الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

Département du Génie des procédés

Mémoire de fin d'étude

Présenté pour L'obtention du Diplôme

De Master en Génie des procédés

Option: Bioprocédé pharmaceutique

THEME

Séparation, purification et caractérisation de la lipase de Ricinus communis

Proposé et dirigé par,

Pr. Abouseoud Mahmoud

Préparé et présenté par,
Melle : Benaoua Amina
Melle : Ouanoughi Halima

Année universitaire 2014 /2015

REMERCIEMENT

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous sommes apporté leur aide et qui ont contribué à élaboration de ce mémoire, ainsi que s'adressent d'abord à ALLAH le tout puissant et à son prophète MOUHAMED (paix et salut sur lui), pour les chances qui nos sont offertes pour réaliser ce travail.

Avant de vous présenter ce rapport, nous tiens à remercier tous ceux qui nous sommes aidé pendant notre stage et nos études à université. ***Dr : YAHIA FARES de MEDEA****.*

Nous voudrons en particulier remercier au, ***Pr : ''MAHMOUD ABOUSEOUD''*** *responsable de mémoire, vous nous avons accordé votre confiance en acceptant de diriger ce mémoire, et de nos sincères remerciement à tous les professeurs de département de* ***GENIE DES PROCEDES*** *pour leurs enseignements et les cours intéressants qu'ils nous donnent pendant notre scolarité à université. Et en particulier a Dr :* ***TASSIST AMINA.***

Nous n'oublie pas de remercier aussi tous les personnels de 2eme année master (LMD) (ST), qui nous apporté leur aide. Depuis nos premières jours dans cet institut, nous allons reçu beaucoup d'aides, de conseils et d'encouragements de nos amies, en particulier ceux de promotion 2eme année master ***BIOPROCEDES PHARMACEUTIQUE (2014-2015).***

Tout cela nous permis de murir chaque jour nous les remercier et nous ne pourrais jamais oublier les souvenirs gais et tristes que nous allons passer avec eux durant ces Cinque ans à l'université.

A tous ceux qui de prés ou de loin, ont apporté leur contribution à la réalisation de travail, nous vous prie de trouver l'expression de nos profondes reconnaissances.

Dédicace

*Merci ALLAH (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout de rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire "**ya kayoum**"*

Je dédie ce modeste travail à qui je perdu dans mon enfance, à mon père que dieu mis en paradis.

A celle qui ma donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère, que dieu la garde et la protège.

A mes frères ahmed, kadour, nadir et Omar.

A mes sœurs Fatima et aicha.

A mes neveux Douà, Akram, Anas, Kouki.

Et Abd el samie.

A mes amies Linda, dalel, fanny et ratiba.

Et en particulier à mon cher binôme Benaoua Amina.

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

Ouanoughi Halima



Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

· Mes parents :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutient permanent venu de toi.

Mes frères et ma sœur qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Mes neveux : yasmine, Mirale, narjisse et mosaabe.

Tous mes amis sans exception

BENAOUA Amina

Liste des abréviations

A : Activité enzymatique

E : Enzyme.

E_a : Energie d'activation.

EEB : Extrait enzymatique brut.

EEPP : Extrait enzymatique partiellement purifier.

IR : infra rouge.

K_m : Constante de Michaelis de l'enzyme.

m_{AGL} : Masse des acides gras libres.

M_{moy} : Masse molaire moyenne.

Rh : Rendement d'hydrolyse.

T : Température.

S : Substrat.

V_0 : Vitesse initiale.

V_{max} : Vitesse maximale de réaction enzymatique.

τ_a : Taux d'activation.

τ_i : Taux d'inactivation.

Table de matières

Remerciement
Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures

Résumé

Introduction……1

Partie théorique……3

Chapitre. I : Généralités sur les enzymes……3

I.1. Définition……3
I.2. Les propriétés générales……3
I.3. Caractéristique des enzymes……5
I.4. La composition des enzymes ……6
I.5.Unité d'activité enzymatique……6
I.6. Application des enzymes……6
I.7. Mécanisme et cinétique enzymatique……6
I.7.1. Equation de michaelis-Menten……7
I.8. Facteurs influençant la vitesse d'une réaction enzymatique……9
I.8.1. Effet de la température……9
I.8.2. Effet du pH……10
I.8.3.Effet de la concentration en enzyme……11
I.8.4. Effecteurs chimiques……11

Chapitre II : Généralités sur les lipases……..…….13

II.1. définition……..…….……13

II.2. Origine et classification des lipases……..…….…13

II.2.1. Lipase végétales……..…….…….……..…....14

II.2.2. Lipase de mammifères……..…..……..…….....15

II.2.3. lipases microbiennes……...……..…….…….…15

II.2.4. les cutinases……..…..……16

II.3. spécificités des lipases……...……..……17

II.3.1. Régiosélectivité envers les triglycérides……..…….…….17

II.3.2. chimio sélectivité…….……..…….…….....….17

II.3.3. stéréo-sélectivité…….……..…….…….....…..18

II.3.4.Enantio-sélectivité…….……..…….……..…18

II.4. Caractéristiques structurelles des lipases……..……...……....….18

II.4.1. Les α/β hydrolases…….....…..18

II.4.2. La triade catalytique…….…….……....…19

II.4.3. le volet amphiphile et l'activation interfaciale des lipases…….....20

II.4.4. trou oxyanion……..…….....21

II.4.5. Arrimage du substrat dans le site actif ……..…..……..…22

II.5. Mécanisme d'action ……...…...…..….23

II.6. Réactions catalysées par les lipases……..……...……..…..25

II.6.1 Réaction d'hydrolyse……..…...25

II.6.2 Réaction de synthèse……...…….....25

II.6.2.1 La transestérification……..……...……...26

II.7 les principales méthodes d'extraction et de purification utilisées à grande échelle…….……...…..27

II.7.1 méthodes d'extraction……...…….……...…..27

II.7.2 Méthodes de purification……...……..28

II.8. Application industrielle de lipase…….……..…….... 28

II.8.1 Applications dans les détergents……..…….…….....28

II.8.2. Applications en bioremédiation……..…….…….…….29

II.8.3. Applications dans l industrie agro-alimentaire…..…….…….29

II.8.4 Les lipases en industries cosmétique……30

II.8.5 Application médicinale et pharmaceutique……..……...…….…30

II.8.6.Production de polymères biodégradables…….30

Partie expérimentale……...33

Chapitre III : extraction, purification et la caractérisation de la lipase semi-purifiée …33

III.1.La source de lipase……....33

III.2.Substrat…….…….....33

III.3. Extraction de la lipase brute…….……34

III.4.Purification partielle de la lipase……..…….35

III.4.1. Mode opératoire ……..……..…….……..…...…35

III.4.2. Mesure de l'activité enzymatique…….…….…..….36

III.4.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford…….…….……..37

III.4.4. Résultat et discussion……..……...……39

III.5. Caractérisation de l'EEPP de la lipase de *Ricinus commun*……40

III.5.1. Effet de température sur l'activité enzymatique…..……...……...…….…40

III.5.1.1. Mode opératoire……..……40

III.5.1.2. Résultats et discussion……..…...……..41

III.5.2. Effet de pH sur l'activité enzymatique de la lipase….……..……..…..…….43

III.5.2.1. Mode opératoire……..…….……..……43

III.5.2.2. Résultats et discussion ……..…….…….……..43

III.5.3. Effet des effecteurs sur l'activité enzymatique…….……..…44

III.5.1.1 Mode opératoire……..…….……..45

III.5.3.2. Résultats et discussion…….……..……..…….……45

III.5.4. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité enzymatique…..……..…..46

III.5.4.1. mode opératoire…….……46

III.5.4.2. Résultat et discussion……..…….……..…47

III.5.5. Effet de la concentration de substrat sur l'activité enzymatique…….48

III.5.5.1. mode opératoire…….…….……..…48

III.5.5.2.Résultat et discussion…….……...…48

III.5.6. Stabilité thermique de la lipase de *Ricinus communis*…….……..…….……51

III.5.6.1. mode opératoire……..51

III.5.6.2. Résultat et discussion……..…….…..…51

III.5.6.3. Détermination de l'énergie désactivation……..……...….....52

Chapitre IV : **Une application sur la synthèse enzymatique du biodiesel**.……..…57

IV.1. Introduction……..……..…….…….57

IV.2. Les paramètres réactionnels de réaction……..……...…..58

IV.2.1. Rapport molaire alcool/huile et type d'alcool……...…..…...…..…….58

IV.2.2. La température et la pression……...……..….....…….58

IV.2.3. L'agitation……...…..…….……57

IV.3. Critères de choix de l'huile…….…..…58

IV.4. Caractérisation des réactifs utilisés……..……59

IV.5. procédé de production de biodiesel…….....……60

IV.6 Les étapes de production de biodiesel……...…….…61

IV.7. Caractérisation de biodiesel……...……..62

IV.8. Résultats……..……63

Conclusion……..…….65

Liste des figures :

Fig. I.1 : le modèle clé serrure…….……...…5

Fig. I.2 : représentation graphique d'une cinétique michaelienne. Evolution de réaction enzymatique en fonction de La concentration en substrat……..…8

Fig. I.3 : représentation graphique en double inverse selon **lineweaver-burk**…….....9

Fig. I.4 : représentation graphique selon **eadie-hosftee**……....…9

Fig. I.5 : influence de la température sur la vitesse d'une réaction enzymatique……..…10

Fig. I.6 :l'effet de pH sur l'activité enzymatique……..…10

Fig. I.7 : influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique……..11

Fig. II.1. Réaction d'hydrolyse complète de triglycérides (TG) par une lipase non-sélective dans un milieu aqueux……..13

Fig. II.2 : identification des liaisons esters potentiellement hydrolysable par la lipase……...17

Fig. II.3: schéma Les α/β hydrolases……19

Fig. II.4. : Représentation schématique des deux conformations d'une lipase……20

Fig. II.5. Représentation moléculaire des deux conformations de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* d'après Svendsen, 2000 ……21

Fig. II.6. Deux types de trous d'oxyanions……...22

Fig. II.7. Trois topologies de site actif de lipase……..22

Fig. II.8 : Schématisation de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique……24

Fig. II.9:Réactions catalysées par les lipases……...26

Fig. III.1. Protocole d'extraction et préparation de l'extrait enzymatique brut de la lipase de graines de ricin …….34

Fig. III.2 : Etapes de purification de lipase de graines de Ricin par précipitation à l'acétone.36

Fig. III.3. Courbe d'étalonnage de l'albumine par la méthode de Bradford……39

Fig. III.4 : Effet de température sur l'activité enzymatique de la lipase de ricin (pH7)……..41

Fig.III.5. Effet de température sur le rendement d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin……..…….42

Fig. III.6 : Effet de pH sur l'activité enzymatique de la lipase de *Ricinus communis*……..…43

Fig.III.7. Effet de pH sur le rendement d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin……...44

Fig.III.8. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité enzymatique de la lipase de *Ricinus communis*……..…47

Fig.III.9. Cinétique d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin à différentes concentrations initiales……..….49

Fig.III.10. Représentation graphique de Michaelis-Menten de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin……..49

Fig.III.11. Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité enzymatique de la lipase……..50

Fig.III.12. Stabilité thermique de la lipase de *Ricinus communis* à différentes températures.51

Fig. III.13. Détermination de la constante de vitesse de dénaturation de la lipase de ricin….54

Fig.III.14. la représentation graphique de ln k en fonction de 1/T pour la réaction de dénaturation thermique de la lipase de *Ricinus communis*.……...55

Fig. IV.1 : Etapes de production de biodiesel a laboratoire…….……62

Fig. IV.2. Spectre IR de biodiesel…...……63

Liste des tableaux :

Tableau I.1 : les différentes classes d'enzymes……..…4

Tableau II.1 : quelques espèces microbiennes productrices de lipase……....16

Tableau II.3 : Application industrielle de lipase…….....…..31

Tableau III.1 : la méthode de Bradford……..38

Tableau III.2 : caractéristiques des préparations enzymatiques de l'EEB et l'EEPP de la lipase de *Ricinus communis*…….…….39

Tableau III.3 : valeurs de taux d'activation et d'inhibition de la lipase de *Ricinus communis* par différents Composés chimiques…….….45

Tableau III. 4. valeurs de la constante de vitesse de dénaturation de la lipase de ricin en fonction de la température……..…54

Tableau IV.1. Propriétés de diesel et biodiesel……57

Tableau IV.2. propriété de biodiesel……...……...…..63

Tableau. IV.3 les groupements fonctionnels de biodiesel……...64

ملخص

الهدف من دراستنا هو استخراج و تنقية الليباز المستخلص من بذور الخروع و دراسة تأثير العوامل الفيزيوكيميائية على النشاط الانزيمي في تفكيك الروابط الاسترية لزيت الزيتون.

اثبت الاستخراج عن طريق الترسيب بواسطة الاسيتون انه طريقة فعالة و سهلة التنفيذ حيث كان عائد التنقية 74%, و النشاط الانزيمي الخاص 335 وع.مغ$^{-1}$

النتائج المتحصل عليها تثبت ان النشاط الانزيمي لليباز يتأثر بعدة عوامل مثل درجة الحرارة, الاس الهيدروجيني, تركيز الأنزيم المؤثرات الكيميائية و الثبات الحراري.

درجة الحرارة المثلى هي 40 درجة مئوية و الاس الهيدروجيني 7.

اما بالنسبة لحركية التحلل لزيت الزيتون هو من نوع ميكاياليز و ثابت السرعة هو 28,85 غ.ل$^{-1}$ و السرعة القصوى هي16,39مغ.د$^{-1}$.

كما ان الليباز مستقر حراريا لمدة 2سا في درجة حرارة 40 درجة مئوية,وتعطيل الطاقة 108كج,مول.

الكلمات المفتاحية ليباز, الاستخراج,بذور الخروع عوامل فيزيوكيميائية, حركية,الثبات.

Résumé

Le but de notre étude est d'extraire et purifier la lipase à partir de graines de ricin « *Ricinus communis* » et d'étudier l'influence de paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique lors de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive. L'extraction par précipitation à l'aide de l'acétone s'est avéré une méthode efficace et facile à mettre en œuvre permettant d'atteindre un rendement de purification de 74% et une activité spécifique de 352 UI/mg protéines. Les résultats obtenus montrent que l'activité de la lipase est modulée par plusieurs facteurs physicochimiques tels que la température, le pH, la stabilité thermique, la concentration d'enzyme, ainsi l'effet de effecteurs chimique. La température optimale est égale à 40 °C avec un pH optimum au voisinage de 7. La cinétique d'hydrolyse de l'huile d'olive est du type Michaelien avec les constantes Km =28,85g/l et V_{max}=16,39mg/min.

La lipase est caractérisée par une grande thermo stabilité pendant 2 heures de traitement à 40 °C. L'énergie de désactivation est égale à 108 kJ/mol.

Mots clés: lipase, Extraction, graine de ricin, paramètres physicochimiques, cinétique, stabilité.

Abstract

The aim of our study was to extract and purify the lipase from castor beans "Ricinus communis" and to study the influence of physicochemical parameters on enzyme activity in the hydrolysis reaction of the olive oil. The extraction by precipitation with acetone has proven effective and easy method to implement to achieve a purification yield of 74% and a specific activity of 352 IU / mg protein. The results obtained show that the lipase activity is modulated by several physicochemical factors such as temperature, pH, thermal stability, the enzyme concentration, and chemical effectors effect. The optimum temperature is 40 ° C with an optimum pH close to 7. The kinetics of hydrolysis of olive oil is the guy with Michaelien constant Km = 28,85g /L and Vmax = 16,39mg / min.

Lipase is characterized by high heat stability for 2 hours of treatment at 40 ° C. The energy deactivation is 108 kJ / mol.

Keywords: lipase, extraction, castor seed, physicochemical parameters, kinetics, stability.

INTRODUCTION

Le développement de nouvelles biotechnologies, bio-industries et bio- raffineries est un défi majeur pour l avenir. Mais ces développements nécessitent la mise au point de biocatalyseurs (que ce soient des microorganismes ou des enzymes) de plus en plus performants mais aussi adaptés à une mise en œuvre dans des conditions industrielles.

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Elles sont des macromolécules qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules suffisamment pour que leur vitesse devienne compatible avec le fonctionnement de l'organisme.

Les enzymes sont des molécules très importantes utilisées dans plusieurs industries comme les industries alimentaires, textiles, pharmaceutiques et cosmétiques.

La lipase fait partie de ces enzymes ubiquistes que l'on retrouve aussi bien chez les organismes inférieurs tels que les bactéries, les champignons ou levures que chez les organismes supérieurs tels que les plantes et les animaux. Elles sont capables de catalyser l'hydrolyse des esters glycérides en milieu aqueux et la synthèse d'esters en milieu non aqueux.

La caractérisation des enzymes lipolytiques ajouterait donc à l'intérêt économique déjà porté aux enzymes, un intérêt technique et technologique pour une mise en œuvre optimale au sein du bioprocédé. Vu le nombre important de facteurs pouvant influencer l'activité enzymatique et par la suite le rendement et la vitesse de la réaction enzymatique, il est impératif de mener une étude approfondie sur le degré d'influence des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique pour une réaction type. Par la suite, il sera possible de déterminer les conditions optimales sous-lesquelles l'activité sera maximale et d'exploiter ainsi d'une manière rationnelle le pouvoir catalytique de l'enzyme.

L'intérêt de la présente étude est portée sur la séparation, purification et la caractérisation de la lipase végétale obtenue à partir de graines de ricin « *Ricinus communis* ».

Le travail sera organisé en deux parties :

- Partie bibliographique composée deux chapitres:
  - Le premier consacré à des généralités sur les enzymes.
  - Le deuxième chapitre consacré à de généralités sur la lipase.
- Partie expérimentale :
  - La première partie porte sur l'extraction, la purification. Et la caractérisation de la lipase de grains de ricin semi-purifiée et l'étude de l'influence de différents paramètres physico-chimiques (Température, pH, substrat, effecteurs….etc.) sur l'activité enzymatique.
  - Une application sur la synthèse enzymatique du biodiesel.

I.1. Définition :

Les enzymes sont des catalyseurs, c'est-à-dire des substances capables d'accélérer des réactions chimiques. Responsables de l'ensemble des réactions qui se déroulent à chaque instant au sein des cellules vivantes, elles sont les outils permettant le fonctionnement du vivant.

Les enzymes sont toutes des protéines. Chaque enzyme est codée par un gène qui lui est propre. Leur action est étroitement spécifique des substances (appelées substrats) dont elles assurent la transformation chimique. Enfin, leur activité est souvent considérable : une seule molécule d'enzyme peut transformer jusqu'à plusieurs millions de molécules de substrat par minute.

Les enzymes assurent une fonction de catalyseurs. En présence d'une enzyme donnée, plusieurs molécules sont amenées à interagir et à subir des transformations chimiques déterminées ; Il en résulte la formation de nouvelles substances pouvant à leur tour être transformées par d'autres enzymes. On appelle substrats les substances réagissantes et produits les substances formées. [1]

I.2. Les 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 différents des catalyseurs chimiques suent plusieurs points importants [2] :

- **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 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-chimique de la réaction. Les réactions enzymatiques peuvent donc être régulées [3].

❖ **Spécificité de la catalyse enzymatique :** l'un des caractères les plus importants de la catalyse enzymatique est sa spécifié 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 [4]. On distingue six classes d'enzymes (tableau) :

Tableau I.1 : les différentes classes d'enzymes [5].

N°	**Classe de l'enzyme**
1	**Oxydoréductases** (qui catalysent le transfert d'électrons : oxydoréduction)
2	**Transférases** (qui catalysent le transfert d'un 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 une 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 les quelles l'enzyme est en interaction.

Les interactions entre un enzyme et son substrat dépendent de la reconnaissance moléculaire fondée sur la complémentaire structurale ; cette reconnaissance est à la base de la spécificité sur le quel se lie le substrat et ou la catalyse a lieu est appelé le site actif de l'enzyme [6]. 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.

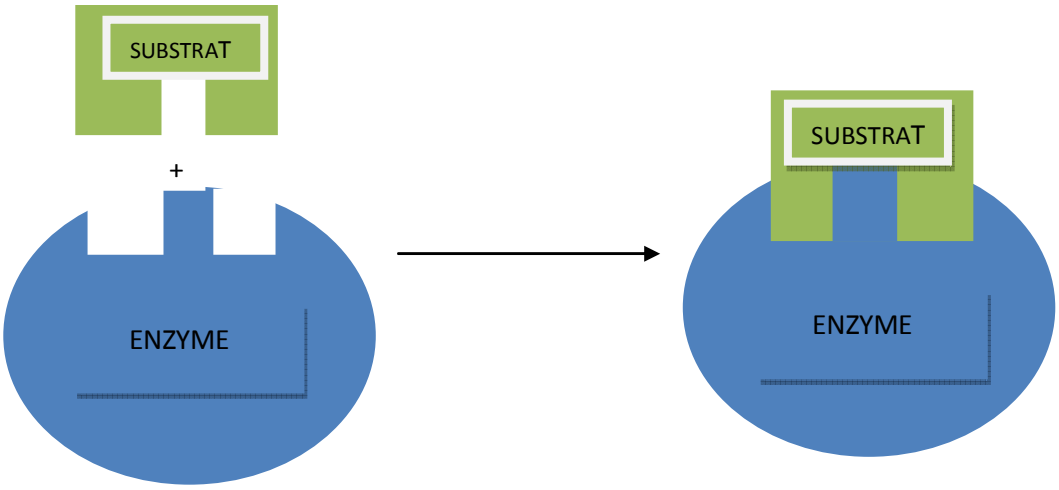


Fig. I.1 : le modèle clé serrure

❖ **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 **apoenzymes.** le complexe enzyme-cofacteur catalytiquement actif est appelée un **holoenzyme** [2].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. Caractéristique des enzymes : [7]

❖ Elles sont de nature organique, étant produit seulement par des cellules.

❖ Elles sont des catalyseurs capables d'augmenter la vitesse de la réaction chimique.

❖ Elles sont solubles, qu'on peut extraire à partir des sources animales et végétales par différents solvants tel que l'eau et solution de sel ou glycérol.

❖ Elles sont précipitées par l'alcool ou les sels métalliques, tel que les sulfates de cuivre ou le chlorure mercurique.

❖ Elles se comportent comme colloïde et ne diffusent pas par les membranes semi perméables.

❖ Elles sont sensibles au changement de la température et de PH de milieu réactionnel.

❖ Elles sont spécifiques dans leurs actions.

❖ Elles sont capables d'inverser le sens de la réaction qu'elles causent.

I.4. La composition des enzymes :

Toutes les enzymes sont des protéines et se composent d'une molécule de protéine (apoenzymes) combinée avec une nonprotéine, portant ce qui s'est appelée '' un facteur biochimique d'énergie '' [7], la dénaturation des protéines, entraines une disparition parallèle de l'activité enzymatique.

Les travaux récents d'analyse des sites actifs de certaines enzymes et la détermination de la structure de la plus petite enzyme connue ont établis avec certitude que la molécule protéique elle-même est le support de l'activité enzymatique.

Le site actif ou centre actif d'un enzyme est une zone privilégiée située dans la zone interne hydrophobe de la protéine enzymatique, au niveau de la quelle s'exerce électivement le pouvoir catalytique.[8]

I.5. Unités d'activité enzymatique :

Unité officielle: katal (kat), quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par seconde. Le katal n'est jamais utilisé, car beaucoup trop grand. On doit utiliser des sous-unités comme les μkat (10-6 katal), nkat (10-9 katal) ou pkat (10-12 katal).
La plupart des biochimistes préfèrent l' "unité internationale" (IU, International Unit), qui est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 μmole de substrat par minute. 60 IU valent donc 1 μkat. [8]

I.6. Application des enzymes : [9]

Les enzymes sont utilisées depuis longtemps pour catalyser les réactions chimiques dans les industries de papier, détergents, produits pharmaceutiques, agro-alimentaires.

L'utilisation médicale des enzymes est le traitement local des enzymes est le traitement local des zones d'inflammations, ou l'élimination des matières étrangères et les tissus morts des blessures et des brulures, et le tableau suivant nous donne les principaux enzymes d'intérêt industriels.

I.7. 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 [6].

Le modèle le plus utilisé est celui de Michaelis-Menten [10].

I.7.1. 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: constants de vitesse.

La vitesse υ de formation de produit est :

$$V=d[P]/dt = K_{+2}[ES]$$

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

$$[E]_0=[E]+[ES]$$

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 :

$$[ES]= \text{constante},$$

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

$$\mathbf{Y=V_M / (K_M +[S])} \qquad \mathbf{(1)}$$

Avec:

$$\mathbf{V_M= K_{+2}[E]_0}$$

$$\mathbf{K_M= (K_{-1} + K_{+2}) / K_{+1}}$$

Ou V_m est la vitesse maximale de la réaction enzymatique, et K_m est la constante de **michaelis** de l'enzyme.

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.2) [11] :

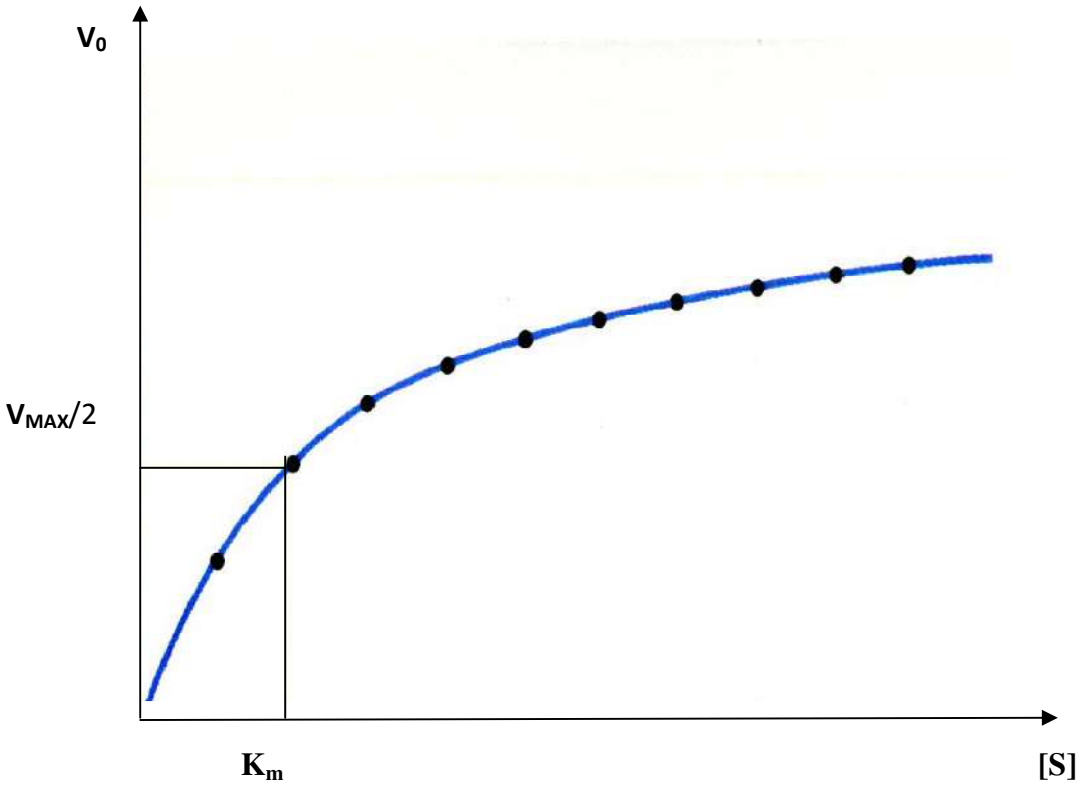


Fig. I.2 : représentation graphique d'une cinétique michaelienne. Evolution de réaction enzymatique en fonction de La concentration en substrat [12]

La détermination graphique directe de V_M et K_M n'est pas toujours précise, et d'autres méthodes ont été proposées, elles reposent sur une linéarisation de l'équation (1) de **michaelis-menten**, la plus connue est la représentation en double inverse selon **lineweaver-burk** représentée sur la figure (I.3) avec une autre représentation selon **eadie-hosftee** (figure I.4)

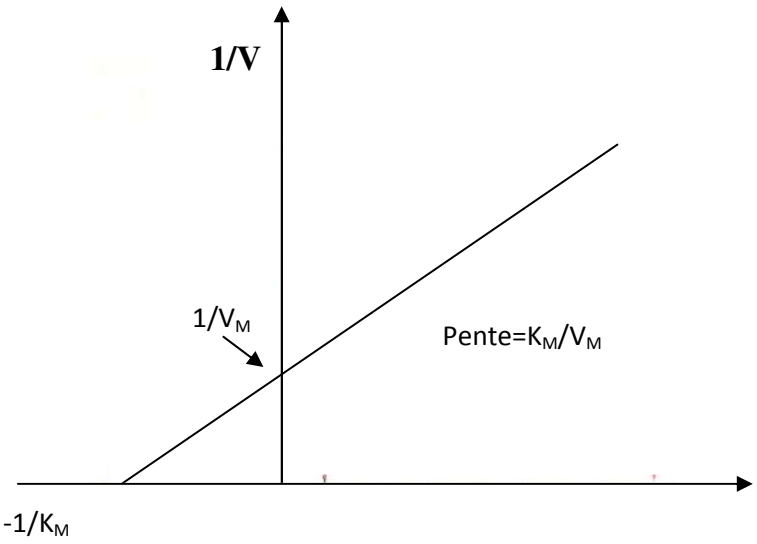


Fig. I.3 : représentation graphique en double Inverse selon **lineweaver-burk**.

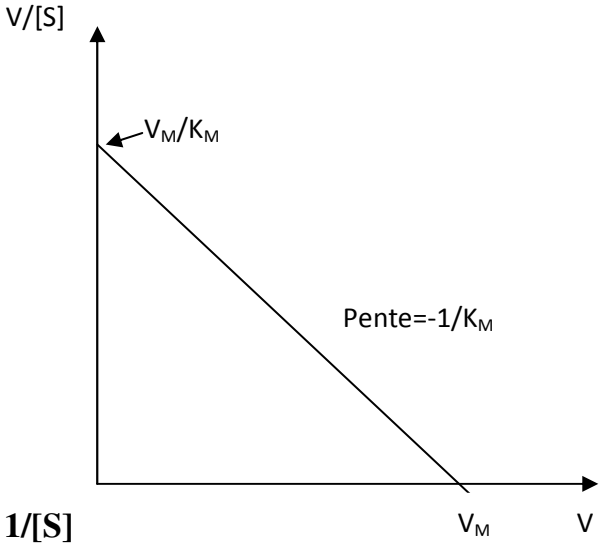


Fig. I.4 : représentation graphique Selon **eadie-hosftee** [11].

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

I.8.1. Effet de la température

Elle a deux effets sur la réaction enzymatique :

- Elle l'accélère, en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation ;
- Elle entraine 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** [13].

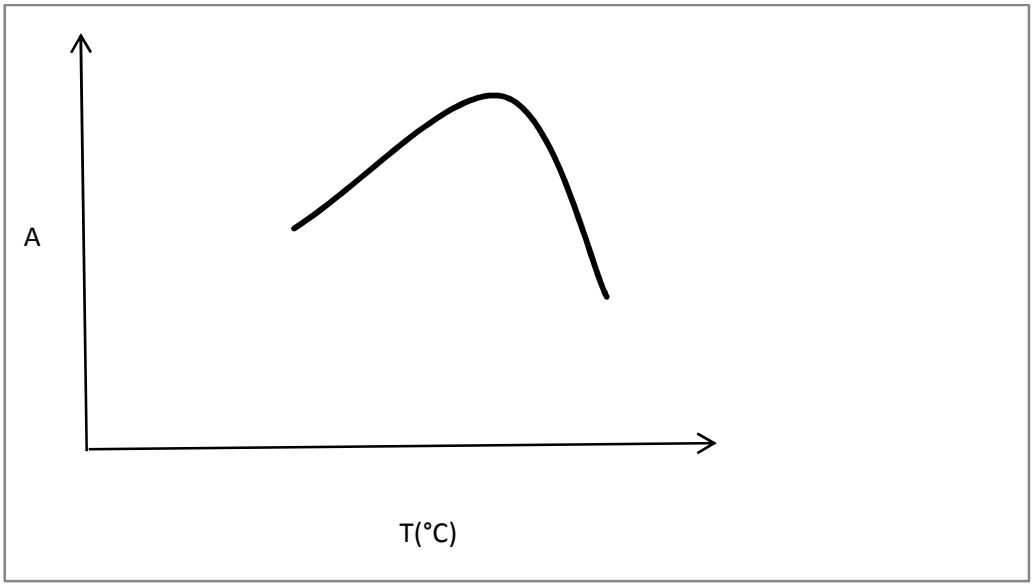


Fig. I.5 : influence de la température sur la vitesse d'une réaction enzymatique

I.8.2. Effet du pH

Les enzymes ne sont en général actifs que dans une zone limitée de pH, et la plupart ont une activité catalytique optimale à un pH particulier. Le pH peut affecter le K_m ou V_m, ou les deux à la fois. 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 [6].

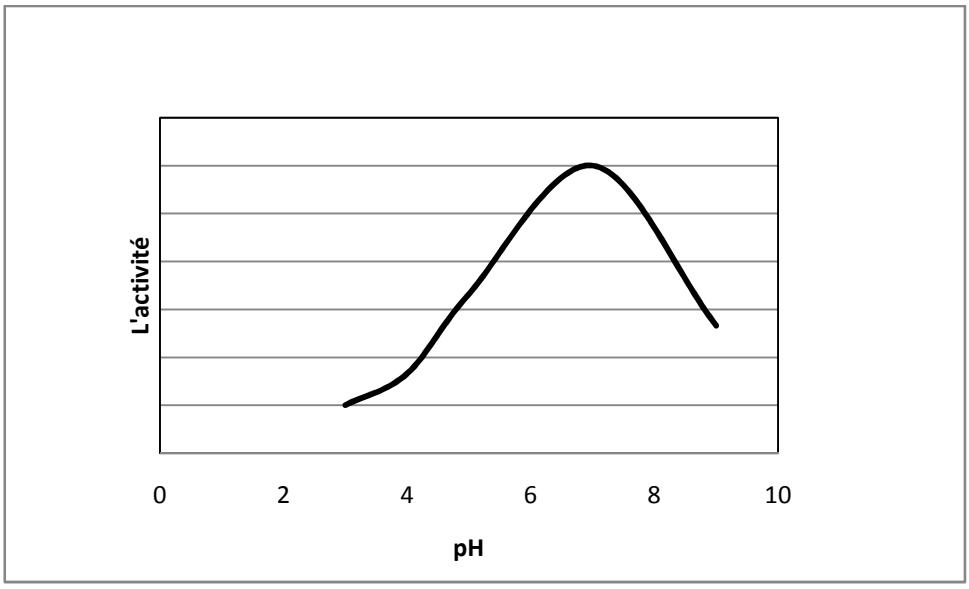


Fig. I.6 : effet de pH sur l'activité enzymatique

I.8.3.Effet de la concentration en enzyme

La réaction d'équilibre entre l'enzyme et son substrat est très rapide. En effet, l'addition de quelques molécules d'enzymes à la réaction augmente la concentration du complexe enzyme-substrat (ES) et par conséquence la vitesse de la réaction. Cette vitesse V, dépend de la concentration totale de l'enzyme $[E]_0$:

$$V=k[E]_0$$

Avec k une constante de proportionnalité [14].

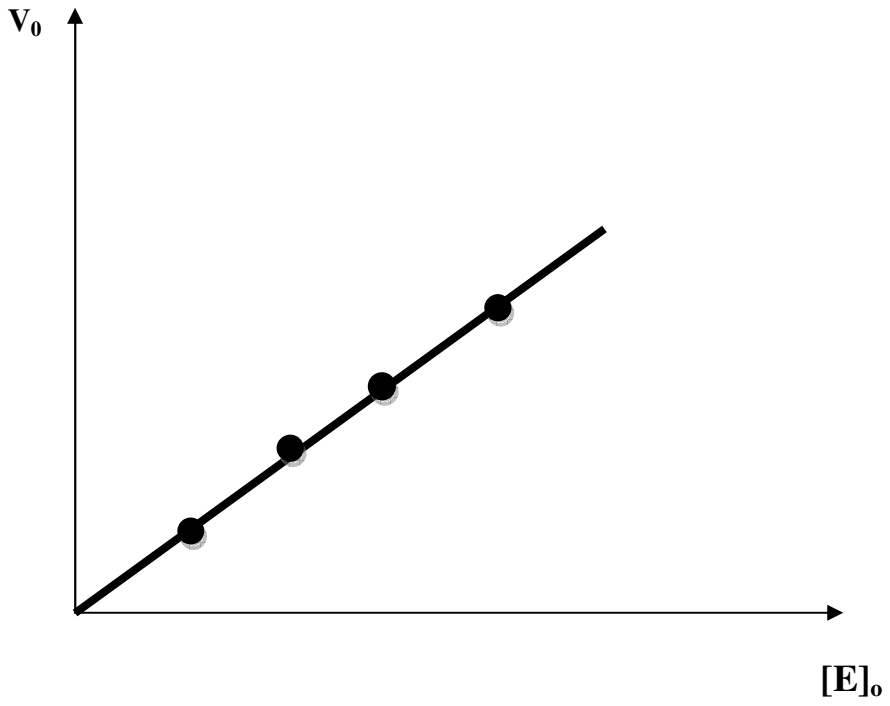


Fig. I.7 : influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique [10].

I.8.4. Effecteurs chimiques

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

- **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'enzyme 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.

- **Activateurs**

Les activateurs sont 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. [15,16].

II. Généralités sur les lipases

II.1. définition

Les lipases sont des hydrolases d'esters carboxyliques capables d'hydrolyser les lipides riches en triglycérides à longue chaines d'acides gras en glycérol et en acides gras correspondants. Cette activité a conduit au choix du terme triacylglycérole acy-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'a 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 proc [17,18].

En plus de leur capacité d'hydrolyse les graisses, les lipases peuvent catalyser bon nombre de réaction allant de l'hydrolyse a 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 et que ces biocatalyseur ne nécessitent pas la présence d'un coenzyme contrairement à beaucoup d'autres [19,17].

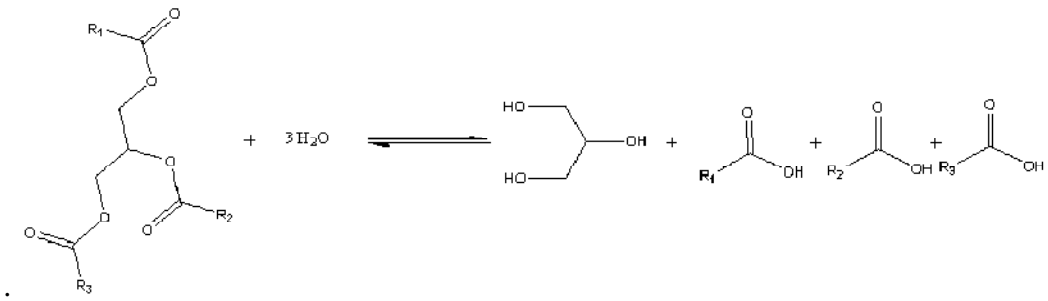


Fig.II.1. Réaction d'hydrolyse complète de triglycérides (TG) par une lipase non-sélective dans un milieu aqueux

II.2. Origine et classification des lipases

Les lipases sont largement répondues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal ; chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez des nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires [20] [21].

II.2.1. Lipase végétales

Les lipases sont largement répondues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (*oil bodies*). Sous l'action de lipase ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante [21].

Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes. Le premier groupe est Constitué par les triacylglycérols hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de l'altération des graines pendant le stockage. Les constituants du second groupe, dénommés acylhydrolases, sont présents dans divers tissus de la plante. Ces enzymes présenctent peu de spécificité pour leur substrat ; elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides mais elles peuvent catalyser certaines réactions de transestérification. Les principales acylhydrolases sont les phospholipases A et B ; les glycolipases, les sulfo-lipases et les mono-glycérides lipases.

Le troisième groupe est constitué par les phospholipases C et D [22].

Les lipases végétales interviennent également dans le métabolisme, le réarrangement et la dégradation de la chlorophylle lors de la croissance et de la sénescence des feuilles ainsi que dans le processus de mûrissement des fruits. Par exemple, les chlorophylases (chlorophylle-chlorophylido hydrolases), présentes dans la membrane des thylakoïdes des chloroplastes, interviennent dans le catabolisme de la chlorophylle. Chez les plantes supérieures, les lipases interviennent dans la biosynthèse de transducteur intervenant dans les mécanismes de régulation ou de défense contre une variété de pathogènes**.** En effet, les oxylipines octadécanoïques telles que l'acide jasmonique sont synthétisées à partir d'acides gras, notamment d'acide alpha- linolénique, en présence de lipases membranaires. Certaines protéines végétales possédant une activité lipolytique peuvent avoir un effet cytotoxique pour les cellules animales. Par exemple, la ricin, une glycoprotéine isolée de la graine de *Ricinus communis*, induit le blocage de la synthèse des protéines par inactivation des ribosomes. Leur étude a permis leur utilisation comme immunotoxines dans le traitement de certains cancers [21].

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. Par exemple, la lipase des graines de colza (*Brassica napus*), obtenue par simple homogénéisation de graine 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 [22] [23].

II.2.2. Lipase de mammifères

Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes :

Le premier est constitué par les lipases associées a la digestion, telles que les lipases lingual, pharyngal, gastrique et pancréatique.

Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la langue, les fois et les tissus adipeux.

Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel [23].

Les lipases de mammifères les plus étudiées sont les lipases liées a 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 [21].

II.2.3. 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'accroitre au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'application qu'elles offrent dans des domaines très variés.

Les lipases microbiennes présentes une grande stabilité vis-à-vis de température, des détergents et des enzymes protéolytique [23]. Elles sont produites par fermentation en présence de substrats inducteurs tels que les acides gras. Selon leur excrétion exo- ou endocellulaire, les lipases sont séparés plus ou moins facilement par différentes méthodes.

Le tableau suivant illustre quelques espèces microbiennes productrices de lipase

Tableau II.1 : quelques espèces microbiennes productrices de lipase.

Espèce	Substrat inducteur	Mode de séparation	Références
Yarrowia lipolytica	Acide oléique	Une centrifugation (2min, 3700rpm, 4°C) permet de récupérer le surnageant de culture	[60,61]
Saccharomyces cerevisiae	Galactose		[62]
Burkhlderia cepacia	Isopropyl-béta-thio-galactosise		[63]
Candida antartica A	méthanol	Le surnagent obtenue par centrifugation a 4°C a été filtré pour récupérer la lipase	[64]
Bacillus sp	blé	Le surnagent obtenu par centrifugation a 10000rpm a été purifié par la solution de sulfate d'ammonium afin d'obtenir une précipite (l'enzyme)	[65]

II.2.4. les cutinases

Les cutinases sont des enzymes produites par différents champignons pathogènes et phytopathogènes tels que *Fusarium solani,* qui est l agent responsable de la formation de mycétome chez l homme ou tels que *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici* qui est responsable de la pourriture de la racine et du collet chez de tomate et certaines céréales. Elles sont des enzymes qui peuvent être apparentées aux lipases et estérases à la différence qu elles ne nécessitent pas d activation interfaciale pour être efficaces. Comme elles sont actives aussi bien en solution moléculaire vraie qu'en système bi phasique, les cutinases sont en quelque sorte le lien entre estérases et lipases [31] [21].

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 chaînes Des acides gras avec une efficacité comparable à celle de lipase pancréatique [32].

II.3. spécificités des lipases

II.3.1. Régiosélectivité envers les triglycérides

C'est la spécificité d'une lipase pour l'hydrolyse préférentielle des fonctions esters à une position donnée du triglycéride. La lipase pancréatique humaine (HPL), la lipase pancréatique porcine (PPL) et la lipase de *Rhizopus arrhizus* (RAL) sont ainsi régiosélectives vis-à-vis des esters d'alcools primaires en position *sn*-1 et *sn*-3 des triglycérides, tandis que seule la lipase A de *Candida antartica* a montré une préférence pour la position *sn*-2. Par contre, d'autres lipases hydrolysent indifféremment toutes les liaisons ester au sein de la molécule de TG, ne faisant pas de discrimination entre leurs positions dans la molécule. Ce sont par exemple les lipases de *Penicillium expansum* (Stocklein et al, 1993), de *Pseudomonas cepacia* et de *Candida rugosa.*

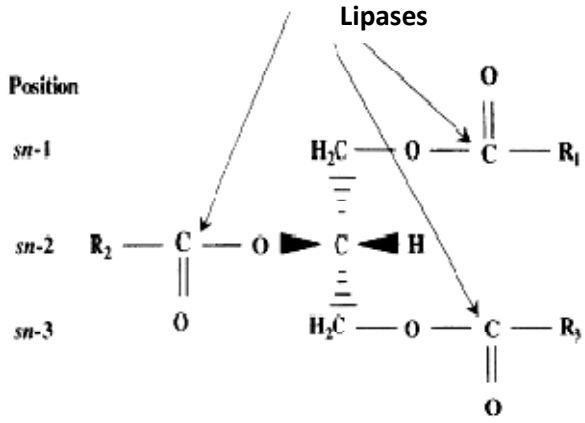


Fig. II.2 : identification des liaisons esters potentiellement hydrolysable par les lipases [33].

II.3.2. chimio sélectivité

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

La chimio sélectivité et la cinétique de la réaction sont amplement influencées par les conditions acido-basiques du milieu réactionnel [34].

II.3.3. stéréo-sélectivité

Elle est définie par la sélectivité observée en fonction de la longueur des chaines carbonées, du degré d'insaturation de l'ester hydrolysé. La stéréo-sélectivité est souvent reliée à la topologie du site actif [35].

II.3.4. Enantio-sélectivité

L'énantion-sélectivité se définit comme la spécificité d'une enzyme pour un substrat en fonction de sa stéréo chimie. Des études récentes illustrent parfaitement la capacité des lipases à catalyser la N-acylation énantio-sélective de molécules aminées a centre chiraux. Ces propriétés d'énantio-sélectivité seraient dues à une conformation tridimensionnelle particulière des résidus aminés catalytiques de leur site actif [36].

II.4. caractéristiques structurelles des lipases

C'est au début des années 1980 que les premières lipases et estérases ont été purifiées et caractérisées au point de vue biochimique [37].

Les lipases sont des enzymes très variables de par leurs origines et leurs spécificités de substrats. Les plus petites ont des masses moléculaires de 20-25 KDa tandis que les plus grosses ont des masses moléculaires de 60-65 KDa. Les premières structures cristallographiques publiées ont été celles de lipases du champignon filamenteux *Rhizomucor miehei* et de lipase pancréatique humaine [21][38].

Bien que les séquences peptidiques montrent très peu des similitudes entre elles, principalement en raison de l'hétérogénéité de leur origine, les lipases présentent dans l'ensemble la même structure tridimensionnelle [21].

II.4.1. Les α/β hydrolases

Le repliement α / β est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases mais également l'acétylcholine estérase, la carboxypeptidase, la dièneIactone hydrolase, l' haloalkane déhalogénase. Ces enzymes ont tous en commun un domaine structural central typique formé par 8 brins connectés par 6 hélices formant un repliement dit α/β hydrolases (Figure. II.3).

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

Le site catalytique des lipases est constitué d'une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique (Asp, Glu) dont l'ordre d'apparition dans la séquence primaire est : Ser Asp / glu-His [39] [40].

De plus, la sérine catalytique est généralement incluse dans la penta peptide Gly-X1-Ser-X2-Gly où X1 et X2 représentent un acide aminé variable. Ce penta peptide est, en général, la seule portion de séquence peptidique conservée chez les lipases. La sérine catalytique est toujours située dans un coude nucléophile situé à l'extrémité C- terminale du 5ème brin et immédiatement suivi d une hélice. L'histidine de la triade catalytique est située à l extrémité carboxyle-terminale du dernier brin de feuillet constituant le repliement / tandis que l acide carboxylique est généralement situé à l'extrémité du 7ème brin, sauf pour la lipase pancréatique où il est situé à l extrémité du 6ème brin [40][21].

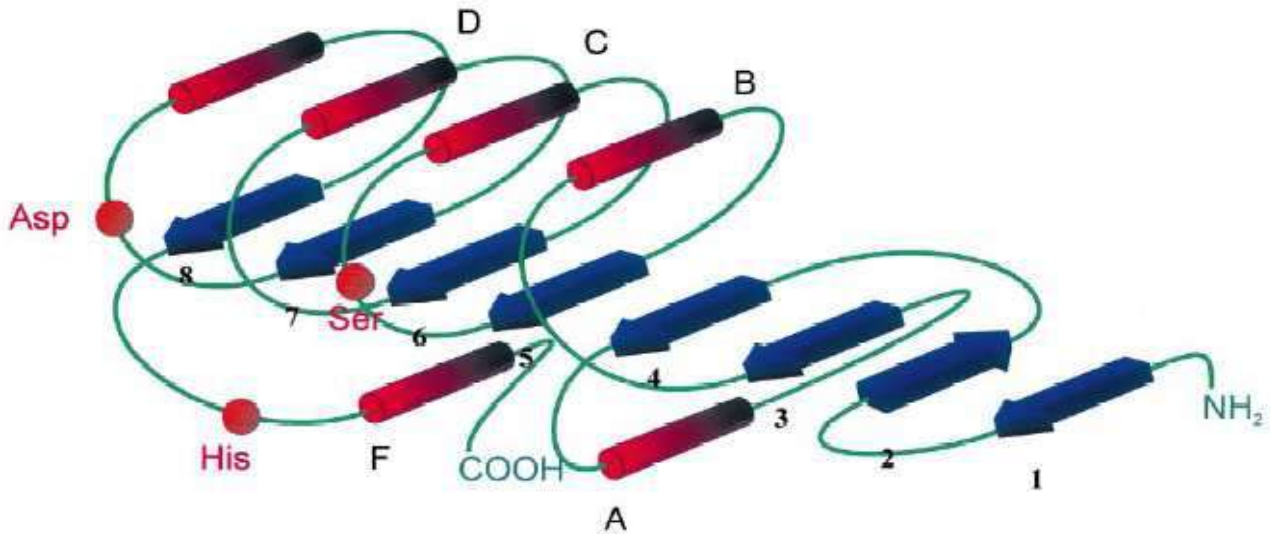


Fig. II.3: schéma Les α/β hydrolases

II.4.2. La triade catalytique

Le site catalytique apparait 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 5 la serine catalytique se situe au centre d'un pentapeptide consensus Gly-X-Ser-X-Gly (GXSXG), ou`les résidus X correspondent a des acides aminés quelconques. Cette structure permet a

la serine d'être d'une part proche de l'histidine catalytique et d'autre part bien positionnée pour l'attaque nucléophile du substrat [27, 41].

Récemment une autre famille de lipase a été mise en évidence : la famille « GDSL » ou` la serine catalytique est placée dans la séquence consensus GDSL. Par exemple, les lipases de *brassica napus* (navet) appartiennent à cette famille [42].

II.4.3. 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 formes d'émulsion, de micelles. Elles agissent alors a l'interface eau /lipide et leur activité est liée a la présence de cette interface. On parle alors de phénomène d'activation interfaciale [43]

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 [44, 45]. En absence d'interface, une très faible activité est observée. On suppose que volet cacherait alors le site actif (FigII.4.).

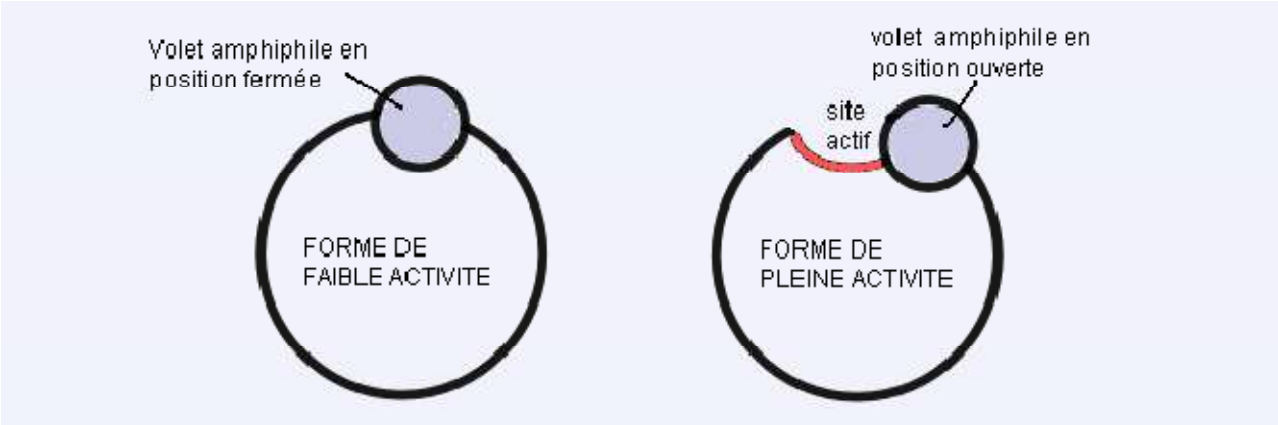


Fig. II.4. : Représentation schématique des deux conformations d'une lipase.

La présence d'un volet amphiphile a été démontrée par les études cristallographiques de plusieurs lipases (fig. II.5). Cependant, certaines lipases ne suivent pas strictement cette règle. Par exemple, la lipase B de *Candida antartica* 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 [27].

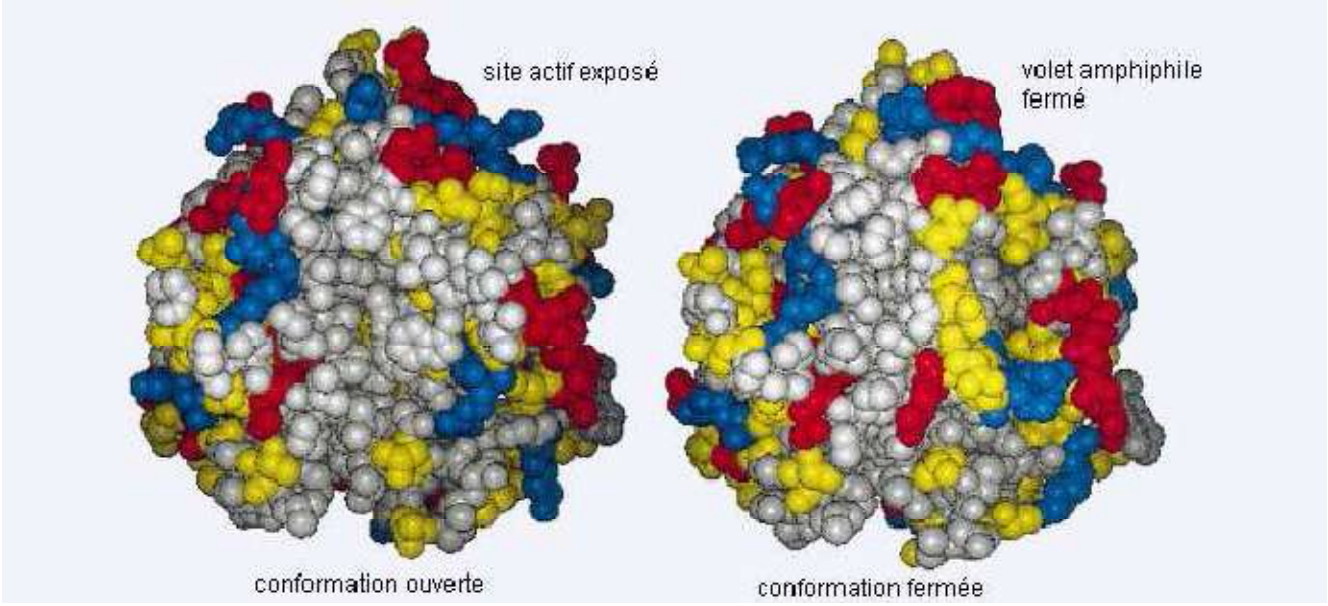


Fig. II.5. Représentation moléculaire des deux conformations de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* d'après Svendsen, 2000**.**

II.4.4. trou oxyanion

Le trou oxyanion est constitué de deux acides aminés dont les groupements amides stabilisent l'état de transition du substrat en forment 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 spécifique a chaines carbonées courtes tandis que les lipases de type GX sont spécifique des substrats a chaines carbonées moyennes et longues [43].

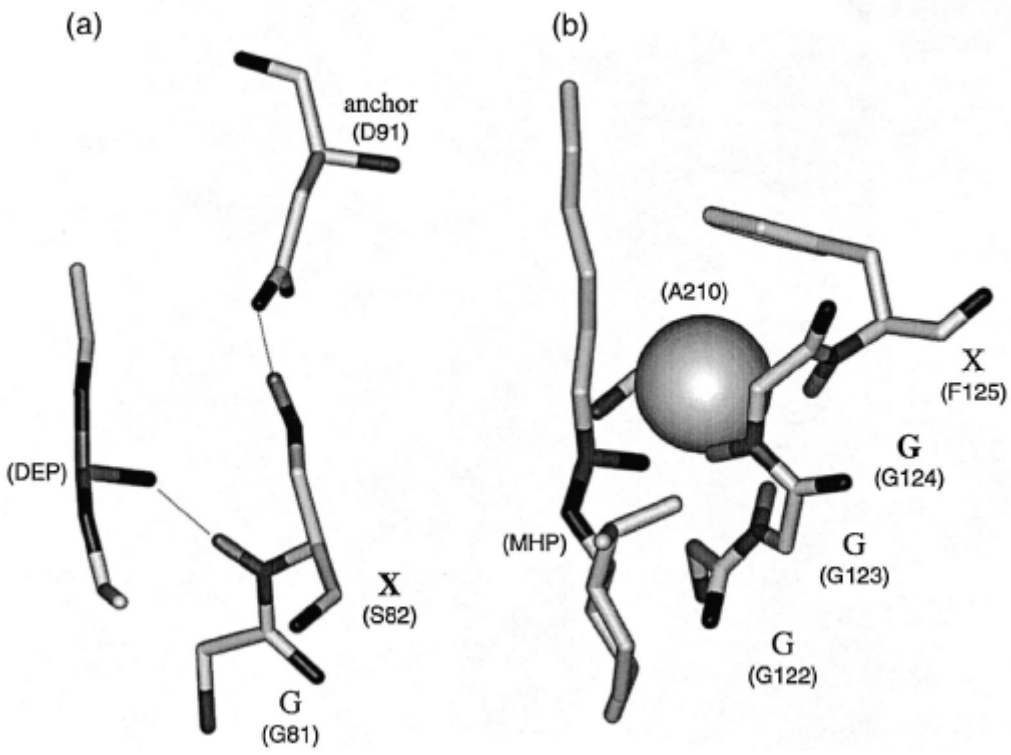
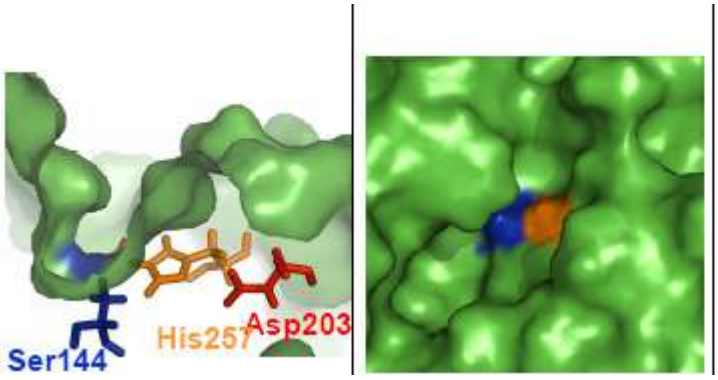


Fig.II.6. Deux types de trous d'oxyanions. (**a**) Type de GX dans R. miehei (entrée PDB 4TGL):phosphonate de diéthyle stabilisée par des liaisons hydrogène avec Leu145 et Ser82. (**b**) Type G GG X en C. lipase rugosa (APB d'entrée 1 LPM): (1R) méthyl phosphonate hexyle stabilisé par des liaisons hydrogène avec Gly124 et Ala 210. Substrat est représenté en noir et de l'hydrogèneobligations sont schématisées par des traits pointillés.

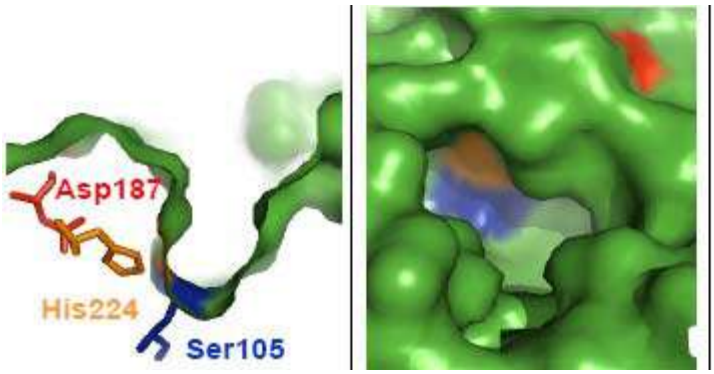
II.4.5. Arrimage du substrat dans le site actif

La cristallisation des lipases en présence et absence d'analogues d'états de transition a permis d'identifier les sites actifs ainsi que de les classer en trois sous-groupes par rapport a la topographie et a la fixation de la partie alcool(acyle –R-C=O) et acides des esters(alkyle OR).

- En forme de crevasse hydrophobe. Située à la surface de la protéine (*Rhizomucor et Rhizopus*).



- En forme d'entonnoir (*Borkholderia cepacia, candida antarica* B).



- En forme de tunnel (*Candida rugosa*).

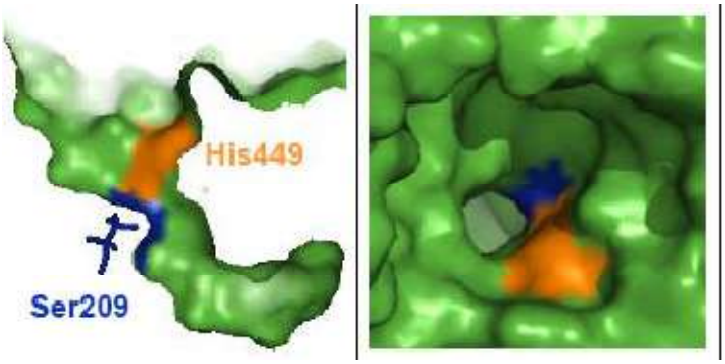


Fig. II.7. Trois topologies de site actif de lipase.Les acides aminés de la triade catalytique sont colorés (Ser catalytique: bleu, Asp ou Glu: rouge et His: orange)

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 [47]. Trois topologie ont été proposées par pleiss et coll dont les vues de coté et de dessus sont représentées en figure II.7. La spécificité de longueur de chaine est attribuée à la longueur et aux propriétés du site de fixation de la partie acyle [48].

II.5. Mécanisme d'action :

Le mécanisme d'action des lipases est identique à celui des protéases à serine qui à été dés les années 60. Le mécanisme de catalyse fait appel à une sérine particulièrement réactive, située au sien du site actif. La serine 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 II.8 montre les différentes étapes de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique [27].

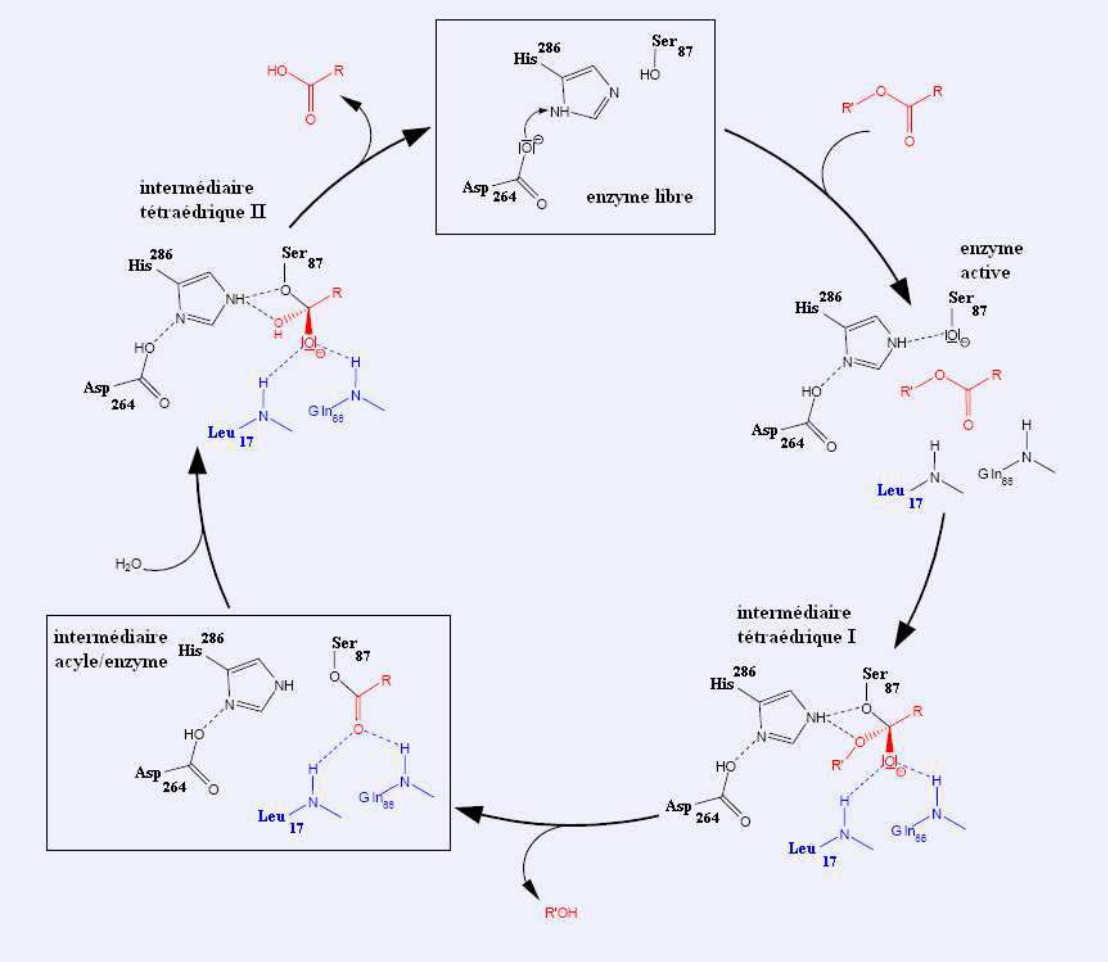


Fig. II.8 : Schématisation de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique [49].

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 II.8). Il se forme ensuite un intermédiaire tétraédrique portant une charge négative sur l'oxygène (figure II.8 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 II.8 C).le groupement acyle resté lié à l'enzyme, formant l'intermédiaire acyle/enzyme, subit ensuite l'attaque de molécules d'eau (figure II.8D). 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 II.8E) [27]

II.6. Réactions catalysées par les lipases

Les lipases peuvent catalyser un grand nombre de réactions allant de l'hydrolyse à l'estérification sans oublier les réactions d'alcoolyse et d'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 réactions, les rendent intéressantes du point de vue industriel [21] [50].

Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse tel que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acyle d'un ester sur d'autres, nucléophiles tels que des amines ou des thiols [51].

II.6.1 Réaction d'hydrolyse

L'hydrolyse de triglycérides en acides gras et en glycérol constitue une réaction importante dans les processus industriels des huiles naturelles et des graisses.

L'hydrolyse permet la production d'acides gras pouvant être convertis en alcool gras, ou employés dans des réactions d estérification ou de transestérification [52] [53].

II.6.2 Réaction de synthèse

En plus de leur fonction naturelle d'hydrolyse, les lipases possèdent également la capacité de synthétiser des esters : la quantité d'eau du milieu détermine le type de la réaction favorisée. Dans les réactions d estérification à l'aide de biocatalyseurs, l'eau est un produit de la réaction. A partir d'une certaine teneur, elle affecte l'équilibre de la réaction entraînant la réaction inverse : l'hydrolyse [54] [55].

II.6.2.1 La transestérification :

La transestérification comprend trois réactions qui sont: interestérification, alcoolyse et acidolyse. Elle implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolyse) ou avec le glycérol (glycérolyse) [50] [56].

A) Interestérification :

Lors de la réaction d interestérification un groupe acyle est transféré à un acide gras (Acidolyse) ou à un ester d'acide gras [54]. 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 cardio- vasculaires. 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 industries de répondre à la demande des consommateurs en produits plus sains [57] [51]. L'utilisation des solvants en interestérification nécessite une désodorisation du produit final, en revanche l interestérification enzymatique réalisée en absence de solvants organiques, est une très bonne alternative. De plus l utilisation de lipases spécifiques des positions sn 1 et sn 3 des triglycérides, permet d obtenir des produits avec des caractéristiques qui ne pourraient pas être obtenues par interestérification chimique [56].

B) Alcoolyse : C est une réaction d'un ester avec un alcool monovalent tel que l'éthanol et butanol ou un alcool polyvalent tel que la glycérine pour produire un ester avec des différents groupes d alkyl [51].

c) Acidolyse : C est une réaction d'un ester avec un acide qui mène à un changement de groupe acyle (un groupe acyle est transféré à un acide gras) [58].

Hydrolyse :

$RCOOR + H_2O \longrightarrow R\,COOH + R\,OH$

Synthèse:

-Estérification:

RCOOH + R OH ⟶ RCOOR + H2O

-Interestérification

R1COOR 1 + R2COOR 2 ⟶ R1COOR 2 + R2COOR 1

-Alcoolyse:

R1COOR 1 + R2OH ⟶ R1COOR 2 + R1 OH

- Acidolyse:

R1COOR 1 + R2COOH ⟶ R1COOR2 + R1 COOH

Fig. II.9 : Réactions catalysées par les lipases [57] [58].

II.7. les principales méthodes d'extraction et de purification utilisées à grande échelle

II.7.1 méthodes d'extraction.

L'extraction a pour but de libérer les enzymes des cellules ou structure subcellulaire au sein des quelles ils se trouvent, il est donc nécessaire de détruire selon le cas, la paroi la membrane cellulaire et les structures subcellulaires par des procédés physiques ou chimiques suffisamment efficaces sans pourtant être trop dénaturants, cette extraction doit se faire à froid, en présence de substance protégeant l'activité enzymatique.

Les méthodes utilisées peuvent être classés en méthodes physiques ou chimiques indiquées par leur ordre décroissant de leurs conformités

1- Utilisation d'abrasifs.
2- Extraction homogénéisation à haute Pression (liquide shear).
3- choc osmotique.
4- traitement alcalin
5- emploi de détergents
6- extraction par décomposition en milieu Solide.
7-lyse enzymatique.
8- sonication
9- Extraction par les solvants organiques.

II.7.2 Méthodes de purification

La purification quand elle est réalisée sur le milieu d'extraction clarifié (enzyme endocellulaire) ou le liquide obtenu après élimination des micro-organisme (enzyme exo cellulaire).

Les méthodes employées sont celles utilisées pour la purification des protéines on peut distinguer

-les méthodes par précipitation → par sels.
→ Changement de la composition chimique du milieu.

-les méthodes par chromatographie → en batch
→ En colonne

- L'extraction liquide-liquide (cours de bio séparation)

II.8. Application industrielle de lipase

Les lipases catalysent les réactions d'hydrolyse des huiles et graisses, mais aussi les réactions de bioconversion de ces substrats. Elles sont utilisées dans différents procédés industriels comme l'industrie des détergents, le traitement des déchets, l'industrie laitière, l'alimentation humaine et animale, la modification des huiles et corps gras. Contrairement aux lipases commercialisées actuellement, majoritairement d'origine microbienne, la production de lipases végétales ne demanderait aucunement l'intervention d'organismes génétiquement modifiés. L'origine végétale de l'enzyme, inexistante sur le marché actuel, garanti naturellement que ces lipases sont dépourvues d'agents pathogènes pour les animaux tels que les virus ou les prions. Cette origine ouvrirait de plus la voie à de nouvelles possibilités dans le secteur agro-alimentaire ou cosmétique.

II.8.1 Applications dans les détergents

Les taches d'huile et de graisse ont toujours été difficiles à enlever. Souvent, on n y parvenait qu'en cuisant le linge. Mais bon nombre de textiles modernes doivent être lavés à températures modérées, ce qui rend la tâche plus ardue encore. Les lipases apportent une aide précieuse dans ce domaine. Leur utilisation dans les détergents (Lessives ménagères) est le champ d application le plus important des lipases [47:48].

Elles sont capables, en effet, de fragmenter en petites particules les taches de graisse, par exemple de rouge à lèvre, de beurre, d'huile et des produits de beauté. Le bain de lessive pourra ensuite évacuer ces particules [49] [50].

II.8.2. Applications en bioremédiation

Les milieux aquatiques d'eau douce ou d'eau salée, ainsi que les sols, sont fréquemment contaminés par les huiles minérales. Ces contaminations constituent un problème environnemental et écologique majeur [48].

Les lipases sont utilisées en environnement et en bioremédiation. Les effluents des industries agroalimentaires sont souvent riches en lipides et en graisses, ce qui peut entraîner le colmatage des canalisations. L'addition de lipases ou la culture dans ces effluents, permet d en réduire la charge en lipide. Les lipases sont également utilisées lors de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures. La bioremédiation est devenue la méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués [51] [52].

II.8.3. Applications dans l industrie agro-alimentaire

Un grand nombre d'applications hydrolytiques additionnelles ont été décrites pour les lipases microbiennes, y compris le développement de saveur pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques, chocolat du lait et bonbons), réalisé par l'hydrolyse sélective de gros triglycérides pour libérer des acides gras ; ceux-ci peuvent agir en tant que saveurs ou précurseurs de saveur [48]. Dans l industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie,

en biscuiterie, en chocolaterie et dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Elles interviennent dans la maturation des fromages et de certaines charcuteries (saucissons, salamis) [52].

Un des domaines d'application concerne le développement des arômes par les lipases exogènes (lipase pré-gastrique ou microbienne) qui accélèrent le développement d'arômes lors de la maturation de fromages. L hydrolyse de la matière grasse conduit, en fonction de la spécificité de l enzyme utilisé, à la libération d acides gras à courte chaîne (C4-C6) ou à plus longue chaîne (C12-C14), ce qui donne des arômes plus au moins forts au produit. Les lipases sont également utilisées dans l'interestérification d'huile et de graisses pour produire des acylglycérols modifiés, impossibles à obtenir par des procédés de synthèse chimique conventionnels [49] [50].

II.8.4 Les lipases en industries cosmétique

Dans l industrie des cosmétiques et de la parfumerie, les lipases sont utilisées dans la synthèse d'arôme soit par réactions de transestérification comme pour le 3,7-dimethyl-4,7-octadien-1-ol qui présentent un arôme de rose ou soit par estérification directe. En effet, de nombreux esters de faibles masses moléculaires tels que l acétate d éthyle, l acétate d isoamyle sont des constituants d'arôme.

Ils sont obtenus à partir de l'alcool et de l'acide correspondant en système non aqueux en présence de lipases de *C. antarctica o*u de *R. miehei* sous forme immobilisée. Les rétinoïdes (vitamine A et dérivés) sont de grand potentiel commercial dans les produits de beauté et de médicaments tels que produits du soin de la peau. Les dérivés du rétinol solubles dans l'eau ont été préparés par réaction catalytique de lipase immobilisée [21] [52].

II.8.5 Application médicinale et pharmaceutique

Les lipases sont largement mises en œuvre dans l industrie pharmaceutique pour la synthèse des médicaments ou dans la préparation d'intermédiaire homochiral optiquement actif. C'est le cas de la nikkomycin-B, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, de certains agents antimoraux, de certains antibiotiques ou vitamines. Par exemple, le naproxène est un anti-inflammatoire non stéroïdien dont l'énantiomère (S) est 28 fois plus actif que

L'énantiomère [21].

Les Lipases de *Candida rugosa* ont été utilisées pour synthétiser lovastatin, une drogue qui diminue le taux de cholestérol du sérum. L'hydrolyse asymétrique de 3-phenylglycidic ester acide qui est une clef intermédiaire dans la synthèse d'hydrochloride du diltiazem, une vasodilatateur coronaire largement utilisé, a été emportée avec *S. marcescens* [52].

Les lipases de *Burkholderia plantarii* et de *Serratia marcescens sont* utilisées aussi pour la production de (2R, 3S)-3-(4-méthoxyphényle) méthyle glycidate employés dans la synthèse d'un antagoniste du calcium: le Diltiazem TM [47][53].

II.8.6. Production de polymères biodégradables

Lipases peut être utilisé comme biocatalyseur dans la production des composés biodégradables utiles. L'oléate du butyle a été produit par estérification direct de butanol et

D'acide oléique pour diminuer la viscosité de biodiesel dans l usage hivernal. Les esters Trimethylol propane ont aussi été synthétisés de la même façon comme lubrifiants. Lipases

peut catalyser des synthèses d'ester et des trans-estérifications. Les polyesters aromatiques peuvent être synthétisés par des biocatalyseurs de lipases [49] [21] [52].

Tableau II.3 : Application industrielle de lipase

Domaine d'application	**Action principale**	**Utilisation**
Alimentation : **-**laiterie et boulangerie. -Brasserie. -boucherie, poissonnerie. -Huilerie.	-Hydrolyse des lipides. -Hydrolyse des lipides. -Hydrolyse des lipides. -Inter estérification des huiles naturelles.	-Modification de la saveur et conservation. -modification de l arôme et accélération de la fermentation. -Développement de la saveur et l'élimination de l'excès de graisse -Formulation des huiles, margarines et beurres.
Chimie fine : -Corps gras. -chimie analytique. -détergents ; dépollution. -cosmétique.	-Hydrolyse. -Estérification -Hydrolyse des lipides. -Hydrolyse des lipides. -Hydrolyse des lipides	-Production d acides gras, mono et diglycérides. -Production d'esters et résolution de mélanges racémiques. -Dosage des glycérides et analyse de la distribution des acides gras. -Elimination des tâches, traitement des eaux grasses et dégraissage des cuirs. -Elimination de graisses et formulation.

Médecine et pharmacie	-Hydrolyse des lipides	-Traitement d insuffisance pancréatique (malabsorption des graisses). -Analyse des triglycérides plasmatiques. -Synthèse stéréospécifique de produits pharmacologiquement actifs.

III.1. LA SOURCE DE 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 d'origine végétale, à partir de graines de ricin, *Ricinus communis.*

Le ricin est une plante originaire du Nord-est africain et du Moyen-Orient. Après s'être répandue vers l'Inde et la Chine, elle envahit l'Amérique au 16e siècle. Grâce à l'extrême viabilité de ses graines qui germent facilement dans une grande variété de sols, elle a pu s'acclimater spontanément aux régions tropicales et subtropicales du monde entier. De type arbuste, elle possède de longues feuilles palmées qui ressemblent un peu à des doigts et des graines en forme de fèves contenues dans des capsules épineuses assemblées en grappes.

De couleurs et de motifs variés, les graines de ricin sont également très jolies et très populaires dans un type de bijouterie fantaisie produite dans les Caraïbes. Malheureusement, cela les rend également très appétissantes, ce qui leur a valu d'être à l'origine de l'empoisonnement de jeunes enfants ayant sucé ou mangé les billes faites à partir de ces graines. Car le ricin contient également une toxine très dangereuse : la ricine.



III.2. Substrat

La réaction d'hydrolyse des lipides a été choisie comme réaction type pour la caractérisation de l'enzyme de ricin. L'huile d'olive commerciale composée d'environ 99 % de lipides a été choisie comme substrat principal de cette réaction. Le 1 % restant constitue les composés mineurs ; il s'agit essentiellement d'antioxydants, de composés phénoliques et de Squalènes.

La matière grasse de l'huile d'olive est composée de triglycérides qui contient une quantité particulièrement élevée d'acides gras mono insaturés qui représentent 80 % de son contenu en lipides [59].

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

- point de fumée : 210 °C
- densité : 0,92 $g.cm^{-3}$
- apport calorique : 900 kcal pour 100 grammes ;
- conservation : l'huile d'olive rancit moins vite grâce à son indice d'iode peu élevé. Elle se conserve mieux si elle est stockée au frais et protégée de la lumière. Il est préférable de la consommer dans les deux années suivant sa fabrication.
- Masse molaire moyenne : 278,6 g/mole [48].

III.3. Extraction de la lipase brute

Des graines de ricin (83 g) épluchées ont été broyées à l'aide d'un mortier dans 250ml d'eau distillé, le broyat obtenu est filtré à l'aide d'une bande à gaze.

Les étapes de broyage, de filtration d'extrait enzymatique sont représentées sur le schéma I.1. :

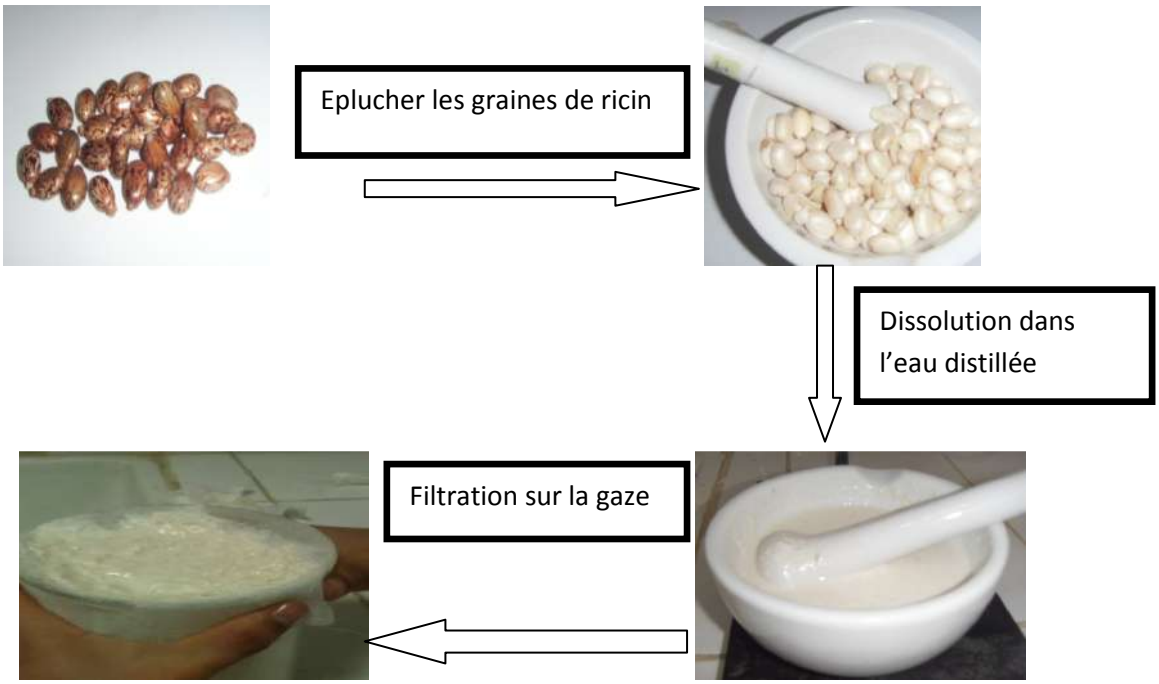


Fig.III.1. Protocole d'extraction et préparation de l'extrait enzymatique brut de la lipase de graines de Ricin

III.4. Purification partielle de la lipase

L'extrait brut obtenu sera purifié pour isoler l'enzyme et éliminer les composants qui peuvent être des agents de contamination ou d'altération (lipides, protéines, sels minéraux….). La précipitation avec les solvants organiques parmi les méthodes qui sont simples dans leur mise en œuvre et qui sont largement utilisées pour la séparation des protéines et des enzymes. L'acétone a été choisie comme un agent de précipitation puisque il est relativement peu couteux et est disponible sous une forme pure avec peu de contamination qui peut inhiber ou empoisonner l'enzyme. La méthode de précipitation à décrite dans plusieurs travaux [60, 61, 62].

II.4.1. Mode opératoire :

La purification de l'enzyme a été réalisée à 4°C comme suit [63]: trois volumes d'acétone glacial sont versés goutte à goutte dans un volume de l'extrait brut disposé sous agitation dans la glace pilée. Une fois l'acétone est versé totalement, le mélange (extrait brute -acétone) est laissé dans le réfrigérateur à 4°C 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).

Les étapes de purification sont récapitulées dans la figure II.2 :



Après 2 heures dans le frigo il se forme un précipité



Centrifugation à 3000 rpm, pendant 10 min





Séchage à l'air libre

(Température ambiante)



L'enzyme après séchage

Fig. III.2 : Etapes de purification de la lipase de graines de Ricin par précipitation à l'acétone.

III.4.2. Mesure de l'activité enzymatique

La caractérisation des systèmes enzymatiques repose sur la mesure de l'activité enzymatique qui a été préalablement définie dans la partie théorique.

III.4.2.1. Mode opératoire

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- Dans un erlenmeyer de 250 ml introduire :

  - 0,5 $Cacl_2$ (0,02 M)

  - 3 ml solution tampon pH 7

  - 5 ml d'émulsion d'huile d'olive (préparer a l'aide d'un homogénéisateur par l'ajout de l'huile d'olive dans la solution de la gomme arabique, le mélange est agité 4 fois 1 minute en s'arrêt 30 secondes entre deux agitations successives pour éviter l'échauffement de l'émulsion)
- Déclencher la minuterie après l'injection de 1 ml de l'extrait enzymatique
- Après 30 min, stopper la réaction en ajoutant 5 ml d'un mélange acétone/éthanol (vol/vol)
- Ajouter quelques goutes d'indicateur coloré (phénolphtaléine)
- Titrer le milieu avec une solution de NaoH (0,05 M)

  L'activité enzymatique sera déterminée par la relation suivante :

$$\mathbf{AE= (V_e – V_t). c. 1000/ t. V_E} \qquad \mathbf{(1)}$$

Avec :

AE : activité enzymatique UI/ml.

V_e : volume de NaoH avec catalyseur (ml).

V_t : volume de NaoH sans catalyseur (ml).

C : concentration de NaoH (M).

V_E : volume de l'extrait enzymatique (ml).

t : temps de réaction (min).

III.4.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Tout le long de la procédure de purification il faut déterminer des paramètres précis pour vérifier si notre procédure est adéquate:

- Volume de la solution
- Concentration protéique
- Activité enzymatique

Ces trois paramètres nous permettrons de calculer:

- Activité spécifique
- Activité totale
- Facteur de purification
- Le rendement

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines. Des comparaisons entre ces méthodes sont disponibles (Davis, 1988). Le choix dépend des besoins et des caractéristiques recherchées: fiabilité, sensibilité, rapidité, taille des échantillons, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage, présence de substances interférentes dans l'échantillon.

La teneur en protéine dans l'enzyme a été déterminée par la méthode de Bradford [60], en utilisant l'albumine comme standard. La technique de Bradford utilise la fixation de bleu de coomassie sur les protéines. Ce colorant existe sous trois formes : une forme anionique colorie en bleu (λ=590nm), une forme cationique rouge (λ=470nm), et une forme neutre (λ=650nm). C'est la forme anionique qui se fixerait préférentiellement aux protéine grâce à des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des protéines.

Gamme d'étalonnage :

Réaliser une gamme d'étalon de 0 à 100 mg/l de protéine a partir d'une solution mère de 100 mg/l.

Les solutions enzymatique (brut et partiellement purifies sont diluées pour se situer dans la gamme).

Tableau III.1 : la méthode de Bradford.

	0 mg/l	25mg/l	50mg/l	75mg/l	100mg/l	X_{Eb}	X_{EEPP}
NaoH	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl
Réactif	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
Vétalon	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl

Après la mesure de DO a λ=590nm de chaque échantillon nous avons tracé la courbe d'étalonnage.

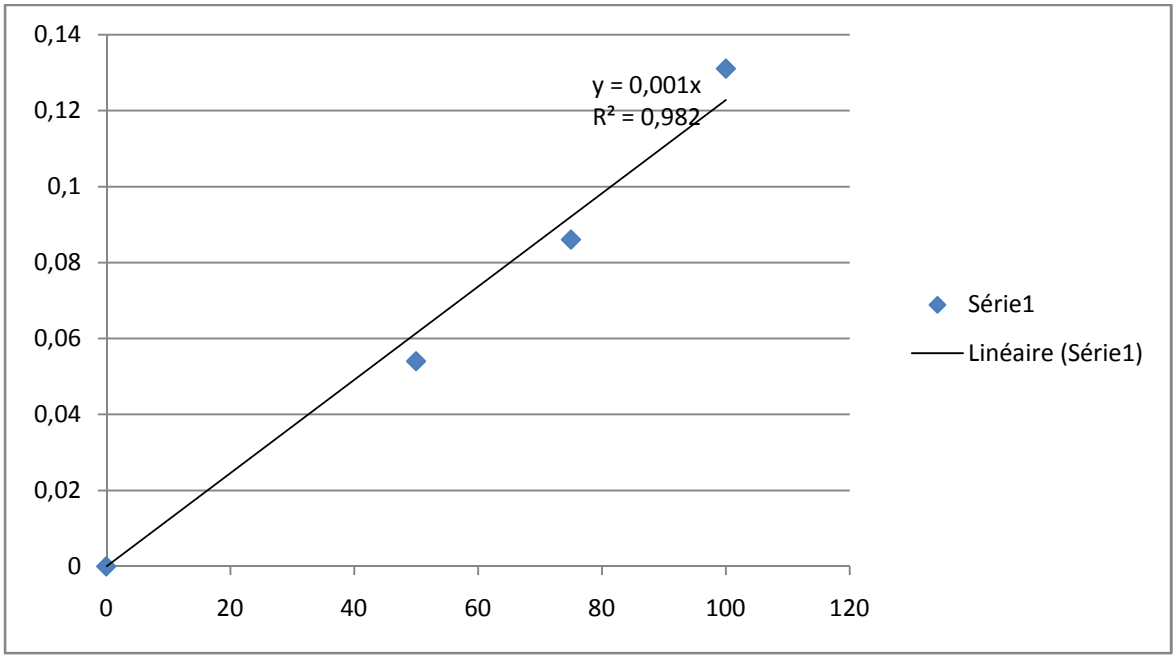


Fig. III.3. Courbe d'étalonnage de l'albumine par la méthode de Bradford

III.4.4 Résultat et discussion :

Le tableau III.1. Sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification. Il fait appel à des notions et à des termes précis : le facteur de purification et le rendement.

Tableau III.2 : caractéristiques des préparations enzymatiques de l'EEB et l'EEPP de la lipase de *Ricinus communis*.

	Volume totale(ml)	Concentration de protéines (mg/l)	Activité (µmol /min.ml)	Activité Spécifique (UI/mg protéine)	Activité totale (µmol/min)	Facteur de purificatio n	Rendement de purification (%)
Eb	225	60,83	8,16	134,14	1836	1	-
EEPP	215	17	6,00	352,94	1290	2,63	73,52

Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport à la première étape) durant chacune des autres étapes de la procédure.

La purification a justement pour but d'obtenir une enzyme de plus en plus pure, ayant donc une activité spécifique de plus en plus élevée. Notre EEB a une activité spécifique de 134,14 UI/mg. Suite à la purification, la quantité de notre protéine non active diminue d'où l'augmentation de l'activité spécifique qui devient 352,94. Par contre l'activité enzymatique est diminue avec une perte de 26,5% et le facteur de purification d'EEPP est triple par rapport à l'EEB

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 à 73,52% puisqu'il est inévitable qu'on ait des pertes de matériel durant l'étape de purification.

Une purification est donc un ''compromis'' entre le désir d'obtenir une protéine la plus pure possible (facteur de purification élève) et une quantité maximale (rendement élevé). En effet, chaque étape supplémentaire, qui permet d'augmenter la pureté, cause des pertes de matériel, donc diminue le rendement.

III.5. Caractérisation de l'EEPP de la lipase de *Ricinus communis*

Afin de garantir la mise en œuvre optimale du pouvoir catalytique des enzymes, il est impératif d'étudier son comportement sous différentes conditions opératoires. Par la suite, il sera possible de rassembler les conditions optimales donnant l'activité maximale pour la réalisation du procédé enzymatique et obtenir ainsi le rendement optimal et la vitesse maximale pour une réaction donnée. Pour cela, une étude classique a été menée sur les effets de différents paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique de la lipase semi-purifiée de *Ricinus communis,* en choisissant comme réaction typique l'hydrolyse de l'huile d'olive. Les paramètres étudiés sont : La température, le pH, la concentration en substrat, la présence des effecteurs. Un seul paramètre est changé à la fois et sa valeur optimale sera maintenue pour la suite des expériences.

III.5.1. Effet de température sur l'activité enzymatique :

Examinons maintenant l'effet de la température du milieu sur la réaction enzymatique qui s'y déroule.

III.5.1.1 Mode opératoire :

L'activité de la lipase a été déterminée pour différentes températures comme suit :

- Préparer les milieux réactionnels dans 6 erlenmeyer (le même protocole de préparation précédemment) dont la concentration d'enzyme est 0.4 g/10ml de solution tampon pH 7
- Préparer les mêmes milieux réactionnels sans catalyseur (les témoins)
- Mettre les erlenmeyer dans les étuves à température constante (20, 30,40 ,50 ,60 et 70 °C) pendant 30 min.
- stopper la réaction en ajoutant 5 ml d'un mélange acétone/éthanol (vol/vol)
- Mesurer l'activité enzymatique pour chaque température.

III.5.1.2. Résultats et discussion

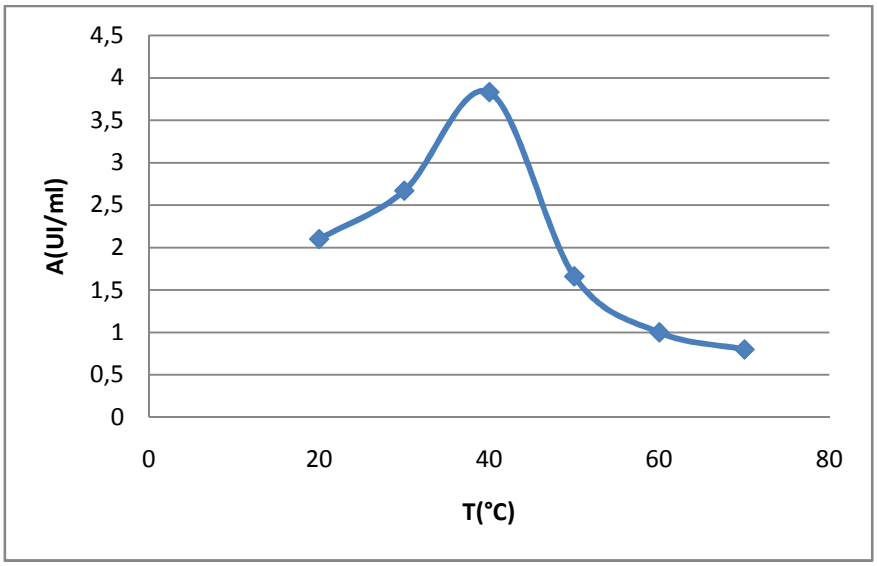


Fig. III.4 : Effet de température sur l'activité enzymatique de la lipase de ricin (pH 7).

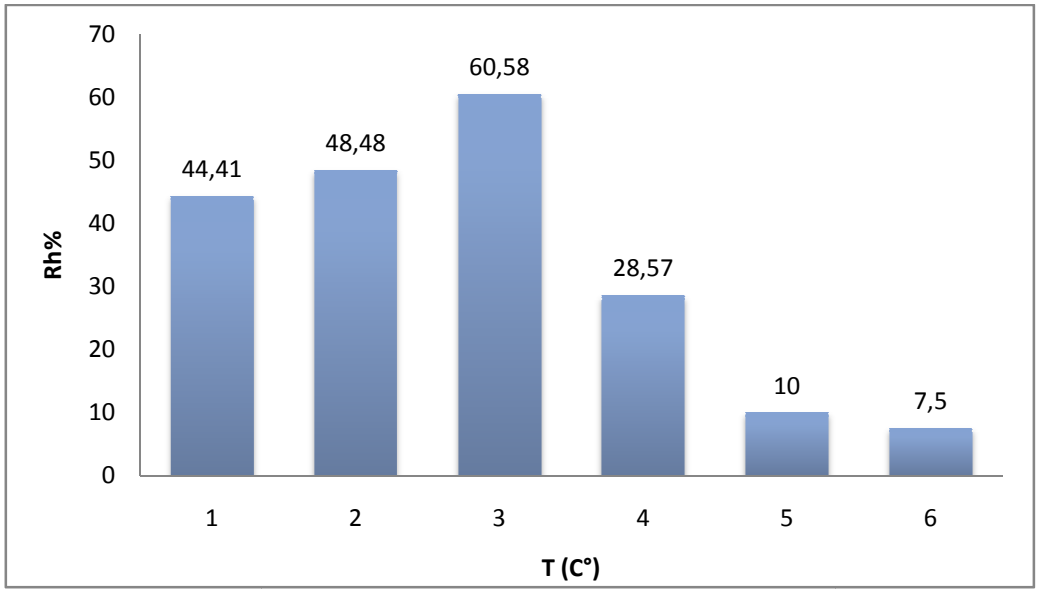


Fig.III.5. Effet de température sur le rendement d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin (pH7)

La figure (III.5) Représente la variation de l'activité enzymatique (A) en fonction de la température (T). L'activité enzymatique de la lipase augmente avec la température jusqu'à atteindre son maximum (3,86UI/ml) à la température optimale 40°C. Au-delà de cette valeur, l'activité décroit considérablement de plus de 50% pour une augmentation de 10°C seulement. Pour des températures entre 50 et 70°C, l'activité enzymatique est faible (0,83UI/ml).

La vitesse enzymatique augmente avec la température puisque l'interaction entre l'enzyme et son substrat devient plus importante à forte température. Cependant, au-delà d'une certaine valeur de température la lipase étant une protéine, sa structure sera altérée. A températures élevées, la protéine se dénature et perd donc une partie de son activité enzymatique. L'activité enzymatique sera donc la résultante de la variation de la vitesse de la réaction enzymatique et du pourcentage de dénaturation de l'enzyme en fonction de la température. Ainsi, l'activité enzymatique augmente jusqu'à une température optimale puis diminue pour atteindre une activité faible à des températures élevées.

Les valeurs optimales peuvent être comparées à celles obtenues avec d'autres lipases végétales pour *Jatropha curcas*, *Triticum aestivum*, *Brassica napus* (37°C) ou bien avec la lipase de *Cucumis melo* (31-40°C) (Sonali Seth et al. 2014).

III.5.2. Effet de pH sur l'activité enzymatique de la lipase:

III.5.2.1. Mode opératoire :

- Préparer une gamme de 5 erlenmeyer, contenant le mélange réactionnel de la réaction d'hydrolyse dans une solution tampon de pH 3 à 9. à température ambiante et sous agitation constante 200 rpm.
- Déclencher la minuterie après l'injection de 1 ml de l'extrait enzymatique
- Préparer une même gamme qui contient la même composition de milieu réactionnel sans enzyme
- Après 30 min ajouter 5 ml de solution d'arrêt (éthanol/acétone)
- Titrer avec la solution NaOH (0,05 M)
- Mesurer l'activité enzymatique pour chaque pH.

III.5.2.2. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure III.6.

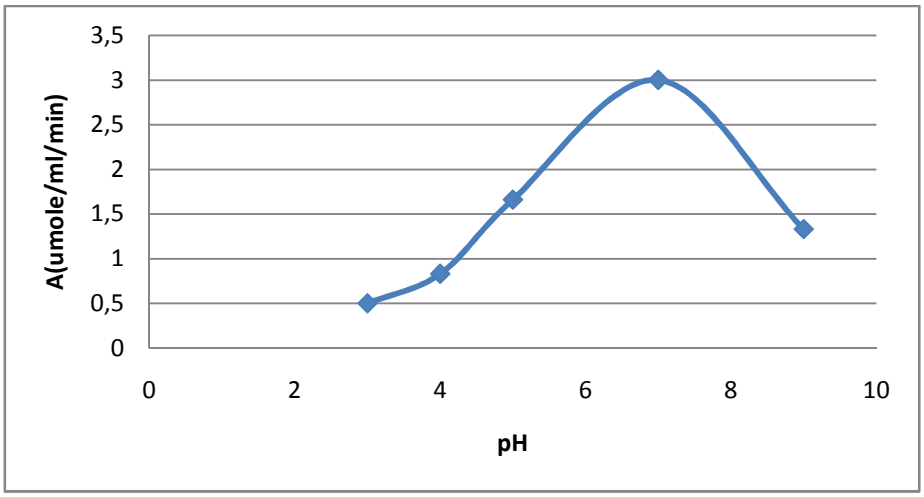


Fig. III.6 : Effet de pH sur l'activité enzymatique de la lipase de *Ricinus communis*

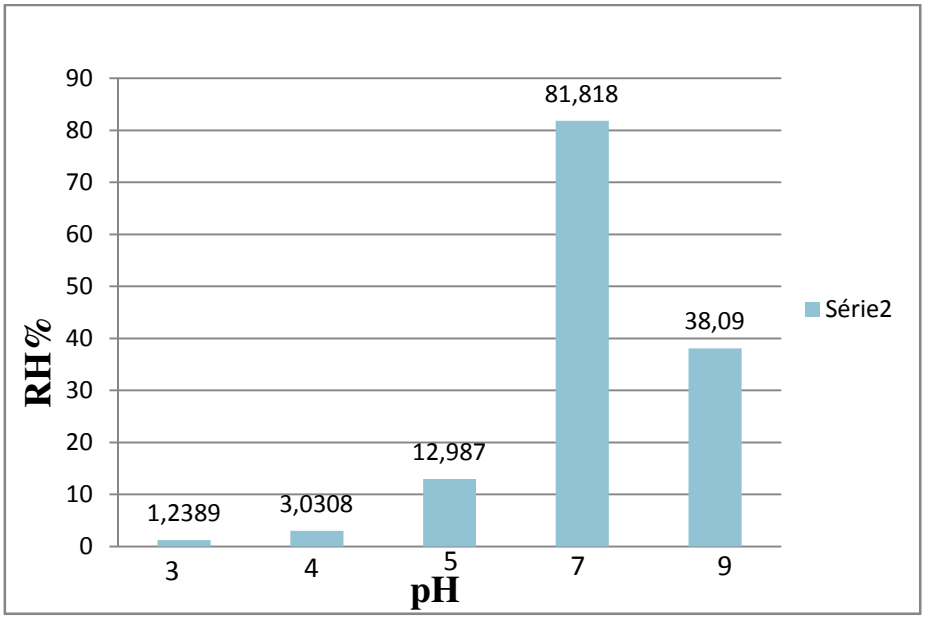


Fig.III.7. Effet de pH sur le rendement d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin

L'activité enzymatique est très dépendante du pH. En général une enzyme possède une zone de pH optimum où son activité est maximale. De part et d'autre de cette zone, plus ou moins étroite, l'enzyme est progressivement inactivée.

A pH optimale, lipase possède une conformation bien déterminée qui va lui conférer son activité. Lorsque le pH varie, la structure de l'enzyme varie et donc son activité diminue. Ainsi, d'après le graphe de l'activité enzymatique en fonction du pH, nous constatons que cette activité augmente pour atteindre une valeur maximale au pH optimale (pH 7), ensuite elle diminue pour atteindre une activité égale à zéro à forte pH.

Le pH intervient de deux manières différentes : soit en modifiant la structure secondaire ou tertiaire de l'enzyme, soit en modifiant les charges électriques des radicaux des acides aminés du site actif. La lipase de *Ricinus communis* par son pH optimal se rapproche des valeurs optimales de pH des lipases de nombreux végétaux telles que *Jatropha cucas* et *Brassica napus* (pH 7.5)(Sonali Seth. et al, 2014). Le pH optimal du son de riz est par contre basique (pH 11) (Kanchan Bhardwaj, et al, 2001).

III.5.3 Effet des effecteurs sur l'activité enzymatique :

Le substrat et l'enzyme, les ions, les coenzymes et l'énergie sont les facteurs indispensables à la réaction enzymatique. Les autres molécules qui entrent en liaison avec l'enzyme, les

ligands, peuvent avoir un effet positif ou négatif. Ils peuvent favoriser ou au contraire contrarier le déroulement de la réaction.

III.5.3.1. Mode opératoire :

Quelques produits chimiques organiques et inorganiques seront testés pour leurs effets sur l'activité enzymatique de la lipase.

- préparer les milieux réactionnels suivant la même manière réalisée précédemment a pH 7
- ajouter les effecteurs à une concentration constante 1mM.
- Incuber à température ambiante sous agitation 200 rpm
- Après 30 minutes ajouter 5 ml solution d'arrêt acétone- éthanol (vol/vol)
- Mesurer l'activité enzymatique

III.5.3.2. Résultat et discussion :

Le tableau III.1. Représente les taux d'inhibitions (τ_i) et d'activation (τ_a) qui sont calculés respectivement par les formules suivantes :

$$\tau_i\ (\%) = 100\ [A_{\text{avec activateur}} - A_{\text{sans activateur}}] / A_{\text{avec activateur}} \qquad (2)$$

$$\tau_a\ (\%) = 100\ [A_{\text{sans inhibiteur}} - A_{\text{avec inhibiteur}}] / A_{\text{sans inhibiteur}} \qquad (3)$$

Dont A : activité lipasique (µmol/min)

Tableau III.3 : valeurs de taux d'activation et d'inhibition de la lipase de *Ricinus communis* par différents Composés chimiques

Effecteurs	Taux d'activation (%)	Taux d'inhibition (%)
$Mgcl_2$	24,92	--
$Zncl_2$	18,83	--
$FeSO_4$	--	70
Urée	--	68
CTAB	--	28,75
SDS	--	43,88

D'après les résultats reportés dans le tableau III.2 et par comparaison entre l'activité enzymatique en absence et en présence de l'effecteur, on constate que les effecteurs choisis ont un effet significatif sur l'activité lipasique.

Le $MgCl_2$ et le $ZnCl_2$ jouent le rôle d'activateurs. Une activation de 24,92% et 18% ont été signalée respectivement. Ces deux composés peuvent donc figurer dans les formulations contenant la lipase de ricin afin d'augmenter son activité. En contradiction avec le résultat trouvé pour la lipase de ricin, le Zn^{2+} est un inhibiteur pour la lipase de *Brassica napus* (Sonali seth, et al 2014), et la lipase bactérienne de *Bacillus subtilis Pa2* (Shah K R, et al 2011). Le Mg^{2+} est un activateur pour nombreuses lipases végétales comme la lipase de *Jatropha curcas* (Sonali seth, et al 2014).

Par ailleurs, le degré d'inhibition des autres substances peut être illustré par ordre de classement décroissant comme suit : $FeSO_4$ > Urée > SDS > CTAB. Ces composés ont provoqué une inhibition partielle de l'enzyme. Ceci, parce que ces substances 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. Les concentrations des composés étudiés doivent être minimisées afin de ne pas altérer l'effet catalytique de la lipase. A titre comparatif, le SDS inhibe de plus de 50% la lipase de son de riz (Kanchan Bhardwaj, et al 2015)

III.5.4. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité enzymatique :

Parmi les paramètres ayant une influence sur l'activité enzymatique c'est la concentration d'enzyme.

III.5.4.1 mode opératoire :

- dissoudre 0,8g d'enzyme dans 100ml de solution tampon
- préparer les milieux réactionnels suivant la même méthode précédemment décrite.
- Ajouter un volume de la solution enzymatique 0.2 à 2 mL.
- Incuber à température ambiante pendant 30 minutes sous agitation permanente 200 rpm
- Arrêter la réaction à l'aide du mélange acétone/Ethanol.
- mesurer l'activité enzymatique

III.5.4.2 Résultat et discussion :

La figure III.8. Présente la variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration d'enzyme dans le milieu.

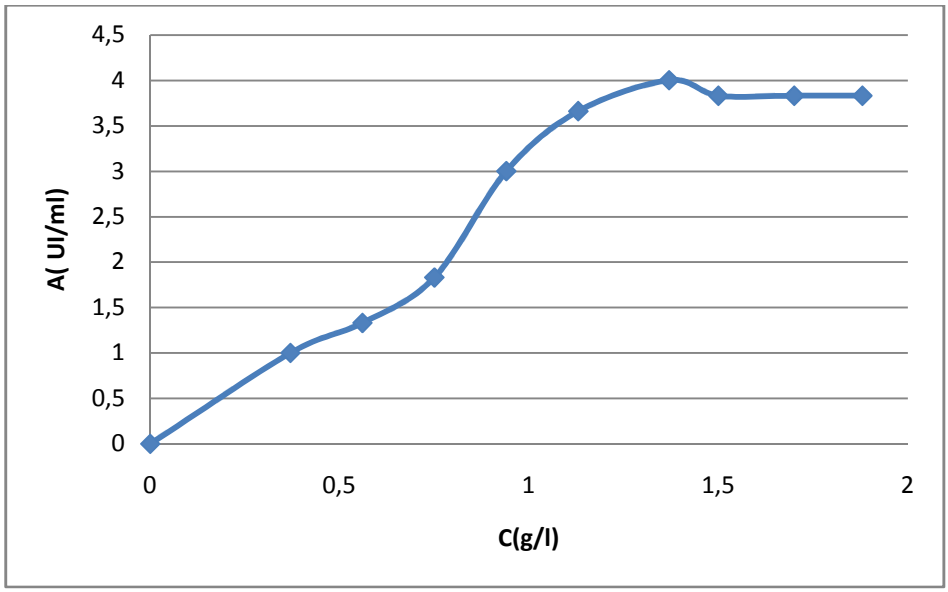


Fig.III.8. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité enzymatique de la lipase de *Ricinus communis*.

Les résultats enregistrés dans la figure (III.8) suggèrent que :

Pour une concentration fixe de substrat, la courbe est une allure hyperbolique. On constate d'abord d'une augmentation linéaire de l'activité en fonction de concentration d'enzyme.

Dans un premier temps chaque molécule de lipase va se lier à une molécule de substrat (formation d'un complexe enzyme-substrat).

L'effet catalytique de l'enzyme transforme alors le complexe enzyme-substrat en complexe enzyme-produit.

A certain concentration la courbe tend vers un plateau ce comportement résulte d'un effet de saturation, le système est saturé par l'enzyme même si la concentration d'enzyme augmente. La totalité des molécules de substrat est hydrolysée par l'enzyme. Donc le milieu ne contient que l'enzyme-produit (acides gras libres).

III.5.5. l'effet de substrat et l'étude cinétique de la lipase :

Examinons à nouveau l'évolution de la réaction lorsqu'on change cette fois-ci la concentration du substrat, l'huile d'olive. Les mesures de la masse des acides gras libres en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat variées.

Les constantes du modèle Michaelis-Menten (Vmax, Km) ont été déterminées en mesurant la vitesse initiale à différentes concentrations d'huile d'olive (g/l).

III.5.5.1. mode opératoire :

- préparer une gamme des émulsions de l'huile d'olive de concentrations (22.288 ,27.86 ,83.58 ,111.44 ,167.16) (g/l)
- Préparer les milieux réactionnels
  - 3ml solution tampon pH 7
  - 0,5ml $Cacl_2$
- ajouter 5ml de chaque émulsion dans les milieux réactionnels.
- Déclencher la minuterie âpres l'injection d'un 1ml d'extrait enzymatique (0,8g/100ml solution tampon).
- Incuber a température ambiante sous agitation permanant 200 rpm
- Ajouter 5 ml de mélange acétone-éthanol
- Mesurer l'activité enzymatique.

III.5.5.2. Résultat et discussion :

La figure III.9 représente le développement de la mase des acides gras libre en fonction de temps pour chaque concentration (22.288 ,27.86 ,83.58 ,111.44 ,167.16) (g/l).

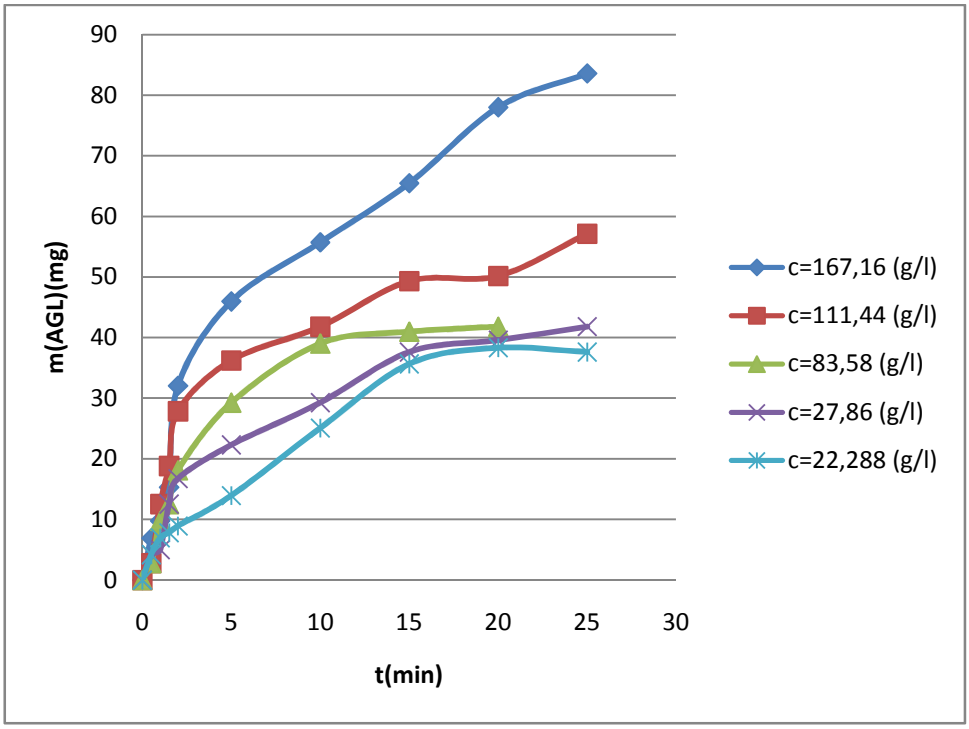


Fig.III.9. Cinétique d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin à différentes concentrations initiales (pH 7, Température ambiante).

Les mesures de la masse des acides gras libres en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat. Lorsque la concentration du substrat est grande la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration du substrat est petite

Pour déterminer les vitesses initiales en calculant la différence de la masse des acides gras libres au cours d'un temps donné, pour chaque concentration du substrat.

Après la détermination des valeurs de V_0, nous traçons le graphe de V_0 en fonction du substrat [s].

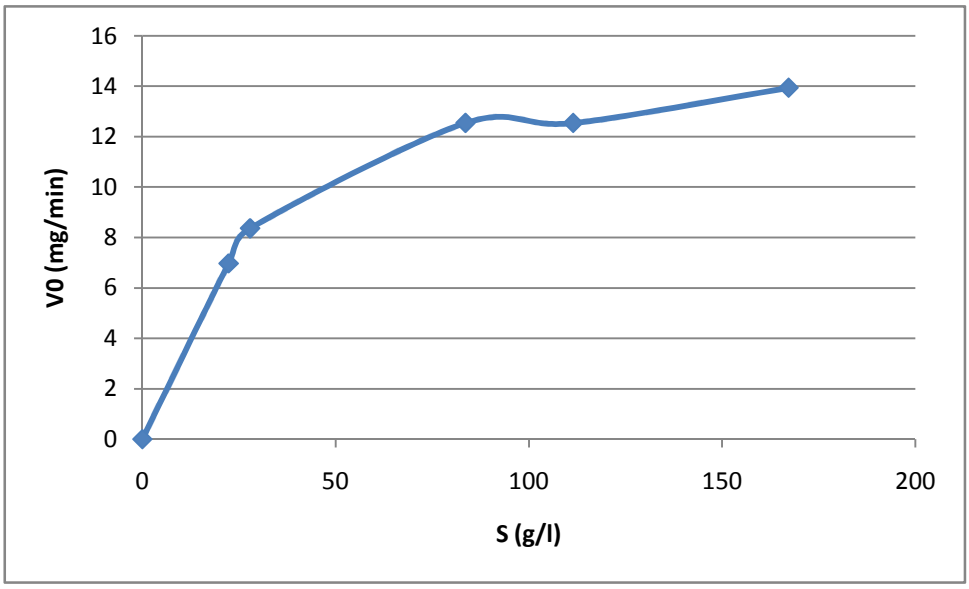


Fig.III.10. Représentation graphique de Michaelis-Menten de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin (pH7 ; Température ambiante)

Dans la figure (III.10), nous avons présenté la variation la vitesse de la réaction d'hydrolyse en fonction de différentes concentrations de l'huile d'olive (substrat). On constate d'abord une augmentation rapide de la vitesse enzymatique pour une faible concentration de l'huile d'olive, mais si la concentration augmente, la courbe tend vers un plateau. Pour les valeurs élevées de [S], il y'a plus d'augmentation de la vitesse, laquelle tend asymptotiquement vers une valeur maximale Vmax.

Par la méthode de linéarisation de Lineweaver-Burke ; il a été possible de déterminer les valeurs des constantes Vmax et Km (figure III.11)

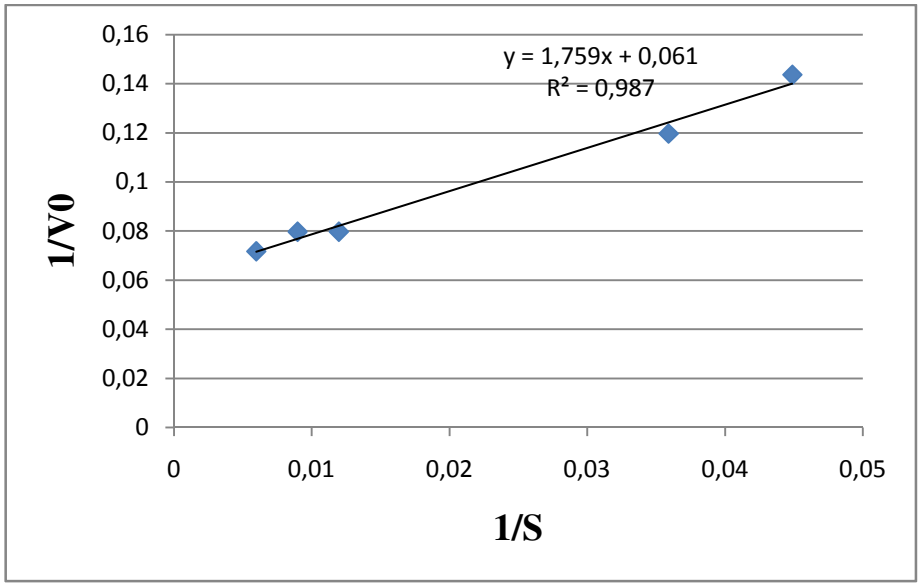


Fig.III.11. Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité enzymatique de la lipase

Le graphe (fig.III.11) représentant la fonction linéaire de 1/V en fonction de 1/[S] est appelé graphe en double inverse (représentation de Lineweaver et Burk) puisque les deux variables de l'hyperbole Vmax et Km peuvent être déterminés expérimentalement en mesurant la vitesse à différentes concentrations de substrat et en exprimant les résultats en inverses des vitesses initiales en fonction des inverses des concentrations du substrat. Cette méthode permet de déterminer par extrapolation les valeurs des paramètres cinétiques (Vmax et Km) de la réaction enzymatique. Par la projection de la ligne droite sur l'axe des abscisses, nous avons trouvé que la valeur de Km est égale à 28,85 (g/l) et la valeur de Vmax est égale à 16,39 (mg/min). A partir de ces résultats nous avons déduit que la lipase montre une bonne affinité pour ce substrat (huile d'olive).

III.5.6. Stabilité thermique de la lipase de *Ricinus communis*:

C'est l'étude de la variation de l'activité catalytique de l'enzyme sous l'effet dénaturant de la température élevée au cours du temps.

III.5.6.1. Mode opératoire :

- Le protocole opératoire appliqué pour la détermination de l'effet de température sera appliqué sur différentes mélanges réactionnels à pH optimal à températures constantes (40, 50, 60 et 70°C) pendant 120 min.
- A des intervalles de temps réguliers (15 minutes), l'activité enzymatique de chaque solution est mesurée.

III.5.6.1 Résultat et discussion :

Les résultats obtenus sont représentées sur le graphe suivant:

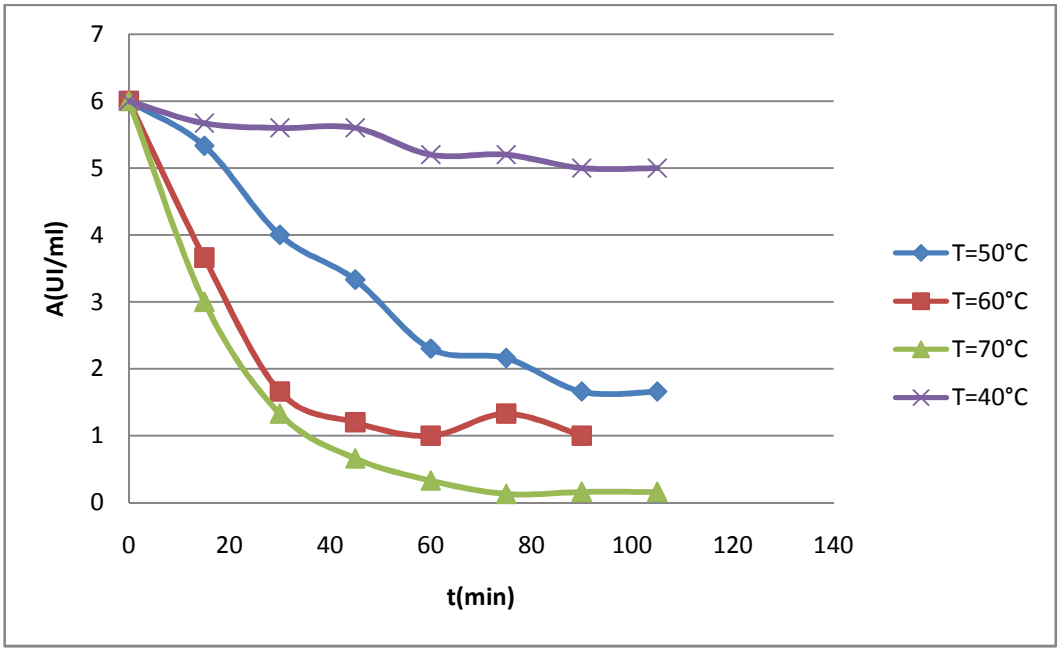


Fig.III.12. Stabilité thermique de la lipase de *Ricinus communis* à différentes températures.

La figure III.12 représente la variation de l'activité de la lipase en fonction de temps qui correspond à la thermo stabilité pendant 120 min. Les résultats de la stabilité thermique de la lipase indiquent que cette enzyme est instable à des températures élevées.

La lipase est stable à 40°C retient 83,33% pendant 2 heures mais elle est rapidement inactivée lorsqu'elle incubée à des températures supérieures à 40°C. Son incubation à 50°C et à 60°C pendant 30 à 60 min. a engendré des pertes d'activité enzymatique de 67 à 72%, et de 60,83 à 83,4% respectivement.

La lipase a conservé 37 % de son activité originale après incubation à 50°C pendant 75 min et 17,6% pour 60°C. En revanche, elle est complètement inactivée à 70°C pendant cette période.

L'inactivation thermique de la lipase est due à la dénaturation des protéines (de sa structure secondaire et tertiaire). On déduit que la lipase montre une thermo stabilité à température (40°C) et sensible au phénomène de dénaturation à des températures supérieures à 40°C.
La lipase de grains d'amande est stable de 20 a 90 C° (yesim hesloglu et lalecan Baskrt 2008).
L'étude de stabilité thermique permet de suivre l'évolution d'une réaction avec la température (la détermination de l'énergie de désactivation). Dans la zone de température où lipase se

dégrade (température supérieure à 40°C). La vitesse est alors de plus en plus faible quand la température augmente.

III.5.7. Détermination de l'énergie d'activation :

L'énergie d'activation c'est l'énergie minimale qu'il faut fournir aux réactifs pour déclencher la réaction chimique. L'énergie d'activation est fondamentale dans toutes les réactions biochimiques. Sans les enzymes (qui baissent l'énergie d'activation) la vie ne pourrait exister.

La plupart des réactions sont plus rapides lorsque la température s'élève. Par conséquent si la température augmente, la constante de vitesse augmente. C'est le scientifique suédois Svente Arrhénius (1859-1927) prix Nobel de chimie en 1903 qui a proposé une loi qui rend compte de ce phénomène.

Cette relation appelée loi d'Arrhénius est la suivante :

$$k = A\, e^{-E/RT} \qquad (2)$$

k : constante de vitesse (s^{-1})

E : Energie d'activation (joule)

A : facteur de fréquence

R : la constante des gaz parfait (8,314 J $K^{-1}mol^{-1}$)

T : la température en Kelvin

D'où

$$\ln k = \ln A - (Ea / RT) \qquad (3)$$

Le graphe d'Arrhénius est un graphe de Ln k en fonction de 1/T. Si le graphe est une droite, on dit alors que la réaction suit la loi d'Arrhénius dans le domaine de température étudié. La pente de cette droite (-Ea/R) permet alors de calculer l'énergie d'activation de la réaction.

Par analogie, la dénaturation ou la désactivation partielle de l'enzyme sous l'effet de la température peut être modélisée avec une loi similaire en considérant que c'est une réaction d'ordre 1 par rapport à l'activité enzymatique.

La vitesse de perte V_D (désactivation ou dénaturation) de l'activité enzymatique AE sera donc égale à :

$$V_D = -\frac{d[AE]}{dt} = k\,[AE] \qquad (4)$$

k : constante de désactivation ou de dénaturation (s^{-1}). C'est une fonction de la température d'après la loi d'Arrhenius.

D'où après intégration on obtient : $\ln \frac{[AE]}{[AE]_o} = -k\,t$ (5)

Où : [AE]= activité (UI/mL) à t et [AE]o : activité initiale à t=0

II.5.7.1. Résultat et discussion :

Les résultats des tracés ln [A]/ $[A_0]$= f(t) pour chacune des températures à partir de la température optimale 40°C jusqu'à 70°C, sont représentés sur la figure III.13

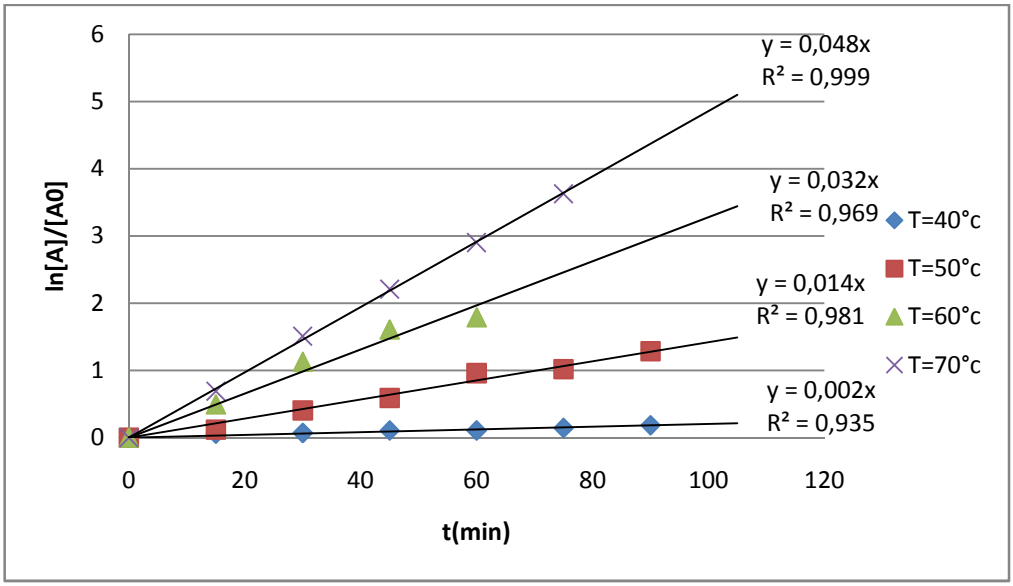


Fig III.13. Détermination de la constante de vitesse de dénaturation de la lipase de ricin

A partir les graphes de figure (III.13) nous avons tiré les valeurs de k en fonction de la température sont illustrées sur le tableau (III.4).

Tableau III. 4. valeurs de la constante de vitesse de dénaturation de la lipase de ricin en fonction de la température

T (°C)	40	50	60	70
k (min^{-1})	0,002	0,0142	0,328	0 ,485

A partir du tableau (III.4) le tracé (ln k) en fonction 1/T est établi et l'énergie de désactivations est déterminée.

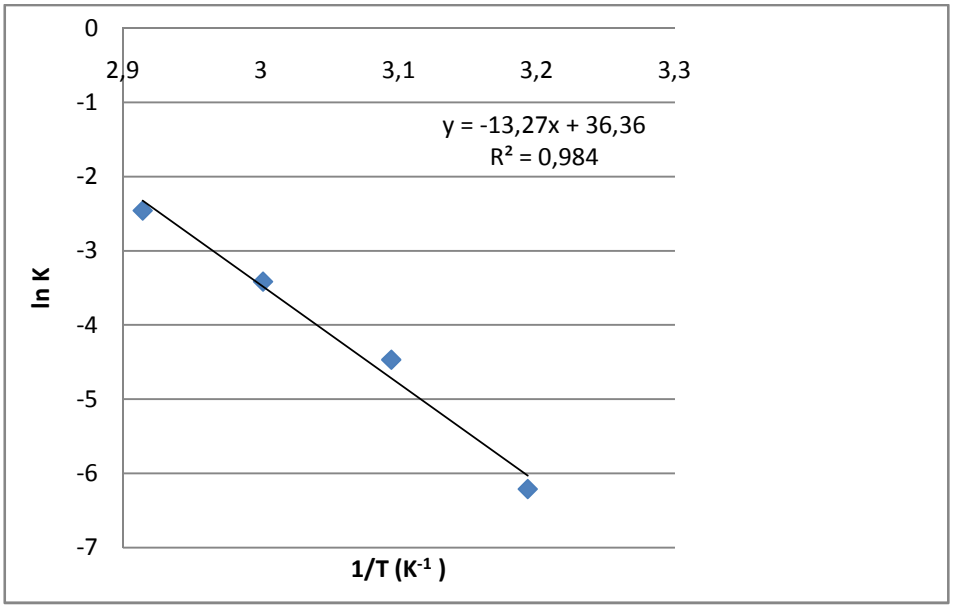


Fig.III.14. la représentation graphique de ln k en fonction de 1/T pour la réaction de dénaturation thermique de la lipase de *Ricinus communis*

D'après le graphe (Fig.III.13), nous avons trouvé que la valeur de l'énergie d'activation de lipase est égale à 110,7 KJ /mole.

L'énergie de désactivation de la lipase de *Ricinus communis* a été estimée à 26,48 Kcal/mol. Cette valeur est largement supérieure aux valeurs de l'énergie de désactivation de certaines lipases bactériennes telle que la lipase de *Pseudomonas fluorescens* (5.2 kcal/mol) (Driessen et stahouders, 1974), ou 4,93 Kcal/mol pour la lipase de *Bacillus sp.* (Ghori et Iqbal, , 2010). De meme pour certaines lipases végétales telles que la lipase de blé (7,3 kcal/mol) (Caillat, 1970). Ceci démontre la stabilité relative de la lipase de Ricin puisque une valeur élevée de l'énergie d'activation implique une probabilité faible de la réalisation de la réaction de dénaturation.

IV. Application

IV.1. Introduction :

Un grand nombre d'applications hydrolytiques additionnelles ont été décrites pour les lipases. Ce sont des enzymes généralement utilisées pour catalyser des réactions d'hydrolyse de triglycéride en milieu aqueux, elles sont également capables de catalyser les réactions d'estérification et de transtérification avec un alcool en milieu non-aqueux. La recherche concernant des procèdes enzymatique se développe mais les résultats ne permettant pas encor leur utilisation a l'échelle industriel [64]

Les lipases trouvent aussi leurs applications dans le domaine d'énergie. Le biodiesel, considéré comme une solution pour remplacer le pétrodiesel est un sujet de recherche d'actualité. Un des principaux problèmes associés au développement industriel du biodiesel est la source de matière première ainsi que le procédé de transformation**.**

Le biodiesel est le nom qui à été donné aux huiles végétales transesterifiées. C'est une réaction entre l'huile et l'alcool, formant ainsi les esters méthyliques ou éthyliques d'huiles végétales (carburant alternatif au diesel d'origine fossile) et du glycérol, désigne sous le nom de glycérine, qui est un produit de grande valeur. Sa valorisation est déterminante pour l'équilibre économique de la filière [65]

Le biodiesel est considéré comme une alternative écologique de remplacement du diesel en raison de ses nombreux avantages, telle sa biodégradabilité et sa non-toxicité. La production de biodiesel au niveau mondial est faible et ne répond pas aux besoins de la société. Par conséquent, des politiques de production de biodiesel ont été implémentées par divers pays [66].

Tableau IV.1. Propriétés de diesel et biodiesel [67]

	unité	diesel	Huile végétale	biodiesel
Densite	Kg/l	0,81-0,85	0,91	0,86-0,9
Viscosite	mm^2/s	1,2-10	98	3,5-6
Indice de citane	CN	>51	51	54

IV.2. Les paramètres réactionnels de réaction

IV.2.1. Rapport molaire alcool/huile et type d'alcool

L'une des variables les plus importantes affectant le rendement en esters est le rapport molaire entre l'huile (les triglycérides) et l'alcool. D'après les coefficients stœchiométriques de la réaction, la transestérification exige trois moles d'alcool pour une mole de triglycérides afin de former trois moles d'esters d'acides gras et une mole de glycérol. [64]

Le méthanol et l'éthanol sont les principaux alcools utilisés dans les réactions de transesterification. Le méthanol a une meilleure réactivité en le comparant à l'éthanol, mais sa solubilité est moindre, d'où une limitation de rendement due transfert de masse. L'éthanol, par contre, est soluble mais moins réactif que le méthanol, ce qui a un impact positif sur le rendement mais négatif sur la vitesse de réaction.

IV.2.2. La température et la pression

La littérature (Freedman et al 1984) révèle que la température a une forte influence sur la vitesse de réaction. L'augmentation de température permet d'atteindre rapidement l'état d'équilibre [68]. Quant à la température elle varie de 40 à 300°C environ; selon la nature de l'huile, du type de catalyseur de la réaction et de sa concentration. La limite supérieure de la température utilisée ne dépassant pas la température de dégradation de l'huile [69]. Montre que pratiquement toutes les études de transestérification catalysées des huiles végétales sont réalisées sous pression atmosphérique [69].

IV.2.3. L'agitation

L'agitation est un paramètre réactionnel primordial pour la réaction de transestérification en raison de l'hétérogénéité du milieu réactionnel (milieu biphasique). L'agitation devra être suffisamment vigoureuse pour que la surface d'échange entre les deux phases soit la plus grande possible. L'agitation favorise un bon contact entre les réactifs et homogénéise le milieu réactionnel. Il est très important que l'huile et le catalyseur se mélange bien dans une réaction de transesterification.

IV.3. Critères de choix de l'huile

La source de biodiesel doit répondre le plus possible à deux critères très importants:

- Bas prix de production

- Une large échelle de production

Le prix des huiles comestibles, comme l'huile de soja par exemple, est plus élevé que le diesel. C'est pourquoi les déchets d'huiles végétales et les huiles végétales non comestibles sont préférés comme source de corps gras pour la production du biodiesel.

IV.4. Caractérisation des réactifs utilisés

- **Huile végétale :**

L'huile qu'on à utilisée est une huile commerciale (ELIO) de Cevital conditionnée dans des flacons de 1L contenant 20% de l'huile de tournesol et 80 % de l'huile de soja. Elle possède également les propriétés suivantes : Masse molaire= 943,6g/l ; Densité =0,907g/cm^{-3} ; Viscosité = 36,85mm^2/s [69].



- **L'éthanol :**

L'alcool est l'un de deux réactifs mis en jeu lors de la réaction de transesterification, dans notre présente d'étude et l'éthanol.

Ethanol de la classe des alcools primaires, de formule CH3CH2-OH à usage des boissons et usage industriel, est obtenu par fermentation de solutions sucrées, naturelles (jus de raisin, canne à sucre, etc.) ou artificielles (hydrolyse de l'amidon). La majeure partie de l'éthanol à usage industriel est synthétisé à partir de l'éthanal ou de l'éthylène issu du pétrole. L'éthanol a une :

Température de fusion de – 114,1°C,

Température d'ébullition de 78,3°C

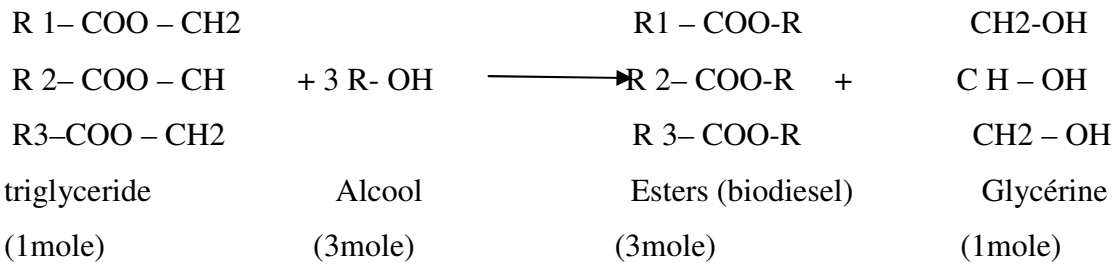
Densité de 0,789 à 20°C .

L'éthanol est plus soluble mais moins réactif que le méthanol ce qui a un impact positif sur le rendement mais négatif sur la vitesse lors des réactions de transesterification [69].

IV.5. PROCEDE DE PRODUCTION DE BIODIESEL :

- **Calcul des masses de réactifs**

Sur la base de l'équation stœchiométrique suivante les quantités de réactifs à mettre dans le milieu réactionnel sont :



$n_{huile} = 50/943,6 = 0,053mol$

$v_{huile} = m/\rho = 55,12ml$

$n_{alcool} = 3.n_{huile}$

$= 0,159mol$

$V_{éthanol} = 9,27ml$

Une quantité de catalyseur (lipase) de 5% par rapport à la masse d'huile initiale [69] ($m_{catalyseur}=2,5g$)

IV.6 Les étapes de production de biodiesel

- **Etape de mélange des réactifs**
  - Sous agitation de 300rpm dissoudre la lipase dans l'éthanol
  - Mettre l'huile dans flacon sous agitation et dans bain marie de température (40 °C)
  - Verser la solution de la lipase dans l'huile et laisser sous agitation et chauffage (300rpm, 40 °C).

- **Etape de la réaction :**

Une fois que le mélange huile/éthanol est conditionné dans le réacteur, le processus de la réaction de transesterification se déclenche pour 24h, sous agitation et chauffage. A la fin de la réaction, huile passe à l'état d'ester en changeant ses propriétés physico-chimiques.

- **Etape de décantation**

Après 24h et dans ampoule à décanter, laisser reposer le mélange pour que la séparation s'effectue (une journée).

Le glycérol plus dense que le biodiesel se condense dans la partie basse.

- **Etape de lavage**

1. Le biodiesel obtenu doit être lavé pour éliminer l'excès d'alcool et de catalyseur.
2. Placer le biodiesel dans une ampoule à décanter et verser lentement l'eau pour le rinçage (environ100ml). Cette opération est délicate, elle doit être réalisée sans perturber le système car l'agitation provoque la formation d'une émulsion qui diminue le rendement de la synthèse.
3. Laisser à nouveau décanter environ 24h.
4. Récupérer le biodiesel.

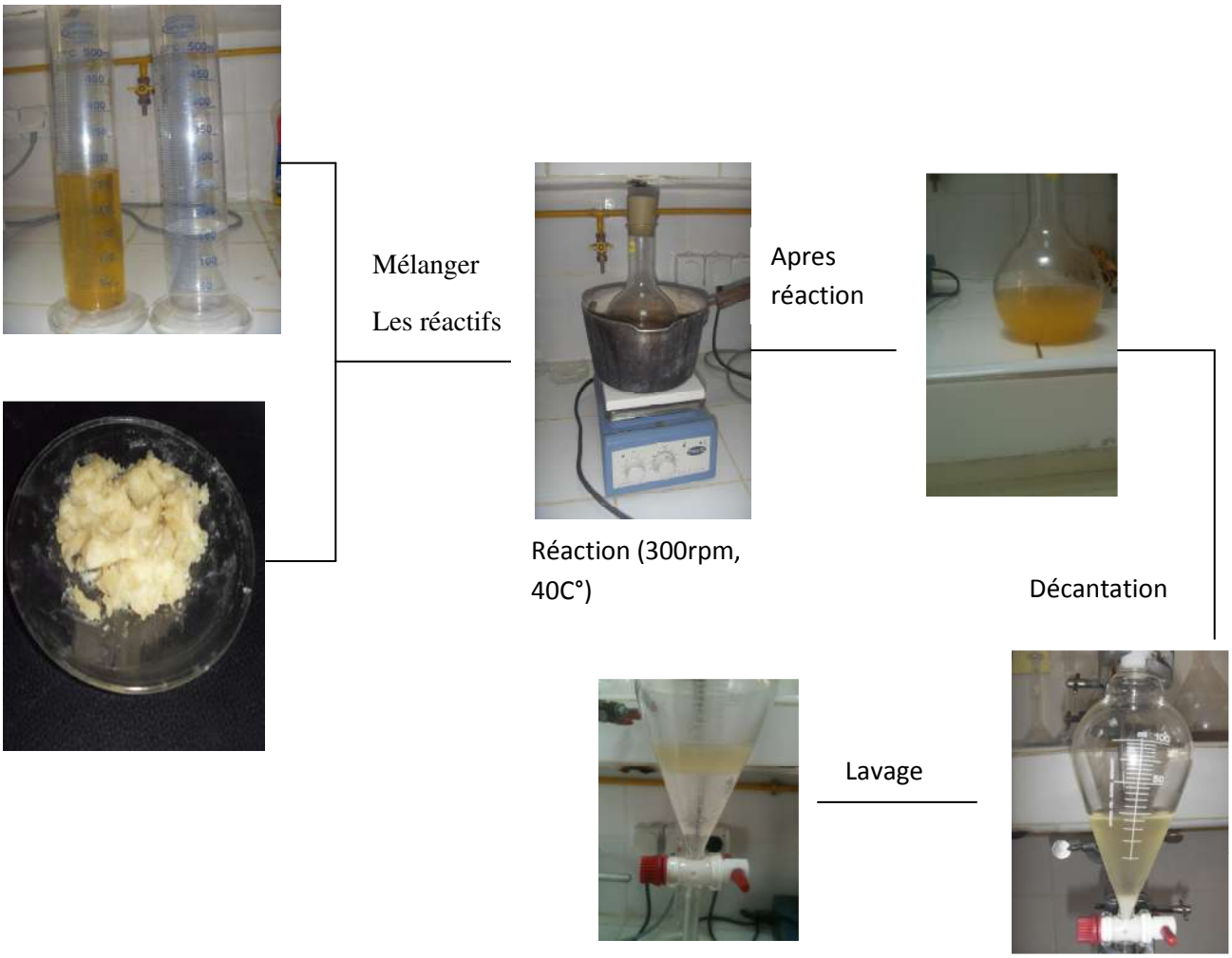


Fig. IV.1 : Etapes de production de biodiesel a laboratoire.

IV.7. Caractérisation de biodiesel

La densité :

La densité constitue une caractéristique importante, principalement pour les biocarburants, car elle conditionne le dimensionnement et les particularités technologiques des organes d'alimentation (pompes, injecteurs); de plus, sur un système installé, une utilisation de biocarburants de densité largement différente, entraînerait des modifications de réglages de combustion avec des répercussions sur la puissance maximale, le rendement et les émissions de polluant.

- Détermination de la densité : par une seringue pré-pesée de 5ml prendre ce volume et peser le contenu.

La viscosite :

La viscosité est définie comme la résistance à l'écoulement uniforme et sans turbulence se produisant dans la masse d'une matière.

- par une pipette pasteur jaugée, verser le biodiesel et on mesure le temps nécessaire à la solution pour parcourir la distance entre deux traits.

Spectre Infrarouge :

Nous avons utilisé comme méthode d'analyse, Le rayonnement infrarouge (IR). Le spectre IR est représenté sur la figure IV.2. L'analyse spectrale des bandes d'absorption caractéristiques des groupements fonctionnels figurent dans le tableau (IV.3)

IV.8. Résultats :

Tableau IV.2 propriétés de biodiesel.

Densité (g/cm^{-3})	**0,86**
Viscosité (mm^2/s)	**6,77**

✓ **Spectre d'IR**

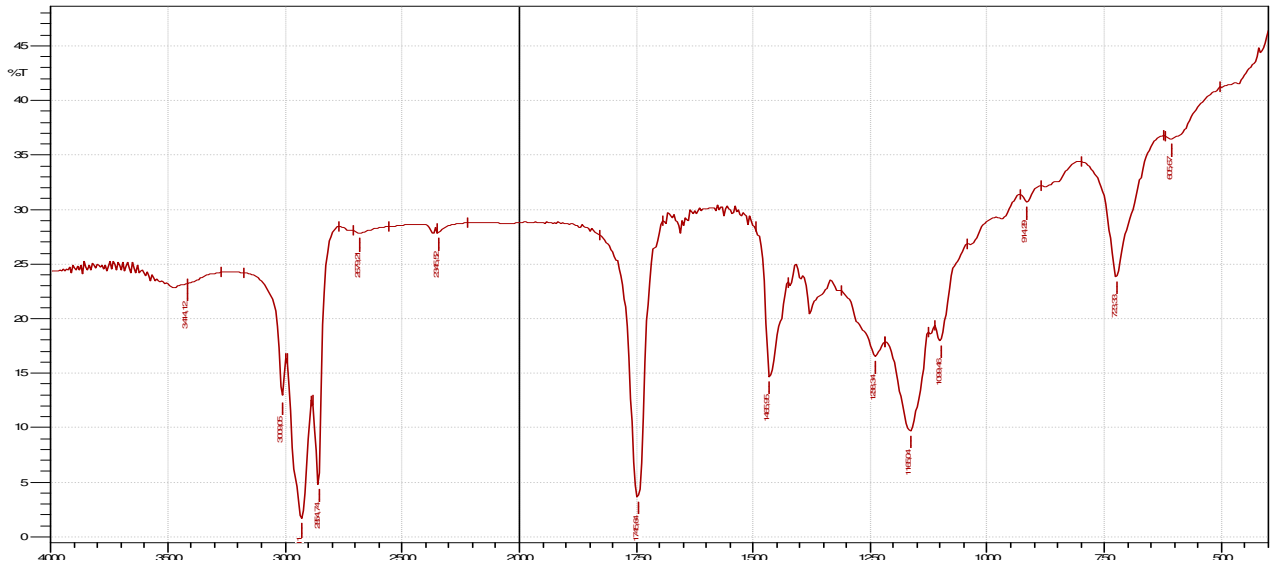


Figure IV.2. Spectre IR de biodiesel

Tableau. IV.3 les groupements fonctionnels de biodiesel

λ (cm^{-})	2902	1750	1450	1125	730
Groupement fonctionnel	C-H	C=O	CH_3, CH_2	C-O	CH

On est limite notre comparaison que certains propriétés (densité, viscosité, IR)
Cependant notre biodiesel présente de densité et viscosité dans les normes [59,63].
Pour l'IR il ya une fonction ester allylique (ester éthylique C=0), et d'après cette fonction nous pouvons dite il y'a une réaction de transterification.

Conclusion

L'objectif de notre travail était d'extraire la lipase et de la purifier à partir des grains de ricin (*Ricinus comminus*). Par la suite, les effets de quelques paramètres physicochimiques tels que la température, le pH, les effecteur, la concentration en enzyme et en substrat, et la stabilité thermique, sur l'activité enzymatique ont été étudiés en vue de caractériser cette enzyme extraite et de déterminer les conditions optimales sous les quelles la lipase a une activité maximale.

Les résultats suivants ont été obtenus:

Le pH optimum est égal à pH 7 avec une température optimale de 40°C. Au dessous et au dessus des deux valeurs optimales obtenues (pH et température) l'activité enzymatique diminue.

Quelques effecteurs chimiques tels que l'urée et le sulfate ferreux anhydre peuvent provoquer une inhibition de l'activité de la lipase de 70%, alors qu'une activation a été signalée avec les chlorures de magnésium et de Zinc de 24,92%, et de 18,83 respectivement.

La lipase de grain de ricin est caractérisée par une grande thermo stabilité pendant 2heures entre 40 et 50°C. Par contre, elle est complètement inactivée à 70°C pendant cette période.

L'étude cinétique de la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin, nous a permis de calculer la valeur de Km en utilisant la représentation de Line weaver -Burk qui est égal à 28,85g/l et Vmax est égale 16,39mg/min.

L'actuel travail est une étape préliminaire qui a permis de caractériser globalement la lipase de *Ricinus communis* à travers la réaction typique de l'hydrolyse des triglycérides.

Cette étude pourra être approfondie sur différents axes:

- L'amélioration du rendement de purification par l'utilisation des techniques chromatographiques.
- Utilisation des techniques pour caractériser la structure et la masse moléculaire de la lipase.
- Etude de la stabilité de la lipase dans les solvants organiques.

Références bibliographiques :

[1] **:** BOUCHAGRA T. docteur en biochimie et KESSOUS C. docteur en sciences médicales : Enzymologie Biochimie Métabolique. juin 1990. Page 5 ,6.

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

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

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

[5] : Stolkowski J., Les enzymes, 6e édition, De Boek université s.a., Paris, 1983.

[6] : Charles M.Grisham., Reginald H.Garrat., 2e edition américaine, De Boek université s.a.2000.

[7] : Lubert clauser et Francois Chapevielle _biochimie collection enseignement des sciences_édition 1974.

[8] : P. Boulanger, T. Plonovski, F.Tayeau, P. Mandel et G. Bieserte professeurs de chimie biologique avec collaboration de M. Dautrvaux et P.Louiset-Biochimie médicale_Fascicule II- Enzyme et métabolisme- deuxiéme édition 1973.

[9] : Gilbert Duant et pierre Mousson- Les enzymes production et utilisations industrielles _Gauter.Villars Bordas, Paris, 1982.

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

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

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

[13]: Moussard C., _biochimie structural et métabolique, De Boek et larcier, 2006.

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

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

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

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

[18]:Sarada L., Desnuelle P.,Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion, Biochim.biophysi. Acta, 30,1958.

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

[20] : Gilham D. & Lehner R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro.Methods. 36: 139-147.

[21]: Jaeger K. E. & Reetz M. T. (1998).Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. Trends biotechnol. 16: 396-403.

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

[23] : Gargouri Y., Julien R., Pieroni G., Verger R. & Sarda L. (1984). Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. Journal of lipid research. 25: 1214-1221.

[24]: Lawrence R.C., Fryer T. F. & Reiter B. (1967). The Production and Characterization of Lipases from a *Micrococcus* and a *Pseudomonad*. J. gen. Microbial. 48: 401-418.

[25]: Bordes F., Dossat V., Nicaud J.M., Marty A, Journa of microbiological methods, 70 :493_502, 2007.

[26]: Pignede G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.M, characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *yarrowia lipolytica,* J bacterial 182, 10:2802_2810, 2000.

[27] : Godet S., Isolement et caractérisation de trios gènes codant une lipase et deux estérases hypothétiques chez la micro algue marine *isochrysis galbana,* thése de doctorat, université de Maine, 2008.

[28] : Lafaquiére V., compréhension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases, thése de doctorat, INSA de Toulouse, 2010.

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

[30]: Nawani N., Khurana J., and Kaur J., A thermostable lipolytica enzyme from a thermophilic *Bacillus sp*: purification and characterization molecular and cellular biochemistry, 290:17_22, 2006.

[31]: Hasan F., Ali Shah A. & Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology. 39: 235 251.

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

[33] : Muralider R. V., chiromamilla R. R., Marchan R., Ramachandran V. N., Ward O. P. & Nigan P. (2002).Understanding lipase stereo selectivity. World journal of microbiology & biotechnology. 18: 81-97.

[34] : Maugard T., Remaud-Smeon M., Petre D., Monsan P., lipase_catalysed chemoselectivite N-acylation of amino-suger dervatives in hydrophobic solvent :

[35] : Jaeger K.E., dijkstra B.W., Reetz M.T., Bacterial biocatalysts : molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases, Anuu. Rev. Micribiaol, 53, 1999.

[36]: Bornsheur U. T., Bessler C., Srinivas R. & Krishna S. H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in biotechnology. 20: 433-437.

[37] : Sexena R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S. (2003).Purification Strategy for microbial lipases. Journal of microbiological methods. 52: 1-18.

[38]: Winkler F. K., D arcy A. & Hunziker W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. Nature.343: 771-774.

[39]: Garde V. L. (2000). Enzymes en agro-alimentaire. Lavoisier Tec. Doc.

[40]: Lotti M. & Alberghina L. (2002). Lipases: Molecular structure and function. Industrial enzymes. 16: 263-281.

[41] :Cancino_Cardenas M.a., Amélioration de l'activité et de l'énantiosélectivité de la lipase *Yarrowia lipolytica* vis-à-vis des acides 2-bromo-aryl acetique, Thése de doctorat INSA de toulouse, 946,2008.

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

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

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

[45]: Brzozowski A.M., Savage H.,Verna C S., Turkenburg J.,PLawson D.M., Svendsen A., Patkar S., Structural origins of the interfacial activation in *thermomyces*

(*humicola*) lanuginose lipase, Biochemistry, 39(49):15071-82,2000.
[46]: Pleiss J., Fischer M., Peiker M., Thiele C., Schmids R.D., Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence-function relationship, J.M. Catal. B Enzym.10, 1:491-508, 2000.
[47]: 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.
[48]: sefha Farida., (2010_2011),'' étude de l'activité enzymatique d'une lipase végétale sous forme libre et immobilisée''. mémoire de magister, en génie des procédés, Médéa.

[49]: Stéphanie Godet., (2008) '' Isolement et caractérisation de trois gènes codant une lipase et deux estérases hypothétiques chez la microalgue marine *Isochrysis galbana* (*Prymnesiophyceae*, *Haptophyta*)
[50]: Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E. & Miller R. (2008). Lipases at interfaces: A review.Advances in colloid and interface science.
[51]: Alloue W.A.M. (2008). Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Thèse de doctorat. Faculté universitaire des sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. Pp 165.
[52] : Jaeger K. E., Dijkstra B. W. & Reetz M. T. (1999). Bacterial, biocatalysts: Molecular biology, three dimensional structure and biotechnological applications of lipases. Annu. Rev. Microbiol.53: 315-351.
[53]: Ota Y., Sawamoto T. & Hasuo M. (2000). Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the Sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum sp.* FO401B. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 2497-2499.
[54]: Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Heuvel M. V & Misset O. (1994).Bacterial lipases. FEMS Microbiology reviews. 15:29-63.
[55]: Joseph B., Ramteke P. W., Thomas G. & Shrivastava N. (2007). Standard review cold-active microbial lipases: A versatile tool for industrial applications. Biotechnology and molecular biology review. 2: 39-48.
[56]: Alloue W. A. M., Aguedo M., Destin J., Ghalfi H., Blecker C., Wathelet J. P. & Thonart P. (2008). Les lipases immobilisées et leur application. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12: 57-68.

[57]: Wu X. Y., J.skelainen S. & Linko Y. Y. (1996). An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. Enzyme and microbial Technology. 19: 226-231.
[58]: Gunstone F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. Journal of the Science of Food and Agriculture. 79: 1535-1549.
[59]: Khallouki F, Younos C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, (2003)''concumption of argan oil (Morocco) With its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects'' European journal of cancer prevention 12(1): 67-75.

[60]: Sammor R.H,. purification and partiel charactérisation of acid lipase in germinating lipidbody linseedlings, department of Botany, Faculty of Science, Tanta University, 29, 177-184, 2005.

[61]: Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R., Methods for lipase detection end essay: a critical review, European journal of lipid Science and Technology, Winhem, 133-153, 2000.
[62]: 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.
[63] : Muto S., Beevers H., lipase activities in castor bean endosperm during germination, Plant physiology, 54, 23-28, 1974.
[64] : RICHARD Romain.,(2011).,"tansterifacation thanolique d'huile végétale dans des microréacteurs : transposition du batch au continu". These de doctorat en science agroressources, l'université de toulouse. France.
[65] : ALLOUNE Rhiad., (2012)., Le biodiesel : ''une source d'énergie propre et prometteuse''
[66] : DORIAC Fabian., (2009)., ''huiles vegetales pures et biodiesel ''. France.
[67] : María Del Pilar Rodriguez., (2014).,''PRODUCTION DE BIODIESEL À PARTIR D'UNE HUILE MODÈLE DE MICROALGUES PAR VOIE DE CATALYSE ENZYMATIQUE HÉTÉROGÈNE'' ., Mémoire de maîtrise En génie chimique., Sherbrooke (Québec) Canada.

[68] : ABOINA GERARD Tchakablo., (2009)., ‘’ptoduction de biodiesel par transterification alcoolique : etude sur reacteur pilot’’., mémoire de master en genie energétique.
[69] : CHAIB Faisa et KHANFAR Afaf., (2013)., ‘’synthese de biodiesel par la transterification des huiles commercialisées’’. Mémoire de master en genie chimique., Ourgla, Alger.