

Université de Montréal

**Développement de papier bioactif par couchage à grande échelle  
d'enzymes immobilisées par microencapsulation**

par

Marco Polo GUERRERO PALACIOS

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences en chimie

Août 2011

© Marco Polo GUERRERO PALACIOS, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Développement de papier bioactif par couchage à grande échelle  
d'enzymes immobilisées par microencapsulation

Présenté par :

Marco Polo GUERRERO PALACIOS

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre CHAURAND, président-rapporteur  
Dominic ROCHEFORT, directeur de recherche  
François BERTRAND, co-directeur  
Robert PRUD'HOMME, membre du jury

## Résumé

L'objectif principal de cette recherche est de contribuer au développement de biocapteurs commerciaux utilisant des surfaces de papier comme matrices d'immobilisation, capables de produire un signal colorimétrique perceptible dans les limites sensorielles humaines. Ce type de biocapteur, appelé papier bioactif, pourrait servir par exemple à la détection de substances toxiques ou d'organismes pathogènes.

Pour atteindre l'objectif énoncé, ce travail propose l'utilisation de systèmes enzymatiques microencapsulés couchés sur papier. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques dotés d'une haute sélectivité, et capables d'accélérer la vitesse de certaines réactions chimiques spécifiques jusqu'à des millions des fois. Les enzymes sont toutefois des substances très sensibles qui perdent facilement leur fonctionnalité, raison pour laquelle il faut les protéger des conditions qui peuvent les endommager. La microencapsulation est une technique qui permet de protéger les enzymes sans les isoler totalement de leur environnement. Elle consiste à emprisonner les enzymes dans une sphère poreuse de taille micrométrique, faite de polymère, qui empêche l'enzyme de s'échapper, mais qui permet la diffusion de substrats à l'intérieur. La microencapsulation utilisée est réalisée à partir d'une émulsion contenant un polymère dissous dans une phase aqueuse avec l'enzyme désirée. Un agent réticulant est ensuite ajouté pour provoquer la formation d'un réseau polymérique à la paroi des gouttelettes d'eau dans l'émulsion. Le polymère ainsi réticulé se solidifie en enfermant l'enzyme à l'intérieur de la capsule. Par la suite, les capsules enzymatiques sont utilisées pour donner au papier les propriétés de biocapteur. Afin d'immobiliser les capsules et l'enzyme sur le papier, une méthode courante dans l'industrie du papier connu sous le nom de couchage à lame est utilisée. Pour ce faire, les microcapsules sont mélangées avec une sauce de couchage qui sera appliquée sur des feuilles de papier. Les paramètres de viscosité

de la sauce et ceux du couchage ont été optimisés afin d'obtenir un couchage uniforme répondant aux normes de l'industrie.

Les papiers bioactifs obtenus seront d'abord étudiés pour évaluer si les enzymes sont toujours actives après les traitements appliqués; en effet, tel que mentionné ci-dessus, les enzymes sont des substances très sensibles. Une enzyme très étudiée et qui permet une évaluation facile de son activité, connue sous le nom de laccase, a été utilisée. L'activité enzymatique de la laccase a été évaluée à l'aide des techniques analytiques existantes ou en proposant de nouvelles techniques d'analyse développées dans le laboratoire du groupe Rochefort. Les résultats obtenus démontrent la possibilité d'inclure des systèmes enzymatiques microencapsulés sur papier par couchage à lame, et ce, en utilisant des paramètres à grande échelle, c'est à dire des surfaces de papier de  $0.75 \times 3 \text{ m}^2$  modifiées à des vitesses qui vont jusqu'à 800 m/min. Les biocapteurs ont retenu leur activité malgré un séchage par évaporation de l'eau à l'aide d'une lampe IR de 36 kW. La microencapsulation s'avère une technique efficace pour accroître la stabilité d'entreposage du biocapteur et sa résistance à l'exposition au  $\text{NaN}_3$ , qui est un inhibiteur connu de ce biocapteur.

Ce projet de recherche fait partie d'un effort national visant à développer et à mettre sur le marché des papiers bioactifs; il est soutenu par Sentinel, un réseau de recherche du CRSNG.

**Mots-clés :** Laccase, microencapsulation, couchage à grande échelle, papier bioactif, activité enzymatique.

## **Abstract**

The main objective of this research is the development of a commercial biosensor immobilized on paper surfaces, able to produce a colorimetric signal detected by human sensorial limits. This kind of biosensor could be used, for example, in the detection of toxic substances or pathogens.

To achieve this objective, microencapsulated enzymes fixed on paper are proposed. Enzymes are biological catalysts with a high selectivity that can accelerate the speed of some chemical reactions up to a million times. However, the enzymes are very sensitive substances that lose their functionality easily; it is therefore necessary to protect them from conditions that could damage them. Microencapsulation is a technique that protects the enzymes without totally isolating them from their environment. In fact, microencapsulation entraps the enzymes into a micron size sphere, made of a porous polymer which prevents the enzyme to be released but allows the diffusion of its substrate inside. The microencapsulation process consists in making an emulsion containing a polymer dissolved in an aqueous phase with the desired enzyme, and the wall of the microcapsule is formed by adding a crosslinking agent that forms a polymer network at the interface of the emulsion. The crosslinked polymer solidifies and it encloses the enzyme in the interior of the capsule. Thereafter, this kind of microcapsules are used to give biosensor properties to the paper. Blade coating technique is used in order to immobilize the enzyme capsules on paper because it is the most widely used method in the paper industry. The microcapsules are mixed with a coating suspension and applied on sheets of paper. The viscosity parameters of the suspension and those of the coating are optimized to obtain a uniform coating in order to meet the industry standards.

Bioactive paper obtained is first studied to assess whether the enzymes are still active or not after all the treatments because, as described above, enzymes are

very sensitive substances. An enzyme known as laccase is used, which allows an easy evaluation of its activity. Enzymatic activity was evaluated through existing analytical techniques or new analysis techniques developed in the Rochefort lab. The results demonstrate the possibility to transfer microencapsulated enzyme systems onto paper by blade coating, by using large scale settings, with paper surfaces of  $0.75 \times 3 \text{ m}^2$  modified at speeds ranging up to 800 m/min. Biosensors retained their activity, despite a drying process by evaporation of water using an IR lamp of 36 kW. The microencapsulation technique proposed here is an effective technique to increase the storage stability of the biosensor and its resistance to exposure to  $\text{NaN}_3$ , which is a known inhibitor of this biosensor.

This research is part of a national effort in order to develop a commercial device called bioactive paper; it is supported by the NSERC research network Sentinel.

**Keywords** : Laccase, microencapsulation, large-scale coating, bioactive paper, enzyme activity.

## Table des matières

Liste des abréviations.....	xiii
1 Introduction.....	1
1.1 Mise en contexte .....	1
1.2 Le papier bioactif.....	3
1.2.1 Fonctionnalité du papier bioactif .....	3
1.2.2 Le réseau de développement.....	3
1.2.3 Le papier comme matrice.....	4
1.2.3.1 Raisons techniques.....	5
1.2.3.2 Raisons économiques.....	5
1.3 Les biocapteurs comme plateformes de développement.....	6
1.3.1 Les différents éléments de reconnaissance .....	7
1.3.1.1 Les systèmes enzymatiques.....	8
1.3.1.2 L'immobilisation d'enzymes. ....	16
1.4 Application industrielle des biomolécules .....	24
1.4.1 L'incorporation à la pâte à papier .....	25
1.4.2 L'impression .....	25
1.4.3 Le couchage .....	26
1.5 Développement récents et motivation.....	27
1.6 Présentation du projet de recherche et objectifs.....	29
2 Partie expérimentale.....	31
2.1 Préparation des solutions et des microcapsules .....	31
2.1.1 Réactifs.....	31
2.1.2 Préparation des solutions et suspensions.....	31
2.1.2.1 Solutions tampons .....	31
2.1.2.2 Substrats.....	32
2.1.2.3 Solubilisation de l'enzyme.....	33

2.2	Techniques de synthèse, modification et application.....	33
2.2.1	Microencapsulation.....	33
2.2.2	Couchage.....	36
2.2.2.1	Échelle laboratoire.....	36
2.2.2.2	Petite échelle.....	39
2.2.2.3	Grande échelle.....	41
2.3	Caractérisation.....	43
2.3.1	Suspensions et solutions.....	43
2.3.1.1	Viscosité.....	43
2.3.1.2	pH des solutions.....	44
2.3.2	Présence, taille et distribution des microcapsules.....	44
2.3.2.1	Taille et dispersion des microcapsules.....	44
2.3.2.2	Présence des microcapsules sur le papier.....	48
2.3.3	Activité.....	51
2.3.3.1	Cellule à oxygène.....	52
2.3.3.2	Adsorption de lumière et intensité de couleur.....	54
3	Résultats et discussion.....	61
3.1	Effet de la microencapsulation sur l'activité enzymatique.....	61
3.1.1	Conditions optimales de la laccase.....	62
3.1.1.1	Température de travail.....	62
3.1.1.2	Conditions optimales de force ionique.....	63
3.1.1.3	pH optimal.....	67
3.1.1.4	Concentration optimale de substrat.....	68
3.1.1.5	Effet de l'entreposage sur l'activité (enzyme non-couchée).....	70
3.2	Effet du couchage sur l'activité enzymatique.....	73
3.2.1	Couchage de la suspension.....	73
3.2.2	Présence des microcapsules.....	75
3.2.3	Effet du couchage.....	77

3.3	Activity, stability and inhibition of a bioactive paper prepared by large-scale coating of laccase microcapsules.....	79
3.3.1	Abstract.....	79
3.3.2	Introduction.....	80
3.3.3	Experimental.....	83
3.3.3.1	Reagents.....	83
3.3.3.2	Preparation of PEI microcapsules.....	83
3.3.3.3	Preparation of the suspension.....	84
3.3.3.4	Applying enzymes by blade-coating.....	85
3.3.3.5	Analysis of the enzymatic activity on paper.....	86
3.3.4	Results and discussion.....	87
3.3.4.1	Drying exposure.....	87
3.3.4.2	Coating suspension formulation.....	90
3.3.4.3	Enzyme Coverage.....	92
3.3.4.4	Activity upon storage.....	95
3.3.4.5	Resistance to anion inhibition.....	96
3.3.5	Conclusions.....	99
3.3.6	Acknowledgements.....	100
4	Conclusions.....	101
5	Annexes.....	i
5.1	Méthodologies utilisées pour réaliser le couchage à grande échelle.....	i
5.1.1	Microencapsulation par polycondensation interfaciale.....	i
5.1.1.1	Réactifs.....	i
5.1.1.2	Équipement.....	i
5.1.1.3	Manipulations.....	ii
5.1.2	Suspension de couchage.....	v
5.1.2.1	Réactifs.....	v
5.1.3	Équipement:.....	v
5.1.3.1	Manipulations.....	v

5.1.4 Couchage à grande échelle à l'aide du CLC-7000.....	vii
5.1.4.1 Réactifs.....	vii
5.1.4.2 Equipement .....	vii
5.1.4.3 Manipulations.....	vii
5.2 Coût de production du papier enzymatique .....	ix
5.3 Automatisation des mesures.....	x
5.4 Index.....	xii

## Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples des biocapteurs à base de papier développés entre 2010 et 2011.....	28
Tableau 2. Sommaire des conditions optimales de la laccase libre et encapsulée.....	72

## Liste des figures

Figure 1. Les éléments d'un biocapteur.....	7
Figure 2. Réaction qui suit la cinétique de Michaelis et Menten.....	10
Figure 3. Réaction redox catalysée par la laccase.....	13
Figure 4. Représentation du site actif de la laccase.....	14
Figure 5. Réaction de Schotten-Bauman pour réaliser la polycondensation interfaciale.....	22
Figure 6. Structure générale de la polyéthylèneimine.....	23
Figure 7. Structure moléculaire du PPD et de l'ABTS.....	32
Figure 8. Étapes de préparation des microcapsules.....	35
Figure 9. Machine à coucher ACCU-LAB.....	38
Figure 10. Photo et schéma de la machine à couchage LCDF.....	40
Figure 11. Schéma représentant les éléments principaux du CLC.....	42
Figure 12. Schéma de l'HORIBA (LA950).....	45
Figure 13. a) Angles de diffraction dans la diffraction de Fraunhofer, b) positionnement des détecteurs dans l'appareil HORIBA.....	46
Figure 14. Distribution du diamètre des microcapsules.....	48
Figure 15. Réaction entre le FITC et les amines primaires.....	49
Figure 16. Microscope à fluorescence.....	50
Figure 17. Formation du pourpre de Ruhemann.....	51
Figure 18. Constituants de la cellule à oxygène.....	53
Figure 19. Diminution du pourcentage d'oxygène en solution après l'ajout de laccase et PPD.....	54
Figure 20. Augmentation de l'absorbance d'une solution de laccase après l'addition d'ABTS.....	56
Figure 21. Produits d'oxydation du PPD.....	57
Figure 22. Exemple de numérisation des échantillons.....	59

Figure 23. Changement d'intensité de la couleur du papier couché avec la laccase après l'addition du PPD.....	59
Figure 24. Activité enzymatique du papier suite à l'adition du PPD : intensité de couleur par rapport au temps et courbe obtenue à partir de ce changement.....	60
Figure 25. Structure des substrats utilisés dans la littérature pour évaluer l'inhibition de la laccase en présence des ions citrates .....	64
Figure 26. Effet de la force ionique sur l'activité enzymatique pour l'enzyme libre et encapsulée .....	66
Figure 27. Effet du pH sur l'enzyme libre et encapsulée.....	68
Figure 28. Effet de la concentration de PPD sur l'activité de la laccase pour l'enzyme libre et l'enzyme encapsulée.....	70
Figure 29. Disparition de l'activité de la laccase libre et encapsulée par rapport au temps .....	71
Figure 30. Effet de la viscosité sur l'uniformité des applications .....	74
Figure 31. Microcapsules modifiées avec FITC ( $\lambda_{ex}$ = 495 nm, $\lambda_{em}$ = 525 nm), observées par microscopie à fluorescence .....	76
Figure 32. Test de Kaiser pour papier couché avec microcapsules (à gauche) et sans microcapsules (à droite). Microcapsules couchées à l'aide du CLC.....	77
Figure 33. Effet de la microencapsulation et du temps d'entreposage sur l'activité de la laccase libre et encapsulée suite à l'ajout du PPD. Applications d'enzymes libres et encapsulées à l'aide du LCDF.....	78
Figure 34. Scheme for the principal parts of the CLC-7000.....	85
Figure 35. Change of color for paper coated with laccase in presence of p-phenylenediamine. ....	86
Figure 36. (a) Effect of drying exposure on activity. (b) Effect of microencapsulation on activity.....	89
Figure 37. Effect of enzyme coverage on activity .....	91
Figure 38. A sample of modified paper immersed in a solution of PPD .....	92

Figure 39. (a) Change in color intensity for samples coated at different concentrations of enzyme. (b) Effect of enzyme coverage on enzymatic activity.....	95
Figure 40. Effect of microencapsulation on activity of coated laccase over several days.....	96
Figure 41. Normalized activities of free and encapsulated enzymes in presence of different concentrations of inhibitors: (a) NaCl, (b) NaF and (c) NaN <sub>3</sub> .....	98
Figure 42. Coût de production du papier enzymatique, couché à l'aide du CLC.....	ix
Figure 43. Fenêtre de démarrage du Applescript .....	xi
Figure 44. Exemple des indications trouvées dans le script.....	xi

## Liste des abréviations

Symbole / abréviation	Description / signification
ABTS	2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)
cs	Concentration d'émulsifiant
CWT	Épaisseur du poids de couche ou « coating weight thickness »
Ds	Diamètre de l'agitateur
Dv	Diamètre du conteneur
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
K	Paramètre constant du système d'émulsion
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis – Menten
LCDF	Machine à couchage « Laboratory coater-dryer facility »
LWC	Papier à couché léger
N	Puissance d'agitation
PEI	Polyéthylèneimine
PPD	p-phénylènediamine
R	Volume de la phase en émulsion par rapport à la matrice
RPE	Résonance paramagnétique électronique
Span	Monooléate de sorbitane
T1	Cuivre type 1, site d'oxydation des substrats.
T2	Cuivre type 2, paramagnétique.
T2/T3	Centre de réduction de l'oxygène formé par cuivres de type 2 et 3.
T3	Cuivre type 3, adsorption dans sa forme oxydée à 330 nm
V <sub>d</sub>	Viscosité des gouttes
V <sub>m</sub>	Viscosité de la matrice
WFM	Épaisseur humide de couche, de l'anglais « wet film thickness »
δ	Diamètre moyen des microcapsules

*À Clotilde.*

### *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier mes co-directeurs : Dominic, mon mentor, qui m'a fait confiance dès le début, et qui a éveillé chez moi le désir d'enseigner, merci pour les conseils et les encouragements donnés quand j'en avais le plus besoin. À François, qui m'a amené plus loin en me demandant d'exprimer plus clairement les idées du projet, ce qui m'a aidé à mieux structurer ma pensée. À tous les deux, merci infiniment pour tout votre soutien, tout au long de ce projet.

Merci à Murray Douglas et à son groupe au Département de génie chimique de l'Université McGill. J'ai beaucoup aimé travailler avec vous pour faire les expériences avec le « Laboratory Coater Dryer Facility ». Merci à Patrice Mangin du Centre de recherche en pâtes et papiers, et à Daniel Matte du Centre international du couchage, qui ont généreusement prêté les appareils et fourni les matériaux nécessaires pour les expériences à grande échelle. Merci également à Nancy Jacob et à Martin Dubé, qui m'ont donné la formation et m'ont guidé lors de l'utilisation du « Cylindrical Laboratory Coater », merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Je veux également remercier toutes les stagiaires avec lesquelles j'ai travaillé sur ce projet: Marjorie Bastien, Katherine Rogers-Vallée et Marie Ortmann. Merci à mes collègues Yufen, Fatima, Fatma, Golfam, Inés, Carlos, Denis, Mathieu, Laurence, Georgiana et Vy des groupes Rochefort et Waldron avec qui j'ai échangé tant d'idées et passé des moments agréables. Un remerciement tout spécial à Yufen Zhang qui m'a introduit aux techniques de base utilisées dans ce projet. Mon projet n'aurait pu être mené à bien sans l'aide constante et précieuse de Line Laurin, Karine Poirier, Diane-Raymonde Pimparé et Jacques Laflamme, et sans le personnel du Secrétariat de chimie qui travaille avec dévouement pour les étudiants.

Merci à Olga et Jean-Jacques, dont le soutien dans les périodes de doute a été si bénéfique.

A Clotilde, qui m'a encouragé sans relâche, je dédie ce mémoire, avec ma plus profonde gratitude.

Finalement, je veux remercier le réseau Sentinel et ses partenaires pour avoir financé ce projet et pour tous ces colloques et rencontres techniques lors desquels j'ai eu l'occasion de partager des points de vue avec de nombreux collègues et spécialistes d'autres domaines.

« *Expérimenter, c'est imaginer* »

*Friedrich Nietzsche,  
Extrait d'Aurore*

# 1 Introduction

## 1.1 *Mise en contexte*

La santé est un état relié à la vie, qui décrit le bon fonctionnement de l'organisme (1) et on peut dire que c'est elle qui nous tient loin de la mort, comme le mentionne Perros dans son ouvrage *Papiers collés* : « la santé, c'est ce qui sert à ne pas mourir chaque fois qu'on est gravement malade » (2).

Étant donné que la santé est reliée à toute activité humaine, il devient difficile de mesurer son impact économique au niveau mondial, mais il suffit d'observer les investissements pour maintenir et rétablir la santé pour se faire une idée de cet impact. Ainsi, pour l'année 2007<sup>1</sup>, la Banque Mondiale a rapporté qu'en moyenne les pays investissent 9.3 % de leur produit intérieur brut (PIB) pour des dépenses reliées au domaine de la santé<sup>2</sup>; en comparaison, et pour la même année, les pays ont dépensé, en moyenne, et en pourcentage de leur PIB : 6.2 % en technologie de l'information et communication, 2.4 % en dépenses militaires<sup>3</sup> et 2.2 % en recherche et développement. On peut donc conclure à la lumière de ces chiffres que la santé et les facteurs qui l'affectent nous occupent et nous préoccupent tous.

---

1 Dernière évaluation publiée et disponible à ce jour.

2 En comptant les organismes privés et publics.

3 Description : ces données incluent les dépenses d'équipement, les ministères de la défense, les forces paramilitaires, les activités spatiales militaires, le coût du personnel militaire et civil (incluant les pensions et services sociaux), les coûts d'entretien, de recherche et de développement et l'aide civile militaire. Ne sont pas inclus : les dépenses de défense civile et les avantages destinés aux anciens combattants, la démobilisation, la conversion ou la destruction d'armement. Il faut noter toutefois que les données relatives à certains pays sont incertaines, partiales ou approximatives.

Il est donc important de connaître les principaux facteurs qui peuvent affecter la santé : maladies d'origine psychologique, sociale, environnementale, biologique ou chimique. Mais parmi toutes les maladies existantes, ce sont les maladies infectieuses et transmissibles qui produisent le plus grand impact sur la santé, tant dans l'actualité que dans l'histoire de l'humanité, et ce de façon plus importante que n'importe quel autre groupe de maladies, à cause de leurs conséquences psychologiques, économiques et démographiques (3).

En effet, selon l'Organisation mondiale de la santé, sept des dix maladies qui causent le plus de décès par année à l'échelle mondiale sont des maladies infectieuses. La diarrhée, en particulier, est, même dans les pays développés, la maladie d'origine alimentaire la plus courante (4).

Les maladies infectieuses peuvent être causées par des bactéries, des virus, des champignons ou parasites qui s'introduisent dans le corps et se multiplient ou produisent une toxine qui affecte l'organisme hôte (5). Afin de combattre les maladies infectieuses, l'homme a dans l'histoire utilisé différents types de stratégies basées sur le développement des médicaments, des antibiotiques et des vaccins ainsi que sur l'application de mesures sanitaires et de contrôle de la qualité des produits de consommation. C'est ce qui a permis de soigner et de prévenir un grand nombre des maladies infectieuses partout dans le monde. Toutefois, un grand nombre de maladies se développent simplement parce que nous ne nous rendons pas compte de la présence des agents pathogènes, car ils échappent à la détection de nos cinq sens.

Ainsi, la création et le développement de dispositifs accessibles au grand public, servant à percevoir en temps réel les agents pathogènes, pourrait s'avérer un outil puissant de prévention des maladies infectieuses, capable de révolutionner notre façon de « voir » les maladies dans le monde. Ce type de technologie pourrait par exemple servir à construire des emballages capables d'indiquer la péremption des produits qu'ils renferment juste avant leur consommation; ce serait une grande amélioration sur les estimations qui se font

actuellement sur la durée de vie des produits, qui sont basées sur des statistiques issues d'études de péremption réalisées dans des conditions qui ne représentent pas toujours la réalité vécue par le produit.

La conception de ce genre de dispositif est restée impossible jusqu'à la fin du siècle dernier; néanmoins, l'avancement actuel de la recherche relié au développement des biocapteurs fait en sorte qu'on est plus proche que jamais de pouvoir proposer un tel dispositif.

## ***1.2 Le papier bioactif***

### **1.2.1 Fonctionnalité du papier bioactif**

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été orientés vers la mise au point à des fins commerciales d'un biocapteur de pathogènes et toxines, appelé papier bioactif. Ce papier est caractérisé par l'inclusion d'un système d'inactivation de ces cibles. Ces fonctionnalités, dites bioactives, sont conçues pour se manifester sans l'aide d'aucun équipement ou appareil additionnel en produisant comme signal un changement de couleur visible au contact avec ces cibles; ce mode d'opération rend le dispositif adaptable à de multiples applications, même lorsque les équipements conventionnels ou les techniciens ne sont pas disponibles, ou lorsque leur disponibilité est limitée.

Le potentiel d'application d'un tel dispositif est énorme, mais le concept d'utilisation du papier bioactif vise en premier lieu les domaines de la santé, de la sécurité et de l'alimentation.

### **1.2.2 Le réseau de développement**

Ce projet développé au laboratoire du professeur D. Rochefort, en collaboration avec le professeur F. Bertrand de l'École Polytechnique de Montréal, a le soutien du

Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (CRSNG). Le réseau Sentinel est aujourd'hui composé de quatre partenaires industriels et de douze centres de recherche dont cinq ont leur siège social au Québec. Tandis que Sentinel est le principal organisme de développement du papier bioactif au Canada, il existe dans le monde d'autres centres de recherche intéressés à développer ce dispositif, que ce soit à l'Université Harvard aux États-Unis (6), au Centre technique de recherche de Finlande (VTT) (7) ainsi qu'en Scandinavie, en Australie et au Japon (8, 9). L'intérêt pour le développement du papier bioactif est en croissance constante et suscite la concurrence au niveau international.

Chaque membre du réseau Sentinel est spécialisé dans un domaine différent de la science, y compris la mise en marché, ce qui permet de développer un produit en utilisant des points de vue complémentaires. Ainsi, notre groupe étudie le développement des biocapteurs sur papier via l'immobilisation des enzymes et, plus spécifiquement, pour le travail présenté ici, par l'immobilisation des molécules en utilisant des conditions semblables à celles trouvées dans l'industrie papetière.

### **1.2.3 Le papier comme matrice**

Le papier est amplement utilisé pour fabriquer divers objets : filtres, contenants, masques, tapis, serviettes, nappes, vêtements, qui sont utilisés quotidiennement dans les domaines de l'alimentation, de la médecine, de la construction, etc. Pour imaginer le potentiel d'utilisation du papier bioactif, il suffit de visualiser les objets déjà existants avec les propriétés bioactives que promet le dispositif, et ce sans mentionner les nouveaux dispositifs qui peuvent en dériver.

De ce fait, les raisons d'utilisation du papier comme matrice sont très nombreuses et comprennent des justifications techniques et économiques qui ne font pas l'objet de notre étude mais dont nous présenterons quelques exemples par la suite.

### **1.2.3.1 Raisons techniques**

« Je n'existe plus puisque je n'ai plus de papier » (10) , cette phrase tirée d'un ouvrage de Bulgakov (Le maître et Marguerite) peut être utilisée dans le cas du papier bioactif puisque le papier ne représente pas qu'un simple support pour les biomolécules mais aussi une structure fonctionnelle (8), qui contribue au bon fonctionnement du dispositif bioactif. En effet, le papier est un matériau solide à l'innocuité prouvée, flexible et facile à modifier par des méthodes bien établies, et qui possède des caractéristiques de perméabilité pour filtrer les substrats et les mettre en contact avec les molécules bioactives. D'autre part, grâce à l'absorption des liquides par l'action de la capillarité propre au papier, les molécules cibles s'imprègnent facilement sur toute la structure du papier. Comme la couleur du papier peut être modifiée, on peut augmenter le contraste par rapport au signal colorimétrique.

### **1.2.3.2 Raisons économiques**

L'industrie forestière dont le revenu annuel en 2005 a été de 84 milliards de dollars est un pilier important de l'économie canadienne, presque égal au revenu économique de l'industrie automobile (94 milliards de dollars pour la même année) (11-13). Avec 23 millions de tonnes de papier, on estime que le Canada est le troisième producteur de papier à l'échelle mondiale (14). Cependant, le marché canadien du papier a été mis à mal dans les dernières années par l'arrivée de nouveaux concurrents capables de produire des matières premières à un prix inférieur grâce aux techniques avancées de sylviculture de la Suède, au climat favorable du Brésil, à la main d'œuvre abordable de la Chine, ainsi que par la substitution du papier par divers types de documents numérisés (15).

Ainsi, le développement de nouveaux produits à valeur ajoutée a été mis en place par le Canada comme stratégie de sauvetage de l'industrie papetière canadienne. En 2009, le gouvernement du Canada a annoncé que 80 millions de dollars sur un total de 170 millions de dollars seront investis directement dans le développement de nouvelles

technologies dans ce secteur afin d'aider l'industrie du papier. Ce qui s'ajoute aux 40 millions de dollars qui iront à des programmes d'aide aux compagnies forestières pour qu'elles mettent des produits innovateurs sur le marché international. Un autre 10 millions de dollars ira au développement de constructions à base de bois et 40 autres millions de dollars seront dédiés aux projets pilotes de production de nouveaux produits du bois (16, 17). Selon le ministre canadien du Revenu national et ministre d'État à l'agriculture, M Jean-Pierre Blackburn, « En ciblant les aspects de marketing et d'innovation de nos industries forestières, notre gouvernement non seulement apporte une assistance nécessaire à ce secteur durant une période difficile, mais il lui prépare également une base solide pour l'avenir. » (17)

Le développement du papier bioactif en utilisant le papier comme support offre donc l'avantage d'utiliser des procédés et machineries déjà existants, en plus d'être subventionné par différents organismes et de proposer un palier de développement durable, le papier étant un matériau abordable, local, dégradable, facile à récupérer et renouvelable.

### ***1.3 Les biocapteurs comme plateformes de développement***

Le principe d'action du papier bioactif repose sur sa capacité à réagir en présence de cibles et, par conséquent, sur sa fonctionnalité comme biocapteur. Les biocapteurs sont des instruments analytiques portatifs qui permettent la détection, l'enregistrement et la transmission de l'information concernant la présence, la concentration et la distribution d'un élément (18). Ils sont composés d'un récepteur qui réagit en présence d'un élément quelconque et d'un transducteur capable de transformer cette réaction en un signal détectable.

### 1.3.1 Les différents éléments de reconnaissance

La spécificité des molécules de reconnaissance détermine la complexité des milieux où les biocapteurs peuvent être utilisés. Comme le papier bioactif sera utilisé dans des milieux complexes, il est souhaitable d'utiliser des éléments hautement spécifiques dans son élaboration. À cet effet, diverses molécules peuvent être ajoutées au papier pour le modifier : anticorps, aptamères, cellules, enzymes, nanoparticules, polymères, tissus et virus (19) (Figure 1).

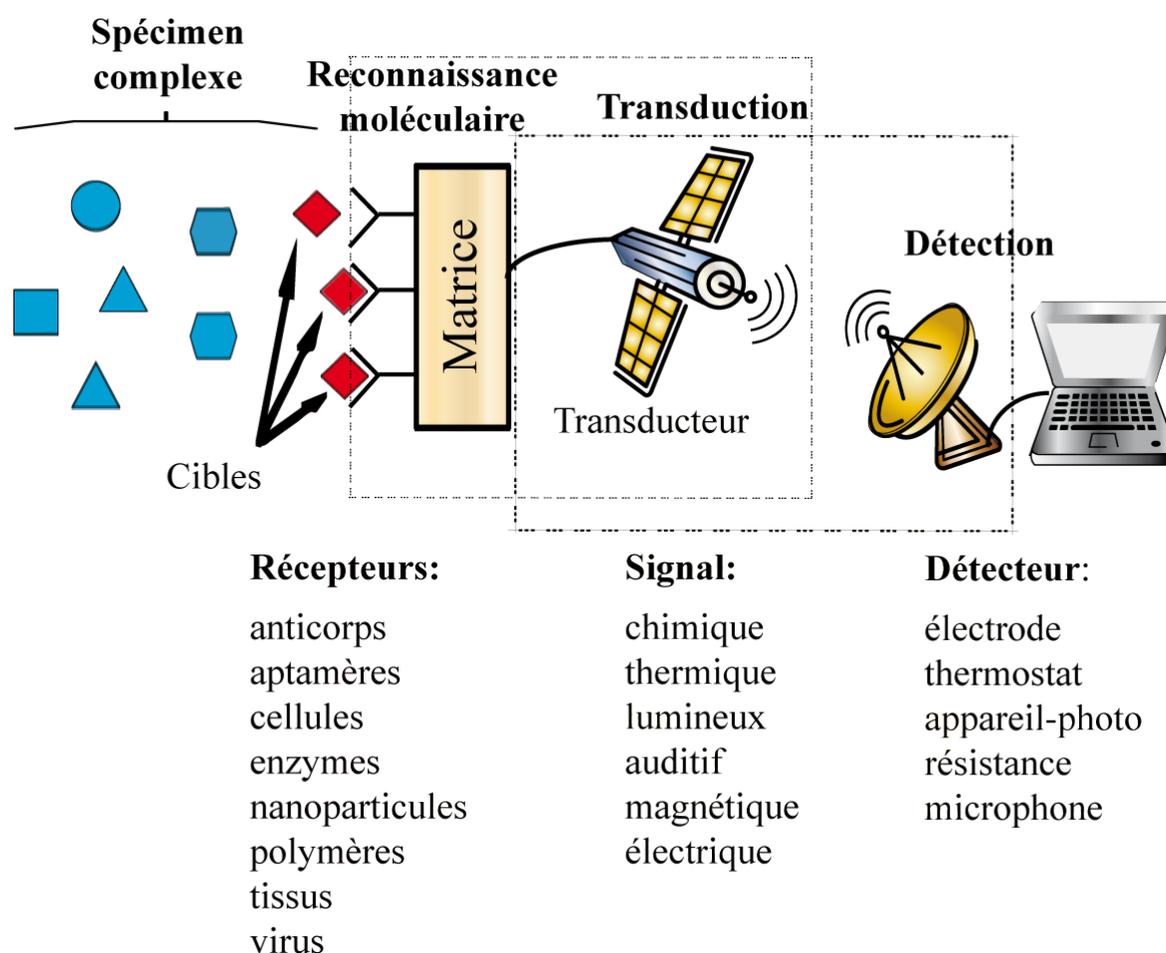


Figure 1. Les éléments d'un biocapteur. Adaptation de (7, 19).

Tel qu'illustré à la Figure 1, la transduction transforme la réponse du système de reconnaissance en un signal exploitable par le détecteur, tel que la formation d'un produit chimique, un changement de température ou l'émission d'un signal sonore, lumineux, magnétique ou électrique. Afin d'obtenir un biocapteur portatif, le signal de transduction du papier bioactif doit être perceptible par les sens. Dans le travail présenté ici, nous avons choisi d'utiliser un changement rapide de coloration dans le spectre visible (380-780 nm), à cause de la facilité d'interprétation de ce signal en absence de tout autre dispositif.

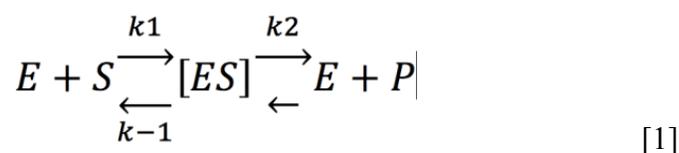
### **1.3.1.1 Les systèmes enzymatiques**

Les systèmes enzymatiques sont les plateformes de développement des biocapteurs les plus étudiées et développées (20) à cause de leurs caractéristiques telles que la reconnaissance spécifique des molécules, la capacité à fonctionner comme transducteurs et la propriété de transformer ou d'éliminer les composants-cibles. Les enzymes ont donc été décrites comme plateformes viables pour le développement du papier bioactif (7) et les prototypes basées sur ces plateformes ont mené à des applications commerciales (21).

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques, dont la plupart (à l'exception des ribonucléoprotéines) sont des protéines capables d'augmenter la vitesse de réaction des cibles (dits substrats) de  $10^6$  à  $10^{12}$  fois sans être consommées pendant la formation des produits de la réaction. Ce changement de vitesse représente un avantage en terme de temps d'analyse et en matière d'amplification du signal (22); et est réalisable grâce au fait que les enzymes fractionnent l'énergie de la réaction en plusieurs étapes à plus faible énergie d'activation. Les substrats sont reconnus et transformés par le site actif de l'enzyme de façon spécifique, ce qui veut dire que le site actif identifie seulement un type de substrat et la réaction face à ce substrat est toujours la même (20).

### 1.3.1.1.1 Cinétique enzymatique selon Michaelis et Menten

Au moment où l'enzyme (E) reconnaît le substrat (S) par contact avec le site actif, il se forme un complexe dit enzyme-substrat (ES) et c'est grâce à ce contact que l'enzyme transforme le substrat en produits de la réaction (P), ce qui entraîne la disparition du complexe (ES) tel que représenté dans l'équation [1] ci-dessous :



Selon Henri, Michaelis et Menten (23), il existe un équilibre thermodynamique entre l'enzyme, le substrat et le complexe enzyme-substrat dont la vitesse de formation est égale à sa vitesse de disparition; en d'autres mots, la concentration (ES) se trouve dans un état stationnaire puisqu'elle reste constante. Pour expliquer l'état stationnaire, les auteurs considèrent que la constante de régénération de l'enzyme  $k_2$  est beaucoup plus faible que la constante de dissociation du complexe enzyme substrat  $k_{-1}$ , c'est à dire  $k_{-1} \gg k_2$ ; c'est donc la formation du produit qui limite la réaction. Briggs et Haldane ont spécifié que l'équilibre de formation du complexe (ES) n'est pas instantané et que c'est après un délai appelé pré-stationnaire que la concentration du complexe enzyme-substrat reste constante par rapport au temps, moment pendant lequel la concentration du complexe arrive à l'état stationnaire. L'évolution d'une réaction enzymatique peut être évaluée en fonction de la disparition de substrat ou de la formation de produit par rapport au temps, on parle ainsi de vitesse enzymatique ( $v$ ). Si une réaction suit la cinétique expliquée par Michaelis et Menten, la vitesse enzymatique change par rapport à la concentration de substrat, et donne une hyperbole rectangulaire où l'on observe deux étapes tel qu'illustré à la Figure 2.

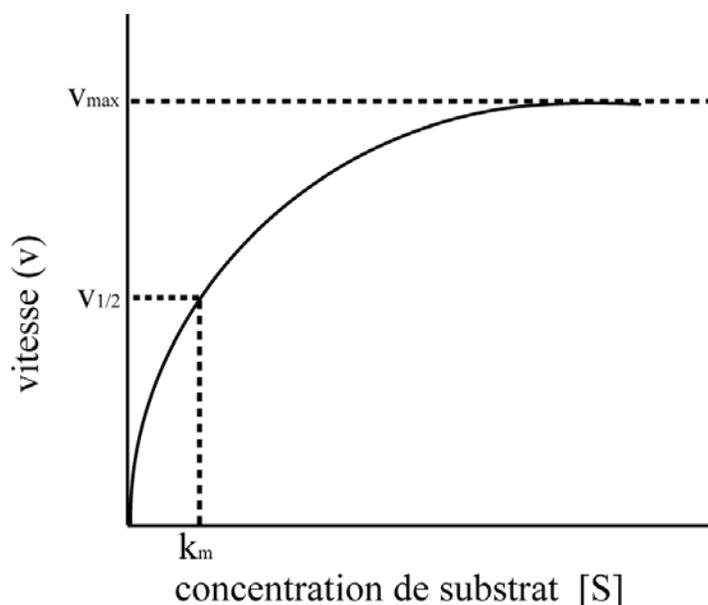


Figure 2. Réaction qui suit la cinétique de Michaelis et Menten. Adapté de (24).

Dans la première étape, la quantité de substrat limite la vitesse de transformation de l'enzyme. Le phénomène s'explique si l'on tient en compte que l'enzyme a une vitesse maximale de transformation ( $v_{\max}$ ); ainsi, à faibles concentrations de substrat, celui-ci prend plus de temps pour entrer en contact avec l'enzyme et former le complexe enzyme-substrat que le temps que le complexe prend pour former les produits; conséquemment, une certaine quantité d'enzyme se trouve toujours en solution sans être utilisée. Dans la deuxième étape, la concentration de substrat commence à excéder la capacité de transformation de l'enzyme. Ainsi, une fois que l'enzyme devient disponible, une nouvelle molécule de substrat entre en contact avec elle pour former le complexe enzyme-substrat. Si on prend une moyenne des espèces en solution, le complexe enzyme-substrat prédomine et peu d'enzyme se trouve disponible en solution puisqu'elle se trouve en tout temps occupée à transformer le substrat. On dit alors que l'enzyme se trouve saturée et la vitesse ne change

plus par rapport à la concentration de substrat. Quand l'enzyme est saturée, la vitesse maximale ( $v_{\max}$ ) est observable (plateau de la Figure 2).

L'activité enzymatique est une mesure de la vitesse de réaction; elle est utilisée pour quantifier les systèmes enzymatiques quand mesurée en conditions de vitesse maximale. On utilise l'activité enzymatique à la place de la concentration enzymatique car cette valeur ne représente pas forcément le nombre d'enzymes actives. En effet, les enzymes sont des molécules très sensibles aux changements, ce qui entraîne leur désactivation sans forcément produire leur désintégration.

#### ***1.3.1.1.2 Équation de Michaelis et Menten***

Michaelis et Menten ont représenté mathématiquement le comportement cinétique des enzymes par l'équation suivante :

$$v = v_{\max} [S] / (K_m + [S]) \quad [2]$$

$$K_m = (k_2 + k_{-1}) / k_1 \quad [3]$$

Dans cette équation, les constantes  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_{-1}$  sont réunies dans une seule constante [3], appelée constante de Michaelis et Menten ( $K_m$ ) en l'honneur des auteurs. À partir de cette équation, on voit que, quand  $K_m$  augmente, il faut une concentration plus grande de substrat pour arriver à la moitié de la vitesse maximale (voir la Figure 2).

Cette équation aide à mieux comprendre l'affinité de l'enzyme pour son substrat puisqu'elle établit que, quand  $K_m$  augmente, l'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue. Il faut aussi remarquer que  $K_m$  est indépendante de la concentration d'enzymes, elle dépend cependant des conditions cinétiques de la réaction, telles que le pH, la température et la concentration du substrat. D'autre part, les enzymes sont des molécules

sensibles à cause de leur caractère protéinique; leur intégrité peut être affectée notamment par la présence d'interactions électrostatiques (telles que la force ionique de la solution et les interactions avec d'autres protéines), par le stress mécanique (tel que le cisaillement et la centrifugation), par les interactions hydrophobiques/hydrophiliques (telles que celles produites par des changements ou des pertes de solvant) ou par la présence d'agents protéolytiques (tels que d'autres enzymes ou des microorganismes).

Dans la section suivante, on énumère les différents types d'enzymes étudiées par le groupe Rochefort au moment de la rédaction de ce mémoire, et on procède à la description de la laccase, qui est l'enzyme utilisée dans le présent travail. Avant de poursuivre, il faut mentionner que le système décrit par l'équation [2] est valable seulement pour des enzymes à un seul substrat, ce qui n'est pas le cas de la laccase qui est une enzyme à deux substrats : l'oxygène et un médiateur. Afin de simplifier nos calculs, nous avons cependant travaillé dans des conditions qui permettent d'obtenir un seul  $K_m$ . Comme l'oxygène est mise en excès, le réactif limitant est le médiateur à étudier.

### ***1.3.1.1.3 Enzymes étudiées***

Diverses enzymes sont étudiées au sein du groupe Rochefort telles que le glucose oxydase, la laccase, la peroxydase de raifort et la luciférase. Les enzymes sont choisies par pour leur fonctionnalité, leur disponibilité, leur résistance, ou leur possibilité d'accouplement avec un autre système de reconnaissance; ce qui consiste à choisir au moins deux éléments de reconnaissance, dont un doit reconnaître la cible et un ou plusieurs autres doivent amplifier et réaliser la transduction du signal. Dans la section suivante, on énumère les différents raisons pour lesquelles la laccase a été choisie dans le cadre de ce travail.

#### 1.3.1.1.4 Laccase

La laccase est une cuproprotéine thermostable de masse molaire comprise entre 50 et 130 kDa qui a été découverte au Japon en 1883 dans les exsudations de l'arbre *Rhus vernicifera*, et qui a été, par la suite, trouvée également dans d'autres organismes tels que les bactéries (*Azospirillum lipoferum*), les insectes (*Manduca sexta*) et surtout dans plus de cent types de levures (*Trametes versicolor*, *Polysporus versicolor*, *T. hirsute*, *T. ochracea*, *T. villosa*, *T. gallica*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polyzona*, etc) (25-30).

La laccase est une glycoprotéine hydrosoluble du groupe des polyphénols oxydases bleues (31), capable d'oxyder un grand nombre des molécules aromatiques, surtout celles du type phénolique, mais aussi quelques molécules du type non phénolique (25). Parmi les molécules oxydables par la laccase se trouvent les benzènediols, les polyamines, les aminophénols, les polyphénols et les lignines. L'oxydation de ces substrats implique la réduction de l'oxygène moléculaire vers eau tel qu'indiqué à la Figure 3.

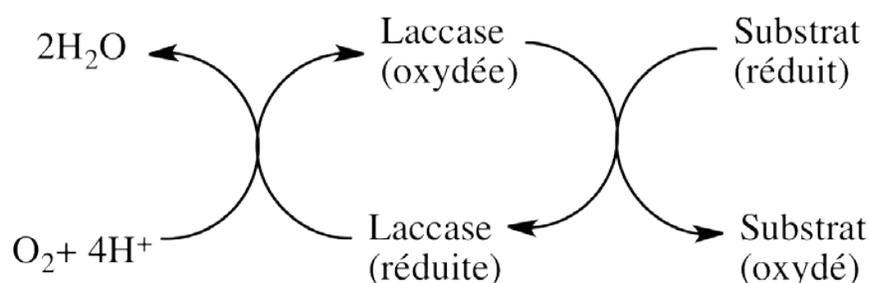


Figure 3. Réaction redox catalysée par la laccase. Adapté de (27, 32).

##### 1.3.1.1.4.1 Site actif de la laccase (cuivres type T1, T2, T3)

La réaction d'oxydoréduction catalysée par la laccase se réalise dans une région appelée site actif (Figure 4), qui contient généralement quatre atomes de cuivre (27). L'arrangement et les liaisons moléculaires des atomes de cuivre jouent un rôle fondamental dans la catalyse des substrats, ces cuivres étant classifiés selon leurs caractéristiques

spectroscopiques et fonctionnelles en trois groupes : type 1 (T1), type 2 (T2) et type 3 (T3). Le groupe T1 inclut un atome de cuivre qui est lié à quatre aminoacides, dont deux sont des histidines, une troisième est une cystéine, qui lui confère une coloration bleue à cause de sa liaison covalente avec le cuivre (absorption à 600 nm), et une quatrième qui est, soit une phénylalanine ou une leucine (quand la laccase provient d'un champignon) ou une méthionine (si la laccase est d'origine bactérienne). Le cuivre T1 est responsable de l'oxydation des substrats grâce à son haut potentiel redox qui va jusqu'à +790 mV par rapport à l'électrode de calomel (27).

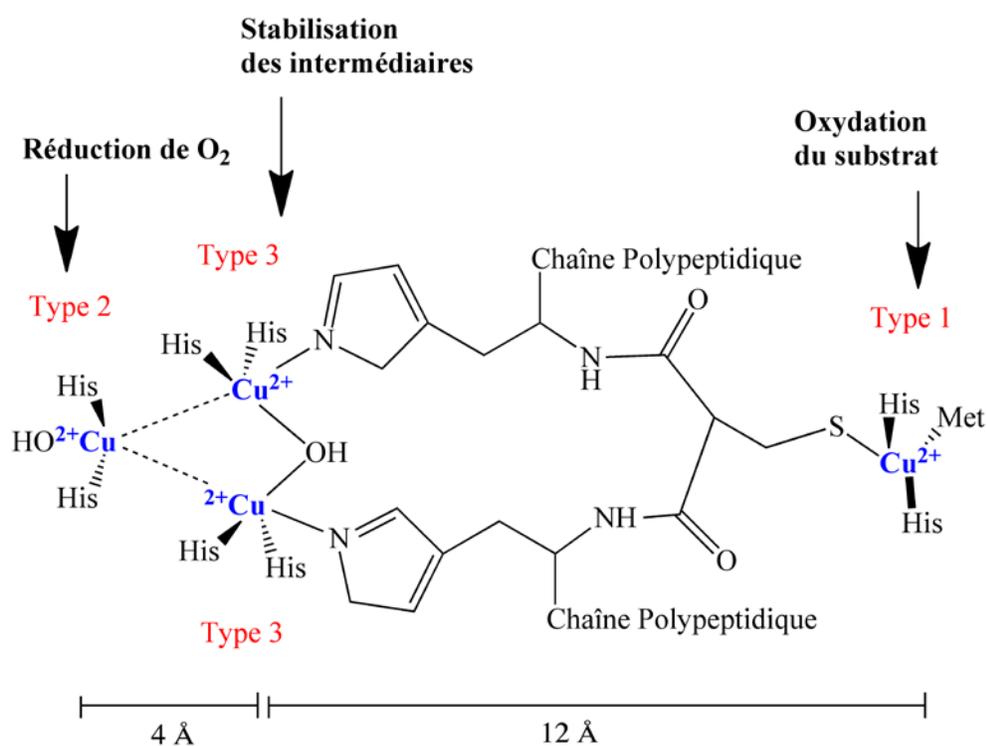


Figure 4. Représentation du site actif de la laccase. Adapté de (25).

Le groupe T2 est composé d'un seul cuivre et le groupe T3 est formé de deux cuivres, formant un cluster responsable de la réduction de l'oxygène. Le cuivre T2, coordonné avec deux histidines et une molécule d'eau (25), présente une faible adsorption dans le spectre visible, mais il a des propriétés paramagnétiques en résonance

paramagnétique électronique (RPE). Les cuivres T3 sont liés à trois histidines et sont reliés entre eux par un hydroxyde (25); ils présentent une adsorption dans leur forme oxydée à 330 nm (27). Il a été démontré que le cuivre T2 est nécessaire pour la réduction de l'oxygène moléculaire tandis que le centre formé par les cuivres T3 est requis pour la stabilisation des intermédiaires de nature peroxyde.

#### 1.3.1.1.4.2 Mécanisme catalytique

Le mécanisme d'action de la laccase consiste en l'oxydation du substrat par le cuivre T1, le transfert des électrons depuis T1 vers le cluster T2/T3 (à une distance de  $\sim 13$  Å) et dans la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Cette réduction implique l'utilisation de quatre électrons en deux étapes : dans la première étape, l'oxygène moléculaire est réduit par le site T2/T3 par l'action de deux électrons pour ainsi produire un peroxyde intermédiaire dont un atome d'oxygène reste lié à T2 et à un des cuivres T3 alors que l'autre atome d'oxygène est lié à l'autre T3. La deuxième étape consiste à réaliser une deuxième réduction à l'aide de deux électrons, ce qui est possible quand les cuivres se trouvent à une distance maximale de 3.3 Å. Cette réduction produit le clivage de la liaison entre les deux oxygènes et la formation d'un intermédiaire dit natif relativement stable, ce qui est la clé de l'efficacité du transfert électronique responsable de la réduction du substrat.

#### 1.3.1.1.4.3 Laccase provenant de *Trametes versicolor*

La laccase provenant de *Trametes versicolor* (diamètre  $\sim 5$  nm (33, 34)) a été choisie comme point de départ pour nos modifications en conditions industrielles, lesquelles incluent des contraintes mécaniques et thermiques, à cause de sa robustesse et de sa thermostabilité ( $t_{op}$  E.C. 1,10,3,2: 45-80 °C (26, 35)). De plus, la laccase présente l'avantage d'être une des enzymes dont le mécanisme de réaction est le plus amplement connu, et en même temps, cette enzyme est une des plus abordables et disponibles sur le marché (26).

Nous utilisons aussi la laccase comme modèle pour construire du papier bioactif à cause de ses propriétés comme biocapteur et sa capacité à désactiver certaines substances toxiques. En effet, la laccase est capable de détecter et d'inactiver d'elle-même un grand nombre de substances toxiques (36-40). Parmi les substances détectables et inactivables, on trouve différents types d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (38, 41) comme le benzopyrène qui est reconnu pour être une des substances les plus cancérigènes (35). La laccase est aussi capable de détecter des inhibiteurs respiratoires tels que les azidures ( $N_3^-$ ) et les cyanures ( $CN^-$ ) (42, 43), et des toxines d'origine naturelle telles que les aflatoxines, qui sont des toxines produites par des champignons et qui sont responsables du cancer du foie. Ces toxines sont hautement répandues dans les céréales ; selon l'agence canadienne d'inspection des aliments, elles sont présentes dans 25 % des récoltes mondiales (44, 45). La laccase représente donc une enzyme très intéressante pour le développement du papier bioactif, elle a été déjà immobilisée pour être utilisée pour des applications industrielles sur différentes surfaces avec des résultats prometteurs (25, 46, 47).

### **1.3.1.2 L'immobilisation des enzymes.**

Même si la laccase est une enzyme très robuste (section 1.3.1.1.3), son activité enzymatique peut être affectée par les conditions de pH, de température et de concentration du substrat (section 1.3.1.1.2) jusqu'à sa totale disparition quand elle est exposée à des conditions extrêmes; d'autre part, la plupart des enzymes sont hautement solubles dans les milieux de réaction où elles doivent agir, ce qui peut entraîner leur perte même avant d'avoir été en contact avec les substrats. L'immobilisation devient donc un aspect critique dans l'utilisation des enzymes comme biocapteurs.

Dans le cas du papier bioactif, les enzymes sont exposées à divers milieux et conditions depuis leur production jusqu'à leur dernière utilisation; en effet, les techniques d'application des substrats existant dans l'industrie impliquent des conditions extrêmes pour la partie protéinique des enzymes, telles que de hautes températures de séchage et des

forces de cisaillement élevées (section 1.4). D'autre part, le papier bioactif est censé être utilisé dans diverses conditions et être capable de maintenir son activité jusqu'à sa dernière utilisation. Il devient donc nécessaire d'augmenter la stabilisation des systèmes enzymatiques face aux conditions impliquées pendant leur implantation sur papier et celles trouvées avant et pendant leur utilisation.

L'immobilisation des enzymes permet de fixer les systèmes enzymatiques à la matrice, ce qui évite leur perte avant leur utilisation et parfois leur réutilisation. D'autre part, plusieurs publications ont démontré l'immobilisation est une alternative pour augmenter la stabilité de l'enzyme (48, 49). En principe, l'immobilisation augmente la stabilité de l'enzyme soit en rendant plus rigide sa structure stéréochimique, soit en l'enfermant dans un milieu qui reste constant; soit par une combinaison de ces deux méthodes. Toutefois, l'immobilisation peut produire l'effet contraire, rendant indisponible le site actif par obstruction ou par modification de sa structure. Parmi les différentes techniques actuelles d'immobilisation d'enzymes (microencapsulation, réticulation et adsorption par liaison ionique ou covalente), la microencapsulation est une technique avantageuse puisqu'elle est capable d'immobiliser un grand nombre d'enzymes du même type ou différents types sans affecter sa configuration stérique (50-52).

Dans le passé, notre groupe a démontré dans diverses publications (32, 34, 53-55) que la microencapsulation était une méthode valide et efficace d'immobilisation d'enzymes sur des surfaces de papier (32, 34, 53, 55). L'immobilisation est assurée en créant des microcapsules d'une taille moyenne de 60  $\mu\text{m}$ , ce qui est suffisant pour éviter la mobilité à travers les pores du papier (1 - 10  $\mu\text{m}$ ); les enzymes sont ainsi immobilisées par voie physique et non chimique.

### ***1.3.1.2.1 La microencapsulation***

Comme plusieurs autres techniques, la microencapsulation constitue une imitation de la nature en prenant comme modèle la cellule (56). La cellule est une entité isolée de son milieu grâce à des membranes semi-perméables qui permettent l'entrée de substrats essentiels ou la sortie des métabolites, tout en bloquant d'autres substances, telles que les éléments structuraux et fonctionnels (ATP, ADN, RNA mitochondrial, etc.), ainsi que certaines molécules dont la cellule n'a pas besoin ou qui peuvent nuire à son bon fonctionnement. Ainsi, la microencapsulation est un ensemble de techniques qui consistent à enrober un produit ou un système à l'intérieur d'une entité individuelle de 1 à 1000  $\mu\text{m}$  de diamètre à l'aide d'une membrane (57).

Cet enrobage est réalisé à des fins structurales ou fonctionnelles qui sont diverses : isolation des éléments du milieu pour les protéger face aux conditions et éléments nuisibles externes, ou à l'inverse, rétention des éléments incorporés qui peuvent être dangereux pour l'environnement (par exemple, les pesticides (58)), concentration des éléments fonctionnels ou essentiels dans un endroit disponible ou à proximité, libération contrôlée des substances, augmentation ou conservation de la stabilité des éléments sensibles à la dégradation, tels que les médicaments, immobilisation ou piégeage des substances dans un matériau pour ainsi les conserver sur place ou les rendre réutilisables et fonctionnalisation du produit ou amélioration de sa présentation comme dans le cas de l'encapsulation de parfums dans l'industrie textile, ce qui permet d'ajouter un effet déodorant aux vêtements (59, 60).

#### **1.3.1.2.1.1 Techniques et étapes de microencapsulation**

La microencapsulation, comme son nom l'indique, peut impliquer la formation de microcapsules, qui sont des sphères creuses remplies de liquide et dont la membrane est solide, comme dans le cas de nos expériences (section 1.3.1.2.1.3); cependant, cette technique peut aussi consister en la formation de microsphères, qui possèdent un cœur et une membrane solides, de liposomes, qui ont une membrane et un cœur liquides, ou de

niosomes, qui sont similaires aux liposomes mais avec une membrane de nature synthétique (60). Les techniques et méthodes de microencapsulation sont très variées. Toutefois, en général, on peut distinguer trois étapes de microencapsulation : l'inclusion du produit, la dispersion de la matrice et la stabilisation du produit de microencapsulation (61):

L'inclusion du produit à l'intérieur de la matrice consiste à diluer, disperser, agglomérer ou adsorber la substance à encapsuler dans un autre composant, sauf quand la substance à encapsuler doit être à l'état pur (57). La dispersion ou pulvérisation de la matrice sert à donner la taille et à séparer les particules qui formeront les microcapsules. Cette étape consiste en général en une séparation des phases liquide/liquide, liquide/air, solide/air, solide/liquide. La dispersion peut être réalisée par nébulisation ou atomisation, ce qui consiste à asperger le produit, ou par émulsification, qui consiste généralement à produire une dispersion en régime turbulent et « prilling », qui est la formation de gouttes à l'aide d'une aiguille ou d'un injecteur (56, 57). La stabilisation de la matrice dispersée ou pulvérisée vise la séparation des produits de microencapsulation (particules) pendant une période de temps appréciable pendant laquelle aucune énergie externe n'est appliquée afin de maintenir la séparation; cette stabilisation est réalisée par des processus tels que la gélatinisation, la coacervation, l'émulsification, l'évaporation, la coalescence, la polymérisation, la polycondensation, la congélation, la vitrification, la cristallisation, la solidification ou l'extraction de solvant (57, 62). La microencapsulation est donc le résultat de la combinaison de ces trois étapes; le choix des techniques dépend de la nature de la matière première à encapsuler et des contraintes du produit final (57).

#### **1.3.1.2.1.2 Exemples d'application de la microencapsulation**

La microencapsulation est utilisée dans plusieurs domaines tels que l'alimentaire, le pharmaceutique, le médical, le textile, le chimique, les biotechnologies, les cosmétiques dans le traitement des déchets, ou pour créer de nouveaux matériaux de construction; dans

l'agriculture, dans l'industrie de la photographie; on l'utilise également dans la fabrication de certaines peintures et en électronique (60).

Comme le nombre d'applications existantes est très élevé, nous ne présentons ici que quelques exemples. Dans le domaine de l'alimentation, la microencapsulation sert à enfermer des parfums, des huiles essentielles, des agents antigels, des nutraceutiques, des probiotiques, des vitamines, afin de donner au produit d'intérêt un goût plus intense et prolongé, ou de lui ajouter une valeur nutritive, ou pour améliorer son apparence, lui faire subir une autre transformation (par exemple ; dans la fermentation des fromages). La microencapsulation sert aussi à conserver plus longtemps les produits en rendant indisponibles les composants faciles à dégrader ou en ajoutant un agent de conservation à libération prolongée. En agriculture, il est possible d'utiliser la microencapsulation pour piéger des pesticides et ainsi augmenter leur temps de libération, diminuer la contamination de l'environnement ou décroître les pertes par évaporation (58). En pharmaceutique, la microencapsulation est utilisée pour produire des médicaments à libération prolongée ou pour les protéger de l'adsorption ou décomposition par le métabolisme. On se sert aussi de la microencapsulation dans le traitement de résidus, comme pour l'épuration des eaux usées, le traitement de déversements de pétrole, etc. (60). Dans le domaine de la construction et des nouveaux matériaux, les microcapsules sont utilisées pour libérer des éléments réparateurs au moment où le matériau est soumis à un stress physique. Ces matériaux appelés aussi auto-cicatrisants sont développés pour des produits divers tels que les peintures, les bétons, les métaux, les polymères, etc. L'utilisation de cette technologie est indispensable surtout dans des cas où la réparation d'un objet reste restreinte, impossible, non déterminable ou dont le coût est trop élevé, par exemple dans le cas des prothèses internes ou des satellites artificiels (63-68).

#### **1.3.1.2.1.3 Microencapsulation par polycondensation interfaciale**

Notre groupe a déjà prouvé que la microencapsulation par polycondensation interfaciale est une technique efficace pour immobiliser des enzymes sur le papier (32, 34, 43, 53, 55, 69). Ce genre de microencapsulation est un procédé qui utilise des conditions de température, de pH et de pression qui sont compatibles avec plusieurs molécules biologiques, ce qui le différencie de la polycondensation en masse dont les conditions sont considérées comme nuisibles pour la plupart de ces molécules (70). La microencapsulation par polycondensation interfaciale utilise la réaction de Schotten – Bauman (71) (Figure 5) à l'interface entre deux liquides immiscibles et dispersés à la façon de gouttelettes, qui sont stabilisées à l'aide d'un tensioactif. La phase aqueuse contient au moins deux polymères complémentaires hydrosolubles tandis que la phase organique contient un chlorure d'acide hydrophobe (57, 72, 73). Lorsque les deux milieux entrent en contact pendant l'étape de dispersion, le réseau de polymère réticulé s'élargit à mesure que les polymères complémentaires migrent vers l'interface.

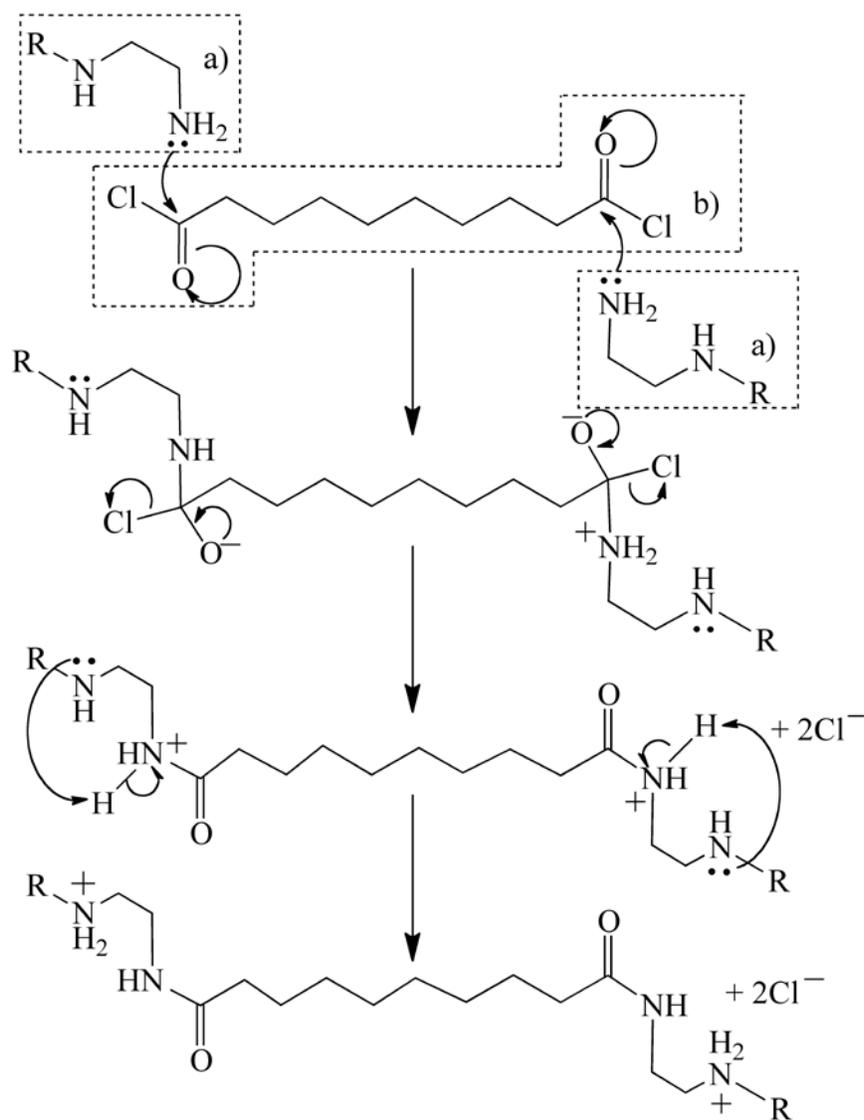


Figure 5. Réaction de Schotten-Bauman pour réaliser la polycondensation interfaciale: a) représente les polymères complémentaires et b) l'acide de sébacoyl. Adapté de (24).

Nous utilisons comme polymère la polyéthylèneimine (PEI, Figure 6), qui est un matériau disponible commercialement à différentes masses molaires et dont la chaîne est composée d'amines primaires et secondaires (34) qui réagissent avec l'acide de sébacoyl

pour créer des liens covalents entre les molécules de PEI, permettant ainsi la formation d'un toile qui, à la fin du processus, génèrera la membrane de la microcapsule.

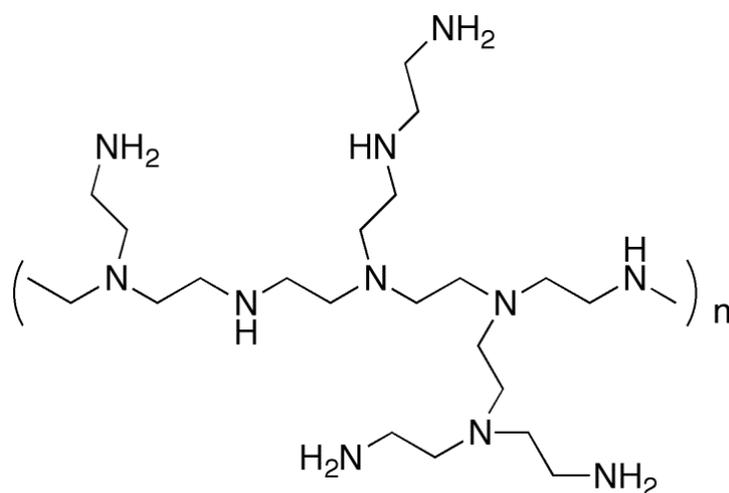


Figure 6. Structure générale de la polyéthylèneimine (PEI).

Au laboratoire Rochefort, deux techniques de dispersion sont disponibles : l'émulsification par action mécanique et le « prilling » par résonance du jet. La technique d'émulsification par action mécanique (utilisée dans ce travail) consiste à disperser le PEI, à l'aide d'une hélice tournante, dans une solution dans laquelle il est insoluble et qui contient du monooléate de sorbitane (émulsifiant span® 85) comme agent dispersant. Tout au long de l'émulsification, il y a formation et destruction des gouttelettes, dont le diamètre moyen ( $\bar{d}$ ), tel que illustré dans l'équation ci-dessous (74), dépend, d'une part, de la constante du système d'émulsion (K) (cette constante tient compte des paramètres tels que le design de l'appareil, le type d'agitateur, l'auto - stabilisation des gouttes, etc.) et, d'autre part, des variables du système telles que le diamètre du récipient ( $D_v$ ), le diamètre de l'agitateur ( $D_s$ ), la vitesse ou la puissance d'agitation (N), la viscosité de la solution aqueuse de polymère ( $v_d$ ), la viscosité de la matrice ( $v_m$ ), le volume de la phase en émulsion par rapport à la matrice (R), la concentration de l'émulsifiant ( $C_s$ ) et la tension superficielle

entre les deux phases ( $\xi$ ) (74). Avec cette technique, le diamètre moyen des microcapsules peut varier entre 5 et 100  $\mu\text{m}$  (34).

$$\bar{d} = k \frac{D_v \cdot R \cdot v_d \cdot \xi}{D_s \cdot N \cdot v_m \cdot C_s} \quad [4]$$

La deuxième technique mise au point dans le laboratoire Rochefort, la microencapsulation par résonance du jet, consiste à faire passer le PEI à travers un injecteur et à couper le jet de la solution aqueuse de polymère par vibration à haute fréquence, ce qui donne lieu à la formation et à la chute des microgouttelettes du polymère dans une solution qui contient l'agent de réticulation (acide de sébacoyl) nécessaire pour la formation de microcapsules par polycondensation interfaciale. Notre groupe a rapporté que cette technique permet l'obtention de microcapsules d'un diamètre moyen de 200  $\mu\text{m}$  (variance de 22 %) et qu'il est possible d'ajuster le diamètre, entre 180 et 260  $\mu\text{m}$ , en ajustant l'ouverture de l'orifice, la viscosité du polymère, la tension superficielle, la concentration de polymère, l'intensité de la dispersion, etc (34).

On a ici choisi la première technique, la dispersion par agitation, parce qu'elle permet la production d'une plus grande quantité de microcapsules que la dispersion par « prilling », ce qui s'avérait essentiel pour produire des microcapsules en quantité suffisante pour réaliser ce travail.

#### ***1.4 Application industrielle des biomolécules***

Tel que mentionné à la section 1.3.1, le papier peut acquérir des propriétés bioactives par l'ajout de biomolécules. Différentes techniques peuvent être utilisées afin de déposer des molécules sur une surface de papier. Cependant, les trois techniques les plus

utilisés dans l'industrie pour leur capacité à modifier des surfaces étendues de papier à haute vitesse et pour leur prix abordable sont : l'incorporation à la pâte à papier, l'impression et le couchage (75-77).

#### **1.4.1 L'incorporation à la pâte à papier**

Cette technique consiste à mélanger les biomolécules avec la pâte à papier avant l'intégration des filaments dans ce qui formera plus tard la surface du papier. Elle peut être considérée comme la plus simple des trois techniques puisqu'elle implique le plus petit nombre d'opérations unitaires à réaliser. Cependant, comme les biomolécules sont ajoutées dans une suspension et non sur une surface sèche, la quantité d'eau à évaporer est très élevée, par conséquent, la possibilité de perdre la fonctionnalité des biomolécules augmente (8, 76).

#### **1.4.2 L'impression**

L'impression est un procédé de marquage par contact qui reproduit une forme prédéterminée sur la surface. Cette technique présente donc l'avantage de pouvoir déposer les biomolécules (21) sur une région spécifique et peut être utilisé pour créer des avertissements visibles suite à la biorecognition (réponse du biocapteur en présence de ses cibles). Comme cette modification peut s'effectuer dans une région bien délimitée du papier, elle permet de réduire la quantité de biomolécules utilisées comme éléments de reconnaissance.

Les biomolécules de reconnaissance sont stabilisées à l'intérieur d'une suspension, dans les conditions optimales pour leur conservation, ce qui permet de les entreposer pendant de longues périodes de temps avant leur application sur le papier. Cette technique, développée au réseau Sentinel (21, 76, 78), offre la possibilité de produire le papier bioactif au fur et à mesure qu'il est requis (78), ce qui évite le gaspillage relié à la surproduction.

### 1.4.3 Le couchage

Le couchage dans l'industrie du papier consiste à étendre une suspension sur une surface de papier brut; cette suspension, appelée aussi sauce de couchage, est composée en général de liants, de pigments et d'additifs, la proportion de chacun de ces composés donnant au papier ses caractéristiques (79). Il existe différents types de couchage, qui peuvent être classés selon la technique utilisée pour étendre la suspension sur le papier. Ainsi, on parle de couchage par rouleau, par barreau, par rideau liquide, par jet et à la lame (79-81). Cette dernière est la technique la plus répandue pour appliquer des suspensions sur des surfaces de papier (77). Le couchage à lame, comme son nom l'indique, utilise une lame qui limite et étend la suspension de couchage sur une longueur continue de papier. Le papier se déplace vers la lame par l'action d'un rouleau rotatif, dont la vitesse de rotation détermine la vitesse d'application de la sauce de couchage (79). L'épaisseur de la couche ou poids de la couche (CWT en anglais) résulte en grande partie de la rigidité de la lame, de la pression exercée sur le papier, de la vitesse d'application et de la nature rhéologique de la suspension appliquée.

Le couchage à lame permet des modifications du papier de haute qualité en utilisant des vitesses d'application au-delà de 1500 m/min (81), ce qui fait du couchage à lame une des techniques les plus rapides de modification sur surface sèche (77, 81). C'est la raison pour laquelle ce genre de technique s'avère intéressante pour des applications où la surface d'analyse est très étendue ou lorsque la production d'échantillons à analyser requiert une production abondante de biocapteurs. Cette technique peut également être adaptée aux besoins du produit puisqu'elle permet le contrôle des paramètres afin d'obtenir une application uniforme et sans patrons indésirables, par exemple, la pression que la lame exerce sur le papier, l'angle d'application, la dureté de la lame, la vitesse d'application, l'épaisseur et la résistance du papier, le temps de séchage, l'intensité de séchage, la porosité du papier et les conditions rhéologiques de la suspension. (82-85).

En résumé, nous avons sélectionné le couchage à lame parce que c'est une technique prometteuse pour le développement du papier bioactif puisqu'elle permet de

réaliser des modifications rapides de grandes surfaces de papier, tout en offrant une plateforme très répandue et adaptable aux procédés industriels conventionnels.

### ***1.5 Développement récents et motivation***

Jusqu'ici, nous avons décrit le papier bioactif, son utilité, son fonctionnement et les différents plateformes servant à sa fabrication. Cependant, tel que mentionné à la section 1.2.2, le papier bioactif développé par le réseau Sentinel n'est pas le seul biocapteur à base de papier en développement dans le monde. En effet, il est possible de trouver différents dispositifs semblables au papier bioactif, avec d'autres appellations telles que : « paper based microfluidic device » (6, 86), « Lab on paper » (86), « paper-based diagnostics and analytical device ( $\mu$ PADs)» (87, 88), « paper based sensor chip » (89, 90), « paper strip biotest » (91), « Paper-Based ELISA » (92), etc., la création d'un biocapteur commercial étant le but visé par tous ces dispositifs (76). C'est pourquoi les cibles recherchées et l'échelle de modification du biocapteur peuvent servir d'indication du niveau de développement des dispositifs étudiés. Comme le dispositif décrit dans ce travail est de nature enzymatique (section 1.3.1), nous limiterons notre révision aux dispositifs de ce type<sup>4</sup>. Tel que montré (Tableau 1), il existe un grand éventail de cibles ou de combinaison de cibles, parmi lesquelles on peut trouver des neurotoxines, des pesticides, des bactéries, des virus, etc. La reconnaissance de pathogènes ou de toxines est l'objectif le plus commun

---

<sup>4</sup> Pour classer les dispositifs, il est possible de tenir compte du type d'agent de reconnaissance utilisé (anticorps, aptamères, enzymes, nanoparticules, cellules, tissus, polymères, virus, etc.) et de la façon dont ils sont immobilisés sur le papier (chimique, physique, biochimique) . Pelton R. Bioactive Paper Provides a Low-Cost Platform for Diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009;28(8):925-42

(76), car elles possèdent un haut potentiel d'application dans différents domaines, comme l'environnement, les diagnostics médicaux, la sécurité au travail, la sécurité nationale, la protection des documents, la santé publique, la chimie analytique, l'emballage des aliments, etc.

Cible	Récepteur	Signal	Échantillon	Support	Méthode d'application
Pesticides organophosphorés (bendiocarbe, carbaryl, paraoxon, malathion)	Acétylcholinestérase,	Colorimétrique	Lait, jus de pomme	Papier Whatman #1	Impression à jet d'encre (21, 78)
E. coli K12	DNAzyme RFD-EC1	Fluorimétrique	Mélange brut de fluides extracellulaires	Papier (non spécifié)	Impression à jet d'encre (93)
Hépatite B (antigène HBsAg)	Arsénate réductase, E. coli, luciférase, $\beta$ -galactosidase	Fluorimétrique	Sérum de boeuf	Papier chromatographique	Impression thermique (88)
E. coli O157:H7	Peroxydase de raifort, T4 phages	Colorimétrique	Culture en agar d' <i>E. Coli</i>	Papier à couché léger <sup>5</sup>	Impression par rotogravure (94)
Glucose, bilirubine, urobilinogène, cétones, nitrites, protéines, pH, érythrocytes, leucocytes	Peroxydase de raifort	Colorimétrique	Urine	Papier Whatman, papier bond	Couchage par rideau liquide. photolithographie, stylo à cire, impression. (95, 96)
Antigène gp41 (HIV-1)	Phosphatase alcaline, anticorps anti-humane IgG	Colorimétrique	Sérum humain	Papier chromatographique	Photolithographie (92)

Tableau 1. Exemples des biocapteurs à base de papier développés entre 2010 et 2011.

---

<sup>5</sup> Light weight coating (LWC)

On observe (Tableau 1) que la plupart des recherches sont dirigées vers l'utilisation de l'imprimerie comme méthode d'immobilisation. Une originalité de notre projet est qu'il propose l'utilisation du couchage à lame pour ajouter les systèmes enzymatiques sur le papier. Ainsi, la laccase, une enzyme prometteuse pour la détection de différentes substances toxiques (section 1.3.1.1.4), est utilisée comme modèle pour évaluer la technique de couchage à lame. En même temps, nous évaluons la microencapsulation comme méthode d'immobilisation de la laccase, appliquée à grande échelle. À notre connaissance, c'est la première fois que le couchage à lame d'enzymes est utilisé pour créer un papier bioactif.

### ***1.6 Présentation du projet de recherche et objectifs***

Ce projet, soutenu par le réseau Sentinel, a comme objectif général la création et le développement du papier bioactif. Les applications visées touchent les domaines de la santé (santé publique et diagnostics), de l'alimentation (emballages et assurance de qualité des aliments) et de la sécurité (anticontrafaçon de documents et biodéfense). Le dispositif doit être capable d'éliminer toxines et pathogènes (section 1.2). Afin d'avertir de la présence de ces cibles au grand public, il doit émettre un signal facilement interprétable et perceptible par les sens humains (section 1.3.1). Comme il s'agit d'un produit commercial, il est de grande importance de réussir sa production à grande échelle et à un prix abordable. L'utilisation des méthodes conventionnelles de l'industrie papetière vise à atteindre ce dernier objectif.

Nous proposons l'utilisation du couchage à lame afin d'inclure des éléments de reconnaissance de type enzymatique sur le papier. Cependant, le couchage à lame implique des conditions extrêmes pour la partie protéique des enzymes, telles que de hautes températures de séchage et des forces de cisaillement élevées. La microencapsulation, une technique d'immobilisation éprouvée par notre groupe, sera utilisée afin d'accroître la stabilité des enzymes face aux conditions trouvées pendant le couchage à lame. Ainsi, les

objectifs du travail présenté ici sont, d'une part, d'évaluer la possibilité d'implantation du couchage à lame (section 1.4.3) comme méthode de modification du papier bioactif et, d'autre part, évaluer si la microencapsulation est une méthode efficace d'immobilisation d'enzymes dans des conditions semblables à celles utilisées commercialement. Nos travaux démontrent qu'il est possible d'utiliser le couchage à lame à grande échelle afin d'appliquer des systèmes enzymatiques et ils dévoilent que la microencapsulation augmente le temps de vie utile du biocapteur et sa résistance face à la présence d'ions azidure, qui est un inhibiteur du site actif de l'enzyme (97).

Jusqu'ici, nous avons présenté les raisons qui nous ont conduit à nous intéresser au couchage à lame comme méthode d'application et la microencapsulation comme système d'immobilisation des systèmes enzymatiques, et ce, en tenant toujours compte de notre objectif. Nous présentons au prochain chapitre les techniques expérimentales qui nous ont servi à atteindre nos objectifs. La première section (2.1) expose les étapes de préparation du matériel et des réactifs utilisés; la deuxième section (2.2) montre les méthodes de modification utilisées à partir du couchage à échelle laboratoire jusqu'aux modifications à l'échelle industrielle, pour compléter ce chapitre, la section (2.3) présente les analyses réalisées afin de déterminer la présence des microcapsules dans le papier et d'évaluer l'activité des enzymes immobilisées.

Nous présentons nos résultats et la discussion au chapitre 3, qui est divisé en trois sections avec nos observations dans un ordre croissant d'échelle de modification, c'est-à-dire, échelle laboratoire, petite échelle et grande échelle. Cette toute dernière section est présentée en langue anglaise puisqu'elle a été utilisée à des fins de publication dans le périodique scientifique « Chemical Engineering Science ». Finalement, un dernier chapitre présente nos conclusions et les perspectives de développement du papier bioactif qu'elles inspirent.

## 2 Partie expérimentale

### 2.1 Préparation des solutions et des microcapsules

Nous énumérons ici les différents réactifs utilisés et nous expliquons la méthode de préparation des solutions et suspensions qui ont été requises tout au long de nos expériences.

#### 2.1.1 Réactifs

La polyéthylèneimine (PEI, Mn : 1200 g mol<sup>-1</sup>, 50 % H<sub>2</sub>O), le chlorure de sébacoyl (SC, purum), le span 85, l'acide citrique (réactif conforme aux spécifications de l'American Chemistry Society - A.C.S.), le phosphate de sodium dibasique heptahydrate (réactif A.C.S.), le chlorure de sodium, le fluorure de sodium, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), l'azide de sodium, le para-phénylènediamine (PPD) et la laccase provenant de *Trametes versicolor* (code de la commission d'enzymes (EC) : 1.10.3.2) ont été obtenus chez SIGMA Aldrich.

Le cyclohexane (A.C.S.) provient de J.T. Baker, l'2-hydroxyéthylamidon nous a été donné par de Pendfort Products, et le papier sans bois (55 g/m<sup>2</sup>, 5-25% filaments) nous a été donné par le Centre international du couchage.

De l'eau désionisée provenant d'un système de purification MilliQ (18 MΩ cm) a été utilisée pour préparer toutes les solutions.

#### 2.1.2 Préparation des solutions et suspensions

##### 2.1.2.1 Solutions tampons

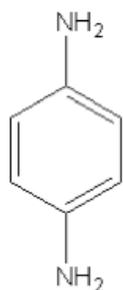
Parce que l'activité enzymatique dépend des conditions de pH, les expériences qui requéraient une quantification de cette activité ont été réalisées en utilisant des milieux tamponnés. Pour ce faire, la solution tampon McIlvaine a été choisie car elle peut se

stabiliser dans l'intervalle de pH compris entre 2.6 et 7.6, qui est l'intervalle de pH optimal (3.5-7.0) de la plupart des laccases (98). La solution McIlvaine reste stable pendant plusieurs jours (à la différence des solutions qui ont un point d'évaporation faible, tel que l'acide acétique présent dans les tampons acétates) en conditions standard et est compatible avec les différents substrats utilisés dans nos expériences (32, 34, 53-55).

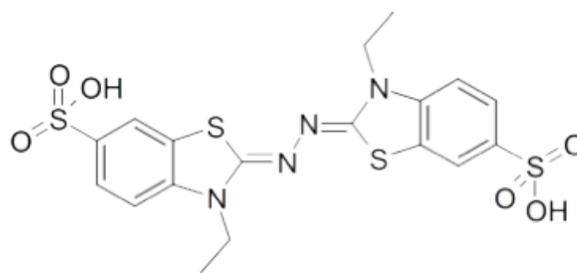
Les solutions tampons ont été préparées de façon hebdomadaire, selon les indications de la littérature (99), en ajoutant peu à peu une solution d'acide citrique 0.1 M (acide faible) dans une solution de phosphate diacide de sodium 0.2 M (base conjuguée) sous agitation constante, jusqu'à obtenir le pH désiré ( $\pm 0.1$ ) à l'aide d'une électrode de verre.

### 2.1.2.2 Substrats

Le p-phénylènediamine (PPD) et le 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS), représentés à la Figure 7, ont été préparés par dilution, dans une solution tamponnée.



PPD



ABTS

Figure 7. Structure moléculaire du PPD et de l'ABTS.

Les solutions d'ABTS ont été conservées pendant un maximum de quinze jours à 4 °C, alors que les solutions de PPD ont été conservées pendant un maximum de trois heures. Ces produits ont été utilisés comme substrats de la laccase parce qu'ils produisent un

changement de couleur visible en présence de la laccase (mauve pour le PPD et vert pour l'ABTS) et parce que leur quantification est facile, par des méthodes directes et indirectes tel que présenté à la section 2.3.3.

### **2.1.2.3 Solubilisation de l'enzyme**

La quantité d'enzyme à utiliser a été pesée par rapport à son activité spécifique (selon l'activité spécifique massique indiquée par le fournisseur), puis rehydratée en utilisant des solutions tamponnées (section 2.1.2.1) optimales pour son activité. Toutes les solutions ont été filtrées afin d'enlever les particules insolubles en utilisant un filtre à base de fibres de borosilicate (taille de 1 $\mu$ m) à chaque préparation.

## ***2.2 Techniques de synthèse, modification et application***

Cette deuxième section de la partie expérimentale vise à présenter la technique d'immobilisation (microencapsulation) et les différents procédés d'application utilisés, lesquels ont été réalisés dans un ordre croissant d'échelonnage.

### **2.2.1 Microencapsulation**

Tel que présenté à la section 1.3.1.2.1.3, nous utilisons la technique de microencapsulation par polycondensation interfaciale sous agitation mécanique. Pour ce faire, nous avons adapté la méthode décrite par Poncelet et al. (70), qui consiste en trois étapes, Figure 8 :

Dans la première étape, dite d'inclusion (section 1.3.1.2.1.1), 200 U/mL d'enzyme dilué dans 10 mL de solution tampon à pH 8.5 (section 2.1.2.3), sont mélangé avec 1 ml de PEI pendant au moins 1 min avec un agitateur magnétique dans un bécher de 50 mL. La

solution obtenue est alors versée dans un bécher de 250 mL contenant un volume de 50 ml de solution organique composée de 95.3 % de cyclohexane et de 4.7 % de monooléate de sorbitane (émulsifiant span® 85). Le tout est réalisé sous agitation constante à 1200 rpm à l'aide de l'agitateur mécanique.

Pendant la deuxième étape, appelée de dispersion (sous agitation continue) (section 1.3.1.2.1.1), se produit un phénomène de formation et de destruction des gouttelettes au sein de l'émulsion. Comme la taille des microcapsules dépend de l'équilibre, l'agitation se poursuit pendant 15 minutes afin d'obtenir des microgouttelettes de taille plus homogène.

Finalement, pendant la troisième étape, dite de stabilisation, 10 ml d'une solution de chlorure de sébacoyl en cyclohexane (1 :10) est ajouté à l'émulsion qui continue à être sous agitation constante; le chlorure de sébacoyl et le PEI entrent en contact grâce à l'agitation, ce qui résulte en la polycondensation du PEI à l'interface des gouttelettes (voir la section 1.3.1.2.1.3). La réaction se poursuit pendant 5 minutes afin d'assurer la formation et la solidification de la paroi des microcapsules, puis l'émulsion est filtrée sous vide à l'aide d'un entonnoir Büchner muni d'un papier Whatman® numéro 4 (pore de 20-25 µm) et rincée avec ~400 ml de cyclohexane, ce qui cause l'arrêt de la réaction et enlève les résidus de sébacoyl. Un rinçage postérieur avec 2 L d'acide citrique (0,01 M) sert à enlever les résidus aqueux tels les chlorures et l'enzyme non étrapée par les microcapsules; ce rinçage en conditions acides assure la charge positive des microcapsules, ce qui contribue à les disperser. Les microcapsules obtenues dans ces conditions ont une taille moyenne de 30 µm (voir la section 2.3.2.1) et un poids humide de 18 g. Elles sont alors entreposées dans des

contenants fermés, soit à 4 °C, soit à la température ambiante, selon les besoins d'expérimentation<sup>6</sup>.

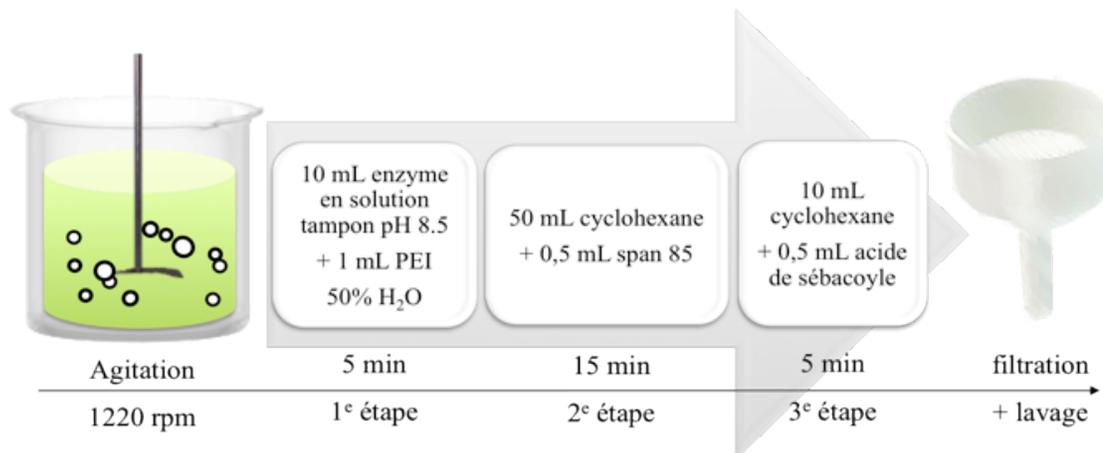


Figure 8. Étapes de préparation des microcapsules.

Le volume de synthèse décrit ci-dessus nous a permis d'obtenir des microcapsules en quantité suffisante pour nos expériences à petite échelle, mais pas pour les expériences de couchage à grande échelle (voir la section 2.2.2.3). L'augmentation du diamètre de l'agitateur ainsi que du volume de synthèse et d'émulsion nous a permis d'ajuster la production des microcapsules à grande échelle, sans trop affecter la morphologie et la taille des microcapsules. Ainsi, en augmentant de 30 fois le volume de synthèse et d'émulsion et en utilisant un agitateur deux fois plus grand (diamètre : 8 cm), nous avons obtenu 500 g des microcapsules (poids humide) d'une taille de 60 µm.

---

<sup>6</sup> Les microcapsules entreposés pendant des temps supérieurs à une semaine ont été rangés dans des contenants dont le volume était de 1.5 ml afin de réduire la variation du poids par évaporation d'eau.

## **2.2.2 Couchage**

Cette section explique les différentes méthodes utilisées pour appliquer les enzymes sur le papier. Des essais ont été réalisés à l'échelle laboratoire, puis dans des conditions recréant la production à petite et à grande échelles.

### **2.2.2.1 Échelle laboratoire**

#### ***2.2.2.1.1 Couchage des microcapsules avec l'amidon***

Afin d'immobiliser les microcapsules sur le papier, l'amidon a été choisi comme liant dû à ses propriétés rhéologiques hautement adaptables (100). L'amidon est aussi préféré à cause de sa non-réactivité avec la laccase (101) et parce que, en terme de poids, c'est l'encollant liant le plus répandu dans l'industrie papetière (102), ce qui est souhaitable si on veut reproduire les conditions trouvées dans l'industrie. Il existe différents types d'amidon sur le marché (naturel et modifié) dont les plus courants dans l'industrie papetière sont ceux provenant de la pomme de terre, du maïs, du blé ou du tapioca.

Les propriétés rhéologiques dépendent de plusieurs facteurs tels que la longueur des chaînes d'amylose (action encollante), les ramifications d'amylopectine (effet épaississant), la charge nette, le niveau d'oxydation (pouvoir dispersant), les types et le niveau des substitutions chimiques (degré de viscosité, hydrophobicité et autres interactions). De l'usage de l'amidon résulte une suspension hautement modifiable et adaptable à un grand nombre d'applications. Nous avons choisi le 2-hydroxyéthylamidon à cause de sa charge neutre, afin de réduire d'éventuelles agglomérations des microcapsules chargées positivement.

Les suspensions servant de base à la sauce de couchage ont été préparées moins de 24 heures avant la réalisation des applications. Cette préparation consiste à mélanger

l'amidon dans l'eau distillée<sup>7</sup> dans une proportion de 25 à 33 %. La suspension est chauffée à 80 °C dans un bain thermostaté pendant 30 minutes afin de faire gélatiser l'amidon. À la fin du processus de réchauffement, la suspension était retirée du bain thermostaté et laissée à refroidir à la température ambiante dans un récipient fermé, puis agitée à 800 rpm pendant 5 min, afin de l'homogénéiser. La viscosité a été mesurée dans tous les cas à l'aide d'un viscosimètre Brookfield (section 2.3.1.1) et ajustée par addition d'eau distillée.

Le couchage a été réalisé sur des feuilles de papier Bond<sup>8</sup> de 9 cm x 21,5 cm avec 3-10 mL de suspension en utilisant une machine à couchage (marque GARDCO® modèle DP-1218L) comprenant une plaque en verre et un barreau applicateur en acier-nickel de 15,24 cm de longueur (numéro de série 110607-20) avec une épaisseur humide de la couche de 0,15 mm (selon les spécifications du fournisseur). Ces enductions ont été réalisées afin de déterminer les limites de concentration pour lesquelles l'amidon est capable de coller les microcapsules sur le papier et afin de trouver les paramètres de viscosité qui mènent à des applications uniformes à l'œil nu.

#### ***2.2.2.1.2 Couchage des enzymes (échelle laboratoire)***

Après avoir déterminé les paramètres pour lesquels l'amidon est capable de fixer les microcapsules sur la surface de papier (section ci-dessus), nous avons procédé en laboratoire à des expériences d'enduction du papier en utilisant des suspensions contenant des enzymes libres et encapsulées.. Les suspensions avec enzymes ont été préparées en utilisant comme base une suspension d'amidon gélatinisé de 25 à 33 % de matières solides

---

<sup>7</sup> Pour ce faire, il faut incorporer l'amidon lentement dans l'eau en l'agitant; nous avons utilisé un agitateur mécanique à hélice et une vitesse de 800 rpm; une fois tout l'amidon incorporé, l'agitation se poursuivait pendant 5 min.

<sup>8</sup> Papier tout usage de haute qualité à poids de base entre 50-75 g/ m<sup>2</sup>

(section 2.2.2.1.1), laquelle a été modifiée en ajoutant entre 1 et 10 mL de l'enzyme hydratée (section 2.1.2.3) quand il s'agissait d'enzymes libres, ou entre 0 et 80% de matières solides quand il s'agissait d'enzymes microencapsulées. Les additions d'enzymes libres et encapsulés ont été réalisées à agitation constante de 800 rpm pendant une période de deux minutes à l'aide d'une hélice à quatre lames pour assurer l'homogénéité des suspensions. La concentration à l'intérieur des microcapsules a été fixée à  $700 U_{\text{laccase}}^9/\text{g}$  de capsule et nous avons appliqué 5 mL de ces suspensions en utilisant une machine à coucher de la marque GARDCO® (ACCU-LAB modèle DP-1230A, Figure 9) sur du papier kraft blanchi (9 cm x 21,5 cm ), choisi à cause de son faible contenu en lignine (101).



Figure 9. Machine à coucher ACCU-LAB modèle DP1230A.

Le modèle DP-1230A a été privilégié par rapport au modèle DP-1218L pour appliquer les enzymes parce qu'il permet de contrôler la pression exercée au moment de l'application, ce qui permet d'obtenir des couchages plus homogènes et reproductibles que le modèle DP-1218L grâce à son barreau applicateur fixé à un support mobile (Figure 9). La procédure d'application est simple et peut se diviser en trois étapes, dont la première

---

<sup>9</sup> 1 U est la quantité d'enzymes nécessaire pour transformer 1  $\mu\text{mol}$  de catéchol par minute (pH 4.5 et 25 °C)

consiste à fixer une feuille de 10.80 x 13.97 cm<sup>2</sup> sur le support à papier; ensuite, 5 mL de suspension sont déposées<sup>10</sup> à l'aide d'une seringue le long du barreau applicateur et, finalement, la suspension est appliquée sur le papier en déplaçant le support mobile jusqu'à l'autre extrémité (voir la direction d'application dans la Figure 9). Une fois les applications réalisées, le papier est séché à la température ambiante. Ensuite, on évalue l'activité enzymatique en utilisant la cellule à oxygène (section 2.3.3.1) ou le changement d'intensité de couleur (section 2.3.3.2.2), et ce, dans un délai maximal de 24 h après l'application.

## 2.2.2.2 Petite échelle

### 2.2.2.2.1 *Contrôle des paramètres rhéologiques et d'application*

Une fois démontrée la possibilité d'appliquer les enzymes par des techniques de laboratoire, nous avons testé la suspension en utilisant une machine à coucher automatisée du Département de génie chimique de l'Université McGill<sup>11</sup>. Cette machine, appelée « Laboratory coater-dryer facility » (LCDF), a l'avantage de produire des applications hautement reproductibles et dont certains paramètres tels que les forces parallèles et perpendiculaires auxquelles est soumis le papier pendant l'application ressemblent à ceux trouvés dans l'industrie (14). Les composantes de cet appareil sont représentées sur le schéma de la Figure 10; ces composantes entrent facilement dans une boîte à outils, mais l'appareil dans son ensemble est loin d'être portable car les éléments permettant son fonctionnement, tels que le moteur de l'applicateur, le four de la chambre à séchage, le compresseur d'air et les contrôles occupent la totalité d'un laboratoire (~90 m<sup>2</sup>).

---

<sup>10</sup> Une pellicule transparente de 3 x 10.80 cm<sup>2</sup> déposée entre la suspension et le papier empêche le contact avant de commencer l'application.

<sup>11</sup> En collaboration avec le groupe de W. Douglas, membre du réseau Sentinel.

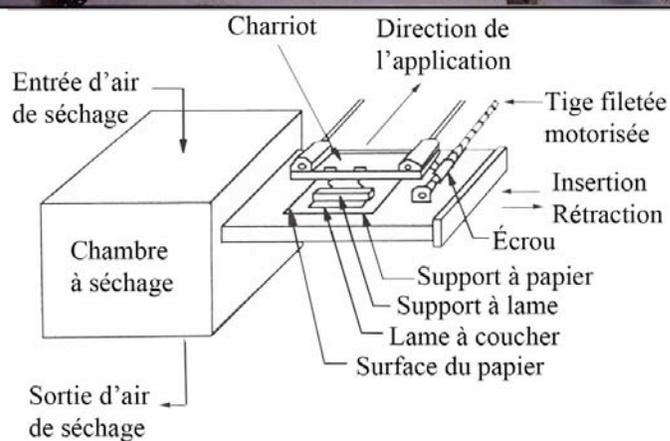


Figure 10. Photo et schéma de la machine à couchage LCDF.

Le principe d'application est le même que celui des machines à coucher vues dans les sections antérieures. Cependant, comme les forces et les vitesses utilisées sont différentes, la suspension est soumise à des forces de cisaillement plus intenses, ce qui pourrait affecter l'intégrité des microcapsules. Pour vérifier si ces paramètres peuvent modifier l'activité enzymatique, nous avons appliqué des suspensions de 45 à 55 % de

matières solides, d'une viscosité comprise entre 1775 et 6337 cP<sup>12</sup>, sur des feuilles de papier de 200 cm<sup>2</sup> (170 x 120 mm), à l'aide d'une lame mobile placée à 45° par rapport à la surface du papier. La lame se déplace à une vitesse de 100 m/min et applique une force de 61 N; une fois la lame hors de la surface du papier, le support à papier (Figure 10) se déplace pour insérer celui-ci à l'intérieur d'une chambre à température ajustable. Le papier est alors séché par une injection d'air à la température ambiante afin de diminuer les pertes d'activité enzymatique qui sont reliées à la dénaturalisation thermique. L'application de la suspension est réalisée en 0.1 s tandis que le processus global dure 0.3 s. Les expériences qui ont été réalisées avaient pour but de trouver les conditions rhéologiques optimales et d'observer si l'activité était affectée quand les enzymes libres et encapsulées étaient soumises à un stress mécanique relativement important.

### **2.2.2.3 Grande échelle**

#### ***2.2.2.3.1 Test quantitatif : contrôle des paramètres d'application***

Le « Cylindrical Laboratory Coater », modèle 7000 (CLC), voir la Figure 11, a été sélectionné pour appliquer les suspensions sur le papier. Le CLC permet le couchage des papiers de façon reproductible en utilisant des paramètres et conditions trouvés dans l'industrie tels que la vitesse d'application et la température de séchage (82, 83). Tel que présenté à la Figure 11, le CLC est composé d'un rouleau rotatif qui déplace le papier dans la direction de la suspension, qui est alors transférée et étendue par une lame. La pression entre la lame et le papier détermine l'épaisseur de la couche; on peut donc ajuster le poids de la couche et le cisaillement en fonction de la suspension utilisée (83, 103); le début et la fin de l'application sont contrôlées à l'aide d'une paroi amovible.

---

<sup>12</sup> Brookfield DV-II + Pro, tige 7, 50 rpm, 23 °C.

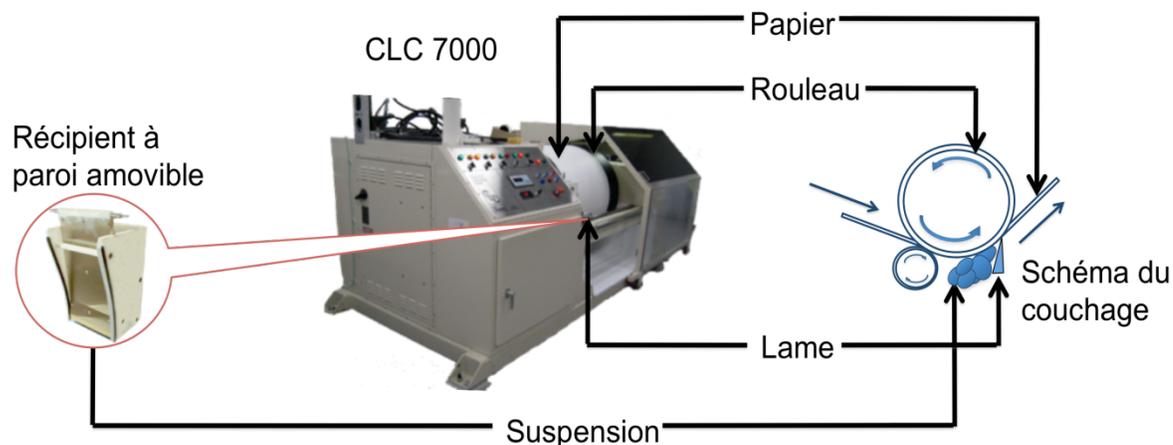


Figure 11. Schéma représentant les éléments principaux du CLC.

Nos expériences de couchage ont été réalisées sur des sections de papier de  $0.75 \times 3$  m, papier dont le grammage est de  $53 \text{ g/m}^2$ . Afin d'éviter les interactions entre la lignine et la laccase, nous avons sélectionné du papier provenant d'une pâte chimique (104). Le séchage a été réalisé en utilisant une lampe à rayons infrarouge (IR) dont la puissance a été ajustée à 36 kW.

Les paramètres du CLC ont été ajustés (103) aux propriétés rhéologiques de la sauce de couchage afin de permettre une application homogène et de pouvoir tester l'activité enzymatique par rapport à la vitesse d'application, la concentration d'amidon, le recouvrement enzymatique et le temps de séchage. Ainsi, on a fait varier l'écart entre la lame et le papier de 0.05 à 1.27 mm; le papier a été préséché à 29 kW pendant 10 s, puis la sauce de couchage appliquée à des vitesses de 500 et 800 m/min; finalement, le papier a été séché par intervalles de 0 à 30 s, un séchage plus long n'a pas été nécessaire car le papier était complètement sec au bout de 30 s.

Le poids de la couche a été mesuré en tenant compte de la masse initiale du papier et de la masse suite à l'application: nous avons obtenu des poids de couche de  $4 \text{ g/m}^2$  pour la suspension contenant des enzymes non encapsulées et entre 7 et  $33 \text{ g/m}^2$  pour la suspension contenant des enzymes encapsulées. Après le couchage, le papier a été découpé

en morceaux de 10 x 30 cm<sup>2</sup> pour pouvoir calculer le poids de couche; le papier ainsi découpé a été conservé à la température ambiante pour réaliser les évaluations d'activité par rapport au temps d'entreposage.

## ***2.3 Caractérisation***

### **2.3.1 Suspensions et solutions**

#### **2.3.1.1 Viscosité**

La viscosité des suspensions a été déterminée à l'aide d'un viscosimètre à cisaillement rotatif, provenant de la compagnie BROOKFIELD (modèle DV-II + Plus), lequel est muni de tiges de contrainte de type RV. Le viscosimètre a été sélectionné pour sa facilité à être transporté, puisque nos expériences se sont déroulées dans trois laboratoires différents<sup>13</sup>.

La procédure de mesure a été développée en tenant compte des caractéristiques techniques du viscosimètre (105), en utilisant toujours des contenants identiques (bêcher en verre Pyrex de 600 mL) et en travaillant toujours aux mêmes volume et à la même température (400 mL à 23 °C). L'insertion de tiges servant à prendre les mesures a été réalisée par immersion semi-horizontale pour éviter l'introduction de bulles d'air dans la suspension, ce qui aurait pu produire des variations de viscosité et fausser les résultats<sup>14</sup>. Après avoir préparé l'appareil, on a laissé la suspension reposer au moins une heure avant

---

<sup>13</sup> Aux laboratoires des groupes Rochefort (Université de Montréal), Douglas (McGill) et au Centre de recherche en pâtes et papiers (UQTR).

<sup>14</sup> Une variation de la viscosité peut être signe d'un problème d'homogénéisation de la suspension à cause, par exemple, de l'agglomération des microcapsules ou de la rétrogradation de l'amidon.

la prise des mesures parce que les suspensions d'amidon ont un comportement non-newtonien, ce qui veut dire que la viscosité de la solution dépend de la vitesse de cisaillement, des conditions d'écoulement et de la concentration des solides en suspension (106). On a ensuite pris les mesures 5 s après le début de la rotation de la tige afin de normaliser les lectures.

### **2.3.1.2 pH des solutions**

Le pH a été mesuré en utilisant un pH-mètre (Acumet, modèle 20, de la marque Fisher Scientific) après avoir étalonné l'appareil avec des solutions tampons standard de pH 4, 7 et 10. Les mesures ont été réalisées en agitation constante à la température ambiante jusqu'à arriver à une lecture stable. Entre chaque lecture, l'électrode a été rincée à l'eau et conditionnée avec la solution à caractériser, sans laisser l'électrode en dehors des solutions pour une période prolongée.

## **2.3.2 Présence, taille et distribution des microcapsules**

### **2.3.2.1 Taille et dispersion des microcapsules**

Compte tenu que la grandeur et la dispersion des microcapsules jouent un rôle important dans l'obtention de suspensions homogènes et, par conséquent, dans la qualité et l'apparence des applications, on a procédé à des analyses de la taille et de la dispersion des microcapsules afin de s'assurer de leur répartition homogène avant leur mise en suspension. Les observations au microscope permettent de mesurer la taille des particules, mais ce type d'observation reste limité quand l'échantillon est formé de particules de tailles très variées, comme dans le cas de nos microcapsules (coefficient de dispersion de 39%), parce que les mesures évaluent une particule à la fois (en série). Il est ainsi plus pratique d'utiliser une technique capable de mesurer la taille de plusieurs particules en même temps afin de diminuer le temps d'analyse et d'améliorer la représentativité des mesures.

Afin d'atteindre cet objectif, et compte tenu du nombre de microcapsules produites (20 - 500 g), nous avons choisi de mesurer la taille des microcapsules en utilisant une technique de diffraction de la lumière. Le principe de fonctionnement consiste à irradier les particules avec un faisceau laser. Le chemin optique du faisceau est dévié selon la taille des particules qu'il frappe (voir la Figure 13); on peut ainsi évaluer la taille et la distribution d'un ensemble de particules simultanément, ce qui est un avantage par rapport aux observations directes (p.ex. en utilisant le microscope à fluorescence) où les particules sont mesurées une à la fois. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un appareil de diffraction de la lumière de marque HORIBA (modèle LA950, Figure 12); ce type d'appareil permet de mesurer des particules d'une taille comprise entre 0.2 et 2000  $\mu\text{m}$ , ce qui est adéquat pour analyser nos microcapsules qui ont un diamètre moyen de 60  $\mu\text{m}$ .

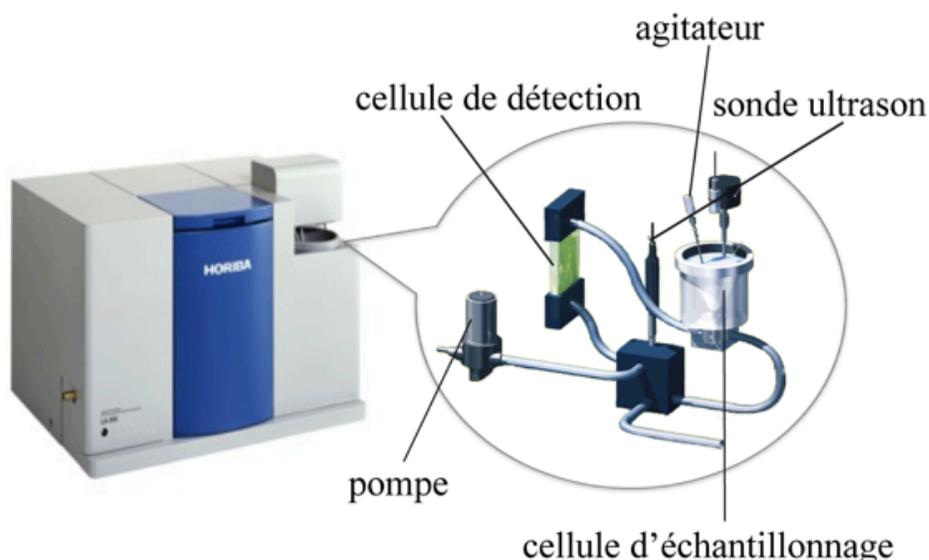


Figure 12. Schéma de l'HORIBA (LA950) montrant le parcours de l'échantillon depuis la cellule d'échantillonnage jusqu'à la cellule de détection.

La procédure d'analyse de cet appareil est basée sur le phénomène de diffraction d'un faisceau lumineux par une particule. Comme cette diffraction varie en fonction de la taille des particules et de la longueur d'onde du faisceau lumineux, elle peut se classer en

trois types : Rayleigh, Mie et Fraunhofer. Ainsi, quand les particules sont plus petites que la longueur d'onde utilisée, on parle de la diffraction de Rayleigh; s'il s'agit de particules de taille semblable à la longueur d'onde, on est en présence d'une diffraction de Mie; si elles sont plus grandes, il s'agit de diffraction de Fraunhofer. Comme les microcapsules de ce travail ont une taille de  $60\ \mu\text{m}$ , ce qui est largement supérieur aux longueurs d'onde utilisées ( $405$  et  $633\ \text{nm}$ )<sup>15</sup>, le mode Fraunhofer prédomine. Dans la diffraction de Fraunhofer, l'angle de diffraction est plus grand quand la taille des particules est plus petite et la diffraction n'est pas influencée par les propriétés optiques de l'échantillon (Figure 13a). Afin d'analyser la lumière diffractée dans tous les angles, le design de l'appareil inclut des détecteurs tout autour de l'échantillon (Figure 13b).

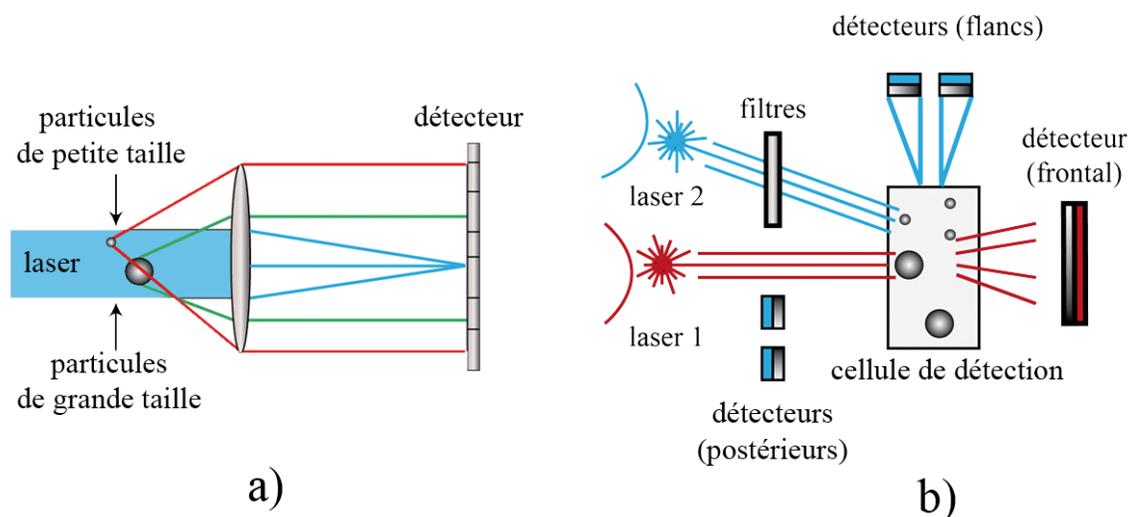


Figure 13. a) Angles de diffraction dans la diffraction de Fraunhofer, b) positionnement des détecteurs dans l'appareil HORIBA LA950.

<sup>15</sup> L'utilisation de deux spectres, à courte et grande longueurs d'onde, élargit l'intervalle des tailles analysables par l'appareil.

L'analyseur de la taille des particules utilisé permet de réaliser des mesures sur des échantillons secs ou humides. Cependant, comme les microcapsules sont remplies d'eau, elles changent de taille en fonction de leur taux d'humidité. Ce qui nous intéresse est de connaître la taille et la distribution à l'intérieur de la suspension de couchage (milieu humide). Les expériences ont été réalisées en dispersant 0.5 g de microcapsules dans 10 mL d'eau.<sup>16</sup> L'échantillon est introduit dans la cellule d'échantillonnage (Figure 12) et soumis à une agitation mécanique et à des ultrasons afin de disperser le plus possible les microcapsules avant de commencer les mesures. L'ultrason est ensuite arrêté et on démarre la pompe de circulation, ce qui amène l'échantillon<sup>17</sup> vers la cellule de mesure dont les deux faisceaux lumineux traversent la solution. Comme la diffraction de Fraunhofer prédomine, la taille des microcapsules est directement proportionnelle à la lumière diffractée et inversement proportionnelle à l'angle de dispersion (voir la Figure 13a). La concentration ou fraction volumique ( $q$ ) est calculée par la suite comme un rapport entre la lumière transmise et la lumière diffractée. Information additionnelle au sujet de la taille et sphéricité des microcapsules sont obtenues à partir de la différence de transmittance entre les deux faisceaux lumineux. Finalement ces résultats sont graphiques (Figure 14), ce qui permet d'obtenir la taille moyenne (colonnes en rouge) et la distribution des microcapsules (trait bleu).

---

<sup>16</sup> Afin d'assurer la propreté de la cellule et d'effectuer le blanc, une mesure de diffraction est réalisée dans le milieu de dispersion avant d'introduire l'échantillon dans la cellule de l'appareil.

<sup>17</sup> Vitesse de circulation entre 5 et 10 A.U. pour des particules entre 10-500  $\mu\text{m}$  selon le protocole d'utilisation de l'appareil.

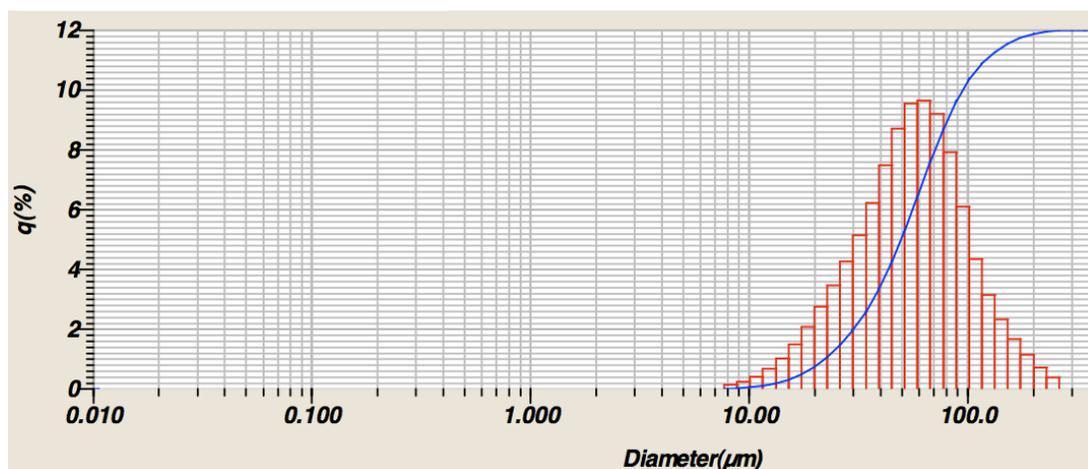


Figure 14. Distribution du diamètre des particules mesuré par diffraction de la lumière.

### 2.3.2.2 Présence des microcapsules sur le papier

Pendant la procédure de couchage, la suspension est étendue sur le papier à l'aide d'une lame. Si l'espace entre la lame et le papier est trop étroit, la suspension ne s'étend pas sur le papier, ce dont on se rend compte immédiatement puisque le papier reste sec. Si l'espace entre la lame et le papier est assez large pour laisser passer la suspension, mais trop étroit par rapport à la taille des microcapsules, le papier est humide, mais aucune microcapsule n'est présente. Afin de vérifier la présence de microcapsules, deux techniques peuvent être utilisées: la microscopie à fluorescence et le test de Kaiser.

#### 2.3.2.2.1 Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence est une technique directe et efficace pour observer la présence des particules microscopiques présentes sur des surfaces opaques. Cette technique est intéressante dans nos analyses parce qu'elle permet d'observer la distribution, la forme et la taille des microcapsules immobilisées sur le papier. Cependant, comme les microcapsules ne sont pas fluorescentes à l'origine, il faut les modifier en ajoutant un agent fluorescent capable de les mettre en évidence par microscopie de fluorescence. À cet effet,

nous utilisons la fluorescéine isothiocyanate (FITC,  $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ ), qui contient un groupe isothiocyanate qui réagit avec les amines (Figure 15), ce qui permet de marquer la PEI (34) qui est le constituant principal des microcapsules (section 1.3.1.2.1.3). En effet, le PEI contient 25% d'amines primaires, 50 % d'amines secondaires et 25 % d'amines tertiaires (55). Pour modifier le PEI, 6 mg de FITC<sup>18</sup> ont été ajoutés à une solution de PEI<sup>19</sup> de 0.6 mg/mL de PEI, opération suivie d'une mise en incubation de 4 h en absence de lumière, afin d'éviter la désactivation du FITC par photoblanchiment. Les microcapsules ainsi préparées sont entreposées dans des contenants opaques à 4° C pendant une période maximale de 24 h avant la synthèse des microcapsules et leur application sur le papier.

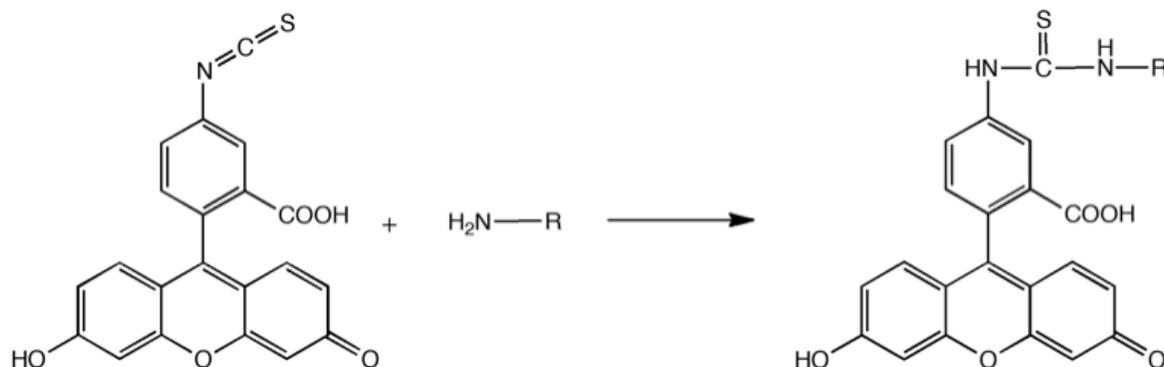


Figure 15. Réaction de conjugaison entre le FITC et les amines primaires.

Les observations se font donc après le couchage des microcapsules modifiées avec le FITC. Pour préparer les échantillons, le papier est découpé en languettes de  $1.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$  et examiné sous le microscope à fluorescence (marque Olympus BX61, Figure 16), et les microcapsules sont révélées en excitant le FITC grâce à l'utilisation d'une lumière ayant

<sup>18</sup> Dans 0.120 mL de sulfoxyde de diméthyl (DMSO)

<sup>19</sup> Dissoudre 2 mg de FITC dans 0.2 mL de sulfoxyde de diméthyle (DMSO) et ajouter ce mélange à 2 mL de PEI tamponné à pH=8.5

une longueur d'onde de 488 nm. Ces observations permettent de corroborer la présence ou l'absence de microcapsules sur le papier couché<sup>20</sup>.



Figure 16. Microscope à fluorescence (Olympus BX61).

#### 2.3.2.2.2 *Test de Kaiser*

Le test de Kaiser a été choisi pour analyser la présence des microcapsules pour les expériences à grande échelle, étant donné l'impossibilité de modifier des microcapsules avec le FITC en quantité suffisante à une telle échelle. Ce test consiste à révéler la présence des amines primaires et secondaires par addition de ninhydrine à pH 5.5 (Figure 17), puisque la ninhydrine est capable de réagir avec les amines du PEI utilisé pour former la paroi des microcapsules en donnant un produit appelé pourpre de Ruhemann ( $\lambda_{\max} = 570$  nm) (107-109).

---

<sup>20</sup> Cependant, l'observation directe de l'état des microcapsules est limitée car les microcapsules se trouvent entre une surface de papier et une couche d'amidon.

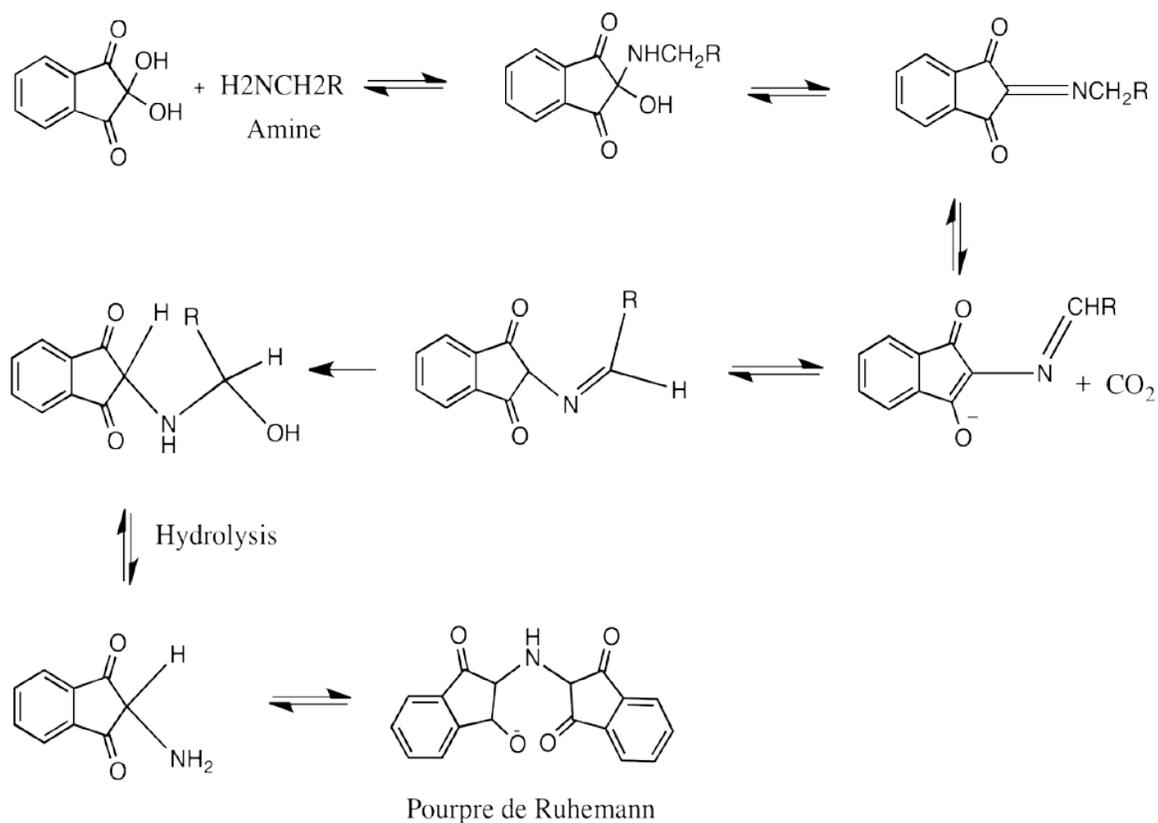


Figure 17. Mécanisme de réaction pour la formation du pourpre de Ruhemann. Adapté de (109).

### 2.3.3 Activité

Les mesures décrites ci-dessous nous ont permis d'analyser l'activité des enzymes par rapport aux conditions telles que le pH, la force ionique, la concentration de substrat, l'inhibition enzymatique ainsi que par rapport aux conditions utilisées pendant le couchage telles que la température de séchage, la couverture enzymatique, la vitesse d'application et la viscosité de la suspension.

### 2.3.3.1 Cellule à oxygène

Cette technique permet de suivre l'activité enzymatique de façon directe puisque la transformation des substrats est reliée à la consommation d'oxygène :



Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une cellule à oxygène (marque Rank Brothers, modèle Digital 10, voir la Figure 18), qui permet le suivi de la concentration d'oxygène dans une solution du fait que la cellule à oxygène est formée d'une électrode de platine. En effet, en fixant le potentiel de l'électrode au potentiel normal de réduction de l'oxygène (60 mV), il est possible de suivre la variation de la concentration d'oxygène dans une solution. Pour ce faire, ~2.7 mL de solution tampon McIlvaine sont placées à l'intérieur de la cellule à oxygène, puis injectées d'air purifié<sup>21</sup> pendant environ 15 min afin de saturer la solution en oxygène (~7.95 mg/L à 25 °C); une fois la saturation achevée, la concentration d'oxygène est normalisée comme étant 100%.

---

<sup>21</sup> La procédure avec de l'air purifié permet l'obtention de solutions saturées d'oxygène plus stables que celles obtenues avec de l'oxygène purifié, du fait que la pression partielle d'oxygène dans l'air purifié est semblable à la pression partielle atmosphérique.

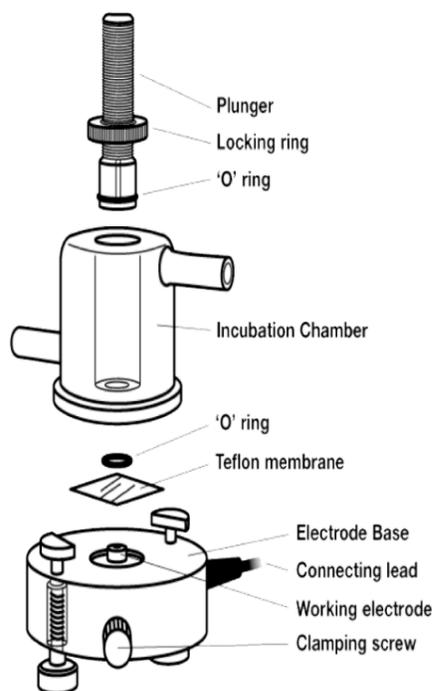


Figure 18. Constituants de la cellule à oxygène. Tiré de la référence (110).

Lorsque l'enzyme et le substrat (PPD) sont ajoutés à la solution saturée, il est possible d'observer une diminution de la concentration d'oxygène ( $\%O_2$ ) dans la solution par rapport au temps (trait noir à la Figure 19). Compte tenu de ces données, une nouvelle courbe est tracée (trait gris) à partir du moment où l'enzyme et son substrat sont ajoutés, jusqu'au moment où un coefficient de corrélation de 0.99 est obtenu (zone des traits pointillés), l'activité enzymatique étant évaluée comme étant la pente de cette nouvelle courbe.

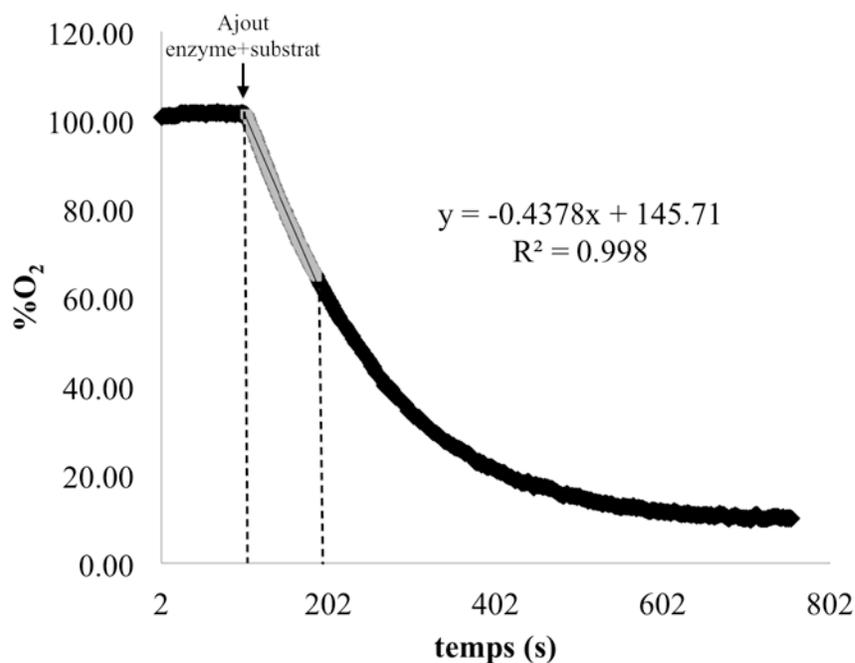


Figure 19. Diminution du pourcentage d'oxygène en solution tampon McIlvaine (pH=5.5), après l'ajout de 50 µL de laccase (10 U/mL) et 600 µl PPD (5 mM). Adapté de (111).

### 2.3.3.2 Adsorption de lumière et intensité de couleur

#### 2.3.3.2.1 Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une technique qui permet l'évaluation de l'activité enzymatique dans un court intervalle de temps<sup>22</sup> (5-20 min) (112). Le principe d'analyse repose sur le changement de l'absorbance de la lumière d'un substrat chromophore; dans le cas de nos expériences, il résulte du contact du substrat avec la laccase. Nous avons

---

<sup>22</sup> Le temps de préparation des réactifs pour nos expériences est court puisqu'elle requiert seulement de dissoudre le substrat dans une solution tamponnée et d'ajouter l'enzyme. Le temps d'analyse est court et réalisable en environ 15 min par échantillon.

sélectionné l'ABTS (Figure 7), qui est un des substrats de référence les plus répandus dans la littérature, pour suivre l'activité enzymatique de la laccase (113-118).

L'ABTS donne un seul produit d'oxydation [6] dont la formation est facile à suivre par spectrophotométrie; en effet, l'ABTS oxydée absorbe la lumière à une longueur d'onde de 420 nm ( $\xi_{420} = 3.60 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) (32). Comme cette transformation est proportionnelle à l'augmentation de l'absorbance, il est possible de se servir de l'équation de Beer-Lambert ( $A = \xi l C$ )<sup>23</sup> pour calculer la concentration du produit d'oxydation. Une fois cette concentration calculée, il est possible d'obtenir l'activité enzymatique, qui représente la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer une micromole de substrat par minute.



Pour réaliser les mesures, nous avons utilisé un spectrophotomètre de la compagnie Thermo (modèle Nicolet Evolution 100) et des cellules en verre optique. Une solution tampon de 2.7 mL est placée dans deux cellules, puis dans l'appareil pour réaliser un blanc. Ensuite, l'enzyme et le substrat sont ajoutés et les lectures à longueur d'onde fixe à 420 nm sont réalisées. La variation de l'absorbance est calculée automatiquement par l'appareil grâce au changement de la transmittance, ce qui permet l'obtention d'une courbe (Figure 20, traits noirs). Ensuite, une nouvelle courbe (Figure 20, traits gris) est tracée à partir du premier point (0 s) jusqu'au dernier point dont un coefficient de corrélation de 0.99 est obtenu, la pente de cette courbe donnant l'activité enzymatique. Il faut noter que ce traitement est semblable à celui qu'on a utilisé pour obtenir l'activité enzymatique à la section précédente.

---

<sup>23</sup> Dans l'équation, « A » représente l'absorbance, «  $\xi$  », l'absorptivité molaire,  $l$ , le chemin optique et « C », la concentration (mol/L).

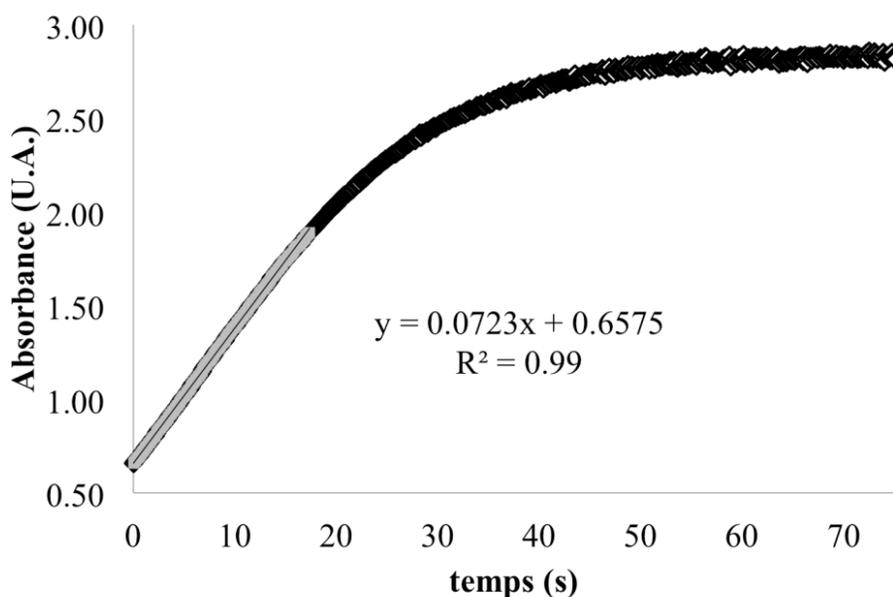


Figure 20. Augmentation de l'absorbance ( $\lambda = 420$  nm) après l'addition de 50  $\mu$ L d'ABTS 10 mM dans 3 mL de solution de laccase 0.05 U/mL (pH 5.5 à température ambiante). Données brutes (points noirs) et données traitées afin d'obtenir l'activité enzymatique (points gris).

### 2.3.3.2.2 Numérisation

Étant donné que le papier bioactif doit produire un signal colorimétrique, nous avons développé une technique qui permet l'analyse du changement de couleur par rapport au temps qui utilise des images numérisées prises en série. Cette technique consiste en l'évaluation de l'intensité de la couleur du papier lorsqu'un substrat chromophore, tel que le PPD, est ajouté. Nous avons choisi le PPD (Figure 21) à cause de son apparente non-réactivité avec la paroi des microcapsules (32) et le haut contraste que ses produits

d'oxydation (couleur mauve) présentent sur le papier (couleur blanche)<sup>24</sup>. En effet, tel que montré à la Figure 21, le PPD donne plusieurs oligomères colorés selon son niveau d'oxydation (53, 111). L'évaluation de l'activité en termes d'unités (U) n'est pas possible en utilisant cette technique. Cependant, comme la concentration des produits mauves augmente par rapport au temps d'exposition au papier enzymatique, il est possible d'analyser l'activité en termes d'intensité de couleur par rapport au temps.

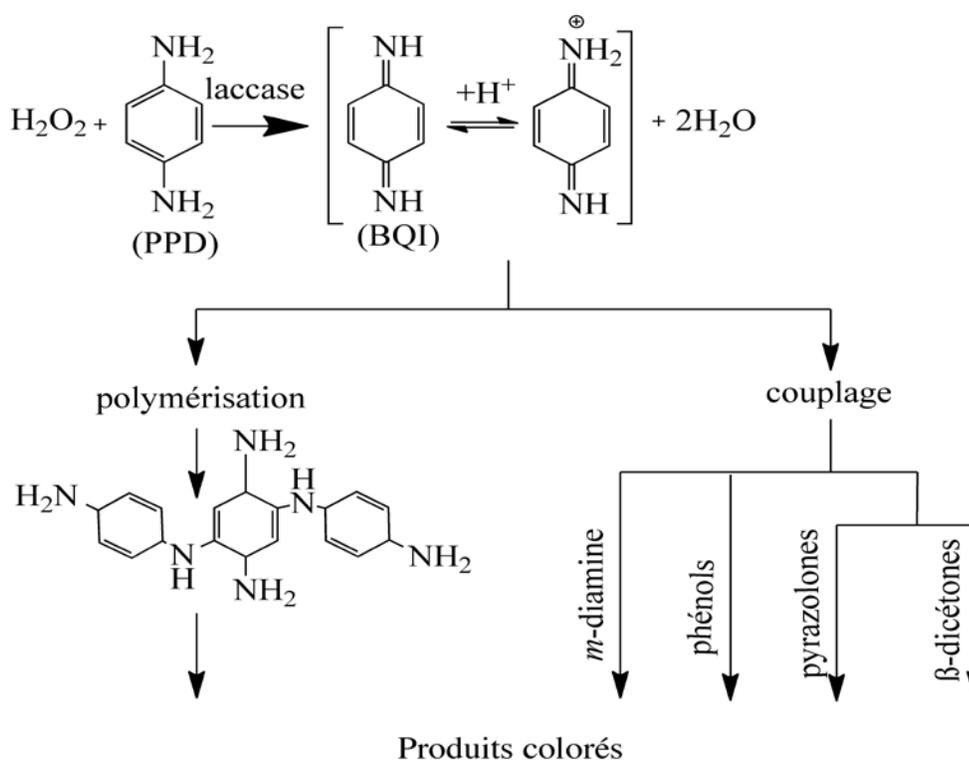


Figure 21. Produits d'oxydation du PPD. Adapté de (111).

<sup>24</sup> L'ABTS n'est pas utilisée pour analyser le papier modifié car sa charge négative [5] l'empêche de diffuser librement à travers la membrane de PEI qui est chargée positivement et qui est la composante principale des microcapsules; de plus, la PEI est un agent réducteur de l'ABTS et, par conséquent, il n'y a pas de formation de couleur visible.

Cette technique basée sur la mesure de la luminosité des pixels de chaque image présente l'avantage de permettre l'analyse de plusieurs échantillons en même temps dans les mêmes conditions expérimentales. De cette façon, le changement d'intensité de couleur du PPD oxydé varie par rapport au temps d'exposition aux enzymes. Afin de réaliser ces mesures, les échantillons de papier couchés, avec la laccase ont été découpés en disques de 8 mm de diamètre et fixés à un scanner de bureau (EPSON NX100), puis additionnés de 10  $\mu$ L PPD (10 mM) à l'aide d'une micropipette. Tous les échantillons ont été recouverts d'un plastique afin d'éviter l'évaporation des substrats pendant la prise d'images. La numérisation s'est accomplie en format JPEG (8 bits, 150 ppp) ce qui permettait d'obtenir le meilleur rendement de vitesse et qualité d'image. Le format d'enregistrement a été réalisé en niveau de gris afin de standardiser et de réduire les paramètres d'analyse. Les mesures ont été réalisées sur des intervalles compris entre 5 et 10 min jusqu'à 120 min. La reproductibilité a été assurée grâce à l'utilisation d'un programme d'automatisation (5.3) développé pendant ce cycle d'études. Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel « Photoshop® suite CS4 Extended » muni d'une extension d'automatisation développée pendant la même période d'expérimentation. Le changement d'intensité de couleur du PPD oxydé varie par rapport au temps de zéro (blanc pur) jusqu'à 255 (noir total). (Figure 23).



Figure 22. Exemple de numérisation des échantillons.

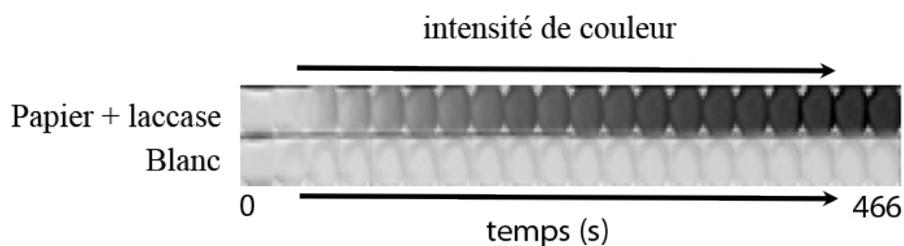


Figure 23. Changement d'intensité de la couleur du papier couché avec la laccase après l'addition de 10  $\mu$ L du PPD (10 mM), pH = 4.5 à la température ambiante.

Les données de changement d'intensité de couleur par rapport au temps sont mises en graphique pour analyse. Afin d'analyser l'activité enzymatique, une nouvelle courbe est tracée (points gris) de façon semblable à celle montrée à la section 2.3.3.1 afin d'obtenir un coefficient de corrélation de 0.99. Finalement, l'activité enzymatique est évaluée à partir de la pente de cette nouvelle courbe.

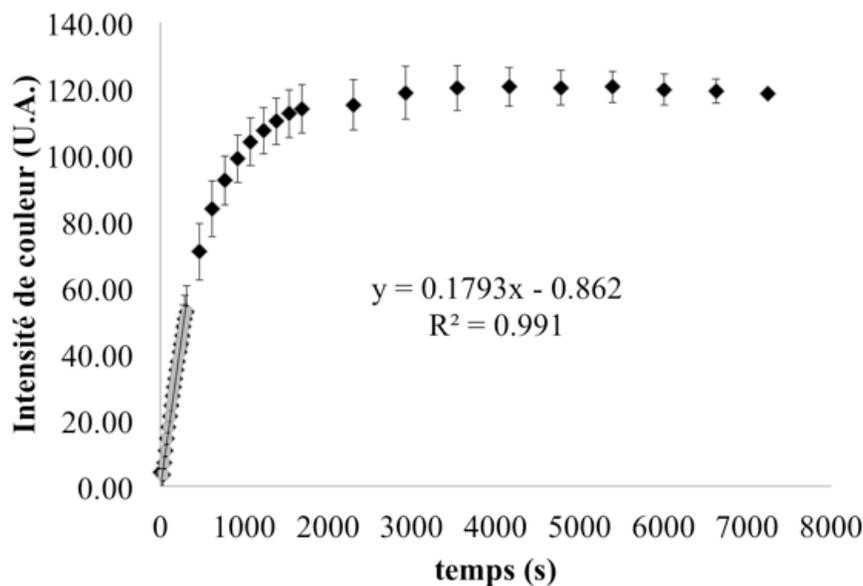


Figure 24. Activité enzymatique du papier suite à l'addition de 10  $\mu\text{L}$  du PPD (10 mM, pH = 4.5, température ambiante) : intensité de couleur par rapport au temps (points noirs) et courbe obtenue à partir de ce changement, dont le coefficient de corrélation est de 0.99 (points gris).

L'utilisation de cette technique est très avantageuse car elle nous permet d'analyser 100 échantillons en 1 h, temps requis auparavant pour évaluer 2 échantillons dans la cellule à oxygène et quatre avec le spectrophotomètre.

### 3 Résultats et discussion

Compte tenu que l'objectif du projet est d'évaluer la microencapsulation comme méthode d'immobilisation d'enzymes par couchage à grande échelle, on présente dans ce chapitre les résultats qui nous ont permis d'obtenir les enductions à grande échelle. Dans la première section on évalue la capacité de la microencapsulation à augmenter la stabilité des enzymes par rapport au temps; dans la deuxième section, on évalue le bénéfice obtenu par la microencapsulation et sa possible élimination à cause du couchage sur le papier (le couchage à échelle laboratoire et à petite échelle sont évalués). Finalement, dans la troisième section on évalue si la microencapsulation à grande échelle de couchage. Comme les résultats obtenus dans cette dernière section ont été utilisés dans un article scientifique, ils sont présentés en langue anglaise.

#### *3.1 Effet de la microencapsulation sur l'activité enzymatique*

Tout d'abord et avant d'appliquer l'enzyme sur le papier, il est important de connaître l'effet de la microencapsulation sur l'activité enzymatique. Pour pouvoir comparer les enzymes libres et encapsulées, il faut travailler dans les conditions optimales de pH, de température, de force ionique et de concentration de substrat, c'est-à-dire dans des conditions de vitesse enzymatique maximale (section 1.3.1.1.1), quand les conditions du milieu sont les plus favorables pour l'activité enzymatique. Nous présenterons ensuite une comparaison des conditions optimales de la laccase libre et encapsulée.

Comme avant-propos, nous tenons à mentionner que les mesures ont été réalisées à l'aide de la cellule à oxygène avec une concentration de 0.22 U/mL d'enzymes libres et 3.82 U/mL d'enzymes microencapsulés. Cela dit, l'activité spécifique de la laccase microencapsulée,  $U/g_{\text{microcapsule}}$ , a été calculée à partir de la quantité d'enzymes qui a été ajoutée pendant le processus de polycondensation interfaciale. La quantité d'enzymes ajoutée est fixée par l'expérimentateur et est arbitraire; elle résulte de la quantité nécessaire pour produire une lecture exploitable pendant le temps d'expérimentation (~15 min).

Comme cela ne tient pas compte de la quantité d'enzymes capturée à l'intérieur des microcapsules ni du nombre d'enzymes qui ont été désactivées<sup>25</sup> pendant le processus de microencapsulation, il n'est pas possible de comparer directement l'activité enzymatique puisque l'enzyme ne se trouve pas dans les mêmes proportions. Afin de pouvoir comparer l'activité des enzymes, nous avons exprimé l'activité sous la forme d'activité normalisée; ainsi, la vitesse de réaction enzymatique prépondérante est établie comme étant 100% de l'activité normalisée, ce qui nous permet de comparer le nombre d'enzymes actives plutôt que la teneur d'enzymes ajoutées.

### **3.1.1 Conditions optimales de la laccase**

#### **3.1.1.1 Température**

Les réactions enzymatiques sont favorisées par l'augmentation de la température due à l'augmentation des mouvements moléculaires et au nombre de collisions moléculaires. Cela vaut jusqu'à ce que la conformation structurale de l'enzyme ne soit pas affectée, produisant sa dénaturation de façon réversible ou irréversible, la première impliquant la rupture des liaisons intramoléculaires à faible énergie comme les liaisons hydrogène (20 kJ/mol) et la deuxième impliquant la rupture des liaisons covalentes (400 kJ/mol) (119). Le phénomène est plus complexe si on tient compte que la dénaturation dépend aussi du temps pendant lequel l'enzyme est exposée à une certaine température (temps d'incubation). Par exemple, la température optimale de la laccase a été rapportée comme étant de 70 °C; cependant, elle perd 75% de son activité après 20 minutes d'incubation (35) et il est ainsi possible de trouver différentes températures optimales selon le temps d'incubation choisi et ce seulement pour le cas de la laccase (26). Ajoutons à cela

---

<sup>25</sup> Enzymes immobilisées à l'intérieur des microcapsules, mais qui ne possèdent plus de caractéristiques catalytiques.

que le médiateur (substrat) peut être affecté par la température (120), ce qui peut produire ou accélérer d'autres types de réactions, par exemple l'auto-oxydation. Il est très difficile de déterminer tous les paramètres catalytiques impliqués dans la variation de la température et « en général, peu d'importance est accordée aux études de la dépendance à la température de quelque paramètre de Michaelis et Menten que se soit sans que la signification de ce paramètre en termes de mécanisme catalytique ne soit connue » (119). Pour simplifier les analyses, la température d'expérimentation a été fixée à 27 °C. Cette température a été choisie parce que l'activité de la laccase *Trametes versicolor* y reste relativement stable pendant le temps d'analyse (~30 min); en effet, la laccase conserve 60 % de son activité après 20 h en solution tampon de citrates à cette température (121).

### 3.1.1.2 Force ionique

Quant à la force ionique (I), elle agit sur l'activité enzymatique en affectant la charge des molécules impliquées. Les enzymes et, par conséquent, le site actif des enzymes, sont composées d'acides aminés possédant différentes charges. D'autre part, plusieurs substrats contiennent des groupements fonctionnels qui leur confèrent aussi une charge (122). Par conséquent, le rapport activité enzymatique-force ionique n'est pas toujours le même, même si certaines distributions de charge favorisent les catalyses réalisées pour une enzyme, alors qu'elles les réduisent pour une autre (120). Pour augmenter la force ionique, il est nécessaire d'augmenter la concentration de chaque ion ( $C_i$ ). Pour cela, il suffit d'augmenter la concentration d'un sel quelconque dans le milieu [7]. Comme conséquence les interactions entre les charges des espèces présentes se réduisent suite à son interaction avec les charges des ions ajoutés ( $Z_i$ ) (120). Cependant, il faut noter que certains sels peuvent jouer un rôle inhibiteur de façon indépendante de la

variation de la force ionique<sup>26</sup>. Par exemple, le chlorure de sodium est un inhibiteur pour la laccase (120, 123) car le chlorure interagit avec le site actif dans la région de réduction de l'oxygène (section 1.3.1.1.4.1).

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad [7]$$

À notre connaissance, le comportement de la laccase par rapport à la force ionique pour la solution phosphate-citrate en présence du PPD n'a pas été rapporté à ce jour. Cependant, la littérature rapporte qu'à des concentrations de 8 mM ou de 16 mM, l'acide citrique inhibe complètement l'activité de la laccase quand le [N, N'-bis-(3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzilidène) hydrazine] et le 2,6-diméthoxyphénol sont, respectivement utilisés comme substrats (124).

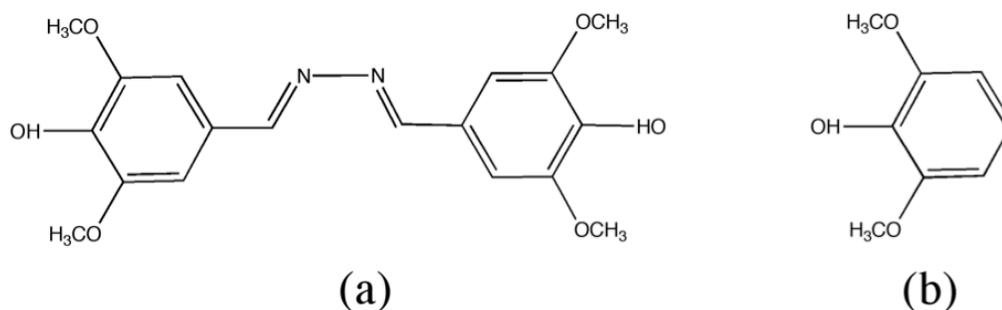


Figure 25. Structure des substrats utilisés dans la littérature pour évaluer l'inhibition de la laccase en présence des ions citrates : (a) [N, N'-bis-(3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzilidène) hydrazine] et (b) 2,6-diméthoxyphénol.

---

<sup>26</sup> D'autres phénomènes tels que la solubilisation saline et la précipitation saline sont possibles, mais ils ne font pas partie de cette étude.

Tel qu'indiqué à la Figure 26, la laccase reste active au-delà de ces concentrations quand le PPD est utilisé. Pour cette raison, nous avons étudié la force ionique optimale en faisant varier la concentration de la solution tampon phosphate-citrate et en utilisant le PPD comme substrat. Nos résultats montrent que l'activité de la laccase augmente par rapport à la force ionique, ce qui est un des cas attendus, cette tendance continue jusqu'à ce que l'activité atteigne une limite (plateau) où elle devient indépendante de la force ionique (Figure 26). Ce phénomène est observé tant pour l'enzyme libre que pour l'enzyme encapsulée dont le plateau est obtenu à partir d'une force ionique de 0.9 M, ce qui correspond à une concentration de solution tampon de 0.1 M. Nous avons choisi de travailler à force ionique de 1.2 M, ce qui se trouve à l'intérieur de l'intervalle où l'activité n'est plus affectée par la force ionique.

L'augmentation de l'activité montre que la diminution des charges au centre du site actif, provoqué par l'addition des ions, favorise une distribution structurale adéquate pour la transformation enzymatique. Pour expliquer cela, rappelons que la laccase possède deux sites de reconnaissance (section 2.3.1.1.4.1), dont la disposition et les distances de séparation des différents cuivres jouent un rôle important dans le processus d'oxydo-réduction. En effet, les cuivres T3 sont séparés entre eux par une distance de 3.9 Å, et sont à 3.8 Å par rapport au T2 (33) (Figure 4). Comme on le verra plus tard à la section 3.3.4.5, quand des inhibiteurs tels que l'azidure, le fluorure et le chlorure se lient au site T2/T3 un écart entre les cuivres se produit ce qui inhibe le transfert d'électrons. En ce qui concerne la force ionique, il est possible que la neutralisation des charges produite à hautes concentrations de substrat produise un effet sur la distance des cuivres dans la région T2/T3, ou encore, un changement de conformation qui rend le site plus accessible pour l'arrivée de l'oxygène. En effet, les cuivres dans cette région sont coordonnés par deux histidines dans le cas du cuivre T2 et six dans le cas des cuivres T3. L'histidine étant un acide aminé de charge positive, il peut être affecté par les changements de force ionique, ainsi, l'addition des contre-ions augmente à mesure que les répulsions entre histidines de même charge diminuent (120), ce qui peut expliquer un changement de conformation de l'enzyme. Comme les études au sujet de la structure tridimensionnelle de la laccase peuvent

être très complexes et qu'elles restent hors des objectifs de ce travail, elles ont été exclues. Cependant, pour éclaircir l'effet de la force ionique sur la structure de la laccase, des analyses par résonance électronique paramagnétique peuvent être effectuées pour évaluer le cuivre T2, ainsi que des études par double résonance électronique et nucléaire ( $^{27}\text{Al}$ ,  $^{125}\text{Te}$ ), spectrophotométrie à 330-345 nm (33, 126) ou encore par dichroïsme circulaire vibrationnel (127) pour évaluer les cuivres T3.

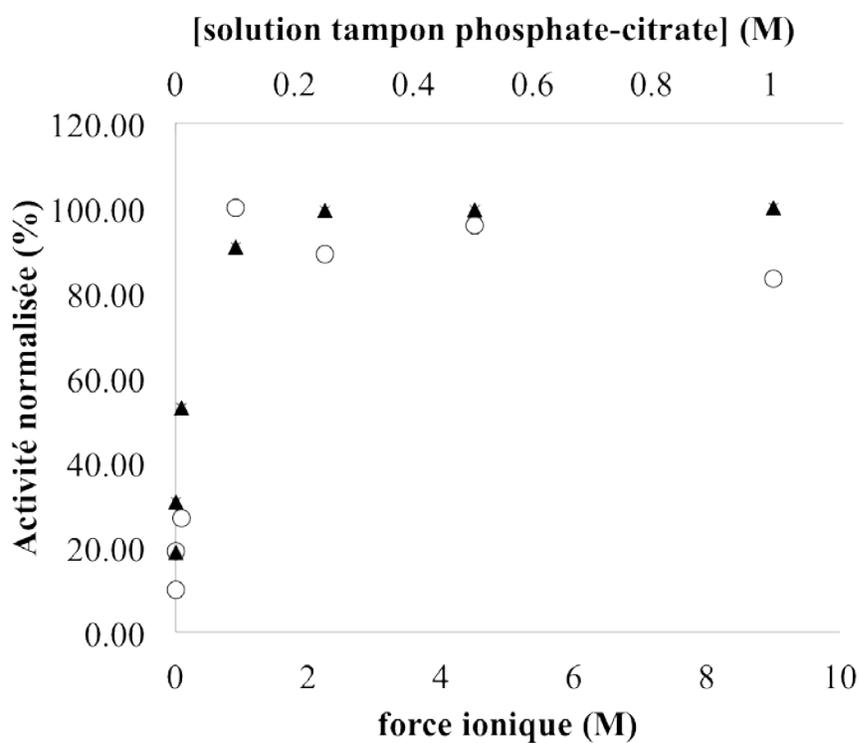


Figure 26. Effet de la force ionique sur l'activité enzymatique pour l'enzyme libre (▲) et encapsulée (○). Mesures réalisées à l'aide de la cellule à oxygène en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  de laccase (224.92 U/mL) et 250  $\mu\text{L}$  de PPD (50 mM) dans 2700  $\mu\text{L}$  de solution tampon McIlvaine (pH 4.5 à 27 °C).

### 3.1.1.3 pH optimal

En ce qui concerne le pH optimal, il varie selon le type et la source d'enzyme (30). Comme l'activité de l'enzyme est influencée par la constante d'acidité ( $K_a$ ) de chaque acide aminé qui la constitue et qu'à la base, tous les acides aminés sont constitués par un groupement carboxyle ( $R-COOH$ ) et un groupement amine ( $R-NH_3$ ), la conformation de l'enzyme et celle du site actif dépendent d'un équilibre de pH. Ainsi, le rapport activité-pH est influencé dans toutes les enzymes par la conformation structurale. Cependant, la conformation structurale n'est pas le seul facteur déterminant du pH optimal, la nature du substrat jouant également un rôle important. Dans le cas de la laccase, tel que mentionné par Xu, l'échange des électrons joue un rôle plus important encore que la conformation structurale (128). Pour expliquer cela, il faut rappeler que la laccase possède deux substrats, (l'oxygène et le médiateur). L'oxydation des substrats phénoliques et de certains substrats non phénoliques tels que le PPD est favorisée par l'augmentation du pH grâce à une diminution du potentiel face au site T1 (128). Cependant, à mesure que le pH augmente, il se produit une inhibition du site T2/T3 par action de l'ion  $OH^-$ , ce qui résulte en une diminution de la réduction d'oxygène (53, 129). Ainsi, quand l'activité enzymatique de la laccase est représentée graphiquement par rapport au pH, on s'attend à obtenir une courbe gaussienne dont le maximum représente l'équilibre dans lequel l'échange d'électrons est favorisé. Nos résultats montrent une courbe de forme gaussienne (Figure 27), ce qu'on attendait pour le PPD (53). D'autre part, le pic d'activité ressemble à ce qui a déjà été rapporté dans la littérature, avec le pH optimal de la laccase *Trametes versicolor* situé dans l'intervalle 4.5-5.5 (32, 55, 130).

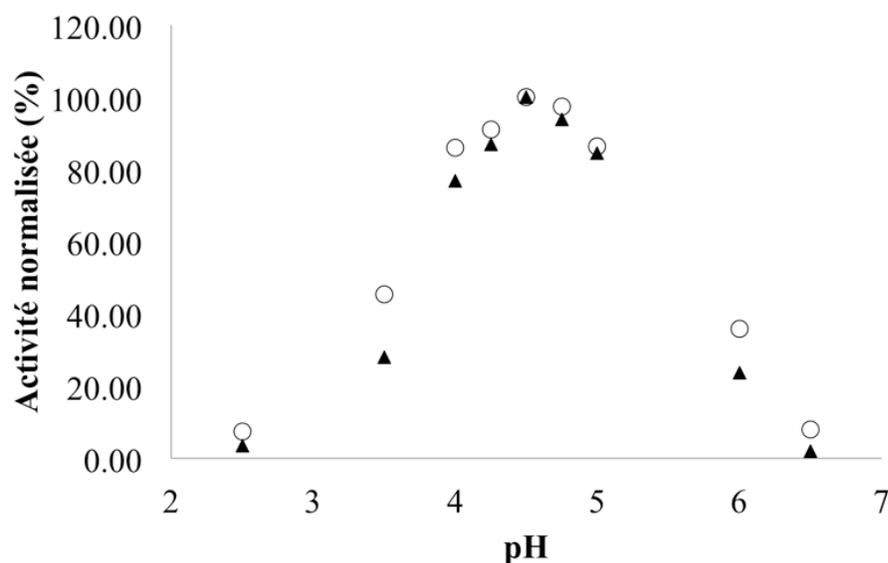


Figure 27. Effet du pH sur l'enzyme libre (▲) et encapsulée (○). Mesures réalisées à l'aide de la cellule à oxygène en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  de laccase (224.92 U/mL) et 250  $\mu\text{L}$  de PPD (50 mM) dans 2700  $\mu\text{L}$  de solution tampon McIlvaine à 27 °C.

#### 3.1.1.4 Concentration optimale de substrat

Pour ce qui est de la concentration de substrat, pour que l'enzyme puisse transformer le substrat, il est nécessaire qu'elle entre en contact avec celui-ci. À partir de ce contact, il faut qu'il y ait place au complexe enzyme-substrat et, finalement, que la dissociation de ce complexe se réalise pour donner place aux produits (section 1.3.1.1.1). Ainsi, un des paramètres qui limite la vitesse de transformation enzymatique (aussi dite activité enzymatique) est la disponibilité du substrat en solution et, par conséquent, sa concentration<sup>27</sup>.

---

<sup>27</sup> D'autres facteurs du milieu peuvent aussi limiter la disponibilité du substrat tels que la viscosité, la température, etc.

Tel que présenté à la Figure 28, nos résultats confirment la tendance décrite précédemment. Cependant il est possible d'observer une différence entre les courbes, analysable à l'aide de la constante de Michaelis et Menten. Rappelons que la constante de Michaelis et Menten ( $K_m$ ) sert à comparer l'activité de deux systèmes enzymatiques et que cette constante inclut les constantes de formation et de dissociation du complexe enzyme - substrat (section 1.3.1.1). Ainsi, à partir de nos résultats, une  $K_m$  de 0.28 et de 0.42 mM est respectivement observable pour l'enzyme libre et l'enzyme encapsulée. Cela indique que l'enzyme perd 67% de son affinité pendant le processus de microencapsulation. Cette perte peut être expliquée par différentes raisons telles qu'une diminution de la diffusion<sup>28</sup>, une accumulation du substrat ou un dépôt du produit à la surface des microcapsules, une déshydratation de l'enzyme par l'action des solvants utilisés pendant la microencapsulation, des interactions électrostatiques avec la membrane de PEI, etc. (32) Cette perte d'affinité ressemble à ce qui a été rapporté antérieurement par un autre membre de notre groupe, soit une perte de 65% de l'activité (131). Il est aussi à remarquer que la vitesse maximale est atteinte après avoir dépassé une concentration de 0.94 et de 1.51 mM de PPD respectivement pour l'enzyme libre et l'enzyme encapsulée comme une conséquence de la diminution de l'affinité.

---

<sup>28</sup> Parce que le substrat doit traverser les pores de la membrane avant de se rendre aux enzymes.

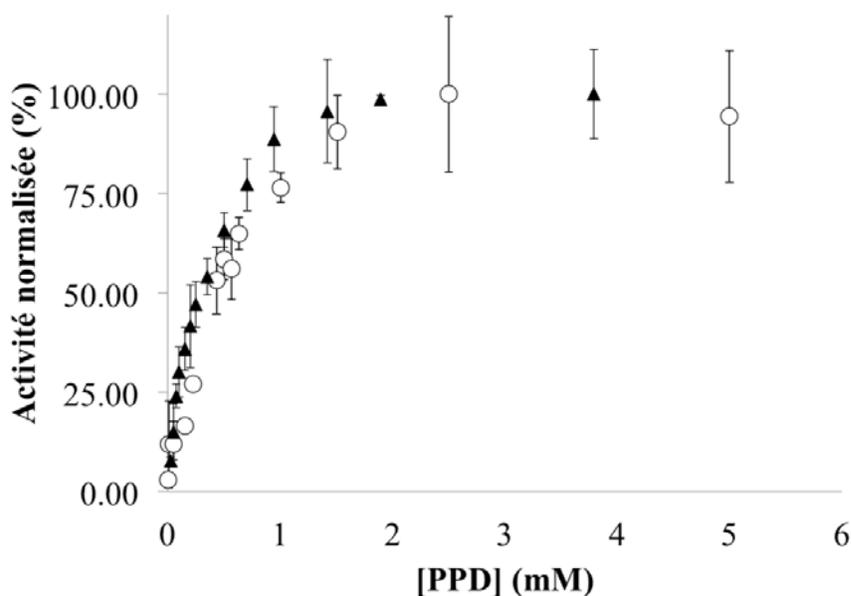


Figure 28. Effet de la concentration de PPD sur l'activité de la laccase pour l'enzyme libre (▲) et l'enzyme encapsulée (○). Mesures réalisées à l'aide de la cellule à oxygène en ajoutant 50  $\mu$ L de laccase (224.92 U/mL) et différents volumes de PPD (50 mM) dans une solution tampon McIlvaine (pH 4.5 à 27 °C).

### 3.1.1.5 Effet de l'entreposage sur l'activité (enzyme non-couchée)

Dans le passé, l'activité de la laccase a été évaluée par rapport au temps d'entreposage montrant que l'enzyme libre retenait 35% de son activité après 1 an d'entreposage à une température de 4°C (55). Nous nous sommes intéressés à savoir si la microencapsulation aide à stabiliser l'activité enzymatique par rapport au temps dans des conditions non contrôlées (température ambiante). Ainsi, l'activité de l'enzyme libre et de

l'enzyme encapsulée a été suivie pendant une période de 15 mois<sup>29</sup>. Tel qu'indiqué à la Figure 29, les enzymes microencapsulés, entreposées à température ambiante, montrent une amélioration de stabilité par rapport aux enzymes libres. En effet, les enzymes retenaient 10% de leur activité après, respectivement, 83 et 190 jours pour l'enzyme libre et l'enzyme encapsulée. D'autre part, les enzymes microencapsulés entreposées à 4 °C ont conservé  $89 \pm 6 \%$  de leur activité initiale après 15 mois (450 jours), ce qui dépasse largement ce qui a été rapporté pour l'enzyme libre entreposée dans les mêmes conditions.

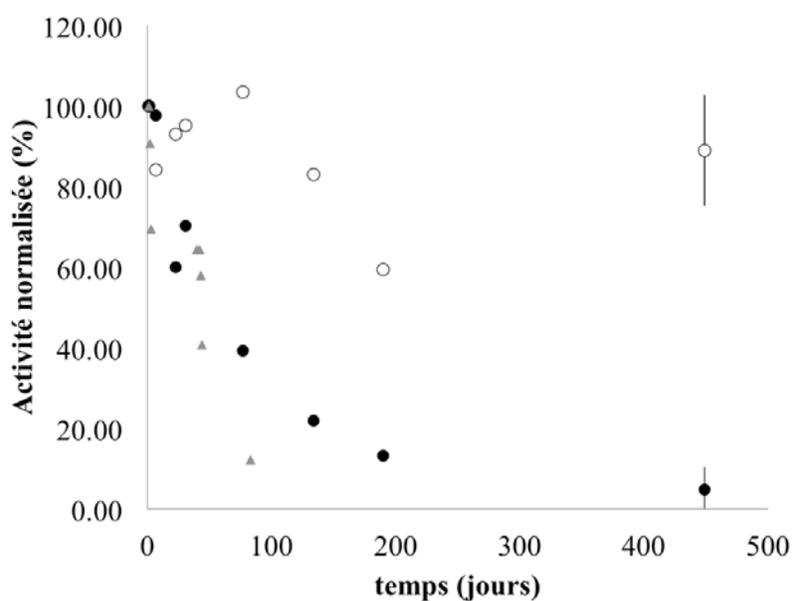


Figure 29. Disparition de l'activité de la laccase libre (▲) et encapsulée (●,○) par rapport au temps. Entreposage à température ambiante (●) et à 4°C (○). Analyse réalisée avec la cellule à oxygène (à 27 °C) par ajout de 300  $\mu$ L de PPD (50 mM) dans une solution à pH= 4.5, contenant 0,22 U/mL d'enzyme libre ou 3.82 U/mL d'enzyme microencapsulée.

<sup>29</sup> L'épuisement du stock de microcapsules produites au début des expériences a déterminé la fin de nos analyses d'activité par rapport au temps d'entreposage.

Un sommaire des résultats obtenus est montré au Tableau 2, où il est possible d'observer une similitude entre les conditions optimales de la laccase libre et encapsulée (pH et force ionique) et une diminution de l'activité enzymatique (67 %). D'autre part, on observe que la microencapsulation produit une augmentation de 69% de l'activité en condition d'entreposage à température ambiante<sup>30</sup>. Nos résultats indiquent que, pour une utilisation immédiate, la microencapsulation n'apporte pas de bénéfice. Cependant pour une utilisation où la conservation de l'activité pour une période de temps étendue est nécessaire, la microencapsulation s'avère bénéfique. Ces résultats sont prometteurs dans le développement d'un papier bioactif qui doit conserver ses propriétés pour une longue période de temps, par exemple, quand le biocapteur doit suivre le comportement d'un produit tout au long de sa vie utile, ou quand le biocapteur doit être entreposé avant d'entrer en contact avec le produit à analyser.

Enzyme	Activité spécifique au départ (U <sup>31</sup> /mL)	pH	Force ionique (M)	Indépendance de la concentration de PPD (mM)	K <sub>m</sub> (mM)	Activité retenue à 80 jours d'entreposage à température ambiante (%)
Libre	0.22	4.5	>9.00 X 10 <sup>-1</sup>	>0.94	0.28	12
Encapsulée	3.82	4.5	>9.00 X 10 <sup>-1</sup>	>1.51	0.42	39

Tableau 2. Sommaire des conditions optimales de la laccase libre et encapsulée.

---

<sup>30</sup> Mesure réalisée après 80 jours d'entreposage.

<sup>31</sup> 1U équivaut à la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 1 µmol de catéchol par minute à 25 °C et pH= 4.5.

### ***3.2 Effet du couchage sur l'activité enzymatique***

Les résultats présentés jusqu'à maintenant, montrent que la microencapsulation augmente la stabilité enzymatique par rapport au temps d'entreposage. Cependant, il n'est pas possible de conclure à ce point-ci que la microencapsulation est efficace quand le papier est couché puisque, pendant le processus de couchage, les enzymes sont soumises à d'autres conditions qui peuvent leur nuire. En effet, pendant le couchage, les enzymes sont entourées d'une suspension qui permet de les fixer sur la surface du papier, ce qui peut diminuer la diffusion des substrats ou la disponibilité du site actif; de plus, le couchage engendre des conditions physiques et des contraintes mécaniques qui peuvent empêcher l'application des microcapsules sur le papier ou nuire à l'intégrité des microcapsules et même à la structure des enzymes. Ainsi, de façon similaire à l'évaluation de l'activité enzymatique, dans le couchage, il est tout d'abord nécessaire de trouver des conditions de fonctionnement stables qui permettent le couchage sur papier des microcapsules.

#### **3.2.1 Couchage de la suspension**

Avant d'appliquer les enzymes, nous avons testé les conditions optimales de viscosité pour réaliser le couchage. Ceci a été réalisé en fixant la quantité de solides de la sauce de couchage et en faisant varier la quantité d'eau à ajouter durant la préparation. Ainsi, nous avons mélangé 62.5 g de matières solides (60 % de microcapsules<sup>32</sup> et 40 % d'amidon) dans des volumes de 55, 65 et 75 mL d'eau; les suspensions obtenues avaient alors des viscosités de 6373, 3145 et 1775 cP respectivement. Les suspensions ont été appliquées en utilisant la machine à couchage de la compagnie GARDCO (section 2.2.2.1.2), ce qui a permis de vérifier la possibilité d'appliquer les microcapsules sur le

---

<sup>32</sup> Les microcapsules utilisées dans cette expérience ne contiennent pas d'enzymes puisqu'on ne souhaitait pas en évaluer l'activité.

papier en utilisant l'amidon comme agent liant. Ensuite, les suspensions ont été appliquées à l'aide du LCDF (section 2.2.2.1). Le couchage a été analysé à l'aide des images numérisées des papiers. Comme le couchage augmente la luminosité des sections où l'amidon a été appliqué, il devient visible en ajustant la luminosité et le contraste des images. Ainsi, en diminuant la luminosité et en augmentant le contraste, une coloration brunâtre est observée dans les sections où le couchage a été réalisé.

Tel que montré à la Figure 30, à une viscosité de 1775 cP (volume de 75 mL), l'application n'est pas homogène sur le papier, à cause de la diminution de la force liante de l'amidon due à la dilution. D'autre part, les suspensions réalisées en utilisant des volumes de 55 et 65 mL permettent une bonne application de la suspension.

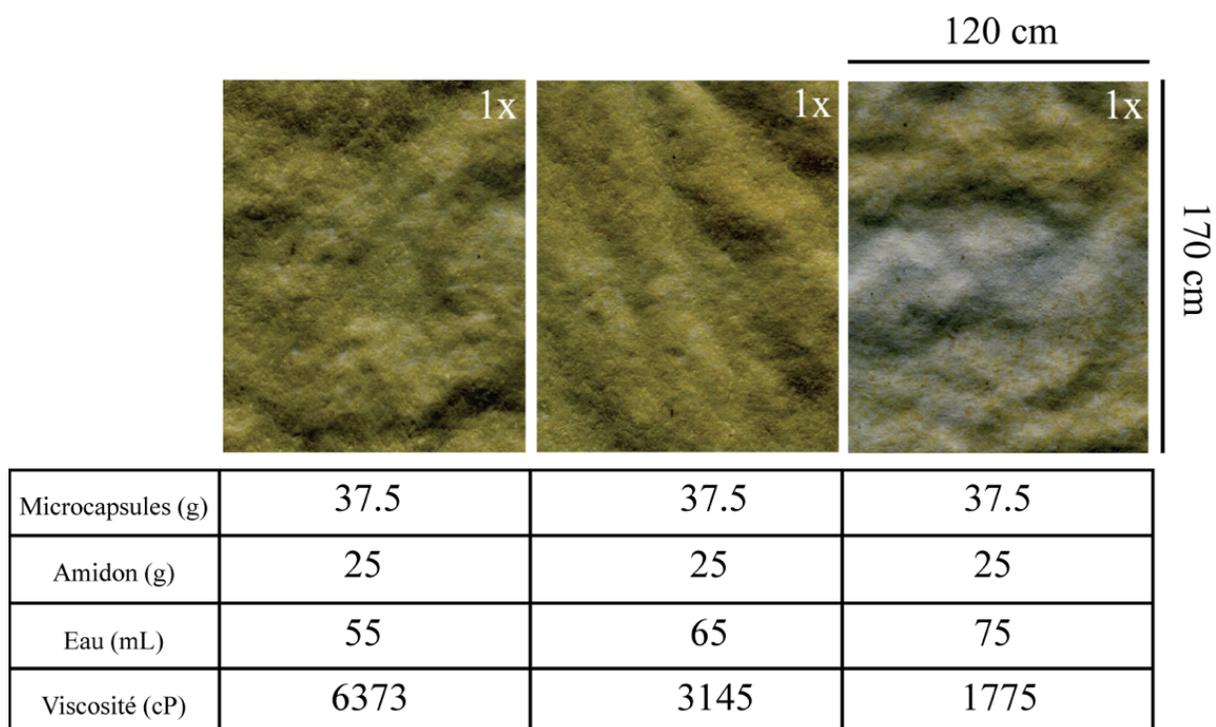


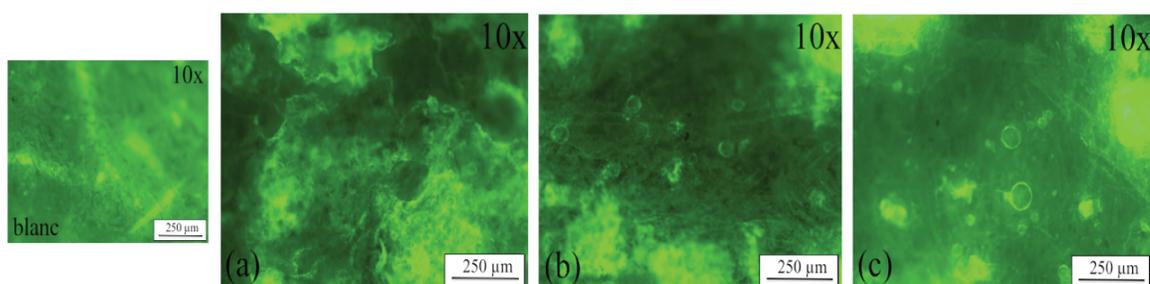
Figure 30. Effet de la viscosité sur l'uniformité des applications. Images obtenues à l'aide d'un scanner et modifiées pour révéler l'application des suspensions (résolution: 600 DPI, luminosité : -90, contraste : 40).

### 3.2.2 Présence des microcapsules

Les résultats présentés antérieurement nous ont permis de déterminer les conditions de viscosité pour lesquelles les suspensions sont applicables. Cependant, ces résultats ne révèlent pas la présence des microcapsules et leur distribution. Pour ce faire, une application de microcapsules fluorescentes a été réalisée et analysée au microscope de fluorescence avec des microcapsules modifiées avec FITC et des suspensions contenant 62.5 g de matières solides (60 % de microcapsules<sup>33</sup> et 40 % d'amidon). Les applications ont été réalisées en utilisant le LCDF comme dans l'expérience antérieure; cependant, le volume de 75 ml a été remplacé par un volume de 60 mL afin d'obtenir une viscosité comprise dans l'intervalle à l'intérieur duquel la suspension est applicable; ainsi, nous avons utilisé des volumes de 55, 60 et 65 mL d'eau. Les viscosités des suspensions résultant de ces préparations étaient respectivement de 6373, 4520 et 3145 cP. Comme observé à la Figure 31, le papier possède une fluorescence en soi. Cependant, l'agent fluorophore (FITC) ajouté aux microcapsules est encore plus fluorescent, ce qui provoque un contraste suffisamment fort pour pouvoir observer les microcapsules sur le papier quand les viscosités de 4520 et 3145 cP sont utilisées. Cependant, avec une viscosité de 6373 cP est utilisée, les microcapsules ne sont plus observables, ce qui peut être causé par un recouvrement excessif de la sauce de couchage ou parce que les microcapsules ne sont pas présentes. À partir de ces observations, nous avons décidé de travailler avec une viscosité de 3145 cP, puisque les microcapsules sont encore visibles et la viscosité est moindre, ce qui diminue les forces de cisaillement auxquelles sont soumises les microcapsules pendant le couchage.

---

<sup>33</sup> Les microcapsules utilisées dans cette expérience ne contiennent pas d'enzymes puisqu'on ne souhaitait pas en évaluer l'activité.



Microcapsules (g)	37.5	37.5	37.5
Amidon (g)	25	25	25
Eau (mL)	55	60	65
Viscosité (cP)	6373	4520	3145

Figure 31. Microcapsules modifiées avec FITC ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ ), observées par microscopie à fluorescence. Applications réalisées à l'aide du LCDF avec une vitesse d'application de 1500 mm/s.

Afin de vérifier la présence de microcapsules dans les applications à grande échelle réalisées avec le CLC<sup>34</sup>, nous avons effectué le test de Kaiser afin de révéler les groupements amine du PEI. Ce test a été réalisé sur les papiers avec et sans microcapsules. La Figure 32 montre que le test est positif en présence des microcapsules.

---

<sup>34</sup> Comme ce test n'a pas été inclus dans l'article, il est présenté dans cette section même s'il s'agit d'un test pour les applications à grande échelle.



Figure 32. Test de Kaiser pour papier couché avec microcapsules (à gauche) et sans microcapsules (à droite). Microcapsules couchées à l'aide du CLC.

### 3.2.3 Effet du couchage

Une fois la présence de microcapsules confirmée sur le papier, il est nécessaire d'évaluer si le papier conserve son activité, puisque réussir le couchage ne garantit pas que les enzymes appliquées restent actives. Ainsi, nous avons évalué l'activité enzymatique en utilisant les paramètres optimaux présentés antérieurement. Nos premières évaluations (Figure 33, jour 1) démontrent que tant les enzymes libres que les enzymes encapsulées continuent à être actives suite au couchage à lame. Afin de déterminer si le couchage affecte l'activité des enzymes, nous avons réalisé une évaluation de l'activité par rapport au temps d'entreposage à la température ambiante. Nos résultats révèlent qu'après 23 jours, la laccase retient 24 et 61 % de son activité initiale lorsqu'elle est respectivement libre ou encapsulée.

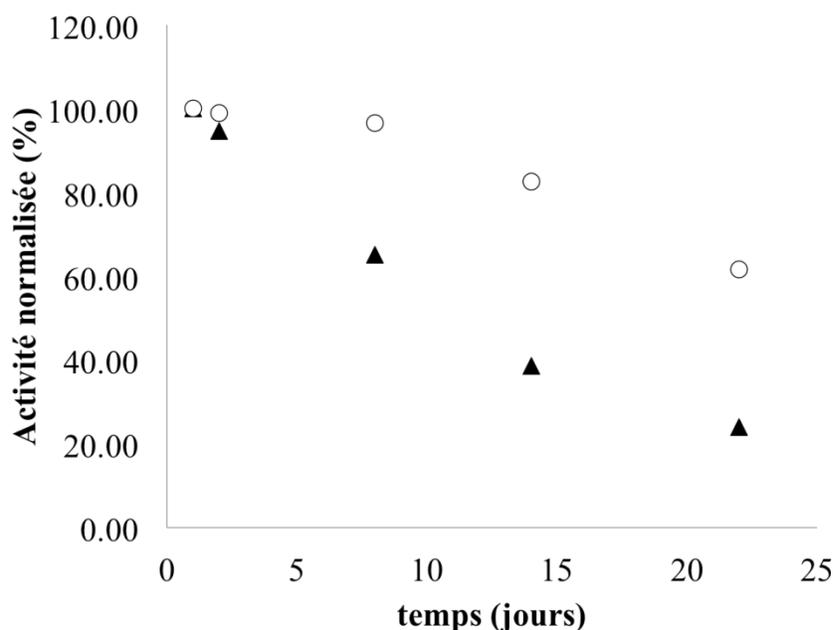


Figure 33. Effet de la microencapsulation et du temps d'entreposage sur l'activité de la laccase libre (▲) et encapsulée (○) suite à l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de PPD (10mM). Applications de 41 et 474 U/mL respectivement d'enzymes libres et encapsulées<sup>35</sup> à l'aide du LCDF en utilisant la suspension dont la viscosité est de 3145 cP.

Les résultats présentés démontrent la possibilité d'utiliser l'amidon comme agent liant pour fixer tant les enzymes libres qu'encapsulées sur du papier. En même temps, ces résultats démontrent la possibilité d'utiliser le couchage à lame pour appliquer les enzymes et la microencapsulation afin d'augmenter la stabilité des enzymes par rapport au temps d'entreposage. Maintenant qu'il est établi que les enzymes appliquées à partir des enductions faites à petite échelle demeurent actives, nous allons montrer dans la section qui suit nos analyses sur des enductions faites à grande échelle.

---

<sup>35</sup> Concentration calculée à partir de la teneur de laccase ajoutée pendant le processus d'encapsulation.

### ***3.3 Activity, stability and inhibition of a bioactive paper prepared by large-scale coating of laccase microcapsules<sup>36</sup>***

M.P. Guerrero<sup>1,2</sup>, F. Bertrand<sup>2</sup>, and D. Rochefort<sup>1\*</sup>

1 Département de chimie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Canada H3C 3J7

2 Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal, CP 6079, Succ. Centre-Ville, Montréal, Canada H3C 3A7

#### **3.3.1 Abstract**

Enzyme immobilization on paper by large-scale processes may play a valuable role in the development of economical and widely distributed biosensors. In this study, we report on the coating of laccase from *Trametes versicolor* on papers using a laboratory coater (Cylindrical Laboratory Coater) that simulates realistic conditions similar to those obtained with industrial coaters. In order to achieve an efficient retention of laccase in the coating, the enzymes were incorporated in poly(ethyleneimine) microcapsules. The microcapsules were suspended in a starch-based coating suspension, applied on paper by blade coating at a rate of 500 and 800 m/min thereupon dried by evaporation by using an IR lamp at 36 kW. A technique based on the colorimetric reaction between the laccase and its substrate, p-phenylenediamine (PPD), was developed to evaluate the activity of the immobilized enzyme. Our results show that the use of microencapsulation allows for better activity retention in papers over time at room temperature (50% loss after 28 days)

---

<sup>36</sup> Accepté pour publication dans Chemical Engineering Science. 2011;66(21):5313-20.

compared to papers modified with free laccase (50% loss after 4 days). Microcapsules also decrease the inhibition of laccase by azide.

Keywords: Enzyme; Emulsion; Scale-up; Suspension; Microencapsulation; Polyethyleneimine

### 3.3.2 Introduction

Bioactive papers are obtained from the modification of the bulk or the surface of paper substrates with biomolecules with the goal of adding functionality to the paper. These functionalities may include detection, capture or inactivation of specific targets, such as harmful molecules or pathogens (76) . These features of bioactive paper are designed to operate without using any sophisticated equipment or apparatus (8), making the device portable and adaptable to various uses and situations. The concept of bioactive paper thus far has been mainly oriented to fulfill specific needs in health, safety and food packaging applications (8).

Due to their specificity and catalytic signal amplification properties (132), enzymatic systems have been described as a viable platform for the development of bioactive papers (7). Although enzymes have been used extensively in the detection and deactivation of numerous types of molecules (40, 89, 133, 134), their application in largely distributed systems or industrial processes remains limited. This is in part due to the inability of enzymes to withstand difficult conditions (e.g. high temperatures and shear forces) throughout the process of their manufacturing. Thus, immobilization systems must enhance their stabilization before implementing them in large scale processes (48, 49).

In a recent paper our group showed that microencapsulation can be used as an effective method to immobilize enzymes, such as laccase from *Trametes versicolor*, on paper under laboratory conditions (32). Microencapsulation consists of the entrapment of fragile species like drugs, proteins or enzymes inside micron-sized spheres made from a semi-permeable material, usually a polymer. Moreover, microcapsules can be used to

control the release of active molecules, such as drugs, fragrances, flavors and pesticides. Considering its compatibility with both paper and enzymes, poly(ethyleneimine) (PEI) has been selected for our purposes of developing bioactive paper. The pore size of PEI microcapsule membranes, measuring between 2.6 and 5 nm (34), offers an efficient physical retention of the enzyme in the capsules while allowing for the diffusion of its substrates (34, 55). The size of the microcapsules can be adjusted during its preparation (see experimental section) and we have designed the microcapsules to be considerably larger (60  $\mu\text{m}$  average diameter) than the pores of the paper (1-10 $\mu\text{m}$ ). As a result, enzyme microcapsules can be immobilized on paper by physical means and attractive ionic interactions as opposed to chemical linking, which might perturb their structure and functionality (25).

Laccase (E.C. 1,10,3,2) from *Trametes versicolor* (27) has been used as a model for our studies since it has been largely proven to oxidize a wide range of toxic compounds (36-38, 40-42) (e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons, such as benzo[ $\alpha$ ]pyrene (38, 41)). Laccase therefore has a potential interest for the remediation of harmful compounds present in water, but its use in a dissolved form prevents catalyst recycling and does not protect the enzyme from inhibition. Therefore, the immobilization of laccase on cheap and disposable substrate would allow the development of filtration devices that can both retain particulate matters and biodegrade chemicals found in contaminated waters. A bioactive paper prepared by large-scale coating could be envisioned as an application of the system presented here. In addition, laccase has been reported under laboratory and mill conditions as being quite a robust and thermostable enzyme ( $t_{\text{op}}$ : 45-80  $^{\circ}\text{C}$ , depending on the source (25, 26, 35)), and is regarded as one of the most studied and available enzymes (26). Laccase catalyzes the four-electron reduction of molecular oxygen to water while oxidizing a substrate. Several substrates for laccase are chromophores that change color in the visible spectrum in their oxidized state, allowing for an easy measurement of enzymatic activity.

Laccase has been immobilized with different techniques over various surfaces including paper (25, 30, 46, 47), although large-scale coating of laccase has never been

reported to our knowledge. In addition, we report here the first demonstration of the use and advantages of microencapsulation to modify papers on a large scale with biomolecules. In this work, we studied the use of a lab-scale blade-coating instrument (Cylindrical Lab Coater, CLC) as an alternative to applying microencapsulated biomolecules onto paper. Blade coating is the most widely used industrial technique for applying suspensions to paper base (77), and the CLC can be used under conditions that are similar to those employed in the industry at high coating rates (e.g. Lipponen et al report speed applications on paper at 1200 m/min (82)). The coating process consists in covering a surface of paper or board with a suspension composed of pigments, binders and additives to enhance optical, mechanical or barrier properties (79). A good coating requires obtaining a uniform application without undesirable patterns. This is achieved by controlling several physical operation parameters, such as pressure over the surface, angle of application, blade hardness, speed of application, etc. These parameters must be adapted to the rheology of the suspension and the physical characteristics of the paper (porosity, hardness, permeability, thickness, etc.) (83, 85, 135).

We have identified that drying exposure, binder concentration and enzyme coverage to be critical parameters that may affect the enzymatic activity and hence the response of the bioactive paper. These parameters were evaluated for two different starch-based coating suspensions, containing free (i.e. non encapsulated) and microencapsulated laccase, respectively. These two types of coatings were applied using the CLC to evaluate the effects and advantages of microencapsulation in the preparation of coated bioactive papers. The effect of the shear rate was also covered by changing the application speed.

The effect of microencapsulation on long-term storage of the bioactive paper and on laccase activity in the presence of the known laccase inhibitors azide, fluoride and chloride (97, 130) was also examined.

### 3.3.3 Experimental

#### 3.3.3.1 Reagents

Polyethyleneimine (PEI,  $M_n = 1200 \text{ g mol}^{-1}$ , 50 %  $\text{H}_2\text{O}$ ), sebacoyl chloride (SC, purum), Span® 85, citric acid (A.C.S reagent), sodium phosphate dibasic heptahydrate (A.C.S. reagent), sodium chloride, sodium fluoride, sodium azide, para-phenylenediamine (PPD) and laccase from *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) with specific activity of 23.1  $\text{U}^{37}/\text{mg}$  were purchased from SIGMA-Aldrich. Cyclohexane was obtained from J.T. Baker and 2-hydroxyethyl starch ether was provided by Penford Products. The paper base used was wood-free paper ( $53 \text{ g/m}^2$ , 5-25% fillers) with no additives, sizing and retention agents or brighteners. Purified water ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) from a MilliQ purification system was used in the preparation of all solutions.

#### 3.3.3.2 Preparation of PEI microcapsules

The method used was based on that developed by Poncelet et al. (70) but modified to produce microcapsules at the few hundred grams to the kg scale. Briefly, the method consists in making an emulsion of an aqueous phase (Mellvaine buffer, pH 8.5) of laccase (2.5 g) and 30 mL of PEI (discrete phase, 300 mL) in an organic phase of cyclohexane (continuous phase, 1800 mL). The water/oil (W/O) emulsion was achieved with a four-blade impeller of 8 cm at 1220 rpm and stabilized by the addition of 15 mL of Span® 85. Once the microemulsion reached a stable state (after ca. 15 min of agitation), the interfacial polymerization of PEI was achieved by adding 15 mL of sebacoyl chloride. The microcapsules obtained under such conditions contained a theoretical laccase specific activity of  $505 \text{ U}_{\text{laccase}}/\text{g}$  (according to the suppliers' specifications).

---

<sup>37</sup> 1 U is the amount of enzyme necessary to transform 1  $\mu\text{mol}$  of catechol per min at 25 °C and pH 4.5.

Microcapsules were first rinsed with 9 L of cyclohexane in order to stop the polycondensation reaction and then with 8L of diluted citric acid solution (0.01 M) to promote their dispersion by charge repulsion. The mean diameter of microcapsules using constant conditions of agitation, volume and viscosity were measured at 60  $\mu\text{m}$  from light scattering particle size distribution analysis (Horiba LA950).

### 3.3.3.3 Preparation of the suspension

Base suspensions were prepared by starch gelatinization (2-hydroxyethyl starch ether) in water to reach 29 wt.% of solids. Neutral starch was selected so as to reduce the electrostatic interactions with positively charged microcapsules. The gelatinization was performed by heating the starch suspension at 80 °C for 30 min in a thermostated bath. The suspension was cooled down to room temperature before adding the enzyme (either free or in microcapsules).

Homogenization of the suspension was achieved by mechanical agitation using a four-blade propeller of 8 cm diameter at 800 rpm for 2 minutes. All viscosities were determined in still suspensions with a Brookfield viscometer (DV-II+Pro) at a controlled temperature of 20 °C. The viscosity of the base suspension (blank) and that of the suspension containing free enzymes (both with 29 % solids) were determined to be 2580-3088 mPa·s (spindle RV5, torque 64.5-72.2 %). The viscosity of the suspension containing microencapsulated enzymes (48% wt solids) was 3145 mPa·s (Spindle RV5, torque 77.2 %). Such suspensions are known to exhibit non Newtonian shear-thinning or shear-thickening behavior, depending on the solids content and flow conditions (106). It is known that the rheology of these suspensions, also called coating colors, is a key parameter for controlling the runnability of coating applications, especially at high coating speeds (136). Because runnability problems were not encountered in this work, a more detailed rheological characterization of the suspension used, with more flexible rheometers, was not performed.

### 3.3.3.4 Applying enzymes by blade-coating

A Cylindrical Laboratory Coater model 7000 (CLC, see Figure 34) was used in order to apply the suspension on paper. The CLC allows for reproducible coatings using commercial parameters at high speed (maximum at 2200 m/min); suspension viscosities and drying temperatures. Although the blade loading is different at the pilot and industrial scale, the shear forces are quite similar and the coating weights can be adjusted by changing the pressure exerted on the blade on the paper (83, 103).

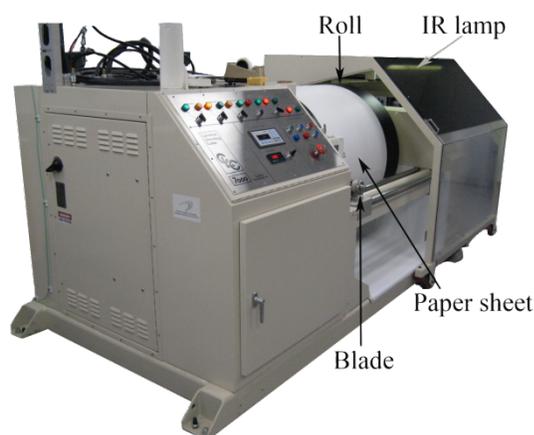


Figure 34. Scheme for the principal parts of the CLC-7000.

Wood-free paper strips of  $0.75 \times 3 \text{ m}^2$  at an average weight of  $53 \text{ g/m}^2$  were used as paper base for the applications, to avoid any interactions between lignin and laccase (104). Drying was achieved by the IR lamp of the CLC at a power of 36 kW.

The coating procedure was done according to the manual provided by the manufacturer (103). The paper was pre-dried for 10 s at 80% of the lamp power and the suspension was coated afterwards using application speeds of 500 and 800 m/min. The coating weight obtained for the different applications were  $4 \text{ g/m}^2$  for the suspension with free, non-encapsulated enzymes and from 7 to  $33 \text{ g/m}^2$  (in order to analyze the activity in function of coverage) for the suspension with encapsulated enzymes.

Enzymatically-modified papers were dried at 100% of the IR lamp power at different exposition times ranging from 0 to 30 s. Prolonged exposure to the IR lamp was not necessary since the papers were thoroughly dried after a 30 s exposure.

### 3.3.3.5 Analysis of the enzymatic activity on paper

To analyze the laccase activity on the modified papers, *p*-phenylenediamine (PPD) was selected as substrate because of its strong color change when oxidized by laccase:



The enzymatic activity was therefore evaluated from the color intensity increase over time (see Figure 35). The experiments were carried out at room temperature by adding fixed volumes of 10  $\mu\text{L}$  of a freshly-prepared PPD solution (10 mM) in pH 4.5 McIlvaine buffers directly onto the sections of the paper to be analyzed. These paper sections were circles of 8 mm in diameter cut from the coated paper sheets. They were fixed on a transparency and directly placed on the glass of an office document scanner. A second transparency was then placed over the one containing the paper samples to reduce water evaporation during measurement and prevent color modification due to humidity changes.

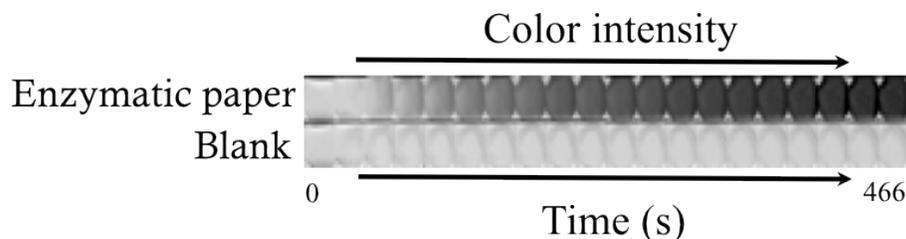


Figure 35. Change of color for paper coated with laccase in presence of *p*-phenylenediamine.

Images were taken in JPEG format (grayscale, 8-bit, 150 ppi) at a constant rate ranging from 5 s to 10 min and were stopped after 120 min by software developed in our laboratory, allowing automatization to improve the reproducibility of the procedure. The images obtained were then analyzed with Photoshop® (CS4 Extended) to measure the color intensity on a dimensionless grayscale level ranging from 0 (pure white) to 255 (darkest). The color intensity of a blank paper sample (containing no enzyme but the appropriate coating) was subtracted from the samples to eliminate the effect of PPD autoxidation. The resulting color intensity was plotted as a function of the time (s). The activity of the enzyme immobilized on paper was obtained from the slope of the linear portion of curve between 0 and 200 s (see Figure 36 for an example of the linear section). The activity was therein reported as I/s, where I represents the dimensionless intensity.

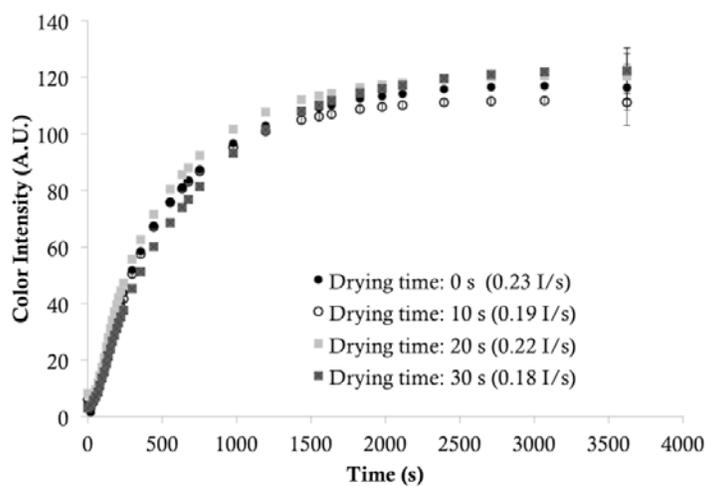
### **3.3.4 Results and discussion**

In this section we present a comparison of parameters we identified as critical for the enzymatic activity in order to determine if microencapsulation enhances the activity of coated enzymes.

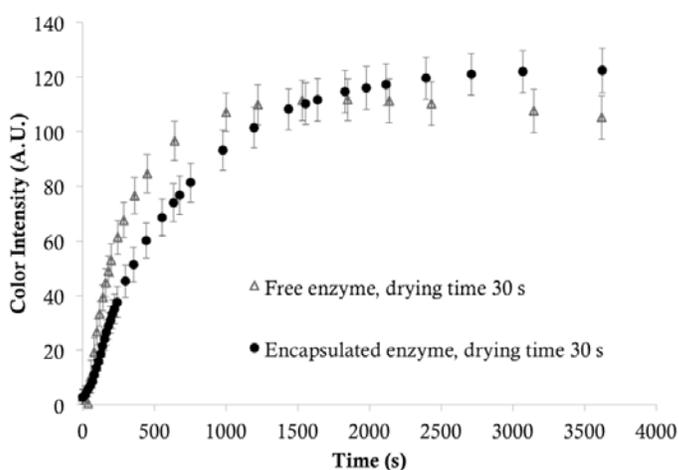
#### **3.3.4.1 Drying exposure**

Laccase from *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) is a moderately thermostable enzyme with a reported optimal activity at temperatures between 30 and 55 °C (26). However, it has been reported that incubating the enzyme at 70°C for 20 min resulted in a decrease in activity of 50-75% from the initial value (26, 35). Since drying exposes the paper and consequently the coated enzymes to temperatures above 70 °C to achieve water evaporation, it is important to evaluate the effect of drying on the enzymatic activity. The temperature reached during drying depends on the wetness and composition of paper (137) and is not constant since the amount of water decreases throughout the drying process. Given that the sheet temperature cannot be tightly controlled during drying, we decided to evaluate the impact of exposure time of the sheet to the CLC IR lamp running at 100% of

its power (36 kW) using an application rate of 800 m/min. Figure 36A presents the effect of drying exposure time (0, 10, 20 and 30 s) on the activity of microencapsulated laccase coated on paper sheets. There is a 20% decrease in activity (represented by the slope) between the 20 and 30 s exposure time, which may be attributed to the paper heating under the IR lamp. This value is however extremely close to the relative uncertainty observed for our measurements (see error bars in Figure 37). After 30 s of drying, the paper sheet reached complete dryness and, since prolonging drying was not necessary, we have selected a 30 s drying for all subsequent coating experiments. Khan et al. (9) added cationic, neutral and anionic polymers to alkaline phosphatase enzyme and studied the thermal stability of this enzyme when immobilized on paper. They showed that the neutral and cationic polymers affected the enzymatic activity the most with a rapid initial deactivation upon heating. We have also reported a similar phenomenon in a previous publication where we showed that incubating microencapsulated laccase at 60°C greatly decreased its activity after the first few minutes (131). We believe that, despite not knowing the temperature reached during drying, the 30s drying time used in the present study is not long enough to perturb the structure of the enzyme. Figure 36A shows a rapid response to the paper as a result of the oxidation of PPD catalyzed by laccase, indicating that the coated enzyme remains active. The color change can be perceived by the naked eye after only 20 s and is increased to a maximum of ca. 120 units after 30 min. The shape of the curve is similar to any enzymatic activity measurements carried out in a solution.



(a)



(b)

Figure 36. (a) Effect of drying exposure on activity: paper covered with  $279 \text{ U/m}^2$  encapsulated laccase was dried for 0, 10, 20 and 30 s. For clarity error bars were presented only for 1 sample. (b) Effect of microencapsulation on activity: the enzymatic activity (I/s) normalized for the surface coverage ( $\text{U/m}^2$ ) was found as  $6.92 \times 10^{-4} \text{ I m}^2/\text{s U}$  for free laccase ( $\Delta$ ) and  $6.10 \times 10^{-4} \text{ I m}^2/\text{s U}$  for encapsulated laccase ( $\bullet$ ).

A comparison of the activity of free and microencapsulated laccase is illustrated in Figure 36B. The activity, in I/s measured by the slope of the initial section of the curve, appears to be higher for the paper modified with free enzymes. However, when the activity

is normalized to take into account the different amounts of free and encapsulated enzymes coated on paper (expressed at  $U/m^2$ ), similar values are obtained ( $6.92 \times 10^{-4} \text{ I m}^2/\text{s U}$  for free laccase and  $6.10 \times 10^{-4} \text{ I m}^2/\text{s U}$  for encapsulated laccase). The slightly lower activity observed for the encapsulated laccase paper can be explained by two factors: the restricted diffusion of PPD to the laccase in the capsules and a detrimental effect during the coating process (rupture of capsules by shear forces, covering of pores of capsule by the binder, obstruction of the application due to the size of the microcapsules, etc.).

As discussed by Egorova (83), the shear rate increases as the application speed increases. Thus to clarify if the shear rate can affect the activity of enzymes, we compared an additional sample coated with encapsulated enzymes keeping the enzyme coverage ( $276 \text{ U/m}^2$ ) and viscosity constant yet decreasing the application rate to 500 m/min. Activity was found to decrease only slightly as the shear rate increased, from 0.25 to 0.17 (I/s) for rates of 500 m/min and 800 m/min, respectively. Microscopic analysis of the paper revealed that the microcapsules were intact after coating at all shear rates.

A decrease in the diffusion of the substrate across the membrane (32) due to the permeability of this membrane (54) cannot however be completely ruled out as a result of the high charge density of the PEI microcapsules. This charge-induced restricted diffusion across microcapsule membranes has already been demonstrated by our group (55) but, at  $\text{pH}=5.5$  (used for the analysis of our bioactive papers), we believe that the main reason for the loss of activity can be attributed to the microencapsulation procedure mentioned above.

#### **3.3.4.2 Coating suspension formulation**

Coating suspensions are usually composed of binders, pigments and additives. In that each component is responsible for providing the paper with the desired properties (such as brightness, color, texture, permeability, pH, etc. (138)), commercial suspensions are normally complex compositions. As the effect of each additive of such complex

formulation on the microcapsules and laccase is unknown, our coating suspension contains only starch, which is commonly used in papermaking (139). Since the microcapsules are embedded in the starch layer deposited on paper by coating, its effect on the diffusion of substrate to reach the enzyme in the microcapsules was evaluated. Two paper sheets were coated with similar enzyme coverage,  $264 \text{ U/m}^2$  and  $224 \text{ U/m}^2$ , although they are from suspensions with different starch concentrations,  $11.07 \text{ g/m}^2$  and  $7.24 \text{ g/m}^2$  (dry weight), respectively.

The magnitude of color intensity and the error bars obtained by a confidence interval at 95% of Figure 37 shows that the activity for both samples is quite similar (overlapped), suggesting starch, at the concentration used to bind the capsules to the paper, does not affect the kinetics of the reaction.

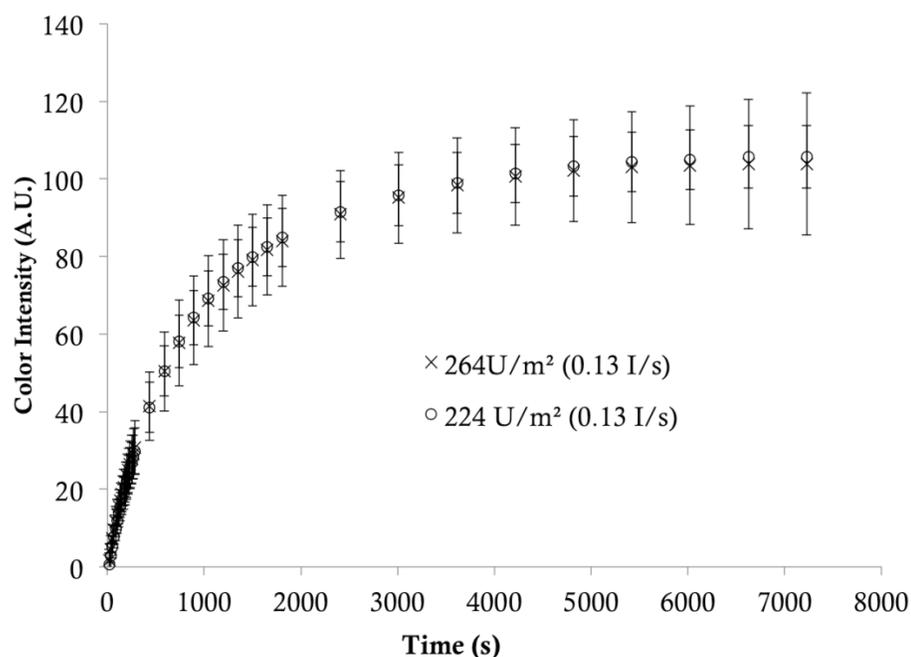


Figure 37. Effect of enzyme coverage on activity: coated papers represented with (x) for  $11.75 \text{ g/m}^2$  ( $264 \text{ U/m}^2$  coverage) and (o) for  $7.82 \text{ g/m}^2$  ( $224 \text{ U/m}^2$  coverage).

### 3.3.4.3 Enzyme Coverage

#### 3.3.4.3.1 Uniformity of application

Uniformity of the encapsulated laccase coating on paper with the CLC was evaluated by immersing complete (full) strips of paper ( $12 \times 21 \text{ cm}^2$ ) in a solution of 50 mM PPD. Figure 38 shows that the blade coating of microencapsulated laccase results in a uniform application along the blade displacement yet is more heterogeneous in the transverse direction. The uniform coating along the application direction shows that there are no significant accumulations of microcapsules aggregates. On the other hand, the heterogeneity of the application in the transverse direction tells us that the blade adjustment must be improved. There is a significantly higher coverage of microcapsules on one side of the sheet. Other applications were made in order to correct these patterns and samples were taken from the same line in the direction of the application.

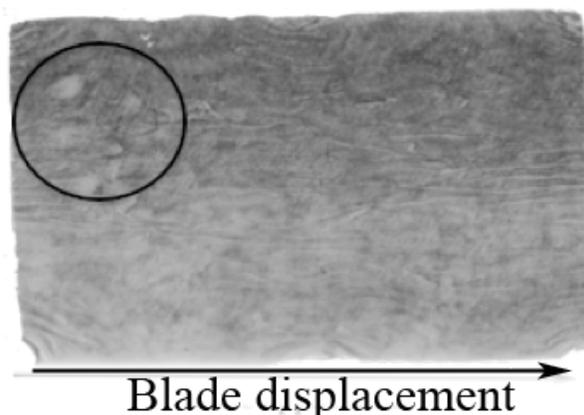


Figure 38. A sample of modified paper ( $12 \times 21 \text{ cm}^2$ ) was immersed in a solution of PPD (50mM), to reveal the enzymatic distribution of encapsulated enzymes.

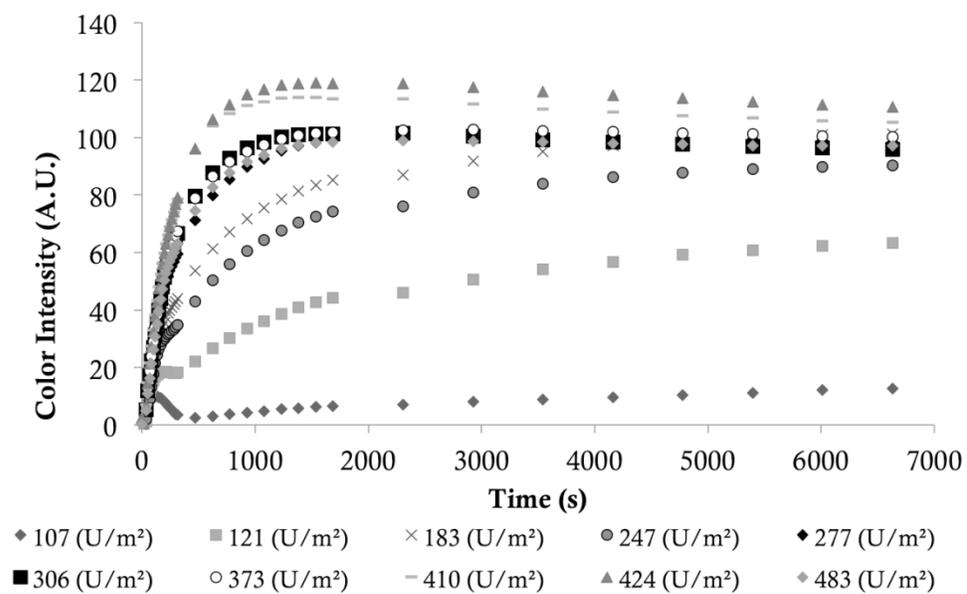
The presence of brighter spots, indicated by the circle in Figure 38, may be the result of flocculation of microcapsules and the blade may not have removed all these aggregates during their application. In order to reduce the interactions between microcapsules, they were treated with citric acid to promote PEI protonation and charge

repulsion; after treatment, we were not able to observe any patterns attributed to flocculation.

#### ***3.3.4.3.2 Laccase surface coverage***

The minimum laccase coverage required to generate a rapid color change on the paper was determined by preparing several paper samples with various concentrations of microcapsules (from a unique batch) in the coating suspension. The encapsulated laccase coverage was adjusted by changing the pressure between the applicator and the paper. As the application consists of a flexible blade, it folds during the application depending on the pressure exerted, hence adjusting the amount of coating (coating weight).

As shown in Figure 39A, the laccase coverage, expressed in  $\text{U/m}^2$ , has a substantial impact on the signal generated by the oxidation of PPD during the first minutes of the reaction. For longer reaction times, all papers with coverage above  $245 \text{ U/m}^2$  tend to converge towards the same color intensity, around 35. The two samples with coverages below  $175 \text{ U/m}^2$  exhibit a plateau or a decrease in color intensity soon after the initial signal increase. It has been proposed that the oxidation of PPD results in the production of strongly-colored reactive intermediates that can react further to oligomerize or polymerize into less absorbing species (111, 140, 141). At low laccase coverage, the formation rate of  $\text{PPD}^+$  species is insufficient with respect to their rapid conversion to oligomers, so that, when  $\text{PPD}^+$  is present at a high enough concentration to oligomerize (i.e. at short time), the overall color intensity decreases. At high enzyme coverage, the formation rate of  $\text{PPD}^+$  is high enough to provide a steady increase in color. Despite this effect at low coverage, the initial reaction rate can be adequately measured. Noteworthy was the coating of high surface coverage of laccase, therefore we evaluated the coverage threshold, although adding further amounts of laccase did not improve the reaction rate. Figure 39B shows that the initial reaction rate for PPD oxidation does not increase above  $420 \text{ U/m}^2$ . At that point, the reaction is limited by the substrate diffusion rate across the microcapsule membrane and the coating (starch).

**(a)**

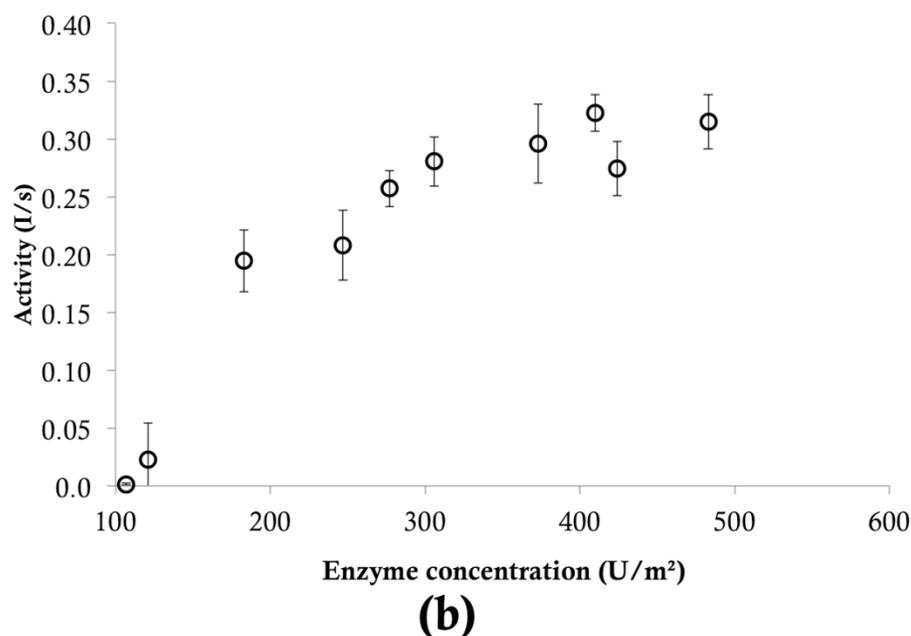


Figure 39. (a) Change in color intensity for samples coated at different concentrations of enzyme. (b) Effect of enzyme coverage on enzymatic activity.

#### 3.3.4.4 Activity upon storage

The activity of coated paper was sampled over a period of 6 months to evaluate if microencapsulation provides a better activity retention upon storage at room temperature. An initial experiment with hand-coated bioactive papers was carried out and confirmed that microencapsulation maintained laccase activity over a long period of time. The residual activity after 6 months was 15% and 66% for free (non-encapsulated) and encapsulated laccase, respectively. Figure 40 illustrates the normalized residual activity of laccase coated with the CLC, over a 6-month period. While both free and encapsulated samples entirely lost their activity after 132 days, the microencapsulation provides a considerably better stability during the first months of storage at room temperature. Microencapsulated laccase reached 50% of its initial activity after 28 days, in contrast to only 4 days with the paper coated with free laccase. The semi-permeable membrane of the microcapsules acts as a barrier and prevents, or at least restricts, the contact of foreign species with the enzyme.

Protein-degrading microorganisms (bacteria) or biomolecules (proteases), for example, would not be able to permeate into the microcapsules due to the small pore size of the membranes.

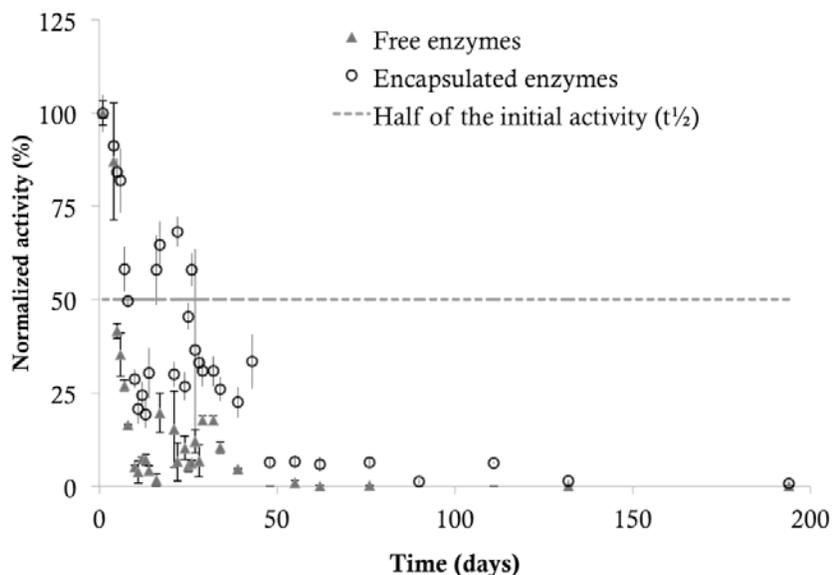
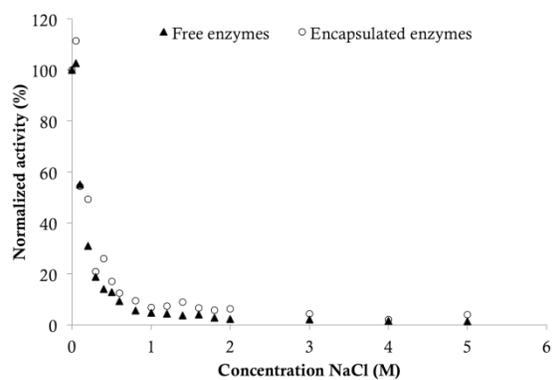


Figure 40. Effect of microencapsulation on activity of coated laccase over several days. Free enzymes and encapsulated enzymes completely lost their activity after 48 and 132 days, respectively.

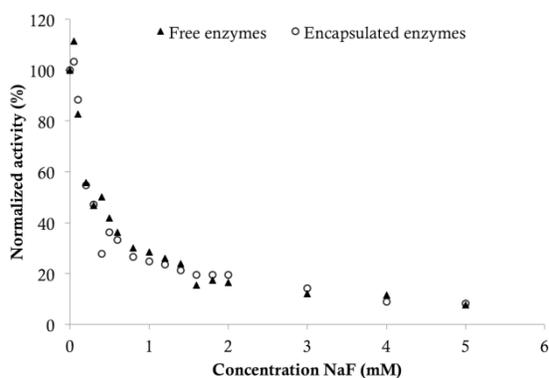
### 3.3.4.5 Resistance to anion inhibition

Like many enzymes, laccase can have its activity decreased by the action of various inhibitors. Contrary to microorganisms, ionic inhibitors would be able to diffuse across the membrane of microcapsules due to their small molecular weight. The most common laccase inhibitors are azide, fluoride and chloride (97, 125, 130). While MilliQ water was used in our laboratory work, tap waters used in the industry, as well as the contaminated waters that could be treated with bioactive filters, contain several ions. Therefore, an

evaluation of their effect on the enzymatic activity is required. The inhibitory effect on laccase for each of these inhibitors was evaluated on our coated bioactive paper by dissolving various amounts of the anion (e.g. sodium chloride) in the buffer test solution containing PPD. Figure 41 presents a decrease in activity with an increase in inhibitor concentration for papers coated with free and microencapsulated laccase.



(a)



(b)

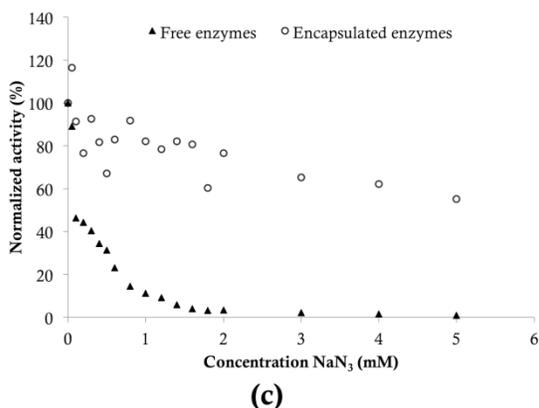


Figure 41. Normalized activities of ( $\Delta$ ) free and (o) encapsulated enzymes in presence of different concentrations of inhibitors: (a) NaCl, (b) NaF and (c) NaN<sub>3</sub>. In this figure, 100% represents the activity of paper in absence of any inhibitor. Note the different concentration scales for chloride inhibitors.

We anticipated that the cationic poly(ethyleneimine) microcapsules would complexify the anionic inhibitors (142). However, it appears that the microcapsules prevented laccase inhibition only from azide. Both curves obtained in the case of chloride and fluoride are nearly identical. The inhibition resistance of microencapsulated laccase cannot be solely attributed to electrostatic interactions between the anions and the cationic membrane.

Halides inhibit laccase by binding to the oxygen reduction site of the enzyme (T2/T3 copper atoms site) (27). Studies of trinuclear copper oxidases similar to laccase, such as the ascorbate oxidase and ceruloplasmin (125, 143), showed that azide binds to these enzymes at one of the T3 copper ions (Cu2) (125, 143) in the proximity of one of the six histidines (H1020) that are found in this site. The azide in this case releases an oxygen linked between the two T3 copper (Cu2, Cu3) and, as a result, the distance between both copper atoms increases. The exchange of electrons necessary for the oxidation of the molecule found at the T1 site becomes no longer possible.

On the other hand, there is controversy concerning the binding site of azide for laccase (144). Some authors reported that azide binds to the T2 site, whereas others

stipulated that it is the T3 site. Some reported that azide can bind to both sites separately (125). Apparently there is no doubt regarding the loss of the OH molecule bounded between coppers T2 and T3 thus, as a result, the reduction of water is no longer possible.

Furthermore, literature tells us that the different bonding mechanisms of the inhibitors to the laccase remains to elucidate, but one difference has been found: fluoride does not bind T2 when copper T3 is reduced, but azide will preferably binds to T2 when T3 is reduced (145). Thus, the resistance to inhibition observed for azide may be explained on the basis of fluoride and chloride binding to one copper type whereas only azide preferably binds to T2 copper. We have already demonstrated that PEI interacts strongly with laccase close to its active site (32). PEI, which is a potent Cu complexing agent, may prevent the interaction between azide and laccase by hindering its access to the active site. Smaller anions like chloride and fluoride would still be able to interact with the active site and inhibit laccase. This hypothesis could be verified by EPR spectroscopy.

### **3.3.5 Conclusions**

The purpose of this paper was to demonstrate that microencapsulation constitutes an appropriate approach to immobilize laccase on paper by conventional coating techniques. Microcapsules can be prepared and mixed afterwards with a coating suspension to modify papers at moderately high rates (500-800 m/min) on a CLC while maintaining the enzyme active and allowing a good control of the enzyme surface coverage of papers. Papers were dried on the CLC for 30 s using IR. Although we observed no decrease in activity between the samples dried at 25°C and those dried for 30 s at maximum IR lamp power, results from future work on the effect on enzymes of the temperature reached during drying will be compared to those obtained in the literature (9, 131). This will provide a better understanding of the possible activity losses resulting from industrial papermaking processes, where roll drying can be used instead of IR. Papers coated with microencapsulated laccase maintained the enzymatic activity for a longer storage period (50% loss after 28 days at room temperature) than those prepared with free enzyme (50%

loss after 4 days). The microcapsules prevented the inhibition of laccase by azide yet did not offer any beneficial effect for chloride and fluoride inhibition. While the exact cause of resistance to azide offered by the poly(ethyleneimine)-based membranes remains to be elucidated, this result demonstrates the importance of polymer selection for the microcapsules within the context of bioactive paper. It is expected that other polymers could decrease the effect of other inhibitors or interfering species present in a specific environment where bioactive paper could be applied with great benefit. The coating technique presented here is representative of the larger scale processes currently used in papermaking industries. The microencapsulation platform is however very versatile and other enzymes and biomolecules could be coated on papers, and at large scales using our technique.

Our preliminary results show that shear rate can affect the activity of coated laccase, nevertheless more studies have to be done in order to elucidate the nature of this tendency. Future work will focus on the microscopy analysis of coated microcapsules in order to elucidate how they affect the activity of enzymes and the structure of microcapsules as a function of the shear rate.

### **3.3.6 Acknowledgements**

Authors acknowledge the NSERC SENTINEL-Canadian Network for the Development and Use of Bioactive Paper for funding this research. Penford Products is also thanked for their generous donation of the commercial-grade starch used in our experiments. We are grateful to Patrice Mangin from the “Centre de recherche en pâtes et papiers” for providing an access to the CLC. Finally, we would like to thank Daniel Matte and Nancy Jacob from the “Centre international de couchage” for supplying paper and training in the use of the CLC.

## 4 Conclusions

L'objectif principal de notre travail de recherche est le développement commercial d'un biocapteur appelé papier bioactif. Ainsi, pour donner au papier les propriétés de biocapteur, notre groupe a démontré dans le passé et dans le présent travail qu'il est possible de se servir des systèmes enzymatiques. D'autre part, notre groupe a démontré que la microencapsulation peut être utilisée pour immobiliser<sup>38</sup> les enzymes sur le papier et en augmenter la stabilité. Pour poursuivre dans le développement commercial du papier bioactif, il faut prouver que les systèmes enzymatiques que nous proposons peuvent être appliqués à grande échelle. Pour ce faire, nous présentons le couchage à lame comme une option prometteuse pour appliquer sur le papier les systèmes enzymatiques. Les expériences ont été réalisées en utilisant des modifications au niveau laboratoire, petite échelle et grande échelle, et les analyses ont été réalisées à l'aide de techniques existantes et nouvelles. En ce sens, notre laboratoire a développé une technique basée sur la numérisation d'images qui s'est avérée efficace pour analyser des biocapteurs colorimétriques. En effet, elle permet d'analyser 100 échantillons en 1 heure, temps requis auparavant pour évaluer 2 échantillons dans la cellule à oxygène et 4 avec le spectrophotomètre.

Les résultats présentés dans ce travail ont permis d'atteindre l'objectif de créer un biocapteur en conditions de grande échelle; en effet, nous avons pu démontrer pour la première fois, à notre connaissance, la possibilité d'utiliser le couchage à lame pour appliquer des systèmes enzymatiques. Ces résultats ouvrent la voie pour le développement commercial du papier bioactif: premièrement, parce que le couchage à lame est la technique la plus répandue et la plus rapide pour modifier des surfaces sèches de papier (77, 81); et deuxièmement, parce que les modifications ainsi réalisées permettent d'obtenir un

---

<sup>38</sup> Les enzymes (5 nm) sont mieux retenues grâce au fait que les microcapsules (60 µm) sont plus grandes que la taille des pores du papier (~10 µm).

biocapteur à un faible coût de production, soit de 1.40 \$/m<sup>2</sup> quand la laccase libre est utilisée comme agent de reconnaissance (Annexe 5.1).

Parallèlement, on a démontré la possibilité d'utiliser la microencapsulation pour augmenter la stabilité des enzymes appliquées par rapport au temps. Le coût de la microencapsulation à grande échelle est trois fois plus élevé (4.40 \$/m<sup>2</sup>). Cependant le temps de demi-vie des papiers avec enzymes microencapsulées, entreposés à la température ambiante, est de 28 jours, soit sept fois plus élevé qu'avec des enzymes libres (4 jours). De plus, on a démontré que la microencapsulation augmente la résistance spécifique de la laccase aux ions azidures. Beaucoup de travail reste à faire pour éclaircir le mécanisme d'action de cette protection inattendue. Qui est probablement due au fait que la charge positive du PEI modifie le potentiel d'oxydation du PPD ou la structure du site actif de la laccase. Cependant, il est clair que cette différence peut aider à éclaircir le mécanisme d'inhibition encore méconnu du site actif T2/T3. Parmi les raisons proposés dans ce travail pour expliquer cette différence se trouve la préférence de l'ion azidure pour se lier au cuivre T2 quand le cuivre T3 se trouve réduit; ainsi, notre supposition est que la liaison avec le cuivre T2 est empêchée par la proximité du PEI. L'étude approfondie de ce phénomène se trouve en dehors des objectifs de notre recherche et la réponse n'a pas été trouvée. Pour vérifier la véracité de nos suppositions, il serait souhaitable de réaliser dans un futur travail une comparaison des distances de liaison des cuivres T2/T3 ainsi que de leur radical peroxyde. Cette étude pourrait par exemple comparer la liaison avec la laccase des différents inhibiteurs en incluant bien sûr l'ion azidure, en présence et en absence du PEI. Diverses techniques disponibles à l'Université de Montréal pourraient être utilisées à ces fins, telles que la résonance électronique paramagnétique pour évaluer le cuivre T2 et le dichroïsme circulaire vibrationnel, ainsi que la spectroscopie à 330 nm pour obtenir l'information en ce qui concerne les cuivres T3.

D'autres analyses à réaliser pouvaient être, par exemple, l'évaluation de l'activité enzymatique suite à l'addition de pigments et d'additifs dans la sauce de couchage. Ces produits d'usage courant dans l'industrie papetière sont utilisés afin d'améliorer les

caractéristiques des applications. L'évaluation de l'activité par rapport à la présence des dits produits peut s'avérer intéressante pour ajuster l'apparence, le rendement, la luminosité et la porosité selon les applications souhaitées.

Dans le passé, notre groupe a démontré l'utilisation de la laccase dans la détection du PPD, qui est hautement toxique quand ingéré. Ce travail nous a permis de concentrer nos efforts sur la mise au point du couchage comme technique d'application à grande échelle. Cependant, tel qu'indiqué à la section 1.3.1.1.4, la laccase peut être utilisée pour la détection et l'inactivation d'un grand nombre de substances toxiques, notamment les aflatoxines. Cette dernière cible se révèle intéressante comme application pour le papier bioactif, étant donné que les aflatoxines sont des contaminants assez répandus dans les produits d'alimentation humaine et animale. En effet, selon la FAO, le contact avec ces mycotoxines peut produire « de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, ainsi que sur l'appareil digestif. Elles peuvent aussi avoir des effets carcinogènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs » (146). Réaliser la détection des aflatoxines dans les produits pour le bétail ou les animaux de compagnie pourrait faciliter la mise en marché de ce produit du côté législatif. En même temps, cette application est très intéressante du point de vue économique si on tient compte que, dans l'industrie d'élevage et du bétail, les aflatoxines produisent la perte aux États-Unis et au Canada de 5 milliards de dollars chaque année (146). Finalement, faire la preuve de l'utilisation du papier bioactif, dans une première étape, pour des produits alimentaires animaux peut faciliter ultérieurement leur mise en marché pour les produits alimentaires humains. Avant de trouver ces produits sur le marché, il reste beaucoup de travail à faire, dont une évaluation de l'efficacité et de la spécificité de ce biocapteur dans un échantillon complexe et sous des conditions réelles. De nouvelles applications dérivées de l'utilisation d'autres systèmes enzymatiques que la laccase pourraient également s'avérer très intéressantes. En intensifiant et en diversifiant la recherche dans le domaine des biocapteurs, peut-être qu'un jour l'homme va réussir à prévenir les maladies en regardant la couleur d'un papier.

## Bibliographie

1. Robert P, Rey A, Rey-Debove J. Dictionnaire Alphabétique et Analogique de la Langue Française : le Nouveau Petit Robert. Paris Montréal: Le Robert ; Dicorobert; 1993.
2. Perros G. Papiers Collés. Paris: Gallimard; 1990.
3. Rubin R, Strayer DS. Rubin's Pathology : Clinicopathologic Foundations of Medicine. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
4. Mathers C, Fat DM, Boerma JT, Organisation mondiale de la santé. The Global Burden of Disease : 2004 Update. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
5. Friis RH. Epidemiology 101. Sudbury, Mass. ; Toronto: Jones and Bartlett Publishers; 2010.
6. Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Sindi H, Whitesides GM. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. *Analytical Chemistry*. 2008;80(10):3699-707.
7. Aikio S, Grönqvist S, Hakola L, Hurme E, Jussila S, Kaukonen O-V, et al. Bioactive Paper and Fibre Products. Patent and Literary Survey. Oulu: VTT Technical Research Centre of Finland. 2006.
8. Pelton R. Bioactive Paper Provides a Low-Cost Platform for Diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009;28(8):925-42.
9. Khan MS, Haniffa SBM, Slater A, Garnier G. Effect of Polymers on the Retention and Aging of Enzyme on Bioactive Papers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;79(1):88-96.
10. Bulgakov M. Le Maître et Marguerite : Roman. Paris: Laffont; 1987.
11. MacDonald C. Industry News (Canadian Forest Industry Vs. Canadian Auto Industry). *Pulp and Paper Canada*. 2009;110(5-6):13-6.
12. Chiras DD. Environmental Science. 8th ed. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett; 2006.
13. Official Report (Hansard). Canada: 40th Parliament 2009. Report No.: 095.
14. Forel F. Effects on Coated Paper Quality of Uncoated and Coated Sheet Drying Strategy. Montréal: McGill; 2004.

15. Nadeau J-B. Forêts - Demain, L'or Boréal - Carburants, Médicaments, Textiles, Cosmétiques: Avec les Arbres, on Fera Plus que des Meubles. Les Bioraffineries, Planche de Santé de la Forêt Québécoise? *L'Actualité*. 2008;33(5):40.
16. MacDonald C. Industry News (Federal Government Provides \$80 Million for Forest Product Innovation). *Pulp and Paper Canada*. 2009;110(5-6):13-6.
17. Raitt L, Blackburn J-P. Canada Economic Action Plan. 2009; Available from: <http://www.actionplan.gc.ca/eng/media.asp?id=1443>.
18. Tothill IE. Biosensors Developments and Potential Applications in the Agricultural Diagnosis Sector. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2001;30(1-3):205-18.
19. Ravindra NM, Prodan C, Fnu S, Padroni I, Sikha SK. Advances in the Manufacturing, Types, and Applications of Biosensors. *JOM*. 2007;59(12):37-43.
20. Leca-Bouvier BD, Blum LJ. Enzyme for Biosensing Applications. In: Zourob M, editor. *Recognition Receptors in Biosensors*: Springer New York; 2010. p. 177-220.
21. Hossain SMZ, Luckham RE, Smith AM, Lebert JM, Davies LM, Pelton RH, et al. Development of a Bioactive Paper Sensor for Detection of Neurotoxins Using Piezoelectric Inkjet Printing of Sol-Gel-Derived Bioinks. *Analytical Chemistry*. 2009;81(13):5474-83.
22. Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, Adley C. An Overview of Foodborne Pathogen Detection: In the Perspective of Biosensors. *Biotechnol Adv*. 2010;28(2):232-54.
23. Voet D, Voet JG. *Biochimie*. 2e éd. ed. Bruxelles: De Boeck; 2005. p. 491-3.
24. Gendron K. Immobilisation D'enzymes par Microcapsules Polymérisées pour le Développement de Biocapteurs. Montréal: Université de Montréal; 2008.
25. Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31(7):907-31.
26. Hildén K, Hakala T, Lundell T. Thermotolerant and Thermostable Laccases. *Biotechnology Letters*. 2009-08-01;31(8):1117-28.
27. Witayakran S, Ragauskas A. Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2009;351(9):1187-209.

28. Yoshida H. Chemistry of Lacquer (Urushi). Part I. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. [ Communication from the Chemical Society of Tokio]. 1883;43:472-86.
29. Suderman RJ, Dittmer NT, Kanost MR, Kramer KJ. Model Reactions for Insect Cuticle Sclerotization: Cross-Linking of Recombinant Cuticular Proteins Upon Their Laccase-Catalyzed Oxidative Conjugation with Catechols. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36(4):353-65.
30. Mayer AM, Staples RC. Laccase: New Functions for an Old Enzyme. *Phytochemistry*. 2002;60(6):551-65.
31. Thurston CF. The Structure and Function of Fungal Laccases. *Microbiology*. 1994;140(1):19-26.
32. Rochefort D, Kouisni L, Gendron K. Physical Immobilization of Laccase on an Electrode by Means of Poly(Ethyleneimine) Microcapsules. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2008;617(1):53-63.
33. Piontek K, Antorini M, Choinowski T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes Versicolor* at 1.90-Angstrom Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(40):37663-9.
34. Zhang Y, Rochefort D. Comparison of Emulsion and Vibration Nozzle Methods for Microencapsulation of Laccase and Glucose Oxidase by Interfacial Reticulation of Poly(Ethyleneimine). *Journal of Microencapsulation*. 2010;27(8):703-13.
35. Koschorreck K, Richter SM, Swierczek A, Beifuss U, Schmid RD, Urlacher VB. Comparative Characterization of Four Laccases from *Trametes Versicolor* Concerning Phenolic C-C Coupling and Oxidation of Paks. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;474(1):213-9.
36. Alberts JF, Gelderblom WCA, Botha A, van Zyl WH. Degradation of Aflatoxin B1 by Fungal Laccase Enzymes. *Int J Food Microbiol*. 2009;135(1):47-52.
37. Mousty C, Vieille L, Cosnier S. Laccase Immobilization in Redox Active Layered Double Hydroxides: A Reagentless Amperometric Biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*. 2007;22(8):1733-8.
38. Hu X, Wang P, Hwang H-m. Oxidation of Anthracene by Immobilized Laccase from *Trametes Versicolor*. *Bioresource Technology*. 2009;100(21):4963-8.
39. Babu PK, Chung JH, Oldfield E, Wieckowski A. Co Surface Diffusion on Platinum Fuel Cell Catalysts by Electrochemical Nmr. *Electrochimica Acta*. 2008;53(23):6672-9.

40. Freire RS, Ferreira MMC, Durán N, Kubota LT. Dual Amperometric Biosensor Device for Analysis of Binary Mixtures of Phenols by Multivariate Calibration Using Partial Least Squares. *Analytica Chimica Acta*. 2003;485(2):263-9.
41. Hu XK, Zhao XH, Hwang HM. Comparative Study of Immobilized *Trametes Versicolor* Laccase on Nanoparticles and Kaolinite. *Chemosphere*. 2007;66(9):1618-26.
42. Leech D, Feerick KO. Biosensor Warning Devices: Reagentless Detection of Modulators of Laccase Activity. *Electroanalysis*. 2000;12(16):1339-42.
43. Rochefort D. Étude des Réactions Enzymatiques et Électrochimiques Impliquées Dans le Bioblanchiment de la Pâte à Papier. Montréal: Université de Montréal; 2001.
44. Charmley LL, Trenholm HL, Prelusky DB. Mycotoxins: Their Origin, Impact and Importance: Insights into Common Methods of Control and Elimination. Lyons TP, Jacques KA, editors. Loughborough: Nottingham University Press; 1995.
45. Charmley LL, Trenholm HL. Fact Sheet - Mycotoxins. Ottawa: Canadian Food Inspection Agency; 2009 [updated Canadian Food Inspection Agency]; Available from: <http://www.inspection.gc.ca/english/anima/feebet/pol/mycoe.shtml>.
46. Couto SR, Osma JF, Saravia V, Gubitz GM, Herrera JLT. Coating of Immobilised Laccase for Stability Enhancement: A Novel Approach. *Applied Catalysis a-General*. 2007;329:156-60.
47. Smolander M, Boer H, Valkiainen M, Roozeman R, Bergelin M, Eriksson J-E, et al. Development of a Printable Laccase-Based Biocathode for Fuel Cell Applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;43(2):93-102.
48. Jiang Y, Sun Q, Jiang Z, Zhang L, Li J, Li L, et al. The Improved Stability of Enzyme Encapsulated in Biomimetic Titania Particles. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(1):328-34.
49. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity Via Immobilization Techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(6):1451-63.
50. Hoshino K, Muramatsu N, Kondo T. A Study on the Thermostability of Microencapsulated Glucose Oxidase. *Journal of Microencapsulation*. 1989;6(2):205-11.
51. Iso M, Shirahase T, Hanamura Si, Urushiyama S, Omi S. Immobilization of Enzyme by Microencapsulation and Application of the Encapsulated Enzyme in the Catalysis. *Journal of Microencapsulation*. 1989;6(2):165-76.

52. Komori T, Muramatsu N, Kondo T. A Study on Heat-Resistance of Microencapsulated Glucose Oxidase. *Journal of Microencapsulation*. 1986;3(3):219-21.
53. Hébert M, Rochefort D. Electrode Passivation by Reaction Products of the Electrochemical and Enzymatic Oxidation of P-Phenylenediamine. *Electrochimica Acta*. 2008;53(16):5272-9.
54. Hébert M, Rochefort D. Investigation of Microencapsulated Laccase as Enzyme Immobilization Template for Application in Bio-Fuel Cell. *ECS Trans*. 2008;16(11):85-97.
55. Kouisni L, Rochefort D. Confocal Microscopy Study of Polymer Microcapsules for Enzyme Immobilisation in Paper Substrates. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009;111(1):1-10.
56. Poncelet D. Life Is Based on a Combination of Biochemistry and Bioencapsulation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2007;6(2):685-6.
57. Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. Microencapsulation : des Sciences Aux Technologies. Paris: Éditions Tec & Doc; 2007. p. 23-33.
58. Benita S. Microencapsulation : Methods and Industrial Applications. 2nd ed. New York: Taylor & Francis; 2006.
59. Poncelet D. Microencapsulation: Fundamentals, Methods and Applications. In: Blitz J, Gun'ko V, editors. Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science. Dordrecht: Springer Netherlands; 2006. p. 23-34.
60. Boh B. Developpements et Applications Industrielles des Microcapsules. In: Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P, editors. Microencapsulation des Sciences Aux Technologies. Paris: Lavoisier; 2007. p. 9-22.
61. Poncelet D, Christelle D. Les Méthodes de Microencapsulation de a à Z (Ou Presque). In: Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P, editors. Microencapsulation des Sciences Aux Technologies. Paris: Lavoisier; 2007. p. 23-34.
62. Devassine M. La Microencapsulation : Une Nouvelle Approche. CARMA2005.
63. Blaiszik BJ, Caruso MM, McIlroy DA, Moore JS, White SR, Sottos NR. Microcapsules Filled with Reactive Solutions for Self-Healing Materials. *Polymer*. 2009;50(4):990-7.
64. Caruso MM, Delafuente DA, Ho V, Sottos NR, Moore JS, White SR. Solvent-Promoted Self-Healing Epoxy Materials. *Macromolecules*. 2007;40(25):8830-2.

65. Yin T, Zhou L, Rong MZ, Zhang MQ. Self-Healing Woven Glass Fabric/Epoxy Composites with the Healant Consisting of Micro-Encapsulated Epoxy and Latent Curing Agent. *Smart materials & structures*. 2008;17(1):15019.
66. Yang JL, Keller MW, Moore JS, White SR, Sottos NR. Microencapsulation of Isocyanates for Self-Healing Polymers. *Macromolecules*. 2008;41(24):9650-5.
67. Wool RP. Self-Healing Materials: A Review. *Soft Matter*. 2008;4(3):400-18.
68. Kalista Jr SJ. Self-Healing of Thermoplastic Poly(Ethylene-Co-Methacrylic Acid) Copolymers Following Projectile Puncture. Blacksburg2003.
69. Guerrero Palacios MP, Ortmann M, Rogers-Vallée K, Rochefort D, Bertrand F, Mangin P. Large Scale Coating of Microcapsules for Enzyme Immobilization in Bioactive Paper. 93rd Canadian Chemistry Conference and Exhibition; July 2010; Toronto, Ontario, Canada, 2010.
70. Poncelet D, Alexakis T, Desmet BP, Neufeld RJ. Microencapsulation within Cross-Linked Polyethyleneimine Membranes. *Journal of Microencapsulation*. 1994;11(1):31-40.
71. Braun D. Polymer synthesis theory and practice : fundamentals, methods, experiments. 4th ed. Berlin ; New York: Springer; 2005. p. 57.
72. Dhumal SS, Suresh AK. A Comprehensive Model for Kinetics and Development of Film Structure in Interfacial Polycondensation. *Polymer*. 2009;50(24):5851-64.
73. Arshady R, George MH. Suspension, Dispersion, and Interfacial Polycondensation: A Methodological Survey. *Polymer Engineering & Science*. 1993;33(14):865-76.
74. Arshady R. Microspheres and Microcapsules: A Survey of Manufacturing Techniques. Part 1: Suspension Cross-Linking. *Polymer Engineering & Science*. 1989;29(24):1746-58.
75. Maurer HW, Industry. TAotPaP. Starch and Starch Products in Surface Sizing and Paper Coating. Atlanta: TAPPI; 2001.
76. Di Risio S, Yan N. Bioactive Paper through Inkjet Printing. *J Adhes Sci Technol*. 2010;24(3):661-84.
77. Iliopoulos I, Scriven LE. A Blade-Coating Study Using a Finite-Element Simulation. *Physics of fluids*. 2005;17(12):127101.

78. Hossain SMZ, Luckham RE, McFadden MJ, Brennan JD. Reagentless Bidirectional Lateral Flow Bioactive Paper Sensors for Detection of Pesticides in Beverage and Food Samples. *Analytical Chemistry*. 2009;81(21):9055-64.
79. Walter JC, Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Coating Process Committee. The Coating Processes. Georgia: Tappi Press.; 1993.
80. Triantafillopoulos N, Gron J, Luostarinen I, Paloviita A. Operational Issues in High-Speed Curtain Coating of Paper, Part 1: The Principles of Curtain Coating. *Tappi Journal*. 2004;3(11):6-10.
81. Maurer HW. Roll Coating and Blade Coating of Paper. Starch and Starch Products in Surface Sizing and Paper Coating. Atlanta: TAPPI; 2001. p. 99-103.
82. Lipponen J, Grön J, Bruun S, Laine T. Surface Sizing with Starch Solutions at Solids Contents up to 30%. *Professional Papermaking*. 2003;1(2003):55.
83. Egorova N. Using Slit Rheometry in Characterising Coating Colour Flow in the Blade Coating Process. Helsinki: Helsinki University of Technology 2006.
84. Lipponen J, Grön J, Bruun SE, Laine T. Surface Sizing with Starch Solutions at Solids Contents up to 18%. *Journal of Pulp and Paper Science*. 2004;30(3):82-90.
85. Modaressi H, Garnier G. Mechanism of Wetting and Absorption of Water Droplets on Sized Paper: Effects of Chemical and Physical Heterogeneity. *Langmuir*. 2002;18(3):642-9.
86. Lu Y, Shi WW, Qin JH, Lin BC. Fabrication and Characterization of Paper-Based Microfluidics Prepared in Nitrocellulose Membrane by Wax Printing. *Analytical Chemistry*. [Article]. 2010;82(1):329-35.
87. Carrilho E, Phillips ST, Vella SJ, Martinez AW, Whitesides GM. Paper Microzone Plates. *Analytical Chemistry*. 2009;81(15):5990-8.
88. Liu XY, Cheng CM, Martinez AW, Mirica KA, Li XJ, Phillips ST, et al., editors. A Portable Microfluidic Paper-Based Device for Elisa. Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2011 IEEE 24th International Conference on; 2011 23-27 Jan. 2011.
89. Nakamura H, Karube I. Current Research Activity in Biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003;377(3):446-68.
90. Yang Z, Suzuki H, Sasaki S, Karube I. Design and Validation of a Low-Cost Paper-Based Oxygen Electrode. *Analytical Letters*. 1997;30(10):1797-807.

91. Reshetilov AN. Biosensor Development in Russia. *Biotechnology Journal*. 2007;2(7):849-62.
92. Cheng C-M, Martinez AW, Gong J, Mace CR, Phillips ST, Carrilho E, et al. Paper-Based Elisa. *Angew Chem Int Ed*. 2010;49(28):4771-4.
93. Ali MM, Aguirre SD, Lazim H, Li Y. Fluorogenic Dnzyme Probes as Bacterial Indicators. *Angew Chem Int Ed*. 2011;50(16):3751-4.
94. Jabrane T, Jeaidi J, Dube M, Mangin PJ. Gravure Printing of Enzymes and Phages. In: Enlund N, Lovrecek M, editors. *Advances in Printing and Media Technology*, Vol Xxxv2008. p. 279-88.
95. Lee DS, Jeon BG, Ihm C, Park JK, Jung MY. A Simple and Smart Telemedicine Device for Developing Regions: A Pocket-Sized Colorimetric Reader. *Lab Chip*. [Article]. 2011;11(1):120-6.
96. Martinez AW, Phillips ST, Nie Z, Cheng C-M, Carrilho E, Wiley BJ, et al. Programmable Diagnostic Devices Made from Paper and Tape. *Lab Chip*. 2010;10(19):2499-504.
97. Johannes C, Majcherczyk A. Laccase Activity Tests and Laccase Inhibitors. *J Biotechnol*. 2000;78(2):193-9.
98. Liu Z, Zhang D, Hua Z, Li J, Du G, Chen J. Improvement of Laccase Production and Its Properties by Low-Energy Ion Implantation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2010;33(5):639-46.
99. Dawson RMC. Ph, Buffers, and Physiological Media. *Data for Biochemical Research*. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press; 1986. p. 427.
100. Willett JL, Jasberg BK, Swanson CL. Rheology of Thermoplastic Starch: Effects of Temperature, Moisture Content, and Additives on Melt Viscosity. *Polymer Engineering & Science*. 1995;35(2):202-10.
101. Mathew S, Adlercreutz P. Mediator Facilitated, Laccase Catalysed Oxidation of Granular Potato Starch and the Physico-Chemical Characterisation of the Oxidized Products. *Bioresource Technology*. 2009;100(14):3576-84.
102. Maurer HW. Use of Starch in the Paper Industry. *Starch and Starch Products in Surface Sizing and Paper Coating*. 2e ed. Atlanta: TAPPI; 2001. p. 170.
103. Horsfield B. Cylindrical Laboratory Coater (Clc) Operators Manual for Models Clc-6000™ and Clc-7000™. Hoodspout: SimuTech International, Inc; 2003.

104. Leonowicz A, Cho N, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, et al. Fungal Laccase: Properties and Activity on Lignin. *Journal of Basic Microbiology*. 2001;41(3-4):185-227.
105. Brookfield Dv-Ii + Pro Programable Viscometer. Operation Instructions. Middleboro, MA. Available from: <http://www.brookfieldengineering.com>.
106. Roper DA, Attal JF. Evaluations of Coating High-Speed Runnability Using Pilot Coater Data, Rheological Measurements, and Computer Modeling. *Tappi Journal*. 1993;76:55-62.
107. MEYER H. The Ninhydrin Reaction and Its Analytical Applications. *Biochem J*. 1957;67(2):333-40.
108. McCaldin DJ. The Chemistry of Ninhydrin. *Chem Rev*. 1960;60(1):39-51.
109. Friedman M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(3):385-406.
110. Mills A. The Rank Brothers Oxygen Electrode. Operating Manual. Cambridge: Rank Brothers Ltd.; 2002.
111. Aoki M, Tsujino Y, Kano K, Ikeda T. Significance of Uricase in Oxidase-Induced Oxidative Coloring Reaction of P-Phenylenediamine. *J Org Chem*. 1996;61(16):5610-6.
112. Owen AE. Fundamentals of Uv-Visible Spectroscopy : A Primer: Hewlett Packard; 1996.
113. Delanoy G, Li Q, Yu J. Activity and Stability of Laccase in Conjugation with Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2005;35(1-2):89-95.
114. Van Hecke W, Salaheddin C, Ludwig R, Dewulf J, Haltrich D, Van Langenhove H. Biocatalytic Cascade Oxidation Using Laccase for Pyranose 2-Oxidase Regeneration. *Bioresource Technology*. 2009;100(23):5566-73.
115. Ibrahim V, Mendoza L, Mamo G, Hatti-Kaul R. Blue Laccase from *Galerina* Sp.: Properties and Potential for Kraft Lignin Demethylation. *Process Biochem*. 2011;46(1):379-84.
116. Mishra A, Kumar S, Kumar Pandey A. Laccase Production and Simultaneous Decolorization of Synthetic Dyes in Unique Inexpensive Medium by New Isolates

- of White Rot Fungus. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2011;In Press, Corrected Proof.
117. Vasdev K, Dhawan S, Kapoor RK, Kuhad RC. Biochemical Characterization and Molecular Evidence of a Laccase from the Bird's Nest Fungus *Cyathus Bulleri*. *Fungal Genetics and Biology*. 2005;42(8):684-93.
  118. Wong D. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009;157(2):174-209.
  119. Cornish-Bowden A, Jamin M, Saks V. Cinétique Enzymatique. Les Ulis: EDP sciences; 2005. p. 283-5.
  120. Bacquet RJ, McCammon JA, Allison SA. Ionic Strength Dependence of Enzyme-Substrate Interactions: Monte Carlo and Poisson-Boltzmann Results for Superoxide Dismutase. *The Journal of Physical Chemistry*. 1988;92(25):7134-41.
  121. Milstein O, Nicklas B, Huttermann A. Oxidation of Aromatic-Compounds in Organic-Solvents with Laccase from *Trametes-Versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1989;31(1):70-4.
  122. Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. Biocatalysts and Enzyme Technology. Weinheim: Wiley-VCH; 2005. p. 63-5.
  123. Cui T. Enhanced Large-Scale Production of Laccases from *Coriolopsis Polyzona* for Use in Dye Bioremediation. [PhD]: University of Westminster; 2009.
  124. Lorenzo M, Moldes D, Couto SR, Sanroman MA. Inhibition of Laccase Activity from *Trametes Versicolor* by Heavy Metals and Organic Compounds. *Chemosphere*. 2005;60(8):1124-8.
  125. Gromov I, Marchesini A, Farver O, Pecht I, Goldfarb D. Azide Binding to the Trinuclear Copper Center in Laccase and Ascorbate Oxidase. *European Journal of Biochemistry*. 1999;266(3):820-30.
  126. Gudin S, Mintz E, Université Joseph F. Etude de L'atpase Cuivre Eucaryote Ccc2 de *Saccharomyces Cerevisiae*. De la Localisation à la Fonction. Grenoble: Université Joseph-Fourier - Grenoble I; 2008.
  127. Allendorf MD, Spira DJ, Solomon EI. Low-Temperature Magnetic Circular Dichroism Studies of Native Laccase: Spectroscopic Evidence for Exogenous Ligand Bridging at a Trinuclear Copper Active Site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(10):3063-7.

128. Xu F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the Ph Activity Profile of Fungal Laccases. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(2):924-8.
129. Strong PJ, Claus H. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2011;41(4):373-434.
130. Leech D, Daigle F. Optimisation of a Reagentless Laccase Electrode for the Detection of the Inhibitor Azide. *Analyst*. 1998;123(10):1971-4.
131. Zhang Y, Rochefort D. Activity, Conformation and Thermal Stability of Laccase and Glucose Oxidase in Poly(Ethyleneimine) Microcapsules for Immobilization in Paper. *Process Biochem*. 2011;46(4):993-1000.
132. Scheller FW, Wollenberger U, Warsinke A, Lisdat F. Research and Development in Biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001;12(1):35-40.
133. Sapsford KE, Francis J, Sun S, Kostov Y, Rasooly A. Miniaturized 96-Well Elisa Chips for Staphylococcal Enterotoxin B Detection Using Portable Colorimetric Detector. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009;394(2):499-505.
134. Monk DJ, Walt DR. Optical Fiber-Based Biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004;379(7):931-45.
135. Lipponen J, Pakarinen J, Jaaskelainen J, Gron J. Mechanical Properties of Woodfree Paper Sheets at Different Surface Size Starch Amounts. *Paperi ja puu*. 2005;87(3):170-5.
136. Alonso S, Bertrand F, Tanguy PA. A Torque-Based Analysis of the Reverse Roll Coating Process. *Chem Eng Sci*. 2003;58(9):1831-7.
137. McDonald JD, Tchepel MV. The Effect of Dryer Section Operation on the Linting Propensity of Newsprint. *Appita Journal*. 2010;63(4):258.
138. Andersson LG. Typical Coating Components. In: Walter JC, editor. *The Coating Processes*. Georgia: Tappi Press.; 1993. p. 9-19.
139. Maurer HW, Kearney RL. Opportunities and Challenges for Starch in the Paper Industry. *Starch-Starke*. 1998;50(9):396-402.
140. Jiao K, Sun W, Zhang S-s, Sun G. Application of P-Phenylenediamine as an Electrochemical Substrate in Peroxidase-Mediated Voltammetric Enzyme Immunoassay. *Analytica Chimica Acta*. 2000;413(1-2):71-8.
141. Cataldo F. On the Polymerization of P-Phenylenediamine. *Eur Polym J*. 1996;32(1):43-50.

142. Reybier K, Zairi S, Jaffrezic-Renault N, Herlem G, Trokourey A, Fahys B. Polyethyleneimine as a Ph Sensitive Film for Potentiometric Transducers. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*. 2001;14(1-2):47-53.
143. Zaitsev VN, Zaitseva I, Papiz M, Lindley PF. An X-Ray Crystallographic Study of the Binding Sites of the Azide Inhibitor and Organic Substrates to Ceruloplasmin, a Multi Copper Oxidase in the Plasma. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1999;4(5):579-87.
144. Fraterrigo TL, Miller C, Reinhammar B, McMillin DR. Which Copper Is Paramagnetic in the Type 2/Type 3 Cluster of Laccase? *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1999;4(2):183-7.
145. Torres J, Svistunenko D, Karlsson B, Cooper CE, Wilson MT. Fast Reduction of a Copper Center in Laccase by Nitric Oxide and Formation of a Peroxide Intermediate. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(6):963-7.
146. FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control., Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual on the Application of the Haccp System in Mycotoxin Prevention and Control. Rome ; [Great Britain]: FAO; 2001.

## **5 Annexes**

### ***5.1 Méthodologies utilisées pour réaliser le couchage à grande échelle***

Cette section est dédiée à l'élaboration d'un guide de consultation rapide des méthodologies nécessaires pour réaliser le couchage à grande échelle de microcapsules de laccase. Ce guide inclut de façon concrète les techniques nécessaires à la synthèse des microcapsules, l'élaboration de la suspension de couchage et le couchage à l'aide du CLC. Il faut mentionner que ce guide n'est pas un manuel d'utilisation, mais un sommaire des réactifs, matériaux et manipulations utilisées pour chaque étape d'expérimentation. En effet, certaines manipulations comme celles du CLC (103) et du viscosimètre Brookfield (105) requièrent une formation personnalisée et une compréhension étendue des instructions incluses dans les manuels d'utilisation.

#### **5.1.1 Microencapsulation par polycondensation interfaciale**

##### **5.1.1.1 Réactifs**

1. 200 mL solution tampon McIlvaine
2. 20 mL Polyéthylèneimine (PEI) 50% eau,  $M_n \sim 1200$ .
3. 4 L acide citrique (0.01 M)
4. 10 mL span 85
5. 5 L cyclohexane
6. 10 mL chlorure de sébacoyl
7. laccase *Trametes versicolor* lyophilisée

##### **5.1.1.2 Equipement**

2 béciers de 600 mL

2 bécher de 250 mL

1 matras de Kitasato de 2 L

1 bécher de 2 L

1 entonnoir Büchner de ~28 cm de diamètre

1 filtre Whatman #4 (taille de pore 20-25  $\mu\text{m}$ ) de même diamètre que l'ouverture de l'entonnoir

1 plateau en plastique découpé pour permettre de couvrir le bécher de 2 L pendant que l'agitation se réalise

1 récipient de 1 L

3 seringues de 20 mL

1 spatule de grande taille

1 agitateur mécanique muni d'une hélice de 8 cm de diamètre

1 chronomètre

1 pipette de 20 mL

1 éprouvette graduée de 250 mL

1 éprouvette graduée de 1 L

### **5.1.1.3 Manipulations**

#### ***5.1.1.3.1 Préparation des solutions***

Solution 1 : Dans un bécher de 2 L ajouter 1 L de cyclohexane et agiter à 1220 rpm à l'aide d'un agitateur mécanique. Ensuite, ajouter 10 mL de span 85 en se servant d'une seringue et continuer l'agitation pendant 5 min.

Solution 2 : Peser la quantité d'enzymes à encapsuler dans un pèse-tare, par exemple 2000 U<sup>39</sup> de laccase *Trametes versicolor*, et diluer dans 200 mL de solution tampon McIlvaine pH 8.5. Pour éviter la formation d'agglomérations, il est préférable d'hydrater à l'avance l'enzyme avec ~5 mL de solution tampon dans bécher de 250 mL et homogénéiser la procédure d'hydratation à l'aide d'un agitateur en verre. Ensuite, ajouter 150 mL de la solution tampon et filtrer la solution afin d'enlever toute matière non soluble. Transférer le filtrat dans un matras jaugé de 200 mL et compléter le volume. Prendre soin d'homogénéiser la solution avant de transvider dans le matras jaugé avec une agitation lente pour d'éviter la formation de mousse. Prélever 20 mL de la solution pour évaluer son activité, mélanger le restant avec 20 mL de PEI et garder à 4° C jusqu'à son utilisation.

Solution 3 : Mélanger 200 mL de cyclohexane et 10 mL de chlorure de sébacoyl dans un bécher de 600 mL.

#### ***5.1.1.3.2 Émulsification et microencapsulation***

Agiter la solution 1 à 1200 rpm à l'aide d'un agitateur mécanique, après 5 minutes d'agitation, ajouter la solution 2 et continuer l'agitation. Au bout de 15 minutes, ajouter la solution 3, continuer l'agitation et couvrir l'émulsion avec le plateau en plastique. La solution devient blanche et opaque car la polycondensation démarre. Continuer l'agitation en faisant attention de dégager les microcapsules qui se collent à la paroi du bécher. 5 minutes après avoir ajouté la solution 3, arrêter l'agitation, filtrer et rincer les microcapsules immédiatement afin d'arrêter la réaction de polycondensation.

---

<sup>39</sup> 1 U correspond à la quantité d'enzymes nécessaire pour transformer 1µmol de catéchol par minute à pH 4.5 et 25 °C.

### ***5.1.1.3.3 Filtration et rinçage***

Filtrer à vide à l'aide d'un matras de Kitasato et un entonnoir Buchner muni du filtre Whatman et laver avec 3 L de cyclohexane, ou jusqu'à éliminer la turbidité de la solution de lavage sortante. Rincer avec 4 L d'acide citrique pour enlever tout excès ou résidu et aider à la dispersion des microcapsules. Dans cette étape, les microcapsules augmentent de deux à trois fois leur volume initial. Prélever un échantillon avec une spatule pour observer l'état physique des microcapsules au microscope optique<sup>40</sup>. Prendre le poids et garder les microcapsules dans un récipient bien fermé à 4 °C.

---

<sup>40</sup> La formation d'une toile à la place de sphères indique une erreur dans la procédure.

## 5.1.2 Suspension de couchage

### 5.1.2.1 Réactifs

- 1500 g d'amidon Penfort 280
- 4 L d'eau milliQ
- 0.5 - 2 Kg de microcapsules
- Laccase *Trametes versicolor*

### 5.1.3 Equipement:

- 1 bain Marie à 25 °C
- 1 autocuiseur
- 1 thermomètre
- 2 béchers de 600 mL
- 1 viscosimètre Brookfield (modèle DVRV-II +)
- 1 agitateur mécanique muni d'une hélice de 8 cm de diamètre
- 4 béchers de 250 mL
- 1 éprouvette graduée de 1000 mL

#### 5.1.3.1 Manipulations

Peser 500 g d'amidon, mélanger chaque échantillon avec 1200 mL d'eau dans l'autocuiseur et chauffer à 80 °C. Compter 30 min à partir du moment où la suspension atteint 80 °C puis sortir les suspensions de l'autocuiseur. Laisser refroidir les suspensions à température ambiante. Une fois atteinte la température ambiante, mélanger la suspension avec les microcapsules (100-375 g) à l'aide de l'agitateur mécanique à 800 rpm. Transvider

400 mL dans un bécher de 600 mL et introduire la tige du Brookfield pour réaliser des mesures de viscosité<sup>41</sup>. Pour éviter l'introduction de bulles d'air, introduire la tige dans la suspension de façon inclinée avant de l'attacher au viscosimètre. Laisser les suspensions au repos pendant une heure dans un bain-marie à 25 °C. Mettre en marche le Brookfield 10 minutes avant d'effectuer les mesures. Réaliser une mesure en laissant tourner 5 fois la tige aux vitesses de 10, 50 et 100 rpm. Noter la viscosité quand le % de torsion est entre 10 et 90 % ; s'il n'est pas possible de réaliser ces mesures, changer la tige et recommencer les mesures. Si nécessaire, ajouter de l'eau pour ajuster la viscosité à une valeur comprise entre 2500 et 9500 mPa·s. Laisser reposer la suspension avant de recommencer les mesures au moins 30 min. Préparer une suspension contenant l'enzyme libre et une autre sans ajouter l'enzyme, laquelle servira de blanc.

---

<sup>41</sup> Selon la quantité d'eau perdue par évaporation, il est conseillé d'utiliser les tiges RV5 à RV7.

## 5.1.4 Couchage à grande échelle à l'aide du CLC-7000

### 5.1.4.1 Réactifs

- 1 rouleau de papier sans bois, largeur : 75 cm, poids:  $\sim 55 \text{ g/m}^2$
- 2 L de suspension d'amidon
- eau distillée

### 5.1.4.2 Equipement

- 1 machine à couchage (CLC-7000)
- 1 viscosimètre Brookfield (modèle DVRV-II +)
- 1 agitateur mécanique muni d'une hélice de 8 cm de diamètre
- 1 gabarit métallique
- 1 spatule
- 1 cutteur
- 1 micromètre
- 1 ruban adhésif
- 1 ruban adhésif étoilé
- 2 éponges
- 1 récipient à 4L
- 1 balance

### 5.1.4.3 Manipulations

Mise en marche de l'appareil : ouvrir la valve à air et activer l'interrupteur général au moins 30 minutes avant de réaliser toute manipulation. Fixer les paramètres de couchage : vitesse d'application de 500 m/min, pré-séchage de 10 s, puissance de la lampe au pré-séchage à 80 %, temps de séchage à 30 s, la puissance de séchage à 100 %, la

distance d'attente à 5 m, la largeur du papier à 75 cm, commencement du patron de couchage commençant à 4 m et finissant à 7 m. Placer la lame dans le récipient à paroi amovible et ajuster la distance de sortie de la lame à l'aide du micromètre. Placer le récipient dans le CLC sans ajouter la porte mobile, et approcher la lame du rouleau pour observer si elle est au niveau, sinon sortir le récipient et replacer la lame. Une fois que la lame est au niveau, ajouter du ruban étoilé, séparer le récipient le plus possible du rouleau et fermer le CLC. Faire une séquence à vide afin de chauffer le rouleau. Ouvrir la porte du CLC et approcher la lame du rouleau jusqu'à toucher légèrement la surface. Noter la distance, qui servira de point zéro pour les ajustements.

Ajuster le papier sur le rouleau et le fixer à l'aide du ruban à mesurer. Ajouter la paroi amovible du récipient et transférer la suspension à l'intérieur. Fermer le CLC et démarrer une séquence afin de coucher la suspension sur le papier. Enlever le papier à l'aide de la spatule pour décoller le ruban adhésif. Découper du papier couché et comparer avec le papier non couché pour obtenir le poids de couche.

## 5.2 Coût de production du papier enzymatique

La Figure 42 montre la proportion du coût de production du papier enzymatique à l'aide du CLC, qui varie de 1.40 et 4.40 \$ CA/m<sup>2</sup> pour le papier obtenu à partir d'enzymes libres et microencapsulées, respectivement. Il est à remarquer que dans le cas du papier obtenu à partir de couchage des microcapsules, ce qui coûte le plus cher ne sont pas les enzymes (41 %), mais le solvant utilisé pendant la microencapsulation (47 %).

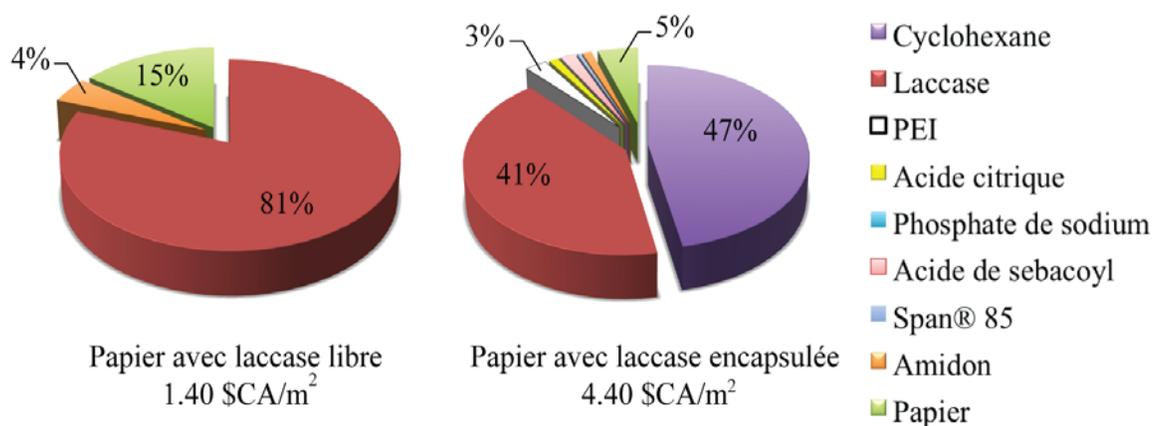


Figure 42. Coût de production du papier enzymatique, couché à l'aide du CLC.

Il existe une différence entre les prix de production, qui est trois fois plus élevé pour la laccase microencapsulée que pour l'enzyme libre. Cependant il faut tenir compte que dans le cas du couchage à grande échelle, la microencapsulation augmente sept fois le temps de demi-vie de l'enzyme; en effet, les papiers perdent 50 % de leur activité après 4 et 28 jours quand ils sont modifiés avec la laccase libre et encapsulée respectivement. Finalement, il est possible de faire baisser le coût de production en utilisant des solvants plus abordables.

### 5.3 Automatisation des mesures

La numérisation des images a été effectuée à l'aide d'un logiciel conçu dans le laboratoire Rochefort. Dans le but de rendre accessible au lecteur ce type d'automatisation, nous avons inclus ci-dessous une version simplifiée du programme utilisé, qui peut être numérisée en version PDF en utilisant la reconnaissance des lettres :

```

-----Numériser le blanc
activate application "Image Capture"
display dialog "Attendre que le scanner démarre complètement et vérifier les paramètres : dossier de destination, format et type d'images ainsi
que la position du papier" with title "Numérisation du blanc" buttons {"arrêter", "continuer"} with icon stop cancel button "arrêter"
try
  tell application "System Events"
    tell process "Image Capture"
      click button "Numériser" of group 1 of splitter group 1 of window 1
    end tell
  end tell
on error
  display alert "Oups! Il faut attendre que le scanner soit prêt"
  exit repeat
end try
-----Demander les parametres et fixer la vitesse de numérisation
display dialog "Attention: la vitesse de numérisation doit être d'au moins deux secondes inférieure à l'écart choisi. La vitesse de numérisation
dépend du modèle de scanner, ainsi que du format, taille et type d'image à prendre" with title "Durée en secondes entre les mesures"
buttons {"arrêter", "continuer"} default answer 20 with icon stop cancel button "arrêter"
set ecart_temps to text returned of result
display dialog "Ajouter le substrat sur le plastique, fermer le scanner et appuyer sur continuer" with title "Combien d'images faut-il prendre?"
buttons {"arrêter", "continuer"} default answer 2 with icon stop cancel button "arrêter"
set nombre_images to text returned of result
-----Numérisation et enregistrement du temps
set list_temps_mesures to {0}
set temps_initial to time of (current date)
repeat nombre_images times
  try
    tell application "System Events"
      tell process "Image Capture"
        click button "Numériser" of group 1 of splitter group 1 of window 1
      end tell
    end tell
    delay ecart_temps
    set temps_zero to time of (current date)
    set temps_actuel to temps_zero - temps_initial
    set end of list_temps_mesures to temps_actuel
  on error
    display alert "Oups! un erreur s'est produite, changer les paramètres avant de réessayer ou attendre que le scanner soit prêt"
    exit repeat
  end try
end repeat
-----Exporter vers texte
display dialog "Comme voulez-vous appeler le document texte qui contient les intervalles de numérisation?" buttons {"continuer"} default
answer "intervalles de numérisation" with icon note
set nom_du_texte to text returned of result
set AppleScript's text item delimiters to return
set SihauLili to list_temps_mesures as text
activate application "TextEdit"
tell application "TextEdit"
  make new document with properties {name:nom_du_texte, text:SihauLili}
end tell

```

Une fois numérisé le script il est possible de le transférer dans le logiciel Éditeur Applescript pour son utilisation (Figure 43).

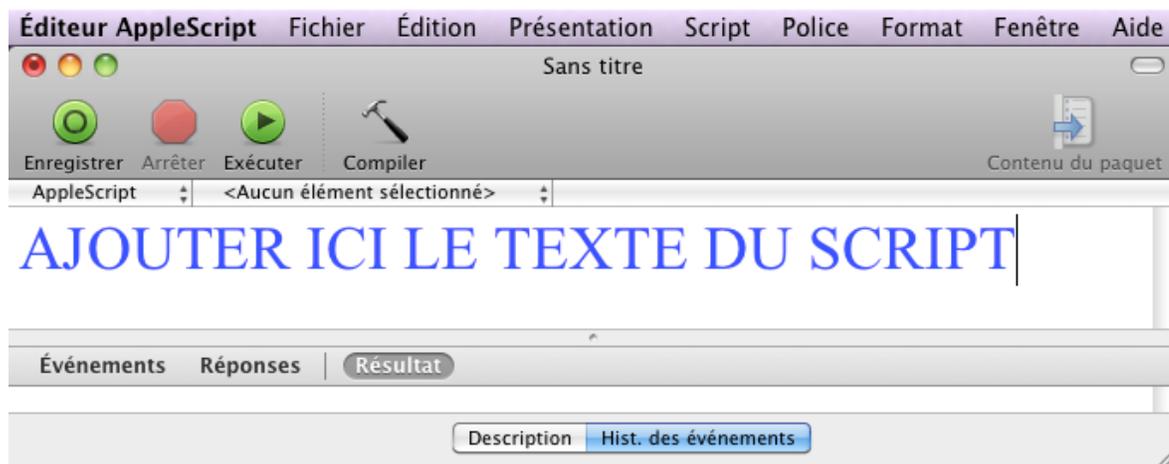


Figure 43. Fenêtre de démarrage du Applescript. Les lettres en couleur bleue ont été ajoutées pour mettre en évidence l'endroit où il faut placer le script.

Quand le script démarre une série d'affiches guide l'utilisateur tout au long des étapes à suivre pour utiliser la numérisation automatique (Figure 44).

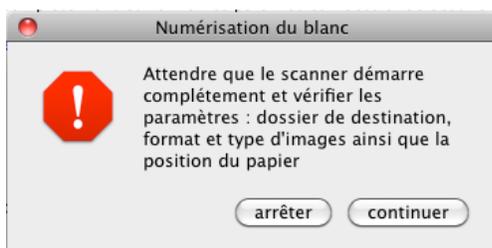


Figure 44. Exemple des indications trouvées dans le script.

## 5.4 Index

- 2
- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) voir ABTS.....xiii, 32
- A**
- ABTS..... xiii, 32, 55, 56, 57
- Activité .....ii, 1, 11, 16, 17, 30, 31, 33, 39, 40, 42, 43, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 77, 78, 103, iii, ix
- Activity (voir aussi activité).....iv, 79, 80, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 95, 96, 97, 98, 100, 101
- Agitation mécanique (voir aussi dispersion mécanique).....33, 47
- Amidon... 36, 37, 42, 43, 44, 50, 73, 74, 75, 78, v, vii
- B**
- Binder .....82, 90
- Bioactive paper (voir aussi papier bioactif) .....iii, 80
- Biocapteur (voir aussi biosensor).. i, ii, 3, 6, 7, 8, 16, 25, 27, 30, 72, 102, 104
- Biosensor (voir aussi biocapteur)..... 27
- Buffer (voir aussi solution tampon) .....83, 97
- C**
- Cinétique enzymatique ..... 9
- Coating (voir aussi couchage)..... 91
- Concentration de substrat..... 68
- Constante de Michaelis et Mentent (Km)... 9, 10, 11, 63, 69
- Couchage... i, ii, xiii, xv, 25, 26, 28, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 47, 48, 49, 51, 61, 73, 75, 77, 101, 103, 104, i, v, vii, ix
- Cuivre T1 .....xiii, 14, 15, 67, 99
- Cuivre T2 ..... xiii, 14, 15, 65, 67, 99, 103
- Cuivre T3 .....xiii, 14, 65
- Cuivres T2/T3 .....xiii, 15, 65, 67, 99, 103
- D**
- Diamètre moyen des microcapsules..xiii, 23, 24, 45
- Dispersion de Fraunhofer .....46
- Dispersion de Mie .....46
- Dispersion de Rayleigh.....46
- Dispersion mécanique .....23
- E**
- Émulsification..... 19, 23, iii
- Encollant (voir aussi liant) .....36
- Enzyme (voir aussi laccase) . i, ii, iii, iv, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 29, 30, 33, 34, 38, 53, 54, 55, 61, 62, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 88, 90, 91, 92, 94, 95, 96, 99, 100, iii, vi, ix
- F**
- FITC..... xiii, 31, 49, 50, 75, 76
- Fluorescéine isothiocyanate voir FITC.... xiii, 49
- Force ionique ..... 12, 51, 61, 63, 64, 65, 66, 72
- H**
- Histidine.....65
- I**
- Inhibiteur .....ii, 30, 63

- Inhibiteur (azide) ..... 31, 80, 83, 97, 99, 100
- Interfacial polymerization (voir aussi Polycondensation interfaciale)..... 84
- K*
- Kaiser .....48, 50, 76, 77
- Km (voir constante de Michaelis et Menten) xiii, 11, 12, 69, 72
- L*
- Laccase .....ii, iv, 12, 13, 14, 15, 16, 29, 31, 32, 36, 42, 52, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 96, 97, 99, 100, 101, 103, 104, i, iii, v, ix
- Liant ..... 36, 74, 78
- M*
- Mcllvaine (solution tampon /buffer). 31, 52, 54, 66, 68, 70, 83, 86, i, iii
- Microcapsules .....i, iii, xiii, 17, 18, 19, 20, 24, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 56, 57, 62, 69, 71, 73, 75, 76, 77, 79, 81, 83, 84, 90, 91, 92, 93, 96, 97, 99, 100, 101, 102, i, iii, iv, v, ix
- Microencapsulation i, ii, i, ii, iii, iv, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 29, 30, 33, 61, 62, 69, 70, 72, 73, 78, 80, 81, 82, 83, 87, 89, 90, 96, 97, 100, 102, 103, i, iii, ix
- Microscopie.....48, 76
- Microscopie à fluorescence.....48, 76
- N*
- Numérisation d'images..... 56
- P*
- pH ...11, 16, 21, 28, 31, 32, 33, 38, 44, 49, 50, 51, 54, 56, 59, 60, 61, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 83, 86, 90, 91, iii
- Polycondensation interfaciale 21, 22, 24, 33, 61, i
- pore size..... 81, 96
- PPD xiii, 31, 32, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 78, 80, 83, 86, 87, 88, 90, 92, 93, 97, 103, 104
- p-phenylenediamine voir PPD ..... 32, 80, 86, 87
- R*
- Réticulation ..... 17, 24
- S*
- Saturation d'oxygène ..... 52, 53
- Size of microcapsules (voir aussi taille des microcapsules)..... 81, 90
- Solution tampon .... 31, 32, 33, 52, 54, 55, 63, 65, 66, 68, 70, i, iii
- Substrat.... 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 51, 53, 54, 55, 56, 61, 63, 65, 67, 68, 69
- T*
- Taille des microcapsules (voir aussi diamètre des microcapsules)..... 34, 35, 45, 48
- Trametes versicolor..... 13, 15, 31, 63, 67, 79, 81, 83, 88, i, iii, v
- U*
- Unités d'enzyme (U) .... 33, 38, 47, 54, 56, 57, 61, 66, 68, 70, 71, 72, 78, 83, 89, 90, 91, 92, 93, iii

<i>V</i>	viscosity .....	iii, 84, 90
Viscosité. i, xiii, 23, 24, 36, 37, 41, 43, 51, 68, 73, 74, 75, 78, vi	Vitesse enzymatique.....	i, 8, 9, 10, 11, 23, 25, 26, 37, 41, 42, 44, 51, 58, 61, 62, 68, 69, 76, vii
	Vitesse maximale .....	11, 69