est de $1,1 .10^{-2}$ mol/l mais D'après le tableau 9, la vitesse d'enzyme libre est de 85,03 µmol.l^{-1}.Min^{-1} importante par rapport aux deux autre systèmes étudies (25 µmol .l^{-1}. Min^{-1} pour ALG-GLT et 27.02 µmol. l^{-1}. Min^{-1} pour l'ALG). Cette diminution, due principalement aux phénomènes du transfert de substrat et produit dans la matrice d'immobilisation.

Tableau 09. *Résultats du K_m et V_m*

	Km (mol/l)	**Vm µmol .l^{-1}. Min^{-1}**
ALG	$2,25 .10^{-3}$	25
ALG-GLT	$2,16 .10^{-3}$	27,02
ENZ libre	$1,1 .10^{-2}$	85,03

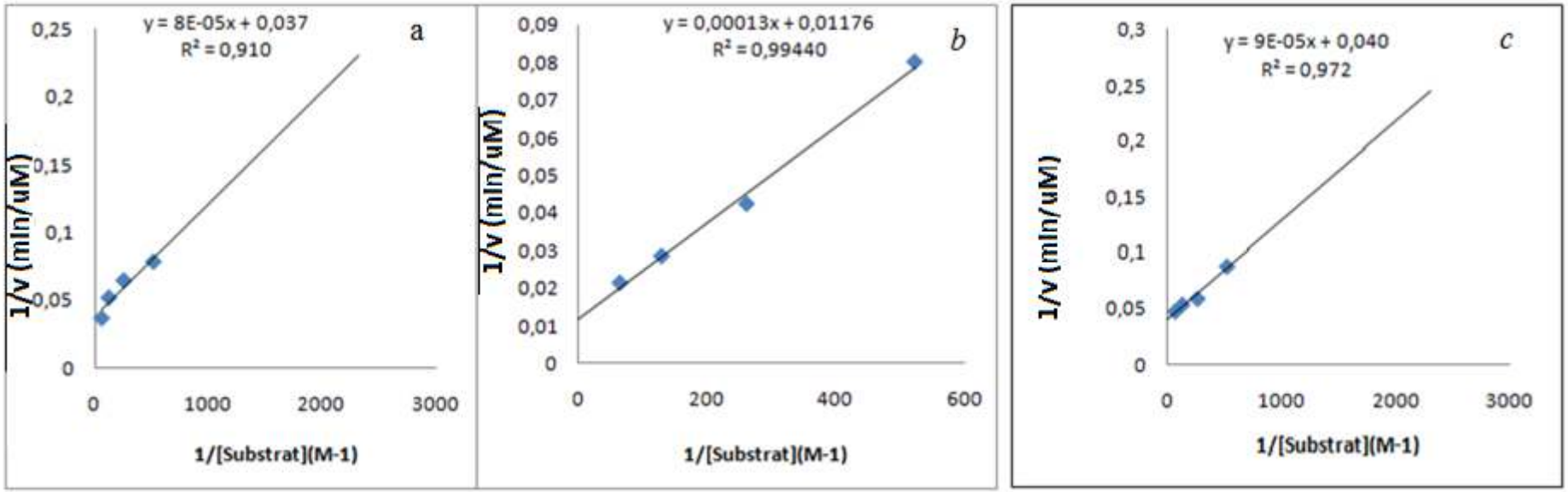


Figure 29. *Représentation de* Lineweaver-Burk. a: *ALG- GLT, b:* Enzyme libre*, c: ALG*

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans cette étude, nous avons sélectionné la formule optimale pour notre système ALG-GLT sur lequel l'enzyme serait immobilisée, où nous avons montré que la bonne concentration utilisée était de 2% ALG et 2% GLT. En effet, nous avons réussi à obtenir des billes de tailles macrométriques qui varient en fonction de la concentration de la gélatine dans la formule.

L'α-amylase a été immobilisée dans des billes de biopolymère obtenues par la méthode d'inclusion. Nous pouvons observe une variation significative du pourcentage pour les deux systèmes étudier. Le meilleur pourcentage est celui de système ALG-GLT a été de 54% par rapport le système ordinaire (ALG) (pourcentage de 35%).

L'étude de la désorption de l'enzyme a été réalisée dans le tampon phosphate. Le pourcentage de désorption est minimum pour la formule F6 avec un pourcentage de 5%. La détermination des paramètres cinétiques et l'étude de recyclage d'enzyme ont été également effectuée, la formule F6 présente une affinité importante comparant la formule F1 et l'enzyme libre. Les billes de la formule F6 peut être réutilisé six foies avec conservation de 55% de son activité initiale.

Annexe

Annexe 1: Principe de dosage par méthode enzymatique

La glucose-oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du β-D-glucose en acide gluconique selon la réaction suivante:

$$ß - D - Glucose + O_2 + H_2O \overset{GOD}{\Longrightarrow} acide\ gluconique + H_2O_2$$

Dans une deuxième réaction indicatrice, le peroxyde d'hydrogène formé réagit ensuite en présence de peroxydase (POD) avec un chromogène pour donner un produit coloré, la quinonéimine qui absorbe à 505 nm.

$$2H_2O_2 + amino - 4 - antipyrine + phénol \overset{pOD}{\Longrightarrow} quinonéimine + 4H_2C$$

✓ **<u>Dosage du glucose</u>**

Le dosage du glucose sera réalisé directement dans une série de micro-cuves spèctrophotométriques UV-VIS, selon le protocole suivant:

- 10 µL de solution glucosée (étalons ou échantillons à doser)
- 1000 µL de réactif RTU®.
- Incuber 10 minutes à 37°C ou 20 minutes à 20-25°C
- Lire l'absorbance contre un blanc réactif à 505 nm.

Annexe 2: Dosage d'alpha-amylase

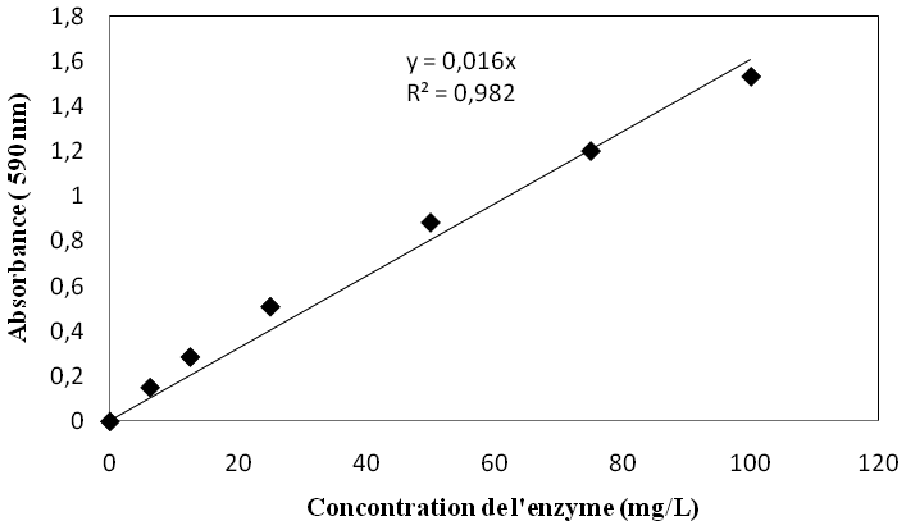


Figure 30. *Gamme étalon de l'absorbance en fonction de la concentration d'enzyme*

Annexe 3: Dosage de la gélatine

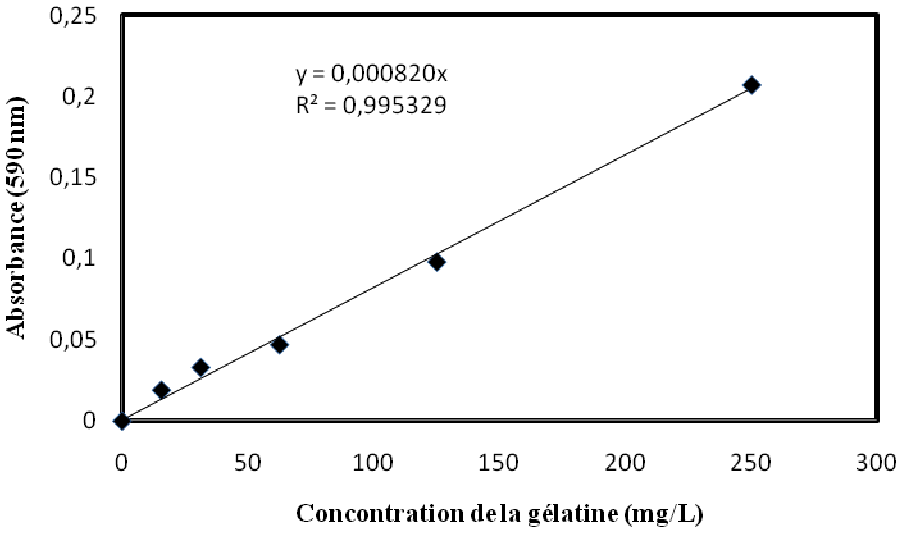


Figure 31.*Gamme étalon de l'absorbance en fonction de la concentration de gélatine.*

Références bibliographiques

-A-

AEHLE W. et Misset O., 1999. Enzymes for industrial applications. *In*: Rehm H.J., Reed G., editors. Biotechnology, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH, pp.189-216.

AHLAWAT, S., DHIMAN, S. S., BATTAN, B., MANDHAN, R. & SHARMA, J. 2009. Pectinase production by Bacillus subtilis and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry,* 44**,** 521-526.

AHMAD, A., SYAIFUL, A., AP, F. A. F. & PATONG, A. R. 2010. Immobilization of glucose oxidase enzyme from Penicillium sp-3 local strain. *Indonesian Journal of Chemistry,* 7**,** 97-104.

ALAIS, C., LINDEN, G. & MICLO, L. 2008. *Biochimie alimentaire: IUT, licence, écoles d'ingénieurs*, Dunod.

ALAUZUN, J. G., YOUNG, S., D'SOUZA, R., LIU, L., BROOK, M. A. & SHEARDOWN, H. D. 2010. Biocompatible, hyaluronic acid modified silicone elastomers. Biomaterials, 31, 3471-3478.

ATES, S., CORTENLIOGLU, E., BAYRAKTAR, E. & MEHMETOGLU, U. 2007. Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor. Enzyme and Microbial Technology, 40, 683-687.

ATKINS, E., NIEDUSZYNSKI, I., MACKIE, W., PARKER, K. & SMOLKO, E. 1973. Structural components of alginic acid. I. The crystalline structure of poly-β-D-mannuronic acid. Results of X-ray diffraction and polarized infrared studies. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules,* 12**,** 1865-1878.

-B-

BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L. & MALCATA, F. X. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology,* 18**,** 392-416.

BERRY, D. R. & PATERSON, A. 1990. Enzymes in the food industry. *Enzyme Chemistry.* Springer.

BETIGERI, S. S. & NEAU, S. H. 2002. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials,* 23**,** 3627-3636.

BONINE, B. M., POLIZELLI, P. P. & BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. 2014. Immobilization of a plant lipase from Pachira aquatica in alginate and Alginate/PVA beads. *Enzyme research,* 2014.

BOROS, Z., WEISER, D., MÁRKUS, M., ABAHÁZIOVÁ, E., MAGYAR, Á., TOMIN, A., KOCZKA, B., KOVÁCS, P. & POPPE, L. 2013. Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of Candida antarctica lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations. *Process Biochemistry,* 48**,** 1039-1047.

BOUSSEBOUA, H. 2002. Eléments de microbiologie générale.

BRUNETON, J. 1987. Elément de phytochimie et de pharmacology. *LAVOISIER***,** 156-160.

BUNGENBERG DE JONG, H. 1936. La coacervation complexe et son importance en biologie. Paris.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72, 248-254.

-C-

CANO, M., AVILA, J. L., MAYÉN, M., MENA, M., PINGARRON, J. & RODRÍGUEZ-AMARO, R. 2008. A new, third generation, PVC/TTF–TCNQ composite

amperometric biosensor for glucose determination. *Journal of electroanalytical chemistry,* 615**,** 69-74.

CHIBA, S. 1988. Handbook of amylases and related enzymes. *by the Amylase Research Society of Japan, Pergamon Press, Oxford***,** 104-116.

COMBELLAS, C., KAJZAR, F., MATHEY, G., PETIT, M. A. & THIÉBAULT, A. 2000. Zwitterionic polymers for nonlinear optics. *Chemical Physics,* 252**,** 165-177.

COZIC, C., PICTON, L., GARDA, M.-R., MARLHOUX, F. & LE CERF, D. 2009. Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. *Food Hydrocolloids,* 23**,** 1930-1934.

-D-

DAUTER, Z., DAUTER, M., BRZOZOWSKI, A. M., CHRISTENSEN, S., BORCHERT, T. V., BEIER, L., WILSON, K. S. & DAVIES, G. J. 1999. X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" α-amylase from Bacillus stearothermophilus: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry,* 38**,** 8385-8392.

DELPECH. J. P, M. A. Figueres, N. Mari, 2000. Technique du moulage."Alginates et Bandes Platrées ", Editions Eyrolles, Paris Août.16, 23, 15,17.

DENG, C., CHEN, J., CHEN, X., XIAO, C., NIE, L. & YAO, S. 2008. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics,* 23**,** 1272-1277.

DESBRIERES, J. 2002. Chitin and chitosan [Chitine et chitosane].Actualite Chimique**,** 39-44.

DHAMI, R., HARDING, S. E., JONES, T., HUGHES, T., MITCHELL, J. R. & TO, K.-M. 1995. Physico-chemical studies on a commercial food-grade xanthan—I. Characterisation by sedimentation velocity, sedimentation equilibrium and viscometry. *Carbohydrate Polymers,* 27**,** 93-99.

DULONG, V., MOCANU, G., PICTON, L. & LE CERF, D. 2012. Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: Synthesis, characterization and physicochemical properties. *Carbohydrate polymers,* 87**,** 1522-1531.

DUMITRIU, S. & CHORNET, E. 1998. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Advanced drug delivery reviews,* 31**,** 223-246.

DURRANI, A., FARR, S. & KELLAWAY, I. 1995. Influence of molecular weight and formulation pH on the precorneal clearance rate of hyaluronic acid in the rabbit eye. *International journal of pharmaceutics,* 118**,** 243-250.

-E-

EŞ, I., VIEIRA, J. D. G. & AMARAL, A. C. 2015. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied microbiology and biotechnology,* 99**,** 2065-2082.

ESHITA, Y., JI, R., ONISHI, M., MIZUNO, M., YOSHIDA, J. & KUBOTA, N. 2012. Supramolecular facilities to melanoma cells B16F10 with nanoparticles of a DEAE-dextran-MMA copolymer-paclitaxel complex. *J Nanomed Nanotechol S,* 5**,** 2.

-F-

FOGARTY, W. & KELLY, C. 1980. In Amylase, Amyloglucosidase and Related Glucanases, Rose AH. Economic Microbiology, Microbial Enzymes and Bioconversion, pp, 115-170. Academic Press Inc., New York, USA.

FOGARTY W. M. AND KELLY, C. T.1994. Microbial Enzymes and Biotechnology .Applied Science, London, New York. (43):71-132.

FOSSI, T., TAVEA, F. & NDJOUENKEU, R. 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology,* 4**,** 14-18.

FRANCO, O. L., RIGDEN, D. J., R. MELO, F., BLOCH JR, C., SILVA, C. P. & GROSSI DE SÁ, M. F. 2000. Activity of wheat α-amylase inhibitors towards bruchid α-amylases and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry,* 267**,** 2166-2173.

FRENCH, D. 1975. Chemistry and biochemistry of starch. *Biochem Ser One*.

-G-

GALAEV, I. & MATTIASSON, B. 2007. *Smart polymers: applications in biotechnology and biomedicine*, CRC Press.

-H-

HAMILTON, L. M., KELLY, C. T. & FOGARTY, W. M. 1999. Production and properties of the raw starch-digesting α-amylase of Bacillus sp. IMD 435. *Process Biochemistry,* 35**,** 27-31.

HAMIMED, F. 2016. Elaboration de billes à base d'alginate: étude rhéologique et de comportement.

HARDING, J. J. 1965. The unusual links and cross-links of collagen. *Advances in protein chemistry.* Elsevier.

HEADON, D. & WALSH, G. 1994. The industrial production of enzymes. *Biotechnology advances,* 12**,** 635-646.

HENDRIKSEN, H., PEDERSEN, S. & BISGARD-FRANTZEN, H. 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. *Patent application*.

HERMANS, P. 1949. Colloid Science. *éd. HR Kruyt, New York***,** 483-494.

HERNAIZ, M. J. & CROUT, D. H. 2000. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β-galactosidase from B. circulans and an α-galactosidase from Aspergillus oryzae. *Enzyme and microbial technology,* 27**,** 26-32.

HUGUET, M., NEUFELD, R. & DELLACHERIE, E. 1996. Calcium-alginate beads coated with polycationic polymers: comparison of chitosan and DEAE-dextran. *Process Biochemistry,* 31**,** 347-353.

-I-

IDRIS, O., WILLIAMS, P. & PHILLIPS, G. 1998. Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids,* 12**,** 379-388.

-J-

JANEČEK, Š. 1994. Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α-amylases. *European journal of biochemistry,* 224**,** 519-524.

JEGANNATHAN, K. R., JUN-YEE, L., CHAN, E.-S. & RAVINDRA, P. 2010. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in κ-carrageenan. *Fuel,* 89**,** 2272-2277.

-K-

JONES, B. 1987. In Hard Capsules-Development and Technology; Ridgway, K. Ed.

KARIM, A. & BHAT, R. 2008. Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in food science & technology,* 19**,** 644-656.

KOTTWITZ, B., UPADEK, H. & CARRER, G. 1994. Application and benefits of enzymes in detergents. *Chimica oggi,* 12**,** 21-24.

KOVALENKO, G. A., BEKLEMISHEV, A. B., PERMINOVA, L. V., MAMAEV, A. L., RUDINA, N. A., MOSEENKOV, S. I. & KUZNETSOV, V. L. 2013. Immobilization of recombinant E. coli thermostable lipase by entrapment inside silica xerogel and nanocarbon-in-silica composites. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 98**,** 78-86.

KULICKE, W.-M., KULL, A. H., KULL, W., THIELKING, H., ENGELHARDT, J. & PANNEK, J.-B. 1996. Characterization of aqueous car□ ymethylcellulose solutions in terms of their molecular structure and its influence on rheological behaviour. *Polymer,* 37**,** 2723-2731.

KUMAR, M. N. R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and functional polymer*s,* 46**,** 1-27.Edition Doin- Paris. 574-581.

-L-

LARPENT-Gaurgaud M. et Sanglier J.J., (1992). Biotechnologies. Principes et méthodes.

LARSEN. B, "Handbook of phycocological and Biochemical methods", Cambridge University Press, 1978. 181-189

LEATHERS, T. D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied microbiology and biotechnology,* 62**,** 468-473.

-M-

MACK, K. D., WEI, R., ELBAGARRI, A., ABBEY, N. & MCGRATH, M. S. 1998. A novel method for DEAE-dextran mediated transfection of adherent primary cultured human macrophages. *Journal of immunological methods,* 211**,** 79-86.

MAGNY, B., ILIOPOULOS, I. & AUDEBERT, R. 1991. Intrinsic viscosity of hydrophobically modified polyelectrolytes. *Polymer communications,* 32**,** 456-458.

MARKS, V. 1996. Blood glucose: its measurement and clinical importance. *Clinica chimica acta,* 251**,** 3-17.

MAZUR, A. K. & NAKATANI, H. 1993. Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic α-amylase hydrolysis of amylose and amylopectin. Archives of biochemistry and biophysics, 306**,** 29-38.

MC TIGUE, M. A., KELLY, C. T., DOYLE, E. M. & FOGARTY, W. M. 1995. The alkaline amylase of the alkalophilic Bacillus sp. IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology,* 17**,** 570-573.

MCCORMICK, C. L., NONAKA, T. & JOHNSON, C. B. 1988. Water-soluble copolymers: 27. Synthesis and aqueous solution behaviour of associative acrylamideN-alkylacrylamide copolymers. *Polymer,* 29**,** 731-739.

MELVIK, J., KRISTENSEN, A., DOMISH, M. & SKAUGRUD, O. 1998. Key characterization parameters of alginate for use in biomedical and pharmaceutical applications. *Pronova Biomedical, presented at Bioencapsulation VII, Easton, USA*.

MERCIER, C. 1985. Les enzymes amylolytiques. *Mouranche A., Costes C., éds., Hydrolases et dépolymérases, collection Biochimie Appliquée dirigée par Costes. Gauthier-Villars***,** 109-142.

MESBAHI, G., JAMALIAN, J. & FARAHNAKY, A. 2005. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids,* 19**,** 731-738.

MEUNIER, N. 1999. *Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales.* Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.

MILNER, J. A., MARTIN, D. J. & SMITH, A. 1997. Two-stage inocula for the production of alpha-amylase by Bacillus amyloliquefaciens. *Enzyme and microbial technology,* 21**,** 382-386.

MOCANU, G., MIHAI, D., DULONG, V., PICTON, L. & LECERF, D. 2011. New anionic amphiphilic thermosensitive pullulan derivatives. *Carbohydrate Polymers,* 84**,** 276-281.

-N-

NELSON, W. L. & CRETCHER, L. H. 1930. The isolation and identification of d-mannuronic acid lactone from the Macrocystis pyrifera. *Journal of the American Chemical Society,* 52**,** 2130-2132.

NIELSEN, J. E., BORCHERT, T. V. & VRIEND, G. 2001. The determinants of α-amylase pH–activity profiles. *Protein Engineering, Design and Selection,* 14**,** 505-512.

-O-

OU, Z. & MUTHUKUMAR, M. 2006. Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: Langevin dynamics simulations. *The Journal of chemical physics,* 124**,** 154902.

OZYILMAZ, E., SAYIN, S., ARSLAN, M. & YILMAZ, M. 2014. Improving catalytic hydrolysis reaction efficiency of sol–gel-encapsulated Candida rugosa lipase with magnetic β-cyclodextrin nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 113**,** 182-189.

OZYILMAZ, G. & GEZER, E. 2010. Production of aroma esters by immobilized Candida rugosa and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 64**,** 140-145.

-P-

PAL, S., MAL, D. & SINGH, R. 2005. Cationic starch: an effective flocculating agent. *Carbohydrate Polymers,* 59**,** 417-423.

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C. R., SOCCOL, V. T., SINGH, D. & MOHAN, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry,* 31**,** 135-152.

PARK, C. S., CHANG, C. C., KIM, J.-Y., OGRYDZIAK, D. M. & RYU, D. D. 1997. Expression, secretion, and processing of rice α-amylase in the yeast Yarrowia lipolytica. *Journal of Biological Chemistry,* 272**,** 6876-6881.

PELLETIER, S., HUBERT, P., LAPICQUE, F., PAYAN, E. & DELLACHERIE, E. 2000. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions. *Carbohydrate Polymers,* 43**,** 343-349.

PÉPIN, A.-S. 2010. *Nouveaux complexes polyélectrolytes à amphiphilie contrôlée à base de polysaccharides modifiés.* Rouen.

PÉREZ, R. 1997. *Ces algues qui nous entourent: Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture*, Editions Quae.

PHAN, T. D., DEBEAUFORT, F., LUU, D. & VOILLEY, A. 2005. Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53**,** 973-981.

PHILIPP, B., DAUTZENBERG, H., LINOW, K.-J., KÖTZ, J. & DAWYDOFF, W. 1989. Polyelectrolyte complexes—recent developments and open problems. *Progress in Polymer Science,* 14**,** 91-172.

PICTON, L., MOCANU, G., MIHAI, D., CARPOV, A. & MULLER, G. 1995. Chemically modified exopolysaccharide pullulans: physico-chemical characteristics of ionic derivatives. *Carbohydrate polymers,* 2**,** 131-136.

PRAKASH, B., VIDYASAGAR, M., MADHUKUMAR, M., MURALIKRISHNA, G. & SREERAMULU, K. 2009. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α-amylases from Chromohalobacter sp. TVSP 101. *Process Biochemistry,* 44**,** 210-215.

-R-

RAJAGOPALAN, G. & KRISHNAN, C. 2008. α-Amylase production from catabolite derepressed Bacillus subtilis KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresource technology, 99, 3044-3050.

ROCHER, V. 2008. *Synthèse et caractérisation de billes d? alginate magnétiques pour l'élimination de polluants organiques dans les effluents par séparation magnétique.* Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

ROCHER, V., SIAUGUE, J.-M., CABUIL, V. & BEE, A. 2008. Removal of organic dyes by magnetic alginate beads. *Water Research,* 42**,** 1290-1298.

RODRíGUEZ, R. A., ALVAREZ-LORENZO, C. & CONCHEIRO, A. 2003. Cationic cellulose hydrogels: kinetics of the cross-linking process and characterization as pH-/ion-sensitive drug delivery systems. *Journal of Controlled Release,* 86**,** 253-265.

ROSEN-MARGALIT, I. & RISHPON, J. 1993. Novel approaches for the use of mediators in enzyme electrodes. *Biosensors and Bioelectronics,* 8**,** 315-323.

-S-

SANKARALINGAM, S., SHANKAR, T., RAMASUBBURAYAN, R., PRAKASH, S. & KUMAR, C. 2012. Optimization of culture conditions for the production of amylase from Bacillus licheniformis on submerged fermentation. *American–Eurasian J. Agric and environmental science,* 12**,** 1507-1513.

SARRAZIN-CARTALAS, A., ILIOPOULOS, I., AUDEBERT, R. & OLSSON, U. 1994. Association and thermal gelation in mixtures of hydrophobically modified polyelectrolytes and nonionic surfactants. *Langmuir,* 10**,** 1421-1426.

SCHULZ, D., BOCK, J., MAURER, J., DUVDEVANI, I. & BERLUCHE, E. ASSOCIATING POLYMERS WITH HYDROPHOBIC AND ZWITTERIONIC GROUPS. ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1991. AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036, 262-POLY.

SCRIBAN S.,1993. Biotechnologie 4eme edition .Techniques et Documentation Lavoisier. Paris; *p*. 225-250.

SCRIBAN, R. 1999. Biotechnologie. 5ème édition, Tec. et doc. *Lavoisier, Paris, France*.

SENAN, C., MEADOWS, J., SHONE, P. & WILLIAMS, P. 1994. Solution behavior of hydrophobically modified sodium polyacrylate. *Langmuir,* 10**,** 2471-2479.

SHARMA, S. & KANWAR, S. S. 2014. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal,* 2014.

SHIMIZU, S., TANI, Y. & YAMADA, H. 1979. Synthesis of coenzyme A by immobilized bacterial cells. *Immobilized microbial cells. Ameri-can Chemical Society, Washington, DC***,** 87-100.

SHU, C., CAI, J., HUANG, L., ZHU, X. & XU, Z. 2011. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized Candida rugosa lipase on cotton cloth. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 72**,** 139-144.

SIMON, S., DUGAST, J., LE CERF, D., PICTON, L. & MULLER, G. 2003. Amphiphilic polysaccharides. Evidence for a competition between intra and intermolecular associations in dilute system. *Polymer,* 44**,** 7917-7924.

SISO, M. I., MURADO, M., FRANCO, J. M., MIRÓN, J. & GONZALEZ, M. P. 1988. Microfungus-yeast mixed cultures in the degradation of amylaceous wastes. I: Interactions affecting amylolytic activity. *Biotechnology letters,* 10**,** 431-436.

SISU, E., TRIPATHY, S., MALLET, J.-M., DRIGUEZ, P.-A., HÉRAULT, J.-P., SIZUN, P., HERBERT, J.-M., PETITOU, M. & SINAY, P. 2003. Synthesis of new conformationally constrained pentasaccharides as molecular probes to investigate the biological activity of heparin. *Biochimie,* 85**,** 91-99.

SMIDSROD, O., HAUG, A. & LARSEN, B. R. 1966. The influence of pH on the rate of hydrolysis of acidic polysaccharides. *Acta Chem. Scand,* 20**,** 1026-1034.

SOUGUIR, Z., ROUDESLI, S., ABOUT-JAUDET, E., PICTON, L. & LE CERF, D. 2010. Novel cationic and amphiphilic pullulan derivatives II: pH dependant physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers,* 80**,** 123-129.

SOUGUIR, Z., ROUDESLI, S., PICTON, E., LE CERF, D. & ABOUT-JAUDET, E. 2007. Novel cationic and amphiphilic pullulan derivatives I: Synthesis and characterization. *European Polymer Journal,* 43**,** 4940-4950.

STANFORD. E.C.C., 1886, Algin and other useful products. US Patent #US349,760

STEWART, W. W. & SWAISGOOD, H. E. 1993. Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards. *Enzyme and microbial technology,* 15**,** 922-927.

-T-

TALEKAR, S. & CHAVARE, S. 2012. Optimization of immobilization of Î±-amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free Î±-amylase. *Recent Research in Science and Technology,* 4.

TEE, B. L. & KALETUNÇ, G. 2009. Immobilization of a thermostable α-amylase by covalent binding to an alginate matrix increases high temperature usability. *Biotechnology progress,* 25**,** 436-445.

TEOTIA, S. & GUPTA, M. 2001. Purification of α-amylases using magnetic alginate beads. *Applied biochemistry and biotechnology,* 90**,** 211-220.

THÜNEMANN, A. F., MÜLLER, M., DAUTZENBERG, H., JOANNY, J.-F. & LÖWEN, H. 2004. Polyelectrolyte complexes. *Polyelectrolytes with defined molecular architecture II.* Springer.

TOLAN, J. 1996. Pulp and paper. *Industrial enzymology, 2nd ed. Stockton Press, New York, NY***,** 327-338.

TSUCHIDA, E. 1994. Formation of polyelectrolyte complexes and their structures. *Journal of Macromolecular Science—Pure and Applied Chemistry,* 31**,** 1-15.

TÜMTÜRK, H., ŞAHIN, F. & DEMIREL, G. 2007. A new method for immobilization of acetylcholinesterase. *Bioprocess and biosystems engineering,* 30**,** 141-145.

-U-

UEDA, G., YAMASAKI, M., INOUE, M., TANAKA, Y., ABE, Y. & OGAWA, M. 1985. Immunohistochemical study of amylase in common epithelial tumors of the ovary. *International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists,* 4**,** 240-244.

-V-

VAN DER MAAREL, M. J., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C., LEEMHUIS, H. & DIJKHUIZEN, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *Journal of biotechnology,* 94**,** 137-155.

VETRIANI, C., MAEDER, D. L., TOLLIDAY, N., YIP, K. S.-P., STILLMAN, T. J., BRITTON, K. L., RICE, D. W., KLUMP, H. H. & ROBB, F. T. 1998. Protein thermostability above 100 C: a key role for ionic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 95**,** 12300-12305.

VU, T. & LE, V. 2008. Biochemical studies on the immobilization of the enzyme invertase (EC. 3.2. 1.26) in alginate gel and its kinetics. Asean Food J, 15, 73-78.

VOGT, S., HEINZE, T., RÖTTIG, K. & KLEMM, D. 1995. Preparation of carboxymethylcellulose sulfate of high degree of substitution. *Carbohydrate research,* 266**,** 315-320.

VOLPERT, E., SELB, J. & CANDAU, F. 1998. Associating behaviour of polyacrylamides hydrophobically modified with dihexylacrylamide. *Polymer,* 39**,** 1025-1033.

-W-

WALLACH J. 1997. Les enzymes. Sciences 128. Editions Nathan. 7-9

WANG, K., ILIOPOULOS, I. & AUDEBERT, R. 1988. Viscometric behaviour of hydrophobically modified poly (sodium acrylate). *Polymer Bulletin,* 20**,** 577-582.

WANG, X., DU, Y., FAN, L., LIU, H. & HU, Y. 2005. Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: synthesis, characterization and structure-activity study. *Polymer Bulletin,* 55**,** 105-113.

WON, J.-H., KIM, J.-W., KOH, G.-W. & LEE, J.-Y. 2005. Evaluation of hydrogeological characteristics in Jeju Island, Korea. *Geosciences Journal,* 9**,** 33.

WU, C. W., LEE, J. G. & LEE, W. C. 1998. Protein and enzyme immobilization on non-porous microspheres of polystyrene. *Biotechnology and applied biochemistry,* 27**,** 225-230.

-Z-

ZHANG, Q., WANG, D., BEI, Y., REN, S. & FANG, G. 2013. Flocculation performance of trimethyl quaternary ammonium salt of lignin-sodium alginate polyampholyte. BioResources, 8, 3544-3555.

ZHANG, D., HEGAB, H. E., LVOV, Y., SNOW, L. D. & PALMER, J. 2016. Immobilization of cellulase on a silica gel substrate modified using a 3-APTES self-assembled monolayer. *SpringerPlus,* 5**,** 48.

ZOUBIRI, L. 2012. Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes.