REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE Dr. YAHIA FARES MEDEA



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département Génie des Procédés Pharmaceutiques

MEMOIRE DE MAGISTERE

Pour l'obtention du titre de Magistère en Génie des Procédés

Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème:

Etude de l'activité enzymatique d'une lipase végétale sous forme libre et immobilisée

Présenté par :

M^{elle} SEFHA farida

Mr. MOULAI-MOSTEFA Nadji	Professeur	UYF de Médéa	Président
Mme. DJABRI Lydia	Professeur	UMM de Tizi-Ouzou	Examinatrice
Mr. KREA Mohamed	Maître de conférences A	UYF de Médéa	Examinateur
Mr. ABOUSEOUD Mahmoud.	Maître de conférences A	UYF de Médéa	Rapporteur

Année universitaire 2010-2011

Remerciements

En premier lieu, je remercie Dieu le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Je remercie Monsieur Dr. ABOUSEOUD Mahmoud pour avoir assuré la direction de ma thèse, pour ces conseils précieux le long de mon travail de thèse. Je ne saurais trop le remercier pour l'intérêt qu'il a accordé à ce travail et pour les longues heures de discussion qu'il m'a réservée avec une patience inégale. J'ai beaucoup apprécié ses qualités scientifiques et humaines

Tout d'abord, j'adresse mes respectueux remerciements à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de mon travail. Je suis certaine de pouvoir compter sur leurs vastes connaissances et leur esprit critique constructif pour m'aider, par leurs commentaires et leurs discussions, à mieux comprendre certains problèmes rencontrés au cours de ce travail de recherche.

J'assure ma profonde gratitude à Monsieur MOULAI-MOSTEFA Nadji, Professeur à l'université de Yahia Fares de Médéa pour l'honneur que vous m'avez fait de présider le jury de ce mémoire de magister.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont pris la peine d'examiner ce travail à savoir : Monsieur KREA Mohamed, Maître de conférence à l'université de Yahia Fares de Médéa, et Madame DJABRI Lydia professeur à l'université de Tiziouzou. Merci pour toutes les remarques constructives apportées à ce manuscrit.

Je remercie également l'ensemble des membres du Hall Technologique et plus particulièrement, Mr. Alouaoui Rédha et M^{elle}. KRAOUCH Meriem.

Je remercie aussi Mme TASSIST Amina et M^{elle} AHMEDI Affef, pour leurs soutiens, leurs aides et leurs conseils.

Il est difficile, dans un ci petit espace, de remercier toutes les personnes qui ont eu une influence sur ma vie de tous les jours pendant la durée de ma thèse. Ces personnes se

reconnaitront facilement et sauront combien ma tendresse et mon amitié sont grandes pour eux.

Ce travail n’aurait jamais pu se réaliser sans le soutien continu de ma famille et sans leur éducation basée sur des valeurs morales fondées sur le respect des autres et du travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mon cher père

Ma chère mère

À mes frères

À mes sœurs

À mes belles sœurs

À mon neveu

Toute la famille SEFHA,

La famille TOUATI

Tous mes amis sans exception

Ma promotion de magister

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحويل ثلاثي الغليسيريد الى غليسرول و حمض بتفكيك الروابط الاسترية **باستخدام** إنزيم الليباز **المستخلص من النبات**.

من بين المصادر النباتية الا**ربعة المدروسة** نوعا وكما عن طريق فحص النشاط الإنزيمي، يمثل الإنزيم المستخلص من **بذور الخروع محفزا ذو** نشاط كبير بالمقارنة مع **المصادر الأخرى من البذور وبالتالي** فهو مهيأ تماما لدراستنا لتفكيك الروابط الاسترية.

أثرت العوامل الفيزيائية **مثل الأس** الهيدروجيني ودرجة الحرارة على تفكيك الروابط الاسترية **باستخدام** إنزيم الليباز **المقتى** جزئيا من **الخروع** ، **أثبتت الدراسة أن الوسط المعتدل** 7.0 **ودرجة الحرارة** $40\ ^0C$ هي **الأكثر ملاءمة** لنشاط الإنزيم. **كما ان** بعض المواد الكيميائية المضافة إلى **الوسط التفاعلي تؤدي إلى** تغير **في نشاط** الإنزيم إما زيادته **أو** نقصانه.

تثبيت الليباز **على دعامة** طبيعية "ألجينات **الكالسيوم**" أدى إلى نقصان نشاطه ولكنه **زاد من استقرار** نشاط الإنزيم **لدرجات الحرارة العالية** . **كما أنه من الممكن استخدام** الليباز **المثبت أكثر من أربع مرات** دون تغير هام في المردودية.

كما أن إنزيم الليباز يستطيع تسريع تفاعلات أخرى مثل الاسترة حيث أثبتت النتائج أنه يمكن تصنيع الستر في مدة قدرها 4 **ساعات وفي درجة حرارة** 40 °C.

أخيرا، كانت القدرة التحفيزية لليباز المعزولة رد فعل عكسي، **الاسترة، من خلال إجراء تجارب على الوسط العضوي الذي**سمح تحديد الظروف المثلى **للتفاعل**.

الكلمات المفتاحية : ليباز ، تنقية ، **نسبة** ، تفكيك، تثبيت ، **تسريع** ، **الاسترة**.

Résumé

L'objectif de cette étude est la transformation des triglycérides en glycérol et d'acide gras avec l'hydrolyse des liaisons d'esters par voie enzymatique en utilisant la lipase extraite à partir de graines végétales.
Parmi quatre sources végétales analysées qualitativement et quantitativement par un dosage enzymatique, les graines de ricin "*Ricinus communis*", présentent un pouvoir catalytique important par rapport aux d'autres sources et une stabilité d'activité, d'où ce sont des graines bien adaptée à notre étude, qui consiste en leur mise en valeur pour l'hydrolyse des esters.
Les effets des agents physico-chimiques tels que le pH et la température sur l'hydrolyse de triglycérides en utilisant des fractions enzymatiques partiellement purifiées de la lipase de ricin "*Ricinus communis*" ont été étudiés. Le pH neutre 7.0 et la température de $40^{\circ}C$ se sont avérés les plus favorables à la catalyse enzymatique et par conséquent à l'hydrolyse du lipide et quelques composés chimiques ajoutés au milieu réactionnel provoque une perturbation sur l'activité enzymatique soit en l'augmentant ou soit en l'abaissant.
L'immobilisation de la lipase sur un support naturel "alginate de calcium" a provoqué la diminution de son activité enzymatique. Cependant, elle a permis d'augmenter sa stabilité thermique. Il a été possible de réutiliser la lipase immobilisée par inclusion plus de quatre fois.

Enfin, le pouvoir catalytique de la lipase isolée a été également prouvé pour la réaction inverse, l'estérification, à travers des essais en milieu organique qui ont permis la détermination des conditions optimales de la réaction.

Mots clés : lipase, purification, hydrolyse, rendement, triglycérides, immobilisation, estérification.

Abstract

The objective of this study is the transformation of the triglycerides in glycerol and fatty acid with the hydrolysis of the links of esters by enzymatic way while using the lipase extracted from the plant seeds.

Among analyzed qualitatively four plant sources and quantitatively by an enzymatic dosage, the seeds of castor oil plant "*Ricinus communis*", presented the highest catalytic efficiency and stability comparing to the other sources, so they were well adapted to our study which consists in their use for ester hydrolysis.

The effects of the physico-chemical agents such as pH and temperature on the hydrolysis of triglycerides by using enzymatic fractions partially purified of «*Ricinus communis*» lipase have been studied. The neutral pH 7.0 and the temperature of 40°C proved to be the most favourable to the enzymatic catalysis and therefore to the hydrolysis of the lipid. Some chemical compounds added to the reactional environment provoked a disruption on the enzymatic activity by increasing or lowering it.

The immobilization of the lipase on a support natural "alginate of calcium" provoked the reduction of her enzymatic activity. However, it permitted to increase its thermal stability. However, it was possible to reuse the lipase immobilized by inclusion more than four times.

Finally, the catalytic power of the isolated lipase on the reverse reaction, esterefication, was also studied in a serie of experiments which permitted the determination of optimum conditions of the reaction.

Key words: lipase, purification, hydrolysis, yield, triglycerides, immobilization.

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE…….……1

PARTIE THÉORIQUE

I. LES ENZYMES 4

I.1. Définition 4

I.2. Propriétés générales 4

I.3. Mécanisme et Cinétique enzymatique 6

I.3.1. Equation de Michaelis-Menten 7

I.4. Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique 9

I.4.1. Effet de la température 9

I.4.2. Effet du pH 10

I.4.3. Effet de la concentration en enzyme 11

I.4.4. Effecteurs chimiques 11

I.5. Unités d'activité 12

II. Immobilisation des enzymes 12

II.1. Introduction 12

II.2. Enzyme immobilisée 13

II.3. Objectifs de l'immobilisation des enzymes 13

II.4. Techniques d'immobilisation 14

II.4.1. Immobilisation par inclusion 14

II.4.2. Immobilisation par confinement 14

II.4.3. Immobilisation par réticulation et co-réticulation 15

II.4.4. Immobilisation par adsorption 15

II.4.5. Immobilisation par liaison covalente 16

II.5. Effets de l'immobilisation sur les propriétés intrinsèques de l'enzyme 16

II.6. Support d'immobilisation 17

III. LA LIPASE 17

III.1. Introduction 17

III.2. Généralités sur les lipases 18

III.3. Origines et classifications des lipases 18

III.3.1. Lipases végétales 18

III.3.2. Lipases de mammifères 19

III.3.3. Lipases microbiennes 20

III.3.4. Cutinases....21
III.4. Spécificités des lipases....22
III.4.1. Régiosélectivité envers les triglycérides....22
III.4.2. Chimiosélectivité....22
III.4.3. Stéréo-sélectivité....22
III.4.4. Enantio-sélectivité....23
III.5. Caractéristiques structurelles des lipases....23
III.5.1. Le repliement α/β....23
III.5.2. La triade catalytique....24
III.5.3. Le volet amphiphile et l'activation interfaciale des lipases....25
III.5.4. Trou oxyanion....26
III.5.5. Arrimage du substrat dans le site actif....27
III.6. Mécanisme d'action....28
III.7. Réactions catalysées par les lipases....29
III.7.1. Réactions d'hydrolyse....29
III.7.2. Réactions de synthèse....30
III.8. Applications industrielles....32

PARTIE EXPÉRIMENTALE

INTRODUCTION:....34

IV. RÉACTIFS UTILISÉS :....35
IV.1. Substrat : Huile d'olive (triglycérides) :....35
IV.2. Gomme arabique :....35
IV.3. Solutions tampons :....36
IV.4. Support d'immobilisation : Alginate de sodium....36
IV.5. Autres réactifs :....36

V. PRÉPATION D'ÉMULSION D'HILE D'OLIVE DANS LA GOMME ARABIQUE :....36

VI. CHOIX DE LA SOURCE DE LA LIPASE :....37
VI.1. Préparation du l'extrait enzymatique brut :....37
VI.1.1. Mode opératoire :....37
VI.1.2. Résultats et discussion :....38

VII. PURIFICATION DE LA LIPASE :....39
VII.1. Mode opératoire :....39
VII.2. Résultats et discussion :....41

VII.2.1. Critère qualitative : 41
VII.2.2. Critère quantitative : 41

VIII.TEST DE SABILITÉ DE LA LIPASE : 43
VIII.1. Mode opératoire : 43
VIII.2. Résultats et discussion : 43

IX. ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS DE RÉACTION SUR LA 45
CINÉTIQUE D'HYDROLYSE DU TRIGLYCERIDES PAR LA LIPASE LIBRE : 45
IX.1. Effet du pH : 45
IX.1.1. Mode opératoire : 45
IX.1.2. Résultats et discussion : 46
IX.2. Effet de la température : 47
IX.2.1. Mode opératoire : 47
IX.2.2. Résultats et discussion : 47
IX.3. Effet du substrat : 48
IX.3.1. Mode opératoire : 49
IX.3.2. Résultats et discussion : 49
IX.4. Effet du l'enzyme : 52
IX.4.1. Mode opératoire 52
IX.4.2. Résultats et discussion : 52
IX.5. Cinétique du l'évolution de produit dans les conditions optimales : 54
IX.5.1. Mode opératoire : 54
IX.5.2. Résultats et discussion : 54
IX.6. Effet des effecteurs chimiques : 55
IX.6.1. Mode opératoire : 55
IX.6.2. Résultats et discussion : 55

X. IMMOBILISATION DE LA LIPASE DANS L'ALGINATE DE CALCIUM : 57
X.1. Préparation de la lipase immobilisée et optimisation du support : 57
X.1.1. Effet de la concentration d'alginate : 58
X.1.2. Effet de la concentration de l'agent de chélation : 59
X.1.3. Effet de la charge en enzyme : 60
X.2. Discussion :..... 61

XI. ETUDE DE L'INFLENCE DES CONDITIONS DE REACTIONS SUR LA CINETIQUE D'HYDROLYSE DE TRIGLYCERIDES PAR LA LIPASE IMMOBILISEE : 62
XI.1. Effet du pH: 62
XI.1.1. Mode opératoire : 62

XI.1.2. Résultats et discussion:.....63
XI.2. Effet de la température :.....64
XI.2.1. Mode opératoire :.....64
XI.2.2. Résultats et discussion :.....64
XI.3. Effet du substrat:.....65
XI.3.1. Mode opératoire :.....65
XI.3.2. Résultats et discussion :.....65
XI.4. Traitement de triglycérides par la lipase immobilisée en batch successifs :.....68
XI.4.1. Mode opératoire :.....68
XI.4.2. Résultats et discussion :.....68

XII. RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS :.....69

XIII.CATALYSE DE LA RÉACTION D'ESTÉRIFICATION PAR LA LIPASE DE :70
XIII.1. Effet du temps de contact:.....70
XIII.1.1. Mode opératoire :.....70
XIII.1.2. Résultats et discussion :.....71
XIII.2. Effet de la température :.....72
XIII.2.1. Mode opératoire :.....73
XIII.2.2. Résultats et discussion :.....73
XIII.3. Effet de la masse d'enzyme :.....74
XIII.3.1. Mode opératoire :.....74
XIII.3.2. Résultats et discussion :.....74
XIII.4. Effet de la teneur en eau :.....75
XIII.4.1. Mode opératoire :.....75
XIII.4.2. Résultats et discussion :.....75

XIV.CARACTÉRISATION DE L'ESTER OBTENU PAR LA LIPASE :.....76
XIV.1. Analyse par spectroscopie infrarouge a transformée de fourrier (FTIR) du l'acétate d'éthyle :.....76

CONCLSION GÉNÉRALE……...……77

Références bibliographiques

Liste des figures

Fig. I.1 : modèle de clé-serrure proposé par Emil-FISHER…….....6
Fig. I.2 : modèle de l'ajustement induit……..8
Fig. I.3 : Courbes d'évolution des composés lors d'une réaction de **Michaelis- Menten**…….8
Fig. I.4 : représentation graphique d'une cinétique Michaelienne. Evolution de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat……...8
Fig. I.5 : Représentation graphique en double inverse selon **Lineweaver-Burck**…….9
Fig. I.6 : Représentation graphique selon **Eadie-Hosftee**……..9
Fig. I.7 : influence de la température sur la vitesse d'une réaction enzymatique…….10
Fig. I.7 : Profils d'activité en fonction du pH de quatre enzymes différents……...…10
Fig. I.8 : influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique……..11
Fig. I.9 : Associations réversibles des activateurs avec l'enzyme ou avec le complexe enzyme-substrat……12
Fig. II.1 : Classification des techniques d'immobilisation.....….....14
Fig. II.2 : Principe de la réticulation avec le glutaraldéhy.....15
Fig. II.3 : Méthodes d'immobilisation d'une enzyme…….....16
Fig. II.4 : Modification de la conformation et de l'accessibilité du site catalytique de l'enzyme due à son immobilisation…….....17
Fig. III.1 : Représentation selon Fischer d'une molécule de triacylglycérol. Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases…….. ……..21
Fig. III.2 : Diagramme schématique du repliement des α/β hydrolases…….. ……..23
Fig. III.3 : Structure tridimensionnelle de la lipase de *Pseudomonas cepacia*… …….23
Fig.III.4 : Représentation schématique des deux conformations d'une lipase… …….25
Fig. III.5 : Représentation moléculaire des deux conformations de la lipase de *Thermomyces lanuginosa*…….. ……..25
Fig. III.6 : Illustration des deux types de trous oxyanions retrouvés chez les lipases …….26
Fig. III.7 : Représentation des trois topologies des sites actifs des lipases…….……..27
Fig. III.8 : Schématisation de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique..……..28
Fig. III.9 : Hydrolyse des triglycérides……...…….29
Fig. VI.1 : Protocole de préparation et de dosage enzymatique des extraits bruts de chaque source des graines……...…..37

Fig. VII.1: Technique de purification de l'extrait brut de la lipase par précipitation à l'acétone……...…..….39
Fig. VII.2: Apparence de l'extrait enzymatique ……..……....40
Fig. VII.3 : Courbe d'étalonnage du l'albumine…….....41
Fig. VIII.1 : Stabilité des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP…….43
Fig. IX.1 : Effet du pH sur le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase libre…...45
Fig. IX.2 : Effet de la température sur le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase libre……...46
Fig. IX.3 : Cinétique de formation d'acide gras libre pour chaque concentration du substrat……..48
Fig. IX.4 : variation de la vitesse initiale et le rendement d'hydrolyse en fonction de la masse de substrat…….49
Fig. IX.5 : Représentation en double inverse de Lineweaver-Burke……...50
Fig. IX.6 : variations de nombre de mole de produit en fonction de la masse d'enzyme……52
Fig. IX.7 : Schéma illustrant le transfert des molécules à l'interface…….....53
Fig. IX.8 : Cinétique du développement de produit dans les conditions optimales…….54
Fig. X.1 : Étapes d'immobilisation de la lipase dans l'alginate de calcium…….57
Fig. X.2 : Activité enzymatique de la lipase immobilisée à différentes concentration d'alginate……...58
Fig. X.3 : nombre de mole d'acide gras produit par les différentes masses d'enzyme……....59
Fig. XI.1 : Effet d pH sur le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase immobilisée……...……62
Fig. XI.2 : Effet de la température sur le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase immobilisée…….……63
Fig. XI.3 : Cinétique de formation d'acide gras libre pour chaque concentration de substrat……..……64
Fig. XI.4 : Vitesse initiale et rendement d'hydrolyse en fonction de la concentration initiale du substrat…….……65
Fig. XI.5 : Représentation en double inverse de Lineweaver-Burke……..68
Fig. XI.6 : Rendement d'hydrolyse de triglycérides après chaque utilisation…….69
Fig. XIII.1 : Les étapes de récupération de l'acétate d'éthyle…….72
Fig. XIII.2 : Rendement d'estérification en fonction du temps……...72
Fig. XIII.3 : Effet de la température sur le rendement d'estérification……73
Fig. XIII.4 : Effet de la masse d'enzyme sur le rendement d'estérification……74
Fig. XIII.5 : Effet de la teneur en eau sur le rendement d'estérification…….....75

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Les différentes classes d'enzymes……...…5
Tableau III.1 : Quelques espèces microbiennes productrices de lipase……..20
Tableau III.2 : Quelques applications industrielles des enzymes lipolytiques……..……32
Tableau VI.1: l'activité enzymatique pour différentes sources végétales de la lipase……38
Tableau VII.1: dosage de l'EEB et l'EEPP par la méthode de Bradford……41
Tableau VII.2 : Caractéristiques des préparations enzymatiques de l'EEB et l'EEPP de la lipase…….42
Tableau IX.1: Constantes cinétiques déterminées par deux méthodes……51
Tableau IX.2 : Valeurs de taux d'activations et d'inhibitions enzymatiques à différents composés chimiques…….55
Tableau X.1 : Activité enzymatique de la lipase retenue dans la solution $CaCl_2$……..……..58
Tableau X.2 : Activité enzymatique de la lipase de la solution $CaCl_2$ calculés à différents concentration en $CaCl_2$…….…….59
Tableau XI.1: Constantes cinétiques déterminées par la représentation de Lineweaver-Burk……...……68
Tableau XII.1 : Récapitulation des résultats obtenus le long de l'étude pour la lipase libre et immobilisée……..….70

Abréviations

E : Enzyme

S : Substrat

P : Produit

V_0 : Vitesse initiale

Rh : Rendement d'hydrolyse

T : Température

T_{amb} : Température ambiante

n_{AGL0} : Nombre de mole d'acide gras libre initiale

n_{AGL} : Nombre de mole d'acide gras libre

EEB : Extrait Enzymatique Brut

EEPP : Extrait Enzymatique Partiellement Purifiée

m_E : masse d'enzyme

M_{moy} : Masse molaire moyenne

TG : triglycérides

$[TG]_0$: Concentration initiale de triglycérides

DO_{EEB} : La densité optique de l'Extrait Enzymatique Brut

DO_{EEPP} : La densité optique de l'Extrait Enzymatique Partiellement Purifiée

A : Activité enzymatique

V_m : Vitesse maximale de la réaction enzymatique

K_m : constante de Michaelis de l'enzyme.

cP : centipoise.

RE : Rendement d'estérification

$m_{f\ Ester}$: masse de l'ester formé

$m_{max\ Ester}$: la masse maximale de l'ester

τ_a : Taux d'activation

τ_i : Taux d'inhibition

Introduction générale

INTRODUCTION :

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation de produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur haut pouvoir catalytique « turn-over », leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits.

Le développement de ces nouvelles biotechnologies pour les industries est un défi majeur pour l'avenir. Ces développements nécessitent la mise au point de biocatalyseurs (des enzymes) de plus en plus performants mais aussi adaptés à une mise en œuvre dans des conditions industrielles.

Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être stable et compatible avec le milieu réactionnel. Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée. Cette technique offre une meilleure flexibilité d'utilisation et une meilleure stabilité pour l'enzyme ainsi qu'une solution pour la mise en œuvre de procédés en continu, ce qui rend le procédé enzymatique plus attractif du point de vue technico-économique.

Les matières grasses ou lipides sont des composés très énergétiques, insolubles et constitués principalement de triglycérides (TG) qui sont des triesters de glycérol et d'acides gras saturés, mono-insaturés ou polyinsaturés. Elles ne sont pas seulement une source d'énergie mais une matière première de base importante pour l'industrie dans la préparation des acides gras.

La transformation des triglycérides en acides gras se fait par des enzymes appelées hydrolases. Parmi les hydrolases capables de catalyser la réaction de transformation des triglycérides, les lipases sont les plus utilisées dans des secteurs industriels.

Les lipases sont des enzymes présentes chez tous les organismes vivants et elles jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides.

Les lipases sont capables de catalyser de nombreuses réactions : hydrolyse de matière grasse, transestérification et interestérification, synthèse d'esters à partir d'acide gras et

d'alcool. Les applications industrielles les plus importantes actuellement concernent la production d'acide gras, la transformation des matières grasses.

La présente étude a pour objectif l'exploration du pouvoir catalytique d'une lipase végétale extraite à partir de grains de ricin. A cet effet, deux réactions majeures seront étudiées : l'hydrolyse des lipides et l'estérification. Le focus sera donné à la détermination et à la mise en œuvre des meilleures conditions permettant de valoriser la mise en œuvre de la lipase afin de mener les réactions dans les conditions les plus favorables permettant d'atteindre la vitesse et le rendement optimaux.

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, cinétique enzymatique et effet des facteurs physico-chimique sur la réaction enzymatique.
    - Les enzymes immobilisées : objectifs de l'immobilisation des enzymes, techniques d'immobilisation et les effets de l'immobilisation sur les propriétés intrinsèques des enzymes.
    - La lipase : où est présentée en détail les différents types, son mécanisme d'action ainsi que les applications notamment dans l'hydrolyse des composés lipidiques.
2. Une partie expérimentale a pour objectif d'étudier la faisabilité d'hydrolyse par voie enzymatique de triglycérides. La stratégie expérimentale est menée en quatre étapes essentielles :
    - La première étape est consacrée essentiellement à choisir la source végétale de la lipase la plus adéquate du point de vue activité lipasique, et stabilité. Le protocole d'extraction et de purification suivi d'un test de stabilité de l'enzyme par des méthodes biochimiques seront nécessaires avant d'entamer les essais en batch.
    - Dans la deuxième étape, des essais en batch, où sera menée la réaction d'hydrolyse d'un lipide, seront menés sur l'enzyme lipase extraite de la source végétale sélectionnée sous forme libre, sous différentes conditions opératoires (pH, température, concentration en substrat et en enzyme). Les conditions

- optimales donnant l'activité maximale de l'enzyme seront ainsi déterminées et la cinétique sera établie.
- Dans la troisième étape on s'intéresse à étudier l'effet de l'immobilisation de la lipase sur un support naturel "alginate de calcium". Ainsi, les meilleures conditions garantissant le taux de rétention et l'activité optimaux, seront déterminées. Une série d'expériences à travers la réaction d'hydrolyse, similaires à celles décrites dans la deuxième étape, sera menée avec l'enzyme immobilisée.
- En dernier lieu, une autre application dans la synthèse chimique sera envisagée. La réaction d'estérification (inverse de l'hydrolyse) à partir d'un alcool et d'acide gras en utilisant la même lipase mais cette fois dans un milieu organique. La détermination des paramètres qui ont des effets directs sur la réaction d'estérification (temps de contact, l'effet de la température, la masse d'enzyme, la teneur en eau dans le milieu réactionnel) nous permet d'atteindre un rendement d'estérification maximal.

Enfin, nous terminons notre travail par une conclusion générale où seront résumés les renseignements tirés de cette étude. Quelques perspectives seront également présentées.

Partie théorique

I. LES ENZYMES

I.1. 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 ex-situ 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 [1,2]. 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 [3,4].

I.2. Propriétés générales

Les innombrables réactions chimiques différentes dont la matière vivante est le siège sont presque toutes sous la dépendance des enzymes. Bien que soumises aux mêmes lois de la nature que les autres substances, les enzymes diffèrent des catalyseurs chimiques sur plusieurs points importants [5] :

- **Vitesses de réactions**: Les réactions catalysées par les enzymes sont 10^6 à 10^{12} fois plus rapides que les réactions non catalysées et peuvent aussi concurrencer les catalyseurs chimiques du point de vue vitesse jusqu'à mille fois. Cette comparaison peut être quantifiée par une grandeur appelée « turn-over number» qui exprime le nombre de moles de substrat pouvant être converti par unité de temps et par molécule d'enzyme.

- **Conditions de réactions :** La plupart des réactions enzymatiques peuvent, en général, avoir lieu sous des conditions « douces », à des températures inférieures à 100°C, une pression atmosphérique et à un pH proche de la neutralité dans un milieu aqueux ou même organique.

❖ **Activité enzymatique :** exprimée en général par le nombre de moles de substrat convertis par unité de volume et de temps. Elle varie selon la concentration de substrat et des conditions physico-chimiques de la réaction. Les réactions enzymatiques peuvent donc être régulées [6].

❖ **Spécificité de la catalyse enzymatique :** l'un des caractères les plus importants de la catalyse enzymatique est sa spécificité en comparaison avec la catalyse chimique. Cette spécificité présente un double aspect :

- *Spécificité réactionnelle* : une enzyme ne peut catalyser qu'un type de réaction donné. Cette spécificité sert de base à la nomenclature et à la classification de ces catalyseurs biochimiques. On distingue six classes d'enzymes (**Tableau : I.1)** : [7].

Tableau I.1 : Les différentes classes d'enzymes [8].

N°	Classe de l'enzyme
1	**Oxydoréductases** (qui catalysent le transfert d'électrons : oxydoréduction)
2	**Transférases** (qui catalysent le transfert d'n groupe fonctionnel d'une molécule à une autre)
3	**Hydrolases** (qui catalysent la coupure de liaisons par hydrolyse)
4	**Lyases** (qui catalysent des réactions d'addition sur ne double liaison)
5	**Isomérases** (qui catalysent des réactions d'isomérisation)
6	**Ligases** (qui catalysent la formation des liaisons par clivage de l'ATP)

- *Spécificité de reconnaissance* des molécules avec lesquelles l'enzyme est en interaction.

Les interactions entre un enzyme et son substrat dépendent de la reconnaissance moléculaire fondée sur la complémentarité structurale ; cette reconnaissance est à la base de la spécificité sur lequel se lie le substrat et où la catalyse a lieu est appelé le **site actif** de l'enzyme [9]. Plusieurs enzymes ont un ajustement : la conformation du site actif est complémentaire de celle du substrat seulement après la liaison du substrat. Le modèle clé-serrure est la schématisation la plus adéquate de cette complémentarité (Fig.I.2).

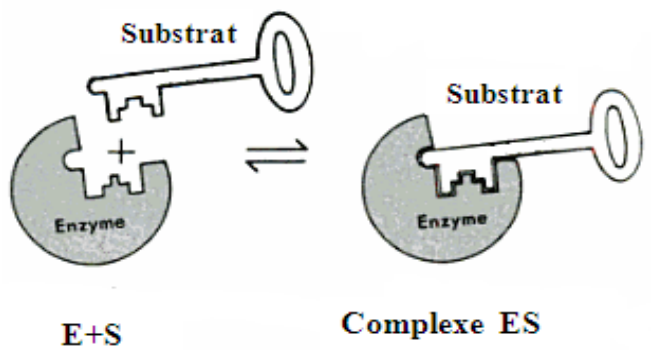


Fig. I.1 : modèle de clé-serrure proposé par Emil-FISHER [10].

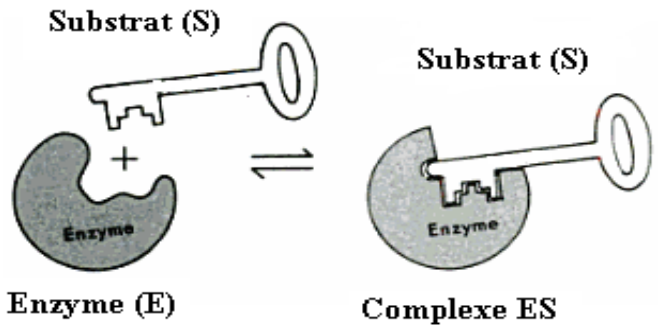


Fig. I.2 : modèle de l'ajustement induit [10].

- **Co-enzyme, co-facteur :** l'une des caractéristiques particulières de l'enzyme est son besoin fréquent de **cofacteur**. Le cofacteur n'est pas une protéine : il peut être un ion métallique (Ca^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}…), ou une molécule organique complexe appelée aussi **coenzymes (Ex. NADH)**. Le cofacteur métallique peut aussi se fixer sur une protéine appelée **apoenzyme [**11**].** Le complexe enzyme-cofacteur catalytiquement actif est appelé un **holoenzyme** [5]. Ces coenzymes et ces cofacteurs jouent le rôle d'intermédiaires et d'agents liants (coordination) dans les réactions enzymatiques lors de la formation des composés complexes (enzyme-substrat).

I.3. Mécanisme et Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique englobe le rôle biologique des catalyseurs enzymatiques et les mécanismes qui permettent leur extraordinaire activité catalytique. Nous cherchons à travers la compréhension du mécanisme et de l'établissement d'un modèle cinétique à

décrire la réaction catalytique et par la suite à déterminer la vitesse maximale de la réaction et à mesurer son affinité pour les substrats [9]. Le modèle le plus utilisé est celui de Michaelis-Menten [12].

I.3.1. Equation de Michaelis-Menten

La réaction enzymatique peut être représentée sous la forme simplifiée suivante :

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

E : enzyme **S :** substrat

P : produit **ES :** complexe enzyme-substrat

k_i : constantes de vitesse

La vitesse υ de formation de produit est :

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

Si $[\mathbf{E}]_0$ représente la concentration initiale en enzyme, on a :

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

On peut voir sur la **figure I.3** 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.

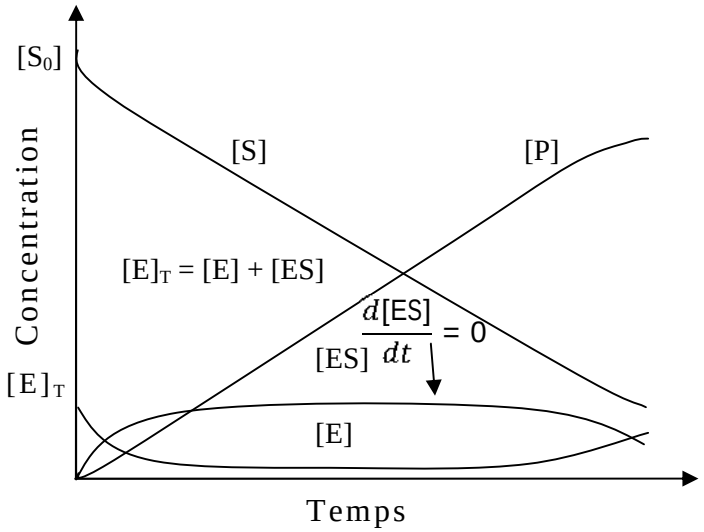


Fig. I.3 : Courbes d'évolution des composés lors d'une réaction de **Michaelis- Menten** [12]**.**

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.4**) [13] :

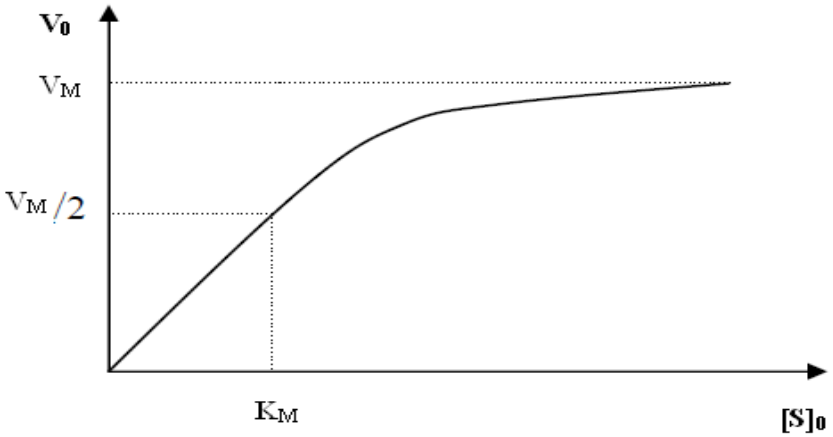


Fig. I.4 : représentation graphique d'une cinétique Michaelienne. Evolution de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat [14].

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.5** avec une autre représentation selon **Eadie-Hosftee** (**figure I.6**) [13].

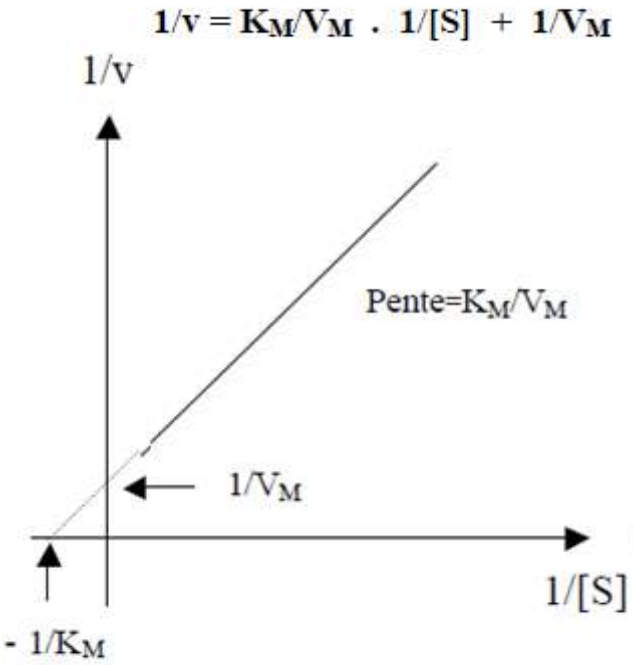


Fig. I.5 : Représentation graphique en double inverse selon **Lineweaver-Burck** [15].

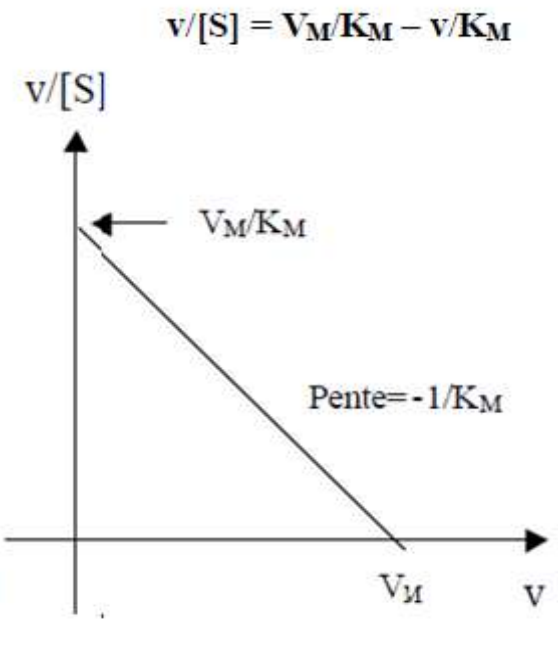


Fig. I.6 : Représentation graphique selon **Eadie-Hosftee** [15]**.**

I.4. Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique

I.4.1. 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) généralement dissymétrique, passant par une valeur maximale pour une température dite **température optimale [**16**].**

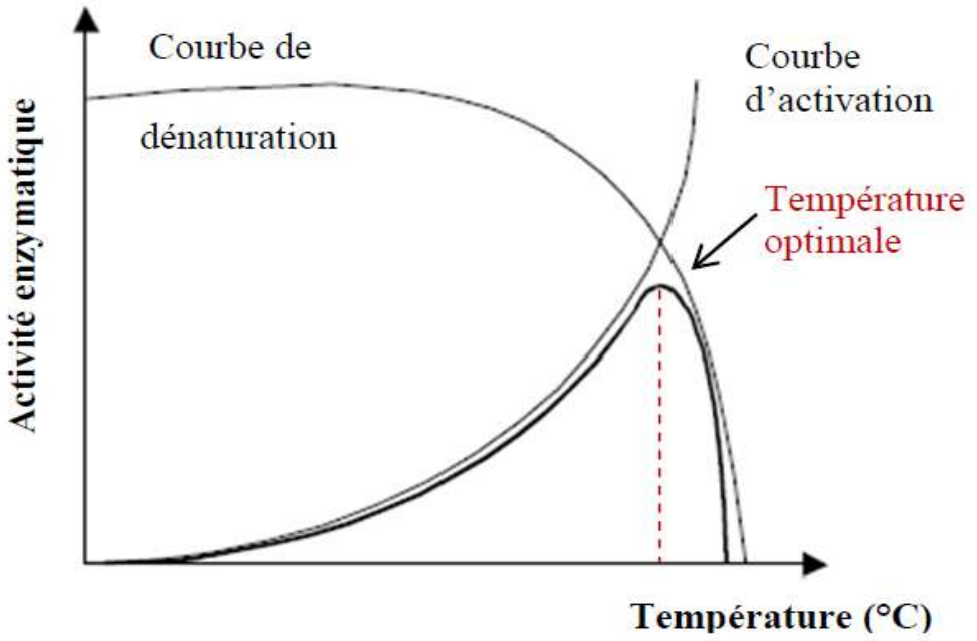


Fig. I.7 : influence de la température sur la vitesse d'une réaction enzymatique [17].

I.4.2. 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. La **figure I.7** illustre les activités relatives de quatre enzymes en fonction du pH. Cette différence suggère que la variation de l'activité d'un enzyme en réponse à une variation de pH puisse être un facteur de la régulation intracellulaire de son activité [9].

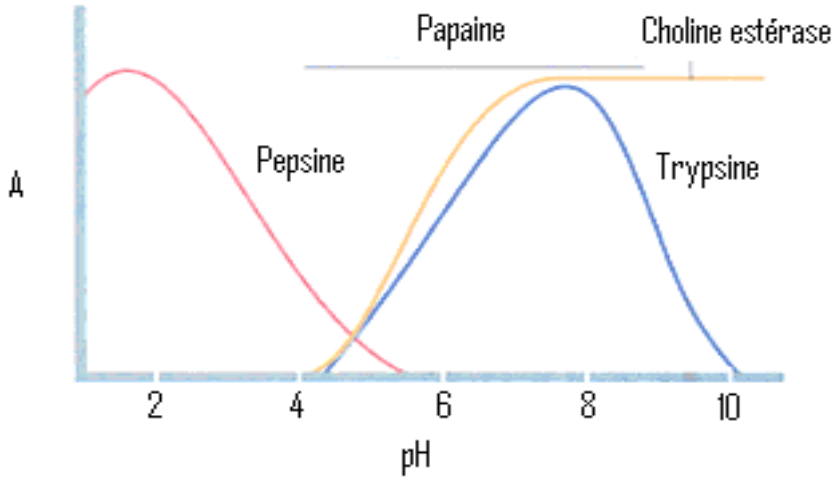


Fig. I.7 : Profils d'activité en fonction du pH de quatre enzymes différents [9].

I.4.3. 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 [18].

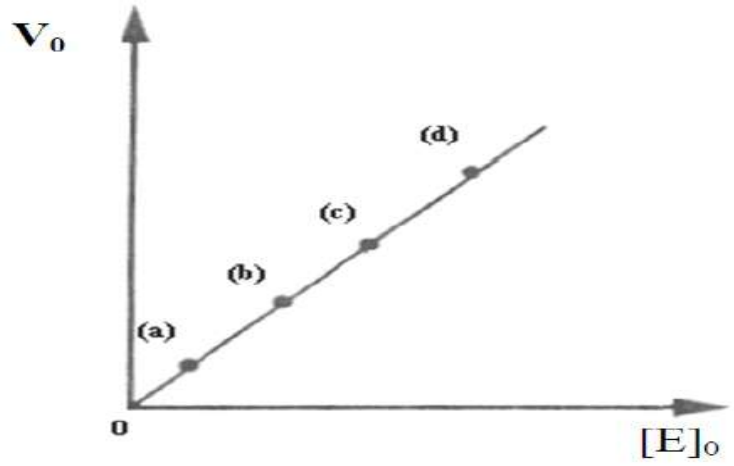


Fig. I.8 : influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique [17].

I.4.4. Effecteurs chimiques

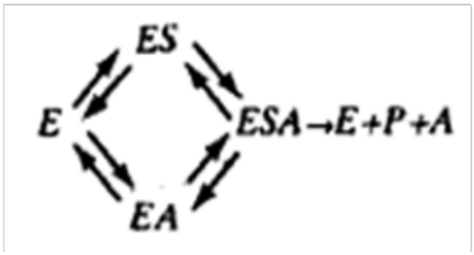
On distingue les **inhibiteurs,** qui diminuent l'activité enzymatique, et les **activateurs,** qui l'augmentent [16].

- **Inhibiteurs**

Les réactions enzymatiques peuvent être inhibées par certaines molécules ou ions. Ces espèces chimiques peuvent bloquer ou provoquer la distorsion géométrique des sites actifs des enzymes. En effet, l'inhibition tend à empêcher l'accès des substrats aux sites catalytiques, ce qui diminue le nombre d'enzymes impliquées dans le processus de catalyse. Une substance qui entre en compétition directement avec un substrat pour un site de liaison enzymatique est ce qu'on appelle un inhibiteur **compétitif.** Un inhibiteur **incompétitif** se lie directement au complexe enzyme-substrat en inactivant, sans pouvoir se fixer à l'enzyme libre. Si l'inhibiteur se fixe à la fois à l'enzyme libre et au complexe enzyme-substrat, on a devant d'une inhibition **non compétitif** [19,20**].**

- **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. Si l'on considère seulement les activateurs capables de former des associations réversibles, plusieurs modes d'associations peuvent être envisagés ; par exemple :



a- Association au hasard

$$E + S \rightleftarrows ES$$
$$ES + A \rightleftarrows ESA \rightarrow E + P + A\ .$$

b- Association selon un mécanisme séquencé

Fig. I.9 : Associations réversibles des activateurs avec l'enzyme ou avec le complexe enzyme-substrat [4].

I.5. Unités d'activité

L'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) et l'IUB (International Union of Biochemistry) recommandent l'adoption d'une unité internationale: U.I.

L'unité internationale, U.I est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme une micromole de substrat ou qui catalyse la formation d'une micromole de produit par minute.

L'unité d'activité spécifique est celle relative à une unité de masse ou une mole d'enzyme. Elle peut être exprimée, par exemple, en micromoles de substrat transformé par minute par milligrammes d'enzymes [21,17].

II. Immobilisation des enzymes

II.1. Introduction

La grande spécificité d'actions des enzymes et les conditions très douces dans lesquelles elles opèrent leur confèrent un avantage certain sur les catalyseurs chimiques

ordinaires. Aussi l'usage des préparations enzymatiques s'est-il considérablement développé dans de nombreux secteurs de la bioindustrie. Mais l'addition d'enzymes en faible quantité dans les milieux réactionnels, et leur grande instabilité en solution, ne permettent généralement pas leur récupération dans des conditions économiques acceptable. De ce fait, dans les procédés industriels, le biocatalyseur est, la plupart du temps, détruis en fin de cycle et renouvelé au début du suivant. L'immobilisation sur support insoluble, qui s'accompagne souvent d'une augmentation de la stabilité de l'enzyme, permet de remédier à cet inconvénient [22].

II.2. Enzyme immobilisée

Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimique en surface ou à l'intérieur d'un solide. On cherche généralement à conserver son activité enzymatique, qui a tendance à diminuer après immobilisation du fait de possibles gênes stériques, de limitations dans l'accessibilité au site actif ; et à augmenter sa stabilité dans le temps, ce qui est souvent le cas du fait de la structure plus rigide conféré par l'immobilisation aux enzymes. On distingue trois types de stabilité pour une enzyme immobilisée :

1. Stabilité de stockage : évolution de l'activité enregistrée dans les conditions usuelles de conservation [23].
2. Stabilité opérationnelle : évolution de l'activité de l'enzyme pendant des essais répétitifs.
3. Stabilité thermique : résistance à des températures plus élevée auxquelles l'enzyme est normalement dénaturée [24].

II.3. Objectifs de l'immobilisation des enzymes

L'immobilisation d'une enzyme sur ou dans une structure solide condensée répond à deux objectifs principaux. En premier lieu, une enzyme étant un catalyseur, il est très important de pouvoir la séparer des substrats et des produits de réaction afin d'assurer un recyclage efficace. L'intérêt est évident dans l'optique d'un procédé réactionnel continu. Le deuxième avantage généralement admis est la stabilisation de la protéine [25,26], en particulier lors de sa fixation par liaison covalente à un support. De plus lorsqu'on met en œuvre des protéases, l'immobilisation permet de diminuer les phénomènes d'hydrolyse mutuelle des enzymes (autolyse) qui conduit à leur inactivation rapide en phase homogène [27,28].

II.4. Techniques d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique. On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme. Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée à l'enzyme [29], la classification des techniques d'immobilisation est résumée dans **la figure II.1** :

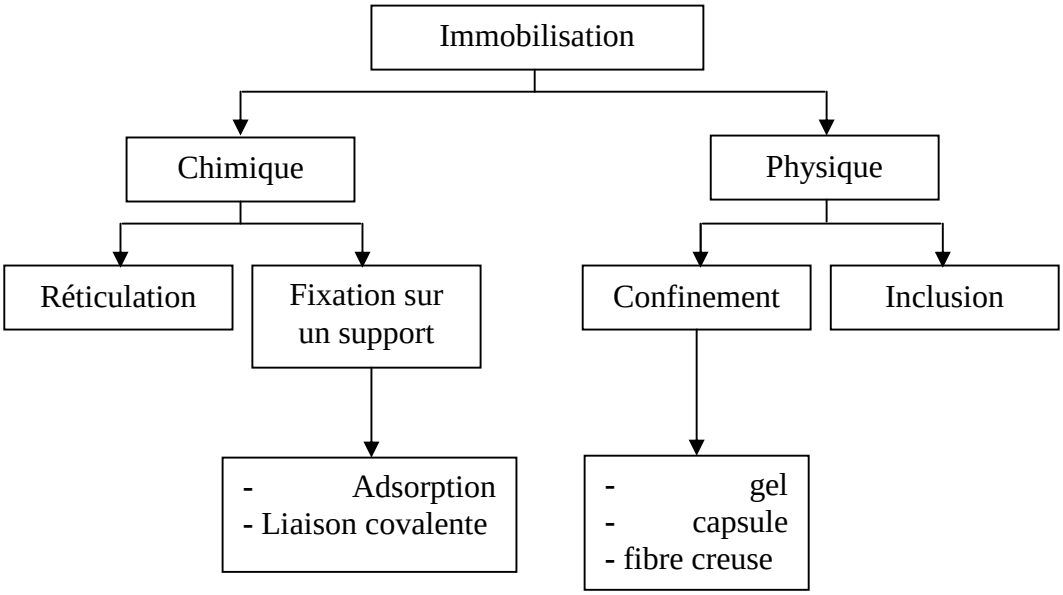


Fig. II.1 : Classification des techniques d'immobilisation [30,31].

II.4.1. Immobilisation par inclusion

Les molécules d'enzymes sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau, Ce procédé d'immobilisation permette de piéger de fortes quantités d'enzymes mais le désavantage réside dans la difficulté pour le substrat de diffuser rapidement vers l'enzyme [32].

II.4.2. Immobilisation par confinement

Cette méthode consiste à enfermer des enzymes dans une membrane semi-perméable. La limitation à des substrats de faible poids moléculaire pour l'enzyme, constitue le désavantage de cette méthode. Le second inconvénient est que la polymérisation interfaciale qui aboutit à la formation des microcapsules entraîne fréquemment une dénaturation des enzymes. Certains ont alors songé à utiliser des fibres creuses à travers lesquelles l'enzyme ne peut diffuser [32].

II.4.3. Immobilisation par réticulation et co-réticulation

La réticulation des biomolécules à la surface d'un support solide ou à d'autres biomolécules ce fait par l'utilisation d'un agent de réticulation. Parmi les agents polyfonctionnels, le glutaraldéhyde [33,34]. Cette méthode de couplage est basée sur la réaction des groupements fonctionnels de l'agent réticulant avec les groupements amine des enzymes pour former des pontages covalent (cross-linking) « enzyme-enzyme ». Les biomolécules immobilisée de cette manière perdent une partie de leurs activités du fait de la rigidification de la structure tridimensionnelle. Pour remédier à ce problème, une nouvelle stratégie consiste à co-réticuler, par exemple, l'enzyme (E) avec une autre protéine inactive (P) telle que l'albumine. L'introduction de cette protéine améliore la répartition des masses des différentes protéines et permet une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique [35].

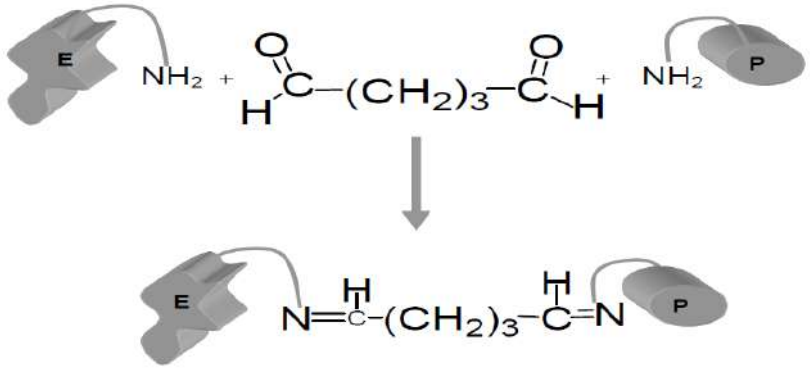


Fig. II.2 : Principe de la réticulation avec le glutaraldéhyde [35].

II.4.4. Immobilisation par adsorption

L'adsorption est la méthode la plus simple, rapide et non dénaturante permet une fixation non covalente des protéines par des interactions de type ionique, hydrophobe ou encore des liaisons hydrogènes à une surface solide par l'intermédiaire d'un matériau actif [36]. Le principal inconvénient est la fragilité de la fixation ; ce peut être également un avantage si l'on souhaite désorber l'enzyme immobilisée pour la remplacer par une enzyme native. Les autres désavantages de cette méthode sont les risques de mauvaise accessibilité au site actif, du fait de l'absence de bras espaceur, les difficultés d'utilisation en réacteurs continus du fait d'une désorption progressive de la protéine, qui est alors libérée dans le milieu réactionnel [37].

II.4.5. Immobilisation par liaison covalente

La liaison covalente avec le support est établie entre un groupement fonctionnel de l'enzyme et un groupement fonctionnel du support préalablement activé [38], ce dernier peut être crées par réaction directe (cellulose + CNBr par exemple) ou par greffage de composé bifonctionnel (bras espaceur) qui comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions portées par les enzymes. Ce composé permet de fixer l'enzyme à une certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat [32].

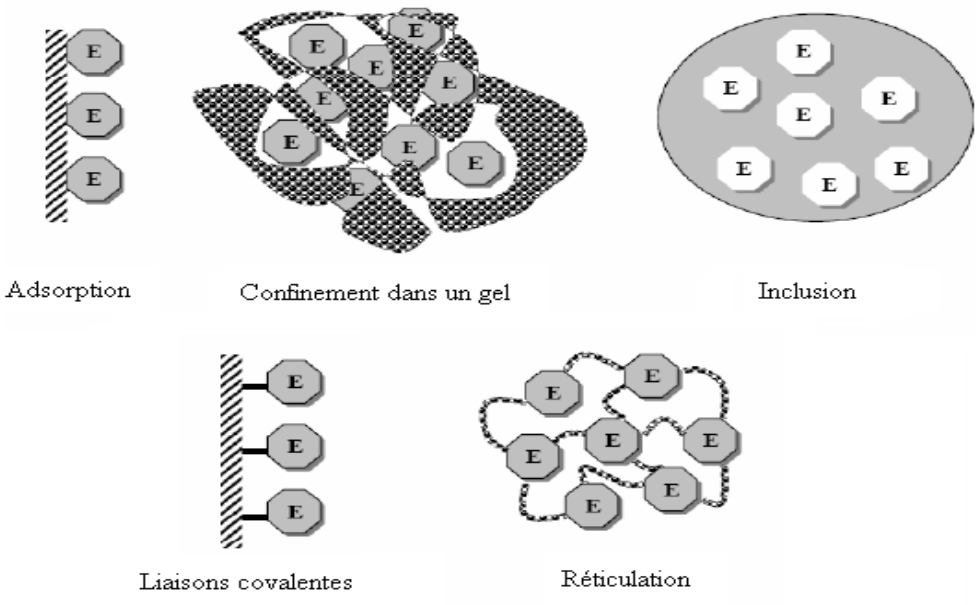


Fig. II.3 : Méthodes d'immobilisation d'une enzyme [39].

II.5. Effets de l'immobilisation sur les propriétés intrinsèques de l'enzyme

L'immobilisation de l'enzyme sur un support crée des modifications des propriétés cinétiques des enzymes. Ce changement cinétique peut être dû, soit à la modification de la conformation des enzymes, soit à a création d'empêchement stériques limitant l'accessibilité de substrat au site catalytique de l'enzyme.

Au cours du processus d'immobilisation, les molécules d'enzymes peuvent être liées au support ou entre elles par un nombre variable de liaisons (covalentes ou non covalentes) et avoir subies des distorsions plus ou moins importantes de leurs structures tridimensionnelles (**figure II.4**) [40].

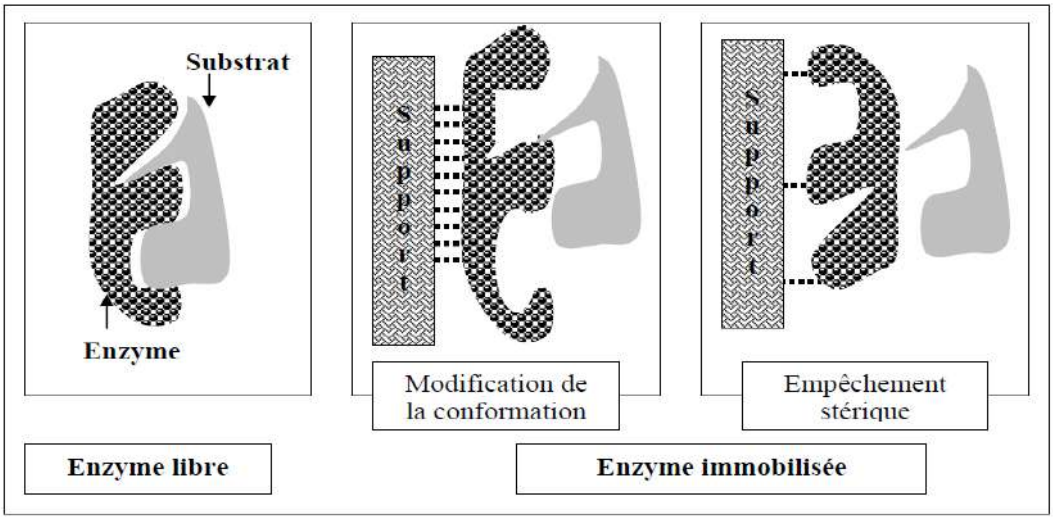


Fig. II.4 : Modification de la conformation et de l'accessibilité du site catalytique de l'enzyme due à son immobilisation [40].

II.6. Support d'immobilisation

Les supports généralement utilisés pour l'immobilisation peuvent être classés en deux grands groupes :

- Les supports organiques qui comprennent les polyosides (acétate de cellulose, nitrate de cellulose, dextrane, agarose, alginate, chitosan, amidon), les polymères (le polyéthylène, le polypropylène, le polystyrène, le polyéthylènetéréphtalate, etc.).
- Les supports inorganiques (verre poreux, silice, métalliques, alumino-silicates, etc.).

Les supports organiques peuvent être chimiquement activés par différentes techniques, ce qui constitue l'un de leurs principaux avantages car ils permettent la fixation d'enzymes par différentes vois. Les supports inorganiques sont généralement plus stable (résistance à l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries) mais la fixation covalente sur ces supports est difficile à cause de leur faible réactivité [32].

III. LA LIPASE

III.1. Introduction

L'enzymologie dite « interfaciale » est aujourd'hui un champ de recherche en plein essor car de nombreux enzymes, comme les lipases, sont impliquées dans des réactions se déroulant aux interfaces (phase apolaire-phase aqueuse), que ce soit dans le monde vivant ou dans des applications industrielles[41]

Avant 1990, l'utilisation des enzymes en catalyse avait uniquement fait l'objet d'études sur la transformation de petites molécules. Plus récemment et maintenant avec un effort de recherche croissant, l'utilisation des enzymes pour la synthèse de polymères a gagné en importance [42]. Les polymères biodégradables et en particulier les polyesters aliphatiques peuvent être synthétisés par un procédé enzymatique [43].

III.2. Généralités sur les lipases

Les lipases sont des hydrolases d'esters carboxyliques, capables d'hydrolyser les lipides riches en triglycérides à longue chaînes d'acides gras en glycérol et en acides gras correspondants. Cette activité a conduit au choix du terme triacylglycérol acyl-hydrolases (EC 3.1.1.3) comme dénomination officielle. Elles ont été mises en évidence, dés 1901, chez les bactéries. Cependant, ce n'est qu'à partir de la fin des années 1950 que l'étude des lipases a réellement pris son essor, notamment avec les travaux de l'équipe de Desnuelle à Marseille sur la lipase pancréatique de porc [44,45].

En plus de leur capacité d'hydrolyser les graisses, les lipases peuvent catalyser bon nombre de réactions allant de l'hydrolyse à l'estérification sans oublier les réactions d'alcoolyse et l'acidolyse. Cette particularité des lipases de catalyser diverses réactions en fonction du microenvironnement de l'enzyme, ainsi que leurs spécificités et leurs conditions douces de réaction, les rendent intéressantes du point de vue industriel. Un autre avantage intéressant est que ces biocatalyseurs ne nécessitent pas la présence d'un coenzyme contrairement à beaucoup d'autres [46,44].

III.3. Origines et classifications 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 dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux micro-organismes.

III.3.1.Lipases végétales

Elles sont présentes au sein de la plante bien qu'en les retrouve principalement dans les graines. 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. Les principales **acylhydrolases** sont les **phospholipases A** et **B** ; les **glycolipases**, les **sulfolipases** et les **monoglycéridelipases**. Elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides mais elles peuvent catalyser certaines réactions de transestérification [47,48].
- Le troisième groupe est constitué par les **phospholipases C** et **D**.

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 et elles présentent des spécificités de substrat atypique comparées aux lipases microbiennes [49,50]. Par exemple : la lipase les graines de colza ou de navet (*Brassica napus*), obtenue par simple homogénéisation des graines dans un tampon adéquat, est utilisée industriellement dans la modification d'huile de tournesol ou dans l'enrichissement de l'huile de primevère en acide γ- linolénique [51].

Les applications industrielles les plus importantes actuellement concernent la production d'acides gras, la transformation des matières grasses. Par exemple : la lipase extraite à partir les graines de ricin (*Ricinus communis*), produit 350µmoles/h d'acides gras par l'hydrolyse d'huile d'olive à 37°C et pH 7,0 [52].

D'autres travaux menés sur l'immobilisation de la lipase extraite à partir les graines de *Nigella sativa*, où le rendement d'hydrolyse est de 43.1% avec une l'activité maximal de 0.19UI/mg à 40°C et pH 6 [53].

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 [54,55]. Leur étude a permis leur utilisation comme immunotoxines dans le traitement de certains cancers [56,57].

III.3.2.Lipases de mammifères

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 tissue adipeux.
- Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel [58].

Les lipases de mammifères les plus étudiées sont les lipases liées à la digestion des graisses et leur absorption, elles hydrolysent les lipides alimentaires dans l'estomac et ne nécessite pas la présence de cofacteurs pour être actives [59].

III.3.3.Lipases microbiennes

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. 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 une grande stabilité vis-à-vis de température, des détergents et des enzymes protéolytique [46]. Elles sont produites par fermentation en présence de substrats inducteurs tels que les acides gras. Selon leur excrétion exo- ou endo-cellulaire, les lipases sont séparés plus ou moins facilement par différentes méthodes.

Le tableau suivant illustre quelques espèces microbiennes productrices de lipase

Tableau III.1 : Quelques espèces microbiennes productrices de lipase.

Espèce	Substrat inducteur	Mode de séparation	Références
Yarrowia lipolytica	Acide oléique	Une centrifugation (20min, 3700rpm, 4°C) permet de récupérer le surnageant de culture	[60,61]
Saccharomyces cerevisiae	Galactose		[62]
Burkholderia cepacia	isopropyl-béta-thio-galactoside		[63]
Candida antarctica A	méthanol	Le surnageant obtenu par centrifugation à 4°C a été filtré pour récupérer la lipase	[64]
Bacillus sp	blé	Le surnageant obtenu par centrifugation à 10000 rpm a été purifié par la solution de sulfate d'ammonium afin d'obtenir une précipite (l'enzyme)	[65]

III.3.4.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, 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 [66,67]. 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. Les cutinases sont des enzymes qui peuvent être apparentées aux lipases à la différence qu'elles ne nécessitent pas d'activation interfaciale pour être efficaces [68,69].

III.4. Spécificités des lipases

III.4.1.Régiosélectivité envers les triglycérides

La régiosélectivité est une spécificité de position. Les lipases ont la capacité d'hydrolyser préférentiellement des acides gras en position 1 ou 3(*sn1, sn3* spécifique respectivement). Par exemple la lipase de *Candida antarctica* B est peu spécifique de ce point de vue, alors que celle de *Rhizomucor miehei* est *sn3* spécifique [70]. Par contre, certaines lipases hydrolysent indifféremment tous types de liaisons ester des triglycérides (figure III.1) [71]. La sérine catalytique se trouve au niveau de la poche où se positionne la chaîne *sn3*. Les différences de taille et d'hydrophobicité entre les différents sites d'arrimage, déterminent la régiosélectivité des lipases [72].

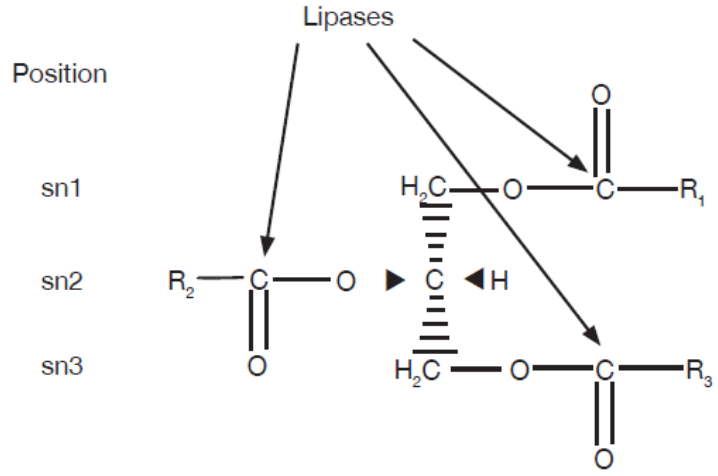


Fig. III.1 : Représentation selon Fischer d'une molécule de triacylglycérol. Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases [73].

III.4.2.Chimiosélectivité

Les lipases peuvent catalyser spécifiquement la transformation d'une fonction donnée, lorsqu'un substrat présente plusieurs fonctions de natures différentes susceptibles de réagir : SH, OH, HN.

La chimiosélectivité et la cinétique de la réaction sont amplement influencées par les conditions acido-basiques du milieu réactionnel [74].

III.4.3.Stéréo-sélectivité

Elle est définie par la sélectivité observée en fonction de la longueur des chaines carbonée, du degré d'insaturation de l'ester hydrolysé. La Stéréo-sélectivité est souvent reliée à la topologie du site actif [75].

III.4.4.Enantio-sélectivité

L'énantio-sélectivité se définit comme la spécificité d'une enzyme pour un substrat en fonction de sa stéréochimie. Des études récentes illustrent parfaitement la capacité des lipases à catalyser la N-acylation énantio-sélective de molécules aminées à centres chiraux. Ces propriétés d'énantio-sélectivité seraient dues à une conformation tridimensionnelle particulière des résidus aminés catalytiques de leur site actif.

III.5. Caractéristiques structurelles des lipases

Au début des années 1990, les premières structures de lipases ont été élucidées. Il s'agissait de la lipase de *Rhizomucor miehei* et de la lipase pancréatique humaine. Ensuite, de nombreuses autres lipases, ont été cristallisées [76,77].

D'après les données biochimiques et cristallographiques, la structure des lipases est identique à celle des hydrolases à repliement α/β [62].

III.5.1.Le repliement α/β

Le repliement α/β est constitué par un noyau central formé de huit feuillets β et d'une enveloppe de six hélices α. Les enzymes de ce type de repliement ont toutes une triade catalytique de type : nucléophile-histidine-acide catalytique [78].

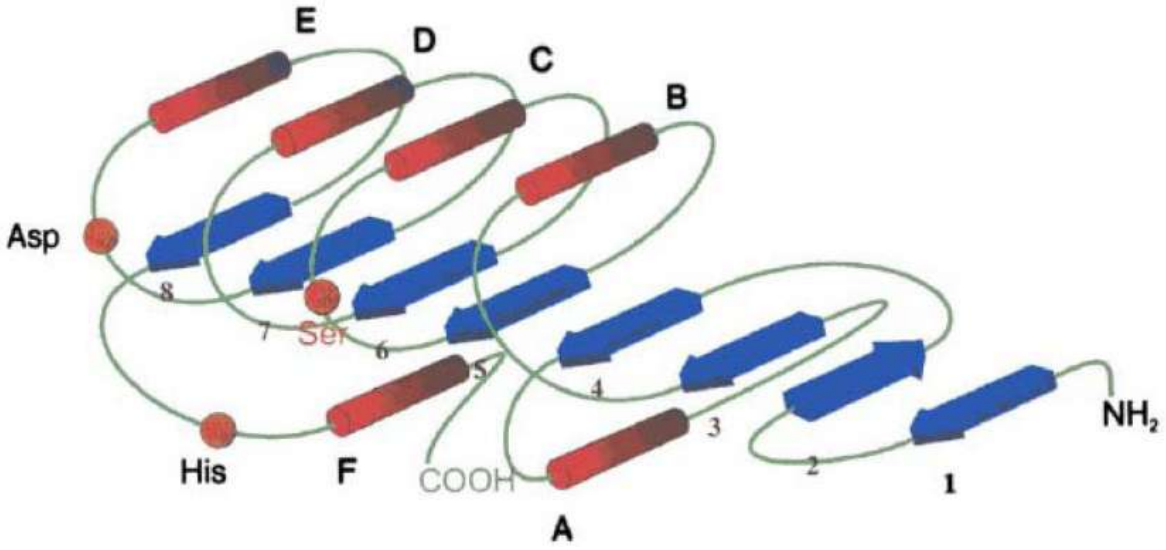


Fig. III.2 : Diagramme schématique du repliement des α/β hydrolases [79].

Les hélices α sont représentées par les cylindres, les brins β sont indiqués par les flèches. La position des résidus du site actif est représentée par un point rouge, la serine

catalytique est positionnée après le brin 5, le résidu aspartique/glutamique après le brin 7 et l'histidine est dans la boucle entre le brin 8 et l'hélice α.

Dans la Protein Data Bank (PDB), qui recense les protéines dont les structures tridimensionnelles ont été élucidées, les lipases comptabilisent 67 entrées. Il s'agit principalement d'enzymes d'origines microbienne ou animale. Les lipases sont formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques. **La figure III.3** illustre la structure tridimensionnelle de la lipase de *Pseudomonas cepacia* [80].

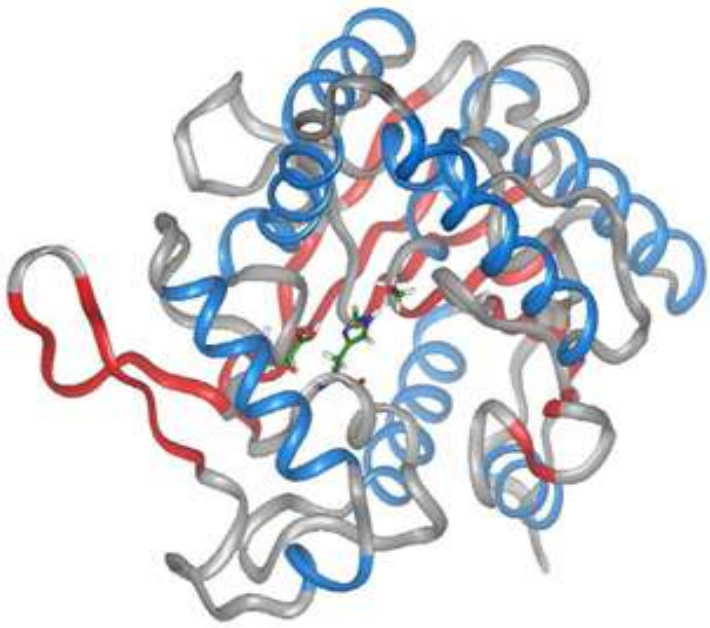


Fig. III.3 : Structure tridimensionnelle de la lipase de *Pseudomonas cepacia*.
En bleu sont présentées les structures secondaires hélices α et en rouges les feuillets β. Les trois résidus aminés figurant sur les structures représentent la triade catalytique Ser, His et Asp [81,82].

III.5.2.La triade catalytique

Le site catalytique apparaît toujours sous la forme d'une triade hautement conservée : serine, histidine et un acide, généralement l'aspartique (ou glutamique plus rarement). Elle a été mise en évidence par Brady et *al*, 1990.

L'emplacement des résidus de la triade catalytique est précisé sur la figure III.2. La serine catalytique se situe au centre d'un pentapeptide consensus Gly-X-Ser-X-Gly (GXSXG), où les résidus X correspondent à des acides aminés quelconques. Cette structure permet à la serine d'être d'une part proche de l'histidine catalytique et d'autre part bien positionnée pour l'attaque nucléophile du substrat [62,72].

Récemment une autre famille de lipase à été mise en évidence : la famille « GDSL » où la serine catalytique est placée dans la séquence consensus GDSL. Par exemple, les lipases de *Brassica napus* (navet) appartiennent à cette famille [83].

III.5.3.Le volet amphiphile et l'activation interfaciale des lipases

Les lipases sont solubles en milieu aqueux mais exercent leur activité hydrolytique essentiellement sur des substrats peu ou non solubles dans l'eau. L'activité des lipases est beaucoup plus importante lorsque les substrats sont sous forme d'émulsion, de liposomes ou de micelles. Elles agissent alors à l'interface eau/lipide et leur activité est liée à la présence de cette interface. On parle alors de phénomène d'activation interfaciale [84].

Le site actif des lipases peut être recouvert par un domaine mobile amphiphile (appelé aussi volet ou « lid »). Lorsque l'enzyme est au contact d'une interface eau/lipide, ce volet s'écarterait permettant la fixation du substrat et son hydrolyse [85,86]. En absence d'interface, une très faible activité est observée. On suppose que volet cacherait alors le site actif (Fig.III.3).

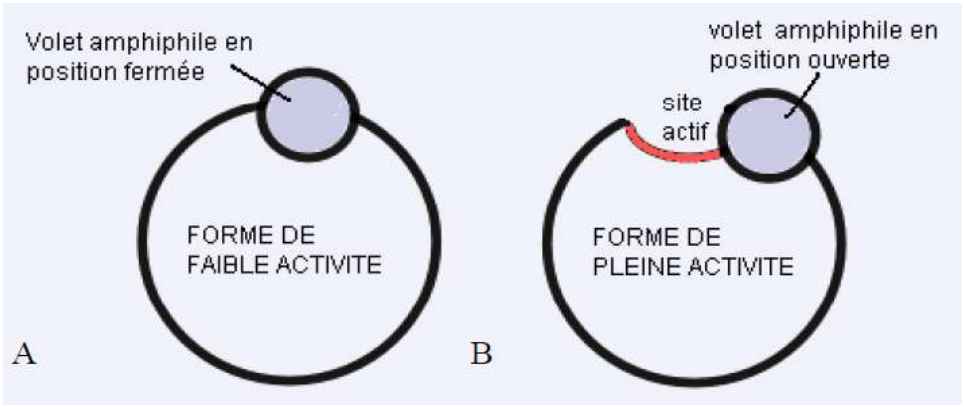


Fig.III.4 : Représentation schématique des deux conformations d'une lipase [62].

La présence d'un volet amphiphile a été démontrée par les études cristallographiques de plusieurs lipases (Fig.III.4). Cependant, certaines lipases ne suivent pas strictement cette règle. Par exemple, la lipase B de *Candida antarctica* possède en guise de volet une courte hélice très mobile et ne montre pas de phénomène d'activation interfaciale. Le site catalytique de la cutinase de *Fusarium solani* est directement exposé aux solvants et l'enzyme ne présente pas de phénomène d'activation interfaciale mais hydrolyse aussi bien des substrats peu solubles que solubles [62].

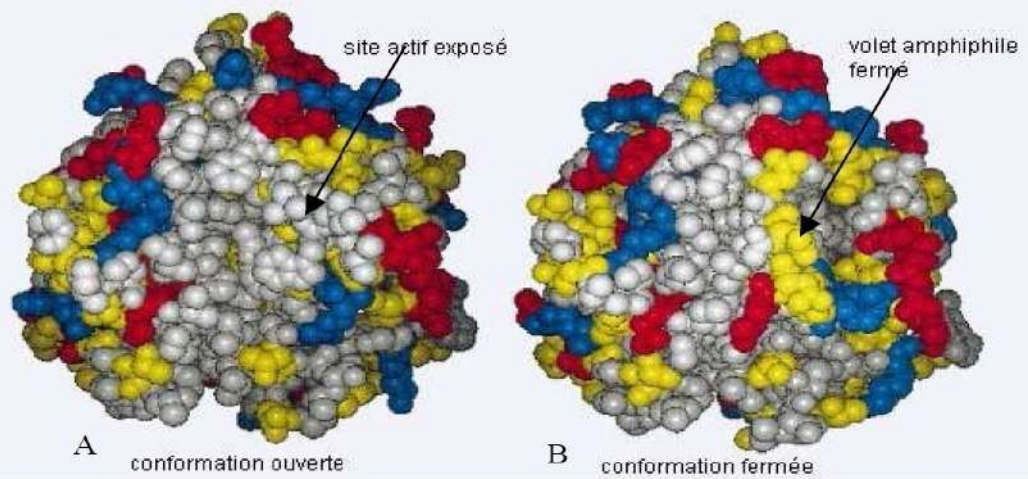


Fig. III.5 : Représentation moléculaire des deux conformations de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* [87].

III.5.4.Trou oxyanion

Le trou oxyanion est constitué de deux acides aminés dont les groupements amides stabilisent l'état de transition du substrat en formant avec celui-ci deux liaisons hydrogènes, le premier de ces deux acides aminés est localisé au sein de la séquence consensus G-X-S-X-G, après la serine catalytique. L'autre peut être un acide aminé placé après une glycine conservée (GX) ou après trois glycines (GGGX) définissant ainsi deux types de trou oxyanion. Cette classification en deux types de trou oxyanion semble corréler avec une différence de spécificité de substrat. En effet, les lipases dites de type GGGX sont spécifiques des substrats à chaînes carbonées courtes tandis que les lipases de type GX sont spécifiques des substrats à chaînes carbonées moyennes et longues [88].

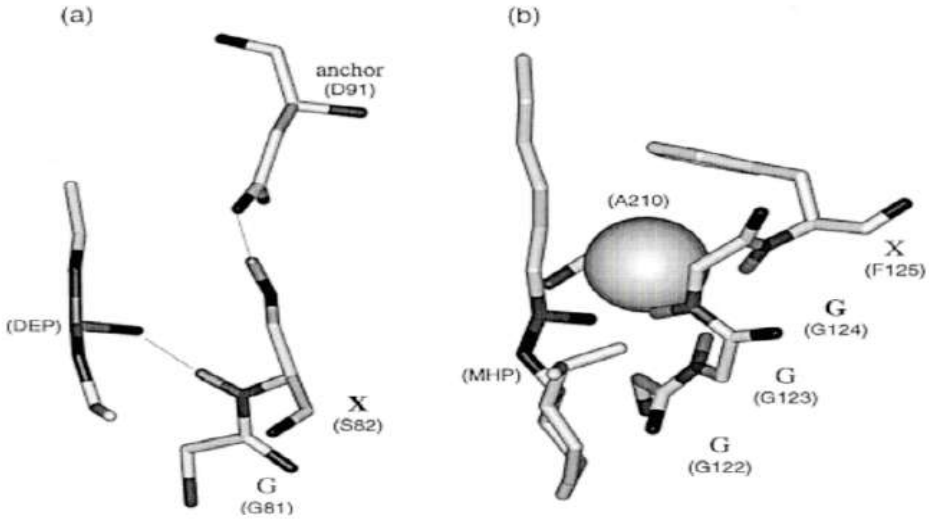


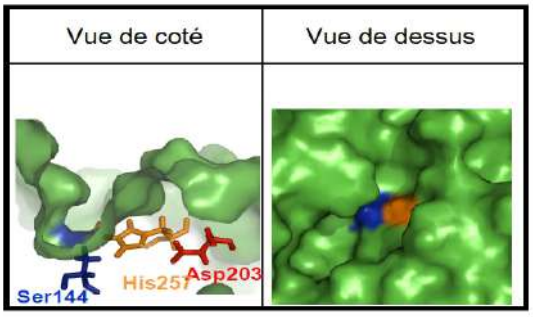
Fig. III.6 : Illustration des deux types de trous oxyanions retrouvés chez les lipases : (a) type GX et (b) type GGGX [88].

III.5.5.Arrimage du substrat dans le site actif

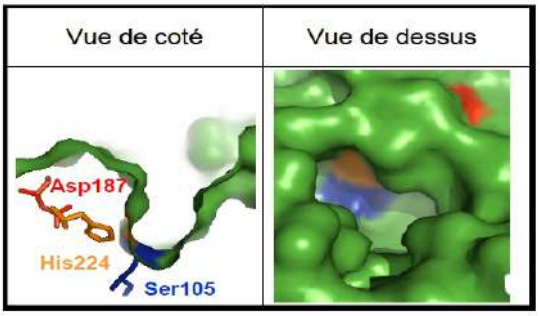
Les structures des lipases cristallisées en présence et en absence d'analogues de lipides ont permis d'identifier les sites de fixation de la partie acyle (-R-C=O) et de la partie alkyle (OR) des esters [89].

Le site de fixation de la partie alkyle est similaire dans toutes les lipases. Il s'agit d'une poche contenant deux zones : une large poche hydrophobe en amont de la sérine catalytique et une, plus petite, en aval de la sérine catalytique qui serait responsable de la stéréo-sélectivité des lipases. En revanche, la topologie du site actif de fixation de la partie acyle varie considérablement selon les lipases [90]. Trois topologie ont été proposées par pleiss et coll dont les vues de côté et de dessus sont représentées en figure III.7. La spécificité de longueur de chaîne est attribuée à la longueur et aux propriétés du site de fixation de la partie acyle [91].

a- les lipases à site actif hydrophobe localisé près de la surface de la protéine



b- les lipases à site actif en forme d'entonnoir



c- les lipases à site actif en forme de tunnel

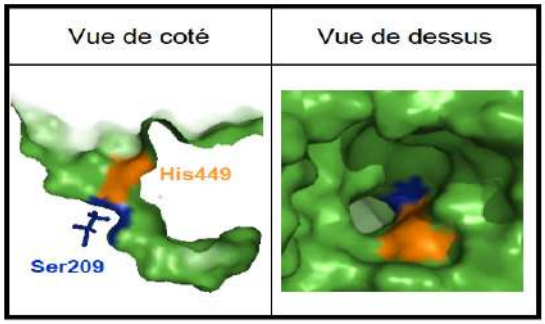


Fig. III.7 : Représentation des trois topologies des sites actifs des lipases [91].

III.6. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des lipases est identique à celui des protéases à serine qui a été étudié dés les années 60. Le mécanisme de catalyse fait appel à une sérine particulièrement réactive, stuée au sein du site actif. La sérine est activée par un relais de charge formé en amont par l'histidine et l'acide aspartique (ou l'acide glutamique) de la triade catalytique. La figure III.8 montre les différentes étapes de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique [62].

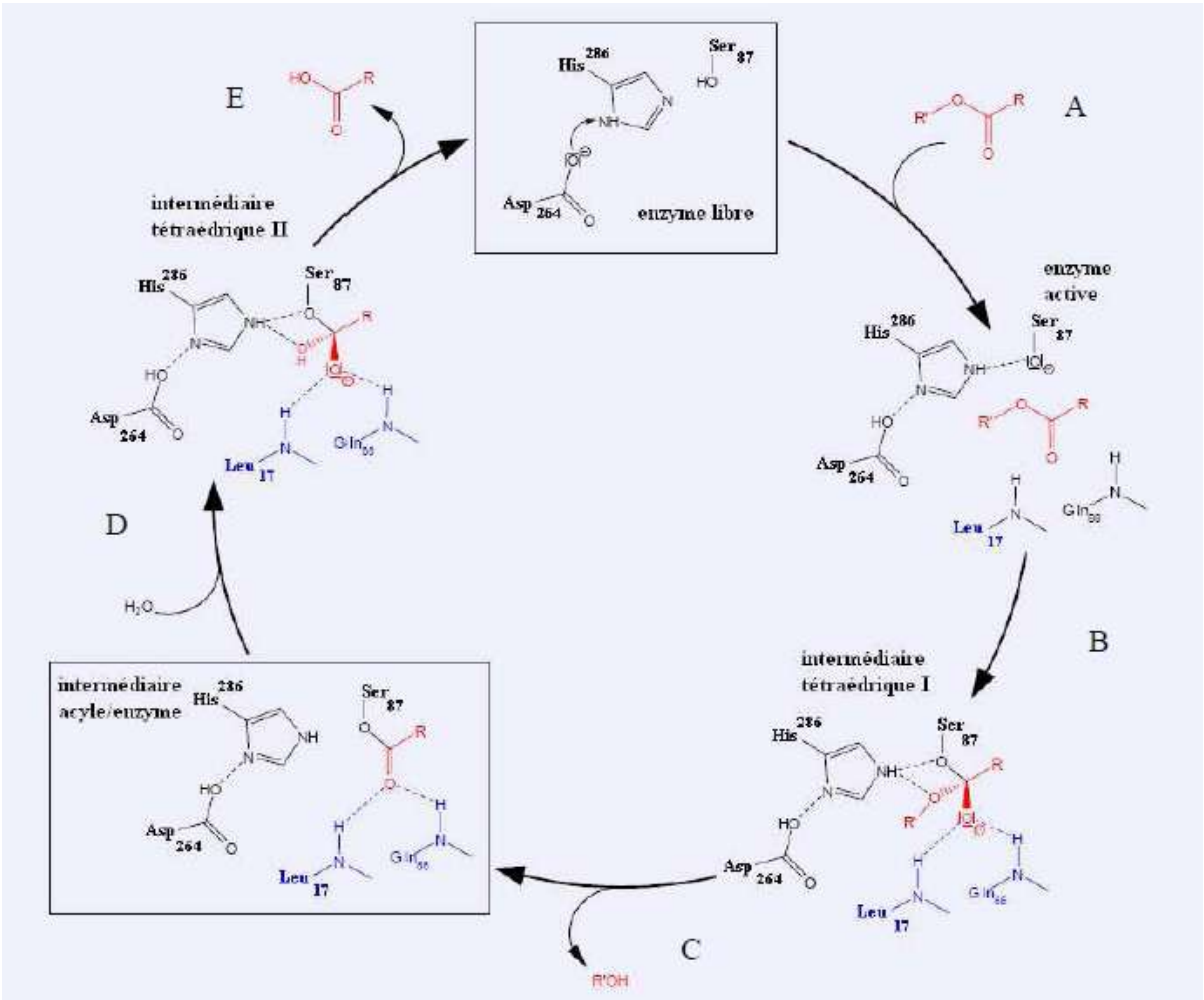


Fig. III.8 : Schématisation de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique [92].

Le substrat figure en rouge. Les acides aminés catalytiques sont en noir. Les acides aminés impliqués dans la composition du puits oxyanionique sont en bleu.

La première étape de la catalyse est l'approche de l'ester qui va subir une attaque nucléophile du résidu serine (figure III.5 A). Il se forme ensuite un intermédiaire tétraédrique portant une charge négative sur l'oxygène (figure III.5 B). Cet intermédiaire, désigné également sous le terme d'oxyanion, très instable, est stabilisé au sein d'un puits oxyanionique (poche hydrophobe) par de pont hydrogènes. Par retour de la charge portée par l'oxyanion, le groupement alcool est libéré (figure III.5 C). Le groupement acyle resté lié à l'enzyme, formant l'intermédiaire acyle/enzyme, subit ensuite l'attaque de molécules d'eau (figure III.5 D). il y a formation d'un deuxième complexe tétraédrique qui se dissocie ensuite en libérant le produit carboxylique d'une part et l'enzyme sous sa forme native d'autre part (figure III.5 E) [62].

III.7. Réactions catalysées par les lipases

III.7.1.Réactions d'hydrolyse

En milieu aqueux, les lipases catalysent spécifiquement l'hydrolyse des liaisons esters des lipides à longues chaînes (figure III.9) dans des systèmes biphasiques, à l'interface entre la phase aqueuse dans laquelle elles sont solubilisées et la phase apolaire constituée par l'ester d'acide gras non solubilisé. Cette réaction constitue la fonction première des lipases dont les substrats naturels sous forme d'émulsion sont les triglycérides. Il en résulte la libération de monoglycéride et diglycérides, de glycérol et d'acides gras. Cette activité hydrolytique trouve des applications dans de nombreux secteurs industriels comme l'industrie laitière pour la production d'arômes, dans le traitement des effluent, ou pour la production des acides gras [93].

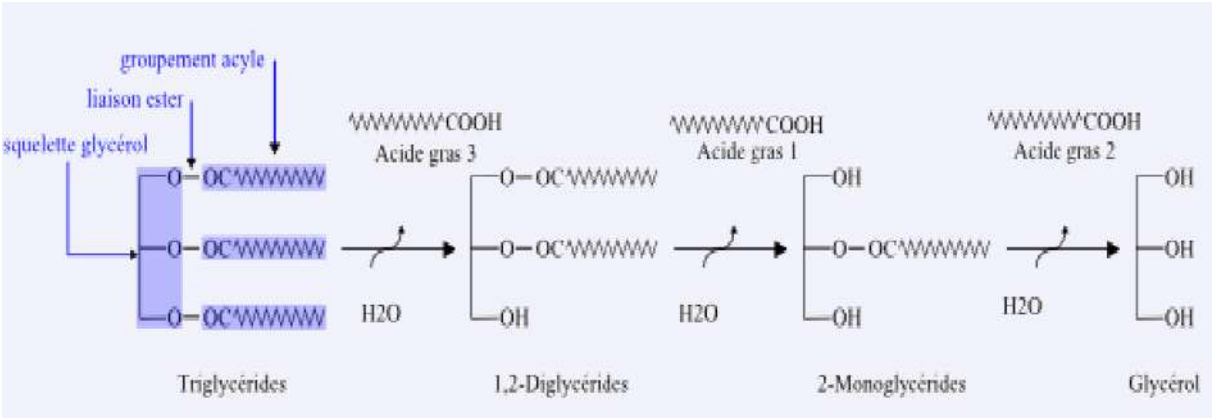
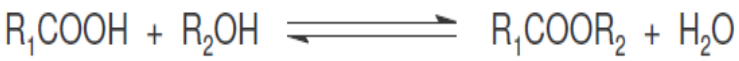


Fig. III.9 : Hydrolyse des triglycérides [62].

III.7.2.Réactions de synthèse

Dans les milieux organiques ou dont l'activité de l'eau est faible, les lipases catalysent la réaction inverse, c'est-à-dire la synthèse de liaisons esters, qui peut se faire selon trois schémas réactionnels :

- La réaction d'**estérification** directe entre un acide et un alcool :



Où R_i sont des groupements alkyls

L'estérification est une des réactions les plus importantes en chimie organique, et l'industrie est toujours à la recherche de procédés pratiques d'estérification.

Il y a eu au cours de ces dernières années un développement important des applications des lipases pour la production d'esters dans les domaines agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Les lipases immobilisées sont particulièrement intéressantes pour ces utilisations industrielles, puisqu'elles peuvent être facilement manipulées. Une large gamme d'esters d'acide gras est maintenant produite commercialement en utilisant une lipase immobilisée, en présence de solvants non aqueux. Par exemple, à partir de l'acide oléique et de méthanol, l'ester est synthétisé pendant un temps de 9 heures avec un rendement plus de 60% [94]. Des esters ont été synthétisés à partir d'acides gras à longue chaîne (12-20 atomes de carbone) et d'alcools à courte chaîne, afin de servir dans la confection de produits alimentaires ou cosmétiques, tandis que ceux issus d'acides gras à longue chaîne et d'alcools à longue chaîne sont utilisés dans la fabrication de plastifiants et de lubrifiants [95]. Ainsi la lipase de *Candida rugosa* immobilisée sur du nylon a permis la synthèse butyrate de butyle à partir d'acide butanoïque et de n-butanol.

L'utilisation des lipases pour la synthèse d'esters via l'estérification ou la transestérification présente des nombreux avantages par rapport à la synthèse chimique, spécialement dans le cas des composés chiraux [93,72]. Par exemple, la synthèse de composés énantiomériquement purs à partir d'une matière première achirale nécessite l'utilisation d'un auxiliaire chiral. A la fin de la synthèse, l'auxiliaire chiral doit pouvoir être détaché de son support et récupéré pour être réutilisé. Cependant la stéréosélectivité de la réaction n'est pas toujours facile à prévoir. De plus, l'utilisation de quantités stœchiométriques d'auxiliaire chiral peut s'avérer onéreuse. Enfin, cette méthode nécessite

deux étapes de synthèse supplémentaires pour lier et enlever l'auxiliaire chiral dans le cas où ce dernier est lié au substrat. Les synthèses asymétriques peuvent également être catalysées par des enzymes ou des microorganismes [96,97], car elles autorisent des procédés moins polluants, catalysent les réactions dans des conditions douces, et présentent une grande spécificité par rapport aux catalyseurs chimiques. En effet, les enzymes sont chimio-, régio- et stéréosélectives [63].

- La réaction de **transestérification** qui regroupe :
  - **Alcoolyse** : par échange du groupement alcool.



  - **Acidolyse** : par échange du groupement acyle.



Il existe plusieurs applications industrielles de la transestérification par la lipase, telles que la production des équivalents du beurre de cacao, des lipides riches en acides gras polyinsaturés, des substituts de matière grasse du lait et des huiles de basse valeur calorique [98]. L'utilisation des enzymes dans ce type de réaction est préférée à la catalyse chimique qui nécessite des conditions de réaction moins modérées ainsi qu'une étape de purification du produit final.

Un exemple de transestérification réalisée dans le but de produire un ester gras (octyl laurate) est utilisé en industries cosmétiques. La réaction se déroule entre du vinyl laurate en présence du 1-octanol donnant lieu à un octyl laurate et un aldéhyde est représenté à la figure 5[99].

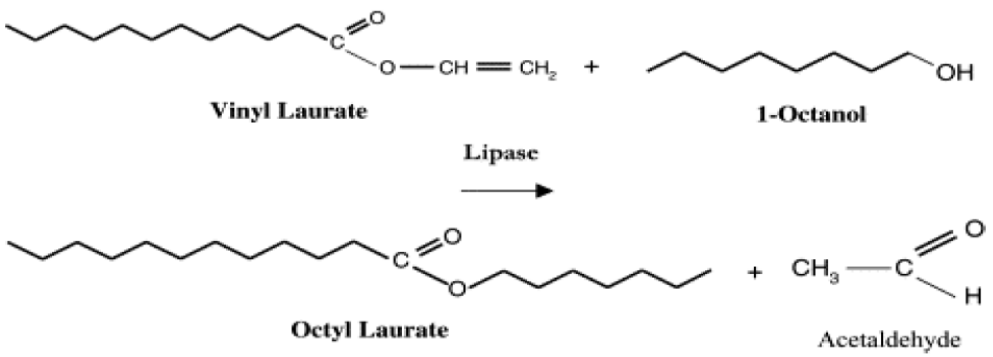
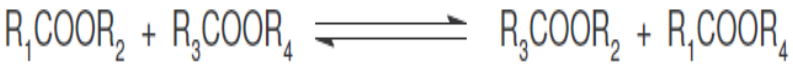


Fig. III.10 : Transestérification de l'octanol et du vinyl laurate par la lipase de *Burkholderia cepacia* [98].

- La réaction d'**interestérification :** par échange du groupement acyle et alcool.



Certaines huiles végétales, comme par exemple l'huile de palme et l'huile d'amande douce, présentent des limites d'applications à cause de leur teneur élevée en acides gras saturés qui sont associés aux maladies cardiovasculaires. Pour élargir leur utilisation commerciale ces huiles végétales peuvent être modifiées physiquement (par fractionnement) ou chimiquement, par mélange avec d'autres huiles ou par traitement enzymatique (interestérification). De telles modifications des huiles et des matières grasses permettent également aux industriels de répondre à la demande des consommateurs en produits plus sains.

- **Autres réactions** : Les lipases peuvent catalysées d'autres réaction comme **l'aminolyse** ou **amidation** si $R_2 = H$



Les amides primaires sont utilisés à grande échelle dans les procédés d'extrusion de polymères, elles peuvent être synthétisées par réaction directe des acides carboxyliques avec les amines ou avec l'ammoniac catalysé par des lipases [100,101].

III.8. 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 [62].

Après les protéases et les carbohydrases, les enzymes lipolytiques sont le troisième grand groupe d'enzymes industrielles [102]. Aujourd'hui, les lipases sont utilisées dans de nombreux secteurs industriels. Leurs principales applications sont regroupées dans le tableau III.1 :

Tableau III.2 : Quelques applications industrielles des enzymes lipolytiques [103].

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

INTRODUCTION:

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité hydrolytique d'une lipase extraite à partir d'une source végétale, sous forme libre et immobilisée, sur les lipides et plus particulièrement les triglycérides. Donc, notre but est la détermination des conditions optimales permettant l'obtention d'un rendement maximal de la réaction catalytique. Pour cela, la stratégie expérimentale adoptée consiste à étudier l'effet d'un seul facteur à la fois, déterminer la valeur optimale et de fixer celle ci, comme valeur pour la suite de l'étude. Deux types de réactions catalysées par la lipase seront étudiés : l'hydrolyse d'un lipide et l'estérification.

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

- La première partie consiste à choisir la source végétale donnant une activité lipasique maximale, une purification éventuelle de l'extrait enzymatique brut nécessaire pour assurer la stabilité de son activité enzymatique ainsi que l'obtention d'une activité spécifique maximale.
- Dans la deuxième partie, les effets de certains paramètres physico-chimiques sur l'activité lipasique seront étudiés. Elle présente une étape primordiale dans toute étude enzymatique, l'analyse de l'influence des conditions opératoires (pH, température, la concentration du substrat d'huile d'olive " triglycérides " et la concentration d'enzyme) sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique de la lipase sous forme libre, couplée à l'étude de l'effet de quelques composés chimiques sur l'activité de l'enzyme, donnent des informations sur la nature du mécanisme et permettant l'obtention des conditions optimales pour l'hydrolyse du substrat.

  Par ailleurs, ces données pourront être exploitées pour l'obtention des paramètres et de modèle cinétique.
- La troisième partie s'intéresse essentiellement aux études de faisabilité de l'immobilisation de la lipase dans le gel alginate de calcium afin de comparer les résultats à ceux obtenues lors de l'étude avec l'enzyme libre.
- Enfin, la quatrième partie comporte une autre application de la lipase qu'était l'estérification (réaction inverse de l'hydrolyse) afin d'évaluer l'intérêt de la lipase pour réaliser ces applications, ainsi que sa stabilité dans des milieux organiques.

IV. RÉACTIFS UTILISÉS :

IV.1. Substrat : Huile d'olive (triglycérides) :

L'huile d'olive est la matière grasse extraite des olives, Elle est composée d'environ 99 % de matières grasses. Le 1 % restant constitue les composés mineurs ; il s'agit essentiellement (par ordre d'importance) : du squalène, des alcools triterpéniques, des stérols (β-sitostérol), des phénols, et des dérivés du tocophérol.

La matière grasse de l'huile d'olive est composée de triglycérides. Ceux-ci sont constitués d'acides gras de différentes sortes, dont la répartition est caractéristique de l'huile d'olive. Lorsque des triglycérides sont dégradés, les acides gras qui les constituaient sont détachés et errent librement dans l'huile : ils sont alors dits *« acides gras libres »*. Leur pourcentage dans l'huile est ce que l'on appelle *« acidité »* de l'huile. Cette acidité ne se perçoit jamais sous forme de goût acide, mais sous la forme de telle ou telle dégradation, comme par exemple un goût de moisi.

Les caractéristiques de l'huile d'olive sont les suivantes :

- point de fumée : 210 °C
- point d'ébullition : 300 °C
- masse volumique : 0,9g/cm^3
- viscosité dynamique à 20 °C : 84cP

IV.2. Gomme arabique :

La gomme arabique est un polysaccharide acide fortement ramifié qui se présente sous la forme de mélanges de sels de potassium, de magnésium et de calcium. Les éléments monomères de l'acide libre (acide arabique) sont le D-galactose, le L-arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique.

Elle est sous forme de poudre de couleur jaune pâle à jaune brunâtre, fade et inodore. Elle est soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool. Même en concentration de 30 à 40 %, la gomme arabique reste très peu visqueuse. Elle sert principalement d'émulsifiant, spécialement pour les huiles d'agrumes, de colloïde protecteur dans les émulsions et de supports pour les arômes.

IV.3. Solutions tampons :

Elles sont préparées par l'acide KH_2PO_4 et sa base conjuguée Na_2HPO_4 pour les différent valeurs du pH 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 et 9.

IV.4. Support d'immobilisation : Alginate de sodium

L'alginate de sodium est principalement constitué par le sel sodique de l'acide alginique, lequel est un mélange d'acides polyuroniques $[(C_6H_8O_6)_n]$ constitués par des résidus de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-guluronique. Il est obtenu principalement à partir d'algues appartenant à la famille des Phéophycées.

Poudre blanche à brun jaunâtre pâle, lentement soluble dans l'eau en formant une solution visqueuse et colloïdale, pratiquement insoluble dans l'alcool et dans l'éther.

Les alginates constituent une famille de polyosides dont la structure en ruban étiré lie les ions métalliques, en particulier les ions de calcium selon la réaction suivante :

$$2(C_5H_7O_4COO^-, Na^+) + Ca^{2+} \longrightarrow (2\ C_5H_7O_4COO^-, Ca^{2+}) + 2Na^+$$

IV.5. Autres réactifs :

- Hexane ;
- Heptane ;
- Chlorure de calcium ($CaCl_2$) ;
- Éthanol ;
- Acétone ;
- Acide acétique ;
- Bleu de coomassie ;
- Acide acétique ;

V. PRÉPATION D'ÉMULSION D'HILE 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 est versée en pluie. 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.

VI. CHOIX DE LA SOURCE DE LA LIPASE :

La lipase est une enzyme qui présente dans la plupart des tissus animaux et végétaux, et dans de nombreux microorganismes.

Dans le présent travail la lipase choisie est de source végétale et en particulier celles contenues dans les graines de sources d'huile, car elle est facilement isolée par un simple broyage. La lipase extraite à partir différentes source de graines (graines de ricin, graines de lin et graines de nigella) sera testé afin de choisir à la fin, une source qui donne le meilleur rendement d'hydrolyse.

L'activité hydrolytique des lipases est déterminée par la méthode titrimétrique d'une émulsion d'huile d'olive [104], définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1mol d'acide gras libre (n_{AGL}). Donc le rendement d'hydrolyse est estimé par le nombre de mole d'acide libérés.

VI.1. Préparation du l'extrait enzymatique brut et dosage de l'activité enzymatique :

VI.1.1. Mode opératoire :

La préparation du l'extrait enzymatique brut se fait selon la méthode de Hassanien et Mukherjee [105]. Les graines préalablement décortiquées sont broyées dans un mortier. Après l'ajout de broyat dans l'eau distillée, les échantillons sont agités vigoureusement au vortex jusqu'à la dissolution du broyat. L'extrait enzymatique brut (EEB) ainsi obtenu est filtré sur une gaze, pour éliminer les grosses particules peu ou mal broyées. On obtient pour chaque matériel végétal un extrait brut.

Pour chaque source de graines, on fait un test lipasique dans les conditions standard (température ambiante, pH 7.0), le milieu réactionnel utilisé est préparé selon la procédure suivante : dans deux erlenmeyers : on introduit 5ml d'émulsion d'huile d'olive, 3ml solution tampon pH 7.0 et 0.5ml de $CaCl_2$. Le premier erlenmeyer est utilisé comme un témoin, et on ajoute dans le deuxième erlenmeyer 3ml de l'extrait enzymatique brut (test standard). Après 30min, la réaction a été stoppée par l'ajout 5ml de la solution acétone-éthanol (1 :1, v/v). Les deux milieux sont titrés par la solution NaOH de 0.05M.

Les étapes de broyage, de filtration et de dosage enzymatique sont représentées sur le schéma VI.1 :

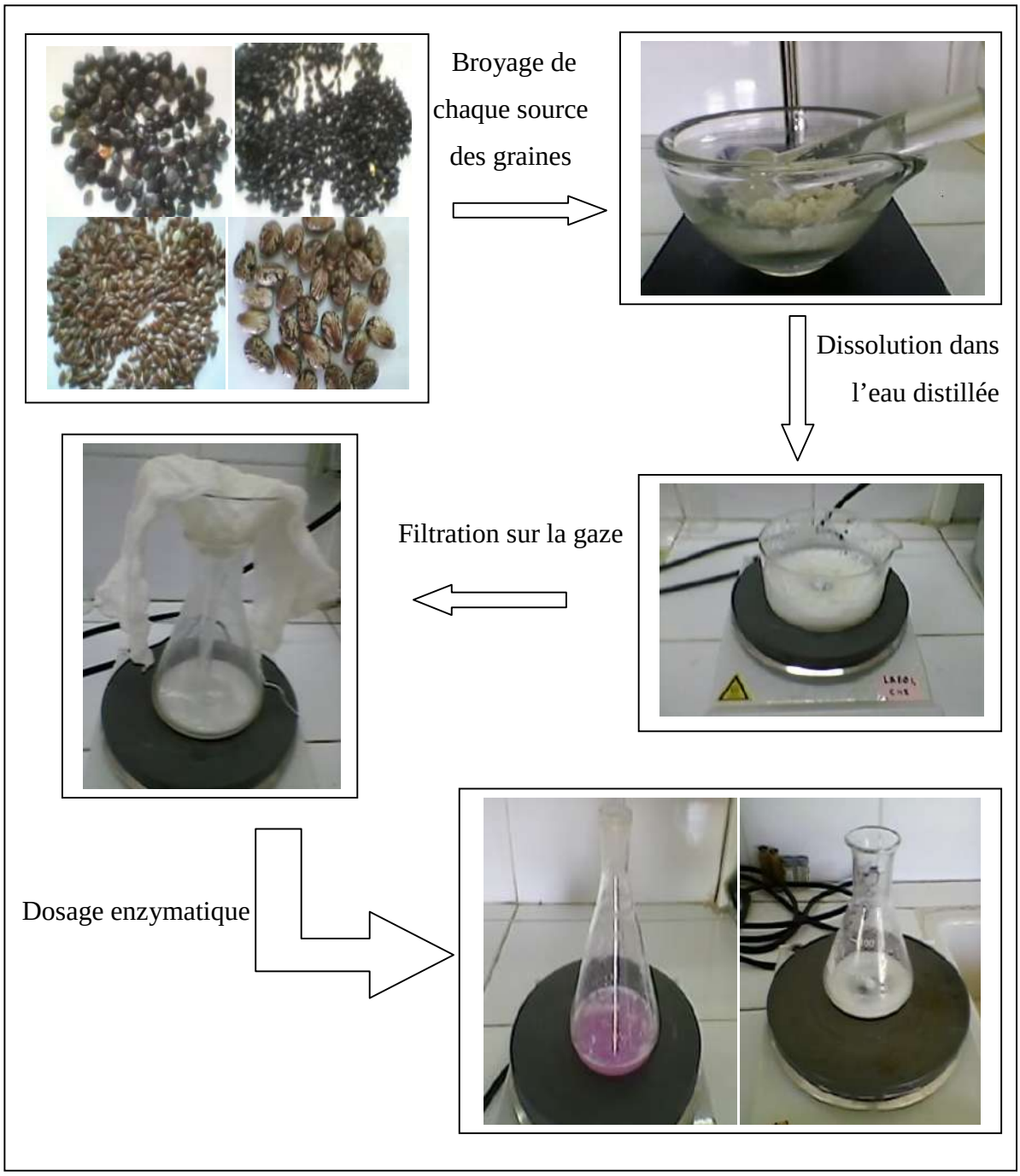


Fig. VI.1 : Protocole de préparation et de dosage enzymatique des extraits bruts de chaque source des graines [105].

VI.1.2. Résultats et discussion :

Le tableau VI.1 résume les résultats des activités lipasiques pour différentes sources de graines de plantes grasses, on observe que le nombre de moles d'acide est augmente dans le deuxième erlenmeyer, cela signifie que la lipase est active. La différence de nombre de mole entre les deux milieux détermine l'activité enzymatique pour chaque source :

Tableau VI.1: Activité enzymatique pour différentes sources végétales de la lipase.

Sources des graines	**n_{AGL} (µmol)**	**Activité enzymatique (µmol/min)**
Ricin	240	8
Nigella sativa	220	7.33
Lin	100	3.33
Nigella	85	2.83

De ce tableau, il ressort que la lipase des graines de ricin (*Ricinus communis*) présente la plus forte activité hydrolytique par rapport à celle obtenue par les graines de nigella (*Nigella sativa*) et les graines de lin (*Linum usitatissimum* L). Les graines de ricin sont facilement décortiquées et broyées. Par contre, les graines de nigella et de lin sont dures, ce qui entraîne la difficulté de l'isolement de l'enzyme. Cette évaluation a permis d'apprécier l'efficacité de ces lipases avant la mise en œuvre des réactions enzymatiques.

De nombreux travaux ont été menés sur l'utilisation de la lipase végétale pour l'hydrolyse les lipides (triglycérides) et pour d'autres applications [106,107,108,109,110,111].

A la lumière de ces résultats, les graines de ricin est la source qui sera utilisée dans la suite de l'étude.

VII. PURIFICATION DE LA LIPASE :

La lipase brute utilisée pour tester l'activité hydrolytique n'est pas pures, l'extrait peut contenir des composés solubles (lipides, protéines, sels minéraux…) n'ayant pas d'une activité lipasique. Il faut tout d'abord la purifier pour isoler l'enzyme et éliminer les composants qui peuvent être des agents de contamination ou d'altération. Il existe plusieurs techniques de purification en utilisant plusieurs agents (sels, solvant, etc). Selon la nature de protéine et ses applications, il faut donc utiliser des milieux dont les caractéristiques sont compatibles avec la stabilité des protéines sans les dénaturer. Une des méthodes se prêtant le mieux à de gros volumes est la précipitation avec de l'acétone. La purification de l'extrait brut de la lipase est réalisée selon cette procédure décrite dans plusieurs travaux [108,112,113].

VII.1. Mode opératoire :

Les lipases sont extraits d'après la méthode de Hassanien et Mukherjee [105]. Toutes les opérations de l'isolement de l'enzyme ont été réalisées à 4°C [114]. Trois volumes d'acétone galcial sont versés goute à goute dans un volume de l'extrait brut disposé sous agitation dans

la glace pilée. Une fois l'acétone est versé totalement, la mélange (extrait brut-acétone) est laissé dans le frigo pendant 2heures, il se forme alors un précipité blanc. Sa récupération se fait par centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes. Le culot récupéré a été séché à température ambiante, la poudre obtenue est l'extrait enzymatique de la lipase partiellement purifiée (EEPP).

La lipase purifiée est souvent stable et doit être généralement conservée dans des conditions la protégeant de la dégradation chimique et biologique. L'isolement se fait à 4°C, donc cette température est suffisante pour sa conservation. Les étapes de purification sont récapitulées dans la figure VII.1 :

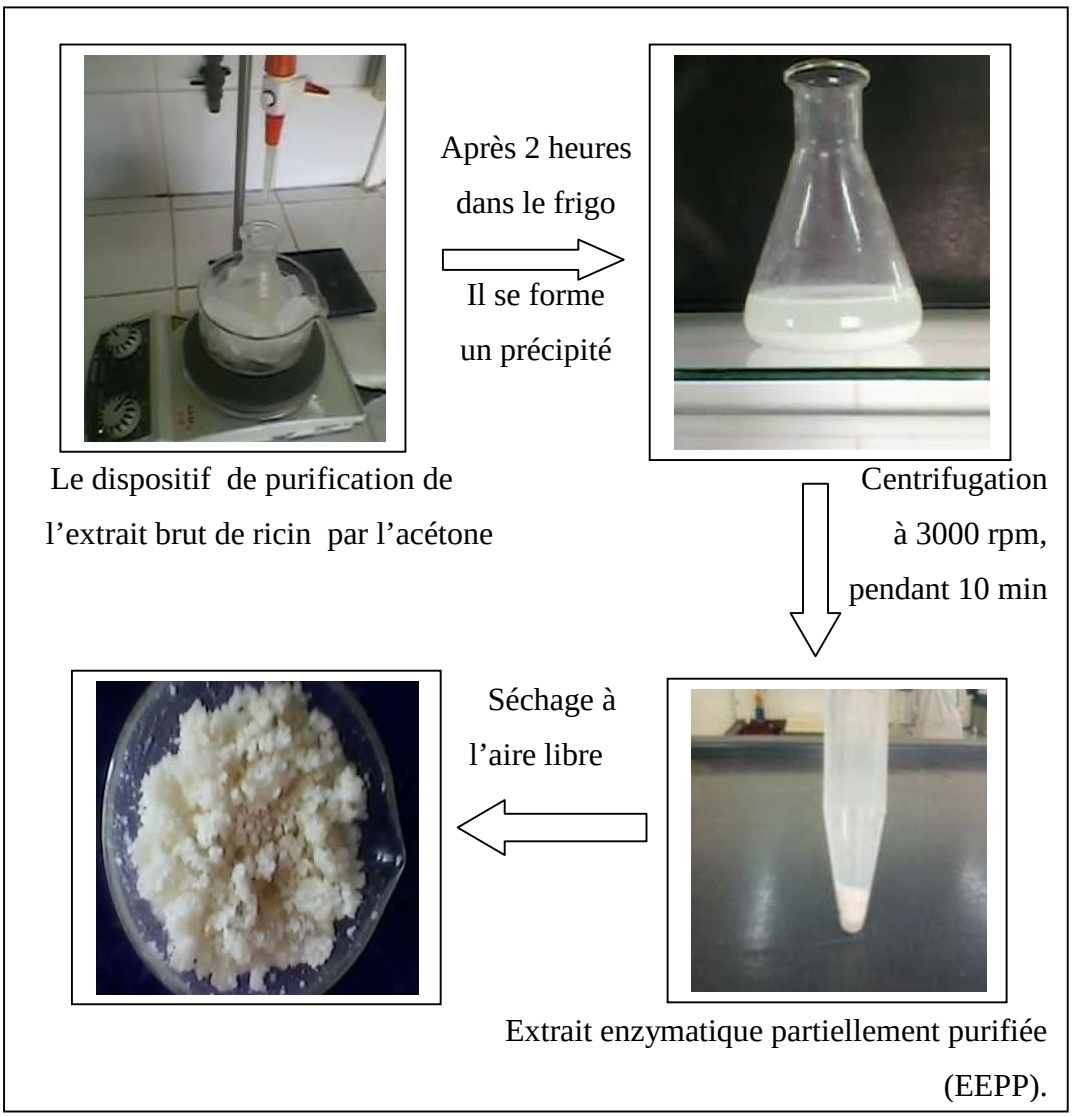


Fig. VII.1: Technique de purification de l'extrait brut de la lipase par précipitation à l'acétone.

VII.2. Résultats et discussion :

L'évaluation de la pureté de la protéine obtenue se fait sur la base de deux critères :

VII.2.1. Critère qualitatif :

Le but principal de la purification est d'obtenir une protéine plus pure et plus stable. D'après la figure VII.2, on observe la différence entre les deux préparations : l'EEB et l'EEPP où la couleur de cette dernière préparation est plus claire que la première.



(A) **(B)**

Fig. VII.2: Apparence de l'extrait enzymatique : (A) avant la purification, (B) après la purification.

VII.2.2. Critère quantitatif :

Quantitativement, on exprime la pureté d'une préparation de protéines en parlant de son activité spécifique. L'activité spécifique est l'activité enzymatique par rapport à la quantité totale de l'ensemble des protéines dans la préparation. Pour cela, on dose avant et après la purification la quantité de protéines totale présente dans les deux extraits (EEB et EEPP).

VII.2.2.1 Dosage de protéine :

La teneur en protéine dans l'enzyme a été déterminée par la méthode calorimétrique de Bradford [115], en utilisant l'albumine comme standard. La technique de Bradford utilise la fixation du bleu de coomassie sur les protéines. Ce colorant existe sous trois formes : une forme anionique colorées en bleu (λ_{max} = 590nm), une forme cationique rouge (λ_{max} = 470nm) et une forme neutre verte (λ_{max} = 650nm). C'est la forme anionique qui se fixerait préférentiellement aux protéines grâce à des interactions électrostatiques avec les

groupements cationiques des protéines (plus particulièrement les groupements fonctionnels basiques et/ou aromatiques).

Gamme d'étalonnage

On réalise une gamme d'étalon contenant de 0 à 100mg/l de protéines à partir d'une solution mère de 100mg/l. dans chaque tube, le volume de l'étalon est de 100µl et 250µl de soude à 1M et 5ml de réactif (bleu de coomassie brillant G250) sont ajoutés. Après 10min, l'absorbance a été mesurée à 590nm. On opère de même sur les solutions enzymatiques (brut et partiellement purifiée) éventuellement diluées pour se situer dans la gamme.

Les résultats obtenus sont représentées dans la figure VII.3 et le tableau VII.1 :

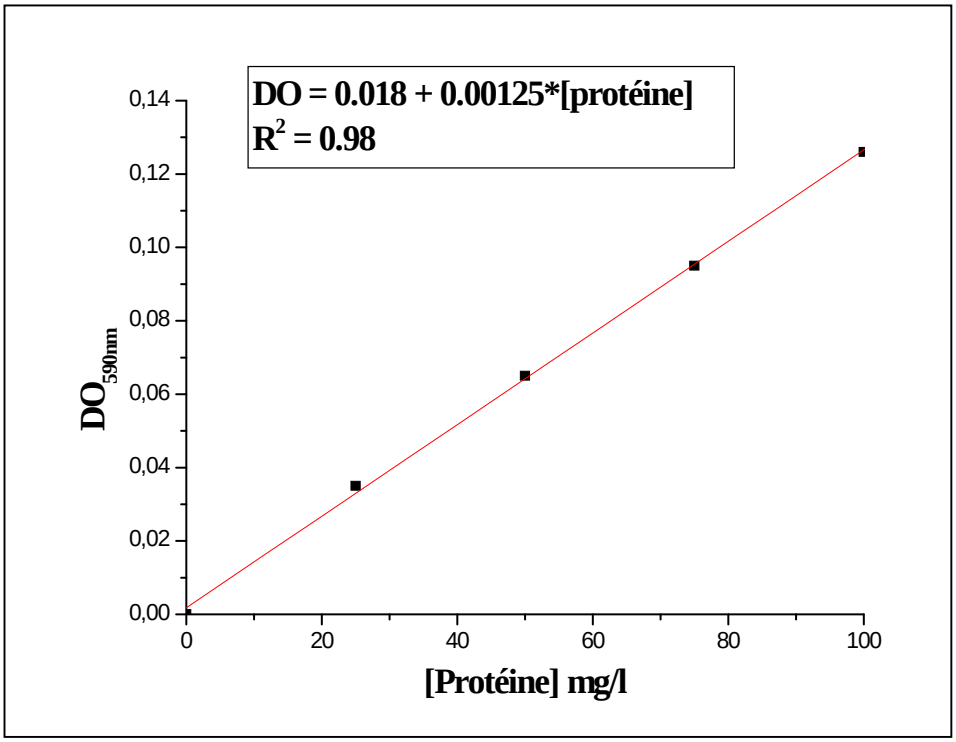


Fig. VII.3 : Courbe d'étalonnage du l'albumine.

Tableau VII.1 : Caractéristiques des préparations enzymatiques de l'EEB et l'EEPP de la lipase.

Etape	Protéine totale (mg)	Activité totale (µmol/min)	Activité spécifique (µmol/mg/min)	Facteur de purification	Rendement (%)
Homogénat initial (EEB)	$96.96 \pm 2\ 10^{-5}$	4.167	0.043	1	100
Purification avec l'acétone (EEPP)	$43.36 \pm 2\ 10^{-5}$	3.333	0.077	1.8	80

L'activité enzymatique est un paramètre qui peut évaluer la pureté d'une préparation enzymatique. Alors, plus l'activité spécifique est élevée, plus l'enzyme est pure.

Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport à la première étape). En effet la purification a justement pour but d'obtenir une protéine de plus en plus pure, ayant donc une préparation dont l'activité spécifique de plus en plus élevée.

Le rendement de la purification est la proportion, en %, de la quantité de la protéine purifiée qui reste par rapport à la quantité initiale. Le rendement diminue de 100% à 80 après la purification avec l'acétone. Ce rendement demeure acceptable vu que l'activité spécifique augmenté de 90%.

VIII. TEST DE SABILITÉ DE LA LIPASE :

VIII.1. Mode opératoire :

La stabilité de la lipase est testée pendant une durée de trois mois dans les deux cas brut et purifié afin d'examiner l'efficacité de la purification par l'acétone. En utilisant la même procédure précédente, on détermine à des intervalles réguliers de temps le nombre de mole d'acide gras libéré au cours de la réaction.

VIII.2. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure VIII.1 :

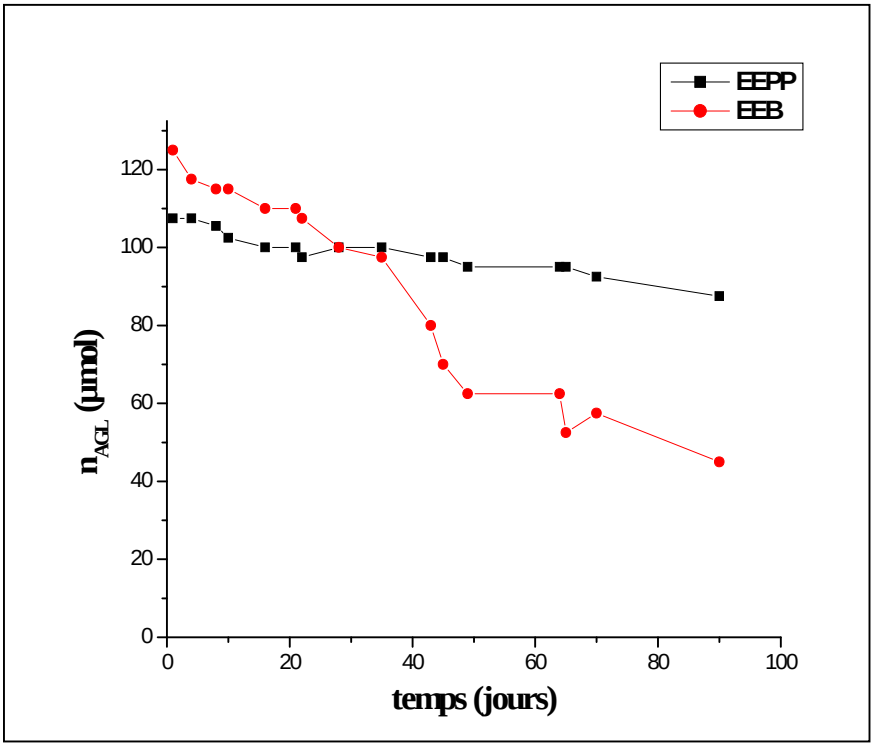


Fig. VIII.1 : Stabilité des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP.

Dans cette étude, nous avons étudié la stabilité de la lipase pendant le stockage à une température de 4°C.

D'après la figure VIII.1 on constate que l'activité enzymatique de l'extrait brut "frais" est plus grande que celle de l'extrait purifié. Elle diminue ensuite jusqu'à où les deux extraits ont la même activité enzymatique (après un mois). Cette diminution peut être due à la présence d'un milieu favorable à la dégradation biologique et chimique de la lipase (présence de nombreux agents : microorganismes, chimiques ou physiques), et provoquant ainsi la dénaturation ou la décomposition des protéines malgré le respect des conditions de conservation. Après un mois, l'activité enzymatique de l'extrait brut diminue très rapidement. Par contre pour l'extrait purifié, son activité enzymatique reste pratiquement stable durant deux à trois mois. Malgré une légère perte de l'activité lipasique totale, la purification de l'enzyme par l'acétone permet donc éliminer les impuretés présentes dans l'extrait brut et par la suite elle permet de stabiliser l'enzyme et augmenter son activité spécifique.

IX. ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS DE RÉACTION SUR LA CINÉTIQUE D'HYDROLYSE DU TRIGLYCERIDES PAR LA LIPASE LIBRE :

Pour évaluer l'influence des conditions de réaction sur l'activité enzymatique de la lipase en phase homogène (l'enzyme est sous forme libre), une série d'expériences a été réalisée en faisant varier le pH, la température, la concentration du substrat (triglycérides) et la concentration d'enzyme.

IX.1. Effet du pH :

Toutes les enzymes sont sensibles aux variations de la concentration en H^+ du milieu, donc il existe une zone de pH pour laquelle l'activité enzymatique est maximale.

Afin d'examiner l'influence de ce paramètre sur le rendement d'hydrolyse de triglycéride, on va réaliser la procédure suivante :

IX.1.1. Mode opératoire :

Le milieu réactionnel contient 5ml de l'émulsion préparé (contient 0.5ml d'huile d'olive), 0.5ml de la solution $CaCl_2$ et 3ml de la solution tampon variant de pH 4.0 à pH 9.0. A température ambiante et sous agitation continue (1000trs/min), la réaction est déclenchée après l'ajout de 0.1g de l'extrait enzymatique purifiée. Après 30min, la réaction a été stoppée par l'ajout de 5ml de la solution acétone-éthanol (1 :1, v/v). Les milieux sont titrés par la solution NaOH de 0.05M.

Pour évaluer l'effet de l'enzyme sur les triglycérides pour les différents milieux réactionnels, on réalise en parallèle les mêmes milieux réactionnels sans extrait enzymatique appelés : témoins

Pour chaque pH, on détermine le rendement d'hydrolyse (Rh %) de triglycérides par la lipase libre de ricin (*Ricinus communis*) selon la règle suivante :

$$Rh\ (\%) = \frac{(n_{AGL} - n_{AGL0}) \cdot M_{moy}}{m_{TG_0}} * 100 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (IX.1).$$

n_{AGL0} : nombre de moles d'acide gras libre initial (mole).

n_{AGL} : nombre de moles d'acide gras libre après la réaction (mole).

m_{TG0} : masse de triglycérides initiales(g).

M_{moy} : masse molaire moyen de triglycérides (g/mole).

M_{moy} = 278.6g/mole.

IX.1.2. Résultats et discussion :

Les rendements d'hydrolyses calculés pour chaque pH, sont représentés sur la figure suivante :

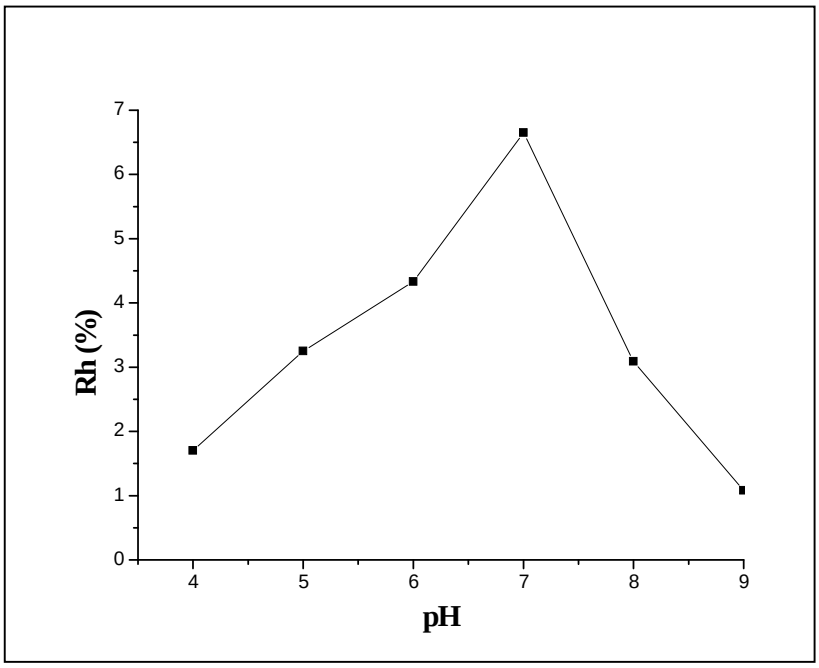


Fig. IX.1 : Effet du pH sur le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase libre ([TG] = 0.2M ; T_{amb} ; m_E = 0.1g ; t = 30min).

Le profil d'activité représenté sur la figure IX.1 suggère que le rendement d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase est influencé par la nature du milieu (acide, neutre ou basique), où l'on observe que l'augmentation de pH provoque une augmentation de rendement d'hydrolyse à un certain degré puis diminue.

Pour le milieu neutre (pH=7), le rendement d'hydrolyse de l'huile d'olive est supérieur à celui enregistré par les autres valeurs de pH.

A la lumière de ces résultats, on peut dire que les résidus d'acides aminés du site actif de la molécule enzymatique qui possèdent des groupements ionisables (certains vont lier et positionner le substrat, d'autres participer à la réaction et la plupart servir au maintien de la conformation de l'enzyme), sont sensibles au pH (même le substrat) et possèdent des états d'ionisation différent selon la valeur du pH.

Le site catalytique de la lipase est sous forme de triade : sérine/acide aspartique (parfois remplacé par un acide glutamique)/histidine, la sérine est activée par un relais de charge formé en amont par l'histidine et l'acide aspartique (ou l'acide glutamique) où elle est responsable à la fixation de triglycéride (huile d'olive) qui possède le groupement $-COO^-$.

L'abaissement du pH du milieu entraîne sa transformation en –COOH qui ne permet plus la fixation de triglycérides et supprime l'activité de la lipase. Aussi, la présence de l'histidine qui constitue la triade catalytique dans le site actif, possède un groupement imidazole où leur pk_a est voisin de 6. Inversement, une élévation du pH facilite la liaison des groupes positifs du substrat sur les sites négatifs de l'enzyme. Mais, comme le triglycéride est un composé apolaire, le milieu basique n'aide pas la fixation du substrat sur le site actif de la lipase.

Pour la suite de l'étude le pH du milieu sera maintenu à la valeur constante pH 7±0.2.

IX.2. Effet de la température :

Comme pour le pH, il existe une zone de température, parfois étroite, pour laquelle l'activité enzymatique est maximale.

IX.2.1. Mode opératoire :

Le protocole opératoire sera répété mais, cette fois la température du milieu réactionnel est variée entre 20-70°C à l'aide d'un bain marie thermostaté, et le pH du milieu fixé à 7.0±0.2.

IX.2.2. Résultats et discussion :

Les rendements d'hydrolyses calculés pour chaque température, sont représentés sur la figure IX.2 :

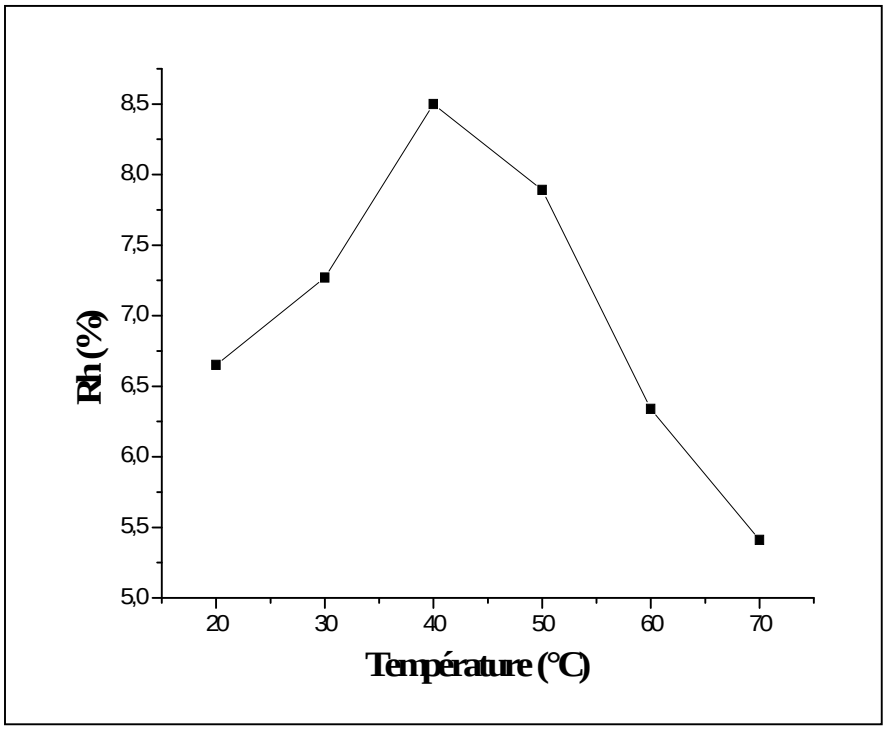


Fig. IX.2 : Effet de la température sur le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase libre ([TG] = 0.2M ; pH=7.0 ; m_E = 0.1g ; t = 30min).

D'après l'allure représentée sur la figure IX.2, on constate que le rendement d'hydrolyse maximale est supérieur à celui retrouvé dans la partie d'optimisation du pH de milieu réactionnel car, l'un des paramètres à optimiser sera fixé.

La variation de rendement d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase libre en fonction de la température résulte de deux effets antagonistes : d'une part l'augmentation de l'agitation des molécules avec l'élévation de température qui va accroître la fréquence des collisions entre le triglycéride et la lipase, cette phase est compris entre 20°C et 40°C, d'autre part la dénaturation de lipase dans la zone des températures supérieur à 40°C, cette dénaturation va modifier la structures de la protéine et donc faire passer la lipase d'une conformation active à une conformation dépourvue d'activité.

Le rendement maximal est enregistré donc pour une température optimale de 40 ± 1°C.

IX.3. Effet du substrat :

Une des premières mesures effectuées dans toute étude cinétique est la détermination de la vitesse d'une réaction en fonction de la concentration d'un réactif. Donc pour déterminer la vitesse d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase libre, il faut tout d'abord, faire une étude cinétique en variant la concentration de substrat dans le milieu.

IX.3.1. Mode opératoire :

Lorsque l'optimisation des conditions opératoires se fait pas par pas, alors le protocole opératoire à suivre est le même protocole que précédemment, sauf que la concentration du substrat (huile d'olive) est variée entre 0.02M et 0.23M.

IX.3.2. Résultats et discussion :

Toujours à partir d'un réactif, on a un produit (acide gras libre). La figure IX.3 représente le développement du produit en fonction de temps :

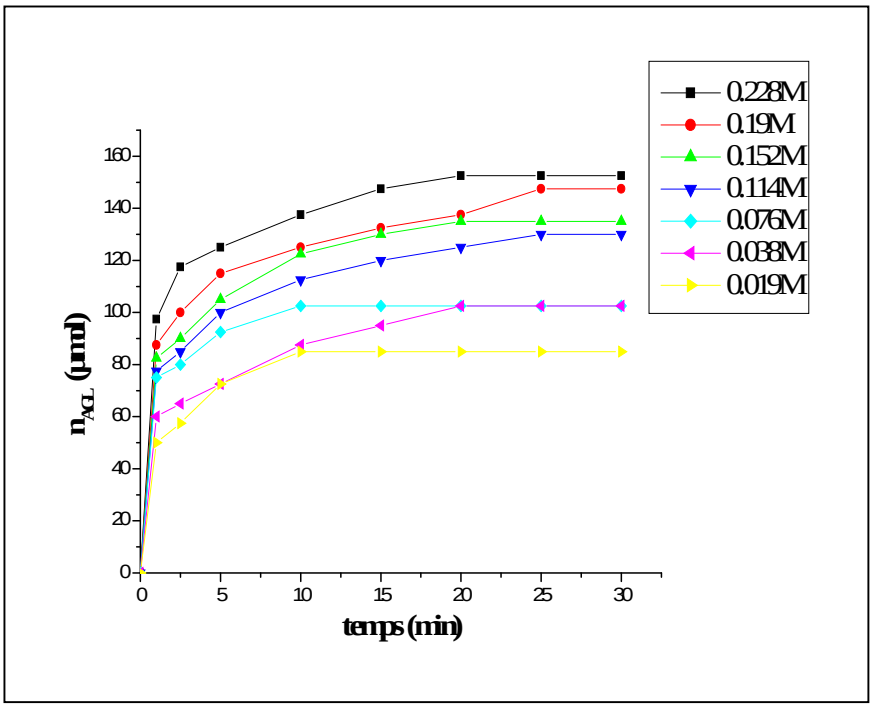


Fig. IX.3 : Cinétique de formation d'acide gras libre pour chaque concentration du substrat (pH=7 ; T=40°C ; m_E=0.1g ; t=30min**).**

La vitesse initiale est la tangente d[P]/dt à la courbe [P] = f(t) au point t=0.

Donc, on détermine la vitesse initiale pour chaque concentration du substrat.

Les critères d'optimisation sont :

- L'activité lipasique (mole d'acide libéré/min).
- Rendement d'hydrolyse ([acide]/[substrat]*100).

Alors, pour déterminer la masse du substrat optimale ; on trace la vitesse initiale et le rendement d'hydrolyse en fonction de la concentration de substrat :

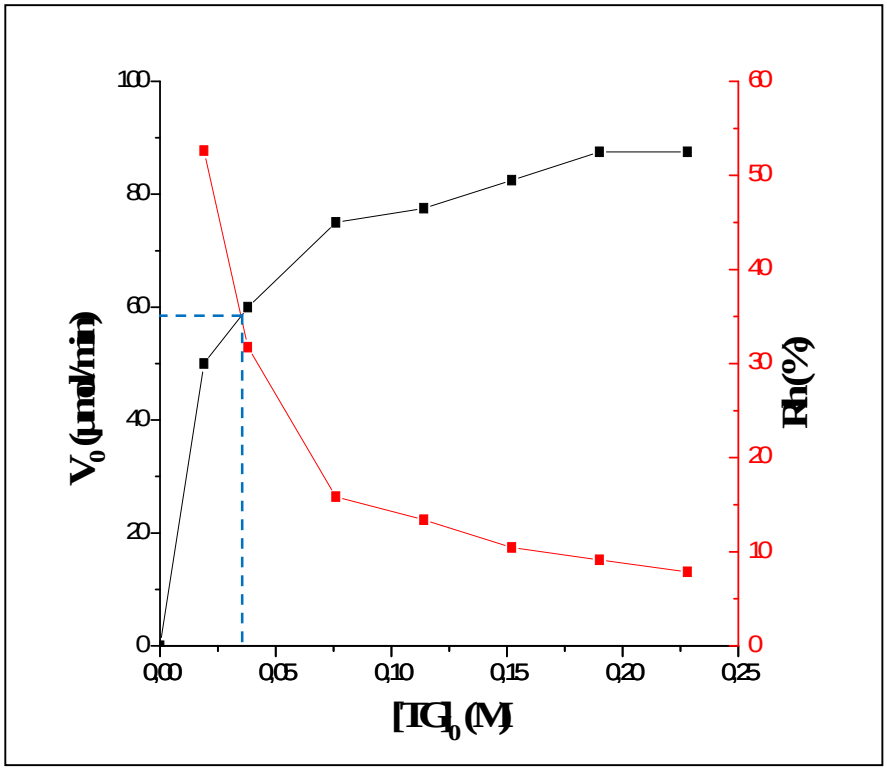


Fig. IX.4 : variation de la vitesse initiale et le rendement d'hydrolyse en fonction de la concentration de substrat (pH=7 ; T=40°C ; m_E=0.1g ; t=30min).

Les résultats représentées dans la figure IX.4 montre que plus il y a de réactif, plus la vitesse de la réaction, V, est élevée. Mais V n'augmente plus proportionnellement quand la masse du substrat augmente, puis cesse d'augmenter au-delà de 0.15M.

Ce comportement résulte d'un effet de saturation : quand V ne varie plus même si m_S augmente, le système est saturée par le substrat. L'interprétation physique est que chaque molécule d'enzyme dans le mélange réactionnel a son site de fixation du substrat occupé par S.

L'intersection des deux courbes donne l'optimum du substrat (3.8 10^{-2}M), car elle donne une meilleure d'activité et un bon rendement d'hydrolyse.

Ce comportement « V_0 = f ($[TG]_0$) » est similaire à celui d'une cinétique classique Michaelis-Menten :

Donc la vitesse de la réaction est donnée par la relation suivante :

$$V_0 = V_M \frac{[TG]_0}{K_M + [TG]_0} \quad \text{.....(IX.2).}$$

Alors à partir de cette représentation hyperbolique, on peut déterminer les paramètres cinétiques V_M et K_M telle que : V_M est la vitesse maximale et K_M est la constante de **Michaelis-Menten** qui est la valeur de $[TG]_0$ pour $V = V_M/2$.

La linéarisation de Lineweaver-Burk nous permet de confirmer si la cinétique est michaelienne ou non et d'accéder aux paramètres V_m et K_m. Donc on pourra déterminer les paramètres V_m et K_m à l'aide de la représentation graphique en double inverse $\frac{1}{V_0} = f(\frac{1}{[TG]_0})$ de Lineweaver-Burk.

Donc l'équation (2) devient :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_M} + \frac{K_M}{V_M} \cdot \frac{1}{[TG]_0} \quad \text{.....(IX.3).}$$

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure IX.5 :

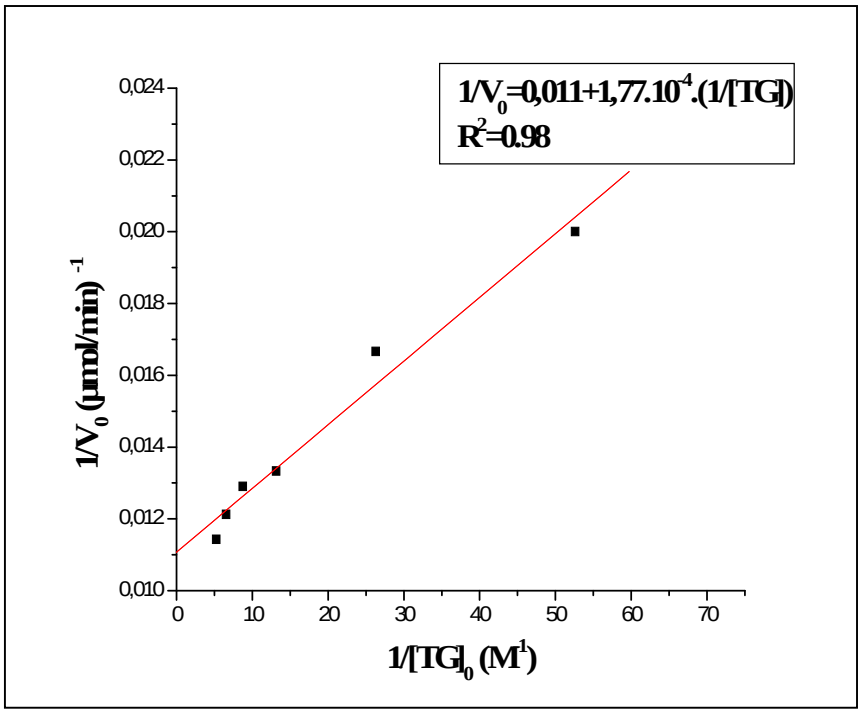


Fig. IX.5 : Représentation en double inverse de Lineweaver-Burck.

Les valeurs des constantes cinétiques obtenues à partir de la linéarisation de Lineweaver-Burck illustrés sur la figure IX.5 sont introduites dans le tableau IX.1 :

Tableau IX.1: Constantes cinétiques déterminées par la linéarisation de Lineweaver-Burck.

Constantes cinétiques / Modèle	V_M (µmol/min)	K_M (M)	$[TG]_{opt}$ (M)	Rh %
Représentation linéaire (Lineweaver-Burck)	$90.9 \pm 3{,}71.10^{-4}$	$0.0160 \pm 1{,}47.10^{-5}$	$3{,}8.10^{-2}$	35

IX.4. Effet du l'enzyme :

IX.4.1. Mode opératoire

Le dernier paramètre qui reste à étudier est la concentration de l'enzyme. Examinons dans les conditions optimales (pH=7 ; T=40°C ; [S] = 3.8 10^{-2}M ; t=30min) l'évolution de la réaction enzymatique lorsqu'on change la mase de l'enzyme de 0.1 à 0.8g. Les mêmes protocoles expérimentaux sont maintenus.

IX.4.2. Résultats et discussion :

Les nombres de moles du produit sont notés en fonction de la masse de l'enzyme. Les résultats sont illustrés dans la figure IX.6 :

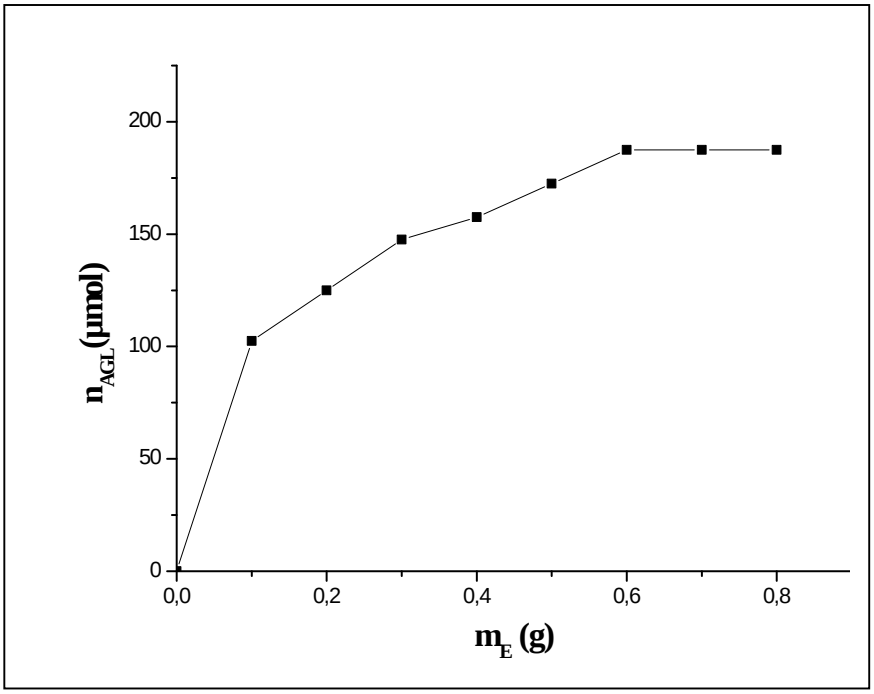


Fig. IX.6 : variations de nombre de mole de produit en fonction de la masse d'enzyme (pH=7 ; T=40°C ; [S] = 3.8 10^{-2}M ; t=30min).

Les résultats enregistrés dans la figure IX.6 suggèrent que :

Pour une masse donnée de substrat, l'étude des variations de nombre de mole de produit en fonction de la masse d'enzyme montre que cette variation n'est pas linéaire. La courbe présente une allure hyperbolique correspondant au fait qu'au de là d'une certaine masse d'enzyme, la totalité du substrat se trouve sous forme de complexe enzyme-substrat ; il en résulte que le nombre de mole de produit en fonction de la concentration en ce complexe demeure constant.

Alors le rendement d'hydrolyse pour pH = 7.0, T = 40°C, [S] = 3.8 10^{-2}M et m_E = 0.6g est 58%.

La réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase se déroule à l'interface eau/substrat apolaire (triglycéride). Cette particularité a été mise en évidence par la détermination des vitesses initiales d'hydrolyse en fonction de la concentration de substrat (effet de substrat). En effet, lorsque la solubilité du substrat est dépassé (émulsion), il y a formation d'une interface qui s'accompagne d'une augmentation de la vitesse d'hydrolyse. Ce phénomène est appelé **activation interfaciale** (figure : IX.7)**.**

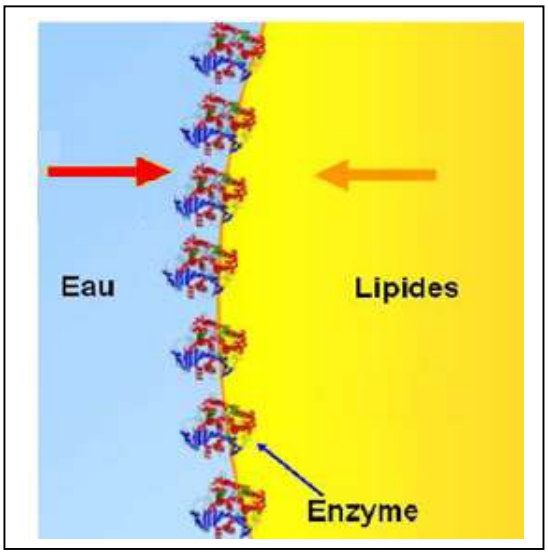


Fig. IX.7 : Schéma illustrant le transfert des molécules à l'interface.

Les premières structures tridimensionnelles des lipases ont suggéré que l'activation interfaciale pourrait être reliée à des changements conformationnels d'**un volet amphiphile** fréquemment rencontré chez les lipases. Ce volet, dont la longueur et la complexité varient selon les enzymes, est constitué d'une ou de plusieurs hélices α. Au contact d'une interface

lipide/eau, cette boucle peptidique amphiphile s'ouvre, libérant alors l'accès au site actif. En conformation fermée, cette boucle peptidique amphiphile obstrue totalement le site actif de l'enzyme, la rendant inactive.

La conformation fermée est supposée prédominer en milieu aqueux, comme indiqué par l'activité lipolytique plus faible des lipases dans l'eau.

IX.5. Cinétique de l'évolution de produit d'hydrolyse dans les conditions optimales :

IX.5.1. Mode opératoire :

Lorsque les paramètres à optimiser sont déterminés, une étude cinétique a été menée dans les conditions optimales : pH 7.0, température 40°C, concentration de substrat [3,8.10^{-2}M] et masse d'enzyme 0.6g, pour nous permettre de constater qualitativement et quantitativement le résultat final du procédé enzymatique de l'hydrolyse de triglycéride par la lipase libre du ricin (*Ricinus communis*).

IX.5.2. Résultats et discussion :

La courbe du développement de nombre de mole des acides gras libre (produit) en fonction d temps est représentée sur la figure IX.8 :

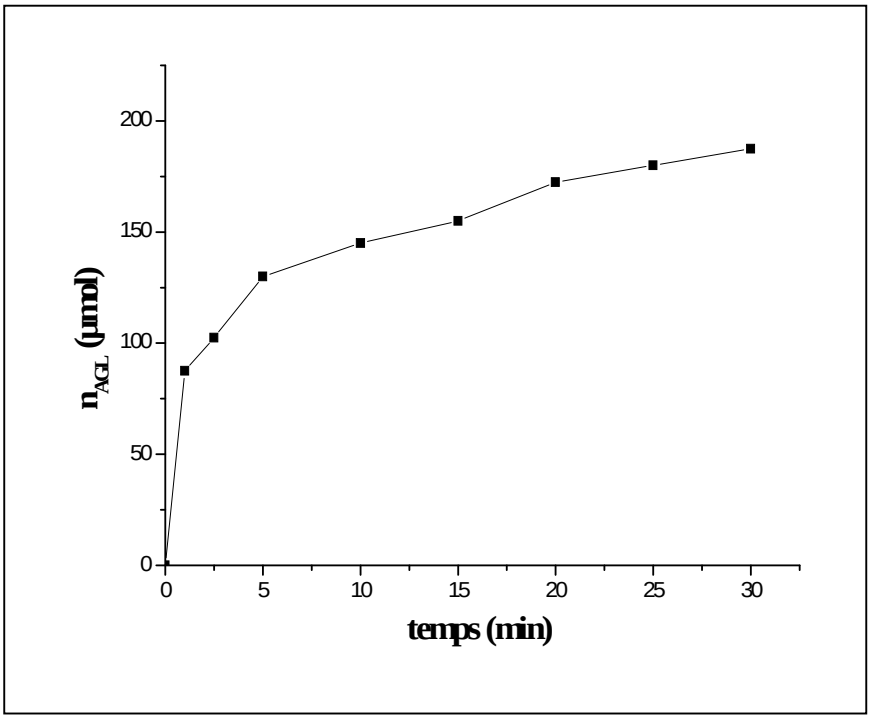


Fig. IX.8 : Cinétique du développement de produit dans les conditions optimales (pH = 7 ; T = 40°C ; [TG] = 3,8.10^{-2}M ; m_E = 0.6g ; t = 30min).

L'allure représentée dans la figure IX.8 montre que la cinétique d'hydrolyse suit une loi hyperbolique.

Dans ces conditions, le rendement d'hydrolyse de triglycéride par la lipase de ricin est atteint 58% avec une production de 192.5 µmol d'acide gras au bout de 30min

Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus dans d'autres travaux avec d'autres sources de lipase [116,117].

IX.6. Effet des effecteurs chimiques :

Un effecteur est une substance chimique qui modifie l'activité enzymatique (c'est-à-dire la cinétique d'une réaction enzymatique). Il peut être activateur (effet positif) ou inhibiteur (effet négatif).

IX.6.1. Mode opératoire :

Quelques produits chimiques organiques et minéraux seront testés pour leurs effets sur l'activité enzymatique de la lipase. On procède de même manière et dans les mêmes conditions optimales réalisées précédemment, en ajoutant 1ml d'une solution connue de l'effecteur.

IX.6.2. Résultats et discussion :

Le tableau représente les taux d'inhibitions (τ_i) et d'activation (τ_a) des composés qui donnent un effet sur l'activité enzymatique de la lipase sont calculés respectivement par les formules suivantes :

$$\tau_a\,(\%) = \frac{A_{\text{avec activateur}} - A_{\text{sans activateur}}}{A_{\text{avec activateur}}} \times 100 \quad \text{.....(IX.4).}$$

$$\tau_i\,(\%) = \frac{A_{\text{sans inhibiteur}} - A_{\text{avec inhibiteur}}}{A_{\text{sans inhibiteur}}} \times 100 \quad \text{.....(IX.5).}$$

Où A : activité lipasique (µmol/min).

Tableau IX.2 : Valeurs de taux d'activation et d'inhibition enzymatique pour différents composés chimiques.

Effecteurs	**Taux d'activation (%)**	**Taux d'inhibition (%)**
$MgSO_4$ (0.3M)	86	--
$CaCl_2$ (0.1M)	16.66	--
$Na_2S_2O_3$ (0.6M)	--	40
$ZnSO_4$ (0.6M)	79.6	--
Glucose (12%)	--	22.5
Hexane (12%)	81	--
Heptane (12%)	69.44	--

D'après les résultats reportés dans le tableau IX.2, et par comparaison entre l'activité enzymatique sans et avec l'effecteur, on constate que ce dernier influence la vitesse initiale de la lipase de ricin.

Le sulfate de magnésium et le sulfate de zinc jouent un rôle d'activateurs. Une élévation de 86% pour le premier composé et une élévation importante d'activité enzymatique supérieure à 79% a été signalée pour le sulfate de zinc. Ceci, est dû en fait que ces composés contiennent des ions (Mg^{2+}, Zn^{2+}), puisque les cations métalliques divalents ou monovalents agissent comme activeurs chez presque tous les enzymes (Gabriel Bertrand 1895). Les ions activateurs et l'enzyme se lient en complexes de chélation. Ainsi quelques solvants organiques jouent un rôle d'activateurs, plus de 69% a été signalé avec l'heptane et 81% avec l'hexane, montrant ainsi le caractère hydrophobe de l'enzyme.

Par ailleurs, le glucose et le thiosulfate de sodium jouent un rôle d'inhibiteurs. Ces composés provoquent un abaissement marqué supérieur à 22% et de 40% pour les deux composés respectivement de l'activité enzymatique de la lipase, donc ils ont donnés une inhibition partielle. Ceci, parce que ces substances contiennent des fonctions similaires à celle du substrat (triglycérides) qui peuvent entrer soit en compétition avec le site actif de substrat, soit avec le complexe ES en inactivant ou soit avec les deux en mêmes temps.

X. IMMOBILISATION DE LA LIPASE DANS L'ALGINATE DE CALCIUM :

Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée.

L'objectif de cette partie de l'étude est de déterminer les paramètres liés au support et à l'enzyme permettant d'atteindre deux objectifs :

- L'obtention du meilleur taux de rétention de l'enzyme (minimum de fuite).
- L'obtention de la meilleure activité de l'enzyme immobilisée.

Les tests seront menés en faisant varier trois paramètres principaux :

- La concentration d'alginate de sodium.
- La concentration en agent de chélation.
- La charge en enzyme (enzyme/support).

Ces tests seront menés dans les conditions physicochimiques standards.

L'immobilisation de la lipase a été traitée dans plusieurs travaux antérieurs en utilisant différents supports naturels et synthétiques pour l'hydrolyse de triglycéride [118].

X.1. Préparation de la lipase immobilisée et optimisation du support :

La lipase immobilisée est préparée par la dissolution sous agitation de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 et 0.5g de l'alginate de sodium dans 10ml de la solution enzymatique (0.1g de la lipase dans 10ml d'eau distillée), le mélange lipase/alginate de sodium est laissé sous agitation jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Pour éviter les bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution de $CaCl_2$, le mélange est laissé reposer pendant 30min. Dans 50ml de la solution de $CaCl_2$ à 0.2M et sous agitation, en versant le mélange lipase/alginate à l'aide d'une seringue, les billes instantanément formées, elles sont laissées sous agitation pendant une heure. Après la récupération et le rinçage des billes avec l'eau distillée, elles sont conservées à 4°C dans une solution tampon pH 7.0. Les billes formées sont de la lipase immobilisée et sont de diamètre moyen de 3.5mm.

Le schéma ci-dessous récapitule tout les étapes d'immobilisation :

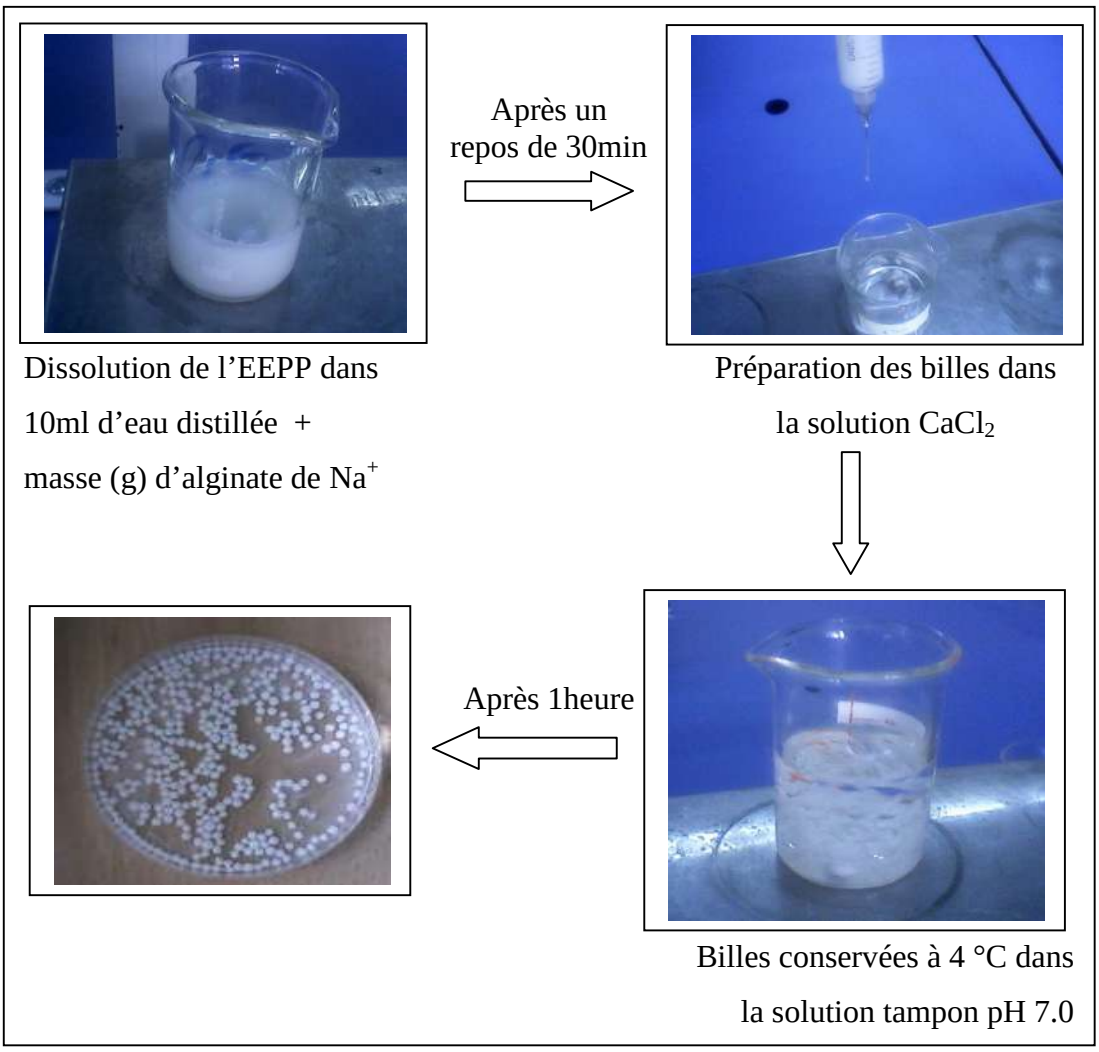


Fig. X.1 : Étapes d'immobilisation de la lipase dans l'alginate de calcium.

X.1.1. Effet de la concentration d'alginate :

X.1.1.1 Mode opératoire :

Pour déterminer la concentration optimale d'alginate, on fait un test standard de l'activité enzymatique de la lipase immobilisée et de la lipase retenue dans la solution de $CaCl_2$ sur chaque support.

X.1.1.1 Résultats :

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure X.2 et le tableau X.1 :

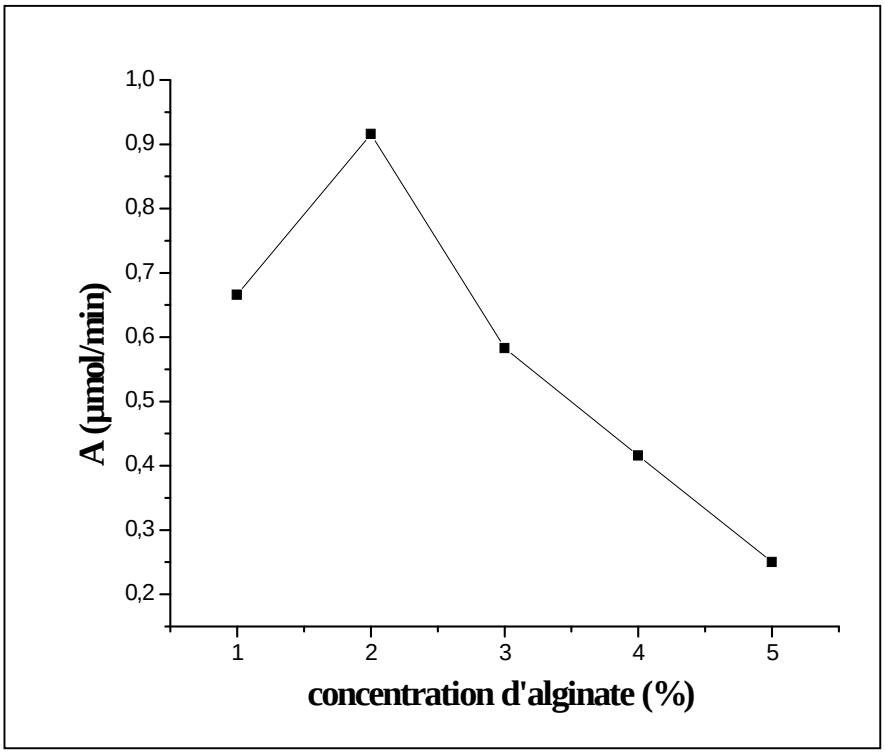


Fig. X.2 : Activité enzymatique de la lipase immobilisée à différentes concentrations d'alginate.

Tableau X.1 : Activité enzymatique de la lipase retenue dans la solution $CaCl_2$.

Concentration d'alginate (%)	1	2	3	4	5
Activité enzymatique de la solution $CaCl_2$ (µmol/min)	0.250	0	0	0	0

X.1.2. Effet de la concentration de l'agent de chélation :

X.1.2.1 Mode opératoire :

Une fois la concentration d'alginate de sodium est fixée, on refait les mêmes étapes d'immobilisation mais cette fois à différentes concentration de $CaCl_2$ à : 0.05; 0.1; 0.15 ; 0.2 et 0.25M.

De même que précédemment, on réalise un test standard sur les différentes solutions de $CaCl_2$.

X.1.2.2 Résultats :

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau :

Tableau X.2 : Activité enzymatique de la lipase de la solution $CaCl_2$ calculés à différents concentration en $CaCl_2$**.**

[$CaCl_2$] (M)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
Activité enzymatique de la solution $CaCl_2$ (µmol/min)	0.416	0.250	0.083	0	0

X.1.3. Effet de la charge en enzyme :

X.1.3.1 Mode opératoire

Le dernier paramètre reste à optimiser pour avoir une lipase immobilisée caractérisée par des propriétés optimales est la charge en enzyme qui peut hydrolyser la quantité maximale de triglycérides.

La même procédure est suivie pour préparer la lipase immobilisée, où les billes préparée avec 0.2g d'alginate de sodium dans la solution de $CaCl_2$ de 0.2M.

Pour les différentes billes, la lipase immobilisée est examinée par le test standard.

X.1.3.2 Résultats :

La figure X.3 représente le nombre de mole d'acide gras produit ces billes :

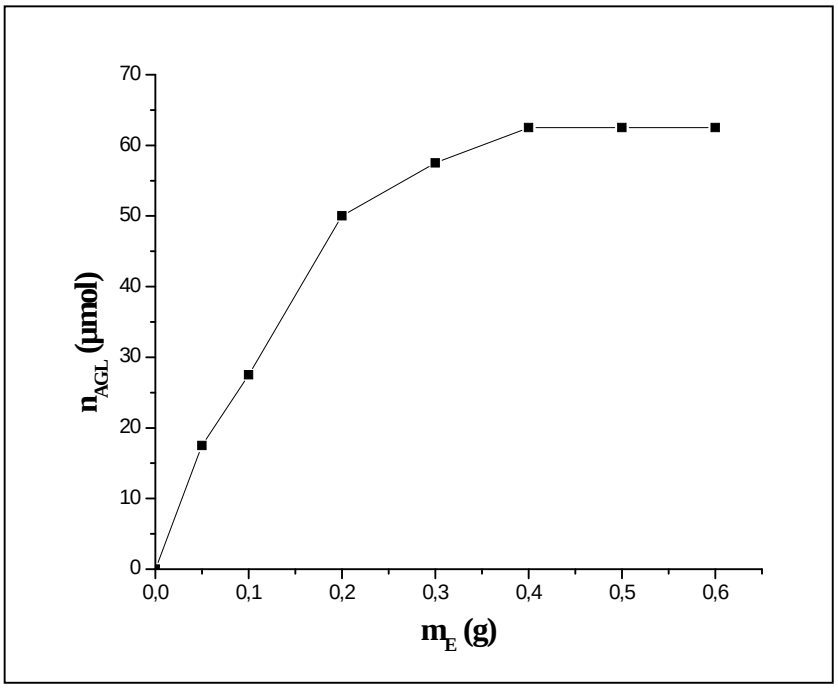


Fig. X.3 : nombre de mole d'acide gras produit par les différentes masses d'enzyme.

X.2. Discussion :

La fixation de la lipase se fait dans les mailles de gel d'alginate de calcium où l'enzyme est ajoutée avant la polymérisation du gel. Cette technique d'immobilisation par inclusion est généralement la plus stable où l'enzyme est emprisonnée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme et permet la diffusion du substrat. Les billes ainsi obtenues, sont sphériques, rigides et stables chimiquement et mécaniquement. Elles sont de diamètre moyen de 3.5mm.

Après l'ajout de la lipase immobilisée dans le milieu réactionnel, on constate le gonflement des billes et augmentation de nombre de moles d'acides gras libre dans le milieu, mais le rendement d'hydrolyse de triglycérides obtenu par ces billes est inférieur à celle-ci enregistré par la lipase libre. Le gonflement des billes indique que le déroulement de la réaction se fait à l'intérieur des billes par pénétration du substrat et puis la libération du produit dans le milieu réactionnel. Les phénomènes de pénétration et de libération sont des phénomènes de diffusion, donc régit par le transfert de masse.

La figure X.2 montre que l'activité enzymatique de la lipase immobilisée (les billes) augmente avec la masse d'alginate puis diminue, plus ce gel présent en grande quantité, plus le mélange (alginate de sodium/lipase) devient visqueux. Les billes deviennent plus rigide ce qui permet une bonne rétention de l'enzyme et réduis la fuite de la lipase vers le milieu extérieur.

La concentration d'alginate optimale qui donne la meilleure d'activité enzymatique et une fuite minimale de la lipase vers le milieu extérieur est de 2%. Ceci résulte à cause de deux effets :

- ❖ Pour les valeurs inférieures à cette concentration optimale, les billes sont moins rigides, ce qui implique la fuite de la lipase dans le milieu extérieur.
- ❖ Par contre, les billes deviennent plus rigides, lorsque la concentration en alginate est plus de 2%, donc la diffusion de substrat à l'intérieur des billes et de produit à l'extérieur est très lente et le transfert de masse devient limitant.

Cet optimum de la concentration en alginate de sodium a été observé dans les travaux de Keehoon et *al* lors de l'optimisation de la lipase immobilisée dans l'alginate de calcium [119].

Le tableau X.2 montre que l'augmentation de la concentration de $CaCl_2$ provoque la diminution de fuite de la lipase vers l'extérieur et les billes deviennent rigide, car le chlorure de calcium joue d'un rôle de gélifiant, donc la concentration 0.2M est suffisante pour avoir une lipase immobilisée ayant une activité enzymatique maximale.

Pour augmenter l'efficacité de la lipase immobilisée, il faut une quantité suffisante de l'enzyme pour avoir un bon rendement d'hydrolyse (production d'un grand nombre de mole d'acide gras). D'après la figure X.3, on constate que le nombre de mole d'acide gras produit par ces billes augmente avec la masse d'enzyme (la charge en enzyme) puis demeure constant malgré que la masse d'enzyme augmente, c'est-à-dire que les molécules de lipase sont en excès par rapport à celle du substrat, ce qui implique que chaque molécule de ce dernier occupe son site actif. Donc, la masse 0.4 à 0.5g en enzyme est suffisante dans ces conditions.

L'immobilisation des enzymes dans un support provoque la diminution de leurs activités enzymatiques. Ce phénomène résulte à cause de plusieurs facteurs dont le microenvironnement dans lequel l'enzyme est immobilisée. La masse de la lipase immobilisée par inclusion dans l'alginate de sodium donne un bon rendement d'hydrolyse pour une concentration d'alginate de 2%, la concentration de chlorure de calcium est de 0.2M et pour une masse d'enzyme de 0.4g. Pour améliorer le rendement d'hydrolyse de triglycérides, il est important de réduire au maximum les contraintes qui ont un effet direct sur la lipase immobilisée par une optimisation des conditions opératoires qui peuvent produire un effet sur l'énergie d'activation et par conséquent sur la vitesse de la réaction. On pourra citer le pH, la température et la concentration du substrat. En utilisant ces conditions optimales obtenues, on prépare à nouveau des billes afin d'étudier l'effet des conditions de réaction sur la cinétique d'hydrolyse de triglycérides.

XI. ETUDE DE L'INFLENCE DES CONDITIONS DE REACTIONS SUR LA CINETIQUE D'HYDROLYSE DE TRIGLYCERIDES PAR LA LIPASE IMMOBILISEE :

XI.1. Effet du pH:

XI.1.1. Mode opératoire :

En utilisant la même procédure de travail lors de l'étude avec l'enzyme libre, des réactions enzymatiques sont effectuées avec 0.4g de la lipase immobilisée dans 2% d'alginate en fonction de pH dans l'intervalle de 4 à 9.

XI.1.2. Résultats et discussion:

L'effet du chaque pH est exprimée par son rendement d'hydrolyse et les résultats obtenus sont représentés sur la figure XI.1 :

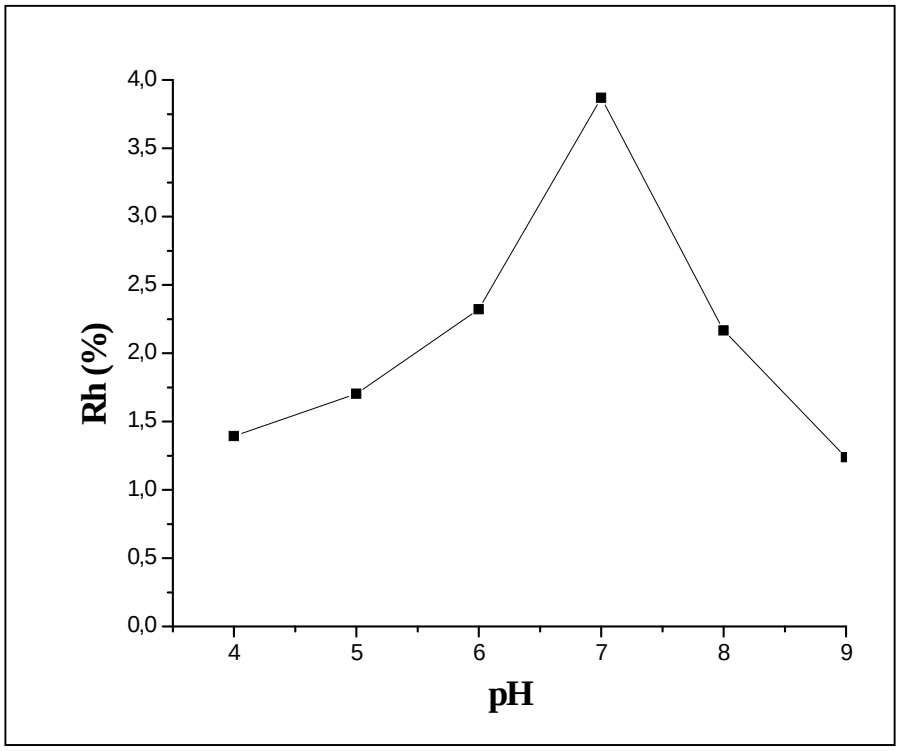


Fig. XI.1 : Effet d pH sur le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase immobilisée ([S] = 0.2M ; T_{amb} ; t = 30min ; m_E = 0.4 g).

La figure XI.1 présente l'évolution du rendement d'hydrolyse de triglycérides en fonction du pH et suggère que la nature de milieu réactionnel a un effet sur l'activité enzymatique de la lipase immobilisée par inclusion dans l'alginate de calcium et par conséquent sur le rendement d'hydrolyse. Le milieu neutre est le milieu adéquat qui peut donner le maximum d'hydrolyse par rapport aux autres milieux. Dans ce cas où l'enzyme est liée à une surface, leur immobilisation des enzymes conduit à la mise en œuvre d'une phase hétérogène solide contrairement à l'enzyme libre où toutes les molécules sont identiques et réparties de manière uniforme dans le milieu réactionnel où on est en présence d'une phase liquide contenant le substrat et d'une phase solide (matériau d'immobilisation) contenant l'enzyme. Les propriétés d'une enzyme peuvent être modifiées, ces changements peuvent être dus à des modifications de conformation dans l'enzyme suite au procédé d'immobilisation, ou à la création d'empêchements stériques limitant l'accessibilité du substrat au site catalytique de l'enzyme.

La valeur optimale de pH égale à 7 ± 0.2 sera donc adoptée pour la suite de l'étude.

XI.2. Effet de la température :

XI.2.1. Mode opératoire :

Afin d'évaluer l'influence de la température sur l'activité enzymatique de la lipase immobilisée, une série d'expérience a été réalisée en faisant varier ce paramètre physique entre 20 et 70°C dans les conditions suivantes : [S] = 0.2M ; pH 7.0 ; t = 30min ; m_E = 0.4g.

XI.2.2. Résultats et discussion :

Les rendements d'hydrolyse de triglycérides par la lipase immobilisée en fonction de température sont représentés dans la figure XI.2 :

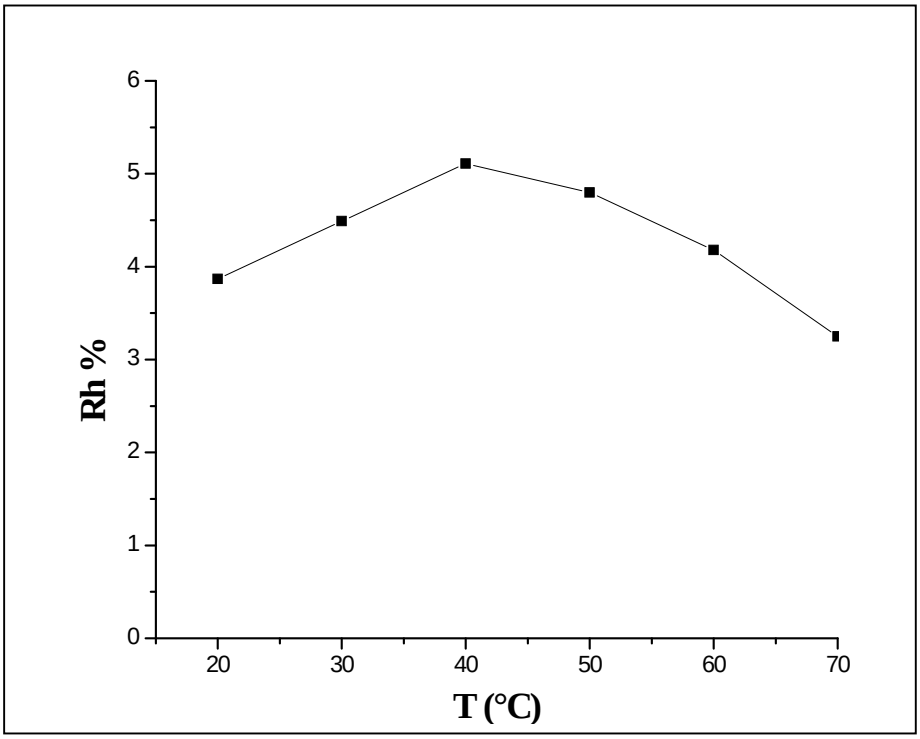


Fig. XI.2 : Effet de la température sur le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase immobilisée ([S] = 0.2M ; pH 7.0 ; t = 30min ; m_E = 0.4g).

A partir des résultats obtenus (figure XI.2), nous avons observé que la température exerçait une influence sur l'activité enzymatique de la lipase immobilisée. La température optimale enregistrée par ces billes (40°C) est même que celle obtenue pour la lipase libre. Aux températures extrêmes, on constate une diminution de rendements d'hydrolyses mais, qui sont proches de l'optimum. Par contre lors de l'étude avec la lipase libre où l'on observe une chute rapide de l'activité enzymatique à cause de la dénaturation de l'enzyme. A la lumière de

ces résultats, on peut dire que la lipase immobilisée exerce une certaine résistance aux températures extrêmes. Elle est donc plus stable thermiquement que l'enzyme libre.

XI.3. Effet du substrat:

XI.3.1. Mode opératoire :

Afin de connaître la dépendance de l'activité enzymatique de la lipase immobilisée vis-à-vis de la concentration du substrat, nous avons effectué une série de mesures dans les conditions optimales trouvées précédemment. La concentration du substrat a été variée entre 0.02M et 0.2M.

Pour déterminer la concentration optimale du substrat, il faut tout d'abord étudier la cinétique de l'évolution du produit (acide gras libre) afin de déterminer la vitesse initiale de l'hydrolyse pour chaque concentration de substrat.

XI.3.2. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure XI.3 :

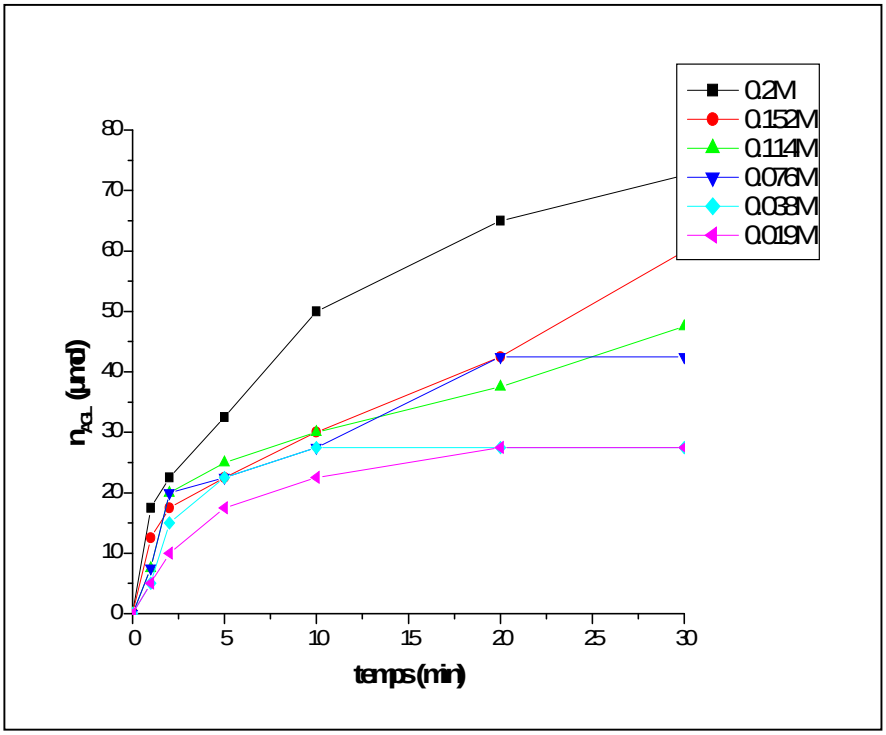


Fig. XI.3 : Cinétique de formation d'acide gras libre pour chaque concentration de substrat (pH = 7.0 ; T = 40°C ; t = 30min ; m_E = 0.4g).

Similairement à ce qui a été présenté dans la première partie (cas de l'étude avec l'enzyme libre), la vitesse initiale est déterminée par la tangente d[P]/dt de la courbe [P] = f(t) au point t=0.

La vitesse initiale et le rendement d'hydrolyse sont représentés sur la figure XI.4 :

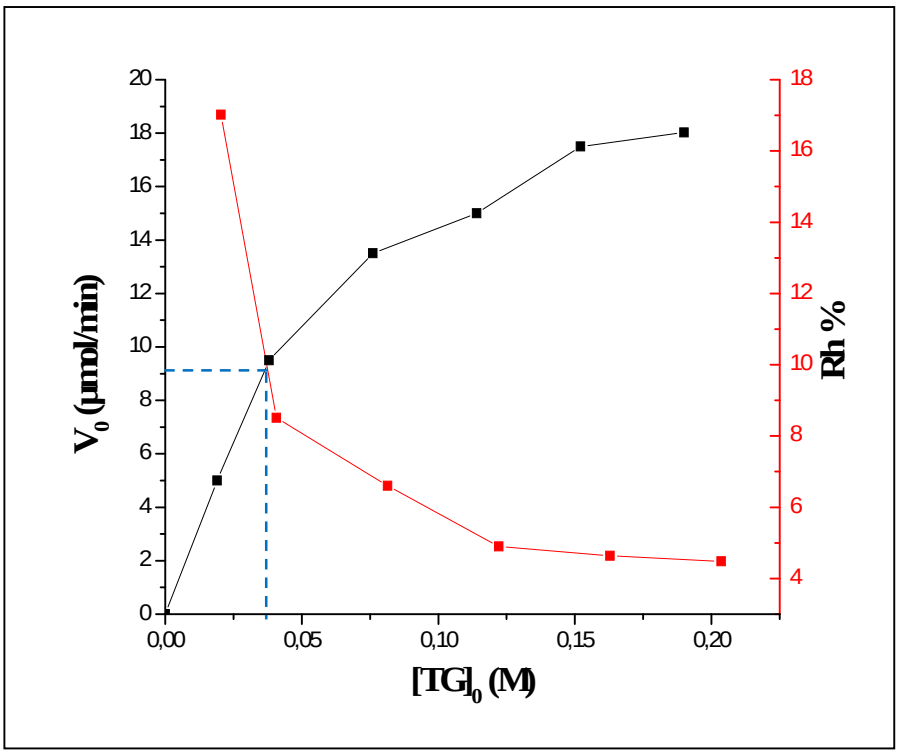


Fig. XI.4 : Vitesse initiale et rendement d'hydrolyse en fonction de la concentration initiale du substrat.

D'après la figure XI.4, on observe que la lipase immobilisée suit une cinétique michaelienne, c'est le même comportement vu lors de l'étude avec la lipase libre sauf que la vitesse initiale de l'hydrolyse du substrat n'atteint pas sa limite et ça dépend au phénomène de diffusion

L'intersection des deux allures de vitesse initiale et de rendement détermine la concentration optimale du substrat. Elle est de 0.036M pour une masse d'enzyme de 0.6g, ce qui est comparable à la concentration optimale obtenue : 0.038M dans la première partie (cas de lipase libre) mais pour une masse d'enzyme de 0.04g. On constate ainsi que pour des concentrations élevées de triglycérides l'enzyme n'atteint pas sa vitesse maximale.

Détermination des paramètres cinétiques apparents :

Détermination de V_M^{app} et K_M^{app} : Ces constantes apparentes sont calculées sur la base de la vitesse globale du procédé, prenant en compte le transfert de masse à l'intérieur du support d'immobilisation et la cinétique enzymatique proprement dite.

Pour cela, on procède de la même manière que pour l'enzyme libre en utilisant la linéarisation de Lineweaver-Burk pour déterminer la vitesse maximale et la constante de **Michaelis-Menten.** Alors, on trace : $\frac{1}{V_0} = f(\frac{1}{[TG]_0})$ et les résultats sont représentés sur la figure suivante :

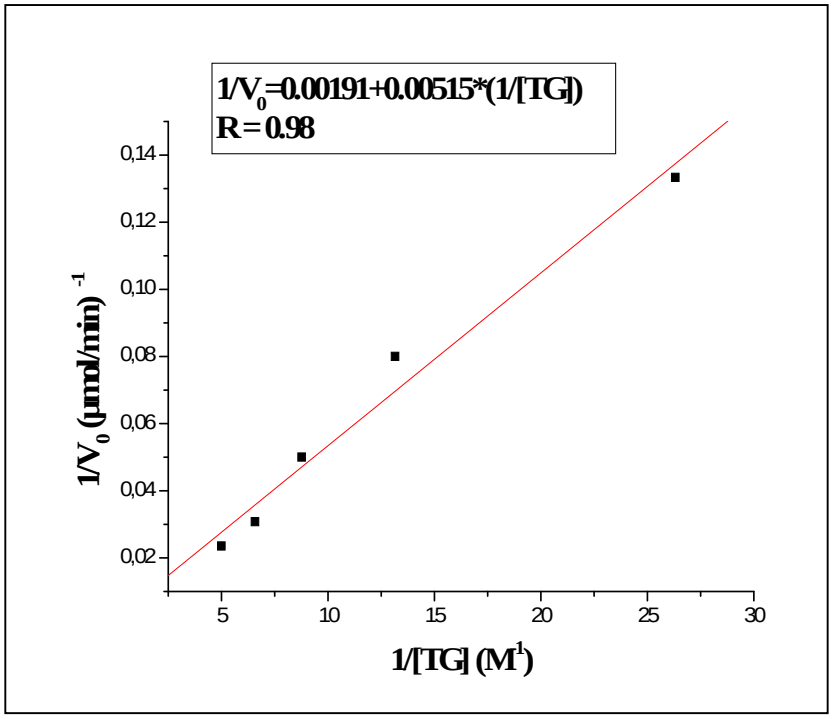


Fig. XI.5 : Représentation en double inverse de Lineweaver-Burke.

À l'aide de la représentation graphique en double inverse de Lineweaver-Burk représentées dans la figure XI.5, les paramètres cinétiques sont déterminés et représentés dans le tableau :

Tableau XI.1: Constantes cinétiques apparentes déterminées par la représentation de Lineweaver-Burk**.**

Paramètres cinétiques apparents	Représentation de Lineweaver-Burk
V_M (µmol/min)	64.1±0.006
K_M (M)	0.33±0.00044

D'après les résultats obtenus dans le tableau XI.1, on constate que la vitesse maximale obtenue par la lipase immobilisée est inférieur à celle obtenu par la lipase libre, cette différence est due aux phénomènes de diffusion des substrats et des produits vers l'intérieur et vers l'extérieur des billes d'alginates respectivement.

XI.4. Traitement de triglycérides par la lipase immobilisée en batch successifs :

XI.4.1. Mode opératoire :

L'objectif est d'analyser la stabilité de la lipase après plusieurs utilisations successives en estimant le rendement d'hydrolyse à chaque fois pour une durée fixe de traitement sous les conditions optimales. Les billes d'alginates utilisées pour le premier batch seront rincées et réutilisées pour le batch suivant :

XI.4.2. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure XI.5 :

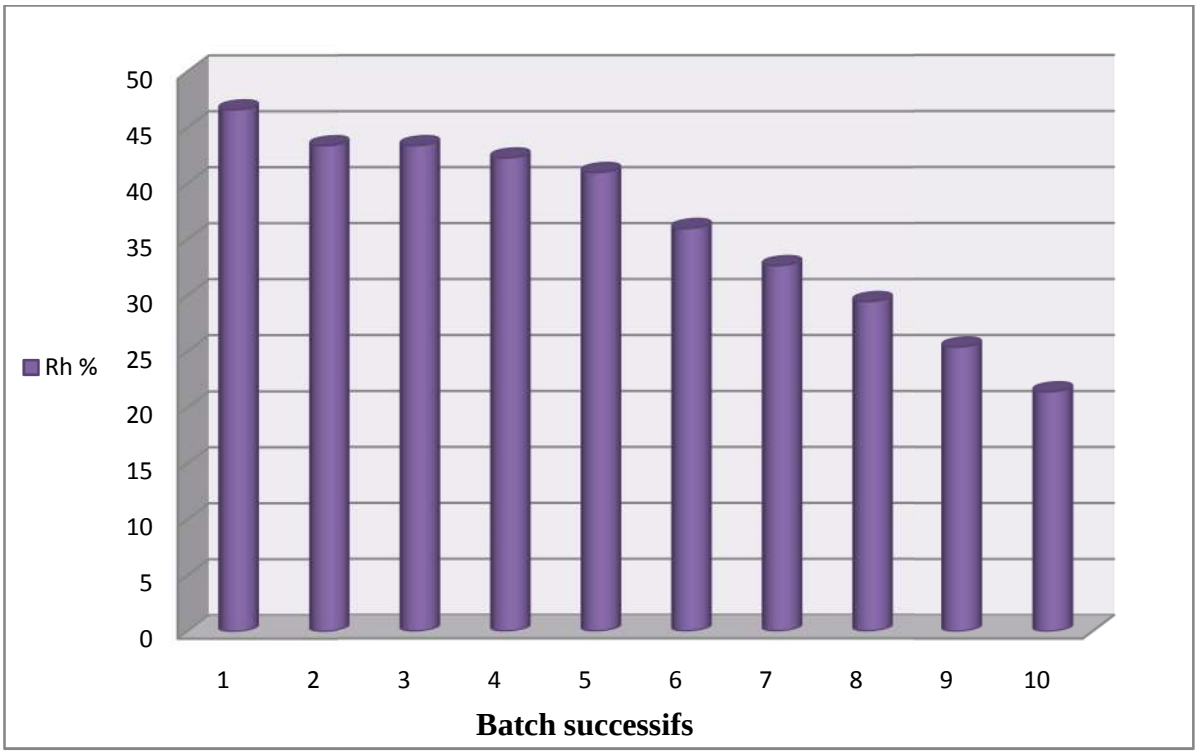


Fig. XI.6 : Rendement d'hydrolyse de triglycérides après chaque utilisation par la lipase immobilisée.

Le pouvoir catalytique des enzymes immobilisées peut être conservé et réutilisé grâce à leur fixation. Cette faculté est d'un intérêt primordial pour l'exploitation à l'échelle

industrielle. Cependant, une fuite plus ou moins prononcée de l'enzyme peut provoquer la diminution de l'activité ou de rendement de transformation.

D'après les résultats enregistrés dans la figure XI.5, on constate que le rendement d'hydrolyse de triglycérides par la lipase immobilisée obtenue par inclusion dans un gel naturel « alginate de calcium » atteint 46.61%. Les résultats obtenus montrent que la technique d'immobilisation des enzymes constitue une méthode pour la conservation du pouvoir catalytique et qui pourra être exploité pour la mise en œuvre de procédés industriels en batch ou en continu.

Des résultats similaires ont été trouvés en utilisant les alginates pour immobiliser les lipases d'autres sources pour l'hydrolyse de triglycérides [120].

XII. RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS :

Les résultats obtenus le long de cette étude sont reportés dans le tableau XII.1:

Tableau XII.1 : Récapitulatif des résultats de l'étude de l'hydrolyse par la lipase libre et immobilisée

Etat de l'enzyme / **Paramètres étudiées**	**Lipase libre**	**Lipase immobilisée**
pH	7.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2
Température (°C)	40 ± 1	40 ± 1
[TG] (M)	0.038	0.036
m_E (g)	0.6	0.4
Temps (min)	10	30
V_M (µmol/min)	$90.9 \pm 3{,}71.10^{-4}$	64.1 ± 0.006
K_M (M)	$0.016 \pm 1{,}47.10^{-5}$	0.33 ± 0.00044
K_{aff} (M^{-1})	62.5	3.03
Rh (%)	58	46.61
Nombre de Batch	-	5 fois

XIII. CATALYSE DE LA RÉACTION D'ESTÉRIFICATION PAR LA LIPASE DE *Ricinus communis* :

En plus de leur fonction naturelle d'hydrolyse, les lipases possèdent également la capacité de jouer le rôle de catalyseur pour la réaction inverse qui est l'estérification. Il y a eu au cours de ces dernières années un développement important des applications des lipases pour la production d'esters dans les domaines agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Une large gamme d'esters est maintenant produite commercialement en utilisant la lipase comme catalyseur de la réaction entre un alcool et un acide.

Un choix judicieux des conditions expérimentales (température, temps de contact, catalyseur et teneur en eau) permettra d'obtenir un avancement final élevé, et cela, dans un temps réduit.

Si la synthèse faite dans des bonnes conditions, on aura un bon rendement. Pour cela, une série d'expérience a été effectuée afin d'optimiser les paramètres suivants :

XIII.1. Effet du temps de contact:

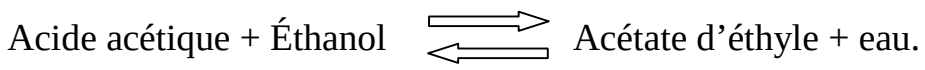
Puisque les enzymes accélèrent la vitesse des réactions immédiatement après les avoir mis dans le milieu réactionnel, il serait intéressant de suivre une cinétique de production de l'ester par la lipase de ricin "*Ricinus communis*".

XIII.1.1. Mode opératoire :

La synthèse de l'ester a été faite à partir d'acide acétique et du éthanol. Dans un ballon de 100ml disposé sur valet en liège avec un réfrigérant et mit dans un bain marré porté à une température de 40 °C, un mélange de 10ml d'acide acétique-éthanol a été introduire (1 :1, v/v). La réaction a été déclenchée lors de l'ajout 0.3g de la lipase. Le dispositif est mis sous agitation.

Une série d'expérience a été réalisée en faisant varier le temps de contact afin d'évaluer l'effet de ce dernier sur la synthèse de l'ester.

La réaction entre l'acide acétique et l'éthanol peut s'écrire comme suivant :



L'effet de temps de contact sur la synthèse de l'ester est estimé par un rendement en pourcentage qui est le rapport entre la quantité de produit effectivement obtenue et la quantité maximal (théorique) attendue (c'est-à-dire la quantité que l'on obtiendrait si la transformation

était totale). Ce rendement est appelé le rendement d'estérification (RE %) est calculé selon la relation suivante :

$$RE\ (\%) = \frac{m_{f\,Ester}}{m_{max\,Ester}} \times 100 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (XIII.1).$$

Afin de séparer l'ester formé (l'acétate d'éthyle), le mélange a été transvasé dans une ampoule à décanter contenant 20ml d'eau distillée glacée pour freiner la réaction, afin de limiter l'hydrolyse de l'ester et de dissoudre principalement les acides et de l'alcool éventuellement restant.

La phase organique a une densité inférieure à celle de l'eau et constituera la phase supérieure. 1g de NaCl a été ajouté dans le mélange pour « alourdir » la phase aqueuse, c'est à dire la rendre plus dense, la différence de densités entre les deux phases aqueuse et organique augmente et la séparation devient plus nette (séparation de l'ester par décantation). Les étapes de récupération de l'ester sont représentées dans la figure XIII.1 :

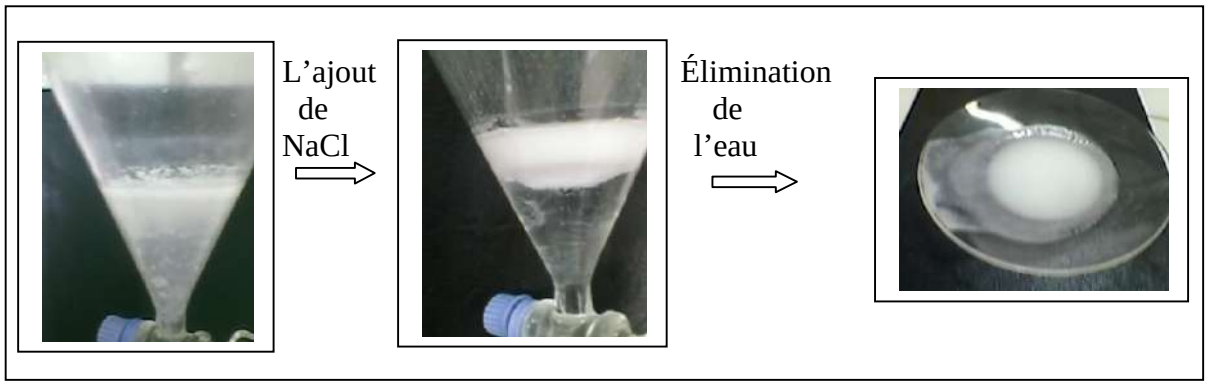


Fig. XIII.1 : Les étapes de récupération de l'acétate d'éthyle.

XIII.1.2. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure XIII.2 :

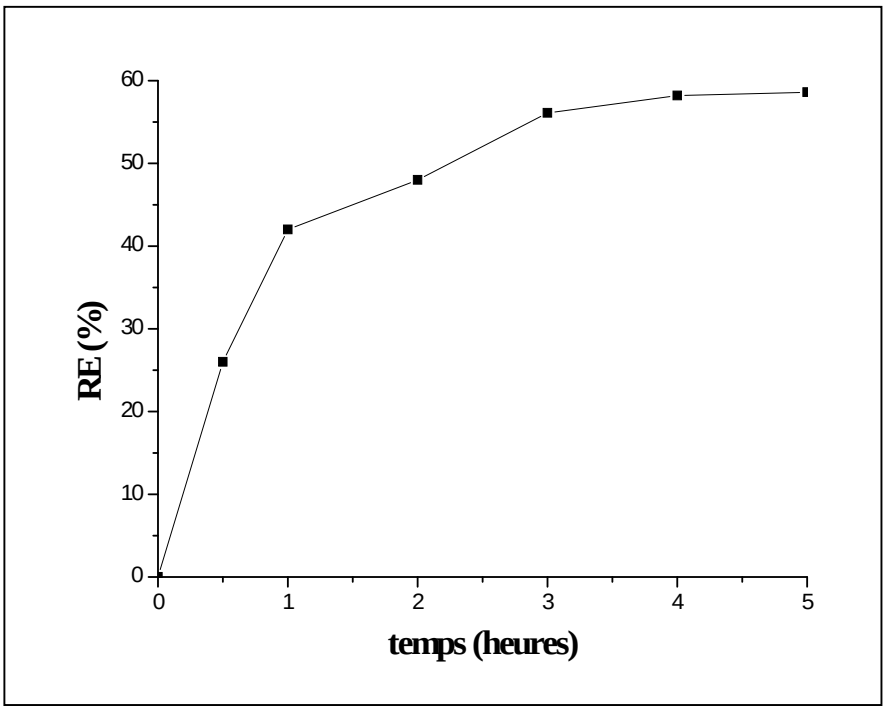


Fig. XIII.2 : Rendement d'estérification en fonction du temps (T = 40 °C ; m_E = 0.3g).

L'allure de cinétique illustrée dans la figure XIII.2 montre que l'augmentation de la durée de la réaction provoque une augmentation du rendement d'estérification telle que pour une température de 40 °C et une masse de 0.3g en enzyme, on atteint un rendement de 58 %. Une durée de 3 à 3.5 heures est suffisante pour atteindre l'équilibre final. Aucune amélioration dans la production de l'ester a été observée après 4 heures. Grâce à ces résultats on constate que la lipase peut catalyser la synthèse de l'acétate d'éthyle pendant une durée de 4 heures. Les transformations associées aux réactions d'estérification par voie chimique sont très lentes (plusieurs heures ou jours). La lipase donc permet également d'atteindre plus rapidement la limite dans les conditions décrites auparavant.

XIII.2. Effet de la température :

On sait que la température a un effet positif sur la vitesse de la réaction et sur le rendement d'estérification qui augmentent avec la température quand en utilisant des catalyseurs chimiques. En utilisant la lipase comme catalyseur, l'effet de la température sur le rendement d'estérification sera étudié comme suit.

XIII.2.1. Mode opératoire :

En utilisant le même protocole expérimental précédent, une série d'expérience a été faite dans une gamme de température variant entre : 30 °C à 80 °C. le mélange réactionnel est maintenant sous agitation pendant une durée de 4 heures.

XIII.2.2. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure XIII.3:

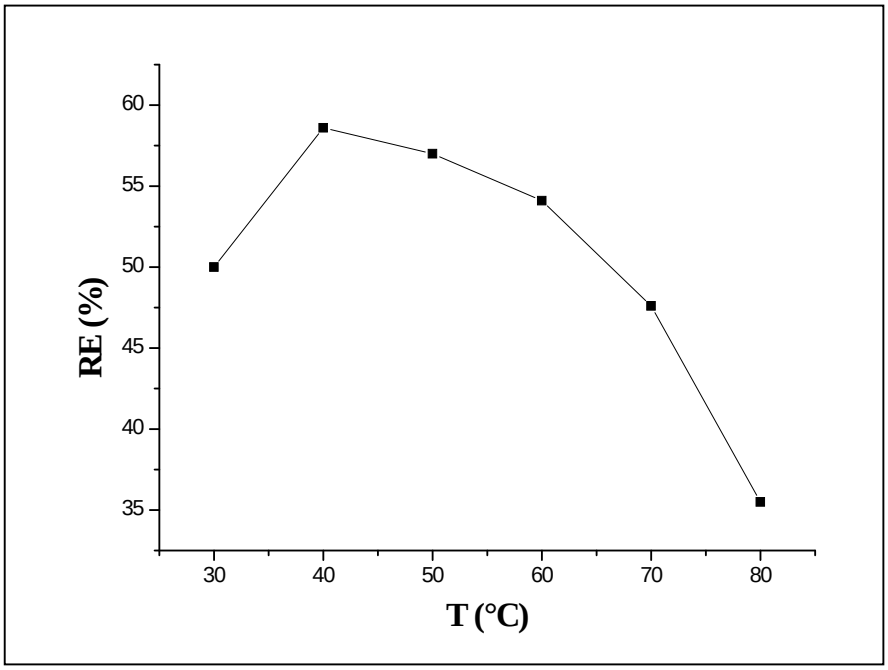


Fig. XIII.3 : Effet de la température sur le rendement d'estérification.

La figure XIII.3 illustre l'effet de température sur la réaction de l'estérification. Les résultats obtenus montrent que le rendement d'estérification augmente jusqu'à un certain seuil puis diminue. Dans la gamme de température (30-60°C) le rendement d'estérification est supérieur à 50%, au-dessus de 60°C la réaction est incomplète. Pendant la réaction d'estérification, l'eau est un sous-produit. Au-dessus de 40°C, On observe la diminution du rendement d'estérification mais à la température 50°C, il est plus proche à celle enregistré à 40°C, cette diminution peut être due à l'eau qui peut inhiber la réaction d'estérification à une concentration particulière suite à l'augmentation de sa solubilité avec l'augmentation de la température. Au-dessus de 60°C la réaction est incomplète. Seulement 35% de rendement d'estérification a été observé à 80°C. Ce qui peut être dû à la dénaturation thermique de

l'enzyme. A la lumière de ces résultats, la température optimale qui donne un meilleur rendement d'estérification est 40°C.

XIII.3. Effet de la masse d'enzyme :

XIII.3.1. Mode opératoire :

Afin d'évaluer l'effet de la masse d'enzyme sur le rendement d'estérification, on fait varier la masse de lipase dans la gamme (0.3-1g) pendant 3heures à 40°C.

XIII.3.2. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure XIII.4 :

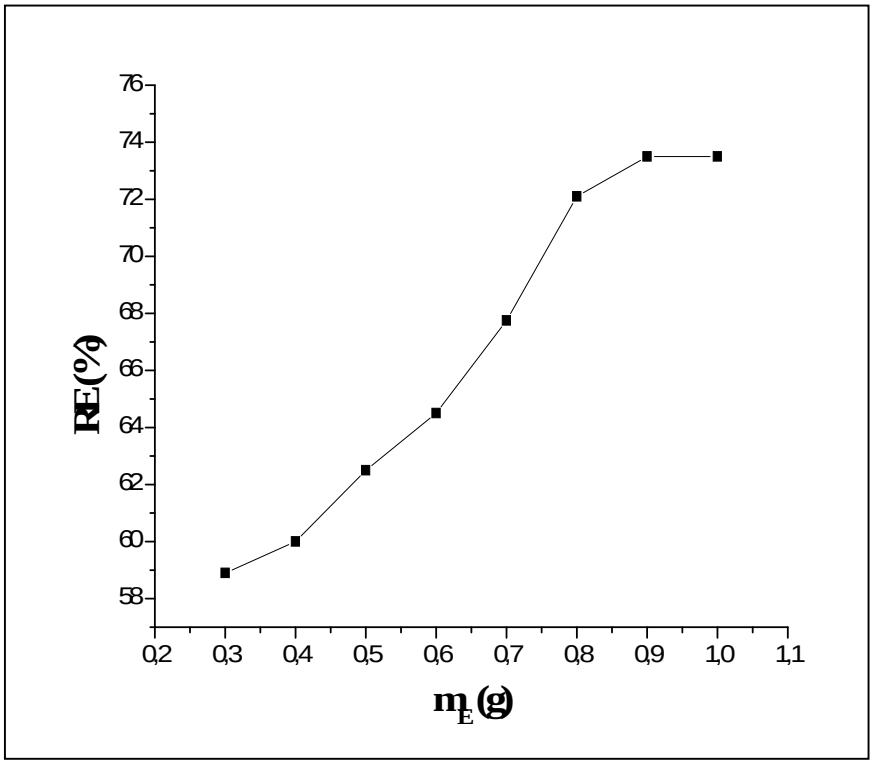


Fig. : XIII.4 : Effet de la masse d'enzyme sur le rendement d'estérification.

D'après les résultats enregistrés dans la figure XIII.4, on constate une augmentation du rendement d'estérification avec la masse d'enzyme puis demeure constant à une certaine quantité. Au début, la quantité de l'enzyme n'est pas suffisante, à cause de ça on observe une augmentation du rendement d'estérification. Par contre, le rendement d'estérification devient constant lorsque la totalité du substrat se trouve sous forme de complexe enzyme-substrat.

La masse de la lipase optimale sera donc au moins 0.9g.

XIII.4.Effet de la teneur en eau :

L'eau est le principal paramètre à maîtriser et à contrôler pour la mise en œuvre de la réaction d'estérification catalysée par les hydrolases de types lipases. Les effets possibles de l'eau sur l'activité catalytique des enzymes et en particulier des lipases en milieu organique s'exercent selon plusieurs mécanismes et sont généralement dus à un manque d'eau à un excès d'eau.

XIII.4.1. Mode opératoire :

De même que précédemment, le protocole opératoire sera répété mais en ajoutant dans le milieu réactionnel une quantité d'eau distillé à différents pourcentages (20-80%) par rapport au volume total du milieu. Le mélange contenant 0.9g d'enzyme est maintenir sous agitation et sous une température constante 40°C pendant 4 heures.

XIII.4.2. Résultats et discussion :

Les rendements d'estérification calculés pour différentes teneurs en eau sont représentés sur la figure XIII.5 :

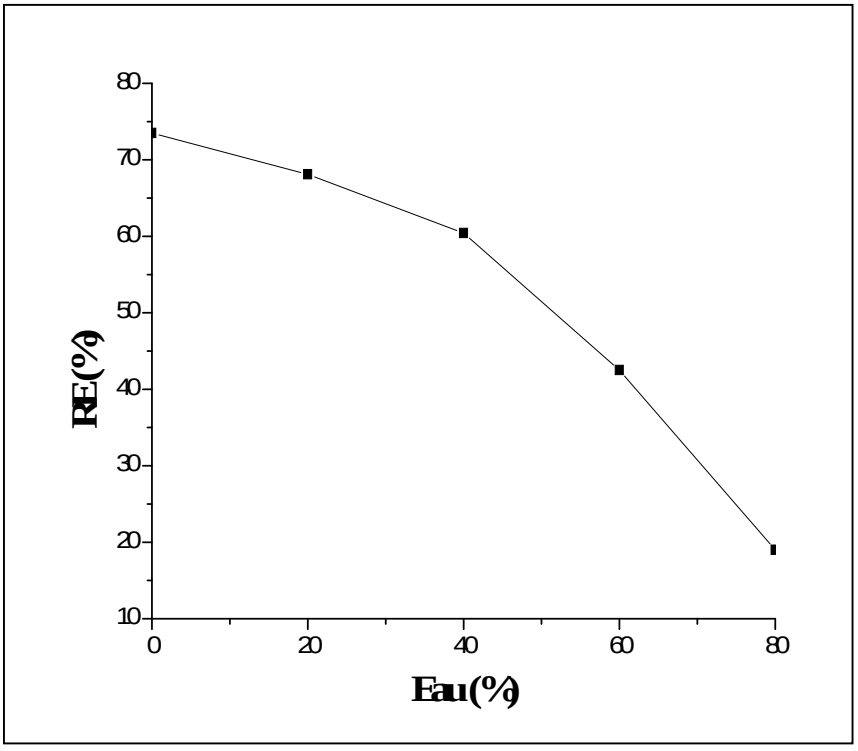


Fig. : XIII.5 : Effet de la teneur en eau sur le rendement d'estérification.

D'après les résultats enregistrés dans la figure XIII.5, on constate une diminution du rendement d'estérification quand on augmente la teneur en eau. Ces résultats s'expliquent par l'effet de l'eau sur la polarité du site actif de la protéine. L'augmentation de la teneur en eau dans le milieu réactionnel entraînerait une accumulation de molécules d'eau autour de l'enzyme constituant alors une barrière diffusionnelle pour les substrats hydrophobes et induirait une activité hydrolytique résiduelle conséquente, et aussi pour la réaction d'estérification catalysée par la lipase, les molécules d'eau libérées sont susceptibles d'orienter la réaction vers l'hydrolyse tel que postulé par les lois des équilibres réactionnels.

Remarque :

Afin d'étudier la faisabilité de réaliser la réaction d'estérification avec la lipase immobilisée, le protocole opératoire sera répété à 40°C et pendant 4 heures avec 0.9g de la lipase immobilisée.

La réaction d'estérification catalysée par la lipase immobilisée, permet d'atteindre un rendement d'estérification de 51%. La diminution de rendement d'estérification est due à l'effet d'immobilisation.

XIV. CARACTÉRISATION DE L'ESTER OBTENU PAR LA LIPASE :

XIV.1. Analyse par spectroscopie infrarouge a transformée de fourrier (FTIR) du l'acétate d'éthyle :

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR dans la plage de 500 – 4000cm^{-1} sur le liquide obtenu après estérification par la lipase. Le spectre infrarouge d'acétate d'éthyle obtenu est représenté sur la figure XIV.1 :

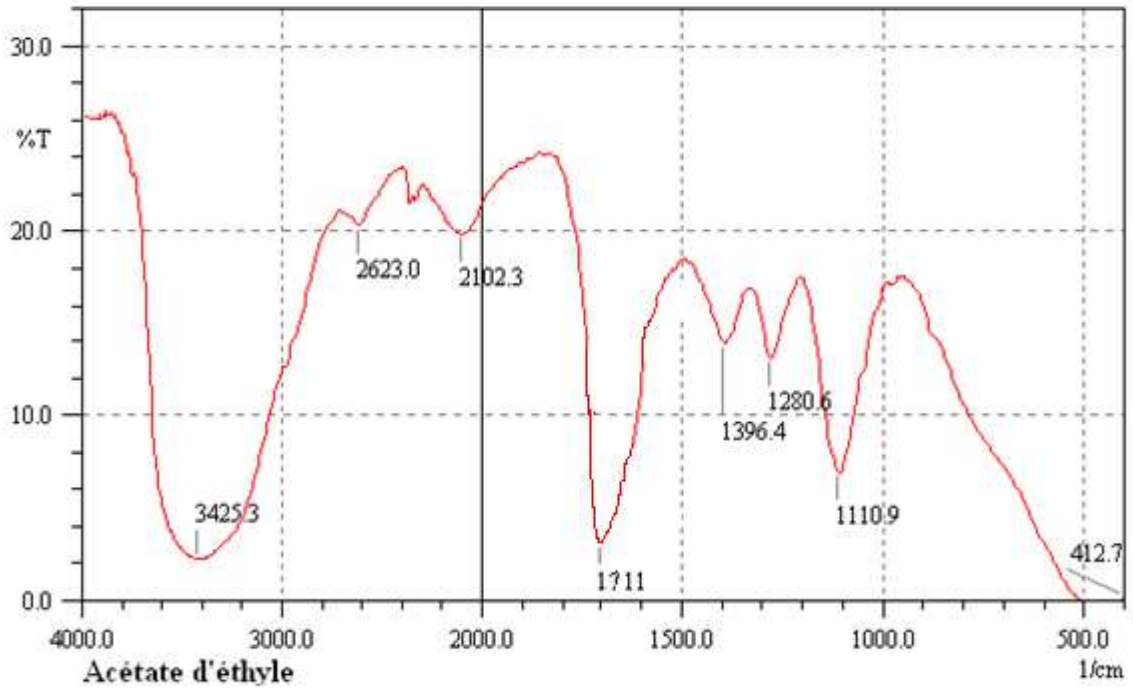


Fig. XIV.1 : Spectre IR d'acétate d'éthyle obtenu par estérification par la lipase de ricin.

La figure XIV.1 illustre le spectre d'infrarouge d'acétate d'éthyle obtenu par estérification par la lipase de ricin "*Ricinus communis*". D'après les pics de transmittance représentés ci-dessus et comparativement avec la table des nombres d'ondes des vibrations de valence et de déformation [121], on observe l'apparition d'une bande à 1110.9 cm^{-1}, ce pic est compris entre 1050-1450 cm^{-1} qui correspond à la liaison C-O. Ainsi que la vibration 1711cm^{-1} montrant la formation de la liaison C=O d'ester (acétate d'éthyle), cette vibration se trouve en général dans la zone 1700-1740 cm^{-1}. La vibration 1396.4 cm^{-1} indique la liaison C_{sp3}-H (CH_3).

CONCLUSION GÉNÉRALE :

L'objectif principal de notre travail était, à l'origine, d'évaluer le rendement d'hydrolyse des lipides par la lipase extraite à partir d'une source végétale. Par la suite, la stratégie expérimentale a permis d'optimiser les conditions dans lesquelles on peut avoir un rendement d'hydrolyse maximal à une vitesse acceptable.

L'hydrolyse est réalisée avec la lipase de ricin "*Ricinus communis"*. Les essais montrent que cette source végétale présente une activité lipasique maximale par rapport à d'autres sources. La purification de l'extrait brut de la lipase de ricin sélectionnée parmi quatre sources végétales est un facteur important permettant d'accroître substantiellement la stabilité de l'activité de la lipase.

Il a été démontré au cours de cette étude que les facteurs physicochimiques (pH, température, la concentration du substrat «triglycérides» et la masse d'enzyme) avaient une influence directe sur la vitesse du procédé et sur le rendement d'hydrolyse.

Les résultats ont montré que la lipase donne son point d'activité maximale dans un milieu neutre (pH 7.0) et sous une température de 40 °C. La transformation du triglycéride par la lipase de ricin suit une cinétique michaelienne.

La variation de la masse d'enzyme nous permet de déterminer le turnover et son efficacité catalytique. Une unité enzymatique de la lipase peut transformer jusqu'à 3.8 de micromoles de substrat en produit par minute.

Quelques effecteurs chimiques tels que le glucose et thiosulfate de sodium peuvent provoquer une inhibition partielle de l'activité catalytique de la lipase de 40%, alors qu'une activation importante supérieure à 80% est obtenue en présence de sulfate de magnésium.

Le problème de récupération de la lipase après son utilisation a été résolu par son immobilisation dans un gel naturel "alginate de calcium". Cette solution permet de la stabiliser, et permet sa réutilisation. L'immobilisation de la lipase conduit à un changement des paramètres cinétiques malgré une diminution relative de la vitesse globale du procédé enzymatique.

Enfin, comparativement à la littérature, l'hydrolyse par voie enzymatique en utilisant la lipase donne des résultats comparables à ceux obtenus par la plupart des chercheurs où on atteint un rendement d'hydrolyse de 58% durant un temps de 20min.

L'étude de la réaction inverse, l'estérification, par la même lipase isolée a permis de démontrer la stabilité dans les milieux organiques. Une stratégie d'optimisation des paramètres régissant cette réaction similaire à celle adoptée pour la réaction d'hydrolyse, a conduit à la détermination des paramètres optimaux à savoir : la durée de la réaction (3 heures), la température (40 °C) et la masse d'enzyme (0.9g). Cette partie ouvre des perspectives pour l'utilisation de la lipase de ricin dans la synthèse d'esters à application dans l'agroalimentaire, le cosmétique et le domaine pharmaceutique.

L'actuel travail n'est qu'une étape préliminaire qui a permis de découvrir les performances et avantages de l'application des enzymes dans l'industrie et plus précisément celle des acides gras. Il est impératif de compléter les résultats obtenus en suggérant d'autres perspectives de développement ou d'amélioration telles que :

- Purification de la lipase avec des techniques plus performantes afin d'avoir un extrait enzymatique totalement purifiée qui permet de caractériser la structure moléculaire de la lipase ainsi les acides aminés qui la constituent.
- Utilisation des techniques analytiques pour la détermination du mécanisme de la transformation enzymatique des lipides par la lipase sous différents conditions (pH, substrat et présences des effecteurs (inhibiteurs ou activateurs) ainsi les phénomènes de diffusion en cas d'utilisation de la lipase immobilisée.
- Analyse des produits par des techniques appropriés tel que spectrométrie de masse permettant l'établissement du mécanisme de dégradation et la caractérisation du produit de traitement enzymatique.

Références bibliographiques :

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

[2]: Lepage J.F., Catalyse de contact : conception, préparation et mise en œuvre des catalyseurs industriels, Editions Technip – Paris, 1978.

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

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

[5] : Voet D., Voet J.G., Biochimie, 2e édition américaine, De Boeck et Lacier, Paris, 2005.

[6]: Lauro F., Enzymologie : Caractéristique générales des enzymes, TSTL-Bioch, 2008.

[7]: Bernhard S., Structure et fonction des enzymes, Ediscience, Paris, 1969.

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

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

[10]: Karp G., Biologie cellulaire et moléculaire, De Boeck et Larcier s.a., Paris, 2004.

[11]: Stryer L., La Biochimie., Flammarion Médecine Sciences., paris, 1985.

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

[13]: 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.

[14]: Atkins W.P., Physical Chemistry. 3rd Ed Oxford University, Press New York, 1982.

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

[16]: Moussard C., Biochimie structurale et métabolique, De Boek et Larcier, 2006.

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

[18]: Armes K., Camp. S. P., Biology 2nd ED CBS College Publishing New York, 1982.

[19]: Amtul Z., Rasheed M., Choudhary M. I., Rosanna S., Khan K. M., Atta-ur-Rahman, Biochemical and Biophysical Research Communications, 319-1053, 2004.

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

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

[22]: Hervagault J.F., Thomas D., les membranes enzymatiques artificielles, Paris, 1982.

[23]: Soni S., Desai J.D., Devi S., Immobilization of yeast Alcohol Dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric support , Journal of Applied Polymer Science, 82, 2001.

[24]: Bartolini M., Andrisano V., Weiner I.W., Developpement and characterization of an immobilized enzyme reactor based on glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies, Journal of Chromatography A, 987, 2003.

[25]: Cao L., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Cross-Linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase; Organic Letter, 2, 2000.

[26]: Schoevaart R., Wolbers M.W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A.P.G., Van Rantwijk F., Van der Wielen L.A.M., Sheldon R.A., Preparation, optimization and structure of cross-linked enzyme aggregates CLEAs, Biotechnology and bioengineering, 87, 2004.

[27]: Mozhaev V.V., Melik-Nubarov N.S., Sergeeva M.V., Siksnis V., Martinek K., Strategy for stabilizing enzyme. Part one: Increasing stability of enzyme via their multi-point interaction with a support, Biocatalysis, 3, 1990.

[28]: Yamada K., Nakasone T., Nagano R., Hirata M., Retention and reusability of trypsin activity by covalent immobilization onto grafted polyethylene plates, Journal of Applied Polymer Science, 89, 2003.

[29]: Zaborsky O., Immobilized enzym, Ohio CRC Press, 1974.

[30]: Schmidt R., Künzi L., Comportement des matériaux dans les milieux biologiques : application en médecine et biotechnologie, 1ière édition, presses polytechniques et universitaires romandes, 1999.

[31]: Ghesemi M., Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma, Paris, 2007.

[32]: Vaubourdolle M., Toxicologie, Sciences mathématiques, physiques et chimiques, Tome 1, toxicologie, 3e édition, Éditions Wolters Kluwer SA, 2007.

[33]: Albareda-Sirvent M., Merkoçi A., Alegret S., Sensors and Actuators B, 69, 153, 2000.

[34]: Li Y.G., Zhou X.Y., Feng L.J., Jiang Z., Ma L., Analytica chimica Acta, 382**,** 277, 1999.

[35]: Wan K., Chovelon J.M., Jaffrezic-Renault N., Talanta 52, 663, 2000.

[36] : Cherif B., Des puces à protéines/peptides pour des applications en recherche fondamentale et clinique, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Département de réponse et dynamique cellulaire, 2006.

[37]: Kim M.I., Kim J., Lee J., Jia H., Na H.B., Youn J.K., Kwak K.H., Dohnalkova A., Grate J.W., Wang P., Hyeon T., Park H.J., Chang H.N., Crosslinked enzyme aggregates in hierarchically-ordered mesoporous silica : A simple and effective method for enzyme stabilization, Biotechnology and Bioengineering, 96, 2007.

[38]: Richards F.M., Knowles J.R., Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent, J Mol Biol, 1968.

[39]: Mosbach K., Methods in Enzymology: immobilized enzyme, Academic Press New York, 1976.

[40]: Barhoumi H., Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour application biocapteur en hémodialyse rénale, thèse d doctorat, Faculté des Sciences de Monastir, Tunis, 2006.

[41] : Schonheyder F, Volqvartz K. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogenous solution. Acta Physiol Scand, 9, 57-67, 1945.

[42]: Gross R.A., Kaplan D.L., Swift G., Enzymes in Polymer Synthesis, ACS Symposium Series 684, American Chemical Society, Washington DC, 1998.

[43]: Albertsson A.C., Degradable Aliphatic Polyesters : Advances in Polymer Science, Eds : Springer-Verlag : New York, 157, 2002.

[44]: Furutani T., Furui M., Ooshima H., Kato J., Enzyme. Microb. Technol., 1996.

[45]: Sarda L., Desnuelle P., Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion, Biochim. Biophys. Acta, 30**,** 1958.

[46]: Fickers P., Destain J., Thonart P., Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12, 2008.

[47]: Beisson F., Oil-bodies as substrates for lipolytic enzyme, Biochim. Biophys. Acta, 1531, 2001.

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

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

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

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

[52]: Cavalcanti E.D.C., Maciel F.M., Villeneuve P., Lago R.C.A., Machado O.L.T., Freire D.M.G., Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L, Applied Biochemistry and Biotechnology, 136-140, 2007.

[53]: Akova A., Ustun G., Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on celite at different pH values, Biotechnology Letters, 22: 355-359, 2000.

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

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

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

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

[58]: Baba T., Structure of human milk bile salt activated lipase, Biochemistry, 30, 1991.

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

[60]: Bordes F., Dossat V., Nicaud J.M., Marty A., Journal of microbiological methods, 70 : 493-502, 2007.

[61]: Pignede G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.M., Caracterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*, J bacterial 182, 10: 2802-2810, 2000.

[62]: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.

[63]: Lafaquière V., comprehension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases, Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, 2010.

[64]:Blum H., Beier H., Gross HJ., Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. Electrophoresis 8: 93-99, 1987.

[65]: Nawani N., Khurana J., and Kaur J., A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Molecular and Celularl Biochemistry*, 290:17-22, 2006.

[66]: Year H., Mycetoma of the foot caused by *Fusarium solani* : identification of the etiologic agent by DNA sequencing, J. Clin. Microbiol., 41, 2003.

[67]: Tan M., Niessen L., Analysis of rDNAITS sequences of determine genetic relationships among and provide a basis for simplified diagnostic of *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals, Mycol. Res., 107, 2003.

[68]: Longhi S., Cambillau C., Structure-Activity of cutinase, a small lipolytic enzyme, Biochim. Biophys. Acta. 1441, 1999.

[69]: Martinez C. et *al*., *Fusarium solani* cutinase is a lipolityc enzyme with a catalytic serine accessible to solvent, Nature, 356, 1992.

[70]: Schmid R.D., Verger R., Lipases : interfacial enzymes with attractive applications, Angew. Chem. Int. Ed., 37, 1998.

[71]: Stocklein W., Sztajer H., Menge U., Schmid R., Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*, Biochim. Biophys. Acta, 1168, 1993.

[72]: Cancino-Cardenas M.A., Amélioration de l'activité et de l'énantiosélectivité de la lipase Lip2 de *Yarrowia Lipolytica* vis-à-vis des acides 2-Bromo-aryl acetique, Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, 946, 2008.

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

[74]: Maugard T., Remaud-Smeon M., Petre D., Monsan P., Lipase-catalyzed chemoselectivite N-acylation of amino-suger derivatives in hydrophobic solvent: acid-amine ion-pair effects, Tetrahedron, 53, 22, 1997.

[75]: Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T., Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases, Annu. Rev. Microbiol, 53, 1999.

[76]: Brady L., Bezozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkenburg J.P., Christiansen L., Huge-Jensen B., Norskov L., Thim L., Menge U., A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase, Nature, 343, 1990.

[77]: Winkler F., D'arcy A., Hunziker W., Structure of human pancreatic lipase, Nature, 343, 1990.

[78]: Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S., Harel M., Remington S.J., Silman I., The hydrolase fold, Protein Eng, 5, 1992.

[79]: Von V., Pfeffer J. C., The lipase from *Candida Antarctica :* cloning, Expression and their Application in the Synthesis of structured Lipids, Institut fur Technische Biochimie an der Universitats Stuttgert, 2008.

[80]: Ileperuma N.R., Marshall S., Squire C.J., Baker H.M., Oakeshott J.G., Russel R.J., Plummer K.M., Newcomb R.D., Baker E.N., High-resolution crystal structure of plant carboxylesterase AeCXE1from *Actinidia eriantha* and its complex with a high-affinity inhibitor paraoxon, Biochemistry, 46, 2007.

[81]: Uppenberg j., Patkar S., Bergfors T., Jones T.A., Cristallization and Preliminary X-ray Studies of amino acid-based surfactants, Journal of American Oil Chemists Society, 74, 1997.

[82]: Kim M.J., Choi M.Y., Lee J.K., Ahn Y., Enzymaric selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 26, 2003.

[83]: Upton C., Buckley J.T., A new family of lipolytic enzymes, Trends Biochem Sci, 20, 1995.

[84]: Sarda L., Desnuelle P., Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion, Biochimica and Biophysica Acta, 30, 1958.

[85] : Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bojkling F., Huge-Jensen B., Patkar S.A., Thim L., A model of interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex, Nature, 531(6326) : 491-4, 1991.

[86]: Brzozowski A.M., Savage H., Verma C.S., Turkenburg J.P., Lawson D.M., Svendsen A., Patkar S., Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa* lipase, Biochemistry, 39(49) : 15071-82, 2000.

[87]: Svendsen A., Lipase protein engineering, Biochima at Biophysica Acta, 1543(2):223-38, 2000.

[88]: Pleiss J., Fischer M., Peiker M., Thiele C., Schmids R.D., Lipase engineering database : Understanding and exploiting sequence-structure-function relaionship, J. Mol. Catal. B Enzym. 10, 1: 491-508, 2000.

[89]: Peters G.H., Van Aalten D.M., Svendsen A., Bywater R., Essential dynamics of lipase binding sites: the effect of inhibitors of different chain length, Protein Eng, 10, 2, 149-58, 1997.

[90]: Tejo B.A., Salleh A.B., Pleiss J., Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent, J Mol Modelling, 10, 5-6, 358-66, 2004.

[91] : Cortés J., Siméon T., Ruiz de Angul V., Guieysse D., Remaud-Siméon M., Tran V., A path planning approch for computing large-amplitude motions of flexible molecules, Bioinformatics, 21, 116-125, 2005.

[92]: Fischer M., Die Lipase Engineering Database systematische analyse familienspezifischer eigenschaften und der sequenz-struktur-funktionsbeziehung von a/B-

hydrolasen, thèse de doctorat, Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, 176, 2004.

[93]: Husson E., Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatiques, thèse de doctorat, Institut national polytechnique de LORRAINE, 2008.

[94]: Nawani N., Singh R., Kaur J., Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme, Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458, 2006.

[95]: Gandhi N. N., Sawant S. B., Jyeshtharaj J.B., Mukesh D. Lipozyme deactivation by butanol and temperature. *Enzyme Microb. Technol.* 17 (4), 373-380, 1995.

[96]: Muller M., Wolberg M., Schubert T., Hummel W., Enzyme-catalyzed regio- and enantioselective ketone reductions. Adv Biochem Eng Biotechnol, 92, 261-87, 2005.

[97]: Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsumada, T.; Harada, T., Recents developments in asymetric reduction of ketones with biocatalysts. Tetrahedron: Asymmetry, 14, 2659-2681, 2003.

[98]: Lancelot WK., Luke M., John SR., Ignatious N. Characterisation of some underutilised vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase-catalysed production of cocoa butter equivalents. Indus. Crops Prod. 16, 237-244, 2002.

[99]: El Rassy H., Perrard A., Pierre A.C., Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: bi-bi pingpong kinetics. J. Mol. Catal. B: Enzym. 30, 137-150, 2004.

[100]: Maugard T., Remaud-Simeon M., Peter D., Monsan P., Lipase-catalyzed chemioselectivite N-acylation of amino-suger derivatives in hycrophobic solvent : acid-amine ion-pair effects, Tetrahedron, 53, 52, 7587-7594, 1997.

[101]: Litjens M.J.J., Quyên Le K., Straathof A.J.J., Jongejan J.A., Heijnen J., Diffusion limitation causes decreased enantioselectivity of esterification of 2-butanol by immobilized *Candida antarctica* lipase B, Biocatal. Biotransform. 19, 1-19, 2001.

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

[103] : 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.

[104] : Soares C.M.F., de Castro H.F., de Moraes F.F. and Zanin G.M., Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica, Applied Biochemistry and Biotechnology, 77/79, 745-757, 1999.

[105]: Hassanien F. R., et Mukherjee K. D., Isolation of lipase from germinating oilseed for biotechnological processes, *journal of American oil chemists society*, 63(7),893-897, 1986.

[106] : Pereira E.B., Zanin G.M. and Castro H.F., Immobilization and Catalytic Properties of Lipase on Chitosan for Hydrolysis and Esterification Reactions, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 343-355, 2003.

[107] : Mohamed M.S., Fidèle P.T., Aléodjrodo P.E., Georges A., Valorisation des huiles d'origine béninoise par alcoolyse enzymatique, Fondamental, 2005.

[108] : 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.

[109] : Victor N.E., Fatima A.T., Tajudeen M.S., Roland D.A., Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth), Food Chemistry, 88, 405-410, 2004.

[110]: Marie Z., Zdenek W., Plant Product for Pharmacology : Application of Enzymes in Their Transformations, Int.J.Mol.Sci., 9, 2447-2473, 2008.

[111]: Kumer S.R., Sana N.K. and Hossain I., Ionic effect of seed storage nutrient substances and lipase activity in germinating (*Brassica napus* L.), Pakistan Journal of Biologie Sciences, 7, 36-41, 2004.

[112] : 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.

[113] : 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.

[114] : Muto S., Beevers H., Lipase activities in castor bean endosperm during germination, Plant physiology, 54, 23-28, 1974.

[115] : Bradford M.M.A., Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principale of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254, 1976.

[116] : Sibel F. and Zerrin S., Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil, Food research international, 30, 171-175, 1997.

[117] : Larissa F., Bueno T., Victor H.P., Santos J.C., de Castro H.F., Enzymatic hydrolysis of soybean oil sing lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids, World J Microbiol Biotechnol, 23, 1725-1731, 2007.

[118] : Dandik L., Aksoy H. A., Application of *Nigella sativa* seed lipase in oleochemical reactions, Enzyme and Microbial Technology 19:277-281, Elsevier Science Inc. 1996.

[119] : Keehoon W., Sangbum K., Kwang-Je K., Hong W.P., Sang J.M., Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads, Process Biochemistry, 40, 2149–2154, 2005.

[120] : Maria G.B.K., Glaucia M.P., Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp, Ciênc. Agrotec., Lavras, 30, 494-502, 2006.

[121] : Michel H., Chimie analytique : Méthodes spectrales et analyse organique, volume 3, 2^{e} édition, Paris, 1990.