

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche Scientifique

UNIVERSITE Dr. YAHIA FARES
MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie
Département Génie des Procédés Pharmaceutiques

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Bioprocédés Pharmaceutiques

THEME

Etude de la synthèse de lipase par *Bacillus subtilis*

Dirigé par :

- Mr : ABOUSEOUD. Mahmoud

Présenté par :

- M^elle^ MEBARKI Souria
- M^elle^ BOULARIAH Hadda

Année universitaire 2010-2011

☙ Remerciements ❧

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude, avant tout à ALLAH qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

Notre promoteur Mr : ABOUSEOUD. MAHMOUD d'avoir assuré notre encadrement et de nous avoir fait profité de ses connaissances scientifiques, pour sa patience, sa disponibilité et ses conseils.

Notre Co- promoteur Mr: BELKACEMI.ABED cadre chez SAIDAL qui nous a facilité la tache et nous a permis de travailler dans des conditions très favorables.

Nos remerciements les plus chaleureux aussi pour : Mr GHERABA MOHAMED, Mr Rachid, pour ses encouragements et ses précieux conseils qui ont été très bénéfiques durant le déroulement de ce travail.

Un grand remerciement à l'ensemble du personnel de la filiale ANTIBIOTICAL, en particulier : Mr CHEBBIL, KHALTI YEMNA, Mr MHAMED.

Nous remercions aussi tous nos enseignants depuis le cycle primaire jusqu'à l'université surtout Madame TASSIST.

∞ Dédicace ∞

Ce modeste travail est dédié à la plus belle bougie qui a éclairé ma vie depuis ma naissance à ce jour, avec sa lumière douce j'ai put parcourir ce chemin sous ses conseils et ses orientations, que Dieu la protège et la garde pour qu'elle puisse continuer à éclaircir ma vie ; merci, je t'adore maman.

Je dédie aussi ce travail a ceux qui m'à été le plus grand soutient morale et matériel qui a tout fait pour que je réussisse : merci mon père et mon frère NABIL.

A ma sœur AMEL et ses enfants WESSAL et MOHAMED AMIN.

A ma sœur BAHIA et ses enfants KAWTHER et ABD EL ADEEM.

A ma très chère sœur BESMA.

A mes frères : MOHAMED, SALIM.

A toutes mes amies, en particulier : FATIHA, CHERIFA, RACHIDA, FATMA, AICHA.

MEBARKI SOURIA

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma grande mère

Et

Ma chère mère

Boulariah Hadda

sommaire

INTRODUCTION GENERALE…….1

PARTIE THÉORIQUE

I. LES ENZYMES……..4

I. 1.Introduction……....4

I. 2. Définition ……..4

I .3. Structure des enzymes …….4

I. 4. Propriétés générales des enzymes…….6

I .5. Mécanisme d'action des enzymes……..6

I .6. Fonctions des enzymes……7

I .7.Cinétique enzymatique Michaelienne ……..8

I. 7.1. Vitesse de la réaction en fonction de la concentration de substrat…..8

I .8. Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique……...11

I .8.1. Effet de la température……11

I .8.2. Effet du pH ……..12

I .8.3. Effet de la concentration en enzyme ……12

I .9. Effecteurs chimiques……...13

I .9.1. Inhibiteurs……13

I .9.2. Activateurs ……..15

I.10. Activité enzymatique ……15

I.10.1. Activité enzymatique (ou catalytique)……..15

I.10.2. Activité enzymatique (ou catalytique) spécifique ……...15

I.11. Application industrielles des enzymes ……...16

a). Détergents……16

b). L'industrie alimentaire …….....16

c). L'industrie chimique et pharmaceutique…….17

d). Industrie papetière……17

e). Industrie textile ……..18

II. LA LIPASE……..19

II.1. Généralités sur les lipases ……..19

II.1.1 Introduction ……19

II.1.2. Origines et classification des lipases ……20

a). Les lipases végétales ……..20

b). Les lipases de mammifères……22

c). Les lipases microbiennes……23

d). Les cutinases ……..24

II.1.3. Séquence, structure et mécanisme réactionnel ……..…24

II.1.3.1. Les α/β hydrolases ……..25

II.1.3.2. Mécanisme enzymatique d'hydrolyse ……...26

II.1.3.3. Cinétique d'hydrolyse……30

II.1.4. Propriétés physico-chimiques des lipases……31

II.1.5. Spécificité des lipases …….....31

II.1.6. Applications industrielles ……33

II.1.7. Conclusion ……34

III. LES LIPASES MICROBIENNES

III.1.introduction…….35

III.2. Micro-organismes producteurs de lipases ……35

III.3. L'isolement et le dépistage des micro-organismes producteurs de la lipase ……..38

III.4. Production et développement des cultures pour la lipase …….38

III.4.1.Méthodologie des bioréacteurs ……38

III.4.2. Les facteurs influençant la production de la lipase microbienne…….39

a). Effet de la source d'azote ……40

b). Effet de la source de carbone ……40

c). Effet de la température……41

d) Effet du PH ……...41

e). Effet de durée d'incubation ……....41

f). Effet de la vitesse d'agitation ……..41

III.5.Les méthodes de dosage ……..42

III. 5.1. Méthodes titrimétriques ……42

III.5.2. Glycérol libéré à partir des triglycérides ……...42

III.5.3. La conductivité électrique ……...42

III.5.4. D'autres méthodes ……...42

III.6. Extraction et purification……..43

III.6. 1.Séparation de la biomasse ……44

III.6. 2. Précipitation de la lipase……..44

a). Par les sels (sulfate d'ammonium)……44

b).Par les solvants organiques ……44

c). Chromatographie sur colonne ……..44

PARTIE EXPÉRIMENTALE

INTRODUCTION ……...45

IV. MATERIELS ET METHODE……46

IV. 1. Produits utilisés 46

IV.1.1 : Substrat : Huile d'olive (triglycérides)……..46

IV.1.2 : Gomme arabique……..…46

IV.1.3 : Autres réactifs purs……46

IV.2.Matériels biologique utilisés……...46

IV.3. Solutions…….47

IV.3.1 : Préparation de tampon phosphate (0.2M) de pH=7…….47

IV.3.2: Préparation de solution d'hydroxyde de sodium de (0.2N)……..47

IV.3 .3 : Préparation de solution d'hydroxyde de sodium de (0.02N)……..47

IV.3.4 : Préparation d'émulsion d'huile d'olive dans la gomme arabique……..47

IV.4. Cultures microbiennes utilisés……..48

IV.4.1. Milieux de culture.....48

a).Milieu d'enrichissement solide 48

b). Milieu de production……48

IV.4.2.Conditions de culture ……...49

IV.4.2.1. Conservation de la souche ……...49

IV.4.2.2. Culture mère …….49

IV.4.2.3. Production de spores (Pré-culture sur milieu solide)…….49

IV.4.2.4. Pré-culture liquide……..…49

IV.4.2.5. Cultures …….49

IV.4.2.6.séparation de lipase ……50

IV.5. MISE EN EVIDENCE DES LIPASES ……..50

IV.5.1. Principe……..50

IV.5.2.Technique ……..51

a). préparation de milieu d'enrichissement ……..51

b). Détection de l'activité lipasique……..51

C) Résultat obtenu……....52

IV.6. Méthodes analytiques ……53

IV.6. 1. Quantification de la biomasse: mesure du poids sec……53

IV.6. 2. Quantification de la lipase microbienne produite ……...*53*

IV.6. 3. Calcul de l'activité enzymatique…….54

IV.7. Optimisation des conditions de culture…….55

a). sélection de la durée d'incubation……...55

b). Effet d'agitation……56

c)-Sélection de la température optimal……....57

d)-Sélection du pH optimal……59

e)- Effet de la nature de la source de carbone sur la production de lipase…….61

f)- Effet de source d'azote sur la production de lipase……..63

g)- Sélection de rapport C/N ……64

h) Suivi des cinétiques de la croissance bactérienne et de la production de la Lipase dans les conditions optimales……65

IV. 8. PURIFICATION DE LA LIPASE 67

IV. 8 .1. Mode opératoire……..67

IV. 8 .2.Mesure de l'activité enzymatique de la lipase semi purifié……..69

CONCLSION GENERALE……...…….70

Références bibliographiques

Liste des figures

Fig. I.1 : Un enchaînement linéaire D'AC Aminés.	5
Fig. I.2 : structure du site actif.	5
Fig. I .3 : l'action d'enzyme sur la vitesse d'une réaction.	6
Fig. I.4 : Illustration du mécanisme d'ajustement induit proposé par KOSHLAND.	7
Fig. I.5 : Courbes d'évolution des composés lors d'une réaction de Michaelis- Menten.	10
Fig. I.6 : représentation graphique d'une cinétique Michaelienne. Evolution de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.	10
Fig. I.7 : Représentation graphique en double Inverse selon Lineweaver-Burck.	11
Fig. I.8 : Représentation graphique Selon Eadie-Hosftee.	11
Fig. I .9 : Influence de la température sur la vitesse d'une réaction enzymatique.	12
Fig. I.10 : représente l'influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale De la réaction enzymatique.	13

Fig. I .11: représentation d'une réaction enzymatique bloquée Par un inhibiteur compétitif.	14
Fig. I .12 : représentation d'une réaction enzymatique bloquée par un inhibiteur non compétitif.	14
Figure II.1 : Liaisons hydrolysées par les phospholipases.	21
Figure II.2 : schéma du repliement α/β.	26
Figure II.3 : représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester.	29
Figure II.4 : représentation selon Lineweaver et burk de la cinétique d'hydrolyse de deux émulsions d'huile d'olive.	30
Figure II.5 : Représentation selon Fischer d'une molécule de triacylglycérol. Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases.	32
Fig.III.1 : diagramme générale représente la fermentation industrielle	39
Fig.III.2 : diagramme générale représente les étapes nécessaires de l'extraction et de la purification industrielle.	43
Fig. IV.1 : *Bacillus subtilis (*ATCC 6633) sous forme lyophilisée.	46
Fig. IV.2 : dispositif de stérilisation des milieux.	52
Fig. IV.3 : dispositif de stérilisation des milieux .	52

Fig. IV.4 : milieu sans tween80.	52
Fig. IV.5 : milieu avec tween80.	55
Fig. IV.6 : Effet de période d'incubation sur l'activité de la lipase.	57
Fig. IV.7 : Effet de la vitesse d'agitation sur l'activité de la lipase.	58
Fig. IV.8 : Effet de la température sur l'activité de la lipase.	60
Fig. IV.9 : Effet de pH sur l'activité de la lipase.	62
Fig. IV.10: Effet de La source de carbone sur l'activité de la lipase.	63
Fig. IV.11 : Effet de la source d'azote sur l'activité de la lipase.	65
Fig. IV.12 : courbe de croissance bactérienne en fonction de temps.	66
Fig. IV.13 : Technique de purification de lipase microbienne produit par précipitation à L'acétone.	68

Liste des tableaux

Tableau. I.1 : les différentes classes d'enzyme	8
Tableau .II.1 : Quelques applications industrielles des enzymes lipolytiques	33
Tableau .III.1 : Certain micro-organismes producteurs de lipase	35
Tableau. IV.1: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour Différents période d'incubation.	55
Tableau. IV.2: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour Différents vitesse d'agitation.	56
Tableau. IV.3: valeurs de l'activité enzymatique pour déférents température.	58
Tableau. IV.4: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour Déférents valeur de PH.	59
Tableau. IV.5: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour Déférents source de carbone.	61
Tableau. IV.6: valeurs de l'activité enzymatique pour déférents source d'azote.	63
Tableau. IV.7: Effet de la valeur de C/N sur l'activité de lipase	64
Tableau. IV.8: la variation de la biomasse sèche en fonction du temps	66

Références bibliographiques

[1] : cours, Biochimie 2 – Licence SV : Cinétique enzymatique,p1.

[2]: Cornish-Bowden A., Jamin M., Saks V., Cinétique enzymatique, EDP sciences, 2005.

[3]: Lepage J.F., Catalyse de contact : conception, préparation et mise en oeuvre des Catalyseurs industriels, Editions Technip – Paris, 1978.

[4]: Augère B., Les enzymes, biocatalyseurs protéiques, Ellipses, Paris, 2001.

[5] : Audigié C., Zonzain F., Biochimie métabolique, Biosciences et techniques, paris, 1995.

[6] : Cours SVT / 1re S, La structure des enzymes, Maxicours.mht, paris 2000-2012.

[7] : Goldberg M., une fonction majeure des protéines : la catalyse enzymatique, Regards sur la Biochimie, 4, 21-33,2003 : p (2-3).

[8] : Professeur Theo WALLIMANN, et le Docteur Uwe SCHLATTNER, d'ETH de Zurich, ISBN 2-86883-742-5, EDP Sciences, Suisse 2005.

[9] : Stolkowski J., Les enzymes, 6°édition, De Boeck université s.a., Paris, 1983.

[10]: Weil J.H., Biochimie générale; 10e édition, Dunod, Paris, 2001.

[11] : Fabiano S., Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : Application à la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques, Université CLAUDE BENARD – Lyon I, 2002.

[12]: Splittgerber G.A., Chemical Education 62 Issue 11, 1008, 1985.

[13]: Moussard C., Biochimie structurale et métabolique, De Boek et Larcier, paris,2006.
[14]: Weil J.H., Biochimie générale; 10e édition, Dunod, Paris, 2001.

[15]: Reginald H.Garratt., Charles M.Grisham., Biochimie., 2e édition américaine, De Boeck Université s.a. 2000.

[16]: Armes K., Camp. S. P., Biology 2ndED CBS College Publishing New York, 1982.
[17]: Amtul Z., Rasheed M., Choudhary M. I., Rosanna S., Khan K. M., Atta-ur-Rahman, Biochemical and Biophysical Research Communications, 319-1053, 2004.

[18] : cours biologie ; les enzymes, Octobre 2005.

[19]: Voet D., Voet JG., Biochimie., 2e édition américaine, De Boeck université s.a ; 1998.

[20] : Audigié C., Zonzain F., Biochimie métabolique, Biosciences et techniques, paris, 1995.

[21]: Dixon M., Webb E., Enzymes, London, Longman Group Limited, 1971.

[22]: R. WEINER, S._LANGILLE & E. QUINTERO, « Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides », in *Journal of Industrial Microbiology*, no 15, pp. 339-346, 1995.

[23]: Mats M. & Karl H., 1994. Kinetics of triglyceride lipase.In: Wooley P. & Petersen S.B., eds. Lipases. Cambridge,UK: Cambridge University Press, 159-180.

[24]: Shu C.H., Xu C.J. & Lin G.C., 2006. Purification and partial characterization of a lipase from Antrodia cinnamomea.Process Biochem., 41, 734-738.

[25]: Lima V.M.G., Krieger N., Mitchell D.A. & Fontana JD, 2004. Activity and stability of a crude lipase fromPenicillium aurantiogriseum in aqueous media and organic solvents. Biochem. Eng., 18(1), 65-71.

[26]: Destain J., Roblain D. & Thonart P., 1997. Improvement of lipase production from Yarrowia lipolytica. Biotechnol. Lett, 19, 105-107.

[27]: Saxena R.K., Davidson W.S., Sheoran A. & Giri B.,2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from Aspergillus carneus. Process Biochem., 39, 239-247.

[28]: Gaoa X., Cao S. & Zhang K., 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated Pseudomonas strain. Enzyme Microb. Technol., 27(1-2), 74-82.

[29]: Stocklein W., Sztajer V., Menge V. & Schmidt R.D., 1993. Purification and properties of a lipase from Penicillium expansum. Biochem. Biophys. Acta, 1168, 181-189.

[30]: Sonnet P.E., Fogia T.A. & Fearheller S.H., 1993. Fatty acid selection of lipases: erucic acid from rapeseed oil. J. Amer. Oil Chem. Soc., 70, 387-391.

[31]: Rønne T.H., Pedersen L.S. & Xu X., 2005. Triglyceride selectivity of immobilized Thermomyces lanuginose lipase in interesterification. J. Amer. Oil Chem. Soc., 82, 737-743.

[32]: Beisson F. et al., 2001. Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. Biochim. Biophys. Acta, 1531, 47-58.

[33]: Adlercreutz P., Gitlesen T., Ncube I. & Read J., 1997.Veronia lipase: a plant lipase with strong fatty acid selectivity. Methods Enzymol., 284, 220-231.

[34]: Hills M.J. & Mukherjee K.D., 1990. Triacylglycerol lipase from rape (Brassica napus) suitable for biotechnological purposes. Appl. Biochem. Biotechnol.,26, 1-10.

[35]: Tsuchiya T. et al., 1999. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 96, 15362-15367.

[36]: Lord J.M., Roberts L.M. & Robertus J., 1994. Ricin: structure, mode of action, and some current applications.FASEB J., 8, 201-208.

[37]: Lombard S., Helmy M.E. & Pieroni G., 2001. Lipolytic activity of ricin from Ricinus sanguineus and Ricinus communis , on neutral lipids. Biochem. J., 358, 773-781.

[38]: Morlon-Guyot J. et al. 2003. Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. J. Biol. Chem., 278, 17006-17011.

[39]: Girbes T. et al., 1996. Recent advances in the uses and applications of ribosome-inactivating proteins from plants. Cell Mol. Biol., 42, 461-471.

[40]: Hassanien F. & Mukherjee J., 1986. Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological process.J. Am. Oil Chem. Soc., 63, 893-897.

[41]: Pahoja V. & Sethar M., 2002. A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms.Pakistan J. Appl. Sci., 2, 474-484.

[42]: Warden C. et al., 1993. Chromosomal localization of lipolytic enzymes in the mouse: pancreatic lipase, colipase, hormone-sensitive lipase, hepatic lipase, and carboxyl ester lipase. J. Lipid Res., 34, 1451-1455.

[43]: Canaan S., Roussel A., Verger R. & Cambillau C., 1999.Gastric lipase: crystal structure and activity. Biochim.Biophys. Acta, 1441, 197-204.

[44]: Miled N., De Caro A., De Caro J. & Verger R., 2000. A conformational transition between an open and closed form of human pancreatic lipase revealed by a monoclonal antibody. Biochim. Biophys. Acta, 1476, 165-172.

[45]: Miled N., 2003. Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases. Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol., 136,131-138.

[46]: Borgstrom B. & Erlanson C., 1973. Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents. Eur. J. Biochem., 37, 60-68.

[47]: Borgstrom B., 1975. On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. J. Lipid Res., 16, 411-417.

[48]: Year H. et al., 2003. Mycetoma of the foot caused by Fusarium solani: identification of the etiologic agent by DNA sequencing. J. Clin. Microbiol., 41, 1805-1808.

[49]: Tan M. & Niessen L., 2003. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, Fusarium species causing crown rot and head blight of cereals. Mycol. Res., 107, 811-821.

[50]: Longhi S. & Cambillau C., 1999. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. Biochim. Biophys. Acta, 1441, 185-196.

[51]: Martinez C. et al., 1992. Fusarium solani cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. Nature, 356, 615-618.

[52]: Farmer E. & Ryan C.A., 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell, 4, 129-134.

[53]: Cygler M. & Schrag J.D., 1999. Structure and conformational flexibility of Candida rugosa lipase. Biochim. Biophys. Acta, 1441, 205-214.

[54]: Brady L. et al., 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. Nature, 343,767-770.

[55]: Winkler F.K., D'Arcy A. & Hunziker W., 1990. Structure of human pancreatic lipase. Nature, 343, 771-774.

[56]: Baba T. et al., 1991. Structure of human milk bile salt activated lipase. Biochemistry, 30, 500-510.

[57]: Ollis D. et al., 1992. The alpha/beta hydrolase fold. Protein Eng., 5, 197-211.

[58]: Derewenda Z., 1994. Structure and function of lipases. Adv. Protein Chem., 45, 1-52.

[59]: Anthonsen H. et al., 1995. Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. Biotechnol. Annu. Rev., 1, 315-371.

[60]: Drablos F. & Petersen S., 1997. Identification of conserved residues in family of esterase and lipase sequences. Methods Enzymol., 284, 28-61.

[61]: Arpigny J.L. & Jaeger K.E., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J., 343, 177-183.

[62]: [41]: Hills M., Kiewitt I. & Mukherjee K., 1989. Enzymatic fractionnement of evening primerose oil by rape lipase: enrichment of γ-linolenic acid. Biotechnol. Lett., 11, 629-632.

[63]: Pleiss J. et al., 2000. Lipase engineering databaseunderstanding and exploiting sequence-structurerelationship. J. Mol. Catal. Part B: Enzymatic, 10, 491-508.

[64]: Fischer M. & Pleiss J., 2003. The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. Nucleic Acids Res., 31, 319-321.

[65]: Derewenda Z., Derewenda U. & Dodson G., 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 A resolution. J. Mol. Biol., 227, 818-839.

[66]: Dodson G., Lawson D. & Winkler F., 1992. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. Faraday Discuss. 93, 95-105.

[67]: Egloff M.P. et al., 1995. Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. Protein Sci., 4, 44-57.

[68]: Schrag J., Li Y., Wu S. & Cygler M., 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. Nature, 351, 761-764.

[69]: Grochulski P., Li Y., Schrag J. & Cygler M., 1994. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. Protein Sci., 3, 82-91.

[70]: Brzozowski A. et al., 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. Nature, 351, 491-494.

[71]: Schrag J.D. & Cygler M., 1993. 1.8 A refined structure of the lipase from Geotrichum candidum. J. Mol. Biol., 230, 575-591.

[72]: Winkler F.K., D'Arcy A. & Hunziker W., 1990. Structure of human pancreatic lipase. Nature, 343, 771-774.

[73]: Miled N., De Caro A., De Caro J. & Verger R., 2000. A conformational transition between an open and closed form of human pancreatic lipase revealed by a monoclonal antibody. Biochim. Biophys. Acta, 1476, 165-172.

[74]: Nini L. et al., 2001. Lipase-catalysed hydrolysis of shortchain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. Biochim. Biophys. Acta, 1534, 34-44.

[75]: Entressangles B. & Desnuelle P., 1968. Action of pancreatic lipase on aggregated glyceride molecules in an isotropic system. Biochim. Biophys. Acta, 159, 285-295.

[76]: Fojan P., Jonson P., Petersen M. & Petersen S.B., 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. Biochimie, 82, 1033-1041.

[77]: Martinelle M., Holmquist M. & Hult K., 1995. On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase. Biochim. Biophys. Acta, 1258, 272-276.

[78]: Misset O. et al., 1994. The structure-function relationship of the lipases from Pseudomonas aeruginosa and Bacillus subtilis. Protein Eng., 7, 523-529.

[79]: Hjorth A. et al., 1993. A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. Biochemistry, 32, 4702-4707.

[80]: Beer H. et al., 1996. Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. Protein Eng., 6, 507-517.

[81]: Jaeger K.E. et al., 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev., 15, 29-63.

[82]: Wrinkler F. & Gubernator, 1994. Structure and mecanism of human pancreatic lipase. In: Wooley P. & Pettersen S., eds. Lipase. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 23-48.

[83]: Hermoso J., 1997. Neutron crystallographic evidence of lipase-colipase complex activation by a micelle. Embo J., 16, 5531-5536.

[84]: Benzonana G. & Desnuelle P., 1965. Kinetic study of the action of pancreatic lipase on emulsified triglycerides. Enzymology assay in heterogeneous medium. Biochim. Biophys. Acta, 105, 121-136.

[85]: Lawrence R., 1967. Microbial lipases and related esterases. Dairy Sci. Abstr., 29, 1-8.

[86]: Veeraragavan K., Colpitts T. & Gibbs B.F., 1990.Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. Biochim. Biophys. Acta, 1044, 26-33.

[87]: Iwai M. & Tsujisaka Y., 1974. The purification and the properties of three kinds of lipase from Rhizopus delemar. Agric. Biol. Chem., 38, 1241-1247.

[88]: Watanabe N., Ota Y., Minoda Y. & Yamada K., 1977. Isolation and identification of alcaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzyme. Agric. Biol. Chem., 41, 1353-1358.

[89]: Roblain D., Destain J. & Thonart P., 1989. Improvement of Mucor lipase production by mutant selection. Belg. J. Food Chem. Biotech., 44, 79-82.
[90]: Waller W. & Comeau L., 1987. Caractéristiques et performances d'une lipase fongique acido-résistante. Étud. Rech., 3, 205-212.

[91]: Sugihara A. et al., 1992. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. J. Biochem., 112, 598-603.

[92]: Shimada Y. et al., 1993. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from Fusarium heterosporum. J. Ferment. Bioeng., 75, 349-352.
[93]: Che Omar I., Hayashi M. & Nagai S., 1987. Purification and some properties of a thermostable lipase from Humicola lanuginosa. Agric. Biol. Chem., 51, 37-45.
[94]: Fukomoto J., Iwai M. & Tsujisaka Y., 1964. Studies on lipase. IV: Purification and properties of a lipase secreted by Rhyzopus delemar. J. Gen. Appl. Microbiol., 10, 257-265.
[95]: Papon M., 1989. Les activites lipolytiques des bactéries lactiques isolées de viande et de Brochothrix thermoshacta. Clermont-Ferrant, France : Université Blaise-Pascal.

[96]: Stocklein W., Sztajer H., Menge U. & Schmid R.,1993. Purification and properties of a lipase from Penicillium expansum. Biochim. Biophys. Acta, 1168, 181-189.

[97]: Engel L., 1992. Lipases: useful biocatalysts for enantioselective reactions of chiral flavor compounds. In: Teranishi R., Takeaka G.R. & Guntert M., eds. Flavor precursors: thermal and enzymatic conversions. ACS Symposium series 490. Washington, DC, USA: American Chemical Society, 20-31.

[98]: Lutz D., Huffer M., Gerlach D. & Schreier P., 1992.Carboxylester-lipase mediated reactions, a versatile route to chiral molecule. In: Teranishi R., Takeaka G. R. & Guntert M., eds. Flavors precursors: thermal and enzymatic conversions. ACS Symposium series 490. Washington, DC, USA: American Chemical Society, 33-45.

[99]: Godet S., Isolement et caractérisation de trois gènes codant une lipase et deux estérases Hypothétiques chez la microalgue marine *Isochrysis galbana (Prymnesiophyceae, Haptophyta)*, Thèse de doctorat, Université de Maine, 2008.

[100] : Hasan F., Shah A.A., Hameed A., Indrustrial applications of microbial lipases, Enzyme and Microbial Technlogy, 39,235-51, 2006.

[101] : Godet S., Isolement et caractérisation de trois gènes codant une lipase et deux Estérases hypothétiques chez la microalgue marine *Isochrysis galbana* (*Prymnesiophyceae, Haptophyta*), thèse de doctorat, Université de Marine, Faculté des Sciences et Techniques, 2008.

[102]: R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee, Production, purification,characterization, and applications of lipases, Biotechnol.Adv. 19 (2001) 627–662.

[103]. R. Kazlauskas, Elucidating structure mechanism relationship in lipases, prospects for predicting and engineering catalytic properties, Trends Biotechnol. 12 (1994) 464–472.

[104] : K.E. Jaeger, B.W. Dijkstra, M.T. Reetz, Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications, Annu. Rev. Microbiol. 53 (2000) 315– 351.

[105]: E. Dalmou, J.L. Montesinos, M. Lotti, C. Casas, Effect of different carbon sources on lipase production by Candida rugosa, Enzyme Microb. Technol. 26 (2000) 657–663.

[106] : Godtfredsen SE. Microbial lipases. In: Fogartty WM, Kelly CT, editors. Microbial enzymes and biotechnology. 2nd ed. London: Elsevier, 1990. pp. 255–73.

[107]: El-Shafei HA, Rezkallah LA. Production, purification and characterization of Bacillus lipase. Microbiol Res 1997;52:199–208.

[108]: Gowland P, Kernick M, Sundaram TK. Thermophilic bacterial isolates producing lipase. FEMS Microbiol Lett 1987;48:339–43.

[109]: Kim HK, Park SY, Lee JK, Oh TK. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from Bacillus stearothermophilus L1. Biosci Biotechnol Biochem 1998;62:66–71.
[110]: Kennedy MB, Rennarz WJ. Characterization of the extracellular lipase of Bacillus subtilis and its relationship to a membrane bound lipase found in a mutant strain. J Biol Chem 1979;254:1080–9.

[111]: Lesuisse E, Schanck K, Colson C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of Bacillus subtilis 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. Eur J Biochem 1993;216: 155–60.

[112]: Hou CT. pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. J Ind Microbiol1994;13:242–8.

[113]: Rua ML, Schmidt-Dannert C, Wahl S, Sprauer A, Schmide RD. Thermo alkalophilic lipase of Bacillus thermocatenulatus large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. J Biotechnol 1998;56:89–102.

[114]: Becker P, Abu-Reesh I, Markossian S, Antranikian G, Markl H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile Bacillus sp. [HI-9] on olive oil. Appl Microbiol Biotechnol 1997;42:184–90.

[115]: Janssen PH, Monk CR, Morgan HW. A thermophilic, lipolytic Bacillus sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl- palmitate esterase activity. FEMS Microbiol Lett 1994;120:195–200.

[116]: Tahoun MK, E-Kady I, Wahba A. Production of lipases from microorganisms. Microbiol Lett 1985;28: 133–9.

[117]: Lee CY, Yandolo JJ. Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a into the lipase structural gene. J Bacteriol 1986;166:385–91.

[118]: Van Oort MG, Deveer AMTJ, Dijkman R, Tjeenk ML, Verheij HM, De Haas GH, Wenzig E, Gotz F. Purification and substrate specificity of Staphylococcus hyicus lipase. Biochemistry 1989;28:9278–85.

[119]: El-Sawah MMA, Sherief AA, Bayoumy SM. Enzymatic properties of lipase and characteristic production by Lactobacillus delbrueckii sub species bulgaricus. Antonie von Leeuwenhoek 1995;67:356–62.

[120]: Meyers SA, Cuppett SL, Hutkins RW. Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. Food Microbiol 1996; 13:383–9.

[121]: Sztajer H, Maliszewska I, Wieczorek J. Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. Enzyme Microb Technol 1988;10:492–7.

[122]: Yeo SH, Nihira T, Yamada Y. Screening and identification of a novel lipase from Burkholderia sp. YY62 which hydrolyzes t-butyl esters effectively. J Gen Appl Microbiol 1998;44:147–52.

[123]: El Khattabi M, Van Gelder P, Bitter W, Tommassen J. Role of the lipase specific foldase of Burkholderia glumae as a stearic chaperone. J Biol Chem 2000; 275:26885–91.

[124]: Mencher JR, Alford JA. Purification and characterization of the lipase of Pseudomonas fragi. J Gen Microbiol 1967;48:317–28.

[125]: Rees GD, Robinson BH. Esterification reactions catalysed by Chromobacterium viscosum lipase in CTAB-based microemulsion system. Biotechnol Bioeng 1995;45:344–5.

[126]: Chen JY, Wen CM, Chen TL. Effect of oxygen transfer on lipase production by Acinetobacter radoresistens. Biotechnol Bioeng 1999; 62:311–6.

[127]: Lotrakul P, Dharmsthiti S. Lipase production by Aeromonas sobria LP004 in a medium containing whey and soybean meal. World J Microbiol Biotechnol 1997; 13:163–6.

[128]: Jaeger KE, Reetz TM. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol 1998;16: 396–403.

[129]: Chahinian H, Vanot G, Ibrik A, Rugani N, Sarda L, Comeau LC. Production of extracellular lipases by Penicillium R. Sharma et al. / Biotechnology Advances 19 (2001) 627–662 653 cyclopium purification and characterization of partial acylglycerol lipase. Biosci Biotechnol Biochem 2000;64:215–22.

[130]: Sztajer H, Maliszewska I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of Penicillium citrinum. Biotechnol Lett 1989;11:895–8.

[131]: Rantakyla M, Alkio M, Paltonen O. Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl) glycosidic ester in supercritical Carbon dioxide by immobilized lipase. Biotechnol Lett 1996;18:1089–94.

[132]: Stahmann KP, Boddecker T, Sahm H. Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles or droplets of lipid or fatty acid. Eur J Biochem 1997;244:220–5.

[133]: Sugihara A, Tani T, Tominaga Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from Bacillus
sp.. J Biochem 1991;109:211–6.

[134]: Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic Bacillus strain, A30-1 (ATCC 53841). J Ferment Bioeng 1995; 79:433–8.

[135]: Merek A, Bednasski W. Some factors affecting lipase production by yeast and filamentous fungi. Biotechnol Lett 1996;18:1155–60.

[136]: Papaparaskevas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. Optimizing production of extracellular lipase from Rhodotorula glutinis. Biotechnol Lett 1992;14:397–402.

[137]: Dharmsthiti S, Ammaranond P. Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (Trichosporon asteroides). Biotechnol Appl Biochem 1997;26:111–6.

[138]: Sztajer H, Maliszewska I, Wieczorek J. Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. Enzyme Microb Technol 1988;10:492–7.
[139] : Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek 1957; 23:15–22.

[140] : Cardenas J, Alvarez E, de Castro-Alvarez M-S, Sanchez-Montero J-M, Valmaseda M, Elson SW, Sinisterra J-V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. J Mol Catal B: Enzym 2001;14:111–23.

[141]: WangY,Srivastava KC,Shen GJ, Wang HY. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic Bacillus strain, A30-1 (ATCC 53841). J Ferment Bioeng 1995;79:433-8.
[142] : Kouker G, Jaeger KE. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Appl Environ Microbiol 1987; 53:211–3.

[143]: Hou CT. pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. J Ind Microbiol 1994; 13:242–8.
[144]: Cours introduction en génie enzymatique.

[145] :Ito T, Kikuta H, Nagamori E, Honda H, Ogino H, Ishikawa H, Kobayashi T. Lipase

Production in two-step fed-batchculture of organic solvent-tolerant Pseudomonas aeruginosa LST-03. J Biosci Bioeng 2001;91: 245–50.

[146]:Hemachander C, Bose N, Puvanakrishnan R. Whole cell immobilization of Ralstonia pickettii for lipase production. Process Biochem 2001;36:629–33.

[147]: Elibol M, Ozer D. Influence of oxygen transfer on lipase production by Rhizopus arrhizus. Process Biochem 2001; 36:325–9.

[148]: Sztajer H, Maliszewska I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium.citrinum*.Biotechnol Lett 1989;11:895–8.

[149]:Izumi T, Nakamura K, Fukase T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas. sp*. KWI-56. Agric Biol Chem 1990;54:1253–8.
[150]:Papaparaskevas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula.glutinis*. Biotechnol Lett 1992;14:397–402.

[151]: Essamri M, Valerie D, Louis C. Optimization of lipase production by *Rhizopus.oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. J Biotechnol 1998;60:97–103.

[152]: Sugihara A, Tani T, Tominaga Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus.sp*.J Biochem 1991;109:211–6.

[153]: Lee YP, Chung GH, Rhee JS. Purification and characterization of *Pseudomonas .fluorescens* SIK WI lipase expressed in Escherichia coli. Biochim Biophys Acta 1993;1169:156–64.

[154]: Sztajer H, Menge U, Schmid RD. Purification and properties of a lipase from *Penicillium.0.expansum*. Biochim Biophys Acta 1993;1168:181–9.

[155] : Maliszewska, I.; Mastalerz, P.: Enzyme Microb. Technol. 1992 (14) 190-193.

[156] : Dimitris, P.; Paul, C.; Dimitris, K.; Basil, J.M.: Bio tech lett,1992 (14) 397-402.

[157]: Tsai, Y.C ,Juang,R.Y.,Lin, S.F.,Chen,S.W. and Tamura, G.1988. production and further characterization of alkaline elastase produced by alkalophilic *Bacillus* strain Ya-B. Appl.Environ. Microbiol.,54 (5) :3156-3161.

[158]: Marcin C, Kat L, Greasham R, Chartrain M (1993). Optimization oflipase production by *Pseudomonas.aeruginosa* MB 5001 in batch cultivation. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 12: 29-3
[159]. Maia, M., M.M. Moraism, J.R. Morias, E.H.M. Melo and J.L. Fiho, 1999. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus Fusarium solani. Revista de Microbiologia, 30: 304-309.

[160] : Kanasawud, P.; Phutrakul, S.; Bloomer, S.; Aldercrentz, P.;Mattiassen, B.: Enzyme Microb. Technol, 1992 (14) 959±964.
[161] .Song, Q. X., Lin, J. P., Rong, Y. P. and Wei, D. Z. 2001. Studies on lipase production from Candida.rugosa. Sheng Wu Gong Ceng Xue Bao., Jan ;17(1) :101-104.

[162]: Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals No18, Gatlinburg, Tennessee , ETATS-UNIS (05/05/1995) 1997, vol. 63-65 (910 p.) (22 ref.), pp. 409-421.

[163]: Cihangir, N. and E. Sarikaya, 2004. Investigation of lipase producing by a new isolate of *Aspergillus.sp.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20: 193-197.

[164]: Sorenson, W.G. and C.W. Hesseltine, 1966. Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus .oligosporus*. Mycologia, 58: 681-689.

[165]: Hendrickson HS. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. Anal Biochem 1994;219:1–8.

[166]:Ferrato F, Carriere F, Sarda L, Verger R. A critical re-evaluation of the phenomenon of "interfacial activation". In: Dennis E, Rubin B, editors. Methods Enzymol. New York: Academic Press; 1997. p. 327–47.

[167]:Pignède G,Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud JM. Characterization of anextracellular lipase encoded by LIP2 in Yarrowia lipolytica. J Bacteriol 2000;182: 2802–10.

[168] : Macedo GA, Park YK, Pastore GM. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of Geotrichum sp. Rev Microbiol 1997;28(2):90–5.

[169] :Pospísil L, Kabátová A. Lipolytic activity in some Candida strains (author's transl)]. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg 1976;131(8):692–6.

[170]: Bjoerkhem IK, Sandelin AT. A simple, fully enzymic bioluminescent assay for triglycerides in serum. Clin Chem 1982;28:1742–4.

[171]: Ballot C, Favre-Bonvin G,Wallach JM. Lipase assay in duodenal juice using a conductimetric method. Clin Chim Acta 1984;143:109–14.

[172] :[Hasan. F,Sahah.AA,Hameed.A Microbiology Research Laboratory, Department of Microbiology, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan.2007] .

[173] : Cours enzymologie.(Bioprocédés-Université de Médéa) " Extraction et purification des enzymes microbiennes"Mme TASSIST,2011.

[174]: [Sierra G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek, 23: 15- 22. A été utilisé pour détecter la production des enzymes lipolytiques. Tween 80 a été utilisé comme substrat lipidique.].

[175]: [Fakhreddine L., Kademi A., Ait-Abdelkader N., Baratti J. C. (1998).Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilicbacterial strains. Biotechnol. Lett., 20: 879-883.]

[176]. Kunio, O.; Yonko, Y.; Junichi, S.: Ferment and Bioengg 1994, 77 (5) 490±495.

[177]: Manoj Singh, 2Kumar Saurav, 2Neha Srivastava and 2Krishnan Kannabiran

1Department of Marine and Coastal Studies, Madurai Kamaraj University, M adurai, India
2Biomolecules and Genetic Division, School of Bioscience and Technology,VIT University, India
[178]. Dimitris, P.; Paul, C.; Dimitris, K.; Basil, J.M.: Bio tech lett, 1992 (14) 397-402.

[179]. Maliszewska, I.; Mastalerz, P.: Enzyme Microb. Technol. 1992(14) 190-193.

[180]: Shu C.H., Xu C.J. & Lin G.C., 2006. Purification and partial characterization of a lipase from Antrodia cinnamomea.Process Biochem., 41, 734-738.

[181]: Gaoa X., Cao S. & Zhang K., 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated Pseudomonas strain. Enzyme Microb. Technol., 27(1-2), 74-82.

[182]. Lehninger, A.L.: Biochemistry, Kalyani Publishers, New Delhi, 1983.

[183]: Sammour R.H., Purification and Partiel Characterisation of Acid Lipase in Germinating Lipidbody Linseedlings, Departement of Botany, Faculty of Science, Tanta University, 29, 177-184, 2005.

[184]: Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R., Methods for lipase detection end assay: a critical review, European Journal of Lipid Science and Technology, Winheim, 133-153, 2000.

[185]: Ejedegba B.O., Onyeneke E.C. and Oviasogie P.O., Characteristics of lipase isolated From coconut (Cocos nucifera linn) seed under different nutriment treatments, African Journal of Biotechnology, 6, 723-727, 2007.

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو إنتاج إنزيم الليباز عن طريق التخمير في دفعة ممزوجة باستخدام آلسلالة الميكروبية *Bacillus.subtilis*.
اختبار وجود إنزيم الليباز في وسط صلب أعطى منطقة واضحة حول المستوطنات ناتجة على التحلل المائي للأحماض الدهنية، دلالة على إنتاج إنزيم الليباز من قبل *Bacillus.subtilis*
وجرت دراسة آثار مركبات الوسط والعوامل الفيزيائية والكيميائية مثل درجة الحرارة ودرجة الحموضة.
وجد أن أفضل مصادر الكربون والنيتروجين هي الجلوكوز، وكلوريد الأمونيوم على التوالي من اجل الحصول على أفضل مردود من lipase.
درجة الوسط المعتدل (7)، درجة الحرارة 37 درجة مئوية، سرعة التحريك 150 دورة في الدقيقة، و مدة الحضانة 48 ساعة هي أفضل الظروف لإنتاج الإنزيم.
وأخيراً، انجاز بروتوكول لفصل وتنقية الإنزيم.

الكلمات الرئيسية: الليباز، الإنتاج، التخمير، *Bacillus.subtilis*، التحسين

Résumé

L'objectif de cette étude est la production de la lipase par fermentation en batch agités en utilisant la souche microbienne *Bacillus.subtilis*.
Le test de mise en évidence sur milieu solide donnant une zone claire autour des colonies, suite à l'hydrolyse d'un acide gras, a montré la production de la lipase par le *Bacillus.subtilis*
Les effets des composés du milieu et des agents physico-chimiques tels que la température et le pH ont été étudiés.
Le glucose, et le chlorure d'ammonium se sont avéré les meilleures sources de carbone et d'azote respectivement pour l'obtention du meilleur rendement en lipase.
Le pH neutre (7), la température 37 °C la vitesse d'agitation 150rpm, la durée d'incubation de 48h sont les meilleures conditions de production de l'enzyme.
Enfin, un protocole de séparation et de purification de l'enzyme a été établi.

Mots clés : lipase, production, fermentation, *Bacillus.subtilis*, optimisation

Abstract
The objective of this study is the production of lipase by agitated batch fermentation using microbial strain *Bacillus.subtilis*.
The emphasis on solid medium test giving a clear zone around the colonies due to the hydrolysis of a fatty acid, showing the production of lipase by the *Bacillus.subtilis*
The effects of the compounds of the medium and physico-chemical agents such as pH and temperature were studied.
Glucose and ammonium chloride were found to the best sources of carbon and nitrogen respectively to obtain the best performance in lipase production.
Neutral pH (7), under temperature of 37 ° C and 150rpm magnetic agitation for 48 h of incubation time were the best conditions for enzyme production.
Finally, a protocol of separation and purification of the enzyme was established.

Key words: lipase, production, fermentation, *Bacillus.subtilis*, optimization

INTRODUCTION

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques hautement spécifiques qui accélèrent les réactions de synthèse chimique en abaissant leurs énergies d'activation. Contrairement aux catalyseurs chimiques, elles fonctionnent sous des conditions modérées de température et de pH en milieu aqueux ou organique. Leur présence fait aussi limiter l'utilisation excessive de produits chimiques et des solvants. Par ailleurs, les réactions secondaires parasites donnant des sous-produits indésirables seront évitées du fait de leur sélectivité élevée.

En conséquence, tout procédé remplaçant les substances chimiques par des enzymes est un procédé moins polluant, plus respectueux de l'environnement et moins onéreux. Les enzymes sont pour cela de plus en plus importantes dans le développement industriel durable.

L'utilisation d'enzymes (isolées ou sous forme de cellules mortes) est d'une grande importance non seulement dans l'industrie alimentaire mais également dans la production de substances chimiques, dans les systèmes analytiques et de diagnostic, dans le traitement des maladies. Elles occupent une place importante dans l'industrie émergente des technologies propres, appelées encore technologie « verte ».

L'utilisation des enzymes dans tous ces domaines a été rendue possible grâce aux meilleures connaissances de la fonction des enzymes dans les systèmes métaboliques des êtres vivants, de la structure des enzymes et par-dessus tout grâce à la possibilité d'obtenir des enzymes de synthèse via la manipulation génétique des microorganismes. Ces facteurs ont fait que de nombreuses entreprises sont spécialisées dans la production à grande échelle d'enzymes d'origine microbienne.

Les lipases sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse des esters glycéridiques en milieu aqueux et la synthèse d'esters en milieu non-aqueux. Elles sont de ce fait capables de catalyser un grand nombre de réactions d'intérêt industriel.

Les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. Ces enzymes, présentes chez tous les organismes vivants, jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides. Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse telles que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert

du groupement acétyle d'un ester sur d'autres nucléophiles tels que des amines ou des thiols.

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux micro-organismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires.

Elles sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi 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*.

L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans des domaines très variés. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale et d'autre part, d'avoir une plus grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux.

La demande pour les enzymes industrielles, en particulier d'origine microbienne, est de plus en plus du fait de leurs applications dans une grande variété de processus.

L'intérêt pour la production de lipase microbienne a augmenté au cours des dernières décennies, en raison de son grand potentiel dans les applications industrielles.

Les lipases sont obtenues à partir de nombreuses sources cependant, la plupart des sources appropriées pour la production de lipase sont des microbes.

Ces micro-organismes peuvent produire des lipases de haute qualité au moindre coût et en un temps modéré.

Afin d'obtenir les rendements les plus élevés de la lipase, les conditions de croissance optimales devraient alors être considérées. La production de lipase dépend

d'un certain nombre de facteurs, notamment des sources carbone et des sources d'azote, le pH, la température, l'aération et la taille d'inoculum.

L'objectif de notre travail consiste à la production de la lipase par l'espèce *Bacillus.subtilis* et la détermination des conditions optimales de la production de l'enzyme dans des cultures liquide en batch agités.

Pour cela, le présent manuscrit décrivant les étapes de l'étude sera composé de deux parties :

1. Une partie bibliographique où sont présentées des notions sur :

- Les enzymes : généralités sur les enzymes, mécanismes d'action, application des enzymes dans l'industrie…
- Les lipases : généralités sur les lipases, origines et classification, leurs applications dans l'industrie…
- Les lipases microbiennes : les microorganismes productrices, l'optimisation de la production….

2. Une partie expérimentale ayant pour objectif l'étude de la production de la lipase par *Bacillus.subtilis*. La stratégie expérimentale est menée en trois étapes essentielles :

- La première étape est consacrée essentiellement à la mise en évidence de la lipase avec des tests qui montrent que cette bactérie est une productrice de cette enzyme.
- Dans la deuxième étape, des essais d'optimisation de la production, c'est l'étude de l'effet des conditions physico-chimiques (température, PH, vitesse d'agitation, durée d'incubation…), et l'effet des composées du milieu (source de carbone, source d'azote…)
- Dans la troisième étape on s'intéresse à la précipitation et la purification de l'enzyme

INTRODUCTION :

L'objectif de cette étude était la production de la lipase par *Bacillus subtilis* et l'optimisation des conditions de croissance qui permettant l'obtention d'un rendement maximale en enzyme.

Pour cela, la stratégie expérimentale adoptée consiste à étudier l'effet d'un seul facteur à la fois, déterminer la valeur optimale et fixer celle ci comme valeur pour la suite de l'étude. La production de la lipase sera suivie à travers la mesure de son activité dans le milieu en se basant sur une réaction caractéristique qui est l'hydrolyse d'un lipide (triglycérides).

En détail, on pourra décomposer l'étude en différentes parties :

- La première partie consiste à la mise en évidence de la lipase produit par une souche microbienne qui nommé *Bacillus subtilis*

- Dans la deuxième partie, les effets de certains paramètres physico-chimiques sur la production de la lipase seront étudiés. Elle présente une étape primordiale dans notre étude, l'optimisation des conditions de culture (source de carbone, source d'azote, le pH, la température, la durée d'incubation, la vitesse d'agitation) qui permet d'obtenir une quantité maximale de lipase.
- La troisième partie s'intéresse essentiellement à la purification de la lipase produite par une méthode simple où la sensibilité de l'enzyme, et la facilité de la procédure doivent être pris en considération.

IV. Matériels et méthode :

IV.1.Produits utilisés :

Les principaux Produits utilisés sont détaillé ci-dessous.

IV.1.1 : Substrat : Huile d'olive commerciale (source de triglycérides)

IV.1.2 : Gomme arabique :

Utilisée comme agent émulsifiant. Poudre de couleur jaune pâle à jaune brunâtre et inodore.

IV.1.3 : Autres réactifs purs:

- Chlorure de calcium ($CaCl_2$) ;
- Éthanol ;
- Acétone ;
- Acide oléique ;

IV.2.Matériels biologique utilisés :

*Bacillus subtilis (*ATCC 6633) lyophilisée est utilisée dans cette étude.



Fig. IV.1 : *Bacillus subtilis (*ATCC 6633) sous forme lyophilisée.

IV.3. Solutions:

Nous avons utilisé les solutions suivantes ;

- Solution tampon phosphate (0.2M) de pH=7.
- Solution d'hydroxyde de sodium de (0.02M).
- Solution d'hydroxyde de sodium de (0.2M) .

IV.3.1 : Préparation de tampon phosphate (0.2M) de pH=7.

1. Dissoudre 13.6g de phosphate monobasique (KH_2PO_4) dans une fiole gaugé de 500 ml et complété avec de l'eau distillé jusqu'au trait.
2. Laisser sous agitation jusqu'à la dissolution complète du solide.
3. Transférer de cette dernier 25 ml dans une fiole jaugé de 1 l.
4. Ajouter 145.5 ml de NaOH (0.2N).
5. Ajouter 500 ml d'eau distillé.
6. Corriger le PH à 7 avec NaOH (0.1N).
7. Compléter le volume avec de l'eau distillé jusqu'à trait.

IV.3.2: Préparation de solution d'hydroxyde de sodium de (0.2N).

1. Dissoudre 4 g de NaOH dans 250ml d'eau distillé.
2. Complété le volume jusqu'à 500 ml dans un ballon volumétrique.

IV.3 .3 : Préparation de solution d'hydroxyde de sodium de (0.02N).

1. Dissoudre 0.8 g de NaOH dans 250 ml d'eau distillé.
2. Compléter le volume a 500ml.

IV.3.4 : Préparation d'émulsion d'huile d'olive dans la gomme arabique :

Dans un bécher d'un litre, on porte à l'ébullition 1L d'eau distillé. Sous agitation, 20g de la gomme arabique.

Quand la gomme arabique est dispersée, la solution est laissée sous agitation dans un cristallisoir remplie de glace jusqu'à ce que la solution soit clarifiée.

L'émulsion d'huile d'olive est préparée à l'aide d'un homogénéiseur par l'ajout d'huile d'olive (tout dépend la concentration en substrat désirée) dans la solution de la gomme arabique, le mélange est agité 4 fois 1 minute en s'arrêtant 30 secondes entre deux agitations successives pour éviter l'échauffement de l'émulsion.

IV.4. Cultures microbiennes utilisés:

IV.4.1. Milieux de culture :

a). Milieu d'enrichissement solide [174] :

Le milieu contient (g/l) :

- Peptone =10 ;
- NaCl =5 ;
- $CaCl_2.2H_2O$=0.1 ;
- Agar =20.

b). Milieu de production [175] :

Les études d'optimisation sont réalisées sur ce milieu de croissance et de production de la lipase par *Bacillus subtilis*.

Un litre de ce milieu de culture est constitué en (g/l) :

- $Na_2HPO_4.2H_2O$ =7 ;
- K_2HPO_4 =3 ;
- NH_4Cl = 1 ;
- NaCl = 0.5 ;
- Glucose = 4;
- $MgSO_4$= 0.25 ;
- $CaCl_2$ =0.02.

Le pH de milieu est ajusté à 8 avec du NaOH 2N avant l'autoclavage 15 min à 120 °C.

IV.4.2.Conditions de culture :

IV.4.2.1. Conservation de la souche :

La souche est stockée sous forme de spores, conservées à +4 °C. Le stock de spores (banque de travail) est réalisé suivant le protocole décrit ci-dessous.

IV.4.2.2. Culture mère :

Une culture liquide en milieu d'enrichissement [174] de 100 ml est réalisée dans un Erlenmeyer de 250 ml.

Cette culture liquide est ensemencée dans des conditions aseptiques à partir de spores de *Bacillus subtilis* obtenues sur gélose inclinée à l'aide d'une anse de platine. Elle est incubée 48 h à 30 °C sous une agitation de 150 RPM.

IV.4.2.3. Production de spores (Pré-culture sur milieu solide):

Des boîtes de Pétri contenant 30 ml de milieu de dépistage solide sont ensemencées avec la culture mère. Après étalement de l'inoculum sur le milieu solide, les cultures solides sont incubées pendant 48H à 30 °C.

IV.4.2.4. Pré-culture liquide :

Les pré-cultures liquides sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu d'enrichissement liquide.

Chaque erlenmeyer est ensemencé avec les spores récupérées à partir d'une Pré-culture sur milieu solide à l'aide d'une anse de platine. Les erlenmeyers sont incubés à 30 °C et sous une agitation de 150 RPM pendant 48 h.

IV.4.2.5. Cultures :

Des erlenmeyers de 250 ml contenant milieu de production [175] sont ensemencés avec un volume de pré-culture égal à 5 % du volume utile (volume de milieu). Les cultures sont incubées à 30 °C sous une agitation de 180RPM. Lors de la production de lipase et des études d'optimisation, le volume utile de culture dans chaque erlenmeyer est de 100 ml. Lors de la production de biomasse nécessaire à la purification de lipase, le volume utile de culture dans chaque erlenmeyer est de 150 ml.

IV.4.2.6.séparation de lipase :

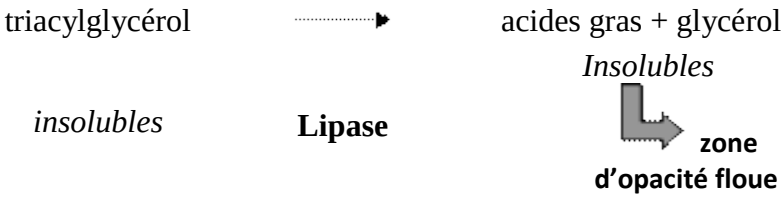
- ❖ Le bouillon de culture a été centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse à 5000 RPM pendant 20min afin de précipiter la biomasse produite.
- ❖ Le surnageant clarifié contenant la lipase extracellulaire a été utilisé pour l'estimation de l'activité de la lipase.

IV.5. Mise en évidence de la lipase:

IV.5.1. Principe :

Les lipases sont des enzymes constitutives, exocellulaires, capables d'hydrolyser les lipides. Elles sont recherchées en choisissant un triacylglycérol comme substrat : le Tween 80, le tributyrate de glycérol (ou **tributyrine**), le Tween60…etc. Mais dans notre travail nous avons utilisé le réactif disponible qui est le Tween 80.

Les **lipases** hydrolysent les triacylglycérols selon la réaction suivant :



La réaction est détectée selon deux principes :

- L'acide gras produit est détecté grâce à un indicateur de pH (rouge de phénol en général)

Ou

- Apparition d'une zone claire autour des colonies cultivées sur milieu solide contenant le tween 80.

IV.5.2.Technique :

- **Mise en évidence des lipases :**

a). préparation de milieu d'enrichissement :

Mode opératoire :

1. Mettre 10g de peptone dans 1L d'eau distillée ;
2. Ajouter 5g de NaCl ;
3. Ajouter 0.1g de $CaCl_2.2H_2O$;
4. Mettre le milieu sous agitation ;
5. Le pH de milieu est ajusté à 7 avec du NaOH (2N) ;
6. Après chauffage du milieu, on ajoute l'agar avec agitation jusqu'à la dissolution totale ;
7. Verser le milieu dans des erlenmeyers de 250 ml ;
8. Stériliser le milieu et le tween 80 séparément à l'aide de l'autoclave à 121°c pendant 15min ;
9. Après la stérilisation émulsionné le substrat mécaniquement (de 1%) dans le milieu préparée et versé dans des boîtes de Pétri ;
10. Laisser le milieu sécher a la température ambiante pendant 30 min.

b). Détection de l'activité lipasique:

- Ensemencer le milieu par un spot de 3 à 5 mm de diamètre, à l'aide de l'anse de platine chargée de culture. **(Fig. IV.2) ;**
- Incuber à 30°C pendant 72 heures en position retournée ;
- Examen de l'apparence des colonies.

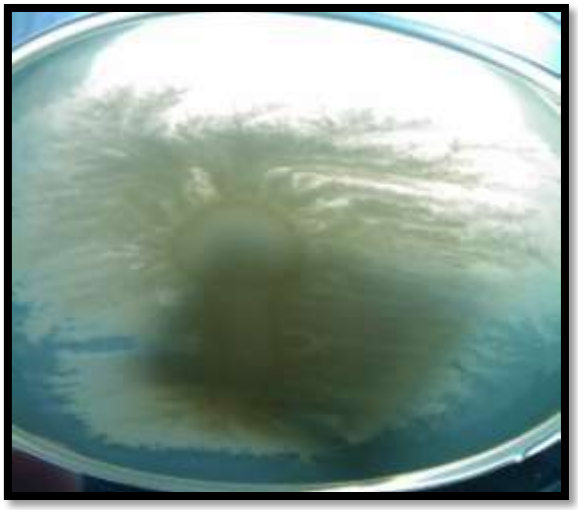


Fig. IV.2 : Milieu ensemencé par la méthode de spot.

C) Résultat obtenu :

Apparition d'une zone claire sur le milieu ensemencé due à la formation de halos clairs autour les colonies cultivées sur le milieu contenant de tween 80 en raison de la dégradation du substrat (hydrolyse), ce qui indique l'activité lipolytique. **(Fig. IV.4).** Donc le test lipase s'est avéré positif (+).



Fig. IV.3: milieu sans tween80



Fig. IV.4 : milieu avec tween80

IV.6. Méthodes analytiques :

2 ml de milieu sont régulièrement prélevés au cours des cultures de *Bacillus subtilis* pour réaliser le suivi de la biomasse et de la production de lipase. La biomasse est déterminée par la mesure du poids sec et les lipases sont quantifiées dans le surnageant de culture par la méthode de dosage titrimétrique.

IV.6. 1. Quantification de la biomasse: mesure du poids sec :

Les étapes suivies pour la détermination de la biomasse sèche sont les suivantes :

1. Des papiers aluminium sont pesés (Pi).
2. 2 ml de culture (Vp) sont versé ensuite sur le papier aluminium pré-pesés.
3. Les papiers aluminium pré-pesés contenant la culture sont séchés à 105 °C pendant 2h, et pesés (Pf).

Le poids secs est déterminé suivant l'Équation(1). Le résultat est exprimé en g L^{-1}

$$\textit{Matière Sèche (g. } L^{-1}\textit{)= \{Pf(g)- Pi(g)\}/ Vp(l)…… (1)}$$

où :

- Pi : poids initial ;
- Pf : poids final ;
- Vp : volume du prélèvement.

IV.6. 2. Quantification de la lipase microbienne produite par *Bacillus subtilis*.

Test d'activité lipasique :

L'estimation de l'activité lipasique se fait par titrage de l'acide gras libéré de l'huile d'olive avec une base (NaOH) [176].

Pour détecter l'activité de la lipase produite par *Bacillus subtilis*, le mélange réactionnel contenant :

- 5ml d'émulsion d'huile d'olive dans la gomme arabique.
- 4 ml de 0,2 M de tampon phosphate de PH =7.
- 1 ml de (0.11) M de $CaCl_2$.
- 1 ml de solution enzymatique.

Après l'incubation à 30°c pendant 30 min, l'activité enzymatique a été arrêtée par addition de 5 ml d'éthanol acétone (1: 1) le mélange et libéré en acides gras libres a été titré par NaOH de 0.02M à l'aide de phénolphtaléine comme indicateur.

IV.6. 3. Calcul de l'activité enzymatique :

Une unité enzymatique est définie comme l'activité enzymatique produisant 1 µmol de lipase par minute.

A partir des volumes de NaOH obtenues nous avons calculé l'activité lipasique :

$$N_{NaOH}V_{NaOH}=N_2V_2 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

N_{NaOH} : normalité de NaOH (0.02M)

N_2 : normalité de l'émulsion test.

ΔV_{NaOH} : volume de NaOH prenant en compte le volume de titrage obtenu avec le test témoin (sans enzyme), c'est-à-dire l'acidité libre naturelle.

D'où : ΔV_{NaOH} = V (essai)-V (témoin)

V_2 : volume de l'émulsion (huile, émulsifiant, huile d'olive, enzyme, solution de stoppage) =21mL

A partir de l'équation (1), on obtient le nombre d'équivalent d'acide libre produit dans l'émulsion : $(N_{NaOH}\ \Delta V_{NaOH})= N_2\ V_2$……..(2)

Donc à partir de l'équation (2) et les données si dessus nous avons calculé l'activité lipasique contenue dans 1ml de culture à partir de l'équation suivante:

Activité (umol/ml.min) = (N_{NaOH} (mol/ml) ΔV_{NaOH}(ml)/ (durée de réaction enzymatique (min)

IV.7. Optimisation des conditions de culture.

a). sélection de la durée d'incubation :

Pour déterminer l'effet de la période d'incubation sur l'activité de lipase, l'incubation a été effectuée à des temps différentes allant de 24H jusqu'à 72H.

❖ **Résultats et Discussion :**

Les résultats obtenus sont représentée dans le tableau suivant.

Tableau. IV.1: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour Différents durée d'incubation.

Durée d'incubation (heure)	Activité enzymatique (umol/ml.min)	Biomasse sèche (g/l)
24	1.333	6.75
48	1.6	9
72	1.266	5.75

A partir des valeurs indiquées dans le tableau ci-dessus, nous avons obtenue la figure. IV.5, qui représente l'activité enzymatique et la biomasse sèche en fonction de durée d'incubation.

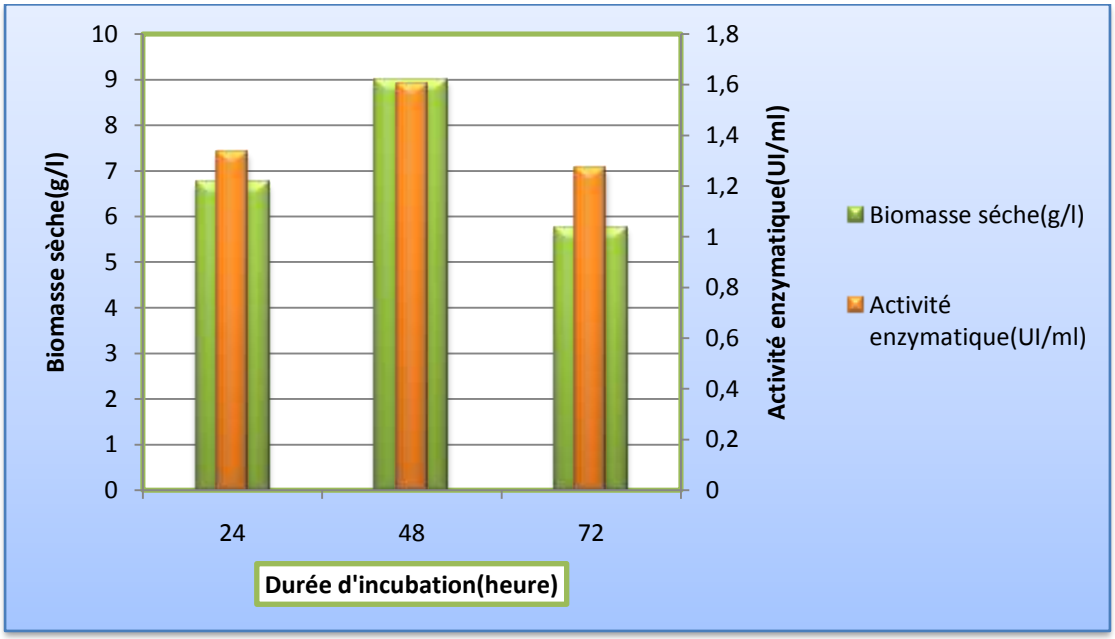


Fig. IV.5. Effet de la durée d'incubation sur la croissance bactérienne et sur la production de la lipase (pH=8 ; T°=30; agitation=150rpm ; C=glucose ; N=NH_4Cl).

D'après les résultats représentés sur la figure IV.6, il a été constaté que l'activité de la lipase est appréciable dès les premières 24 heures et atteint son maximum après 48 heures d'incubation et la valeur de la biomasse sèche atteint 9 g/L.

Au-delà de 48h l'activité de lipase diminue légèrement suite à l'arrêt de la croissance bactérienne. Le résultat est similaire à celui trouvé par d'autres auteurs utilisant l'espèce *Bacillus subtilis* [177]. Cette durée optimale d'incubation est inférieure à celles obtenues avec d'autres microorganismes tels que *Rhodotorula glutinis* [178] *Penicillium citrinium* [179].

b). Effet d'agitation :

Pour déterminer l'effet d'agitation sur la production de lipase, l'incubation fixée à 48 heures, la vitesse d'agitation a été variée de 150rpm jusqu'à 300rpm.

❖ **Résultats et Discussion**

Le tableau ci-dessous représente les différentes valeurs d'activité et de biomasse sèche obtenues en fonction de la vitesse d'agitation.

Tableau. IV.2: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour différentes vitesse d'agitation.

Vitesse (rpm)	Activité enzymatique (umol/ml.min)	Biomasse sèche (g/l)
150	**1.666**	**9.25**
200	**1.4**	8
300	**1.133**	**5.25**

A partir de **(Tableau. IV.2),** on a réalisé la (**Figure. IV.6).**

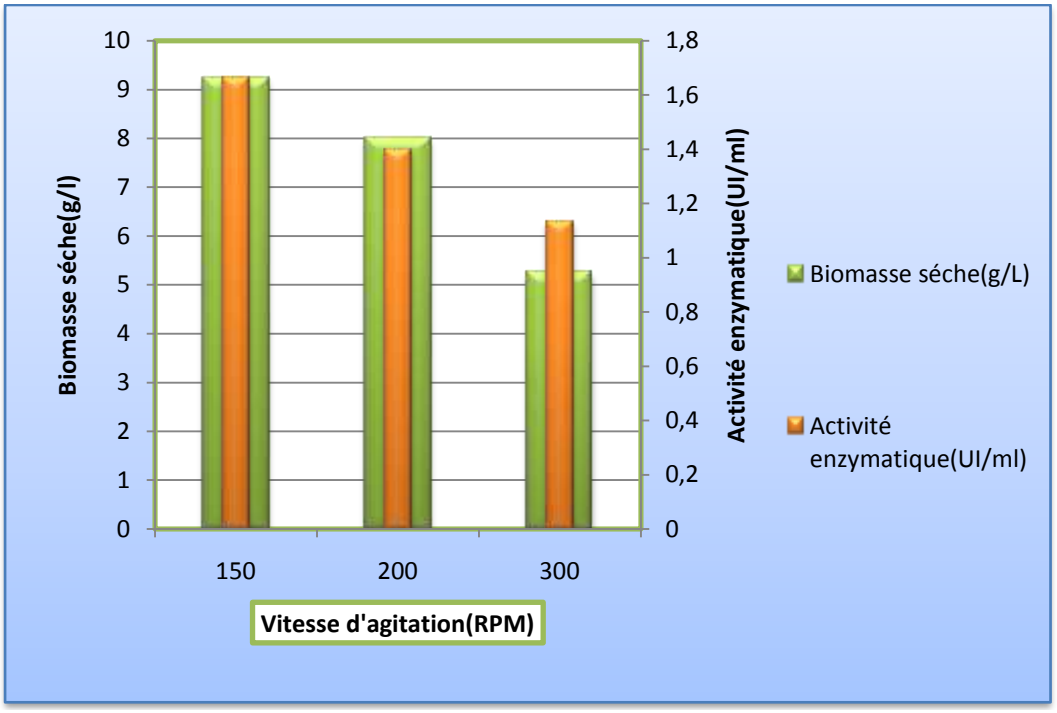


Fig. IV.6: Effet de la vitesse d'agitation sur la croissance bactérienne et sur la production de la lipase (pH=8; T°30; $t_{incubation}$=48h ; C=glucose ; N=NH_4Cl)

Nous avons vu que dans le milieu où la vitesse d'agitation est de 150rpm, une activité lipasique optimale a été obtenue accompagné de la production maximale en biomasse.

La production de la lipase diminue lorsque la vitesse d'agitation augmente 200 et 300rpm. La diminution en biomasse est plus importante que celui de l'activité lipasique. Ceci peut être interprété par une augmentation du stress sur les parois cellulaires, ce qui provoque une détérioration et la mort des bactéries. Un résultat similaire (180rpm) a été trouvé que la production de la lipase par *Bacillus.subtilis* [177].

c)-Sélection de la température optimale :

Pour déterminer l'effet de la température sur l'activité de la lipase, l'incubation a été effectuée à températures différentes allant de 4 à 45 ° C, et maintenir les autres conditions du procédé constants.

Résultats et Discussion :

Les résultats de dosage des acides gras produits, de l'activité enzymatique et de la biomasse produite en fonction de la température sont représentés dans le **(Tableau. IV.3).**

Tableau. IV.3: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour différentes températures.

Température (°c)	Activité enzymatique (umol/ml.min)	Biomasse sèche (g/l)
4	0	0
20	0.166	7.25
25	1.333	8.75
37	2.5	10
40	1.22	4
45	0.333	1.5

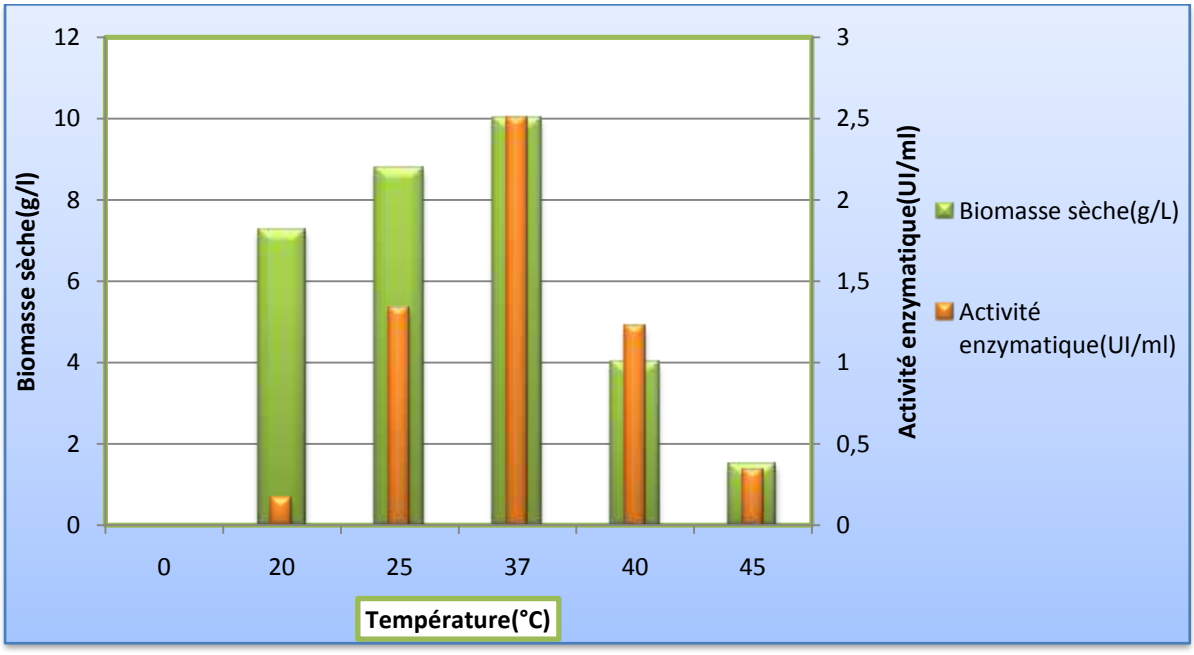


Fig. IV.7: Effet de la température sur la croissance bactérienne et sur la production de la lipase (pH=8 ; Agitation : 150rpm ; $t_{incubation}$=48h ; C=glucose ; N=NH_4Cl).

La production de la lipase et de biomasse augmentent avec la température. Nous avons observé que la production de la lipase était maximale à 37 ° C, les

résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par d'autres auteurs avec *Bacillus subtilis* (37°C) [177], *Rhodotorula glutinis* (30°C) [178] et *Penicillium citrinium* (22°C) [179].

La production de la lipase a diminué de façon drastique à des températures supérieures à 40 °C et a été presque totalement inhibée à la température de 45 ° C suite à la diminution de la production de biomasse.

Il existe cependant des enzymes actives à des températures extrêmes: *Cinnamomea antrodia* [180], *Pseudomonas sp* [181] produisant des lipases qui ont une activité maximale à 45°C et elles restent très actives à des températures allant jusqu'à 80°C.

d)-Sélection du pH optimal :

Pour la sélectionné le pH optimale pour la production de lipase, on réalise l'incubation à des pH différents, allant de 3 jusqu'à 9 à 37° C pendant 48 heures. Les autres paramètres étant inchangés. Par la suite, l'activité résiduelle a été dosée. Le pH du milieu a été modifié en utilisant des solutions de HCL (0.5N) et NaOH (0.2N).

Résultats et Discussion:

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau(IV.4).

Tableau. IV.4: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour différentes valeurs de pH.

pH	Activité enzymatique (umol/ml.min)	Biomasse sèche (g/l)
3	2.4	7.5
5	2.733	8.5
7	2.9	10.75
8	2.4	9.75
9	1.733	3.25

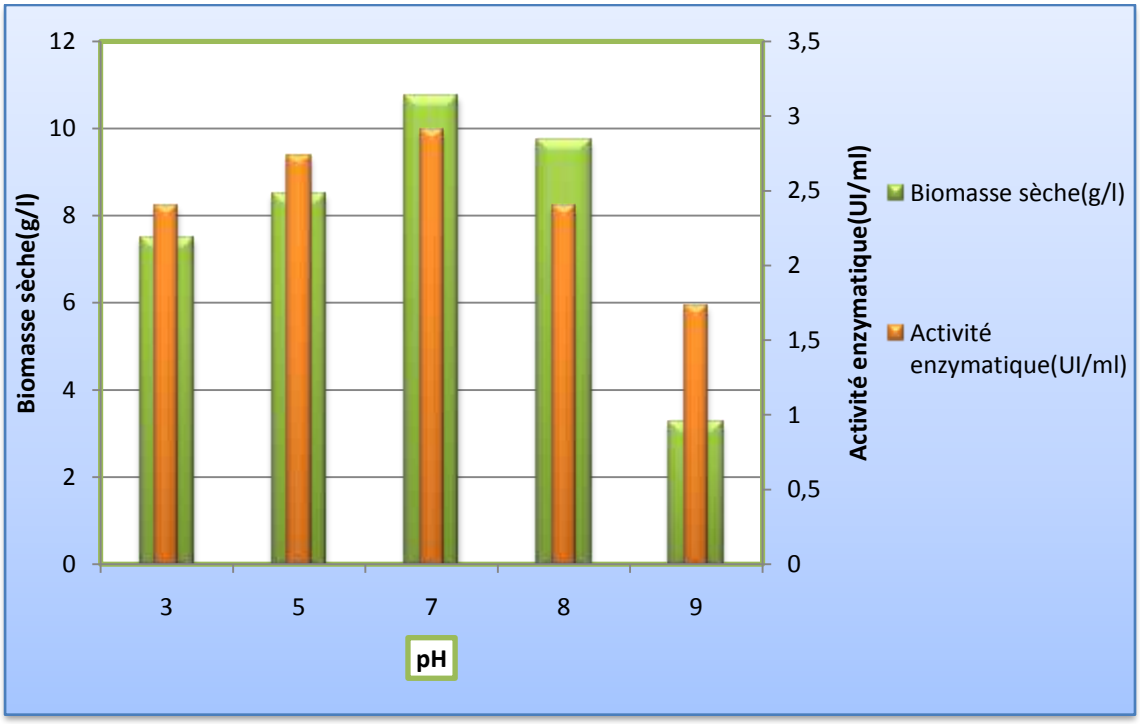


Fig. IV.8: Effet de pH sur la croissance bactérienne et sur la production de la lipase (T°= 37°C ; Agitation=150rpm ; $t_{incubation}$=48h ; C=glucose ; N=NH_4Cl).

On remarque sur la **Fig.IV.8.** Que la souche *Bacillus subtilis* supporte la croissance et par conséquent la production de la lipase pour des pH acides variant entre 3 et 6. Cette production atteint son maximum de 2.9 umol/ml.min pour un pH 7.

A pH plus élevé entre 7.5 et 9, l'activité enzymatique diminue suite à la diminution de la croissance et à la dénaturation, jusqu'à 1.7 umol/ml.min pour un pH 9.Donc le pH optimum a été trouvé à 7 ce qui est rapporté pour être inférieur à la valeur trouvée en utilisant d'autres organismes tel que *Rhodotorula glutinis* (pH= 8) [178] ou *Penicillium aurantiogriseum* (pH= 8) et *Aspergillus carneus* (pH= 9) [181].

D'autres lipases d'origine fongique ont généralement un pH optimum neutre ou légèrement acide tel que pour la lipase de *Yarrowia lipolytica* [180]. Les lipases peuvent être actives sur une large gamme de pH, ainsi la lipase de *Y. lipolytica* conserve au moins 60% de son activité à pH 4 et 8 [180].

e)- Effet de la nature de la source de carbone sur la production de lipase :

L'effet de sources de carbone sur la production de la lipase a été testé pour déterminer la source qui donne un meilleur rendement et pour voir, d'un autre coté, aussi si cette source est un stimulateur ou inhibiteur sur la production de lipase.

Ces sources de carbone ont été optimisées à une concentration de 4%, l'activité a été testée pour une durée de 48 heures d'incubation.

Quatre milieux ayant la composition de base du milieu de production mais contenant différentes sources de carbone et d'énergie ont été utilisés pour l'optimisation :

- **Milieu 1** : milieu + glucose 4g/l.
- **Milieu 2** : milieu + l'acide oléique 2.04g/l
- **Milieu 3** : milieu + l'huile de soja 2.04g/l
- **Milieu 4** : milieu + (glucose 2g et l'acide oléique 1.03g)

Le milieu de base contenant par ailleurs : NH4Cl, 1g/l **;** Na2HPO4. 2H2O = 7 g/l, K_2HPO_4, 3 g/l; NaCl = 0,5 g/l, $MgSO_4$ = 0,25 g/l, $CaCl_2$ = 0,02 g/l.

Résultats et Discussion :

L'effet du chaque source de carbone est exprimée par son activité enzymatique et les résultats obtenus sont représentés sur le tableau(**IV.5**).

Tableau. IV.5: valeurs de l'activité enzymatique et de la biomasse sèche pour différentes sources de carbone.

	Glucose	Acide oléique	Glucose+Acide oléique	Huile de soja
Activité enzymatique (umol/ml.min)	3.466	1.6	3.333	3.000
Biomasse sèche (g/l)	12.5	6.25	11.5	6

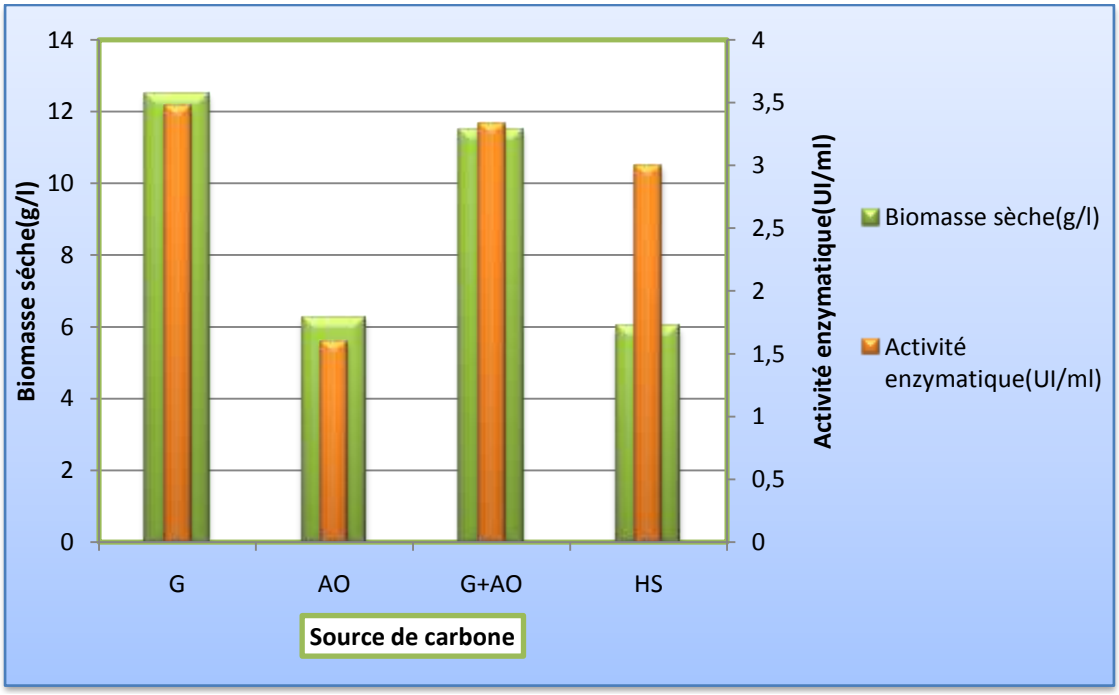


Fig. IV.9: Effet de source de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de la lipase (T°= 37°C ; Agitation=150rpm ; $t_{incubation}$=48h ; pH =7 ; N=NH_4Cl).

A partir des résultats obtenus, nous avons constaté que la production de la lipase était meilleure dans le milieu contient le glucose parmi les sources utilisées. La combinaison entre le glucose et l'acide oléique aussi donne une meilleure production qui n'était pas loin de la production maximale (environ 3.3 UE/mL).

L'acide oléique (insaturé) n'a pas favorisé la production de la lipase. Cependant, il pourra donner une production positive s'il est associé au glucose qui sera utilisé comme source d'énergie.

Par ailleurs, il s'est avéré que la présence de triglycérides n'est pas indispensable pour la production de la lipase. La production maximale (3.5 UE/mL) étant obtenue en utilisant le glucose comme substrat. L'enzyme est donc une enzyme excrétée naturellement par la bactérie. Elle n'est pas induite. C'est une enzyme constitutive et c'est un métabolite primaire associé à la croissance car on remarque que la biomasse atteint un maximum pour la même source de carbone optimale, le glucose.

f)- Effet de source d'azote sur la production de lipase :

Différents sources d'azote ont été ajoutées au milieu pour étudier l'effet des sources d'azote sur la production de la lipase. Parmi les différentes sources d'azote ajouté, NH_4NO_3 (0.8g/L), NH_4CL(1g/L) et NH_4CO_3(1.6g/l).

Résultats et Discussion :

Le (Tableau. IV.6) représente les résultats de la production de la lipase obtenues pour différentes sources d'azote.

Tableau. IV.6: valeurs de l'activité enzymatique et la biomasse sèche pour déférents source d'azote.

Source d'azote	NH_4Cl	NH_4NO_3	NH_4CO_3
Activité enzymatique (umol/ml.min)	3.666	2.766	2.133
Biomasse sèche (g/l)	12.5	12	5.75

A partir de ces résultats du tableau **.**IV.6, on trace l'activité de lipase en fonction de source d'azote.

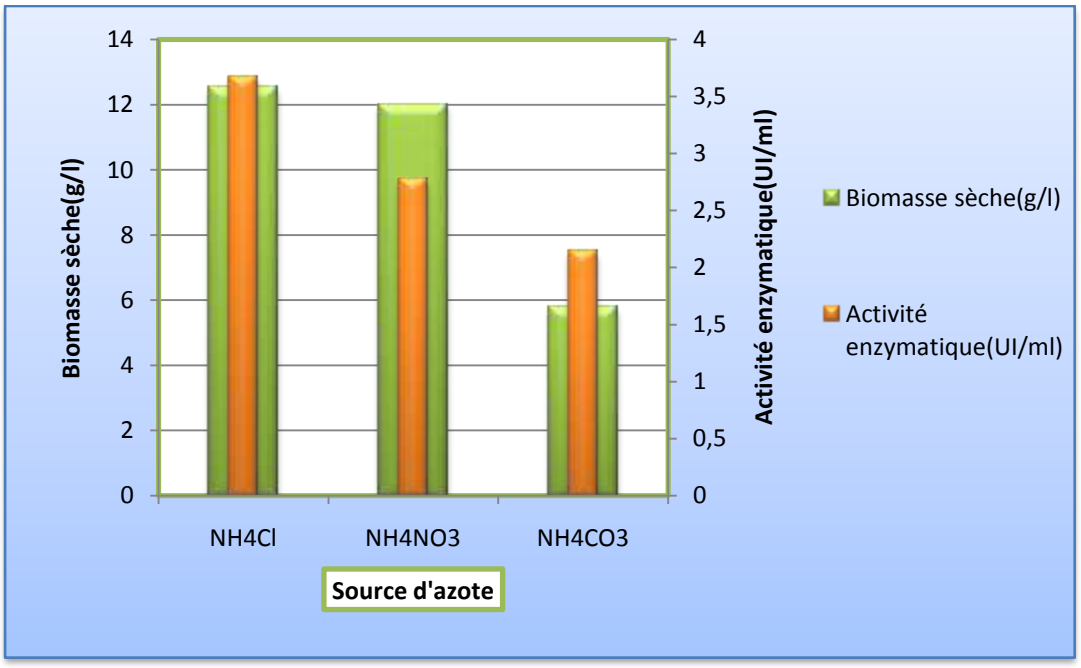


Fig. IV.10: Effet de source d'azote sur la croissance bactérienne et sur la production de la lipase (T°= 37°C ; Agitation=150rpm ; $t_{incubation}$=48h ; pH 7 ; C= glucose).

Trois sources d'azote étaient testées afin de déterminer leur influence sur la synthèse de lipase par *Bacillus subtilis.*

Toutes les sources utilisées sont des sources minérales. Afin de choisir une source minérale simple.

Les résultats révèlent que l'utilisation de NH_4CL comme la source d'azote donne une meilleure activité (3.7 UE/mL), comparativement à *Rhodotorula glutinis* [13] qui préfère l'addition du phosphate d'ammonium.

Le chlorure d'ammonium, NH_4CL, sera donc pris comme source d'azote pour la croissance et pour la production optimale de l'enzyme.

g)- Sélection de rapport C/N :

Pour sélectionner le rapport C/N nous avons fixé la source d'azote qui est le NH4CL à une concentration de 1g/l alors que la concentration de glucose est variée de façon à obtenir différents rapports molaires de C/N.

Résultats et Discussion:

Les résultats sont représentés sur le **tableau IV.7.**

Tableau. IV.7 : Effet du rapport carbone/azote (C/N) sur la production de la lipase.

Concentration de glucose (g/l)	Activité enzymatique (umol/ml.min)	C/N	Biomasse sèche (g/l)
1	0.8	1.8	9
2	2.5	3.6	10.5
3	3.0	5.4	11.5
4	4.0	7.2	12.5
5	3.4	9.0	12.25
6	2.1	10.8	11
10	0.53	18.0	10.5

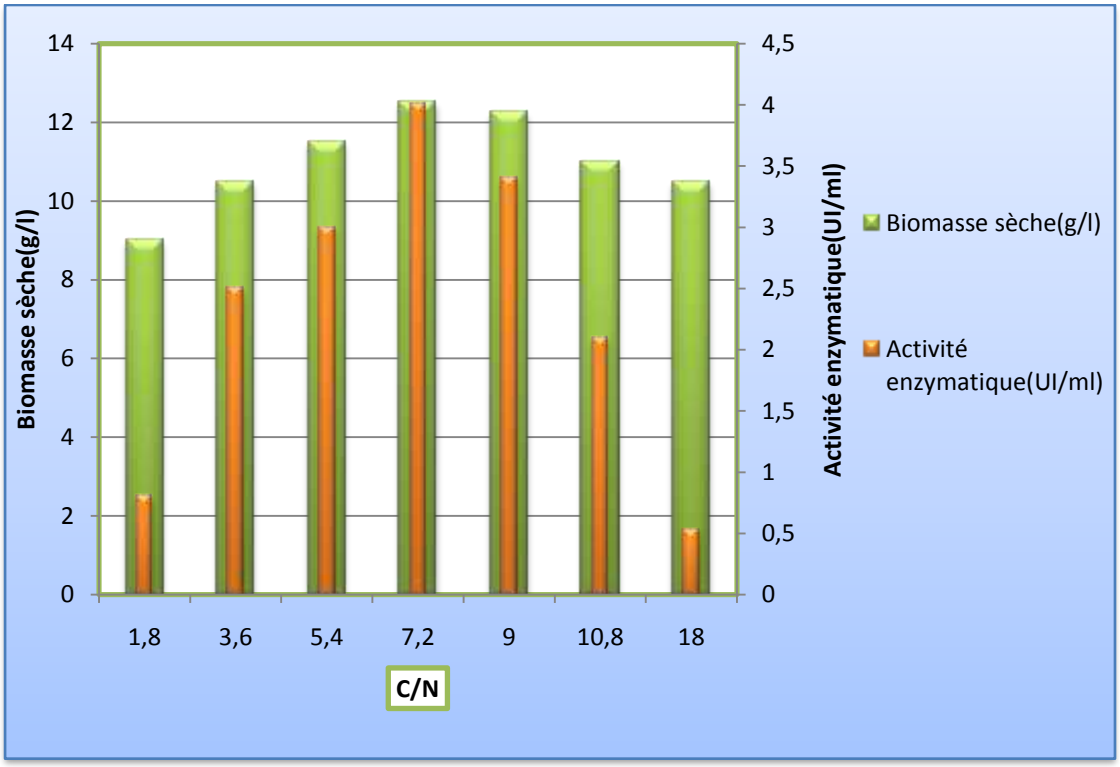


Fig. IV.11: Effet de C/N sur la croissance bactérienne et sur la production de la lipase (T°= 37°C ; Agitation=150rpm ; $t_{incubation}$=48h ; pH 7 ; C= Glucose ; N= NH4Cl).

La concentration croissante de glucose a fait augmenter l'activité lipasique pour atteindre une valeur maximale de 4 UI/ min pour une concentration en glucose de 4 g/l. Cependant, au delà de cette concentration l'activité de la lipase dans le surnageant a diminué jusqu'à 0.53 µmol/ml.min pour une concentration de glucose égale à 10g/l (Tableau 1). Cela peut être attribué à l'inhibition par le substrat [181].

h) Suivi des cinétiques de la croissance bactérienne et de la production de la lipase dans les conditions optimales.

On suit la production en biomasse sèche et la production de la lipase en fonction du temps, pendant 72 heures, sous les conditions optimales déterminées. Pour cela, on prélève des intervalles de temps déterminés, 2ml de culture. La concentration en biomasse et l'activité enzymatique sont déterminées.

Résultats et Discussion :

Tableau .IV.8 : La variation de l'activité enzymatique et la biomasse sèche en fonction du temps :

Temps (h)	Activité enzymatique (UI /ml)	Biomasse sèche (g /l)
0	0	0
1	0	0.25
2	0	0.3
3	0	0.3
4	0	1
10	0.1	7
11	0.2	7.25
24	1.7	9
27	1.9	12.5
48	4.1	12.5
50	3.9	11
72	2.2	5

A partir des valeurs de tableau (IV.8) Nous avons obtenue la figure suivante :

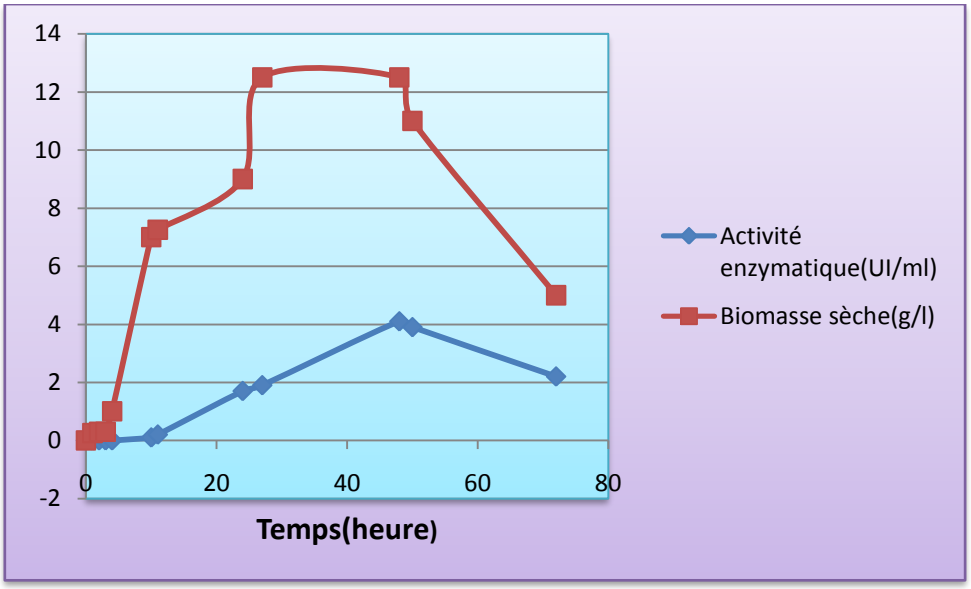


Fig. IV.12 : La variation de la croissance et de l'activité enzymatique en fonction du temps(T°= 37°C ; Agitation=150rpm ; $t_{incubation}$=48h ; pH 7 ; C= Glucose ; N=NH4Cl).

La courbe rouge représente l'évolution de la croissance bactérienne et la production de la lipase de en fonction du temps.

La croissance et par conséquent la production de la lipase étaient très faibles aux premières heures et pas d'activité, c'est la phase de latence.

A partir de 4h la biomasse augmente rapidement jusqu'à 27 h où elle atteint une valeur de 12.5 g/L. Cependant, l'activité lipasique n'est détectée qu'après 10h. Elle atteint son maximum au bout de 48h à (3.9UI/mL).

Par la suite, la croissance s'arrête et on atteint la phase stationnaire à 27 heures, suivie rapidement par la phase de mort due à l'appauvrissement du milieu et la consommation totale du glucose. Durant la phase stationnaire les bactéries produisent toujours de la lipase mais le taux de production s'affaiblit.

L'expérience a montré que la lipase est un métabolite primaire vu que la production dépend de la croissance bactérienne, mais cette dépendance n'est que partielle.

IV. 8. Purification de la lipase :

Une des méthodes les plus simples, se prêtant le mieux à de gros volumes est la précipitation avec de l'acétone. La purification de lipase est réalisée selon cette procédure décrite dans plusieurs travaux [183, 184,185].

IV. 8 .1. Mode opératoire :

La première étape de séparation consiste à séparer la biomasse bactérienne de l'enzyme qui se trouve dans la solution (milieu appauvri). La séparation est effectuée par centrifugation du bouillon de la culture bactérienne effectuée dans les conditions optimales, à 5000rpm pendant 20min.

Les étapes de purification peuvent être décrites comme suit et sont représentées dans la **figure. IV.13** :

- Prendre 10 ml de surnageant est prélevé, le reste est ensuite refroidi à 4°C pour conserver l'enzyme.
- Par la suite, trois volumes d'acétone glacial sont versés goute à goute dans un volume de surnageant disposé sous agitation dans la glace pilée.
- Une fois l'acétone est versé totalement, le mélange (surnageant-acétone) est laissé dans le frigo pendant 2heures, il se forme alors un précipité blanc. Sa

récupération se fait par filtration sous vide, la poudre obtenue est la lipase partiellement purifiée (LPP).

La lipase partiellement purifiée est souvent stable et doit être généralement conservée à une température 4°C dans des conditions la protégeant de la dégradation chimique, thermique et biologique.



Le dispositif de purification de la lipase microbienne par l'acétone

Après 2 heures

Dans le frigo à T = 4°C

Il se forme

Un précipité



Filtration sous vide



Le dispositif de filtration sous vide

Séchage à l'aire libre (température ambiante)



Enzyme partiellement purifier

Fig. IV.13 : Technique de purification de lipase microbienne produit par précipitation à L'acétone.

IV. 8 .2.Mesure de l'activité enzymatique de la lipase semi purifié :

Pour mesurer l'activité enzymatique de la lipase semi purifié, nous avons suivi les étapes suivantes :

- La dissolution de l'enzyme sèche dans le tampon phosphate (pH=7).
- Préparation du milieu réactionnel qui contient 5ml d'huile émulsionné, 4ml du tampon, 1ml de $CaCl_2$, et 1 ml de la solution enzymatique préparé.
- Le dosage des acides gras libres par le NaOH après 30minutes (le temps de la réaction).

Résultat et discussion :

L'activité enzymatique obtenue était de 12 µmol/ml.min.

	Activité totale(UI)	Rendement de purification(%)
Extrait brute	40	-
Extrait purifié	36	90

La Méthode de séparation est assez simple et rentable, permettant l'obtention d'une enzyme semi-purifiée…La séparation et la purification permettent d'éliminer les impuretés contenues dans le bouillon de fermentation, les débris cellulaires et les métabolites secondaires solubles dans l'acétone ou qui n'ont pas les caractéristiques protéiques telles que les polysaccharides. Le produit obtenu possède une activité acceptable et comparable à l'activité obtenue dans les mêmes conditions avec la même souche [177]. Par ailleurs, la forme semi-purifiée est plus conservable que la forme brute. Cependant, il est possible d'obtenir une lipase plus pure dont l'activité spécifique est élevée en utilisant d'autres méthodes telles que les méthodes chromatographiques [177].

I. LES ENZYMES

I. 1.Introduction

Presque toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans les systèmes biologiques sont catalysées par des enzymes qui constituent la classe de protéines à la fois la plus vaste et la plus spécialisée. Ils représentent l'instrument primaire direct de l'expression de l'action du gène puisqu'ils catalysent les milliers de réactions chimiques qui constituent le métabolisme intermédiaire des cellules. Dans cette partie introductive, nous aborderons uniquement quelques notions générales sur les enzymes [1].

I. 2. Définition :

Les enzymes, peuvent être définies comme étant des biomolécules de nature protéique jouant le rôle de biocatalyseurs impliquées dans des réactions métaboliques spécifiques dans les organismes vivants ou dans des milieux et des conditions favorables après les avoir extraites de ces organismes.

Sans la catalyse enzymatique aucune forme de vie n'aurait pu exister. Par ailleurs, sans l'introduction des procédés enzymatiques dans la catalyse industrielle, l'innovation de Plusieurs produits nécessaires à notre vie quotidienne, n'aurait jamais vu le jour [2,3].

Les enzymes constituent la classe de protéines, à la fois la plus vaste et la plus spécialisée, qui en reconnaissant spécifiquement certaines molécules, accélèrent les réactions de transformation de ces molécules suffisamment pour que leur vitesse devienne compatible avec le fonctionnement de l'organisme [4,5].

I .3. Structure des enzymes :

Les enzymes sont le plus souvent des protéines, et sont donc constituées de chaînes d'acides aminés (fig. I .1).

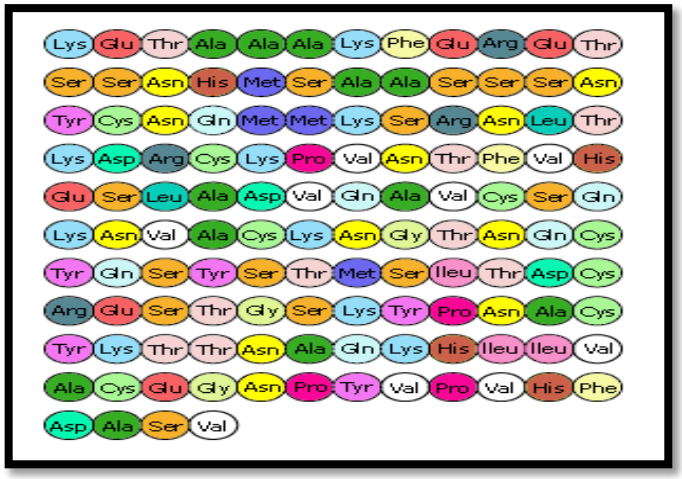


Fig. I.1 : Un enchaînement linéaire D'AC Aminés [6]

La partie importante de l'enzyme est constituée du site actif. Le site actif d'un enzyme est schématiquement formé par un petit nombre d'acides aminés organisés en un arrangement tridimensionnel précis formant une poche ou une crevasse dans la protéine (Fig. I.2).

Le site a une affinité élevée pour le substrat, parce que la nature chimique des acides aminés du site et leur arrangement spatial forment une région complémentaire de certains groupements de la molécule de substrat [7].

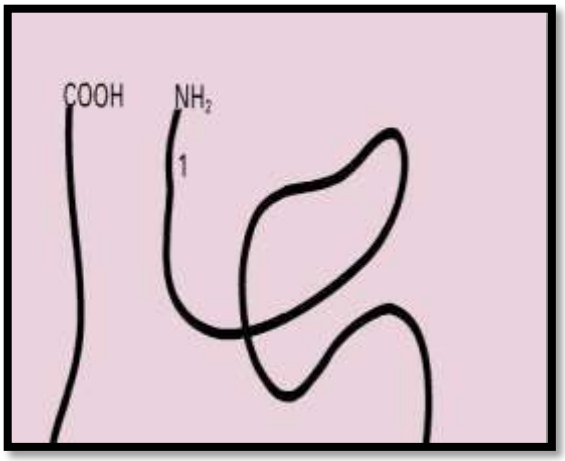


Fig. I.2 : structure du site actif [7]

I. 4. Propriétés générales des enzymes:

Comme tous les catalyseurs, les enzymes agissent à une très faible concentration, ils restent inchangés à la fin de la réaction qu'ils catalysent, et n'affectent pas l'équilibre d'une réaction réversible : ils augmentent simplement la vitesse à laquelle l'équilibre est atteint, augmentent la vitesse de réaction.

Pour simplifier, comme le montre la figure ci-dessous (ΔU : variation nette de l'énergie), un catalyseur (K) ,[un enzyme] diminue l'énergie d'activation E d'une réaction (qui transforme un substrat A en un produit B), en permettant la formation d'un ou plusieurs intermédiaires dont l'énergie d'activation est plus basse (E1, E2) [7].

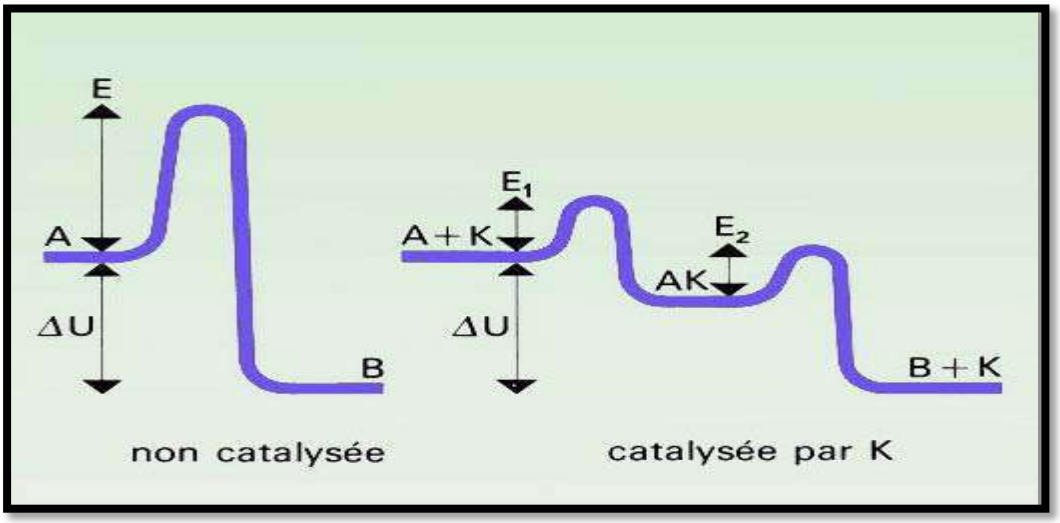


Fig. I .3 : l'action d'enzyme sur la vitesse d'une réaction [7]

I .5. Mécanisme d'action des enzymes :

Les progrès dans l'étude des mécanismes enzymatiques ont conduit au développement d'un modèle décrivant l'interaction entre le substrat et l'enzyme. Ce modèle, Proposé ultérieurement par KOSHLAND, implique un changement de conformation du site actif de l'enzyme lors de la fixation du substrat.

Ce modèle est connu sous le nom d'*ajustement induit* (*induced-fit*) et est illustré dans la **figure I.4**. Ce modèle implique que l'enzyme sélectionne spécifiquement Son substrat, non sur la base d'une complémentarité statique entre l'enzyme et le Substrat, mais en agissant comme des « pinces » qui se renferment pour piéger le Substrat. L'enzyme devient actif

uniquement dans sa forme fermée impliquant une Régulation de l'activité par la fixation du substrat [8].

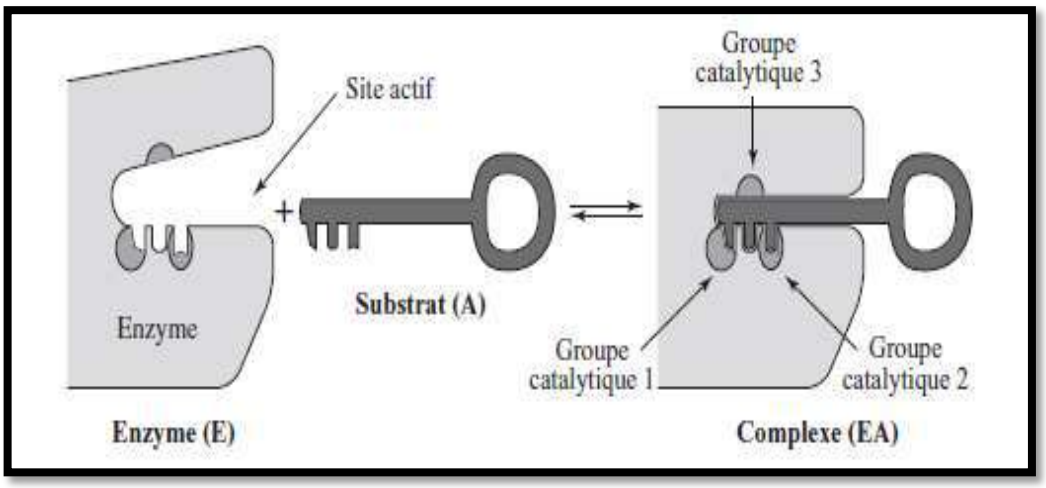


Fig. I.4 : Illustration du mécanisme d'ajustement induit proposé par KOSHLAND [8]

I .6. Fonctions des enzymes :

Les enzymes ont pour mission d'accélérer (catalyser) des millions de fois les réactions chimiques dans les organismes vivants. Il existe un grand nombre d'enzymes spécifiques qui jouent un rôle important dans les processus physiologiques (digestion, conduction nerveuse, synthèse d'hormones, etc.)[9]. On peut toutefois classer les enzymes en six catégories suivant la réaction biochimique qu'elles réalisent :

Tableau. I.1 : les différentes classes d'enzyme [9]:

N°	Classe de l'enzyme
1	les oxydoréductases (qui catalysent des réactions d'oxydoréduction (comme la peroxydase)
2	les transférases (qui catalysent le transfèrent d'un groupement fonctionnel d'une molécule à l'autre)
3	Les hydrolases (qui catalysent l'hydrolysent des liaisons chimiques, comme les nucléases qui coupent l'ADN ou l'ARN)
4	Les lyases (qui rompent des liaisons mais en produisent de nouvelles simultanément)
5	les isomérases (qui réarrangent les groupements fonctionnels d'une molécule pour former des isomères)
6	Les ligases ou synthétases (qui permettent la jonction de deux molécules (comme les ADN ligases)

I .7.Cinétique enzymatique Michaelienne :

I. 7.1. Vitesse (V) de la réaction en fonction de la concentration de substrat (S).
Equation de Michaelis-Menten :

Les enzymes (E) catalysent les réactions en formant un complexe avec leur substrat (S) au niveau de leur site actif. La façon la plus schématique et la plus simple de représenter La Réaction catalysée par un enzyme est la suivante [10] :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\longleftrightarrow}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$$

Où
- E = enzyme,
- S = substrat,
- ES = complexe enzyme-substrat,
- ki : constantes de vitesse,
- P = produit.

La vitesse υ de formation de produit est :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}\,[ES]$$

Si [**E**] 0 représente la concentration initiale en enzyme, on a :

$$[\mathbf{E}]_0 = [\mathbf{E}] + [\mathbf{ES}]$$

On peut voir sur la **(figure I.5)** que la concentration de **ES** se stabilise au bout d'un temps très court, ce qui permet de supposer l'établissement rapide d'un état quasi stationnaire.
Cette hypothèse est valable seulement si $[E]_0 << [S]_0$.
Avec l'approximation de l'état quasi stationnaire de Briggs et Haldane, on a :

[**ES**] = constante,

Alors, la vitesse de réaction est donnée par l'équation de **Michaelis-Menten :**

$$v = V_M \frac{[S]}{K_M + [S]} \qquad (1)$$

Avec :

$$V_M = k_{+2}[E]_0$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

Où V_M est la vitesse maximale de la réaction enzymatique, et K_M est la constante de **Michaelis** de l'enzyme.

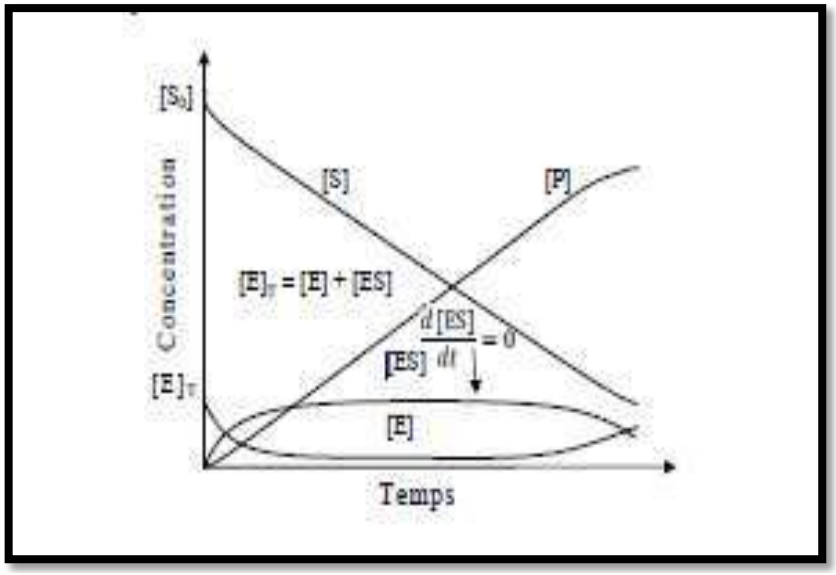


Fig. I.5 : Courbes d'évolution des composés lors d'une réaction de **Michaelis- Menten** [10]**.**

La représentation graphique de l'équation (1) permet de d'écrire le comportement cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en Substrat **(Figure I.6)** [11] :

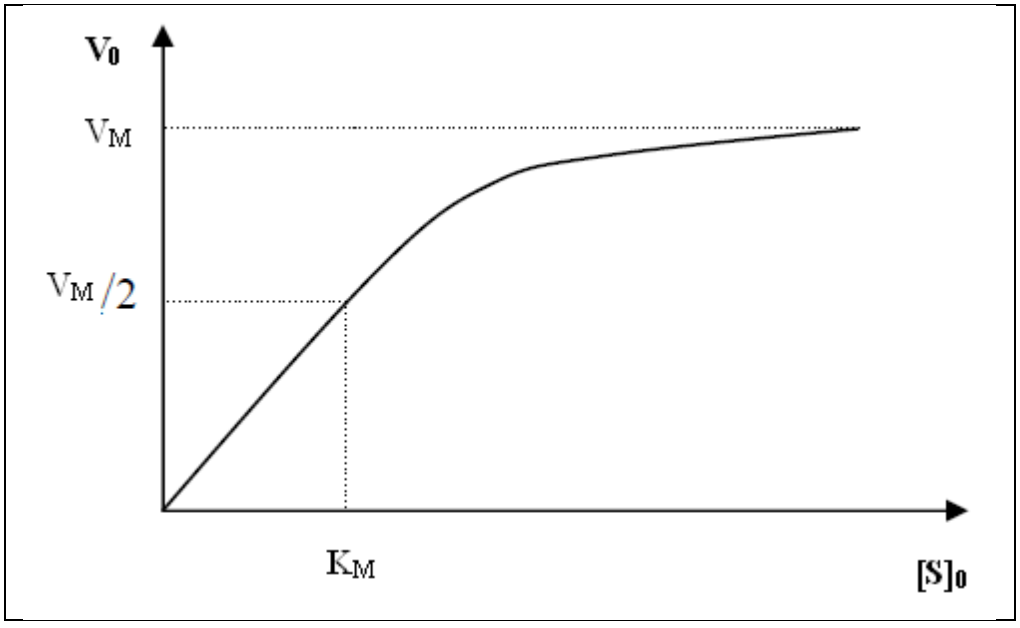


Fig. I.6 : représentation graphique d'une cinétique Michaelienne. Evolution de réaction Enzymatique en fonction de la concentration en substrat [12].

La détermination graphique directe de V_M et K_M n'est pas toujours précise, et d'autres méthodes ont été proposées, elles reposent sur une linéarisation de l'équation (1) de Michaelis-Menten, la plus connue est la représentation en double inverse selon Lineweaver-Burck représentée sur la **(figure I.7)** avec une autre représentation selon Eadie-Hosftee **(Figure I.8)** [11].

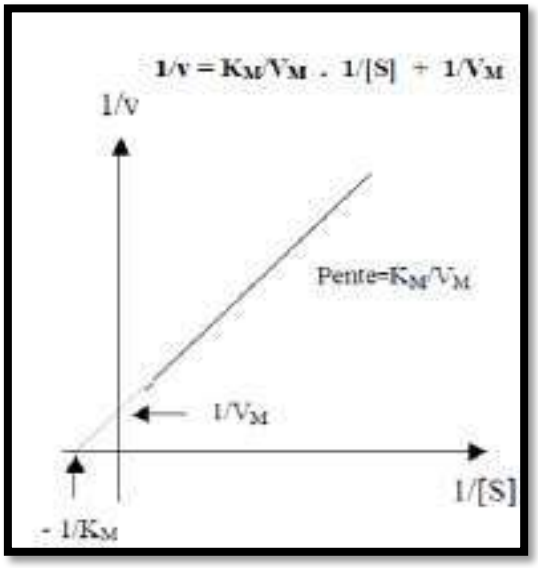


Fig. I.7 : Représentation graphique en double Inverse selon Lineweaver-Burck [12].

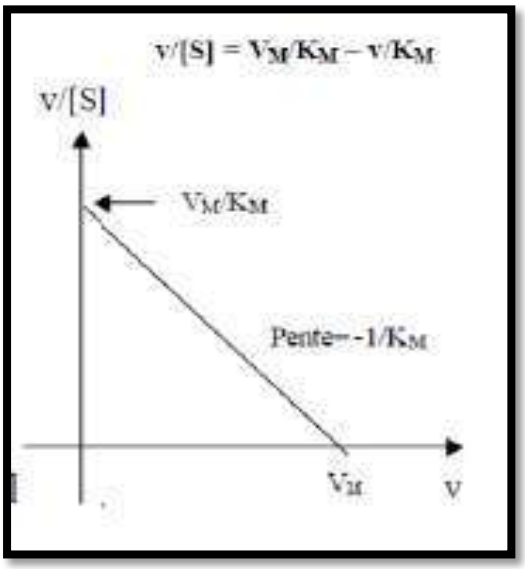


Fig. I.8 : Représentation graphique Selon Eadie-Hosftee [12]**.**

I .8. Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique :

I .8.1. Effet de la température :

Elle a deux effets sur la réaction enzymatique :

- Elle l'accélère, en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation ;
- elle entraîne progressivement la dénaturation de la protéine, donc sa désactivation.

La résultante de ces deux effets se traduit par une courbe V = f(T) **(Fig. I .9)** généralement dissymétrique, passant par une valeur maximale pour une température dite température Optimale **[**13**].**

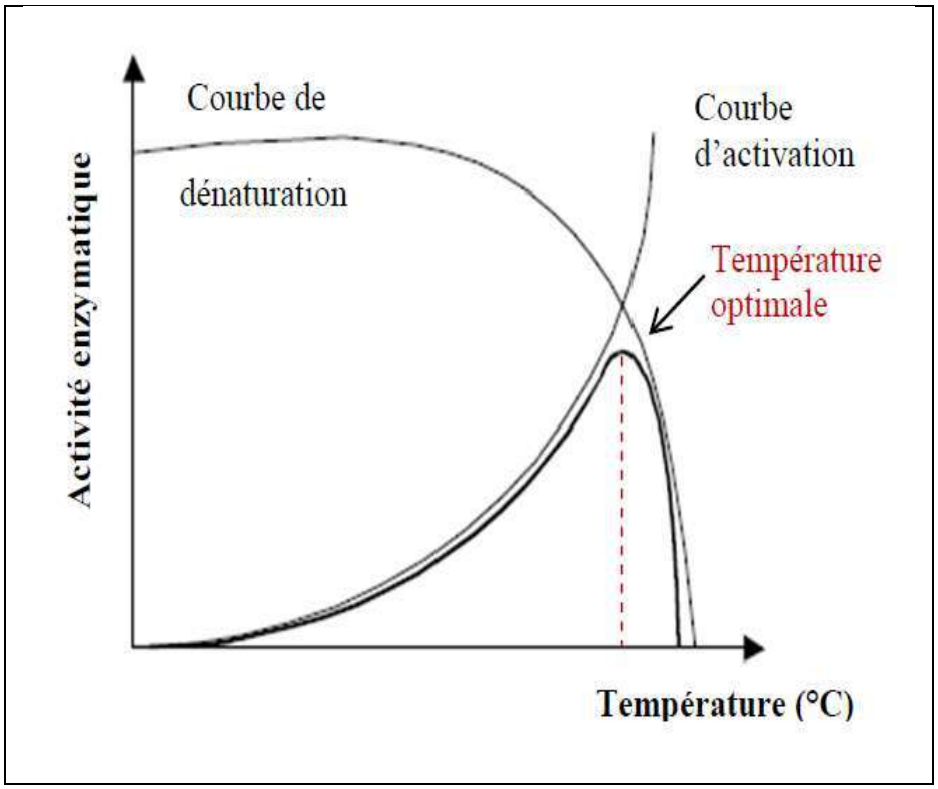


Fig. I .9. : Influence de la température sur la vitesse d'une réaction enzymatique [14].

I .8.2. Effet du pH :

Les enzymes ne sont en général actifs que dans une zone limitée de pH, et la plupart Ont une activité catalytique optimale à un pH particulier. Le pH peut affecter le K_M ou le V_M, Ou les deux à la fois [15].

I .8.3. Effet de la concentration en enzyme :

La réaction d'équilibre entre l'enzyme et son substrat est très rapide. En effet, L'addition de quelques molécules d'enzymes à la réaction augmente la concentration du Complexe enzyme-substrat (ES) et par conséquence la vitesse de la réaction. Cette vitesse V, Dépend de la concentration totale de l'enzyme $[E]_0$: $V = k[E]_0$ Avec k une constante de proportionnalité [16].

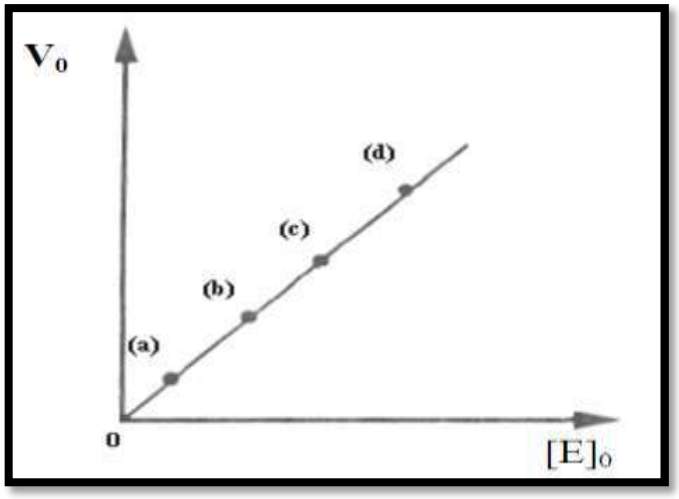


Fig. I.10 : représente l'influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale De la réaction enzymatique [10].

I .9. Effecteurs chimiques :

On distingue les inhibiteurs**,** qui diminuent l'activité enzymatique, et les activateurs**,** qui l'augmentent [13].

I .9.1. Inhibiteurs :

L'activité catalytique d'une enzyme peut diminuer et même complètement s'arrêter au contact de certaines substances chimiques. On reconnaît généralement deux modes d'inhibition différents:

- Un **inhibiteur compétitif** ressemble au substrat et entre en compétition avec lui pour s'introduire dans le site actif. Si le site actif est bloqué par un inhibiteur compétitif, l'enzyme ne peut plus fonctionner. L'inhibiteur compétitif a souvent une action réversible. Il peut se retirer du site actif si sa concentration devient faible dans le milieu [17].

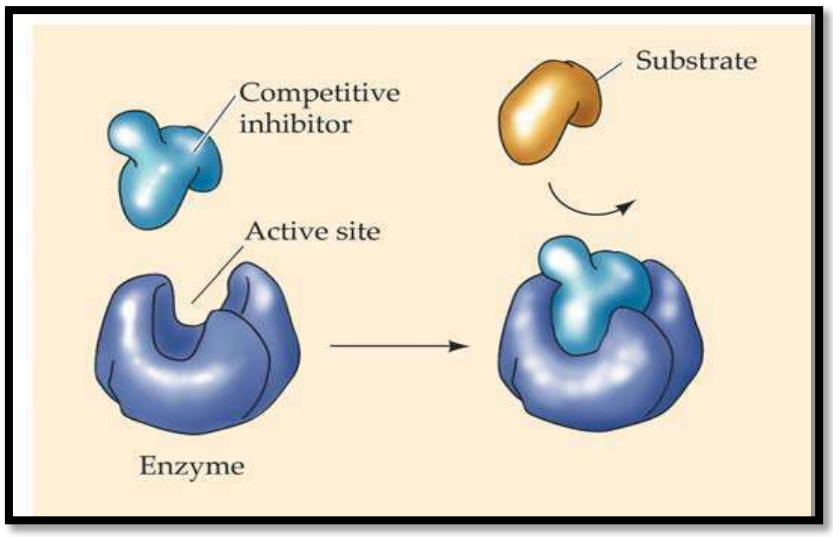


Fig. I .11.représentation d'une réaction enzymatique bloqué
Par un inhibiteur compétitif [18].

- Un inhibiteur **non compétitif** se lie à l'enzyme (en un point autre que le site actif) ce qui provoque la déformation du site actif.
- Le site actif déformé ne peut plus se lier au substrat, l'enzyme est inhibée. Leur liaison à l'enzyme peut être réversible ou irréversible. Plusieurs inhibiteurs non compétitifs réversibles sont des produits normaux du métabolisme [19].

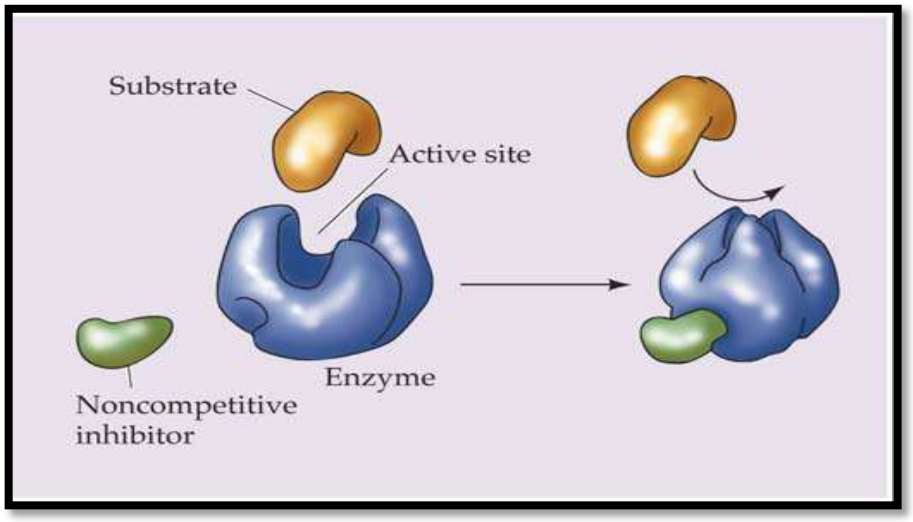


Fig. I .12.représentation d'une réaction enzymatique bloqué par un inhibiteur non compétitif [18].

I .9.2. Activateurs :

Les activateurs sont des molécules ou des ions qui s'associent à l'enzyme ou au Complexe ES, qui ont pour effet d'augmenter la vitesse des réactions enzymatiques sans être Eux-mêmes impliquées dans la réaction catalysée par l'enzyme. Parmi les activateurs que L'on rencontre fréquemment, il y a les cations métalliques [20].

I.10. Activité enzymatique :

I.10.1. Activité enzymatique (ou catalytique)

Cette unité a été définie pour estimer la quantité de l'activité catalytique d'une préparation ou d'un échantillon d'enzyme lorsque l'enzyme ne peut être défini que par rapport à son activité catalytique.

Une unité d'activité enzymatique (abréviation U.I. ou U.E.) est définie comme la quantité d'enzyme qui produit la transformation d'une micromole de substrat par minute à 25°C (µmole min- 1).

Remarque :

Dans le système international (S.I.), l'unité officielle est le katal (kat) : quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par seconde. Les biochimistes Préfèrent utiliser les unités internationales (U.I. ou U.E.) [21].

I.10.2. Activité enzymatique (ou catalytique) spécifique :

C'est l'activité d'une préparation d'enzyme, normalisée par unité de masse exprimée Classiquement en mg : micromole de substrat par minute par milligramme de l'échantillon (µmole min-1 mg-1).Dans le cas d'un échantillon pur, et si la quantité d'enzyme est exprimée En µmole, on retrouve la constante catalytique, exprimée dans ce cas en (min-1) [21].

I.11. Application industrielles des enzymes :

Les principaux domaines d'utilisation sont l'industrie des détergents, de l'amidon, l'agroalimentaire (alimentation humaine et animale), la chimie fine et le secteur de la santé, ainsi que les domaines de l'analyse et des capteurs.

a). Détergents

L'utilisation des enzymes dans l'industrie des détergents représente l'application industrielle la plus importante à la fois en termes de valeur et de quantité.

Les enzymes les plus utilisées sont les protéases, mais beaucoup d'autres hydrolases peuvent également être ajoutées aux préparations pour aider à l'élimination de taches très diverses.

Les marques de lessive les plus performantes combinent protéases, amylases, lipases et cellulases pour augmenter l'efficacité du lavage. Chacune de ces enzymes est capable d'attaquer un type particulier de tache ou de salissure. Le fait d'inclure plusieurs types d'activité enzymatique dans le détergent permet ainsi d'éliminer des salissures contenant différentes substances. Par exemple, une tache alimentaire peut contenir des protéines, des lipides (gras) et de l'amidon,…etc. [22].

b). L'industrie alimentaire :

Au cours des fermentations alimentaires, ce sont les multiples enzymes des cellules microbiennes qui provoquent les modifications complexes observées. Il est également possible de faire intervenir des enzymes seules, en l'absence de toute cellule vivante. Ces enzymes jouent plusieurs rôles dans les productions alimentaires industrielles :

- Faciliter le procédé de préparation (exemple : les jus de fruits ou de légumes sont plus faciles à filtrer après hydrolyse enzymatique des macromolécules en suspension)
- Améliorer la texture (exemple : la formation de gel dans certains jus de fruits concentrés sucrés est évitée en hydrolysant la pectine naturelle par des pectinases)
- Provoquer une insolubilisation de certaines molécules (exemple : l'utilisation de la présure bovine ou microbienne pour la coagulation de la caséine du lait dans la fabrication des fromages) Clarifier et stabiliser certains liquides en vue de

la conservation (exemple: l'emploi de cellulases et de pectinases permet de clarifier le vin et les jus de fruits)

- Améliorer les qualités organoleptiques (exemple : l'ajout de lipases à certains fromages
- Augmenter le rendement (exemple : la saccharification du moût de céréales peut être amplifiée par améliore leur saveur) l'addition d'amylases au cours de la préparation de la bière)
- Améliorer la digestibilité (exemple : l'hydrolyse enzymatique du lactose du lait permet d'éviter les symptômes d'intolérance au lactose)
- Permettre la production de nouveaux produits ou la mise au point de nouveaux procédés de fabrication (exemple : la valorisation du lactosérum, la préparation de sirops ou d'alcools à partir d'amidon de céréales ou de cellulose...)Sauf quelques exceptions (comme la présure bovine utilisée dans les fromageries ou la papaïne extraite d'un fruit tropical et employée dans la préparation de la bière), les enzymes utilisées dans l'industrie alimentaire sont d'origine microbienne [22].

c). L'industrie chimique et pharmaceutique

L'utilisation d'enzymes pour la synthèse de composés chimiques variés présente certains avantages par rapport à la synthèse chimique :

- Procédé moins polluant, mais qui doit être mis en œuvre en présence de solvants non aqueux
- et plus grande spécificité d'action.
- La synthèse chimique nécessite trois étapes mettant en œuvre des réactifs toxiques et demandant des conditions réactionnelles assez drastiques. La bioconversion se fait en une seule étape, dans des conditions réactionnelles douces et sans autre réactif que des enzymes et leurs substrats [22].

d). Industrie papetière

Certaines étapes du procédé de fabrication de la pâte à papier se déroulent à des températures de 130 à 190 °C, en présence de fortes concentrations de soude ou d'acides, soit dans des conditions telles que les enzymes ne peuvent être, pour l'instant, utilisées à ce stade de préparation.

En revanche, on utilise déjà des enzymes pour améliorer le drainage des pâtes avant fabrication (cellulases), pour le blanchiment des pâtes chimiques (xylanases), pour le désencrage (cellulases), pour la modification de l'amidon utilisé comme additif pour la fabrication de certains papiers (amylases) ou encore pour l'élimination de certains sous-produits gênants (lipases).

Les enzymes sont devenues des outils indispensables et en plein développement dans cette industrie : amélioration des rendements, réduction des quantités de produits chlorés, etc.

Concernant, la réduction des déchets organochlorés provenant des agents chimiques de blanchiment, de nouveaux procédés enzymatiques ont été mis au point en 1995 permettant d'obtenir le même degré de blanchiment pour une consommation en chlore inférieure d'un tiers environ [22].

e). Industrie textile :

L'industrie textile utilise des enzymes pour déférentes application comme :

Amylases/ cellulase ⟹ délavage des jeans

Amylases bactérienne ⟹ désencollage de l'amidon

Cellulase diverses ⟹ « anti-bouloches »

II. LA LIPASE

II.1. Généralités sur les lipases :

II.1.1 Introduction ;

Encore appelées triacylglycérols acyl hydrolases (EC.3.1.1.3), les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol.

L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques insolubles dans l'eau se produit à l'interface entre lipide et eau [23]. ces enzymes, présentes chez tous les organismes vivants, jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides.

Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse tel que l'estérification (réaction Entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acyle d'un ester sur d'autres Nucléophiles tels que des amines ou des thiols.

Les lipases présentent des propriétés catalytiques variables suivant les différentes espèces.

- Les lipases extracellulaires de *Cinnamomea antrodia* [24] et de *Penicillium aurantiogriseum* ont un pH optimum de 8, tandis que celle d'*Aspergillus carneus* est de 9[25].
- D'autres lipases d'origine fongique ont généralement un pH optimum neutre ou légèrement acide tel que pour la lipase de *Yarrowia lipolytica* [26].
- Les lipases peuvent être actives sur une large gamme de pH, ainsi la lipase de *Y. lipolytica* conserve au moins 60% de son activité à pH 4 et 8 [26].
- Concernant la température, de nombreuses lipases microbiennes ont une activité maximale Située entre 30 et 40°C.
- Les lipases d'*Aspergillus carneus et de Y. lipolytica* par exemple, ont une activité maximale à 37°C [27-26]. Il existe cependant des enzymes actives à des températures extrêmes: *Cinnamomea antrodia* [24], *Pseudomonas sp* [28] produisent des lipases qui ont une activité maximale à 45°C et elles restent très actives à des températures allant jusqu'à 80°C.

Les triglycérides sont les substrats préférentiels de la plupart des lipases. Certaines lipases hydrolysent indifféremment tout types de liaisons ester des triglycérides, ne faisant pas

de discrimination entre leurs positions dans la molécule. Ce sont par exemple les lipases de *Penicillium expansum* [29] et de *Pseudomonas cepacia* [30].

La lipase de *Thermomyces lanuginosa* en est un exemple, elle est toutefois non sélective vis-à-vis de la longueur de chaîne des acides gras ou des espèces triglycéridiques [31].Cette sélectivité entraîne l'apparition d'une concentration équimolaire en diglycérides 1,2 et 2,3 lors de la réaction. L'hydrolyse plus complète entraîne l'apparition de monoglycérides, Puis de glycérol et des acides gras**.**

La polyvalence réactionnelle des lipases et la diversité de leurs propriétés catalytiques leur confèrent une place de choix pour des applications industrielles potentielles, telles que la confection de produits alimentaires, de détergents, de produits pharmaceutiques et cosmétiques.

L'utilisation des lipases dans ces nombreux secteurs nécessite une formulation préalable.

II.1.2. Origines et classification des lipases :

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses.

On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux micro-organismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires.

a). Les lipases végétales :

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes [32].

Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante [33]. Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes.

- Le premier groupe est constitué par les triacylglycérol hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines.

Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de l'altération des graines pendant le stockage.

- 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 [34].

Les principales acylhydrolases sont les phospholipases A et B ; les glycolipases, les sulfolipases et les monoglycérides lipases.

- La troisième groupe est constitué par les phospholipases C et D.

Les liaisons hydrolysées par les phospholipases sont représentées sur la figure(II.1).

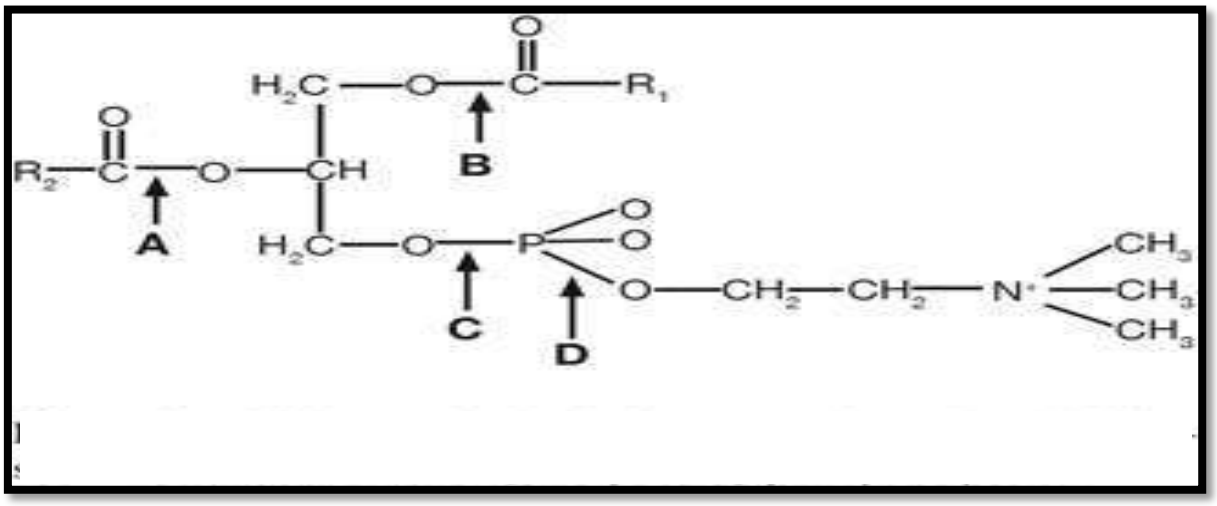


Figure II.1 : Liaisons hydrolysées par les phospholipases[34].

Les lipases végétales interviennent également dans le métabolisme, le réarrangement et la dégradation de la chlorophylle lors de la croissance et de la sénescence des feuilles ainsi que dans le processus de mûrissement des fruits.

Chez les plantes supérieures, les lipases interviennent dans la biosynthèse de transducteur intervenant dans les mécanismes de régulation ou de défense contre une variété de pathogènes [35].

Certaines protéines végétales possédant une activité lipolytique peuvent avoir un effet cytotoxique pour les cellules animales. Par exemple, la ricine, une glycoprotéine isolée de la graine de Ricinus communis, induit le blocage de la synthèse des protéines par inactivation des ribosomes [36-37-38].

Leur étude a permis leur utilisation comme immunotoxines dans le traitement de certains cancers [39].

D'un point de vue industriel, l'intérêt des lipases végétales n'a cessé de s'accroître depuis quelques années, notamment dans le domaine de la biotransformation de lipides. en effet, les lipases végétales sont facilement isolées à partir de graines [40] et elles présentent des spécificités de substrat atypique comparées aux lipases microbiennes [41].

b). Les lipases de mammifères

Les lipides constituent pour les mammifères une source énergétique essentielle et avantageuse de par leur faible densité. Chez l'homme, ainsi que chez d'autres vertébrés, 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 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 effet, les lipases jouent un rôle important dans la digestion chez le nouveau-né dont l'alimentation est riche en lipides [42].

Les tissus adipeux contiennent également une lipase hormonosensible qui est activée par les hormones lipolytiques, telles que le glucagon, via un mécanisme de phosphorylation et déphosphorylation spécifique dépendant de l'AMP cyclique.

Les lipases de mammifères les plus étudiées sont les lipases liées à la digestion des graisses et à leur absorption. Il s'agit de la lipase gastrique, de la lipase pancréatique, de la lipoprotéine lipase et de la lipase hépatique.

Des études de la structure de leurs gènes suggèrent que ces différents enzymes dérivent d'un ancêtre commun [42].

La lipase gastrique, sécrétée par la muqueuse gastrique, hydrolyse les lipides alimentaires dans l'estomac. Elle ne nécessite pas la présence de cofacteurs pour être active ; elle est stable et active à des valeurs de pH proches de 1 et elle est résistante à la pepsine ainsi qu'aux protéases gastriques [43-44-45].

La lipase pancréatique est le principal enzyme responsable de la digestion des lipides alimentaires. Elle agit principalement sur les diglycérides libérés par la lipase gastrique. elle est sécrétée dans le duodénum et fonctionne à des pH légèrement alcalins,contrairement à la lipase gastrique.

Les produits de la lipolyse sont, suite à son action, véhiculés à l'aide des agents tensioactifs naturels que sont les sels biliaires. L'activité de la lipase pancréatique peut s'exercer en présence ou en absence des sels biliaires. En leur absence, la lipase s'adsorbe d'abord à l'interface lipide / eau avant d'hydrolyser les esters carboxyliques.

Par contre, en présence de ces sels biliaires, la lipase pancréatique est inactive, mais son activité est restaurée par un cofacteur protéique appelé colipase [46].

Les sels biliaires sont essentiels pour l'assimilation des lipides. En effet, sans l'interface eau / lipide de l'émulsion formée avec les sels biliaires, la lipolyse des triglycérides serait 2 à 4 fois moins efficace [47].

La lipoprotéine lipase joue un rôle dans le métabolisme intermédiaire des lipides. Elle permet l'hydrolyse et l'absorption, par les tissus, des triglycérides transportés dans le sang sous forme de lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL).

La lipase hépatique joue également un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines circulant dans le sang. Elle est capable d'hydrolyser les glycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol. Elle peut aussi catalyser la trans-estérification entre glycérides.

c). Les lipases microbiennes

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux.elles sont aussi 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*.

Bien que les premières lipases étudiées fussent d'origine animale, l'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans des domaines très variés.

Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale et d'autre part, d'avoir une plus grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques.ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux.

d). Les cutinases :

Les cutinases sont des enzymes produites par différents champignons pathogènes et phytopathogènes tels que *Fusarium solani*, qui est l'agent responsable de la formation de mycétome chez l'homme [48] ou tels que *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* qui est responsable de la pourriture de la racine et du collet chez la tomate et certaines céréales [49].

Les cutinases sont capables de dégrader la cuticule des végétaux en clivant les liaisons esters des polymères de cutine. elles sont également capables d'hydrolyser des triglycérides à courtes et longues chaînes d'acides gras avec une efficacité comparable à celle de la lipase pancréatique [50].

Les cutinases sont des enzymes qui peuvent être apparentées aux lipases et estérases à la différence qu'elles ne nécessitent pas d'activation interfaciale pour être efficaces [51].comme elles sont actives aussi bien en solution moléculaire vraie qu'en système biphasique, les cutinases sont en quelque sorte le lien entre estérases et lipases.

II.1.3. Séquence, structure et mécanisme réactionnel :

C'est au début des années 1980 que les premières lipases et estérases ont été purifiées et caractérisées au point de vue biochimique.a ce jour, plusieurs centaines de séquences sont répertoriées dans les bases de données telles que Swiss-Prot [52].

Comme il a déjà été mentionné précédemment, les lipases sont des enzymes très variables de par leurs origines et leurs spécificités de substrat. les plus petites ont des masses moléculaires de 20-25 kDa tandis que les plus grosses ont des masses moléculaires de 60-65 kDa [53].

Les premières structures cristallographiques publiées ont été celle de la lipase du champignon filamenteux *Rhizomucor miehei* [54] et celle de la lipase pancréatique humaine [55]. Depuis lors, ce sont plus de 60 structures tridimensionnelles qui sont accessibles au NCBI [56].

Bien que les séquences peptidiques montrent très peu de similitude entre elles, principalement en raison de l'hétérogénéité de leur origine, les lipases présentent dans l'ensemble la même structure tridimensionnelle [57- 58]. Différents travaux ont cependant permis le regroupement des lipases en sous-familles en fonction de leurs origines et de leurs rôles physiologiques respectifs [59- 60-61].

Cependant, la découverte constante de nouvelles lipases ainsi que leurs caractérisations conduiront à l'évolution de cette classification. Récemment, l'analyse de la relation séquence–structure–fonction de 1 367 séquences protéiques correspondant aux 806 lipases répertoriées dans la base de données LED (Lipase Engineering Database)[62] a permis de les classer en 16 superfamilles et 38 familles homologues [63- 64].

II.1.3.1. Les α/β hydrolases :

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 dièlactone hydrolase, l'haloalkane déhalogénase.

Ces enzymes ont tous en commun un domaine structural central typique formé par 8 brins β connectés par 6 hélices α formant un repliement dit α/β [57].

Autour de ce domaine central, viennent se greffer diverses structures peptidiques responsables des propriétés catalytiques de l'enzyme ainsi que de sa spécificité de substrat.

Le site catalytique des lipases est constitué d'une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique (Asp, Glu) dont l'ordre d'apparition dans la séquence primaire est Ser-

Asp/Glu-His. De plus, la sérine catalytique est généralement incluse dans le pentapeptide Gly-X1-Ser-X2-Gly où X1 et X2 représentent un acide aminé variable.

Ce penta peptide est, en général, la seule portion de séquence peptidique conservée chez les lipases. La sérine catalytique est toujours située dans un coude nucléophile situé à l'extrémité C-terminale du 5e brin β et immédiatement suivi d'une hélice α (Figure II.2).

L'histidine de la triade catalytique est située à l'extrémité carboxy-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 [65-66- 53].

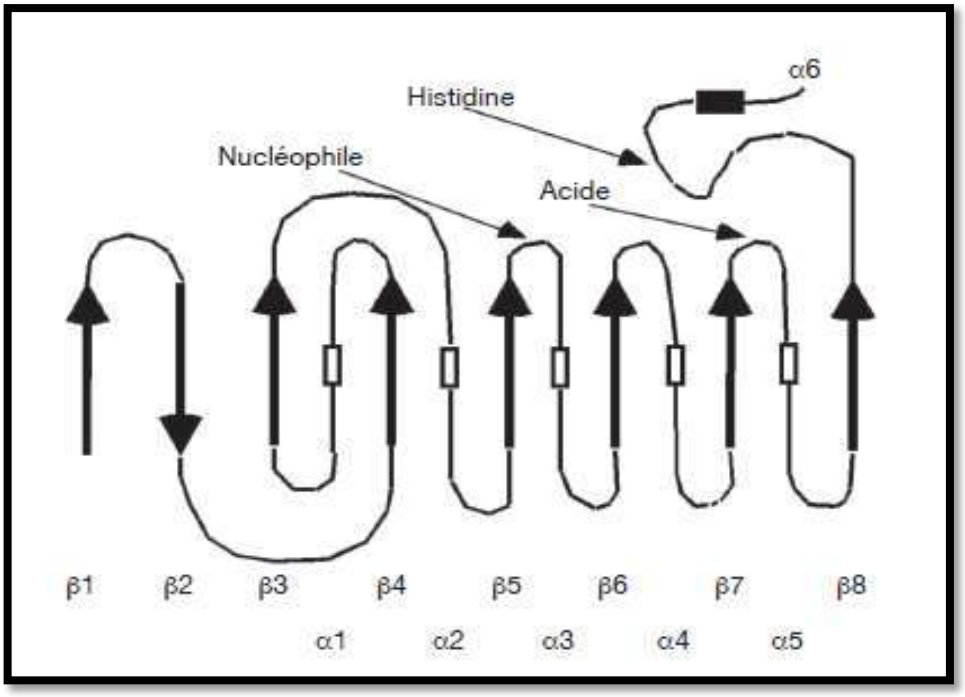


Figure II.2 : schéma du repliement α/β [67]

- Les flèches représentent les feuillets β et les rectangles les hélices α.
- Le rectangle noir représente le volet amphiphile.

II.1.3.2. Mécanisme enzymatique d'hydrolyse :

Le mécanisme enzymatique des lipases montre quelques similitudes avec celui des protéases à sérine active. Contrairement aux autres hydrolases, le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice α amphiphile d'une quinzaine d'acides aminés qui agit comme un volet [68- 65-69] (Figure I.2).

Lorsque cette hélice α recouvre le site actif, l'enzyme est dans sa forme fermée ou inactive. Dans cette conformation, la face hydrophobe de cette hélice amphiphile est en interaction avec des résidus hydrophobes entourant le site actif tandis que sa face hydrophile interagit avec des molécules d'eau. Le substrat ne peut donc pas être en interaction avec la triade catalytique.

Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme et suite au mécanisme d'activation interfaciale, il y a un déplacement de l'hélice α constituant le volet.

La face hydrophobe de l'hélice orientée auparavant vers l'intérieur du site actif s'expose au solvant, créant une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface eau / corps gras. Le site actif de l'enzyme est dès lors accessible au substrat.

La résolution de structures cristallographiques des lipases de *R. miehei* [70], de *Geotrichum candidum* [71] et de la lipase pancréatique humaine [72-73] a permis de mettre en évidence l'existence de cette hélice amphiphile recouvrant le site catalytique.

Cependant, certaines lipases sont capables d'hydrolyser des lipides en dessous de leur concentration micellaire critique et il a été montré que l'augmentation de leur concentration au-delà de leur CMC n'entraîne pas une brusque augmentation de la lipolyse [74].

Pour expliquer cette observation, l'hypothèse la plus plausible est qu'il existe, en solution aqueuse, un équilibre entre forme ouverte et forme fermée de l'enzyme et que le passage vers la forme ouverte correspond au déplacement de cette hélice α amphiphile recouvrant le site actif.

D'un autre côté, il a été démontré que même en deçà de leur CMC, les molécules de substrat ont tendance à former de petits agrégats [75] formant dès lors des micelles transitoires pouvant conduire au mécanisme d'activation interfaciale [76 -74].

D'autre part, des études cinétiques et structurales d'enzymes lipolytiques telles que la cutinase de *Fusarium solani* [51], des lipases de *Candida antarctica* [77], de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Bacillus subtilis* [78] ainsi que de la lipase pancréatique du cochon d'Inde [79] ont montré d'une part, qu'elles étaient actives sur des esters carboxyliques partiellement solubles en phase aqueuse (tributyrine, butyrate de p-nitrophényl) et d'autre part, qu'elles ne présentaient pas de mécanisme d'activation interfaciale.

Pour certaines de ces enzymes, les analyses cristallographiques ont mis en évidence l'absence d'hélice amphiphile recouvrant le site actif. En conséquence, ces lipases sont plutôt classées comme étant des estérases bien qu'étant capables d'hydrolyser des triglycérides à longues chaînes d'acides gras insolubles en phase aqueuse [75].

Sur la base de données cristallographique, certains résidus, différents de ceux de la triade catalytique, semblent être importants dans le mécanisme catalytique. Ces résidus forment ce que l'on dénomme le trou de l'oxyanion (oxyanion hole).leur rôle serait essentiellement de stabiliser des intermédiaires réactionnels, tels que les intermédiaires tétraédriques.

Pour la lipase de *Humicola lanuginosa*, l'azote des fonctions amides de Ser83 et de Leu147 ainsi que le groupement hydroxyle de la Ser83 forment des liaisons hydrogènes avec les intermédiaires tétraédriques.

Dans le cas de la lipase de *Candida rugosa*, ce sont les azotes des fonctions amides des Gly123 et Gly124 ainsi que l'Ala210 qui semblent remplir la même fonction [79.80]. L'hydrolyse d'un ester carboxylique par la triade catalytique peut se décomposer en six grandes étapes (Figure II.3).

Tout d'abord, le carbone de la fonction carboxylique du substrat subit une attaque nucléophile du groupement hydroxyle de la sérine dont le caractère nucléophile est augmenté par le résidu histidine suite à la formation d'une liaison hydrogène. L'anneau imidazole de l'histidine devient alors protoné et chargé positivement. Cette charge positive est stabilisée par une charge d'un résidu acide (Asp ou Glu) (1).

Il en résulte la formation d'un premier intermédiaire tétraédrique, stabilisé par deux liaisons hydrogènes avec des résidus du trou de l'oxyanion (2). Par la suite, il y a libération d'une molécule d'alcool, formation de l'acyl-enzyme (3) et attaque nucléophile de l'acyl-enzyme par une molécule d'eau (4).

Cette seconde attaque nucléophile aboutit à la formation d'un second intermédiaire tétraédrique, stabilisé par le trou de l'oxyanion (5). Finalement, il y a libération de l'acide gras et retour de l'enzyme dans sa conformation initiale (6) [81-82-80].

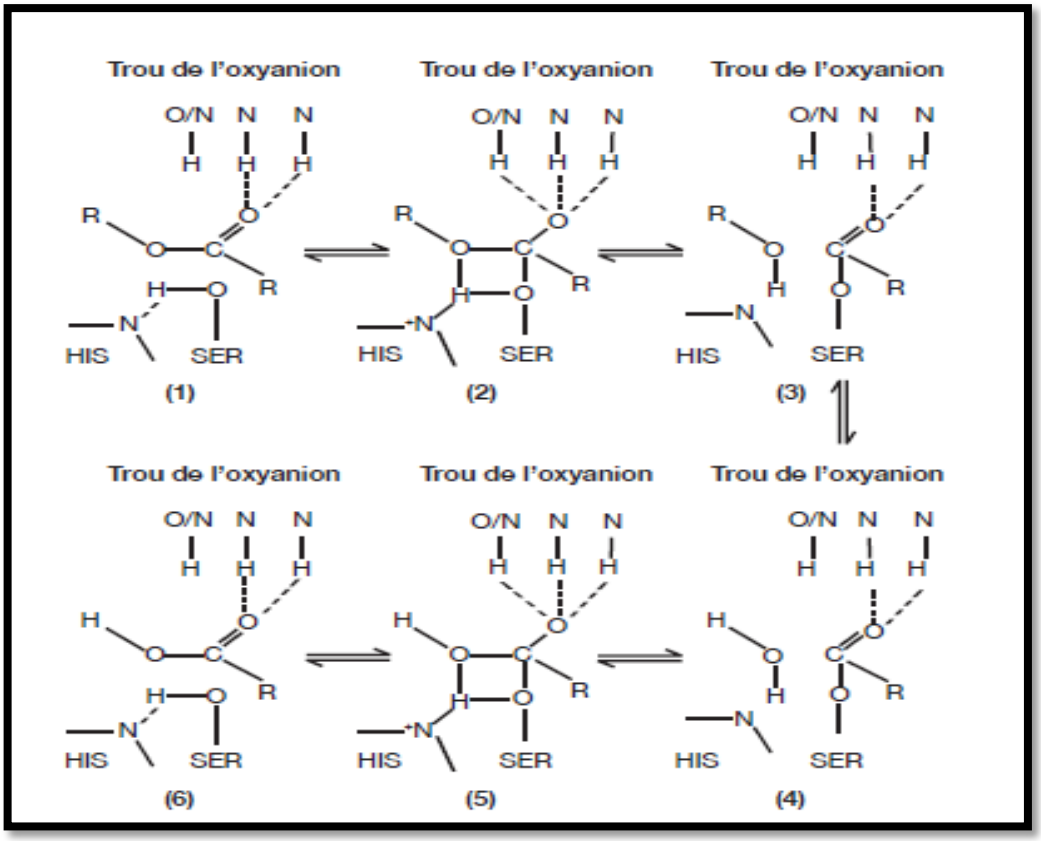


Figure II.3 : représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester [80]

- (1) complexe de Michaelis non- covalent ;
- (2) intermédiaire tétraédrique 1;
- (3) acylenzyme et libération de l'alcool ;
- (4) attaque nucléophile de la molécule d'eau ;
- (5) intermédiaire tétraédrique 2 ;
- (6) libération de l'acide gras.

Le mécanisme d'action de la lipase pancréatique met en œuvre des phénomènes plus complexes. Une Co-lipase est nécessaire pour assurer la fixation de l'enzyme sur le substrat.

Le mécanisme d'activation interfaciale est dans ce cas sujet à controverse.En effet, Hermoso et ses collaborateurs ont démontré en 1997 que le système lipase Colipase-micelles (= sels biliaires) est activé dans l'eau avant de rejoindre l'interface [83].

II.1.3.3. Cinétique d'hydrolyse

Il a déjà été mentionné que les lipases agissent sur des composés insolubles en phase aqueuse et que la réaction se déroulait à l'interface eau / corps gras.De ces propriétés atypiques résulte une cinétique d'hydrolyse particulière.

La première étape consiste en l'adsorption de l'enzyme à l'interface eau / huile selon un isotherme de Langmuir [84].La réaction se déroulant dans un système biphasique, la vitesse d'hydrolyse dépend non seulement de la quantité de substrat présent dans le milieu mais également de l'aire interfaciale.

En effet, en utilisant deux types d'émulsions d'huile d'olive, une fine et une grossière, les représentations de Line weaver et Burk montrent deux droites de pentes différentes lorsque l'activité enzymatique est exprimée en fonction de la quantité du substrat et deux droites confondues lorsque l'activité est exprimée en fonction de l'aire interfaciale de l'émulsion **(Figure II.4)**.Dans ces conditions, le modèle de Michaelis-Menten, valable en phase homogène, ne peut servir pour décrire la cinétique des lipases.

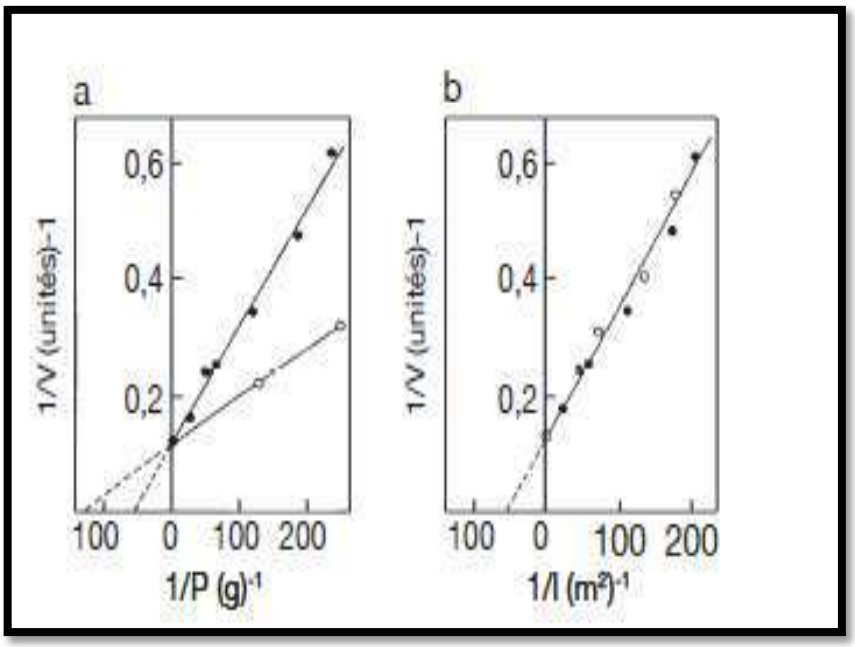


Figure II.4 : représentation selon Lineweaver et burk de la cinétique d'hydrolyse de deux émulsions d'huile d'olive [84].

- a : en fonction de la quantité du substrat
- b : en fonction de l'aire interfaciale.

II.1.4. Propriétés physico-chimiques des lipases

Les lipases bactériennes ont en général un pH optimum neutre ou légèrement alcalin (8-8,5) [85] tandis que les lipases d'origine fongique ont un pH optimum neutre ou légèrement acide : 6,5 pour celle de *Geotrichum candidum* [86] ; 5,6 pour celle de *Rhyzopus delemar* [87].

Cependant, il existe des lipases conservant une bonne activité à des pH plus extrêmes. Celles de *Pseudomonas fragi* [88], *Mucor javanicus* [89] ont un pH optimum situé entre 8 et 10 tandis que celle de *Torulopsis sp*. [90] conserve 80 % de son activité à pH 3.

D'autre part, certaines lipases sont stables et actives dans une large gamme de valeurs de pH. La lipase de *Pseudomonas cepacia* conserve 100 % de son activité après incubation durant 24 h à 30 °C pour une gamme de pH variant de 3 à 11 [91] tandis que celle de *Fusarium heterosporum* est stable dans une gamme de pH variant de 4 à 10 [92]. La température optimale des lipases est souvent comprise entre 30 et 40 °C.

En général, les lipases d'origine végétale ou animale sont peu thermostables contrairement aux lipases microbiennes. En effet, *Humicola lanuginosa* produit une lipase dont l'activité optimale est de 45 °C [93] tandis que pour certaines souches de P. fragi, elle est de 75 °C [87.88].

D'autres lipases sont adaptées aux plus basses températures. C'est le cas de celle *d'Aspergillus niger* qui a une température optimale de 25 °C [94], ainsi que celle de *Pseudomonas fluorescens* qui possède encore 30 % de son activité maximale à 1 °C [95].

II.1.5. Spécificité des lipases :

Certaines lipases hydrolysent indifféremment tous types de liaisons ester des triglycérides, ne faisant pas de discrimination entre leurs positions dans la molécule. Ce sont par exemple les lipases de *Penicillium expansum* [96] et de *P.cepacia* [27.30].

Par contre, d'autres lipases sont spécifiques de la position de ce lien ester au sein de la molécule **(Figure II.5)**.

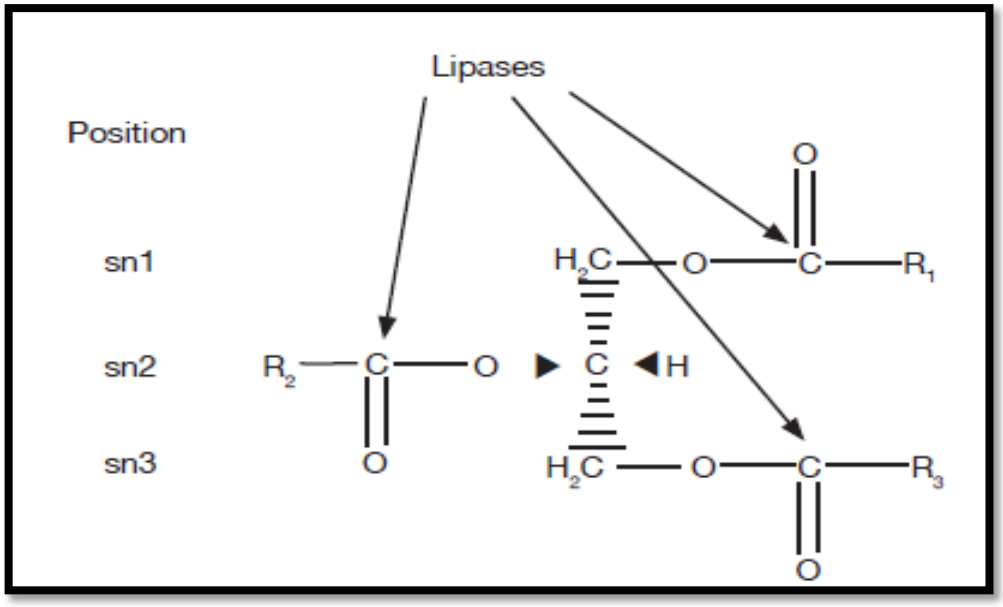


Figure II.5 : Représentation selon Fischer d'une molécule de triacylglycérol. Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases [67]

Ce lien ester peut être situé sur le carbone 1 (sn1) du glycérol, sur le carbone sn2 ou sur le carbone sn3.

Les lipases de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus acnes* et de *Chromobacterium viscosum* hydrolysent indifféremment les positions sn1, sn2 ou sn3 tandis que celles de *P. fragi* et de *Pseudomonas geniculata* sont spécifiques des positions sn1 et sn2.

Les lipases de *Pseudomonas glumae* et de *P. fluorescens* semblent quant à elles être spécifiques de la position sn2 [81]. Les lipases peuvent être également spécifiques vis-à-vis de l'acide gras.

La lipase de *G. candidum* est spécifique des acides cis-9 insaturés et celle de *Penicillium roqueforti* des acides gras à courte chaîne [67].

Certaines lipases ont même des propriétés stéréospécifiques.En effet, de nombreux exemples de l'aptitude des lipases à distinguer des énantiomères ont été décrits dans la synthèse d'esters à propriétés aromatiques [97-98].

II.1.6. Applications industrielles :

L'industrie enzymatique que nous connaissons aujourd'hui résulte de l'évolution rapide de la biotechnologie moderne des quatre dernières décennies. Les enzymes peuvent se substituer aux catalyseurs chimiques et répondre aux exigences du développement industriel durable [99].

Après les protéases et les carbohydrases, les enzymes lipolytiques sont le troisième grand groupe d'enzymes industrielles [100]. Aujourd'hui, les lipases sont utilisées dans de nombreux secteurs industriels. Leurs principales applications sont regroupées dans le **Tableau. II.1** :

Tableau II.1 : Quelques applications industrielles des enzymes lipolytiques [101].

Domaine industriel	**Réaction**	**Exemples de produit ou d'application**
Nettoyage, détergents	Hydrolyse des graisses	Lessives, détachants
Industrie du papier	Hydrolyse	Dissolution enzymatique des pitchs, blanchiment écologique de la pâte à papier
Textile	Hydrolyse	Blanchiment des tissus de type jean, modification des fibres synthétiques (polyester)
Cosmétique	Transestérification	Soins cutanés, crèmes amaigrissantes, parfums
Oléochimie (huiles et graisses)	Transestérification, hydrolyse	Synthèse des esters, hydrolyse des graisses et de la lécithine
Chimie fine	Synthèse énantiosélective	Synthèse de substance Organique
Dégradation des hydrocarbures, Traitement des déchets	Hydrolyse	Nettoyage des eaux Contaminées
Production des biodiesel	Transestérification	Esters de méthyle

Tannage	Hydrolyse	Préparation des peaux, élimination des poils et de la graisse
Alimentation	Estérification	Synthèse de lipides structurés de meilleure qualité nutritionnelle, synthèse d'esters aromatiques
Applications médicales	Transestérification, Hydrolyse	Lipides spécifiques, aides digestives, action bactéricide, diagnostic

II.1.7. Conclusion :

Les lipases sont des enzymes ubiquistes que l'on retrouve aussi bien chez les organismes inférieurs tels que les bactéries, champignons ou levures que chez les organismes supérieurs tels que les plantes et les animaux. Bien que leurs origines et leurs spécificités de substrat soient très variées, le centre catalytique de l'enzyme possède la même architecture tridimensionnelle.

Ce qui rend ces enzymes atypiques, c'est qu'elles sont actives aussi bien en phase aqueuse qu'en milieu solvant organique. C'est pour toutes ces raisons que l'intérêt que portent les scientifiques ainsi que le monde industriel sur l'étude des lipases n'a cessé de croître au cours de ces dernières années.

III. LES LIPASES MICROBIENNES

III.1.introduction :

L'intérêt de la lipase a augmenté au cours des dernières années en raison de leurs excellentes propriétés catalytiques [102] et leurs diverses applications industrielles, par exemple, les additifs contenus dans les détergents, l'élaboration d'aliments diététiques pour une utilisation dans l'industrie alimentaire, l'obtention d'une molécule bioactive dans l'industrie pharmaceutique, ainsi que des modifications de graisses et des lipides par des réactions d'hydrolyse et d'estérification [103].

Les lipases sont largement présentes dans les bactéries, les levures et les champignons [104-105]. Les champignons sont largement reconnus comme l'un des meilleures sources de lipase et sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire. La plupart des recherches se concentrent sur la production des lipases extracellulaires à travers une grande variété de microorganismes. Toutefois, l'exigence de source de carbone des lipides reste essentielle pour la production des enzymes.

III.2. Micro-organismes producteurs de lipases :

Les lipases sont produites par de nombreux microorganismes.

La plupart des lipases commercialement utiles sont d'origine microbienne.

Certains des micro-organismes producteurs de lipase sont énumérés dans le **tableau III.1.**

Tableau III.1: Certains micro-organismes producteurs de lipase

Source	genre	Espèce	référence
	Bacillus	*B. megaterium[1]* *B. cereus [2]* *B. stearothermophilu.[3]...* ***B. subtilis [4]*** *Recombinant B. subtilis 168[5]* *B. brevis [6]* *B. thermocatenulatus[7]* *Bacillus sp. IHI-91[8]* *Bacillus strain WAI 28A5[9]* *Bacillus sp.[10]*	*[106]* *[107]* *[108]* *[109]* *[110]* *[111]* *[112]* *[113]* *[114]* *[115]*

Les bactéries... (Gram-positive)	**Staphylococcus**	*S.canosus [11]* *S. aureus [12]* *S. hyicus[13]*	*[116]* *[117]* *[118]*
	Lactobacillus	*Lactobacillus delbruckii[14] sub sp. Bulgaricus* *Lactobacillus sp.[15]*	*[119]* *[120]*
	Streptococcus	*Streptococcus lactis[16]*	*[121]*
	Micrococcus	*Micrococcus freudenreichii [7]* *M. luteus [7]*	*[112]* *[112]*
	Propionibacterium	*Propionibacterium acne[16]* *Pr. Granulosum[16]*	*[121]* *[121]*
	Burkholderia	*Burkholderia sp.[17]* *Bu. Glumae[18]*	*[122]* *[123]*
Les bactéries... (Gram-négative)	**Pseudomonas**	*P. aeruginosa[7]* *P. fragi[19]*	*[112]* *[124]*
	Chromobacterium	*Ch. Viscosum[20]*	*[125]*
	Acinetobacter	*Aci.Pseudoalcaligenes[16]* *Aci. Radioresistens[21]*	*[121]* *[126]*
	Aeromonas	*Ae. Hydrophila[22]* *Ae. sorbia LP004 [22]*	*[127]* *[127]*
	Rhizopus	*Rhizop. Delemar[23]*	*[128]*
	Aspergillus	*A. niger [21]*	*[126]*

champignons	**Penicillium**	*Pe. cyclopium [24]* *Pe. citrinum [25]*	*[129]* *[130]*
	Mucor	*Mucor miehei[26]*	*[131]*
	Ashbya	*Ashbya gossypii[27]*	*[132]*
	Geotrichum	*G. candidum [28]*	*[133]*
levures	**Rhizomucor**	*R. miehei[23]*	*[128]*
	Candida	*C. rugosa[29]*	*[134]*
	Yarrowia	*Y. lipolytica[30]*	*[135]*
	Rhodotorula	*Rho. Glutinis[31]*	*[136]*
	Saccharomyces	*Sa. Lipolytica[11]*	*[116]*
		Sa. Crataegenesis[7]	*[112]*
Actinomycètes	**Torulospora**	*Torulospora globora [7]*	*[112]*
	Trichosporon	*Trichosporon[32]*	*[137]*
	Streptomyces	*Streptomyces fradiae NCIB8233[16]*	*[121]*
		Streptomyces sp. CCM 33[16]	*[121]*
		Str. Coelicolor[7]	*[112]*

III.3. L'isolement et le dépistage des micro-organismes producteurs de la lipase :

Les micro-organismes producteurs de Lipase ont été trouvés dans des habitats variés tels que les déchets industriels, les usines de transformation d'huiles végétales, les laiteries, les sols contaminés avec de l'huile, et de la nourriture en décomposition,…etc. [138].

Micro-organismes producteurs de Lipase comprennent les bactéries, les champignons, Les levures, les actinomycètes. Une méthode simple et fiable pour la détection des micro-organismes dans les activités de la lipase [139].

Cette méthode utilise le tensioactif Tween 80 dans un milieu solide pour identifier une activité lipolytique. La formation de zones opaques autour des colonies est une indication de la production de lipase par les micro-organismes.

En outre, le dépistage des producteurs de lipase sur des plaques d'agar est souvent fait en utilisant la tributyrine comme un substrat [140] et les zones claires autour des colonies indiquent la production de la lipase.

Wang et al [141] ont utilisé plaques de gélose de rhodamine B modifiée pour cribler l'activité de lipase dans un grand nombre de micro-organismes. D'autres versions de cette méthode ont été rapportées [142-143].

III.4. Production et développement des cultures pour la lipase :

III.4.1. Méthodologie des bioréacteurs :

Les lipases microbiennes sont produites principalement en culture submergée [145], La production par culture de cellules immobilisées a été également utilisée dans quelques cas [146]. De nombreuses études ont été entreprises pour définir la culture optimale et les besoins nutritionnels pour la production de lipase par culture optimale et les besoins nutritionnels pour la production de lipase par culture submergée. La production à l'échelle industrielle passe par plusieurs étapes telles qu'illustré sur la **figure III.1** [147].

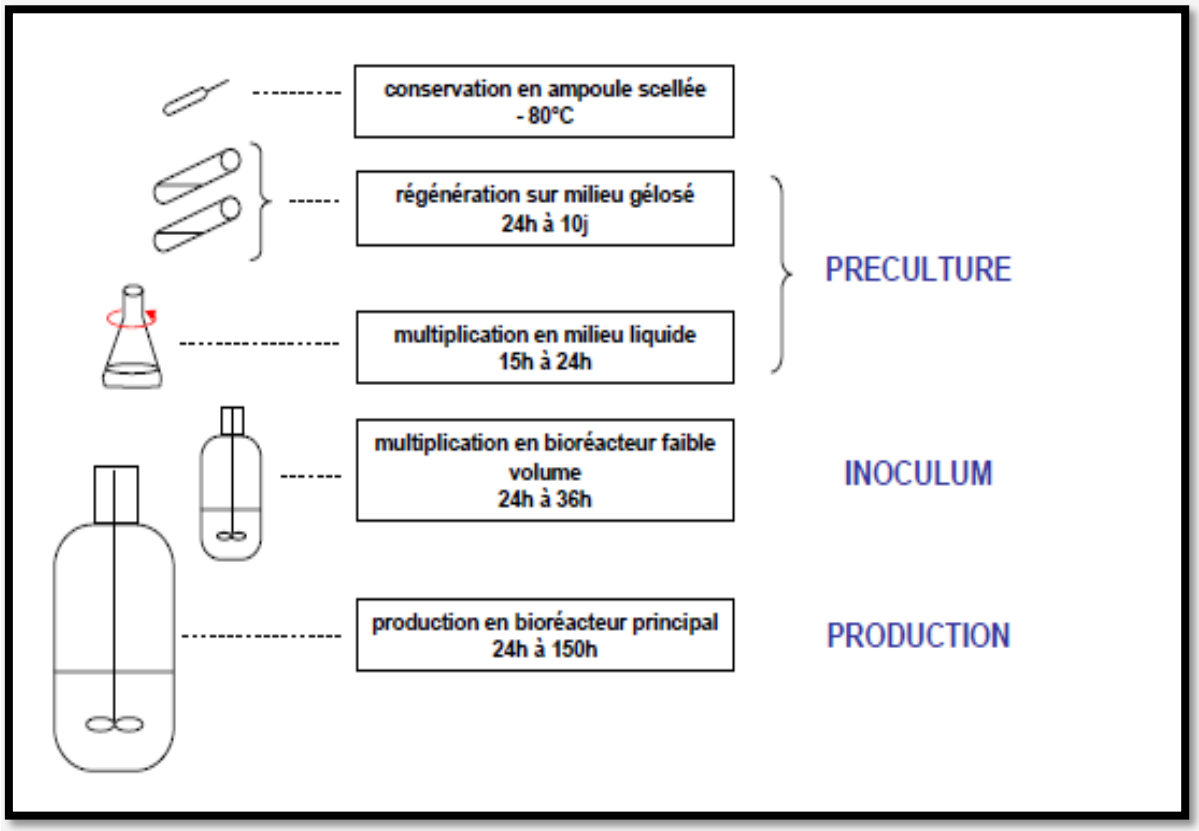


Fig.III.1 : diagramme général représentant la fermentation industrielle.

III.4.2. Les facteurs influençant la production de la lipase microbienne :

La production de la lipase microbienne est influée par plusieurs facteurs. D'une part, les composés du milieu (source de carbone, source d'azote, les sels minéraux, les facteurs de croissance, la valeur C/N,….) et d'autre part les paramètres physicochimiques du milieu de culture (pH, température, vitesse d'agitation, durée d'incubation, le volume d'inoculum,…)

L'amplitude des effets dépend d'un microorganisme à un autre et on ne peut pas tirer de conclusion ou de règle générale définitive concernant un facteur donné qu'après avoir mené une étude expérimentale profonde.

a). Effet de la source d'azote :

Pour une lipase extracellulaire de *Pe. citrinum*, [148] une production maximale a été obtenue dans un milieu contenant 5 % (wt/vol) de peptone comme source d'azote (pH 7,2). A un degré moindre, d'autres sources d'azotes tels que la liqueur de mais appelé encore « corn steep liquor » et la farine de soja ou de maïs stimulent la production de la lipase.

L'urée et le sulfate d'ammonium inhibent la synthèse de la lipase. Une activité lipolytique (1120 U/L) a été déterminée par titrage des acides gras libérés de l'huile d'olive incubées avec le bouillon stérile [148].

Une lipase Thermostable de *Pseudomonas sp*., KW1-56 a été produite dans un milieu qui contenait de la peptone (2 % wt/vol) et de l'extrait de levure (0,1 % wt/vol) comme sources d'azote[149].

La source d'azote inorganique tel que le phosphate d'ammonium semble favoriser la production de lipase [150]. Pour la production de la lipase intracellulaire par le champignon *Rhizop.oryzae*, le corn steep liquor (7 %) s'est avérée comme une source d'azote optimale [151].

b). Effet de la source de carbone :

Sugihara et coll ont signalé la production de lipase de *Bacillus sp*. En présence de 1 % huile d'olive dans le milieu de culture. Peu d'activité enzymatique a été observée en l'absence d'huile d'olive même après une culture prolongée. Le Fructose et l'huile de palme ont été signalés pour être les meilleurs des glucides et des lipides, respectivement, pour la production d'une lipase extracellulaire par *Rhodotorula glutinis* [152].

Lorsque les sources de deux carbone ont été comparés, l'huile de palme à une concentration de 2 % s'est avéré plus avantageuse pour la production de la lipase que le fructose [150].

Une activité spécifique de 7395 U/mg de protéine a été observée pour la lipase alcaline (pH 8,5) produite par *P. fluorescens* S1K WI dans un milieu qui contenait l'émulsion d'huile d'olive comme source de carbone [153].

De même, une lipase alcaline de *Penicillium expansum* a produit une activité maximale lorsque la biomasse est cultivée dans un milieu contenant de l'huile (huile d'olive à 0,1 %) à un pH de 8,3 [154].

c). Effet de la température :

La température optimale pour la production de la lipase bactérienne coïncide souvent avec la température optimale de croissance.

Lors de l'étude de l'effet de la température sur la synthèse et la sécrétion de la lipase par le champignon *Rhodotorula. glutinis* [155] et *Penicillium citrinium* [156], des températures de l'ordre de 30 ° C et 22 ° C ont été respectivement signalées.Alors que chez *Bacillus.subtilis* la température optimale était de 37°C [157].

d). Effet du PH :

L'expérience a montré que pour *Rhodotorula.glutinis* la production maximale est obtenue à pH=8 [156], alors que pour *Pseudomonas.sp* KW1-56- et *P. aeruginosa MB* un pH=7.0 était le plus adéquat [158].Les résultats ont montré que les champignons sont capables de croître dans la gamme de pH de 5 à 11 et atteignent une activité lipasique maximale (17,0 U/ ml) à un pH de 8,6 [159].

e). Effet de durée d'incubation :

La sécrétion de lipase par *P.flourescens* et pour plusieurs bactéries marines [160] est atteinte pour des durées d'incubation entre 20 et 24 heures. Des durées d'incubation du même ordre ont été signalées avec un champignon comme *Rhodotorula.glutinis* [156] et de *Penicillium citrinium* [155].Des durées d'incubation plus longues (72 heures) peuvent être réduites avec l'ajout des facteurs de croissance, les vitamines, les agents tensio-actifs, etc...

f). Effet de la vitesse d'agitation :

La vitesse d'agitation (180rpm) a donné la production maximale de la lipase chez *Candida.rugosa* [161]. Alors que pour *Penicillium.restrictum* une vitesse de 200rpm donnait le maximum taux de production de la lipase [162].

Une augmentation de la production a été détectée pour une culture statique (13 UI/mL) lorsque la vitesse d'agitation atteint 150 rpm (17 UI/mL) chez *Fusarium.oxysporum*. Dans d'autres cas il est possible de constater une inhibition complète de la production de la lipase sans agitation [163,164].

III.5.Les méthodes de dosage :

Il n'existe pas de méthode universelle de dosage de l'activité lipasique. Le choix d'une méthode particulière dépendra propres à l'utilisateur des exigences spécifiques. Pour le dosage de toute enzyme, la sensibilité, la disponibilité des substrats, et la facilité de la procédure doivent être pris en considération [165].

III. 5.1. Méthodes titrimétriques :

Réaction lipolytique libère un acide qui peut être dosée titrimétriquement. l'activité de la lipase est mesurée sur une émulsion agitée mécaniquement de triacylglycérides naturelle ou synthétique (DAT) par neutraliser les acides gras libérés avec le temps en ajoutant NaOH titré afin de maintenir le pH à une valeur du point final constante.Il s'agit d'une méthode quantitative sensible à 1 mol d'acide gras libéré par min. C'est un moyen fiable de détecter les niveaux d'activité inférieurs à 0,1 mol par minute [166].

L'utilisation de l'huile d'olive en tant que substrat pour le 'Procédé titrimétrique a été rapporté par de nombreux scientifiques [167-168-169].

III.5.2. Glycérol libéré à partir des triglycérides :

La détermination directe de la glycérine libre n'est pas couramment pratiquée, puisque toutes les trois chaînes acyles d'un triacylglycerol molécule sont rarement libérées par une seule lipase, et donc les taux d'hydrolyse initiaux ne peuvent être déterminés. Pour estimer le glycérol libéré libre, oxydation périodique de glycérol libre, conduit à la formation de formaldéhyde qui peut être dosé par spectroscopie [170].

III.5.3. La conductivité électrique

La conductivité électrique du milieu augmente au cours de la réaction d'hydrolyse catalysé par lipase en raison du développement de charges électriques effectuées par les AGL libérés [171]. Cette technique a une sensibilité satisfaisante mais présente l'inconvénient de nécessité de prise de mesure à des températures très élevées.

III.5.4. D'autres méthodes [167-168-169]

La méthode de la plaque Wilhelmy

- Conductance d'onde acoustique ;
- Les méthodes colorimétriques ;

- Méthodes fluorométriques ;
- La spectrométrie de masse ;
- Surveillance de la tension interfaciale ;
- Les méthodes chromatographiques :
    - Méthodes HPLC
    - Méthodes chromatographiques en phase gazeuse

III.6. Extraction et purification:

La séparation et la purification de la lipase microbienne passe par plusieurs étapes tel qu'illustré sur la **figure III.2.**

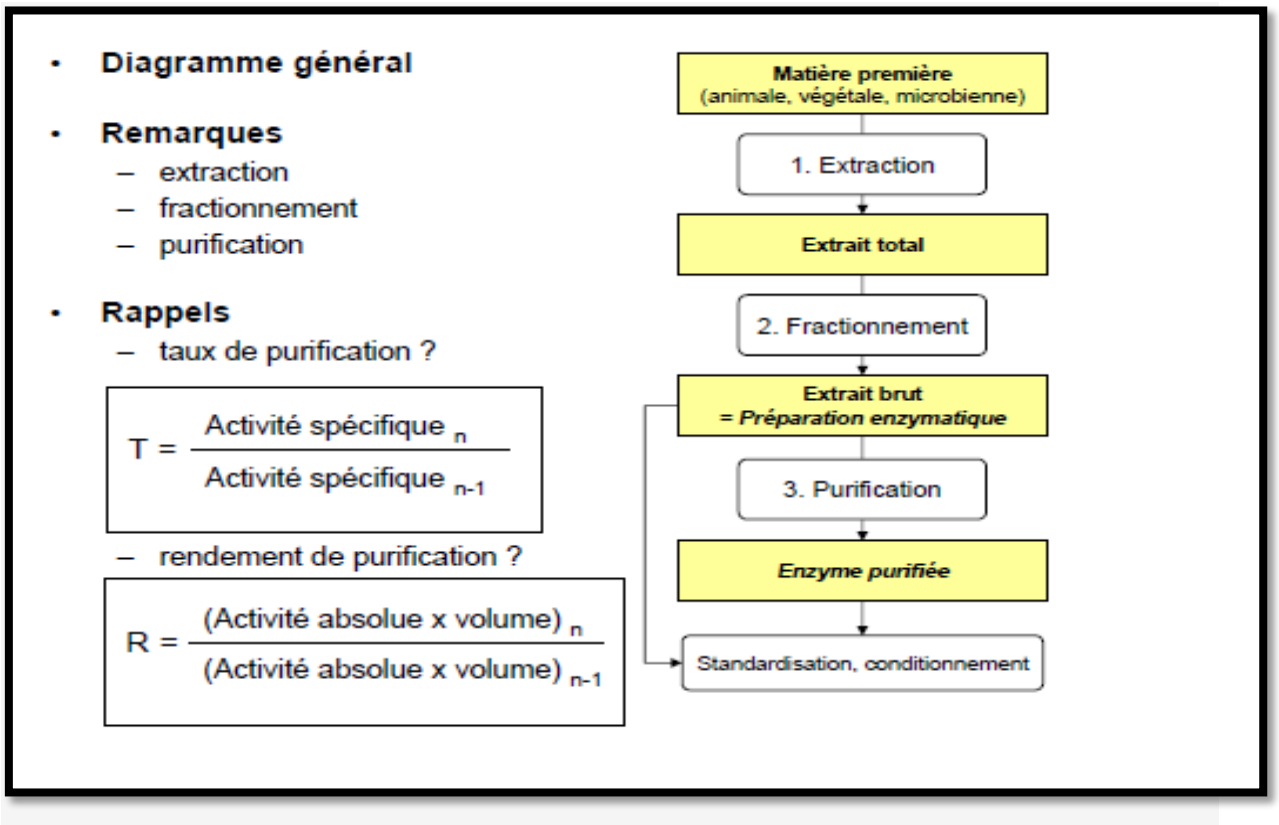


Fig.III.2 : diagramme général représentant les étapes de l'extraction et de la purification industrielle des enzymes [144].

Les étapes de purification peuvent comprendre notamment le fractionnement à l'acétone et la chromatographie sur colonne séquentielle : sur chromatographie DEAE-cellulose, Sephadex G-75 et l'adsorption sur Hydroxylapatite [172].

III.6. 1.Séparation de la biomasse :

La lipase produite par les microorganismes est, en général, une enzyme extracellulaire. Le moût de fermentation est traité pour séparer les cellules, le plus généralement par centrifugation.

III.6. 2. Précipitation de la lipase:

a). Par les sels (sulfate d'ammonium):

Il existe différentes manières d'employer le sulfate d'ammonium. Nous pouvons citer :

- L'utilisation des concentrations croissante en sel : addition fractionnées de cristaux de sel séparées par des périodes d'équilibrage ;
- L'emploi d'une solution saturée de sel. Son inconvénient réside dans la dilution importante de la préparation.
- Par dialyse : Cette méthode est lente.

b).Par les solvants organiques :

Les alcools sont utilisés pour précipiter les acides nucléiques, les polysaccharides et les protéines. Les solvants organiques dans une large mesure précipitent les macromolécules en modifiant leur hydratation. Ils diminuent aussi l'activité de l'eau ce qui provoque une baisse de la solvatation des macromolécules chargées.

L'acétone, l'éthanol, le méthanol, le butanol sont miscibles à l'eau, mais occasionnent une élévation de la température de milieu. Ils ont tous tendance à dénaturer les protéines, particulièrement lorsqu'ils sont utilisés au-dessus de 0°C [173].

c). Chromatographie sur colonne :

Après filtration de mélange à séparer, dissous dans un solvant généralement organique traverse l'adsorbant (appelée phase stationnaire) placé dans une colonne en verre.

Les composants différemment retenus s'étagent en anneaux le long de la colonne, l'anneau le plus bas correspondant au composé le moins adsorbé [173].

CONCLUSION GÉNÉRALE :

Cette étude s'inscrit dans le cadre général du développement industriel de la production d'une lipase microbienne et concerne plus particulièrement la lipase de la souche bactérienne *Bacillus.subtilis* afin de mettre au point les techniques, le milieu, et les conditions favorables, à l'échelle laboratoire, pour la production de cette enzyme qui présente un grand potentiel d'applications industrielles.

Les essais ont montré que cette souche bactérienne présente une activité lipasique grâce à l'apparition d'une zone claire autour des colonies de *Bacillus.subtilis* sur milieu solide contenant le milieu de culture plus le tween80 qui été hydrolysé par la lipase produite par la bactérie.

Des cultures en batch agités, sur milieu liquide, ont été réalisées pour l'étude de la production de la lipase. Il a été démontré au cours de cette étude que les facteurs physico- chimiques (pH, température, vitesse d'agitation, durée d'incubation…), ainsi que les composés du milieu de croissance (source de carbone, source d'azote, et le rapport carbone/azote) avaient une influence directe sur le rendement de la production de la lipase exprimé en termes d'activité lipasique à travers la réaction d'hydrolyse d'un acide gras.

Les résultats ont montré que le *Bacillus.subtilis* donne sa production maximale en lipase à pH neutre, sous une température de 37°C, avec une vitesse d'agitation de 150rpm, pour une durée d'incubation de 48 heures. La composition optimale du milieu de culture donnant le meilleur rendement en lipase contenait le glucose comme source de carbone (C) et d'énergie et le chlorure d'ammonium comme source d'azote (N) avec un rapport molaire optimal C/N=7.5.l'activité lipasique obtenue sous ces conditions optimales était de 4.1UI/ml,La production de la lipase était partiellement associée à la croissance.

Enfin, la séparation et la purification de l'enzyme qui a été produite dans les conditions optimales ont été réalisées en quelques étapes :

- La centrifugation pour l'obtention de la solution enzymatique
- La précipitation à l'acétone
- La filtration du précipitât

- Le séchage de l'enzyme à la température ambiante

Notre travail n'est qu'une étape préliminaire qui a permis de déterminer les meilleures conditions de la production, à l'échelle de laboratoire, de l'une des enzymes industrielles les plus importantes.

Les résultats pourront être complétés par la suite sur divers axes, notamment :

- L'étude de l'effet des concentrations des composés du milieu sur la cinétique de croissance et de production, éventuellement les éléments minéraux.
- La modélisation des cinétiques de croissance et de production.
- La production de la lipase en continu ou avec des cellules immobilisées.
- La séparation et la purification de la lipase avec des techniques plus performantes afin d'avoir un extrait enzymatique totalement purifié qui permet d'augmenter l'activité spécifique de la lipase.