



UNIVERSITÉ DE  
**SHERBROOKE**

Faculté de génie  
Département de génie civil

**PRODUCTION ET CARACTÉRISATION DE BIOCATALYSEURS  
INSOLUBLES DE LACCASE PAR L'ACTION DU CHITOSANE  
COMME AGENT DE RÉTICULATION**

Mémoire de maîtrise  
Spécialité : Génie civil

Alexandre ARSENAULT

Jury : Hubert CABANA (Co-directeur)  
J. Peter JONES (Co-directeur)  
Jay LACEY (Rapporteur)  
Isabel Morales Belpaire

Sherbrooke (Québec), Canada

Mai 2011

IV-2152



**Library and Archives  
Canada**

**Published Heritage  
Branch**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque et  
Archives Canada**

**Direction du  
Patrimoine de l'édition**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Your file Votre référence  
ISBN: 978-0-494-83739-9**

**Our file Notre référence  
ISBN: 978-0-494-83739-9**

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**



# Table des matières

Table des matières .....	iii
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux .....	7
Liste des acronymes .....	8
Résumé .....	9
Remerciements .....	9
Chapitre 1 .....	10
Introduction .....	10
Immobilisation enzymatique .....	11
Objectif général .....	16
Objectifs spécifiques .....	16
Contributions originales .....	17
Structure du manuscrit.....	18
Chapitre 2 .....	19
Revue de littérature.....	19
Les champignons de la pourriture blanche du bois et leurs enzymes modifiant la lignine ....	19
Les enzymes modifiant la lignine.....	20
Techniques d'immobilisation/insolubilisation .....	31
Immobilisation sur support.....	31
Glutaraldéhyde .....	36
Alternatives au glutaraldéhyde .....	38
Le glyoxal .....	38
Hydrates de carbone fonctionnalisés .....	39
La génipine .....	42
Le chitosane.....	43
Chapitre 3 .....	48
Avant-propos .....	48
Laccased-based CLEAs : Chitosan as a novel cross-linking agent.....	49
Résumé .....	49
Abstract.....	49
Introduction .....	50
Materials and methods.....	53
Materials .....	53
Laccase production.....	53
Enzyme assay .....	53
Chitosan solution preparation.....	54
CLEAs production.....	54
Concentrations optimization.....	54
Optimization of CLEAs preparation conditions.....	55
CLEAs and free laccase thermal stability .....	55
Total amount of ABTS oxidized under denaturing conditions .....	56
Enzyme kinetics.....	57
CLEAs and free laccase stability to chemicals denaturants .....	57
Scanning electron microscopy of CLEAs .....	57

Particle size of CLEAs .....	58
Results .....	58
Preliminary screening.....	58
Optimization of CLEAs preparation conditions.....	60
Michaelis-Menten Kinetic Parameters .....	63
Stability against chemical denaturants .....	63
Stability against wastewater effluent.....	64
SEMs .....	66
Particle size.....	67
Discussion.....	67
Conclusion.....	71
Acknowledgements .....	72
Chapitre 4 .....	73
Discussion.....	73
Travaux futurs .....	74
Annexe 1.....	88
Annexe 2.....	91

## Liste des figures

Figure 1-1 Les différentes approches pour la formation d'enzymes insolubilisées sans support (modifié de (Cao <i>et al.</i> , 2003)).	13
Figure 2-1 Structure de la lignine	19
Figure 2-2 Cycle catalytique de la laccase où RH est le substrat et R• est le radical produit. (Modifié de (Wesenberg <i>et al.</i> , 2003)).	21
Figure 2-3 Structure d'un cristal de lysozymes (Cohen-Hadar <i>et al.</i> , 2006). Les points rouges indiquent des canaux formés lors de la cristallisation des lysozymes.	35
Figure 2-4 Schématisation de la réticulation d'agrégats d'enzymes	36
Figure 2-5 Mécanisme partiel de réticulation d'enzymes par le glutaraldéhyde (adapté de (Migneault <i>et al.</i> , 2004)).	37
Figure 2-6 Structure chimique du glyoxal	38
Figure 2-7 Mousse de chitosane réticulée par l'action du glyoxal (Testouri <i>et al.</i> , 2010).	39
Figure 2-8 Mécanisme d'oxydation du glucose par le periodate (Adapté de (Schoevaart <i>et al.</i> , 2005)).	40
Figure 2-9 Structure simplifiée du dextran	40
Figure 2-10 Oxydation du dextran par le periodate de sodium.	41
Figure 2-11 Mécanisme réactionnel de la réticulation d'enzymes par la génipine (modifié de (Butler <i>et al.</i> , 2003)).	42
Figure 2-12 Schéma de la réticulation de la laccase par l'action combinée du chitosane et de l'EDAC (Adapté de (Rafat <i>et al.</i> , 2008)).	43
Figure 2-13 Structure du chitosane. La chitine (polysaccharide formé de plus de 50% du monomère m) est déacétylé pour donner le chitosane (polysaccharide formé de plus de 50% du monomère n).	44
Figure 3.1 Influence of the temperature (A), the reaction time (B) and the interaction between agitation and reaction time (C) on the specific activity of the CLEA-1.867-50.5. On graph C: Reaction time of 8 hours (■), 16 hours (▲) and 24 hours (◆).	62
Figure 3.2. Residual activity of free laccase and CLEAs after 4 hours of incubation with various chemical denaturants at a pH of 3 and 20°C. From left to right: CLEA-1.0-136 (■), CLEA-1.5-100 (■), CLEA-1.867-50.5 (■), CLEA-1.0-50.5 (■) and free laccase (■) Values represent means of triplicate results ± standard deviation.	64
Figure 3.3. Residual activity of free laccase and CLEAs after 24 hours of incubation in a wastewater effluent collected from the WWTP of Mont St-Grégoire (Qc, Canada).	66
Figure 3.4. SEMs of A) chitosan and B) CLEA-1.0-50.5.	67
Figure A1.1 Cinétique de Michaelis-Menten de CLEA-1,5-100	89
Figure A1.2 Cinétique de Michaelis-Menten de CLEA-1,0-136	89
Figure A1.3 Cinétique de Michaelis-Menten de CLEA-1,0-50,5	90
Figure A1.4 Cinétique de Michaelis-Menten de CLEA-1,867-50,5	90
Figure A2.1 Dégradation thermique de CLEA-0,2-200 (•, —), CLEA-0,2-400 (○, --) et CLEA-0,2-600 (▼, ----).	91
Figure A2.2 Dégradation thermique de CLEA-0,6-200 (•, —), CLEA-0,6-400 (○, --) et CLEA-0,6-600 (▼, ----).	92

Figure A2.3 Dégradation thermique de CLEA-1,0-200 (•, _____), CLEA-1,0-400 (○, -- ) et CLEA-1,0-600 (▼, ---- ).....	92
Figure A2.4 Dégradation thermique de CLEA-0,5-1 (•, _____), CLEA-1,5-1 (○, -- ) et CLEA-1,0-0,05 (▼, ---- ).....	93
Figure A2.5 Dégradation thermique de CLEA-1,0-50,5 (•, _____), CLEA-0,134-50,5 (○, --) et CLEA-1,867-50,5 (▼, ---- ).....	93
Figure A2.6 Dégradation thermique de CLEA-0,5-100 (•, _____), CLEA-1,0-136 (○, -- ) et CLEA-1,5-100 (▼, ---- ).....	94

## Liste des tableaux

Tableau 2.1 Exemples de composés oxydés par l'action de la laccase.....	23
Tableau 2.2 Bioremédiation utilisant la laccase .....	28
Tableau 2.3 Utilisations du chitosane pour immobiliser la laccase.....	44
Table 3.1 Chitosan and EDAC concentrations tested for the optimization of the CLEAs formation at 4°C during 48 hours.....	54
Table 3.2 Conditions tested for the optimization of CLEAs characteristics .....	55
Table 3.3 Specific activity, thermal stability and total amount of ABTS oxidized by all the prepared samples .....	59
Table 3.4 Results of the analysis of variance (ANOVA) performed on the specific activities (U/g) of 2 replicates of the CLEA-1.867-50.5 .....	61
Table 3.5. Michaelis-Menten kinetic constants of laccase CLEAs for the oxidation of ABTS <sup>a</sup>	63
Table 3.6. Characteristics of the effluent taken at the Mont St-Grégoire WWTP after the settling basin. ....	65
Table 3.7. Particle sizes of CLEAs as determined by PCS. ....	67



## Liste des acronymes

**2,4-DCP**, 2,4-dichlorophénol;  
**2,6-DMP**, 2,6-diméthoxyphénol;  
**A<sub>0,t</sub>**, Activité de la laccase au temps 0 et au temps t, ;  
**ABTS**, 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid);  
**AND**, acide désoxyribonucléique;  
**ANOVA**, *analysis of variance*;  
**ANT**, Anthracène;  
**BaP**, Benzo-(a)-pyrène  
**BBP**, Benzylphthalate;  
**BPA**, bisphénol A;  
**CARBA**, Carbamazépine;  
**CLE**, *cross-linked enzymes*;  
**CLEA**, *cross-linked enzyme aggregate*;  
**CLEA-XX-YY**, CLEA formée avec XX g/l de chitosane et YY mM d'EDAC;  
**CLEC**, *cross-linked enzyme crystal*;  
**COD**, *chemical oxygen demand*;  
**CSDE**, *cross-linked enzyme dried by spray drying*;  
**DEP**, diéthylphthalate;  
**E1**, Estrone;  
**E2**, 17β-estradiol;  
**E3**, estriol;  
**EDAC**, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide  
**EDTA**, ethylenediamine-tetraacetic acid;  
**EE2**, 17α-ethinylestradiol;  
**GLU**, glutaraldéhyde;  
**GLY**, glyoxal;  
**IBU**, Ibuprofen;  
**ICP-MS**, *inductively coupled plasma mass spectroscopy*;  
**k<sub>cat</sub>**, taux de réaction maximale par unité massique d'enzyme (coefficient catalytique);  
**K<sub>m</sub>**, constante d'affinité de Michaelis-Menten;  
**LiP**, lignine peroxidase;  
**LME**, *lignin modifying enzyme*;  
**MnP**, manganèse peroxidase;  
**NP**, nonylphénol;  
**OMW**, *olive-mill wastewater*;  
**PCS**, *photon correlation spectroscopy*;  
**PYR**, pyrène;  
**RBu19**, Remazol blue 19;  
**RBBR**, Remazol brilliant blue R;  
**SEMs**, scanning electron micrographs;  
**SPSEs**, substances perturbatrices du système endocrinien TCS, triclosan;  
**VP**, *versatile peroxydase*;  
**WRF**, *white-rot fungi*;  
**WWTP**, wastewater treatment plant;

## Résumé

La laccase est une enzyme ayant une faible spécificité qui peut dégrader de nombreux contaminants présents dans l'environnement. Son utilisation dans des procédés de bioremédiation est donc appelée à augmenter dans les années à venir. Il est donc important d'améliorer le potentiel d'utilisation de cette enzyme en la rendant réutilisable et plus stable qu'à l'état naturel. Plusieurs techniques d'immobilisation/insolubilisation sont déjà disponibles mais la plupart utilisent un agent toxique pour plusieurs espèces. Cette étude cherche donc à remplacer ce produit toxique par un agent biodégradable, le chitosane, ayant peu d'effets sur l'environnement dans la formation d'agrégats d'enzymes réticulés [*cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs)]. Les conditions de formation de ces biocatalyseurs ont été optimisées dans le but d'obtenir un produit actif et stable. Ces CLEAs ont également été caractérisées en termes de capacité catalytiques, de stabilité thermique et face aux dénaturants chimiques ainsi qu'en terme de dimensions.

Mots clés : Laccase, CLEAs, Chitosane, Insolubilisation, Optimisation

## Remerciements

J'aimerais remercier tout particulièrement messieurs Hubert Cabana et Peter Jones pour leur appui lors de cette maîtrise. Merci également à Catherine Beauregard-Paultre et Maxime Sirois-Gosselin pour leur collaboration technique. À Serge Bérubé également pour ses conseils d'ordre technique. Merci à Geneviève Arsenault pour son coup de main dans la mise en forme du présent document et d'avoir sauvé ma santé mentale. Également, j'ai une pensée pour le Conseil de recherche en sciences naturelles et génie (CRSNG) qui a fourni le support financier pour rendre ce projet réalisable.

# Chapitre 1

## Introduction

Les enzymes sont de plus en plus utilisées de nos jours dans différents domaines tels l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire et même l'industrie pétrochimique (Edwards *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2008). Elles sont utilisées à la fois pour former des produits finis et pour traiter les effluents de ces entreprises afin de réduire leur impact environnemental.

Plusieurs avantages en font un catalyseur de choix :

- 1) Les réactions qu'elles catalysent se font généralement à des températures et pression près des conditions ambiantes (Mateo *et al.*, 2007).
- 2) Ces catalyseurs sont entièrement biodégradables et les milieux réactionnels utilisés sont souvent moins dommageables pour l'environnement que pour des procédés n'utilisant pas les enzymes comme catalyseurs (Sheldon, 2007A).
- 3) Leur activité est généralement très spécifique vis-à-vis un substrat ce qui fait que peu de produits secondaires indésirables sont formés (Sheldon, 2007A).
- 4) Pour la synthèse de composés chimiques, l'utilisation d'enzymes peut contourner la protection de groupements réactifs et ainsi diminuer le nombre d'étapes et le coût de production desdits composés (Sheldon, 2007A).

Le plus gros avantage des enzymes sur les microorganismes est qu'elles n'engendrent que peu de biomasse. Le traitement des résidus de procédés enzymatiques est également plus simple que celui des résidus de traitement par des microorganismes.

Cependant, il est parfois très coûteux d'utiliser des enzymes qu'une seule fois puisque la purification des enzymes peut faire augmenter grandement leur coût de production. Certaines enzymes sont également très instables ce qui nécessite l'utilisation de beaucoup de ces catalyseurs pour une même quantité de substrat à traiter. Afin d'augmenter le potentiel d'utilisation de ces enzymes, il est possible de les immobiliser ou les insolubiliser ce qui permet de les rendre plus stables aux conditions dénaturantes et il est plus aisé de les réutiliser (Sheldon, 2007A).

## Immobilisation enzymatique

Plusieurs techniques sont possibles pour avoir des enzymes réutilisables et plus stables. On peut séparer ces techniques en deux grandes catégories : immobilisation sur support solide et insolubilisation sans support. L'immobilisation sur un support solide peut se faire selon trois modes : 1) les enzymes peuvent être posées à la surface du support par des interactions physiques comme les forces de van der Waals ou des interactions hydrophobiques, 2) se fixer au support par des liaisons ioniques, 3) être attachées au support par des liens covalents ou 4) être emprisonnées dans une matrice (encapsulation) (Sheldon, 2007A). Les deux premiers types de liaisons sont plutôt faibles. Lorsque les conditions du milieu ne changent pas, ces techniques peuvent être avantageuses puisqu'il y a peu d'encombrement stérique mais un changement trop grand de pH par exemple peut résulter en un lavage des enzymes de la surface du support (Sheldon, 2007A). L'inconvénient d'utiliser des liens covalents pour fixer les enzymes sur les supports est la possibilité d'inactiver les enzymes et ainsi de rendre inutilisables autant l'enzyme que le support qui peut coûter parfois très cher. Dans tous les cas, le biocatalyseur formé a une activité par unité de masse très faible, étant donné que la masse la plus importante des biocatalyseurs ainsi produits est le support, l'activité des enzymes est

grandement diluée. En effet, le support inactif compte pour environ 90% de la masse de ces biocatalyseurs (Cao, 2005). L'utilisation de support peut cependant aboutir à la production de biocatalyseurs efficaces comme celui décrit par Ghanem et Ghaly (2004) qui a immobilisé la glucose oxydase sur du chitosane (Ghanem et Ghaly, 2004). De plus, dans certains cas, l'utilisation de supports est nécessaire puisque les alternatives d'immobilisation sans support dénaturent les enzymes utilisées (Costa *et al.*, 2008).

L'insolubilisation sans support, quant à elle, permet de former des amas insolubles et composés presque entièrement d'enzymes. L'activité spécifique de ces biocatalyseurs est donc plus élevée que celle des enzymes immobilisées sur support. Il y a quatre options pour la production d'enzymes insolubles : 1) la formation de réticulats d'enzymes (*cross-linked enzymes*, CLEs) 2) la réticulation de cristaux d'enzymes (*cross-linked enzyme crystals*, CLECs) 3) la réticulation d'enzymes séchées par atomisation (*cross-linked spray dried enzymes*, CSDEs) et finalement 4) la réticulation d'agrégats d'enzymes (*cross-linked enzyme aggregates*, CLEAs). La différence entre ces quatre techniques est l'état initial des enzymes avant de les lier entre elles comme illustré à la figure 1-1.

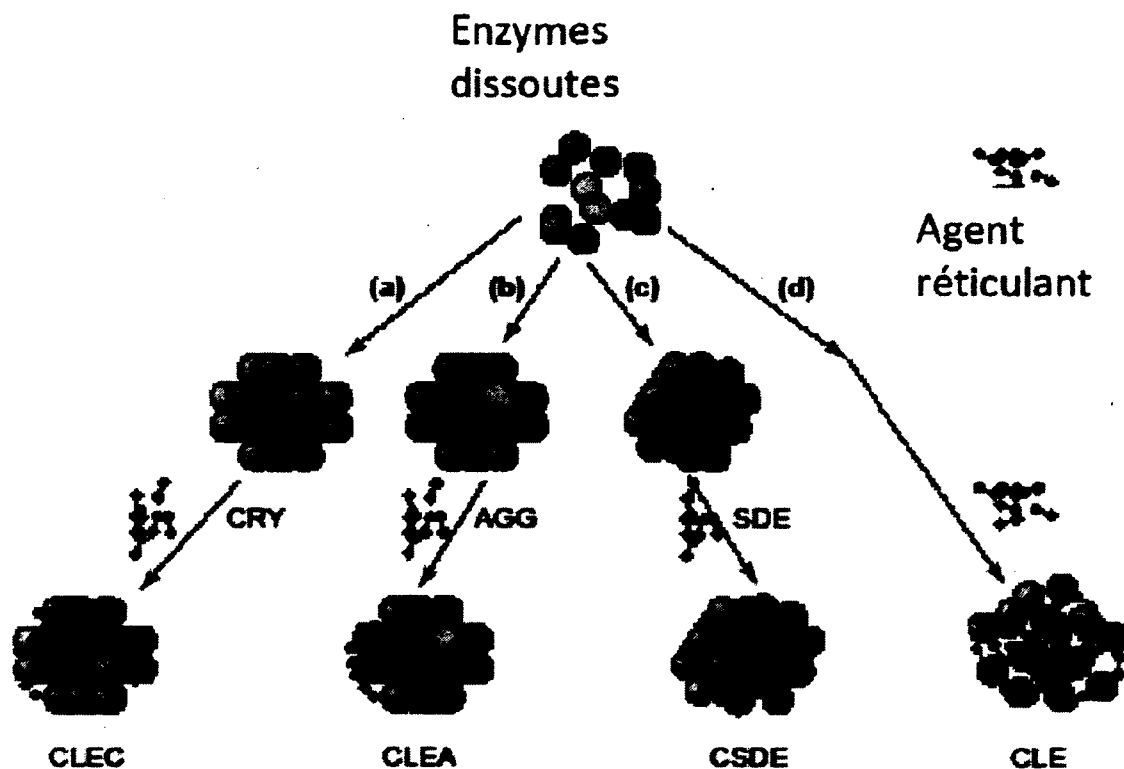


Figure 1-1 Les différentes approches pour la formation d'enzymes insolubilisées sans support (modifié de (Cao *et al.*, 2003)). CRY (*Crystal*), AGG (*Aggregate*), SDE (*Spray-dried enzyme*) CLEC (*Cross-linked enzyme crystal*), CLEA (*Cross-linked enzyme aggregate*), CSDE (*Cross-linked spray-dried enzyme*) et CLE (*Cross-linked enzyme*).

Les premières expériences de réticulation consistaient à ajouter à une solution d'enzymes, un agent réticulent, souvent le glutaraldéhyde (GLU) (Cao, 2003). Le résultat était peu satisfaisant. Les CLEs obtenues avaient une stabilité thermique plus grande que les enzymes libres mais il était difficile de les manipuler car elles formaient un gel et leur résistance mécanique était très faible. De plus, les expériences étaient difficiles à répéter car les conditions d'opération faisaient beaucoup varier les résultats. Ces difficultés ont été surpassées en utilisant des supports pour immobiliser les enzymes et la réticulation sans support a été quelque peu abandonnée (Sheldon, 2007A). Certains essais ont été effectués pour réticuler des poudres d'enzymes séchées par atomisation. Cependant, ces biocatalyseurs ont une activité relativement faible principalement en raison des conditions dénaturantes utilisées lors de

l'atomisation (Cao *et al.*, 2003). Par contre, d'autres méthodes d'insolubilisation sans support ont donné des résultats intéressants.

Par exemple, les cristaux d'enzymes réticulés (CLECs), ont donné lieu à plusieurs développements intéressants. Ces biocatalyseurs se sont avérés très stables lorsque soumis à des forces de cisaillement, des pH extrêmes et des températures élevées (Roy, 2006). Cependant la préparation de cristaux d'enzymes demande une solution enzymatique d'une très grande pureté et un contrôle rigoureux des conditions de formation (Sheldon, 2007A). La réticulation des cristaux permet également de conserver les canaux présents entre les enzymes et ainsi améliore la diffusion du substrat vers les sites actifs des enzymes dans le cristal (O'Fagain, 2003). Également, les résultats varient selon les méthodes de formation utilisées et les conditions d'utilisation des CLECs (Govardhan, 1999).

Une autre technique d'insolubilisation, de plus en plus utilisée, est la formation d'agrégats d'enzymes réticulés [*cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs)]. Elle consiste en la formation d'agrégats d'enzymes puis en leur réticulation. Pour former les agrégats, plusieurs produits peuvent être utilisés. L'ajout de sulfate d'ammonium, de polyéthylène glycol ou de solvants organiques comme l'éthanol ou l'acétone diminue la solubilité des enzymes qui forment alors des agrégats et précipitent. Le sulfate d'ammonium perturbe le film d'hydratation entourant les protéines ce qui entraîne leur rapprochement et, passé un certain point, leur précipitation. C'est la capacité du sulfate d'ammonium à former des structures de molécules d'eau qui lui permet de réduire le film d'hydratation des protéines. Ce phénomène s'appelle relargage (*salting-out*). L'ajout de solvant organique augmente l'entropie du système ce qui force les molécules d'eau à la surface des protéines à se détacher du film d'hydratation et de former un film autour des molécules de solvant. Les protéines perdant leur film d'hydratation seront attirées l'une vers l'autre et précipiteront (Ladisch, 2001). En même temps ou

subséquentement, ces agrégats sont mis en contact avec un agent bifonctionnel pour les réticuler. L'avantage de précipiter les enzymes sous forme d'agrégats est que leur conformation est la même que dans leur forme soluble (Cao *et al.*, 2003). Les CLEAs ont donc une activité relativement élevée à moins que l'agent réticulant vienne se lier sur le site catalytique ou si l'encombrement stérique est augmenté par la réticulation. Certaines CLEAs ont été formées avec succès comme des CLEAs de lipase (Lopez-Serrano *et al.*, 2002), pénicilline acylase (Cao *et al.*, 2001), et de laccase (Cabana *et al.*, 2007) entre autres.

La plupart des techniques décrites ci-haut nécessitent l'utilisation d'un agent réticulant. L'agent réticulant le plus utilisé pour lier les enzymes entre elles ou sur un support de façon covalente est le glutaraldéhyde (GLU) (Sheldon, 2007B). Cet agent bifonctionnel réagit avec les enzymes, plus précisément avec le groupement amine des résidus lysine, et forme des liens amides. Les mécanismes chimiques impliqués ne sont pas très bien compris par contre puisque le glutaraldéhyde a tendance à polymériser mais reste efficace malgré tout (Betancorl *et al.*, 2006). Sous des contraintes mécaniques, les CLEAs pourraient relâcher ce produit dans le milieu réactif. Plusieurs études démontrent que ce dialdéhyde réduit le taux d'éclosion des œufs de certaines espèces aquatiques (Leung, 2001; Raikow *et al.*, 2007; Emmanuel *et al.*, 2005). Le GLU aurait aussi certains effets chroniques sur des embryons de poissons et certains phytoplanctons (Sano *et al.*, 2005). Il est également avéré que le GLU, souvent utilisé comme biocide dans les hôpitaux peut induire des effets indésirables sur les employés manipulant ce produit. Il a été démontré que le GLU peut causer un asthme occupationnel, de l'eczéma et des irritations de la peau et des voies respiratoires (Takigawa et Endo, 2006). Son potentiel cancérigène est également évalué puisqu'il provoque des liaisons entre l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les protéines de cellules mammifères (Speit *et al.*, 2008). Il est



donc recommandable de trouver des alternatives au glutaraldéhyde pour former des CLEAs ayant aucun ou peu d'impact néfastes sur l'environnement.

Ce projet s'attarde principalement sur le remplacement du GLU comme agent réticulant afin de produire un biocatalyseur utilisable sans danger pour l'environnement aquatique et la santé des travailleurs. Pour appuyer ce but, une enzyme oxydative a été choisie comme sujet : la laccase (E.C. 1.10.3.2). Son intérêt grandissant est inextricablement lié à sa capacité à oxyder une vaste gamme de composés phénoliques se retrouvant dans les eaux usées (Cabana *et al.*, 2007). Parmi ces substances phénoliques, plusieurs molécules attirent de plus en plus l'attention des chercheurs comme les substances perturbatrices du système endocrinien (SPSEs). Ces substances ont très souvent une structure ressemblant au phénol ce qui fait en sorte qu'elles se lient aux récepteurs hormonaux (Cabana *et al.*, 2007). La laccase pouvant éliminer le potentiel endocrinien de ces SPSEs, il serait important de l'immobiliser ou l'insolubiliser avec un agent réticulant ayant peu d'impact sur l'environnement. C'est pour cette raison que le chitosane, un biopolymère renouvelable et biodégradable a été choisi pour réticuler la laccase. Comme ce polymère provient d'un produit secondaire, la chitine obtenue à partir des carapaces de crevettes principalement, l'impact sur l'environnement de la formation et de l'utilisation de ce biocatalyseur serait minimal.

## Objectif général

Le principal objectif de ce projet est de former et de caractériser des CLEAs de laccase en utilisant un agent réticulant non toxique à savoir, le chitosane.

## Objectifs spécifiques

De façon plus spécifique, ce projet s'attarde à :

- Produire des CLEAs avec du chitosane.
- Déterminer l'activité spécifique des CLEAs formées.
- Caractériser les CLEAs en termes de stabilité thermique, face aux dénaturants chimiques.
- Caractériser la cinétique réactionnelle des CLEAs.
- Déterminer les conditions optimales de formation des CLEAs.

## Contributions originales

Les résultats obtenus dans ce projet ont été présentés à diverses conférences et colloques. Ils ont également fait l'objet d'un article (Chapitre 3).

- 25th Eastern Canadian Symposium on Water Quality Research, *Immobilized laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals: characterization of the biocatalysts formed and their utilization in continuous bioprocesses*. Ottawa, 30 octobre 2009.
- BIT's 1st Inaugurate Symposium on Enzymes & Biocatalysis, *Cross-Linked Laccase Aggregates : Novel Biocatalysts for the Elimination of Emerging Pollutants*. Shanghai, 22-24 avril 2010.
- BIT's 1st Inaugurate Symposium on Enzymes & Biocatalysis, *A novel approach for the Production of Cross-Linked Laccase Aggregates: Utilization of Chitosan as a Cross-Linker*. Affiche présentée à Shanghai, 22-24 avril 2010.

- OxiZymes in Leipzig, *Chitosan: an attractive cross-linking agent for the production of insoluble laccase-based biocatalysts*. Affiche présenté à Leipzig, 14-16 juin 2010.
- Arsenault, A., Cabana, H., Jones, J. P. (soumis le 15 avril 2011), Laccased-based CLEAs : Chitosan as a novel cross-linking agent. *Enzyme Research*, soumis le 15 avril 2011.
- IWA World Water Congress and Exhibition, *Immobilization of Laccase Aggregates on a Biodegradable Support: Chitosan*. Affiche présentée à Montréal, 19-24 septembre 2010.

## Structure du manuscrit

Le chapitre 2 contient une revue de la littérature en lien avec les enzymes ligninolytiques, la laccase, l'immobilisation enzymatique, la formation de CLEAs, les effets néfastes du GLU et certaines alternatives à cet agent réticulant. Le chapitre 3 est un résumé des expériences effectuées sur la caractérisation des CLEAs présentés sous forme d'article et le chapitre 4 est une discussion sur les résultats obtenus et leur implication potentielle suivi d'une conclusion qui apporte quelques pistes de travaux futurs.

## Chapitre 2

### Revue de littérature

#### Les champignons de la pourriture blanche du bois et leurs enzymes modifiant la lignine

Les champignons de la pourriture blanche du bois (*white rot fungi*, WRF) font partie du groupe des basidiomycètes et sont les organismes dégradant le plus efficacement la lignine transformant ainsi la lignocellulose en saccharides simples assimilables par d'autres microorganismes (Lundell *et al.*, 2010). La dégradation de cet hétéropolymère complexe leur est possible, contrairement à d'autres organismes, grâce à leurs enzymes modifiant la lignine (*lignin modifying enzyme*, LME). La nature de la lignine nécessite l'utilisation d'enzymes non-spécifiques pour la dégrader étant donné le caractère hétérogène de ce polymère.

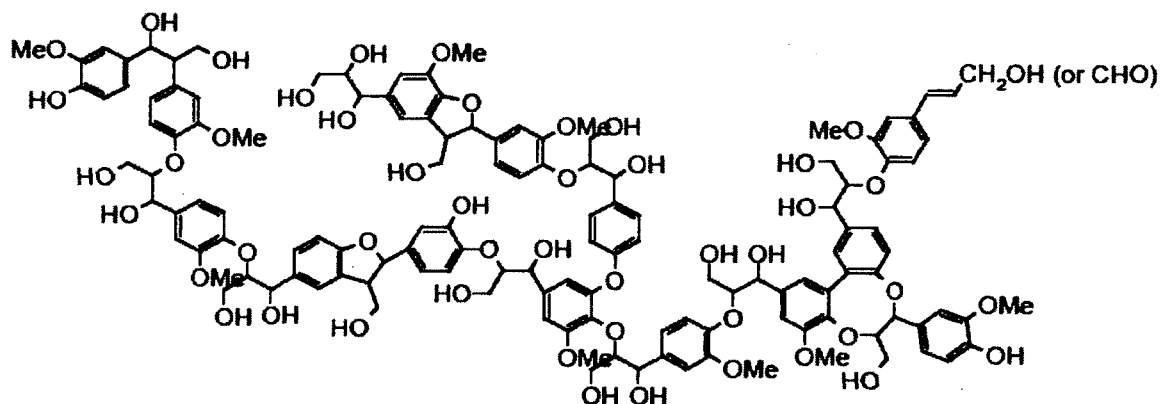


Figure 2-1 Structure de la lignine

La non spécificité de ces LME s'avère très intéressante pour le développement de procédés de bioremédiation (Rubilar *et al.*, 2008; Couto et Toca-Herrera, 2007). Une seule enzyme pouvant traiter plusieurs polluants à la fois limiterait les coûts de traitements de milieux contaminés. Également, ces champignons sont plus intéressants que les bactéries dans plusieurs cas, puisque leurs LME sont généralement extracellulaires ce qui simplifie leur purification (Pointing, 2001).

Les principales LME des WRF sont la lignine peroxydase (LiP, E.C. 1.11.1.14), la manganèse peroxydase (MnP, E.C. 1.11.1.13), la versatile peroxydase (VP, E.C. 1.11.1.16) et la laccase (Lac, E.C. 1.10.3.2). Plusieurs autres enzymes sont nécessaires pour minéraliser la lignine mais ces dernières sont incapables d'altérer ce polymère seules. Elles viennent généralement supporter l'action des LME ainsi que le font plusieurs molécules de faible masse moléculaire agissant comme médiateurs (Johannes et Majcherczyk, 2000). Ces enzymes font des WRF, d'excellents organismes pour la dégradation de polluants persistants (Rubilar *et al.*, 2008). Plusieurs WRF ont été utilisés pour éliminer des polluants comme des colorants industriels (Karapinar et Kargi Kapdan, 2002; Wesenberg *et al.*, 2003), des composés pharmaceutiques (Marco-Urrea *et al.*, 2009) ou des surfactants comme le nonylphénol (Soares *et al.*, 2005). Plusieurs inconvénients sont associés à l'utilisation de microorganismes pour la dégradation de polluants : 1) les conditions du milieu doivent être contrôlées 2) il faut s'assurer que les microorganismes croissent 3) éviter les contaminations en stérilisant le milieu et 4) il faut ensuite gérer la biomasse produite de façon sécuritaire. L'utilisation de microorganismes pour traiter des milieux contaminés peut donc s'avérer coûteuse (Ahuja *et al.*, 2004). En utilisant seulement leurs enzymes, on évite la gestion des déchets biologiques associée à l'utilisation de champignons *in situ*. Ces enzymes sont généralement insensibles à la présence de prédateurs, la concentration en contaminants les affecte peu et les conditions environnementales diminuent leurs capacités dans une moindre mesure que les microorganismes (Gianfreda et Rao, 2004). Les enzymes n'ont pas de période d'acclimatation ni de diminution de performance face aux variations subites de concentration de contaminants (Karam et Nicell, 1997). De plus, l'amélioration des propriétés de ces enzymes est possible afin d'élargir le spectre des conditions environnementales qui leur sont favorables.

## Les enzymes modifiant la lignine

Les LME sont généralement produites lors du métabolisme secondaire des WRF puisqu'elles n'apportent pas d'énergie directement. La synthèse de ces enzymes commence lorsqu'un stress est induit comme une diminution dans la source de carbone ou d'azote ou l'introduction dans le milieu de composés phénoliques comme le catéchol ou encore du cuivre (Fonseca *et al.*, 2010; Cambria, 2011). Lors de culture par suspension, les WRF produisent, généralement, la LiP et la MnP quand il y a beaucoup d'oxygène dissout mais sans agitation.

Contrairement à la laccase qui est produite de façon optimale lorsque les WRF en suspension sont agités (Elisashvili *et al.*, 2008). Le grand avantage de la laccase sur les peroxydases, du point de vue industriel, est qu'il n'est pas nécessaire d'ajouter du peroxyde dans le milieu puisque l'accepteur final d'électrons est l'oxygène.

La laccase est une enzyme oxydative qui transforme les composés phénoliques. Son mécanisme d'action fait intervenir quatre atomes de cuivre, au centre de son site actif, qui s'oxydent et se réduisent afin de radicaliser son substrat (voir figure 2.2) tout en réduisant de façon concomitante le dioxygène solubilisé dans le milieu réactionnel. Le radical formé étant très instable réagira de différentes façons dépendamment des conditions du milieu dans lequel il se trouve (Wong, 2009).

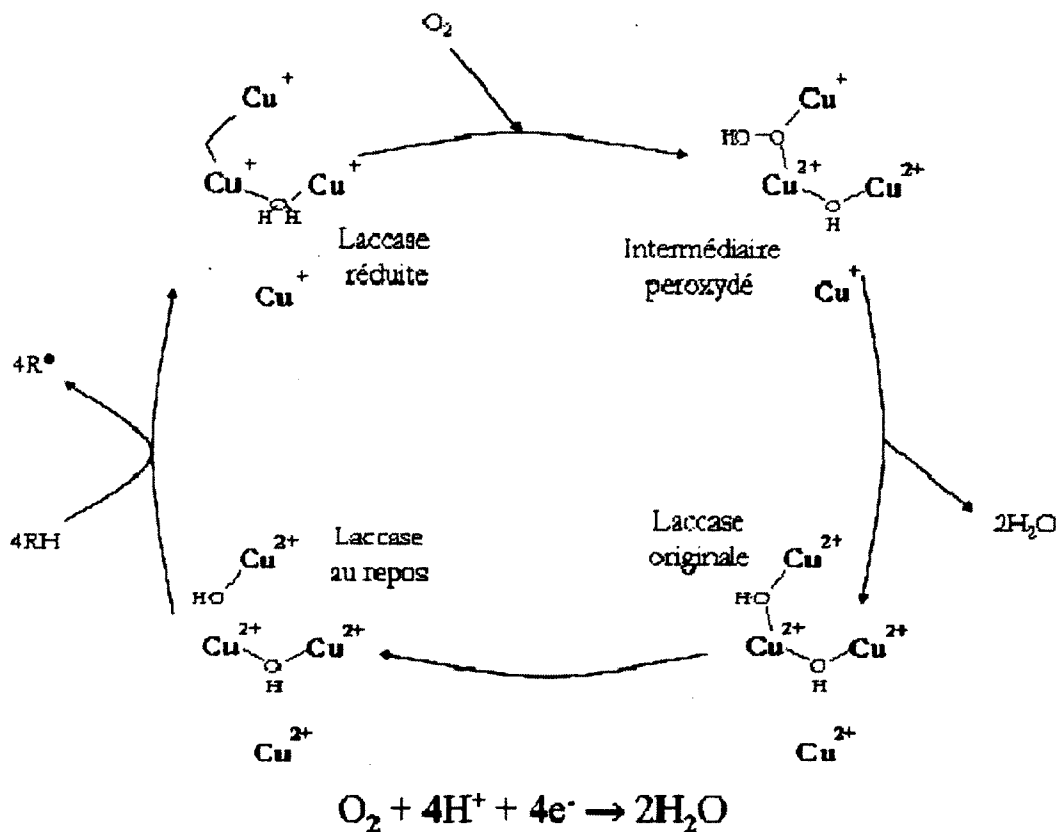
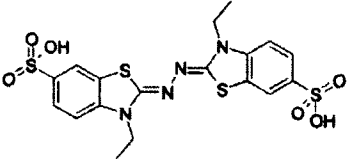
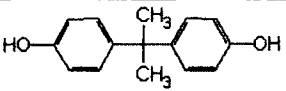
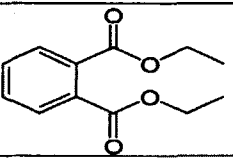
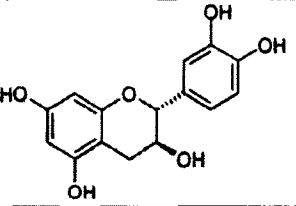
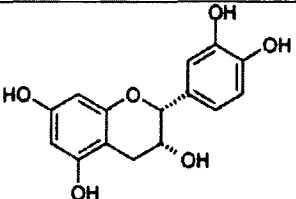


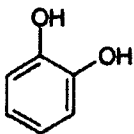
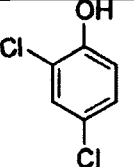


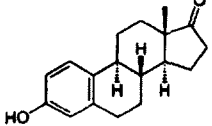
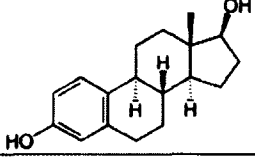
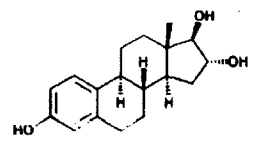
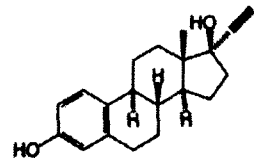
Figure 2-2 Cycle catalytique de la laccase où RH est le substrat et R• est le radical produit. (Modifié de (Wesenberg *et al.*, 2003)).

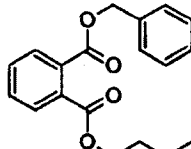
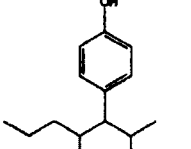
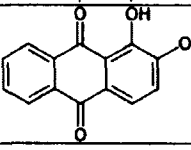
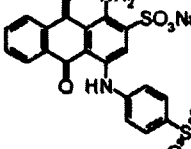
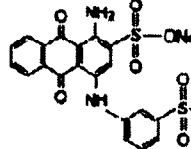
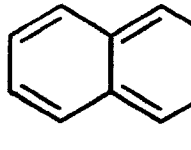
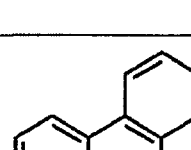
L'aspect intéressant de cette enzyme dans une perspective de bioremédiation est qu'elle oxyde une grande variété de molécules contenant une structure phénolique. Plusieurs exemples sont mentionnés dans le Tableau 0.1.

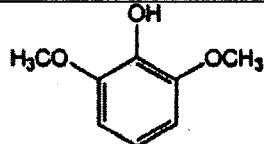
Tableau 0.1 Exemples de composés oxydés par l'action de la laccase

Nom des composés	Acronyme	Utilité/problématique associée	Structure	Référence
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	ABTS	Industrie textile : utilisé comme encre Utilisé pour quantifier le potentiel antioxydant d'aliments et l'activité d'enzymes oxydatives		(Bourbonnais <i>et al.</i> , 1998)
Bisphénol A	BPA	Industrie des plastiques : utilisé dans la fabrication de polycarbonates et résines époxy		(Cabana <i>et al.</i> , 2007)
Diéthylphtalate	DEP	Produits d'hygiène personnelle, parfums		(Kim <i>et al.</i> , 2008)
(+)-catechin		Antioxydant d'origine végétale		(Ma <i>et al.</i> , 2009)
(-)-epicatechin		Antioxydant d'origine végétale		(Ma <i>et al.</i> , 2009)



Catechol		Précurseur dans la production de pesticides et de saveurs artificielles		(Ma <i>et al.</i> , 2009)
2-4-dichlorophénol	2-4-DCP	Pesticide, présent dans certains combustibles et dans la production de plastiques		(Zhang <i>et al.</i> , 2009)
Ibuprofen	IBU	Analgésique et anti-inflammatoire		(Marco-Urrea <i>et al.</i> , 2009)
Carbamazépine	CARBA	Antiépileptique		(Marco-Urrea <i>et al.</i> , 2009)
Estrone	E1	Hormone sexuelle féminine		(Auriol <i>et al.</i> , 2008)
17β-estradiol	E2	Hormone sexuelle féminine		(Auriol <i>et al.</i> , 2008)
Estriol	E3	Hormone sexuelle féminine		(Auriol <i>et al.</i> , 2008)
17α-éthynylestradiol	EE2	Substitut d'œstrogène présent dans les médicaments anticonceptionnels		(Auriol <i>et al.</i> , 2008)

Benzylbutylphtalate	BBP	Utilisé comme plastifiant dans la fabrication du PVC		(Kim <i>et al.</i> , 2008)
Nonylphénol	NP	Produit de dégradation des alkylphénol éthoxylates, des surfactants		(Kim <i>et al.</i> , 2008)
Alizarin Red		Encre industrielle		(Lu <i>et al.</i> , 2007)
Reactive Blue 19	RBu19	Encre industrielle		(Trovaslet <i>et al.</i> , 2007)
Remazol Brilliant Blue R	RBBR	Encre industrielle		(Osma <i>et al.</i> , 2010)
Anthracène	ANT	Précurseur utilisé dans la fabrication d'encre. Considéré comme un polluant important par l'Agence de Protection de l'Environnement américaine		(Dodor <i>et al.</i> , 2004)
Benzo-a-pyrène	BaP	Considéré comme un polluant important par l'Agence de Protection de l'Environnement américaine		(Dodor <i>et al.</i> , 2004)

2-6-diméthoxyphénol	2-6-DMP	Produit de la pyrolyse de la lignine		(Hublik et Schinner, 2000)
---------------------	---------	--------------------------------------	---	----------------------------

Cette versatilité l'avantage donc vis-à-vis d'autres enzymes oxydant les phénols comme la tyrosinase (Ma *et al.*, 2009). Elle est donc très intéressante pour les procédés comme la décoloration des encres textiles (Cho *et al.*, 2007) ou dans les biosenseurs (Couto et Toca-Herrera, 2007). La détoxification des effluents d'usines de production d'huile d'olive peut aussi être réalisée à l'aide de la laccase (Jaouani *et al.*, 2006). Il est également possible d'élargir le spectre d'action de la laccase en la faisant interagir avec un médiateur comme l'ABTS ou le 1-hydroxybenzotriazole (Kurniawati et Nicell, 2007). Plusieurs autres utilisations de la laccase dans des procédés de bioremédiation ont été répertoriées dans la littérature. Une partie de ces utilisations est présentée dans le Tableau 0.2.

Tableau 0.2 Bioremédiation utilisant la laccase

Source de laccase	Mode de traitement	Contaminant	Matrice	Taux d'élimination	Élimination du potentiel oestrogénique	Commentaires	Référence
<i>T. villosa</i>	Laccase libre et immobilisé	2-4-DCP	Sol				(Ahn <i>et al.</i> , 2002)
<i>T. versicolor</i>	Laccase libre et utilisation d'un médiateur (HBT)	E2 et EE2	Aqueux	~100% en 1h	100 % en 8h	L'activité oestrogénique était détectée même à de faibles concentration d'E2 et EE2	(Suzuki <i>et al.</i> , 2003)
	Laccase conjugué sur du chitosane	TCS	Aqueux	100% en 6h		60% d'élimination du TCS avec la laccase libre en 6h	(Cabana <i>et al.</i> , 2010)
	Laccase libre	E1, E2, E3, EE2	Eau usée et eau usée synthétique		100 % en 1h	Eau synthétique : eau déionisée contenant les oestrogènes	(Auriol <i>et al.</i> , 2008)
	Laccase immobilisée sur kaolinite	ANT et BaP	Émulsion	17 et 19% en 24h		L'utilisation de l'ABTS comme médiateur permet d'atteindre 80 et 85% d'élimination en 24h	(Dodor <i>et al.</i> , 2004)
	Laccase immobilisée sur	RBBR	Aqueux	45% en 30 min		L'utilisation d'un médiateur	(Peralta-Zamora <i>et al.</i> , 2003)

	silice					est nécessaire avec la laccase libre mais pas avec la laccase immobilisée	
<i>T. versicolor</i>	Laccase avec HBT	Méthoxychlor e (pesticide)	Aqueux	23% en 24h avec 1 nkat d'enzyme		1 nkat représente la quantité d'enzyme oxydant 1nmol de 2,6-DMP en 1 seconde	(Hirai <i>et al.</i> , 2004)
<i>Coriolopsis polyzona</i>	Laccase libre, immobilisée et en CLEAs	BPA TCS NP	Aqueux				(Cabana <i>et al.</i> , 2009; Cabana, 2008; Cabana <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Laccase libre et laccase immobilisée sur alginate et chitosane	RBBR	Aqueux	70% en 1h 40% en continu		Billes d'alginate traitées au chitosane pour diminuer la perte de laccase	(Palmieri <i>et al.</i> , 2005)
	Laccase	Perylène ANT PYR Fluorène Fluoranthrène Phénanthrène	1% (v/v) Acétonitrile	100% 2j. 95% 2j. 40% 2j. 95% 2j. 50% 10j. 90% 10j.		10 µM de polluant et 0,176 U de laccase ont été utilisés.	(Pozdnyakova <i>et al.</i> , 2006)
	Laccase immobilisée sur Eupergit®	2,6-DMP	Aqueux	100% en continu 1mM à 1ml/min		Du Benzoate a été utilisé pour protéger le site actif lors de l'immobilisation	(Hublik et Schinner, 2000)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Laccase libre	Encres industrielles	Aqueux	80%, 52% et 60% respectivement en		Décoloration réalisée à 25°C	(Trovaslet <i>et al.</i> , 2007)

		Acid blue 62 Acid yellow 36 Acid orange 7		48 heures		à pH 4,5 pendant 48 heures.	
<i>Lentinula edodes</i>	Laccase immobilisée sur Eupergit®	OMW	Aqueux	Réduction jusqu'à 70% des phénols totaux		Traitement effectué à 35°C sous un débit de 5ml/min	(D'Annibale <i>et al.</i> , 2000)
	Laccase immobilisée sur chitosane	OMW	Aqueux	Réduction de 67% des phénols totaux et 99% du catechol et du 3,4-dihydroxyphényle thanol		Traitement effectué à 30°C sous un débit de 1ml/min pendant 24h	(D'Annibale <i>et al.</i> , 1999)

Malheureusement, cette enzyme ne peut être utilisée de façon rentable dans les procédés industriels actuels car elle est instable dans les conditions de réaction ainsi qu'en raison de la perte des enzymes en solution (Sheldon, 2007A). Pour améliorer sa stabilité et rendre possible sa réutilisation, il est possible de l'immobiliser ou l'insolubiliser.

## Techniques d'immobilisation/insolubilisation

L'immobilisation et l'insolubilisation enzymatique sont des processus visant à transformer une enzyme en un biocatalyseur qui est par définition réutilisable. Plusieurs moyens différents peuvent être utilisés pour immobiliser la laccase. Les techniques d'immobilisation peuvent être séparées en deux grands groupes : l'attachement à un support solide et l'immobilisation sans support (insolubilisation). L'immobilisation sur un support solide consiste en l'attachement de l'enzyme de façon ionique, mécanique ou chimique sur une matrice. La matrice en question peut avoir différentes formes : billes, film, membrane, capsule, etc. et être constituée de différents matériaux : polymère, métal, silice, etc. D'un autre côté, ce qu'on appelle insolubilisation est la technique consistant à rendre une enzyme insoluble en liant plusieurs molécules enzymatiques ensemble pour former un amas réutilisable. Le biocatalyseur obtenu a donc 3 avantages importants : 1) il est généralement plus stable que l'enzyme libre, 2) il est plus facile à utiliser et 3) il ne contaminera pas les produits formés puisqu'il peut être séquestré.

### Immobilisation sur support

Pour l'immobilisation sur un support, trois voies sont possibles (Duran *et al.*, 2002). Premièrement, on peut utiliser les forces ioniques pour adsorber les enzymes sur un support ayant une charge électrostatique opposée inverse, en utilisant les forces de van der Waals ou les liens hydrophobes. Un avantage indéniable de cette méthode est qu'il n'est pas nécessaire de purifier l'enzyme puisque l'immobilisation se fait généralement en fonction des propriétés de cette dernière (Hanefeld *et al.*, 2009). Un support hydrophobe permettra une bonne adsorption d'une enzyme hydrophobe mais ne retiendra pas les enzymes hydrophiles. Cette technique est plutôt simple à utiliser et peut même servir à purifier une enzyme d'un bouillon



de culture. Un désavantage de cette méthode est que la charge de l'enzyme change en fonction des conditions du milieu dans lequel elle est utilisée et qu'elle peut donc se détacher du support (Hanefeld *et al.*, 2009). De plus, comme les liens entre l'enzyme et le support sont faibles, l'enzyme peut se désorber par des forces mécaniques ou si les conditions du milieu changent subitement (Sheldon, 2007A). Une immobilisation par adsorption peut toutefois améliorer les propriétés catalytiques de l'enzyme ou encore sa stabilité face à des conditions dénaturantes. Par exemple, une polyphénol oxydase (EC 1.14.18.1) a été immobilisée par adsorption dans une membrane capillaire pour l'oxydation de composés phénoliques dans un effluent industriel (Edwards *et al.*, 1999). La perte d'activité était nettement inférieure à l'enzyme libre mais le taux d'immobilisation était plutôt faible à 26%.

Deuxièmement, il est possible de former des liens covalents entre le support et les enzymes en utilisant un agent réticulant et parfois un activateur. Dans bon nombre d'applications, le GLU est utilisé comme agent réticulant et dans certains cas comme activateur de supports contenant des groupements amine (Betancorl *et al.*, 2006). Cette méthode permet un attachement durable de l'enzyme, d'augmenter sa stabilité et de l'utiliser pour plusieurs traitements successifs dans un procédé en continu (Sheldon *et al.*, 2007C). L'attachement par liens covalents est souvent préféré à l'adsorption par interactions hydrophobes ou ioniques (Uhlig et Linsmaier-Bednar, 1998). L'attachement par liens covalents diminue grandement les chances que l'enzyme immobilisée se détache de son support par des forces mécaniques (Sheldon, 2007A). Les nombreux liens formés entre l'enzyme et son support réduit sa flexibilité et diminue ainsi les risques de dénaturation (Hanefeld *et al.*, 2009). Plusieurs études ont mis en évidence la stabilisation des enzymes immobilisées face à un pH extrême (Costa *et al.*, 2002; Yinghui *et al.*, 2002; D'Annibale *et al.*, 2000), des températures élevées (D'Annibale *et al.*, 2000; Hung *et al.*, 2003; Arroyo *et al.*, 1999) ou dans des composés dénaturants (Bindhu et Abraham, 2003; Cabana *et al.*, 2007)

Un des inconvénients est que l'activité spécifique du biocatalyseur ainsi formé (activité par unité de masse) est moindre que l'activité spécifique de l'enzyme pure car le support utilisé est inactif. Les liens formés peuvent aussi diminuer la mobilité de l'enzyme et également créer un encombrement stérique diminuant l'activité apparente de l'enzyme. L'enzyme, ne comptant que pour 10% environ de la masse du catalyseur, il faut donc une masse 10 fois plus grande d'enzymes immobilisées que d'enzymes libres pour atteindre la même activité dans un milieu

réactionnel. Généralement, le potentiel d'utilisation des enzymes immobilisées est augmenté comparativement aux enzymes libres tel que démontré par Kandelbauer *et al.* (Kandelbauer *et al.*, 2004). La laccase immobilisée sur des billes alumine silanisées était utilisée pour éliminer des encres ou du moins éliminer la couleur produite par ces encres. Les enzymes immobilisées sur des supports ont l'avantage de pouvoir être utilisées dans des réacteurs à lit fixe ou fluidisé. Par exemple, une laccase a été utilisée pour éliminer une encre d'un effluent en continu dans un réacteur à lit fixe. Environ 40% de la couleur de l'effluent était éliminée par une laccase de *T. versicolor* immobilisées sur des billes d'alginate (Palmieri *et al.*, 2005).

Troisièmement, il est possible de piéger les enzymes dans une matrice ou une capsule. Cette méthode consiste à fixer l'enzyme dans une matrice pendant la formation de celle-ci ce qui l'emprisonne mécaniquement. Il est parfois nécessaire de lier de façon covalente à la matrice pour éviter les pertes de catalyseurs (Sheldon *et al.*, 2007C). Cette matrice peut ensuite être modifiée de façon à former des billes utilisables dans un réacteur à lit fluidisé ou à lit fixe. Avec cette méthode, il y a encore l'inconvénient de la dilution de l'activité enzymatique et de la possibilité d'inactiver les enzymes. Également, il peut y avoir une diminution de la vitesse de diffusion en raison de la taille des pores de la matrice donc diminution globale de l'activité apparente. Une lipase a été immobilisée selon cette méthode pour la production de biodiesel à partir de l'huile de palme (Jegannathan *et al.*, 2009). La laccase aussi a été encapsulée dans divers polymères. Par exemple, l'alginate a été utilisée avec le chitosane pour encapsuler la laccase dans des microcapsules. La laccase était ainsi plus stable face à la dégradation thermique. Elle était aussi efficace sur une plus grande gamme de température (Lu *et al.*, 2007).

L'utilisation de support pour l'immobilisation entraîne un inconvénient souvent négligé. Comme l'activité volumique des catalyseurs immobilisés est moindre qu'avec les enzymes libres, les unités de traitement utilisant ces billes de catalyseur doivent être bien plus grandes pour une même activité totale (Sheldon, 2007A).

L'insolubilisation, quant à elle, n'utilise aucun support solide et permet ainsi de conserver une bonne activité massique et volumique car le biocatalyseur est constitué presque entièrement d'enzymes (Duran *et al.*, 2002). Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour insolubiliser une enzyme sans support. Les premières techniques d'insolubilisation apparemment il y a près de 50 ans (Cao *et al.*, 2003). Les enzymes en solution étaient directement réticulées

ce qui donnait un gel enzymatique. Les résultats étant mitigés et l'utilisation d'un tel gel étant compliqué, l'immobilisation sur des supports solides est devenue populaire et l'insolubilisation a été laissée de côté (Sheldon, 2007A). Une méthode utilisée à partir des années 1990 est de former des cristaux de protéines puis de les réticuler en utilisant un agent bifonctionnel comme le GLU (Roy *et al.*, 2005). Par contre cette technique nécessite une enzyme d'un haut niveau de pureté et la cristallisation doit être rigoureusement contrôlée (Sheldon *et al.*, 2005). La formation de cristaux réticulés (CLEC) a cependant servi à immobiliser une laccase dans le but de fabriquer une électrode permettant la détection du phénol (Roy *et al.*, 2005). Les cristaux de laccase étaient 4 fois plus stables face à une dégradation thermique que la laccase libre (Roy et Abraham 2006). Plusieurs molécules ressemblant au phénol peuvent être détectées efficacement par l'électrode produite. Des CLECs de protéases ont également été préparés et leur stabilité thermique et face à divers dénaturant chimiques était améliorée (Simi et Abraham, 2007). La structure de l'enzyme est conservée lors de la cristallisation ce qui fait que les CLECs sont des biocatalyseurs actifs. Ils sont également plus stables pour deux raisons : 1) les liens formés par le GLU solidifient la structure tridimensionnelle des enzymes et 2) la proximité des enzymes permet plus d'interactions entre elles comme des ponts hydrogènes, ce qui diminue l'impact de conditions dénaturantes (Govardhan, 1999). La diffusion du substrat est également facilitée dans les canaux formés lors de la cristallisation [

Figure 0-3 Structure d'un cristal de lysozymes (Cohen-Hadar *et al.*, 2006). Les points rouges indiquent des canaux formés lors de la cristallisation des lysozymes.

] (O'Fagain, 2003).

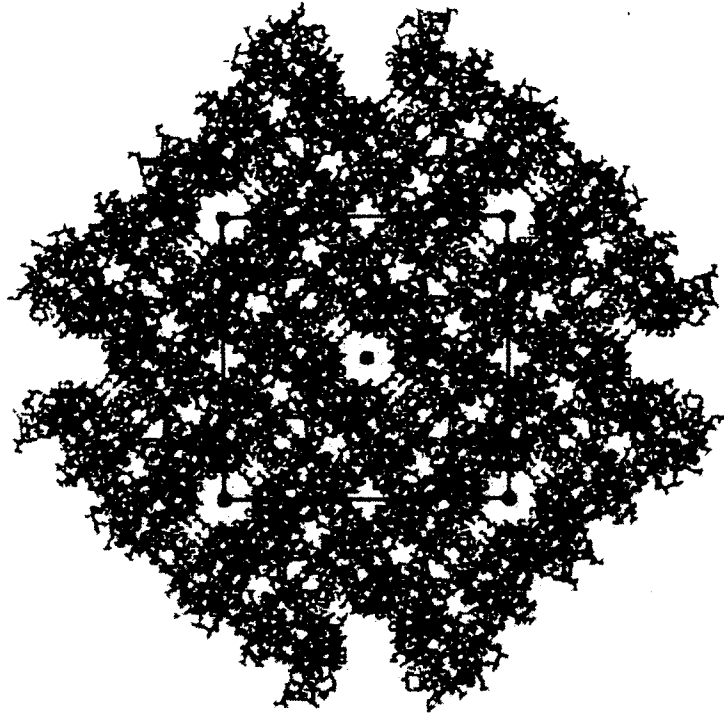


Figure 0-3 Structure d'un cristal de lysozymes (Cohen-Hadar *et al.*, 2006). Les points rouges indiquent des canaux formés lors de la cristallisation des lysozymes.

Une autre technique de réticulation consiste à faire réagir le GLU avec des enzymes qui ont été séchées par atomisation (*cross-linked spray-dried enzymes*, CSDE). Cette technique n'a été que peu utilisée car les enzymes ainsi séchées sont dénaturées de façon temporaire (Cao *et al.*, 2003). En réticulant ces enzymes, leur structure tridimensionnelle se trouve figée ce qui les maintient dans une conformation inactive. Pour cette raison, les recherches sur l'immobilisation sans support se sont dirigées principalement vers les CLECs et les agrégats d'enzymes réticulés (*cross-linked enzyme aggregates*, CLEAs).

Cette dernière technique consiste à former des agrégats d'enzymes par précipitation puis de former des liens covalents entre les enzymes d'un même agrégat (voir Figure 2-). Plusieurs enzymes ont été insolubilisées de cette façon avec succès. La laccase (Matijošyte *et al.*, 2010; Cabana *et al.*, 2007; Desentis-Mendoza *et al.*, 2006), la pénicilline acylase (Wilson *et al.*, 2009; Rajendhran et Gunasekaran, 2007; Cao *et al.*, 2001), la glutaryl acylase (Lopez-Gallego *et al.*, 2005), la nitrilase (Kumar *et al.*, 2010; Martinková *et al.*, 2009; Kaul *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2006; Van Langen *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2004) et la lipase (Majumder *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2006; Lopez-Serrano *et al.*, 2002) sont des exemples d'enzymes ayant un attrait sur le plan industriel qui ont été insolubilisées sous forme de CLEAs.

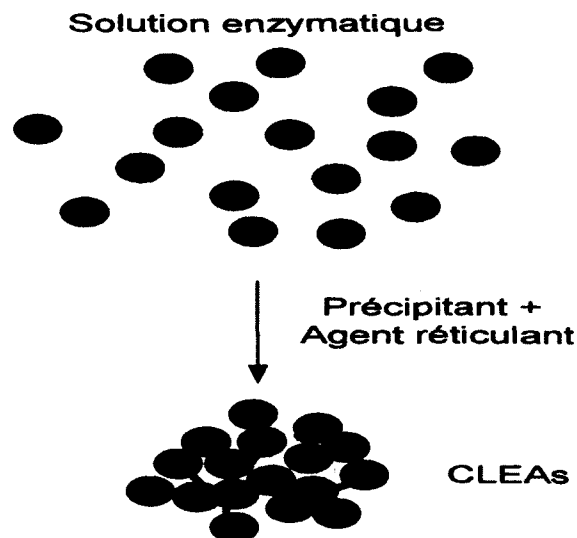


Figure 2-4 Schématisation de la réticulation d'agrégats d'enzymes

L'utilisation de ces biocatalyseurs de façon industrielle est possible en raison de leur taille suffisamment grande (1-100 $\mu$ m) pour les récupérer entre chaque utilisation (Jung *et al.*, 2009; Cabana *et al.*, 2009). Pour ce faire, il est toutefois nécessaire de développer des bioréacteurs adaptés (Cabana *et al.*, 2009).

Comme la plupart des autres techniques d'immobilisation, la formation de CLEAs nécessite l'utilisation un agent bifonctionnel pour lier les enzymes. Plusieurs composés peuvent être utilisés pour remplir cette fonction mais le plus fréquemment utilisé reste, sans doute, le GLU (Cabana *et al.*, 2009).

## Glutaraldéhyde

Le GLU est un dialdéhyde formé d'une chaîne de cinq atomes de carbones. Son utilisation comme agent réticulant pour les enzymes est très répandu car il réagit facilement avec les groupements amines. Comme il a deux groupes réactifs, le glutaraldéhyde peut former des liens amides entre deux enzymes. Les liens entre les protéines et le glutaraldéhyde sont très stables (Cabral et Kennedy, 1991). Par contre, cette technique ne fonctionne pas pour certaines enzymes comme les nitrilases car le GLU peut modifier la conformation de l'enzyme ou réagir avec des acides aminés du site actif et l'inactiver (voir Figure 2-5) (Mateo *et al.*, 2004).

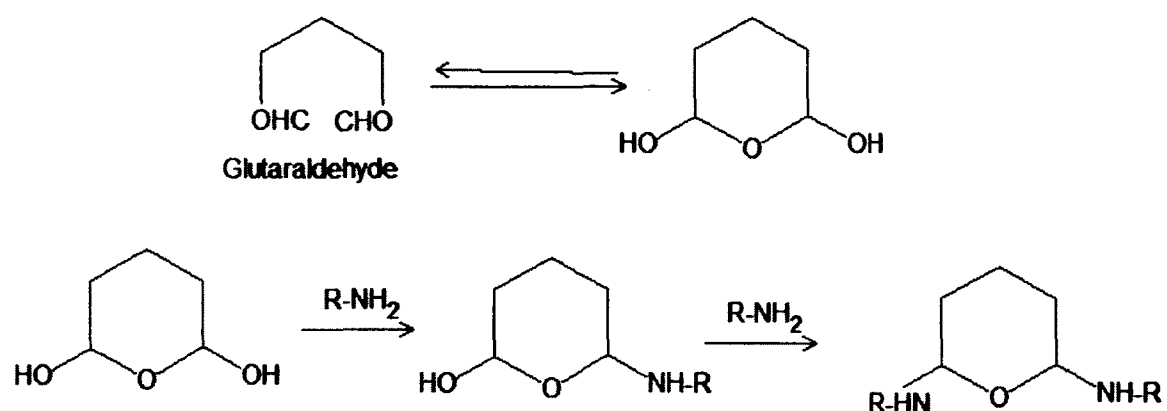


Figure 2-5 Un mécanisme possible de réticulation d'enzymes par le glutaraldéhyde (adapté de (Migneault *et al.*, 2004)). R-NH<sub>2</sub> représente une protéine ou une chaîne aminée.

Cependant, le GLU peut être nocif pour certains organismes aquatiques. En effet, plusieurs recherches montrent que le GLU affecte la reproduction et la santé d'organismes aquatiques (Emmanuel *et al.*, 2005; Leung, 2001; Sano *et al.*, 2005) sans compter les effets sur la santé humaine (Dimich-Ward *et al.*, 2004; Takigawa et Endo, 2006). Il est reconnu pour avoir une toxicité aigüe pour certains organismes aquatiques comme *Vibrio fischeri* (Emmanuel *et al.*, 2005). Le GLU diminuerait également le taux de reproduction de plusieurs espèces aquatiques (Sano *et al.*, 2005). En effet, la toxicité du GLU est très importante sur les œufs de crevettes (90% de mortalité à 226mg/l de GLU) (Raikow *et al.*, 2007) et le taux de reproduction des daphnies (50% moins d'œufs pondus à 4,25mg/l de GLU) (Leung, 2001). Le GLU a aussi un effet néfaste sur la croissance des algues. À une concentration de moins de 1 mg/L, une diminution de la croissance des algues de type *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum* a été constatée (Leung, 2001).

Certains effets sont aussi constatés sur des mammifères tels les porcs, souris, hamsters et même les humains. Le GLU est reconnu comme irritant des voies respiratoires, de la peau et il peut entraîner un asthme occupationnel ou de l'eczéma allergique (Takigawa et Endo, 2006). Des nécroses du myocarde, des perturbation du système nerveux se traduisant en nausées ou migraines et des irritations pulmonaires aigües ont été constaté suite à une exposition au GLU même à des concentrations aussi faibles que 0,1% (Luthra *et al.*, 2008). Également, des cas de paralysie du diaphragme ont été détectés sur des porcs, proches parents génétiques de l'humain (Fürst et Banerjee, 2005). Certains travaux démontrent aussi un potentiel génotoxique du GLU

qui réagirait avec les bases aminés présents dans l'ADN. (Miyachi *et al.*, 2005; Zeiger *et al.*, 2005). L'exposition à un produit potentiellement toxique comme le GLU met en danger la santé des travailleurs et met en péril certains écosystèmes aquatiques, il serait donc souhaitable de trouver une alternative à cet agent.

## Alternatives au glutaraldéhyde

Plusieurs alternatives sont possibles pour remplacer le GLU comme agent réticulant. Cependant, seulement ceux ayant une toxicité moindre ou ne restant pas dans le biocatalyseur considérés dans le présent projet.

### Le glyoxal

Le glyoxal (GLY) est également un dialdéhyde mais ayant deux atomes de carbone au lieu de cinq comme le GLU (Figure 2-6).

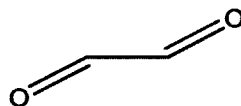


Figure 2-6 Structure chimique du glyoxal

Les liens formés avec les protéines ne sont pas aussi stables qu'avec le glutaraldéhyde mais il est possible de stabiliser les liens formés par une réduction des produits formés (Hermanson, 1996). De plus, le GLY est biodégradable par des enzymes du système ligninolytique des moisissures de la pourriture blanche du bois (Shah et Nerud, 2002). Cependant, certains problèmes de santé lui sont attribués. Il peut devenir problématique surtout chez les personnes diabétiques et il serait impliqué dans le processus du vieillissement et de maladies neurodégénératives (Grillo et Colombatto, 2008; Brouwers *et al.*, 2011).

Le GLY a été utilisé dans la formation de panneaux de contreplaqués sans résines synthétiques (Mansouri *et al.*, 2010). Il est aussi utilisé comme agent réticulant dans la fabrication de mousse de chitosane (Figure 0-) (Testouri *et al.*, 2010). Le GLY réagissant en présence des groupements amines sur le chitosane, il est raisonnable de croire qu'il est possible de l'utiliser comme agent de réticulation d'enzymes.

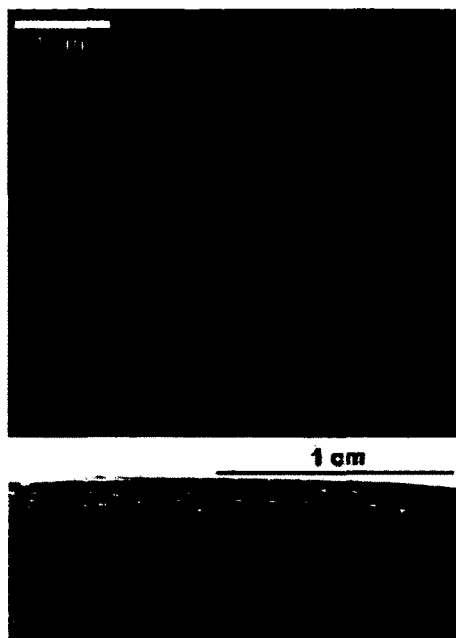


Figure 0-7 Mousse de chitosane réticulée par l'action du glyoxal (Testouri *et al.*, 2010)

La laccase a d'ailleurs été immobilisée sur un support en utilisant le GLY comme réticulant. Une amélioration de la stabilité thermique et face à divers dénaturants chimique a été détectée suite à l'immobilisation de l'enzyme (Cabana *et al.*, 2009).

L'utilisation du GLY comporte cependant quelques désavantages. Il provoque entre autres une inflammation des cellules endothéliales (Yamawaki et Hara, 2008) qui peut se traduire par une irritation de la peau. Ses effets comme agent mutagène commencent également à être bien documentés (Olsen *et al.*, 2005) et son potentiel d'irritation des voies respiratoires aussi (Enoch *et al.*, 2010). Bien que ces effets soient moins importants que les inconvénients du GLU, d'autres options sont envisageables qui n'apportent pas de risque pour la santé des travailleurs.

### Hydrates de carbone fonctionnalisés

Il est également possible de créer des aldéhydes à partir d'autres molécules. Par exemple, en oxydant un hydrate de carbone, on peut ajouter à ce dernier un ou plusieurs groupes fonctionnels dépendamment du nombre de monomères présents (Hermanson, 1996;



Mateo *et al.*, 2004). Le glucose, le lactose, le fructose, l'amidon, le dextran et bien d'autres peuvent servir à préparer un agent réticulant.

La façon la plus commune de fonctionnaliser ces saccharides est de les oxyder en les mettant en contact avec un oxydant fort comme le periodate de sodium et ainsi leur incorporer deux groupements aldéhydes par monomère oxydé (Figure 2-7).

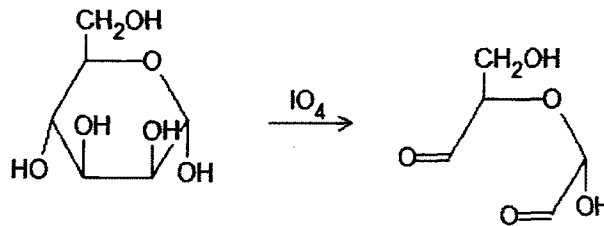


Figure 0-8 Mécanisme d'oxydation du glucose par le periodate ( $\text{IO}_4$ ) (Adapté de (Schoevaart *et al.*, 2005))

L'oxydation du glucose permet la formation de deux groupements aldéhydes sur le glucose (Schoevaart *et al.*, 2005). La structure obtenue ressemble beaucoup à la structure du GLU en solution aqueuse. Il est donc raisonnable de penser que la réaction entre le glucose dialdéhyde et les amines primaires des enzymes sera semblable à celle impliquant le glutaraldéhyde. Pour augmenter la quantité de groupements actifs, il est possible d'oxyder des polymères de monosaccharides comme le lactose, l'amidon ou le dextran.

Ce dernier est un polysaccharide servant à plusieurs microorganismes de réserve d'énergie ou comme polymère pour former une capsule de protection (Figure 2-9) (Poli *et al.*, 2010). Si ce polymère sert à protéger les microorganismes des conditions de milieu défavorables, il pourrait aussi bien servir à protéger une enzyme de conditions dénaturantes.

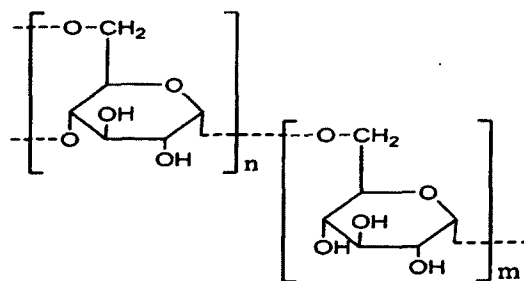


Figure 0-9 Structure simplifié du dextran

Un autre avantage d'un polyaldéhyde de haut poids moléculaire est qu'il y a peu de chance pour qu'il parvienne au site actif de l'enzyme par diffusion (Mateo *et al.*, Cesar 2004). Ainsi, on s'assure que l'enzyme insolubilisée a réagi en surface seulement et a donc plus de chance de rester active. De plus, ce composé ne semble pas toxique et il a même été testé comme fixatif de tissus pour aider à la cicatrisation (Bhatia *et al.*, 2007; Bhatia *et al.*, 2007). Son oxydation donne lieu à la création de groupements aldéhydes semblables à ceux du glucose oxydé décrit plus haut (Figure 2-9).

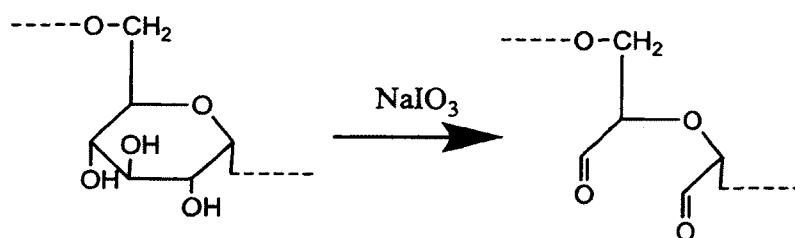


Figure 0-10 Oxydation du dextran par le periodate de sodium.

Certaines enzymes et protéines ont été immobilisées avec succès grâce aux dérivés de saccharides comme la pectinase (Kobayashi et Takatsu., 1996), la trypsine (Kobayashi *et al.*, 1994), la catalase bovine (Betancorl *et al.*, 2003) et l'hémoglobine humaine (Artyukhov *et al.*, 2006). La stabilité face à des pH acides et une température de 60°C de la pectinase a été améliorée. La trypsine modifiée par le dextran dialdéhyde n'était plus affectée par l'inhibiteur de trypsine extrait de la fève de soya. La catalase bovine a également été immobilisée avec succès grâce au dextran dialdéhyde qui fixe les sous-unités de l'enzyme empêchant ainsi sa dénaturation par dissociation. La stabilité thermique de l'hémoglobine a également été légèrement améliorée par la réaction avec le dextran dialdéhyde. D'autres polymères ont aussi été réticulé par des saccharides fonctionnalisés comme le polyuréthane (Lalwani et Desai, 2010) et le chitosane (Zhang *et al.*, 2003).

Il est également possible d'oxyder les polysaccharides des protéines glycosylées afin de les réticuler sans intervention d'un agent extérieur. L'utilisation du periodate de sodium sur des enzymes glycosylées permet d'ajouter des groupements actifs sur ces dernières qui peuvent ensuite réagir avec des acides aminées comme la lysine (Schoevaart *et al.*, 2005).

Un des inconvénients à utiliser les polysaccharides est qu'ils peuvent être hydrolysés (Schoevaart *et al.*, 2005). Il est donc probable que le biocatalyseur formé se dégrade en solution et que leur utilisation sur une longue période soit limitée.

## La génipine

Certains produits naturels peuvent aussi réticuler les enzymes des agrégats afin de les insolubiliser. Par exemple la génipine (acide aglycone geniposidique), est une molécule réagissant avec les amines primaires (Butler *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2007) (voir Figure 2-10). Comme la lysine contient une amine primaire, il est raisonnable de croire qu'il serait possible d'utiliser cette molécule pour réticuler des protéines. La génipine est déjà utilisée pour améliorer les caractéristiques du chitosane ou du collagène en réagissant avec les amines les composant (Mi *et al.*, 2007; Everaerts *et al.*, 2008; Sung *et al.*, 2003). Elle est également utilisée dans la fabrication de colorants alimentaires (Sung *et al.*, 2001). La génipine réagit de deux façons différentes avec les amines primaires ce qui permet en fait de réagir avec deux acides aminés de deux enzymes différentes comme on peut le voir sur la Figure 2-10.

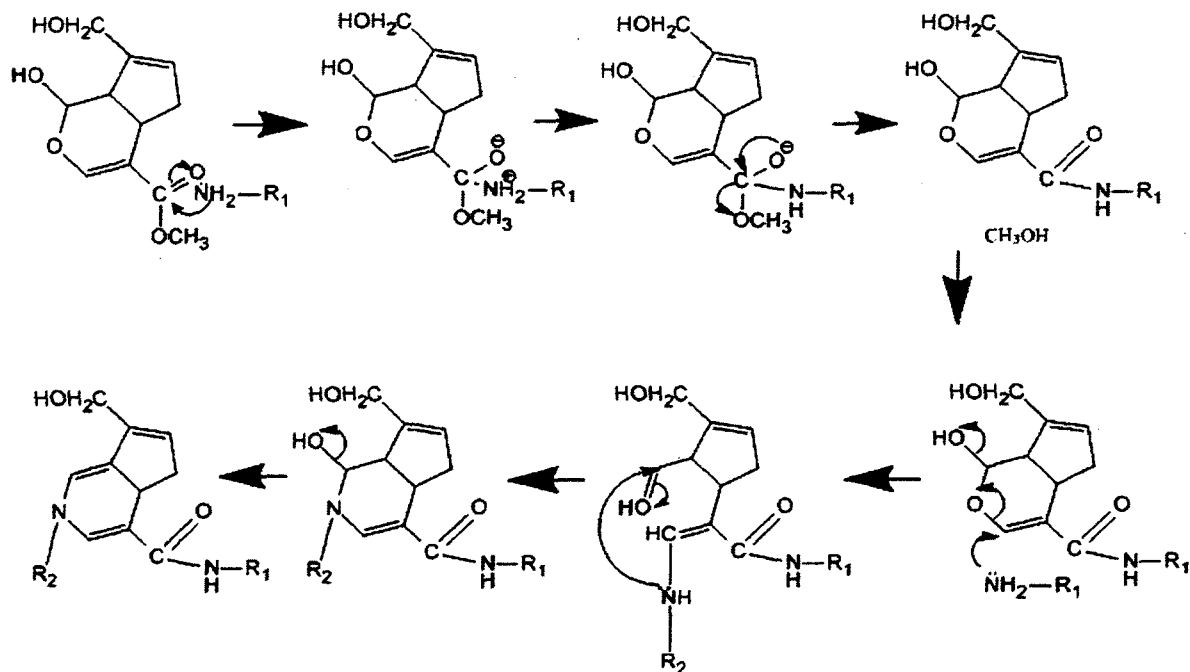


Figure 2-11 Mécanisme réactionnel de la réticulation d'enzymes par la génipine (modifié de (Butler *et al.*, 2003)).

Cependant, la génipine semble occasionner des bris dans l'ADN de certaines cellules ainsi que la formation de tétraploïdes (Ozaki *et al.*, 2002). Son potentiel cancérigène et son coût élevé rend cette alternative au GLU peu intéressante.

## Le chitosane

L'utilisation d'un autre biopolymère peut aussi être envisagée. Le chitosane a déjà été utilisé dans plusieurs expériences d'immobilisation d'enzymes surtout comme support ou matrice (Cabana *et al.*, 2010; El Ichi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008; Delanoy *et al.*, 2005; Ghanem et Ghaly, 2004). Il serait cependant possible de l'utiliser comme agent réticulant. Par exemple, l'utilisation d'un carbodiimide réagissant avec le groupement carboxylique de l'acide aspartique (présent dans la plupart des enzymes) donne un intermédiaire pouvant réagir avec un groupement amine sur le chitosane (Hermanson, 1996; Bindhu et Abraham, 2003). Il y a plusieurs carbodiimides disponibles sur le marché qui peuvent être utilisés dans ce contexte. Par exemple, l'EDAC (1-ethyl-3-(3-diméthyl aminopropyl)-carbodiimide). Après avoir lié l'enzyme à son support, l'EDAC a été transformé en une isourée qui peut être facilement retiré de la solution par dialyse (Figure 2-12) (Hermanson, 1996).

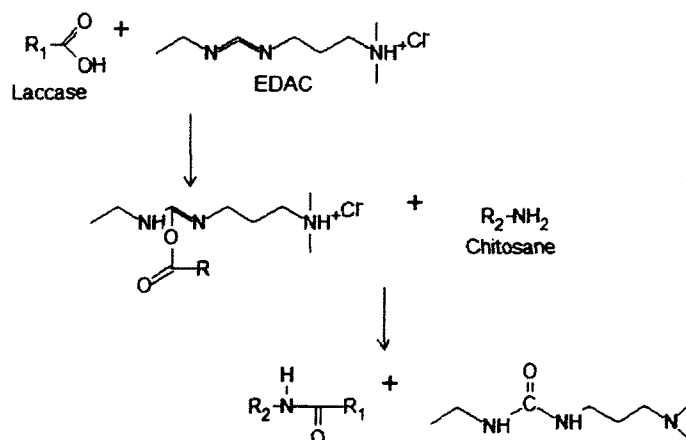


Figure 2-12 Schéma de la réticulation de la laccase par l'action combinée du chitosane et de l'EDAC (Adapté de (Rafat *et al.*, 2008)).

L'EDAC sert donc uniquement d'agent activateur puisqu'il ne se retrouve pas dans le produit fini. Le chitosane quant à lui est un biopolymère renouvelable et entièrement biodégradable (Figure 2-13). C'est un polymère très abondant sur Terre. En effet, la chitine

servant à la production du chitosane est un polymère structurel présent chez tous les arthropodes qui constituent plus de 80% des espèces de la planète (Brusca et Brusca, 2003).

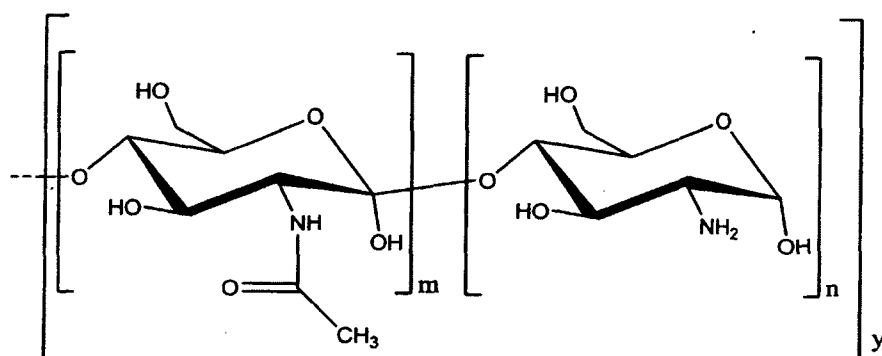


Figure 2-13 Structure du chitosane. La chitine (polysaccharide formé de plus de 50% du monomère m) est déacétylé pour donner le chitosane (polysaccharide formé de plus de 50% du monomère n)

Ce polymère est l'objet de plusieurs études en ingénierie tissulaire (Rafat *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2002), en pharmaceutique (Chen et Chen, 1998; Mi *et al.*, 2001) et pour la formation de milieux solides activés pour l'immobilisation enzymatique (Lu *et al.*, 2007; Ghanem et Ghaly, 2004). De plus, le chitosane est un polycation pouvant servir dans les procédés de coagulation/floculation des stations d'épuration des eaux usées (Huang et Chen, 1996; Cheng *et al.*, 2005). Il peut aussi servir à adsorber et ainsi faciliter l'élimination de métaux lourds comme le mercure (Miretzky *et al.*, 2009).

Certaines laccases ont déjà été immobilisées avec succès sur ce biopolymère (Cabana *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006; Delanoy *et al.*, 2005; Palmieri *et al.*, 2005; D'Annibale *et al.*, 1999). Le Tableau 2.3 présente certains faits concernant l'immobilisation de la laccase sur du chitosane. Aucune de ces études n'utilisait le chitosane comme agent réticulant.

Tableau 0.3 Utilisations du chitosane pour immobiliser la laccase

Type de chitosane	Type d'immobilisation	Agent utilisé	Commentaires	Référence
90,3% déacétylé	Immobilisation sur support	Glutaraldéhyde	Stabilité augmenté, réutilisation du biocatalyseur jusqu'à	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)

			6 cycles	
Chitosane de carapace de crabes	Immobilisation sur support	Glutaraldéhyde	Stabilité à la conservation augmentée, perte de 15% d'activité en 2 mois à 4°C. Réutilisation du biocatalyseur pendant 30 cycles	(D'Annibale <i>et al.</i> , 1999)
80 kDa 92,5% déacétylé	Immobilisation sur support	Glutaraldéhyde	L'enzyme immobilisée a une bonne activité sur une plus grande gamme de pH et de température	(Yang <i>et al.</i> , 2006)
Pas précisé	Immobilisation sur support. Enzyme liée directement sur le chitosane	EDAC	Activité résiduelle à 25% après 24h à pH 1 contre 5% pour la laccase libre. Activité résiduelle à 100% contre 50% pour l'enzyme libre après 60h à pH 12	(Vazquez-Duhalt <i>et al.</i> , 2001)
Faible, moyenne et haute masse moléculaire	Immobilisation sur support. Enzyme liée directement sur le chitosane	EDAC	La laccase immobilisée n'était que peu affectée par des changements de phase successifs (15 cycles)	(Delanoy <i>et al.</i> , 2005)
66 kDa	Immobilisation sur support. Enzyme liée directement sur le chitosane	Periodate de sodium	La laccase immobilisé avait 55% de son activité initiale après 1h à 55°C alors que la	(Gupta et Raghava, 2011)

			laccase libre n'avait plus d'activité	
Pas précisé	Immobilisation dans une matrice de chitosane (immobilisation physique)	Acétone	La membrane de chitosane-laccase a pu être utilisée dans 21 cycles consécutifs pour la décoloration d'une encre industrielle	(Katuri <i>et al.</i> , 2009)
308 kDa; 76% déacétylé	Immobilisation sur du chitosane en solution	EDAC	La laccase immobilisée a conservé environ 70% de son activité après 48 h à 40°C et pH4 contre 0% pour la laccase libre	(Cabana <i>et al.</i> , 2010)
750 kDa; 64% déacétylé	Réticulation d'agrégats de laccase par le chitosane	EDAC	La laccase insolubilisée a conservé jusqu'à 118% de son activité après 24h à 30°C et pH 3 contre 21% pour la laccase libre	(Arsenault <i>et al.</i> To be published)

Le chitosane possède en effet plusieurs avantages en ce qui concerne l'immobilisation enzymatique. Comme c'est un polycation, cela facilite l'adsorption des enzymes sur le chitosane (Yang *et al.*, 2006). C'est un biopolymère peu coûteux et abondant et son hydrophilicité facilite sa manipulation pour l'immobilisation d'enzymes hydrosolubles (D'Annibale *et al.*, 1999). Le chitosane est également résistant à la dégradation par des microorganismes ce qui en fait un support de choix pour des enzymes destinées à traiter des milieux contenant une flore microbienne importante comme le sol ou les eaux usées (Yang *et al.*, 2006). Il est également biocompatible et n'est pas considéré comme étant toxique autant

pour l'environnement que pour la santé humaine (Vold et Christensen, 2005). Pour ces raisons, il a été étudié comme agent réticulant dans cette étude afin d'insolubiliser la laccase.



# Chapitre 3

## Avant-propos

### Auteurs et affiliation :

A. Arsenault : Étudiant à la maîtrise, Université de Sherbrooke, département de génie civil.

H. Cabana : professeur, Université de Sherbrooke, département de génie civil.

J. P. Jones : professeur, Université de Sherbrooke, département de génie chimique et génie biotechnologique.

Date de soumission : 15 avril 2011

Accepté au mois de Mai 2011. À être publié sous peu avec légères modifications.

Revue : Enzyme Research

Titre français : CLEAs de laccase : le chitosane comme nouvel agent réticulant

Contribution au document : Cet article contribue au mémoire en présentant les résultats obtenus lors des travaux effectués en laboratoire.

# Laccased-based CLEAs : Chitosan as a novel cross-linking agent

## Résumé

La laccase du champignon de la pourriture blanche du bois *C. Polyzona* a été insolubilisée sous forme d'agrégats d'enzymes réticulés (CLEAs) pour la première fois avec du chitosane comme agent réticulant. Des concentrations se situant entre 0,134 et 1,867 g/L de chitosane ont été utilisées et de 0,05 à 600 mM de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDAC). La laccase a été précipitée en utilisant 550 g/L de sulfate d'ammonium simultanément à la réticulation. L'activité spécifique et la stabilité thermique des biocatalyseurs obtenus ont été mesurées. Des activités jusqu'à 737 U/g ont été obtenues avec le 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) comme substrat. De plus, la stabilité des biocatalyseurs a été améliorée par rapport à la dégradation thermique comparativement à la laccase libre lorsqu'exposés à des conditions de température élevée (40°C) et de pH faible (pH = 3). La stabilité des CLEAs a aussi été testée face à divers dénaturants chimiques mais aucune amélioration significative n'a été détectée. La quantité totale d'ABTS oxydé pendant la dégradation thermique par les CLEAs et la laccase libre a également été calculée et les enzymes insolubilisées ont oxydé davantage de substrat que la laccase libre. Les conditions de formation des CLEAs ont été analysées par une méthodologie de surface de réponse afin de déterminer un environnement optimal pour la production de CLEAs de laccase efficace avec le chitosane comme agent réticulant. Après 24 heures à pH 3 et à 4°C sans agitation, les CLEAs avaient la meilleure activité spécifique.

## Abstract

Laccase from the white-rot fungus *Coriolopsis Polyzona* was insolubilized as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for the first time with chitosan as the cross-linking agent. Concentrations between 0.01 and 1.867 g/L of chitosan were used and between 0.05 and 600 mM of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride. The laccase was

precipitated using 550 g/L of ammonium sulphate and cross-linked simultaneously. Specific activity and thermal stability of these biocatalysts were measured. Activities of up to 737 U/g were obtained when 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was used as a substrate. Moreover, the stability of these biocatalysts was improved with regards to thermal degradation compared to free laccase when exposed to denaturing conditions of high temperature and low pH. The CLEAs stability against chemical denaturants was also tested but no significant improvement was detected. The total amount of ABTS to be oxidized during thermal degradation by CLEAs and free laccase was calculated and the insolubilized enzymes were reported to oxidize more substrate than free laccase. The formation conditions were analyzed by response surface methodology in order to determine an optimal environment for the production of efficient laccase-based CLEAs using chitosan as the cross-linking agent. After 24 hours of formation at pH 3 and at 4°C without agitation, the CLEAs exhibit the better specific activity.

## Introduction

There is growing interest in the use of enzymes in industrial bioprocesses dedicated to bioremediation purposes (Ahuja *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2003). Over the last years, laccases (polyphenoloxidase, EC 1.10.3.2) have gained attention due to their ability to convert a wide range of pollutants present in different environmental matrices (Torres *et al.*, 2003; Giardina *et al.*, 2009; Kunamneni, *et al.*, 2008; Cabana *et al.*, 2007; Wesenberg *et al.*, 2003). Laccases are produced by fungi, higher plants, bacteria and insects. These multicopper oxidases catalyze the oxidation of various phenol-like compounds, aromatic amines and some inorganic compounds. They have received a growing attention due to their intrinsic properties such as relatively low substrate specificity, stability and the simple and inexpensive culture media that could be used to produce them (Elisashvili *et al.*, 2006).

However, two major obstacles hamper the use of laccases in industrial bioprocesses: 1) their sensitivity to various environmental denaturants such as salts, solvents and proteolytic enzymes (Lu *et al.*, 2007) and 2) the difficulty of retaining the enzyme in a continuous flow

bioreactor. These obstacles make the use of laccases a costly alternative to conventional environmental remediation alternatives.

In the interest of enhancing the industrial applicability of laccase, including the improvement of its stability and its repeated utilization, substantial efforts have been made to immobilize this enzyme with or without a solid support (Duran *et al.*, 2002). A well-known strategy to immobilize enzyme is to bind them covalently or through ionic interactions to a solid support or by trapping them in a matrix made of (bio)polymer (Sheldon, 2007). These methods produce stable and reusable biocatalysts but can reduce considerably their specific activity (Cabana *et al.*, 2009). The formation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) can overcome this drawback. Insolubilization of enzyme as CLEAs is a simple technique to produce a biocatalyst with high enzyme activity per unit volume. Since it does not use a support to insolubilize the enzyme, it increases the specific activity of the biocatalyst formed (Sheldon, 2007). An industrial process using CLEAs can make use of them in smaller reactors than the enzymes immobilized on a solid support.

CLEAs of laccase secreted by the white rot fungus (WRF) *Coriolopsis polyzona* have been prepared by Cabana *et al.* (Cabana *et al.*, 2005) using glutaraldehyde (GLU) as the cross-linking agent. These CLEAs have shown high enzyme activity and higher stability than free laccase against physical, chemical and biological denaturants and good kinetics of reaction. These biocatalysts have been successfully used for the continuous treatment of water contaminated by the endocrine disrupting chemicals bisphenol A, nonylphenol and triclosan (Cabana *et al.*, 2009). In addition, Matijošytė *et al.* (Matijošyte *et al.*, 2010) have produced CLEAs with laccases from the WRF *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* and *Agaricus bisporus*. Their laccase CLEAs have also shown higher stability than the free enzymes and have been used in a laccase/mediator system for the successful oxidation of C<sub>5</sub>–C<sub>10</sub> aliphatic alcohols.

The formation of CLEAs requires the use of a cross-linking agent. Generally, GLU is chosen for this purpose due to its low cost, ease of manipulation and its ability to generate covalent bonds with most enzymes (Sheldon, 2007). Even if this chemical is used in several

applications, it presents adverse effects on the aquatic environment and on the health of the workers (Takigawa *et al.*, 2010; Raikow *et al.*, 2007). GLU is suspected of reducing the hatching rate of some aquatic species eggs (Raikow *et al.*, 2007; Emmanuel *et al.*, 2005). It also has many effects on human health: It can provoke asthma, eczema and respiratory tract and skin irritation (Takigawa *et al.*, 2006). The utilization of GLU for the formation of CLEAs dedicated to environmental applications can pose a problem because this cross-linking agent can leach from the biocatalysts to the receiving environment where it can cause adverse effects to the aquatic ecosystems. To overcome this potential issue, an alternative must be found to cross-link the aggregated enzymes destined for environmental processes.

The renewable biopolymer chitosan represents an attractive candidate for the cross-linking of the enzyme aggregates. Chitosan is obtained from the deacetylation of the naturally occurring polymer chitin. The use of this biopolymer is favored by: 1) its high amino group content which favors link formation with enzymes, 2) its good mechanical strength and its resistance to chemical degradation and 3) its biocompatibility and biodegradability (Krajewska, 2004). Furthermore, its production is of low cost and ecologically interesting. The amino groups present on its chain can react with activated carboxylic group present in non-essential amino acid of the enzyme and form amide bonds (Ghanem and Ghaly, 2004). Moreover, one molecule of chitosan can react with more than one carboxylic group and therefore more than one enzyme since it has many amino groups on its chain. This way, laccase aggregates can be covalently attached and permanently insolubilized. The activation of the carboxylic group is done through carbodiimide chemistry. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDAC) is perhaps one of the most popular chemicals used for the binding of an enzyme to chitosan. Some investigations have used this strategy for the conjugation of free laccases to chitosan (Delanoy *et al.*, 2005; Vazquez-Duhalt *et al.*, 2001). However, the objective of this study is to use chitosan and EDAC as a cross-linking complex rather than a binding support.

The first objective of this study was to produce CLEAs of laccase from the WRF *C. polyzona* by using chitosan as the cross-linking agent and characterize them. The second

objective was to determine the effects of the conditions of formation (pH, temperature, reaction time and shaking speed) on the characteristics of the CLEAs produced by this new approach.

## Materials and methods

### Materials

The WRF strain *C. polyzona* (MUCL 38443) was provided by the Belgian Coordinated Collection of Microorganisms (BCCM<sup>TM</sup>/MUCL). Cellulose membranes for dialysis came from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). All other reactants used came from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) and were of analytical grade or the highest grade available.

### Laccase production

The inoculum was grown in a rotary shaker at 150 rpm and 27°C in 250-mL Erlenmeyers containing 100 mL of standard medium: 10 g/L glucose, 2 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.8 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub> •7H<sub>2</sub>O, 2 g/L yeast extract. The medium was adjusted to pH 6.0 with 2 M NaOH prior to autoclaving. After 10 days of cultivation or after reaching a laccase activity over 2 000 U/L in the broth, the biomass was filtered and the supernatant was conserved. Enzymes were precipitated using 600 g/L ammonium sulphate. The resulting solution was then centrifuged at 10000×g for 5 minutes and the supernatant was removed. The precipitation steps were repeated until no laccase activity was detected in the supernatant. The precipitates were solubilized in deionized water. The resulting preparation was dialyzed against distilled water using a regenerated cellulose membrane with a molecular cut-off of 13 kDa and then used as the source of laccase.

### Enzyme assay

Laccase activity was determined by monitoring the oxidation of 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) to its radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) (Bourbonnais and Paice, 1990). The assay mixture contained 0.5mM ABTS. The pH was adjusted to 3 using 60 mM citric acid/di-sodium hydrogen phosphate buffer at room temperature. One unit of activity was defined as the amount of enzyme forming 1 mmol of ABTS<sup>•+</sup> per min.

## Chitosan solution preparation

Chitosan (mean molecular weight of 750 kDa and 64% deacetylated) was solubilized in HCl (0.1 M) solution to a final concentration of 5 g/L. The solution was shaken in a sonification bath during one hour.

## CLEAs production

CLEAs were prepared by simultaneously aggregating and cross-linking the laccases (Cabana *et al.*, 2007). In 10 mL of solution, 550 g/L of ammonium sulphate, 10 units of laccase, chitosan and EDAC were added to a 500 mM phosphate buffer at pH 5. This reaction solution was stored at 4°C for 48 h. These formation conditions were used unless other conditions are cited. Subsequently, the solution was centrifuged at 10000×g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the precipitate was washed with 3 mL of 50 mM acetate buffer at pH 6.5 and centrifuged at 10000×g for 5 minutes. The washing and centrifugation steps were then repeated with deionised water until no laccase activity was detected in the supernatant. The washed precipitate was then suspended in 5 mL of deionised water. The CLEAs samples were identified as follows: CLEA-concentration of chitosan (in g/L)-concentration of EDAC (in mM) (e.g. CLEA-1.0-200 for CLEA prepared with 1,0 g/L of chitosan and 200 mM of EDAC).

## Optimization of concentrations

The impact of chitosan and EDAC concentrations on the performances of CLEAs were tested in two experimental designs. The concentrations used in these experiments are shown in Table 3.1. The center composite design was modified to have positive values of EDAC concentrations.

Table 3.1 Chitosan and EDAC concentrations tested for the optimization of the CLEAs formation at 4°C during 48 hours

Experimental design type	Sample names	Chitosan concentration (g/L)	EDAC concentration (mM)
3 <sup>2</sup>	CLEA-0.2-200	0.2	200
	CLEA-0.2-400	0.2	400
	CLEA-0.2-600	0.2	600
	CLEA-0.6-200	0.6	200
	CLEA-0.6-400	0.6	400
	CLEA-0.6-600	0.6	600
	CLEA-1.0-200	1.0	200
	CLEA-1.0-400	1.0	400

	CLEA-1.0-600	1.0	600
	CLEA-0.5-1	0.5	1
	CLEA-0.5-100	0.5	100
	CLEA-1.5-1	1.5	1
Modified	CLEA-1.5-100	1.5	100
Central	CLEA-1.0-0.05	1.0	0.05
Composite	CLEA-1.0-50.5	1.0	50.5
	CLEA-1.0-136	1.0	136
	CLEA-0.134-50.5	0.134	50.5
	CLEA-1.867-50.5	1.867	50.5

The specific activity, the thermal stability, the half-life under thermal degradation and the total amount of ABTS oxidized by the prepared CLEAs were evaluated. Design-Expert 6.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN) software was used to evaluate the influence of chitosan and EDAC concentrations on these parameters.

### Optimization of CLEAs preparation conditions

The physical conditions of CLEAs formation were also optimized to reach better specific activity and thermal stability. The different conditions tested are shown in Table 3.2. The concentrations of chitosan and EDAC were fixed at 1.87g/L and 50.5mM respectively.

Table 3.2 Conditions tested for the optimization of CLEAs characteristics

Condition	Value
pH	3 and 5
Temperature	4, 20 and 30 °C
Agitation	0 and 150 RPM
Reaction time	8, 16 and 24 hours

Each condition was tested twice for a total of 72 samples. The specific activity and thermal stability of each sample were measured twice each and an analysis of variance was conducted on the results with the Stat-Ease software Design-Expert 6.0 (Minneapolis, MN).

### CLEAs and free laccase thermal stability

The thermal stability was determined by monitoring free laccase and CLEAs activity through time when exposed to a temperature of 40°C and a pH of 3. CLEAs or laccase solutions (400 µL) were incubated in 400 µL of 50mM citric acid/sodium phosphate buffer.



Activity was measured twice and at different moments during the degradation. The inactivation of free laccase and CLEAs was modeled using the 3-parameter phenomenological model proposed by Aymard and Belarbi (Aymard and Belarbi, 2000). This biexponential model is expressed by Eq. (3.1)

$$\frac{(A)_t}{(A)_0} = C * e^{-\alpha t} + (1 - C) * e^{-\beta t} \quad (3.1)$$

The ratio  $\frac{(A)_t}{(A)_0}$  represents the enzyme activity remaining after a time  $t$  ( $A_t$ ) compared to initial activity ( $A_0$ ). The physical meaning of the parameters and their expressions as a function of individual rate constants differs according to the mechanism considered. This expression can be used irrespective of the thermal inactivation mechanism involved (Aymard and Belarbi, 2000). The values of the different parameters of this model ( $C$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ ) were obtained by curve-fitting of the plot of the residual enzyme activity *versus* time using the Sigma Plot 7.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

### Total amount of ABTS oxidized under denaturing conditions

To consider both the initial activity of the biocatalysts formed and their thermal stability, the total amount of ABTS oxidized by the different biocatalysts under the thermal denaturing conditions was calculated. To do so, the Aymard-Belarbi model was integrated to determine the theoretical total amount of ABTS oxidized under thermal degradation (see Eq. (3.2)).

$$Q_t = (A)_0 * \int (C * e^{-\alpha t} + (1 - C) * e^{-\beta t}) dt \quad (3.2)$$

The amount of ABTS oxidized ( $Q_t$  (mmol)) was calculated on a 24-hour interval using the parameters  $C$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  obtained from the thermal degradation tests (see Section 3.7) and the initial activity of the biocatalyst ( $A_0$ ).

## Enzyme kinetics

Michaelis-Menten parameters of CLEAs and free laccase were determined using ABTS as a substrate at various concentrations (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 and 2.0 mM). The activity with each substrate concentration was determined three times. The parameter values were obtained by curve fitting the plot of reaction rate versus substrate concentrations using the Sigma Plot 7.0 software.

## CLEAs and free laccase stability to chemicals denaturants

The CLEAs and free laccase were also exposed to chemicals to determine their stability against denaturing environments. Solutions of  $\text{CaCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (10  $\mu\text{M}$ ),  $\text{NaN}_3$  (30  $\mu\text{M}$ ), acetone (25% (v/v)) and methanol (25% (v/v)) were prepared separately by dissolving the powders or diluting the solvents in a 50 mM citric acid/phosphate buffer at pH3. CLEAs and free laccase triplicates (100  $\mu\text{L}$  each) were exposed to each of these chemicals (400  $\mu\text{L}$ ) separately for 4 hours.

The stability of CLEAs and free laccase have also been tested after an exposition of 24 hours to an effluent of a wastewater treatment plant (WWTP). The effluent was taken from the Mont St-Grégoire (Québec, Canada) WWTP. As for the stability against chemical denaturants test, 100  $\mu\text{L}$  of CLEAs or free laccase solution was mixed with 400  $\mu\text{L}$  of denaturing medium. The methods used to characterize the wastewater samples were: ICP-MS for total phosphorus content (APHA 2005), infrared spectroscopy for COD (APHA 2005), gravimetric for suspended particles (APHA 2005), spectrophotometry for nitrogen- $\text{NH}_3$  (APHA 2005), HPLC for nitrites and nitrates (APHA 2005) and hexane extraction and gravimetric method for oils and grease (APHA 2005).

## Scanning electron microscopy of CLEAs

Scanning electron micrographs (SEMs) of CLEAs were obtained on Hitachi S-4700 FESEM and S-3000N VPSEM (Tokyo, Japan) electron microscopes. The samples were previously dried at ambient temperature and then coated with platinum using an Emitech K550 (Ashford, UK) sputter coater.

## Particle size of CLEAs

The size of the CLEAs was measured by photon correlation spectroscopy (PCS) with a ZetaPlus zeta potential analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, USA). CLEAs suspension was diluted in a 1:1 ratio with deionised water in 2 mL cuvettes at 20°C. Each CLEAs particle size was measured twice.

## Results

### Preliminary screening

Table 3.3 shows the specific activities, the thermal stability, the half-life under thermal degradation and the total amount of ABTS oxidized by CLEAs and free laccase. The specific activity of the CLEAs prepared was between 16 and 737 U/g while the free laccase used had a specific activity of 284 U/g.

Table 3.3 Specific activity, thermal stability and total amount of ABTS oxidized by all the prepared samples

Sample	Specific activity* (U/g)	Thermal stability* <sup>a</sup> (%)	Aymard-Belarbi parameters			Half-life (h)	Amount of ABTS oxidized in 24 h under denaturing conditions (mmol/U)
			C	alpha	beta		
CLEA-0.2-200	298 ± 44	7.9 ± 1.2	0,71	0,15	1,78	2.36	0.305
CLEA-0.2-400	65.3 ± 1.9	13.5 ± 0.4	0,12	-0,01	0,19	5.79	0.135
CLEA-0.2-600	42.9 ± 3.5	17.7 ± 1.4	0,38	0,04	0,77	2.79	0.101
CLEA-0.6-200	18.6 ± 3.5	81.5 ± 15.3	0,79	0,006	183166	44.2	0.178
CLEA-0.6-400	103 ± 21	31.4 ± 6.4	0,74	0,025	49,72	0.84	0.094
CLEA-0.6-600	133 ± 29	34.4 ± 7.5	1,04	0,04	7,65	18.7	0.172
CLEA-1.0-200	77.1 ± 0.3	47.6 ± 0.2	19,3	0,34	0,34	20.8	0.159
CLEA-1.0-400	14.7 ± 3.2	68.6 ± 14.9	1,32	0,13	0,125	62.3	0.301
CLEA-1.0-600	24.4 ± 0.2	22.3 ± 0.2	0,76	0,027	41,2	16.5	0.123
CLEA-0.5-1	35.6 ± 4.1	13.6 ± 7.9	0,32	0,03	1,27	1.51	0.379
CLEA-0.5-100	156 ± 6	38.5 ± 4.6	0,76	0,026	56,8	5.84	0.334
CLEA-1.5-1	69 ± 14	82.9 ± 17.3	0,80	0,006	34,8	7.00	0.259
CLEA-1.5-100	39.5 ± 1.9	118.5 ± 1.8	1,58	0,03	0,03	78.48	1.103
CLEA1.0-0.05	21.2 ± 6.6	85.5 ± 28.6	13,4	0,025	0,025	2.77	ND
CLEA-1.0-50.5	78.8 ± 9.9	60.0 ± 4.8	0,51	0,027	15048	7.54	0.565
CLEA-1.0-136	737 ± 24	68.8 ± 2.7	0,465	0,024	2,62	1.29	0.539
CLEA-0.134-50.5	186 ± 10	37.2 ± 3.2	0,413	0,005	0,117	11.9	ND
CLEA-1.867-50.5	16.0 ± 2.9	91.8 ± 2.5	1,58	0,0264	0,0259	81.1	1.094
Free laccase	284 ± 33	21.3 ± 2.5	0,433	0,0189	0,0997	19.7	0.787

\* The values represent means of duplicate experiments for the specific activity and thermal stability ± standard deviation.<sup>a</sup> Residual activity after 24 hours at 40°C and pH 3

ND: Not determined

Free laccase has a half-life of 19 hours while CLEA-1.867-50.5 and CLEA-1.5-100 have half-life of 81 and 78 hours respectively. CLEA-0.5-1, CLEA1.0-136 and CLEA-0.6-400 all have a half-life under 2 hours. These half-lives were calculated by using the kinetic of thermal degradation model proposed by Aymard and Belarbi (Aymard and Belarbi, 2000).

In order to have a good basis to compare biocatalysts with different initial activities and stability, the total amount of ABTS theoretically oxidized during the thermal denaturation of the biocatalysts for 24 hours was calculated. After a 24-hour period of thermal denaturation, CLEA-1.5-100 and CLEA-1.867-50.5 both oxidized more ABTS than free laccase. CLEA-1.5-100 and CLEA-1.867-50.5 respectively oxidize 1.103 mmol/U and 1.094 mmol/U of ABTS while free laccase oxidizes only 0.787 mmol/U. CLEA-1.0-136 and CLEA-1.0-50.5 have catalyzed a number of reactions comparable to those catalyzed by free laccase after 24 hours (respectively 0.539 and 0.565 mmol/U).

From this point, only the four samples that oxidized the highest amount of ABTS in 24h have been used to characterize the CLEAs. These samples are CLEA-1.0-136, CLEA-1.5-100, CLEA-1.867-50.5 and CLEA-1.0-50.5. They were the most promising samples for the preparation of efficient and stable biocatalysts dedicated to bioremediation purposes.

## Optimization of CLEAs preparation conditions

Table 3.4 presents the results of the analysis of variance (ANOVA) performed on the results of specific activity for each of the prepared samples.

**Table 3.4 Results of the analysis of variance (ANOVA) performed on the specific activities (U/g) of the CLEA-1.867-50.5**

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F Value	p-value
Model	101.15	8	12.64	5.04	< 0.0001
Agitation (RPM)	5.21	1	5.21	2.07	0.1547
Temperature (°C)	27.36	2	13.68	5.45	0.0066
pH	7.09	1	7.09	2.82	0.0978
Reaction time (h)	36.98	2	18.49	7.37	0.0013
Interaction					
Agitation/Reaction time	24.01	2	12.00	4.78	0.0116
Residues	158.07	63	2.51		
<i>Lack of Fit</i>	86.03	27	3.19	1.59	0.0955
Pure error	72.03	36	2.00		
Total	259.22	71			

The ANOVA performed shows a significant effect of the temperature ( $p = 0,0066$ ) and reaction time ( $p = 0,0013$ ) on the specific activity of the CLEAs. The Figures 3.1A and 3.1B show how these parameters influence the specific activity of the CLEAs while Figure 3.1C illustrates the interaction between the agitation and reaction time.

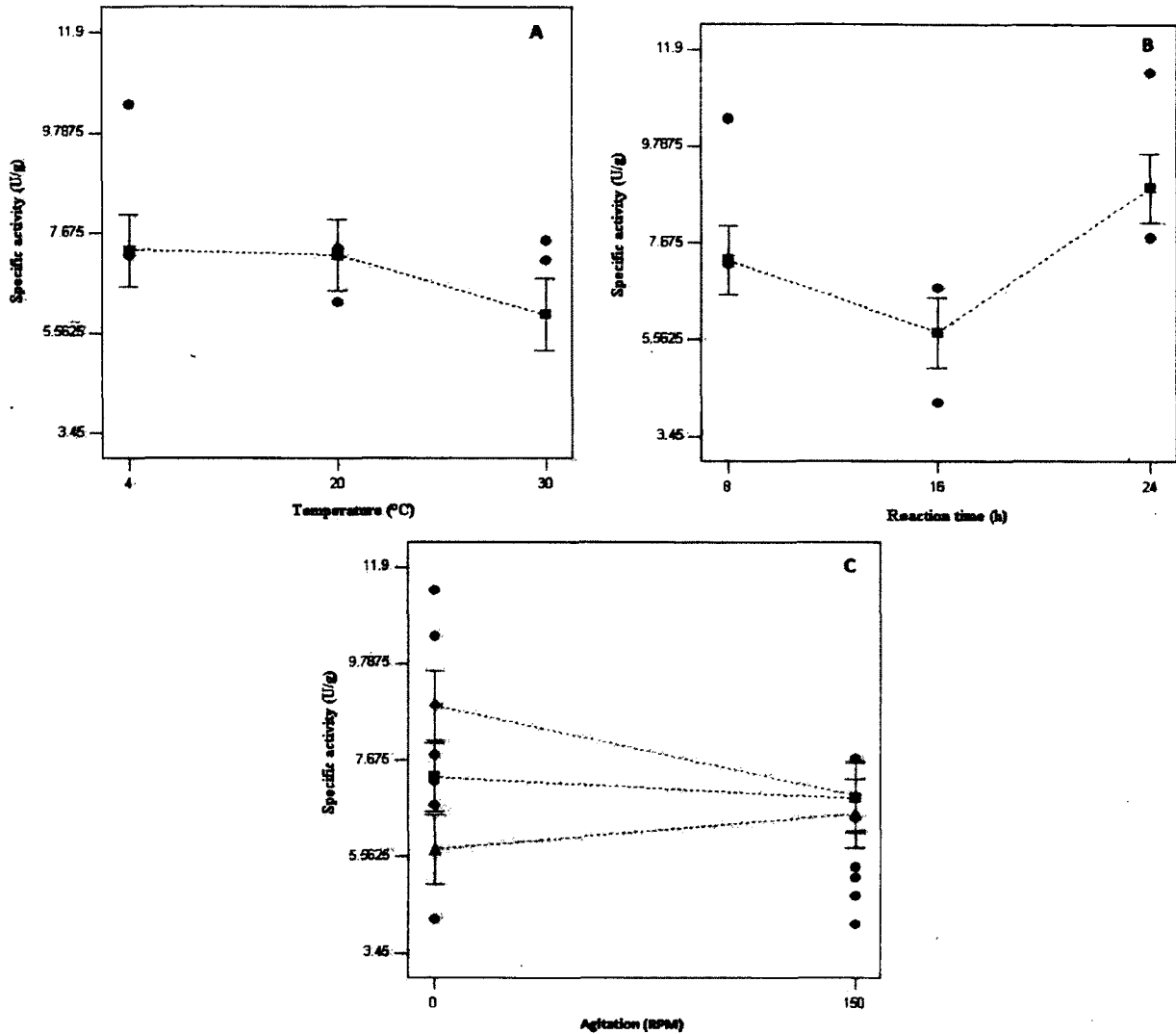


Figure 3.1 Influence of the temperature (A), the reaction time (B) and the interaction between agitation and reaction time (C) on the specific activity of the CLEA-1.867-50.5. On graph A and B : Model points (■) and Experimental points (●). On graph C: Reaction time of 8 hours (■), 16 hours (▲) and 24 hours (◆).

The specific activity of CLEAs prepared at 30°C is lower than those prepared at 20°C and 4°C. The longer the cross-linking reaction, the more active the CLEAs should be. The reaction has to last more than 16 hours though according to Figure 3.1B. A regression has to be performed on the results to confirm the model obtained in this ANOVA.

## Michaelis-Menten Kinetic Parameters

Table 3.5 shows the enzyme kinetic parameters for the oxidation of ABTS by CLEAs and free laccase. They all follow Michaelis-Menten kinetics according to the correlation factor obtained by the curve-fitting analysis (Annexe 1).

Table 3.5. Michaelis-Menten kinetic constants of laccase CLEAs for the oxidation of ABTS<sup>a</sup>

Sample	K <sub>m</sub> (mM)	K <sub>cat</sub> (μmol/s/mg)	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (L•mg/s)
CLEA-1.0-136	0,083 ± 0,015	30,760 ± 0,900	0,369
CLEA-1.5-100	0,156 ± 0,026	2,524 ± 0,091	0,016
CLEA-1.867-50.5	0,259 ± 0,044	0,986 ± 0,046	0,004
CLEA-1.0-50.5	0,101 ± 0,027	5,295 ± 0,250	0,053
Free laccase	0,082 ± 0,010	2,694 ± 0,060	0,033

<sup>a</sup> Results are mean of triplicate measures ± standard deviation

CLEA-1.0-136 and CLEA-1.0-50.5 have a comparable affinity for ABTS to free laccase according to the Michaelis-Menten constant (K<sub>m</sub>). Free laccase has a K<sub>m</sub> of 0.082 mM and CLEA-1.0-136 and CLEA-1.0-50.5 K<sub>m</sub> are respectively 0.083 and 0.101 mM. The same CLEAs have a higher maximum rate of ABTS transformation than free laccase. CLEA-1.0-136 and CLEA-1.0-50.5 have k<sub>cat</sub> of 30.760 and 5.295 μmol/s/mg respectively while free laccase has a k<sub>cat</sub> of 2.694 μmol/s/mg. The biocatalytic efficiencies (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) of CLEAs are equivalent to free laccase except for CLEA-1.0-136 that has a k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> 10 times higher than free laccase.

## Stability against chemical denaturants

Figure 3.2 shows the resistance to chemical degradation of free laccase and CLEAs to various chemical denaturants.



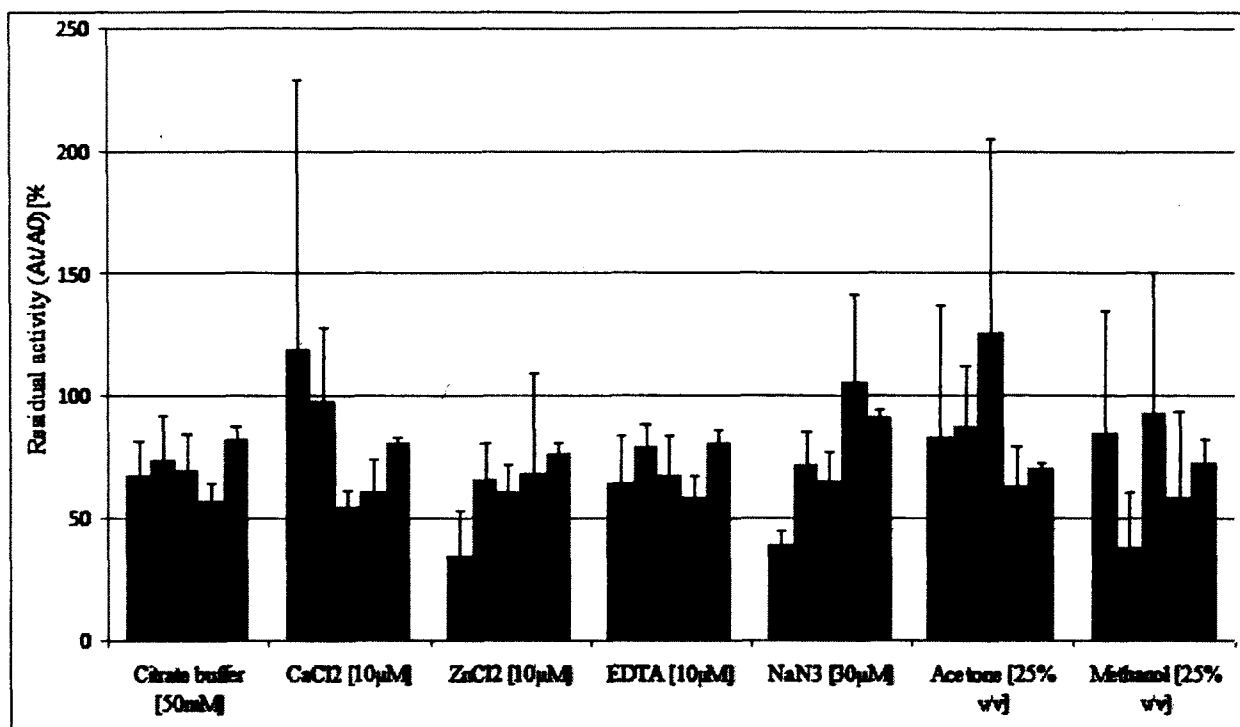


Figure 3.2. Residual activity of free laccase and CLEAs after 4 hours of incubation with various chemical denaturants at a pH of 3 and 20°C. From left to right: CLEA-1.0-136 (■), CLEA-1.5-100 (■), CLEA-1.867-50.5 (■), CLEA-1.0-50.5 (■) and free laccase (■) Values represent means of triplicate results ± standard deviation.

No significant differences were observed....The resistance of CLEAs and free laccase to the chemical denaturants was similar except for the sodium azide and the organic solvents.

When exposed to sodium azide, the residual activity of CLEAs is slightly lower than free laccase but not significantly except for CLEA-1.0-136 which residual activity is significantly lower than free laccase. For the acetone, all CLEAs had a higher residual activity than free laccase except CLEA-1.867-50.5. And for the methanol, only CLEA-1.5-100 and CLEA-1.867-50.5 lost more apparent activity than free laccase and the other CLEAs. However, no clear conclusion can come out of these results since the error bars are too large.

### Stability against wastewater effluent

To confirm the usability of our biocatalysts in a wastewater treatment bioprocess, the stability of CLEAs and free laccase has been determined by exposing the biocatalysts to a sample of WWTP effluent for which the characteristics are shown in Table 3.6.

Table 3.6. Characteristics of the effluent taken at the Mont St-Grégoire WWTP after the settling basin.

Type of contaminant	Concentration
Total phosphorus (mg/L)	1.8
Dissolved COD (mg/L)	36
Particles in suspension (mg/L)*	820
Nitrogen-NH <sub>3</sub> (mg-N/L)	0.61
Nitrites (mg-N-NO <sub>2</sub> /L)	2.53
Nitrates (mg-N-NO <sub>3</sub> /L)	8.12
Oils and greases (mg/L)	24.1

\* Before using this sample, it has been filtrated through a 0.02  $\mu\text{m}$  so we assume there are no particles in suspension left.

The residual activities of free laccase and CLEAs after a 24-hour exposure to this wastewater effluent are shown in Figure 3.3.

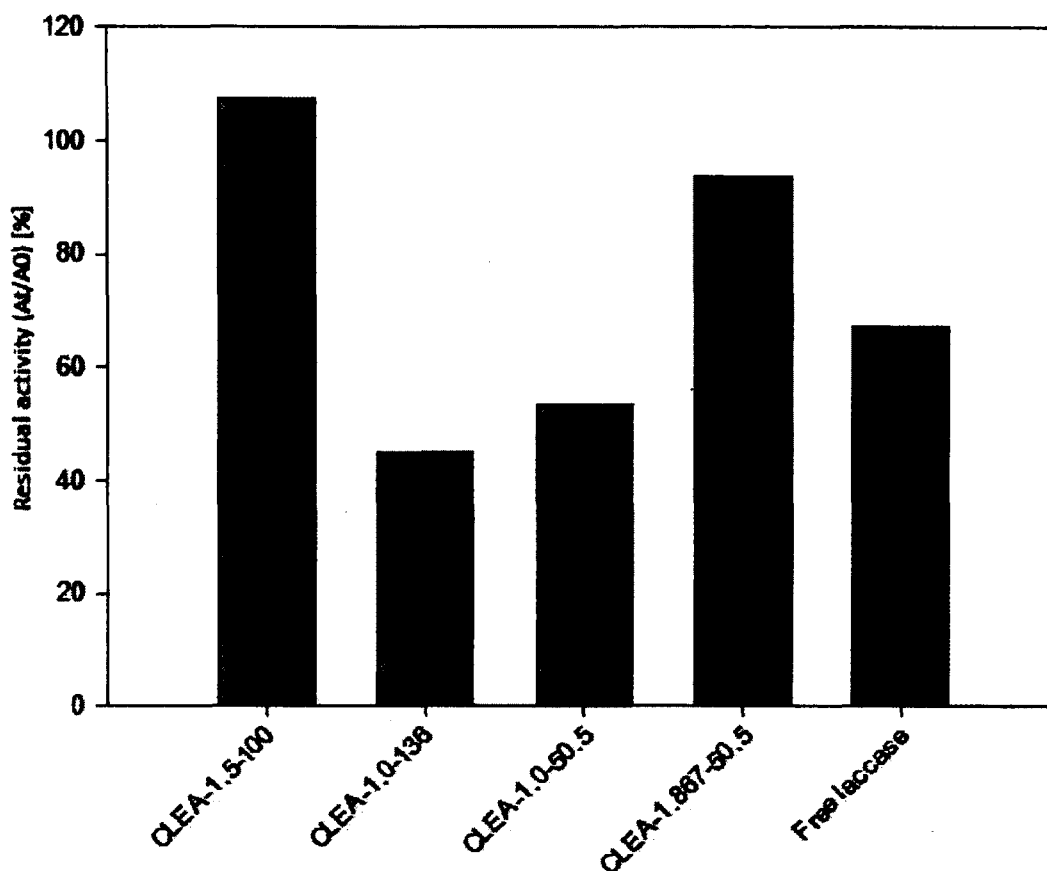


Figure 3.3. Residual activity of free laccase and CLEAs after 24 hours of incubation in a wastewater effluent collected from the WWTP of Mont St-Grégoire (Qc, Canada).

Free laccase seems to be quite resistant to the wastewater effluent chosen (67.2% residual activity) but CLEA-1.5-100 and CLEA-1.867-50.5 have a residual activity of 107.5% and 93.8% respectively. The other two samples are less stable to wastewater effluent than free laccase by 14% for CLEA-1.0-50.5 and 22 % for CLEA-1.0-136. However more tests have to be done in order to evaluate statistical significance of these results.

## SEMs

Figure 3.4 shows the SEMs of chitosan (Figure 3.4A) and CLEA-1.0-50.5 (Figure 3.4B). The chitosan is more than 50  $\mu\text{m}$  long according to Figure 3.4A while the laccase-based CLEA is approximately 10  $\mu\text{m}$  long (Figure 3.4B).

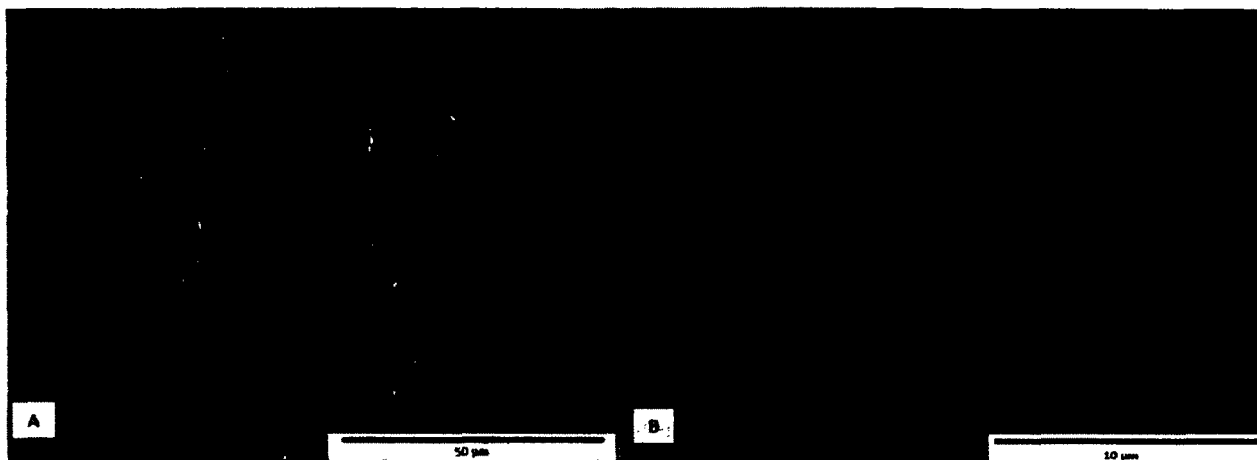


Figure 3.4. SEMs of A) chitosan and B) CLEA-1.0-50.5.

The laccase aggregates seem to be attached to the chitosan backbone. The structure of the CLEA appears to be amorphous and relaxed rather than compact and uniform.

## Particle size

The size of the CLEAs produced has been determined by PCS and the results are presented in Table 3.7.

Table 3.7. Particle sizes of CLEAs as determined by PCS.

	CLEA-1.5-100	CLEA-1.0-136	CLEA-1.867-50.5	CLEA-1.0-50.5
Average (nm)	1694.3	1716.5	2313.7	2308.6
Standard deviation (nm)	900.9	835.9	1171.6	860.3

The CLEA-1.5-100 and CLEA-1.0-136 are approximately 35% smaller than CLEAs-1.867-50.5 and CLEA-1.0-50.5. The standard deviation is between 800 and 1200 nm.

## Discussion

It is important to determine good reaction conditions to produce efficient biocatalysts due to the possible denaturation of the enzyme or mass transfer limitations associated with the

cross-linking agent (APHA *et al.*, 2005). The activator EDAC is known to react with carboxylic acids, like aspartic acid or glutamic acid found in laccase, to form O-acylisourea intermediates. These active intermediates can then react with a nucleophilic species such as a primary amine to form an amide bond (Zhang *et al.*, 2009). In the present case, the primary amine is found in chitosan but also in the amino acid lysine present in laccase. A high concentration of the activator can reduce CLEAs activity according to the specific activities of CLEAs prepared with 200 mM or more of EDAC. Bindhu et Abraham (Bindhu and Abraham, 2003) observed the same phenomenon when immobilizing horseradish peroxidase on chitosan. It is probably caused by the non-specific activation of carboxyl groups provoking a perturbation in the tridimensional structure of the enzyme. Activity reduction is also observed when the amount of chitosan used is higher than 1.0 g/L. The dilution of laccase concentration by chitosan or a steric hindrance phenomena caused by the addition of the biopolymer can explain the loss of specific activity. The tridimensional structure of the CLEAs could also limit the diffusion of the substrate to the catalytic site therefore reducing the specific activity (Bindhu and Abraham, 2003). The specific activities of chitosan-based CLEAs obtained are lower than the specific activity of free laccase except for CLEA-1.0-136 and CLEA-0.2-200. D'Annibale *et al.* (D'Annibale *et al.*, 1999) used chitosan to immobilize laccase with GLU and the biocatalysts retained 45% of the initial activity (specific activity of immobilized enzyme divided by the specific activity of free enzyme). Zhang *et al.* (APHA *et al.*, 2005) produced laccase-chitosan biocatalysts that retained 52.2% of initial activity. The laccase-chitosan CLEAs retained up to 259% of initial specific activity. Considering that chitosan can account for an important mass in the biocatalyst, the retention of activity of 259% can indicate an hyperactivation of laccase when attached to chitosan (Cabana *et al.*, 2010). Laccase attached to chitosan by Cabana *et al.* (Cabana *et al.*, 2010) also exhibited an hyperactivation of 265%.

An important factor to consider for specific activity optimization is the temperature of the formation of the CLEAs. The CLEAs prepared at 4°C had the highest activity, comparable to those prepared at 20°C. The CLEAs formed at 30°C however are less active. It is probably because the laccase was thermally degraded therefore yielding less active CLEAs. The optimal reaction time seems to be at 24 hours, but longer times have not yet been tested. Higher specific activity could be obtained for longer reaction time. The agitation seems to reduce the

influence of reaction time. The CLEAs prepared under agitation at 150 RPM have a comparable specific activity for all the reaction times tested.

The thermal stability of CLEAs was significantly higher than the stability of free laccase. It can be explained by the formation of chemical bonds between chitosan and laccase. Bonds can also be formed between different molecules of laccase and inside the same enzyme. These decrease the mobility of the enzyme, therefore providing a greater resistance to thermal degradation, often caused by drastic conformational change (Lu *et al.*, 2007; Couto and Toca, 2006). It can also be explained by the presence of chitosan which may somehow coat the enzyme. CLEAs prepared with GLU by Cabana *et al.* (Cabana *et al.*, 2005) had a residual activity between 20% and 40% after a 24-hour period under the same denaturing conditions.

The kinetics of thermal degradation of free laccase are accelerated and these soluble enzymes present almost no activity after 24 hours of incubation under denaturing conditions while the CLEAs stayed active for a longer period of time. The experiment was run over 48 hours and CLEAs were still active after two days of thermal degradation while laccase lost almost all its activity within the first 24 hours. The same tendency was observed by Cabana *et al.* (Cabana *et al.*, 2005) but the CLEAs prepared in that previous study were degraded faster than the chitosan-based CLEAs.

To our knowledge, no studies have determined the amount of substrate theoretically oxidized by laccase under thermal degradation. By using this approach, the thermal stability and the initial specific activity are integrated into one parameter describing the global performance of a biocatalyst. The model proposed by Aymard and Belarbi (Aymard and Belarbi, 2000) is ideal for it describes well the kinetics of thermal degradation of our CLEAs. This model was integrated to obtain the total amount of substrate a laccase can oxidize when exposed to the denaturing conditions tested. It appears that for each unit of laccase activity, the CLEAs can oxidize more molecules of ABTS than free laccase after 24 hours. The fast decay of free laccase activity can explain these results. The amount of substrate oxidized by the CLEAs prepared by Cabana *et al.* (Cabana *et al.*, 2005) with GLU was calculated on a 24-hour period and compared the chitosan-based CLEAs. The CLEAs made without a co-protein

oxidized 0.642 mmol/U of ABTS while the CLEAs with 0.01, 0.1 and 1 mg/U of bovine serum albumin oxidized respectively 0.738, 0.792 and 0.954 mmol/U of ABTS. CLEA-1.867-50.5 and CLEA-1.5-100 oxidized more substrate (respectively 1.094 and 1.103 mmol/U of ABTS) while CLEA-1.0-136 and CLEA-1.0-50.5 oxidized less substrate than all the CLEAs from Cabana *et al* (Cabana *et al.*, 2007).

The kinetic study, based on the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ), shows that the different CLEAs have almost the same affinity for the substrate (ABTS). However, the CLEAs are better biocatalysts when the turnover number is used for comparison ( $k_{cat}$ ) and free laccase is better when it's the biocatalytic efficiency that is the base of the comparison ( $k_{cat}/K_m$ ). In terms of kinetic properties, CLEA-1.867-50.5 is not as good as the others. CLEAs prepared with GLU in Cabana's group proved to have a turnover number 6 times higher than free laccase (Cabana *et al.*, 2005) but CLEA-1.0-136 has a  $k_{cat}$  15 times higher than the free laccase. This can be explained by the hyperactivation of laccase when in contact with chitosan (Cabana *et al.*, 2010).

The stability of CLEAs and free laccase has been measured in solutions containing various chemicals known to denature enzymes. These chemicals inhibit or denature laccase in various ways. The chloride salts are known to inhibit laccase activity by raising the ionic strength of the solution (Couto and Toca, 2006). The solvents lower the strength of hydrophobic interactions so the equilibrium is shifted to the denaturated state (Couto and Toca, 2006). Sodium azide binds to the active site of laccase and modifies its structure (Battistuzzi *et al.*, 2003) and EDTA is a chelator that can take out the copper ions present in the catalytic site of the laccase (Ghorbel *et al.*, 2003). The amorphous structure of CLEAs reduces the mass transfer of EDTA to the catalytic site of the enzymes (Cabana *et al.*, 2005). The CLEAs structure does not limit the diffusion of smaller molecules like chloride ions or sodium azide to the catalytic site but their rigidity reduces their denaturation by hydrophobic interactions. Therefore, the stability of CLEAs is not significantly higher than free laccase when exposed to salts or chelators but seems slightly increased towards solvents. However, further tests are needed to confirm this affirmation.

Little research has been done to determine the stability of laccase in a real wastewater effluent. Auriol *et al.* (Auriol *et al.*, 2007; Auriol *et al.*, 2008) used real wastewater effluents to test the capacity of commercial laccase from the WRF *T. versicolor* to transform the endocrine disrupting chemicals estrone, estriol and estradiol, but the stability of the enzyme was not evaluated. Laccase can be used in wastewater effluents to eliminate phenolic compounds and it is important to have a good stability in this complex medium. These results show that some CLEAs had a higher stability than free laccase probably because the denaturants present in the effluent cannot get to the catalytic site of the CLEAs due to their amorphous structure. The rigidity of the CLEAs is another factor in the enhancement of stability towards organic solvents. Since free laccase and CLEAs proved to be quite stable in a wastewater effluent, they are good candidate to eliminate phenolic compounds.

According to Schoevaart *et al.* (Schoevaart *et al.*, 2004), CLEAs can be separated in two types based on their structure. Type 1 aggregate has a uniform structure and has a diameter around 1  $\mu\text{m}$ . Type 2 aggregates are usually smaller with a diameter around 0.1  $\mu\text{m}$ . According to this classification, chitosan based-CLEAs have a structure similar to type 1 CLEAs. The results obtained concerning the particle size determine by PCS of the CLEAs confirms our observations with the SEM. The particles have a diameter of about 1700 - 2300 nm. An interesting fact is that the CLEAs prepared with more EDAC are smaller. This could be explained by a more important cross-linking level of the CLEAs formed. The small CLEAs have a higher surface/volume ratio that helps diffusion to the catalytic site of laccase and therefore make them more active than the larger CLEAs (Table 6).

## Conclusion

The results presented in this study demonstrate a novel method for making CLEAs with laccase by using chitosan as the cross-linking agent. The CLEAs formed are stable, active biocatalysts which are suitable for use in environmental and industrial bioprocesses. The method used should be applicable to many other enzymes although this was not demonstrated



in this study. Chitosan used here for the first time as the cross-linking agent used to form CLEAs has considerable advantages from environmental and worker safety points of view over chemicals traditionally used. Because chitosan is obtained from aquatic organisms by-products, its use is in good conformity with sustainable development. Its abundance and renewable nature makes it an attractive candidate for the production of insolubilized enzyme, while its biocompatibility makes it an environmentally harmless reactant that does not put the health of the workers at risk.

## Acknowledgements

This project was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The authors are also thankful to Serge Bérubé, Maxime Sirois-Gosselin and Catherine Beauregard-Paultre for their technical support.

**Abbreviations:** CLEAs: Cross-linked enzyme aggregates; WRF: white-rot fungus; GLU: Glutaraldehyde; EDAC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride; ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid); SEMs: Scanning electron micrographs; PCS; Photon correlation spectroscopy;

**Keywords:** Laccase, cross-linked enzyme aggregates, chitosan, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide), stabilization, *Coriolopsis polyzona*, Michaelis-Menten kinetic parameters, particle sizes.

# Chapitre 4

## Discussion

Cette étude démontre la capacité du chitosane à réticuler des agrégats de laccase et ainsi former des CLEAs performantes. Ces CLEAs sont plus stables face à la dégradation thermique que l'enzyme libre, et dans certaines conditions, elles peuvent être plus actives. Leur stabilité face à un effluent de station d'épuration des eaux usées est comparable à la laccase libre. Leur taille leur confère également un avantage notable sur la laccase libre : elles peuvent être séquestrées dans un bioréacteur et donc être réutilisées.

Les paramètres influençant l'activité spécifique de ces CLEAs sont 1) les concentrations de chitosane et d'EDAC, 2) la température à laquelle les CLEAs sont formées et 3) le temps de réaction entre les agrégats de laccase et le chitosane/EDAC. Il est important de noter également l'interaction entre l'agitation et le temps de réaction, mis en évidence par l'analyse de variance, sur l'activité spécifique des CLEAs.

Le chitosane est donc une option envisageable pour remplacer le GLU dans la préparation de biocatalyseurs. La démonstration a été faite pour la laccase mais il est presque certain que ça fonctionne également avec d'autres enzymes. D'autres enzymes pouvant servir dans des procédés de bioremédiation pourraient être immobilisées avec le système chitosane/EDAC pour former des biocatalyseurs entièrement biodégradables et presque sans risque pour l'environnement.

Les paramètres cinétiques des CLEAs avec l'ABTS comme substrat laissent deviner qu'une configuration spéciale de bioréacteur serait requise pour le traitement de polluants présents à de très faibles concentrations (ng/L). Un polluant comme le BPA pour lequel la laccase a un  $K_m$  de 10000  $\mu\text{M}$  serait difficile à éliminer s'il est présent à des concentrations de l'ordre du ng/L (Cabana *et al.*, 2007). Un réacteur à membrane permettrait donc à la fois de séquestrer les CLEAs et de concentrer les contaminants à l'interface membrane/solutions aqueuse et ainsi les dégrader plus efficacement.

## Travaux futurs

Plusieurs améliorations sont encore possibles pour préparer des CLEAs plus performantes, plus stables et moins coûteuses. D'abord, l'optimisation des conditions de formation n'est pas terminée, seulement certaines tendances sont observées mais aucun optimum n'a été détecté. Le protocole utilisé peut également être modifié pour améliorer l'activité ou la stabilité des CLEAs. Par exemple, l'utilisation du benzoate pendant l'insolubilisation de la laccase permet de protéger le site actif et d'ainsi prévenir son inactivation (Hublik et Schinner, 2000). Il est aussi possible d'utiliser une co-protéine comme l'albumine bovine ou un polymère aminé comme le polyéthylèneamine lors de l'agrégation pour aider à la stabilité de la laccase (Cabana *et al.*, 2007). L'utilisation d'un autre activateur que l'EDAC serait avantageux puisque ce dernier est très coûteux (environ 150\$ pour 5 g, Sigma-Aldrich). L'utilisation d'un agent réducteur comme l'acide cyanoborohydrique peut aussi aider à stabiliser les liens formés lors de la réticulation (Hermanson, 1996). Également, en utilisant une laccase ayant un pH optimal plus près de la neutralité, les possibilités d'utilisation seraient grandement améliorées.

Il serait aussi intéressant de tester l'utilisation des CLEAs de laccase-chitosane dans un bioréacteur pour tester leur résistance à des utilisations répétées et également s'il est aisé de les séquestrer.

## Références

- Ahn, M. Y., Dec, J., Kim, J. E. et Bollag, J. M. (2002). Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J. Environ. Qual.*, volume 31, numéro 5, p. 1509-1515.
- Ahuja, S. K., Ferreira, G. M. et Moreira, A. R. (2004). Utilization of enzymes for environmental applications. *Critical reviews in biotechnology*, volume 24, numéro 2-3, p. 125-154.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), Standard Methods for examination of water and wastewater, Eds: Greenberg, A.E. Clesceri, L.S. Eaton, A.D Baltimore, Maryland, 1382p (2005)
- Arroyo, M., Sanchez-Montero, J. M. et Sinisterra, J. V. (1999). Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and microbial technology*, volume 24, numéro 1-2, p. 3-12.
- Artyukhov, V. G., Putintseva, O. V. et Savostin, V. S. (2006). Influence of rheopolyglucin and dextran dialdehyde on physicochemical properties and thermostability of human hemoglobin. *Biophysics*, volume 51, numéro 3, p. 376-384.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C. D., Tyagi, R. D., Nogueroles, T. N. et Pina, B. (2008). Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, volume 70, p. 445-452.
- Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, G. D. O. C., Fernandez-Lafuente, R. et Guisan, J. M. (2006). Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, volume 39, numéro 4, p. 877-882.
- Betancor, L., Hidalgo, A., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R. et Guisan, J. M. (2003). Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and postimmobilization techniques. *Biotechnology progress*, volume 19, numéro 3, p. 763-767.
- Bhatia, S. K., Arthur, S. D., Chenault, H. K., Figuly, G. D. et Kodokian, G. K. (2007). Polysaccharide-based tissue adhesives for sealing corneal incisions. *Current eye research*, volume 32, numéro 12, p. 1045-1050.
- Bhatia, S. K., Arthur, S. D., Chenault, H. et Kodokian, G. K. (2007). Interactions of polysaccharide-based tissue adhesives with clinically relevant fibroblast and macrophage cell lines. *Biotechnology Letters*, volume 29, numéro 11, p. 1645-1649.

- Bindhu, L. V. et Abraham, E. T. (2003). Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan for use in nonaqueous media. *Journal of Applied Polymer Science*, volume 88, numéro 6, p. 1456-1464.
- Bourbonnais, R., Leech, D. et Paice, M. G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, volume 1379, numéro 3, p. 381-390.
- Brouwers, O., Niessen, P. M., Ferreira, I., Miyata, T., Scheffer, P. G., Teerlink, T., Schrauwen, P., Brownlee, M., Stehouwer, C. D. et Schalkwijk, C. G. (2011). Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats. *Journal of Biological Chemistry*, volume 286, numéro 2, p. 1374-1380.
- Brusca, R. C. et Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*, 2 édition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 922 p.
- Butler, M. F., Ng, Y. et Pudney, P. D. A. (2003). Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, volume 41, numéro 24, p. 3941-3953.
- Cabana, H. (2008). *Élimination des perturbateurs endocriniens nonylphénol, bisphénol A et triclosan par l'action oxydative de la laccase de Coriolopsis polyzona*. 1-250p.
- Cabana, H., Jones, J. P. et Agathos, S. A. (2007). Elimination of endocrine disrupting chemicals using lignin modifying enzymes from white rot fungi: a review. *Eng. Life Sci.*, volume 7, p. 429-456.
- Cabana, H., Jones, J. P. et Agathos, S. A. (2007). Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology*, volume 132, numéro 1, p. 23-31.
- Cabana, H., Jones, J. P. et Agathos, S. N. (2009). Utilization of cross-linked laccase aggregates in a perfusion basket reactor for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Biotechnology and bioengineering*.
- Cabana, H., Ahamed, A. et Leduc, R. (2010). Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan .
- Cabana, H., Alexandre, C., Agathos, S. N. et Jones, J. P. (2009). Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Bioresource technology*, volume 100, numéro 14, p. 3447-3458.

- Cabral, J. M. S., Kennedy, J. F. (1991). Covalent and coordination immobilization of proteins. Dans Taylor, R. F., *Protein immobilization : fundamentals and applications*. Marcel Dekker, New York, p. 73-138.
- Cambria, M. T., Ragusa, S., Calabrese, V. et Cambria, A. (2011). Enhanced laccase production in white-rot fungus *Rigidoporus lignosus* by the addition of selected phenolic and aromatic compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 163, numéro 3, p. 415-422.
- Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art? *Current opinion in chemical biology*, volume 9, p. 217-226.
- Cao, L., van Langen, L. et Sheldon, R. A. (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current opinion in biotechnology*, volume 14, p. 387-394.
- Cao, L., van Langen, L. M., van Rantwijk, F. et Sheldon, R. A. (2001). Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of  $\alpha$ -lactam antibiotics. *J.Mol.Catal.B-Enzym.*, volume 11, numéro 4-6, p. 665-670.
- Chen, J. et Chen, J. (1998). Preparation and characterization of immobilized phospholipase A2 on chitosan beads for lowering serum cholesterol concentration. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, volume 5, numéro 5-6, p. 483-490.
- Cheng, W. P., Chi, F. H., Yu, R. F. et Lee, Y. C. (2005). Using chitosan as a coagulant in recovery of organic matters from the mash and lauter wastewater of brewery. *Journal of Polymers and the Environment*, volume 13, numéro 4, p. 383-388.
- Cho, H. Y., Cho, N. S., Jarosa-Wilkolazka, A., Rogalski, J., Leonowicz, A., Shin, Y. S. et Ohga, S. (2007). Effect of fungal laccase and new mediators, acetovanillone and acetosyringone, on decolourization of dyes. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, volume 52, p. 275-280.
- Cohen-Hadar, N., Wine, Y., Nachliel, E., Huppert, D., Gutman, M., Frolow, F. et Freeman, A. (2006). Monitoring the stability of crosslinked protein crystals biotemplates: A feasibility study. *Biotechnology and bioengineering*, volume 94, numéro 5, p. 1005-1011.
- Costa, L., Brissos, V., Lemos, F., Ribeiro, F. R. et Cabral, J. M. S. (2008). Comparing the effect of immobilization methods on the activity of lipase biocatalysts in ester hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, volume 31, numéro 4, p. 323-327.
- Costa, S. A., Tzanov, T., Carneiro, F., Gubitz, G. M. et Cavaco-Paulo, A. (2002). Recycling of textile bleaching effluents for dyeing using immobilized catalase. *Biotechnology Letters*, volume 24, numéro 3, p. 173-176.
- Couto, S. R. et Toca-Herrera, J. L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, volume 25, numéro 6, p. 558-569.

- D'Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E. et Sermanni, G. G. (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process biochemistry (Barking, London, England)*, volume 34, numéro 6-7, p. 697-706.
- D'Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V. et Giovannozzi Sermanni, G. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology*, volume 77, numéro 2-3, p. 265-273.
- Delanoy, G., Li, Q. et Yu, J. (2005). Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. *International journal of biological macromolecules*, volume 35, numéro 1-2, p. 89-95.
- Desentis-Mendoza, R., Hernández-Sánchez, H., Moreno, A., Rojas, d. C., Chel-Guerrero, L., Tamariz, J. et Jaramillo-Flores, M. (2006). Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules*, volume 7, numéro 6, p. 1845-1854.
- Dimich-Ward, H., Wymer, M. L. et Chan-Yeung, M. (2004). Respiratory health survey of respiratory therapists. *Chest, 2004 Oct*, volume 126, numéro 4, p. 1048-1053.
- Dodor, D. E., Hwang, H. et Ekunwe, S. I. N. (2004). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.*, volume 35, numéro 2-3, p. 210-217.
- Duran, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A. et Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.*, volume 31, numéro 7, p. 907-931.
- Edwards, W., Bownes, R., Leukes, W. D., Jacobs, E. P., Sanderson, R., Rose, P. D. et Burton, S. G. (1999). A capillary membrane bioreactor using immobilized polyphenol oxidase for the removal of phenols from industrial effluents. *Enzyme and microbial technology*, volume 24, numéro 3-4, p. 209-217.
- Edwards, W., Leukes, W. D. et Bezuidenhout, J. J. (2002). Ultrafiltration of petrochemical industrial wastewater using immobilised manganese peroxidase and laccase: application in the defouling of polysulphone membranes. *Desalination*, volume 149, numéro 1-3, p. 275-278.
- El Ichi, S., Limam, F. et Marzouki, M. N. (2009). Garlic peroxidase immobilized into chitosan matrix suitable for biosensors applications. *Materials Science and Engineering C*, volume 29, numéro 5, p. 1662-1667.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E. et Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by

- white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, volume 35, numéro 11, p. 1531-1538.
- Emmanuel, E., Hanna, K., Bazin, C., Keck, G., Clement, B. et Perrodin, Y. (2005). Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organisms. *Environment international*, volume 31, numéro 3, p. 399-406.
- Enoch, S. J., Roberts, D. W. et Cronin, M. T. D. (2010). Mechanistic category formation for the prediction of respiratory sensitization. *Chemical research in toxicology*, volume 23, numéro 10, p. 1547-1555.
- Everaerts, F., Torrianni, M., Hendriks, M. et Feijen, J. (2008). Biomechanical properties of carbodiimide crosslinked collagen: Influence of the formation of ester crosslinks. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, volume 85, numéro 2, p. 547-555.
- Fonseca, M. I., Shimizu, E., Zapata, P. D. et Villalba, L. L. (2010). Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme and microbial technology*, volume 46, numéro 6, p. 534-539.
- Fürst, W. et Banerjee, A. (2005). Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *Annals of Thoracic Surgery*, volume 79, numéro 5, p. 1522-1528.
- Ghanem, A. et Ghaly, A. (2004). Immobilization of glucose oxidase in chitosan gel beads. *Journal of Applied Polymer Science*, volume 91, numéro 2, p. 861-6.
- Gianfreda, L. et Rao, M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb. Technol.*, volume 35, numéro 4, p. 339-354.
- Govardhan, C. P. (1999). Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Current opinion in biotechnology*, volume 10, numéro 4, p. 331-335.
- Grillo, M. A. et Colombatto, S. (2008). Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino acids*, volume 35, numéro 1, p. 29-36.
- Gupta, M. N. et Raghava, S. (2011). Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, volume 679, p. 133-145.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. et Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, volume 38, numéro 2, p. 453-468.
- Hermanson, G. T. (1996). *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego, 785 p.



- Hirai, H., Nakanishi, S. et Nishida, T. (2004). Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere*, volume 55, numéro 4, p. 641-645.
- Huang, C. et Chen, Y. (1996). Coagulation of colloidal particles in water by chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, volume 66, numéro 3, p. 227-232.
- Hublik, G. et Schinner, F. (2000). Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme Microb. Technol.*, volume 27, numéro 3-5, p. 330-336.
- Hung, T., Giridhar, R., Chiou, S. et Wu, W. (2003). Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 26, numéro 1-2, p. 69-78.
- Jaouani, A., Tabka, M. G. et Penninckx, M. J. (2006). Lignin modifying enzymes of *Coriopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. *Chemosphere*, volume 62, numéro 9, p. 1421-1430.
- Jegannathan, K. R., Leong Jun-Yee, Eng-Seng Chan et Ravindra, P. (2009). Design an immobilized lipase enzyme for biodiesel production. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, volume 1, numéro 6, p. 063101 (8 pp.).
- Johannes, C. et Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 66, numéro 2, p. 524-528.
- Jung, D., Paradiso, M. et Hartmann, M. (2009). Formation of cross-linked glucose oxidase aggregates in mesocellular foams. *Journal of Materials Science*, volume 44, numéro 24, p. 6747-6753.
- Kandelbauer, A., Maute, O., Kessler, R. W., Erlacher, A. et Gubitz, G. M. (2004). Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.*, volume 87, numéro 4, p. 552-563.
- Karam, J. et Nicell, J. A. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of chemical technology and biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)*, volume 69, p. 141-153.
- Karapinar Kapdan, I. et Kargi, F. (2002). Biological decolorization of textile dyestuff containing wastewater by *Coriolus versicolor* in a rotating biological contactor. *Enzyme and microbial technology*, volume 30, numéro 2, p. 195-199.
- Katuri, K. P., Venkata Mohan, S., Sridhar, S., Pati, B. R. et Sarma, P. N. (2009). Laccase-membrane reactors for decolorization of an acid azo dye in aqueous phase: Process optimization. *Water research*, volume 43, numéro 15, p. 3647-3658.

- Kaul, P., Stolz, A. et Banerjee, U. C. (2007). Cross-linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis. *Advanced Synthesis and Catalysis*, volume 349, numéro 13, p. 2167-2176.
- Kim, Y., Yeo, S., Kim, M. K. et Choi, H. T. (2008). Removal of estrogenic activity from endocrine-disrupting chemicals by purified laccase of *Phlebia tremellosa*. *FEMS microbiology letters*, volume 284, numéro 2, p. 172-175.
- Kobayashi, M., Chiba, Y., Funane, K., Ohya, S. et Kato, Y. (1996). Mold pectinase modified with dialdehyde derivatives of dextran and cellulose. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, volume 60, numéro 5, p. 794-797.
- Kobayashi, M. et Takatsu, K. (1994). Cross-linked stabilization of trypsin with dextran-dialdehyde. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, volume 58, numéro 2, p. 275-278.
- Kumar, S., Mohan, U., Kamble, A. L., Pawar, S. et Banerjee, U. C. (2010). Cross-linked enzyme aggregates of recombinant *Pseudomonas putida* nitrilase for enantioselective nitrile hydrolysis. *Bioresource technology*, volume 101, numéro 17, p. 6856-6858.
- Kurniawati, S. et Nicell, J. A. (2007). Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Enzyme Microb. Technol.*, volume 41, numéro 3, p. 353-361.
- Ladisch, M. R. (2001). *Bioseparations engineering : principles, practice, and economics*. Wiley & Sons, New York, 735 p.
- Lalwani, R. et Desai, S. (2010). Sorption behavior of biodegradable polyurethanes with carbohydrate crosslinkers. *Journal of Applied Polymer Science*, volume 115, numéro 3, p. 1296-1305.
- Leung, H. W. (2001). Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies. *Ecotoxicology and environmental safety*, volume 49, numéro 1, p. 26-39.
- Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernandez-Lafuente, R. et Guisan, J. M. (2005). Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. *Biomacromolecules*, volume 6, numéro 4, p. 1839-1842.
- Lopez-Serrano, P., Cao, L., van Rantwijk, F. et Sheldon, R. A. (2002). Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol.Lett.*, volume 24, numéro 16, p. 1379-1383.
- Lu, L., Zhao, M. et Wang, Y. (2007). Immobilization of Laccase by Alginate-Chitosan Microcapsules and its Use in Dye Decolorization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, volume 23, numéro 2, p. 159-166.

- Lundell, T. K., Mäkelä, M. R. et Hildén, K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - Ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology*, volume 50, numéro 1, p. 5-20.
- Luthra, S., Theodore, S. et Tatoulis, J. (2008). Bioglue: A Word of Caution. *Annals of Thoracic Surgery*, volume 86, numéro 3, p. 1055-1056.
- Ma, H., Kermasha, S., Gao, J., Borges, R. M. et Yu, X. (2009). Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 57, numéro 1-4, p. 89-95.
- Majumder, A. B., Mondal, K., Singh, T. P. et Gupta, M. N. (2008). Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. *Biocatalysis and Biotransformation*, volume 26, numéro 3, p. 235-242.
- Mansouri, H. R., Navarrete, P., Pizzi, A., Tapin-Lingua, S., Benjelloun-Mlayah, B., Pasch, H. et Rigolet, S. (2010). Synthetic-resin-free wood panel adhesives from mixed low molecular mass lignin and tannin. *European Journal of Wood and Wood Products*, p. 1-9.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T. et Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, volume 74, numéro 6, p. 765-772.
- Martínková, L., Vejvoda, V., Kaplan, O., Kubáč, D., Malandra, A., Cantarella, M., Bezouška, K. et Křen, V. (2009). Fungal nitrilases as biocatalysts: Recent developments. *Biotechnology Advances*, volume 27, numéro 6, p. 661-670.
- Mateo, C., Fernandes, B., Van Rantwijk, F., Stolz, A. et Sheldon, R. A. (2006). Stabilisation of oxygen-labile nitrilases via co-aggregation with poly(ethyleneimine). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 38, numéro 3-6, p. 154-157.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. et Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.*, volume 40, numéro 6, p. 1451-1463.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Van Langen, L. M., Van Rantwijk, F. et Sheldon, R. A. (2004). A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Biotechnology and bioengineering*, volume 86, numéro 3, p. 273-276.
- Matijošyte, I., Arends, I. W. C. E., de Vries, S. et Sheldon, R. A. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, volume 62, numéro 2, p. 142-148.
- Mi, F. L., Huang C.T., Chiu Y.L., Chen M.C., Liang H.F. et Sung, H. W. (2007). *Aglycone geniposidic acid, a naturally occurring crosslinking agent, and its application for the fixation of collagenous tissues* United States, 667-673 p.

- Mi, F., Sung, H. et Shyu, S. (2001). Release of indomethacin from a novel chitosan microsphere prepared by a naturally occurring crosslinker: Examination of crosslinking and polycation-anionic drug interaction. *Journal of Applied Polymer Science*, volume 81, numéro 7, p. 1700-1711.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. et Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, volume 37, numéro 5, p. 790-802.
- Miretzky, P. et Cirelli, A. F. (2009). Hg(II) removal from water by chitosan and chitosan derivatives: A review. *Journal of hazardous materials*, volume 167, numéro 1-3, p. 10-23.
- Miyachi, T. et Tsutsui, T. (2005). Ability of 13 chemical agents used in dental practice to induce sister-chromatid exchanges in Syrian hamster embryo cells. *Odontology*, volume 93, numéro 1, p. 24-29.
- O'Fagain, C. (2003). Enzyme stabilization - recent experimental progress. *Enzyme Microb. Technol.*, volume 33, numéro 2-3, p. 137-149.
- Olsen, R., Molander, P., Øvrebø, S., Ellingsen, D. G., Thorud, S., Thomassen, Y., Lundanes, E., Greibrokk, T., Backman, J., Sjöholm, R. et Kronberg, L. (2005). Reaction of glyoxal with 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytidine, cytidine, thymidine, and calf thymus DNA: Identification of DNA adducts. *Chemical research in toxicology*, volume 18, numéro 4, p. 730-739.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L. et Rodríguez-Couto, S. (2010). Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. *Bioresource technology*, volume 101, numéro 22, p. 8509-8514.
- Ozaki, A., Kitano, M., Furusawa, N., Yamaguchi, H., Kuroda, K. et Endo, G. (2002). Genotoxicity of gardenia yellow and its components. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, volume 40, numéro 11, p. 1603-1610.
- Palmieri, G., Giardina, P. et Sanna, G. (2005). Laccase-mediated Remazol Brilliant Blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor. *Biotechnology progress*, volume 21, numéro 5, p. 1436-1441.
- Peralta-Zamora, P., Pereira, C. M., Tiburtius, E. R. L., Moraes, S. G., Rosa, M. A., Minussi, R. C. et Duran, N. (2003). Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Appl. Catal. B-Environ.*, volume 42, numéro 2, p. 131-144.
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 57, numéro 1-2, p. 20-33.

- Poli, A., Anzelmo, G. et Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. *Marine Drugs*, volume 8, numéro 6, p. 1779-1802.
- Pozdnyakova, N. N., Rodakiewicz-Nowak, J., Turkovskaya, O. V. et Haber, J. (2006). Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons and their derivatives catalyzed directly by the yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J.Mol.Catal.B-Enzym.*, volume 41, numéro 1-2, p. 8-15.
- Rafat, M., Li, F., Fagerholm, P., Lagali, N. S., Watsky, M. A., Munger, R., Matsuura, T. et Griffith, M. (2008). PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials*, volume 29, numéro 29, p. 3960-72.
- Raikow, D. F., Landrum, P. F. et Reidtt, D. F. (2007). Aquatic invertebrate resting egg sensitivity to glutaraldehyde and sodium hypochlorite. *Environmental Toxicology and Chemistry*, volume 26, numéro 8, p. 1770-1773.
- Rajendhran, J. et Gunasekaran, P. (2007). Application of cross-linked enzyme aggregates of *Bacillus badius* penicillin G acylase for the production of 6-aminopenicillanic acid. *Letters in applied microbiology*, volume 44, numéro 1, p. 43-49.
- Roy, J. J., Abraham, T. E., Abhijith, K. S., Kumar, P. V. S. et Thakur, M. S. (2005). Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosensors and Bioelectronics*, volume 21, numéro 1, p. 206-211.
- Roy, J. J. et Abraham, T. E. (2006). Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. *J.Mol.Catal.B-Enzym.*, volume 38, numéro 1, p. 31-36.
- Rubilar, O., Diez, M. C. et Gianfreda, L. (2008). Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, volume 38, numéro 4, p. 227-268.
- Sano, L. L., Krueger, A. M. et Landrum, P. F. (2005). Chronic toxicity of glutaraldehyde: differential sensitivity of three freshwater organisms. *Aquatic Toxicology*, volume 71, numéro 3, p. 283-296.
- Schoevaart, R., Siebum, A., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. et Kieboom, T. (2005). Glutaraldehyde cross-link analogues from carbohydrates. *Starch*, volume 57, numéro 3-4, p. 161.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. et Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, volume 26, numéro 3, p. 246-265.
- Shah, S., Sharma, A. et Gupta, M. N. (2006). Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Analytical Biochemistry*, volume 351, numéro 2, p. 207-213.

- Shah, V. et Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal of Microbiology/Revue Canadienne de Microbiologie*, volume 48, numéro 10, p. 857-870.
- Sheldon, R. A. (2007A). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA (R) s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society transactions*, volume 35, p. 1583-1587.
- Sheldon, R. A. (2007B). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, volume 349, numéro 8-9, p. 1289-1307.
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R. et Van Langen, L. M. (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation*, volume 23, numéro 3-4, p. 141-147.
- Sheldon, R. A., Sorgedraeger, M. et Janssen, M. H. A. (2007C). Use of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) for performing biotransformations. *Chemistry today*, volume 25, numéro 1, p. 62-67.
- Simi, C. K. et Emilia Abraham, T. (2007). Encapsulation of crosslinked subtilisin microcrystals in hydrogel beads for controlled release applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, volume 32, numéro 1, p. 17-23.
- Soares, A., Jonasson, K., Terrazas, E., Guieysse, B. et Mattiasson, B. (2005). The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 66, numéro 6, p. 719-725.
- Speit, G., Neuss, S., Schutz, P., Frohler-Keller, M. et Schmid, O. (2008). The genotoxic potential of glutaraldehyde in mammalian cells in vitro in comparison with formaldehyde. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, volume 649, p. 146-154.
- Sung, H., Chang, W., Ma, C. et Lee, M. (2003). Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, volume 64, numéro 3, p. 427-438.
- Sung, H., Liang, I. L., Chen, C., Huang, R. et Liang, H. (2001). Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Journal of Biomedical Materials Research*, volume 55, numéro 4, p. 538-546.
- Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H. et Nishida, T. (2003). Removal of estrogenic activities of 17beta-estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water research*, volume 37, numéro 8, p. 1972-1975.
- Takigawa, T. et Endo, Y. (2006). Effects of glutaraldehyde exposure on human health. *Journal of Occupational Health*, volume 48, numéro 2, p. 75-87.

- Testouri, A., Honorez, C., Barillec, A., Langevin, D. et Drenckhan, W. (2010). Highly structured foams from chitosan gels. *Macromolecules*, volume 43, numéro 14, p. 6166-6173.
- Trovaslet, M., Enaud, E., Guiavarc'h, Y., Corbisier, A. M. et Vanhulle, S. (2007). Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. *Enzyme and microbial technology*, volume 41, numéro 3, p. 368-376.
- Uhlig, H. et Linsmaier-Bednar, E. M. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. Wiley, New York, 454 p.
- Van Langen, L. M., Selassa, R. P., Van Rantwijk, F. et Sheldon, R. A. (2005). Cross-linked aggregates of (R)-oxynitrilase: A stable, recyclable biocatalyst for enantioselective hydrocyanation. *Organic letters*, volume 7, numéro 2, p. 327-329.
- Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., D'Antonio, P., Timmie Topoleski, L. D. et Payne, G. F. (2001). Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: Smart biocatalysts and biocatalytic hydrogels. *Bioconjugate chemistry*, volume 12, numéro 2, p. 301-306.
- Vold, I. M. N. et Christensen, B. E. (2005). Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. *Carbohydrate research*, volume 340, numéro 4, p. 679-684.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. et Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, volume 22, numéro 1-2, p. 161-187.
- Wilson, L., Illanes, A., Soler, L. et Henriquez, M. J. (2009). Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. *Process Biochemistry*, volume 44, numéro 3, p. 322-326.
- Wong, D. W. S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 157, numéro 2, p. 174-209.
- Yamawaki, H. et Hara, Y. (2008). Glyoxal causes inflammatory injury in human vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, volume 369, numéro 4, p. 1155-1159.
- Yang, W. Y., Min, d. Y., Wen, S. X., Jin, L., Rong, L., Tetsuo, M. et Bo, C. (2006). Immobilization and characterization of laccase from Chinese *Rhus vernicifera* on modified chitosan. *Process Biochemistry*, volume 41, numéro 6, p. 1378-1382.
- Yinghui, D., Qiuling, W. et Shiyu, F. (2002). Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier. *Letters in applied microbiology*, volume 35, numéro 6, p. 451-456.

- Zeiger, E., Gollapudi, B. et Spencer, P. (2005). Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde - A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, volume 589, numéro 2, p. 136-151.
- Zhang, J. B., Liu, X. P., Xu, Z. Q., Chen, H. et Yang, Y. X. (2008). Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, volume 61, numéro 4, p. 351-356.
- Zhang, J., Xu, Z., Chen, H. et Zong, Y. (2009). Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. *Biochemical engineering journal*, volume 45, numéro 1, p. 54-59.
- Zhang, L., Pan, J., Li, J., Wu, W. et Yu, Y. (2003). Studies on the preparation of chitosan microcarriers cross-linked by oxidized lactose and culture of primary hepatocytes. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, volume 31, numéro 3, p. 293-301.
- Zhu, A., Zhang, M., Wu, J. et Shen, J. (2002). Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive hetero-bifunctional crosslinking reagent on PLA surface. *Biomaterials*, volume 23, numéro 23, p. 4657-4665.



# Annexe 1

## A1 Cinétique de type Michaelis-Menten

La laccase libre utilisée et les CLEAs produits suivent la cinétique Michaelis-Menten. Cette cinétique enzymatique s'exprime sous la forme de l'équation A1.1

$$-r_s = \frac{V_{max}*[S]}{K_m+[S]} \quad \text{A1.1}$$

$-r_s$  dans ce cas-ci peut s'exprimer comme l'activité de l'enzyme (U/L)

$[S]$  est la concentration en substrat (mM)

$V_{max}$  est la vitesse maximale de réaction (U/L)

$K_m$  est la constante de Michaelis-Menten et représente la concentration de substrat (mM) à laquelle l'enzyme aura une activité égale à  $0,5V_{max}$ .

En utilisant le logiciel SigmaPlot 7.0, il est possible d'effectuer un ajustement de courbe et d'apposer ce modèle sur les données recueillies de l'activité des CLEAs en fonction de la concentration en substrat. Les figures A1.1 à A1.4 présentent les résultats de l'étude cinétique des 4 CLEAs dont la cinétique a été déterminée en utilisant l'ABTS comme substrat.

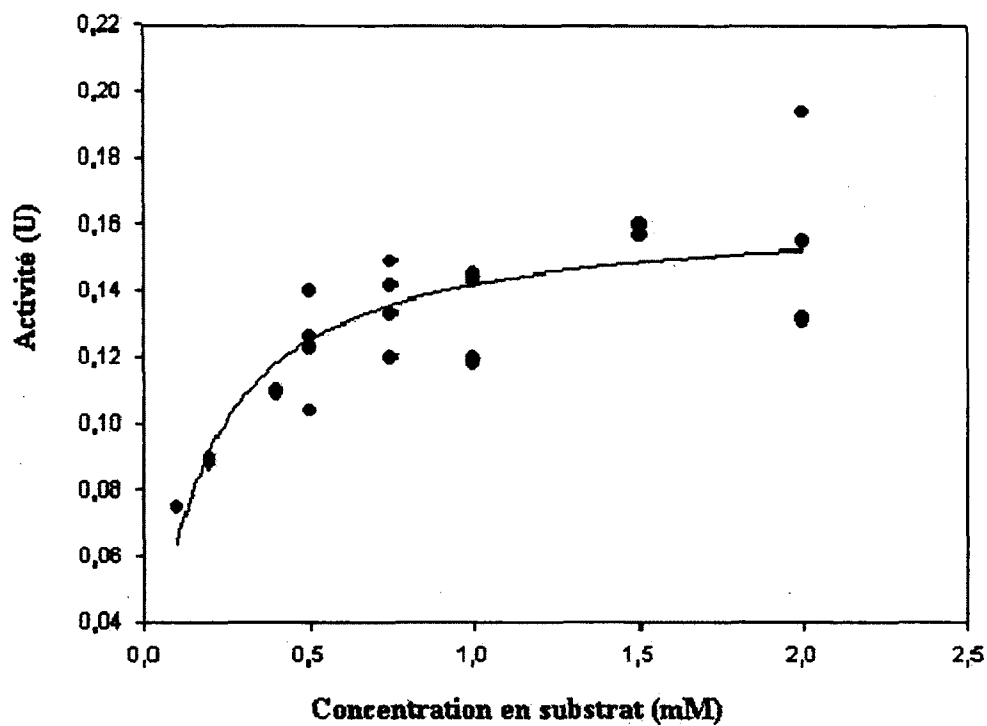


Figure A1.1 Cinétique de Michaelis-Menten de CLEA-1,5-100

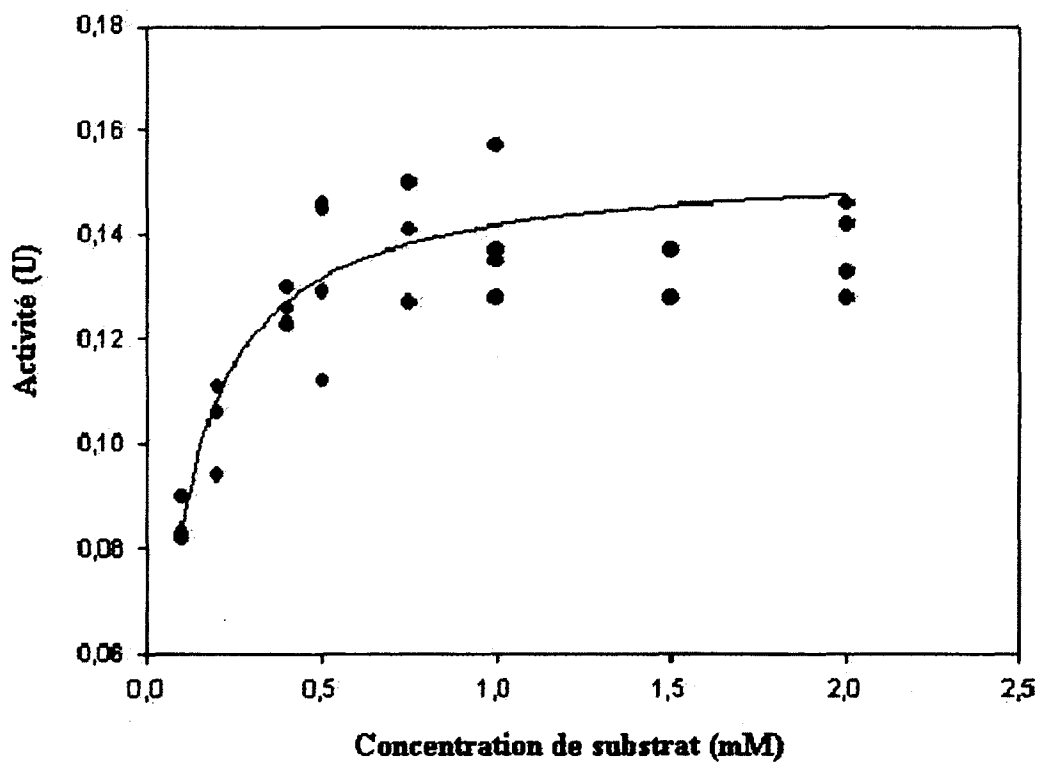


Figure A1.2 Cinétique de Michaelis-Menten de CLEA-1,0-136

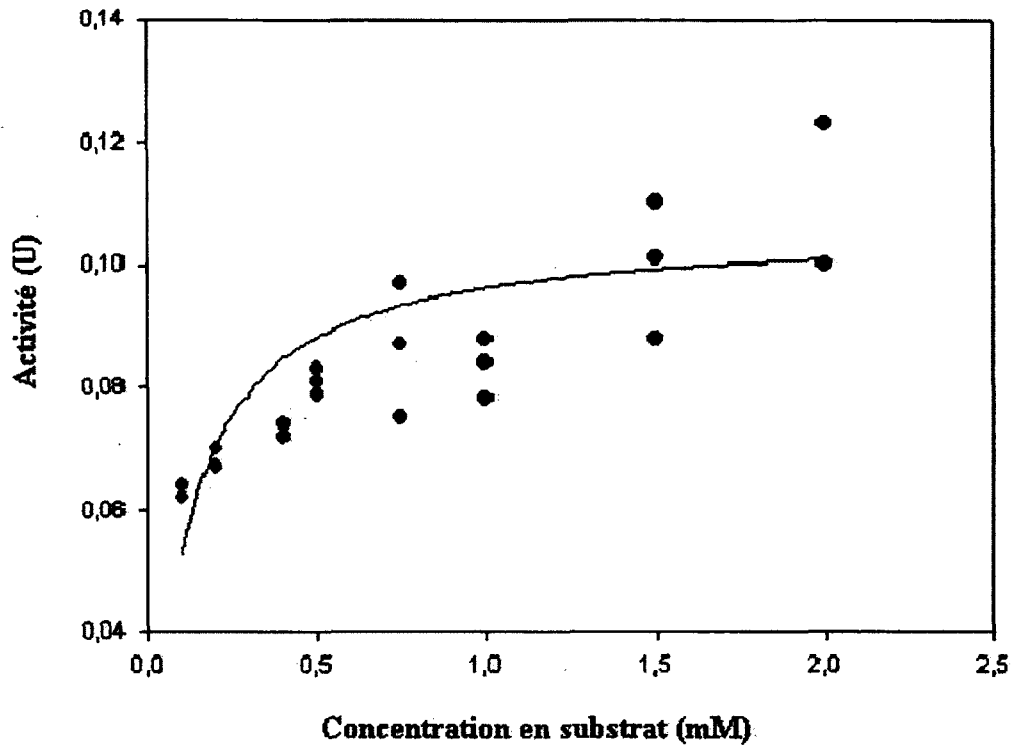


Figure A1.3 Cinétique de Michaelis-Menten de CLEA-1,0-50,5

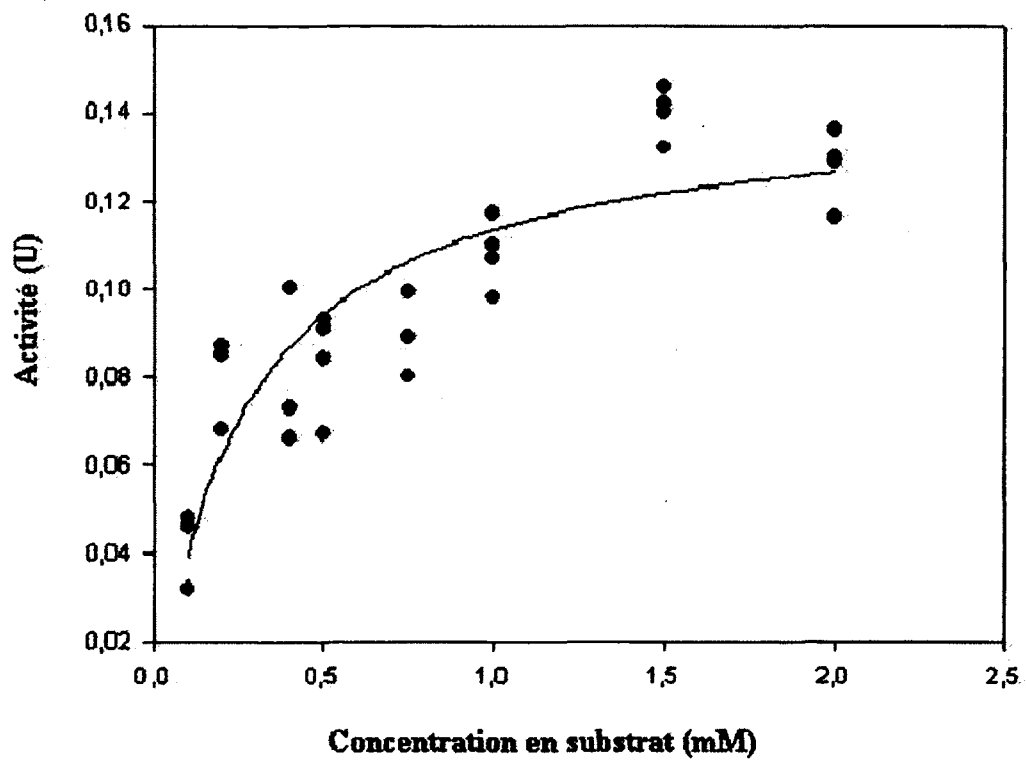


Figure A1.4 Cinétique de Michaelis-Menten de CLEA-1.867-50,5

## Annexe 2

### A2 Dégradation thermique

L'activité de la laccase libre et des CLEAs a été mesurée en fonction du temps d'exposition à des conditions dénaturantes (*i.e.*, 40°C et pH 3). Les résultats de ces mesures sont répertoriés dans les figures A2.1 à A2.6.

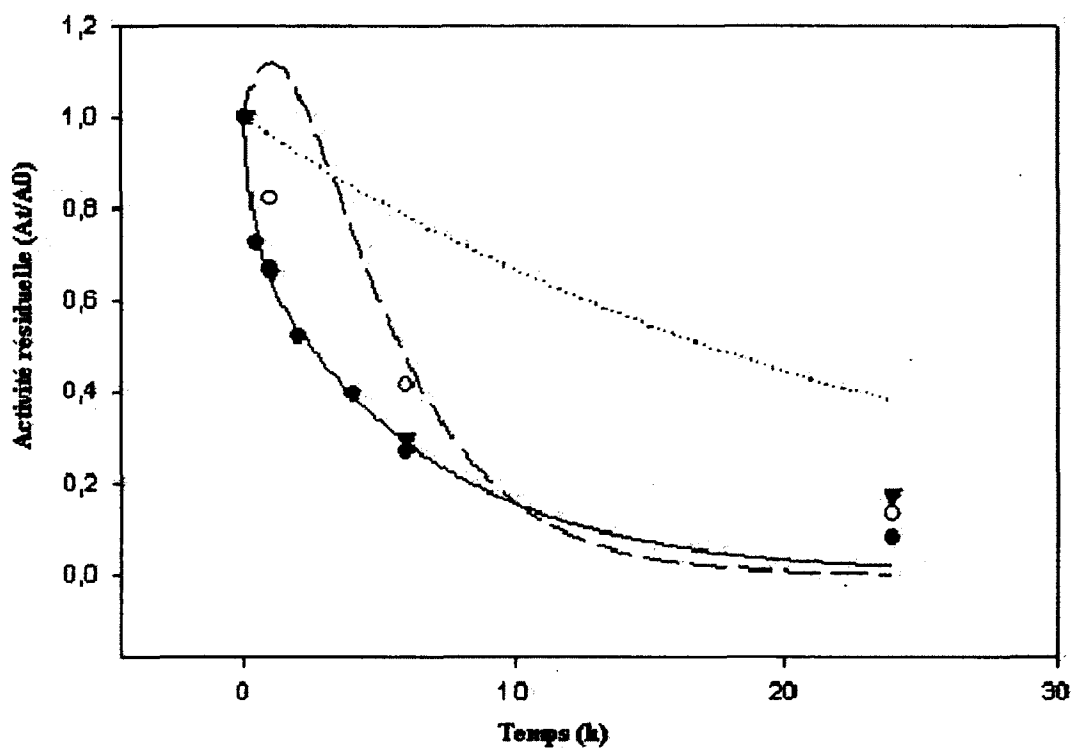


Figure A2.1 Dégradation thermique de CLEA-0,2-200 (•, —), CLEA-0,2-400 (○, - -) et CLEA-0,2-600 (▼, - - -)

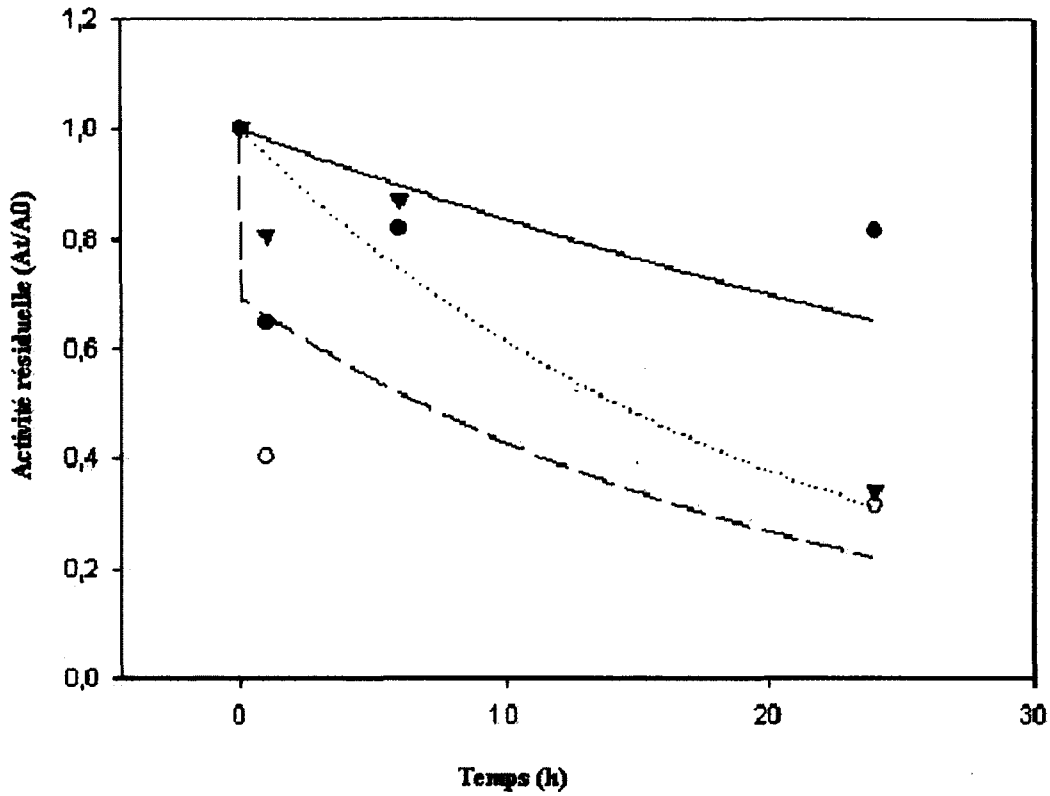


Figure A2.2 Dégradation thermique de CLEA-0.6-200 (•, —), CLEA-0.6-400 (○, - -) et CLEA-0.6-600 (▼, ····)

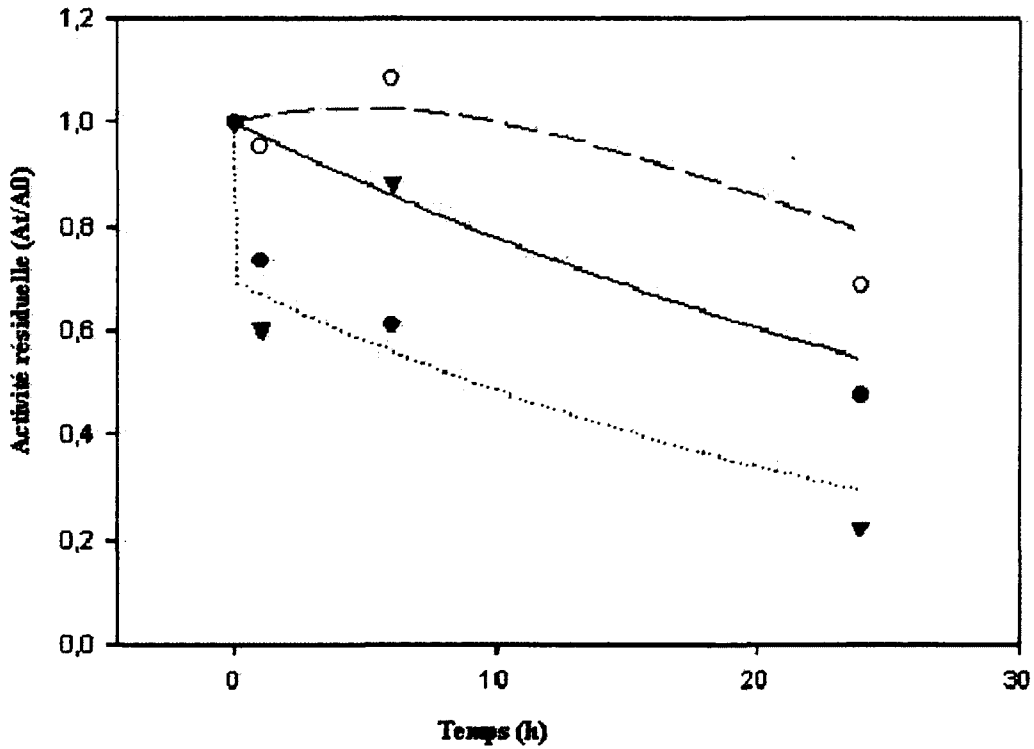


Figure A2.3 Dégradation thermique de CLEA-1.0-200 (•, —), CLEA-1.0-400 (○, - -) et CLEA-1.0-600 (▼, ····)

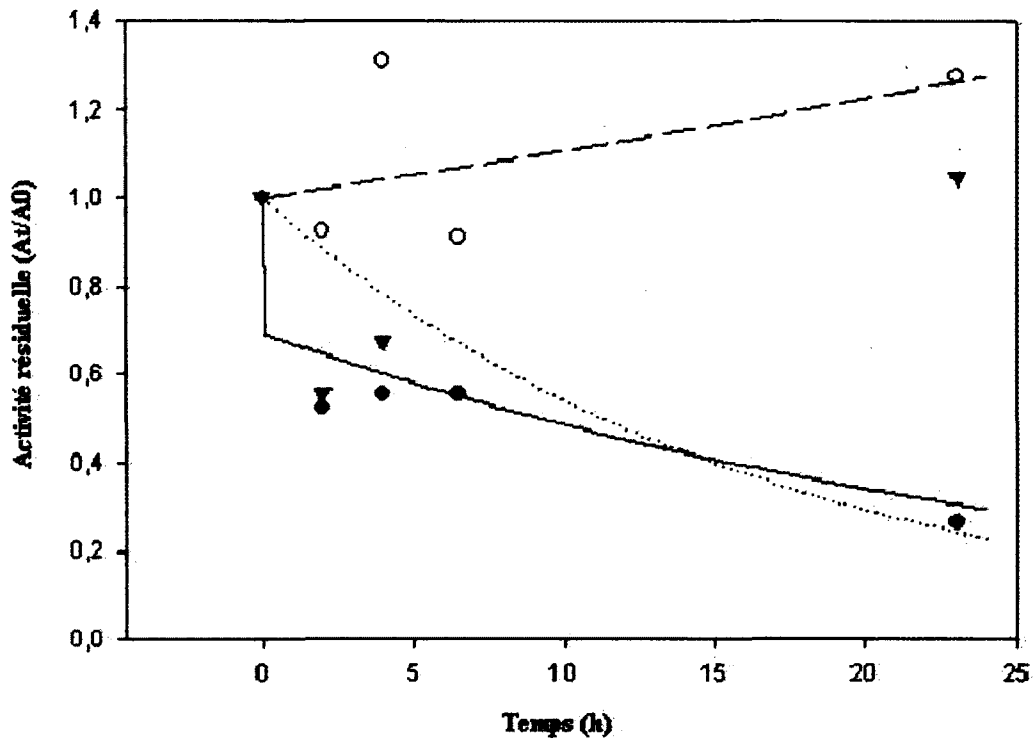


Figure A2.4 Dégradation thermique de CLEA-0,5-1 (•, —), CLEA-1,5-1 (○, - -) et CLEA-1,0-0,05 (▼, ····)

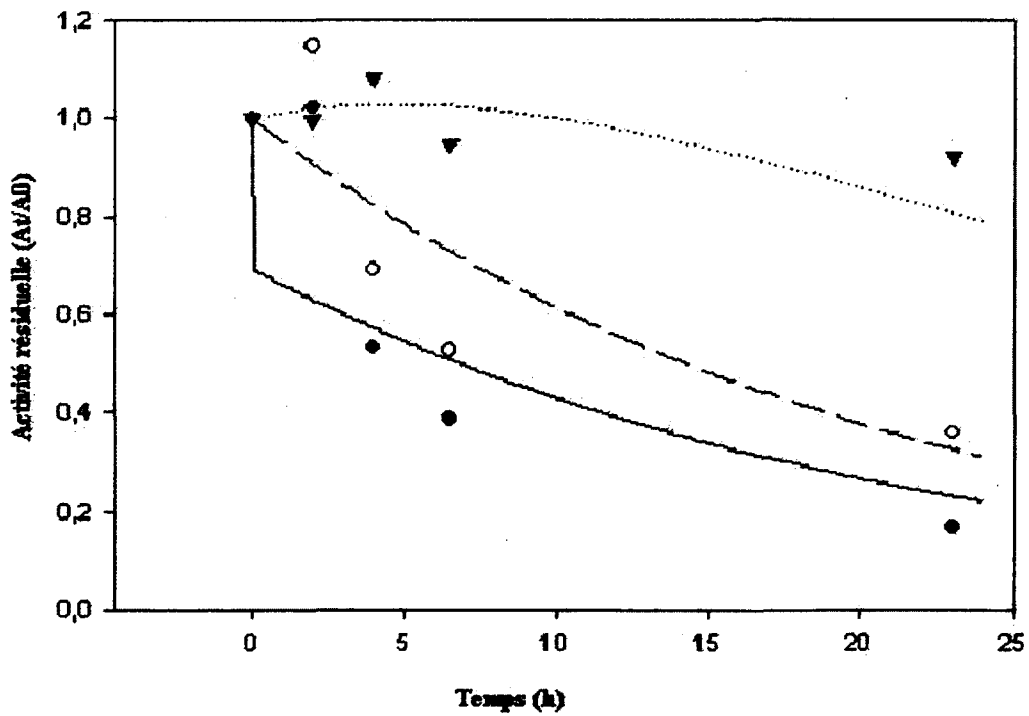


Figure A2.5 Dégradation thermique de CLEA-1,0-50,5 (•, —), CLEA-0,134-50,5 (○, - -) et CLEA-1,867-50,5 (▼, ····)

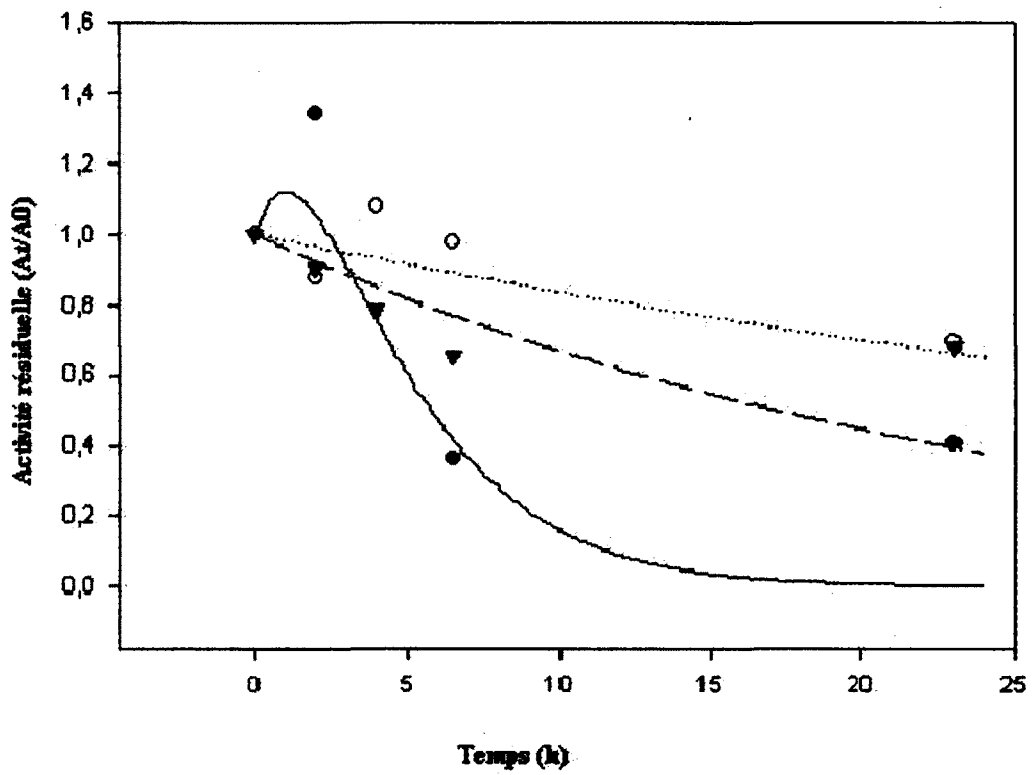


Figure A2.6 Dégradation thermique de CLEA-0.5-100 (•, —), CLEA-1.0-136 (○, - -) et CLEA-1.5-100 (▼, ····)