REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA



Faculté de **T**echnologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de Fin d'études de Master

Filière : Génie des Procédés
Spécialité : Génie des Procédés Pharmaceutiques

THEME

Préparation et caractérisation d'agrégats (CLEAs) de la lipase de ricin

Proposé et dirigé par :

Dr. Abouseoud Mahmoud

Dr. Sefha Farida

Présenté par :

Ali Kacem Imene

Hazi Nesrine

Promotion : 2024/2025

Remerciement

Tout d'abord, nous remercions Allah tout puissant de nous avoir offert l'opportunité de franchir ce stade de savoir, et de nous avoir donné le courage et la patience de réaliser ce modeste travail.

Mes remerciements spéciaux vont à nos encadreurs, **Dr. Abouseoud Mahmoud** et **Dr. Sefha Farida**, pour leur accompagnement précieux, leur disponibilité, leurs conseils judicieux et leur encadrement tout au long de ce travail.

Leur expertise et leurs encouragements nous ont été d'un grand soutien à chaque étape de cette étude.

Nous tenons remercions également la responsable de laboratoire Chimie 3 **Madame Rachida** pour son accueil chaleureux, son aide et les moyens mis à notre disposition.

Nous remercions également **Dr. GHERABA Lamia et Dr .AHMEDI Afaf** d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous remercions aussi tous les enseignants du département de génie des procédés, pour la qualité de l'enseignement reçu tout au long de notre parcours universitaire.

Dédicace

À mes plus grands soutiens et lumières sur mon chemin, je dédie ce travail avec tout mon amour et une reconnaissance infinie.

À mon cher père **Slimane**, *à l'épaule sur laquelle j'ai reposé mes fardeaux, à celui qui m'a soutenu sans limite et donné sans attendre en retour. Merci pour ton amour inconditionnel et tous les sacrifices que tu as faits pour moi.*

À ma merveilleuse maman **Farida Boudella** , *qui a toujours été mon palier tout au long de mon parcours scolaires , ton amour dévoué et tes sacrifices pour moi sont inestimables. Chaque mot de ce travail porte la trace de ton cœur, et chaque pas franchi a été soutenu par tes prières et ton amour.*

À mes Sœurs **Nour el Houda et Naziha** *et mon petit frère* **Abderrahmane**, *mes soutiens silencieux, mes forces dans l'ombre. Vous avez toujours été la, sans jamais faillir, et vos gestes, même les plus simples, ont toujours porté le poids de votre amour pour moi.*

À mes grands- parents **Fatima El zahraa** *et* **Ahmed** , *mon oncle* **Bilel** *et son fils* **Djawed.**

À mon binôme et chère amie **Nesrine** , *pour son soutient moral , sa patience et se compréhension tout au long de ce projet. Et à tous mes amis. A celui qui a cru en moi et m'a encourager en silence, qui m'a offert sa présence même de loin, comme un ancrage billy.*

Sans oublier à celui qui m'a appris les premières lettres, À celui qui m'a ouvert les portes du savoir, Cher enseignant **Ould Medjber Ismail**, *toute ma gratitude et mon respect, pour m'avoir mis sur le chemin de la réussite.*

Ali kacem Imene

Dédicace

En arrivant à la fin de ce chemin, je ressens une profonde gratitude. Je me remercie moi-même pour ma patience, ma persévérance et le courage d'avoir avancé malgré les épreuves. Aujourd'hui, je suis fière du parcours accompli.

Je remercie de tout mon cœur mes parents, mon Cher père ***Bachir*** *et ma mère* ***Habiba Halfaoui****, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices silencieux, et leur soutien infini.*
À mes frères ***Wassim, Youssef, Isaac*** *et à ma belle-sœur* ***Ritajde****, je vous souhaite un avenir rempli de réussite et de bonheur. Vous êtes ma fierté.*

Je rends hommage à ***mon mari Sofiane Ould Kiar*** *pour son amour et sa tendresse.*
Merci également à ***son père Youcef*** *et à* ***sa sœur Wafa****, ma deuxième sœur, pour leur respect et leur affection sincère.*

Je tiens à remercier mon amie fidèle ***Imane Ali Kacem****, avec qui j'ai partagé cinq années pleines de hauts et de bas. Merci pour ta loyauté, ton écoute, et ta présence à mes côtés.*

je remercie de tout cœur ***Nesrine Nabi****, ma meilleure amie, et* ***Malak Kahlia****, ma cousine.*
Je n'oublie pas ***Sid Ali Halfaoui, Noura Halfaoui****, ainsi que tous les membres de ma famille.*
Un hommage particulier à mes grands parents ***Zainab Moula Semara, Geribi Cherifa*** *et* ***Abd al-Rahmane Halfaoui****.*
Mes sincères remerciements à ***M. Sedik Fatoumi****, mon professeur de primaire,*
Et à ***M. Khir Eddine Skander****, mon professeur d'anglais. Pour chaque pas, chaque personne, et chaque instant qui a façonné mon chemin*

. ***Hazi Nesrin***

ملخص :

تم تنقية الليباز النباتي المستخرج من بذور الخروع ثم تثبيته باستخدام طريقة التجمّعات الإنزيمية المتشابكة (CLEAs) ويهدف هذا العمل إلى دراسة استقراره الحراري والكيميائي، وكفاءته التحفيزية، بالإضافة إلى إمكانية إعادة استخدامه، وذلك بمقارنته مع الشكل الحر للإنزيم.

أتاحت عملية الاستخلاص الميكانيكي متبوعة بالترسيب بواسطة الأسيتون الحصول على مستخلص إنزيمي نشط. وقد سمحت عملية تحسين ظروف التثبيت بتحديد الظروف المثلى لتكوين الـCLEAs ، وهي: 60% من كبريتات الأمونيوم، و50 ملي مول/غرام من الغلوتارالدهيد، وزمن تشابك قدره ساعتان.

أظهرت النتائج أن الليباز المثبت على شكل CLEAs يتمتع باستقرار حراري أعلى، حيث بلغت درجة الحرارة المثلى لنشاطه 50 درجة مئوية ، أي بزيادة 10 درجات مئوية مقارنة بالليباز الحر. ومن جهة أخرى، احتفظ الشكل المثبت بنفس الرقم الهيدروجيني الأمثل مثل الليباز الحر.(pH = 4.5) , كما أظهرت الـ CLEAs مقاومة أعلى تجاه المثبطات الكيميائية مثل النحاس، والمذيبات العضوية مثل الكحوليات، بالإضافة إلى نشاط تحفيزي مائي محسّن. وكشفت التحاليل الحركية عن زيادة ملحوظة في السرعة القصوى (Vmax) من 94.97 وحدة دولية/غرام إلى 167.78 وحدة دولية/غرام، وانخفاض في ثابت ميكايليس-منتن (Km) من 0.028 مول/لتر إلى 0.0146 مول/لتر بعد التثبيت، مما يدل على تحسُّن في الألفة تجاه الركيزة. وأظهرت اختبارات القابلية لإعادة الاستخدام أن الـ CLEAs تحتفظ بأكثر من 70% من نشاطها الأصلي بعد أربع دورات من التحلل المائي، بالإضافة إلى استقرار أعلى أثناء التخزين عند 4 درجات مئوية.

الكلمات المفتاحية : ليباز بذور الخروع , الاستخلاص , الثبات الحراري, الثبات الكيميائي , CLEAs , الارتباط المتقاطع , قابلية الاستخدام المتكرر.

Résumé :

Une lipase végétale extraite à partir des graines de ricin a été purifiée puis immobilisée en utilisant la méthode des agrégats enzymatiques réticulés (CLEAs). L'objectif est d'étudier sa stabilité thermique et chimique et ses performances catalytiques ainsi que sa réutilisabilité en la comparant avec la forme libre.

L'extraction mécanique suivie d'une précipitation à l'acétone a permis d'obtenir un extrait enzymatique actif. L'optimisation des conditions d'immobilisation a identifié 60 % de sulfate d'ammonium, 50 mM/g de glutaraldéhyde et un temps de réticulation de 2 heures comme paramètres optimaux pour la formation des CLEAs.

Les résultats démontrent que la lipase immobilisée sous forme de CLEAs présente une stabilité thermique supérieure avec une température optimale à 50 °C, soit 10 °C de plus que la lipase libre, Par ailleurs, la forme immobilisée conserve un pH optimal identique à celui de la lipase libre (pH =4,5). Les CLEAs présentent également une résistance accrue aux inhibiteurs chimiques tels que le cuivre et aux solvants organiques tels que les alcools, ainsi qu'une activité hydrolytique améliorée. L'analyse cinétique révèle une augmentation significative de la vitesse maximale (Vmax) (de 94.97 UI/g à 167.78 UI/g) , et une diminution de la constante de Michaelis-Menten (Km) de0.028mol /L à 0,0146 mol/L après l'immobilisation, traduisant une meilleure affinité pour le substrat. Les tests de réutilisabilité ont montré que les CLEAs conservent plus de 70% de leur activité initiale après 4 cycles d'hydrolyse ainsi qu'une stabilité accrue lors du stockage à 4°C.

Mots Clé : Lipase des graines de ricin, extraction, stabilité thermique, stabilité chimique, CLEAs , réticulé , réutilisabilité**.**

Abstract :

A plant lipase extracted from castor bean seeds was purified and then immobilized using the cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) method. The objective is to study its thermal and chemical stability, catalytic performance, and reusability by comparing it with the free form.

Mechanical extraction followed by acetone precipitation yielded an active enzymatic extract. Optimization of immobilization conditions identified 60% ammonium sulfate, 50 mM/g glutaraldehyde, and 2 hours of cross-linking time as optimal parameters for CLEAs formation.

The results show that the lipase immobilized in the form of CLEAs exhibits higher thermal stability with an optimal temperature of 50 °C, which is 10 °C higher than that of the free lipase. Furthermore, the immobilized form retains the same optimal pH as the free lipase (pH = 4.5). CLEAs also show greater resistance to chemical inhibitors such as copper and to organic solvents such as alcohols, as well as improved hydrolytic activity. Kinetic analysis reveals a significant increase in the maximum reaction rate (Vmax) (from 94.97 U/g to 167.78 U/g), and a decrease in the Michaelis-Menten constant (Km) from 0.028 mol/L to 0.0146 mol/L after immobilization, indicating a better affinity for the substrate. Reusability tests showed that CLEAs retain more than 70% of their initial activity after 4 hydrolysis cycles, and exhibit enhanced storage stability at 4 °C.

Keywords : Castor bean lipase, thermal stability , chemical stability , CLEAs ,cross linked , Reusability.

Liste des abréviations

AE : Activité enzymatique UI.

AEm : Activité enzymatique massique Ul/g.

BSA : Bovin Sérum albumine.

C : Concentration.

CLEA: Cross Linked Enzyme Aggregates.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

EEB : Extrait enzymatique brute.

EEPP : Extrait enzymatique partiellement purifiée,

m_{EEPP} : Masse d'extrait enzymatique partiellement purifiée.

m_{cLEAs} : Masse des agrégats d'enzyme réticulée.

m/V : Masse par volume

Rpm : Rotations par minute.

SDS : dodécylsulfate de sodium

t : Temps d'essai (minute).

V/V : Volume par volume.

Liste des figures

Figure I-1: Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par lipase**.** 3

Figure I-2: Réactions catalysées par les lipases non spécifique et 1,3-spécifiques**.** 4

Figure I-3 Structure 3D de lipase 5

Figure I-4 : Repliement α/β (Les flèches représentent les feuillets β et les rectangles les hélices α. Le rectangle noir représente le volet amphiphile) 6

Figure I-5: Techniques d'immobilisation par adsorption physique**.** 16

Figure I-6: Techniques d'immobilisation par inclusion dans une matrice de gel**.** 17

Figure I-7: Technique d'immobilisation par encapsulation 17

Figure I-8: Immobilisation par liaison covalente**.** 18

Figure I-9: Immobilisation par réticulation sans support. 19

Figure I-10: Préparation d'agrégats enzymatiques récticulés (CLEAs) de lipase**.** 20

Figure II-1: Ricin commun (*Ricinus communis*) 24

Figure II-2: La distribution de ricinus communis. 26

Figure II-3: La tige de *R. communis* L. 27

Figure II-4: Les feuilles de *R. communis* L. 27

Figure II-5: Les fleurs de *R. communis* L**.** 28

Figure II-6: Les fruits de *R. communis* L**.** 28

Figure II-7: Les graines de *R. communis* L**.** 29

Figure III-1: Les étapes d'extraction de la lipase brute 37

Figure III-2: Les étapes de purification partielle de la lipase par précipitation à l'acétone 39

Figure III-3: Les étapes de préparation des CLEAs de lipase de ricin. 42

Figure III-4: Extrait brut de lipase de ricin. Figure III-5: Extrait de lipase partiellement ... 50

Figure III-6: Effet de sulfate ammonium sur l'activité enzymatique des CLEAs 52

Figure III-7: Morphologie des particules des CLEAs de différentes concentrations en sulfate d'ammonium. 54

Figure III-8: Effet de différentes concentrations de glutaraldéhyde sur l'activité enzymatique des CLEAs. 55

Figure III-9: Morphologie des particules des CLEAs lipase pour différentes concentrations en glutaraldéhyde. 56

Figure III-10: Effet de duré de réticulation sur l'activité enzymatiques des CLEAs lipase. .. 57

Figure III-11: La morphologie des particules des CLEAs lipase en fonction de temps 57

Figure III-12: Effet de pH sur l'activité enzymatique de l'EEPP (libre) et des CLEAs de lipase de ricin 58

Figure III-13: Effet de la température de réaction d'hydrolyse sur l'activité enzymatique de la lipase libre et CLEAs lipase. 59

Figure III-14: Stabilté thermique de la lipase libre et CLEAs lipase de ricin. 60

Figure III-15: Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique de CLEAs et la lipase libre de ricin 61

Figure III-16: Effet des tensioactifs sur l'activité enzymatique de CLEA lipase et lipase libre de ricin. 62

Figure III-17:Effet de différents substrats sur l'activité enzymatique des CLEAs lipase et lipase libre de ricin. 64

Figure III-18: Effet de solvants organiques polaires sur l'activité enzymatique de lipase libre et CLEAs lipase de ricin avec. 65

Figure III-19: Représentation graphique de Michaelis-Menten de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase libre de ricin. 67

Figure III-20: Représentation graphique de Michaelis-Menten de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive par la CLEA lipase de ricin. 68

Liste des figures

Figure III-21: Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité enzymatique de la lipase libre de ricin. 69

Figure III-22: Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité enzymatique des CLEAs lipase de ricin. 69

Figure III-23: Réutilisabilité des CLEAs lipase (Ricinus communis). 71

Figure III-24: La stabilité de stockage de CLEAs lipase de ricin. 72

Liste des tableaux:

Tableau I.1: Quelques sources végétales et leurs applications**……..……** 8

Tableau I.2: Quelques sources microbiennes de lipases et leurs applications industrielles**……** 9

Tableau I.3: **L**es réactions catalysées par la lipase……. 12

Tableau II.1: Classification taxonomique de ricinus communis……...…. 25

Tableau III.1: Appareillages utilisés. …….33

Tableau III.2: Les réactifs utilisés. ……36

Tableau III.3:Les constantes de Michaelis-Menten ……...70

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction Générale 1

Chapitre I : Les lipases 3

I.1 La Lipase 3
I.1.1 Définition 3
I.1.2 Classification 3
I.1.2.1 Les lipases spécifiques au substrat 4
I.1.2.2 Les lipases régiosélectives 4
I.1.2.3 Les lipases énantiosélectives 5
I.1.3 Structure des lipases 5
I.1.3.1 Repliement α/β 6
I.1.4 Sources des lipases 7
I.1.4.1 Sources végétales 7
I.1.4.2 Sources microbiennes 9
I.1.4.3 Sources mammifères 10
I.1.5 Réactions caractéristiques des lipases: 10
I.1.5.1 Réaction d'hydrolyse : 10
I.1.5.2 Réactions de synthèse 10
I.1.5.2.1 Estérification : 11
I.1.5.2.2 Transestérification : 11
I.1.6 Applications 13
I.1.6.1 Industrie des détergents 13
I.1.6.2 Production de biodiesel 13
I.1.6.3 Cosmétiques et parfumerie 14
I.1.6.4 Biorémédiation 14
I.1.6.5 Industrie alimentaire 14
I.2 Immobilisation des lipases 15
I.2.1 Objectifs d'immobilisation 15

I.2.2 Méthodes d'immobilisation: 16
I.2.2.1 Immobilisation par adsorption : 16
I.2.2.2 Immobilisation par inclusion (confinement) : 16
I.2.2.3 Encapsulation : 17
I.2.2.4 Immobilisation par liaisons covalentes sur support : 18
I.2.2.4.1 Réticulation (agrégation) sans support 18
I .2.2.4.1.1 Les agrégats enzymatiques réticulés (cross linked enzyme agreggates ou CLEAs) 19
I.2.2.4.1.1.1. Méthode de préparation des CLEAs 19
I.2.2.4.1.1.2. Caractérisation des CLEAs : 20
I.2.2.4.1.1.3. Paramètres influents la préparation des CLEAs : 21
I.2.2.4.1.1.4. Avantages des CLEAs : 22
I.2.2.4.1.1.5. Applications des CLEAs lipase 23
Chapitre II : La lipase de ricin 24
II.1 La plante de ricin : 24
II.1.1 Généralités : 24
II.1.2 Nomenclature 24
II.1.3 Classification Taxonomique 25
II.1.4 Origine et Habitat 25
II.1.5 Caracérisatiques botaniques 26
II.2 La lipase de ricin 29
II.2.1 Les méthodes d'extraction et purification utilisés à grande échelle : 29
II.2.2 Propriétés et caractéristiques de la lipase de ricin : 30
Chapitre III : Partie expérimentale 33
III.1 Objectif de l'Étude : 33
III.2 Matériels et Réactifs : 33
III.2.1 Matériels: 33
III.2.1.1 Verrerie et matériel de laboratoire complémentaire : 35
III.2.2 Réactifs: 35
III.3 Préparation de l'extrait enzymatique brut 37
III.3.1 Préparation de la lipase brute : 37
III.3.2 Purification partielle de la lipase de ricin 38
III.4 Mesure de l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique (EEPP) 40
III.5 Immobilisation ou formation d'agrégats enzymatiques (CLEAs) de lipase 41

III.5.1 Mode opératoire de Préparation des CLEAs 41
III.6 Caractérisation de la lipase libre et CLEAs lipase de ricin : 43
III.6.1 Effet de pH: 43
III.6.2 Effet de la température 43
III.6.3 Étude de la stabilité de la lipase libre et des CLEAS de lipase de ricin 44
III.6.3.1 Stabilité thermique 44
III.6.3.2 Stabilité chimique 44
III.6.3.2.1 Stabilité en présence des ions métalliques 44
III.6.3.2.2 Stabilité en présences des tensioactifs : 45
III.6.3.2.3 Effet de la nature du substrat sur l'activité : 46
III.6.3.2.4 Stabilité en présences des solvants organiques polaires: 46
III.6.4 Étude de la cinétique d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase libre et les CLEA de lipase 47
III.6.5 Réutilisation et stabilité à long terme des CLEAs de lipase : 48
III.6.5.1 Test de Réutilisabilité (Cycles d'utilisation) : 48
III.6.5.2 Test de Stabilité au Stockage (Longue Durée) : 49
III.7 Résultats et discussion 50
III.7.1 Extraction et purification de la lipase (*Ricins communise* L) : 50
III.7.2 L'activité enzymatique de l'EEPP 51
III.7.3 Préparation d'agrégats enzymatiques (Claes) de la lipase de ricin 52
III.7.3.1 Étape de précipitation: 52
III.7.3.1.1 Optimisation de concentration en sulfate d'ammonium : 52
III.7.3.2 Étape de réticulation: 54
III.7.3.2.1 Optimisation de la Concentration en glutaraldéhyde 54
III.7.3.2.2 Optimisation de la durée de réticulation : 56
III.7.4 Caractérisation de la lipase libre et des CLEAS de la lipase de ricin : 58
III.7.4.1 Effet de pH : 58
III.7.4.2 Effet de la température : 59
III.7.4.3 Étude de la stabilité de la lipase libre et des CLEAS de lipase de ricin 60
III.7.4.3.1 Test de stabilité thermique : 60
III.7.4.3.2 Stabilité chimique 61
III.7.4.3.2.1 Stabilité en présence des ions métalliques : 61
III.7.4.3.2.2 Stabilité en présences des tensioactifs : 62
III.7.4.3.2.3 Effet de la nature du substrat sur l'activité : 63

III.7.4.3.2.4 Effet de solvants organiques polaires : 65
III.7.4.3.3 Etude de la cinétique d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase libre et CLEAs de lipase : 67
III.7.4.4 Test de Réutilisabilité : 70
III.7.4.5 Stabilité au stockage : 72
Conclusion Générale et perspectives 74

Introduction Générale

Introduction Générale

L'immobilisation des enzymes constitue une approche essentielle dans le domaine de la biotechnologie industrielle. Elle vise principalement à améliorer la stabilité, l'efficacité et la réutilisabilité des biocatalyseurs. Parmi les enzymes d'intérêt, les lipases occupent une place importante. Ces enzymes, que l'on retrouve chez les bactéries, les animaux et également chez les plantes, jouent un rôle majeur dans l'hydrolyse des triglycérides. Ce processus est fondamental pour la transformation des lipides, avec des applications variées dans les domaines de chimie industrielle, des biocarburants, de l'agroalimentaire et de l'industrie pharmaceutique**.**

Bien que les lipases soient reconnues pour leur spécificité et leur polyvalence en tant que biocatalyseurs, leur instabilité face aux variations de température, de pH ainsi qu'à la présence de solvants organiques ou d'inhibiteurs, représente un obstacle majeur à leur utilisation à grande échelle. La perte d'activité enzymatique durant les procédés et la difficulté de récupération pour une réutilisation multiple compromettent leur rentabilité économique.

Pour pallier ces limitations, la formation d'agrégats enzymatiques réticulés ou Cross-Linked Enzyme Aggregats (CLEAs), apparaît comme une technique prometteuse d'immobilisation. Les CLEAs offrent plusieurs avantages : ils ne nécessitent ni support coûteux ni enzymes hautement purifiées, et permettent de combiner en une seule étape la purification partielle et l'immobilisation. De plus, ils présentent généralement une spécificité catalytique élevée, une bonne stabilité opérationnelle, une rigidité mécanique et une stabilité chimique. Les CLEAs conservent aussi leur activité pour une longue durée de conservation. Ces caractéristiques les rend particulièrement adaptés aux exigences industrielles**.**

La méthode repose sur la précipitation de l'enzyme suivie d'une réticulation chimique, généralement à l'aide du glutaraldéhyde, conduisant à la formation de biocatalyseurs insolubles mais actifs, capables de résister à des conditions opératoires sévères.

Cette étude vise à extraire et purifier la lipase végétale à partir de graines de ricin et l'immobilisée en utilisant la méthode des agrégats enzymatiques réticulés (CLEAs). L'objectif est d'étudier sa stabilité thermique et chimique et ses performances catalytiques ainsi que sa réutilisabilité en la comparant avec la forme libre.

Le travail est divisé en deux grandes parties :

- **Partie bibliographique** : composée deux chapitres :

- Le premier chapitre : Généralités sur les lipases

  Ce chapitre présente la structure**,** le mécanisme d'action**,** et les applications industrielle**s** des lipases. Il aborde également les différentes méthodes d'immobilisation, avec un accent particulier sur la technique des CLEAs.

- Le deuxième chapitre est consacré à des généralités sur la lipase de ricin.

- **Partie expérimentale** : divisée en deux volets :

- Premier volet : consiste à présenter le matériel et les protocoles expérimentaux, en décrivant en détail :

  - L'extraction, la purification et la lipase de grains de ricin,
  - La préparation des agrégats enzymatiques réticulé (les CLEAs) par optimisation de trois facteurs significatifs (concentration de précipitant, concentration l'agent de réticulation et le temps de réticulation),
  - La caractérisation des CLEAs lipase et la lipase libre de grains de ricin semi-purifiée en étudiant l'influence des paramètres physico–chimiques (température, pH, substrat, les effecteurs.. ..etc.) sur l'activité enzymatique.

- Deuxième volet : Résultats et discussion

Cette partie analyse et compare les performances des formes libre et immobilisée de la lipase. Elle met en évidence les améliorations apportées par l'immobilisation, en confrontant les résultats obtenus avec ceux déjà rapportés dans la littérature scientifique, afin de situer les performances dans un contexte plus large**.**

Et enfin une conclusion générale viendra récapituler les résultats obtenus**,** discuter leur signification et proposer des perspectives pour des applications futures ou des améliorations méthodologiques.

Partie théorique

Chapitre I : Les lipases

I

I.1La Lipase

I.1.1 Définition

Les lipases sont des sérines hydrolases définies comme des acylhydrolases à triacylglycérol (C.E. 3.1.1.3) et doivent être différenciées des estérases (C.E. 3.1.1.1) par la nature de leur substrat **[1].** Elles sont largement répandues dans les règnes végétal et animal, ainsi que chez les moisissures et les bactéries. La fonction naturelle des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. Elles agissent spécifiquement sur les liaisons esters carboxyliques des TAGs, comme indiqué par des flèches dans la (Figure I .1) **[2, 3]** qui lient les acides gras au squelette carboné du glycérol. R1, R2 et R3 représentent les chaînes d'acides gras.

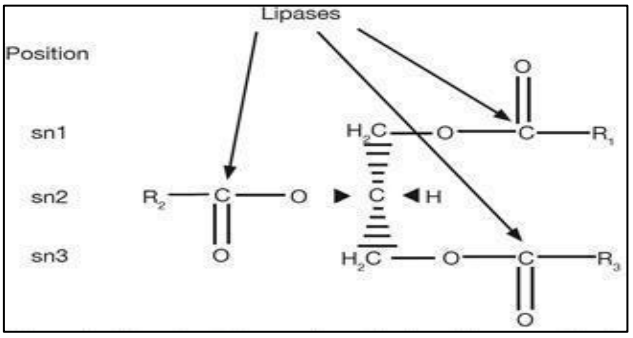


Figure I-1: Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par lipase **[4].**

I.1.2 Classification

De manière générale, la classification des lipases repose sur leur spécificité ainsi que sur leur source d'origine.

- ✓ Les lipases sont présentes dans diverses sources, telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes. Cependant, elles se trouvent plus abondamment chez les bactéries, les champignons et les levures **[5].**

La spécificité est un critère essentiel pour déterminer les applications industrielles des lipases. Sur cette base, elles peuvent être regroupées en trois catégories principales : spécifiques au substrat, régiosélectives, énantiosélectives **[6].**

I.1.2.1 Les lipases spécifiques au substrat

Les lipases spécifiques au substrat peuvent être utilisées efficacement dans des réactions où elles agissent sélectivement sur un substrat spécifique au sein d'un mélange de matières premières brutes, facilitant ainsi la synthèse du produit souhaité **[7],** Les substrats naturels sont des esters de glycérol. Ces enzymes sont capables de catalyser l'hydrolyse non seulement des triacylglycérols (TAG), mais également des di- et monoacylglycérols et même des phospholipides, dans le cas des phospholipases **[8].**

I.1.2.2 Les lipases régiosélectives

La régiosélectivité des lipases se définit par leur capacité à orienter une réaction dans une direction préférentielle plutôt que vers des réactions secondaires. Elle représente le pouvoir d'hydrolyser les esters primaires situés en position externe (**sn-1** ou **sn-3**) ou les esters secondaires situés en position interne (sn-2) des triacylglycérols **[9, 10].**

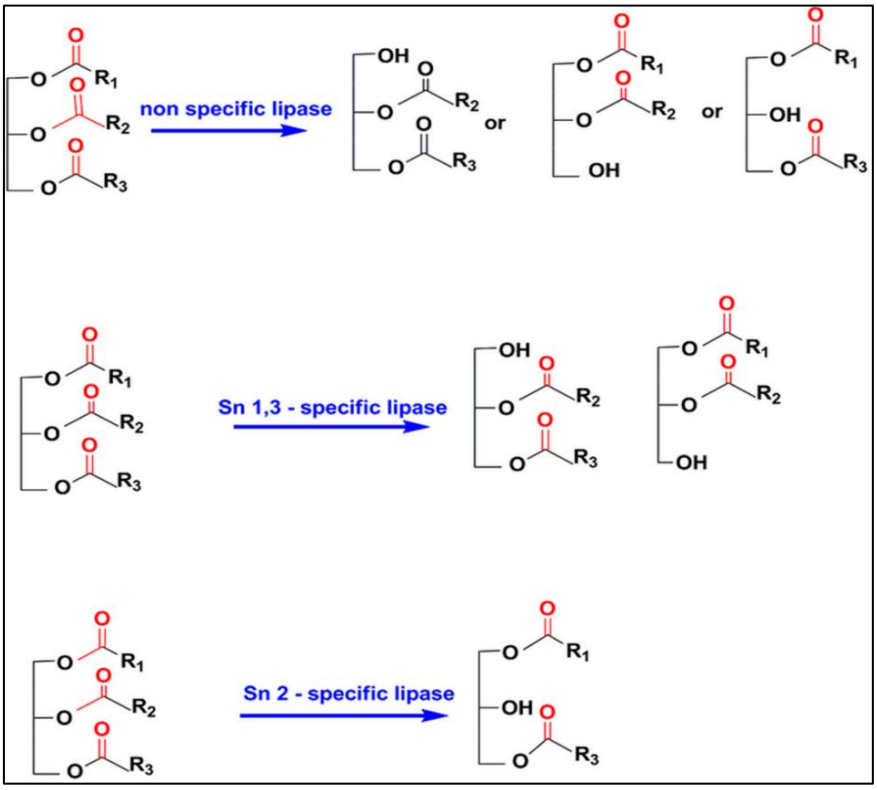


Figure I-2: Réactions catalysées par les lipases non spécifique et 1,3-spécifiques **[9].**

Les réactions catalysées par les lipases non spécifiques ainsi que par les lipases spécifiques aux positions (1,3) et (2) sont illustrées dans la Figure I-2.

I.1.2.3 Les lipases énantiosélectives

L'énantiosélectivité c'est la catalyse préférentielle d'une des deux formes chirales d'un substrat et permettent donc le dédoublement cinétique de mélanges racémique, dans le cas d'une molécule chirale (par exemple des triacylglycérols comportant trois acides gras différents). Dans le cas de molécules prochirales (triacylglycerols comportant trois acides gras identiques) la stéréosélectivité représente la capacité de discriminer un groupement stéréo hétérotopique mais homomorphique par rapport à l'autre (positions sn-l contre sn-3) **[10, 11].**

I.1.3 Structure des lipases

Les premières structures cristallographiques publiées concernent la lipase du champignon filamenteux *Rhizomucor miehei* ainsi que la lipase pancréatique humaine. Maintenant les lipases sont très variables, les plus petites ont des masses moléculaires de 20-25 KDa tandis que les plus grosses ont des masses moléculaires de 60-65 KDa même si les séquences peptidiques présentent très peu de similitudes, principalement dû à l'hétérogénéité de leur origine, les lipases ont généralement la même structure tridimensionnelle **[4].**

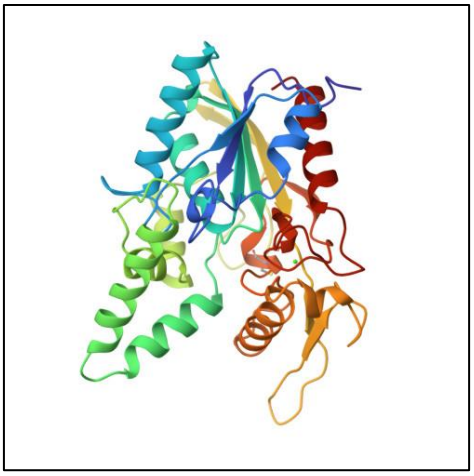


Figure I-3 Structure 3D de lipase **[12].**

I.1.3.1 Repliement α/β

Le repliement α/β est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases mais également l'acéthylcholine estérase, la carboxypeptidase, la dièneIactone hydrolase, l'haloalkane déhalogénase. Le pli de l'α/β hydrolase est caractérisé par la présence d'un feuillet β central contenant huit brins β parallèles, à l'exception du brin β2, qui est antiparallèle par rapport aux autres [**4 ,13].** Les lipases sont de puissants biocatalyseurs grâce à la présence d'une triade catalytique composée de sérine nucléophile, histidine et acide glutamique ou aspartique. La détermination de cette triade dans une enzyme purifiée est essentielle pour prédire sa structure tridimensionnelle **[7].** La sérine catalytique est située dans un coude nucléophile situé à l'extrémité C-terminale du 5e brin β et immédiatement suivi d'une hélice α. L'histidine est située à l'extrémité carboxyle-terminale du dernier brin du feuillet constituant le repliement α/β tandis que l'acide carboxylique est généralement situé à l'extrémité du 7e brin, sauf pour la lipase pancréatique où il est situé à l'extrémité du 6e brin [**4].**

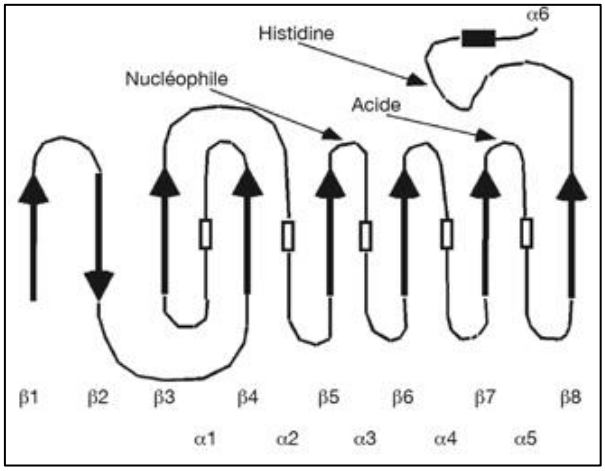


Figure I-4 : Repliement α/β (Les flèches représentent les feuillets β et les rectangles les hélices α. Le rectangle noir représente le volet amphiphile) **[4].**

I.1.4 Sources des lipases

Puisque les lipases sont nécessaires aux organismes vivants. Ils sont essentiels pour les organismes vivants. Ils sont omniprésents et peuvent être trouvés dans diverses sources, telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes. Cependant, on les retrouve plus abondamment chez les bactéries, les champignons et les levures **[6].**

I.1.4.1 Sources végétales

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines telles que la graine de ricin, le haricot africain, l'orme, le tournesol etc. .. où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou *oil bodies*) **[4, 7].**

L'activité des lipases dans les graines des plantes augmente pendant la germination, car les TAGs sont convertis en sucres solubles sous l'action des lipases. Ces sucres sont ensuite transportés vers les tissus en croissance pour fournir du carbone structurel et de l'énergie, soutenant ainsi la croissance des jeunes plantes **[14].** Les lipases végétales sont facilement Les lipases végétales sont facilement isolées à partir de graines et possèdent des spécificités de substrat atypiques par rapport aux lipases microbiennes **[4].**

Ces Les lipases peuvent être classées en trois grands groupes. Le premier groupe est constitué par les triacylglycérols hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Les constituants du second groupe, dénommés acylhydrolases, sont présents dans divers tissus de la plante. Ces enzymes présentent peu de spécificité pour leur substrat ; elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides mais elles peuvent catalyser certaines réactions de transestérification. Les principales acylhydrolases sont les phospholipases A et B ; les glycolipases, les sulfolipases et les monoglycéride lipases. Le troisième groupe est constitué par les phospholipases C et D [**4].**

Tableau I.1: Quelques sources végétales et leurs applications **[7].**

Lipase végétale	**Applications**
Graine de tournesol	Production de lipides structurés par action sur d'autres huiles à partir de graines de tournesol
Graine de ricin	Hydrolyse des huiles végétales
Maïs	Agir sur l'oléyl ester et le stéaryl ester pour libérer les acides gras.
La noix de coco	Transformation de l'huile de noix de coco
Lupin	Spécifique à l'huile de lupin pour libérer les acides gras
Ermonia sp	Spécifique au trivirnoléine
Grain de blé	Détermination de la qualité de stockage du blé et du son de blé
Fruit de palmier – Mésocarpe	Pharmaceutique, détergents industriels, alimentation et cosmétiques.

I.1.4.2 Sources microbiennes

Les lipases microbiennes, provenant principalement de bactéries, levures et champignons. Elles sont bien produites chez les bactéries Gram + telles que celles des genres *Bacillus* et *Staphylococcus* que par des bactéries Gram – telles que *Pseudomonas*. Elles sont également largement répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces*, les lipases microbiennes sont valorisées pour leur diversité catalytique, leur rendement élevé, leur faible coût de production, et leur stabilité dans des conditions extrêmes. Elles n'ont pas besoin de cofacteurs et présentent une large spécificité de substrat, ce qui les rend particulièrement utiles dans le commerce **[15, 4].** Il a été récemment révélé que les lipases microbiennes peuvent également être obtenues par la fermentation de déchets agricoles et de déchets laitiers, contribuant ainsi à la protection de l'environnement et pouvant être exploitées pour de futures applications biocatalytiques **[7].**

Tableau I.2: Quelques sources microbiennes de lipases et leurs applications industrielles **[16].**

Source	Application
Bacillus sp	Utilisé dans le traitement du cuir
Yarrowia lipolytica	Dégrade efficacement les substrats hydrophobes et inhabituels, servant ainsi de sources de carbone à faible coût.
Candida rugosa	Substitut de graisse du lait humain
Marinobacter lipolyticus	Enzyme lipolytique tolérante aux solvants organiques
Micrococcus sp.	Utilisé couramment dans les détergents pour améliorer l'élimination des taches grasses sur différents types de tissus

I.1.4.3 Sources mammifères

Les lipases interviennent dans le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses. Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes

- ✓ Le premier groupe est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique
- ✓ Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, la langue, le foie et les tissus adipeux.
- ✓ Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel. En effets les lipases jouent un rôle important dans la digestion chez le nouveau-né dont l'alimentation est riche en lipides **[4].**

I.1.5 Réactions caractéristiques des lipases:

Les lipases sont les biocatalyseurs les plus flexibles et assurent une large gamme de réactions de biotransformation, telles que l'hydrolyse, l'estérification, l'inter-estérification, l'aminolyse, l'alcoolyse et l'acidolyse .En outre, les lipases possèdent une capacité bien établie à catalyser la dégradation des lipides, mais elles peuvent également stimuler des réactions de synthèse, comme la transestérification .Selon un rapport précédent , les réactions catalysées par les lipases sont classées en trois catégories principales :

I.1.5.1 Réaction d'hydrolyse :

Cette réaction se produit en présence d'une grande quantité d'eau **[17]**, où la rupture de la liaison ester a lieu dans des systèmes biphasiques, à l'interface entre la phase aqueuse, dans laquelle elles sont solubilisées, et la phase apolaire constituée par l'ester d'acide gras non solubilisé. Cette réaction constitue la fonction première des lipases dont les substrats naturels sous forme d'émulsion sont les tri-acylglycérols. II en résulte la libération de mono- et di-acyl glycérols, de glycérol et d'acides gras **[18].**

I.1.5.2 Réactions de synthèse :

Les lipases, dans des conditions thermodynamiquement favorables (c'est-à-dire, à faible activité en eau), peuvent catalyser une grande variété de réactions de synthèse, qui peuvent

être classées en deux types principaux : l'estérification et la trans-estérification. Comme montré dans le tableau I.3.

I.1.5.2.1 Estérification :

C’est une réaction où un acide gras est lié, sous l'action de l'enzyme, à un alcool par une liaison covalente, produisant un ester et libérant une molécule d'eau. La thioestérification et l'amidation sont des réactions similaires, mais impliquent respectivement un thiol ou une amine comme substrats **[19].**

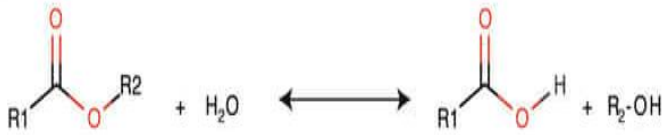
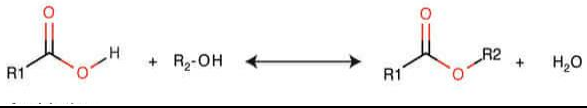
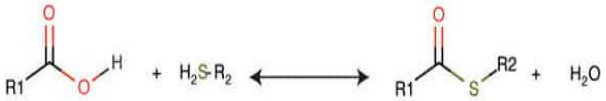
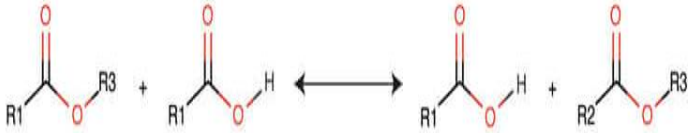
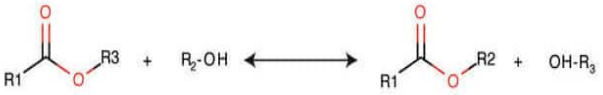
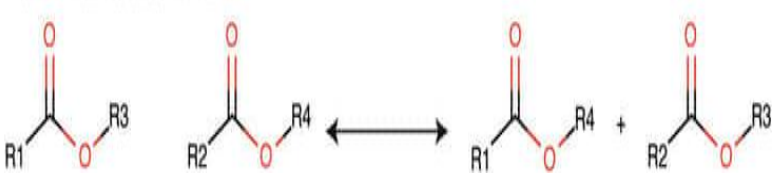
I.1.5.2.2 Transestérification :

Ce processus implique l’échange du groupement acide entre deux ou plusieurs composés. Selon le type de substrats, les lipases sont capables de catalyser :

- L’acidolyse (impliquant un ester et un acide carboxylique),
- L’alcoolyse (impliquant un ester et un alcool),
- L’aminolyse (où un ester réagit avec une amine),
- L’intérêstérification (où deux groupes acyles sont échangés entre deux esters) **[17].**

L'intéresterification permet de modifier la composition des huiles et des graisses, modifiant ainsi les caractéristiques physiques du mélange de triglycérides **[6].**

Tableau I.3: Les réactions catalysées par la lipase **[1].**

Types de réaction	Réactions catalyse
1) Hydrolyse	
2) Synthese **Esterification**	Esterification 
	Amidation 
	Thioestirification 
Transestérification	Réaction d'acidolyse : 
	Réaction d'aminolyse : 
	Réaction d'alcoolyse : 
	Réaction d'interestérification : 

I.1.6 Applications

Au cours des deux dernières décennies, l'importance des applications biotechnologiques des lipases a considérablement augmenté en raison du comportement catalytique polyvalent de ces enzymes. Les lipases occupent une place essentielle dans diverses industries, allant de l'alimentaire aux produits pharmaceutiques en passant par les détergents, les oléo chimiques, l'industrie du thé, l'agriculture, la cosmétique, le cuir, ainsi que dans plusieurs processus de bioremédiation. [**20].**

I.1.6.1 Industrie des détergents

En raison de leur capacité à hydrolyser les graisses et les lipides, les lipases sont utilisées dans l'industrie de la lessive ainsi que dans les détergents ménagers **[21].** L'industrie des détergents s'appuie sur des lipases recombinantes (Lipex et Lipolase de Novozymes) pour la formulation de biodétergents, en raison de leur stabilité en présence d'ingrédients agressifs comme les surfactants et les agents oxydants **[22].** Les lipases peuvent réduire l'impact environnemental des produits détergents en permettant un lavage à basse température, ce qui entraîne une économie d'énergie. L'industrie des détergents est le plus grand secteur d'utilisation de cette enzyme. Les lipases utilisées comme additifs dans les détergents doivent répondre à plusieurs critères : stabilité en milieu alcalin, solubilité dans l'eau, compatibilité avec les tensioactifs et faible spécificité de substrat **[23].**

I.1.6.2 Production de biodiesel

Une application industrielle importante des lipases est la modification des graisses et des huiles pour produire du biodiesel et d'autres lipides structurés. Les lipases sont capables de synthétiser du biodiesel en présence d'une teneur élevée en eau, ce qui constitue une stratégie utile lorsque des huiles usagées sont utilisées, car elles contiennent généralement une grande quantité de molécules d'eau. Dans la production de biodiesel, les lipases sont utilisées comme biocatalyseurs. La réaction de transestérification catalysée par les lipases a lieu entre un lipide et un alcool à chaîne courte pour produire un ester et du glycérol. La production de biodiesel à partir d'*Aspergillus sp***.** en utilisant de l'huile extraite des graines de *Calophyllum inophyllum* a été rapportée **[23 , 24].**

I.1.6.3 Cosmétiques et parfumerie

Les lipases sont largement utilisées dans l'industrie des cosmétiques et des parfums pour la production de nombreux surfactants et composés aromatiques. Divers tensioactifs à base de monoacylglycérols et de diacylglycérols sont produits par transestérification catalysée par les lipases et par résolution des intermédiaires racémiques. En outre, les esters de cire, les esters d'acide cinnamique, les esters d'acide ellagique et les esters d'acide férulique sont synthétisés par estérification catalysée par la lipase, ils peuvent être utilisés comme composés aromatiques/parfumant, comme précurseurs pharmaceutiques ou comme additifs dans les cosmétiques et les écrans solaires. Les lipases sont également des composants essentiels des crèmes topiques ou des médicaments oraux qui favorisent la perte de poids par l'élimination des graisses **[7].**

I.1.6.4 Biorémédiation

En biotechnologie, l'utilisation des lipases représente un nouvel aspect du processus de bioremédiation. Provenant de différentes sources comme les restaurants et les usines, les lipases peuvent être utilisées pour nettoyer les déchets issus du traitement des lipides. Elles peuvent être utilisées de deux manières : soit in situ, soit ex situ.

Les lipases présentent des propriétés uniques dans le domaine de l'adaptation au froid, telles que la synthèse de composés actifs à basse température, la bioremédiation des environnements contaminés par des graisses, ainsi que le traitement des eaux usées en conditions froides. Cette enzyme est idéale pour le processus de bioremédiation car elle est active à des températures modérément basses [**25].**

I.1.6.5 Industrie alimentaire

L'une des principales applications des lipases dans le domaine industriel concerne leur utilisation dans l'industrie laitière pour l'hydrolyse des graisses du lait et la lipolyse de la matière grasse du beurre et le développement de la saveur dans la transformation d'autres aliments tels que les produits carnés, aliments cuits au four. Les lipases sont utilisées dans cette industrie pour modifier la longueur de chaîne des acides gras et améliorer les arômes ainsi que le processus d'affinage du fromage. Elles sont également employées dans la production d'aliments pour bébés et de lipides structurés aux propriétés uniques polyinsaturés). Les lipases sont aussi utilisées pour renforcer l'arôme des produits de boulangerie lors de l'estérification, en libérant des acides gras. La durée de conservation des

produits de boulangerie peut être améliorée grâce aux lipases. Les lipases produites par certaines espèces de Pseudomonas ont été utilisées pour produire des aromes tels que le B-pinène et l'isopulégol , ce dernier est utilisé pour un parfum de type agrume, tandis que le premier est utilisé pour une saveur de menthe verte . Les lipases purifiées à partir de *Lactobacillus plantarum* sont utilisées dans la synthèse de produits alimentaires fermentés à base de fromage **[16 ,1,26].**

I.2 Immobilisation des lipases

L'immobilisation des enzymes est une méthode qui consiste å fixer les enzymes sur une surface solide ou un support, pour améliorer leur stabilité et leur capacité catalytique. Les enzymes immobilisées sont utilisées dans diverses applications industrielles et médicales telles que la production d'aliments, de médicaments et de biocarburants **[27].**

Le principe fondamental de l'immobilisation des enzymes est que ces dernières sont capables de maintenir leur activité catalytique même lorsqu'elles sont fixées sur une surface solide ou un support. Cette fixation peut être réalisée selon différentes méthodes, telles que l'adsorption, la covalence, le piégeage et la micro encapsulation **[28].**

I.2.1 Objectifs d'immobilisation

- ✓ Améliorer la stabilité des enzymes : Les enzymes immobilisées sont généralement plus stables que les enzymes solubles équivalentes. L'immobilisation protège en effet l'enzyme contre les conditions environnementales défavorables telles que les variations de PH, les températures élevées et les solvants organiques, ce qui permet d'allonger sa durée de vie et, par conséquent, de réduire les coûts de production **[29].**
- ✓ Permettre la réutilisation des enzymes : II est possible de récupérer les enzymes immobilisées après leur utilisation dans un processus industriel, ce qui permet de les réutiliser économiquement et réduit la quantité d'enzyme nécessaire pour la production **[30].**
- ✓ Permettre l'utilisation d'enzymes dans des environnements non aqueux : Permet leur utilisation dans des environnements non aqueux, comme les solvants organiques, élargissant ainsi leur champ d'application dans les processus industriels **[30].**

I.2.2 Méthodes d'immobilisation:

Le Choix de la technique dépend du type d'enzyme utilisée, du transducteur et de l'environnement dans lequel le biocapteur fonctionne. Aussi des stabilités mécaniques et chimiques de la matrice et de son coüt.et de l'application finale donnée à l'enzyme **[31].**

I.2.2.1 Immobilisation par adsorption :

L'adsorption des enzymes résulte d'interactions hydrophobes et de liaisons salines lorsque le support est immergé dans l'enzyme pour une adsorption physique ou lorsque l'enzyme est séchée sur les surfaces des électrodes. Les enzymes adsorbées sont protégées de l'agrégation, de la protéolyse et de l'interaction avec les interfaces hydrophobes **[32].**

Les avantages de l'immobilisation enzymatique par adsorption sont les suivants : un minimum d'étapes d'activation est requis, peu de réactifs sont nécessaires, et il s'agit d'une méthode peu coûteuse et facile à mettre en œuvre **[33].**

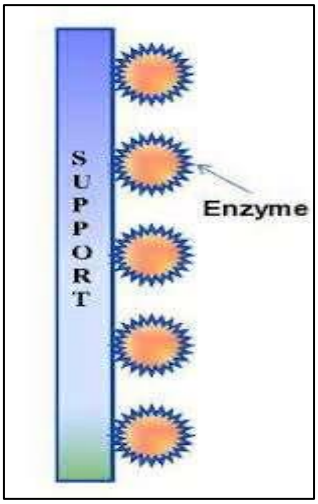


Figure I-5: Techniques d'immobilisation par adsorption physique **[34].**

I.2.2.2 Immobilisation par inclusion (confinement) :

Dans cette méthode, les enzymes sont retenues dans une matrice poreuse. L'enzyme est dispersée dans une solution homogène de monomères ou d'émulsion. La polymérisation du monomère conduit å la formation d'un réseau au sein duquel l'enzyme est emprisonnée d'une manière purement physique. La réaction de polymérisation doit être réalisée dans des conditions les moins dénaturantes possibles. Le polymère peut être : polyacrylamide,

polyéthylène glycol, polyvinyl pyrrolidone, amidon. La matrice peut être inorganique tel que l'argile **[35].**

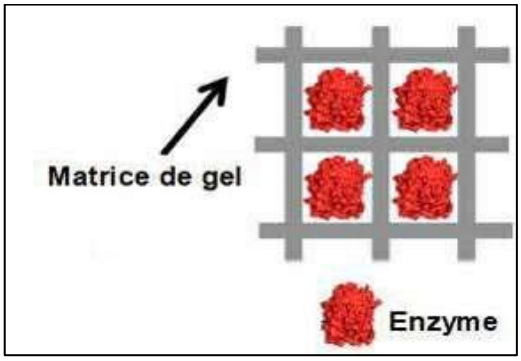


Figure I-6: Techniques d'immobilisation par inclusion dans une matrice de gel **[34].**

I.2.2.3 Encapsulation :

La technique d'immobilisation par encapsulation consiste à piéger plusieurs biomolécules dans différentes matrices polymères.

L'encapsulation est analogue au piégeage dans la mesure où les enzymes et les cellules sont libres dans les solutions, mais dans un espace contrôlé. Elle vise à immobiliser les enzymes sensibles et les solutions cellulaires dans de minuscules vésicules dotées de membranes poreuses. Les enzymes de grande taille ne peuvent ni sortir des capsules ni y entrer, tandis que les substrats et produits de petite taille peuvent se déplacer librement à travers une membrane semi-perméable **[33].**

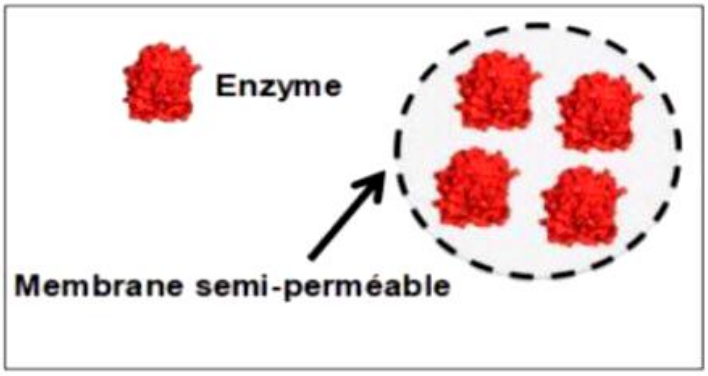


Figure I-7: Technique d'immobilisation par encapsulation **[35].**

I.2.2.4 Immobilisation par liaisons covalentes sur support :

Elle est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support. Ces groupes, en général insuffisamment réactif, nécessiteront une activation préalable. A priori, il faut activer soit l'enzyme, soit le support. L'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme peut conduire å la dénaturation de l'enzyme **[36].**

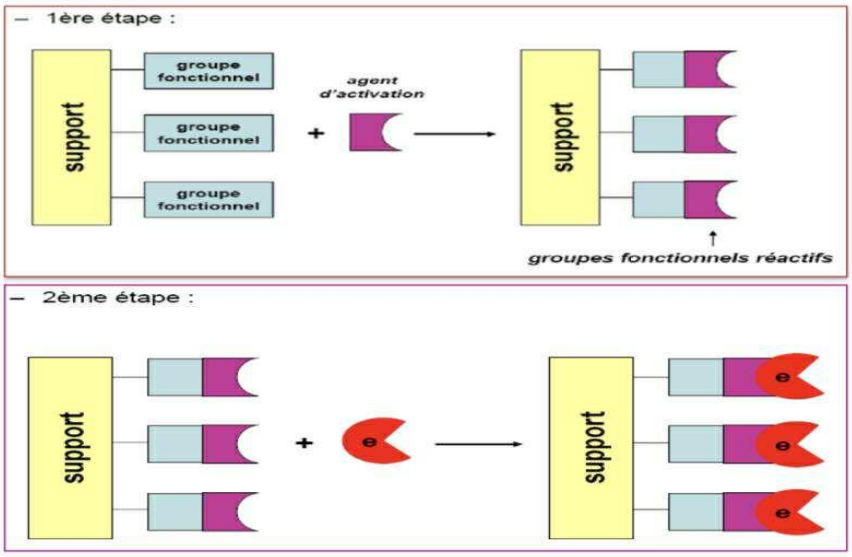


Figure I-8: Immobilisation par liaison covalente **[36].**

Figure étape 1: activation du support, étape 2:fixation de l'enzyme

I.2.2.4.1 Réticulation (agrégation) sans support

Au début des années 1960, **l'**immobilisation d'enzymes sans support a été tentée. La première étape de cette insolubilisation fut le développement des enzymes réticulées amorphes insolubles (CLEs), formées par la réticulation des groupes NH_2 des enzymes. Par la suite, les cristaux d'enzymes réticulés (CLECs**)** ont été développés, impliquant la cristallisation des enzymes suivie de leur réticulation au glutaraldéhyde, Le principal inconvénient des CLECs était la nécessité de purifier et cristalliser l'enzyme. En 2001, comme solution potentielle aux limitations des CLECs, les agrégats d'enzymes réticulées (CLEA) ont été développés par Cao et al **[37].**

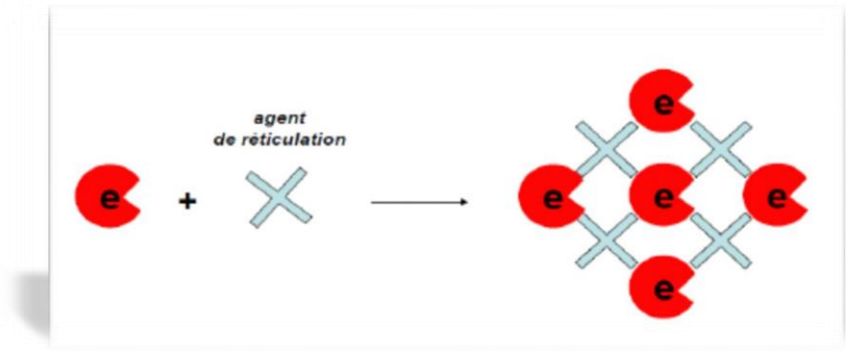


Figure I-9: Immobilisation par réticulation sans support **[36].**

I .2.2.4.1.1 Les agrégats enzymatiques réticulés (cross linked enzyme agreggates ou CLEAs)

Les agrégats d'enzymes réticulés (CLEAs) sont l'une des technologies qui permettent d'immobiliser rapidement l'enzyme sans support **[38].** Elles représentent un exemple relativement simple . La préparation des CLEAs à partir d'une grande variété d'enzymes a été décrite **[39].** Ce procédé combinant essentiellement la purification et l'immobilisation en une seule opération unitaire ne nécessitant pas une enzyme de haute pureté **[28].** Cette technique consiste à précipiter l'enzyme, suivie de la réticulation des agrégats enzymatiques précipités à l'aide d'un agent de réticulation bifonctionnel.

Un autre avantage de la technique CLEA réside dans une optimisation plus rapide des conditions d'immobilisation, en comparaison avec les techniques d'immobilisation sur support. Ces dernières reposent en grande partie sur des essais-erreurs fastidieux, en raison de l'absence de règles générales liant la nature du support choisi aux performances de l'enzyme pour une application donnée **[39].**

I.2.2.4.1.1.1. Méthode de préparation des CLEAs

La préparation des CLEAs se fait en deux étapes principales, la Formation d'agrégats physiques d'enzymes par précipitation et l'établissement de liaisons chimiques entre les enzymes à l'aide d'agents de réticulation pour obtenir des CLEAs insolubles.

Les agrégats physiques sont formés en précipitant l'enzyme brute avec :

- ✓ Des solvants organiques miscibles dans l'eau.
- ✓ Des sels inorganiques.
- ✓ Des polymères non ioniques à partir de solutions aqueuses.

Ce système est utile pour de nombreuses classes d'enzymes, car il permet la formation simultanée d'agrégats d'enzymes réticulées contenant plus de deux enzymes. Les agrégats formés sont maintenus par des liaisons non covalentes, préservant ainsi les structures tertiaires des enzymes **[40].**

La réticulation des agrégats physiques est réalisée avec un réactif bifonctionnel, tel que le glutaraldéhyde ou la poly-Lysine [**40].** Le glutaraldéhyde est généralement l'agent de réticulation choisi car il est peu coûteux et facilement disponible en quantités commerciales **[41].** Le processus de réticulation influe sur la préparation et les propriétés enzymatiques des CLEAs. Après réticulation chimique, les agrégats d'enzymes deviennent insolubles tout en conservant leur activité catalytique **[40].**

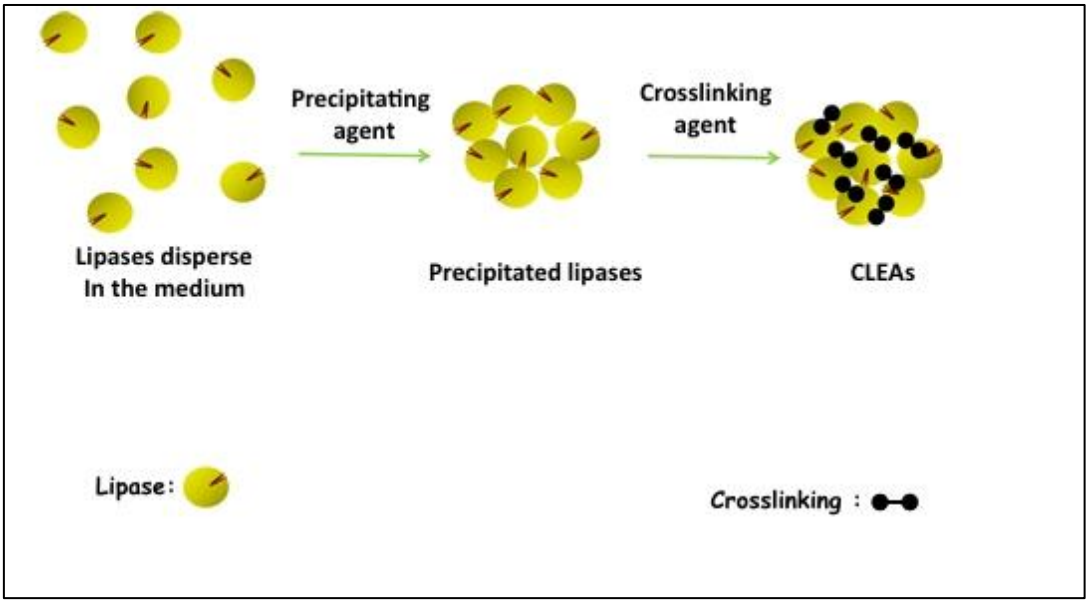


Figure I-10: Préparation d'agrégats enzymatiques récticulés (CLEAs) de lipase **[42].**

I.2.2.4.1.1.2. Caractérisation des CLEAs :

- ✓ **Propriétés structurelles**

La morphologie et la taille des particules sont deux propriétés importantes des CLEAs (agrégats enzymatiques réticulés) car elles influencent directement le transfert de masse et la filtrabilité dans des conditions opérationnelles **[40].**

La taille typique des particules de CLEAs se situe entre 5 et 50 μm**,** et leur filtrabilité est généralement suffisante pour une opération en batch **[43].**

Le taux de diffusion est influencé par la taille des particules, laquelle dépend notamment du rapport entre l'agent de réticulation et l'enzyme**.** Des vitesses optimales sont observées avec des particules plus petites, mais des considérations pratiques comme la facilité de filtration imposent l'utilisation de particules plus grandes, ce qui nécessite donc un compromis entre activité catalytique et filtrabilité [**43].**

- ✓ **Propriétés catalytiques**

L'immobilisation des enzymes sous forme de CLEAs (agrégats enzymatiques réticulés) peut entraîner des modifications de leur conformation et de leur microenvironnement, affectant ainsi la cinétique des réactions catalysées par l'enzyme.
Une représentation de Lineweaver-Burk a été réalisée pour estimer :

- La constante de Michaelis–Menten (**Km**),
- La vitesse maximale de réaction (**Vmax**),
- Le nombre de turnover (**kcat**),
- Et l'efficacité catalytique (**kcat/Km**)

  de l'enzyme libre et des CLEAs à différentes concentrations de substrat.

- ✓ **Recyclabilité**

Une autre raison importante d'immobiliser une enzyme est de faciliter sa récupération à partir du milieu réactionnel et sa réutilisation**,** ce qui permet de simplifier les étapes de purification en aval et de réduire le coût de l'enzyme dans le produit final [**43].**

I.2.2.4.1.1.3. Paramètres influents la préparation des CLEAs :

- ✓ Le choix et la dose du précipitant : Le choix du précipitant ne doit pas entraîner de perte d'activité enzymatique tout en précipitant l'enzyme de manière quantitative**.** Parmi les précipitants qui ont montré de bons résultats, au moins dans certains cas, on trouve : l'acétone, le diméthoxyéthane, le n-propanol, le t-butanol, le polyéthylène glycol (PEG), et le sulfate d'ammonium **[44].**

  L'ajout de BSA ou de sucres (glucose, galactose, fructose, lactose) peut (atténue) limiter la dénaturation enzymatique lors de la précipitation [**40].**

- ✓ Le degré de réticulation : Dépend à la fois de la concentration d'agent de réticulation et du temps **[45].** La concentration de l'agent de réticulation est un paramètre clé dans la production des CLEAs, car elle influence l'activité, la stabilité opérationnelle et la taille (morphologie) des particules des CLEAs obtenues. Comme cela ressort de la littérature, la concentration de l'agent de réticulation passe par un optimum **[46].**

  Le temps de réticulation est un autre facteur important dans la préparation des CLEAs pour obtenir une récupération d'activité élevée. La réaction entre l'agent de réticulation et les résidus d'acides aminés doit être suffisamment prolongée pour permettre la formation d'agrégats [**47].**

- ✓ pH et température : Dans la majorité des études, la préparation des CLEAs est réalisée à un pH neutre ou légèrement alcalin [**46]**. En revanche, une étude sur les Lac-CLEAs de *T. versicolor* a montré que les récupérations d'activité maximales étaient atteintes dans la plage de pH 4 à 7 en présence de différents solvants, tandis qu'une chute dramatique de l'activité enzymatique a été observée à pH 8,0 **[41].**

  La température de réticulation est un facteur important à prendre en compte pour l'optimisation de l'activité [**48].** La température optimale pour la lipase sous forme de CLEAs est comprise entre 45 et 50 °C comme indiqué dans la littérature **[49].**

I.2.2.4.1.1.4. Avantages des CLEAs :

Les CLEAs présentent plusieurs avantages en comparaison avec l'enzyme libre ou les enzymes immobilisées par les autres méthodes, notamment :

- ➢ La pureté de l'enzyme n'est pas une condition exigée pour réaliser le processus **[28].**
- ➢ La préparation est simple et combine essentiellement deux étapes (la précipitation et l'agrégation) en une seule opération [**48].**
- ➢ Les limitations diffusionnelles sont minimes suite à l'absence de support solide.
- ➢ Le faible coûts de production .
- ➢ C'est une excellente méthode pour stabiliser les structures quaternaires des enzymes multimériques [**48].**
- ➢ Facilité de récupération et de recyclage **[28].**

I.2.2.4.1.1.5. Applications des CLEAs lipase

Grâce à toutes les caractéristiques des CLEAs et à leurs avantages par rapport aux autres techniques d'immobilisation, elles ont gagné en popularité auprès des chercheurs, qui développent de plus en plus de CLEAs, en vue d'élargir leur utilisation dans diverses industries [**50] :**

- Biotransformation (synthèse chimique) : La lipase-CLEA, notamment la CALB-CLEA, a démontré une activité spécifique élevée et une grande stabilité dans des milieux non conventionnels comme le dioxyde de carbone supercritique et les liquides ioniques. Elle a notamment été utilisée pour la synthèse de l'oléate d'éthyle à partir d'acide oléique et d'éthanol par réaction d'estérification **[50]**
- CLEAs des lipases (*Rhizomucor miehei* et *Thermomyces lanuginosa*) ont été utilisés pour hydrolyser l'huile de poisson et libérer sélectivement l'EPA et le DHA à partir du squelette glycéridique.
- Production de biodiesel : Des CLEAs magnétisées de la lipase ont été préparés à partir de *Candida antarctica* et utilisés comme biocatalyseur robuste pour produire du biodiesel à partir de plantes oléagineuses non comestibles (comme le soja brut, le jatropha, la caméline) et d'huiles de friture usées **[50].**

Chapitre II : La lipase de ricin

II

II.1 La plante de ricin :

II.1.1 Généralités :

Le nom générique *Ricinus* signifie “tique” en latin : la graine a été ainsi nommée en raison de ses marques et de sa protubérance qui la font ressembler à certaines tiques **[51].** Le ricin ou *Ricinus communis* L est un arbuste annuel appartenant à la famille des *Euphorbiaceae* qui pousse à l’état sauvage dans les champs ouverts des régions tempérées et subtropicales. Il peut être un arbuste envahissant non désiré ou une plante cultivée à des fins commerciales **[52].** Les plantes de cette famille se caractérisent principalement par la présence d’un latex blanc, épais, collant et irritant pour la peau, ainsi que par un fruit composé de trois loges **[53].**



Figure II-1: Ricin commun (*Ricinus communis*) **[54].**

II.1.2 Nomenclature

En anglais : *Castor plant, Castor oil plant, Palma Christi* (Leo et al., 2009)

Au Brésil : *Carrapateira, mamona* ou *mamoneira* (Anete et al., 1999)

En français : *Ricin* (Maroyi, 2007)

Au Niger : *Karoua* (Hammiche et Maiza, 2006)

En arabe : *Wriwra, Kran'k, Tazart ûchan, Wararû, Wrûri, Wayrûrû* (Jalal et al., 2000), *Khareoua, Sakta* ou *meskouta* (nom donné à la graine) (Hammiche, 2013(**[55].**

II.1.3 Classification Taxonomique

Tableau II.1: Classification taxonomique de ricinus communis **[56].**

Règne	Plantae
Ordre	Malpighiales
famille	Euphorbiaceae
Sous-famille	Acalyphoideae
Tribu	Acalypheae
Sous-tribu	Ricininae
Genre	ricinus
Espéce	Ricinus communis

II.1.4 Origine et Habitat

Ricinus communis a une répartition cosmopolite est originaire du nord-est de l'Afrique tropicale, il est souvent présent comme plante rudérale à proximité des villages en zone urbaine et au bord des rivières temporaires **[57].**

Il était déjà cultivé pour son huile en Égypte il y a environ 6000 ans et s'est répandu très tôt à travers la Méditerranée, le Moyen-Orient et l'Inde. Il est aujourd'hui largement cultivé dans la plupart des régions sèches des tropiques et des subtropiques, ainsi que dans de nombreuses zones tempérées connaissant un été chaud.. *Ricinus communis* est présent sur l'ensemble du continent africain, de la côte atlantique à la mer Rouge, de la Tunisie à l'Afrique du Sud, ainsi que dans les îles de l'océan Indien **[58].** Plus de 95% de la culture de *Ricinus* dans le monde est concentrée en Inde, la Chine et le Brésil [**59].**

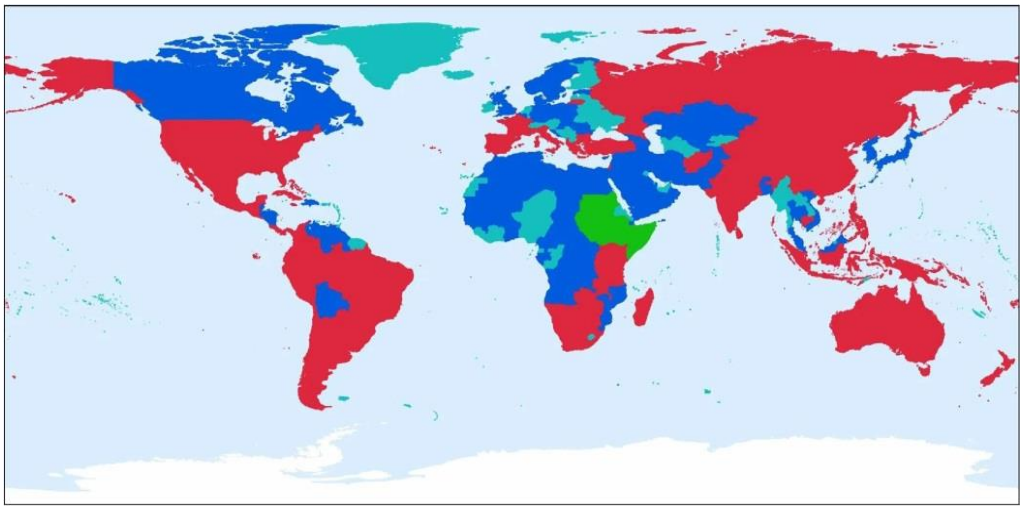


Figure II-2: La distribution de ricinus communis **[60].**

II.1.5 Caracérisatiques botaniques

Bien que le genre *Ricinus* comprenne une seule espèce (*communis*), il affiche toutefois une variation considérable notamment par sa taille, sa longévité, la forme et la taille du fruit et de la graine, ainsi que les dessins et la couleur du tégu- ment Elle peut être vivace avec 10-13 m de hauteur sous les tropiques, avec une tige de 7-15 cm de diamètre, mais elle se comporte souvent comme une plante annuelle dans les régions tempérées avec 1-3 m de hauteur **[57].** Il possède deux parties :

Une partie aérienne : possédant :

- **Une tige** dressée, robuste, rameuse avec des branches à nœuds visibles et cicatrisés annulaires, généralement glauques, parfois vertes ou rouges, un peu fistuleux, bien unie, ronde, lisse, ramifiée seulement dans le haut **[61].**



Figure II-3: La tige de *R. communis* L **[62].**

- **Les feuilles** : sont alternes, grandes parfois de plus d'un pied, palmées de 7 à 9 lobes, glabres, vertes glauques, avec une veine médiane de couleur rougeâtre, dentées irrégulièrement, rouge à leur développement, portées par de longs et forts pétioles glanduleux vers leur sommet [**63].**



Figure II-4: Les feuilles de *R. communis* L **[62].**

- **Les fleurs** : sont monoïques forment de grosses grappes redressés, rameuses ; les fleurs mâles sont situées dans le bas de l'inflorescence, composées d'un calice de cinq pièces sans corolle et de groupes nombreux d'étamines monadelphes Calice, et au-dessous de petites écailles un ovaire globuleux hérissé, surmonté de trois pistils longs rouges, hispides **[64].**



Figure II-5: Les fleurs de *R. communis* L **[65].**

- **Les fruits :** Fruits capsule à 3 coques hérissées, chacune contenant une graine ovale, marbrée, à caroncule saillante et albumen riche en huile, Les capsules renferment généralement 3 graines de couleur marron clair, marron rouge ou gris tachète de blanc **[66].**



Figure II-6: Les fruits de *R. communis* L **[62].**

- **Les Graines :** sont contenues dans chacune des loges du péricarpe, ont presque la forme d'un haricot moyen, sont piriformes, ovoïdes, allongées ou plates, luisantes marbrées de gris rougeâtre et de blanc. A l'intérieur de la graine se trouve une amende oléagineuse qui est très toxique **[67].**



Figure II-7: Les graines de *R. communis* L **[62].**

Une partie souterraine : possédant une racine pivotante puissante a racines latérales marquées

II.2 La lipase de ricin

II.2.1 Les méthodes d'extraction et purification utilisés à grande échelle :

Les méthodes d'extraction correspondent au transfert sélectif d'un soluté contenu dans le milieu initial vers un second milieu dans le quel il est soluble en vue de son isolement. L'extraction consiste en la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires, nécessitant donc un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire, par des procédés mécaniques, physiques ou chimiques **[68].** Cette extraction doit se faire à froid, en présence de substance protégeant l'activité enzymatique **[69].**

Les méthodes d'extraction peuvent être classées en méthodes physiques mécaniques ou chimiques :

- Méthodes physiques : Choc osmotique.
- Méthodes mécaniques : Congélation-décongélation, Broyage ou agitation avec des abrasifs, Bombe à disruption, Homogénéisateur d'Elvjm de potier, Les billes de verre, Sonication.

- Extraction chimique : Enzymes lytiques, Extraction liquide-liquide, Extraction liquide-solide **[68].**

La purification est un ensemble d'opérations visant à enlever toutes les impuretés d'un extrait brut contenant l'enzyme d'intérêt. En principe, n'importe quelle méthode des au fractionnement de protéines peut être employée pour la purification d'enzymes.

Les méthodes sont celle utilisées dans la purification des protéines. On peut désigner les différentes méthodes en fonction de leur propriété générale de purification :

- ✓ Méthode basée sur les différences de solubilité : précipitations par sels
- ✓ Méthodes basées sur la taille des molécules : Dialyse, Centrifugation, Filtration membranaire.
- ✓ Méthodes basées sur les propriétés ioniques : Chromatographie, Electrophorèse **[68].**

II.2.2 Propriétés et caractéristiques de la lipase de ricin :

Les lipases sont présentes dans presque toutes les graines oléagineuses, où l'hydrolyse des acylglycérols a lieu durant la germination. L'enzyme lipase est activée pendant la germination dans les tissus des graines de différentes espèces végétales telles que *Jatropha curcas* L. (noix de purgatif) (*Helianthus annuus* L. (tournesol) *Brassica napus* (colza) *Zea mays* (maïs) et *Ricinus communis* L. (graines de ricin) **[70].** Les graines de ricin possèdent une activité catalytique même lorsqu'elles sont inactives ou au repos, et pas uniquement en période de germination **[71]**, contrairement aux autres graines oléagineuses où la lipase est uniquement activée pendant la germination **[70].**

Les lipases des graines ont attiré beaucoup d'attention comme biocatalyseur, Dans certains cas, ces enzymes présentent des avantages par rapport aux lipases animales et microbiennes en raison de caractéristiques intéressantes telles que la spécificité, le faible coût, la disponibilité et la facilité de purification, représentant une excellente alternative pour une exploitation industrielle potentielle **[72].**

Plusieurs études ont examiné et présenté les caractéristiques biochimiques des lipases, en particulier celles issues du grain de ricin (*Ricinus communis*). Celles-ci incluent, la spécificité du substrat, le pH optimal, la température idéale ainsi que la stabilité de la lipase de ricin.

- ✓ **la spécificité du substrat**

- L'étude de Yue et *al* a montré que la lipase de ricin a une L'activité d'hydrolyse plus forte pour les substrats à longues chaînes (C14/C16/C18) que pour ceux à chaînes courtes. RcLipase est une lipase spécifique des positions sn-1,3 plutôt que des positions sn-2 **[73].**
- La lipase de graine de ricin présente une sélectivité pour les acides gras dominants présents dans la graine. Par exemple, les lipases de ricin montrent une sélectivité pour le triricinoléine **[72].**

- ✓ **Effet de pH :**

Plusieurs études scientifiques ont examiné l'impact du pH sur l'activité lipasique de Ricinus C ommunis L. Il a été signalé que ces enzymes fonctionnent de manière optimale à un pH de 8 comme le montre l'étude de Yue Li et *al*. Une autre recherche a aussi noté que l'activité lipasi que de *Ricinus Communis* atteignait son optimum à des niveaux de pH neutres, bien que la ma jorité indique une activité optimale à des pH acides variant entre 4 et 4.5 **[74].**

- ✓ **Effet de température et stabilité thermique :**

La température et la stabilité thermique de lipase de ricin sont étudiées dans plusieurs travaux scientifiques

- La température optimale de la lipase de ricin se situe généralement entre 30 C et 40 C comme indiqué dans Les littératures **[73, 75, 76].** Etude de Srivastava et a*l* ont montré que les taux d'hydrolyse et l'activité lipasique du ricin augmentaient jusqu'à 40 °C, puis présentaient une tendance à la baisse à 45 °C, enregistrant une valeur minimale à 50 °C pour presque tous les substrats **[76].**
- Etude de Ye Li et Al met en évidence que la lipase de ricin est thermostable dans une plage de (40 - 45 °C), ce qui signifie qu'elle peut perdre son activité à des températures plus élevées **[73].**

- ✓ **Effet des ions métalliques**

Les ions métalliques ont un effet notable sur l'activité lipasique de ricin (*Ricinus communis*), plusieurs études scientifiques ont examiné l'impact de ces ions :

- Les résultats rapportés par SU Er-zheng et al ont indiqué que la lipase acide purifiée n'était pratiquement pas affectée par Ca^{2+} $Mg^{2+,}$ et $Sn^{+2.}$ L'enzyme était inhibée en présence de Zn^{2+}, CO^{2+}, Pb^{2+} et $Cu^{2+.}$ Tandis que, les ions Mn^{2+}, Na^{+}, K^{+}, $A1^{3+}$ et Li^{+} ont relativement activé l'enzyme **[77].**
- L'étude de Malo A. et Darakli M ont montré que Ca^{2+} Mg^{2+}, Nh^{4+} et K^{+} stimulent l'activité enzymatique en revanche Zn^{2+} et Fe^{3+} avaient un effet d'inhibition sur l'enzyme **[78].**

✓ **Effet des solvants**

Les lipases sont connues pour leur capacité à fonctionner aussi bien en milieux aqueux qu'en solvant organiques, en biochimie. L'étude de SU Er-zheng et *al* a montré que la lipase été inhibée par le méthanol, l'éthanol, le propanol-2- et le butanol, tandis qu'elle est restée active dans l'hexane, isooctane et le benzène **[77].** Ces résultats sont confirmés par l'étude de Debajyoti Goswami et al, tel que les meilleurs résultats sont trouvés avec les solvants organiques hydrophobes **[79].**

Partie expérimentale

III

III.1 Objectif de l'Étude :

L'objectif principal de ce travail expérimental est d'optimiser et d'évaluer une méthode efficace d'immobilisation de la lipase extraite de graines de ricin (*Ricinus communis*), sous forme d'agrégats enzymatiques réticulés (CLEAs), avec un intérêt particulier pour l'hydrolyse des triglycérides. Pour atteindre cet objectif, la lipase brute sera d'abord extraite puis purifiée et son activité enzymatique sera déterminée en utilisant le test d'hydrolyse. L'enzyme sera ensuite immobilisée par précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une réticulation au glutaraldéhyde, avec une optimisation rigoureuse des conditions clés d'immobilisation (concentrations du précipitant et celle de l'agent réticulant, temps de réticulation). Enfin, une évaluation comparative des performances catalytiques de la lipase sous ses formes libre et immobilisée sera menée, en étudiant l'influence de divers paramètres physico-chimiques (pH, température, sels métalliques, solvants organiques et tensioactifs) sur l'activité hydrolytique vis-à-vis de substrats lipidiques. Cette démarche permettra d'apprécier la stabilité thermique et chimique, l'efficacité, et la réutilisabilité de la lipase immobilisée sur plusieurs cycles d'utilisation, ouvrant la voie à des applications industrielles.

III.2 Matériels et Réactifs :

III.2.1 Matériels:

Outre la verrerie couramment utilisée en laboratoire de chimie, les différents équipements employés au cours de cette étude sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau III.1: Appareillages utilisés.

Appareil	Marque	Utilisation spécifique
Balance électronique	KERN 	Utilisée pour la pesée précise des réactifs solides, étape cruciale dans la préparation des milieux réactionnels.
Agitateur magnétique	**UC152 - Stuart** 	Permet l'agitation homogène des solutions réactionnelles, garantissant une bonne dispersion des constituants.

Centrifugeuse	**HettichEBA 20** 	Employée pour la séparation des phases ou la concentration d'agrégats enzymatiques par centrifugation.
pH-mètre	**Starter 3100** 	Utilisé pour mesurer avec précision le pH des solutions, paramètre essentiel dans l'optimisation des conditions réactionnelles**.**
Étuve	**Moment** 	Sert à la mise en température contrôlée des échantillons, ainsi qu'au traitement thermique des solutions ou suspensions enzymatiques.
Vortex	**Heidolph** 	Utilisé pour l'homogénéisation rapide de petites quantités de liquide dans des tubes ou microtubes.
Homogénéiseur		**U**tilisé pour obtenir des mélanges homogènes ou broyer des tissus / cellules en solution.
Incubateur		Utilisé pour incuber des échantillons à température constante, essentiel pour certaines réactions enzymatiques ou cultures.

III.2.1.1 Verrerie et matériel de laboratoire complémentaire :

En complément des appareils mentionnés, divers matériels de verrerie ont été utilisés tels que les béchers, les erlenmeyers, les fioles jaugées de différents volumes, les entonnoirs, les verres de montre ainsi que des spatules de tailles variées, nécessaires à la préparation et à la manipulation des solutions et des réactifs.

III.2.2 Réactifs:

Dans le cadre de ce travail expérimental, plusieurs réactifs ont été sélectionnés pour la mise en œuvre et l'évaluation de l'activité enzymatique de la lipase extraite des graines de ricin. Ces réactifs ont été choisis en fonction de leur pertinence scientifique, de leur pureté, et de leur capacité à permettre une caractérisation précise de l'enzyme étudiée.

- **Enzyme:** Lipase végétale.

La lipase utilisée dans cette étude est d'origine végétale, extraite à partir des graines de ricin (*Ricinus communis L*). Ce choix présente plusieurs avantages notables :

- ✓ Source renouvelable qui pourra être adaptée aux applications agroalimentaires et pharmaceutiques.
- ✓ Processus d'extraction simple et économique, favorable à une production à grande échelle.
- ✓ Potentiel enzymatique élevé, démontré par sa capacité à hydrolyser efficacement divers substrats lipidiques.

- **Substrats :**

- ✓ Huile d'olive
- ✓ Huile de ricin
- ✓ Huile noix de coco
- ✓ Huile de soja

L'huile d'olive, utilisée comme substrat principal dans la réaction d'hydrolyse enzymatique, est une matière grasse extraite des fruits de l'olivier. Nous utiliserons une huile d'olive commerciale.

- **Solutions tampons :**

Les tampons ont été préparés pour couvrir une large gamme de pH (2 à 10), afin d'étudier la stabilité et l'activité optimale de l'enzyme en fonction du pH :

-Solution tampon pH 2,0 préparé par chlorure de potassium à 0,05M ;

-Solution tampon pH 4,5 préparé par biphthalate de potassium à 0,05M ;

-Solution tampon pH 7,0 préparé par phosphate monopotassique à 0,05M ;

-Solution tampon pH 9,0 ; 10,0 préparé par chlorure de potassium à 0,05M et l'acide borique à 0,01M.

Le pH des solutions sera ajusté en utilisant les solutions de NaOH (0.05M) et HCl (0.1M), pour les différentes valeurs de pH étudiées (2, 4.5, 7, 9, 10).

- **Autre réactifs**

Dans ce travail, seule la réaction d'hydrolyse enzymatique a été étudiée. Par ailleurs, d'autres réactifs ont été utilisés dans la partie caractérisation. Les réactifs spécifiques utilisés dans ce cadre sont inclus dans le tableau suivant :

Tableau III.2: Les réactifs utilisés.

Réactifs	**Formule**	**Masse molaire (g/mol)**
Éthanol	**C_2H_6O**	46,0684 ± 0,0023 g/mol
ACETONE	**C_3H_6O**	46,0684 ± 0,0023 g/mol
Phénolphtaléine	**$C_{20}H_{14}O_4$**	318,3228 ± 0,0182 g/mol
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	**C_2H_6OS**	78,133 ± 0,007 g/mol
Méthanol	**CH_4O**	32,0419 ± 0,0014 g/mol
Propan-2ol	**C_3H_8O**	60,0953 ± 0,0033 g/mol
Chlorure de cuivre	**$Cu\ Cl_2$**	134,452 ± 0,007 g/mol
Chlorure de calcium	**$Ca\ Cl_2$**	110,984 ± 0,008 g/mol
Chlorure de fer	**$Fe\ Cl_2$**	126,751 ± 0,006 g/mol
Chlorure de magnésium	**$Mg\ Cl_2$**	95,21 ± 0.01 g/mol
SDS	**$C_{12}H_{25}NaO_4S$**	288,38 g/mol
Tween 20	**$C_{58}H_{114}O_{26}$**	1228g/l
Tween 40	**$C_{62}H_{122}O_{26}$**	1284g/l
Tween 80	**$C_{64}H_{124}O_{26}$**	1310g/l

III.3 Préparation de l'extrait enzymatique brut

III.3.1 Préparation de la lipase brute :

La source végétale qui est les graines de ricin décortiquées, ont été broyée à l'aide d'un pilon et d'un mortier avec l'addition d'eau distillée. Le mélange a été ensuite filtré sur une gaze. Les étapes de broyage, de filtration d'extrait enzymatique sont représentées sur la **Figure III.1.**

		
1) Pesage des graines de ricin	2) Décorticage manuel des graines	3) Broyage des graines décortiquées à l'aide d'un mortier et d'un pilon
		
4) Addition d'eau distillée au broyat	5) Filtration du mélange broyé à travers une gaze	6) Récupération de l'extrait enzymatique filtré

Figure III-1: Les étapes d'extraction de la lipase brute.

III.3.2 Purification partielle de la lipase de ricin

❖ **Mode opératoire:**

La purification de la lipase par la technique de précipitation à l'acétone a été réalisée à une température contrôlée de 4 °C, selon les étapes représentées sur la **Figure III.2** :

- Préparation de l'extrait brut :

- L'extrait brut enzymatique est placé dans un récipient maintenu sur de la glace pilée.
  - Le tout est soumis à une agitation continue.

- Addition d'acétone glacée :

- Trois volumes d'acétone glacée sont ajoutés (goutte à goutte) à l'extrait brut, tout en maintenant l'agitation. Cette étape permet la précipitation sélective des protéines.

- Incubation au froid *:*

- Une fois l'ajout d'acétone terminé, le mélange est placé au réfrigérateur à 4 °C pendant 2 heures.
- Un précipité blanc commence à se former.

- Centrifugation :

- Le mélange est centrifugé à (3000 rpm pendant 10 minutes) pour séparer le précipité.
- Le culot (précipité) est ensuite récupéré avec précaution.

- Séchage du culot et obtention de l'extrait enzymatique partiellement purifié (EEPP)

- Le culot est laissé à l'air libre pour permettre son séchage complet.
- La poudre obtenue représente l'extrait enzymatique partiellement purifié de la lipase

- Conditions de conservation :

- L'EEPP doit être conservé à l'abri de la lumière, de l'humidité et de toute contamination.
- Il est recommandé de le stocker dans un récipient en verre hermétiquement fermé, enveloppé dans du papier aluminium, et conservé au réfrigérateur.

Dans ces conditions, il peut être conservé pendant plusieurs semaines sans altération significative de son activité enzymatique.

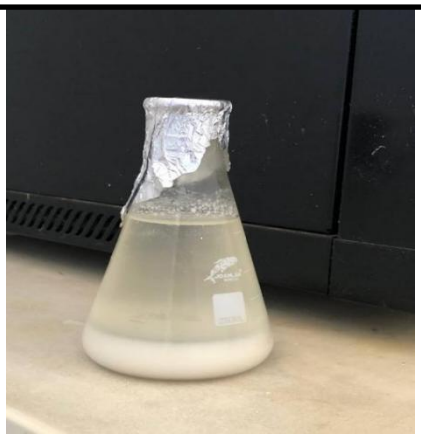
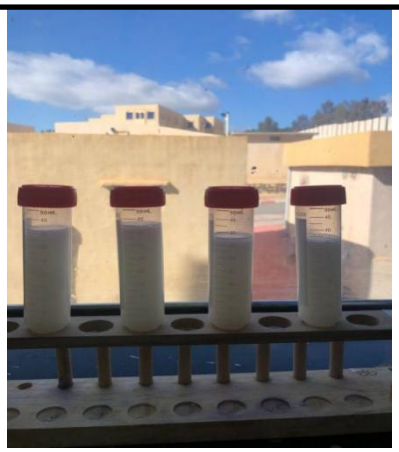
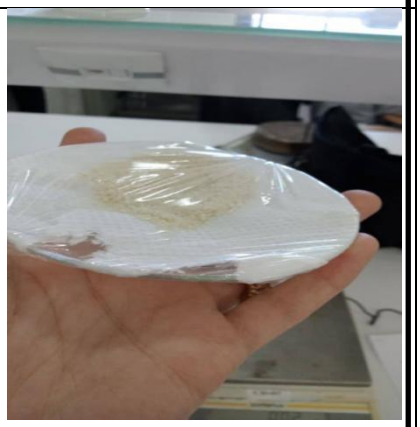
		
1) Ajouter de l'acétone goutte à goutte	2) Après 2 heures dans le frigo il se forme un précipité	**3)** Mettre l'extrait dans des tubes égaux et on les centrifuge
		
4) Centrifugation à 3000 rpm, pendant 10 min	5) Séchage à l'air libre (Température ambiante)	6) L'enzyme après séchage (Extrait enzymatique partiellement purifiée (EEPP)).

Figure III-2: Les étapes de purification partielle de la lipase par précipitation à l'acétone

III.4 Mesure de l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique (EEPP)

❖ **Principe** :

L'activité enzymatique de la lipase est déterminée sur la base de la réaction d'hydrolyse, sous des conditions standards, en utilisant l'huile d'olive comme source de triglycérides. La concentration des acides gras libérés suite à cette réaction est dosée par titrimétrie selon le protocole suivant :

❖ **Préparation de l'émulsion d'huile d'olive (émulsion A) :**

- Dissoudre (2 g) de gomme arabique dans 100mL d'eau distillée sous agitation modérée à une température de (40 à 50°C).
- Ajouter progressivement 10mL d'huile d'olive à 88mL de la solution de gomme arabique, en maintenant une agitation vigoureuse (avec un homogénéisateur) jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène.

❖ **Test d'activité lipasique:**

- Introduire dans un erlenmeyer :

- 5 ml de l'émulsion (A),
- 5 ml de solution tampon (pH =4.5 ou pH 7, 0.05 M),
- 1 ml de solution de chlorure de calcium ($CaCl_2$, 1 g/L).

- Incuber le mélange à 37°C pendant 10 minutes, sous agitation constante
- Ajouter 0.1 g de poudre enzymatique, tout en démarrant le chronomètre.
- Après 5 minutes de réaction, ajouter la solution stop (B), constituée de 7.5 ml d'éthanol (95 %), ou d'un mélange éthanol/acétone (1:1),
- Réaliser le titrage avec une solution de NaOH (0.05 N) jusqu'à l'apparition d'une couleur rose stable pendant 10 à 15 secondes.

❖ **Témoin ou essai blanc :**

Dans un autre erlenmeyer, effectuer un essai identique, en l'absence d'enzyme, ou en ajoutant immédiatement la solution d'arrêt (éthanol).

L'activité enzymatique sera déterminée par la relation suivante :

$$\mathbf{AE = (Ve - Vt).\ C.1000/t}$$

Avec :

AE : Activité enzymatique Ul.

Ve : Volume de NaOH (ml) en présence d'enzyme.

Vt : Volume de NaOH (ml) sans enzyme (temoin).

C : concentration de NaOH (M).

t : Temps de réaction (min).

L'activité massique AEm pourra être calculée en rapportant AE à la masse d'enzyme

m_E utilisée, on aura ainsi :

$$\mathbf{AEm = (Ve - Vt).\ C.1000/t.m_E}$$

III.5 Immobilisation ou formation d'agrégats enzymatiques (CLEAs) de lipase

La préparation des CLEAs de lipase a été optimisée selon l'approche d'un seul facteur à la fois. Trois paramètres ont été étudiés : la concentration de l'agent précipitant, le sulfate d'ammonium (50%, 60% et 80 %, v/v), la concentration de l'agent réticulant, le glutaraldéhyde (25, 50 et 75 mM), ainsi que le temps de réticulation (1, 2 et 4 heures). À chaque série d'expériences, un seul facteur a été modifié tandis que les autres étaient maintenus constants. La valeur optimale du paramètre varié obtenue est celle donnant la valeur maximale de l'activité des CLEAs préparées. Le protocole expérimental est décrit comme suit :

III.5.1 Mode opératoire de Préparation des CLEAs

- ✓ Dissoudre (0.1 g) de lipase dans 40 ml de tampon phosphate (pH= 7).
- ✓ Précipiter le mélange (lipase, tampon) par le sulfate d'ammonium glacial (50, 60 et 80 %, v/v) : dans un bain glacé agité, placer un volume V de la solution enzymatique, puis ajouter goutte à goutte le sulfate ammonium glacial (quantité totale 3V).
- ✓ Une fois la précipitation est terminée, la réticulation est démarrée par l'ajout de glutaraldéhyde (25, 50 et 75 mM /g).
- ✓ Laisser le mélange sous agitation pendant (1h, 2h et 4h) puis centrifuger à 3000 rmp pendant 10 min et séparer les particules agglomérées (CLEAs).
- ✓ Laver les particules 2 à 3 fois avec l'eau distillée ou à l'aide du tampon phosphate pH=7. Après chaque lavage, centrifuger pendant 5min pour chaque lavage et séparer les particules de CLEAs.

- ✓ A la fin, séparer, laisser sécher pendant 2h à l'air libre ou dans l'étuve à 30 °C.
- ✓ À chaque expérience, une masse de CLEAs est testée pour son activité lipasique sous les conditions standards.
- ✓ Conserver les CLEAs dans un récipient en verre hermétiquement fermé, enveloppé dans du papier aluminium au réfrigérateur à labri de lumière et l'humidité.

Les différentes étapes de préparation de CLEA sont représentées dans **la figure III.3 :**

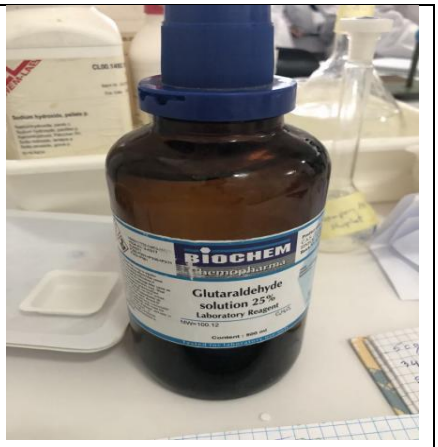
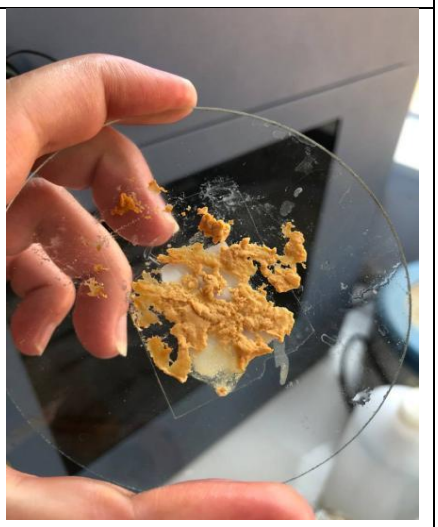
		
1) Dissolution de la lipase dans la solution tampon phosphate pH7.	**2)** Ajouter goutte à goutte le sulfate d'ammonium glacial.	**3)** Utilisation du glutaraldéhyde comme agent réticulant à différente concentration.
		
4) Observation du changement de couleur et formation des agrégats.	**5)** Transfert dans les tubes et centrifuge à 3000 rpm, pendant 10 min, et laver les particules.	**6)** Récupérer le précipité de l'enzyme immobilisée, puis le mettre à sécher.

Figure III-3: Les étapes de préparation des CLEAs de lipase de ricin.

III.6 Caractérisation de la lipase libre et CLEAs lipase de ricin (sous les conditions optimale) :

III.6.1 Effet de pH:

❖ **Objectif:**

L'activité de la lipase dépend du pH du milieu. Nous étudierons la plage de pH où l'enzyme est la plus active et stable. L'effet du pH a été examiné en mesurant l'activité enzymatique de lipase libre et immobilisée à différents pH (2, 4.5, 7, 9 et 10).

❖ **Mode opératoire :**

- ✓ Préparer une série d'erlenmeyers contenant chacun le mélange réactionnel constitué de 5 ml d'émulsion, 1ml de $CaCl_2$, et 5ml de la solution tampon de pH (2, 4.5, 7, 9 et 10) ;
- ✓ Pré incuber les mélanges à 37C°, sous agitation constante à 200 rpm, pendant 10 min ;
- ✓ Ajouter 0,1 g de lipase libre ou de CLEAs-lipase à chaque mélange réactionnel, puis démarrer immédiatement le chronométrage ;
- ✓ Préparer une même série qui contient la même composition de milieu réactionnel sans enzyme (témoins) ;
- ✓ Après 5 minutes de réaction, ajouter 7,5 ml d'éthanol dans chaque erlenmeyer pour arrêter la réaction ;
- ✓ Titrer avec la solution de NaOH (0.05 M) ;
- ✓ Mesurer l'activité enzymatique pour chaque pH.

III.6.2 Effet de la température

Ce test permet de déterminer la température à laquelle l'enzyme présente son activité catalytique maximale.

❖ **Mode opératoire:**

- Réaliser le **test standard** directement sous les températures suivantes (ambiante, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 70 °C.).
- Maintenir le pH constant et comparer l'activité obtenue pour chaque température afin d'identifier la température optimale.

III.6.3 Étude de la stabilité de la lipase libre et des CLEAS de lipase de ricin

III.6.3.1 Stabilité thermique

❖ **Objectif:**

Le teste de Stabilité thermique vise à évaluer la résistance thermique de la lipase (libre et sous forme de CLEAs) après incubation sous différentes températures (ambiante, 30°C, 40°C, 50°C et 70°C).

❖ **Mode opératoire:**

- ✓ Préparer une gamme d'erlenmeyers contenant chacun de 0.1 g (lipase libre ou de CLEAs de lipase) et 5 ml tampon pH optimale ;
- ✓ Incuber Les mélanges à différentes températures **(**ambiante, 30°C, 40°C, 50°C et 70°C) pendant 2 heures **;**
- ✓ Après l'incubation, retirer les erlenmeyers et démarrer le test standard à 37C° par l'ajout de 5ml d'émulsion et 1ml de $CaCl_2$;
- ✓ Après 5 min arrêter la réaction toujours avec l'arrêt éthanol et tester l'activité ;
- ✓ Préparer les mêmes milieux réactionnels sans catalyseur (les témoins) pour mesurer l'acidité initiale par titrimétrie.

III.6.3.2 Stabilité chimique

III.6.3.2.1 Stabilité en présence des ions métalliques

❖ **Objectif :**

La présence de certains ions métalliques peut modifier l'activité enzymatique positivement (activateur) ou négativement (inhibiteur). Nous analyserons l'effet de différents ions sur la performance catalytique de la lipase (libre et réticulé).

❖ **Mode opératoire :**

- Préparer le tampon de réaction standard pH optimale ;
- Préparer des solutions mères de 0.5M de différents cations métalliques ;
- Prélever un volume (0.1ml) de la solution métallique de façon à ce que la concentration en cation dans la solution totale de test standard (10ml) soit 5mM ;

- Dans différents erlenmeyers ajouter (5 ml de tampon pH=4.5 avec 0.1ml de sel et 0.1g de l'enzyme (libre ou réticulé) ;
- pré incubé le mélange pendant 30 min à 37 C° sous agitation à 200 rpm ;
- Après l'incubation ajouter 5ml d'émulsion pour démarrer le test standard (5min de réaction à 37C°et sous agitation à 200 rpm) ;
- Arrêter la réaction ;

- Préparer les mêmes milieux réactionnels sans enzyme (les essais Blancs) ;
- Mesurer l'activité.
- Comparer avec un contrôle sans sel métallique (un seul contrôle pour tous les sels).

III.6.3.2.2 Stabilité en présences des tensioactifs :

- **Objectif:**

L'objectif de cette étape est d'évaluer l'influence de différents tensioactifs sur l'activité de la lipase extraite. Ces agents peuvent modifier la structure de l'enzyme ou l'interface substrat/enzyme, affectant ainsi la catalyse enzymatique.

- **Mode opératoire:**

1. Préparation de solutions tensioactifs à une concentration de 1 % m/v ou v/v dans le milieu réactionnel ;
   - Pour préparer les solutions à 1 % m/v ou v/v des tensioactifs (SDS et Tween (20-40-80), une quantité appropriée de chaque tensioactif a été dissoute dans un volume de tampon pH= 4,5, de façon à obtenir un volume final de 5 ml.
2. Dans des erlenmeyers propres et étiquetés ajouter :
   - ✓ 5 ml de la solution (tensioactif et tampon optimal pH=4.5).
   - ✓ 0,1 g de lipase (libre ou réticulé).
   - ✓ 1 ml de $CaCl_2$ (1g/L).
3. Pré incubé le mélange pendant 15 à 30 minutes à 37 °C sous agitation à 200 rpm ;
4. Ajouter 5ml d'émulsion pour démarrer le test ;
5. Incuber le mélange réactionnel pendant 30 min à 37 °C et sous agitation 200 rpm ;
6. Arrêter la réaction ;

7. Préparer les mêmes milieux réactionnels sans enzyme (les essais Blancs) ;
8. Calculer l'activité ;

Un test témoin, réalisé en l'absence de tensioactif, a servi de référence pour le calcul de l'activité relative.

III.6.3.2.3 Effet de la nature du substrat sur l'activité :

La lipase agit différemment selon le type de substrat utilisé. Nous testerons son affinité vis-à-vis de différent type de substrat.

❖ Mode opératoire

Effectuer le test d'activité standard de différents types des huiles (huile d'olive, huile de ricin, huile de noix de coco, et huile de soja) :

1. Dans une série d'erlenmeyers propres et étiquetés introduire :

   - ✓ 5 ml d'émulsion d'huile ;
   - ✓ 5 ml de tampon (pH =4.5) ;
   - ✓ 1 ml d'une solution de $CaCl_2$ (1 g/L) ;

2. Pré incuber le mélange pendant 10 min à 37 °C et sous agitation modérer à 200 rmp ;
3. Lancer la réaction en ajoutant 0.1 g de l'enzyme (libre ou réticulé) ;
4. Après 5 min d'incubation Arrêter la réaction en ajoutant 7.5 ml d'éthanol ;
5. Titrer le milieu avec une solution de NaOH (0.05M) ;
6. Préparation des témoins :
   Pour chaque type d'huile, préparer un mélange identique, mais sans enzyme.
7. Calculer l'activité pour chaque huile.

III.6.3.2.4 Stabilité en présences des solvants organiques polaires:

❖ Objectif :

Étudier l'influence des solvants organiques polaires sur l'activité et la stabilité de la lipase libre et immobilisé, en tenant compte de leur usage fréquent en synthèse enzymatique.

❖ Mode opératoire:

Effectuer le test d'activité standard en préparant un mélange (solvant/tampon) à 50%.

1. Préparer une gamme de 5 erlenmeyers contenant chacun un mélange constitué de :

- ✓ 2.5 ml de tampon pH =4.5 avec 2.5 mL de solvant (acétone, éthanol, méthanol, isopropanol, DMSO) ;
- ✓ 5 ml émulsion ;
- ✓ 1 ml de solution $CaCl_2$ (1 g/L) ;

2. Pré incuber le mélange pendant 10 min à 37 °C et sous agitation à 200 rmp ;
3. Ajouter 0.1 g de l'enzyme (libre ou réticulé) et lancé la réaction par le déclanchement de chronomètre ;
4. Après 5 min arrêter la réaction en ajoutant 7.5 ml d'éthanol.
5. Préparer les mêmes milieux réactionnels sans catalyseur (les essais blancs) ;
6. Mesurer l'activité.
7. Effectuer un test sans solvant (100 % tampon) pour calculer l'activité relative.

III.6.4 Étude de la cinétique d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase libre et les CLEA de lipase

❖ **Objectif :**

Ce travail vise à déterminer les paramètres cinétiques du modèle de Michaelis-Menten, à savoir la vitesse maximale (Vmax) et la constante de Michaelis (Km), pour la lipase sous forme libre et sous forme de CLEAs (Cross-Linked Enzyme Aggregates)

❖ **Matériels et produits utilisés :**

- ✓ Lipase libre et CLEAs
- ✓ Solution tampon pH= 4.5.
- ✓ Tubes à essai / Erlenmeyers
- ✓ Agitateur (vortex ou homogénéisateur).
- ✓ Incubateur (37°C).
- ✓ Chronomètre.

❖ **Mode opératoire :**

1. Préparation de l'émulsion :

✓ Préparer 100 ml de solution de gomme arabique (2g).

✓ Dans des tubes séparés, mélanger des volumes croissants d'huile d'olive (1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml et 9 ml) avec (9 ml, 8 ml, 6 ml, 4 ml, 2 ml et 1 ml) de solution de gomme arabique respectivement, pour obtenir différentes concentrations en substrat.

- ✓ Agiter très fortement (homogénéisateur) jusqu'à obtenir une émulsion stable.

2. Préparation des milieux Réactionnels : À chaque tube d'émulsion, ajouter 10 ml de Solution tampon optimal (pH=4.5) et 2 ml de solution de $CaCl_2$ (1 g/L).

3. Pré incubation **:**

Pré Incuber tous les mélanges à 37°C pendant 10 minutes sous agitation à 200 rpm.

4. Lancement de la réaction :

- ✓ Ajouter 0.2 g de la lipase libre dans chaque tube.
- ✓ Déclencher immédiatement le chronomètre.

Remarque :

Le même protocole est appliqué pour tester l'enzyme immobilisée (CLEAs**)**, en remplaçant la lipase libre par 0,2 g de CLEAs dans les tubes réactionnels.

5. Arrêt de la réaction : Après 5 minutes, arrêter la réaction à l'aide de 7.5 ml d'éthanol.

6. Témoins **:** Pour chaque concentration d'huile d'olive, préparer une erlenmeyer (sans l'enzyme).

7. Calculer l'activité (c'est la vitesse de la réaction (v)).

8. Tracer le graphique V en fonction de la concentration de substrat (S) et réaliser la linéarisation de lineweaver-Burk pour la détermination de Vmax et Km.

III.6.5 Réutilisation et stabilité à long terme des CLEAs de lipase :

- ❖ **L'objectif de l'étude**

Ce travail vise à vérifier si les CLEAs de lipase peuvent être réutilisées plusieurs fois et s'ils gardent leur activité longtemps après stockage.

III.6.5.1 Test de Réutilisabilité (Cycles d'utilisation) :

- ❖ **Mode opératoire :**

1. Réaliser le test de réaction d'hydrolyse par les CLEAs selon la méthode standard mentionnée précédemment ;
2. Mesurer l'activité du premier cycle : C'est l'activité relative à 100%).

3. Lavage des CLEAs : Récupérer les CLEAs sur le papier filtre, et faire un lavage 2 à 3 fois avec l'eau distillée froide.
4. sécher les CLEAs quelques minutes à l'air libre.
5. Répéter les étapes jusqu'au le 5^{e} cycle.
6. Analyse : Noter l'activité des CLEAs après chaque utilisation pour déterminer l'activité résiduelle.

III.6.5.2 Test de Stabilité au Stockage (Longue Durée) :

La stabilité au stockage a été évaluée en incubant la lipase-CLEAs dans un tampon de pH =4.5 à 4 °C. L'activité de la CLEAs lipase a été déterminée par le test standard chaque 2 ou 4 jours pendant 10 jours d'incubation.

III.7 Résultats et discussion

III.7.1 Extraction et purification de la lipase (*Ricinus communis L.*) :

L'étape d'extraction et de purification de la lipase à partir des graines de *Ricinus communis* L constituent une étape primordiale de notre travail puisqu'elle influence directement sur la qualité des résultats expérimentaux.

Le broyage mécanique des graines souvent en présence de tampon phosphate pH=7 permet la rupture des structure cellulaires et la solubilisation des protéines intracellulaires dont la lipase. Le mélange obtenu a ensuite été filtré à l'aide de gaze. Le filtrat recueilli se présentait sous la forme d'un liquide trouble et de couleur blanchâtre, sous forme d'une émulsion ou une suspension légèrement laiteuse. Cet aspect est dû à la présence de fines particules lipidiques et de protéines solubles. Il s'agit de l'extrait brut (**Figure III-4**).

La purification par l'acétone froide a pour but de concentrer et partiellement purifier la lipase. La précipitation a été réalisée par l'ajout de l'acétone, lentement, à l'extrait brut sous agitation. Le mélange a été ensuite incubé à 4°C pendant 2 heures puis centrifugé.

A la suite de cette étape, un précipité pâteux s'est formé dans le fond du tube. Ce précipité présentait un aspect homogène, une texture compacte mais souple et une couleur blanc cassé. Après séchage, la lipase semi purifiée est obtenue sous forme de poudre beige clair, à texture fine et régulière **(Figure III-5).**

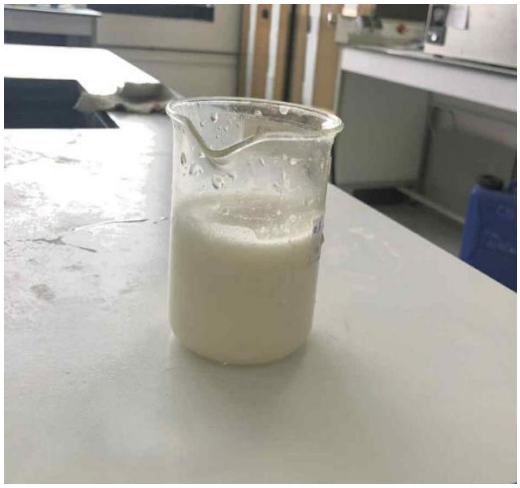




Figure III-4: Extrait brut de lipase de ricin. **Figure III-5**: Extrait de lipase partiellement Purifiée (EEPP).

En comparaison, l'extrait brut contient une grande diversité de protéines et de composés solubles, ce qui peut interférer avec les mesures d'activité et les applications ultérieures. La fraction semi-purifiée obtenue par précipitation à l'acétone est enrichie en lipase, avec une réduction significative des contaminants, ce qui améliore la reproductibilité et la fiabilité des essais enzymatiques.

La précipitation à l'acétone froide est une méthode commune qui s'est avérée efficace et simple à mettre en œuvre, pour la concentration et la purification partielle de la lipase de ricin, en accord avec les résultats rapportés dans la littérature **[80, 81]**.

III.7.2 L'activité enzymatique de l'EEPP

Les valeurs de l'activité de la lipase de ricin semi purifié mesurée par le test d'hydrolyse sous les conditions standard à pH =4.5 et pH =7 étaient de **15 UI** et **7UI** respectivement

Correspondant à une Activité massique (par g d'enzyme) :

- À pH=4.5 **AEm = 150 UI/ g**
- À pH=7 AEm **= 70 UI /g**

Ces résultats indiquent que, dans les conditions expérimentales adoptées, la lipase présente une meilleure activité enzymatique à pH acide (4,5) qu'à pH neutre.

Des résultats identiques ont été obtenus par d'autres auteurs [**78, 82, 83**].

III.7.3 Préparation d'agrégats enzymatiques (CLEAs) de la lipase de ricin

III.7.3.1 Étape de précipitation:

Le processus de précipitation, considéré comme une étape importante pour la récupération de l'activité des CLEAs , est réalisé en agrégeant la lipase de ricin semi-purifiée à l'aide du sulfate d'ammonium. Trois concentrations ont été testées afin d'optimiser le processus : 50 %, 60 % et 80 %. Cette méthode permet de fractionner les protéines selon leur solubilité et d'isoler la lipase en favorisant son agrégation à des niveaux spécifiques de saturation du sulfate d'ammonium. La concentration optimale sera celle donnant l'activité maximale.

III.7.3.1.1 Optimisation de concentration en sulfate d'ammonium :

La figure III.6 représente l'effet de différentes concentrations de sulfate d'ammonium (50 %, 60 %, 80 %) sur l'activité enzymatique des lipases agrégées (CLEAs) à deux valeurs de pH (pH 7 et pH 4,5).

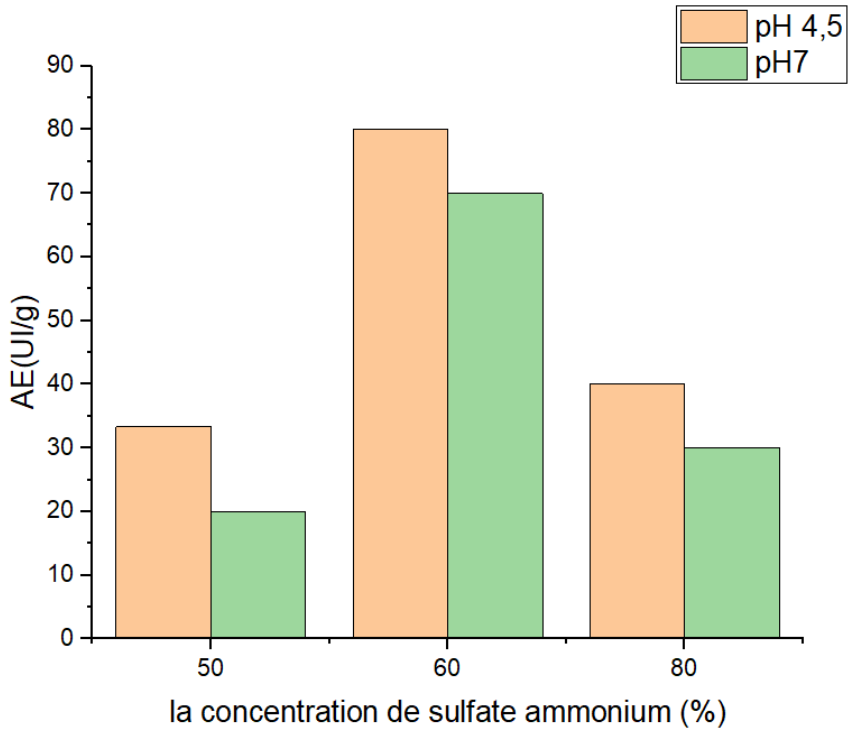


Figure III-6: Effet de sulfate ammonium sur l'activité enzymatique des CLEAs

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la concentration optimale de sulfate d'ammonium est de **60 %** donnant les valeurs de l'activité enzymatique de CLEAs, à pH 7 et pH 4,5 de **70UI / g** et **80 UI/ g,** respectivement.

Avec une concentration plus basse (50 %) ou plus élevée (80 %) de sulfate d'ammonium, une diminution significative est observé dans les deux valeurs de pH étudiés, ce qui indique que ces concentrations ne sont pas propices à une formation efficace des CLEAs. Cette diminution de l'activité pourrait être due à un effet insuffisant de précipitation à de faibles concentrations, tandis qu'à concentration élevée, un excès de sel peut provoquer une précipitation non spécifique ou la formation d'agrégats désordonnés, réduisant ainsi l'efficacité de l'agrégation enzymatique.

Ces résultats sont en cohérence avec ceux rapportés par **Talekar et al. (2012)**, **Yuliya V. et al.,** qui ont montré que des concentrations modérées de sulfate d'ammonium (entre 60 et 70 %) permettent une précipitation efficace et douce des enzymes, favorisant la formation de CLEAs hautement actifs. À des concentrations trop faibles, la précipitation est incomplète, et à des concentrations trop élevées, on observe une précipitation non spécifique ou une dénaturation partielle de l'enzyme **[84, 85].**

- **Remarques sur la taille et la morphologie des particules des CLEAs ;**
  (Voir Figure III.7.)

- ✓ À 50 **%** de sulfate d'ammonium : nous observons que les particules sont petites, irrégulières, et la structure est peu cohésive**,** indiquant une réticulation insuffisante**.**
- ✓ À 60 **%** de sulfate d'ammonium : Des particules plus nombreuses et plus uniformes, la précipitation est plus efficace, formant des agrégats plus compacts et homogènes
- ✓ À 80**%** de sulfate d'ammonium **:** Des particules grosses et compactes, cela peut réduire l'accessibilité de l'enzyme à son substrat.

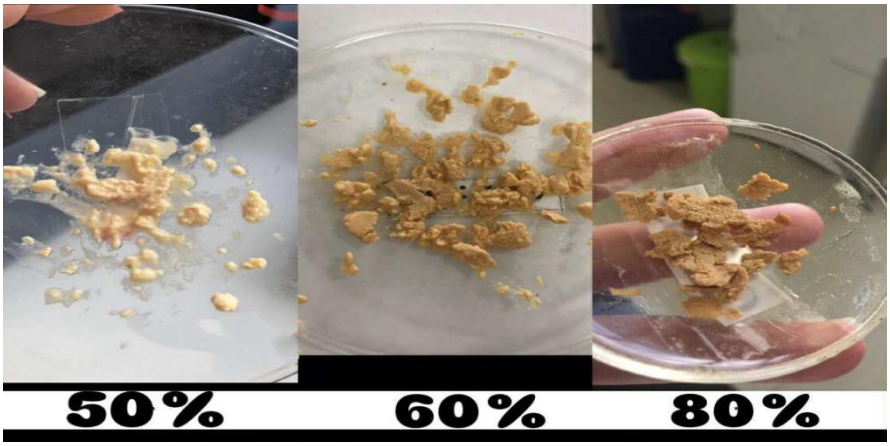


Figure III-7: Morphologie des particules des CLEAs de différentes concentrations en sulfate d'ammonium.

III.7.3.2 Étape de réticulation:

Dans le but d'étudier l'effet de l'agent réticulant et d'obtenir la concentration optimale donnant l'activité optimale des CLEAS, l'étape de réticulation des agrégats a été réalisée avec un réactif bifonctionnel (le glutaraldéhyde) à trois concentration différentes (25mM /g, 50 mM/g et 75mM/g). Cette étape joue un rôle crucial dans la préparation des CLEAs, car elle influence directement la stabilité et les propriétés catalytiques de la lipase immobilisée.

III.7.3.2.1 Optimisation de la Concentration en glutaraldéhyde

La figure III-8 illustre l'influence de la concentration de glutaraldéhyde sur l'activité enzymatique des CLEAs de lipase de ricin, à deux valeurs de pH (pH 7 et pH 4,5).

À partir des résultats obtenus, on constate que l'activité maximale des CLEAs est obtenue à une concentration en glutaraldéhyde de **50 mM/g**, correspondant à une activité maximale égale à **200 UI/ g** à pH 7 et **230 UI/ g** à pH 4,5. En revanche, à une concentration plus faible de 25 mM/g, l'activité enzymatique est nettement faible, **60 UI/g** et **70 UI/g** à pH7 et pH 4.5 respectivement, ce qui indique une réticulation insuffisante. En effet, une faible concentration de glutaraldéhyde entraîne un nombre insuffisant de liaisons covalentes entre les enzymes, favorisant une perte d'activité plus importante, car les enzymes non immobilisées sont susceptibles d'être éliminées lors des étapes de lavage.

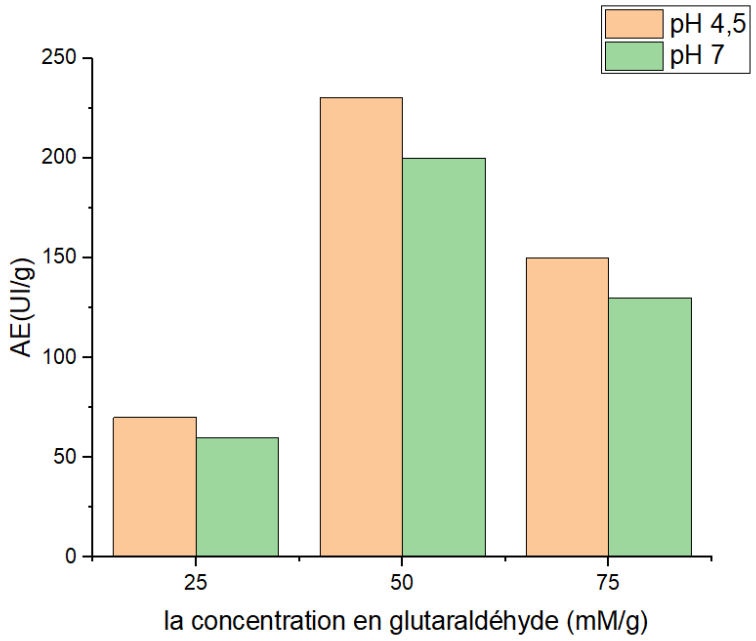


Figure III-8: Effet de différentes concentrations de glutaraldéhyde sur l'activité enzymatique des CLEAs.

À une concentration plus élevée (75 mM/g), une diminution de l'activité lipasique a été signalée. Une concentration plus élevée de glutaraldéhyde conduit à la formation de liaisons multipoints, ce qui entraîne la formation de CLEA avec des pores très petits, limitant ainsi la diffusion d'un substrat de grande taille vers le site actif de l'enzyme **[46].**

Des résultats similaires ont été trouvés par l'étude **de Martina V et *al* [48], Mahmod SS et *al*) [86]** et **HADJARAB**, **Sonia et al [87].**

La taille et la morphologie des particules des CLEAs obtenus pour différentes concentrations de glutaraldéhyde sont montrées dans la **figure III.9** :

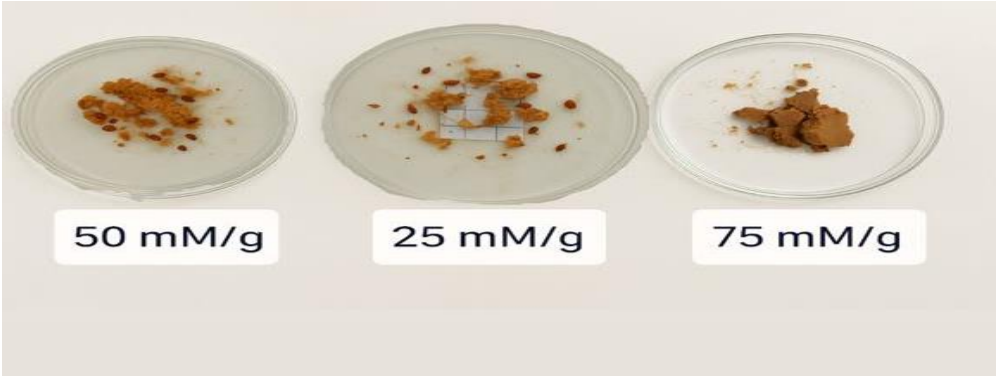


Figure III-9: Morphologie des particules des CLEAs lipase pour différentes concentrations en glutaraldéhyde.

- ✓ À 25 mM/g nous observons que les particules sont petites, dispersées et friables. La réticulation est insuffisante, ce qui donne des particules peu cohésives et friables. Les enzymes ne sont pas assez liées entre elles.
- ✓ À 50 mM/g les particules sont de taille moyenne, plus uniformes, dispersées, donc la réticulation est plus efficace.
- ✓ À 75 mM/g nous constatons de grosses particules, bien agglomérées mais plus compactes.
- ✓

III.7.3.2.2 Optimisation de la durée de réticulation :

La **figure III-10** montre l'effet du temps de réticulation sur l'activité enzymatique des CLEAs.

À partir de **la figure III.10** nous constatons que la durée optimale d'agrégation pour la formation des CLEAs de lipase de ricin est de **2 heures**, avec une activité enzymatique maximale observé 270 UI /g à pH 7 et 240 UI/ g à pH4.5.

Un temps de réticulation plus court (1h) était insuffisant pour réticuler les molécules de lipase, tandis qu'un temps de réticulation plus long (4h) aurait pu entraîner une réticulation excessive et obstruer la fente active de la lipase. Cette réticulation excessive pourrait entraver le degré de flexibilité essentiel.

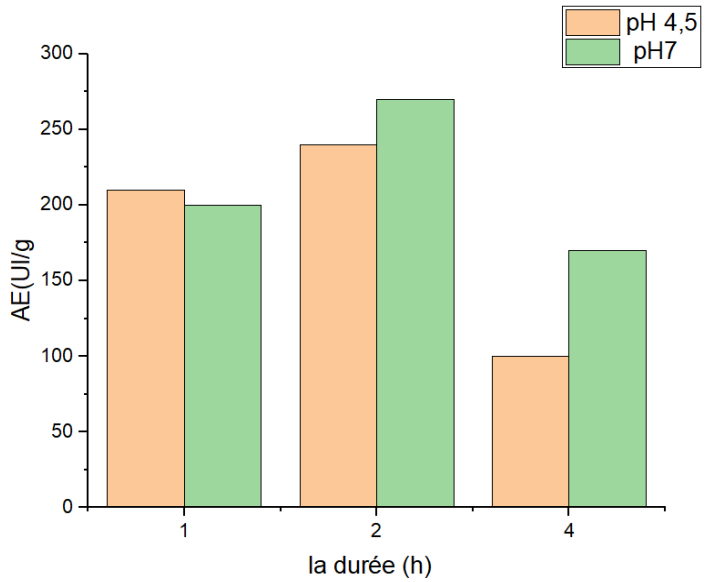


Figure III-10: Effet de duré de réticulation sur l'activité enzymatiques des CLEAs lipase.

Si la taille des particules des CLEAs augmente, les molécules d'enzymes retenues à l'intérieur de la particule de CLEAs auront un accès restreint au substrat comme montré dans la **figure III-11.** Des résultats similaires ont été trouvés par **JIAN DONG CUI[88].**

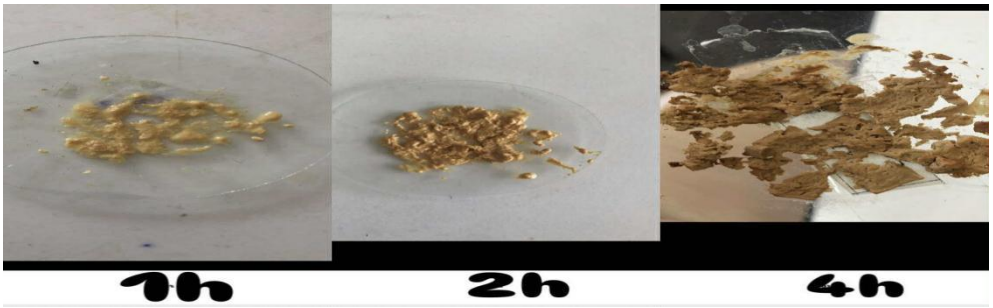


Figure III-11: La morphologie des particules des CLEAs lipase en fonction de temps

- ✓ **1h** : Les particules sont peu agglomérées, de petite taille et dispersées. Leur aspect est friable et peu compact, indiquant une réticulation incomplète.
- ✓ **2h** : Les particules plus cohésives, taille moyenne, et l'aspect est plus compact. La réticulation est suffisante, ce qui permet la formation d'agrégats plus stables et d'apparence plus homogène.
- ✓ **4h** : Les particules sont très agglomérées, peu dispersée avec une structure dure, ce qui indique un excès de réticulation.

III.7.4 Caractérisation de la lipase libre et des CLEAS de la lipase de ricin :

Afin de montrer les caractéristiques fonctionnelles des CLEAs de lipase de ricin et les avantages liés suite à l'immobilisation, une étude de l'influence de différents paramètres physico-chimiques et chimiques a été menée. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec l'EEPP.

III.7.4.1 Effet de pH :

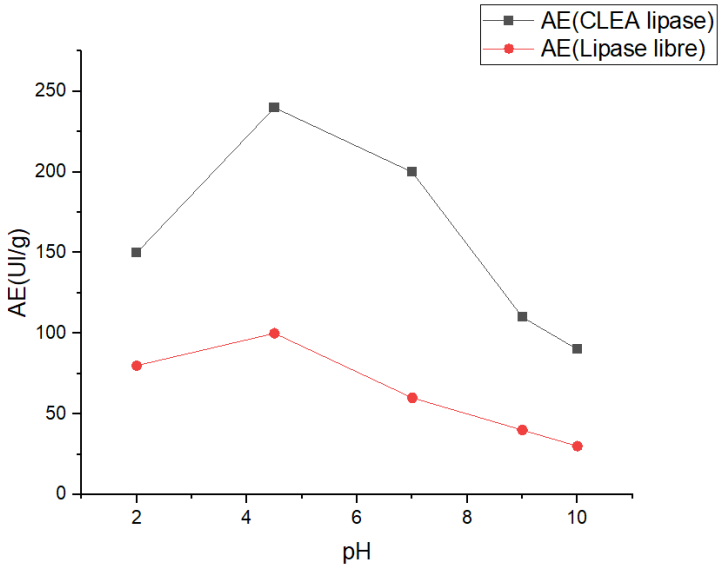


Figure III-12: Effet de pH sur l'activité enzymatique de l'EEPP (libre) et des CLEAs de lipase de ricin (T= 37C° ; $t_{réaction}$=5min, m_{CLEA} et m_{EEPP}=0.1g).

Le graphique représenté sur la **figure III-12**, indique l'évolution de l'activité enzymatique de la lipase libre et de la lipase-CLEA de ricin en fonction du pH du milieu réactionnel.

Nous constatons que l'activité enzymatique augmente pour atteindre un maximum à un pH de **4.5**, considéré comme le pH optimal pour les deux formes de lipase, l'activité enzymatique est de **240 UI /g** pour les CLEAs lipase et de **100 UI/g** pour la lipase libre. L'activité diminue considérablement aux pH élevés ou aux pH très acides (dénaturation). La graine de ricin contient deux types de lipase, une enzyme qui est associée aux membranes des sphérosomes (corps lipidiques) et est active dans les graines dormantes ou en repos. Cette lipase n'est active qu'en milieu acide, d'où son nom de lipase acide. L'autre enzyme, la lipase alcaline, est associée à la membrane des glyoxysomes et du réticulum endoplasmique, est inactive dans la graine dormante mais son activité augmente fortement pendant la germination avec un pH

proche de neutralité **[70, 76].** Les résultats obtenus sont compatibles avec ceux rapportés par **BRAROSS M [72] SU Er-Zheng [77]** et **ROBERT L. ORY [89].**

III.7.4.2 Effet de la température :

Les résultats présentés dans la **figure III-13** indiquent que la température idéale pour la lipase libre est de **40 °C**, avec une activité enzymatique de 180 UI /g. En revanche, pour la lipase immobilisée sous forme de CLEA, la température idéale est de **50 °C**, soit 10 °C de plus que celle de la lipase libre, et son activité enzymatique est de 270 UI /g.

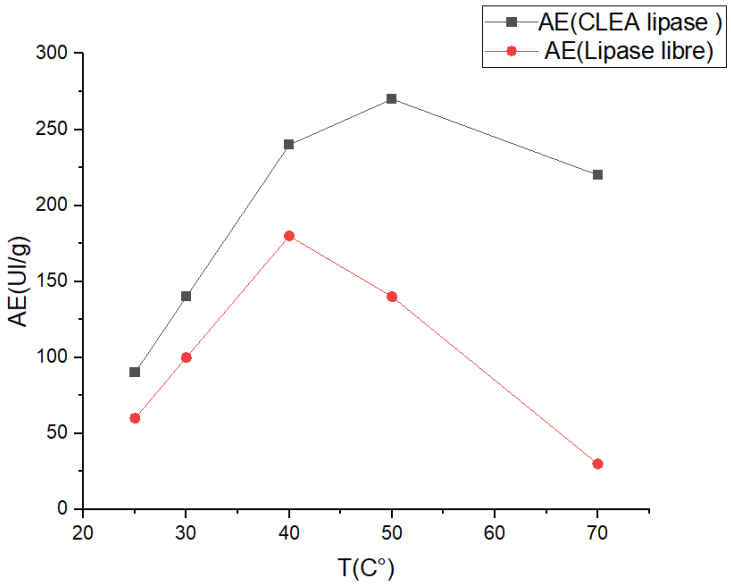


Figure III-13: Effet de la température de réaction d'hydrolyse sur l'activité enzymatique de la lipase libre et CLEAs lipase($t_{réaction}$=5min, mCLEA et m_{EEPP}=0.1g).

Une baisse progressive de l'activité de l'enzyme libre se manifeste à des températures supérieures à 40 °C, tandis que la lipase CLEA supporte l'augmentation de la température, affichant seulement une légère diminution de son activité à 70 °C. Les enzymes immobilisées sont protégées, probablement en raison de leur conformation rigide. Ainsi, elles semblent capables de conserver leur activité catalytique [**90].**

Des résultats similaires ont été obtenus par **Muley et al**. **. Miao et al** et **Cui et al. [49, 91. 92].**

III.7.4.3 Étude de la stabilité de la lipase libre et des CLEAS de lipase de ricin

III.7.4.3.1 Test de stabilité thermique :

La **figure III-14** illustre la variation de l'activité enzymatique de lipase libre et lipase-CLEAs en fonction de la température d'incubation.

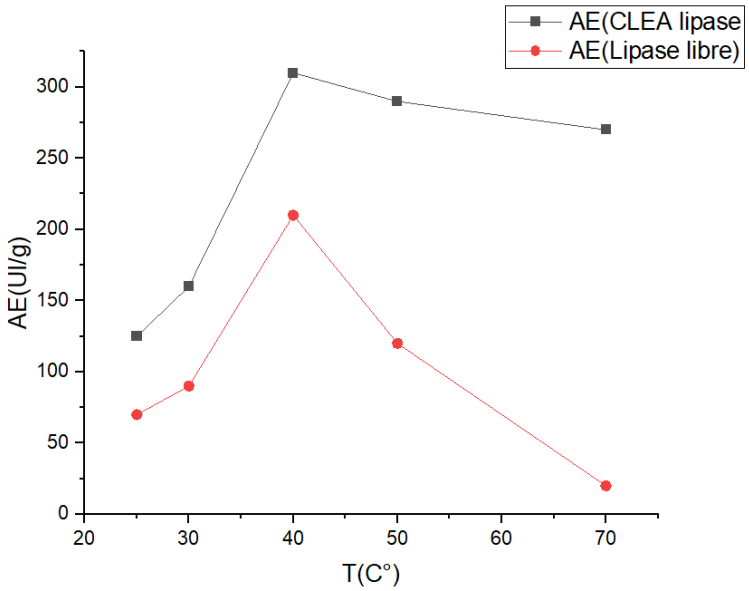


Figure III-14: Stabilte thermique de la lipase libre et CLEAs lipase de ricin ($t_{réaction}$=5min ; m_{CLEA} et m_{EEPP}=0.1g).

D'après les résultats obtenus, l'activité enzymatique augmente progressivement jusqu'à un maximum à **40 °C** pour les deux formes de lipase avec une activité enzymatique est 310UI/g, 210 UI/g pour CLEAs lipase et lipase libre respectivement. L'incubation à des températures supérieures n'affecte pas significativement l'activité des CLEAs. Les CLEAs ne perdent que 10% au maximum de leur activité maximale à la température 70 °C. En revanche, pour la lipase libre nous observons une baisse notable de l'activité enzymatique et une dénaturation presque totale à 70°C.

Il est bien établi que la stabilité thermique de la lipase immobilisée est significativement améliorée. Cette amélioration pourrait être due à la réticulation covalente entre les agrégats enzymatiques Cela signifie que la lipase immobilisée par réticulation peut conserver une activité catalytique élevée sur une plus large plage de température **[48].**

Cette observation est conforme aux résultats de l'étude de **Xu et *al.*** (**2013**) qui ont démontré que les CLEAs se sont avérés plus stables thermiquement que les enzymes libres en raison de la structure rigide créée par l'étape de réticulation **[93].** De plus **Kim et *al.*** (**2013**) ont rapporté que les CLEAs présentent une stabilité thermique quatre fois supérieure à celle de l'enzyme libre **[94].**

III.7.4.3.2 Stabilité chimique

III.7.4.3.2.1 Stabilité en présence des ions métalliques :

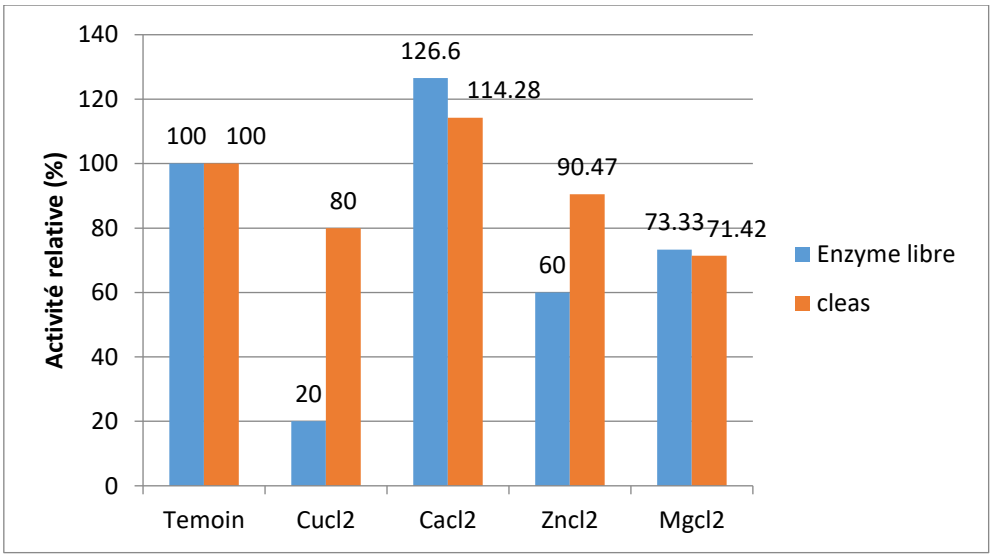


Figure III-15: Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique de CLEAs et la lipase libre de ricin..

D'après les résultats reportés sur la figure **III.15** et par comparaison entre l'activité enzymatique en absence d'ions métalliques (test témoin), nous observons que les effecteurs choisis ont un effet significatif sur l'activité enzymatique de lipase libre et sur les CLEAs de lipase.

Pour les deux formes de lipase, tous les effecteurs (Cu^{2+}, Mg^{2+} et Zn^{2+}) jouent le rôle d'inhibiteurs, sauf le Ca^{2+} qui a un effet activateur : Le Ca^{2+} est bien connu pour stabiliser la structure et du site actif. C'est un activateur net, surtout pour la forme libre **(+26 %),** mais également pour la forme immobilisée **(+14 %).**

Le Magnésium (Mg^{2+}) a un effet légèrement inhibiteur. Le taux d'inhibition **(-30%)** est presque identique pour la forme libre comme pour les CLEAs de la lipase de ricin. Il semble

perturber légèrement l'activité, notamment en interagissant avec des groupes carboxylates du site actif ou en modifiant l'équilibre ionique.

Le Cuivre (Cu^{2+}) est signalé comme inhibiteur fort pour la forme libre (-80%). La forme immobilisée est moins affectée **(-20%).** Le Cu^{2+} peut se lier au site actif ou perturber la conformation de l'enzyme. L'immobilisation protège partiellement l'enzyme de ce type d'inhibition. Le Zinc (Zn^{2+}) a également un effet inhibiteur modéré. Une diminution de **-40%** avec la lipase libre a été signalée, alors que pour les CLEAs, l'inhibition ne dépasse pas **10%.** Ces résultats sont cohérents avec ceux rapporté par **Yue Li et al [73], Rosa-Maria Oliart-Ros et al** [**95**], **Malo A et al** [**78].**

III.7.4.3.2.2 Stabilité en présences des tensioactifs :

La figure **III.16** représente l'effet des tensioactifs sur l'activité enzymatique de lipase libre et lipase immobilisée sous forme de CLEA.

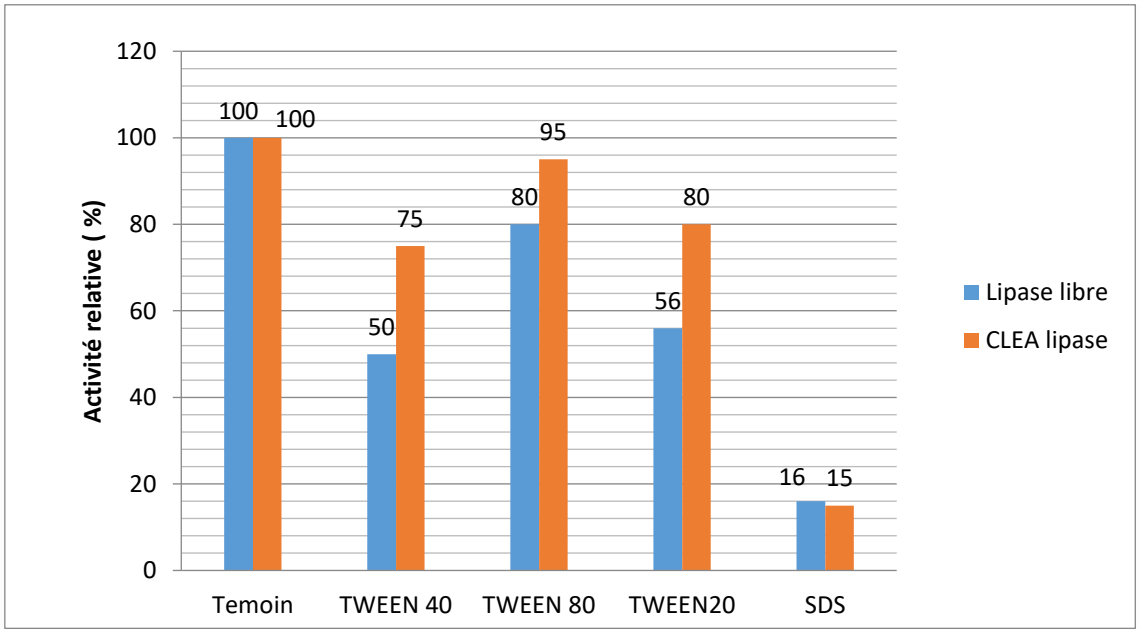


Figure III-16: Effet des tensioactifs sur l'activité enzymatique de CLEA lipase et lipase libre de ricin (AE0 à pH=4.5 =100U/g pour lipase libre et 200U/g pour CLEA lipase).

Pour les quatre tensioactifs testés, une diminution de l'activité lipasique a été signalée en comparaison avec le test témoin (sans tensioactif). Cette inhibition est due à l'effet dénaturant ou perturbant de la structure de l'enzyme, causé par les interactions avec les molécules de tensioactif, ou encore à la diminution de la disponibilité du substrat (huile d'olive), conséquence de la disposition des molécules de tensioactif à l'interface huile-eau

Dans le cas des tweens, qui sont des tensioactifs non ioniques, l'effet observé est plutôt doux. Leur composition est plus compatible avec celle de l'huile d'olive. Une diminution de **20 %** seulement a été notée avec le tween 80 pour l'enzyme libre, tandis qu'une inhibition maximale de **50 %** a été enregistrée avec le tween 40. Des résultats similaires ont été obtenus avec les lipases immobilisées sous forme de CLEAs, mais avec des taux de diminution moins importants, ce qui pourrait s'expliquer par l'effet protecteur de l'agrégation et la solidité de la structure des CLEAs. En effet, la diminution de l'activité n'a pas dépassé **25 %** dans le cas des tweens 20 et 40, et seulement **5 %** avec le tween 80.

En revanche, avec le SDS, un tensioactif anionique fort, l'effet dénaturant est beaucoup plus marqué. Il perturbe fortement la structure de l'enzyme, entraînant une inhibition significative avec une diminution de l'activité de plus de **85 %,** pour l'enzyme libre et pour les CLEAs. Plusieurs travaux scientifiques ont porté sur l'effet des tensioactifs sur l'activité enzymatique de la lipase :

- **WANG, Khaïkan et al** qui ont montré que SDS, Tween-20, Tween-80 (1 % et 10 %) : Provoquent une inhibition significative de la lipase d'Acinetobacter calcoaceticus 1-7 **[96].**
- **Gosawmi, D** a indiqué que de faibles concentrations de tensioactifs non ioniques (0,0075 M ou moins) augmentent la catalyse lipasique ; une augmentation de la concentration en tensioactifs (0,01 M ou plus) entraîne souvent une diminution des performances catalytiques **[97].**

III.7.4.3.2.3 Effet de la nature du substrat sur l'activité :

La spécificité de substrat de la lipase des graines de ricin, sous ses deux formes, a été étudiée sur divers substrats. Les huiles naturelles utilisées comme substrats sont : l'huile d'olive, l'huile de soja, l'huile de coco et l'huile de ricin.

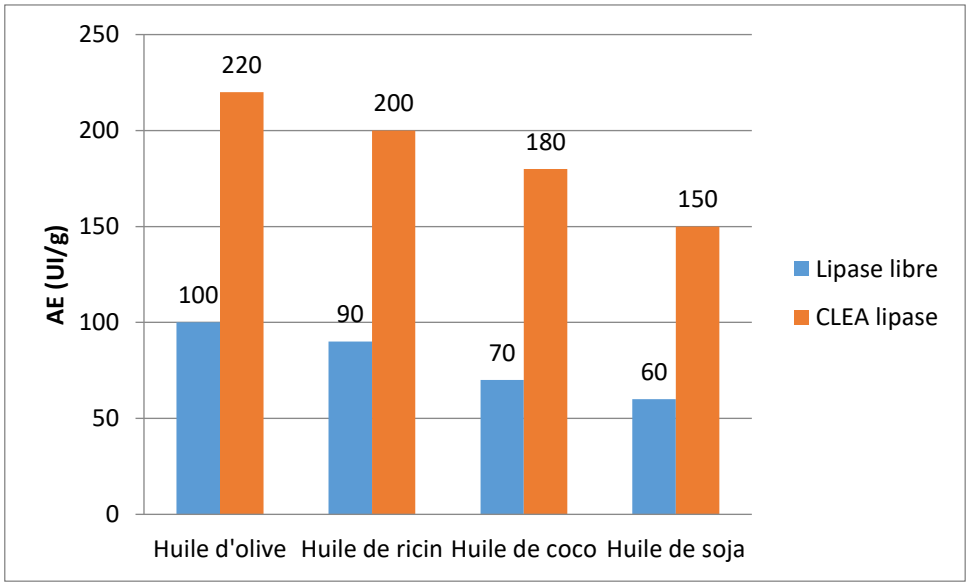


Figure III-17:Effet de différents substrats sur l'activité enzymatique des CLEAs lipase et lipase libre de ricin.

D'après les résultats présentés dans la figure **III.17**, on constate :

1. **Huile d'olive :** Il parait que la lipase de ricin a plus d'affinité envers l'huile d'olive, triglycéride riche en acide oléique (C18 :1) qui est un acide gras mono-insaturé que la lipase de ricin hydrolyse très efficacement. Sa structure simple, peu encombrée, permet un accès facile au site actif. Les valeurs élevées des activités pour la lipase libre et les CLEAs indiquent une forte affinité enzyme-substrat.
2. **Huile de ricin :** L'huile de ricin contient spécifiquement de l'acide ricinoléique (C18 :1 avec un groupe -OH). C'est le substrat naturel de l'enzyme. C'est une structure spéciale.
3. **Huile de coco :** La lipase de ricin a une affinité moyenne envers l'huile de coco, vu qu'elle soit composée d'acides gras à chaîne moyenne et saturés, principalement de l'acide laurique, C12 :0. De nombreuses lipases végétales préfèrent souvent les longues chaînes.
4. **Huile de soja :** On constate une faible affinité pour cette huile riche en acide gras polyinsaturé, qui est l'acide linoléique (C18 :2). Ce type d'huiles contenant plusieurs doubles liaisons sont plus difficiles à hydrolyser, à cause des effets stériques.

L'activité hydrolytique augmente significativement, de 1.5 à 2 fois après immobilisation et pour toutes les huiles. La lipase immobilisée est plus stable et plus active.

Grâce à l'agrégation, les sites actifs sont plus nombreux et plus accessibles pour l'hydrolyse à l'interface huile/eau.
L'ordre d'affinité est le même pour la lipase sous forme libre ou immobilisée. L'immobilisation améliore l'efficacité catalytique tout en gardant la spécificité de substrat.

En conclusion le classement des huiles selon l'affinité de la lipase de ricin est :

Huile d'olive > Huile de ricin > Hile de coco > Huile de soja.

D'autres études sur l'effet de différents substrats sur les grains de ricin ont donné des résultats similaires **[98, 78].**

III.7.4.3.2.4 Effet de solvants organiques polaires :

La figure III.18 représente l'effet de différents solvants organiques polaires (acétone, éthanol, méthanol, propane-2-ol, DMSO) sur l'activité de la lipase libre et de la lipase immobilisée sous forme de CLEAs.

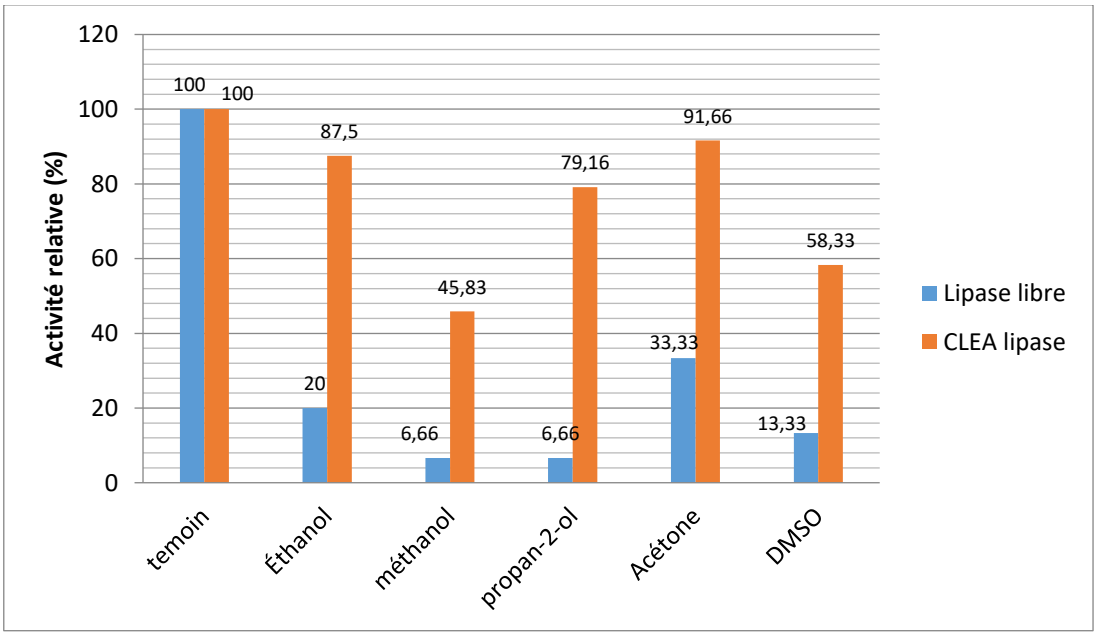


Figure III-18: Effet de solvants organiques polaires sur l'activité enzymatique de lipase libre et CLEAs lipase de ricin avec (AE0= **150 UI/g** pour lipase libre et **240 UI /g** pour CLEA lipase).

Les résultats obtenus montrent que la présence de solvants organiques polaires à 50 % (v/v) entraîne une diminution de l'activité hydrolytique de la lipase libre de ricin par rapport au témoin sans solvant (150 UI/g). Cette inhibition peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment la perturbation de la structure tertiaire de l'enzyme, la déshydratation de son site actif ou encore la diminution de la disponibilité du substrat en raison de changements dans la polarité du milieu réactionnel.

Avec l'enzyme libre, l'acétone a induit la plus faible inhibition relative **(-65%),** ce qui suggère une certaine tolérance de l'enzyme à ce solvant. L'acétone est suivie de l'éthanol **(-80%),** du DMSO (**-85%)** et plus fortement du méthanol et l'isopropanol **(-95%),** probablement en raison de leur capacité à perturber l'hydratation de l'enzyme ou à interagir directement avec ses résidus catalytiques. Ces résultats suggèrent que la lipase de ricin sous forme libre conserve une certaine activité en milieu organique, mais que sa stabilité est fortement dépendante de la nature du solvant. Cela souligne l'intérêt d'adopter certaines stratégies telles que l'immobilisation enzymatique pour améliorer la tolérance aux solvants dans des applications biocatalytiques en milieu non aqueux. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **SU Er-Zheng [79], et Chen Mei et al [99].**

Les expériences menées avec la lipase de ricin immobilisée montrent une amélioration significative de l'activité enzymatique en présence de solvants organiques polaires à 50 % (v/v), comparée à la forme libre de l'enzyme.

Le taux d'inhibition varie entre **10** et **15%** pour l'acétone, l'éthanol et l'isopropanol. Ce qui présente une meilleure stabilité et une tolérance accrue vis-à-vis de ces deux solvants organiques. L'amélioration observée pourrait être due à une meilleure rigidité de la structure enzymatique par l'immobilisation, limitant les effets dénaturants des solvants et maintenant l'intégrité du site actif. Par contre, en présence du méthanol ou du DMSO, l'activité des CLEAs diminue entre **50** et **60%,** ce qui représente, néanmoins, une meilleure stabilité en comparaison avec l'enzyme libre. Ces résultats sont similaires avec ceux rapportés par l'étude de **Rosa-Maria Oliart-Ros et al [95].**

En conclusion générale, l'immobilisation de la lipase de ricin sous forme de CLEAs, permet d'obtenir une enzyme plus active et plus stable thermiquement et chimiquement.

III.7.4.3.3 Etude de la cinétique d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase libre et CLEAs de lipase :

Les figures III-19 et III-20 représentent la variation de la vitesse de réaction d'hydrolyse de lipase libre et lipase-CLEAs en fonction de différentes concentrations de l'huile d'olive (substrat).

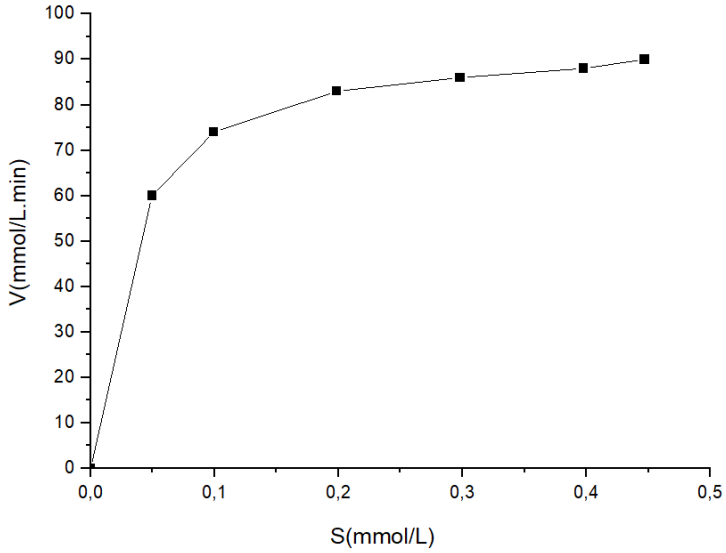


Figure III-19: Représentation graphique de Michaelis-Menten de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase libre de ricin (pH=4.5 ; T=37 °C).

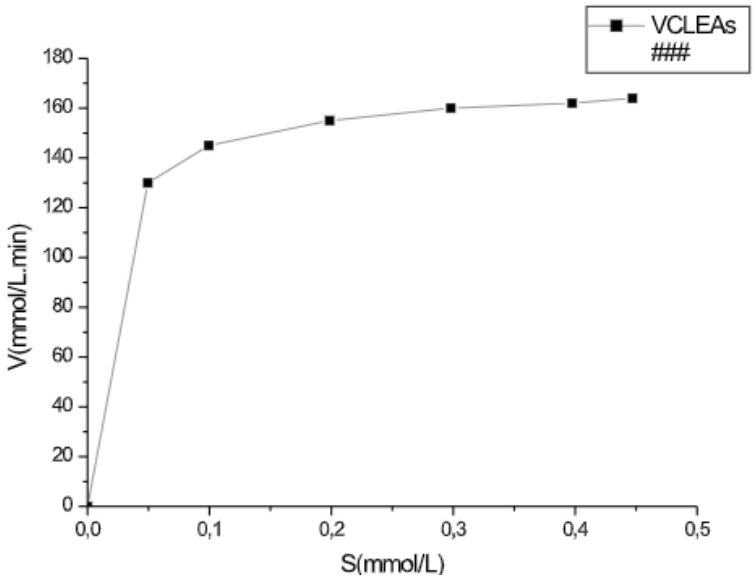


Figure III-20: Représentation graphique de Michaelis-Menten de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive par la CLEA lipase de ricin (pH=4.5 ; T=37 °C).

On constate une augmentation rapide de la vitesse enzymatique pour une faible concentration de l'huile d'olive pour les deux formes de lipase. La vitesse d'hydrolyse augmente avec la concentration en substrat, la courbe tend vers un plateau asymptotiquement vers une valeur maximale Vmax. Ce qui représente une allure typique à une cinétique de Michaelis-Menten.

Par la méthode de linéarisation de Lineweaver-Burke, il a été possible de déterminer les valeurs des constantes Vmax et Km (figure III. 21), (figure III. 22).

Km (constante de Michaelis –Menten) représente la concentration de substrat à laquelle la vitesse de la réaction enzymatique atteint la moitié de sa vitesse maximale (Vmax). Cette constante est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat : plus Km est faible, plus l'affinité est élevée. Tandis que Vmax correspond à la vitesse maximale de la réaction enzymatique lorsque toutes les molécules d'enzyme sont saturées par le substrat, c'est-à-dire lorsque le complexe enzyme-substrat est à son maximum, Vmax reflète la capacité catalytique maximale de l'enzyme.

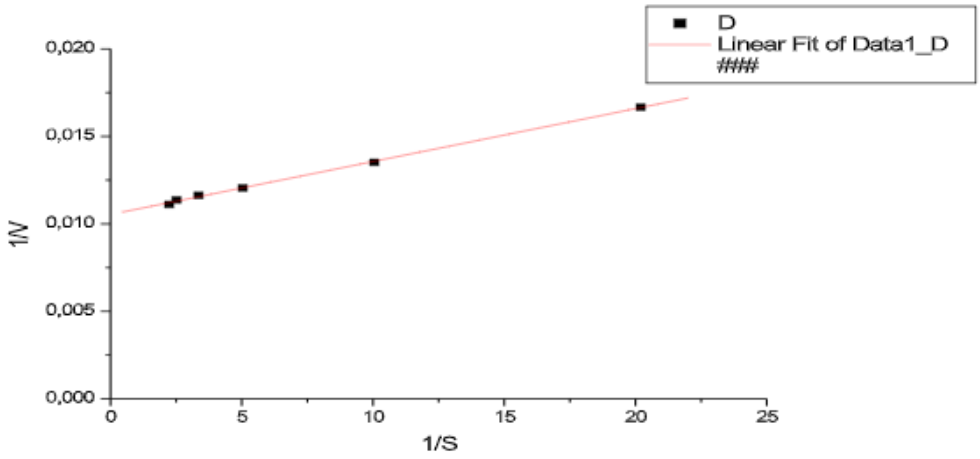


Figure III-21: Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité enzymatique de la lipase libre de ricin.

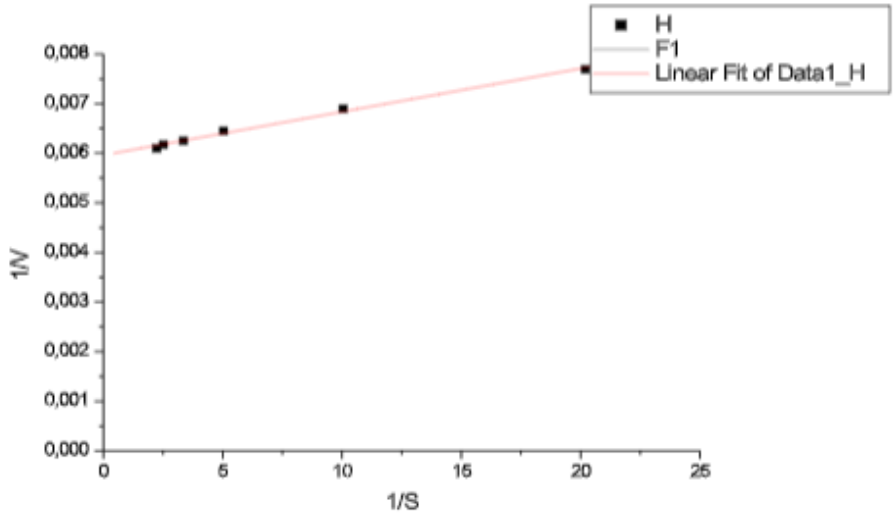


Figure III-22: Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité enzymatique des CLEAs lipase de ricin.

Les graphes (fig. III.21, fig. III.22) représentent la fonction linéaire de 1/V en fonction de 1/[S] est nommée un graphe en double inverse (représentation de Lineweaver et Burk) qui est la transformation double réciproque de l'équation de Michaelis–Menten. Les valeurs de Km et

Vmax ont été déduites de la pente et de l'ordonnée à l'origine du graphique de Lineweaver–Burk et sont listées dans le Tableau **III.1**

Tableau III.3: Les constantes de Michaelis-Menten

	Lipase libre	**Lipase-CLEAs**
Vmax	**94,97 U /G**	**167,78 U /G**
Km	**0,0287 mol/L**	**0,0146 mol/L**

D'après les résultats montrés dans le tableau **III-3** la valeur de Km après l'immobilisation de l'enzyme a diminué (de 0,0287 mol/L à 0,0146 mol/L respectivement). Tandis qu'une augmentation de la valeur de Vmax (de 94.97 UI/g à 167.78 UI/g).

La diminution de Km indique une meilleure affinité de lipase réticulée pour son substrat (huile d'olive). Ceci implique que l'interaction entre l'enzyme et le substrat pourrait avoir été renforcée par une orientation adéquate du site actif de l'enzyme vers le substrat **[48].**

L**'**augmentation de Vmax indique une amélioration de la capacité catalytique maximale**,** probablement due à une stabilisation de l'enzyme en présence du réticulant, limitant la dénaturation et favorisant une plus grande disponibilité des sites actifs pour la catalyse.

Des résultats sont similaires à ceux trouvés par l'étude de **Martina V et al** [**48].**

III.7.4.4 Test de Réutilisabilité :

La figure III 23 montre l'activité résiduelle des CLEAs lipase après cinq cycles de Réutilisation.

Nous constatons que La CLEA lipase de ricin a montré une meilleure réutilisabilité**,** puisqu'elle a conservé environ **70 %** de son activité même après 4 cycles d'utilisation. L'un des principaux objectifs de l'immobilisation des enzymes est sa réutilisabilité, offrant ainsi de multiples possibilités d'utilisation pour un même biocatalyseur.

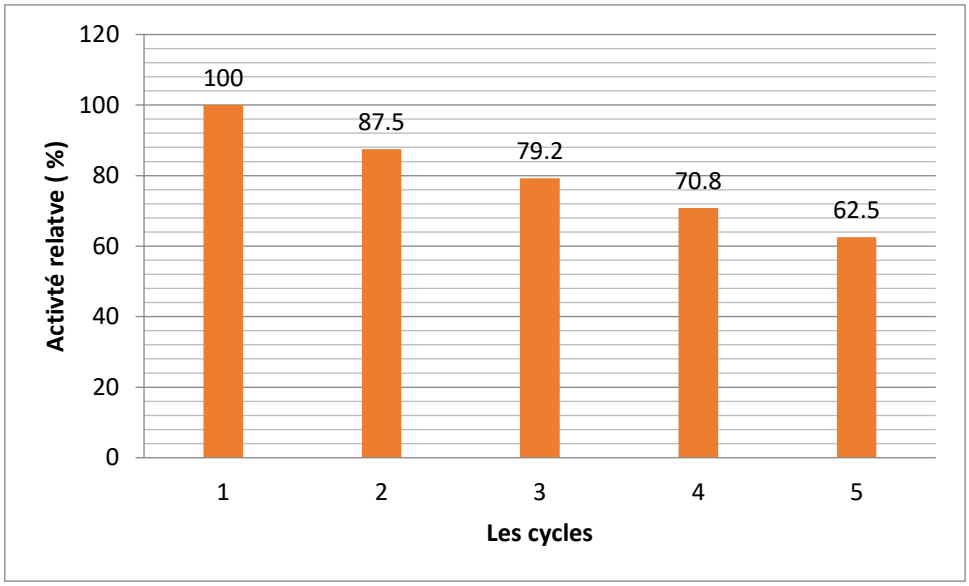


Figure III-23: Réutilisabilité des CLEAs lipase (Ricinus communis).

(AE0 =240UI/g est l'activité relative de premier cycle).

Les CLEAs présentent un résultat très prometteur dans ce domaine, car ils peuvent être facilement détachés du mélange réactionnel, lavés et réutilisés. De plus, les CLEAs sont insolubles dans le milieu réactionnel, évitant ainsi la contamination du produit, ce qui facilite la séparation et le processus en aval **[100].**

Des résultats similaires ont été trouvés dans plusieurs travaux de recherches :

- **Soofia Khanahmadi** et al ont montré que les CLEAs de lipase ont conservé plus de 60 % de l'activité initiale après six cycles de réutilisation **[101].**
- **Abhijeet Bhimrao Muley** les lipase-CLEAs de Coquille de fève de cacao ont conservé plus **de 65 %** d'activité jusqu'à quatre cycles **[49].**

III.7.4.5 Stabilité au stockage :

La figure **III** 24 montre l'activité des CLEAs lipase après 10 jours de stockage.

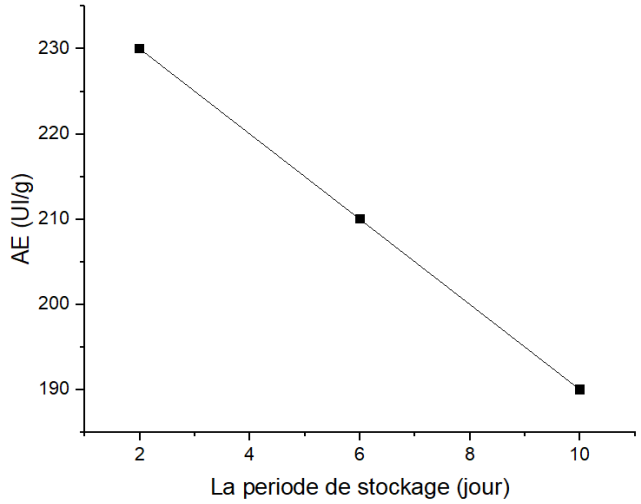


Figure III-24: La stabilité de stockage de CLEAs lipase de ricin.

La stabilité de stockage des CLEAs de lipase a été évaluée après une incubation avec le tampon optimale pH4.5 à 4 °C pendant 10 jours. L'activité enzymatique initiale des CLEAs était de **240 UI/g** et après la de stockage de 10 jours est de **190 UI/g**. (Figure **III** 24) Cela correspond à une rétention d'activité supérieure à **79 %** de l'activité initiale, démontrant une excellente stabilité de la lipase immobilisée sous forme de CLEA. Cette grande stabilité peut être attribuée à plusieurs facteurs liés à la structure et au mode d'immobilisation des CLEAs. Tout d'abord, la réticulation par le glutaraldéhyde confère une rigidité importante à la structure tridimensionnelle de l'enzyme, empêchant ainsi la déformation de la fente active essentielle à la catalyse sous l'effet de changement de température. Cette stabilisation structurelle permet à la lipase de conserver sa configuration fonctionnelle même après plusieurs jours de stockage. De plus, la formation de CLEAs protège l'enzyme contre l'autolyse, un phénomène courant qui conduit à la dégradation enzymatique spontanée. La réticulation crée un réseau covalent qui limite la dégradation protéolytique, assurant ainsi une conservation prolongée de l'activité enzymatique.

En conclusion, lipase immobilisée sous forme de CLEAs présente une stabilité de stockage remarquable, ce qui est un atout majeur pour son application dans des procédés industriels nécessitant une conservation prolongée sans perte significative d'activité. Cette stabilité

favorise la viabilité économique et opérationnelle de l'utilisation des CLEAs dans divers domaines biotechnologiques.

Ces résultats sont en cohérence avec qu'ils rapportés par **Muley AB et *al* [49], Badoei-Dal fard et *al* [102] et Cui et *al [*103**

Conclusion Générale et perspectives

L'étude menée sur la lipase végétale extraite des graines de ricin a permis d'évaluer l'efficacité de son immobilisation par la méthode CLEAs ainsi que ses performances catalytiques dans diverses conditions. Les résultats obtenus permettent de tirer plusieurs Conclusions importantes :

- ✓ L'extraction mécanique suivie d'une précipitation à l'acétone a permis d'obtenir un extrait enzymatique actif.
- ✓ L'optimisation de l'immobilisation a montré que les conditions optimales pour la formation de CLEAs étaient (60 % de sulfate d'ammonium, 50 mM/g de glutaraldéhyde, et 2 heures de réticulation).
- ✓ Le pH optimal de l'activité enzymatique est acide (pH 4,5) pour les deux formes libre et immobilisée.
- ✓ La température optimale pour la lipase CLEA était de 50 °C soit 10 C° de plus que celle de la lipase libre.
- ✓ L'enzyme immobilisée (CLEAs) a présenté une meilleure stabilité thermique que la forme libre, avec une activité maximale à 40 °C et une conservation d'activité jusqu'à 70 °C.
- ✓ Quelques effecteurs chimiques pour la lipase libre et lipase CLEAs tels que Cu^{2+}, Mg^{2+} et Zn^{2+}) qui peuvent provoquer une inhibition de l'activité. Avec un léger taux d'inhibition avec Mg^{2+} (-30%) pour les deux formes de lipase, une inhibition modérée avec Zn^{2+} pour le lipase libre 40% alors qu'elle ne dépasse pas 10 % pour la lipase immobilisée.
- ✓ Le Cuivre (Cu^{2+}) est signalé comme inhibiteur fort pour la forme libre (-80%). La forme immobilisée est moins affectée (-20%).
- ✓ Le calcium (Ca^{2+}) s'est révélé être un activateur respectivement pour lipase libre et lipase immobilisées.
- ✓ La lipase libre est fortement inhibée par les solvants organiques polaires à 50 % (v/v), avec une inhibition allant jusqu'à 95 %, notamment avec le méthanol et l'isopropanol. L'immobilisation réduit significativement cette inhibition, notamment pour l'acétone, l'éthanol et l'isopropanol (10-15 %) et modérément pour le méthanol et le DMSO (50-60 %).

- ✓ Les tensioactifs non ioniques (tweens) provoquent une inhibition modérée, atténuée par l'immobilisation, tandis que le SDS, tensioactif anionique, induit une forte inhibition (>85 %) pour les deux formes enzymatiques.
- ✓ L'activité d'hydrolyse est le plus élevsé dans le cas d'huile d'olive et huile de ricin pour les deux formes (libre et réticulée 'CLEAs).
- ✓ Pour l'étude cinétique de la réaction d'hydrolyse d'huile d'olive, l'immobilisation de la lipase de ricin réduit la constante Km de0.028mol /L à 0,0146 mol/L et augmenter la valeur de Vmax (de 94.97 UI/g à 167.78 UI/g).
- ✓ Les CLEAs de lipase ont conservé plus de 70 % d'activité jusqu'à quatre cycles et ont montré une bonne stabilité de conservation pendant 10 jours lorsqu'ils étaient stockés à 4 °C.

Il est recommandé de compléter les résultats obtenus en suggérant d'autres perspectives d'amélioration telles que :

- Évaluer la performance des CLEAs dans des conditions industrielles réelles, notamment en milieu organique ou en présence de mélanges complexes de substrats.
- Investigation approfondie des mécanismes d'inhibition par les ions métalliques et tensioactifs, afin de développer des stratégies pour minimiser ces effets délétères.
- Étendre l'étude à d'autres substrats et réactions enzymatiques pour élargir les applications potentielles de la lipase immobilisée.
- Production à grande échelle : adoption de méthodes efficaces et économiques pour la fabrication industrielle des CLEAs de lipase de ricin.
- Tester des supports hybrides ou magnétiques pour faciliter la récupération et la réutilisation des CLEAs, tout en améliorant leur résistance mécanique.
- Sécurité et biocompatibilité : évaluation de la toxicité et de la compatibilité biologique de CLEAs lipase pour garantir une utilisation sûre.

.

Bibliographie

[1] CASAS-GODOY, LETICIA, GASTEAZORO, FRANCISCO, DUQUESNE, SOPHIE, *et AL*. Lipases: an overview. *Lipases and phospholipases: methods and protocols*, 2012, p. 3-30.

[2] HOUDE,ALAIN , KADEMI, ALI, et LEBLANC, DANIELLE. Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2004, vol. 118, p. 155-170.

[3] ZALLOT, REMI. Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant I 'hydrolyse des réserves chez Arabidopsis thalian Thèse de doctorat. Bordeaux 2 : s.n., 2011.

[4] FICKERS, PATRICK, DESTAIN, JACQUELINE , et THONART, PHILIPPE . Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 2008, vol. 12, no 2.

[5] HAKI, G. D. et RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes : à review. *Bioresource technology*, 2003, vol. 89, no 1, p. 17-34.

[6] SALLEH, ABU BAKAR, RAHMAN, NOOR ZALIHA RAJA ABDUL , ET RAJA, MAHIRAN BASRI . New lipases and proteases. *Nova publishers* 2006.

[7] SARMAH, NIPON, REVATHI, D., SHEELU, G., *et AL* . Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology progress*, 2018, vol. 34, no 1, p. 5-28.

[8] HELLAL, Dr.ABDELKADER**.** Utilisations des Hydrolases en Synthèse Organique,université setif . 2021.

[9] ALBAYATI, SAMAH HASHIM , MASOMIAN, MALIHE , ISHAK, SITI or HASMAH, *et AL*. Main structural targets for engineering lipase substrate specificity. *Catalysts*, 2020, vol. 10, no 7, p. 747.

[10] LARBI DAOUADJI KELTHOUM, et Al. Isolement et identification des souches productrices de lipase. Thèse de doctorat 2015.

[11] LULOIC CHAPUT. Compréhension de l'énantiosélectivité de la lipase B de Candida antarctica : étude par modélisation moléculaire et expérimentation. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2012. Français. ⟨NNT : 2012LAROS371⟩ . ⟨tél-00825876⟩

[12] BOURNE, Y.,CAMBILLAU , C. HORSE PANCREATIC LIPASE. THE CRYSTAL STRUCTURE AT 2.3 ANGSTROMS RESOLUTION [en ligne].RCSB protein data bank, 1994 .disponible sur: https://doi.org/10.2210/pdb1HPL/pdb

[13] ANOBOM, CRISTIANE D., PINHEIRO, ANDERSON S., DE-ANDRADE, RAFAEL A., *et AL*. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*, 2014, vol. 2014, no 1, p. 684506.

[14] MEHTA, AKSHITA , GULERIA, SUMAN, SHARMA, ROJI, *et AL*. The lipases and their applications with emphasis on food industry. In : *Microbial biotechnology in food and health*. Academic Press, 2021. p. 143-164.

[15] AHLEM DAB CRIBLAGE , identification et caractérisation biochimique, moléculaire et structurale de lipases, phospholipases et protéases d'origine microbienne et d'intérêt industriel, l'université Claude Bernard Lyon 1 en cotutelle avec l'université de safax , Thèse de doctorat 2015 .

[16] CHANDRA, PREM, ENESPA, SINGH,RANAJAN , *et AL*. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial cell factories*, 2020, vol. 19, p. 1-42.

[17] JOSHI, RITIKA et KUILA, ARINDAM. Lipase and their different industrial applications: A review. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 2018, vol. 5, no 10, p. 237-247.

[18] COMBES, M. DIDIER et DUBREUCQ, M. ERIC. Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique. 2008.

[19] CASAS-GODOY,LETICIA , GASTEAZORO, FARNCISCO, DUQUESNE, SOPHIE, *et AL*. Lipases: an overview. *Lipases and phospholipases: methods and protocols*, 2012, p. 3-30.

[20] HASAN, FARIHA, SHAH,AAMER ALI Ali, JAVED, SUNDUS, *etAL* . Enzymes used in detergents : lipases. *African journal of biotechnology*, 2010, vol. 9, no 31, p. 4836-4844.

[21] JOSHI, RITIKA et KUILA, ARINDAM. Lipase and their different industrial applications: A review. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 2018, vol. 5, no 10, p. 237-247.

[22] CHAUHAN, MAMTA, CHAUHAN, RAJINDER SINGH , et GARLAPATI, VIJAY KUMAR. Evaluation of a new lipase from Staphylococcus sp. for detergent additive capability. *BioMed research international*, 2013, vol. 2013, no 1, p. 374967

[23] MEHTA, AKSHITA , GULERIA, SUMAN , SHARMA,ROJI , *et AL* . The lipases and their applications with emphasis on food industry. In : *Microbial biotechnology in food and health*. Academic Press, 2021. p. 143-164.

[24] MELANI, NATALIA B., TAMBOURGI, ELIIAS B., et SILVEIRA, EDGAR. Lipases: from production to applications. *Separation & Purification Reviews*, 2020, vol. 49, no 2, p. 143-158.

[25] ALI, SAJIDA, KHAN, SUMERA AFZAL, HAMAYUN, MUHAMMAD, *et aL*. The recent advances in the utility of microbial lipases: A review. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, no 2, p. 510.

[26] GUERRAND, DAVID. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 2017, vol. 24, no 4, p. D403.

[27] Katchalski, E., & Wilchek, M. Enzyme Immobilization. In K. Mosbach (Ed.), *Methods in Enzymology* 1976. Vol. 44, pp. 329–356.

[28] SHELDON, ROGER A. et VAN PELT, SANDER . Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical society reviews*, 2013, vol. 42, no 15, p. 6223-6235

[29] SHELDON, ROGER A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007, vol. 349, no 8-9, p. 1289-1307.

[30] MATEO C., ABIAN O. & FEMANDEZ -LAFUENTE R. (2007). Preparation of enzyme— Biopolymer conjugates for biocatalysis. Current Opinion in Biotechnology, 18(3), 213-219, 2007.

[31] Enzymes immobilisées et applications Biotechnologie université Mila 2023

[32] DATTA, SUMITRA, CHRISTENA, L. RENA, et RAJARAM, YAMUNA RANI SRIRAMULU. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 2013, vol. 3, no 1, p. 1-9.

[33] MAGHRABY, YASMIN R et AL. “Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications.” *ACS omega,* 2023 vols. 8,6 5184-5196.

[34] BRENA, BEATRIZ M. et BATISTA-VIERA, FRANCISCO . Immobilization of enzymes : a literature survey. *Immobilization of enzymes and cells*, 2006, p. 15-30.

[35] HARRIECHE O, Méthodes d’immobilisation des enzymes, Enzymologie appliquée , université mila 2024

[36] Enzymes immobilisées et applications Biotechnologie MIBC université mila 2023

[37] GUAUQUE TORRES, MARIA DEL PILAR , FORESTI, MARIA LAURA , et FERREIRA, MARIA LUJAN. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity. *AMB express*, 2013, vol. 3, p. 1-11.

[38] JIAOJIAO, XIA, YAN, , BIN, ZOU, *et AL* . Improved catalytic performance of carrier-free immobilized lipase by advanced cross-linked enzyme aggregates technology. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, p. 1-12.

[39] KARTAL, FUNDA et KILINC,ALI . Crosslinked aggregates of Rhizopus oryzae lipase as industrial biocatalysts: Preparation, optimization, characterization, and application for enantioselective resolution reactions. *Biotechnology progress*, 2012, vol. 28, no 4, p. 937-945.

[40] CHEN, NING , CHANG, BAOGEN, SHI, Nian, *et AL*. Cross-linked enzyme aggregates immobilization: Preparation, characterization, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, vol. 43, no 3, p. 369-383.

[41] BILAL, MUHAMMED, NOREEN,SADIA , ASGHER, MUHAMMED, *et AL*. Development and characterization of cross-linked laccase aggregates (Lac-CLEAs) from Trametes versicolor IBL-04 as ecofriendly biocatalyst for degradation of dye-based environmental pollutants. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, vol. 21, p. 101364.

[42] SAMPAIO, CAMILA S., ANGELOTTI,JOELS AF, FERNANDEZ-LAFUENTE, ROBERTO, *et AL*. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects–A review. *International journal of biological macromolecules*, 2022, vol. 215, p. 434-449.

[43] SHELDON,ROGER A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, vol. 92, no 3, p. 467-477.

[44] GUPTA, MUNISHWAR N. et RAGHAVA, SMITA. Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. In : *Enzyme stabilization and immobilization: Methods and protocols*. Totowa, NJ : Humana Press, 2010. p. 133-145.

[45] MAJUMDER, ABIR B., MONDAL, KALYANI, SINGH, TEJ P., *et AL*. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2008, vol. 26, no 3, p. 235-242.

[46] TALEKAR, SACHIN, JOSHI, ASAVARI, JOSHI, GANDHALI, *et AL*. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *Rsc Advances*, 2013, vol. 3, no 31, p. 12485-12511.

[47] REHMAN, SAIMA, BHATTI, HAQ NAWAS, BILAL, MUHAMMED, *et AL*. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of Pencilluim notatum lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics. *International journal of biological macromolecules*, 2016, vol. 91, p. 1161-1169.

[48] VRŠANSKÁ, MARTINA, VOBĚRKOVÁ, STANISLAVA, JIMENEZ JIMENEZ, ANA MARIA, *et AL*. Preparation and optimisation of cross-linked enzyme aggregates using native isolate white rot fungi Trametes versicolor and Fomes fomentarius for the decolourisation of synthetic dyes. *International journal of environmental research and public health*, 2018, vol. 15, no 1, p. 23.

[49] MULEY, ABHIJEET BHIMRAO , AWASTHI,SNEHA, BHALERAO, PRASANNA PRAKASH, *et AL*. Preparation of cross-linked enzyme aggregates of lipase from Aspergillus niger: process optimization, characterization, stability, and application for epoxidation of lemongrass oil. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, vol. 44, p. 1383-1404.

[50] NOORI, RUBIA, PERWEZ,MUHAMMAD , et SARDAR, MERYAM. Cross-linked enzyme aggregates: current developments and applications. *Biocatalysis: Enzymatic basics and applications*, 2019, p. 83-112.

[51] RAMPRASAD, R. et BANDOPADHYAY, R. Future of Ricinus communis after completion of the draft genome sequence. *Curr Sci India*, 2010, vol. 99, p. 1316-1318.

[52] KANCHAN, TANUJ, ATREYA,ALOK , et SHEKHAWAT, RAGHVENDRA SINGH. Cathartic turned bioweapon: Ricinus communis, the castor bean. *Wilderness & Environmental Medicine*, 2016, vol. 27, no 3, p. 444-445.

[53] LAGNIKA,LATIFOU. *Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises*. 2005. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur (Strasbourg)(1971-2008).

[54] Sténio Félix les arbres de mon pays Ricin , wordpress.com [en ligne], 2008 disponible à https://articlesnature.wordpress.com/2008/09/18/les-arbres-de-mon-pays-43le-ricin/

[55] Hadj Benrezig Mahdjouba , L'effet bio-insecticide de l'extrait méthanoïque du Ricinus communis L. Sur les larves de Tuta absoluta, Mémoire fin d'étude 2016

[56] JENA, JITENDRA et GUPTA, ASHISH KUMAR . Ricinus communis Linn: a phytopharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, vol. 4, no 4, p. 25-29.

[57] MAKHLOUF, K., HAMROUNI, L., KHOUJA, M. L., *et AL* . Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur Ricinus communis L. *Phytothérapie*, 2010, vol. 8, no 6, p. 374-376.

[58] MAROYIi, A., 2007. *Ricinus communis* L.. In: van der Vossen, H.A.M.; Mkamilo, G.S. (Eds). PROTA4U. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands.

[59] SAILAJA, M., TARAKESWARI, M., et SUJATHA, M. Stable genetic transformation of castor (Ricinus communis L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant Cell Reports*, 2008, vol. 27, p. 1509-1519.

[60] PICTURETHIS .Ricin commun, Distribution de Ricin commun[en ligne] disponible à **https://www.picturethisai.com/fr/wiki/Ricinus_communis.html**

[61] COUPLAN, F., STYNER, E. (1994). Guides des plantes sauvages : comestibles et toxiques(1994), Paris, pp : 367-368.

[62] WIKTROP.Ricinus communis L.[en ligne], identification et connaissance des movaises herbes dans les zones tropicales et méditerranéennes ,disponible à l'adresse https://portal.wiktrop.org/species/show/466

[63] GONZÁLEZ, GRACIA , *et al.* Pollinosis to Ricinus communis (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study. *Clinical & Experimental Allergy*, 1999, vol. 29, no 9.

[64] KOUACHI HAIFA' NECIB MOUFIDA, Étude de l'activité toxique et anti-nutritionnelle de Ricinus communis sur le coléoptère de la farine Tribolium confusum, Université Larbi Tébessi, 2019.

[65] Musém nationale d'histoire naturelle , ANGIOSPERME (PLANTE A FLEURS) Ricin commun [en ligne] disponible à l'adresse https://www.mnhn.fr/fr/ricin-commun

[66] COOPMAN, Vera, DE LEEUW, Marc, CORDONNIER, Jan, *et al.* Suicidal death after injection of a castor bean extract (Ricinus communis L.). *Forensic science international*, 2009, vol. 189, no 1-3, p. e13-e20.

[67] LITTLE, ELBERT LUTHER, WOODBURY, ROY O., et WADSWORTH, FRANK HOWARD. *Trees of Puerto Rico and the Virgin islands*. US Department of Agriculture, Forest Service, 1974.

[68] CHEBIRA HADJAR et MOUSSAOUI RAHIM Méthodes d'extraction et de purification des enzymes, université constantine 1, 2015

[69] : BENAOUA AMINA et OUANOUGHI HALIMA Séparation, purification et caractérisation de la lipase de Ricinus communis , université Dr yahia fares de Médéa ,201

[70] TAVARES, F., PETRY, J., SACKSER, P. R., *et AL.* Use of castor bean seeds as lipase source for hydrolysis of crambe oil. *Industrial Crops and Products*, 2018, vol. 124, p. 254-264.

[71] AGUILERA FLORES,MIGUEL MAURICIO , SÁNCHEZ CASTRO,MANUEL ALEXIS, ÁVILA VÁZQUEZ, VERONICA , *et AL.* Evaluation of the lipase from castor bean (Ricinus Communis L.) as a potential agent for the remediation of used lubricating oil contaminated soils. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2022, vol. 20, no 2, p. 657-673.

[72] BARROS, M., FLEURI, L. F., et MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties-a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2010, vol. 27, p. 15-29.

[73] LI, YUE, LI, GUORUI, SUN, HUAJUN , *et AL* . Characterization of a novel sn1, 3 lipase from Ricinus communis L. suitable for production of oleic acid-palmitic acid-glycerol oleate. *Scientific reports*, 2021, vol. 11, no 1, p. 6913.

[74] SEFHA FARIDA 1 and ABOUSEOUD MAHMOUD, Biocatalytic Hydrolysis of Triglycerides Using a Plant Lipase Extracted from Oil Seeds, Tob Regul4131,2023.

[75] SANTOS, KADIMA C., CASSIMIRO, DEBORA MJ, AVELAR,MATHEUS HM, *et AL*. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial crops and products*, 2013, vol. 49, p. 462-470.

[76] SRIVASTAVA,ALKA , MATHUR, RASHMI MOHAN , PRAKASH,RACHANA , *et AL*. Studies on Ricinus lipase enzyme isolated from castor seeds. *Oriental Journal of Chemistry*, 2016, vol. 32, no 2, p. 1235.

[77] SU ER-ZHENG, ZHOU YING, YOU PENG-YONG and WEI DONG-ZH, Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization, J Shanghai Univ (Engl Ed), 14(2): 137-144), 2010.

[78] M. DARAKLI and A. MALO Effective Factors of Dormant Seeds Lipase Activity in Gota Castor Bean 2010 Departement of chemistry, faculty of science , Damasus university , syria

[79] DEBAYOTI GOSWAMI, JAYANTA KUMAR BASU &SIRSHENDU De, Lipase applications in oil hydrolysis with a case Study on castor Oil: a review, Critical Reviews in Biotechnology, 33, 81-96, 2013.

[80] FERREIRA, ERIC EA, BRENDA C. PEREIRA et DANIELA B. HIRATA. 2023. « Précipitation par solvants organiques pour la purification de la lipase de Preussia Africana ». *Biotechnology Journal International* 27 (6) : 12-21

[81] KUMAREVEL, TS, GOPINATH, SCB, HILDA, A. *et AL*. Purification de la lipase de *Cunninghamella verticillata* par précipitation progressive et conditions optimisées de cristallisation. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 23–26 (2005).

[82] AGUILERA FLORESs, MM, SANCHEZ Castro, MA, Ávila Vázquez, V. *et al.* Évaluation de la lipase du ricin (*Ricinus Communis* L.) comme agent potentiel pour la dépollution des sols contaminés par des huiles lubrifiantes usagées. *J Environ Health Sci Engineer* **20**, 657–673 (2022).

[83] TÜTER, MELEK. Castor bean lipase as a biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, vol. 75, no 3, p. 417-420.

[84] SAMOYLOVA, YULIYA V., SOROKINA, KESENIA N., PILIGAEV, ALEXANDER V., *et al.* Preparation of stable cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of a Ureibacillus thermosphaericus esterase for application in malathion removal from wastewater. *Catalysts*, 2018, vol. 8, no 4, p. 154

[85] TALEKAR,SACHIN ,WAINGADE, SAILEE, GAIKWAD, VISHALl, *et al.* Preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of Bacillus amyloliquefaciens alpha amylase. *Journal of Biochemical Technology*, 2012, vol. 3, no 4, p. 349-353.

[86] MAHMOD, SAFA SENAN, YUSOF, FARIDAH, et JAMI, MOHAMMED SAEDI . Production of cross-linked enzyme aggregate-lipase from channel catfish (Ictularus punctatus) viscera. In : *International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences*. 2014. p. 37-40

[87] HADJARAB, SONIA, ALAM, MD ZAHANGIR, YUSOF, FARIDAH , *et al.* optimization and characterization of free and cross-linked enzymes aggregate from solid-state fermented materials. *Chemical and Natural Resources Engineering Journal (Formally known as Biological and Natural Resources Engineering Journal)*, 2023, vol. 7, no 1, p. 43-57.

[88] CUI**,** JIAN DONG, LIU, RONG LIN, et LI, LIN Bo. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates of bovine pancreatic lipase using bovine serum albumin as an additive. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2016, vol. 33, p. 610-615.

[89] ROBERT L. ORY, ACID Lipase Of the Castor Bean, Southern Regional Research Laboratory, -- New Orleans, Louisiana 70119, a Presented at the AOCS-AACC Joint Meeting. Washington, D.C., April 1968.

[90] XU CY, LI XF, LOUB WY, ZONG MH (2013) Cross-linked enzyme aggregates of Mung bean epoxide hydrolases: a highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides. J Biotechnol 166:12–19

[91] KIM MH, PARAKA S, KIM YH, WON K, LEE SH (2013) Immobilization of formate dehydrogenase from Candida boidiniithrough cross-linked enzyme aggregates. J Mol Catal B Enzym 97:209–214.

[92] TUTAR H, YILMAZA E, PEHLIVAN E, YILMAZ M (2009) Immobilization of Candida rugosa lipase on sporopollenin from Lycopodium clavatum. Int J Biol Macromol 45:315–320.

[93] MIAO, CHANGLIN, LI,HUIWEN , ZHUANG, XINSHU, *et AL*. Synthesis and properties of porous CLEAs lipase by the calcium carbonate template method and its application in biodiesel production. *RSC advances*, 2019, vol. 9, no 51, p. 29665-29675.

[94] CUI, JIANDONG, CUI, LILI, JIA, SHIRU, *et AL*. Hybrid cross-linked lipase aggregates with magnetic nanoparticles: a robust and recyclable biocatalysis for the epoxidation of oleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, vol. 64, no 38, p. 7179-7187.

[95] OLIART-ROS R-M, BADILLO-ZEFERINO G-L, Quintana-Castro R, Ruíz-López I-I, Alexander-Aguilera A, Domínguez-Chávez J-G, Khan AA, Nguyen DD, Nadda AK, Sánchez-Otero M-G. Production and Characterization of Cross-Linked Aggregates of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 Thermoalkaliphilic Recombinant Lipase. *Molecules*. 2021; 26(24):7569

[96] WANG, HAIKUAN, ZHONG, SHAOJIONG, MA, HUIJING, *et AL*. Screening and characterization of a novel alkaline lipase from Acinetobacter calcoaceticus 1-7 isolated from Bohai Bay in China for detergent formulation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, vol. 43, p. 148-156.

[97] GOSWAMI, DEBAJYOTI. Lipase catalysis in presence of nonionic surfactants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, vol. 191, no 2, p. 744-762.

[98] SANTOS, KADIMA C., CASSIMIRO, DEBORA MJ, AVELAR, MATHEUSE HM, *et AL*. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial crops and products*, 2013, vol. 49, p. 462-470.

[99] CHEN, MEI, TONGTONG JIN, BINBIN NIAN, and WENJUN CHENG. 2024. "Solvent Tolerance Improvement of Lipases Enhanced Their Applications: State of the Art" *Molecules* 29, no. 11: 2444.

[100] MAHMUDE**,** SS, YUSOF, F., JAMI, MS *et AL*. Optimisation des conditions de préparation et caractérisation d'une protéase à agrégats enzymatiques réticulés (CLEA) stable et recyclable. *Bioresour. Bioprocess.* **3** , 3 (2016)

[101] KHANAHMADI, SOOFIA, YUSOF, FARIDAH, AMID, AZURA, *et AL.*. *Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk. Journal of Biotechnology*, 2015, vol. 202, p. 153–161.

[102] BADOEI-DALFARD, ARASTOO, KARAMI, ZAHRA, ET MALEKABADI, SAIED. *Construction of CLEAs-lipase on magnetic graphene oxide nanocomposite: an efficient nanobiocatalyst for biodiesel production. Bioresource Technology*, 2019, vol. 278, p. 473–476.

[103] CUI, JIANDONG, LIN, TAO, FENG, YUXIAO, *eT AL.*. *Preparation of spherical cross-linked lipase aggregates with improved activity, stability and reusability characteristic in water-in-ionic liquid microemulsion. Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2017, vol. 92, no 7, p. 1785–1793. CLEAs sphériques.