REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA



Faculté de **T**echnologie

Département du Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de Fin d'études de Master

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie des Procédés Pharmaceutiques

THEME

Étude de la stabilité thermique et chimique d'une lipase végétale

Proposé et dirigé par :

Dr. SEFHA Farida.

Dr. ABOUSEOUD Mahmoud.

Présenté par :

DALI AHMED Anfel.

BENROKIA Amina.

Promotion : 2023/2024

Remerciement

Tout d’abord nous remercions Allah pour nous avoir guidées vers le chemin de la lumière et du savoir, pour nous avoir donné le courage et la volonté afin de pouvoir réaliser ce travail.

Nous souhaitons exprimer nos plus sincères remerciements à nos encadreurs **Dr. SEFHA Farida** et **Dr. ABBOUSEOUD Mahmoud**, d’avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, ses conseils, ses recommandations et ses encouragements constants tout au long de la réalisation de notre travail. Nous sommes très reconnaissantes envers eux.

Nous remercions les éléments de l’université de Yahia Fares de Médéa et spécialement le directeur de hall technologique et les membres des laboratoires de CHIMIE.

Nous remercions également **Dr. TASSIST Amina** pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant le jury de ce mémoire.

Nous remercions aussi **Dr. AHMEDI Afaf** d'avoir accepté de juger ce travail

Nous remercions enfin toutes les personnes qui nous ont aidées de près ou de loin, pour la réalisation de ce travail.

Dédicace

C’est avec une très grande émotion et un immense plaisir que je dédie ce modeste travail :

A ceux qui sont la source de mon inspiration et mon courage afin que je puisse

Accomplir toute mes années d’étude.

A mon adorable père : Fodhil.

A ma très chère mère : Hamida.

A mon marie: MENACER Ibrahim.

A ma sœur : Nour el Houda.

A mon frère : Djaafer.

A tous les membres de ma famille petits et grands.

A DALI AHMED Anfel, chère amie avant d’être binôme, et à toute sa famille.

A tous mes collègues de la promotion.

A tous ceux qui m’ont aidé et encouragé pour réaliser ce mémoire.

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embarrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère,

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non et n'a épargné aucun pour me rendre heureuse : mon adorable mère, Ahlem.

A mon cher père, Mouloud.

À mon idole, mon cher grand-père KRAOUCHE Ali que Dieu ait pitié de lui.

A mes frères : Hasna, Maamoun, Ayoub, Meriem, je leurs souhaite plus de succès.

A mon binôme, BENROKIA Amina et à toute sa famille Pour son soutien moral, sa patience, et sa compréhension tout au long de ce projet.

ملخص:

الهدف من دراستنا هو استخلاص وتنقية الليباز من بذور الخروع « *Ricinus communis* » ودراسة الثبات الحراري والكيميائي للليباز الحر والمترابط "CLEAs" أثناء تفاعل التحلل المائي لزيت الزيتون. أثبت الاستخلاص عن طريق الترسيب باستخدام الأسيتون أنه طريقة فعالة وسهلة التنفيذ، حيث حقق عائد تنقية بنسبة 91.26% لليباز الحر. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن نشاط الليباز يتم تعديله بعدة عوامل مثل الرقم الهيدروجيني والثبات الحراري وكتلة الإنزيم وزمن التفاعل والثبات الكيميائي. درجة الحرارة المثالية تساوي 35 درجة مئوية مع الرقم الهيدروجيني الأمثل حوالي 4 لكلا النموذجين. يتميز الليباز بالثبات الحراري العالي خلال ساعة واحدة من العلاج عند 40 درجة مئوية.

الكلمات المفتاحية: الليباز، الاستخلاص، حبة الخروع، الاستقرر الحراري، الاستقرارالكيميائي، الارتباط المتقاطع، CLEAs.

Résumé :

Le but de notre étude est d'extraire et purifier la lipase à partir de graines de ricin « *Ricinus communis* L» et d'étudier la stabilité thermique et chimique pour la lipase libre et réticulée 'CLEAs' lors de la réaction d'hydrolyse d'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 91.26 % pour la lipase libre. Les résultats obtenus montrent que l'activité de la lipase est modulée par plusieurs facteurs tels que le pH, la stabilité thermique, la masse d'enzyme, le temps de réaction ainsi la stabilité chimique. La température d'incubation optimale est égale à 35 °C avec un pH optimum au voisinage de 4 pour les deux formes. La lipase est caractérisée par une grande thermo stabilité pendant 1 heure de traitement à 40°C.

Mots clés : lipase, extraction, graine de ricin, stabilité thermique, stabilité chimique, réticulée, CLEAs.

Abstract:

The aim of our study is to extract and purify lipase from castor bean seeds « *Ricinus communis* » and to study the thermal and chemical stability for free and cross-linked lipase 'CLEAs' during the hydrolysis reaction of olive oil. Extraction by precipitation using acetone proved to be an effective and easy-to-implement method, achieving a purification yield of 91.26% for free lipase and 52.15% for CLEAs. The results obtained show that lipase activity is modulated by several factors such as pH, thermal stability, enzyme mass, reaction time and chemical stability. The optimal temperature is equal to 35°C with an optimum pH around 4 for both forms. The lipase is characterized by high thermo stability during 1 hour of treatment at 40°C.

Keywords: lipase, Extraction, castor bean, thermal stability, chemical stability, cross-linked, CLEAs.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AE : Activité enzymatique UI.

AE_m : Activité enzymatique massique UI/g.

AS : Activité spécifique.

BSA : Bovin Sérum albumine.

C : Concentration.

CLA: Acide linoléique conjugué

CLEA: Cross Linked Enzyme Aggregates.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

E/E_0: Activité relative.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

EEB : Extrait enzymatique brute.

EEPP : Extrait enzymatique partiellement purifiée.

GLU : Glutaraldéhyde.

m_{AGL} : Masse des acides gras libres.

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

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

mM : Millimolaire.

Rh : Rendement d'hydrolyse.

Rpm : Rotations par minute.

t : Temps d'essai.

µmol : Micromolaire.

V/V : Volume par volume.

ve : Volume de l'enzyme.

Liste des figures

Liste des figures

Figure I.1: Hydrolyse des liaisons esters des triacylglycérols par les lipases…….4

Figures I.2 : Classification des lipases……5

Figure I.3 : Représentation schématique d'une hydrolase de type α / β……..6

Figure I.4 : Réaction d'hydrolyse…….....10

Figure I.5 : Mécanisme d'action catalytique des lipases. (A) Conformation initiale de l'enzyme. (B) Premier intermédiaire tétraédrique après attaque nucléophile de la serine. (C) libération du groupement partant (alcool) et formation de l'acyl-enzyme. (D) Attaque nucléophile par une molécule d'eau du carbone de l'acyl-enzyme. (E) Formation du second intermédiaire tétraédrique. (F) Libération de l'acide carboxylique qui régénère l'enzyme libre…….14

Figure I.6 : Diverses applications industrielles des lipases…….....15

Figure I.7: Les méthodes d'immobilisation…….....19

Figure I.8 : Technique d'immobilisation par liaison covalente……..19

Figure I.9 : Technique d'immobilisation par l'adsorption physique……...20

Figure I.10 : Technique d'immobilisation par micro-encapsulation dans une capsule……20

Figure I.11 : Technique d'immobilisation par inclusion dans une matrice de gel…….21

Figure I.12 : Technique d'immobilisation par cross linking……..21

Figure I.13: Technique d'immobilisation par Co-réticulation……22

Figure II.1 : Ricin commun (*Ricinus communis*) - Jardin botanique Val Rahmeh-Menton…….25

Figure II.2 : Appareils végétatif et reproducteur du ricin. A. Port général de l'arbuste. B. Feuilles composées palmées. C. Fleurs femelles. D. Fleur mâle. E. Fruits immatures. F. Fruit mature. G. Grains…….26

Figure II.3 : Origine de ricin……...27

Liste des figures

Figure II.4 : Situation géographique de la culture du Ricin en Algérie sous le colonialisme Français……..28

Figure II.5 : Les graines de ricin…….29

Figure II.6 : La tige de ricin…….....30

Figure II.7 : Les feuilles de ricin…….....30

Figure II.8 : Fleurs du plant de ricin……31

Figure II.9 : Les fruits de ricin……31

Figure II.10 : Les graines de Ricin…….32

Figure III.1 : Les étapes d'extraction de la lipase brute…….45

Figure III.2 : Les étapes de purification partielle de la lipase. ….……47

Figure III.3 : Courbe d'étalonnage de l'albumine par la méthode de Bradford……51

Figure III.4 : Effet de pH sur l'activité enzymatique de la lipase de *Ricinus communis*…….53

Figure III.5 : Effet de la température du milieu sur la réaction enzymatique à pH=7 et pH=4 ……...54

Figure III.6 : La cinétiques de stabilité thermique à pH=7…….....55

Figure III.7 : La cinétiques de stabilité thermique à pH=4…….....55

Figure III.8: Effet de la masse d'enzyme sur l'activité enzymatique……62

Figure III.9 : Etapes de la préparation des CLEAs……67

Figure III.10 : la forme de granules agglomérées, insolubles dans la solution tampon……68

Figure III.11: Effet de pH sur l'activité des CLEAs de lipase de ricin…….....69

Figure III.12 : Effet de température sur l'activité du CLEAs……70

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Lipases d'origine végétale……..8

Tableau I.2 : Quelques espèces animales productrices de lipase…….9

Tableau I.3 : Quelques espèces microbiennes productrices de lipase……10

Tableau I.4 : Des réactions catalysées par les lipases……12

Tableau II.1 : Les méthodes d'extraction de la lipase de ricin……..34

Tableau III.1: Appareillages utilisés…….41

Tableau III.2 : Substances chimiques utilisées au cours de la synthèse d'hydrolyse…43

Tableau III.3 : Résultats de dosage par la méthode de Bradford.……..……50

Tableau III.4: Caractéristiques des préparations enzymatiques de l'EEB et l'EEPP de la lipase de *Ricinus communis*. ……...…51

Tableau III.5 : Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique à pH=7……..58

Tableau III.6 : Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique à pH=4……..58

Tableau III.7 : Effet de solvants sur l'activité enzymatique à pH=7…….59

Tableau III.8 : Effet des solvants sur l'activité enzymatique à pH=4……...60

Tableau III.9 : Effet de substrat sur l'activité enzymatique à pH=7……..…61

Tableau III.10 : Effet de substrat sur l'activité enzymatique à pH 4…….……61

Tableau III.11 : Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse à pH=7…...64

Tableau III.12 : Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse à pH=4…...64

Tableau III.13 : Effet des ions métalliques sur l'activité du CLEAs……71

Tableau III.14 : Effet de solvants sur l'activité du CLEAs……...72

Tableau III.15 : Effet de substrat sur l'activité du CLEAs……73

Tableau III.16 : Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse du CLEAs……74

Sommaire

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction Générale ……1

I CHAPITRE I : LES LIPASES..... 3

I.1 LIPASES : 4
I.1.1 Définition : *4*
I.1.2 Classification : *4*
I.1.3 Structure : *5*
I.1.4 Sources : *7*
I.1.4.1 Sources végétales : 7
I.1.4.2 Sources animales et insectes : 8
I.1.4.3 Sources microbiennes : 9
I.1.5 Réactions caractéristiques : *10*
I.1.5.1 Réaction d'hydrolyse : 10
I.1.5.2 Réaction de synthèse : 10
I.1.6 Mécanisme d'action : *13*
I.1.7 Application : *14*
I.1.7.1 Détergents : 15
I.1.7.2 Industrie alimentaire : 16
I.1.7.3 Médecine : 16
I.1.7.4 Traitement des eaux usées : 17
I.1.7.5 Biodiesel : 17
I.2 IMMOBILISATION DES LIPASES : 17
I.2.1 Définition et principe d'immobilisation : *17*
I.2.2 Objectifs d'immobilisation : *17*
I.2.3 Les principales méthodes d'immobilisation : *18*
I.2.3.1 La liaison covalente : 19
I.2.3.2 L'adsorption physique : 20
I.2.3.3 L'encapsulation : 20
I.2.3.4 L'inclusion : 20
I.2.3.5 Réticulation et Co-réticulation : 21

II LA LIPASE DE RICIN : 24

II.1 LA PLANTE DE RICIN : 25
II.1.1 Définition : *25*
II.1.2 Description : *25*
II.1.3 Origine : *27*
II.1.4 Nomenclature : *27*

Sommaire

II.1.5 La culture du Ricin en Algérie : *28*
II.1.6 Les Caractéristiques : *29*
II.1.6.1 Caractéristiques des graines : 29
II.1.6.2 Caractéristiques de plante de ricin : 29
II.1.7 Utilisation ou les applications de la plante de ricin : *32*
II.1.7.1 Médecine et santé : 32
II.1.7.2 Cosmétique : 32
II.1.7.3 Ornementation : 32
II.1.7.4 Autres usages : 33
II.2 LA LIPASE DE RICIN : 33
II.2.1 Extraction de la lipase de Ricin (Ricinus communis) : *33*
II.2.2 Applications de la lipase de ricin : *34*
II.2.2.1 Applications de la lipase de ricin dans l'industrie alimentaire : 34
II.2.2.2 Applications de la lipase de ricin dans l'industrie cosmétique : 35
II.2.2.3 Applications de la lipase de ricin dans l'industrie pharmaceutique : 35
II.2.3 Avantages de l'utilisation de la lipase de ricin : *35*
II.2.4 Propriétés et caractéristiques de la lipase de ricin : *35*

III PARTIE EXPERIMENTALE 39

III.1 INTRODUCTION: ..... **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**
III.2 MATERIELS ET REACTIFS : 40
III.2.1 Matériels : *40*
III.2.2 Réactifs : *42*
- Substrat : Huile d'olive (triglycérides) : 42
- Solutions tampons : 43
- Autres réactifs : 43

III.3 PREPARATION DU L'EXTRAIT ENZYMATIQUE BRUTE : 44
III.3.1 Extraction de la lipase brute : *44*
III.3.2 Purification partielle de la lipase : *46*
III.4 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'EEPP : 48
III.5 MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE D'EB : 49
III.6 DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE ET DU DEGRE DE PURIFICATION : 49
- *Dosage des protéines par la méthode de Bradford :* *49*

III.7 CARACTERISATION DE L'EEPP DE LA LIPASE DE *RICINUS COMMUNIS* : 52
III.7.1 Effet de pH : *52*
III.7.2 Étude de stabilité de la lipase de ricin : *53*
III.7.2.1 Stabilité thermique : 53
III.7.2.2 Stabilité chimique : 57
III.8 PREPARATION DU L'EXTRAIT ENZYMATIQUE CLEAS : 65
III.8.1 Extraction de la lipase brute : *65*
III.8.2 La préparation des CLEAs de lipase : *65*
III.9 CARACTERISATION DE CLEAS DE LA LIPASE DE *RICINUS COMMUNIS* L : 68
III.9.1 Effet de pH : *68*
III.9.2 Stabilité thermique : *69*
III.9.3 Stabilité chimique : *70*
III.9.3.1 Stabilité en présence des ions métalliques : 70
III.9.3.2 Stabilité en présence de solvants polaires : 71

Sommaire

III.9.3.3 Effet de la nature du substrat sur l'activité de CLEAs :.....72
III.9.3.4 Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse : 73
Conclusion générale et perspectives……75

Introduction Générale

Introduction Générale

Le développement de nouvelles biotechnologies, bio-industries et bio- raffinerie 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. Ce 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.

L'utilisation d'un catalyseur relativement coûteux comme les enzymes nécessite dans de nombreux cas, sa récupération et sa réutilisation pour un processus économiquement réalisable. Cependant, l'idée de réutilisation des enzymes signifie que la stabilité de la préparation enzymatique finale doit être suffisamment élevée pour permettre son utilisation de nouveau dans d'autres opérations d'hydrolyse ou de synthèse.

L'immobilisation est une ancienne technique qui a trouvé son application ces dernières années et qui est devenue une exigence pour l'utilisation de la plupart des enzymes en tant que biocatalyseurs dans les processus industriels, comme elle est considérée utile pour la séparation des enzymes du milieu réactionnel à la fin du processus et leur réutilisation de nouveau. Comme la plupart des enzymes, l'utilisation des lipases nécessite leur immobilisation afin d'assurer leur récupération du milieu réactionnel. Les agrégats d'enzymes réticulés (CLEAs) sont connus pour être une méthode d'immobilisation sans support nouvelle et polyvalente. Les CLEAs sont intéressants en raison de leur simplicité et de leur robustesse. Ils présentent généralement une spécificité et une sélectivité catalytique élevée, une bonne stabilité opérationnelle et de stockage,

ainsi qu'une bonne réutilisation. Ces avantages de CLEAs ouvrent la voie à d'autres applications industrielles.

L'intérêt de la présente étude porte sur la séparation, purification et voire la stabilité thermique et chimique de la lipase végétale obtenue à partir de graines de ricin sous forme soluble ou d'agrégats. L'objectif est de mieux cerner les capacités catalytiques de cette enzyme peu connue, ce qui permettra de connaitre les conditions optimales en vue d'une utilisation dans divers secteurs.

Le travail sera organisé en deux parties :

- Partie bibliographique composée en deux chapitres:
  -Le premier consacré à de généralités sur la lipase ;
  -Le deuxième chapitre consacré à de généralités sur la lipase de ricin.
- 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 température, pH, substrat, les ions métalliques….etc.) sur l'activité enzymatique.
  -La deuxième partie porte sur la préparation de CLEAs et l'étude de sa stabilité thermique et chimique.

Enfin, une conclusion servira à récapituler les principaux résultats et les perspectives envisageables pour de futurs développements du sujet.

Partie théorique

Chapitre I

Les lipases

I.1 Lipases :

I.1.1 Définition :

Les lipases ou triacylglycérol acylhydrolase (EC 3.1.1.3) comme dénomination officielle (Commission internationale des enzymes : « International Union of Biochemistry, IUB ») font partie de la classe des hydrolases (EC3). Elles agissent spécifiquement sur les liaisons ester (EC3.1) présentent dans les esters carboxyliques (EC3.1.1) **[1,2]**. Le rôle physiologique de la lipase est important, elles hydrolysent les triacylglycérols en acides gras, diacylglycérols, monoacylglycérols et glycérol **[3]**. La figure I.1 montre les trois liaisons esters carboxyliques des TG potentiellement hydrolysables par les lipases. Elles sont présentes aussi bien dans des tissus animaux, de végétaux, que chez de nombreux micro-organismes **[4].**

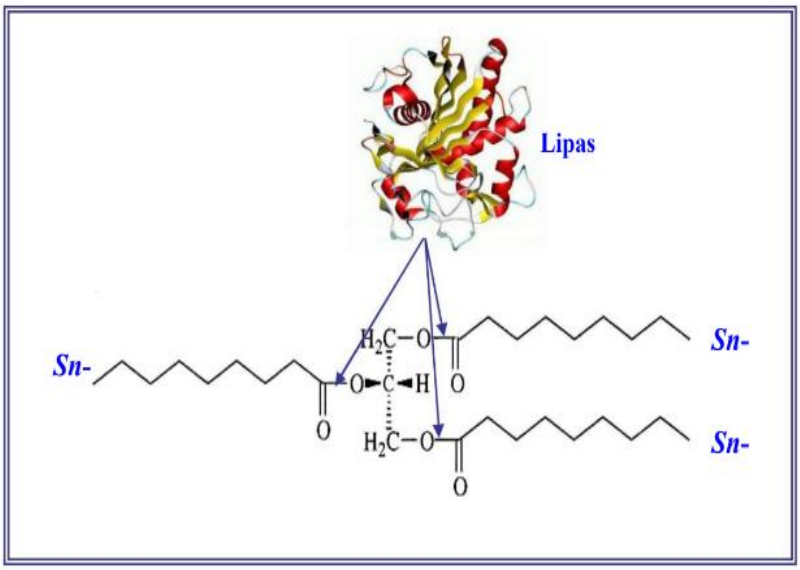


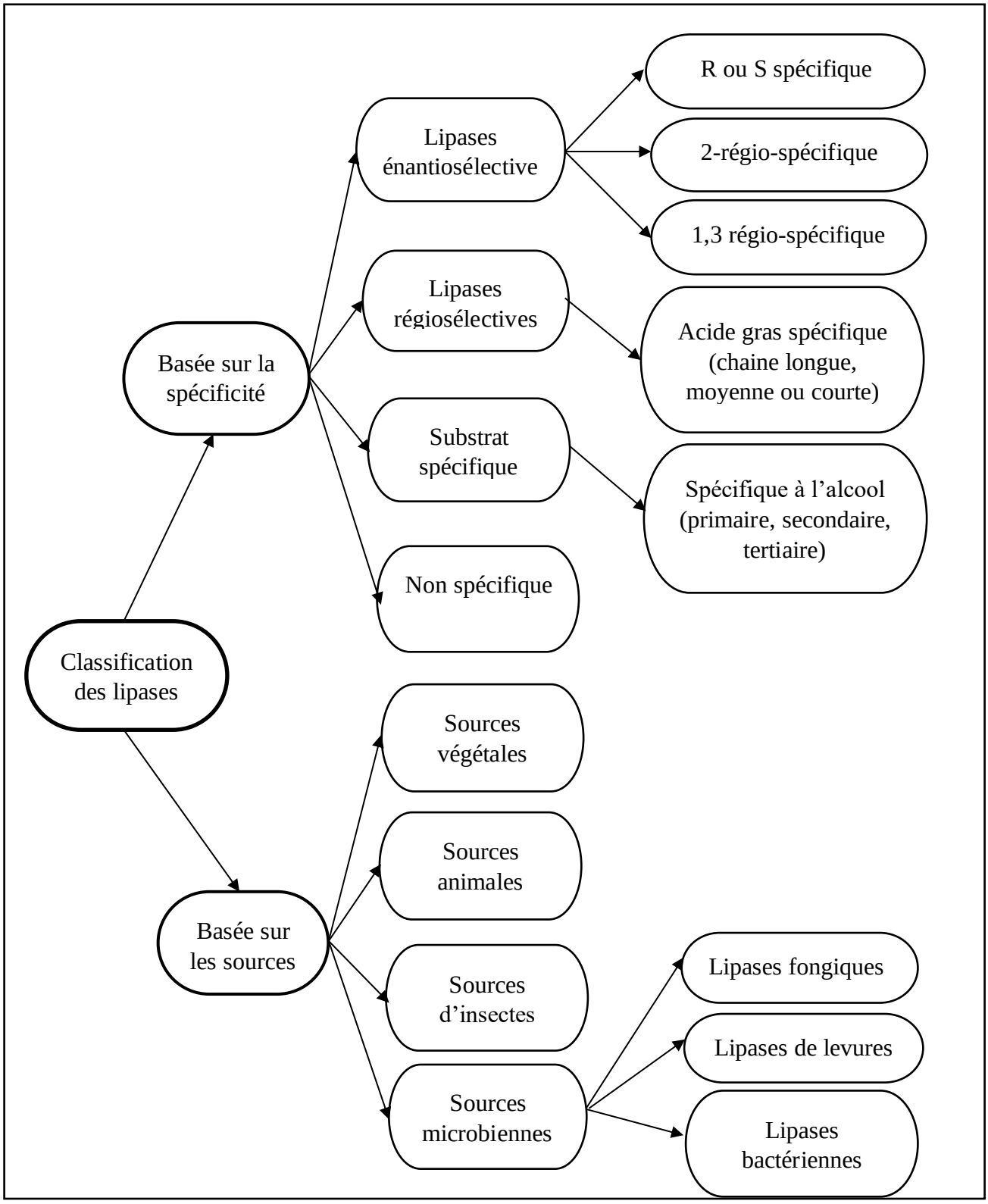
Figure I.1: Hydrolyse des liaisons esters des triacylglycérols par les lipases **[2].**

I.1.2 Classification :

En général, les lipases peuvent être classées en fonction de leurs spécificités et de leurs sources, comme le montre la figure I.2. La classification des lipases illustrée dans les sections suivantes, permet de mieux comprendre leur disponibilité, leur fonctionnalité et leur large applicabilité **[5]**.

La spécificité est un critère important pour décrire les applications industrielles des lipases, sur la base duquel elles peuvent être regroupées en trois catégories principales : (i) spécifique du substrat, (ii) régiosélective et (iii) énantiosélective **[5].**

Les lipases sont produites de manière omniprésente par les plantes, les animaux, les insectes et les organismes microbiens **[6,7]**.



Figures I.2 : Classification des lipases **[8].**

I.1.3 Structure :

Les premières structures de lipase ont été obtenues à partir de Rhizomucor miehei et de la lipase humaine pancréatique. Aujourd'hui, plusieurs centaines de séquences de lipases

sont répertoriées dans des bases de données. Cependant, ces 100 structures ne représentent que les lipases de 31 organismes, puisqu'une même lipase peut avoir plusieurs structures dans des conformations différentes ou avec des substrats différents **[9].**

Malgré leur faible identité de séquence primaire, les lipases présentent un pli très similaire. D'autres enzymes, telles que les estérases, les protéases, déhalogénases, les époxydes hydrolases et les peroxydases, présentent des caractéristiques structurelles similaires et dans l'ensemble, elles constituent la famille des α/β hydrolases.

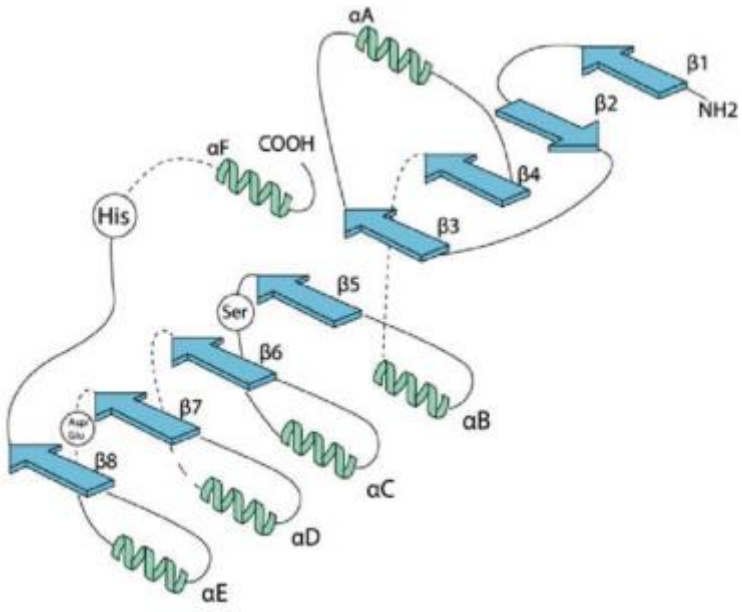


Figure I.3 : Représentation schématique d'une hydrolase de type α / β **[10].**

Le pli de l'α/β hydrolase est caractérisé par la présence d'un α/β central de β contenant huit β-strands parallèles, à l'exception de β2, qui est antiparallèle par rapport aux autres. Le feuillet β central présente une torsion super hélique de gauche, générant un angle de 90∘. Entre le premier et le dernier brin. Les brins β3 à β8 sont reliés par un faisceau d'hélices: les hélices A et F s'appuient sur la face concave de l'β8.contre le côté concave du feuillet β central, tandis que les hélices B, C, D, et E contre le côté convexe. Le site actif des α/β hydrolases consiste en une triade catalytique hautement conservée : un résidu nucléophile (sérine, cystéine ou acide aspartique), un résidu acide catalytique (acide aspartique ou glutamique), et un résidu histidine. Dans les lipases, le nucléophile a toujours été caractérisé comme un résidu de sérine **[11].**

I.1.4 Sources :

Les lipases sont produites de manière omniprésente par les plantes, les animaux, les insectes et les organismes microbiens **[12]** :

I.1.4.1 Sources végétales :

Les lipases sont largement répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou corps gras). Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante **[12]**.

La majorité des lipases végétales sont disponibles à partir de sources de graines, notamment ricin, haricot africain, orme, tournesol, noix physique, lupin, graines de lin, noix de coco, amande, noir cumin, grains de blé, riz, maïs, avoine, orge, sésame, sorgho, etc. Certaines de ces applications sont décrites dans le tableau I.1 Lipase supérieure l'activité est observées dans les graines que dans toute autre source car elles contiennent une concentration élevée de triacylglycérols et servent donc de source d'énergie pour la croissance des plantes **[8].**

Tableau I.1 : Lipases d'origine végétale **[8].**

Source de la lipase	Applications
Graine de ricin	Hydrolyse d'huiles végétales
Orge	Hydrolyse de substrats hydrosolubles de faible poids moléculaire et de triglycérides insolubles à longue chaîne Substrats et triglycérides insolubles à longue chaîne
Riz/son de riz	Hydrolyse préférentielle de la position sn-2 de la phosphatidylcholine
Amande	Hydrolyse de l'huile Dans les réactions impliquant des graisses et des huiles exigeant un sn-3
Haricot africain	Production de condiments fermentés tels qu'Iru, Soumbala, daddawa, sonsu, afitin, ugba
Graines de tournesol	Production de lipides structurés par action sur d'autres huiles
La noix de coco	Transformation de l'huile de coco
Avoine	Transformation de l'avoine
Vermonia sp	Spécifique à la trivernoléine
Cumin noir	Pour l'enrichissement de l'acide Γ-Linolénique dans les fractions d'acylglycérols non hydrolysésd'acylglycérols non hydrolysés des huiles contenant d'acide linolénique.

I.1.4.2 Sources animales et insectes :

Les cellules animales synthétisent des lipases qui permettent la digestion des graisses et des lipides. Cependant, les lipases animales sont plus souvent utilisées pour le diagnostic clinique que pour des applications commerciales. Production en raison de facteurs compliquant tels que la manipulation de la culture et la séparation des produits. Comparées aux lipases végétales et microbiennes, ces lipases sont beaucoup moins étudiées **[8].**

Tableau I.2 : Quelques espèces animales productrices de lipase.

Example de Lipase de source animales et insectes	Référence de l'espèce
Sus scrofa domesticus	**[13, 14, 15, 16]**
Hexaplexe trunculus	**[17]**
Gryllus bimaculatus	**[18]**
Thunnus orientalis, Totoaba macdonaldi, Morone saxatilis	**[19]**

I.1.4.3 Sources microbiennes :

Les lipases microbiennes comprennent les lipases fongiques, de levure et bactériennes. La polyvalence du microbien les lipases et leur facilité de production les rendent plus attractives pour les applications industrielles La spécificité exceptionnelle des lipases microbiennes en fait un outil puissant pour applications biotechnologiques, qui sont plus détaillées. La plupart des lipases microbiennes sont extracellulaire et dérivé d'espèces bactériennes et fongiques. Leur production est grandement influencée par la composition du milieu en plus de facteurs physico-chimiques tels que la température, pH et oxygène dissous. Plus de détails sur les lipases microbiennes peuvent être notés récemment ont rapporté des articles de synthèse couvrant l'aperçu des lipases microbiennes, alcalines microbiennes lipases et purification des lipases microbiennes. De plus, il a été récemment révélé que les lipases microbiennes peuvent également être obtenues par fermentation de déchets agricoles et déchets laitiers contribuant à la protection de l'environnement et pouvant être valorisés à des fins futures applications biocatalytiques **[8]**.

Tableau I.3 : Quelques espèces microbiennes productrices de lipase.

Espèce	Références
Yarrowia lipolytica	**[20,21]**
Saccharomyces cerevisiae	**[22]**
Burkhlderia cepacia	**[23]**
Candida antartica A	**[24]**
Bacillus sp	**[25]**

I.1.5 Réactions caractéristiques :

I.1.5.1 Réaction d'hydrolyse :

Les lipases catalysent naturellement l'hydrolyse de la liaison ester des tri-, di-, et monoglycérides en acides gras et en glycérol. Néanmoins, comme le montre la figure (Figure I.4), elles sont également actives sur une large gamme de substrats. Dans tous les cas, la réaction s'effectue à l'interface d'un système biphasique. Ce système biphasique résulte de la présence d'une phase organique non miscible, contenant le substrat hydrophobe, dans l'eau **[26]**.

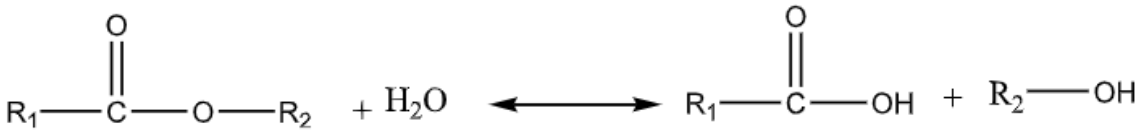


Figure I.4 : Réaction d'hydrolyse **[26].**

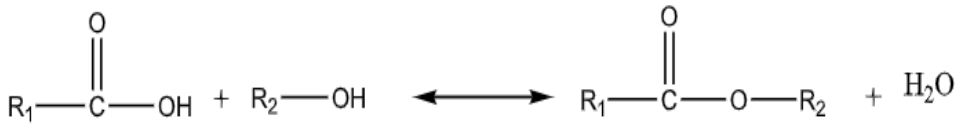
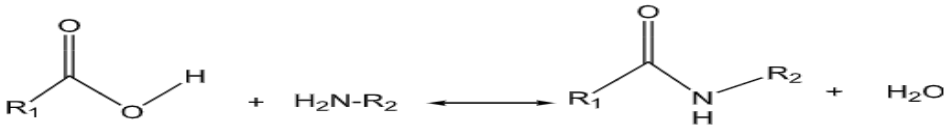
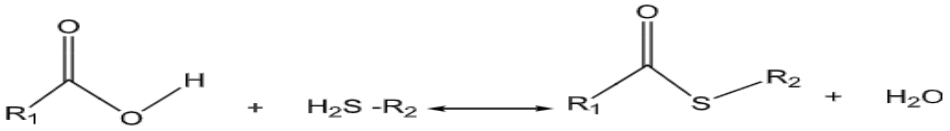
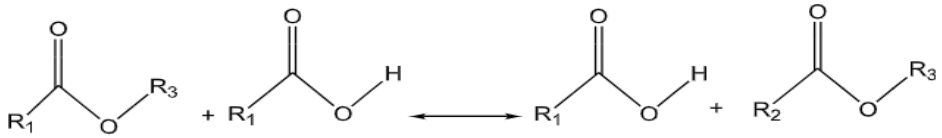
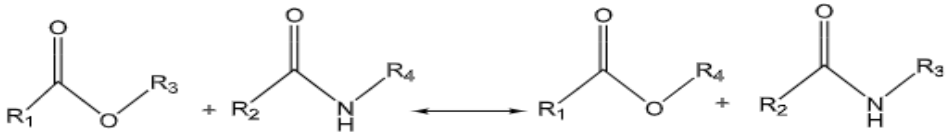
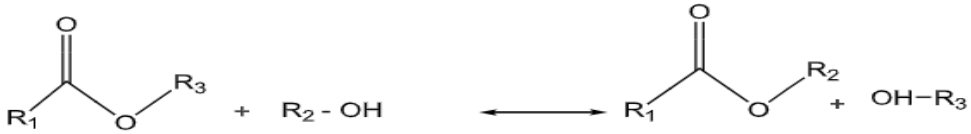
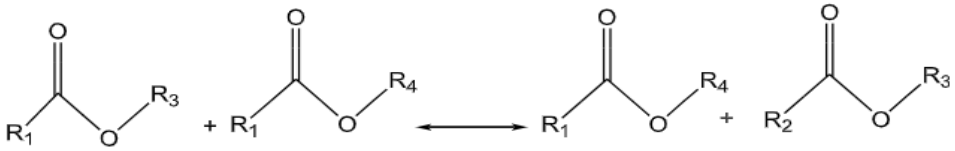
I.1.5.2 Réaction de synthèse :

Les lipases dans des conditions thermodynamiques favorables (faible activité de l'eau), catalysent également une grande variété de réactions de synthèse qui peuvent être classées en deux types principaux de réactions à savoir l'estérification et la transestérification. Comme le montre le tableau I.4, l'estérification est la réaction dans laquelle un acide gras est lié à un autre acide gras. Sous l'action de l'enzyme, à un alcool par une l'enzyme, à un alcool par une liaison covalente, produisant un ester et libérant une molécule d'eau. La Thio-estérification et l'amidation sont des réactions similaires mais avec un thiol ou une amine comme substrats **[26].**

La transestérification regroupe les réactions d'alcoolyse, d'acidolyse, d'aminolyse et d'interestérification. En général, ces réactions de synthèse se produisent dans un milieu à

faible activité thermodynamique de l'eau. L'activité thermodynamique de l'eau étant une mesure de la disponibilité de la molécule dans un solvant. Le milieu consiste alors en un système de solvant libre (milieu fondu) ou en un solvant organique. Enfin, les lipases sont également capables d'exprimer d'autres activités annexes telles que la phospholipase, la lysophospholipase, le cholestérol estérase, cutinase ou amidase **[26].**

Tableau I.4 : Réactions catalysées par les lipases **[27].**

Les Types principale de Réactions :	**Réactions catalysées par les lipases :**
1) Estérification :	Estérification : 
	Amidation : 
	Thioestirification : 
2) transestirification :	Réaction d'acidolyse : 
	Réaction d'aminolyse : 
	Réaction d'alcoolyse : 
	Réaction d'interestérification : 

I.1.6 Mécanisme d'action :

Le mécanisme catalytique moléculaire des lipases est décrit comme un mécanisme à deux substrats de type substitué ou << ping-pong>> et a été extrapolé de celui proposé pour la chymotrypsine **[28].** Ce mécanisme réactionnel implique les étapes d'acylation et de désacylation de l'enzyme (Figure I.5). L'acylation provient de l'attaque nucléophile (Figure I.5.A) d'une des fonctions ester carboxylique du substrat par la sérine de la triade catalytique. La fonction hydroxyle de la sérine, activé par le réseau de relais de charge Ser-His-Asp, attaque le carbone de la fonction ester carboxylique du substrat pour former un premier intermédiaire tétraédrique (Figure I.5.B). Les liaisons hydrogènes, entre l'oxygène chargé négativement (oxydation) de l'intermédiaire tétraédrique et des groupes peptidiques N-H, stabilisent la charge négative de l'oxydation **[29].** Cet environnement atomique et électronique est appelé << trou d'oxydation>>. Ce trou stabilise la structure tétraédrique et abaisse donc l'énergie d'activation de la réaction. Lors de cette catalyse acido-basique, la liaison ester carboxylique est rompue et le groupement alcool partant (R_2-OH) emporte un proton de l'ion imidazolium du résidu histidine. La chaîne acyle de la liaison ester du substrat reste liée de façon covalente à l'enzyme sous forme d'un intermédiaire acyl-enzyme (FigureI.5.C). La d'acylation provient de l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau (Figure I.5.D) pour donner un deuxième intermédiaire tétraédrique (Figure I.5.E). Ce dernier se dissocié en libérant le groupement acyl partant (R_1-COOH) et l'enzyme libre (Figure I.5.F). Tout comme dans l'étape d'acylation, le deuxième intermédiaire tétraédrique est stabilisé par le trou de l'oxydation **[30].**

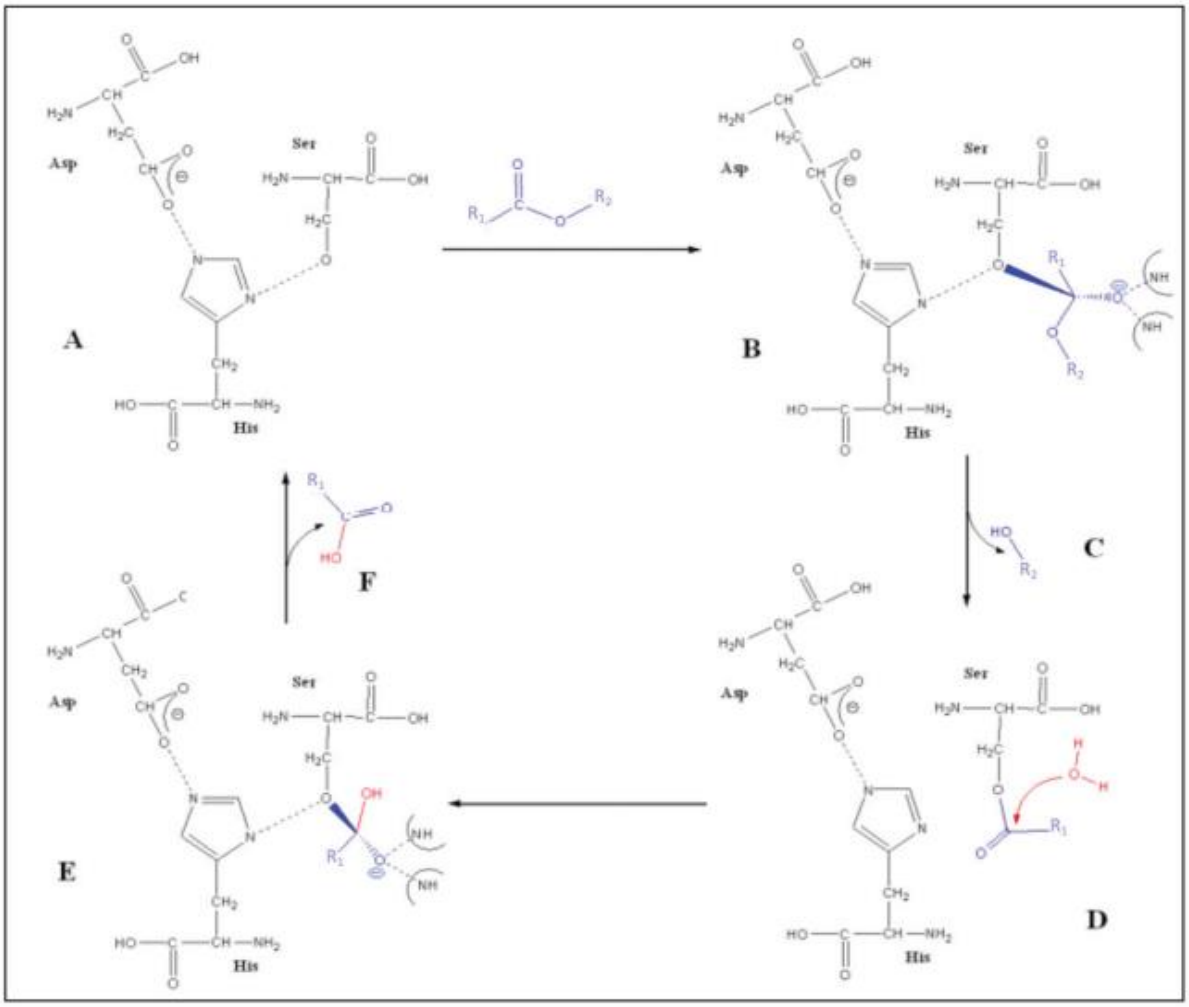


Figure I.5 : Mécanisme d'action catalytique des lipases. (A) Conformation initiale de l'enzyme. (B) Premier intermédiaire tétraédrique après attaque nucléophile de la serine. (C) libération du groupement partant (alcool) et formation de l'acyl-enzyme. (D) Attaque nucléophile par une molécule d'eau du carbone de l'acyl-enzyme. (E) Formation du second intermédiaire tétraédrique. (F) Libération de l'acide carboxylique qui régénère l'enzyme libre **[10].**

I.1.7 Application :

Les lipases sont capables non seulement de catalyser l'hydrolyse, mais aussi la synthèse de glycérides à longue chaîne en milieu peu hydraté. D'autres part, elles peuvent accommoder un grand nombre de substrats, ce qui leur associe d'importantes applications en biocatalyse (Figure I.6).



Figure I.6 : Diverses applications industrielles des lipases **[10].**

I.1.7.1 Détergents :

Les lipases utilisées dans les lessives ont pour rôle d'éliminer les corps gras provenant des fritures, beurres, sauces, huiles végétales, afin de se substituer aux produits chimiques et de développer des détergents respectueux de l'environnement. De ce fait, plusieurs travaux se sont intéressés à la recherche des lipases performantes et efficaces en tant que bio-additifs dans la formulation détergente **[31, 32, 33]**. Le nombre de brevets et de publications scientifiques sur les lipases détergentes n'a cessé d'augmenter au cours des années 1990. Par exemple, en 1994, certaines formulations détergentes, telles que Lumafast® de (Genecor Int.) et Lipomax® (Gist-Brocades) comprenaient des lipases du genre P Pseudomonas et qui sont toutes deux commercialisées. Quelques travaux ont montré l'efficacité des lipases thermo alcalines : une lipase Haloferax Méditerranée stable dans les détergents commerciaux **[34]**, la lipase de *Pseudomonas helmanticensis* HS6 **[31]**, et la lipase de *Bacillus licheniformis* **[35]**.

I.1.7.2 Industrie alimentaire :

Les graisses et les huiles sont des constituants importants des aliments. La valeur nutritionnelle et sensorielle et les propriétés physiques d'un TG sont fortement influencées par des factures telles que les positions sn de l'acide gras sur le squelette du glycérol, la longueur de la chaîne de l'acide gras et son degré d'instauration **[36]**. Les lipases grâce à leur régiosélectivité sont capables de modifier les propriétés des lipides en modifiant la localisation des chaînes d'acides gras dans les glycérides et en remplaçant un ou plusieurs acides gras par de nouveaux acides gras **[36,37]**. Ont rapporté la synthèse du 1,3-dioléoyl-2-palmitoylglycérol, un TG structuré qui pourrait remplacer la graisse du lait humain dans les préparations alimentaires pour nourrissons, par l'utilisation d'une lipase commerciale nommé Lipozyme TL (Thermomyces lanuginosus) **[38].** Dans l'industrie laitière, la lipase hydrolyse la matière grasse du lait ; cela pourrait grandement améliorer la saveur et le goût des produits laitiers et augmenter leur valeur nutritionnelle. La lipase peut également être utilisée pour améliorer la qualité des produits de boulangerie ; elle peut blanchir les pains plus foncés, améliorer le goût et la qualité des aliments cuits au four et prolonger leur durée de conservation **[39].**

I.1.7.3 Médecine :

Des études et des investigations intensives ont conduit les biotechnologistes à explorer les lipases dans la thérapie de substitution, ou la déficience enzymatique (en cas de maladie). Dans le corps humain, les lipases servent à la digestion des lipides alimentaires, facilitant ainsi leur absorption dans l'intestin. Ainsi, un déficit en lipases entraîne une malabsorption des graisses et des vitamines liposolubles **[40,41].** Pour remédier à ce problème, la thérapie de substitution des lipases pancréatique par voie orale a été suggérée **[42,43].** A titre d'exemple, la lipase de Yarrowia lipolytica active à des pH acides de 4 à 7 et stable à la pepsine, a montré son efficacité dans la digestion in vitro des TG dans un repas test. La lipase peut également contribuer au processus de résolution chirale des médicaments ; l'estérification sélective facilite la séparation du mélange racémique et l'isolement d'un seul énantiomère actif **[44].** En effet, plusieurs substances actives de médicaments, synthétisés chimiquement, tels que, le kétoprofène et l'alténolol se trouvent sous forme de mélanges racémiques et la lipase de Candida rugosa a montré également une efficacité dans la résolution de l'aténolol racémiques **[45].**

I.1.7.4 Traitement des eaux usées :

Le traitement des eaux usées est un énorme défi en raison de la forte production d'eaux usées de différentes industries, telles que l'industrie laitière, les abattoirs et les huileries, eaux qui sont très riches en matières grasses peu dégradables. Un traitement adéquat des eaux usées dépend de divers facteurs, tels que la source de rejet des déchets (par exemple, industriels, domestiques), la composition chimique (par exemple, les métaux lourds, la teneur en matières inorganiques et organiques). Par conséquent, l'hydrolyse de ces matériaux à l'aide de lipases peut améliorer l'efficacité du traitement des eaux usées. En effet, la lipase d'*Aeribacillus pallidus* a été recommandée pour l'élimination de l'huile des eaux usées **[46].**

I.1.7.5 Biodiesel :

Il est généralement produit par une réaction de transestérification ou d'interestérification (les réactions en dessous) catalysée chimiquement ou par voie enzymatique, à partir des huiles végétales et graisses animales, comestibles ou bon marché. Il peut également être produit par réaction d'estérification des acides gras avec un alcool à chaîne carbonée courte comme le méthanol ou l'éthanol. Ces réactions aboutissent à la formation d'un ester d'acides gras nommé biodiesel, qui représente une alternative renouvelable et moins toxique au diesel issu du pétrole **[47].**

Les lipases de *Candida rugosa* et *Pseudomonas fluorescens* ont été aussi utilisées pour la production de biodiesel **[48].**

I.2 Immobilisation des lipases :

I.2.1 Définition et principe d'immobilisation :

Les enzymes immobilisées sont des enzymes qui ont été liées à un support insoluble, comme des billes de gel ou des membranes, dans le but de faciliter leur utilisation dans des processus industriels ou biologiques et améliorer leur stabilité et leur capacité catalytique **[49].**

Le principe fondamental de l'immobilisation des enzymes est que ces dernières sont capables de maintenir leur activité catalytique même lorsqu'elles sont fixées sur une surface solide ou un support. Cette fixation peut être réalisée selon différentes méthodes, telles que l'adsorption, la covalence, le piégeage et la micro encapsulation **[50].**

I.2.2 Objectifs d'immobilisation :

Les objectifs principaux de l'immobilisation des enzymes sont les suivants :

- ✓ Améliorer la stabilité des enzymes : Les enzymes immobilisées sont généralement plus stables que les lipases solubles équivalentes. L'immobilisation protège en effet l'enzyme contre les conditions environnementales défavorables telles que les variations de pH, les températures élevées et les solvants organiques, ce qui permet d'allonger sa durée de vie et, par conséquent, de réduire les coûts de production **[51].**
- ✓ Permettre la réutilisation des enzymes : Il est possible de récupérer les enzymes immobilisées après leur utilisation dans un processus industriel, ce qui permet de les réutiliser économiquement et réduit la quantité de l'enzyme nécessaire pour la production **[52].**
- ✓ Améliorer la sélectivité des enzymes : Altérer les propriétés de l'enzyme, telles que son affinité pour le substrat, sa stéréosélectivité et sa régiosélectivité, ce qui peut améliorer la sélectivité de l'enzyme pour un substrat ou un produit spécifique **[53].**
- ✓ Augmenter la cinétique des réactions enzymatiques : Augmenter la vitesse des réactions enzymatiques en favorisant la concentration d'enzyme active près du substrat, en minimisant les effets de diffusion et en optimisant les conditions de réaction **[54].**
- ✓ Améliorer la résistance aux inhibiteurs et aux toxines : Protéger ces dernières contre les inhibiteurs et les toxines présents dans le milieu réactionnel, améliorant ainsi leur stabilité et leur durée de vie **[55].**
- ✓ Permettre l'utilisation des enzymes dans des environnements non aqueux : comme les solvants organiques, élargissant ainsi leur champ d'application dans les processus industriels [**52].**

I.2.3 Les principales méthodes d'immobilisation :

Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée à l'enzyme et la capacité de la matrice ou la technique de liaison, ainsi que la stabilité mécanique et chimique de la matrice, son coût, la difficulté de l'activation du support sont aussi importants dans le développement d'un système d'enzyme immobilisée.

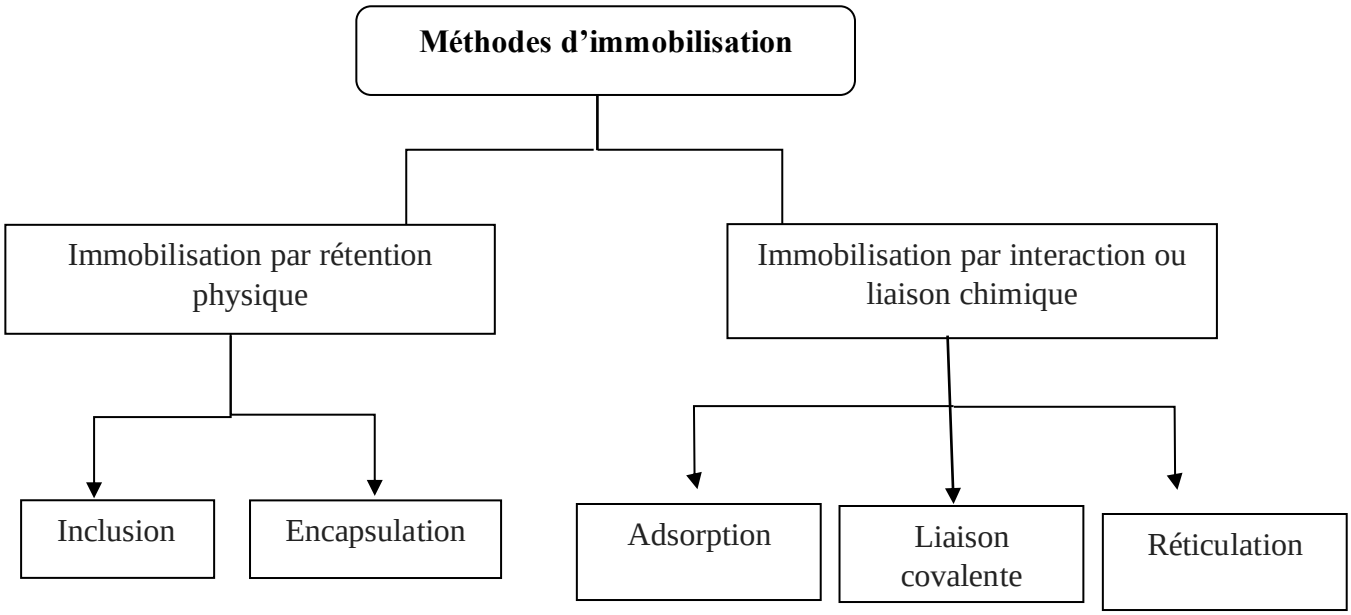


Figure I.7: Les méthodes d'immobilisation **[56].**

I.2.3.1 La liaison covalente :

Cette immobilisation est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupements réactifs du support (de type carboxylique COOH, amine NH_2 primaire, moins fréquemment hydroxyle OH ou thiol SH). Dans cette méthode, il est nécessaire d'activer soit les groupements de l'enzyme, soit ceux du support. Comme l'activation de l'enzyme engendre une perte d'activité il faut donc activer le support (Figure I.8) :

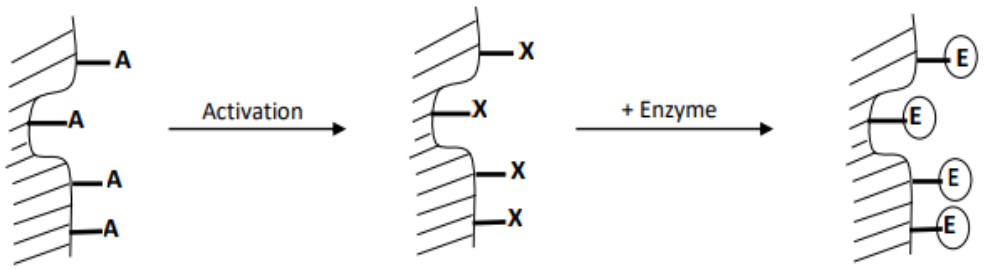


Figure I.8 : Technique d'immobilisation par liaison covalente **[57].**

Afin de lier l'enzyme au support par liaisons covalentes, on fait apparaître sur le support des fonctions chimiques réactives. Ces dernières peuvent être créées par réaction directe (cellulose + bromure de cyanogène) ou par greffage de composé bifonctionnel (bras espaceur) permettant de fixer l'enzyme à une certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat **[57].**

I.2.3.2 L'adsorption physique :

Dans cette méthode, les enzymes sont retenues à la surface d'un support insoluble minéral ou organique par établissement d'interactions non covalentes entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. Elle est obtenue par la mise en contact du support et des enzymes pendant une période définie (figure I.9) **[58].**

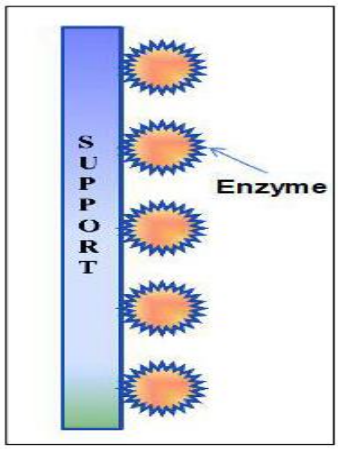


Figure I.9 : Technique d'immobilisation par l'adsorption physique **[58].**

I.2.3.3 L'encapsulation :

Cette méthode consiste à enfermer des enzymes dans une membrane semi-perméable. La limitation à des substrats de faible poids moléculaire pour l'enzyme, constitue le désavantage de cette méthode. Le second inconvénient est que la polymérisation interfaciale qui aboutit à la formation des microcapsules entraîne fréquemment une dénaturation des enzymes. Certains ont alors songé à utiliser des fibres creuses à travers lesquelles l'enzyme ne peut diffuser (Figure I.10) **[56].**

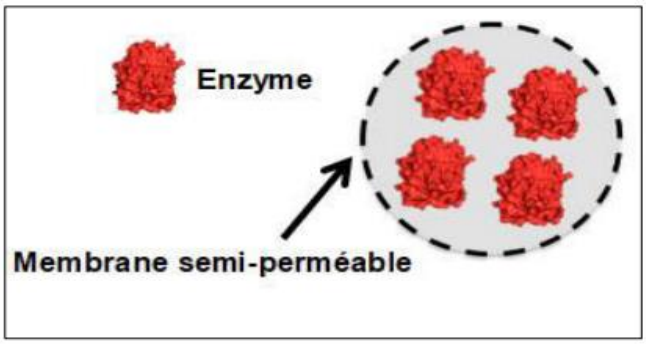


Figure I.10 : Technique d'immobilisation par micro-encapsulation dans une capsule **[57].**

I.2.3.4 L'inclusion :

Dans cette méthode, les enzymes sont retenues dans une matrice poreuse. L'enzyme est dispersée dans une solution homogène de monomères ou d'émulsion. La polymérisation du

monomère conduit à la formation d'un réseau au sein duquel l'enzyme est emprisonnée d'une manière purement physique. La réaction de polymérisation doit être réalisée dans des conditions les moins dénaturantes possibles. Le polymère peut être : polyacrylamide, polyéthylène glycol, polyavinyl pyrrolidone, amidon. La matrice peut être inorganique tel que l'argile (figure I.11) **[57].**

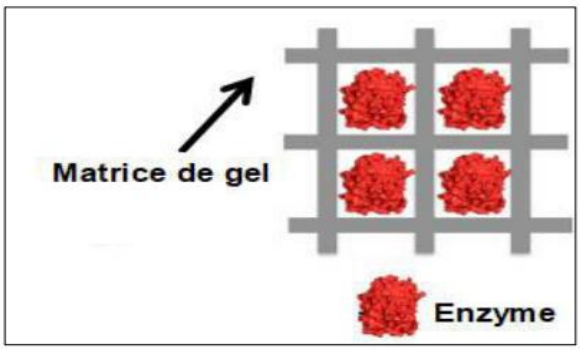


Figure I.11 : Technique d'immobilisation par inclusion dans une matrice de gel **[57].**

I.2.3.5 Réticulation et Co-réticulation :

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulant qui va permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons covalentes. Contrairement aux autres méthodes, il n'y a pas de matrice ou support **[58].**

Il existe deux méthodes de réticulation :

- ✓ **Réticulation (Cross-Linking) :** les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant formant des liaisons covalentes afin de donner un réseau enzymatique tridimensionnel et qui contrairement à l'enzyme seule, il est insoluble (Figure I.12) **[58].**

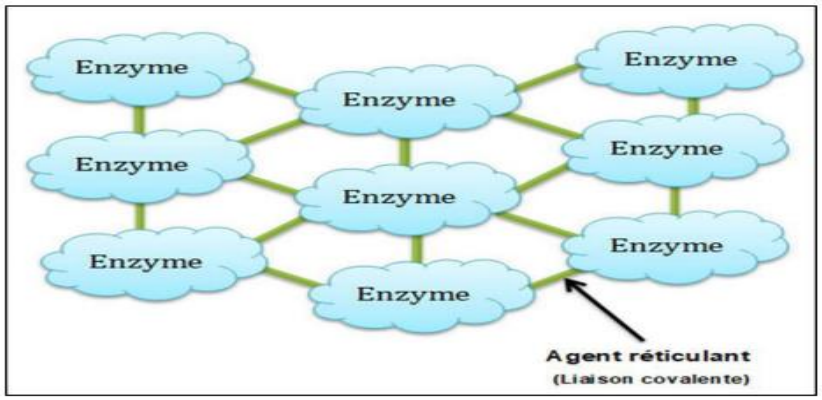


Figure I.12 : Technique d'immobilisation par cross linking **[58].**

- ✓ **Co-réticulation :** ce procédé consiste à associer à l'enzyme, en plus de l'agent réticulant bi ou multifonctionnel une protéine inerte afin de faciliter ou améliorer la réticulation. Le complexe formé possède une masse moléculaire élevée et il est insoluble. Le plus souvent, la protéine est l'albumine du sérum bovin (BSA) et l'agent réticulant est le Glutaraldéhyde (Figure I.13) **[58].**

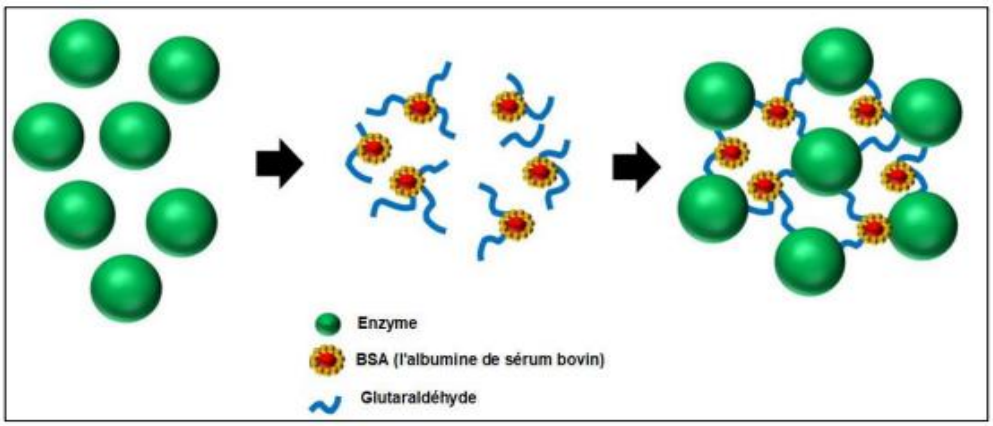


Figure I.13: Technique d'immobilisation par Co-réticulation **[58].**

- ✓ **Caractéristiques des agrégats d'enzyme réticulés (CLEAs) :**

Il existe plusieurs réactifs (agents réticulant) pour cette méthode d'immobilisation : glutaraldéhyde, diazobenzidine, hexaméthylène, diisocyanate et toluène diisothiocyanate.

- ✓ Glutaraldéhyde est l'agent réticulant le plus utilisé.
- ✓ L'immobilisation par réticulation est une technique simple et couteuse.
- ✓ L'inconvénient de cette méthode est le risque de dénaturation de l'enzyme par des réactifs polyfonctionnels **[58].**

- ✓ **Avantages et inconvénients des CLEAs :**

Le principal avantage de cette méthode est :

- Sa simplicité,
- Elle offre une bonne stabilité du système d'immobilisation.

Quelques inconvénients sont présents :

- Cette technique nécessite de grandes quantités d'enzyme (pour avoir une réticulation suffisante et bonne on aura recours à l'utilisation d'une concentration élevée d'enzyme),

- Cette technique est associée à une certaine diminution d'activité enzymatique (pour remédier à cet inconvénient il est préférable d'opter pour la Co-réticulation, qui grâce à la protéine inerte permet d'éviter un contact trop étroit entre les molécules enzymatiques) **[58].**

Chapitre II

La lipase de ricin

II.1 La plante de ricin :

II.1.1 Définition :

Le ricin est une plante appartenant à la famille des Euphorbiacées. Bien que la genre *Ricinus* comprenne une seule espèce *(communis*), il affiche toutefois une variation considérable, notamment par sa taille, sa longévité, la forme et la taille du fruit et de la graine, ainsi que les dessins et la couleur du tégument **[15].**

Le nom scientifique de l'espèce est *Ricinus communis L* **[59].** Le ricin est appelé également kharouâa en arabe, ricin en français et castor plant ou castor oïl plant en anglais **[60].**



Figure II.1 : Ricin commun (*Ricinus communis*) - Jardin botanique Val Rahmeh-Menton **[61].**

II.1.2 Description :

Le ricin (*Ricinus communis*) est une plante de la famille des Euphorbia-ceae, probablement d'origine asiatique, qui a été introduite au Brésil par les Portugais. En raison de sa grande adaptabilité, on la trouve partout sur le territoire brésilien. Comme la plupart des plantes tropicales, la culture du ricin est très adaptée à des températures comprises entre 20 et 30° Cet à un fort ensoleillement. Dans les régions semi-arides du Brésil, ce végétal a une place spéciale parmi les autres oléagineux, en particulier grâce à sa tolérance à la sécheresse et à ses facilités de traitements, avantage important vis-à-vis des exploitations familiales. Il y a presque 30 ans, le Brésil était le premier producteur mondial de graines de ricin **[62].**

Cette plante peut prendre la forme d'un arbre ou d'un arbrisseau (Fig. 1A) selon les conditions climatiques de la région. Elle peut être vivace avec 10–13 m de hauteur sous les tropiques, avec une tige de 7–15 cm de diamètre, mais elle se comporte souvent comme une plante annuelle dans les régions tempérées avec 1–3 m d'hauteur **[63].** Les feuilles sont alternes, orbiculaires, glabres, composées palmées, de 1–6 dm de large et avec 6–11 lobes dentés (Fig. 1B). Cette plante présente de nombreuses fleurs réunies en inflorescences racémeuses, avec des fleurs mâles à la base (Fig. 1D) et des fleurs femelles à l'extrémité (Fig. 1C).

Elles sont apétales chez les deux sexes, avec trois à cinq sépales verdâtres. Les fleurs mâles comportent de nombreuses étamines (cinq à dix), et les fleurs femelles comportent un ovaire supère, tri carpellaire avec un style court et trois stigmates. Le fruit est une capsule sphérique de 2,5 cm de diamètre, souvent épineuse, de couleur verte virant au brun à la maturation (Fig. 1E). C'est un fruit sec déhiscent (Fig. 1F).

Il renferme généralement trois graines ovoïdes, brillantes, de 0,5–1,5 cm de long avec une caroncule de couleur blanche. Les graines (Fig. 1G) sont de couleurs variées : gris, brun, jaune, marron, rouge ou noir, finement pointillées ou à grandes tâches **[15].**



Figure II.2 : Appareils végétatif et reproducteur du ricin. A. Port général de l'arbuste. B. Feuilles composées palmées. C. Fleurs femelles. D. Fleur mâle. E. Fruits immatures. F. Fruit mature. G. Grains **[15].**

II.1.3 Origine :

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 **[64].**

Actuellement, l'Inde y domine le marché mondial de manière écrasante, en fournissant presque de 70 % (830 kt/an) des graines disponibles dans le monde. Elle est suivie de la Chine qui, rappelons-le, a importé la culture du ricin depuis l'Inde il y a environ 1 500 ans, avec 18 % de la production mondiale (210 kt/an), soit près de quatre fois moins que l'Inde. Malgré ce deuxième rang, la production ne suffit pas à alimenter le marché interne et la Chine est un importateur net. Le troisième acteur significatif du secteur est le Brésil, avec environ 8 % du marché mondial (91,5 kt/an), alors qu'il était à la première place il y a une trentaine d'années. Les autres producteurs ne représentent chacun guère plus de 1 % de la production mondiale. Notons que l'Egypte et l'Ethiopie, bien que berceaux historiques suppos est du ricin, n'ont pas tire parti par la suite de cette ressource potentielle de revenus et se cantonnent maintenant à de petits volumes, très largement dépassés par l'Inde et la Chine. Par ailleurs, notons que les Etats-Unis comptés parmi les plus importants producteurs de ricin, mais les circonstances économiques de 1972 les ont relégués au statut d'importateur et ils dépendent maintenant de l'étranger pour leur approvisionnement **[65].**



Figure II.3 : Origine de ricin.

II.1.4 Nomenclature :

- ✓ Anglais: Castor plant, castor oil plant, Palma Christi (Leo et al., 2009);
- ✓ France : Ricin (Maroyi, 2007) ;
- ✓ Nom arabe : Wriwra, Kran'k, Tazart ûchan, Wararû, Wrûri, Wayrûrû (Jalal et al. 2000), Khareoua, Sakta ou meskouta (graine) (Hammiche, 2013) **[66].**

II.1.5 La culture du Ricin en Algérie :

Depuis 1881 la culture du ricin n'a existé qu'à titre de tentatives infructueuses. Cependant le *Ricinus communis* pousse librement dans le lit des Oueds du littoral ; sur les Hauts-Plateaux et l'Atlas, il ne peut résister à la rigueur des hivers, mais il réapparaît très abondant dans la zone saharienne **[67].**

En 1929, les plantations d'Oued Rhiou existaient toujours. La teneur en huile des graines a été de 46,98 % soit 60,52 % du poids de l'amande et les rendements à l'hectare ont été de 1250 kg en coques la première année, soit 800 kg de graines nettes. Un nouvel essai était en projet pour 1930. Des graines provenant de la Station expérimentale de Chlef et issues du R. Sanguin de Vérone introduit en 1927, devaient être distribuées aux agriculteurs qui en avaient fait la demande. Les graines de Ricin Sanguin cultivées dans les plaines, cependant très fertiles, de la Mitidja et du Bas-Chelif sont moins grosses et moins riches en huile que les graines de la même variété récoltées sur les dunes d'Agadir et de Mogador (Maroc) **[68].**

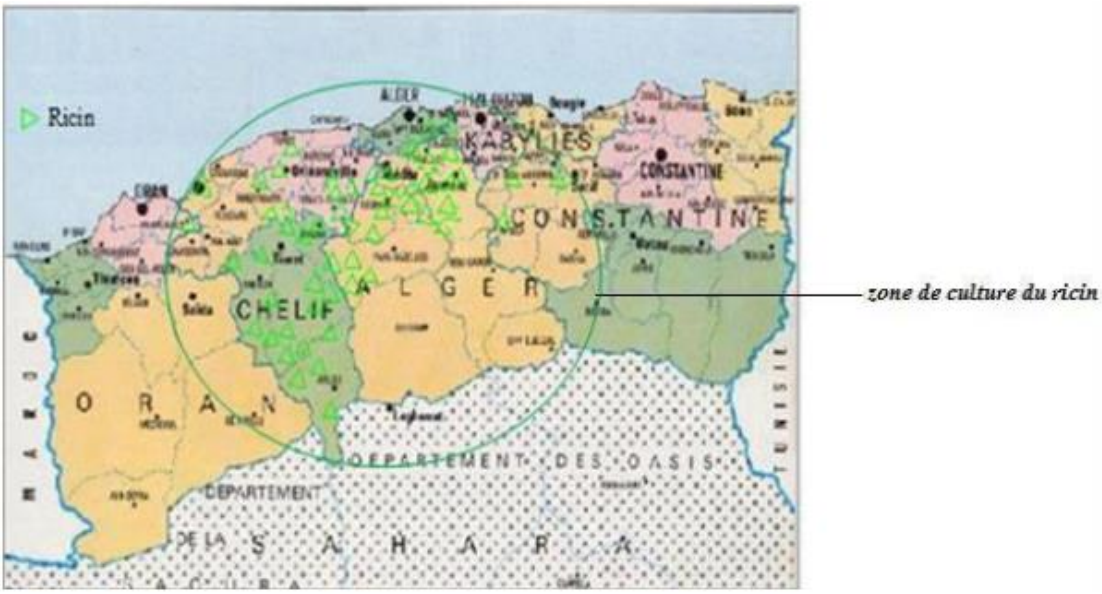


Figure II.4 : Situation géographique de la culture du Ricin en Algérie sous le colonialisme Français **[69].**

Après l'indépendance, la culture du Ricin a rarement préoccupé le cultivateur Algérien et reste toujours classer comme plante endémique. Les essais qui ont été faits avec cette Euphorbiacée n'ont pas été heureux. Il faudrait attribuer la cause de ces échecs réitérés aux gelées printanières et aux grêles, puis aux exigences de la plante en eau d'irrigation pendant l'été pour assurer des rendements moyens. La cueillette impose l'emploi d'une main - d'œuvre assez considérable.

II.1.6 Les Caractéristiques :

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 **[64].**

II.1.6.1 Caractéristiques des graines :

- ✓ Couleur : Fond blanc presque invisible. Nombreuses marbrures brun foncé, généralement en forme de rayes, quelquefois en forme de petites taches. Teinte générale, brun foncé.
- ✓ Forme : Ovoïde. Caroncule de grosseur moyenne **[64].**



Figure II.5 : Les graines de ricin.

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.

Les graines sont riches en huile et en protéines :
40 à 60 % d'huile,
15 à 20 % des protéines
et contiennent une toxalbumine très dangereuse : la ricine.

II.1.6.2 Caractéristiques de plante de ricin :

Elle possède :

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



Figure II.6 : La tige de ricin.

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



Figure II.7 : Les feuilles de ricin

- ✓ Fleurs : sont monoïques, forment de grosses grappes redressés, rameuses ; les fleurs mâles sont situées dans le bas de l'inflorescence, composées d'un calice de cinq pièces sans corolle et de groupes nombreux d'étamines monadelphes verdâtre, comme ramifiées ; les fleurs femelles ont seulement trois folioles au calice, et au-dessous de petites écailles ; un ovaire globuleux hérissé, surmonté de trois pistils longs, rouges, hispides.



Figure II.8 : Fleurs du plant de ricin.

- ✓ Fruits : sont des capsules tricoques (formé de 3 lobes) hérissées de pointes et plus ou moins déhiscentes à maturité en saisons sèche. Les capsules renferment généralement 3 graines de couleur marron clair, marron rouge ou gris tacheté de blanc.



Figure II.9 : Les fruits de ricin.

- ✓ Graines : sont contenues dans chacune des loges du péricarpe, ont presque la forme d'un haricot moyen, sont piriformes, ovoïdes, allongées ou plates, luisantes marbrées de gris rougeâtre et de blanc.

A l'intérieur de la graine se trouve une amende oléagineuse qui est très toxique **[70].**



Figure II.10 : Les graines de ricin.

II.1.7 Utilisation ou les applications de la plante de ricin :

Le ricin est une plante aux multiples usages, bien que certaines parties soient hautement toxiques. Voici les principales utilisations du ricin et de son huile :

II.1.7.1 Médecine et santé :

- L'huile de ricin est un puissant laxatif, utilisé comme purgatif **[71,72].** Cependant, son usage interne est déconseillé sans avis médical.
- Appliquée en cataplasme, l'huile de ricin a des vertus anti-inflammatoires, analgésiques et antibactériennes, notamment pour traiter rhumatismes, douleurs musculaires et articulaires **[71].**
- Les feuilles fraîches écrasées s'utilisent aussi en cataplasme pour leurs propriétés émollientes **[72].**

II.1.7.2 Cosmétique :

- L'huile de ricin est largement utilisée dans les soins des ongles, cheveux et cils pour ses bienfaits **[71,72].**
- C'est un ingrédient courant dans de nombreux produits de beauté à usage externe **[71].**

II.1.7.3 Ornementation :

- Le ricin est fréquemment cultivé comme plante ornementale pour son aspect exotique, avec ses grandes feuilles palmées et ses fruits rouges épineux **[73].**
- Il s'intègre bien dans les massifs ou en arrière-plan isolé **[73].**

II.1.7.4 Autres usages :

- L'huile de ricin était autrefois utilisée comme combustible pour l'éclairage.
- Elle sert aujourd'hui de lubrifiant dans les moteurs de voitures de course et modèles réduits **[4].**
- En culture bio, le ricin repousse les doryphores lorsqu'il est intercalé entre les pieds de pomme de terre.

Cependant, il faut garder à l'esprit que le ricin est une plante toxique, en particulier les graines qui contiennent de la ricine, un poison redoutable **[71,74].** Son ingestion, même en petite quantité, peut être mortelle, surtout chez l'enfant **[74].** Son huile doit donc être utilisée avec précaution, uniquement à usage externe.

II.2 La lipase de ricin :

II.2.1 Extraction de la lipase de Ricin (*Ricinus communis*) :

L'extraction a pour but de libérer les enzymes des cellules ou structure subcellulaire au sein desquelles 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.

Tableau II.1 : Les méthodes d'extraction de la lipase de ricin **[81,82].**

Les Méthodes	Conditions	Rendement	Référence
Extraction a l'éthanol	Graines de ricin broyées, mélangées avec l'éthanol froid, agitation, centrifugation.	70-80% de la lipase totale	**[75]**
Extraction au tampon phosphate	Graines de ricin broyées, mélangées avec un tampon phosphate pH7, agitation, centrifugation.	80-90% de la lipase totale	**[76]**
Précipitation a l'acétone	Extrait de graines de ricin, ajout progressif d'acétone sous agitation, centrifugation.	60-70% de la lipase totale	**[77]**
Chromatographie d'affinité	Extrait purifie sur colonne d'affinité avec un ligand spécifique de la lipase, élution.	90-95% de la lipase totale	**[78]**
Extraction a l'eau	Graines de ricin broyées, mélangées avec l'eau distillée, agitation, centrifugation.	50-60% de la lipase totale	**[79]**
Extraction au sel	Graines de ricin broyées, mélangées avec une solution saline, agitation, centrifugation.	60-70% de la lipase totale	**[80]**

II.2.2 Applications de la lipase de ricin :

II.2.2.1 Applications de la lipase de ricin dans l'industrie alimentaire :

- Modification des graisses : la lipase permet de modifier la structure et les propriétés des graisses alimentaires.
- Maturation des fromages : elle accélère la maturation des fromages en hydrolysant les lipides.
- Amélioration de la texture : l'utilisation de la lipase peut améliorer la texture et la qualité de certains aliments.

II.2.2.2 Applications de la lipase de ricin dans l'industrie cosmétique :

- Emulsification des huiles : la lipase facilite l'émulsification des huiles dans les produits cosmétiques.
- Traitement de peau : certains produits de soin de la peau utilisent la lipase pour ses propriétés hydratantes et régénérantes.
- Fabrication des savons : la lipase est utilisée pour la production de savons doux et de haute qualité.

II.2.2.3 Applications de la lipase de ricin dans l'industrie pharmaceutique :

- Médicaments : la lipase est utilisée dans certains médicaments pour faciliter l'absorption des nutriments lipidiques.
- Tests de diagnostic : elle sert comme marqueur dans des tests de diagnostic lies aux troubles lipidiques.
- Recherche médicale : la lipase de ricin est un outil précieux pour les études sur les lipides et les maladies métaboliques **[12,83].**

II.2.3 Avantages de l'utilisation de la lipase de ricin :

La lipase de ricin offre plusieurs avantages dans son utilisation :

Elle présente une préférence pour les acides gras cis-9 insaturés comme l'acide oléique et l'acide linoléique présents dans l'huile de ricin. Elle a été utilisée pour l'enrichissement d'acyl glycérides en acide γ-linolénique à partir d'huile de bourrache 12. Elle est discriminante envers l'acide ricinoléique dans des réactions de transestérification en présence d'un alcool léger 5. Elle permet l'extraction bio sélective d'ester d'acide ricinoléique, et donc l'obtention d'une fraction enrichie en cet ester à partir de l'huile de ricin ou toute autre huile contenant des résidus d'acide ricinoléique. Elle est résistante à l'action dénaturante de l'acétone, ce qui la rend utile pour des applications en génie enzymatique. Elle peut être immobilisée sur résine pour être utilisée en continu dans des réacteurs à lit catalytique fixe, ce qui la rend utile pour la production de CLA (acide linoléique conjugué) **[84]**.

En résumé, la lipase de ricin est une enzyme très spécifique des triglycérides de l'huile de ricin, libérant l'acide ricinoléique qui a des propriétés laxatives. Elle présente aussi un intérêt pour des applications en synthèse organique et en enrichissement d'huiles en acides gras spécifiques.

II.2.4 Propriétés et caractéristiques de la lipase de ricin :

Plusieurs plantes ont été signalées avec une activité lipase élevée présentant plusieurs avantages tels qu'une haute disponibilité, notamment dans les graines oléagineuses, un faible

coût de production, une tolérance aux solvants organiques, ce qui ouvre plusieurs domaines d'application et une applicabilité. Les méthodes d'extraction sont assez simples à mettre en œuvre **[85].** Cependant, seulement environ 11 % des lipases isolées et traitées dans la littérature sont d'origine végétale en raison de la grande difficulté de caractérisation, compte tenu des processus laborieux de purification de cet extrait brut et de la perte d'activité dans le processus **[86]** et donc peu de ces lipases ont été caractérisée et il n'y a toujours pas de structure résolue d'une lipase végétale **[87].** Pour ces raisons, l'étude des lipases végétales comme alternatives présente un grand intérêt. Leurs propriétés biochimiques générales, y compris la masse moléculaire, la spécificité de substrats, le pH optimal, la température optimale et la stabilité de la lipase de ricin ont été étudiées et présentées dans plusieurs travaux :

- **Masse moléculaire :**

Il existe peu de littérature sur l'expression hétérologue des lipases végétales et seuls deux articles décrivant le clonage des lipases présentes dans les graines de ricin ont été trouvés **[88].** Connaissant l'activité lipase acide de l'endosperme de la graine, une des études a réalisé une analyse protéomique des corps lipidiques purifiés et a identifié une lipase présente dans leur membrane, d'une masse moléculaire d'environ 60 kDa. Son gène s'appelait Oil Body Lipase 1 (OBL1, faisant référence à corps lipidique en anglais) et cloné chez Escherichia coli **[89].**

Une lipase d'une masse moléculaire d'environ 38 kDa, appelée RcLipase, a été étudiée. Elle est présente après 4 jours de germination, qui a été clonée dans Pichia pastoris X-33 avec le vecteur pPICZα pour l'expression extracellulaire **[90].**

- **Spécificité de substrat :**

Les lipases de *Ricinus Communis L* présentent une spécificité de substrats bien définie :

- Elles ont une forte activité sur les triglycérides contenant des acides gras à chaînes courtes et moyennes, plutôt que sur ceux à longues chaînes. Par exemple, la triricinolléine est un très bon substrat (C18 :3) **[91].**
- Yue Li et *al* ont montrés que ces enzymes sont régiosélectives en position sn-1,3, hydrolysant préférentiellement les esters primaires des triglycérides plutôt que les esters secondaires en position sn-2. L'analyse HPLC a monté que l'enzyme

produit 21,3% d'acide oléique et 79,1% d'acide palmitique lors de l'hydrolyse des triglycérides **[92].**

- Elles peuvent hydrolyser à la fois des triglycérides naturels et synthétiques à longues chaînes **[92].**

- **pH :**

L'effet du pH sur l'activité lipasique de *Ricinus Communis L* a été étudié dans plusieurs travaux scientifiques. Il a été rapporté que ces enzymes ont une activité optimale à pH 8.0, comme montré dans l'étude de Yue Li et *al* **[93].** Une autre étude a également rapporté que l'activité lipasique de *Ricinus Communis* montrait un optimum à des valeurs de pH neutres, tandis que la plupart présentent une activité optimale à des pH acides entre 4et 4.5 **[94].**

- **Température et stabilité thermique :**

La température et la stabilité thermique de la lipase de ricin (*Ricinus Communis)* est un sujet étudié dans plusieurs travaux scientifiques :

- La température optimale pour l'activité de la lipase de ricin est généralement comprise entre 30 et 40 °C, comme indiqué dans la littérature **[91,95].** Plus précisément, des études ont montré que la lipase de ricin la température optimale pour l'activité de la lipase de *Ricinus Communis L* est de 40°C. Cependant, la température de 50°C réduit significativement l'activité de l'enzyme, alors que pour des températures dépassant 60°C l'enzyme devient inactive **[92].**
- Thermostabilité : Les lipases de ricin sont généralement peu thermostables. Elles peuvent perdre leur activité à des températures supérieures à 40-45°C. Les travaux de Yue Li et *al* montrent que la lipase peut conserver plus de 80% de son activité relative après incubation à 40°C pendant 12 heures, mais cette activité chute à environ 14% après incubation à 60°C pendant la même période **[92].**

- **Effet des ions métalliques :**

Les ions métalliques ont un effet significatif sur l'activité de la lipase de ricin (*Ricinus Communis L*). Yue Li et *al* ont examinés l'impact de divers ions métalliques sur l'activité de la lipase de ricin. Les résultats montrent que les ions Zn^{2+} et Cu^{2+} ont exercés des effets inhibiteurs évidents sur l'enzyme. Après 2 h, l'activité de la Lipase a diminué de 53 % et 40 %, respectivement. Les résultats rapportés par SU Er-zheng et *al* ont indiqué que la lipase

acide purifiée n'était pratiquement pas affectée par Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+} et Sn^{2+}. L'enzyme était inhibée en présence de Zn^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+} et Cu^{+}. Tandis que, les ions Mn^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Al^{3+} et Li^{+} ont relativement activé l'enzyme **[94].**

- **Effet du solvant :**

L'étude de l'effet des solvants sur l'activité de la lipase extraite de *Ricinus Communis* L est un domaine de recherche intéressant, notamment pour ces applications en biotechnologie et en biochimie. L'étude de SU Er-zheng et *al* a montré que la lipase été inhibée par le méthanol, l'éthanol, le propanol-2- et le butanol, tandis qu'elle est restée active dans l'hexane, isooctane et le benzene **[94].** Ces résultats sont confirmés par l'étude de Debajyoti Goswami et *al*, tel que les meilleurs résultats sont trouvés avec les solvants organiques hydrophobes **[95].**

Partie expérimentale

III.1 Objectif:

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité hydrolytique d'une lipase extraite à partir d'une source végétale, sous forme libre et agrégat, sur les lipides et plus particulièrement les triglycérides. Donc, notre but est l'étude de la stabilité thermique et chimique de la lipase de ricin et la détermination des conditions optimales permettant l'obtention d'un rendement maximal de la réaction catalytique. Pour cela, la stratégie expérimentale adoptée consiste à étudier l'effet d'un seul facteur à la fois pour l'étude de stabilité, et détermination de la valeur optimale pour le rendement. Un type de réactions d'hydrolyse catalysées par la lipase sera étudiés.

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

- La première partie nécessite une préparation préalable de la lipase en commençant par l'extraction, la purification et en terminant par la mise en évidence et la mesure de l'activité.
- La deuxième partie présente une étape primordiale dans toute étude enzymatique, l'étude de la stabilité thermique et chimique (pH, température, la concentration du substrat d'huile d'olive et d'autre huiles végétales " triglycérides ", les ions métalliques, solvants polaires, temps de réaction et la concentration d'enzyme) sous forme libre, permettant l'obtention des conditions optimales pour l'hydrolyse du substrat.
- La troisième partie s'intéresse essentiellement aux études de stabilité de cette lipase sous forme agrégats (pH, température, la concentration du substrat d'huile d'olive et d'autre huiles végétales " triglycérides ", les ions métalliques, solvants polaires, temps de réaction et la concentration d'enzyme).

III.2 Matériels et Réactifs :

III.2.1 Matériels :

En plus de la verrerie de laboratoire de chimie, les différents matériels utilisés lors de cette étude sont présentés dans le (tableau III.1).

Tableau III.1: Appareillages utilisés.

Appareil	Photo	Type et emploi
Balance électronique		Type:KERN Emploi: Pour faire la pesée des réactifs.
Agitateurs		Type: UC152-stuart Emploi: Agitation des milieux réactionnels.
Centrifugeuse		Type : Hettich EBA 20 Emploi : Centrifugation des préparations
pH mètre		Type : starter 3100 Emploi : pour mesurer l'acidité ou la basicité d'une solution
Bain marie ou étuve		Type : moment Emploi : pour la mise en température d'échantillons ainsi que pour le traitement thermique des solutions.
Vortex		Type : Heidolph Emploi : pour mélanger de petites fioles de liquide
Spectromètre UV		Type : Emploi : pour mesurer la concentration d'une molécule en solution.

III.2.2 Réactifs :

- **Enzyme :** Dans le présent travail, la lipase (EC. 3.1.1.3) utilisée est de source végétale extraite à partir les graines de ricin (*Ricinus communis L*). La méthode d'extraction et de purification est décrite dans le paragraphe III.3.

- **Substrat :** Huile d'olive (triglycérides) :

L'huile d'olive est la matière grasse extraite des olives, Elle est composée d'environ 99 % de matières grasses. Le 1 % restant constitue les composés mineurs.

La réaction d'hydrolyse des lipides a été choisie comme réaction type pour la caractérisation de l'enzyme de ricin. 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 contiennent une quantité particulièrement élevée d'acides gras mono insaturés qui représentent 80 % de son contenu en lipides. Ceux-ci sont constitués d'acides gras de différentes sortes, dont la répartition est caractéristique de l'huile d'olive, et à un niveau de détail plus poussé, des différentes variétés ou du lieu de production. La teneur en chacun de ces acides gras, et plus particulièrement l'acide oléique, ne doit pas être confondue avec l'acidité d'une huile, qui s'exprime en grammes d'acide oléique libre pour 100 grammes d'huile **[96].**

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

- Point de fumée : 210 °C ;
- Point d'ébullition : 300 °C ;
- Masse volumique : 0,9g/cm3 ;
- Viscosité dynamique à 20 °C : 84cP ;

L'huile d'olive vierge est composée principalement de :

- 99% de lipides ;
- 55 à 80 % d'acides gras mono insaturés (acide oléique) ;
- 8 à 25 % d'acides gras saturés (acides palmitique et stéarique) ;
- 4 à 22 % d'acides gras polyinsaturés (acides linoléique et alpha-linoléique) ;
- Vitamine E : 150 mg/kg ;
- Polyphénols : 2,5 mg/kg ;

- β-carotène: 0,5-10 mg/kg **[34];**

❖ **Solutions tampons :**

-Solution tampon pH 2,0 préparé par chlorure de potassium à 0,01M ;

-Solution tampon pH 3,0 ; 4,0 et 5,0 préparé par biphthalate de potassium à 0,01M ;

-Solution tampon pH 6,0 et 7,0 préparé par phosphate monopotassique à 0,01M ;

-Solution tampon pH 8,0 ; 9,0 ; 10,0 préparé par chlorure de potassium à 0,01M et l'acide borique à 0,01M.

En ajustant le pH des solutions en utilisant les solutions de NaOH (0.2N) et HCl (0.2N), pour les différentes valeurs de pH étudiées (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

❖ **Autres réactifs :**

Un seul type de réaction enzymatique a été étudié dans ce travail, c'est la réaction de synthèse d'hydrolyse.

Selon ce type de réaction, on cite les réactifs utilisés :

Tableau III.2 : Substances chimiques utilisées au cours de la synthèse d'hydrolyse.

Réactifs	Formule	Masse molaire (g/mol)
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	110,984 ± 0,008 g/mol
Éthanol	C_2H_6O	46,068 4 ± 0,002 3 g/mol
Acétone	C_3H_6O	58,079 1 ± 0,003 1 g/mo
Hydroxyde de sodium	NaOH	39,997 1 ± 0,000 4 g/mol
Phénolphtaléine	$C_{20}H_{14}O_4$	318,322 8 ± 0,018 2 g/mol
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	C_2H_6OS	78,133 ± 0,007 g/mol
Méthanol	CH_4O	32,041 9 ± 0,001 4 g/mol
Butanol	$C_4H_{10}O$	74,121 6 ± 0,004 2 g/mol
Propan-2ol	C_3H_8O	60,095 ± 0,003 3 g/mol
Acide phosphorique 88%	H_3PO_4	97,995 2 ± 0,001 4 g/mol
Bleu de Coomassie	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	825,967 ± 0,052 g/mol
Sulfate de magnésium	$MgSO_4$	120,368 ± 0,007 g/mol
Sulfate de manganèse	$MnSO_4$	151,001 ± 0,006 g/mol
Sulfate de zinc	$ZnSO_4$	161,44 ± 0,03 g/mol
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	110,984 ± 0,008 g/mol
Chlorure de cuivre	$CuCl_2$	134,452 ± 0,007 g/mol
Chlorure de fer	$FeCl_2$	126,751 ± 0,006 g/mol

- Autres huiles végétales utilisées pour l'effet du substrat (soja, tournesol, coconut) ;

III.3 Préparation du l'extrait enzymatique brute :

III.3.1 Extraction de la lipase brute :

- **Mode opératoire :**

Le matériel végétal qui est les graines de ricin décortiquées, a été broyé à l'aide d'un pilon et d'un mortier avec l'addition d'eau distillée. Le mélange a été ensuite filtré sur une gaze. Les étapes de broyage, de filtration d'extrait enzymatique sont représentées sur la figure III.1 :

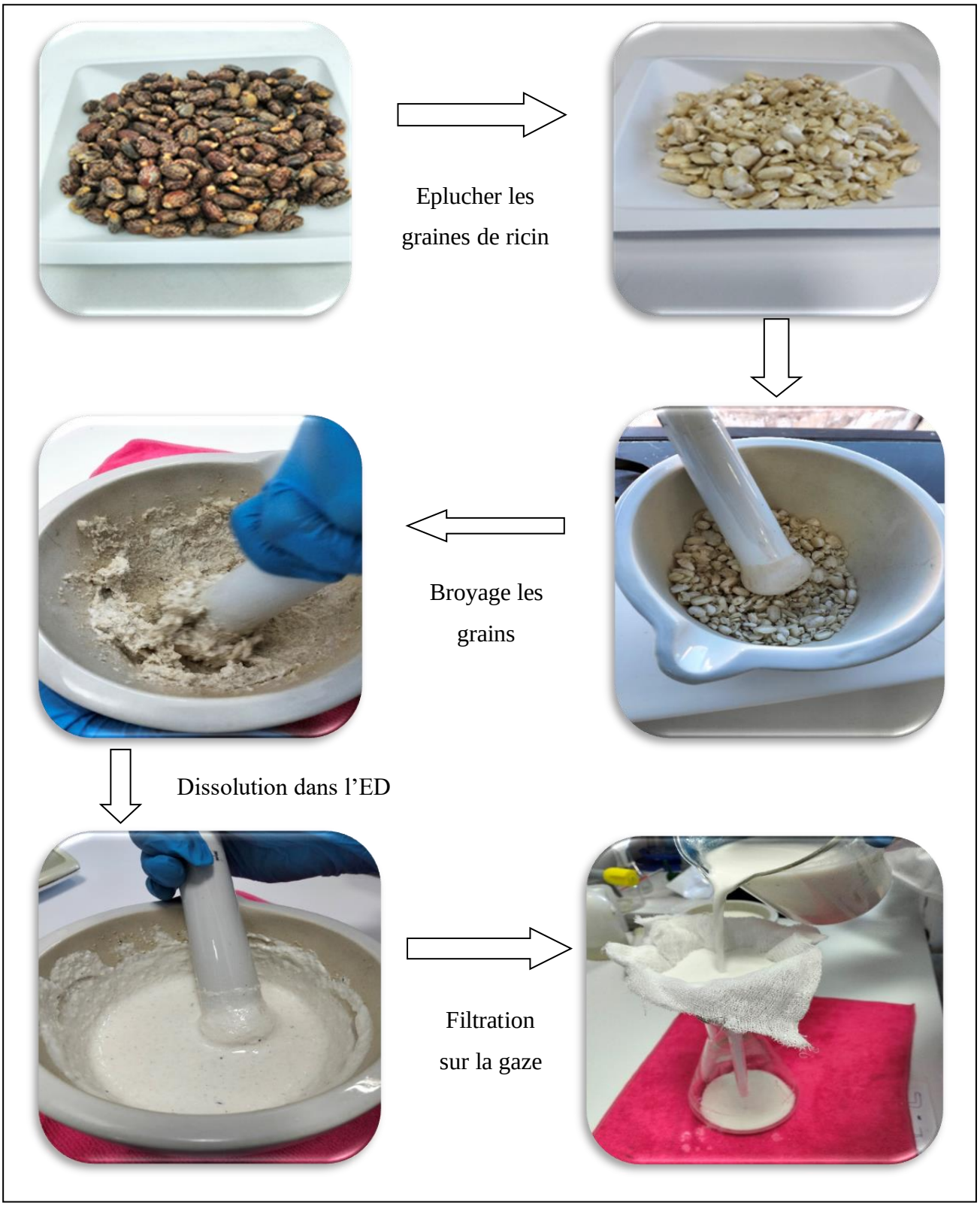


Figure III.1 : Les étapes d'extraction de la lipase brute.

III.3.2 Purification partielle de la lipase :

- **Mode opératoire :**

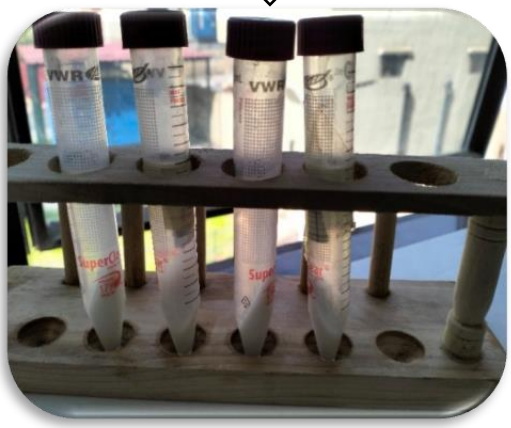
La purification de l'enzyme a été réalisée à 4°C comme suit **[35]** : trois volumes d'acétone glacial sont versés goutte à goutte dans un volume de l'extrait brut disposé sous agitation dans la glace pilée. Une fois l'acétone est versée totalement, le mélange (extrait brute -acétone) est laissé dans 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). La lipase semi-purifiée est souvent stable et doit être généralement conservée dans sous des conditions la protégeant de la dégradation chimique et biologique, dans un récipient en verre, hermétiquement fermé et enveloppé à l'aide de papier aluminium. L'EEPP peut être conservé dans le réfrigérateur pendant plusieurs semaines. Les étapes de purification sont illustrées dans la figure III.2 :



Ajout de l'acétone goutte à goutte



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 (Extrait enzymatique partiellement purifiée (EEPP)).

Figure III.2 : Etapes de purification partielle de la lipase par précipitation à l'acétone.

III.4 Mesure de l'activité enzymatique d'EEPP :

❖ **Mode opératoire :**

L'activité enzymatique (AE) d'une lipase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire, par hydrolyse d'une matière grasse, 1µmol d'acide gras libre par minute. Elle est déterminée par la méthode titrimétrique d'huile d'olive. Le principe consiste à titrer par la soude les acides gras libérés par la lipase **[96, 97,98].** La réalisation du test lipasique se fait dans les conditions standards (température ambiante, pH 7), le milieu réactionnel utilisé est préparé selon la procédure suivante : Dans deux erlenmeyers, on introduit 5ml d'huile d'olive, 3ml solution tampon pH 7 et 0.5ml de $CaCl_2$. Le premier erlenmeyer est utilisé comme un témoin, alors qu'on ajoute dans le deuxième erlenmeyer 0.1g de l'extrait enzymatique. Après 30min, la réaction a été stoppée par l'ajout 5ml de l'éthanol. Les deux milieux sont titrés par la solution NaOH de 0.1M en présence d'un indicateur coloré qui est la phénolphtaléine.

L'activité enzymatique sera déterminée par la relation suivante :

$$AE = (Ve - Vt).\ C.1000/t \qquad \textbf{(III.1)}$$

Avec :

AE : Activité enzymatique UI.

Ve : Volume de NaOH avec catalyseur (ml).

Vt : Volume de NaOH sans catalyseur (ml).

C : Concentration de NaOH (M).

t : Temps de réaction (min).

L'activité massique AE_m pourra être calculée en rapportant AE à la masse d'enzyme m_E utilisée, on aura ainsi :

$$AE_m = (Ve - Vt).\ C.1000/m_E{*}t \qquad \textbf{(III.2)}$$

❖ **Résultat et discussion :**

L'activité de la lipase de ricin semi-purifiée obtenue par le test d'hydrolyse sous les conditions standards citées est : **AE =7 UI.**

Correspondant à une activité massique : **AEm =70 UI/g.**

III.5 Mesure de l'activité enzymatique d'EB :

❖ **Mode opératoire :**

De même que précédemment, le protocole opératoire (pages48) sera répété mais en remplace l'enzyme semi purifie par l'enzyme brute dans le milieu réactionnel.

❖ **Résultat et discussion :**

L'activité de la lipase de ricin brute obtenue par le test d'hydrolyse sous les conditions standards citées est : **AE =7.67UI.**

Correspondant à une activité massique : **AEm =76.7 UI/g.**

III.6 Détermination de l'activité spécifique et du degré de purification :

Dans le but de vérifier l'efficacité de l'opération de purification et de mentionner l'activité lipasique active dans notre biomasse semi-purifiée, il est indispensable de rapporter l'activité obtenue à la masse de protéines totaux dans l'échantillon afin de mesurer l'activité spécifique. Pour cela, le protocole suivant a été adopté :

- **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 **[99],** 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 protéines 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 à 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.3 : Résultats de dosage par la méthode de Bradford.

	0 mg/l	**25 mg/l**	**50 mg/l**	**75 mg/l**	**100 mg/l**	**XEb**	**XEEPP**	**X**
NaOH	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl	250µl
Réactif	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
Vétalon	100µl	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.

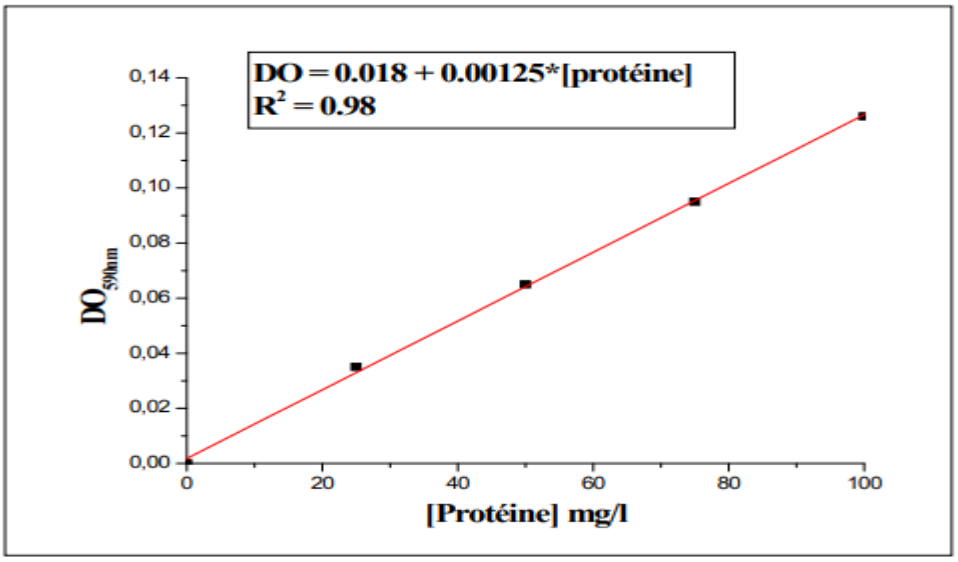


Figure III.3 : Courbe d'étalonnage de l'albumine par la méthode de Bradford.

❖ **Résultats et discussion :**

Le tableau III.2 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.4: Caractéristiques des préparations enzymatiques de l'EEB et l'EEPP de la lipase de *Ricinus Communis L.*

	Concentration de protéines (mg/l)	**Activité totale (UI)**	**Activité Spécifique (UI/g)**	**Facteur de purification**	**Rendement de purification (%)**
EEB	88,8	7.67	86,37	1	100
EEPP	72	7	97,2	1.125	91,26

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

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

Le rendement de la purification est la proportion en %, de la quantité de la protéine purifiée qui reste par rapport à la quantité initiale. Le rendement diminue de100% à 91%

après la purification avec l'acétone. Ce rendement demeure acceptable vu que l'activité spécifique augmenté de 97%.

Cette méthode de purification qui s'appelle aussi une méthode de délipidation **[100],** provoque une perte d'activité totale de la lipase de 7.67 à 7 µmol / min. L'activité spécifique est de 97.2 µmol/g/min. Kádima C. et al ont obtenus une activité de 61.1 µmol/g/min provenant de la même source (graines de ricin) utilisant huile d'olive comme substrat **[101].** Une activité de 67,2 µmol/g/min a été obtenue avec des graines de *Jatropha curcas* L **[102].**

III.7 Caractérisation de l'EEPP de la lipase de *Ricinus communis* :

III.7.1 Effet de 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 **[103].**

- **Mode opératoire :**

- ✓ Préparer une gamme des erlenmeyers, contenant le mélange réactionnel de la réaction d'hydrolyse (5ml d'huile d'olive et 0.5ml de $CaCl_2$) à température ambiante et sous agitation constante 200 rpm ;
- ✓ Déclencher la minuterie après l'injection de la solution enzymatique (0,1g de l'extrait enzymatique dissout dans 3ml de la solution tampon de pH 1 à 12) ;
- ✓ 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 ;
- ✓ Titrer avec la solution NaOH (0,1 M) ;
- ✓ Mesurer l'activité enzymatique pour chaque pH.

- **Résultats et discussion:**

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure III.4.

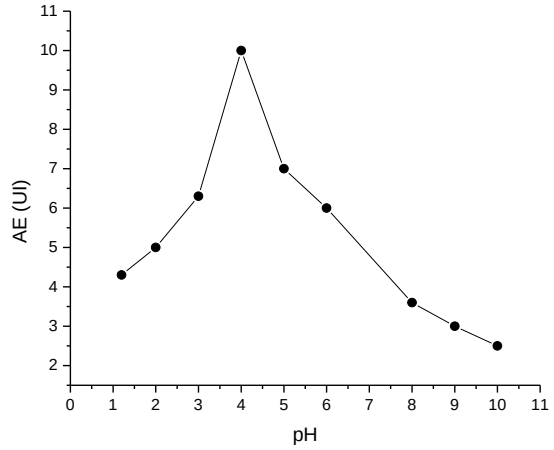


Figure III.4 : Effet de pH sur l'activité enzymatique de la lipase de *Ricinus communis*.

(T =25 °C ; $t_{réaction}$ = 30min ; m_{EEPP}= 0.1g ; V_{HO}=5ml).

La figure III.4 présente l'évolution du l'activité enzymatique en fonction du pH et suggère que la nature de milieu réactionnel a un effet sur l'activité enzymatique de la lipase semi purifiée. 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=4), ensuite elle diminue considérablement aux pH élevés. La graine de ricin contient deux lipases. L'une est présente dans les graines au repos à pH acide **[104,105] ;** l'autre apparaît après plusieurs jours de germination et a un pH optimal proche de la neutralité [**106].**

L'activité maximale de l'enzyme de lipase a été observée à pH 4 (Figure III.4). Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Barros M **[107]**, SU Er-Zheng **[94]** et ROBERT L. ORY **[108].**

Pour des raisons pratiques en vus d'applications diverses, l'étude de stabilité sera menée pour le pH optimal et pour le pH neutre.

III.7.2 Étude de stabilité de la lipase de ricin :

III.7.2.1 Stabilité thermique :

Examinons maintenant l'effet de la température d'incubation sur l'activité enzymatique de la lipase de ricin.

❖ **Mode opératoire :**

✓ Préparer une solution mère de la lipase dans deux tampons pH 4 et pH 7 ;

- ✓ Préparer les mêmes milieux réactionnels sans catalyseur (les témoins) afin de mesurer l'acidité initiale par titrimétrie ;
- ✓ Mesurer l'activité ;
- ✓ Mettre un volume dans différents tubes fermés (5-6tubes). Bien mélanger la solution mère avant de mettre dans le tube ;
- ✓ Incuber à T fixée (étuve ou bain marie). (20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 et 70 °C) ;
- ✓ Retirer les tubes après 1h ;
- ✓ Laisser refroidir ;
- ✓ Tester l'activité ;
- ✓ Calculer l'activité relative :

$$\textbf{Activité relative (AE/AE}_0\textbf{)} = \frac{\textbf{activité de l'échantillon traité}}{\textbf{activité de la solution mère.}} * 100 \quad \textbf{(III.3)}$$

❖ **Résultats et discussion :**

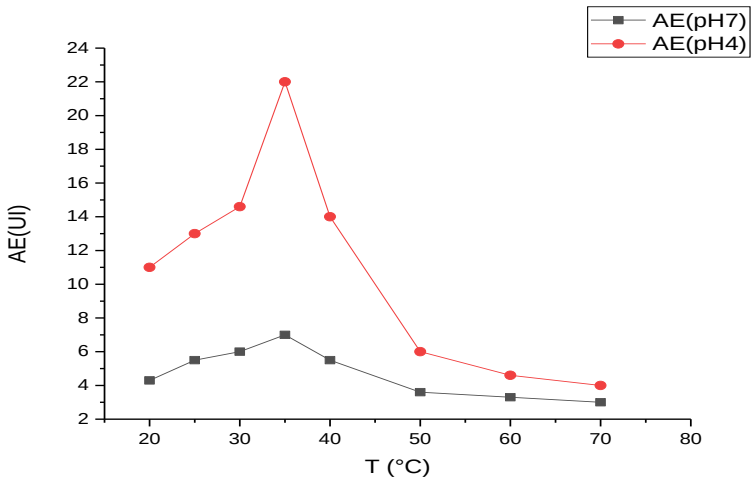


Figure III.5 : Effet de la température du milieu sur la réaction enzymatique à pH=7 et pH=4

($t_{réaction}$ = 30min ; m_{EEPP} = 0.1g ; V_{HO}=5ml).

La figure III.5 représente la variation de l'activité de la lipase à pH 7 et pH 4 en fonction de différentes températures, ce qui correspond à une étude de thermo stabilité. Les mêmes allures sont obtenues pour les deux niveaux de pH.

A partir des résultats obtenus (figure III.5), nous avons observés que l'activité enzymatique de la lipase augmente avec la température jusqu'à atteindre son maximum à la température 35°C à pH7 et à pH4. Au-delà de 35°C, suite à la dénaturation thermique, le pourcentage de diminution de l'activité varie entre 50% (pH7) et 75% (pH4) à 50°C.

Cependant, la lipase de ricin reste active jusqu'à une température de 70°C. A la lumière de ces résultats, la température optimale qui donne une meilleure activité enzymatique est 35°C, des résultats similaires ont été trouvés avec ceux rapportés par **[103,109].**

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) **[94].**

Les cinétiques de stabilité thermique pour les températures 40, 50, 60 °C, ont été établies et sont représentées sur les figures **III.6** et **III.7** pour les deux niveaux de pH 4 et pH 7. Pour cela, la solution enzymatique de la lipase de ricin a été incubée à la température donnée pendant une certaine durée. Le même protocole précédemment décrit a été suivi pour la mesure de l'activité résiduelle après traitement thermique.

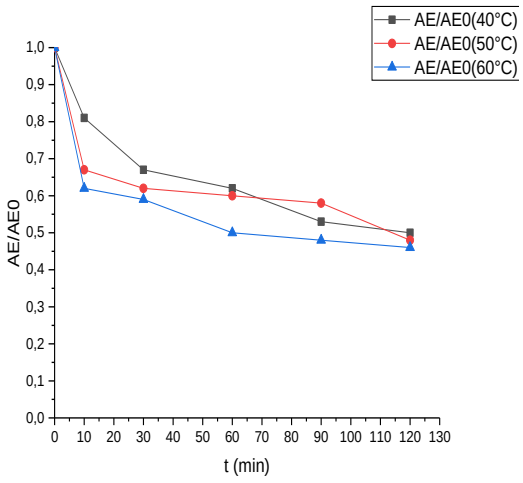


Figure III.6 : La cinétique de stabilité thermique à pH=7

($t_{réaction}$ = 30min ; m_{EEPP}= 0.1g ; V_{HO}=5ml).

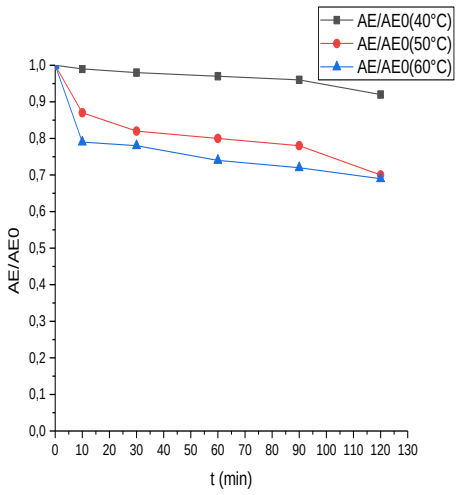


Figure III.7 : La cinétique de stabilité thermique à pH=4

($t_{réaction}$ = 30min ; m_{EEPP} = 0.1g ; V_{HO}=5ml).

❖ **Discussion :**

La stabilité thermique a été évaluée pour la lipase semi purifiée de ricin à 40 °C, 50 °C et 60°C ainsi qu'à deux pH différents : neutre (pH 7) et acide (pH 4). La cinétique de stabilité thermique de la lipase pour chaque condition est présentée sur les figures **III.6** et **III.7 :**

- **À pH 7 (Figure III.6)** :

- **À 40°C** : La stabilité est relativement bonne jusqu'à environ 30 minutes, après quoi l'activité commence à décroître de manière plus marquée. À cette température la lipase semi purifiée maintient une partie de son activité plus longtemps qu'à 50°C et 60°C, passant de 1,0 à environ 0,4 après120 minutes d'incubation, ce qui correspond à une perte de 60% de son activité.

- **À 50°C** : La stabilité diminue plus rapidement qu'à 40°C, avec une chute significative de l'activité dès les 10 premières minutes d'incubation.

- **À 60°C** : La stabilité est la plus faible parmi les trois températures, avec une perte rapide de l'activité dès les premières minutes d'incubation.

Et la vitesse de dégradation est lente à 40°C, modérée à 50°C, et rapide à 60°C.

- **À pH 4 (Figure III.7)** :

- **À 40°C** : La stabilité est meilleure qu'à 50°C et 60°C. L'activité reste assez constante jusqu'à environ 60 minutes d'incubation. La lipase semi purifiée conserve une partie significative de son activité, atteignant environ 0,8 après 120 minutes d'incubation, soit une dégradation de seulement 20%.

- **À 50°C** : La dégradation de l'activité commence plus tôt que pour 40°C, et une perte progressive est observée, mais à un rythme plus lent qu'à 60°C.

- **À 60°C** : La perte d'activité est rapide, similaire à celle observée à pH 7, avec une chute significative dès les premières minutes.

À la lumière de ces résultats, la lipase semi purifiée montre une meilleure stabilité thermique à pH 4 par rapport à pH 7, surtout à 40°C. À des températures plus élevées (50°C et 60°C), la dégradation est rapide dans les deux cas, mais l'enzyme conserve légèrement plus d'activité à pH 4.

Les valeurs optimales peuvent être comparées à celles obtenues avec d'autres lipases végétales pour *Jatropha curcas*, *Triticum aestivum*, *Brassica napus* (37°C) et *Cucumis melo* (31-40°C) **[94].**

III.7.2.2 Stabilité chimique :

Examinons maintenant les effets de nature de substrat, solvants et d'ions métalliques du milieu sur la réaction d'hydrolyse enzymatique par la lipase de ricin.

III.7.2.2.1 Stabilité en présence des ions métalliques :

❖ **Mode opératoire :**

- Préparer une solution mère de l'enzyme ;
- Mesurer l'activité ;
- Mettre un volume (3ml) dans différents tubes fermés (6tubes) ;
- Préparer des solutions de 0.01M de différents cations métalliques ;
- Prélever un volume de la solution métalliques et ajouter dans la solution enzymatique de façon à ce que la concentration en cation dans la solution enzymatique soit 10mM ;
- Incuber pendant 1 heure à T=35°C ;
- Retirer les tubes de l'étuve et laisser refroidir ;
- Tester l'activité.
- Calculer :

$$\text{Taux d'activation ou d'inhibition (\%)} = (AE-AEo)/AEo \qquad \textbf{(III.4)}$$

❖ **Résultats et discussions** :

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux III.5 et III.6 :

Tableau III.5 : Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique à pH=7.

Ions	Activité enzymatique AE	AE/AE_0	Taux d'activation ou d'inhibition (%)
$MgSO_4$	3	0.56	-44.44
$CuCl_2$	3.33	0.62	-38.33
$ZnSO_4$	3	0.56	-44.44
$CaCl_2$	5.8	1.07	7.41
$FeCl_2$	2	0.37	-62.96
$MnSO_4$	4.33	0.81	-19.81

Telle que : AEo= 5.4 UI**,** est l'activité en absence du cation**.**

Tableau III.6 : Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique à pH=4.

Ions	Activité enzymatique AE	AE/AE_0	Taux d'activation ou d'inhibition (%)
$MgSO_4$	21.6	1.71	71.42
$CuCl_2$	8.6	0.68	-31.74
$ZnSO_4$	12.3	0.97	-2.38
$CaCl_2$	12.6	1	0
FeCl2	12.3	0.97	-2.38
$MnSO_4$	12	0.95	-4.76

D'après les résultats reportés dans les tableaux III.5 et III.6 et par comparaison entre l'activité enzymatique en absence et en présence d'ions métalliques, on constate que les effecteurs choisis ont un effet significatif sur l'activité enzymatique.

-Les Zn^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}et Mn^{2+} jouent le rôle des inhibiteurs **à pH 7**. Une diminution importante d'activité enzymatique de 62**%** a été signalée pour Fe^{2+} (**Tableau III.5)**, Et comme le rapportent des études sur d'autres lipases, une concentration aussi faible que 1 mmol/L de certains ions métalliques peut affecter l'activité enzymatique **[26,27].** Des valeurs similaires ont été obtenues avec la lipase de Brassica napus **[110]** et la lipase bactérienne de Bacillus subtilis Pa2 **[111].**

- **À pH 4** : le Ca^{2+} a un effet non significatif sur l'activité enzymatique de la lipase et le Mg^{2+} joue un rôle d'activateurs, active environ 71.42% de l'activité de la lipase. Les résultats sont identiques aussi avec ceux trouvés par SEFHA F **[112].** On trouve aussi des

résultats similaires qui indique que le Mg^{2+} est un activateur pour nombreuses lipases végétales comme la lipase de Jatropha curcas **[110].** Le Cu^{2+} était l'inhibiteur le plus puissant, inhibant environ 31.74% de son activité. Des résultats similaires ont été trouvés avec ceux rapportés par ROBERT L. ORY **[108]** et SU Er-zheng **[94].**

III.7.2.2.2Stabilité en présence des solvants polaires :

❖ **Mode opératoire :**

- Préparer une solution mère de l'enzyme ;
- Mettre un volume (3ml) dans différents tubes fermés (5-6tubes) ;
- Ajouter un volume de solvant polaire de façon à obtenir un pourcentage 20% de solvant (80% de solution enzymatique) ;
- Incuber pendant 1heure à T=35°C ;
- Retirer les tubes de l'étuve et laisser refroidir ;
- Tester l'activité.

❖ **Résultats et discussions :**

Tableau III.7 : Effet de solvants sur l'activité enzymatique à pH=7 avec AE_0=5.4UI.

Solvants	**AE**	**AE/AE_0**	**Taux d'activation ou d'inhibition (%)**
Acétone	2	0.37	- 62.962
Ethanol	2.66	0.50	- 50.74
Butanol	2.33	0.43	- 56.85
Méthanol	1.66	0.31	- 69.259
Propan-2-ol	2.33	0.43	- 56.851
DMSO	1.33	0.25	- 75.370

Tableau III.8 : Effet des solvants sur l'activité enzymatique à pH=4 avec AE_0=12.6UI.

Solvants	**AE**	**AE/AE_0**	**Taux d'activation ou d'inhibition (%)**
Acétone	4.3	0.34	- 65.87
Ethanol	8.3	0.65	- 34.126
Butanol	1.3	0.10	- 89.682
Méthanol	5.6	0.44	- 55.55
Propan-2-ol	7.6	0.60	- 39.682
DMSO	2.3	0.18	- 81.746

Les lipases sont connues par leur capacité à agir dans les milieux aqueux, ainsi que des solvants organiques polaires et apolaires.

La lipase a ainsi été étudiée dans divers solvants organiques polaires par mélange d'aliquotes enzymatiques avec les solvants pendant 30 min à température ambiante.

Les résultats enregistrés dans le tableau III.7 et III.8 suggèrent que :

- ✓ L'enzyme a été inhibée par tous les solvants (DMSO, le butanol, l'éthanol ; acétone, propan-2-ol, le méthanol) à pH 7 et pH 4. Le pourcentage de dénaturation varie entre 35 et 90%. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par SU Er-Zheng **[94]**.
- ✓ Ces résultats trouvent un certain intérêt dans des synthèses particulières telles que le Biodiesel ou certaines préparations pharmaceutiques ou cosmétiques. Par ailleurs, les solvants donnant une dénaturation quasi-totale, peuvent être utilisés comme moyens d'arrêter la réaction enzymatique catalysée par la lipase de ricin.

III.7.2.2.3 Effet de la nature du substrat sur l'activité :

❖ **Mode opératoire** :

Effectuer le test d'activité standard de différents types des huiles.

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- Dans des erlenmeyers de 250 ml introduire :
  - 0,5 $CaCl_2$ (0,02 M) ;
  - 5 ml de chaque huile (huile de soja, olive, coconut, tournesol) ;

- Déclencher la minuterie après l'injection de la solution enzymatique (0,1g de l'extrait enzymatique dissout dans 3 ml solution tampon pH 7 ou pH 4) ;
- Après 30 min, stopper la réaction en ajoutant 5 ml d'éthanol ;
- Ajouter quelques gouttes d'indicateur coloré (phénolphtaléine) ;
- Titrer le milieu avec une solution de NaOH (0,1 M) ;
- Préparer les mêmes milieux réactionnels sans catalyseur (les témoins) afin de mesurer l'acidité initiale par titrimétrie ;
- Calculer l'activité de chaque huile.

❖ **Résultats et discussions :**

La spécificité du substrat de la lipase des graines de ricin sur divers substrats a été étudiée. Diverses huiles naturelles telles que l'huile d'olive, l'huile de soja, huile de coconut et l'huile de tournesol ont été utilisées comme substrat. Les résultats sont résumés dans les Tableau III.9 et 10.

Tableau III.9 : Effet de substrat sur l'activité enzymatique à pH=7.

Substrats	Activité enzymatique (UI)
Huile d'olive	5.3
Huile de coconut	2
Huile de tournesol	3
Huile de soja	1.3

Tableau III.10 : Effet de substrat sur l'activité enzymatique à pH 4.

Substrats	Activité enzymatique (UI)
Huile d'olive	12.6
Huile de coconut	11.3
Huile de tournesol	8.6
Huile de soja	7

D'après les résultats obtenus, il apparaît clairement que l'activité d'hydrolyse est le plus élevé dans le cas d'huile d'olive et huile de coconut. Autres études similaires sur les lipases des graines ont donné des résultats similaires **[113].**

Ceci est naturellement attendu, car ils sont de composition similaire à l'huile d'olive, qui contient 55 % de triglycérides d'acides gras insaturés. De plus, les chaînes oléyle ont été signalées être libéré légèrement plus rapidement que les autres acides gras à longue chaîne, pour d'autres lipases de plantes **[114,115].**

Certains auteurs pensent qu'une plus grande activité de la lipase sur un substrat plus petit peut être causée par la solubilité dans l'eau de ces composés à chaîne courte, ce qui créerait une plus grande zone interfaciale et une inhibition moins prononcée par les produits car les acides gras libres auraient une tendance plus forte à aller dans la phase aqueuse que ceux des chaînes moyennes et longues **[116].**

III.7.2.2.4 Effet de la masse enzyme :

- **Mode opératoire :**

Afin d'évaluer l'effet de la masse d'enzyme sur l'activité enzymatique, on fait varier la masse de lipase dans la gamme (0.1-1g) pendant 30 minutes à 25°C pour la réaction d'hydrolyse de l'huile d'olive (5mL).

- **Résultats et discussion :**

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure III.9 :

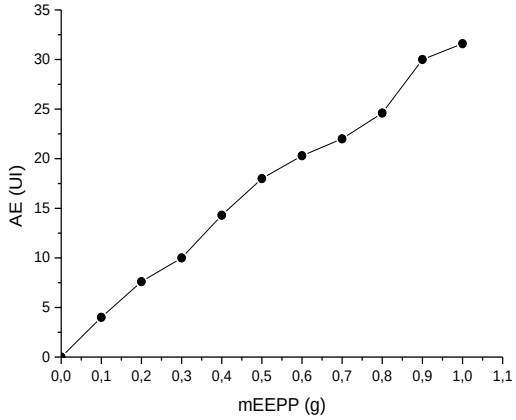


Figure III.8: Effet de la masse d'enzyme sur l'activité enzymatique.

(T =25 °C ; pH =7 ; t = 30min ; V_{HO}=5ml).

La figure III.8 montre l'effet de la masse de l'enzyme sur l'activité enzymatique. La figure illustre que l'ajout de l'enzyme augmente l'activité enzymatique jusqu'à atteindre une limite (environ 0,9 g) où l'ajout supplémentaire de l'enzyme n'entraîne plus une augmentation significative de l'activité. Ce comportement est typique des réactions

enzymatiques où l'augmentation de la concentration en enzyme mène à une saturation de l'activité enzymatique lorsque tous les substrats disponibles sont occupés par l'enzyme. La masse de la lipase optimale sera donc au moins 0.2g d'enzyme/g d'huile. Les résultats obtenus sont identiques avec ceux trouvés par SEFHA F **[112].**

III.7.2.2.5 Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse :

❖ **Mode opératoire :**

Lorsque les paramètres à optimiser sont déterminés, une étude cinétique a été menée dans les conditions optimales.

- Sous agitation, introduire dans des erlenmeyers de 250 ml :
- 5 ml d'huile d'olive ;
- Déclencher la minuterie après l'injection de solution enzymatique (0,5g d'extrait enzymatique dissout dans 3 ml solution d'ion optimal préparer avec tampon pH=7 ou pH=4) ;
- 5 ml d'huile d'olive ;
- Stopper la réaction en ajoutant 5 ml d'un éthanol ;
- Ajouter quelques gouttes d'indicateur coloré (phénolphtaléine) ;
- Titrer le milieu avec une solution de NaOH (0,1 M) ;

Le rendement d'hydrolyse (Rh %) de triglycérides par la lipase libre de ricin (*Ricinus communis L*) sera déterminé par la relation suivante :

$$Rh\ (\%) = \frac{(n_{AGL} - n_{AGL0}) * M_{moy}}{m_{TG_0}} * 100 \qquad \textbf{(III.5)}$$

Avec :

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

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

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

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

❖ **Résultats et discussions :**

Les tableaux III.11 et III.12 représentent le rendement d'hydrolyse de l'huile d'olive par la lipase de ricin en fonction du temps à pH=7 et à pH=4 respectivement :

Tableau III.11 : Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse à pH=7.

Temps (min)	Rh (%/g d'enzyme).
30	13.5
60	13.76
120	13.89
180	14.55
240	14.68
300	18.09
1320	18.35
1440	18.35

Tableau III.12 : Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse à pH=4.

Temps (min)	Rh (%/g d'enzyme).
30	18.35
60	20.58
120	23.59
180	25.17
240	30.41
300	33.56
1320	39.59
1440	39.59

Le rendement d'hydrolyse est exprimé en pourcentage par gramme d'enzyme, indiquant l'efficacité de l'enzyme dans la réaction d'hydrolyse sur une période donnée. Au début de la réaction, le rendement d'hydrolyse augmente rapidement. Par exemple, de 30 à 300 minutes, le rendement passe de **18,35 % /g** à **33.56% /g**. Cette phase représente la période où l'enzyme rencontre beaucoup de substrat disponible, favorisant une réaction rapide. Entre 300 minutes (**33,56 %/g**) et 1320 minutes (**39.59%/g**), il y a une augmentation de 6% seulement pour une durée de 17 heures. Entre 1320 minutes et 1440 minutes, le rendement se stabilise à **39,59 %/g.** Cela indique que l'enzyme a atteint sa capacité maximale d'hydrolyse dans les conditions expérimentales fournies.

Pour des applications pratiques où le coût et l'efficacité du processus enzymatique doivent être équilibrés pour optimiser la production et les ressources utilisées, le temps de réaction optimal est fixé à 300 minutes (5heures).

Un rendement d'hydrolyse de 9.69% après 24 heures a été trouvé par Astri Nur Istyami et *al* en utilisant 1 % de la lipase de ricin **[117]**.

III.8 Préparation du l'extrait enzymatique CLEAs :

III.8.1 Extraction de la lipase brute :

On prépare l'enzyme brute comme d'habitude dans une solution tampon pH7 (Les étapes d'extraction sont dans la figure III.1 (page45)) ;

- ✓ Ajouter le BSA de façon à obtenir dans la solution une concentration de BSA 0.05 g/L ;
- ✓ Laisser agiter quelques minutes.

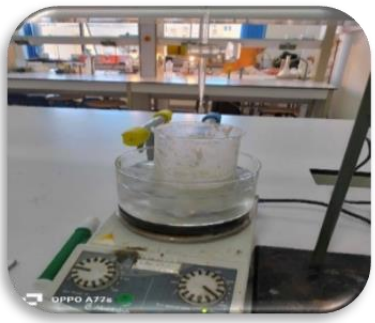
III.8.2 La préparation des CLEAs de lipase :

- ❖ **Mode opératoire :**

Les étapes de préparation des CLEAs sont résumées dans la figure III.9 :

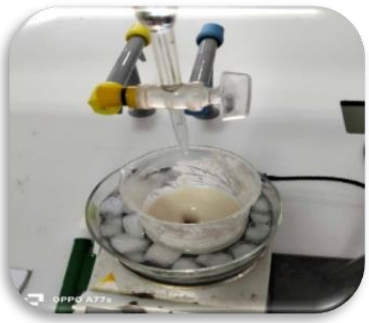
- ✓ Préparer un bain glacé agité et l'acétone glaciale.
- ✓ Faire la précipitation (purification) à l'acétone glacial : dans un bain glacé agité et placer un volume V de la solution enzymatique, puis ajouter goutte à goutte l'acétone glacial (quantité totale 3V).
- ✓ Lorsque le volume d'acétone glacé nécessaire à la précipitation (bain glacé) est épuisé, laisser toujours sous agitation pendant 1h ;
- ✓ Préparer une solution glutaraldéhyde dans l'eau distillée (10%v/v).

- ✓ Ajouter graduellement le volume de glutaraldéhyde préparé, de façon à obtenir à la fin, une concentration en glutaraldéhyde dans le mélange (acétone+ solution enzyme) de l'ordre de 50 mM (à calculer à partir des données sur le flacon et du volume (acétone +solution enzymatique (4V)).
- ✓ Après quelques minutes, les particules d'enzyme se rassemblent.
- ✓ Laisser agiter pendant 2h, puis centrifuger et séparer les particules agglomérées (CLEAs) (Cross-Linked Enzyme Aggregates) ;
- ✓ Laver les particules 2 à 3 fois avec la solution tampon 7 (à chaque lavage centrifuger et séparer), A la fin séparer, laisser sécher 1h à l'air libre ou dans l'étuve à 30°C. et conserver sous forme solide ;
- ✓ Une masse de CLEAs est testée pour son activité lipasique sous les conditions standards.



Ajouter l'acétone goutte à goutte

Aprés 1h agitation



Ajouter graduellement le volume de glutaraldéhyde

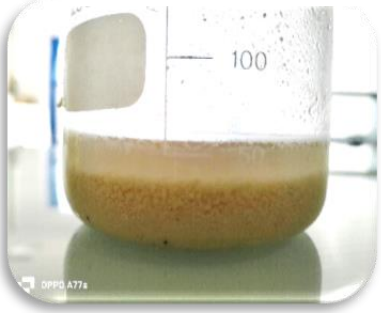
Agiter pendant 2h



Centrifugation à 3000 rpm, pendant 10 min



Lave les particules 2 à 3 fois avec la solution pH 7





Séchage à l'air libre (Température ambiante)



L'enzyme immobilisée après séchage (CLEAs).

Figure III.9 : Etapes de la préparation des CLEAs.

❖ **Résultats et discussion :**

✓ **Aspect des particules de CLEAs :**

Les particules de CLEAs de lipase de ricin réticulées à l'aide de glutaraldéhyde (agent de réticulation) et en présence du BSA (agent protecteur et stabilisant) sont illustrées sur la figure III.10 Elles ont la forme de granules agglomérées, insolubles dans la solution tampon. Elles ne se dispersent en solution qu'à la suite d'une forte agitation.



Figure III.10 : La forme de granules agglomérées, insolubles dans la solution tampon.

✓ **Activité des CLEAs :**

L'activité des CLEAs de lipase obtenue est mesurée suivant le protocole standard en prenant une masse m_{CLEAS} = 0.1g.

L'activité obtenue est égale : **AE = 0.66 UI** à pH 7.

L'activité massique **AEm = 6.6 UI/g CLEAs.**

III.9 Caractérisation de CLEAs de la lipase de *Ricinus communis* L :

III.9.1 Effet de pH :

❖ **Mode opératoire :**

De même que précédemment, le protocole opératoire (page 52) sera répété en remplaçant l'enzyme semi purifie par les CLEAs dans le milieu réactionnel.

❖ **Résultats et discussion :**

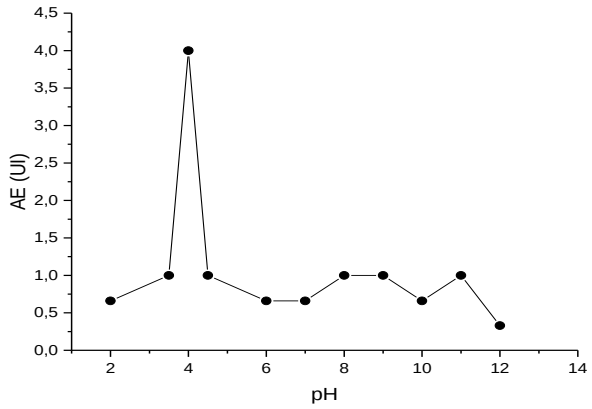


Figure III.11: Effet de pH sur l'activité des CLEAs de lipase de ricin.

(T= 25 °C ; t = 30min ; V_{HO}=5ml; m_{CLEAs} =0.1g).

La figure III.11 présente l'évolution du l'activité enzymatique en fonction du pH et suggère que la nature de milieu réactionnel a un effet sur l'activité enzymatique de CLEAs. Le milieu acide pH=4 est le milieu adéquat qui peut donner le maximum d'activité par rapport aux autres milieux. Comparée à la lipase semi-purifiée (soluble), la lipase sous forme de CLEAs possède une activité moindre. Ceci sachant que cette activité est rapportée à la même masse et qu'un pourcentage de cette masse dans les CLEAs est une biomasse inactive sous forme de protéine BSA. Néanmoins, on constate une stabilité de l'activité lipasique lorsque la valeur du pH varie la zone pH 6-11, voire même, une légère augmentation entre pH 7et pH 9. Ce phénomène n'a pas été constaté pour l'enzyme semi-purifiée soluble où l'activité diminuait constamment lorsque le pH augmentait.

Changlin Miao et *al* ont trouvés le pH optimal de CLEAs la lipase de *Candida antarctica* est basique (pH 8) **[118].**

III.9.2 Stabilité thermique :

❖ **Mode opératoire :**

De même que précédemment, le protocole opératoire (pages 53-54) sera répété mais on remplace l'enzyme semi purifie par le CLEAs dans le milieu réactionnel.

❖ **Résultats et discussion :**

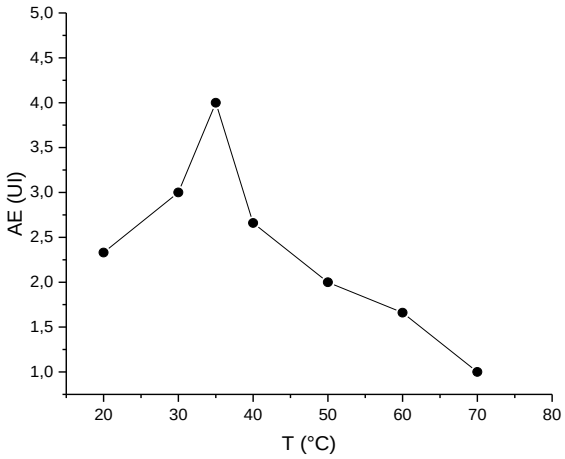


Figure III.12 : Effet de température sur l'activité du CLEAs.

($t_{réaction}$ = 30min ; pH= 4 ; m_{CLEAs} = 0.1g ; V_{HO}=5ml).

La figure III.12 représente l'activité enzymatique AE(UI) du CLEAs en fonction de température T (°C). L'activité enzymatique de la lipase augmente avec la température jusqu'à atteindre son maximum à la température optimal (35°C), valeur identique à celle obtenue pour l'EEPP. 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.

Changlin Miao et *al* ont trouvés la température d'incubation optimale est voisinage de 45°C **[118].**

III.9.3 Stabilité chimique :

III.9.3.1 Stabilité en présence des ions métalliques :

❖ **Mode opératoire :**

De même que précédemment, le protocole opératoire (page 57) sera répété mais on remplace l'enzyme semi purifie par le CLEAs dans le milieu réactionnel.

❖ **Résultats et discussion :**

Tableau III.13 : Effet des ions métalliques sur l'activité du CLEAs.

Ions	AE	AE/AE_0	Taux d'activation ou d'inhibition (%)
$FeCl_2$	0,33	0.08	-91.75
$MgSO_4$	1,33	0.33	-66.75
$CaCl_2$	4.3	1.07	7.5
$ZnSO_4$	0.33	0.8	-91.75
$MnSO_4$	2	0.5	-50
$CuSO_4$	1,6	0.4	-60

Telle que : AEo= 4 UI, est l'activité en absence du cation.

D'après les résultats reportés dans le tableau III.13 et par comparaison entre l'activité enzymatique en absence et en présence d'ions métalliques, on constate que les effecteurs choisis ont un effet significatif sur l'activité lipasique sauf le Ca^{2+}.

-Les cations Cu^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} et le Zn^{2+} jouent le rôle des inhibiteurs.

- Fe^{2+} et le Zn^{2+} étaient les inhibiteurs les plus puissants, inhibant environ 91.75% de son activité. Ce phénomène pourrait être dû à l'induction d'une perturbation structurelle de la protéine, probablement due à l'association avec des résidus qui participent aux processus catalytiques. Rosa-María Oliart-Ros et *al* ont trouvés que le Ca^{+2} a provoqué une activation significative (20%) de l'activité du CLEA de la lipase extraire à partir de *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 (LipMatCCR11), tandis que le Cu^{+2} et Hg^{+1} ont provoqué un effet inhibiteur de 80 et 95% respectivement, sur les deux formes de l'enzyme (libre et CLEA) **[117].**

III.9.3.2 Stabilité en présence de solvants polaires :

❖ **Mode opératoire :**

De même que précédemment, le protocole opératoire (page 59) sera répété mais en remplace l'enzyme semi purifiée par le CLEAs dans le milieu réactionnel.

❖ **Résultats et discussion :**

Tableau III.14 : Effet de solvants sur l'activité du CLEAs avec (E0=4 UI).

Solvants	AE	E/E0	Taux d'activation ou d'inhibition (%)
Acétone	0,66	0.165	- 83.5
Ethanol	0,33	0.0825	- 91.75
Butanol	1	0.25	-75
Méthanol	0,66	0.165	- 83.5
Propan-2-ol	1	0.25	- 75
DMSO	0,33	0.0825	- 91.75

Telle que : AEo= 4 UI**,** est l'activité en absence du solvant**.**

La lipase sous forme CLEAs a ainsi été testée pour son activité dans divers solvants organiques polaires pendant 30min à 35°C.

Les résultats enregistrés dans le tableau III.14 suggèrent que : L'enzyme a été inhibée par tous les solvants (DMSO, l'éthanol, méthanol, acétone, propan2-ol, butanol). Même effet a été obtenu par les travaux de Rosa-María Oliart-Ros et *al*, l'activité du CLEAs a été diminuée par 60% dans l'acétone, propanol-1 et butanol et par plus de 60% dans méthanol **[117].**

III.9.3.3 Effet de la nature du substrat sur l'activité de CLEAs :

❖ **Mode opératoire :**

De même que précédemment, le protocole opératoire (page 60) sera répété mais en remplace l'enzyme semi purifie par le CLEAs dans le milieu réactionnel.

❖ **Résultats et discussion :**

Tableau III.15: Effet de substrat sur l'activité du CLEAs.

Substrat	AE
Huile d'olive	4
Soja	1,33
Tournesol	0,66
Coconut	0,33

La spécificité du substrat de la lipase des graines de ricin sur divers substrats a été étudiée. Diverses huiles naturelles telles que l'huile d'olive, l'huile de soja, huile de coconut et l'huile de tournesol ont été utilisées comme substrat. Les résultats sont résumés dans le tableau III.15. Il apparaît clairement que l'activité d'hydrolyse est le plus élevé dans le cas d'huile d'olive et huile de soja. Autres études sur la lipase extraire a partir des graines sont données des résultats similaires **[113].**

III.9.3.4 Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse :

❖ **Mode opératoire :**

De même que précédemment, le protocole opératoire (pages 63) sera répété en remplaçant l'enzyme semi purifie par le CLEAs dans le milieu réactionnel acide (pH4).

❖ **Résultats et discussion :**

Le rendement d'hydrolyse est déterminé par la relation **(III.5),** les résultats obtenus sont représentés dans le tableau III.17.

Tableau III.16 : Effet de temps de réaction sur le rendement d'hydrolyse par les CLEAs.

Temps (min)	Rh (%/g d'enzyme).
30	11.01
60	11.14
120	11.27
180	11.66
240	12.32
300	13.5
1320	14.29
1440	14.29

D'après les résultats enregistrés dans le tableau III.16, on constate que durant les premières heures (0 à 5 heures), le rendement d'hydrolyse augmente lentement. Les enzymes commencent à décomposer les substrats, mais l'activité n'est pas encore à son maximum. Cela pourrait être dû à la nécessité d'une certaine adaptation ou activation initiale des enzymes. Après 5heures, on observe des augmentations ne sont plus significatives. Cette saturation peut être due à une inhibition par produit ou à la dénaturation des enzymes sur une longue période.

Conclusion générale et perspectives :

Conclusion générale et perspectives :

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 tels que la stabilité thermique et chimique de la lipase libre et réticulée (CLEAs) sur l'activité enzymatique ont été étudiés.

Les résultats suivants ont été obtenus :

- ✓ Le pH optimum est égal à pH 4 avec une température optimale de 35°C pour la lipase libre et réticulée (CLEAs).
- ✓ 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 91.26% et une activité spécifique de 97.2 UI/g pour la lipase libre.
- ✓ Quelques effecteurs chimiques pour la lipase libre tels que Fe^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} et Cu^{2+}peuvent provoquer une inhibition de l'activité de la lipase de 62.69 % avec Fe^{2+} et de 44.44% avec Mn^{2+} et Zn^{2+} à pH 7, et de 31.74% avec Cu^{2+} à pH 4, alors qu'une activation a été signalée avec Mg^{2+}de 71.42% à pH 4.
- ✓ Pour la lipase réticulée (CLEAs), on trouve que le Fe^{2+}et le Zn^{2+}sont des inhibiteurs les plus puissants, inhibant environ 91.75%.
- ✓ Ca^{2+} dans les deux formes (libre et réticulée 'CLEAs') a un effet non significatif.
- ✓ La lipase de grain de ricin est caractérisée par une grande thermo stabilité pendant 1h entre 20 et 40°C. Par contre, elle est faiblement active à 70°C pendant cette période.
- ✓ La lipase se forme libre et réticulée 'CLEAs' a été inhibée par tous les solvants (DMSO, l'éthanol, méthanol, acétone, propan2-ol, butanol).
- ✓ L'activité d'hydrolyse est le plus élevé dans le cas d'huile d'olive et huile de coconut pour les deux formes (libre et réticulée 'CLEAs')

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

- Purification de la lipase avec des techniques plus performantes afin d'avoir un extrait enzymatique totalement purifiée qui permet de caractériser la structure moléculaire de la lipase ainsi les acides aminés qui la constituent.
- Étude approfondie des mécanismes de stabilité.

Conclusion générale et perspecives

- Optimisation des procédés de réticulation : trouver les conditions optimales de réticulation pour maximiser la stabilité et l'activité des lipases de ricin sous forme de CLEAs, et faciliter sa réutilisation.
- Production à grande échelle : développer des méthodes efficaces et économiques pour la production de CLEAs de lipase de ricin.
- Évaluation de la toxicité et de la sécurité : assurer que les CLEAs de lipase de ricin sont sûres pour les applications alimentaires et pharmaceutiques, en évaluant leur biocompatibilité et leur absence de toxicité.

Références

Références :

[1] HOUDE, Alain, KADEMI, Ali, et LEBLANC, Danielle. Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 118, p. 155-170, 2004.

[2] NEHAL FATMA,Caractérisation de lipases isolées à partir de souches microbiennes locales, Université Hassiba Benbouali de Chlef 2017.

[3] Hadjer ZAAK, Amélioration de la stabilité des enzymes par moyen d'immobilisation : cas des hydrolases, Université IBN KHALDOUN Tiaret 2018.

[4] A. Belafriekh, F. Secundo, S. Serra, Z. Djeghaba. Enantioselective enzymatic resolution of racemic alcohols by lipases in green organic solvents, Tetrahedron: Asymmetry, 28 473-478, (2017).

[5] Abu bakar saleh, book of new lipase and protease, biomedical, nova science publishers.Inc, New York, 2006.

[6] Maldonado RR, Macedo GA, Rodrigues MI. Lipase productionusing microorganisms from different agro-industrial by products. Int J App Scien Tech 2014.

[7] Ray A, Application of lipase in industry, Asian J Pharm Technol, 2:33–37, 2012.

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

[9] CASAS-GODOY, Leticia, DUQUESNE, Sophie, BORDES, Florence, *et al.* Lipases: an overview. *Lipases and phospholipases: methods and protocols*, p. 3-30, 2012.

[10] HASNAOUI Ismail, applications et propriétés enzymatiques et antimicrobiennes de souche isole de coproduits oléicoles : cas d'une lipase de penicillium crustosum et de peptides antimicrobiens de lactobacillus, université claude bernard lyon 1 et universite mohammed premier, 2023.

[11] ANOBOM, Cristiane D., PINHEIRO, Anderson S., DE-ANDRADE, Rafael A., *et al.* From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*, 2014, vol. 2014.

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

Références

[13] Borrelli GM, Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. Int J Mol Sci; 16: 20774-20840, 2015.

[14] de Oliveira Lima V, Prates KV, Fazolo A. Avaliação da eficiência de bactérias lipolíticas e lipase suína no pré-tratamento de efluente de curtume. Rev Gestao Sustentabilidade Ambiental; 8: 131-151, 2019.

[15] Mendes AA, Pereira EB, Furigo Jr A, Castro HF. Anaerobic biodegradability of dairy wastewater pretreated with porcine pancreas lipase. Braz Arch Biol Technol; 53: 1279-1284. 2010.

[16] Bavandi H, Habibi Z, Yousefi M. Porcine pancreas lipase as a green catalyst for synthesis of bis4-hydroxy coumarins. Bioorg Chem; 103: 104139, 2020.

[17] Zarai Z, Ali MB, Fendri A, Louati H, Mejdoub H, Gargouri Y. Purification and biochemical properties of Hexaplex trunculus digestive lipase. Process Biochem; 47: 2434-2439, 2012.

[18] Weidlich S, Hoffmann KH, Woodring J. Secretion of lipases in the digestive tract of the cricket Gryllus bimaculatus. Arch Insect Biochem Physiol, 90: 209-217, 2015.

[19] Rueda-López S, Martínez-Montaño E, Viana MT. Biochemical characterization and comparison of pancreatic lipases from the Pacific bluefin tuna, Thunnus orientalis; totoaba, Totoaba macdonaldi; and striped bass, Morone saxatilis. J World Aquac Soc; 48: 156-165, 2017.

[20] 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.

[21] 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.

[22] 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.

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

[24] RICHARD Romain, tansterifacation thanolique d'huile végétale dans des microréacteurs : transposition du batch au continu". These de doctorat en science agroressources, l'université de toulouse. France,(2011).

[25] ALLOUNE Rhiad, Le biodiesel : ''une source d'énergie propre et prometteuse'', (2012).

[26] CASAS-GODOY, Leticia, DUQUESNE, Sophie, BORDES, Florence, *et al.* Lipases: an overview. *Lipases and phospholipases: methods and protocols*, p. 3-30, 2012.

[27] REN, Yuhong, RIVERA, Jose G., HE, Lihong, *et al.* Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC biotechnology*, vol. 11, p. 1-8, 2011.

[28] Blow, D.M., Birktoft, J.J. and Hartley, B.S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsine. Nature, 221(5178), 337-340, (1969).

[29] Whiting, A.K. and Peticolas, W.L. Details of the acyl-enzyme intermediate and the oxyanion hole in sérine protease catalysis. Biochem. 33(2), 552-561, (1994).

[30] Beer, H. D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J. E. G., S homburg, D., & Schmidt, R. D. (1996). Analysis of the catalyic mechanism of a fungal lipase using computer -aided design and structural mutants. Protein Eng. Des. Sel., 9(6), 507-517, 1996.

[31] Phukon, L.C., chourasia,R., Kumari, M., Godan, T.K., sahoo,D.,parameswaran,B.,& Rai,A.K. production and characterization of lipase for application in detergent industry from a novel Pseudomonas helmanticensis HS6. Bioresour .technol. 309,123352, 2020.

[32] Gurkuk, S. And Ozdal,M. Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermo active, and detergent-compatible lipase from Aeromonas caviae Lip T51 for application in detergent industry. Protein expression purif. 180, 105819, 2021.

[33] Enespa, Chandra,p. And Singh, D.P. sources, purification, immobilization, and industrial applications of microbial lipases: An overview. Crit. Rev Food Sci. Nutr. 1-34, 2022.

[34] Akmoussi-Toumi, S., Khemili-Talbi,S., Ferioune,I., &Kebbouche-Gana, S. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant and detergent-stable lipase from Haloferax Mediterranean CNCMM 50101. Inter.J. Biol. Macromol., 116,817-830, 2018.

Références

[35] Zhao,J., Liu, S.,GAO,Y.,Ma,M., Yan., cheng, D., wan, D., Zang, Z., Yu, P.& Gong, D. Characterization of a novel lipase from bacillus lichenifirmis NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2, 4-Dbutyl ester.Int.J Biol. Macromol., 176, 126-136, 2021.

[36] Ghazani, S.M. and Marangoni, A. G.(2018). Facile lipase-catalyzed synthesis of a chocolate fat mimetic. Sci. Rep., 8(1), 1-18, 2018.

[37] Zorn, K., Oroz-Guinea, I., Brundiek, H., & Bornscheuer, U. T. (2016). Engineering and application of enzyme for lipid modification, an update. Prog. Lipid Res., 63, 153-164, 2016.

[38] Wang, Z., Liu, L., Liu, L., Liu, T., Li, C., & sun, L. (2019). 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol-rich triacylglycerol characterization by three processing methods. Inter. J. Food Prop., 22(1), 1156-1171, 2019.

[39] Yao, W., Liu, K., Liu, H., Jiang, Y., Wang, R., Wang, W., & Wang, T. (2021). A valuable product of microbial cell factories: microbial lipase. Front. Microbiol., 12, 743377, 2021.

[40] Loli, H. (1809). Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertation I. Mag Ges Nature Freunde Berlin, 3, 3-42, 2015.

[41] Tsikis, S. T., Fligor, S. C., Décor, J.D., Yu, L. J., Pan, A., Mitchell, P. D. & Pudeur, M. (2022). An on-line digestive cartridge increases enteral fat and vitamin absorption in a porcine model of short bowel syndrome. Clin. Nutr. 41(5), 1093-1101, 2020.

[42] Fieker, A., Philippot, J. and Armand, M. (2011). Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future. Clin. Exp. Gastroenterol., 4, 55-73, 2011.

[43] Antoni, F., Crippa, S., Falcon I, M., Macaroni, G., & Pezzilli, R. (2018). Pancreatic enzyme replacement therapy after gastric résection: an update. Digestive Lover Dis., 50(1), 1-5, 2018.

[44] Kumar, R., Banoth. L., Banerjee, U. C., & Kaur, J. (2017). Enantiomeric separation of pharmaceutically important drug intermediates using a Metagenomic lipase and optimization of its large-scale production. Inter. J. Biol. Macromol., 95,995-1003, 2017.

[45] Sikora, A., Chelminiak-Dudkiewiez, D., Ziegler-Borowska, M., & Marshall, M. P. (2017). Enantioseparation of (RS)-atenolol with the use of lipases immobilized onto new-synthesized magnetic nanoparticules. Tetrahedron: Asymmetry, 28(2), 374-380, 2017.

Références

[46] Ktata, A., krayem, N., Aloulou, A., Benzine, S.,Sayari,A., chamkha, M.,& karray, A. Purification, biochemical and molecular study of lipase producing from a newly thermoalkaliphilic aeribacillus pallidus for oily wastewater treatment.J. biochem, 167(1), 89-99, 2020.

[47] Thangaraj,B ., Solomon, P., Muniyandi,B., Ranganathan,S., & Lin, L. Catalysis in biodiesel production -a review. Clean Energy, 3(1), 2 -23, 2019.

[48] Wang,H., Peng,X., Zhang,H., Yang, S., &Li,H. Microorganisms- promoted biodiesel production from biomass :a review. Energy convers. Manage.t:X, 12,100137, 2021.

[49] Ulijn R. V. (2006). Enzyme immobilization: An overview. In Methods in biotechnology (Vol. 22, pp. 1-15). Humana Press.132, 2006.

[50] Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chemical Society Reviews, 42(15), 6223-6235, 2013.

[51] Sheldon R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced Synthesis & Catalysis, 349(8-9), 1289-1307, 2007.

[52] Mateo C., Abian O. & Fernández-Lafuente R. (2007). Preparation of enzyme–biopolymer conjugates for biocatalysis. Current Opinion in Biotechnology, 18(3), 213-219, 2007.

[53] Torres-Salas P., Jiménez A., Segura R.L. (2015). Industrial applications of lipases: a review, 2015.

[54] Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. Chemical Society Reviews, 38(2), 453-468, 2009.

[55] Betancor L., López-Gallego F. & Hidalgo A. (2015). The quest for an efficient biocatalyst: A booming industry, 2015.

[56] ZAHRA sabrina et AISSOU meriem, étude de l'effet d'immobilisation sur lactivites enzymatique de la lipase de candida rugosa (CRL), université Saad Dahlab Blida 1, 2022.

[57] HARRIECHE O, Méthodes d'immobilisation des enzymes, université Mila, 2024.

[58] BENAMMAR Leyla, Enzymologie Appliquée : immobilisation des enzymes, universite batna2.dz, 2020.

Références

[59] Armstrong, W.P. The Castor bean. http://waynesword.palomar.edu/plmar99.htm, 1982.

[60] Gharbi, I., Issaoui, M., Mehri, S., Cheraief, I., Sifi, S., & Hammami, M. . Agronomic and technological factors affecting Tunisian olive oil quality. Agricultural Sciences, 6(05), 513, 2015.

[61] RICIN COMMUN *Ricinus communis* L, ANGIOSPERME (PLANTE À FLEURS), Muséum national d'Histoire naturelle, 57 rue Cuvier, 75005 Paris (France), 2010.

[62] PINA, Michel, SEVERINO, Liv S., BELTRÃO, Napoleão EM, et al. De nouvelles voies de valorisation pour redynamiser la filière ricin au Brésil. Cahiers Agricultures, vol. 14, no 1, p. 169-171 (1), 2005.

[63] Mase T, Matsumiya Y, Akiba T. Purification and characterization of a new lipase from Fusarium sp. YM-30 [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 59(9): 1771–1772, 1995.

[64] C. DE MELLO GERALDES, Étode sur les caractéristiques ães graines de ricin des colonies portugaises, Anais do Instituto de Agronomia, 198,1921.

[65] DUMEIGNIL, Franck. Propriétés et utilisation de l'huile de ricin. Oléagineux, Corps gras, Lipides, vol. 19, no 1, p. 10-15, 2012.

[66] Mlle Hadj Benrezig Mahdjouba, L'effet bio-insecticide de l'extrait méthanoïque du Ricinus communis L. Sur les larves de Tuta absoluta, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, 2016.

[67] Trochain J., Le Ricin (suite), Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale, 107, 578-589. Doi : 10.3406/jatba.1930.4881,1930.

[68] André F., la culture du ricin en Afrique du nord. Ann Off nat Comb liquides, 3, 529-541, 1929.

[69] MAKHLOUF, K., HAMROUNI, L., KHOUJA, M. L., et al. Ethnobotanical and phytopharmacological notes on Ricinus communis L. Phytothérapie, vol. 8, p. 374-376, 2010.

Références

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

[71] HARRIECHE O, Méthodes d'immobilisation des enzymes, université Mila, 2024

[72] López-Serrano P., Cao L., Van Rantwijk F., Sheldon R. A. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. Biotechnol. Lett, 24,1379-1383, 2002.

[73] Hadjer ZAAK, Amélioration de la stabilité des enzymes par moyen d'immobilisation : cas des hydrolases, Université IBN KHALDOUN Tiaret, 2018.

[74] BENAMMAR Leyla, Enzymologie Appliquée : immobilisation des enzymes, universite batna2.dz, 2020.

[75] Casimir C Akoh., David B. Min, Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Marcel Dekker, Inc; 2002.

[76] Jean-Pierre Verger, Michel Botineau, Askolds Vilks, Myriam Gioan, David

Siriex, Karine Reliat & Catherine Lerouge, The sepentinite massif of Bettu (Corrèze, Limousin, France). - Bocconea 13: 583-587-ISSN 1120-4060, 2001.

[77] A. R. Macrae, Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, journal of the American oil chemists society, Volume60, Issue2Part1, 1983.

[78] Mohamed Haythem RIAHI, MODÉLISATION DE PHÉNOMÈNES MICROBIOLOGIQUES, BIOCHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES INTERVENANT LORS DE L'AFFINAGE D'UN FROMAGE DE TYPE PÂTE MOLLE CROÛTE LAVÉE. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Ecole Doctorale ABIES, 2006.

[79] Omar Aktouf, Méthodologie des sciences sociales et approche qualitative des organisations, Une introduction à la démarche classique et une critique, Les Presses de l'Université du Québec, **213 pp, 1987.**

[80] A. Macrae, R. C. Hammond, Present and future applications of lipases, Biology ; Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, DOI:10.1080/02648725. 10647813Corpus ID: 85373183, 1985.

Références

[81] Khedidja BENAROUS, Cours de Métabolites secondaire, UNIVERSITE AMAR TELIDJI-LAGHOUAT-ALGERIE, 2022.

[82] Melle BOUHAFS Nour elhouda et HADJAIDJI Amina, Extraction d'huile des plantes oléagineuses locales (plant de ricin) pour la production du biocarburant en Algérie, Université Echahid Hamma Lakhdar. El Oued, 2017.

[83] Mohamed Gargouri, Najla Ben Akacha, Faten Kotti & Ines Ben Rejeb
Voie de la lipoxygénase : valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de flaveurs (volume 12- numéro 2) ,2008.

[84] procédé de production d'ester d'acide ricinoléique par transestérification enzymatique sélective, ottawa-hull kia 0C9, 2010.

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

[86] SETH, S. et al. An insight into plant lipase research--challenges encountered. Protein Expression and Purification, v. 95, p. 13-21, 2014.

[87] SANKAR, S.; PONNURAJ, K. Less explored plant lipases: Modeling and molecular dynamics simulations of plant lipases in different solvents and temperatures to understand structure-function relationship. International Journal of Biological Macromolecules, v. 164, p. 3546- 3558, 2020.

[88] Massaglia Luca et Campos Gabriel Mendes. Caractérisation des lipases de ricin (Ricinus communis) exprimées chez Pichia pastoris. Université fédérale de Rio de Janeiro, École de chimie, 2023.

[89] EASTMOND, P. J. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 44, p. 45540-45545, 2004.

[90] LI, Y. et al. Characterization of a novel sn1, 3 lipase from Ricinus communis L. suitable for production of oleic acid-palmitic acid-glycerol oleate. Scientific reports, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

[91] M. Barros, L. F. Fleuri and G. A. Macedo, SEED LIPASES: SOURCES, APPLICATIONS AND PROPERTIES – A REVIEW, Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 27, No. 01, pp. 15 - 29, January - March, 2010.

Références

[92] Yue Li, Guorui Li, Huajun Sun & Yongsheng Chen, Characterization of a novel sn1, 3 lipase from Ricinus communis L. suitable for production of oleic acid-palmitic acid-glycerol oleate, Scientifc Reports, 11:6913, 2021.

[93] SEFHA Farida 1 and ABOUSEOUD Mahmoud, Biocatalytic Hydrolysis of Triglycerides Using a Plant Lipase Extracted from Oil Seeds, Tob Regul Sci;9(1):4119-4131,2023.

[94] SU Er-zheng, ZHOU Ying, YOU Peng-yong and WEI Dong-zh, Lipases in the castor bean seed of Chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization, J Shanghai Univ (Engl Ed), 14(2): 137–144), 2010.

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

[96] Debajyoti Goswami,Jayanta Kumar Basu &Sirshendu De, Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review, Critical Reviews in Biotechnology, 33, 81-96, 2013.

[97] D. C. Elisa, M. M. Fábio, V. Pierre, C. A. Regina, L. T. Olga and M. G. Denise, Acetone Powder from Dormant Seeds of Ricinus communis LAppl. Biochemi. Biotechnol. 07, 136–140, 2007.

[98] Maliks, S.V., V. Kalia and C.S. Pundir, Immobilization of porcine pancreas lipase on zirconia coated alkylamine glass using glutaraldehyde. Indian J. Chem. Technol., 7, 64-67, 2000**.**

[99] 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.

[100] Sonali S., Debamitra C., Kumar D. and Sanjukta P., An insight into plant lipase research – challenges encountered, Protein Expression and Purification, 95, 13–21, 2014

[101] Kádima C. S., Débora M.J., Matheus H.M., Daniela B. H., Heizir F., Roberto F-L., Adriano A. M., Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for

the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils, Industrial Crops and Products, 49, 462– 470, 2013.

[102] Gu, H., Jiang, Y., Zhou, L., Gao, J., Reactive extraction and in situ self-catalyzed methanolysis of germinated oilseed for biodiesel production, Energy. Environ. Sci. 4, 1337–1344. 2011.

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

[104] Ory, R. L., A. J. St. Angelo and A. M. Altschul, J. Lipid Res. 1. 208-213 (1960).

[105] Savary. P... J. Flanzy and P. Desnuelle, Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 637-645 (1958).

[106] Yamada, M., Sci. Pap. Coll. Educ... Univ. Tokyo 7. 97-104 (1957).

[107] M. Barros1*, L. F. Fleuri2 and G. A. Macedo, SEED LIPASES: SOURCES, APPLICATIONS AND PROPERTIES – A REVIEW, Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 27, No. 01, pp. 15 - 29, January - March, 2010.

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

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

[110] Sonali S., Debamitra C., Vikash K. D. and Sanjukta P., An insight into plant lipase research – challenges encountered, Protein Expression and Purification, 95, 13–21, 2014.

[111] Kamlesh Shah, Purification and Characterization of lipase from B.subtilis Pa2, Journal Of Biochemical Technology, Vol 3, (No 3):292-295, November 2011.

[112] SEFHA Farida, Etude de l'activité enzymatique d'une lipase végétale sous forme libre et immobilisée, UNIVERSITE Dr. YAHIA FARES MEDEA, 2011.

[113] (Ayten Sagiroglu a & Nilay Arabaci, Sunflower Seed Lipase: Extraction, Purification, and Characterization, Department of Chemistry, Faculty of Science and Letters, Trakya University, 22030, Edirne, Turkey Version of record first published: 23 Sep 2010.

[114] Aizono, Y.; Funatsu, M.; Sugano, M.; Hayashi, K.; Fujiki, Y. Enzymatic properties of rice brain lipase. Agric. Biol. Chem. 1973, 37, 2031–2036.

Références

[115] Shastry, B.S.; Rao, M.R.R. Chemical studies on rice brain lipase. Cereal Chem, 53, 190–200, 1976.

[116] Enujiugha, V. N., Thani, F. A., Sanni, T. M., and Abigor, R. D. (2004), Food Chem. 88(3), 405–410, 2004.

[117] Astri Nur Istyami, Myra Wardati Sari, Cristy Hagi Gultom, Tirto Prakoso, Tatang Hernas Soerawidjaja, Exploration of Novel Lipase from Plant Seeds and Plant Latexes, , Indo. J. Chem. Res., 12 (1), 1-8, 2024.

[118] Changlin Miao et *al*, Synthesis and properties of porous CLEAs lipase by the calcium carbonate template method and its application in biodiesel production, RSC Advances, 51, 2019.