

République Algérienne démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE A.MIRA –BEJAIA

Faculté de Technologie, Département de Génie des Procédés

Mémoire

Présenté par

Wassila TIGHZERT

Pour l'obtention du diplôme

MAGISTER

Filière : Génie des procédés
Option : Génie des polymères

Thème :

IMMOBILISATION D'UNE LIPASE SUR DES SUPPORTS POLYMERES ET APPLICATIONS

Le, .../ .../ 2012, le public est cordialement invité

Devant le jury composé de :

Mr. A. HABI,	Maitre de conférences, (U. A. M. Bejaia),	Président
Mme. S. Kaddour,	Maitre de conférences, (USTHB, Alger),	Examineur
Mr. F. REZGUI,	Professeur, (U.A.M. Béjaia),	Examineur
Mr. T. SADOON,	Professeur, (U.A.M. Béjaia),	Encadreur

2011/2012

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire des Matériaux Organiques de l'université Abderrahmane MIRA de Béjaia, dirigé par le professeur Tahar SADOUN, à qui, j'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Il a su me guider au cours de ce travail tout en me laissant souvent une belle autonomie. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour l'intérêt avec lequel il a suivi mon travail et les nombreux conseils qu'il n'a jamais cessé de me donner.

Je remercie les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail : Mr. A. HABI qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury, Mme. S. Kaddour et Mr. F. REZGUI qui ont très aimablement accepté de faire partie de ce jury en qualité d'examineurs.

Ma gratitude va aussi au Pr Dj. SADOUN directrice du laboratoire de microbiologie Appliquée qui m'a permis de travailler dans son laboratoire et à M^{me} BENACHOUR maître de conférences au laboratoire de microbiologie Appliquée pour toute son aide.

Je tien à remercier, les techniciens et ingénieurs de laboratoire du bloc 11. Je pense en particulier à M^{me} BRADAI, M^{me} BENAMOÛR et Mr MAMASSE pour leur disponibilités et leur gentillesse. Mes plus chaleureux remerciements s'adressent également, à mes camarades du Laboratoire des Matériaux Organiques M^{me} G. AIT CHERIF, M^{lle} S. KHELOUFI M^{me} N. ROUBA, Mr S. ZADI, M^{lle} A. MERRAKCHI, M^{lle} Y. BAKOURI, M^{me} KEMOUN Naima, M^{me} Dj. KERROUCHE Je les remercie tous pour leur aide et leur gentillesse et pour l'une ambiance particulièrement favorable pour mener à bien mon travail.

Je n'oublierai pas de remercier ceux qui m'ont toujours soutenue : ma sœur, mes frères. Et j'exprime mes plus vifs remerciements et je suis très reconnaissante envers ma mère pour son intarissable soutien et sa compréhension jamais prise en défaut. Et mes amies Nabila, Amel, Samira, Kahina, je tiens à remercier particulièrement Ghania, et spécialement Salima pour leurs aides, leur soutien et leur joie de vivre. Un grand merci à toute personnes ayant, de près ou de loin, contribué à ce mémoire.



Un grand merci à vous tous.



Dédicaces

A ma Tendre Maman Mebrouka

A la Mémoire de mon Père Salah et de mon frère Yazid

A ma Sœur Lynda et son Mari Farid

Et sa fille Lilia-Océane

A mes frères Ilyes, Fares et Yahia

A mes Amies

Wassila

SOMMAIRE

Remerciements	I
Dédicace	II
Sommaire	III
Liste des abréviations	IX
Liste des tableaux	X
Liste des figures	XI

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I : Rappels bibliographiques sur les lipases

I.1. DEFINITION DES LIPASES	3
I.2. SOURCES DES LIPASES	4
I.2.1. Sources microbiennes.....	4
I.2.2. Sources végétales.....	4
I.2.3. Sources animales.....	5
I.3. REACTIONS CATALYSÉES PAR LES LIPASES	6
I.3.1. Réaction d'hydrolyse.....	6
I.3.2. Réactions de synthèses.....	6
I.4. CARACTERISTIQUE STRUCTURAL DES LIPASES	7
I.4.1. La structure tridimensionnelle des lipases.....	7
I.4.2. Triade catalytique.....	8
I.4.3. L'activation interfaciale.....	8
I.5. MECANISME D'ACTION CATALYTIQUE	9
I.6. PROPRIÉTÉS DES LIPASES	11
I.6.1. Spécificités des Lipases	11

I.6.2. pH optimum d'activité des lipases.....	12
I.6.3. Température d'activité optimum des lipases.....	13
I.7. METHODES D'EVALUATION DE L'ACTIVITÉ DES LIPASES.....	13
I.7.1. Méthode titrimétrique.....	14
I.7.2. Méthodes spectrophotométriques.....	14
I.7.3. Méthodes chromatographiques.....	15
I.8. APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES LIPASES LIBRES ET IMMOBILISÉES.....	16
I.8.1. Lipases dans l'industrie alimentaire.....	16
I.8.2. Lipases pour la production de biodiesels.....	17
I.8.3. Lipases dans les détergents.....	18
I.8.5. Lipases dans l'industrie du papier.....	19
 Chapitre II : Rappels bibliographiques sur l'immobilisation des enzymes	
II.1. PRINCIPALES MÉTHODES D'IMMOBILISATION DES ENZYMES.....	20
II.1.1. Immobilisation par inclusion.....	21
II.1.2. Immobilisation par encapsulation.....	21
II.1.3. Immobilisation par liaison covalente.....	22
II.1.4. Immobilisation par adsorption.....	24
II.2 SUPPORTS UTILISÉS POUR L'IMMOBILISATION DES LIPASES.....	25
II.3. ACTIVITÉ DES LIPASES IMMOBILISÉES.....	26
II.4 PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES DES LIPASES IMMOBILISÉES.....	29
II.4.1. Effet de l'immobilisation sur le pH optimum d'activité.....	29
II.4.2. Effet de l'immobilisation sur la température optimum d'activité.....	30
II.4.3. Effet de l'immobilisation sur la stabilité thermique.....	30

Chapitre III : Immobilisation de la Lecitase Ultra

III.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES	32
III.1.1 Matériel	32
III.1.1.1. La lipase utilisée.....	32
III.1.1.2. Les supports.....	33
III.1.2. MÉTHODES.....	34
III.1.2.1. Spectroscopie Infrarouge.....	34
III.1.2.2. Spectrophotométrie UV-visible.....	35
III.1.2.3. Mesure de la surface spécifique (méthode BET).....	35
III.1.3. Préparation des solutions tampon.....	35
III.1.4. Prétraitement des résines.....	36
III.1.5. Adsorption de la Lecitase [®] Ultra sur les résines échangeuses d'ions.....	36
III.1.5.1. Détermination des conditions optimales d'adsorption.....	37
III.1.5.2. Etude des isothermes d'adsorption de la Lecitase [®] Ultra à l'équilibre.....	37
III.1.5.3. Cinétique d'adsorption.....	38
III.1.5.4. Modélisation des isothermes d'adsorption.....	39
III.1.5.5. Modélisation des cinétiques d'adsorption.....	41
III.2. RESULTATS ET DISCUSSIONS	42
III.2.1. Caractérisations des produits utilisés.....	42
III.2.1.1. Dosage de la quantité de la Lecitase [®] Ultra par spectrophotométrie UV- visible.....	42
III.2.1.2. Spectroscopie infrarouge de la Lecitase [®] Ultra.....	43
III.2.1.3. Mesure de la porosité et de la surface spécifique.....	44
III.2.2. Immobilisation de la lecitase ultra sur les résines échangeuse d'ions.....	45
III.2.2.1. Adsorption de la lipase en fonction du pH.....	46
III.2.2.2. Adsorption de la Lecitase [®] Ultra en fonction de la température...	49
III.2.2.3. Effet du temps de contact sur l'adsorption de la lecitase [®] ultra...	51
III.2.2.4. Adsorption en fonction da la concentration de la lecitase [®] ultra...	53
III.2.2.5. Etude de l'équilibre d'adsorption.....	54
III.2.2.6. Modélisation des isothermes d'adsorption.....	55

III.2.2.7. Cinétique d'adsorption de la Lecitase® Ultra par les résines échangeuse d'ions.....	58
III.2.2.8. Modélisation.....	60

Chapitre IV : Étude de l'activité de la Lecitase Ultra immobilisée

IV.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	66
IV.1.1. Produits et matériels utilisés.....	66
IV.1.2. Préparation des solutions d'enzymes et d'huile d'olive.....	66
IV.1.3. Étude de l'activité de la lecitase®ultra libre.....	67
IV.1.3.1. Mesure de l'activité de la lecitase®ultra libre.....	67
IV.1.3.2. Détermination des conditions optimales de l'activité de la lecitase®ultra libre.....	67
IV.1.4. Étude de l'activité de la lecitase®ultra immobilisée.....	67
IV.1.4.1. Mesure de l'activité de la lecitase®ultra immobilisée.....	67
IV.1.4.2. Détermination des conditions optimales de l'activité de la lecitase®ultra immobilisée.....	68
IV.1.5. Réutilisation de lecitase®ultra immobilisée.....	68
IV.1.6. Étude de la stabilité thermique de la lecitase®ultra immobilisée.....	68
IV.2 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	69
IV.2.1. Spectroscopie infrarouge du substrat.....	69
IV.2.2. Activité de lecitase®ultra libre.....	70
IV.2.2.1. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction du temps.....	70
IV.2.2.2. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction du pH.....	71
IV.2.2.3. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction de la température...	73
IV.2.2.4. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction de la concentration du substrat.....	74
IV.2.2.5. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction de la concentration en enzyme.....	75
IV.2.3. Activité de lecitase®ultra immobilisée.....	76
IV.2.3.1. Activité de la lecitase®ultra immobilisée en fonction du pH.....	76

IV.2.3.2. Activité de la lecitase®ultra immobilisée en fonction de la température.....	80
IV.2.3.3. Activité de la lecitase ultra immobilisée en fonction du substrat...	83
IV.2.3.4. Stabilité thermique de la lecitase®ultra.....	85
IV.2.3.5. Activité de la lipase immobilisée en fonction du nombre de cycles d'utilisation.....	86
CONCLUSION.....	88
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....	90
ANNEXE.....	111

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Absorbance

Å : Angström

B.E.T : Brunauer, Emmett et Teller

BSA : Bovine sérum albumine

C : Concentration (g/l)

C₀ : Concentration initiale

C_f : Concentration finale

C_e : Concentration à l'équilibre (g/l)

DVB : Divinylbenzène

Eupergit : poly (méth-Acrylamide)

IRC 50 : Résine échangeuse de cation (Na⁺), polyacide méthacrylique/divinylbenzène

IRN 78 : Résine échangeuse d'anion (Cl⁻), d'anion polystyrène/divinylbenzène

IRTF (FTIR) : Infrarouge à transformée de Fourier

h : Heure

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

kDa : Kilo Dalton

k₁ : constante cinétique de premier ordre

k₂ : constante cinétique du second ordre

K_F : Constante de Freundlich

K_L : Constante de Langmuir

K_m : Constante de Michaelis

K_p : Constante de diffusion

LECI : Lecitase ultra

min : minute

n : paramètre de Freundlich

nm : nanomètre

n.d : non donné

PAM-DVB : Résine échangeuse de cation polyacide méthacrylique/divinylbenzène

pI : point isoélectrique

Phe : Phénylalanine

PL : Phospholipides

PLA : Phospholipase A

pNPP : para-nitro-phényl-palmiate

PP : polypropylène

PS-DVB : Résine échangeuse d'anion polystyrène/divinylbenzène

Q_a : Quantité adsorbée

Q_e : Quantité adsorbée à l'équilibre

Q_{max} : capacité d'adsorption maximale (mmol. g⁻¹)

rpm : rotation par minute

Ser : Serine

t : Temps (s)

T : Température °C

TAG: Triacylglycerol

TG: triglycerides

Trp: Tryptophan

Tyr : Tyrosine

UV-Vis : Ultraviolet/Visible

v/v : volume /volume

w/v: poids /volume

Liste des tableaux

Tableau I.1: Applications industrielles des lipases.....	16
Tableau II.1 : Différentes méthodes d'immobilisation des enzymes.....	20
Tableau II.2 : Principaux groupements réactionnels entre le support et l'enzyme.....	23
Tableau II.3 : Supports généralement utilisés pour l'immobilisation des lipases.....	26
Tableau II.4. L'influence de l'immobilisation sur les activités des lipases de la famille <i>aspergillus</i>	27
Tableau II.5 : L'influence du type de support l'activité de la lipase <i>Talaromyces thermophilus</i>	27
Tableau II.6 : Activité et quantité immobilisée de la lipase <i>candida rugosa</i>	28
Tableau II.7 : Influence de la quantité immobilisée sur l'activité des lipases.....	29
Tableau III.1 : Caractéristiques des résines Amberlite utilisées comme supports pour l'immobilisation de la lecitase®ultra.....	33
Tableau III.2 : Caractéristiques des résines Amberlite.....	45
Tableau III.3: Les quantités maximales et les taux d'adsorption la lecitase®ultra (3 g/l) sur les résines échangeuse d'ions (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78).....	52
Tableau III.4 : Paramètres obtenus des isothermes de l'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine PS-DVB (Amberlite IRN 78) à pH=7 et la résine PAM-DVB (Amberlite IRC 50) à pH = 4.8 à 40°C.....	58
Tableau III.5 : Paramètre des modèles pseudo-ordre 1 et pseudo-ordre 2 de l'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines styrénique et méthacrylique.....	63
Tableau III.6 : Paramètre du modèle de diffusion intraparticulaire de l'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines styrénique et méthacrylique.....	63
Tableau IV.1 : Composition physico-chimique de l'huile d'olives utilisée comme substrat.....	66
Tableau IV.2 : Groupements fonctionnels et modes de vibration des différents groupements de l'huile d'olive extra vierge.....	70

Liste des figures

Figure I.1. Liaisons hydrolysées par les phospholipases.....	3
Figure I.2 : Image simplifiée du repliement 3D des lipases d'après le schéma de Jaeger et coll. Les hélices α sont représentées par des cylindres, les brins β sont indiqués par des flèches.....	7
Figure I.3. : Hydrolyse de la triacétine par une lipase en fonction de la solubilité de cet ester dans l'eau.	8
Figure I.4.: schémas du volet amphiphile d'une lipase.....	9
Figure I.5. : Mécanisme d'action catalytique des lipases.....	10
Figure I.6. : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases.....	11
Figure I.7 : Réaction d'hydrolyse par la lipase : (a) <i>p</i> -nitrophenyl butyrate, (b) <i>p</i> -nitrophenyl palmitate.....	15
Figure I.8: synthèse de biodiesel.....	17
Figure II.1 : Immobilisation par adsorption physique.....	25
Figure II.2 : Schémas représentatif de (a) PP-poly-alpha-allyle glucoside (PAG) et (b) PP-poly-gamma stéaryle-L-glutamate (PSLG).....	31
Figure III.1. : (a) structure d'un phospholipide, (b) structure d'un triglycéride.....	32
Figure III.2. : Résine anionique polystyrènes divinylbenzène. (a): photos de la résine amberlite IRN78, (b) : structure macromoléculaire de la résine anionique polystyrènes divinylbenzène.....	34
Figure III.3.: Résine cationique polyacide méthacrylique divinylbenzène. (a): photos de la résine amberlite IRC50, (b) : structure macromoléculaire de la résine cationique polyacide méthacrylique divinylbenzène.	34
Figure III.4. : Spectre UV- visible de la Lecitase®ultra.....	43
Figure III.5 : Le spectre infrarouge de l'échantillon de lecitase ultra.....	44
Figure III.6 : Influence du pH sur la quantité de lecitase® ultra adsorbée sur la résine méthacrylique et le taux d'adsorption, (T=40°C, temps de contact : 60min).....	47

Figure III.7 : Influence du pH sur la quantité de lecitase ultra adsorbée sur la résine styréniq ue et le taux d'adsorption, (T=40°C, temps de contact : 60min).....	47
Figure III.8 : Schéma représentatif de l'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine méthacrylique PAM-DVB.....	48
Figure III.9 : Schéma représentatif de l'adsorption de la lecitase ultra sur la résine styréniq ue PS-DVB.....	49
Figure III.10 : Influence de la température sur la quantité de lecitase®ultra adsorbée sur la résine méthacrylique (PAM-DVB) et le taux d'adsorption, (pH=4.8, temps de contact : 60min).....	50
Figure III.11 : Influence de la température sur la quantité de lecitase®ultra adsorbée sur la résine styréniq ue (PS-DVB) et le taux d'adsorption, (pH=7, temps de contact : 60min).....	50
Figure III. 12 : Evolution de la quantité de la lecitase®ultra adsorbée et du taux d'adsorption en fonction du temps sur la résine methacrylique (T=40°C, pH= 4.8, C ₀ =3 g/l).....	51
Figure III.13 : Evolution de la quantité de la lecitase®ultra adsorbée et du taux d'adsorption en fonction du temps sur la résine styréniq ue (T=40°C, pH=7, C ₀ =3 g/l)...	52
Figure III.14 : Influence de la concentration initiale de la lecitase ultra sur la quantité de la lipase adsorbé sur les résines styréniq ue et méthacrylique (T=40°C, temps de contact = 60 min).....	53
Figure III.15 : Isothermes d'adsorption de lecitase®ultra sur les résines styréniq ue et méthacrylique (T=40°C, temps d'équilibre : 60 minutes).....	55
Figure III.16 : La linéarisation selon le modèle de Langmuir des isothermes d'adsorption de la lecitase ultra par la résine styréniq ue.....	56
Figure III.17 : La linéarisation selon le modèle de Langmuir des isothermes d'adsorption de la lecitase ultra par la résine méthacrylique.....	56
Figure III.18 : La linéarisation selon le modèle de Freundlich des isothermes d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine styréniq ue.....	57
Figure III.19 : La linéarisation selon le modèle de Freundlich des isothermes d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine méthacrylique.....	57
Figure III.20 : cinétique de l'adsorption de la Lecitase ultra par la résine styréniq ue (À 40°C, pour une concentration initiale de la lecitase ultra de 3g/l).....	59

Figure III.21 : cinétique de l'adsorption de la lipase par la résine méthacrylique (À 40°C, pour une concentration initiale de la lipase de 3g/l).....	60
Figure III.22 : Cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine styrénique : Modèle pseudo- ordre 1.....	61
Figure III.23 : Cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine méthacrylique : Modèle pseudo- ordre 1.....	61
Figure III.24 : Cinétique d'adsorption de la lecitase ultra par la résine styrénique : Modèle pseudo- ordre 2.....	62
Figure III.25 : Cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine méthacrylique: Modèle pseudo- ordre 2.....	62
Figure III.26 : Cinétique d'adsorption de la lecitase ultra par la résine styrénique : Modèle de diffusion intraparticulaire.....	64
Figure III.27 : Cinétique d'adsorption de la lecitase ultra par la résine méthacrylique : Modèle de diffusion intraparticulaire.....	64
Figure IV.1 : Le spectre infrarouge de l'échantillon de l'huile d'olive extra vierge.....	69
Figure IV.2 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction du temps. (À pH=5, T= 40°C).....	71
Figure IV.3 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction du pH d'hydrolyse enzymatique de l'huile d'olive (À T= 40°C, t= 20 min).....	72
Figure IV.4 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction de la température (À pH=5, C ₀ =3g/l t= 20min).....	73
Figure IV.5 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction de la concentration du substrat (À pH=5, T=40°C, t= 20min).....	74
Figure IV.6 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction de la concentration en enzyme (pH=5, T=40°C, t=20 min).....	76
Figure IV.7 : Evolution de l'activité de la Lecitase® Ultra immobilisée sur la résine méthacrylique en fonction du pH (T=40°C, t=20 min).....	77
Figure IV.8 : Evolution de l'activité de la Lecitase® Ultra immobilisée sur la résine styrénique en fonction du pH. (T=40°C, t=20 min).....	78
Figure IV.9 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre et immobilisée en fonction du pH (T=40°C, t=20 min).....	79

Figure IV.10 : Evolution de l'activité de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique en fonction de la température (À pH=5, $[S]_0=72 \cdot 10^{-3}$ g/ml).....	81
Figure IV.11 : Evolution de l'activité de la lecitase®ultra libre et immobilisée en fonction de la température (À pH=5, $[S]_0=72 \cdot 10^{-3}$ g/ml).....	82
Figure IV.12 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre et immobilisée en fonction de la température (À pH=5, $[S]_0=72 \cdot 10^{-3}$ g/ml).....	83
Figure IV.13 : Evolution de l'activité de la lecitase®ultra libre et immobilisée en fonction du substrat (À 40°C et pH=5).....	84
Figure IV.14 : Evolution de l'activité relative de la lecitase ultra libre et immobilisée en fonction du temps (À 50°C et pH=5).....	85
Figure IV.15: Evolution de l'activité relative de la lecitase®ultra immobilisée sur les résines méthacrylique et styrénique en du nombre de cycles d'utilisation (À 50°C et pH=5).....	87

INTRODUCTION

Introduction

Les lipases sont des enzymes exceptionnelles de par leur mécanisme d'action et leur spécificité [1]. En fonction du microenvironnement, elles sont capables de catalyser l'hydrolyse des triglycérides en milieu aqueux, ou agir comme catalyseurs en synthèse organique, aussi catalyser la transestérification et l'interestérification de matière grasse. Ces réactions sont appliquées dans de nombreux domaines industriels tels que l'industrie des biocarburants pour la synthèse de biodiesel à partir des huiles végétales. Le biodiesel étant considéré comme une alternative au diesel classique [2]. Et dans l'industrie pharmaceutique [3], où la chiralité est un facteur principal dans l'efficacité de beaucoup de médicaments, les lipases sont employées comme catalyseur dans les procédés de dédoublement de mélanges racémiques pour la production des intermédiaires de médicament. La firme Glaxo Welcome (actuellement GSK) a développé, au début des années 90, un agent anti-leucémique par acylation de la purine à l'aide de la lipase *Candida antarctica* immobilisée (Novozyme 435, Novo Nordisk, Danemark). Ce procédé a rendu le produit plus soluble et donc plus bio-disponible [4]. Le domaine de l'agroalimentaire [5,6] concerne la production d'acide gras, et la transformation des matières grasses par transestérification à l'aide des lipases afin d'obtenir des triglycérides renfermant des acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 9), réputés anti-inflammatoires, et réducteurs de la pression sanguine. En outre, elles peuvent être encore exploitées dans beaucoup de nouveaux secteurs où elles peuvent servir de biocatalyseurs potentiels.

Cependant, les enzymes en général coûtent cher et elles sont solubles dans le milieu réactionnel généralement aqueux, leur récupération en fin de réaction n'est pas aisée et il est indispensable, sur le plan économique de prolonger leur durée d'utilisation. Pour cela, des recherches ont été entreprises pour les utiliser sous forme insolubles en procédant à leurs immobilisations sur, ou dans, un support solide, permettant leur récupération après usage ou leur utilisation dans des réacteurs fonctionnant en continu.

De nombreuses méthodes d'immobilisation ont été rapportées dans la littérature, telle que l'encapsulation [4], l'immobilisation par liaisons covalentes [7], ou par inclusion [8], et particulièrement l'immobilisation par adsorption sur des supports organiques [9,10]. Les lipases immobilisées sur des supports microporeux hydrophobes présentent de plus grandes activités par rapport aux lipases immobilisées sur des supports hydrophiles. Les supports microporeux

hydrophobes communément utilisées sont le polypropylène (PP), le polyéthylène (PE), poly(styrène-divinylbenzène) [11].

Généralement l'immobilisation sur les supports hydrophobes microporeux se fait par adsorption. Cette méthode a été utilisée dans de nombreux travaux, mais la plupart de ces travaux se sont intéressés seulement à l'optimisation de la quantité et à l'activité de la lipase immobilisée ainsi qu'à la possibilité de sa réutilisation. Malheureusement, peu d'intérêt a été porté à l'étude des isothermes et des paramètres cinétiques de l'immobilisation qui ont une importance non négligeable dans la compréhension et l'amélioration du processus de l'interaction de chaque couple enzyme/support et enzyme/substrat. L'optimisation des paramètres de réaction a une grande importance pour une utilisation à l'échelle industrielle. À notre connaissance, l'étude de l'immobilisation de la Lecitase® Ultra sur les résines Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78 n'a pas été étudiée notamment son application pour l'hydrolyse de l'huile d'olive.

Notre travail s'inscrit dans un cadre thématique qui a pour objectif l'étude de l'immobilisation d'une lipase appelée Lecitase® Ultra par adsorption sur deux types de polymères, styrénique et méthacrylique (résines échangeuse d'ions). Dans la première partie du travail, nous avons effectué l'adsorption sur deux résines styrénique et méthacrylique (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) dans diverses conditions (pH, concentration, temps et température). Après on a construit les isothermes d'adsorption et déterminer leurs paramètres. La deuxième partie consistait à étudier l'activité de la Lecitase® Ultra libre et immobilisée en fonction de divers paramètres (pH, concentration, temps et température).

Nous présentons ce travail en quatre chapitres. Le premier chapitre consiste à faire une synthèse bibliographique sur les propriétés cinétiques et les caractéristiques des lipases, leur mécanisme d'action catalytique, les réactions catalysées par les lipases ainsi que les méthodes d'évaluation de l'activité de la lipase et les applications des lipases. Le deuxième chapitre résume une recherche bibliographique sur l'immobilisation des enzymes sur des supports polymères. Le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'immobilisation par adsorption de la Lecitase® Ultra ainsi que la modélisation de l'adsorption et les paramètres des isothermes d'adsorption ont été déterminés. Quand au quatrième, il est consacré à l'étude de l'activité et de la réutilisation de la Lecitase® Ultra immobilisée.

CHAPITRE I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES LIPASES

I.1 DEFINITION DES LIPASES

Les hydrolases (E.C.3.X₁.X₂.X₃) constituent une classe d'enzymes qui catalysent des réactions d'hydrolyse d'esters. Les lipases sont des **triacylglycerol-acylhydrolases** (EC 3.1.1.3), d'origine animale, végétale ou microbienne. Elles sont très répandues dans le monde vivant où elles jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des triglycérides [4]. Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse telle que l'estérification, la transestérification et l'interestérification [10,12]. Un changement de la conformation de l'enzyme se produit quand elle est en contact avec un substrat insoluble dans l'eau. Ce phénomène d'activation interfaciale avec le volet amphiphile qui est l'emplacement du site actif est aujourd'hui un secteur étendu de recherche [5,13].

Les lipases présentent des propriétés catalytiques variables suivant les différentes espèces. Elles peuvent être actives sur une large gamme de pH, concernant la température, de nombreuses lipases microbiennes ont une activité maximale située entre 30 et 40°C. [14]. Il existe cependant des enzymes actives à des températures extrêmes: *Cinnamomea antrodia* [15], *Pseudomonas sp* [16] qui produisent des lipases ayant une activité maximale à 45°C et elles restent très actives à des températures allant jusqu'à 80°C.

Les phospholipases forment une autre classe d'enzymes optimisées pour hydrolyser des phospholipides (PL) à des liaisons ester spécifiques. Il existe deux classes, des phospholipases (les acyles hydrolases) et les phosphodiesterases. Ces enzymes, au sein de chaque ensemble, sont classés en fonction de la coupure de la liaison ester pour lesquelles elles sont spécifiques. Les Phospholipases A₁ (PLA₁), les phospholipases A₂ (PLA₂), les phospholipases B (PLB), et les lysophospholipide A_{1/2} (LysoPLA_{1/2}) constituent les acyles hydrolases, alors que les phosphodiesterases sont représentées par les phospholipases C (PLC) et les phospholipases D (PLD) [17].

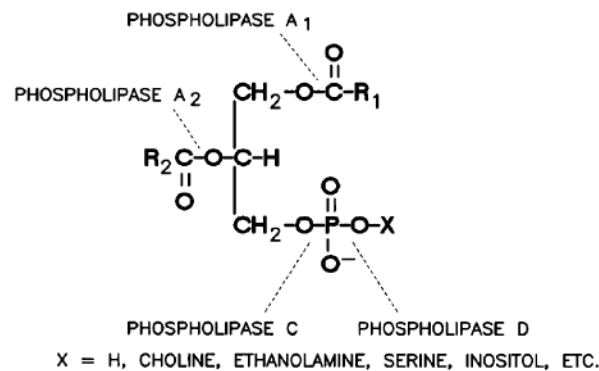


Figure I.1. Liaisons hydrolysées par les phospholipases.

Les PLA₁ (EC 3.1.1.32) catalysent spécifiquement l'hydrolyse des esters d'acyle en position sn-1 de phospholipides (Figure I.1) et produisent des acides gras libres (AGL) et lysophospholipide (lysoPL). Cependant, de nombreuses enzymes PLA₁ présentent une activité lypolytique c'est-à-dire qu'elles hydrolysent des triglycérides, tout en préférant le site de clivage sn⁻¹ [18]. Là une grande quantité de résultats des premières études concernant la détection de l'activité PLA à partir de tissus bruts étaient erronée en raison de l'incapacité à déterminer avec précision quelles sont les enzymes présentes (lipases ou phospholipases).

I.2 SOURCES DES LIPASES

La première lipase a été découverte dans le jus pancréatique des animaux en 1856 par Claude Bernard [19]. Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux microorganismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires [1].

I.2.1. Sources microbiennes

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par des bactéries telles que celles des genres *Bacillus* et *Staphylococcus* ou du genre *Pseudomonas*. Elles sont également largement répandues chez les levures du genre *Candida* ou *Geotrichum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces* [20]. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale et d'autre part, d'avoir une plus grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux [4].

I.2.2. 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 [21]. Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés en acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante [22].

Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes. Le premier groupe est constitué par les triacylglycérol hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de l'altération des graines pendant le stockage. Les constituants du second groupe, dénommés acylhydrolases (phospholipase), sont présents dans divers tissus de la plante. Ces enzymes présentent peu de spécificité pour leur substrat [23]. Les principales acylhydrolases sont les phospholipases A et B. Le troisième groupe est constitué par les phospholipases C et D. Les liaisons hydrolysées par les phospholipases sont représentées dans la figure I.1.

D'un point de vue industriel, l'intérêt des lipases végétales n'a cessé de s'accroître depuis plusieurs décennies, notamment dans le domaine de la biotransformation des lipides. Du point de vue de **Hassanien et al.**, [24], les lipases végétales sont facilement isolées à partir de graines et elles présentent des spécificités de substrat atypique comparées aux lipases microbiennes. Par exemple, **Hassanien et al.**, [24] et **Hills et al.**, [25] ont prouvé que la lipase des graines de colza (*Brassica napus*), obtenue par simple homogénéisation de graine dans un tampon adéquat, est utilisée industriellement dans la modification de l'huile de tournesol ou dans l'enrichissement de l'huile de primevère en acide γ -linoléinique.

I.2.3. Sources animales

Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes : le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique. Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, la langue, le foie et les tissus adipeux. Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel. En effet, les lipases jouent un rôle important dans la digestion en particulier chez le nouveau-né dont l'alimentation est riche en lipides [26].

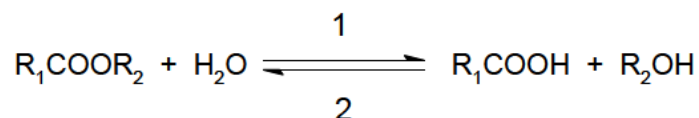
Les lipases de mammifères les plus étudiées sont les lipases liées à la digestion des graisses et à leur absorption. Il s'agit de la lipase gastrique, de la lipase pancréatique, et de la lipase hépatique. Des études de leurs structures suggèrent que ces différentes enzymes dérivent d'un ancêtre commun [27]. Elles sont capables d'hydrolyser les glycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol. Elles peuvent aussi catalyser la transestérification entre glycérides.

I.3. REACTIONS CATALYSÉES PAR LES LIPASES

En fonction de l'environnement, des substrats mis en jeu et des conditions réactionnelles, les lipases catalysent un très large éventail de réactions que nous présenterons brièvement et qui permettent de mesurer les atouts de ces catalyseurs. Contrairement à d'autres enzymes hydrophiles, les lipases de différentes origines sont particulièrement stables dans des solvants organiques non-polaires et peuvent accepter une large gamme de substrats.

I.3.1. Réaction d'hydrolyse

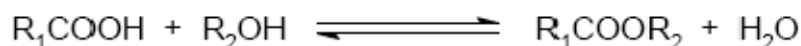
Les lipases catalysent naturellement l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et glycérol. Elles sont également actives sur de nombreux esters d'acides gras. Dans tous les cas, la réaction s'effectue à l'interface entre le substrat hydrophobe et le milieu aqueux, formant un système réactionnel diphasique. Ce système diphasique résulte de la présence d'une phase organique non miscible à l'eau, cette phase étant constituée soit du substrat seul, soit du substrat dissout dans un solvant non miscible à l'eau [28].



I.3.2. Réactions de synthèses

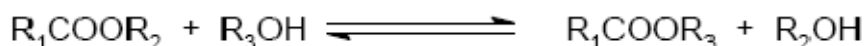
Les lipases catalysent une grande variété de réactions de synthèse qui sont listées ci-dessous. Ces réactions de synthèse se produisent dans des milieux à faible teneur en eau ou en l'absence de solvants (milieu fondu) ou en présence de solvants organiques dans lesquelles elles présentent une grande stabilité, notamment sous forme immobilisées. Ces réactions sont très utilisées dans l'industrie, dans les procédés industriels [29,30].

a) l'estérification :

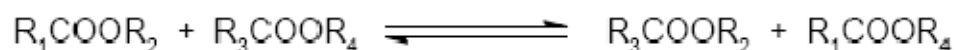


b) la transestérification :

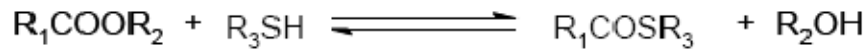
- *Alcoolyse* : par échange du groupement alcool



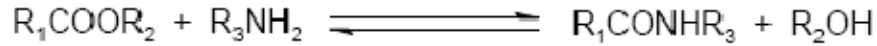
- *Interestérification* : par échange des groupements acyle et alcool



- *Thio-estérification* : par échange du groupement thiol



c) Aminolyse, ou amidation : si $R_2=H$



I.4. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES LIPASES

I.4.1. Structure tridimensionnelle des lipases

Les lipases peuvent être extraites des animaux, des bactéries, et des végétaux et toutes ces lipases ont tendance à avoir les mêmes structures tridimensionnelles. Entre 1990 et 1995, des cristallographes ont élucidé par diffraction des rayons-X les premières structures de 11 différentes lipases et estérases dont la lipase pancréatique humaine. Il a été constaté que malgré les différences de taille, de séquence homologue, de substrats, d'activateurs, d'inhibiteurs, et d'autres propriétés, la plupart des lipases adoptent une topologie de base similaire qui se caractérise par un repliement α/β [31].

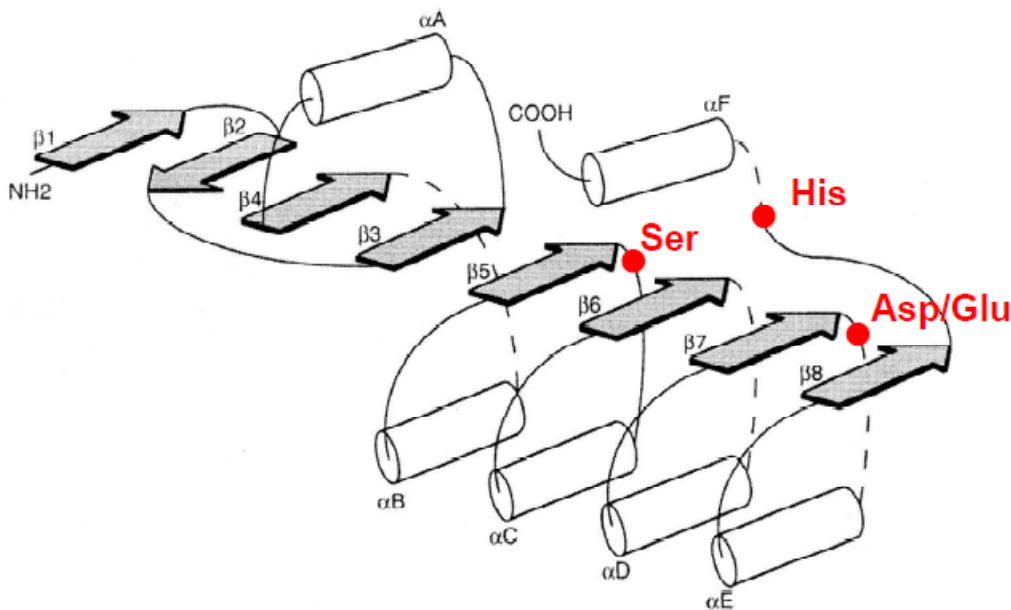


Figure I.2 : Image simplifiée du repliement 3D des lipases d'après le schéma de Jaeger et coll. Les hélices α sont représentées par des cylindres, les brins β sont indiqués par des flèches [32].

Donc sur un plan structural, les lipases appartiennent toutes à la famille des α/β hydrolases. Leur structure tridimensionnelle est constituée d'un feuillet β central formé par 7

brins β parallèles et un brin β (β_2) antiparallèle. Les brins β_3 à β_8 sont connectés à des hélices α (Figure I.2). Le motif minimum de cette structure commune à toutes les lipases est composé de 5 brins β parallèles dans le feuillet β central et de 2 hélices α . Il y a cependant des variations au sein des différentes familles de lipases. On peut noter que certaines lipases possèdent un ou plusieurs ponts disulfures qui peuvent être important pour l'activité catalytique ou la stabilité de l'enzyme [33].

I.4.2. Triade catalytique

La triade catalytique est composée des résidus de sérine (nucléophile), d'histidine et généralement, d'un acide l'aspartique ou plus rarement le l'acide glutamique. C'est un élément très conservé dans la structure des lipases. Elle a été mise en évidence par **Brady et al**, [34]. Dans le repliement α/β les positions des résidus catalytiques sont représentées : la serine catalytique est positionnée après le brin β_5 , le résidu Asp/Glu après le brin β_7 , et l'histidine, est dans la boucle entre le brin β_8 et l'hélice αF qui est présenté dans la figure I.2 précédente [32].

I.4.3. L'activation interfaciale

Les réactions catalysées par les lipases se déroulent à l'interface eau/substrat apolaire. Cette particularité catalytique a été mise en évidence par la détermination des vitesses initiales d'hydrolyse en fonction de la concentration de substrat. En effet, lorsque la solubilité du substrat est dépassée (émulsion), il y a formation d'une interface qui s'accompagne d'une augmentation brutale de la vitesse d'hydrolyse (figure I.3) Ce phénomène est appelé activation interfaciale [1].

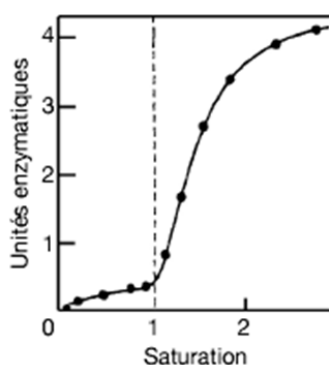


Figure I.3. : Hydrolyse de la triacétine par une lipase gastrique en fonction de la solubilité de cet ester dans l'eau, exprimée en multiple de la saturation. La ligne verticale en pointillés représente la limite de solubilité de cet ester [1].

Les premières structures tridimensionnelles des lipases ont suggéré que l'activation interfaciale pourrait être reliée à des changements de conformation d'un **volet amphiphile** fréquemment rencontré chez les lipases. Ce volet, dont la longueur et la complexité varient selon les enzymes, est constitué d'une ou plusieurs hélices α . Au contact d'une interface lipide/eau, cette boucle peptidique amphiphile s'ouvre, libérant alors l'accès au site actif. En conformation fermée, cette boucle peptidique amphiphile obstrue totalement le site actif de l'enzyme, la rendant inactive (**Figure I.4**)[12, 35].

La conformation fermée est supposée prédominer en milieu aqueux, comme indiqué par l'activité lipolytique plus faible des lipases dans l'eau tandis que la forme ouverte serait prépondérante en milieu organique et à l'interface eau/lipide. La conformation du volet (degré d'ouverture) mais aussi la nature amphiphile et la séquence spécifique des acides aminés qui le composent joueraient un rôle clé dans l'activité, la spécificité et l'énantiosélectivité des lipases (**Figure I.4**) [35].

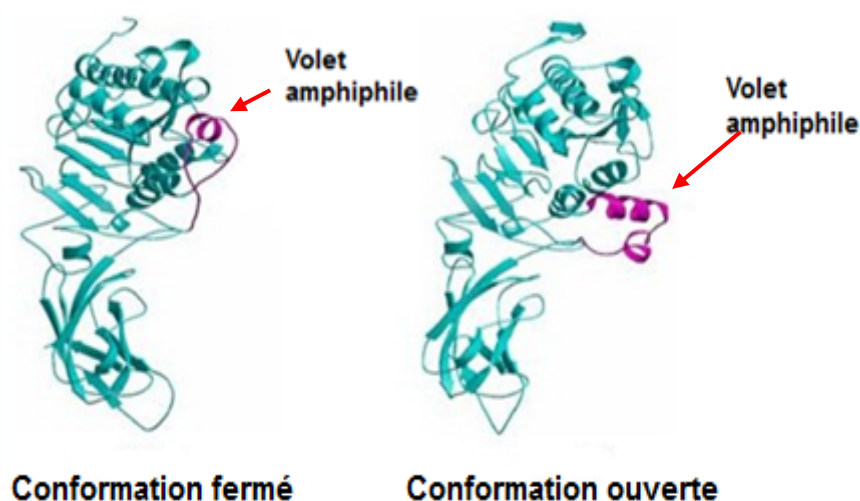


Figure I.4.: schémas du volet amphiphile d'une lipase [36].

I.5. MECANISME D'ACTION CATALYTIQUE

Les lipases sont des hydrolases à serine qui suivent le mécanisme général d'action catalytique décrit dans la Figure I.5.

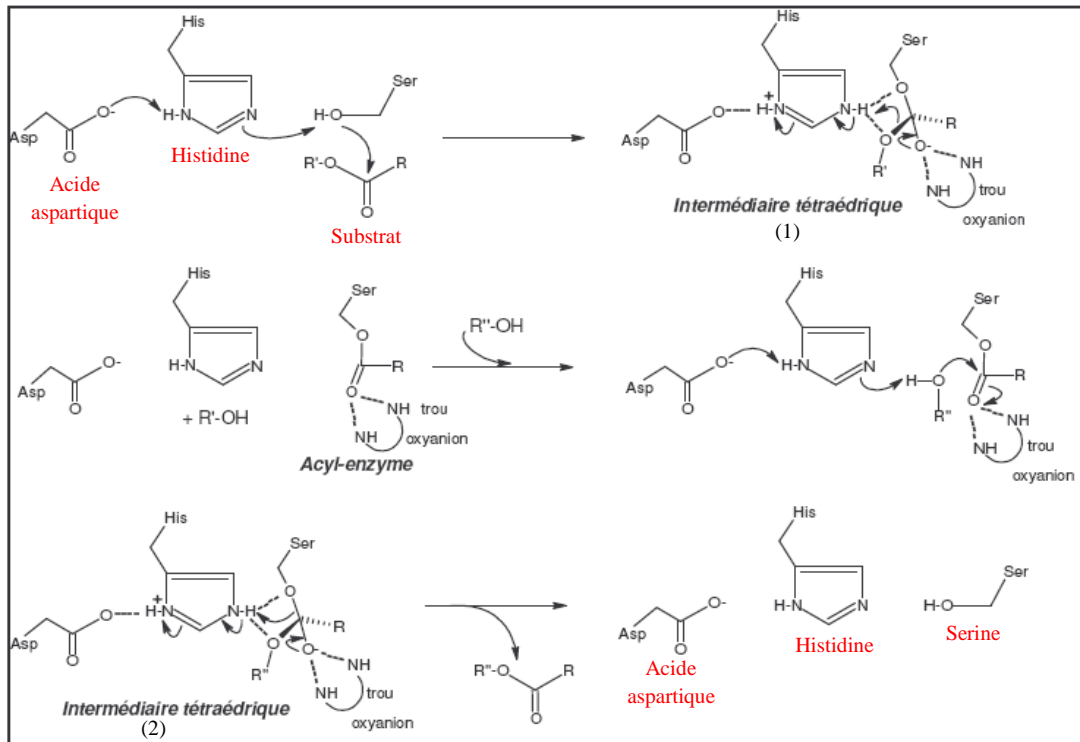


Figure I.5. : Mécanisme d'action catalytique des lipases.

Action de la triade catalytique (Serine, histidine, acide aspartique)[37].

Le transfert de proton entre l'acide aspartique (ou acide glutamique), l'histidine et la sérine catalytique permet d'activer l'oxygène de la sérine qui exerce alors une attaque nucléophile sur la fonction carbonyle du substrat pour former le premier intermédiaire tétraédrique (1). Cet intermédiaire est stabilisé par au moins cinq liaisons hydrogène dont au moins deux entre l'oxygène du substrat chargé négativement et les acides aminés du trou oxyanion (*oxyanion hole* (Annexe III)).

Le retour du doublet de l'oxygène et le transfert d'un proton de l'histidine entraîne la libération du premier produit de la réaction (soit une molécule d'eau soit une molécule d'alcool, en fonction du substrat mis en jeu) et la formation de l'acyle-enzyme. Cette première étape d'acylation (formation de l'acyle-enzyme) est suivie d'une étape de déacylation faisant intervenir une attaque nucléophile qui peut être exercée par une molécule d'eau (réaction d'hydrolyse) ou par une molécule d'alcool (réaction de synthèse) sur le carbonyle de l'acyle-enzyme pour former le second intermédiaire tétraédrique (2). Cette étape de déacylation qui suit un processus analogue à celui de l'étape d'acylation conduit à la formation du second produit de la réaction (acide carboxylique ou ester) avec régénération de l'enzyme libre [37].

I.6. PROPRIÉTÉS DES LIPASES

I.6.1. Spécificités des lipases

Certaines lipases hydrolysent indifféremment tout type de liaisons ester des triglycérides, ne faisant pas de discrimination entre leurs positions dans la molécule. D'autres en revanche présentent des spécificités vis à vis du substrat, hydrolysant préférentiellement les liaisons esters en positions sn1 et sn3 du triglycéride [38]. Cette sélectivité entraîne l'apparition d'une concentration équimolaire en diglycérides 1,2 et 2,3 lors de la réaction. L'hydrolyse plus complète entraîne l'apparition de monoglycérides, puis de glycérol et des acides gras. Au cours de la réaction d'hydrolyse, on pourra distinguer les lipases par leurs régiosélectivité, typosélectivité ou encore énantiosélectivité.

1. La régiosélectivité : elle peut être de type sn1, sn2 ou sn3 et correspond à la position préférentielle d'hydrolyse des liaisons ester sur les triglycérides (Figure I.6). Le résultat est l'obtention d'acides gras, de diacylglycérol et monoacylglycérol [39]. Par exemple, d'après **Jaeger et al., (1994) [40]** les lipases de *Pseudomonas fragi* et de *Pseudomonas geniculata* sont spécifiques de la position sn1 et sn2.

Alors que **Sanz et al., (1990) [41]** ont montré que la lipase de graine de lupin montre une spécificité pour la position sn1 et sn3. Cependant certaines lipases ne présentent aucune régiospécificité. C'est le cas des lipases de *Penocillium expansum* [42] et de *Pseudomonas cepacia* [43].

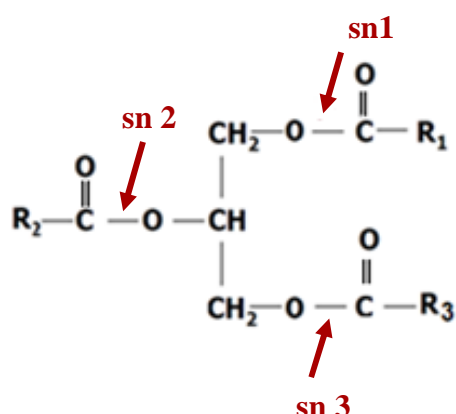


Figure I.6. : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par les lipases.

2. La typosélectivité : elle est définie par la sélectivité observée en fonction de la longueur des chaînes carbonées, du degré d'insaturation et de substitution de l'ester. La typosélectivité est souvent liée à la topologie du site actif.

Si la lipase de *Penecillium requforti* a une spécificité pour les triglycérides avec des acide gras à chaînes courtes [44], celle de *Pseudomonas cepacia* montre une préférence pour l'hydrolyse des triglycérides à chaînes longues supérieures à 8 carbones [44]. Il a été démontré que la lipase de *Geotrichum candidum* est spécifique des acide gras cis- insaturé alors que celle du tournesol hydrolyse efficacement tout les triglycérides mais avec une préférence pour les triglycérides avec des acide gras mono-insaturés [45].

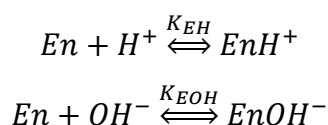
3. L'énantiosélectivité : elle traduit la préférence entre deux énantiomères. En effet, l'aptitude des lipases à distinguer des énantiomères a été décrite pour les réactions de synthèse d'ester à propriétés aromatiques [46, 47], et pour les réactions d'hydrolyse [48]. **Cabrera et al.**, [49] ont effectué l'hydrolyse assymétrique du 3-phenylglutarate diméthylique par différentes préparations d'une phospholipase A₁ (Lecitase ultra (LECI)) immobilisées à pH 7 et à 25°C.

Barbosa et al., [50] ont utilisé la lipase *Candida antarctica B* sous forme libre puis immobilisée pour la résolution énantiomérique de l'atenolol acétate, par une réaction de transestérification en utilisant l'acétate de vinyle en tant qu'agent acyles et un solvant organique comme milieu de réaction.

I.6.2. pH optimum d'activité des lipases

Les lipases ont une activité seulement à certaines valeurs de pH, selon leur origine et l'état d'ionisation des résidus dans le site actifs. Les pH optimums pour la plupart des lipases se trouvent entre 5 et 9, bien que les lipases puissent être actives sur un éventail de valeurs acides et alcalines de pH, environ de 4 à 10 [51].

Seyhan et al., [52] suggère que l'effet des ions H⁺ ou des ions OH⁻ sur l'activité d'une enzyme est probablement provoquée par un changement dans la configuration à proximité de l'emplacement du site actif. Presque toutes les réactions de protonation se produisent très rapidement. Les différentes configurations sont instantanément en équilibre. Les enzymes protonées ou hydroxylées sont supposées être complètement inactives ou moins actives. Ceci peut être représenté par les mécanismes suivants:



Où K_{EH} et K_{EOH} : constantes d'équilibre des réactions, et **En** : enzyme.

I.6.3. Température d'activité optimum des lipases

Les lipases sont connues pour être active sur un large éventail de températures. Mais la température optimale des lipases est souvent comprise entre 30 et 40 °C. En général, les lipases microbiennes ont des températures optimales plus élevé que les lipases d'origine végétale ou animale. En effet, *Humicola lanuginosa* produit une lipase dont l'activité optimale est de 45 °C tandis que pour certaines souches de *Pseudomonas fragi*, elle est de 75°C. D'autres lipases se sont adaptées aux plus basses températures. C'est le cas de celle d'*Aspergillus niger* qui a une température optimale de 25 °C, ainsi que celle de *Pseudomonas fluorescens* qui possède encore 30 % de son activité maximale à 1 °C [1].

Rani et A. Panneerselvam [53] ont étudié l'activité enzymatique de plusieurs lipases telles que *Fusarium moniliforme* (17.3 U/ml), *Penicillium funiculosum* (16.3 U/ml), *P. chrysogenum* (15.4 U/ml) et *A. fumigatus* (14.6 U/ml) à différentes températures (10-50°C). Ils ont constaté que la température optimale de chaque enzyme était de 30°C. L'activité enzymatique de la lipase *litopenaeus vannamei* a été étudiée à différentes températures (20-70°C) par **Rivera-Pérez et al., [54]**. L'activité maximale a été détectée à 30°C. Et **Song et Rhee [55]**, on trouvé une température d'activités optimum de 37°C après l'étude de l'activité d'une phospholipase A₁ à différentes températures (4-95°C).

I.7. METHODES D'EVALUATION DE L'ACTIVITÉ DES LIPASES

Pour étudier une enzyme, il est préférable de disposer d'une ou plusieurs méthodes pour mettre en évidence la réaction catalysée, et si possible de pouvoir mesurer quantitativement l'importance de ces effets. L'activité d'une enzyme se traduit par une quantité de matière transformée dans une unité de temps. Par exemple le nombre de micromoles d'un substrat transformé par minutes. Or l'importance de cette activité dépend de nombreux facteurs qui sont citées ci-dessous :

- La nature du substrat ;
- La composition ionique du milieu : pH, force ionique etc.... ;
- La température
- La durée de la réaction.

La plupart des analyses pour évaluer l'activité de la lipase ont été développées sur la base de la mesure de la quantité des acides gras libérés. L'utilisation des substrats spécifiques ou fluorescents permet l'utilisation de la spectrophotométrie pour suivre directement et sans

interruption le cours de la réaction d'hydrolyse par la lipase. D'autres approches sont généralement moins employées et sont basées sur l'instrumentation sophistiquée et/ou exploite la capacité de mesurer les changements physico-chimiques provoqués par action des lipases sur les substrats.

I.7.1. Méthode titrimétrique

Cette méthode consiste à déterminer la quantité des acides gras libérés lors de la réaction d'hydrolyse. Les acides gras libérés sont directement titré en utilisant généralement le NaOH ou le KOH comme solution titrante et de la phénolphtaléine comme indicateur coloré. Cette méthode tient compte pratiquement de tout triacylglycérol comme substrat.

Salis *et al.*, [2] ont employé la méthode titrimétrique afin de déterminer l'activité de plusieurs lipases (*Aspergillus Niger*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camembertii*, *Candida rugosa*, *Rhizopus oryzae*) en utilisant la trioleine et la tributyrine comme substrat.

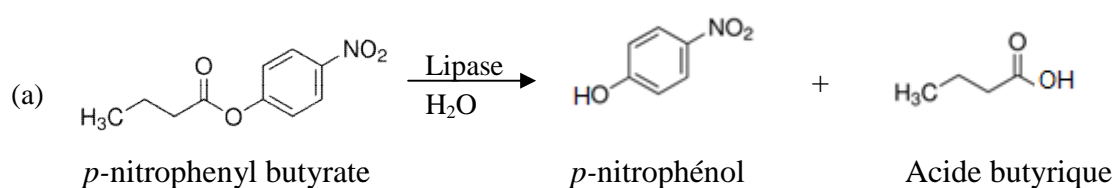
Forest et Ferreira [56] ont évalué l'activité hydrolytique de la lipase *candida Antartique B* (5000 U/ml) par titrage en utilisant la trioleine comme substrat. Dans l'étude faite par **Victor Sivozhelezov *et al.*, [57]**, l'activité de la lipase *Mucor Miehei* a été mesurée en titrant l'acide gras libéré par l'hydrolyse de l'huile d'olive. **Song et Rhee [55]**, ont étudié l'activité d'une phospholipase A₁ en mesurant par titrage la quantité des acides gras libérés après l'hydrolyse d'une émulsion de phosphatidylcholine.

I.7.2. Méthodes spectrophotométriques

1. Détection de l'alcool libéré après hydrolyse

Cette méthode consiste à mesurer la quantité du *p*-nitrophénol ($\lambda_{\max} = 400$ à 420 nm) libéré après l'hydrolyse de *p*-nitrophenyl esters par la lipase. L'activité de la lipase peut être calculé en comparant les valeurs à une courbe standard préparée avec du *p*-nitrophénol [58].

Plusieurs auteurs ont utilisé le *p*-nitrophényl palmitate (pNPP) et le *p*-nitrophényl acétate comme substrat pour déterminé les activités de plusieurs lipases : la lipase *Pseudomonas cepacia* [7], la lipase *Fusarium oxysporum* [59], la lipase *Candida rugosa* [60].



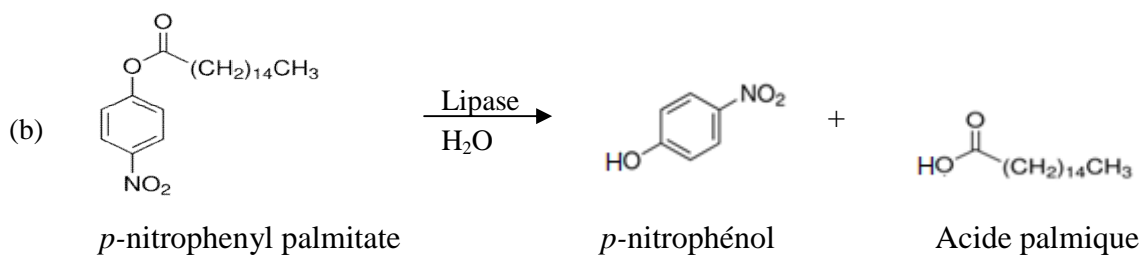


Figure I.7 : Réaction d'hydrolyse par la lipase :

(a) *p*-nitrophenyl butyrate, (b) *p*-nitrophenyl palmitate.

2. Détection de l'acide gras libéré après hydrolyse

Cette méthode consiste à mesurer la quantité d'acides gras complexés avec un réactif colorimétrique qui est l'acétate cuivrique/pyridine. Pendant l'hydrolyse du substrat par la lipase, les acides gras complexent avec le cuivre pour former des sels ou des savons cuivriques qui absorbent la lumière dans la région du visible ($\lambda_{\text{max}}=715$ nm). La quantification des acides gras libérés est déterminée en se référant à une courbe standard préparée en utilisant l'acide oléique [58]. Angkanurukpun *et al.*, [61] ont déterminé l'activité de la lipase *carica papaya* (CPL) en utilisant cette méthode avec la trioléine comme substrat. Et Saisuburamaniyan *et al.*, [62] rapporte que c'est une méthode simple et sensible pour l'évaluation de l'activité de lipase dans les sols.

I.7.3. Méthodes chromatographiques

Une autre méthode qui est la méthode chromatographique par HPLC couplée à un spectrophotomètre UV-visible permet aussi la détermination de la quantité des acides gras produit à la fin de l'hydrolyse.

Hao *et al.*, [63] ont combiné la HPLC à un spectromètre de masse pour mesurer la quantité de l'acide oléine libérée lors de l'hydrolyse de la trioléine par la lipase. Ils ont mis le mélange réactionnel dans le system HPLC-SM ou les acides gras libéré ont été séparés du reste de la réaction par HPLC et le spectromètre de masse à mesurer leurs quantités. Les résultats ont été traduis sous forme de graphe ou, il est observé différents pics, les concentrations des acides gras ont été calculées à partir des surfaces relative de ces pics.

Dans la méthode HPLC-SM, l'étape de la détection et de la quantification des acides gras libérés était complètement indépendante de la réaction lipolytique. Par conséquent, cette analyse est compatible avec divers substrats et les réactions peuvent se faire dans divers solvants et elle est indépendante du pH de la réaction. De plus, cette méthode peut quantifier des concentrations plus élevées là, où d'autres détecteurs ne le peuvent pas.

I.8. APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES LIPASES LIBRES ET IMMOBILISÉES

La polyvalence réactionnelle des lipases et la diversité de leurs propriétés catalytiques leur confèrent une place de choix pour des applications industrielles potentielles, telles que la production de produits alimentaires, de détergents, et de produits pharmaceutiques ainsi que la fabrication du papier [4]. L'utilisation des lipases dans ces nombreux secteurs requiert la connaissance des propriétés spécifiques du substrat et de l'enzyme comme la spécificité, la stabilité, la température et le pH [64]. Quelques applications principales des lipases sont récapitulées dans le tableau I.4.

Tableau I.1: Applications industrielles des lipases [65].

Industries	action	Production ou application
Détergents	Hydrolyse des graisses.	Enlèvement des taches huileuses des tissus.
Produits laitiers	Hydrolyse des matières grasses du lait, mûrissant des fromages,	Développement des aromatisants en lait, fromage, et beurre.
Boulangerie	Amélioration de saveur.	Prolongation de durée de conservation.
Alimentaire.	Amélioration de la qualité.	Mayonnaise, dressages.
Industrie du Bio	Transestérification	Nourritures saine.
Des viandes et des poissons	Développent des arômes.	Productions de produits à base de viande ou de poisson.
Graisses et huiles	Transestérification ; hydrolyse.	beurre de cacao, margarine, acides gras, glycérol, mono -, et diglycérides.
Produits chimiques	Enantiosélectivité, synthèse	Produits chimique et modules chiraux.
pharmaceutiques	Transestérification ; hydrolyse	Aides digestifs, problèmes d'assimilations des lipides.
Cosmétiques	Synthèse	émulsifiants.
Cuir	hydrolyse	Produits en cuirs.
Papier	hydrolyse	Papier avec une meilleure qualité.

I.8.1. Lipases dans l'industrie alimentaire

L'utilisation des enzymes dans l'industrie alimentaire au lieu des processus chimiques traditionnels a été développée au cours de ces dernières années dues à l'intérêt accru pour les produits naturels ou le Bio.

De nos jours, des lipases sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour l'accélération de la maturation de plusieurs fromages tels que le cheddar et le fromage bleu [6]. Hasan *et al.*, [66], rapporte que des lipases d'origine microbienne différente ont été

employées pour le raffinage du riz afin d'obtenir un meilleur arôme, et pour le lait de soja modifier afin d'améliorer son goût.

Le beurre de cacao est une matière première importante dans la fabrication du chocolat et pour les industries de confiserie. Sa consistance et ses qualités, dérivant de la composition en acides gras de ses triglycérides, qui sont très recherchées par le consommateur. Mais l'offre est limitée, et la forte demande entraîne la flambée des prix sur le marché. Un substitut de beurre de cacao avec une composition en triacylglycérols semblable au beurre de cacao peut être préparé à partir de graisses ou d'huiles bon marché. Certaines études récentes ont montré qu'une lipase immobilisée par adsorption sur une résine macroporeuse, a permis la synthèse d'un substitut de beurre de cacao par transestérification d'huile de graines de thé, stéarate de méthyle et palmitate de méthyle[67]. La transestérification implique l'échange entre un groupe acyle et un alcool (alcoololyse) ou avec le glycérol (glycérolyse) [6].

I.8.2. Lipases pour la production de biodiesels

Les limites et la diminution rapide des ressources combustibles fossiles, les prix croissants du pétrole brut, et des soucis environnementaux ont été à l'origine de l'utilisation des huiles végétales comme carburants alternatifs [68]. Le biodiesel à base d'huile végétale ne produit pas d'oxyde de soufre et réduit les émissions de particules de suie d'un tiers en comparaison avec les carburants issus du pétrole. En raison de ces avantages environnementaux, le biodiesel peut être prévu comme produit de remplacement pour le carburant diesel conventionnel [2].

La réaction de synthèse de biodiesel est représentée dans la figure I.8 :

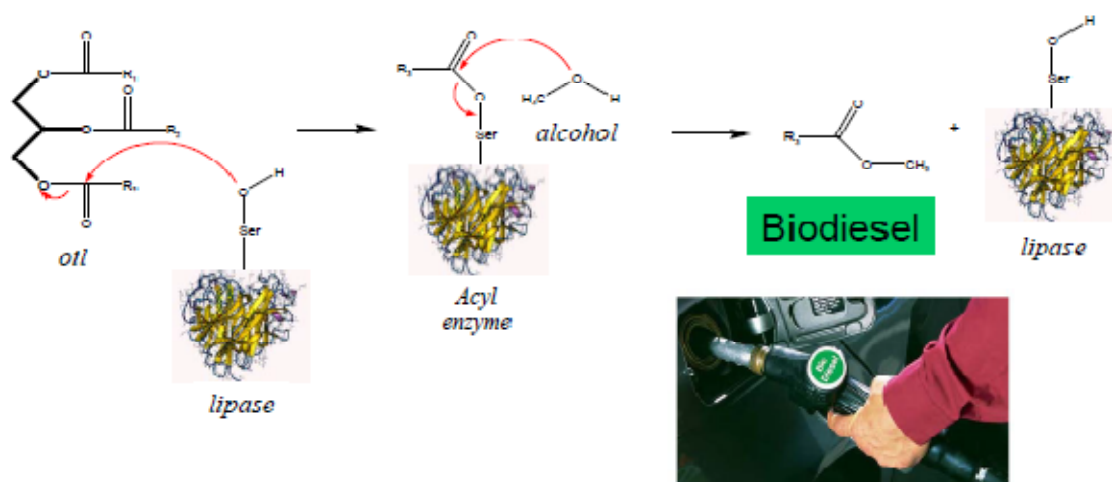


Figure I.8: Synthèse de biodiesel.

Li et al., [68] ont utilisé, la lipase *p. cepacia* immobilisée sur une membrane à base de polyacrylonitrile comme catalyseur pour la réaction de transestérification pour convertir l'huile de soja en biodiesel. Dans les conditions optimales de réaction, la conversion de l'huile de soja en biodiesel a réalisé un rendement de 90% après 24 h de réaction. En étudiant la réutilisabilité, la lipase immobilisée *p. cepacia* garde 91% de son activité initiale après 10 fois de réutilisation.

Salis et al., [2] ont utilisé, huit lipases commerciales qui ont été immobilisées sur le polypropylène par l'intermédiaire de l'adsorption physique pour la production de biodiesel. La lipase immobilisée de *Pseudomonas fluorescens* était le biocatalyseur le plus actif (taux de production de biodiesel = 58% après 22 h et un taux de 98% après 70 h), suivi de la lipase immobilisée *pseudomonas cepacia* (taux de production de biodiesel = 37% après 51,5 h), tandis que toutes les autres lipases (*Rhizopus oryzae*, *candida rugosa*, *javanicus mucor*, *penicillium roqueforti*, *aspergillus camembertii*, *penicillium*), étaient inactives pour la synthèse du biodiesel.

I.8.3. Lipases dans les détergents

Une enzyme a été employée pour la première fois en 1913 par l'Allemand appelé Otto Röhm, le fondateur de la compagnie chimique géante Röhm et Hass, pour améliorer l'efficacité d'un détergent de blanchisserie. L'enzyme qu'il a employé, dérivée des pancréas d'animaux, qui était un extrait brut non purifier, qui à leur tour, ont parfois souillé le textile censé nettoyer. Le processus d'extraction assez coûteux des enzymes ne permettait pas de les inclure dans des détergents pour l'usage ménagé [69]. De nos jours la puissance de nettoyage des détergents est à la pointe de la technologie; tous les détergents contiennent les ingrédients semblables et sont basés sur les mécanismes semblables. Pour améliorer la détergence, les nouvelles variétés modernes de détergents en poudre ou liquide contiennent une ou plusieurs lipases [70].

I.8.4. Lipases dans l'industrie pharmaceutique

La chiralité est un facteur principal dans l'efficacité de beaucoup de médicaments. Ainsi, la production des énantiomères simples des intermédiaires de médicament est devenue de plus en plus importante dans l'industrie pharmaceutique. Les intermédiaires chiraux sont dans une demande élevée des industries pharmaceutiques et agrochimiques pour la préparation des substances en bloc de médicaments et des produits agricoles. Il y a eu une

conscience croissante de l'énorme potentiel des enzymes pour la transformation des produits chimiques synthétiques avec une haute énantiosélectivité [66].

Zhu et al., [71] ont utilisé la lipase *candida rugosa*, immobilisée par liaison covalente à un support sensible au changement de pH. La lipase immobilisée peut effectuer l'hydrolyse énantiosélective de l'ester ketoprofen sous une forme soluble qui peut être récupérée après précipitation en ajustant simplement le pH. L'activité de la lipase immobilisée était de 1,5 fois supérieures et l'énantiosélectivité était 8,7 fois supérieure par rapport à la lipase libre. Après huit cycles d'utilisation la lipase immobilisée a gardé 46% de son activité et son énantiosélectivité est restée inchangée.

Zhang et al., [72] ont utilisé la lipase *candida antarctica* pour la résolution cinétique de flurbiprofen racémique par la méthode d'estérification énantiosélective avec des alcools. Et **Zhang et al., [3]** ont fait une étude cinétique de l'hydrolyse énantiosélective de l'ester éthylique (R,S)-ketoprofen en utilisant la lipase *T. laibacchii* comme catalyseur. Les expériences cinétiques ont été effectuées dans un réacteur à différentes températures (30-45°C). Le rapport enantiomérique élevé (E=87) indique que cette métabolisation est un exemple prometteur pour la production industrielle de (S)-ketoprofen.

I.8.5. Lipases dans l'industrie du papier

L'industrie de fabrication de papier nécessite des quantités énormes de biomasse lignocellulosique chaque année. La technologie pour la fabrication de la pulpe est fortement diverse, et les nombreuses occasions existent pour l'application des enzymes. Dans le passé, les enzymes ont trouvé quelques utilisations dans l'industrie du papier, mais celles-ci ont été principalement confinés aux secteurs des modifications d'amidon cru. Les lipases ont été utilisées dans un processus de fabrication de papier à grande échelle comme opération courante qu'à partir du début des années 90 [66].

Bajpai et al., [73] ont utilisé la lipase pour le désencrage du papier, elle peut augmenter le taux de la pulpe, et augmenter la blancheur et l'intensité du papier, et réduire l'usage de produit chimique, et prolonger la vie de l'équipement, réduire le niveau de pollution des eaux de rejet, économiser l'énergie et le temps et ainsi réduire les coûts.

CHAPITRE II

*RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES
SUR L'IMMOBILISATION
DES ENZYMES*

II.1. PRINCIPALES MÉTHODES D'IMMOBILISATION DES ENZYMES

Des enzymes immobilisées sont définies par Katchalski-Katzir à la première conférence de technologie d'enzymes, tenue chez Henniker, NH, Etats-Unis, en 1971, comme l'emprisonnement ou la localisation physique d'une enzyme dans une certaine région définie de l'espace avec la conservation de l'activités catalytique, et qui peut être employée à plusieurs reprises [74]. La première étude d'immobilisation de lipase a été effectuée en 1956 par Brandenberger qui immobilise une lipase par liaison covalente sur des résines échangeuse d'ions [69]. Les premières tentatives pour l'utilisation de la lipase immobilisée pour des réactions de synthèse d'ester ou d'hydrolyse ont été faites par Iwai et ces collaborateurs en 1964[69].

Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée à l'enzyme. En tenant compte de plusieurs paramètres tels que l'activité enzymatique, l'efficacité des caractéristiques d'utilisation, de désactivation et de régénération de l'enzyme, du coût du procédé d'immobilisation, de toxicité des réactifs d'immobilisation, et des propriétés finales désirées de l'enzyme immobilisée.

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique. On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme. La rétention physique exploite la grande différence de taille entre l'enzyme et le substrat, d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir l'enzyme. Elle peut être un réseau, une capsule, ou une membrane [75]. La liaison entre l'enzyme et le support se réalise soit par adsorption, soit par création d'une liaison covalente (fixation covalente sur support activé et co-réticulation). L'immobilisation présente souvent l'avantage de stabiliser la protéine et de permettre une utilisation prolongée [76]. Le principe de ces méthodes est résumé dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : différentes méthodes d'immobilisation des enzymes [77].

Immobilisation par rétention physique	Inclusion	<ul style="list-style-type: none"> • Dans une matrice constituée par le réseau tridimensionnel d'un polymère. • Dans une membrane.
	encapsulation	<ul style="list-style-type: none"> • Dans une microcapsule • Dans une fibre creuse.
Immobilisation par interaction physique ou liaison chimique	Fixation sur un support	<ul style="list-style-type: none"> • Par adsorption.
		<ul style="list-style-type: none"> • Par liaison covalente.

II.1.1. Immobilisation par inclusion

L'enzyme est dispersée dans une solution homogène de monomère ou d'émulsion. La polymérisation du monomère conduit à la formation d'un réseau tridimensionnel au sein duquel l'enzyme est emprisonnée. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme et permet la diffusion du substrat. Plusieurs polymères, entre autres l'alginate, le chitosane, le gel polyacrylamide et le gel d'amidon, sont utilisés.

Des travaux sur l'inclusion de la lipase dans des gels d'alginate, de chitosane, et de polyacrylamide ont été publiés [78, 79, 80, 81, 82]. Shafei et Allam [78], ont immobilisé la lipase *penicillium chrysogenum* par inclusion sur divers supports à savoir le gel d'alginate, de k-carrageenan et le gel polyacrylamide. Le k-carrageenan a été mélangé simplement avec la lipase à 50°C puis disposé dans une boîte de pétri et laissé à l'air libre pour se solidifier. Après la solidification ce gel a été conservé dans du KCl à 4°C. Le gel polyacrylamide a été obtenu en mélangeant l'acrylamide, du bisacrylamide, de l'ammonium persulfate, du SDS (sodium dodécyle sulfate) et du N, N, N1, N1-tetraméthyl ethylènediamine (TEMED) puis la lipase a été ajoutée. Les taux d'inclusion de la lipase dans le gel d'alginate, de k-carrageenan et le gel polyacrylamide étaient de 81,57%, 63,41% et 48,93% respectivement. Le gel d'alginate a gardé 72,09% de son activité après l'hydrolyse de l'huile d'olive pendant 6 utilisations.

D'autres travaux sur l'inclusion de la lipase dans des gels de polyacrylamide ont été menés par Knight *et al.*, [79]. Ils ont utilisé la même technique que Shafei *et al.*, pour immobiliser la lipase *Fusarium solani* (FS1) par inclusion dans le gel de polyacrylamide. La lipase garde 53% de son activité catalytique en utilisant la trioléine comme substrat.

L'électrospinning a été utilisé par Sakai *et al.*, [83], elle consiste à faire dissoudre la lipase *Rhizopus oryzae* et le polystyrène dans une solution de N,N-diméthylformamide, et effiler le polymère sous forme de nanofibres avec un diamètre de 200nm, la lipase ainsi immobilisée a montré 77% d'activité après 10 cycles d'utilisation.

Liu *et al.*, [84] ont immobilisé la lipase provenant de *Sp. Burkholderia* sur une membrane à base de nitrate de cellulose (CN) par l'intermédiaire de la filtration. La lipase de CN-immobilisée pouvait maintenir 60% de son activité originale après neuf fois d'utilisations répétées.

II.1.2. Immobilisation par encapsulation

Cette technique consiste à enfermer des enzymes dans une membrane semi-perméable. La limitation à des substrats de faible poids moléculaire pour l'enzyme, constitue

l'inconvénient de cette méthode. La polymérisation interfaciale qui aboutit à la formation des microcapsules entraîne fréquemment une dénaturation des enzymes. Certains ont alors proposé d'utiliser des fibres creuses à travers lesquelles l'enzyme peut diffuser [8].

Une nouvelle technique consiste à l'encapsulation de la lipase dans un aérogel à base de silice qui a été utilisée par **Uyanik et al.**, [8]. Cette technique appelée procédure sol-gel utilise le séchage au dioxyde de carbone supercritique (SC-CO₂) à haute et basse pression. Les résultats montrent que cette méthode offre à l'enzyme une meilleure stabilité thermique et donc une meilleure résistance à la dénaturation, et l'activité catalytique de la lipase *Candida rugosa* encapsulée a été améliorée.

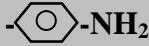

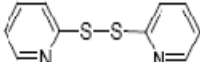
Jegannathan et al., [85] ont immobilisé la lipase *Burkholderia cepacia* par encapsulation dans un biopolymère, le k-carrageenan, pour la production du biodiesel à partir de l'huile de palme, la lipase a gardé 82% d'activité catalytique après cinq cycles d'utilisation. L'encapsulation de la lipase a été effectuée par une technique de coextrusion, qui consiste à emprisonner l'enzyme dans une membrane poreuse formant une double couche. La solution d'enzymes se trouve dans l'aiguille interne de l'appareil et le k-carrageenan est situé dans l'aiguille externe. La lipase est co-extrudée avec un débit de 5 ml/h et le polymère avec un débit de 50 ml/h à l'aide d'une pompe. Cette méthode d'encapsulation présente un grand avantage qui est le taux d'encapsulation qui avoisine les 100%.

II.1.3. Immobilisation par liaison covalente

Cette immobilisation est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support. Ces groupes, en général insuffisamment réactifs, nécessiteront une activation préalable. A priori, il faut activer soit l'enzyme, soit le support. Pour des raisons qui tiennent à la difficulté de maintenir l'activité de l'enzyme (l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme peut conduire à la dénaturation de l'enzyme) et aussi à la faible réactivité chimique des acides aminés, on choisit généralement d'activer le support [4].

Les principaux groupements réactionnels entre le support et l'enzyme sont représentés dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Principaux groupements réactionnels entre le support et l'enzyme [86].

Groupement fonctionnel au niveau du support	Composé bifonctionnel	Groupement fonctionnel au niveau de l'enzyme
-COOH	Carbodiimide ($R_1-N=C=N-R_2$) Chlorure d'acide (PCl_3, PCl_5)	-NH ₂
-OH	Chlorotriazine ($C_3N_3Cl_2$) Halogénure de cyanogène (BrCN, ClCN)	-NH ₂
-NH ₂	Glutaraldéhyde (OHC-(CH ₂) ₃ -CHO)	-NH ₂
-NH ₂	Carbodiimide ($R_1-N=C=N-R_2$) Isothiocyanate (R-N=C=S)	-COOH
 -NH ₂	Isothiocyanate (R-N=C=S) Isocyanate (R-N=C=O) Sels de diazonium R-  -N ⁺ =N, Cl ⁻	-Tyrosine
-SH	4,4-Dithiodipyridine 	-SH

Le principal avantage de la liaison covalente, c'est que cette immobilisation est très solide. Contrairement à l'adsorption physique, la force de liaison entre l'enzyme et le support est si forte qu'aucune fuite des enzymes ne se produit, même en présence de substrat ou solution de force ionique élevée. En outre, les enzymes immobilisées obtenues sont généralement très stables et résistants aux conditions extrêmes (pH, température). La structure 3-D de la protéine est considérablement modifiée après la fixation au support. Cette modification entraîne généralement une perte significative de l'activité initiale du biocatalyseur [86].

Knight et al., [79], ont immobilisé la lipase *Fusarium solani* (FS1), par liaisons covalentes sur des billes de polyacrylamide activé par le glutaraldéhyde, ils ont constaté 12% de retenue de la lipase et 97% d'activité a été maintenue en utilisant le triolein comme substrat.

Pour leur part, **Huang et al.**, [87], ont immobilisé la lipase *Candida rugosa*, par liaison covalente sur des membranes fibreuses à base de poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyéthyle méthacrylate) activés par différents composés (l'épichlorhydrine, et la p-benzoquinone). Ils ont montré que les méthodes d'activation des groupes d'hydroxyle affecte l'activité de la lipase.

D'autres études ont été publiées telle que celle de la lipase immobilisée par liaisons covalentes sur une membrane à base de polypropylène par **Bayramoglu et al.**, [88]. Dans cette étude ils ont démontré que la lipase *Candida rugosa* immobilisée sur une membrane à base de polypropylène activée avec du glutaraldéhyde, avait une bonne rétention de l'activité après l'hydrolyse de l'huile d'olive (76% de son activité initiale). Et **Ye et al.**, [89] ont également constaté que la lipase *Candida rugosa* immobilisée par liaison covalente avait une meilleur activité (65%) que celle immobilisée par adsorption (38%). Contrairement aux résultats observé par **Fernandez et al.**, [7] qui ont remarqué que la lipase *Pseudomonas cepacia* immobilisée par liaison covalentes sur du silicone poreux et activé par le glutaraldéhyde n'a pas donné une bonne activité.

II.1.4. Immobilisation par adsorption

L'adsorption des enzymes est une méthode physique, elle se fait grâce aux interactions ioniques entre le support et l'enzyme. L'adsorption ionique est une méthode relativement simple, économique et rapide, les supports utilisés sont stables. L'avantage de l'adsorption est la désorption de l'enzyme du support après sa désactivation (en utilisant des conditions drastiques), et ensuite le support peut être utilisé pour l'adsorption d'enzyme fraîche [9, 86, 90].

Le succès et l'efficacité de l'adsorption des enzymes sur un support solide dépendent de plusieurs paramètres. La taille des protéines à adsorber, la surface spécifique du support et la nature de sa surface (porosité, taille des pores) sont cruciaux. Une immobilisation efficace dépend également de la concentration en enzymes. En effet, la quantité d'enzyme adsorbée par quantité de support augmente avec la concentration en enzymes atteignant un plateau à la saturation du support. Cette opération est habituellement effectuée à une température constante, et par conséquent, des isothermes d'adsorption sont obtenues et qui suivent les équations de Langmuir ou de Freundlich etc. Le pH auquel l'adsorption est conduite est également important puisque les interactions ioniques sont cruciales dans une telle immobilisation. Habituellement, on observe l'adsorption maximum pour des valeurs de pH près du point isoélectrique de l'enzyme [86].

L'octadécyle-Sepabeads a été utilisé par **Palomo et al.**, [91] pour immobiliser les lipases *candida antarctica*, *mucor miehei* et *candida rugosa* par adsorption. D'après **Palomo et al.**, [91], en dépit d'être immobilisées par simple adsorption les lipases ont été plus stables que celles immobilisées par liaison covalente multipoint et beaucoup plus stables que leurs enzymes libres respectifs. Et **Minovska et al.**, [92], ont constaté également que la lipase

Candida rugosa immobilisée sur des résines échangeuse ions était stable et démontrait un degré d'hydrolyse de l'huile d'olive de 99%.

Belhaj-Ben Romdhane et al., [10] ont immobilisé la lipase *thermophile talaromyces* (TTL) par adsorption notamment, par échange ionique sur le chitosane, traité préalablement avec du glutaraldéhyde, avec un taux d'immobilisation de 91%. La lipase immobilisée a pu être employée pendant dix cycles avec plus que 80% de son activité hydrolytique initiale comparée à l'enzyme libre. La figure II.1 suivante montre un schéma de l'immobilisation par adsorption.

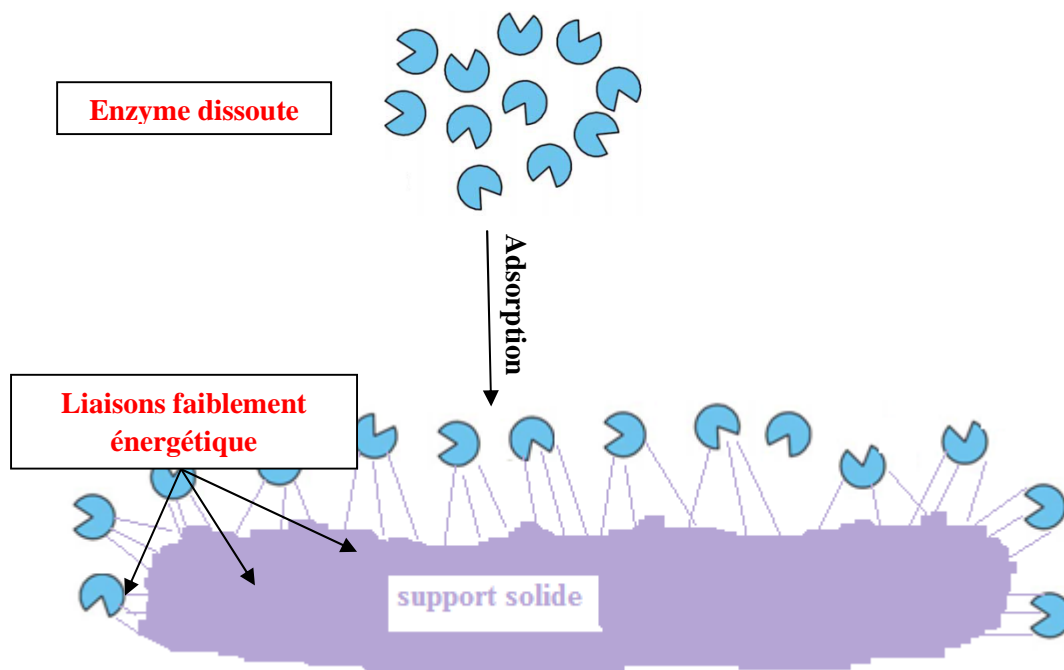


Figure II.1 : Immobilisation par adsorption.

II. 2 SUPPORTS UTILISÉS POUR L'IMMOBILISATION DES LIPASES

Le choix d'un support solide pour l'immobilisation des enzymes se fait souvent selon les propriétés qui sont importantes pour des applications industrielles potentielles: force mécanique, stabilité physique, caractère hydrophobique/hydrophile, capacité de charge d'enzymes et le coût.

Les supports généralement utilisés pour l'immobilisation peuvent être classés en deux groupes principaux. Les supports organiques peuvent être chimiquement activés par différentes techniques, ce qui constitue l'un de leurs principaux avantages car ils permettent la fixation d'enzymes par différentes voies. Les supports inorganiques sont généralement plus stables (résistance à l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries) mais la fixation covalente sur ces supports est difficile à cause de leur faible réactivité.

Tableau II.3. Supports généralement utilisés pour l'immobilisation des lipases.

Les Supports Organiques		Références
Les polysides	Cellulose	[93]
	Acétate de cellulose	[93]
	Carboxymethylcellulose	[94]
Macromolécules naturelles	Dextrane	[4]
	Agarose	[80]
	Alginate	[80]
	Chitosane	[81]
Polymères synthétiques	Polystyrène (PS)	[51]
	Polypropylène (PP)	[95]
	Polyéthylène téréphtalate (PET)	[96]
	Polyméthacrylate de méthyle (PMMA)	[97]
	Poly-acrylonitrile-co-2-hydroxyéthylméthacrylate	[87]
les résines d'échangeuse d'ions	Amberlite	[92]
	Duolite	[98]
Les Supports Inorganiques		Références
Les Argiles	Verre poreux	[92]
	Gel de silice	[92]
	Aluminosilicates	[99]

II.3. ACTIVITÉ DES LIPASES IMMOBILISÉES

L'immobilisation semble offrir principalement des avantages économiques. Cependant, il y a un certain nombre d'avantages à immobiliser les enzymes sur un support solide. Dans certains cas l'activité de l'enzyme immobilisé s'en trouve même améliorée par rapport à l'enzyme libre notamment dans des conditions de température, de pH, ou de force ionique plus élevé [91].

Pour déterminer l'effet de l'immobilisation sur l'activité des lipases immobilisée, plusieurs études ont été effectuées sur différentes lipases de la famille *Aspergillus* [64]. Dans ce but **Da Silva et al.** [64] ont comparé les activités des lipases *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, et *Aspergillus terreus* libre et immobilisée par adsorption sur la celite. Les résultats montrent que l'activité des lipases *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, et *Aspergillus terreus* immobilisée par adsorption c'est améliorée par rapport à l'activité des lipases libre. Par contre, l'activité de la lipase *Aspergillus niger* a baissé. Cette étude a mis en évidence que l'activité de l'enzyme immobilisée peut dépendre de la nature de l'enzyme utilisée.

Tableau II.4. L'influence de l'immobilisation sur les activités des lipases de la famille aspergillus [64].

Sources des lipases	Forme	Activité (U/ mg)
<i>Aspergillus flavus</i>	Libre	0,42
	immobilisée	0,45
<i>Aspergillus oryzae</i>	Libre	0,55
	immobilisée	0,71
<i>Aspergillus terreus</i>	Libre	0,47
	immobilisée	0,51
<i>Aspergillus niger</i>	Libre	0,56
	immobilisée	0,54

En effet, plusieurs études ont démontré que l'activité de la plus part des lipases étudiée diminuer après immobilisation [100, 101]. C'est le cas de **Nasratun et al.**, [102] qui ont immobilisé la lipase *candida rugosa* par adsorption sur des billes de chitosane. Ils ont comparé les activités relatives de la lipase libre et immobilisée. Le résultat expérimental montre que l'activité relative de la lipase immobilisée était de 72,25% alors que celle de la lipase libre était de 76,5%. **Nasratun et al** [102] rappellent que malgré que l'activité relative de la lipase libre ait été plus élevée, il est plus facile de séparer le produit final de la lipase immobilisée et il est possible de la réutilisée.

Romdhane et al., [10] ont immobilisé par adsorption la lipase *Talaromyces thermophilus* sur différent supports tels que le CaCO₃, et les résines Amberlite IRC 50, Duolite et DEAE-Sephadex. Les résultats obtenus ont mis en évidence que l'activité et la quantité de la lipase immobilisée dépend fortement du type de support utilisée (Tableau II.5). En effet la quantité et l'activité de la lipase immobilisée sur la résine échangeuse d'anions Sephadex-DEAE est plus grande par rapport à celles de la lipase immobilisée sur les résines échangeuses de cations Amberlite IRC 50 et Duolite. L'activité est donc non seulement fonction du type de support mais aussi de la charge à la surface du support.

Tableau II.5. L'influence du type de support l'activité de la lipase *Talaromyces thermophilus*.

Type de résine	CaCO ₃	Amberlite IRC 50	Duolite	Sephadex-DEAE
Taux d'immobilisation	15, 0	24,0	20,0	48,0
Taux d'activité	ND	32.	30.0	50.4

Deng et al., [103] quand à eux ont mis en évidence que l'activité et la quantité de la lipase immobilisée dépend fortement de la nature du support et du degré d'hydrophobicité,

lorsqu'ils ont immobilisé la lipase *Candida rugosa* sur le polypropylène (PP), le PP-poly-gamma stéaryle-L-glutamate (PSLG) et le PP-poly-alpha-allyle glucoside (PAG) avec des hydrophobicité décroissante. Leurs résultats montrent que la quantité immobilisée est d'autant plus grande que le support est hydrophobe (Tableau II.6).

Tableau II.6. Activité et quantité immobilisée de la lipase *Candida rugosa* [103].

supports	Activité (U/ mg)	Quantité de lipase adsorbée (mg/m ²)
polypropylène (PP)	69,9	82,7
PP-poly-gamma stéaryle-L-glutamate (PSLG)	88,1	74,6
PP-poly-alpha-allyle glucoside (PAG)	60,7	62,5

Grâce à l'introduction du poly-gamma stéaryle-L-glutamate sur la surface du polypropylène l'activité de la lipase *Candida rugosa* a augmenté par rapport à l'activité de la lipase adsorbée sur le polypropylène non modifié. Les longues chaînes du PP-poly-gamma stéaryle-L-glutamate (PSLG) interagissent avec la surface hydrophobe du site actif de la lipase plus que celles du poly-alpha-allyle glucoside (PAG), parce qu'elles sont plus hydrophobe et à cause de l'encombrement stérique de ce dernier (figure II.2).

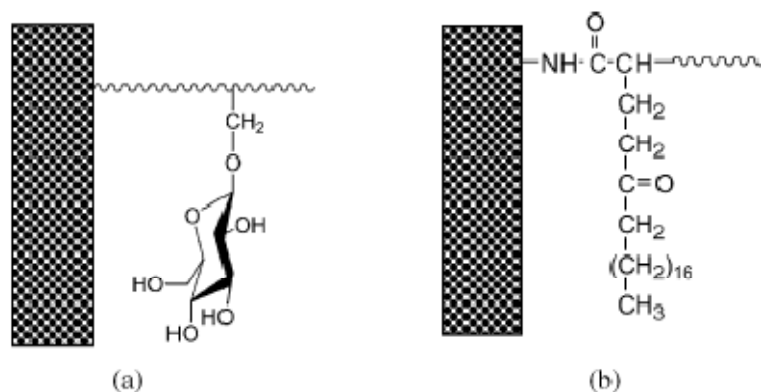


Figure II.2 : Schémas représentatif de (a) PP-poly-alpha-allyle glucoside (PAG) et (b) PP-poly-gamma stéaryle-L-glutamate (PSLG) [103].

Pereira et al [104], ont immobilisée par adsorption la lipase porcine pancréatique (PPL) et la lipase (CRL) *Candida rugosa* sur du chitosane mais sous deux forme différentes (billes poreuses et flocons). Leurs résultats montrent que l'activité des lipases immobilisée sur les billes de chitosane était plus élevée que celle immobilisée sur les flocons, ils attribuent cela à la surface spécifique des billes de chitosane qui est plus élevée que celle des flocons,

par conséquent la quantité de lipases immobilisée par les billes est plus grande. Donc l'activité dépend également de la quantité immobilisée (Tableau II.7).

Tableau II.7. Influence de la quantité immobilisée sur l'activité des lipases.

supports	Type de lipases	Activité (U/ mg)	Taux d'immobilisation
<i>Chitosane sous forme de billes poreuse</i>	PPL	8,6	4,3
	CRL	22,9	7,1
<i>Chitosane sous forme de flocons</i>	PPL	42,6	18,2
	CRL	42,7	14,7

II.4 PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES DES LIPASES IMMOBILISÉES

Le comportement cinétique des lipases immobilisées en fonction du pH, de la température est différent selon les supports utilisés et les lipases étudiées.

II.4.1. Effet de l'immobilisation sur le pH optimum d'activité

En générale le pH optimum d'activité des lipases immobilisée est le même que celui mesuré pour les lipases libre. **Lo et Ibrahim [105]** ont suivie l'évolution de l'activité de la lipase *pseudomonas sp* libre et immobilisée par adsorption sur la résine Amberlite XAD-7 en fonction du pH, les résultats qu'ils ont obtenus montrent que le pH optimum d'activité de la lipase libre et immobilisée est le même (pH=7). **Palomo et al., [91]** qui a immobilisée les lipases *Candida rugosa*, *Candida antarctica B* et *Mucor Miehei* sur l'octadécyle-Sepabeads, trouvent également le même résultat (pH=7). Le pH optimum d'activité de la lipase *Candida sp* n'a pas été modifié après son immobilisation sur des fibres en soie (pH=8) [106].

Par contre, le pH optimum d'activité de certaines lipases immobilisées est déplacé vers un pH alcalin par rapport à la lipase libre. C'est le cas de la lipase *Rhizopus oryzae* immobilisée par adsorption sur un aérogel à base de silice le pH optimum d'activité est décalé vers le pH plus alcalin de 8 à 8.5 [103], également de la lipase *Candida rugosa* immobilisée sur polypropylène, le pH optimum d'activité est décalé de pH 7,7 à 8,5 [103], et aussi de la lipase *Candida rugosa* immobilisée sur le chitosane, le pH optimum d'activité c'est décalé de pH 8,5 à pH 9,0[101].

Plusieurs auteurs ont essayé d'expliquer ce phénomène. **Deng et al., [103]** expliquent que l'immobilisation sur un support a pour conséquence l'orientation de la lipase vers la conformation ouverte, par conséquent le site actif est plus accessible. D'après **Kharrat et al.,**

[107], habituellement, l'immobilisation de l'enzyme sur un support cationique cause un décalage du pH optimum vers la gamme acide, tandis que, l'immobilisation sur un support anionique cause un décalage vers des valeurs basique de pH.

II.4.2 Effet de l'immobilisation sur la température optimum d'activité

L'étude de l'activité enzymatique des lipases libres et immobilisées en fonction de la température ont montré que dans beaucoup de cas les lipases immobilisées présentent une activité optimale à des températures plus élevées par rapport à celles observé pour les lipases libres. C'est-ce qui a été rapporté par **De Oliveira et al., [90]**. Ils ont observé que la température optimale de la lipase *Candida rugosa* immobilisée sur une résine à base de styrène/divinylbenzène est de 50°C alors que celle de la lipase libre est de 40°C et c'est le même constat qu'ont fait **Karra-Chaabouni et al., [108]** lorsqu'ils ont suivi l'évolution de l'activité de la lipase *Rhizopus oryzae* en fonction de la température. Alors que la température optimale de la lipase libre est de 37°C celle de la lipase immobilisée sur la cellulose est de 45°C et elle garde 90% de son activité initial.

Le même résultat a été observé par **Yilmaz et al., [109]**, la lipase *candida rugosa* immobilisée sur des billes de silice présente une température optimale d'activité enzymatique de 45°C, alors que celle de la lipase libre était de 35°C. L'amélioration de la résistance des enzymes à la dénaturation thermique semble être due à la l'interaction entre le support et l'enzyme.

Dans d'autre cas, les lipases quelles soient immobilisée ou libres ont la même température optimal. La lipase *Rhizopus oryzae* libre et immobilisée sur un aérogels à base de silice étudié par **Kharrat et al., [107]** présente une température optimum d'activité de 30°C. Et c'est le même résultats a été observé par **Awang et al., [110]** la lipase *Candida Rugosa* libre et immobilisée sur le polyuréthane a gardé la même température optimum d'activité de 40°C.

II.4.3 Effet de l'immobilisation sur la stabilité thermique

La stabilité thermique des enzymes est affectée par au moins deux facteurs. Le premier est la structure primaire de l'enzyme. Une teneur élevée en acides aminés hydrophobes dans la molécule d'enzyme fournit une structure compacte, qui n'est pas dénaturée facilement par un changement de l'environnement externe [111]. En outre, les ponts bisulfure et d'autres liaisons fournissent une résistance élevée à l'inactivation thermique. D'une façon générale, les lipases

animales et végétales sont habituellement moins thermostables que les lipases microbiennes [65].

Plusieurs études rapportent qu'il y a une amélioration de la stabilité thermique de plusieurs lipases après immobilisation [107, 112, 90, 100]. **Shafei et Allam [78]** rapporte que la lipase *Penicillium chrysogenum* immobilisée par inclusion dans l'alginate est plus stable que l'enzyme libre. Ils ont constaté qu'à 60 °C l'enzyme immobilisée avait retenu une activité de 62,79%, alors que la lipase libre garde 52,45%. Et **Uygun et al., [113]**, ont observé une amélioration de la stabilité de la lipase pancréatique porcine après son immobilisation sur des nanosphères à base de méthacrylate. L'activité de la lipase ainsi immobilisée conserve 92% d'activité catalytique par rapport à la lipase libre.

Dans l'étude menée par **Deng et al., [103]** la stabilité thermique des lipases *candida rugosa* immobilisée sur le polypropylène s'est améliorée par rapport à celle de la lipase libre. Il constate que la lipase libre a perdu toute son activité initiale après 100 minutes, et la lipase adsorbée sur le PP greffé au poly-gamma stéaryle-L-glutamate (PSLG) conserve 58% de son activité initiale après 2 h. mais la lipase adsorbée sur le PP greffé au poly-alpha-allyle glucoside (PAG) conserve 42% après la même durée. Il semble que les chaînes stéaryliques (Figure II.4) stabilisent la conformation ouverte de la lipase et améliorent sa résistance à la dénaturation thermique et également sa stabilité thermique.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

IMMOBILISATION DE LA LECITASE ULTRA

III.1. MATÉRIELS MÉTHODES

III.1.1 Matériel

III.1.1.1. La lipase utilisée

L'enzyme utilisée est une phospholipase (PLA₁) appelée lecitase®ultra (E.C 3.1.1.3). Elle est commercialisée par la société Novozymes. Cette phospholipase est obtenue par la fusion de la bactérie *Thermomyces lanuginosa* et de la bactérie *Fusarium oxysporum*. Cette enzyme combine la stabilité de la lipase *T. lanuginosa* et l'activité de l'enzyme *F. oxysporum*. La lecitase®ultra est une phospholipase (PLA₁) qui hydrolyse les esters et qui montre une activité vers les phospholipides et les triglycérides (TG) en position sn₁ et les galactolipides. (Figure III.1) [18].

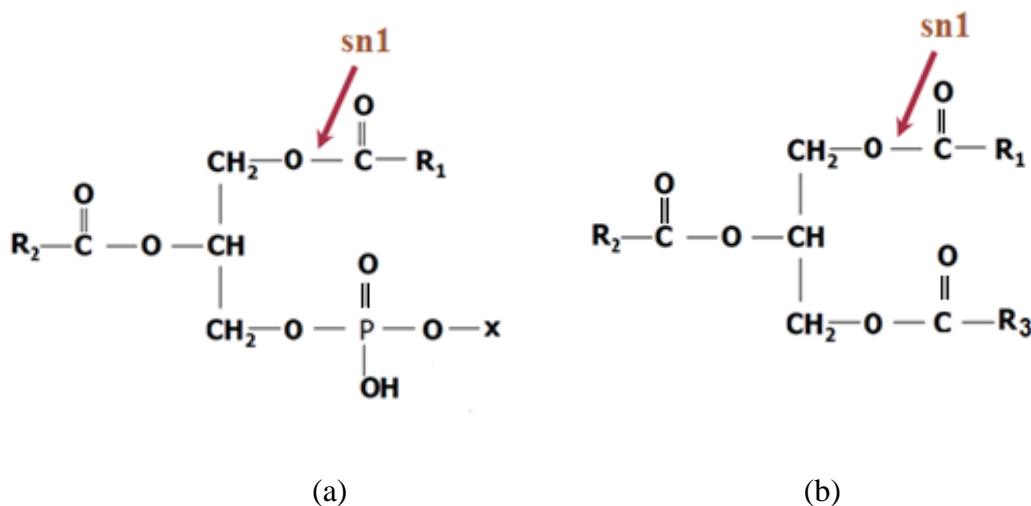


Figure III.1 : (a) Structure d'un phospholipide, (b) structure d'un triglycéride.

Elle se présente sous forme d'un liquide brunâtre, de densité 1,2 g/cm³. Selon les caractéristiques données par le fournisseur elle possède une masse moléculaire de 35 kDa avec une activité de 10 000 U/ml (une unité est égale à la quantité d'enzyme qui libère 1 μmole d'acide gras équivalent par minute à pH=5.0 et à 40°C).

La lecitase®ultra hydrolyse essentiellement la fonction esters des triglycérides et des phospholipides en position 1 (Figure III.1). Il a été déterminé par **Yang et al [114]** qu'à une température supérieure à 40°C c'est l'hydrolyse des phospholipides qui est largement favorisée et à une température inférieure à 40°C c'est l'hydrolyse des triglycérides qui est favorisée. **Aoki et al, [18]** ont ajouté que les PLA₁ sont généralement caractérisés par un volet amphiphile court, alors que les autres lipases qui montrent une spécificité envers les triglycérides seulement se caractérisent par un volet amphiphile long.

Lorsqu'elle est stockée dans des récipients fermés à 25°C, elle conservera son activité pendant au moins 3 mois. Elle absorbe la lumière dans le domaine de l'UV à 255 nm correspondant à l'absorbance des noyaux aromatique que constituent des groupements tryptophane, tyrosine ou phénylalanine qu'elle possède.

III.1.1.2. Les supports

Deux résines échangeuses d'ions commerciales fournies par Prolabo (France), ont été utilisées comme support pour l'immobilisation de la lecitase®ultra, une résine méthacrylique (Amberlite IRC 50) qui est un copolymère à base de polyacide méthacrylique/divinylbenzène, et une résine styrénique (Amberlite IRN 78) à base de styrène/divinylbenzène. Ces deux résines ont été choisies pour leur remarquable stabilité et leur grande capacité d'adsorption. Les caractéristiques principales de ces deux résines, données par le fournisseur, sont décrites dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Caractéristiques des résines Amberlite utilisées comme supports pour l'immobilisation de la lecitase® ultra.

Paramètres	Amberlite IRN 78	Amberlite IRC 50
Matrice du polymère	polystyrène divinylbenzène	Poly (acide méthacrylique) divinylbenzène
Groupe fonctionnelle	Triméthylammonium	-COO ⁻ , H ⁺
Forme ionique	Cl ⁻	Na ⁺
Capacité d'échange	2,6-3 eq kg ⁻¹ de résine sèche	10,0 eq kg ⁻¹ de résine sèche
Apparence	Billes sphérique rouge dorés translucides	Billes sphériques brunes
Taille effective	300-680µm	280-700µm
Rétention d'eau	43-53%	45%

Les résines cationique et anionique sont représentées respectivement par les figures III.2 et III.3.

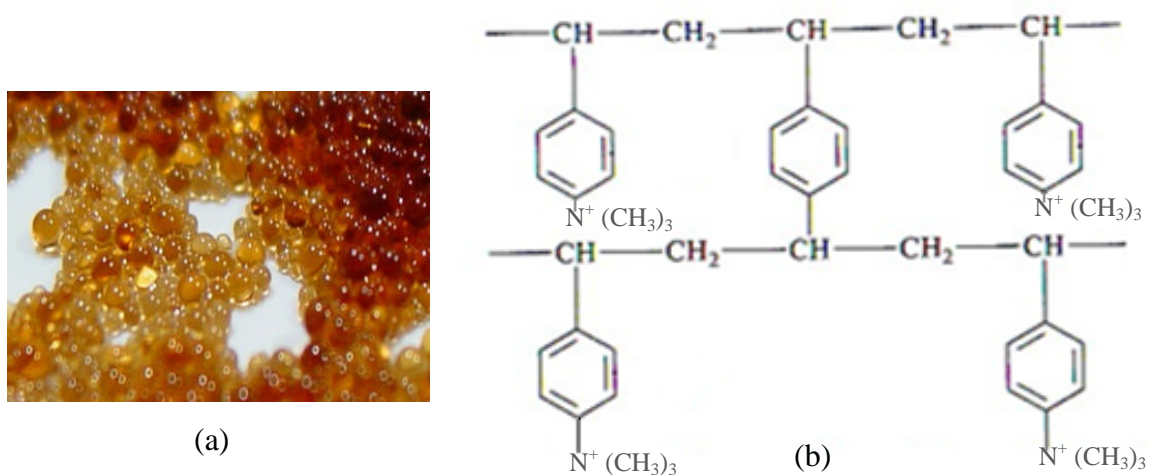


Figure III.2. : Résine anionique polystyrènes divinylbenzène. (a) Résine amberlite IRN78, (b) : structure macromoléculaire de la résine anionique polystyrènes-divinylbenzène.

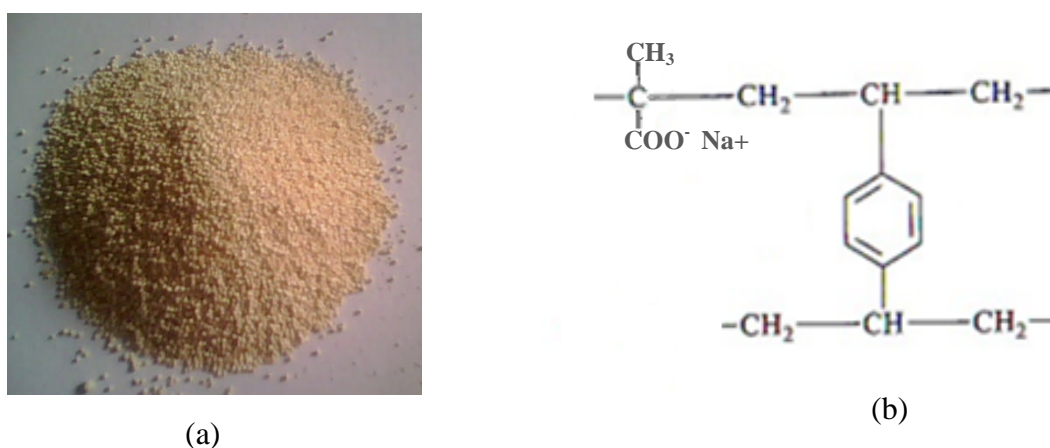


Figure III.3. : Résine cationique polyacide méthacrylique divinylbenzène. (a) : Résine amberlite IRC50, (b) : structure macromoléculaire de la résine cationique polyacide méthacrylique-divinylbenzène.

III.1.2. MÉTHODES

III.1.2.1. Spectroscopie Infrarouge

L'échantillon de lecitase®ultra est sous forme liquide et il a été analysé par un spectrophotomètre infrarouge à transformé de Fourier de marque IR Affinity-1 SHIMADZU, avec une résolution de 4 cm^{-1} et sur une région comprise entre 4000 et 400 cm^{-1} .

III.1.2.2. Spectrophotométrie UV-visible

a) Courbe d'étalonnage

Pour déterminer la courbe d'étalonnage de la Lecitase®ultra étudiée on commence d'abord par préparer une solution-mère de concentration donnée, puis on fait des dilutions à avec des concentrations bien déterminées sont préparées par dilutions successives. Ensuite ces solutions sont mesurées par spectrophotométrie UV-visible de marque Spectoscan 50. Enfin, une droite d'étalonnage a été établie représentant l'absorbance A au maximum de la bande d'absorption, en fonction de la concentration C (Annexe IV). Cette étude a été menée de manière à déterminer les quantités fixées de l'adsorbant depuis sa mise en contact avec l'adsorbant.

Les concentrations en enzymes, les masses de l'adsorbant et les flacons sont tous identiques et un tube témoin sans adsorbant a servi de référence. Les échantillons sont prélevés à des intervalles de temps bien définis.

III.1.2.3. Mesure de la surface spécifique (méthode BET)

La surface spécifique d'une poudre est estimée à partir de la quantité d'azote adsorbée en relation avec sa pression à la température d'ébullition de l'azote liquide et sous une pression atmosphérique normale. Les informations sont interprétées selon le modèle de Brunauer, Emmett et Teller (méthode BET). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un appareil de type «Quantachrome NovaWin2». Le même appareil permet de calculer le volume total des pores.

III.1. 3. Préparation des solutions tampons

Tous les réactifs utilisés pour la préparation des solutions tampons ont été fournis par BIOCHEM chemopharma (Montréal, Québec) et les pH ont tous été vérifiés à l'aide d'un pH-mètre de marque InoLab WTM tetracon 325.

Les solutions tampons phosphate utilisées ont été préparées régulièrement. Les tampons de pH de 3 à 4 sont obtenues avec du tampon phosphate de sodium-acide citrique 50 mM.

Les solutions tampons acétate utilisées de pH 3 à 6 ont été préparées quotidiennement utilisant le sel d'acétate de sodium (0,2 M) et d'acide acétique (0,2 M) et ajusté au pH désiré avec des solutions d'acide chlorhydrique (0,2 M) et d'hydroxyde de sodium (0,2 M), puis on ajuste avec de l'eau distillée pour avoir une concentration de 50 mM.

Les tampons de pH 5 à 8 sont obtenues avec du tampon phosphate disodique/monopotassique sodium 50 mM. Et Les tampons de pH de 9 à 12 sont obtenus avec du tampon phosphate de sodium-NaOH 50 mM.

III.1.4. Prétraitement des résines

Le prétraitement s'effectue dans une colonne en pyrex de 25cm de hauteur et de 3cm de diamètre bouchée avec de la laine de verre et fermée par un robinet où une quantité de résine (environ 100g) est introduite. La résine anionique (PS-DVB) est lavée avec de l'eau distillée puis activée par un lavage avec une solution d'acide chlorhydrique (1M) puis avec une solution d'hydroxyde de sodium (1M), alternée par un lavage abondant à l'eau distillée jusqu'à l'élimination de toute trace d'acide ou de base en contrôlant le pH des eaux de lavage à l'aide d'un pH-mètre. La résine est ensuite équilibrée par une solution tampon au pH désiré.

Dans le cas de la résine cationique (PAM-DVB), le lavage débute par une solution d'hydroxyde de sodium (1M) puis par une solution d'acide chlorhydrique (1M), alterné par un lavage abondant à l'eau distillé jusqu'à l'élimination de toute trace d'acide ou de base en contrôlant le pH des eaux de lavage à l'aide d'un pH-mètre. La résine est ensuite équilibrée par une solution tampon au pH désiré.

III.1.5. Adsorption de la Lecitase® Ultra sur les résines

Pour l'étude de l'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines échangeuse d'ions, on met dans des tubes à essai des échantillons de 10 ml de solution de lecitase®ultra à différentes concentrations initiales C_0 (de 0,06 à 6 g.l⁻¹) préparées dans des solutions tampons au pH désiré et placées dans un bain thermostaté muni d'un thermocouple à la température désirée. Nous introduisons dans ces tubes à essai 0,5g de résine sèche préalablement équilibrée au même pH de la solution enzymatique, ce pH est ajusté, si c'est nécessaire, avec des solutions d'acide acétique et d'hydroxyde de sodium. Les suspensions sont maintenues dans les même conditions jusqu'à l'équilibre.

Pour l'étude de l'adsorption sur les deux résines échangeuses d'ions (PS-DVB et PAM-DVB), nous avons choisie de fixer la quantité de l'adsorbant et de faire varier la concentration initiale de la lecitase®ultra. Les isothermes sont construites à différentes températures (de 25 à 60°C).

III.1.5.1. Détermination des conditions optimales d'adsorption

L'adsorption de la lecitase®ultra a été effectuée à différentes valeurs de pH de (3 à 12) pour les deux résines échangeuses d'ions (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78). La résine échangeuse d'anions est un polystyrène, réticulé avec du divinylbenzène, porteur de groupement ammonium- NH_3^+ . Pour permettre une bonne adsorption, il est préférable que la lecitase®ultra soit dans une solution alcaline, dans laquelle la charge totale est négative. La résine échangeuse de cations est un poly (acide méthacrylique), réticulé avec du divinylbenzène, et portant des groupements carboxylates COO^- . Pour permettre une bonne adsorption, la lecitase®ultra doit être dans une solution acide, avec une charge totale positive.

Les températures de l'adsorption ne doivent pas dépasser $60^\circ C$ pour éviter une éventuelle dénaturation de l'enzyme, la gamme de température choisie pour l'étude de l'effet de la température sur l'adsorption de la lipase est de 25 à $60^\circ C$. Les concentrations initiales de la lecitase®ultra sont $0,06$, $0,12$, $0,5$, 1 , 2 , 3 et 6 g/l. La quantité de support choisie est fixée à $0,5$ g de résine dans une solution tampon de 10 ml en présence de l'enzyme. Tous les calculs des quantités adsorbées sont effectués avec les concentrations exprimées en mg/l.

III.1.5.2. Etude des isothermes d'adsorption de la lecitase®ultra à l'équilibre

L'adsorption de la lecitase®ultra par les résines méthacrylique et styrénique, est étudiée en traçant des isothermes d'adsorption, obtenue en reportant la quantité de lecitase®ultra adsorbée (Q_e) en fonction de sa concentration de dans la solution (C_e). Les échantillons utilisés pour construire ces isothermes sont obtenus en réacteur discontinu, en mettant en contact une série de solutions de lecitase®ultra de concentration initiale C_0 avec une masse d'adsorbant connue pendant un temps suffisant pour établir l'équilibre.

A l'équilibre, l'adsorbant chargé en enzyme est séparé de la solution. La concentration de la lecitase®ultra non adsorbée dans la solution (C_e) est déterminée par spectrophotométrie UV-visible. La quantité de lecitase®ultra adsorbée Q_e est obtenue à partir de la différence $C_0 - C_e$.

Une isotherme d'adsorption permet donc de traduire graphiquement l'équilibre s'établissant entre les molécules de la lipase présente dans la solution et celles adsorbées sur les supports utilisés. Lorsque le matériau adsorbant est saturé en enzymes, l'isotherme d'adsorption présentera un palier correspondant à la capacité d'adsorption maximum du matériau, noté Q_{max} .

La quantité d'adsorption d'équilibre de cellulase sur les supports, Q_e (mg/g) a été calculée selon l'équation :

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{m} \times V \quad (1)$$

Le pourcentage d'adsorption est évalué par la relation suivante :

$$A\% = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

Avec : V (ml) : est le volume de la solution de lipase en contact avec l'adsorbant (les résines méthacrylique et styrénique).

C_0 et $C_e \left(\frac{g}{l}\right)$: sont la concentration initiale de la lipase et à l'équilibre respectivement.

m (g) : est la masse du support.

III.1.5.3. Cinétique d'adsorption

L'analyse de cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra par les résines méthacrylique et styrénique est effectuée de la même façon que l'étude de l'équilibre, en mettant en contact plusieurs échantillons de résine sèche d'une masse 0,5g avec 10 ml de solution de lecitase®ultra avec une concentration initiale C_0 . A des intervalles de temps bien déterminés, les résines sont retirées très rapidement de la solution enzymatique qui est analysée par spectrophotométrie UV-visible afin de déterminer la concentration de lecitase®ultra non adsorbé et calculer la quantité adsorbée. La lecitase®ultra immobilisée est stockée dans les tubes à essai à 4°C.

La quantité de lecitase®ultra adsorbée Q_a en fonction du temps exprimé en mg de soluté par gramme de support, est donnée par la relation suivante :

$$Q_a = \frac{(C_0 - C_t)}{m} \times V \quad (3)$$

Avec : V (ml) : est le volume de la solution de lipase en contact avec l'adsorbant (les résines méthacrylique et styrénique).

C_0 et $C_t \left(\frac{g}{l}\right)$: sont la concentration initiale de la lipase et au temps (t) respectivement.

m (g) : est la masse du support.

Le pourcentage d'adsorption est évalué par la relation suivante :

$$A\% = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100 \quad (4)$$

III.1.5.4. Modélisation des isothermes d'adsorption

L'analyse quantitative des données expérimentales est réalisée en les ajustant par des modèles, c'est-à-dire des équations mathématiques établies à partir de mécanisme théorique. Un bon accord entre les prédictions d'un modèle et les données expérimentales indique que le phénomène observé se déroule selon le mécanisme décrit par le modèle utilisé. De plus, le meilleur ajustement des données expérimentales permet de quantifier les paramètres caractéristiques de ce mécanisme. Il est alors possible de comparer facilement les résultats à ceux obtenus par d'autres systèmes employant le même modèle et de faire les prévisions de comportement. Différents modèles sont mis en place pour quantifier la relation entre Q_e et C_e . Les modèles de Freundlich et Langmuir sont utilisés dans notre étude pour interpréter les données expérimentales.

a) Modèle de Langmuir

Le modèle de Langmuir est bâti à partir d'une analyse de l'équilibre entre les molécules adsorbées et les molécules libres en solution. Il s'appuie sur les hypothèses suivantes :

- Les sites d'adsorption sur le matériau sont indépendants et équivalents.
- Chaque site ne peut adsorber qu'une seule molécule, formant ainsi une monocouche sur la surface.
- Les molécules adsorbées n'interagissent pas entre elles.

Ce modèle permet de prévoir la saturation d'un adsorbant lorsque tous les sites susceptibles d'interagir avec les entités adsorbées sont occupés. Ce phénomène se traduit sur l'isotherme d'adsorption par un palier, c'est-à-dire une valeur constante de Q_e , dénommée capacité d'adsorption maximum Q_{max} . Le modèle de Langmuir apparaît donc comme particulièrement adapté à l'étude d'adsorbants possédant un nombre limité de sites actifs lorsque les ions ou molécules adsorbés se montrent peu capables de se condenser en couches multiples. L'équation de Langmuir, est donnée par la relation suivante n°5 :

$$Q_e = \frac{Q_{max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (5)$$

Où Q_e est la quantité d'entités adsorbées à l'équilibre ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), C_e leur concentration dans la solution ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), Q_{\max} la capacité d'adsorption maximum de l'adsorbant ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) et K_L la constante de Langmuir ($\text{l}\cdot\text{g}^{-1}$).

Par ailleurs la linéarisation de la fonction de saturation (5) par passage à l'inverse donne l'équation (6):

$$\frac{1}{Q_e} = \left[\left(\frac{1}{Q_0 K_L} \right) \left(\frac{1}{C_e} \right) + \left(\frac{1}{Q_{\max}} \right) \right] \quad (6)$$

L'équation obtenue permet de déterminer les paramètres d'équilibre de la relation : Q_{\max} et K_L . Avec Q_{\max} : capacité maximale d'adsorption et K_L : constante de Langmuir.

Un facteur adimensionnel de séparation, R_L , est défini pour évaluer la validité du processus d'adsorption de type isotherme de Langmuir. Le facteur R_L est déterminé selon l'équation (20) suivante [97] :

$$R_L = \left(\frac{1}{1 + C_0 K_L} \right) \quad (7)$$

Avec C_0 : la concentration initiale de l'enzyme (g/l) et K_L : constante de Langmuir.

- $R_L = 0$ \Longrightarrow (isotherme irréversible) ;
- $0 < R_L < 1$ \Longrightarrow (isotherme favorable) ;
- $R_L = 1$ \Longrightarrow (isotherme linéaire) ;
- $R_L > 1$ \Longrightarrow (isotherme non favorable).

b) Modèle de Freundlich

Le modèle de Freundlich est un ajustement de l'isotherme à l'aide d'une loi de puissance

équation (21) :

$$Q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (8)$$

Où Q_e ($\frac{\text{mg}}{\text{g}}$) est la quantité d'enzymes adsorbées par gramme d'adsorbant, C_e ($\frac{\text{g}}{\text{l}}$) leur concentration dans la solution au contact de l'adsorbant, n le paramètre de Freundlich, et K_F ($\frac{\text{l}}{\text{g}}$) la constante de Freundlich, associées respectivement à l'infinité d'adsorption et la capacité d'adsorption. La forme logarithmique de l'équation (8) donne une équation linéaire :

$$\log Q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (9)$$

À partir des valeurs expérimentales de C_e et Q_e , nous avons calculé au moyen de la régression linéaire, les valeurs des constantes K_F et n , ainsi que les coefficients de corrélation R^2 . L'importance de l'exposant $1/n$ donne une indication de l'adéquation et de la capacité du système d'adsorbant/adsorbât [115]. Dans la plupart des cas, les valeurs de n qui se situent entre 1 et 10 montrent une adsorption bénéfique.

III.1.5.5. Modélisation des cinétiques d'adsorption

La modélisation des cinétiques d'adsorption, a pour but l'identification des mécanismes contrôlant la vitesse de l'adsorption.

Trois étapes limitantes sont généralement considérées :

- Le transfert de masse de la solution vers le matériau adsorbant,
- La diffusion à l'intérieur du matériau vers les sites actifs,
- La réaction d'adsorption elle-même.

Aux cours des expériences d'adsorption menées dans ce travail, une agitation des solutions est maintenue ce qui permet de les considérer comme homogènes et de négliger la diffusion des espèces dans la solution. Trois modèles sont utilisés pour approcher les données expérimentales : pseudo-ordre 1, pseudo-ordre 2 et diffusion intraparticulaire.

a) Modèle pseudo-ordre 1

Le plus ancien des modèles cinétique, le modèle pseudo-ordre 1 a été proposé par Lagergren en 1898. Considérant l'adsorption comme limitée par la formation de la liaison entre soluté et le site actif, la loi de vitesse peut être décrite avec l'équation (10) :

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(Q_e - Q_t) \quad (10)$$

Avec : Q_t est la quantité de soluté adsorbé au temps t , Q_e la quantité de soluté adsorbé à l'équilibre et k_1 une constante cinétique. Après intégration, on obtient l'équation (11) :

$$\ln(Q_e - Q(t)) = \ln(Q_e - Q_t) = \ln(Q_e) - k_1 t \quad (11)$$

Q_0 est la quantité initiale de soluté.

b) Modèle pseudo-ordre 2

Développé par **Ho et Mc Kay (1998) [116]**, pour traduire l'existence d'un équilibre entre espèces en solution et espèces adsorbées, le modèle pseudo-ordre 2 suit l'équation (12) :

$$\frac{dQ(t)}{dt} = k_2(Q_e - Q(t))^2 \quad (12)$$

$Q(t)$ est la quantité de soluté adsorbé au temps t , Q_e la quantité de soluté adsorbé à l'équilibre et k_2 une constante cinétique. Après intégration, on obtient l'équation (13) :

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{t}{Q_e} \quad (13)$$

c) Modèle de diffusion intraparticulaire

Le modèle de diffusion intraparticulaire suppose que l'adsorption n'est pas limitée par la réaction entre soluté et site actif mais par la diffusion du soluté à l'intérieur du matériau. L'équation mathématique (14) est donnée par Weber et Morris [117].

$$Q_t = K_d t^{1/2} + C_i \quad (14)$$

K_d est la constante de diffusion. Elle dépend du coefficient de diffusion de l'espèce considérée, ainsi que de la largeur des pores empruntés à l'intérieur du matériau adsorbant. C_i nous renseigne sur l'épaisseur de la couche limite. Plus l'interception est grande, et plus l'effet couche limite est grande. En portant Q_e en fonction de la racine carrée du temps, la pente de la droite permet de déduire la constante de diffusion d'adsorption K_d [118].

III.2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.2.1. Caractérisations des produits utilisés

III.2.1.1. Dosage de la quantité de la lecitase®ultra par spectrophotométrie UV- visible

La spectrophotométrie UV- visible est l'une des méthodes de dosage des protéines la plus utilisées, car elle est rapide et ne demande pas de réactifs particuliers. Le spectre UV- visible de la lecitase® ultra a été enregistré entre 200 et 400 nm. Il est représenté dans la figure III.4.

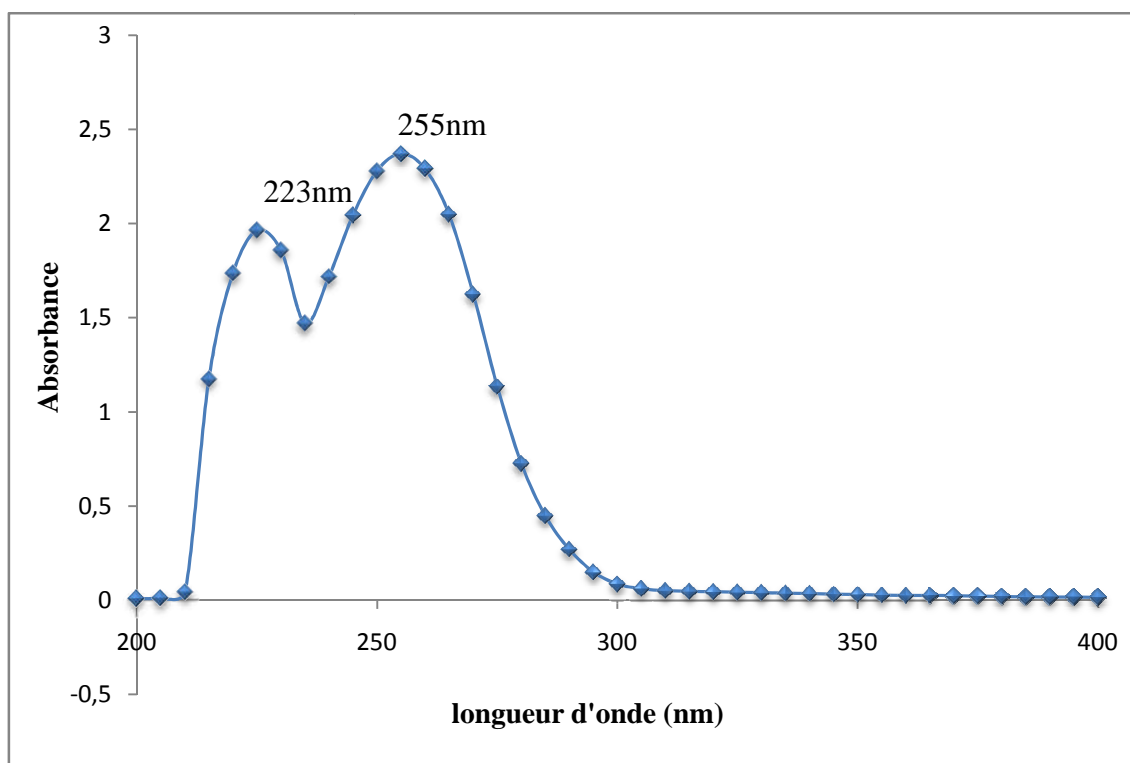


Figure III.4. : Spectre UV- visible de la lecitase@ultra.

La figure III.4 montre deux bandes d'absorption maximale, la première à 223 nm et la deuxième à 255nm. La bande de 280 nm d'absorption du tryptophane qui est l'acide aminé le plus opaque à cette longueur d'onde [119] n'a pas été détecté. Ceci est certainement dû au fait que la lecitase@ultra est moins riche en tryptophane. C'est le même résultat qu'a trouvé **Pinholt (2010) [120]**.

Toutes les mesures de concentration en enzyme sont déterminées à une longueur d'onde de 255 nm à l'aide de la droite d'étalonnage (Annexe IV).

III.2.1.2. Spectre infrarouge de la lecitase@ultra

Le spectre FTIR de l'échantillon de lecitase@ultra, a été enregistré entre 400 et 4000 cm^{-1} (figure III.5).

Les données spectrales IR des protéines en générale et des enzymes en particulier présente neuf bandes caractéristiques d'absorption IR, à savoir, amide A, B, et amide I à VII et sont caractérisés par des modes de vibration sensible à la structure secondaire des protéines [121]. Parmi ces dernières, les bandes amide I et II sont les deux plus importants groupes de vibration pour les enzymes. Les hélices α présentent une bande amide I à 1652 cm^{-1} et une

bande amide II à 1548 cm^{-1} et les feuillets β antiparallèles dans la chaîne polypeptide ont deux bandes une intense à 1630 cm^{-1} et une autre faible à 1680 cm^{-1} [121].

La spectroscopie IRTF de la lecitase@ultra montre l'existence des bandes d'absorption centrées à 3276 et 2940 cm^{-1} caractéristique de l'élongation du groupement N-H de l'amide A, et de l'élongation du groupement C-H respectivement. La bande d'absorption à 2122 cm^{-1} correspond au recouvrement des deux absorbances de l'amide A et amide III. La présence des faibles bandes d'absorption à 1668 cm^{-1} correspond à l'élongation des groupements C=O des feuillets β antiparallèles dans la chaîne polypeptides.

La bande d'absorption à $1653,84\text{ cm}^{-1}$ est caractéristique de l'amide I, qui est due presque entièrement à l'élongation des groupements C=O des liaisons peptidiques de l'asparagine. Nous remarquons également, la présence des bandes 1092 , 1245 et 1412 cm^{-1} attribuées respectivement aux groupements N-C, C=C et à la déformation du groupement C-H du tryptophane. La bande d'absorption à 661 cm^{-1} est caractéristique de la torsion du groupement C-N de l'amide V.

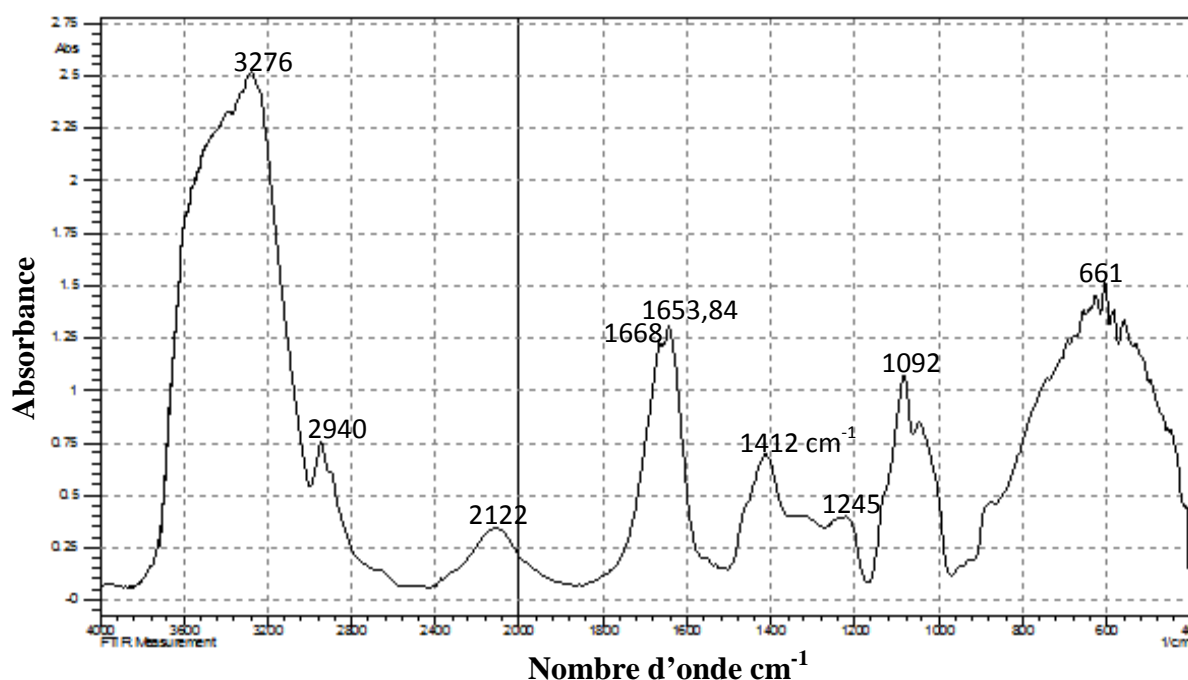


Figure III.5 : Le spectre infrarouge de l'échantillon de lecitase@ultra.

III.2.1.3. Mesure de la porosité et de la surface spécifique

L'appareil de type « Quantachrome NovaWin2 » a été utilisé dans cette étude. Les résines méthacrylique et styrénique (Amberlite IRC 50 et amberlite IRN 78) (0.0625 g) ont été dégazées à 80°C sous 10^{-3} mmHg jusqu'à l'équilibre, à la température de l'azote liquide

77,3 °K. Les résultats concernant l'étude de la surface spécifique et la porosité des résines styrénique et méthacrylique (la résine méthacrylique et la résine styrénique) sont présentés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Caractéristiques des résines.

Caractéristique résines	Surface spécifique (m ² /g)	Volume totale des pores (cc/g)
Résine méthacrylique	75.054	0.086
Résine styrénique	-	-

D'après ces résultats la surface spécifique de la résine méthacrylique est de 75,054 m²/g. De même, le volume total des pores est de 0,086 (cc/g). Par contre l'analyse par le B.E.T. de la résine styrénique n'a donné aucun résultat, qui peut être attribué aux sites d'échange qui étaient saturés la résine styrénique par des molécules ayant une grande taille moléculaire, provoquant ainsi l'inaccessibilité de l'azote gazeux à la surface interne et le blocage des micropores de la résine styrénique.

Les mesures de la surface spécifique qui ont été déterminées par le B.E.T. ne décrivent pas la surface disponible pour l'adsorption de la protéine. Les mesures B.E.T sont basées sur l'adsorption de molécules de N₂ sur la surface du support. La longueur de la liaison d'une molécule N est de 1,1 Å [122]. Les molécules de lipase ont un ou deux ordres de grandeur de diamètre plus grand que l'azote. Il peut y avoir de nombreux site pour effectuer l'échange des ions mais qui sont situées dans des pores trop étroits où la protéine ne peut pas pénétrer et ainsi la zone d'adsorption disponible pour l'adsorption de la protéine, est réduite.

III.2.2. Immobilisation de la lecitase ultra sur les résines échangeuse d'ions

Dans ce chapitre, l'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines styrénique et méthacrylique est étudiée. La comparaison des quantités de lecitase®ultra adsorbées par chacune des deux résines permet d'évaluer l'influence de la nature et la charge du support sur l'adsorption.

Dans un premier temps, le comportement du système à l'équilibre est observé. La mesure de la quantité de la lecitase®ultra adsorbée par les résines a permis de construire les isothermes d'adsorption. Ces isothermes donnent des informations sur les mécanismes d'adsorption impliqués et permettent de déterminer la capacité d'adsorption des résines. L'impact de la température et du pH sur les quantités de lecitase®ultra adsorbée sera également étudié. Dans un second temps, les cinétiques d'adsorption de la lecitase®ultra par

les résines sont étudiées de manière à déterminer les temps nécessaires pour atteindre l'équilibre d'adsorption.

Les résines échangeuse d'ions doivent répondre à certaines exigences. Leur structure poreuse doit être assez forte pour résister aux pressions élevées qui sont habituellement exercées dans les bioréacteurs en plus, de leur résistance aux agressions des produits chimiques. Les résines poly(styrène-divinylbenzène) et poly(acide méthacrylique-divinylbenzène), comme les résines amberlite IRC 50 et amberlite IRN 78, possèdent ces propriétés [92, 123].

III.2.2.1. Adsorption de la Lecitase® Ultra en fonction du pH

L'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines styrénique et méthacrylique a été effectuée à différents pH et à 40°C pour un temps de contact de 60 minutes et une concentration de la lecitase®ultra de 3 (g/l). Les résultats sont représentés dans les figures III.6 et III.7. Ces figures montrent d'une manière générale que la résine méthacrylique (PAM-DVB) adsorbe mieux en milieu acide et que la résine styrénique (PS-DVB) adsorbe mieux en milieu basique ce qui confirme nos prévisions.

Sur les figures III.6 et III.7 est observé l'existence d'un pH d'adsorption maximal de 4.8, sur la résine méthacrylique on peut en déduire que la lecitase®ultra a certainement changé de conformation après l'adsorption car le pH optimale de l'enzyme libre est de 5. Et on a trouvé un pH= 7 pour la résine styrénique.

On a trouvé un pH d'adsorption maximale de 7 pour la résine styrénique (PS-DVB) ce qui n'est pas en accord avec les résultats obtenus par **Boukraa-Oulad Daoud, et al [124]** lors de l'immobilisation de la cellulase sur une résine anionique similaire IRA 400 ou ils ont obtenu un pH optimum de 8. Mais la charge à la surface de la protéine dépend du point isoélectrique de l'enzyme, donc au dessous de pI elle est chargée positivement et en dessous de pI elle est chargée négativement donc on suppose qu'à pH=7 elle est chargée négativement donc elle est toujours attirée par la résine styrénique échangeuse d'anions (PS-DVB).

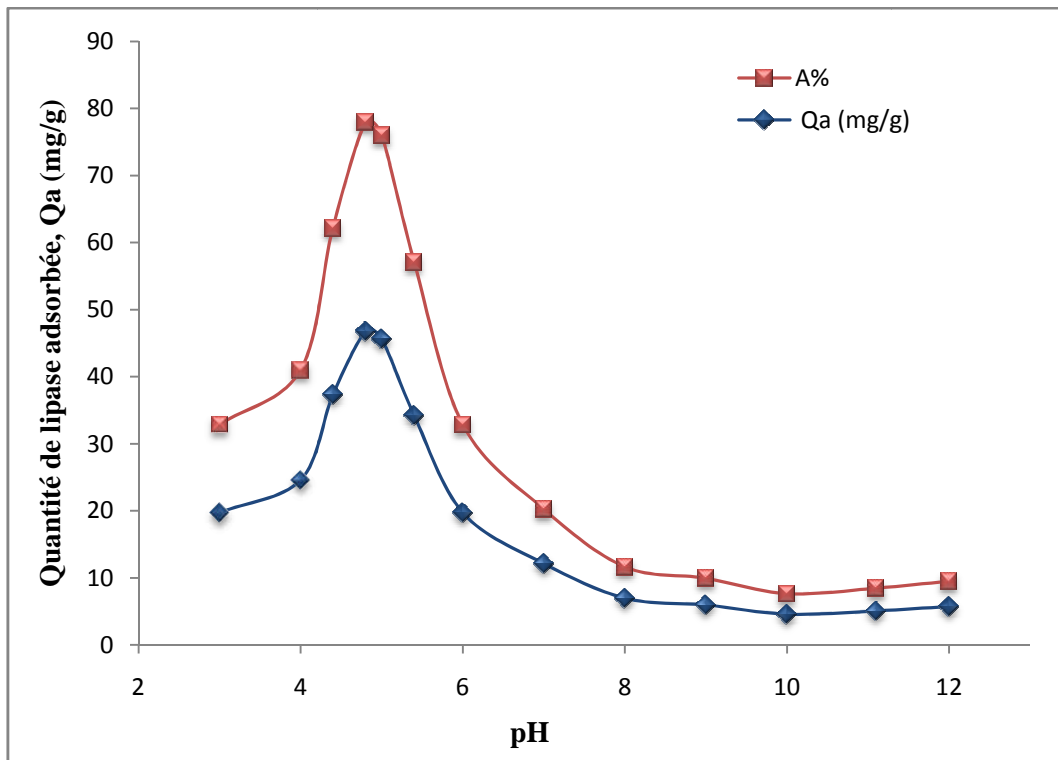


Figure III.6 : Influence du pH sur la quantité de lecitase® ultra adsorbée sur la résine méthacrylique et le taux d'adsorption, (T=40°C, temps de contact : 60min).

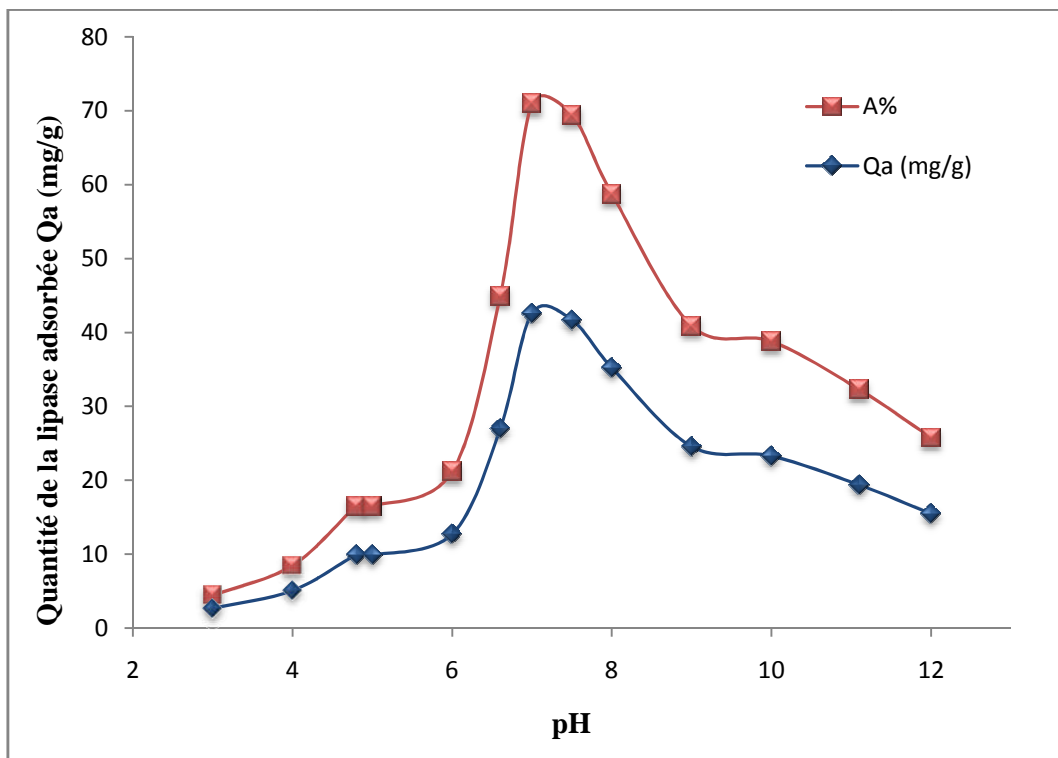


Figure III.7 : Influence du pH sur la quantité de lecitase ultra adsorbée sur la résine styrénique et le taux d'adsorption, (T=40°C, temps de contact : 60min).

La figure III.6 montre que le taux d'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine méthacrylique (amberlite IRC 50) atteint 78% à un pH=4.8 puis, diminue jusqu'à 9.5% au pH= 12. La figure III.7, montre clairement que le taux d'adsorption augmente progressivement jusqu'à atteindre près de 71% d'adsorption pour la Lecitase® Ultra adsorbée sur la résine styrénique (amberlite IRN 78) à un pH=7, au-delà de ce pH le taux d'adsorption diminue jusqu'à atteindre 23% au pH= 12.

Les quantités de l'enzyme adsorbé semblent être influencées par la charge extérieure de la Lecitase® Ultra et sur les résines. Dans une solution basique la Lecitase® Ultra a une charge négative et dans une solution acide la lecitase®ultra a une charge positive, donc l'enzyme est attirée par la résine styrénique (PS-DVB) aux valeurs de pH basique et par la résine cationique (PAM-DVB) aux valeurs de pH acide. Dans notre cas les deux résines méthacrylique et styrénique se lient avec l'enzyme par interaction ionique s'établissant par la modification de la surface de la protéine d'une part et des résines d'autre part.

En ce qui concerne la résine méthacrylique (PAM-DVB): Pour des pH inférieurs à 4.8 la diminution de la concentration des ions H^+ conduit à l'augmentation de la proportion des ions carboxylate COO^- favorisant l'attraction de la lecitase®ultra dont la charge total est positive. Au-delà de pH= 4.8, c'est la charge positive de la lecitase®ultra qui diminue provoquant une plus faible attraction par le support (Figure III.8).

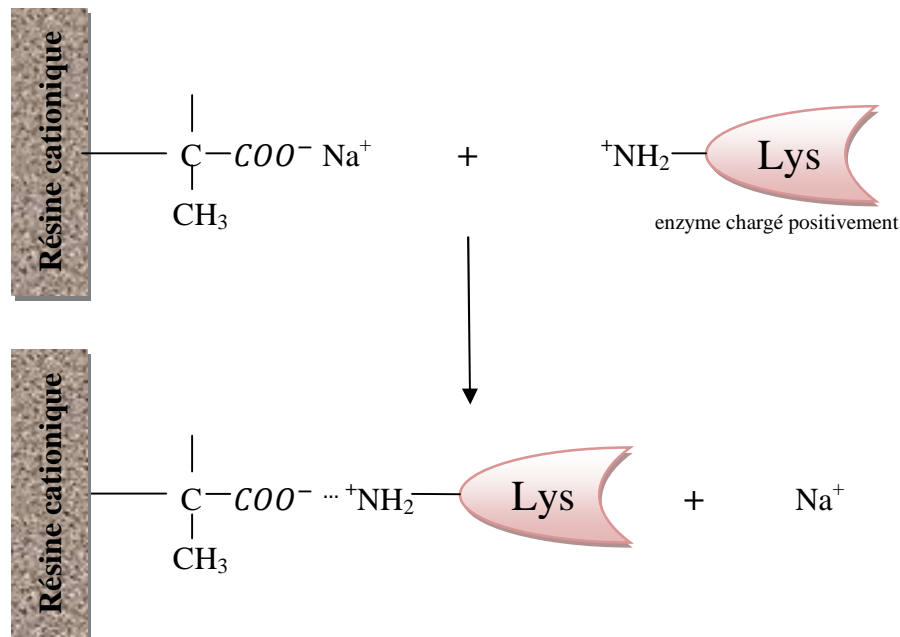


Figure III.8 : Schéma représentatif de l'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine méthacrylique (PAM-DVB).

Pour la résine styrénique échangeuse d'anions (PS-DVB) : pour des pH inférieurs à 7, lorsque la concentration des ions H^+ diminue, les groupes ionisables de la lecitase®ultra font que la charge négative totale de la lecitase ultra augmente conduisant à une plus forte attraction par le support. Au-delà de $pH=7$ la proportion des ions $-NH_3^+$ diminue, au profit des $-NH_2$, entraînant une attraction amoindrie de la lecitase®ultra, chargé négativement.

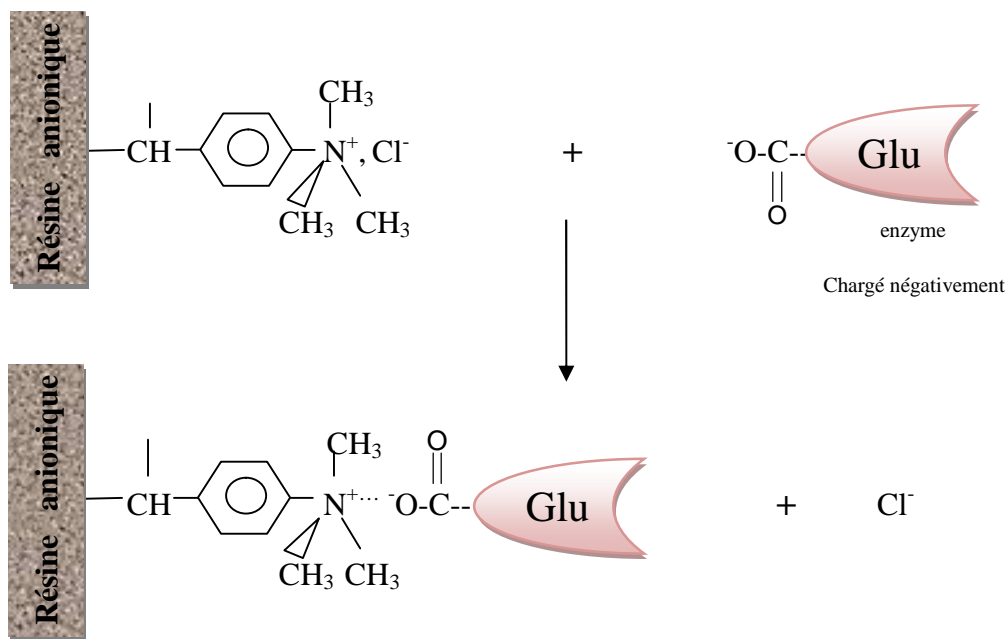


Figure III.9 : Schéma représentatif de l'adsorption de la lecitase ultra sur la résine styrénique (PS-DVB).

Nous pouvons supposer qu'aux pH très acides et aux pH très hauts, que la lecitase®ultra se comporte comme un polyélectrolyte. Les groupements ioniques de même nature électronique se repoussent obligeant la macromolécule de lecitase®ultra à se déplier et changer de conformation, perdant ainsi sa forme active. Les résultats obtenus concordent avec les travaux menés par **Yong et al., 2010 [125]** qui ont adsorbé la lipase *Burkholderia pseudomallei* sur un système à lit fluidisé.

III.2.2.2. Adsorption de la lecitase®ultra en fonction de la température

L'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines méthacrylique et styrénique a été effectuée à différentes températures (25, 30, 35, 40, 45, 50 et 60°C) pendant 60 min à $pH=4,8$ pour la résine méthacrylique, et à $pH=7$ pendant 60 min pour la résine styrénique. Les quantités et les taux d'adsorption sont représentés dans sur les figures III.10 et III.11.

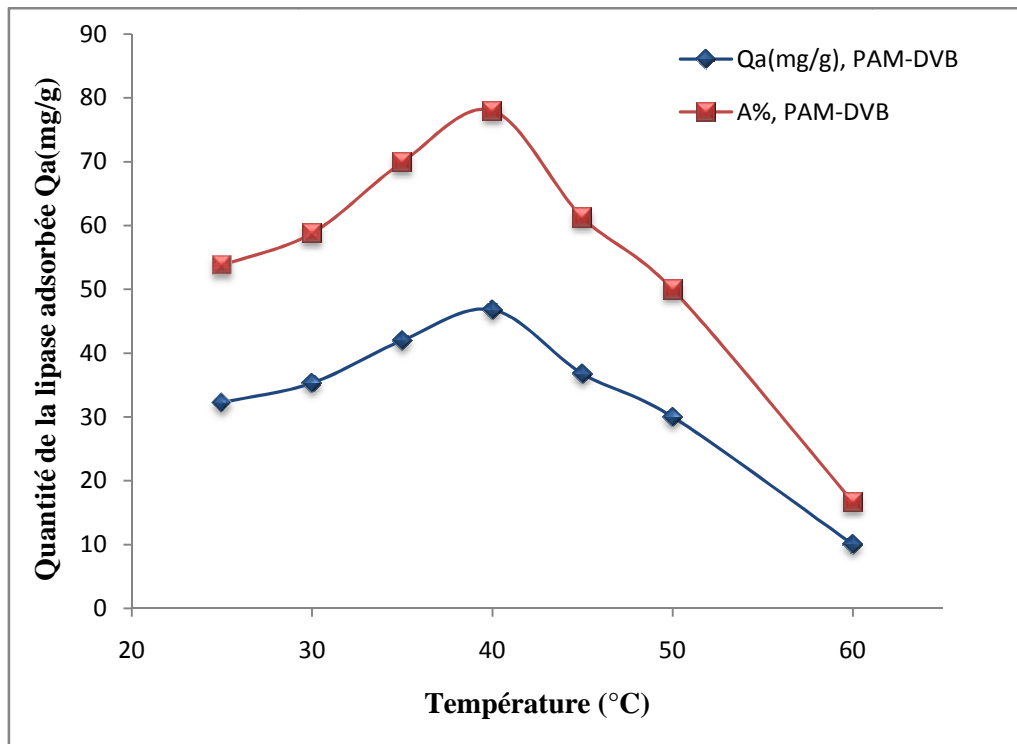


Figure III.10 : Influence de la température sur la quantité de lecitase® ultra adsorbée sur la résine méthacrylique et le taux d'adsorption, (pH=4.8, temps de contact : 60min).

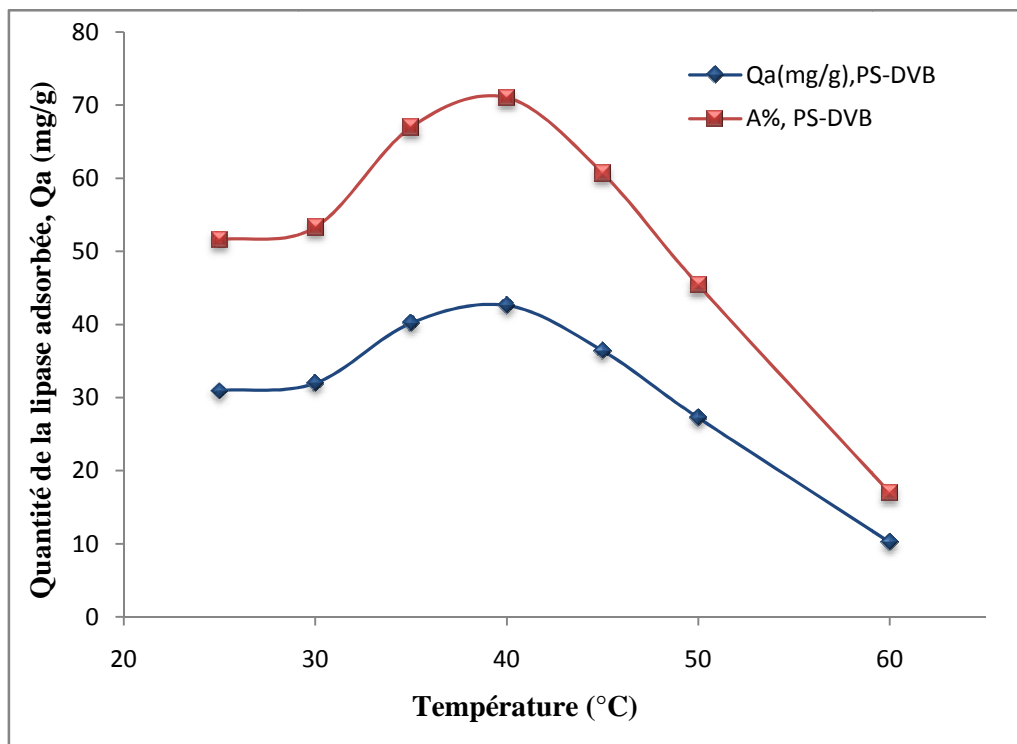


Figure III.11 : Influence de la température sur la quantité de lecitase® ultra adsorbée sur la résine styrénique (PS-DVB) et le taux d'adsorption, (pH=7, temps de contact : 60min).

Pour les deux supports utilisés (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) la quantité de lecitase®ultra adsorbée augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à 40°C et diminue au-delà. Ce comportement est souvent rencontré dans le cas de l'adsorption des enzymes. L'adsorption suit la loi d'Arrhenius jusqu'à 40°C où la quantité adsorbée est maximale, elle atteint 42.59 (mg/g de résine) pour la résine styrénique et 46.79 (mg/g de résine) pour la résine méthacrylique, à cette température l'enzyme présente la conformation la plus propice à l'entrée en contact avec les résines. Au de-là de 40°C, l'enzyme semble changé de conformation à cause de la rupture des différentes faible liaisons, en particulier les liaisons hydrogène. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Shamel *et al.*, (2007) [126]** lorsqu'il a immobilisé la lipase *Mucor miehei* par adsorption sur une membrane commerciale à base de polysulfone. D'après eux, à cette température (40°C) l'enzyme est thermiquement stable.

III.2.2.3. Effet du temps de contact sur l'adsorption de la lecitase®ultra

L'immobilisation de la lecitase®ultra sur les résines méthacrylique et styrénique à été étudiée en fonction du temps de contact à 40°C et pH= 4,8 pour la résine méthacrylique (amberlite IRC 50), et à 40°C et pH= 7 pour la résine styrénique (amberlite IRN 78), pour une concentration de 3g/l de lecitase®ultra. Les quantités de lecitase®ultra adsorbées sur les deux résines et les taux d'adsorption sont représentées dans les figures III.12 et III.13.

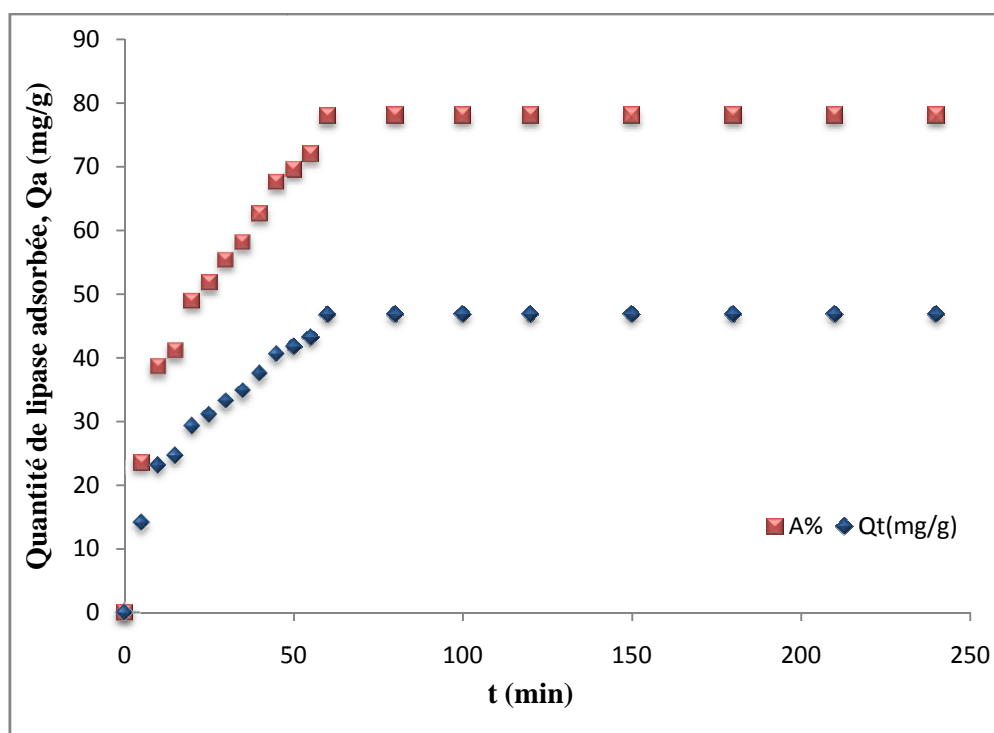


Figure III. 12 : Evolution de la quantité de la lecitase®ultra adsorbée et du taux d'adsorption en fonction du temps sur la résine méthacrylique (T=40°C, pH= 4.8, C₀=3 g/l).

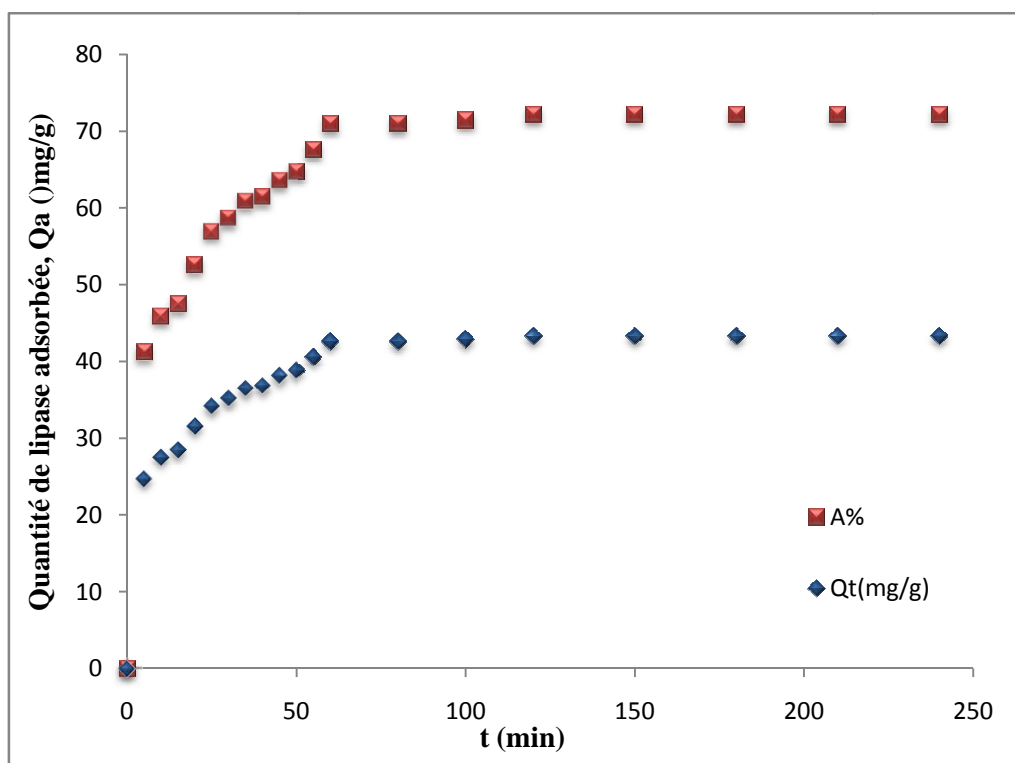


Figure III.13 : Evolution de la quantité de la lecitase® ultra adsorbée et du taux d'adsorption en fonction du temps sur la résine styrénique ($T=40^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7$, $C_0=3$ g/l).

Les cinétiques d'adsorption de la lecitase® ultra sur les deux résines méthacrylique et styrénique (amberlite IRC 50 et amberlite IRN 78), sont rapides durant les 55 premières minutes, durant cette phase l'adsorption se produit instantanément car le nombre de site d'adsorption disponible est assez élevé, puis un ralentissement est observé jusqu'à atteindre un palier au-delà de 60 minutes. Nous supposons que la diminution du nombre de sites d'adsorption libres et l'engorgement des pores présent à la surface des billes de résine (résine styrénique ou la résine méthacrylique) provoquerait la diminution des quantité de lecitase® ultra adsorbée. Les quantités maximales et les taux d'adsorption sont donnés dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Les quantités maximales et les taux d'adsorption la lecitase® ultra (3 g/l) sur les résines échangeuse d'ions (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) :

Type de support	Quantité adsorbée (mg/g)	Taux d'adsorption (%)
Résine PAM-DVB (amberlite IRC 50)	46,79	77,98
Résine PS-DVB (amberlite IRN 78)	42,59	70,99

Nous remarquons que les quantités adsorbées sur la résine méthacrylique (PAM-DVB) sont supérieures à ceux adsorbées sur la résine sur la styrénique (PS-DVB). Et c'est de même pour les taux d'adsorption. Ceci pourrait être attribués à la faible rigidité des chaînes méthacryliques par rapport aux styréniques permettant une plus grande facilité d'approche et de pénétration de la lecitase®ultra dans les réseaux méthacrylique.

Pour tous les essais d'adsorption suivants, un temps de contact de 60min est choisi dans lequel le pseudo-équilibre est supposé déjà atteint.

III.2.2.4. Adsorption en fonction de la concentration de la lecitase®ultra

L'adsorption de la lecitase®ultra a été étudiée pour diverses concertations de 0 à 6 g/l à 40°C, pH=4,8 pour la résine méthacrylique, pH=7 pour la résine styrénique, durant 60 minutes. Les quantités adsorbées et les temps d'adsorption sont représentés dans la figure III.14.

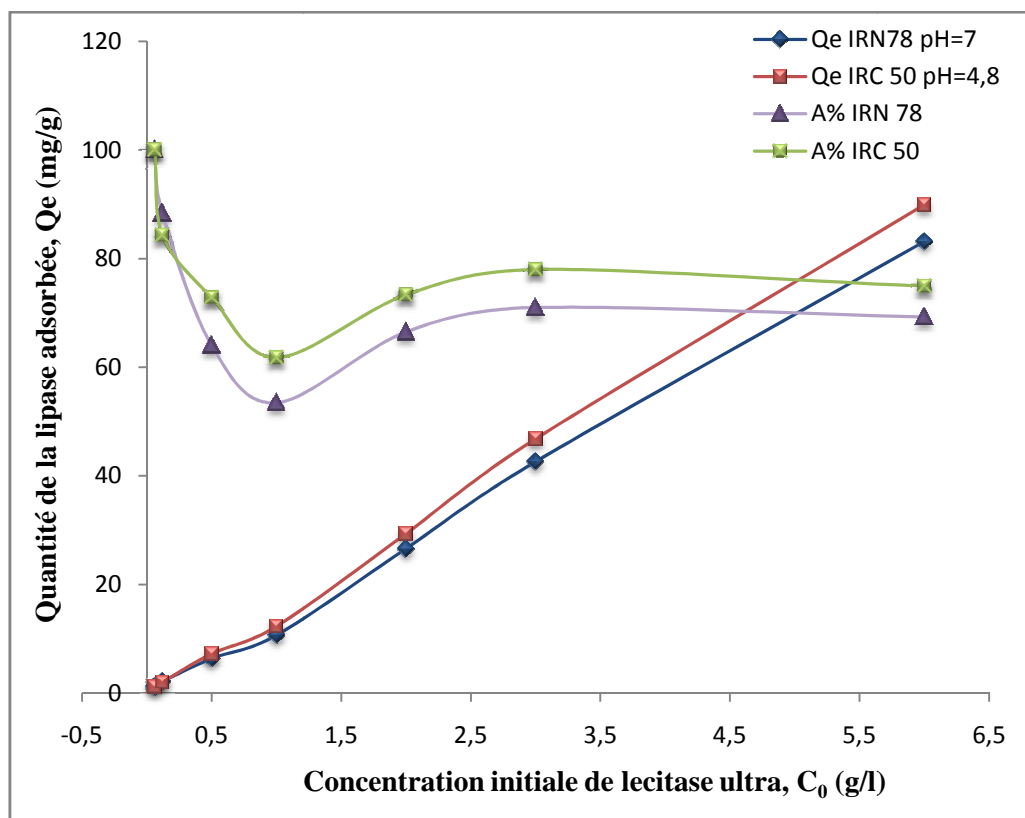


Figure III.14 : Influence de la concentration initiale de la lecitase® ultra sur la quantité adsorbée sur les résines styrénique et méthacrylique ($T=40^\circ\text{C}$, temps de contact = 60 min).

D'après la figure III.14 la quantité de la lecitase®ultra adsorbée augmente avec la concentration, on suppose donc que tous les sites actifs ne sont pas encore tous occupés. On observe une proportionnalité entre la quantité adsorbée et la concentration initiale de la

lecitase® ultra entre 0 et 6 g/l pour les deux résines (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78). Ceci laisse supposer une cinétique d'adsorption d'ordre 1.

En ce qui concerne les taux d'adsorption pour de très faibles concentrations inférieures à $<0,05$ les taux d'absorption sont très élevés avoisinant les 100% cela est dû au nombre de sites actifs qui constitue la capacité totale des deux résines (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78), ils sont assez nombreux pour adsorber toute la lecitase®ultra. Et pour les concentrations supérieures à 0,05 (g/l) nous observons une proportionnalité entre les taux d'adsorption et la concentration initiale de la lecitase®ultra pour les deux résines méthacrylique et styrénique (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78), puis nous observons un ralentissement du taux d'adsorption tendant vers un équilibre. L'adsorption de la lecitase®ultra peut impliquer une série d'étapes. D'abord les molécules migrent de la phase aqueuse vers la matrice de la résine par diffusion, ensuite la molécule d'enzyme est attirée par les charges électriques opposées de la résine puis il s'établit par échange ionique une liaison de faible énergie par interaction électrostatique. Enfin, les molécules accèdent à l'intérieur de la matrice de la résine et restent fixées en établissant un lien avec la paroi du support. De ce fait la facilité de diffusion de l'enzyme est diminuée et donc les quantités de lecitase®ultra adsorbées sont amoindries également, Ceci qui peut expliquer probablement le ralentissement observé.

III.2.2.5. Etude de l'équilibre d'adsorption

Les isothermes d'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines méthacrylique et styrénique (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) ont été étudiées (voir la section III.1.5.2.).

Elles représentent la variation de la quantité de la lecitase®ultra adsorbée à l'équilibre (Q_e en mg/g) en fonction de la concentration en enzymes dans la solution (C_e en mg/l). Une isotherme d'adsorption permet donc de traduire graphiquement l'équilibre s'établissant entre les molécules d'enzyme présentes dans la solution et celles adsorbées sur les résines. Les propriétés de cet équilibre se répercutent sur la forme des isothermes. Lorsque le matériau adsorbe une quantité finie d'enzymes par unités de masses, l'isotherme d'adsorption présente un plateau correspondant à la capacité d'adsorption maximum du matériau, notée Q_{max} .

De façon à éliminer l'influence de la quantité d'adsorbant utilisée pour construire les isothermes, Q_e est normalisé par la masse du support utilisée; (équation (1), chapitre III) ;

Les isothermes d'adsorption de la lecitase®ultra par les résines styrénique et méthacrylique sont présentées dans la figure III.15.

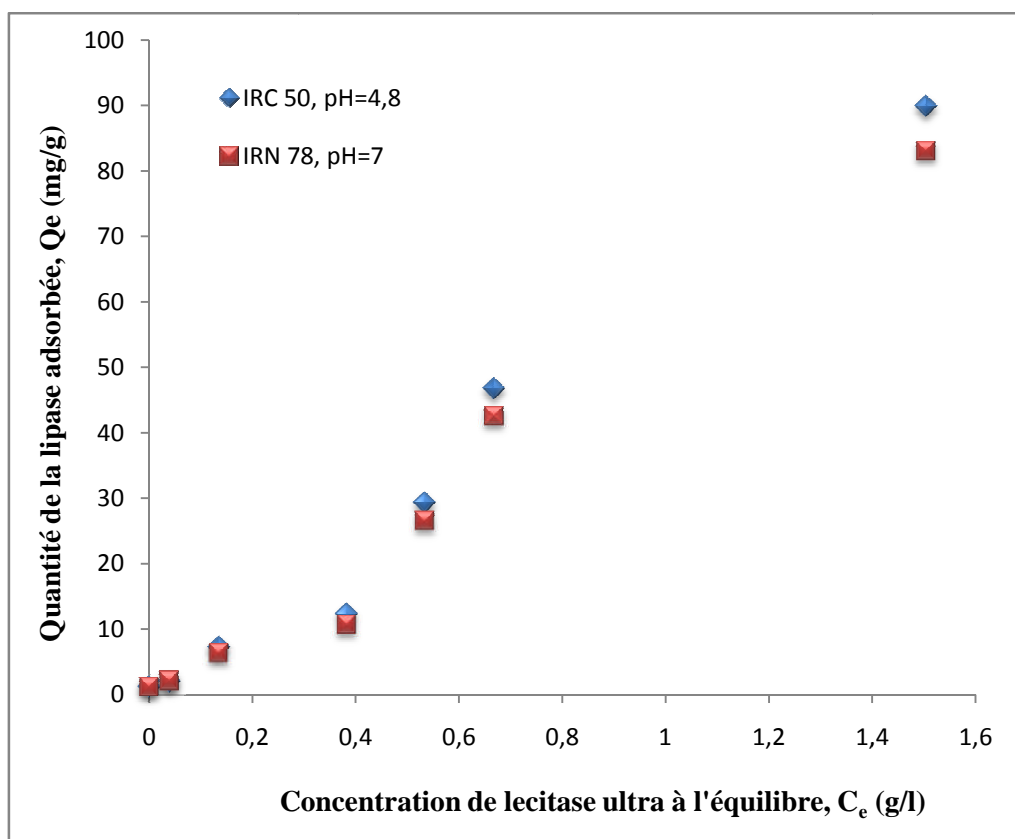


Figure III.15: Isothermes d'adsorption de lecitase®ultra par les résines styrénique et méthacrylique ($T=40^{\circ}\text{C}$, temps de contact : 60 minutes).

Les deux isothermes montrent que la quantité (Q_e) de la lecitase®ultra adsorbée par les résines augmente avec la quantité de lecitase®ultra en solution (C_e). Bien que la lecitase®ultra soit adsorbée par les deux résines utilisées, la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50) adsorbe une quantité légèrement plus importante que la résine styrénique (Amberlite IRN 78). Cet écart est dû probablement à la différence de structure des deux résines, les chaînes de la résine poly (acide méthacrylique-divinylbenzène) étant plus flexible que celles de la résine poly (styrène-divinylbenzène).

III.2.2.6. Modélisation des isothermes d'adsorption

Les équations de Freundlich et de Langmuir, présentées dans le chapitre III, ont été utilisées pour modéliser des résultats expérimentaux concernant l'adsorption de la lecitase®ultra par les résines styrénique et méthacrylique.

La linéarisation des isothermes avec le modèle de Freundlich et de Langmuir sont représentées sur les figures III.16, III.17, III.18, III.19.

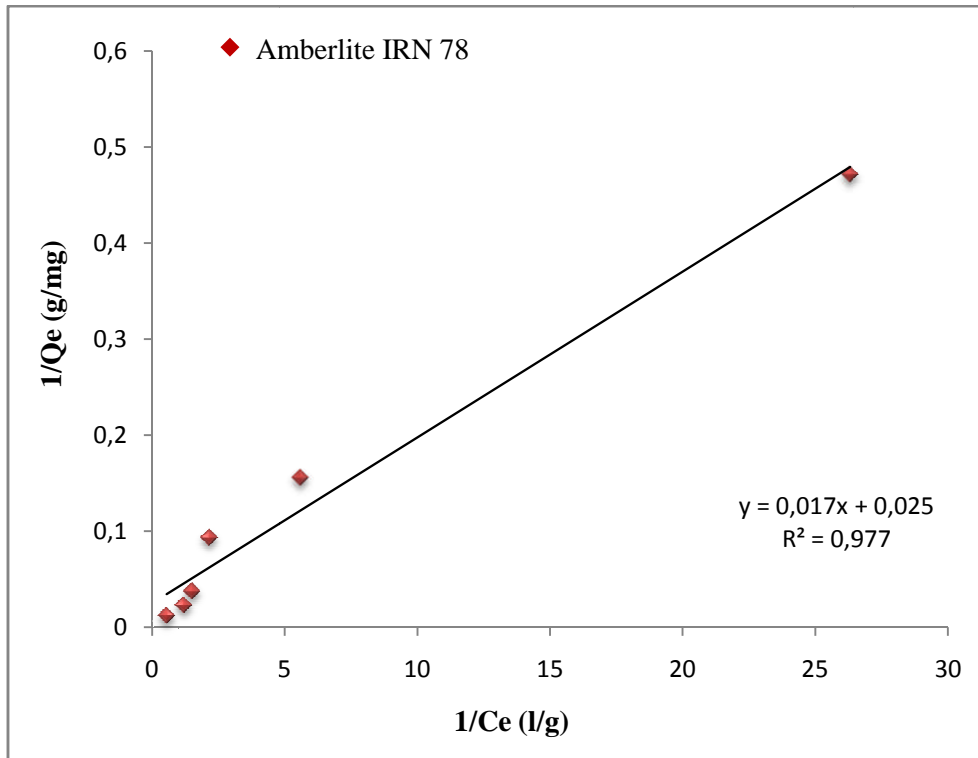


Figure III.16 : La linéarisation selon le modèle de Langmuir des isothermes d'adsorption de la lecitase® ultra par la résine styrénique.

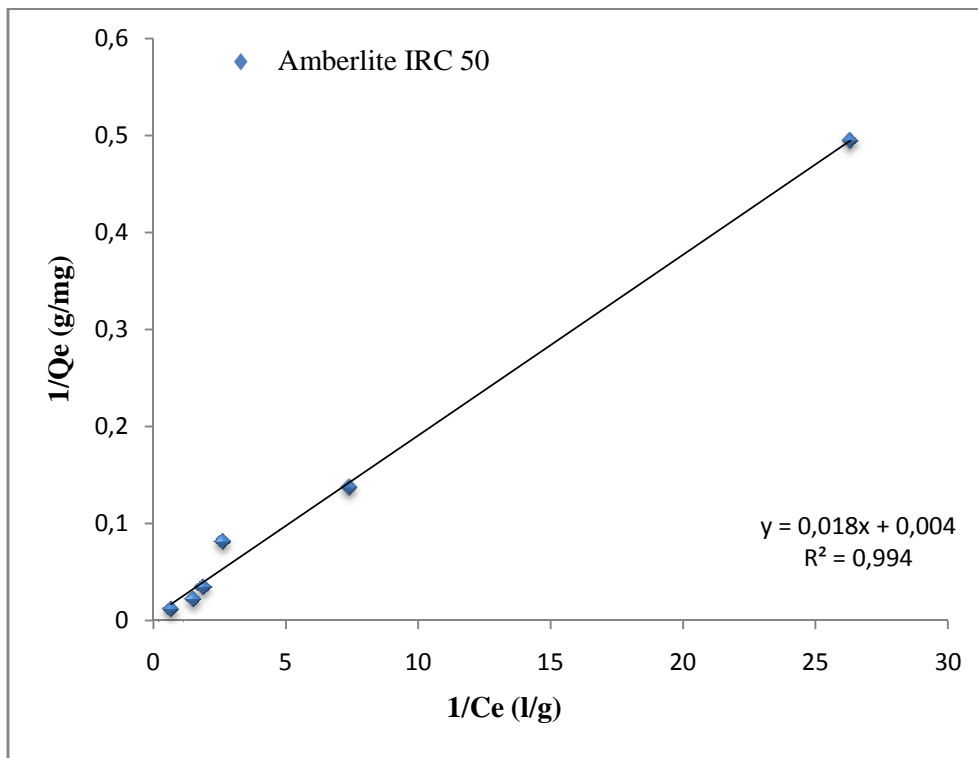


Figure III.17 : La linéarisation selon le modèle de Langmuir des isothermes d'adsorption de la lecitase® ultra par la résine méthacrylique.

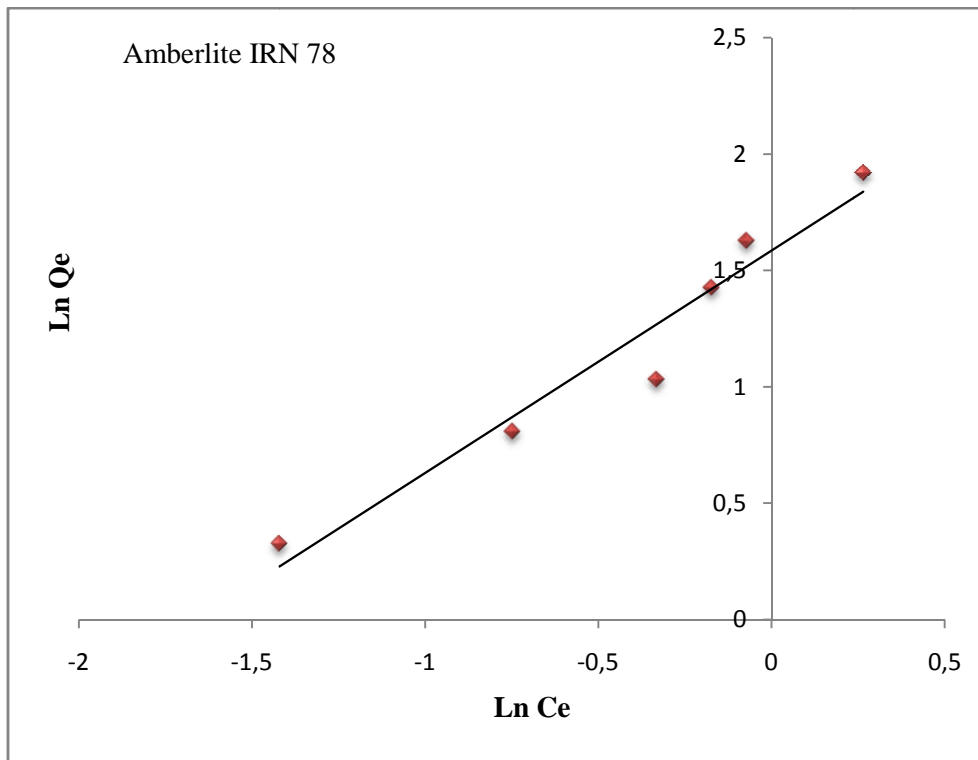


Figure III.18 : La linéarisation selon le modèle de Freundlich des isothermes d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine styrenique.

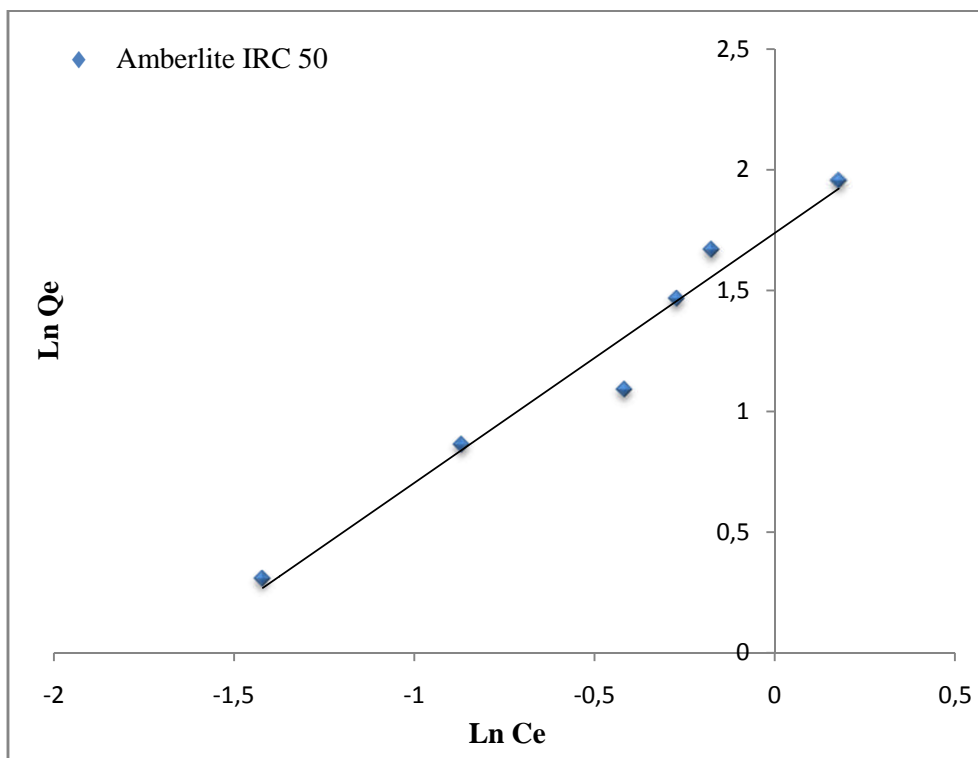


Figure III.19: La linéarisation selon le modèle de Freundlich des isothermes d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine méthacrylique.

A partir des pentes et des ordonnées à l'origine, nous avons déterminé les différents paramètres pour les deux types d'isotherme. Les résultats ainsi que les coefficients de corrélation sont reportés dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Paramètres obtenus par les isothermes de l'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine styrénique (Amberlite IRN 78) à pH=7 et la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50) à pH = 4.8 à 40°C.

Paramètres	Amberlite IRN 78	Amberlite IRC 50
Paramètres de Freundlich		
K_F (mg/g) (g/l) ^{1/n}	38,45	54,82
1/ n	0,954	1,035
r^2	0,946	0,965
Paramètres de Langmuir		
Q_0 (mg/g)	40	250
K_L (l/g)	1,47	0,22
r^2	0,977	0,994
R_L	0,184	0,602

Les résultats montrent que le modèle de Langmuir décrit raisonnablement les isothermes d'adsorption de la lecitase®ultra adsorbée par les deux types de résines styrénique et méthacrylique (PS-DVB et PAM-DVB). En effet, les coefficients de corrélation r^2 correspondant sont très proches de 1. Ceci suggère une adsorption de la lecitase® ultra sur les deux et méthacrylique en monocouche, le solide étant saturé lors du remplissage de la monocouche. Donc les interactions à la surface des résines sont faibles car le nombre de couches adsorbées ne peut croître librement.

III.2.2.7. Cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra par les résines échangeuse d'ions

Les isothermes d'adsorption décrites jusqu'à présent permettent d'étudier le comportement à l'équilibre des résines styrénique et méthacrylique (PAM-DVB et PS-DVB), et de recueillir les informations sur les réactions mise en œuvre lors de l'adsorption. Toutefois, il s'avère nécessaire d'étudier également la cinétique des réactions afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre. C'est, notamment un paramètre indispensable si on veut utiliser le système à plus grande échelle, notamment dans un cadre industriel.

L'étude des cinétiques d'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines styrénique et méthacrylique est menée en déterminant la quantité de lecitase®ultra adsorbée par les résines pour des temps de contact variables. Les figures III.20 et III.21 montrent que la quantité de lecitase®ultra adsorbée, augmente proportionnellement avec le temps de contact jusqu'à atteindre un plateau. Un phénomène similaire a été observé par **Y. Li *et al* [127]** lors de l'étude de l'adsorption de la lipase pancréatique porcine sur un polymère méso-poreux le SBA-15.

La première partie des courbes révèle une adsorption rapide avec des taux d'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine méthacrylique de 72% atteints en 55 min et . La résine styrénique adsorbe 67,6% de la lecitase®ultra après 55 min. Dans la deuxième partie, les quantités adsorbées de lecitase®ultra, évoluent plus lentement jusqu'à atteindre un plateau correspondant à l'équilibre. Le taux d'adsorption de la résine méthacrylique est de 78% et il est de 71% pour la résine styrénique et cela pour une concentration de 3g/l.

À l'équilibre, les quantités de lecitase®ultra adsorbée sont très proches de celles enregistrées lors de la construction des isothermes d'adsorption.

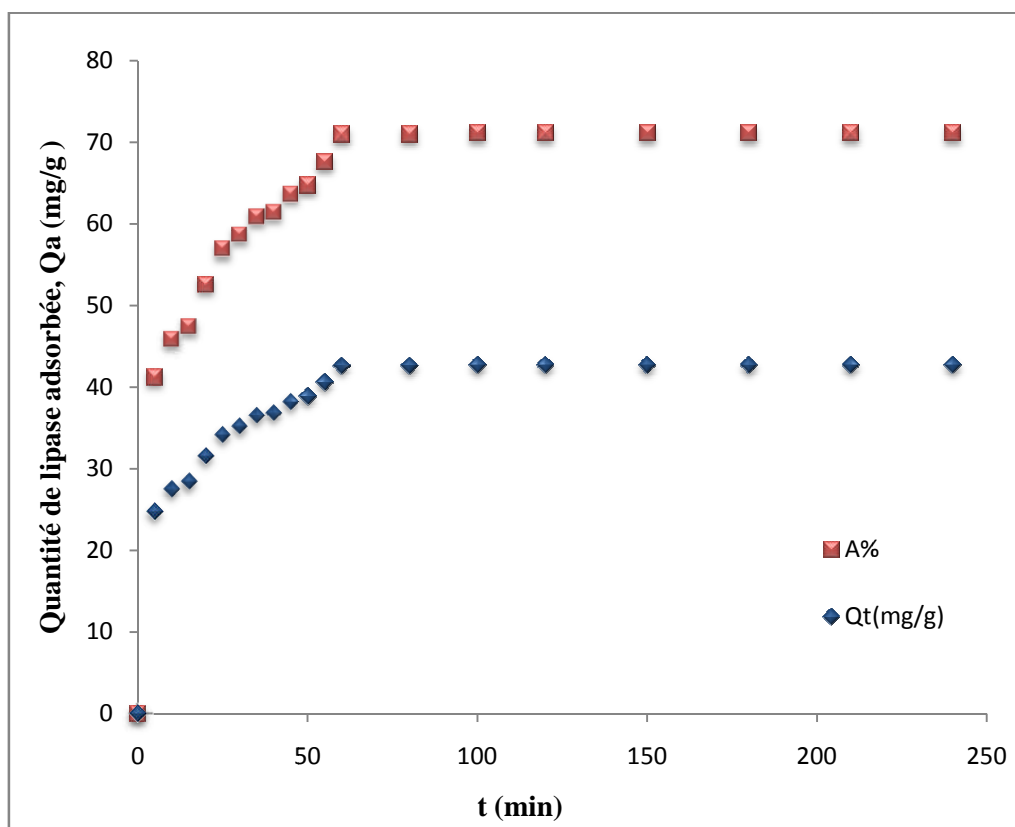


Figure III.20 : Cinétique de l'adsorption de la Lecitase ultra par la résine styrénique (À 40°C, pour une concentration initiale de la lecitase ultra de 3g/l).

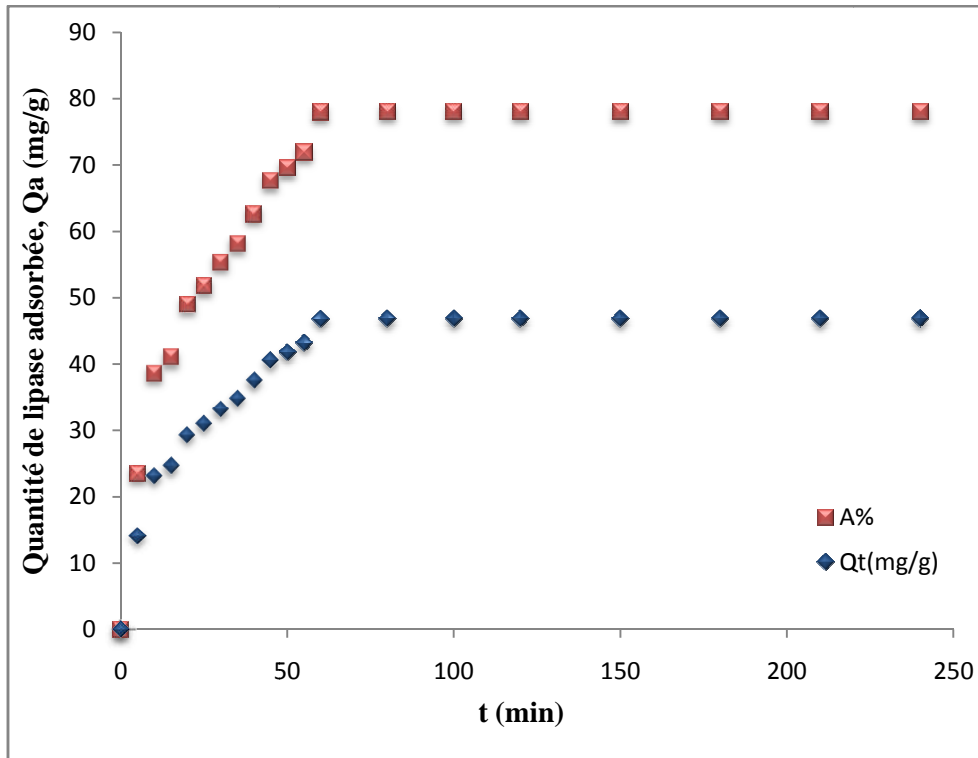


Figure III.21 : cinétique de l'adsorption de la lipase par la résine méthacrylique (À 40°C, pour une concentration initiale de la lipase de 3g/l).

III.2.2.8. Modélisation

Les cinétiques d'adsorption sont liées d'une part aux réactions d'adsorption et d'autre part à la diffusion externe des espèces dans la solution ou à la diffusion interne des espèces dans le support.

Différents modèles sont décrits dans la littérature pour rendre compte des cinétiques d'adsorption, les plus couramment utilisés sont le modèle pseudo-ordre 1 et le modèle pseudo-ordre 2 [116] dépendant des réactions d'adsorption et le modèle de diffusion intraparticulaire. Ces trois modèles sont détaillés dans ce chapitre.

1. modèle pseudo- ordre 1 et modèle pseudo- ordre 2

Les figures, III.22, III.23, III.24 III.25, représentent les courbes $\log(Q_e - Q(t)) = f(t)$, et

$\frac{t}{Q(t)} = f(t)$, pour les deux types de résines.

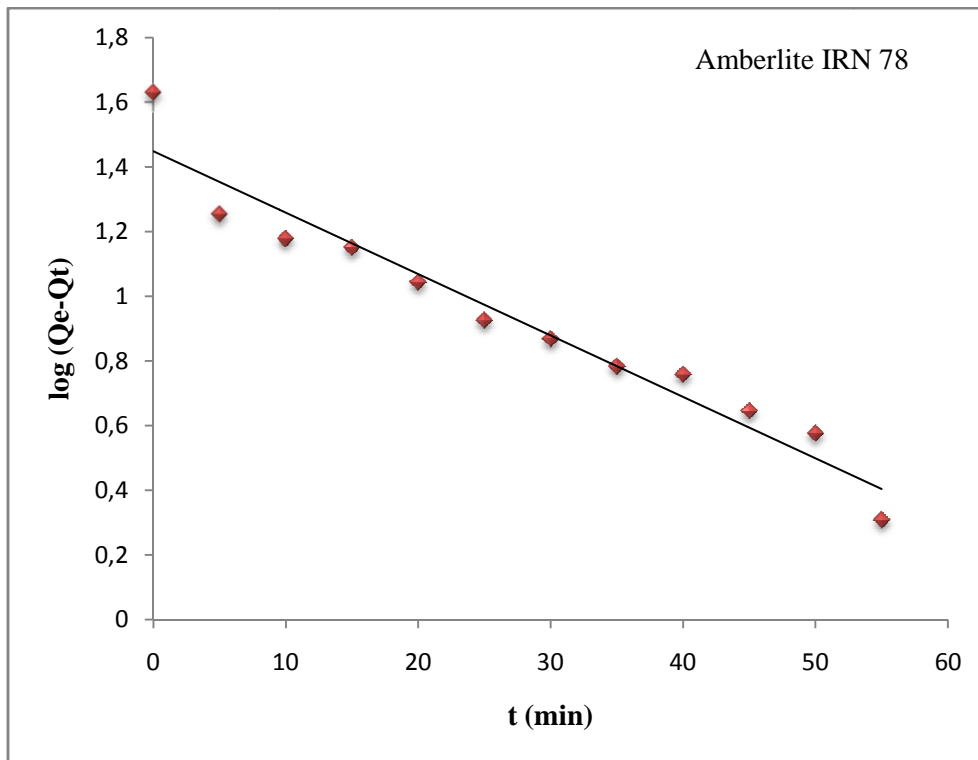


Figure III.22 : Cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine styrénique :
Modèle pseudo- ordre 1.

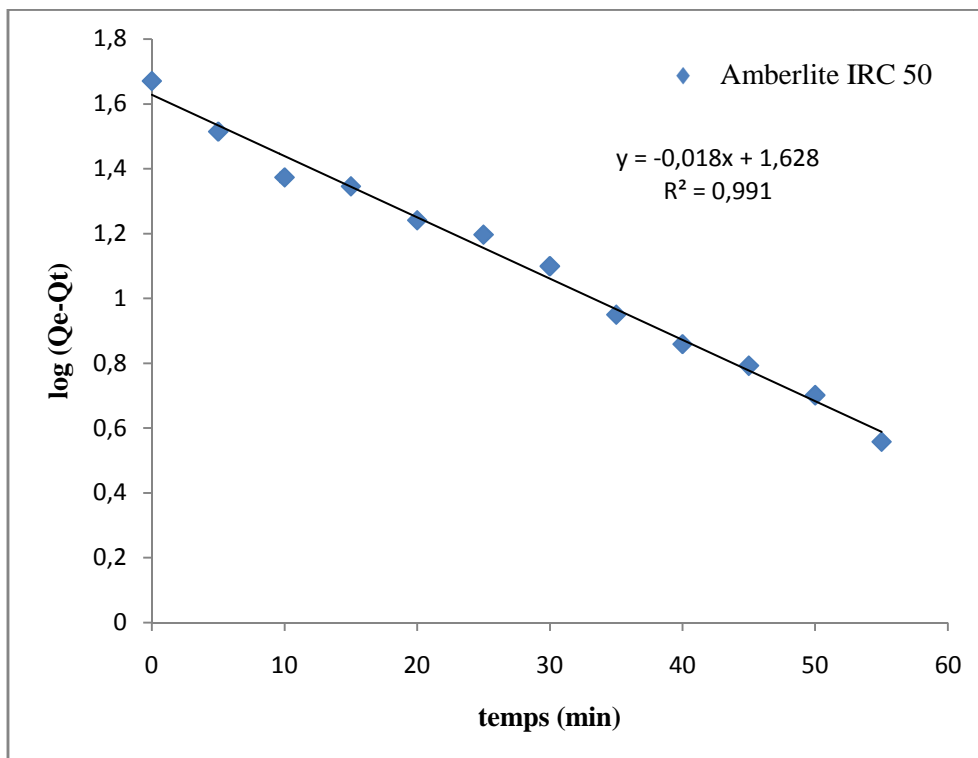


Figure III.23 : Cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine méthacrylique :
Modèle pseudo- ordre 1.

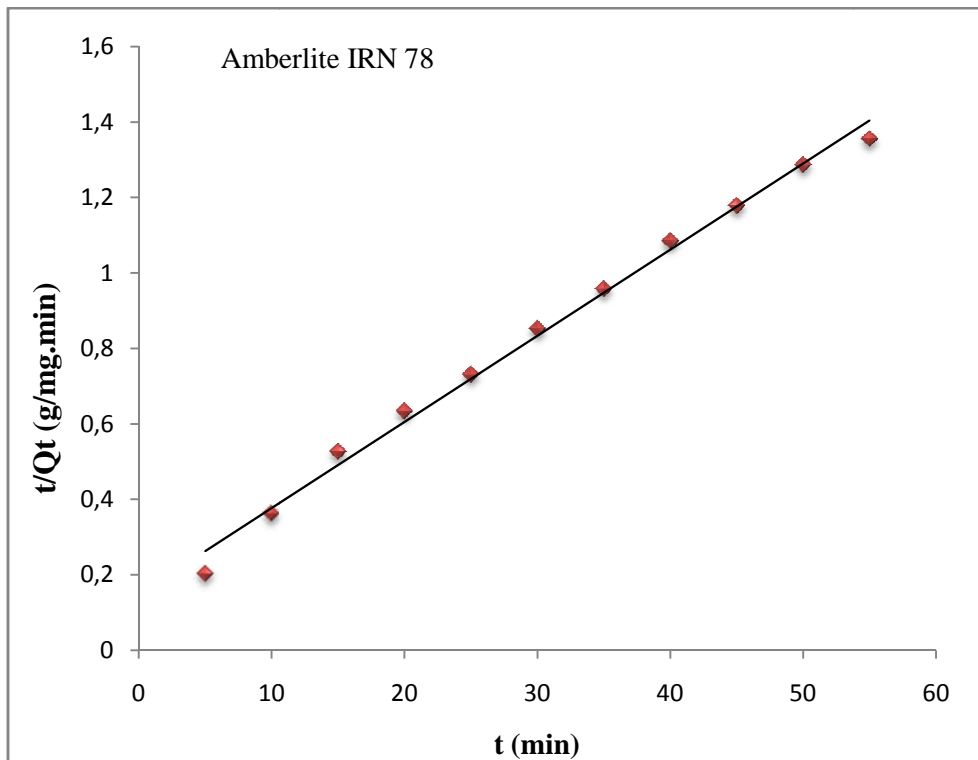


Figure III.24 : Cinétique d'adsorption de la lecitase ultra par la résine styrénique :
Modèle pseudo- ordre 2.

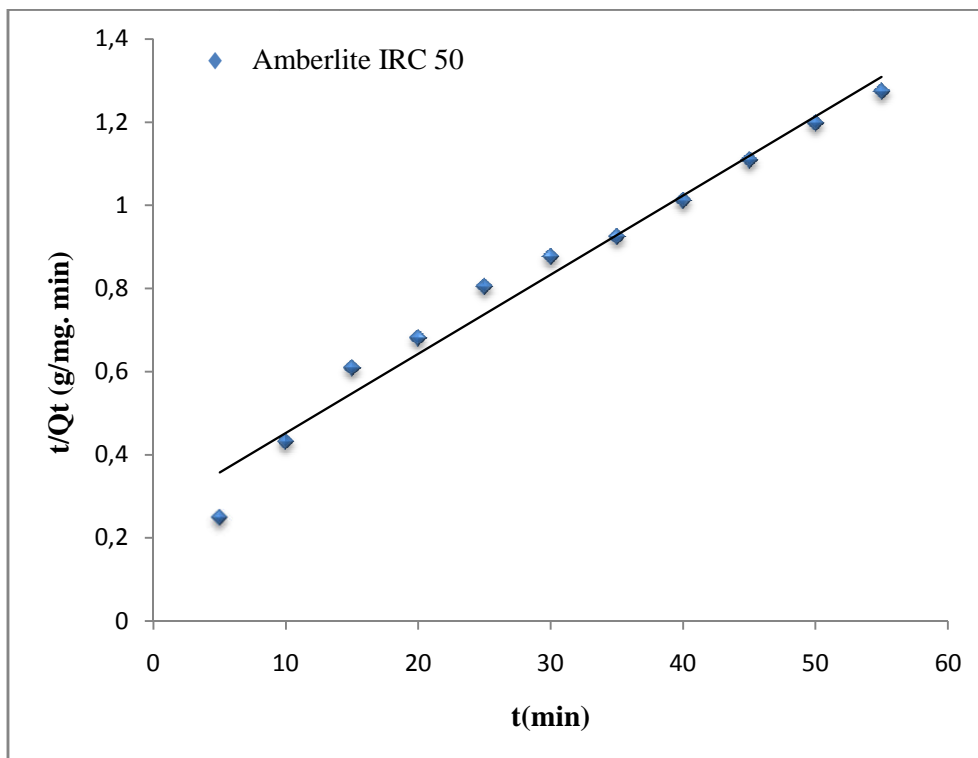


Figure III.25 : Cinétique d'adsorption de la lecitase® ultra par la résine méthacrylique:
Modèle pseudo- ordre 2.

Tableau III.5 : Paramètre des modèles pseudo-ordre 1 et pseudo-ordre 2 de l'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines styrénique et méthacrylique.

Paramètres	Modèle cinétique pseudo-ordre 1				Modèle cinétique pseudo-ordre 2		
	$Q_{e, \text{exp}}$	k_1 (min^{-1})	$Q_{e, \text{Cal}}$	r^2	k_2 (g/mg.min)	$Q_{e, \text{Cal}}$	r^2
Amberlite IRN 78	42,6	0,019	28,05	0,944	$3,69 \cdot 10^{-3}$	42,64	0,993
Amberlite IRC 50	46,79	0,018	42,46	0,991	$1,377 \cdot 10^{-3}$	46,71	0,975

D'après les résultats de cette étude (tableau III.5) tous les coefficients de corrélation obtenus sont proches de 1. En ce qui concerne la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50), le coefficient de corrélation dans le modèle cinétique pseudo-ordre 1 est supérieur au coefficient de corrélation du modèle pseudo-ordre 2, donc le modèle cinétique pseudo-ordre 1 est le mieux adapté pour décrire les résultats expérimentaux pour cette résine. Mais la valeur de Q_e calculés dans le modèle cinétique pseudo-ordre 2 est plus proche que celle du modèle cinétique pseudo-ordre 1. Ceci indique que l'immobilisation de la lecitase®ultra sur la résine méthacrylique ne suit pas le modèle cinétique de pseudo-ordre 1.

Cependant en ce qui concerne la résine styrénique (Amberlite IRN78) le coefficient de corrélation du modèle cinétique pseudo-ordre 2 est supérieur à 0,99 et la courbe de la figure III.24 montre une linéarité presque parfaite par rapport au modèle cinétique pseudo-ordre 1. De plus, la valeur de Q_e calculés est très proche de la valeur expérimentale montrée dans le tableau III.5 donc le modèle cinétique pseudo-ordre 2 se révèle le plus adapté pour décrire les résultats expérimentaux pour cette résine (Amberlite IRN78) ce qui suggère l'existence d'une chimisorption, un échange ionique entre une molécule d'enzyme (lecitase® ultra) et d'adsorbant solide (la résine).

2. Modèle de diffusion intraparticulaire

Les figures, III.26, III.27 représentent les courbes $Q_t = f(t^{0,5})$, pour les deux types de résines (styrénique et méthacrylique). Et le tableau III.6 regroupe les paramètres du modèle de diffusion intraparticulaire de l'adsorption de la lecitase ultra sur les deux résines.

Tableau III.6 : Paramètre du modèle de diffusion intraparticulaire de l'adsorption de la lecitase®ultra sur les résines styrénique et méthacrylique.

Modèle cinétique de diffusion intraparticulaire				
Paramètres	k_p ($\text{mg/g.min}^{0,5}$)	r^2	C_i	Domaine de linéarité
Amberlite IRN 78	3,059	0,985	17,85	0-5 min
Amberlite IRC 50	4,663	0,987	8,249	15-55 min

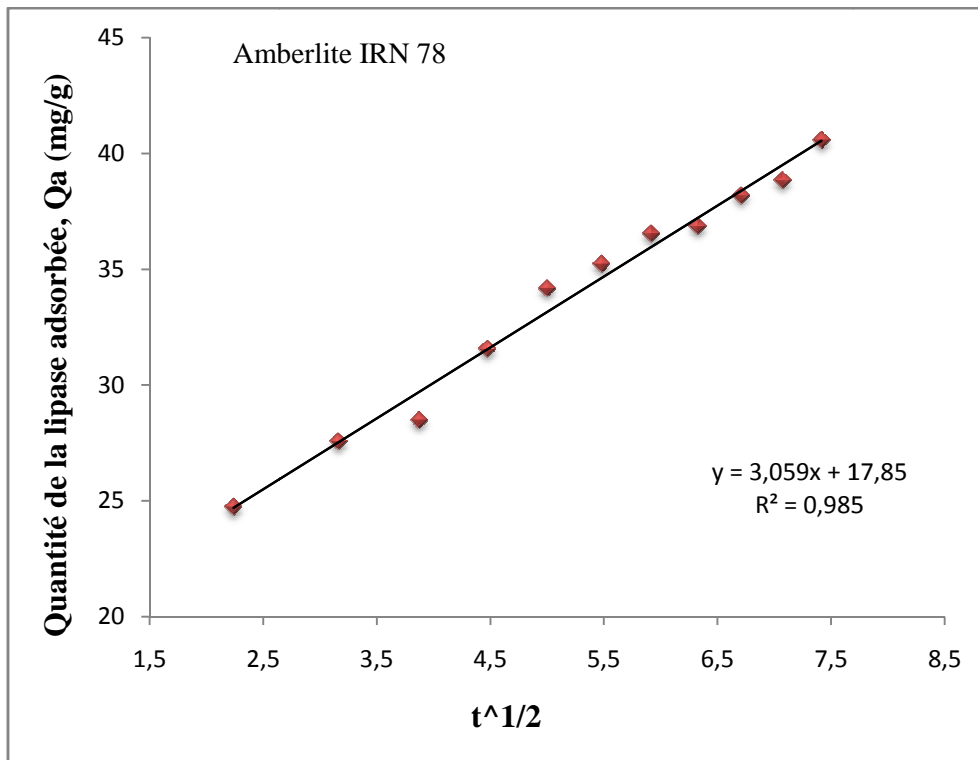


Figure III.26 : Cinétique d'adsorption de la lecitase ultra par la résine styrénique :
Modèle de diffusion intraparticulaire.

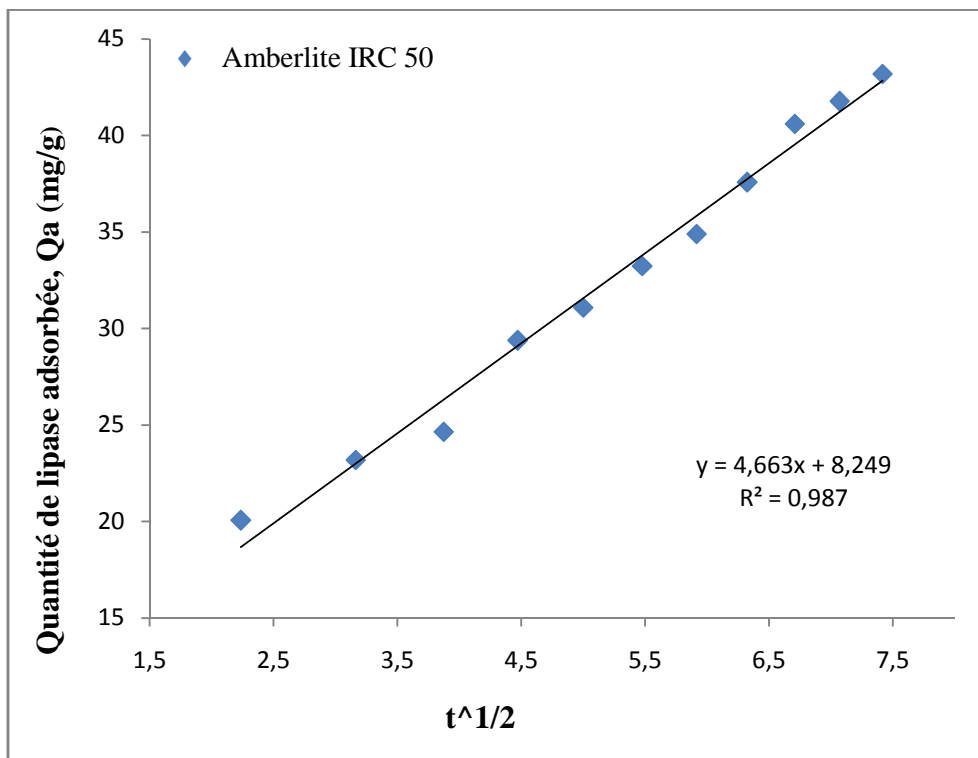


Figure III.27: Cinétique d'adsorption de la lecitase® ultra par la résine méthacrylique :
Modèle de diffusion intraparticulaire.

Le modèle de diffusion intraparticulaire ne permet pas une bonne approche pour décrire l'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine styrénique (Amberlite IRN 78) (figure III.26), le coefficient de corrélation du modèle cinétique de diffusion intraparticulaire est de 0,985, seul le domaine situé au début de la courbe montre une linéarité avec $t^{0,5}$ (tableau IV.6). Cependant, en ce qui concerne la résine méthacrylique le coefficient de corrélation du modèle cinétique de diffusion intraparticulaire est de 0,987 il est inférieur aux coefficients de corrélation des modèles cinétiques, pseudo-ordre 1 (figure III.27), il présente une linéarité dans un domaine situé entre 15 et 55 min. Le modèle cinétique de diffusion intraparticulaire ne permet pas une bonne approche pour l'ensemble de la courbe, donc il n'est pas le mieux adapté pour décrire les résultats expérimentaux pour cette résine (Amberlite IRC 50). Ces résultats suggèrent que la formation d'une couche à la surface des particules de résine est rapide du fait des liaisons ioniques.

Des trois modèles cinétiques le modèle pseudo-ordre 2 permet la meilleure description des résultats expérimentaux pour la résine styrénique (Amberlite IRN 78) et la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50). La vitesse globale d'adsorption de la lecitase®ultra par la résine méthacrylique est donc limitée par l'adsorption des molécules d'enzyme sur les sites actifs et la vitesse globale d'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine styrénique, dépend de la concentration des ions sur la surface des adsorbants en conformité avec une nature d'une chimisorption.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'ACTIVITÉ DE LA LECITASE ULTRA IMMOBILISÉE

IV.1. MATERIELS ET METHODES

IV.1.1. Produits et matériels utilisés

L'enzyme utilisée est la lecitase®ultra (E.C 3.1.1.3). Elle est commercialisée par la société Novozymes.

Le substrat utilisé est l'huile d'olive vierge, achetée sur le marché local. Cette huile est issue de la région de Béjaia de la commune de Seddouk, elle est mise en bouteille par l'établissement KHODJA & CO. Elle a été analysée par un spectrophotomètre infrarouge à transformé de Fourier de marque IR Affinity-1 SHIMADZU, avec une résolution de 4 cm^{-1} et sur une région de 4000 à 400 cm^{-1} . La composition physico-chimique de l'huile d'olives, dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Composition physico-chimique de l'huile d'olives utilisée comme substrat.

Compositions	Taux
Acide gras saturés	13.50 %
Acide gras monoinsaturés acide oléique (C18:1)	73.7 %
Acide gras polyinsaturés	8.4 %
Indice d'acidité	3.3 %
Indice de peroxyde	20 meq/g
Indice d'iode	78 g
Indice de saponification	190 mg KOH/g
Humidité relative	0.12 % (m/m)
Vitamine E	11 g

IV.1.2. Préparation des solutions d'enzyme et d'huile d'olive

Une solution d'enzymes à $C=3 \text{ g/l}$ a été préparée par solubilisation de $0,0125 \text{ ml}$ de Lecitase ultra dans 5 ml de solution tampon phosphate de sodium (50 mM) à $\text{pH} = 7$.

La solution de substrat a été préparée comme suit : 50 ml d'huile d'olive, neutralisée par 30 ml d'une solution NaOH à 0.1 M , sous agitation pendant 5 min .

L'émulsifiant a été préparé en mélangeant 6 g de gomme arabique, 54 ml glycérol, 1.79 g NaCl , 2 g CaCl_2 et 0.041 g KH_2PO_4 dans 40 ml d'eau distillée. La gomme arabique a été achetée sur le marché local, nettoyée, et broyée avec un broyeur ménager de marque

Moulinex. Les autres réactifs ont été fournis par BIOCHEM chemopharma (Montréal, Québec).

IV.1.3 Étude de l'activité de la lecitase® ultra libre

L'activité de la lecitase® ultra a été réalisée par titrimétrie en dosant la quantité d'acide gras libérée lors de l'hydrolyse de l'huile d'olive.

IV.1.3.1. Mesure de l'activité de la lecitase® ultra libre

Le substrat et l'émulsifiant ont été émulsionnés avec un rapport en volume de 0,8:4,2 et ont été mis sous forte agitation à 40°C. Puis ont été additionnés à 5 ml de solution d'enzyme à (pH=5) et incubés à 40 °C pendant 20 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 20 ml d'un mélange éthanol/acétone 1/1 (v/v). Les acides gras libérés sont alors titrés par une solution de NaOH 0.1 N en présence de phénophtaléine (solution à 1% dans l'éthanol). La lecture est effectuée contre un témoin fait dans les mêmes conditions opératoires mais en présence de la lecitase® ultra préalablement dénaturée à 100°C pendant 15 min. L'activité (U/ml d'enzymes) est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$A = \frac{\text{normalité de NaOH} \times 1000 \times \text{Quantité de NaOH (ml)}}{\text{Quantité d'enzyme(ml)} \times \text{temps d'incubation(min)}} \quad (15)$$

L'activité enzymatique ainsi mesurée est exprimée en unité enzymatiques. Ici une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour former 1 µmol d'acide gras par minute (à 40°C, pH 5).

IV.1.3.2. Détermination des conditions optimales de l'activité de la lecitase® ultra libre

Afin de déterminer les paramètres optimaux de l'activité de la lecitase® ultra, l'activité lyolytique a été mesurée à différentes températures (de 25 à 60°C) et à différents pH (de 3 à 12) et à différentes concentrations en enzyme et en substrat.

IV.1.4. Étude de l'activité de la lecitase® ultra immobilisée

IV.1.4.1. Mesure de l'activité de la lecitase® ultra immobilisée

L'activité de la lecitase immobilisée sur les deux résines méthacrylique et styrénique a été déterminée en mélangeant 0,5 g de résine (chargée avec 46,64 mg/g pour la résine méthacrylique et la résine styrénique est chargée avec 42,59 mg/g) avec 5 ml de solution

tampon de 50 mM (pH=5) et 4 ml d'émulsifiant et 1 ml d'huile d'olive. Ce mélange est incubé à 40 °C pendant 20 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 20 ml d'un mélange éthanol (95 %) /acétone 1/1 (v/v). Les acides gras libérés sont alors titrés par une solution de NaOH 0.1 N en présence de phénophtaléine. La lecture est effectuée contre un témoin fait dans les mêmes conditions opératoires mais en présence de la lecitase®ultra préalablement dénaturée à 100°C pendant 15 min.

IV.1.4.2. Détermination des conditions optimales de l'activité de la lecitase®ultra immobilisée

Afin de déterminer les conditions optimales de l'activité de la lecitase®ultra immobilisée sur les résines styrénique et méthacrylique, les mesures de l'activité ont été effectuées à différentes températures de 25 à 60°C, à différents pH de 3 à 12 et à différentes concentrations de substrat.

IV.1.5. Réutilisation de lecitase®ultra immobilisée

Dans le but d'examiner la réutilisation de lecitase®ultra immobilisée sur les deux résines styrénique et méthacrylique, ces systèmes ont été utilisés pendant plusieurs cycles dans la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'huile d'olive émulsionnée. Chaque cycle a duré 20 min, le support contenant la lecitase®ultra immobilisée est ensuite retiré du mélange réactionnel et lavé avec la solution tampon fraîche au pH optimum. Le milieu réactionnel est remplacé par une nouvelle solution d'huile d'olive émulsionnée pour effectuer une autre réaction avec la même lecitase®ultra immobilisée.

L'activité de la lecitase®ultra immobilisée durant chaque cycle a été rapportée à celle de la première utilisation (du premier cycle) et est exprimée par l'efficacité de réutilisation [134] définie comme suit :

$$\text{Efficacité de réutilisation} = \frac{\text{Activité enzymatique dans le } n^{\text{ème}} \text{ cycle}}{\text{Activité enzymatique dans le premier cycle}} \times 100$$

IV.1.6. Etude de la stabilité thermique de la lecitase®ultra immobilisée

La stabilité thermique de la lecitase®ultra immobilisée a été déterminée dans un système en batch par mesure de l'activité des échantillons de solutions du mélange réactionnel prélevé à des intervalles de temps fixés (20 min, 1h, 2h, 6h, 8h et 24h) et dans les conditions

optimales de l'activité enzymatique (à 50°C). Elle est exprimée en activité relative A_R (%) définie comme suit :

$$A_R (\%) = \frac{\text{Activité au temps } (t)}{\text{Activité initial}} \times 100 \quad (17)$$

IV.2 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.2. 1. Spectroscopie infrarouge du substrat

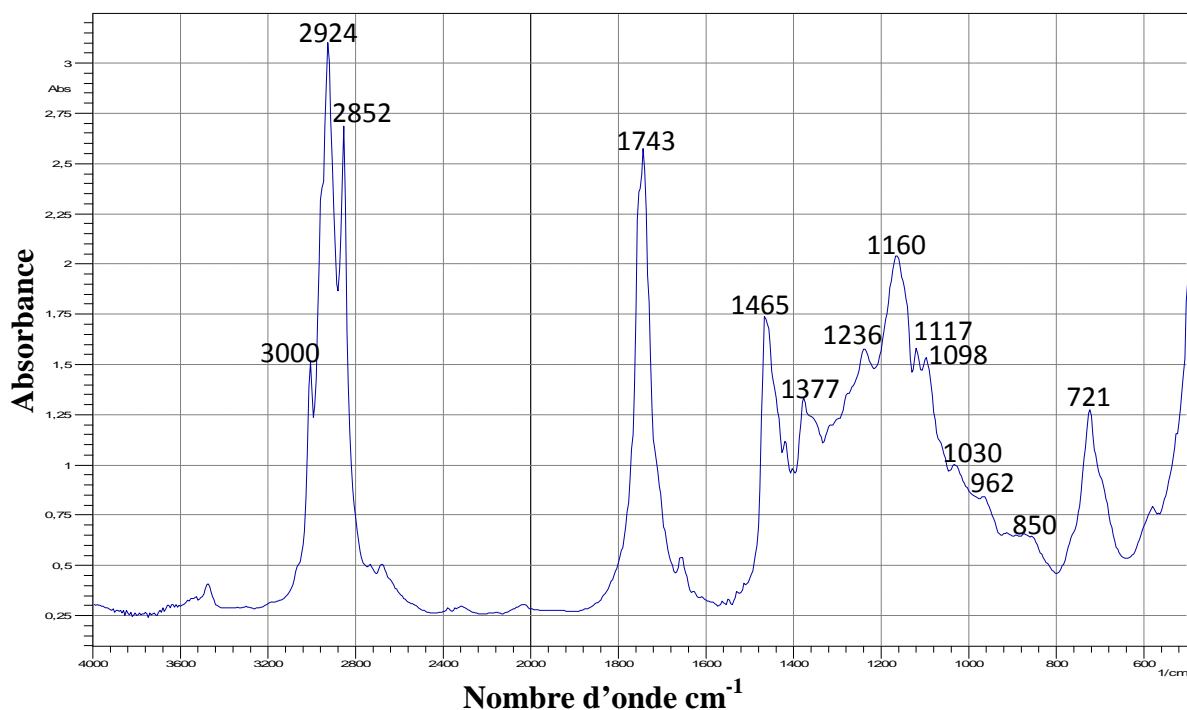


Figure IV.1 : Spectre infrarouge de l'échantillon de l'huile d'olive extra vierge.

La figure IV.1 montre le spectre infrarouge de l'échantillon de l'huile d'olive extra vierge utilisée pour l'étude de l'activité de la lecitase®ultra, ce spectre est similaire au spectre obtenue par **Rohman et al., (2010) [128]** d'un échantillon d'huile d'olive extra vierge de la région de Serdang, (Malaisie). L'huile d'olive utilisée dans ce travail est authentique et n'a pas été contaminée par d'autres huiles.

Les groupements fonctionnels et les modes de vibration dans le spectre d'huile d'olive vierge sont montrés dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Groupements fonctionnels et modes de vibration des différents groupements de l'huile d'olive extra vierge [128].

Fréquence (cm ⁻¹)	Les groupements fonctionnels
2924 et 2852	asymétrique et symétrique vibration d'élongation du groupement méthylène (-CH ₂).
1743	Groupement fonctionnel carbonyle de l'ester des triglycérides.
1465	Vibrations de liaisons CH ₂ et CH ₃ des groupes aliphatiques.
1377	Vibrations de liaisons CH ₂ .
1236 et 1160	Elongation du groupement C-O.
1117 et 1098	Elongation du groupement C-O de l'ester.
1030	Elongation du groupement C-O.
962	Vibration de liaison des groupes fonctionnels C-H de l'oléfine-trans isolé.
850	Déformation des groupes fonctionnels =CH ₂ .
721	Recouvrement de la vibration du méthylène (-CH ₂) et vibration hors plan des oléfines cis di-substituées.

IV.2.2. Activité de lecitase®ultra libre

IV.2.2.1. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction du temps

L'activité de la lecitase®ultra a été suivie en fonction du temps à pH=5 et 40°C. La concentration en enzyme est de 3g/l et celle du substrat est de $72 \cdot 10^{-3}$ g/ml. Les résultats sont représentés sur la figure IV.2.

L'activité de la lecitase®ultra augmente d'une manière rapide et quasi-linéaire durant 20 minutes, elle atteint une activité maximale de 9840 (U/ml). Au-delà de ce temps l'activité diminue graduellement, et atteint une activité de 7733 (U/ml). De nombreux travaux [129, 109,130] montrent que l'activité de la plupart des lipases diminue avec le temps et d'après ces scientifiques cette diminution est attribuée à la dénaturation de l'enzyme provoqué par des changements de conformation. D'autres auteurs [69, 114, 130, 131,132], attribuent, la perte d'activités des lipases à un appauvrissement en substrat dans le milieu et non à une désorption ou à une dénaturation des enzymes comme le suggèrent de nombreuses autres études.

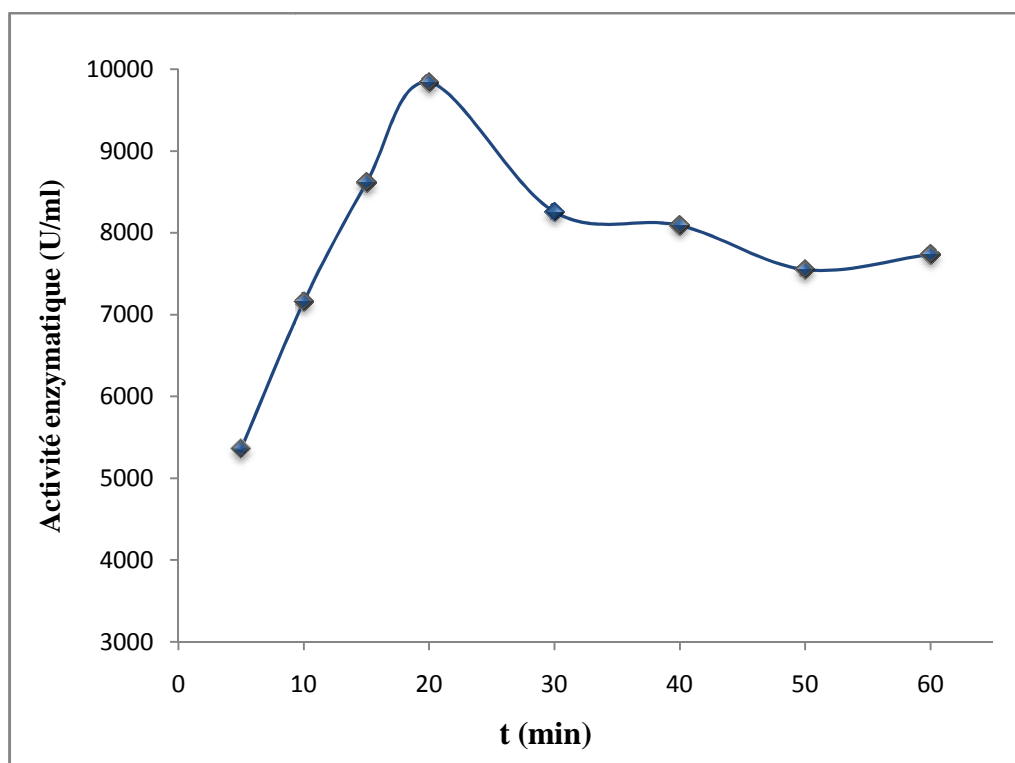


Figure IV.2: Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction du temps. (À pH=5, T= 40°C).

IV.2.2.2. Activité de la lecitase@ultra libre en fonction du pH

Les enzymes sont des macromolécules composées d'acides aminés unis entre eux par des liaisons amides -CO-NH-. Sous leur forme native, elles comportent des sites actifs adaptés pour la fixation du substrat. Une variation de pH peut changer l'ionisation de ces chaînes latérales et la géométrie du site actif peut être altérée et l'enzyme perd alors sa conformation native et donc son activité.

Par conséquent, chaque enzyme a une gamme optimale de pH qui aide à la maintenir dans sa conformation native dans l'environnement opératoire [69]. Alors un contrôle du pH au moyen de tampons est nécessaire lors de toute mise en œuvre d'enzymes pour maintenir leur activité à une valeur optimale.

L'étude de l'activité de la lecitase@ultra en fonction du pH a été effectuée à 40°C pendant 20 min de réaction avec une émulsion d'huile d'olive en utilisant des solutions tampon allant de pH=3 à pH=12. La figure IV.3 montre l'évolution de l'activité de la Lecitase@ultra en fonction du pH.

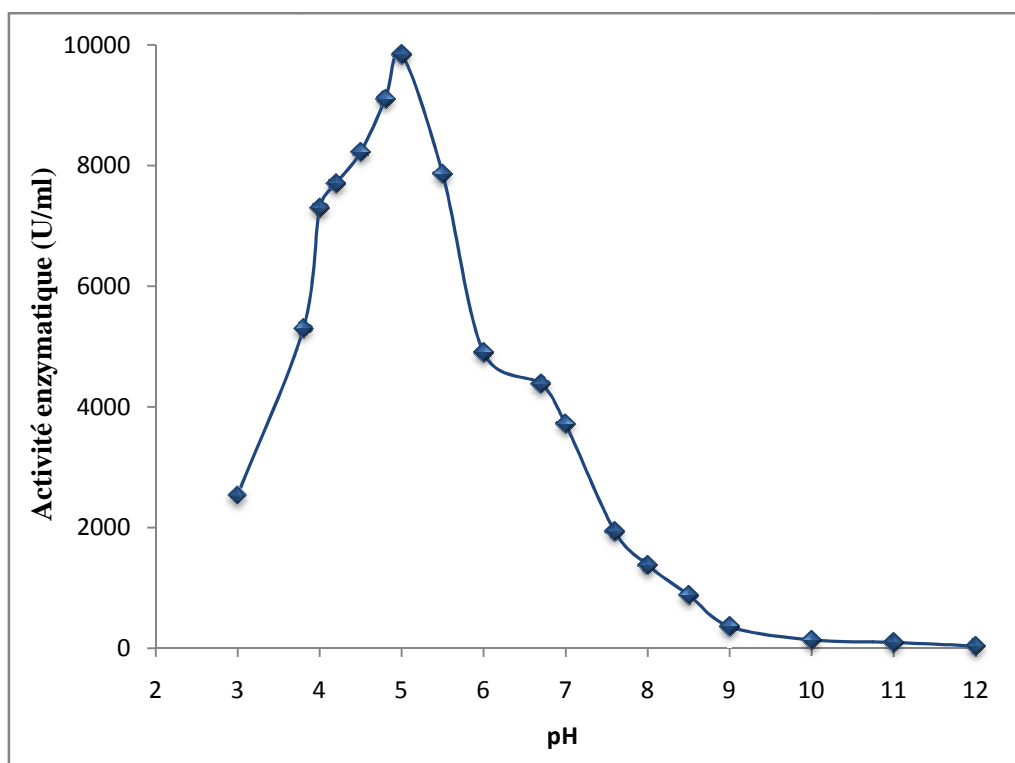


Figure IV.3: Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction du pH d'hydrolyse enzymatique de l'huile d'olive (À $T=40^{\circ}\text{C}$, $t=20$ min).

La figure IV.3 montre que l'évolution de l'activité de la lecitase®ultra augmente jusqu'à atteindre un optimum à $\text{pH}=5$. Cette valeur est identique à celle observée par **Yang et al** [114] et par **K. Ramani et al** [132]. Cependant, **Mishra et al** [133] ont rapporté un pH optimum qui est situé vers 8,5 qu'ils ont attribué à la différence de préparation de la Lecitase®ultra élaboré par Novozymes. Les divergences trouvées montrent que de nombreux facteurs peuvent influencer sur l'activité des enzymes, entre de ce fait chaque enzyme nécessite une étude particulière.

Nous remarquons une augmentation rapide de l'activité de $\text{pH} 3$ à $\text{pH} 5$, puis il y a une diminution dans l'activité à des pH supérieurs à 5. Cette perte d'activité peut être attribuée au changement dans la structure de la Lecitase®ultra rendant le site actif difficilement accessible selon le pH de la solution. Le pH modifie les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique, et cela en affectant directement l'association entre enzyme et substrat c'est-à-dire le complexe enzyme-substrat. Et si la concentration en complexe enzyme-substrat diminue, alors la vitesse de réaction diminue.

IV.2.2.3. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction de la température

L'activité de la lecitase®ultra en fonction de la température a été suivie de 25°C à 60°C pendant un temps de réaction de 20 min, avec une émulsion d'huile d'olive à pH=5. La figure IV.4 montre l'évolution de l'activité de la lecitase®ultra en fonction de la température.

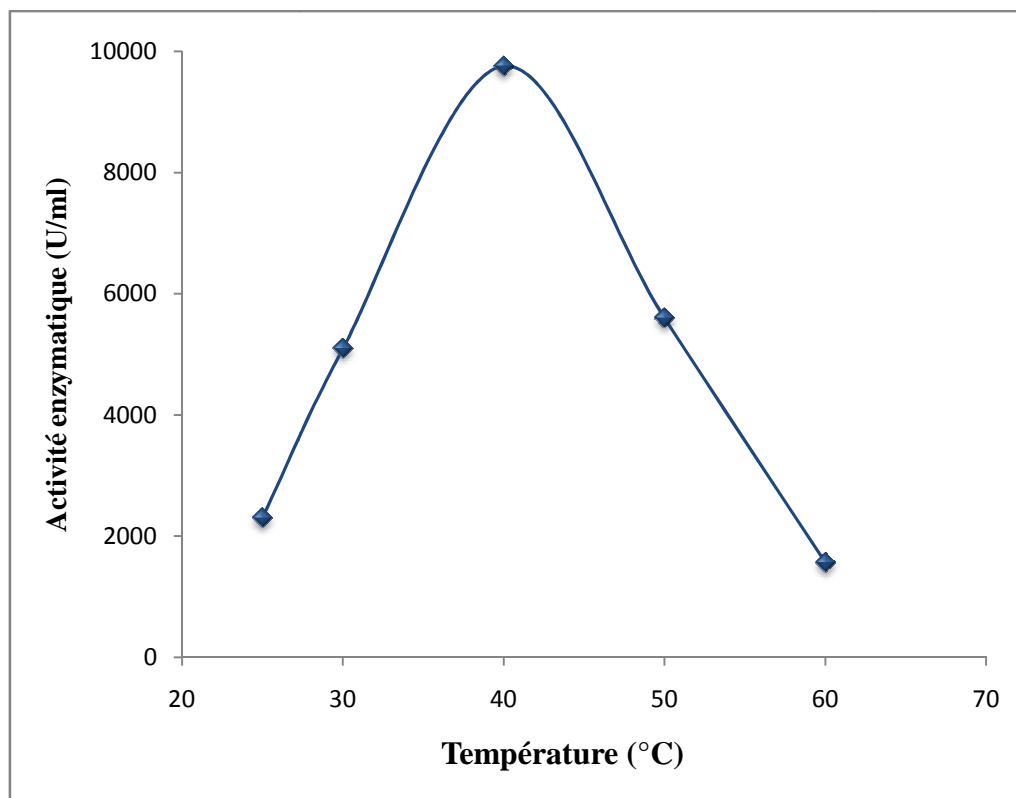


Figure IV.4: Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction de la température.
(À pH=5, $C_0=3\text{g/l}$ $t=20\text{min}$).

L'activité enzymatique est dépendante de la température comme l'illustre la figure IV.4, où on observe qu'elle augmente avec la température, puis elle atteint un optimum à 40°C, au-delà duquel elle diminue. Ce résultat concorde avec celui trouvé par **Yang et al [114]**. Et il est de même pour la plupart des lipases microbiennes, elles montrent une activité maximale vers 40°C, entre autre c'est le cas de la lipase *Candida rugosa* étudié par **Deng et al [95]**.

Ce profil en forme de cloche de l'activité enzymatique de la lecitase® ultra est très typique pour les cinétiques enzymatiques. Il résulte de l'opposition de deux effets inverses : en premier lieu l'augmentation de l'activité au fur et à mesure que la température augmente dû à l'activation thermique de l'enzyme. Et en second lieu, une diminution de l'activité enzymatique due à des changements de conformation de l'enzyme, principalement au niveau

du site actif. C'est-à-dire que le volet amphiphile change probablement de position, et ainsi obstruant totalement ou partiellement le site actif de l'enzyme, la rendant inactive. **Deng et al [95]** a expliqué cette diminution de l'activité enzymatique par la dénaturation thermique de la lipase par l'augmentation de la température. De plus **Yang et al [114]** ont démontré qu'à une température supérieure à 40°C la lecitase®ultra favorise plus l'hydrolyse des phospholipides, que l'hydrolyse des triglycérides certainement à cause du changement de conformation de la lecitase®ultra. Ce qui confirme le résultat obtenu.

IV.2.2.4. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction de la concentration du substrat

L'étude de l'évolution de l'activité de la lecitase® ultra en fonction de la variation de la concentration de substrat, a été étudiée en effectuant l'hydrolyse d'une émulsion d'huile d'olive dans un tampon acétate à pH=5. Cette étude a été effectuée à différentes concentration en substrat (0,45, 9, 18, 27, 36, 45, 50, 60, 72, 80 ,90 g/l) pendant un temps de réaction de 20 min et incubé à 40°C. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure IV.5.

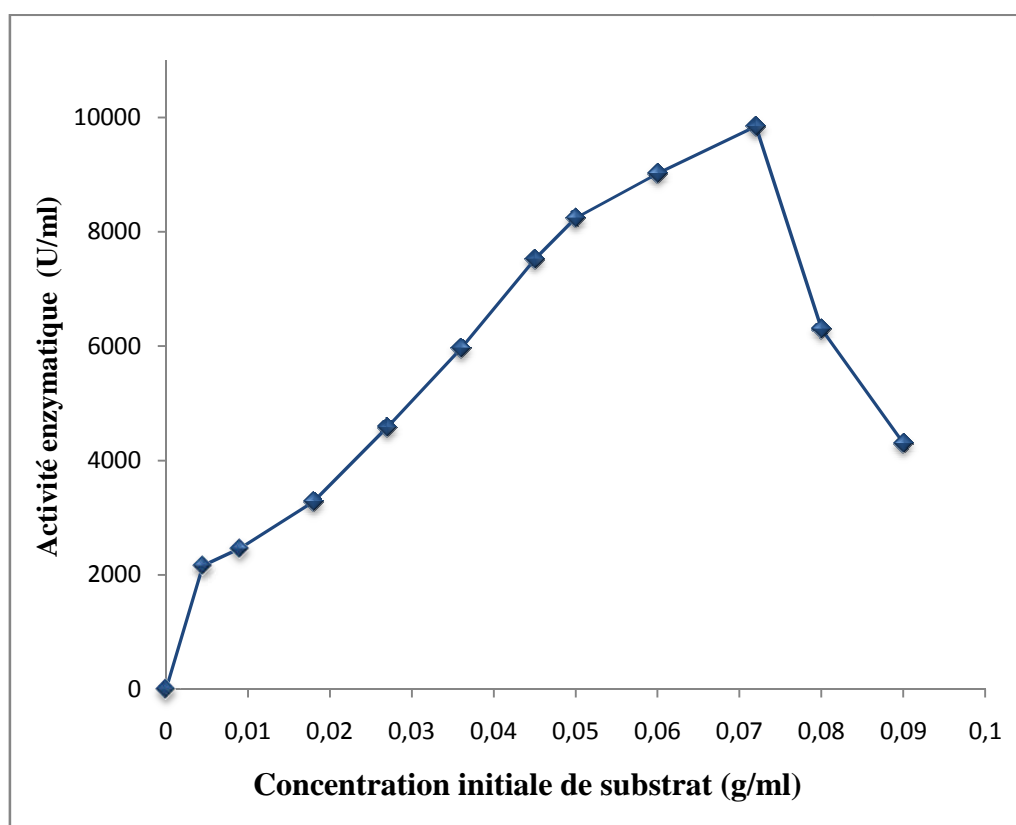


Figure IV.5: Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction de la concentration du substrat. (À pH=5, T=40°C, t= 20min).

La figure IV.5 montre qu'il ya une augmentation progressive de l'activité de la lecitase®ultra jusqu'à un point de saturation de l'enzyme à 72 g/l où elle atteint 9840 U/ml. Puis, elle diminue brusquement et atteint 4300 U/ml à 9 g/l. La diminution de l'activité enzymatique est peut être due à l'inhibition de la lecitase®ultra par un excès de substrat par rapport à la quantité d'enzymes présentes. Cette situation a mené à la diminution des interfaces eau/lipide, ayant pour résultat la diminution de l'activité enzymatique.

En effet, cette enzyme comme toutes les lipases et phospholipases procède par une activation à l'interface eau/lipide, donc une augmentation de la concentration en substrat réduit les surfaces actives c'est-à-dire les interfaces eau/lipide. Le substrat occupe graduellement l'interface et finalement la composition du mélange de la réaction devient biphasée, ce qui n'est pas un état idéal pour que la lecitase®ultra exerce son activité catalytique. Par conséquent, elle se retrouve inhibée et son activité diminue, et à de basses concentrations en substrat l'interface est disponible pour l'activité catalytique de l'enzyme.

Ejedegba et al., (2007) [134] ont obtenu le même résultat, l'étude de l'activité de la lipase *cocos nucifera linn* extraite des noix de coco en fonction de la concentration et cela en utilisant plusieurs substrats (l'huile d'olive l'huile de coco, trioleine, tripalmitine) a donné la même allure des courbes et qui présente à chaque fois un optimum. D'après eux la diminution de l'activité après la concentration optimum peut être due à l'inhibition de l'enzyme par l'excès de substrat ou à un changement dans les caractéristiques physicochimiques.

IV.2.2.5. Activité de la lecitase®ultra libre en fonction de la concentration en enzyme

La variation de l'activité de la lecitase® ultra libre exprimé en U/ml en fonction de la concentration est représentée dans la figure IV.6.

La figure IV.6 montre que l'activité augmente linéairement avec la concentration en enzyme à des concentrations inférieures à 3 g/l, où elle atteint un maximum d'activité de 9840 U/ml. Au-delà de cette concentration l'activité diminue, puis atteint un palier à partir d'une concentration de 24 g/l. L'activité en fonction de la concentration en enzyme ne suit donc pas la cinétique classique de Michaelis-Menten où la vitesse est d'ordre 1 par rapport à l'enzyme quelque soit sa concentration.

Dans le cas présent, la vitesse de la réaction est d'ordre 1 à des concentrations inférieures à 3 g/l, et elle change d'ordre si cette concentration est dépassée. Ce résultat peut s'expliquer par un phénomène de saturation de l'interface eau/lipide. Du fait de l'augmentation de la concentration en enzymes, la viscosité augmente et la diffusion de

l'enzyme diminue. C'est la même observation que **Kartal *et al* [130]** ont fait, en faisant varier la concentration de la lipase pancréatique porcine. D'après eux, l'activité est indépendante de la concentration molaire, mais contrôlée par la concentration de substrats aux interfaces. **Reis *et al* [131]** constatent que les réactions d'hydrolyse à l'interface présentent un effet d'autolimitation due à des changements simultanés dans la composition de l'interface et de l'accumulation des produits finaux réduisant l'accès du substrat au site actif.

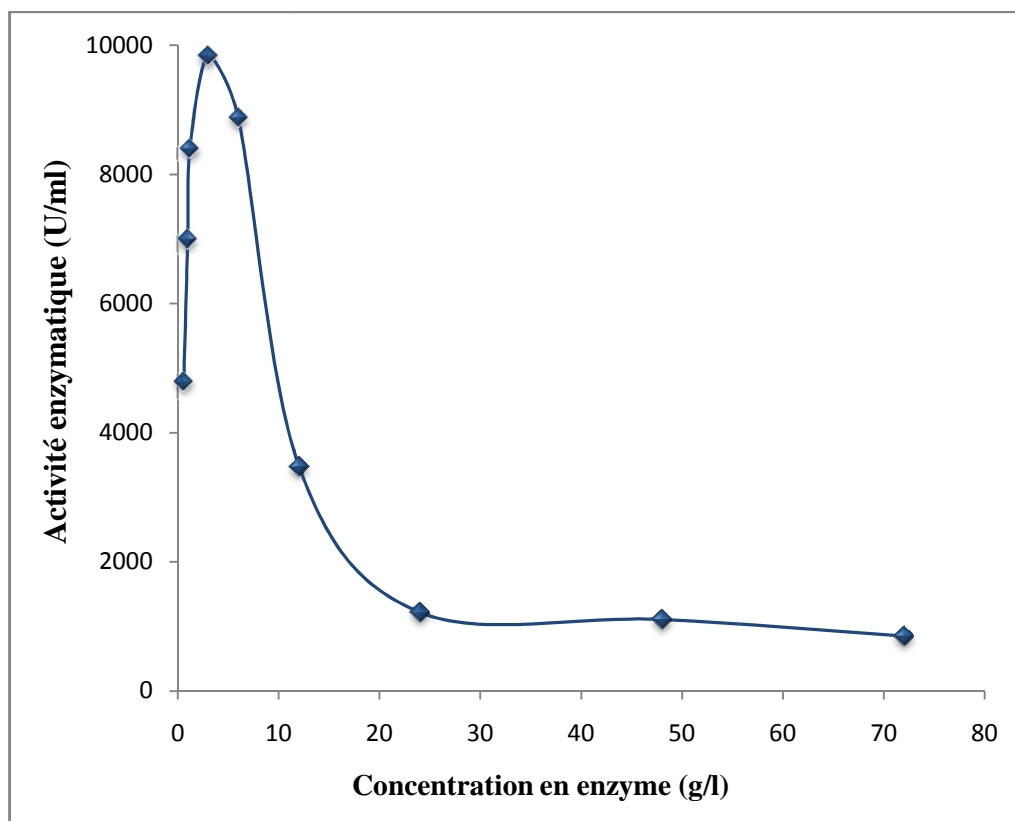


Figure IV.6: Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre en fonction de la concentration en enzyme (pH=5, T=40°C, t=20 min).

IV.2.3. Activité de lecitase®ultra immobilisée

IV.2.3.1. Activité de la lecitase®ultra immobilisée en fonction du pH

Dans cette étude, l'effet du pH sur l'activité de la lecitase®ultra immobilisée a été étudié dans un domaine de pH variant de 3 à 12 à 40°C les résultats sont présentés dans les figures IV.7, IV.8, IV.9.

a) Activité de la lecitase® ultra immobilisée sur la résine méthacrylique

La figure IV.7 montre l'évolution de l'activité de la lecitase® ultra immobilisée sur la résine méthacrylique en fonction du pH.

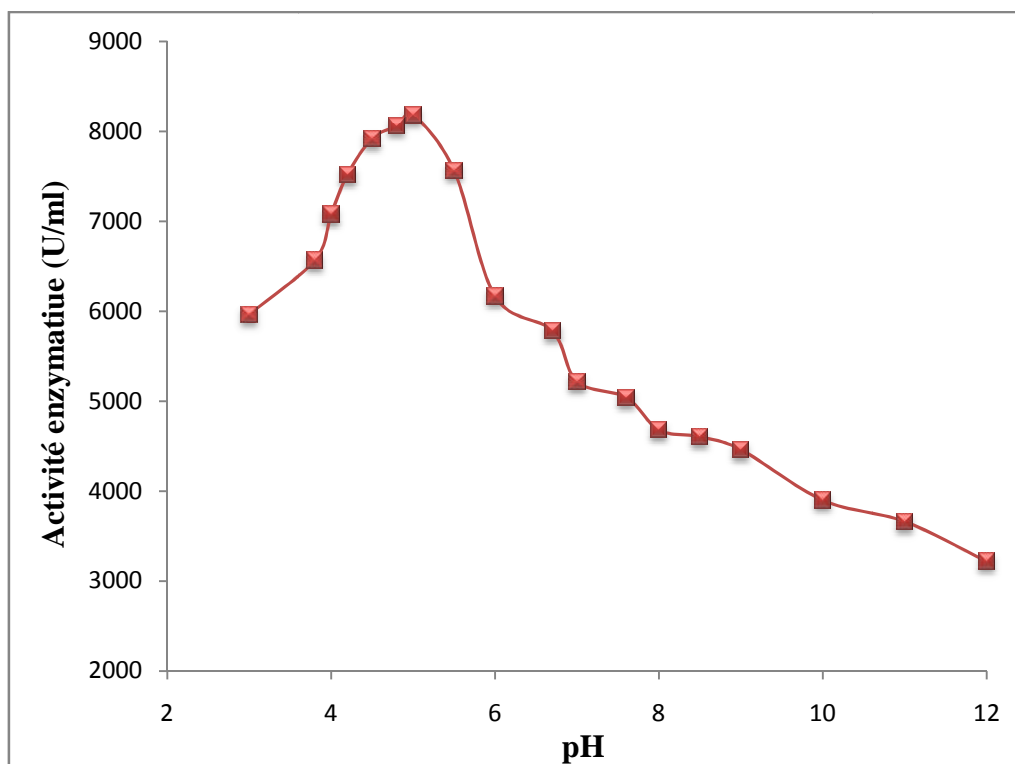


Figure IV.7 : Evolution de l'activité de la Lecitase® Ultra immobilisée sur la résine méthacrylique en fonction du pH (T=40°C, t=20 min).

D'après la figure IV.7 l'activité de la lecitase® ultra augmente jusqu'à atteindre un optimum à pH=5, puis elle diminue. Nous observons également que les activités de la lecitase® ultra dans la gamme de pH acide sont supérieures à celles de la gamme de pH basique. Nous pouvons supposer que la résine méthacrylique a maintenu la lecitase® ultra dans une conformation assez stable ou le site actif est accessible à des pH acides. Et cette conformation n'est plus stable dans la gamme de pH basique rendant le site actif moins accessible. **Yilmaz [109] et al** ont fait les mêmes observations, ils constatent que la lipase *Candida rugosa* immobilisée sur un support à base de tétraéthoxysilane et d'octyltriéthoxysilane en présence de Fe₃O₄ a une activité élevée dans une gamme de pH acide. D'après eux c'est due essentiellement au support qui a une variété d'effets sur l'état d'ionisation et la dissociation de la lipase et de son environnement. De plus, ils suggèrent que l'immobilisation est susceptible de provoquer à un changement de conformation de la lipase, qui mène à sa désactivation.

a) Activité de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine styrénique

La figure IV.8 montre l'évolution de l'activité de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine styrénique en fonction du pH.

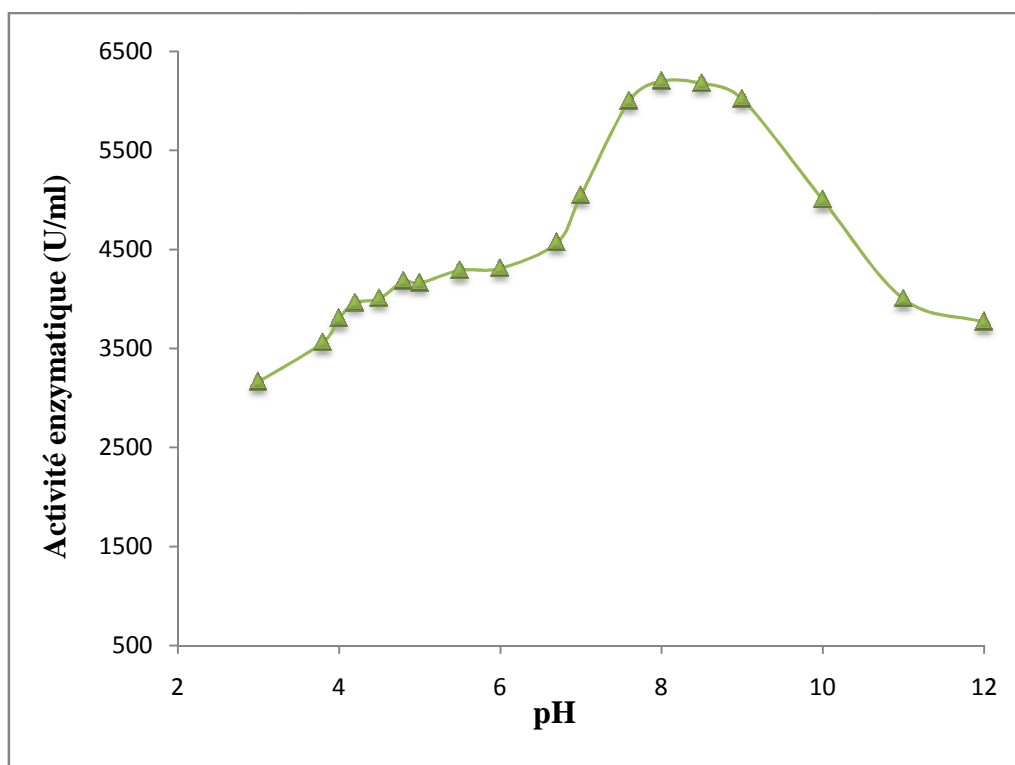


Figure IV.8 : Evolution de l'activité de la Lecitase® Ultra immobilisée sur la résine styrénique en fonction du pH (T=40°C, t=20 min).

D'après la figure IV.8 nous observons que l'activité de la lecitase®ultra augmente d'une façon proportionnelle au pH jusqu'à atteindre un optimum à pH=8, puis elle diminue. On observe que l'activité de la lecitase®ultra dans la gamme de pH= 7,6 à 9 varie peu. Nous supposons que la résine styrénique a maintenu la lecitase®ultra dans une conformation stable ou le site actif est accessible dans cette gamme de pH. Un résultat similaire a été rapporté par **De Oliveira et al [90]** pour la lipase *Candida rugosa* immobilisée sur le polystyrène/divinylbenzène.

b) Comparaison de l'activité de la lecitase®ultra libre et immobilisée

L'activité enzymatique est nettement influencée par les conditions du milieu réactionnel, nous avons particulièrement observé que le pH est l'un des paramètres les plus influents sur le changement de l'activité enzymatique dans un milieu aqueux. Par conséquent, il est très utile de comparer l'activité enzymatique de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée en fonction des variations du pH.

La figure IV.9 montre que l'activité de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique en fonction du pH est inférieure à celle de l'enzyme libre dans la plage de pH allant de 4 à 5.5 et il est de même pour la lecitase®ultra immobilisée sur la résine styrénique, ceci peut être expliqué par la quantité d'enzyme immobilisée qui est inférieure à la quantité d'enzyme libre utilisée. Malgré que les activités de la lecitase®ultra immobilisée sur les deux résines soient inférieures à celles de l'enzyme libre, la différence entre ces valeurs n'est pas très grande nous pouvons donc supposer que l'enzyme immobilisée est maintenue dans une conformation assez stable dans cette gamme de pH.

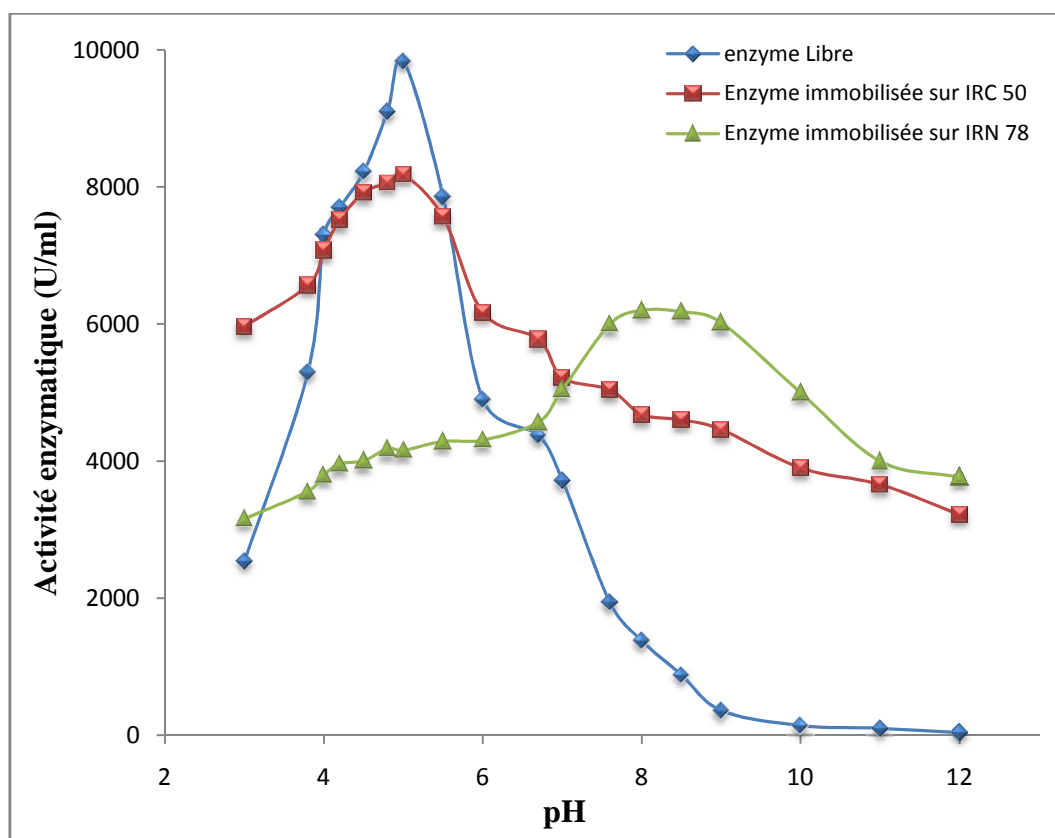


Figure IV.9 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre et immobilisée en fonction du pH (T=40°C, t=20 min).

Nous constatons qu'au pH=3 et 3,8 et aux pH allant de 6 à 12 les activités de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique sont supérieures à celles de l'enzyme libre au même pH. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'immobilisation a limité les changements de conformations de la lecitase®ultra et l'a maintenue dans une forme où le site actif est accessible au substrat. Alors que pour la lecitase®ultra immobilisée sur la résine

styrénique on observe une augmentation significative de l'activité du pH allant de 6,7 à 12 par rapport à l'enzyme libre.

L'enzyme libre a un pH optimal de 5, alors que pour la lecitase@ultra immobilisée sur la résine styrénique il est de 8, on remarque que le pH optimal s'est décalé vers la plage de pH plus basique. Ces observations ont suggéré un changement significatif du microenvironnement immédiat du site actif de l'enzyme immobilisée sur la résine styrénique et qui coïncide avec les observations faites par de nombreux auteurs [90, 135]. Ces changements peuvent être causés par la liaison de la résine à un acide aminé qui compose le volet amphiphile de la lecitase ultra qui se trouve en aval du site actif et ainsi changer sa position ou sa géométrie. De nombreuses recherches ont été menées afin de déterminer le rôle du volet amphiphile, soit en le changeant ou en l'éliminant complètement de l'enzyme, **Jennens et al [136]**, **Bezzine et al [137]** et **Thomas et al [138]** expliquent que ce n'est pas le volet amphiphile lui-même qui est responsable de l'activation interfacial mais plutôt son mouvement et sa stabilisation de la conformation ouverte de l'enzyme qui sont impliqués dans l'activation de la lipase.

En ce qui concerne la lecitase@ultra immobilisée sur la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50) le pH optimal d'activité est de pH= 5 il est identique à celui de l'enzyme libre. C'est le même résultat qu'ont obtenu **Abbas et Comeau [139]** en étudiant l'activité de la lipase *Mucor sp* immobilisée sur une résine méthacrylique identique à celle que nous avons utilisé (Amberlite IRC 50). L'enzyme a maintenu 87% de son activité initial.

IV.2.3.2. Activité de la lecitase@ultra immobilisée en fonction de la température

Le profil de température de la lipase immobilisée est un des principaux paramètres exigés pour savoir si le procédé d'immobilisation affecte l'activité enzymatique. Dans cette étude, l'activité de la lecitase@ultra libre et immobilisée sur les deux résines méthacrylique et styrénique (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) a été déterminée par hydrolyse de l'huile d'olive émulsionnée à pH= 5 et à différentes températures de 25 à 60°C. Les résultats sont présentés dans les figures IV.10, IV.11, IV.12.

a) Activité de la lecitase@ultra immobilisée sur la résine méthacrylique

La figure IV.10 montre l'évolution de l'activité de la lecitase@ultra immobilisée sur la résine méthacrylique en fonction de la température.

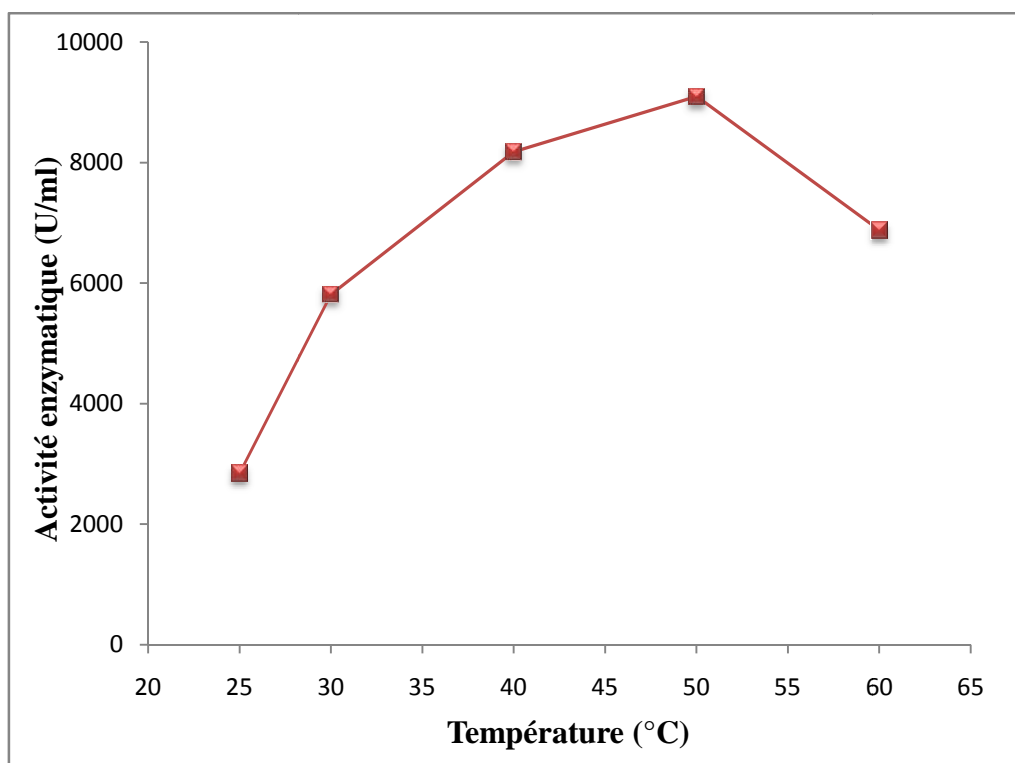


Figure IV.10 : Evolution de l'activité de la lecitase@ultra immobilisée sur la résine méthacrylique en fonction de la température (À pH=5, $[S]_0=72 \cdot 10^{-3}$ g/ml).

D'après la figure IV.10 nous observons que l'activité de la lecitase@ultra augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à atteindre un optimum à 50°C, puis elle diminue. **I.B.-B. Romdhane et al., [10]** suggèrent que l'immobilisation a peut être réduit la flexibilité des molécules d'enzymes et il a fallut une énergie plus élevée pour que la molécule puisse se réorganiser et avoir une conformation adéquate pour que le site actif soit accessible.

a) **Activité de la lecitase@ultra immobilisée sur la résine styrénique**

La figure IV.11 montre l'évolution de l'activité de la lecitase@ultra immobilisée sur la résine styrénique en fonction de la température. Nous observons que l'activité de la lecitase@ultra augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à atteindre un optimum à 50°C, puis elle diminue. Un résultat similaire a été rapporté par **De Oliveira et al [90]** pour la lipase *Candida rugosa* immobilisée sur une résine à base de polystyrène/divinylbenzène. D'après eux l'immobilisation a limité la conformation de l'enzyme à haute température.

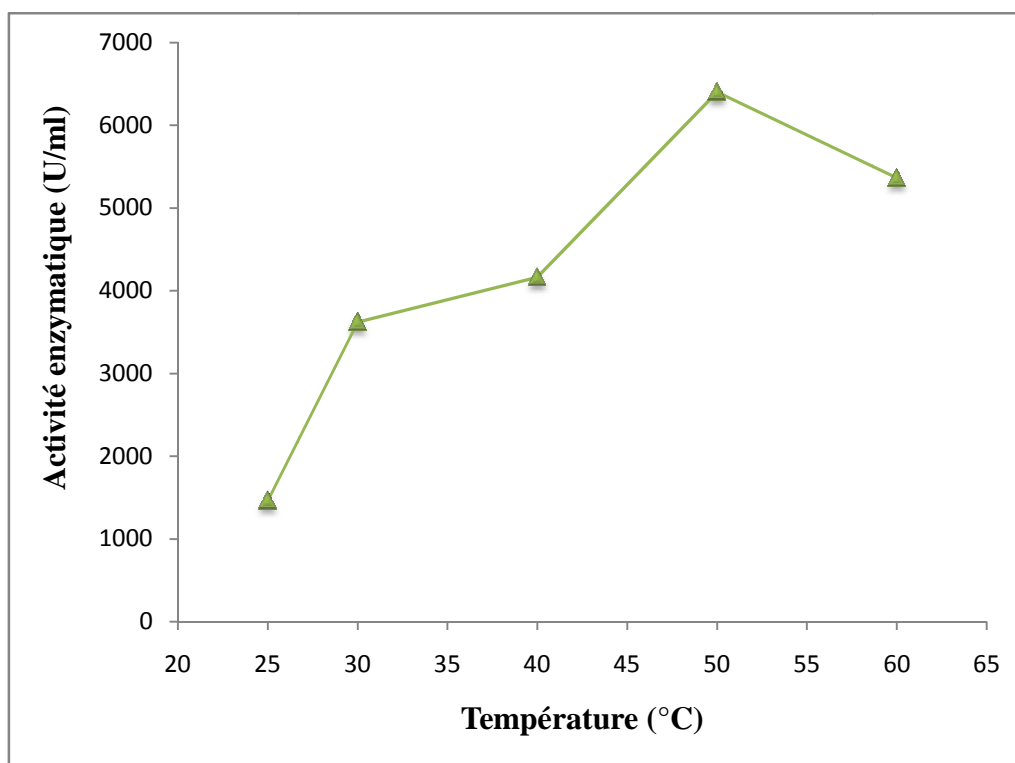


Figure IV.11 : Evolution de l'activité de la lecitase®ultra libre et immobilisée en fonction de la température (À pH=5, $[S]_0=72 \cdot 10^{-3}$ g/ml).

b) Comparaison de l'activité de la lecitase®ultra libre et immobilisée

La figure IV.12 montre l'évolution de l'activité de la lecitase®ultra libre et immobilisée sur les résines méthacrylique et styrénique en fonction de la température.

Les deux systèmes d'immobilisations (lecitase®ultra-résine) montrent des températures optimales décalées vers des températures plus élevées que celle de la lecitase®ultra libre. Nous constatons que la température optimale pour la lecitase®ultra libre est de 40°C, tandis que celles de la lecitase®ultra immobilisée sur les deux résines méthacrylique et styrénique ont décalé et elles sont de 50°C. Une augmentation considérable de l'activité est observé à 60°C pour la lecitase®ultra immobilisé sur les résine méthacrylique et styrénique (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) par rapport à celle de l'enzyme libre.

Ces résultats indiquent que la stabilité thermique de la lecitase ultra a été augmentée grâce à l'immobilisation, les mêmes observations ont été notées par **Da Silva et al [64]**. Ce comportement est considéré comme avantageux et peut être attribué à une structure plus rigide de la lecitase®ultra immobilisée spécialement celle immobilisée sur la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50). En outre, **Bayramoglu et al [129]** et **Chen et al [106]** suggèrent que ceci pourrait être expliqué par la création des limitations de conformation sur les mouvements d'enzymes comme résultats d'interaction ionique entre l'enzyme et le

support, ou une résistance améliorée de la protéine à la dénaturation thermique. C'est-à-dire qu'à 50°C la lecitase® ultra est maintenue dans une bonne conformation ou le site actif est accessible. C'est pour cela que son activité est plus grande que celle de l'enzyme à l'état libre à cette même température.

De plus, la figure IV.12 montre qu'il y a une diminution de l'activité enzymatique après immobilisation de la lecitase® ultra. Ceci est attribué à la modification mineure dans sa structure tridimensionnel qui peut mener à la déformation des résidus d'acides aminés concernés dans la catalyse, et à la présence d'une immobilisation aléatoire qui obstrue l'emplacement du site actif et aux limitations imposées par le transfert de masse lent du substrat ou du produit à/ou de l'emplacement actif de l'enzyme.

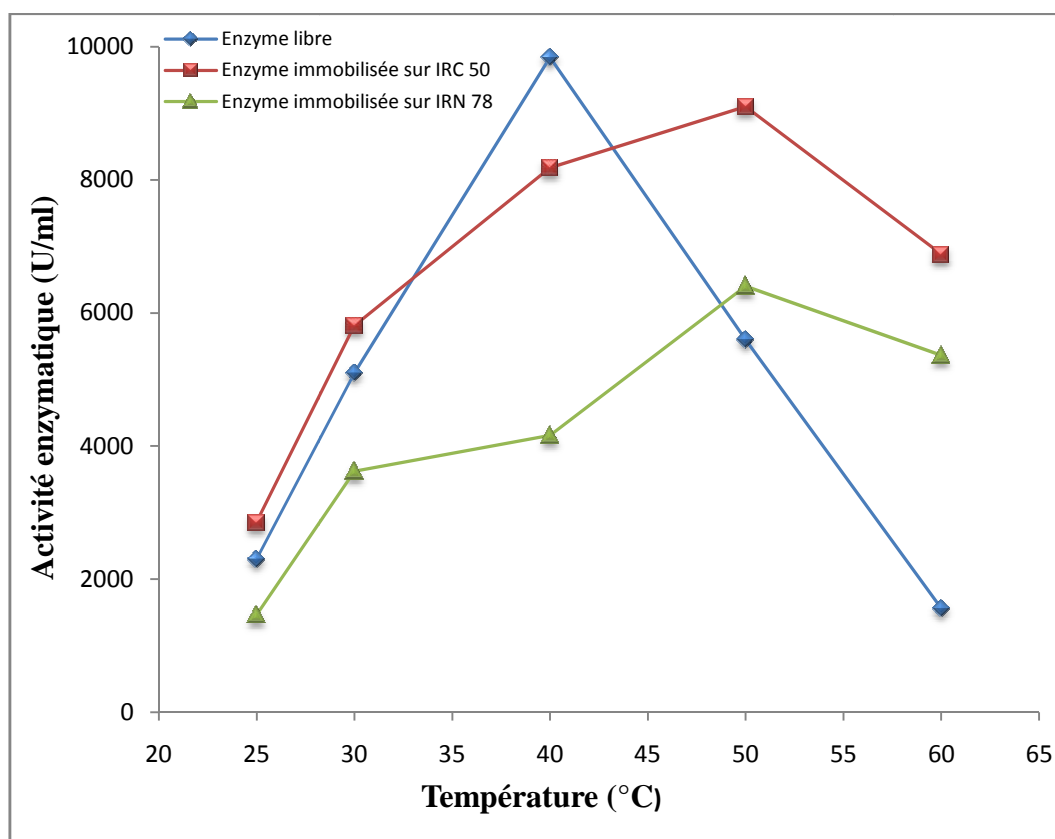


Figure IV.12 : Evolution de l'activité de la lecitase ultra libre et immobilisée en fonction de la température (À pH=5, $[S]_0=72 \cdot 10^{-3}$ g/ml).

IV.2.3.3. Activité de la lecitase ultra immobilisée en fonction du substrat

L'étude de l'évolution de l'activité de la lecitase® ultra immobilisée sur les résines méthacrylique et styrénique (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) en fonction de la variation de la concentration du substrat, a été étudiée en effectuant l'hydrolyse d'une

émulsion d'huile d'olive. Cette étude a été effectuée à différentes concentrations en substrat ($0, 45 \cdot 10^{-3}, 9 \cdot 10^{-3}, 18 \cdot 10^{-3}, 27 \cdot 10^{-3}, 36 \cdot 10^{-3}, 45 \cdot 10^{-3}, 72 \cdot 10^{-3}, 90 \cdot 10^{-3}$ g/ml) pendant un temps de réaction de 20 min et incubé à 40°C . Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure IV.13.

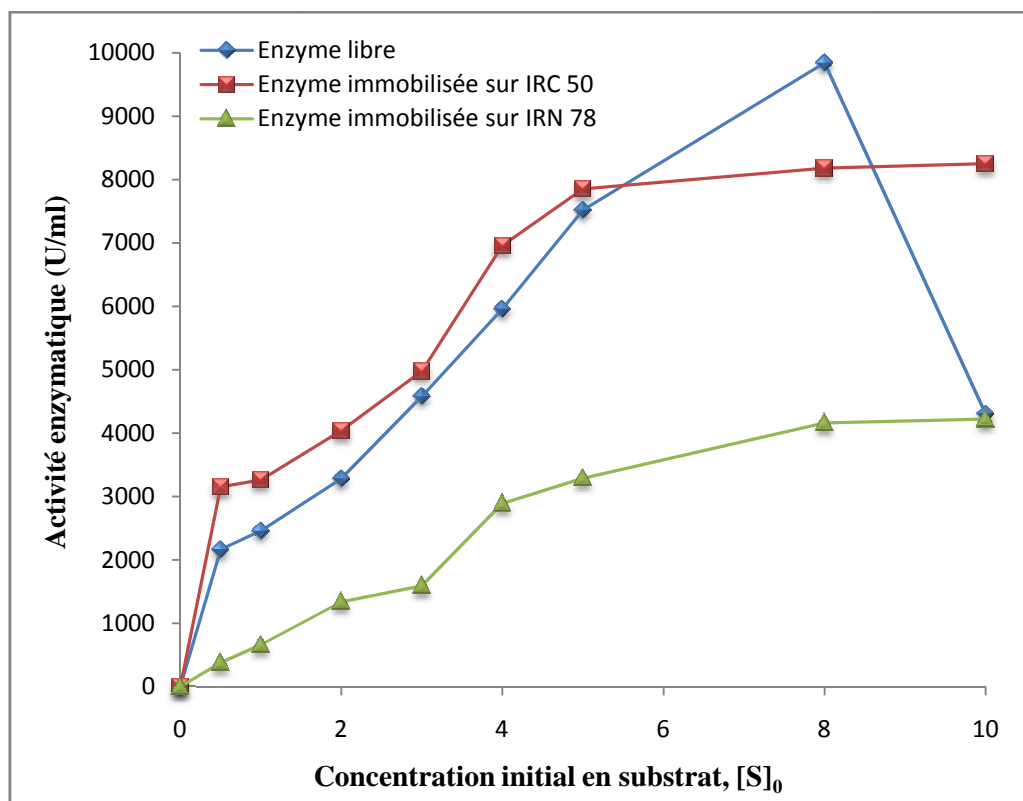


Figure IV.13 : Evolution de l'activité de la lecitase@ultra libre et immobilisée en fonction du substrat (À 40°C et $\text{pH}=5$).

Les résultats de la figure IV.13 montrent une augmentation progressive de l'activité de la lecitase@ultra immobilisée sur les deux résines méthacrylique et styrénique (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) avec l'augmentation de la concentration du substrat jusqu'à atteindre un palier, à partir d'une concentration de 0.045 g/ml. On constate que pour de faibles concentrations inférieures à 0.045 l'activité enzymatique de la lecitase@ultra immobilisée sur la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50) est supérieure à celle de l'enzyme libre. Ce résultat est peut être la conséquence de l'immobilisation qui a maintenu l'enzyme dans une conformation favorable ou le site actif est accessible au substrat.

De plus, nous remarquons que l'activité de lecitase@ultra immobilisée sur la résine méthacrylique est supérieure à celle immobilisée sur la résine styrénique. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la résine méthacrylique a adsorbé une quantité de

lecitase®ultra plus élevée que la résine styrénique. Et il est probable que l'échange ionique s'est effectué entre la résine styrénique et un résidu d'acide aminé proche du site actif de la molécule d'enzyme, et ainsi rendant le site actif partiellement accessible ou inaccessible au substrat.

IV.2.3.4. Stabilité thermique de la lecitase®ultra

Pour des applications industrielles, la stabilité de l'activité de l'enzyme immobilisée est un des facteurs significatifs pour évaluer ses propriétés, qui peuvent être supérieures ou non à celle de l'enzyme libre. La stabilité thermique de la lecitase®ultra immobilisée sur les résines méthacrylique et styrénique a été effectuée dans les conditions optimales déterminée de l'activité enzymatique immobilisée à une température de 50°C et pH=5, pendant une durée de 24h. les résultats obtenus sont comparés avec la stabilité de la lecitase®ultra libre. Les résultats sont exprimés en activité relative A_R (%) (Figure IV.14).

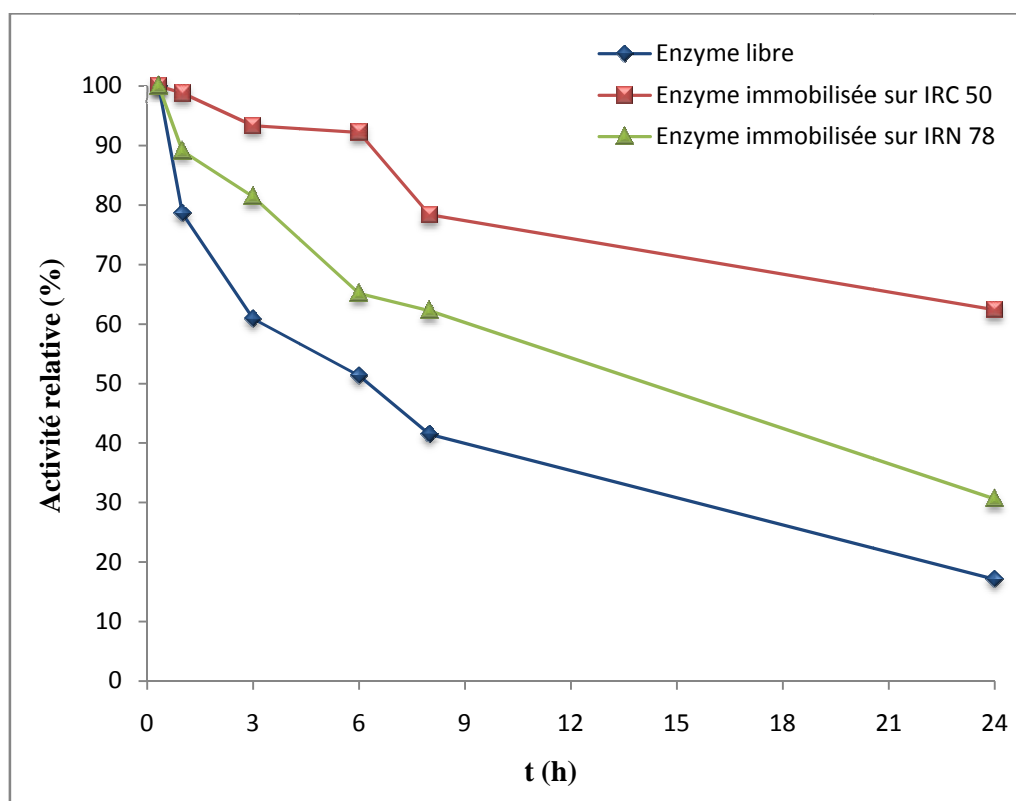


Figure IV.14 : Evolution de l'activité relative de la lecitase ultra libre et immobilisée en fonction du temps (À 50°C et pH=5).

Les résultats démontrent que la stabilité thermique de la lecitase®ultra immobilisée sur les résines méthacrylique et styrénique est supérieure à celle de l'enzyme libre. Nous constatons que la lecitase® ultra immobilisée sur la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50)

conserve 62% de son activité après 24h, tandis que celle immobilisée sur la résine styrénique (Amberlite IRN 78) conserve près de 31% de son activité après 24h alors que, l'enzyme libre maintient seulement 17% de son activité. De ce fait, la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique a une meilleure stabilité thermique, et elle est supérieure à celle de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine styrénique. Cette amélioration de l'activité selon **Mendes et al [140]** peut être attribuée à l'immobilisation qui stabilise la conformation de la protéine enzymatique et améliore la résistance des protéines à la dénaturation thermique.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que la flexibilité de l'enzyme a été réduite après immobilisation, et que cette dernière a mené à une légère augmentation de la rigidité de l'enzyme à 50°C [90]. Par conséquent, l'immobilisation de la lecitase®ultra a réduit le changement de conformation de l'enzyme, et a pu garder une activité enzymatique. Ce résultat démontre clairement l'efficacité de la méthode d'immobilisation et qui prolonge l'application potentielle de la lecitase®ultra comme biocatalyseur.

IV.2.3.5. Activité de la lipase immobilisée en fonction du nombre de cycles d'utilisation

La stabilité opérationnelle du système d'enzymes immobilisées est très importante pour des applications industrielles. Dans cette étude, la réutilisation de la lecitase® ultra immobilisée sur les deux résines styrénique et méthacrylique (Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78) a été évaluée par des hydrolyses successives de l'huile d'olive émulsionnée à 50°C et à pH=5 (Chaque cycle a duré 20 min), le processus a été répété jusqu'à 8 cycles. Les résultats sont représentés dans la figure IV.15.

Comme il peut être vu sur la figure IV.15, la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50) a des activités relatives plus élevées que celle immobilisée sur la résine styrénique (Amberlite IRN 78) supérieur à 95% durant les 3 premiers cycles de réutilisation. Ensuite, après trois cycles une réduction continue de l'activité relative a été observée et cette perte a atteint 12% après 4 cycles, 36% après 5 cycles jusqu'à atteindre 90% après 8 cycles. Cette baisse d'activité est probablement due aux pertes d'une quantité d'enzyme au cours du processus de réutilisation, causées spécialement par le lavage de la lecitase immobilisée sur la résine méthacrylique entre chaque cycle, en effet, la lecitase®ultra a été adsorbée par interactions ioniques qui sont des liaisons de faible énergie. Et cette baisse d'activité peut être attribuée à l'inactivation de la lecitase®ultra immobilisée durant la réutilisation [141]. Par contre la lecitase®ultra immobilisée sur la résine styrénique (Amberlite IRN 78) subit une perte brutale de son activité estimée à 51% dès le 2^{ème} cycle,

après cela, une réduction continue de l'activité enzymatique est observée et atteint 96% de perte après seulement 5 cycles. Cette perte d'activité est essentiellement causée par la dégradation de la résine styrénique, après chaque cycles une désintégration des billes de résine a été observée, ce qui implique une désorption de l'enzyme qui part avec les eaux de lavages entre chaque cycle et par conséquent conduit à une réduction de la concentration de l'enzyme dans le milieu réactionnelle. **Ramani et al [132]** suggèrent que l'addition répétée du substrat après chaque cycles d'utilisation aurait changé la structure conformationnelle et la géométrie du site actif de l'enzyme, provoquant la diminution de l'activité enzymatique.

Les résultats obtenus impliquent que la stabilité opérationnelle de la lecitase@ultra immobilisée sur la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50) est plus élevée que celle de la lecitase@ultra immobilisée sur la résine styrénique (Amberlite IRN 78). En outre, la résine méthacrylique a pu également fournir un microenvironnement approprié pour la lecitase@ultra en empêchant un excès d'accumulation en eau pendant le processus de réutilisation. De plus, la stabilité opérationnelle de la lecitase ultra immobilisée sur la résine méthacrylique a donné de meilleurs résultats en comparaison avec la cellulase immobilisée sur cette même résine qui a été étudiée par **Boukraa-Oulad Daoud et al [124]**.

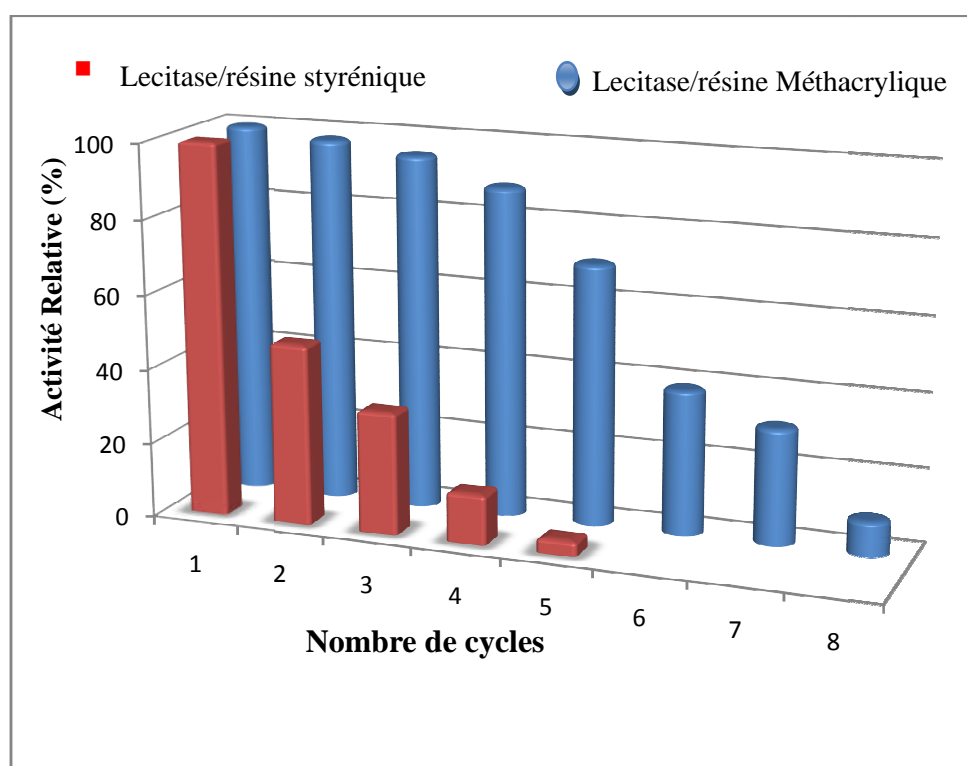


Figure IV.15: Evolution de l'activité relative de la lecitase@ultra immobilisée sur les résines méthacrylique et styrénique en fonction du nombre de cycles d'utilisation (À 50°C et pH=5, durée de chaque cycle 20min).

CONCLUSION

L'objectif de ce travail est l'immobilisation de la lecitase®ultra sur deux polymères, une résine styrénique et une résine méthacrylique par l'adsorption. Ainsi que l'étude de son activité enzymatique avant et après l'immobilisation pour permettre sa réutilisation dans un réacteur en continu et de juger de l'impact de la méthode d'immobilisation sur son efficacité enzymatique.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'adsorption qui dépend de la structure et de la morphologie de la phase solide, les supports proposés ont été caractérisés par analyse BET pour la détermination de la surface spécifique et de la taille des pores. Le substrat et l'enzyme utilisés ont été caractérisés par la spectroscopie infrarouge IR et par spectrophotométrie UV-Vis.

Dans un premier temps, le comportement des résines méthacrylique et styrénique vis-à-vis de l'adsorption de la lecitase®ultra et l'effet de plusieurs paramètres expérimentaux ont été étudiés. Les résultats obtenus ont montré que le mécanisme d'adsorption dépend étroitement du pH. Le pH optimal d'adsorption de la lecitase® ultra sur la résine méthacrylique est de 4.8, et sur la résine styrénique est de 7.

En utilisant une technique d'adsorption en batch, nous avons étudié l'équilibre et la cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra dans une gamme très large de concentration initiale en enzyme de 0,06 à 6 g.l⁻¹. La construction des isothermes d'adsorption des molécules de lecitase®ultra par les deux résines méthacrylique et styrénique a permis de déterminer leur capacité d'adsorption maximale en relation avec leurs capacités d'échange et leur charge. Les résultats ont montré que l'adsorption de la lecitase®ultra sur chaque résine peut être modélisée en utilisant le modèle de Langmuir. L'équilibre est atteint au bout de 1h à pH 4.8 dans le cas de la lecitase®ultra adsorbée par la résine méthacrylique et à pH 7 dans le cas de la lecitase®ultra adsorbée par la résine styrénique. La nature chimique des sites mis en jeu dans l'adsorption ne modifie pas la vitesse d'adsorption. Les mêmes quantités relatives de molécules d'enzyme étant adsorbées en même temps.

Les régressions linéaires ont montré que les cinétiques sont contrôlées par le modèle pseudo second ordre pour la lecitase®ultra adsorbée par les deux résines styrénique et méthacrylique. A la fin de cette étude nous pouvons conclure que les supports présentent une bonne efficacité d'adsorption où le taux d'adsorption de la lecitase®ultra sur la résine méthacrylique (amberlite IRC 50) est de 78% et proche de 71% pour celle adsorbée sur la résine styrénique (amberlite IRN 78).

Dans un deuxième temps, l'étude de la lecitase®ultra libre a permis de vérifier sa réactivité par rapport au substrat choisi (l'huile d'olive) et l'efficacité de la méthode de dosage de l'activité qui a été adopté dans ce travail. L'étude de plusieurs paramètres affectant son activité a permis de déterminer les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme, un pH de 5 et une température de 40°C, concentration de 3 g/l et concentration en substrat est de 0.072 g/ml.

L'effet de plusieurs paramètres sur l'activité de la lecitase®ultra immobilisée a été étudié (Température, pH et concentration en substrat). L'effet du pH a eu comme conséquence, un décalage de la valeur du pH optimum de la lecitase immobilisée sur la résine styrénique vers un pH=8. Et n'avait pas d'effet significatif sur l'activité de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique. Les températures optimales de la lecitase immobilisée sur les deux résines se sont décalées vers des températures plus élevées (50°C) par rapport à celle de l'enzyme libre (40°C). Donc une augmentation de la température conviendra à l'ajustement de la conformation de la lecitase®ultra immobilisée sur les résines méthacrylique et styrénique. Pour de faibles concentrations en substrat inférieur à 0.045 l'activité enzymatique de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique s'est améliorée.

Lors de l'étude de la stabilité thermique, la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique a perdu environ 38% de son activité après 24h, tandis que celle immobilisée sur la résine styrénique a perdu près de 69% de son activité après 24h alors que, la lecitase®ultra libre perd 83% de son activité après 24h. Les résultats de la réutilisation montrent que l'activité de la lecitase®ultra immobilisée sur la résine styrénique diminue graduellement jusqu'à s'annuler lors du 5^{ème} cycle d'utilisation. Par contre, la lecitase®ultra immobilisée sur la résine méthacrylique conserve une activité de 64% par rapport à celle de la première utilisation après 5 cycles d'utilisations consécutifs.

En conclusion la titrimétrie est une bonne méthode efficace et facile à utiliser pour l'étude de l'activité de la lecitase®ultra. Nous pouvons conclure également que la résine méthacrylique (Amberlite IRC 50) est un bon matériau comparée à la résine styrénique (Amberlite IRN 78), elle reste stable à pH=5 et à 50°C en maintenant une bonne activité enzymatique pendant plusieurs cycles d'utilisation. Ce système peut être utilisé pour une production continue d'acide gras dans un réacteur en continu contenant une membrane adéquate afin de faciliter la séparation de l'acide gras libéré qui peu être utilisé dans la synthèse du biodiesel.

*RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES*

- [1] **Fickers Patrick, Jacqueline Destain, Philippe Thonart**, Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (2008) 12(2), 119-130.
- [2] **Salis Andrea, Marcella Pinna, Maura Monduzzi, Vincenzo Solinas**, Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 54 (2008) 19–26.
- [3] **Zhang Yuan-Yuan, Jun-Hong Liu**, Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R, S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase, *Biochemical Engineering Journal* 54, (2011) 40–46.
- [4] **Alloue Wazé Aimée Mireille, Mario Aguedo, Jacqueline Destain, Hakim Ghalfi, Christophe Blecker, Jean-Paul Wathelet, Philippe Thonart**, Les lipases immobilisées et leurs applications, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2008 12 (1), 57-68.
- [5] **Joel D. A. Tyndall, Supachok Sinchaikul, Linda A. Fothergill-Gilmore, Paul Taylor et Malcolm D. Walkinshaw**, Crystal Structure of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1, *J. Mol. Biol.* (2002) 323, 859–869.
- [6] **Rajendran Aravindan, Anbumathi Palanisamy et Viruthagiri Thangavelu**, Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries, *Brazilian archives of biology and technology, International Journal*, Vol. 52, n°1: (2009) 207-219.
- [7] **Fernandez Renny Edwin, Enakshi Bhattacharya, Anju Chadha**, Covalent immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on semiconducting materials, *Applied Surface Science* 254 (2008) 4512–4519.
- [8] **Arzu Uyanik, Nejdet Sen, Mustafa Yilmaz**, Improvement of catalytic activity of lipase from *Candida rugosa* via sol–gel encapsulation in the presence of calix(aza)crown, *Bioresource Technology* 102 (2011) 4313–4318.
- [9] **Palla Camila A., Consuelo Pacheco, María E. Carrín**, Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization, *Biochemical Engineering Journal* 55 (2011) 199– 207.
- [10] **Belhaj-Ben Romdhane Ines, Zamen Ben Romdhane, Ali Gargouri, Hafedh Belghith**, Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto Chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68: (2011) 230–239.
- [11] **Huang Fang-Cheng et Ju, Yi-Hsu**, Improved activity of a lipase by vacuum drying on to a hydrophobic microporous support, *Biotechnology Techniques*, Vol 8, N° 11, (1994), 827-830.
- [12] **Foresti M.L., Alimenti G.A., Ferreira M.L.**, Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis, *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2005) 338–349.
- [13] **Mancheno Jose´ M., Maria A. Pernas, Maria J. Martinez, Begona Ochoa, M. Luisa Rua and Juan A. Hermoso**, Structural Insights into the Lipase/esterase Behavior in the *Candida rugosa* Lipases Family: Crystal Structure of the Lipase 2 Isoenzyme at 1.97 Å^o, *Resolution, J. Mol. Biol.* (2003) 332, 1059–1069.

- [14] **Saxena R.K., Anita Sheoran, Bhoopander Giri, W. Sheba Davidson**, Purification strategies for microbial lipases, review, *Journal of Microbiological Methods* 52: (2003) 1 – 18.
- [15] **Shu Chin-Hang, Chun-Jun Xu, Gee-Chen Lin**, Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*, *Process Biochemistry* 41: (2006) 734–738.
- [16] **Gao Xiu-Gong, Shu-Gui Cao, Ke-Chang Zhang**, Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain, *Enzyme and Microbial Technology* 27: (2000) 74–82.
- [17] **Richmond Gregory S. et Terry K. Smith**, Phospholipases A₁, *International Journal of Molecular Sciences*, (2011), 12, 588-612.
- [18] **Aoki Junken, Asuka Inoue, Kumiko Makide, Naoya Saiki, Hiroyuki Arai**, Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family, *Biochimie* 89 (2007) 197-204.
- [19] **Sangeetha R., A. Geetha, I. Arulpandi**, Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* vsg1: Production, Purification and Characterization, *Brazilian Journal of Microbiology* 41: (2010) 179-185.
- [20] **Svendsen Allan**, Lipase protein engineering, *Biochimica et Biophysica Acta* 1543 (2000) 223-238.
- [21] **Beisson H., Ferte N., Bruley S., Vouloury R., Verger R., Arondel V.**, Oil bodies as substrates for lipolytic enzymes, *Biochim Biophys Acta* 1531: 47-58.
- [22] **Adlecreutz P., Gitlesen T., Read J., Vernonia**, lipase: a plant lipase with strong fatty acidselectivity, *Methode enzymol*, 284: (1997) 220-231.
- [23] **Hills M.J. & Mukherjee K.D.**, Triacylglycerol lipase from rape (*Brassica napus*) suitable for biotechnological purposes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 26, (1990), 1-10.
- [24] **Hassanien F., Mukherjee J.**, Isolation of lipase from germinating oilseed for biotechnological process, *JAM. Oil Chem. Soc.* 63: (1986) 893-897.
- [25] **Hills M., Kiewitt I. et Mukherjee K.**, Enzymatic fractionnement of evening primrose oil by rape lipase: enrichment of γ -linolenic acid. *Biotechnol. Lett*, 11, (1989), 629-632.
- [26] **Baba T., Down D., Jackson K. W., Tang J., Wang C.S.**, Structure of human milk bile salt activated lipase. *Biochemistry*, 30: (1991), 500-510.
- [27] **Warden C., Davis R., Yoon M., Hui D., Svenson K., Xia., Diep A., He K.,Lusis A.**, Chromosomal localization of lipolytic enzymes in the mouse: pancreatic lipase, colipase, hormone-sensitive lipase, hepatic lipase, and carboxyl ester lipase. *J. Lipid Res.*, 34, (1993), 1451-1455.
- [28] **Piamtongkam Rungtiwa**, Expression and evolution of lipases from *Candida rugosa* and *Yarrowia lipolytica* to modify their activities and specificities, (2010).

- [29] **Jegannathan, K. R.; Abang, S.; Poncelet, D.; Chan, E. S.; Ravindra, P.**, Production of biodiesel using immobilized lipase-a critical review. *Crit Rev Biotechnol* 28: (2008), (4), 253-64.
- [30] **Gupta R., N. Gupta, P. Rathi**, Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, *Appl Microbiol Biotechnol* (2004) 64: 763–781.
- [31] **Olis D., Cheah E., Cygler M., Dijkstre B., Frolow F., Franksen S.M., Harel M., Remington S., Sliman I.**, The Alfa/Beta hydrolase fold, *Protein Eng* 5, (1992), 197-211.
- [32] **Jaeger, K.E., Reetz, M.T.**, Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 16, issue 9, (1998), 396-403.
- [33] **Nardini Marco, Dietmar A. Lang, Klaus Liebeton, Karl-Erich Jaeger, and Bauke W. Dijkstra**, Crystal Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Lipase in the Open Conformation, *The journal of biological chemistry* Vol. 275, No.40 (2000), pp. 31219–31225.
- [34] **Brady L., Berzozowski A.M., Derewanda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolly S., Turkenburg J.P., Christiansen L.; Huges-Jensen B., Norscov L., Thim L., Menge U.**, A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase, *Nature* 343:(1990), 767-770.
- [35] **Gutierrez-Ayesta Cecilia, Amalia A. Carelli, Maria, L. Ferreira**, Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids, *Enzyme and Microbial Technology* (2007) 41: 35–43.
- [36] **Polaina Julio et MacCabe Andrew P.**, Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications, *Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands* (2007).
- [37] **Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K.**, Molecular basis for the chiral preference of lipases. *J. Am.Chem.Soc.* (1994), 116, 3180-3186.
- [38] **Ebrahimpour Afshin, Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman, Mahiran Basri, Abu Bakar Salleh**, High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM, *Bioresource Technology* 102 (2011) 6972–6981.
- [39] **Filice Marco, Teodora Bavaro, Roberto Fernandez-Lafuente, Massimo Pregnotato, Jose M. Guisan, Jose M. Palomo, Marco Terreni**, Chemo-biocatalytic regioselective one-pot synthesis of different deprotected monosaccharides, *Catalysis Today* 140 (2009) 11–18.
- [40] **Jaeger K.E. Ransac S., Dijkstra B., Colson C., Van Hunel M., Misset**, Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev*, 15, (1994), 29-63.
- [41] **Sanz L.C. et Olias J.M.**, Characterization of lupin seed lipase, *food chemistry*, 37: (1990), 221-228.
- [42] **Stocklein W., Sztajer H., Menge U. & Schmid R.**, Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1168, (1993). 181-189.

- [43] **Sonnet P., Foglia T. & Fearheller S.**, Fatty acid selection of lipase: erucic acid from rapeseed oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 70, (1993). 387-391.
- [44] **Egloff M.P., Ransacs., Marguet F., Rogalska A., Van Tilbeurgh H., Buono G., Cambillau C., Vergerr.**, Les lipases: cinétique, spécificité et aspect structuraux. *OCL 2* : 52-64.
- [45] **Ayten S., Nilay A.**, Sunflower seed lipase: Extraction, Purification and Characterization, *Flamwold 35*: (2005), 37-51.
- [46] **Engel L.**, Lipases: useful biocatalysts for enantioselective reactions of chiral flavor compounds. In: Teranishi R., Takeaka G.R. & Guntert M., eds. *Flavor precursors: thermal and enzymatic conversions*. ACS Symposium series 490. Washington, DC, USA: American Chemical Society, (1992). 20-31.
- [47] **Lutz D., Huffer M., Gerlach D., Schreier P.**, Carboxylester-lipase mediated reactions, a versatile route to chiral molecules. In: Flavor Precursors., Teranishi R., Takeoka G.R., Guntert M., eds. *ACS Symposium Series 490*, (1993) 33-45.
- [48] **Fernandez-Lorente Gloria, Jose M. Palomo, Jose M. Guisan, Roberto Fernandez-Lafuente**, Effect of the immobilization protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecitase® Ultra, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 47 (2007) 99–104.
- [49] **Cabrera Zaida, Gloria Fernandez-Lorente, Jose M. Palomo, Jose M. Guisana, Roberto Fernandez-Lafuente**, Asymmetric hydrolysis of dimethyl 3-phenylglutarate catalyzed by Lecitase Ultra® Effect of the immobilization protocol on its catalytic properties, *Enzyme and Microbial Technology* 43 (2008) 531–536.
- [50] **Barbosa Oveimar, Claudia Ortiz, Rodrigo Torres, Roberto Fernandez-Lafuente**, Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida Antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2011) 71: 124–132.
- [51] **Miletic´ Nemanja, Volker Abetz, Katrin Ebert, Katja Loos**, Immobilization of *Candida Antarctica* lipase B on Polystyrene Nanoparticles, *Macromol. Rapid Commun.* (2010), 31, 71–74.
- [52] **Seyhan F., L.M.M. Tijsskens, O. Evranuz**, Modelling temperature and pH dependence of lipase and peroxidase activity in Turkish hazelnuts, *Journal of Food Engineering* 52: (2002) 387–395.
- [53] **Rani C., A. Panneerselvam**, Influence of environmental and nutritional parameters on lipase production, *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, VOL.4, NO. 5, (2009)
- [54] **Crisalejandra Rivera-Pérez, M. de los Ángeles Navarrete del Toro, Fernando García-Carreño**, Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 158: (2011) 99-105.
- [55] **Song Jae Kwang et Joon Shick Rhee**, Simultaneous Enhancement of Thermostability and Catalytic Activity of Phospholipase A1 by Evolutionary Molecular Engineering, *Applied and environmental microbiology*, 66: (2000),890–894.

- [56] **Foresti M.L., M.L. Ferreira**, Analysis of the interaction of lipases with polypropylene of different structure and polypropylene-modified glass surface, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 294 (2007) 147–155.
- [57] **Sivozhelezov Victor, Debora Bruzzese, Laura Pastorinoa, Eugenia Pechkova, Claudio Nicolini**, Increase of catalytic activity of lipase towards olive oil by Langmuir-filmimmobilization of lipase, *Enzyme and Microbial Technology* 44 (2009) 72–76.
- [58] **Praphan Pinsiromdom and Kirk L. Parkin**, Lypolytic Enzymes, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (2001) C3.1.1-C3.1.13.
- [59] **Nicanuzia Janaina dos Prazeres, Juliana Aparecida Bortollotti Cruz, Gláucia Maria Pastore**, Characterization of alkaline lipase from fusarium oxysporum and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity, *Brazilian Journal of Microbiology* (2006) 37:505-509.
- [60] **Ozyilmaz Gul**, The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 56 (2009) 231–236.
- [61] **Angkanurukpun Porntippa, Pensiri Sriburi and Pawinee Kanasawud**, Improvement of Carica papaya Lipase for Methanolysis of Triolein, *Chiang Mai J. Sci.* (2006); 33(2) : 217-222.
- [62] **N.Saisuburamanyan, L. Krithika, K.P. Dileena, S. Sivasubramanian, et R. Puvanakrishnan**, Lipase assay in soils by copper soap colorimetry, *Analytical Biochemistry* 330: (2004) 70–73.
- [63] **Gang Hao, Lan Yang, Istvan Mazsaroff, et Melanie Lin**, Quantitative Determination of Lipase Activity by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom*, 18: (2007), 1579–1581.
- [64] **Da Silva Vania C. F., Fabiano J. Contesini and Patrícia de O. Carvalho**, Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study, *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 19, No. 8, (2008), 1468-1474.
- [65] **Sharma Rohit, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee**, Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnology Advances* 19: (2001) 627–662.
- [66] **Hasan Fariha, Aamer Ali Shah, Abdul Hameed**, Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology* (2006) 39: 235–251.
- [67] **Wang, H., Hou, W., Chi-Tang, H., Weng, X**, Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chemistry*. **97**, (2006) 661–665.
- [68] **Li Sheng-Feng, Yi-Hsuan Fan, Rong-Feng Hu, Wen-Teng Wu**, Pseudomonas cepacia lipase immobilized onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for biodiesel production from soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72: (2011) 40– 45.

- [69] **Öztürk Nevra, Sinan Akgöl, Münevver Arısoy, Adil Denizli**, Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres, *Separation and Purification Technology* 58 (2007) 83–90.
- [70] **Hasan Fariha, Aamer Ali Shah, Sundus Javed et Abdul Hameed**, Enzymes used in detergents: Lipases, *Review*, African Journal of Biotechnology, Vol. 9(31), (2010), 4836–4844.
- [71] **Shengdong Zhu, Yuanxin Wu, Ziniu Yu**, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on a pH-sensitive support for enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester, *Journal of Biotechnology* 116: (2005) 397–401.
- [72] **Zhang HY, Wang X, Ching CB, Wu JC.**, Experimental optimization of enzymic kinetic resolution of racemic flurbiprofen. *Biotechnol Appl Biochem* 42: (2005), 67–71.
- [73] **Bajpai P**, Application of enzymes in the pulp and paper industry, *Biotechnol Progr*, 15: (1999), 147–57.
- [74] **Katchalski-Katzir Ephraim, Dieter M. Kraemer**, Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10: (2000), 157–176.
- [75] **Gao Siliang, Yujun Wang, Xiang Diao, Guangsheng Luo, Youyuan Dai**, Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15, *Bioresource Technology* 101: (2010) 3830–3837.
- [76] **Perez Victor H., Grazielle S. da Silva, Fabricio M. Gomes, Heizir F. de Castro**, Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin, *Biochemical Engineering Journal* 34: (2007) 13–19.
- [77] **Sheldon Roger A.**, Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance, *Adv. Synth. Catal* 349: (2007), 1289 – 1307.
- [78] **Shafei, M. S., et Allam, R. F.**, Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum*, *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 6(2): (2010), 196–202.
- [79] **Knight Kirsty, Maria do Carmo Barros Pimentel, Marcia Maria Camargo de Moraes, William M. Ledingham, José Luiz de Lima Filho, Maria de Mascena Diniz Maia**, Immobilization Of Lipase From *Fusarium Solani* Fs1, *Brazilian Journal of Microbiology* 31: (2000) 220–222.
- [80] **Cruz-Ortiz Brenda Rogelina, Leopoldo Javier Ríos-González, Yolanda Garza García, José Antonio Rodríguez de la Garza, and Jesús Rodríguez-Martínez**, Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase in PVA-alginate Beads, *J. Mex. Chem. Soc.* (2011), 55(3), 176–180.
- [81] **Amorim R.V.S., E.S. Melo, M.G. Carneiro-da-Cunha, W.M. Ledingham, G.M. Campos-Takaki**, Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization, *Bioresource Technology* 89 (2003) 35–39.

- [82] **Xiao-Jun Huang, Dan Ge, Zhi-Kang Xu**, Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization, *European Polymer Journal* 43: (2007), 3710–3718.
- [83] **Shinji Sakai, Tetsu Yamaguchi, Rie Watanabe, Masaaki Kawabe, Koei Kawakami**, Enhanced catalytic activity of lipase in situ encapsulated in electrospun polystyrene fibers by subsequent water supply, *Catalysis Communications* 11: (2010) 576–580.
- [84] **Chien-Hung Liu, Jo-Shu Chang**, Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous Burkholderia sp. C20, *Bioresource Technology* 99: (2008) 1616–1622.
- [85] **Kenthorai Raman Jegannathan, Leong Jun-Yee, Eng-Seng Chan, Pogaku Ravindra**, Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in j-carrageenan, *Fuel* 89: (2010), 2272–2277.
- [86] **Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J.**, Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 9, issues 4-6, (2000), 113-148.
- [87] **Huang Xiao-Jun, An-Guo Yu, Zhi-Kang Xu**, Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application, *Bioresource Technology* 99: (2008) 5459–5465.
- [88] **Gülây Bayramoglu, Baki Hazer, Begum Altıntas, M. Yakup Arica**, Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis, *Process Biochemistry* 46: (2011) 372–378.
- [89] **Ye Peng, Zhi-Kang Xua, Ai-Fu Che, Jian Wu, Patrick Seta**, Chitosan-tethered poly (acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization, *Biomaterials* 26: (2005) 6394–6403.
- [90] **De Oliveira Pedro C., Gizelda M. Alves, Heizir F. de Castro**, Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene±divinylbenzene copolymer, *Biochemical Engineering Journal* 5: (2000) 63-71.
- [91] **Palomo José M, Gloria Muñoz, Gloria Fernández-Lorente, Cesar Mateo, Roberto Fernández-Lafuente**, Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl–Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases, José M. Guisán, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19–20 (2002) 279–286.
- [92] **Minovska Vilma, Eleonora Winkelhausen et Slobodan Kakuzmanova**, Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis, *J. Serb. Chem. Soc.* 70 (4): (2005), 609–624.
- [93] **Carneiro-Da-Cunha M.G., J.M.S. Rocha, J.M.S. Cabral, M.H. Jill, F.A.P. Garcia**, Covalent immobilization of lipase on different supports, *Latin American Applied Research*, 32: (2002), 69-72.

- [94] **Dalla-Vecchia Roberto, Damianni Sebrao, Maria da Graca Nascimento, Valdir Soldi**, Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization, *Process Biochemistry* 40: (2005) 2677–2682.
- [95] **Deng Hong-Tao, Zhi-Kang Xua, Zheng-Wei Dai, Jian Wu, Patrick Seta**, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on polypropylene microfiltration membrane modified by lycopolymer: hydrolysis of olive oil in biphasic bioreactor, *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2005) 996–1002.
- [96] **Yigitoglu Mustafa, Zulfikar Temoçin**, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66: (2010) 130–135.
- [97] **Pugazhenth G., Anil Kumar**, Enzyme membrane reactor for hydrolysis of olive oil using lipase immobilized on modified PMMA composite membrane, *Journal of Membrane Science* 228: (2004) 187–197.
- [98] **Yee L. N., Casimir C. Akoh, et Robert S. Phillips**, Lipase PS-Catalyzed Transesterification of Citronellyl Butyrate and Geranyl Caproate: Effect of Reaction Parameters, *JAACS* 74, (1997) 255–260.
- [99] **Yesim Yesiloglun**, Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Process Biochemistry* 40: (2005), 2155–2159.
- [100] **Knezevic Z., B. Obradovic**, Lipase Immobilization in a Hollow Fiber Membrane Reactor: Kinetics Characterization and Application for Palm Oil Hydrolysis, *Chem. Pap.* 58(6): (2004) 418-423.
- [101] **Shao-Hua Chiou, Wen-Teng Wu**, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials* 25: (2004), 197–204.
- [102] **Nasratun M., H.A. Said, A. Noraziah et A.N. Abd Alla**, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification Reaction, *American Journal of Applied Sciences* 6 (9): (2009), 1653-1657.
- [103] **Hong-Tao Deng, Zhi-Kang Xu, Jian Wu Peng Ye, Zhen-Mei Liu, Patrick Seta**, A comparative study on lipase immobilized polypropylene microfiltration membranes modified by sugar-containing polymer and polypeptide, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28 :(2004), 95–100.
- [104] **E.B. Pereira, G.M. Zanin et H.F. Castro**, Immobilization And Catalytic Properties Of Lipase On Chitosan For Hydrolysis And Esterification Reactions, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20: (2003), 343 – 355.
- [105] **Lo, Y.S. et Ibrahim, C.O.**, Some characteristics of Amberlite XAD-7 adsorbed lipase from *Pseudomonas* sp. AK, *Malaysian Journal of Microbiologie*, (1): (2005), 53-56.
- [106] **Chen Biqiang, Chunhua Yin, Yuanyuan Cheng, Weina Li, Zhu-an Cao, Tianwei Tan**, Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: The effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability, biomass and bioenergy : (2010), 1-8.

- [107] **Kharrat Nadia, Yassine Ben Ali, Sana Marzouk, Youssef-Talel Gargouri, Maha Karra-Châabouni**, Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme, *Process Biochemistry*, 46 :(2011), 1083–1089.
- [108] **Karra-Châabouni Maha, Ines Bouaziz, Sami Boufi, Ana Maria Botelho do Rego, Youssef Gargouri**, Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 66 : (2008) 168–177.
- [109] **Yilmaz Elif, Keziban Can, Mehmet Sezgin, Mustafa Yilmaz**, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for énantiosélective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester, *Bioresource Technology* 102 : (2011) 499–506.
- [110] **Roila Awang, Mohd Rafaei Ghazuli et Mahiran Basri**, Immobilization of Lipase from *Candida Rugosa* on Palm-Based Polyurethane Foam as a Support Material, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3 (3): (2007), 163-166.
- [111] **Miguel Cancino, Philippe Bauchart, Georgina Sandoval, Jean-Marc Nicaud, Isabelle André, Valérie Dossat, Alain Marty**, A variant of *Yarrowia lipolytica* lipase with improved activity and enantioselectivity for resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters, *Tetrahedron: symmetry* 19: (2008), 1608–1612.
- [112] **Ting W.J., K.Y. Tung, R. Giridhar, W.T. Wu**, Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 42 (2006) 32–38.
- [113] **Deniz Aktaş Uygun, M. Emin Çorman, Nevra Öztürk, Sinan Akgöl, Adil Denizli**, Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methacryloylamidotryptophane) nanospheres and their utilization as affinity adsorbents for porcine pancreas lipase adsorption, *Materials Science and Engineering C* 30: (2010) 1285–1290.
- [114] **Ji-Guo Yang, Yong-Hua Wang, Bo Yang, Geoffrey Mainda et Yong Guo**, Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (1): (2006), 101–104.
- [115] **Bilgili M.S.**, *J. Hazard. Mate*, (2006), 137- 157.
- [116] **Ho Y. S. et G. McKay**, *Chemical Engineering Journal*, 70(2): (1998), 115-124.
- [117] **Karla Aparecida Guimarães Gusmão, Leandro Vinícius Alves Gurgel, Tânia Márcia Sacramento Melo, Laurent Frédéric Gil**, Application of succinylated sugarcane bagasse as adsorbent to remove methylene blue and gentian violet from aqueous solutions e Kinetic and equilibrium studies, *Dyes and Pigments* 92: (2012), 967-974.
- [118] **Xiaoyan Yang et Bushra Al-Duri**, Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes on activated carbon, *Journal of Colloid and Interface Science* 287: (2005) 25–34.
- [119] **Abelson John N. et Simon Melvin I.**, METHODS IN ENZYMOLOGY, vol 463, édité par Richard R. Burgess et Murray P. Deutscher, Second edition (2009).

- [120] **Pinholt Charlotte, Mathias Fanø, Charlotte Wiberg, Susanne Hostrup, Jens Thostrup Bukrinsky, Sven Frokjaer, Willem Norde, Lene Jorgensen**, Influence of glycosylation on the adsorption of *Thermomyces lanuginosus* lipase to hydrophobic and hydrophilic surfaces, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40: (2010) 273–281.
- [121] **Barth Andreas**, Infrared spectroscopy of proteins, Review, *Biochimica et Biophysica Acta* 1767: (2007) 1073–1101.
- [122] **Macintyre, J.E., Daniel, F.M. et Stirling, V.M.**, Dictionary of Inorganic Compounds, 1st edition, Vol. 3, Chapman and Hall, London. (1992).
- [123] **Onder Aybastier, Cevdet Demir**, Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene–divinylbenzene copolymer using response surface methodology, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 63: (2010) 170–178.
- [124] **Oulad-Daoud Boukraa Fatima, Kaddour Samia et Tahar Sadoun**, Immobilization of *Aspergillus Niger* cellulose on ionic exchangers-isothermal and kinetic studies, *journal de la Société Algérienne de Chimie*,(2009) Vol.19, N°2.
- [125] **Hor Shee Yong, Beng Ti Tey, Siew Ling Hii, Siti Mazlina Mustapa Kamal, Arbakariya Ariff et Tau Chuan Ling**, Application of a high density adsorbent in expanded bed adsorption of lipase from *Burkholderia pseudomallei*, *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (2): (2010), 203-216.
- [126] **Shamel Marwan M., K.B. Ramachandran, Masitah Hasan, Sulaiman Al-Zuhair**, Hydrolysis of palm and olive oils by immobilized lipase using hollow fibre reactor, *Biochemical Engineering Journal* 34: (2007) 228–235.
- [127] **Yanjing Li, Guowei Zhou, Changjun Li, Dawei Qin, Wenting Qiao, Bo Chu**, Adsorption and catalytic activity of *Porcine pancreatic* lipase on rod-like SBA-15 mesoporous material, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 341 :(2009), 79–85.
- [128] **Rohman A., Che Man Y.B.**, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil, *Food Research International* 43: (2010) 886–892.
- [129] **Bayramoglu Gulay, Yasemin Kacar, Adil Denizli, M. Yakup Arica**, Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly (2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix, *Journal of Food Engineering* 52: (2002) 367–374.
- [130] **F. Kartal, A. Akkaya, A. Kilinc**, Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57 (2009) 55–61.
- [131] **Reis Pedro, Krister Holmberg, Reinhard Miller, Martin E. Leser, Thomas Raab, Heribert J. Watzke**, Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes, *C. R. Chimie* 12 (2009) 163-170.
- [132] **Ramani K., R. Boopathy, C. Vidya, L. John Kennedy, M. Velan, G. Sekaran**, Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil, *Process Biochemistry* 45: (2010) 986–992.

- [133] **Mishra M. K, Thenkrishnan Kumaraguru, Gurralla Sheelu, Nitin W. Fadnavis,** Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions, *Tetrahedron: Asymmetry* 20: (2009), 2854–2860.
- [134] **Ejedegba B. O., E. C. Onyeneke and P. O. Oviasogie,** Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocosnucifera* linn) seed under different nutrient treatments, *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (6),(2007),723-727.
- [135] **Wang Zhen-Gang, Jian-Qin Wang, Zhi-Kang Xu,** Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on electrospun polysulfone nanofibrous membranes by adsorption, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 42: (2006), 45–51.
- [136] **Jennens, M. L., et Lowe, M. E,** *J. Biol. Chem.* 269, (1994), 25470–25474.
- [137] **Bezzine, S., Ferrato, F., Ivanova, M. G., Lopez, V., Verger, R., et Carriere, F.** *Biochemistry* 38, (1999), 5499–5510.
- [138] **Thomas Annick, Maya Allouche, Frederic Basyn, Robert Brasseur, et Brigitte Kerfelec** Role of the Lid Hydrophobicity Pattern in Pancreatic Lipase Activity, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 280, N°. 48, (2005), 40074–40083.
- [139] **Abbas Houria, Louis Comeau,** Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp, *Enzyme and Microbial Technology*, 32: (2003), 589–595.
- [140] **Mendes Adriano A., Larissa Freitas, Ana Karine F. de Carvalho, Pedro C. de Oliveira, et Heizir F. de Castro,** Immobilization of a Commercial Lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by Different Strategies, SAGE-Hindawi Access to Research, *Enzyme Research Article*, (2011) , doi:10.4061/2011/967239.
- [141] **Mensah P, Carta G,** Adsorptive control of water in esterification with immobilized enzymes: continuous operation in a periodic counter-current reactor. *Biotechnol Bioeng* 66: (1999), 137-46.

ANNEXES

ANNEXE I : Nomenclature des lipases

Le composé transformé par une enzyme est nommé substrat et le composé obtenu est appelé produit. Le « Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) » régit la nomenclature et la classification des enzymes. La nomenclature EC (EC est le sigle de « Enzyme Commission numbers », la Commission des enzymes) est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. Toutes les enzymes actuellement connues sont répertoriées sous un numéro portant 4 nombres séparés par des points et précédés de EC soit (EC X₁.X₂.X₃.X₄). La signification des nombres est la suivante :

X1 : *Le premier nombre pouvant varier de 1 à 6 indique le type de réactions*

1 : *Oxydoréductases (transfert d'électrons, d'atomes d'hydrogène ou fixation d'oxygène).*

2 : *Transférases (transfert d'atomes ou de groupes d'atomes autres que ceux de 1).*

3 : *Hydrolases (Coupure des liaisons avec fixation de radicaux H et OH issus de l'eau).*

4 : *Lyases (Coupure des liaisons par d'autres modes autres que l'hydrolyse).*

5 : *Isomérases (réaction conservant la formule brute du composé).*

6 : *Ligases (formation des liaisons entre C et un autre métalloïde en utilisant l'énergie de l'ATP).*

X2 : *Le deuxième désigne la sous-classe de l'enzyme qui est définie suivant son mécanisme d'action.*

X3 : *Le 3ème nombre désigne la nature de la molécule qui sert d'accepteur, lorsqu'il s'agit d'un transfert d'électrons.*

X4 : *Le 4ème nombre est un numéro d'ordre dans le groupe et dans le sous-groupe.*

Par exemple : LES HYDROLASES DES LIPIDES

1. Hydrolases des triglycérides

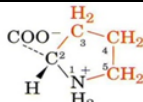
- a) - **Triglycéride lipase** : Triglycéride + H₂O $\frac{3}{4}$ \longrightarrow 2 Acides gras + 2-monoacylglycérol.
- b) - **Diglycérides lipase** : Diglycérides + H₂O $\frac{3}{4}$ \longrightarrow 2 Acides gras + glycérol.

2. Phospholipases : *ces enzymes hydrolysent les phospholipides. On distingue selon le site d'action de l'enzyme :*

- **Phospholipase A1 (3.1.1.32)** *enlève l'acide gras lié à la fonction alcool primaire du glycérol.*
- **Phospholipase A2 (3.1.1.4)** *enlève l'acide gras lié à la fonction alcool secondaire du glycérol*
- **Phospholipase C (3.1.1.4)** *intervient sur la fonction ester liant le glycérol et le phosphate.*
- **Phospholipase D (3.1.4.4.)** *sépare l'acide phosphatidique de l'alcool.*

ANNEXE II : Les Principaux Acides Aminés

La charge des protéines dépend des acides aminés (groupements R) et du pH du milieu. Les groupements R peuvent être acides, basiques ou aussi avoir une nature hydrophobe.

Nom Symbole en trois lettres Symbole en une lettre	Structure	Nom Symbole en trois lettres Symbole en une lettre	Structure
Acide Aminés à chaînes latérales non polaire			
Glycine Gly G	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Méthionine Met M	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Alanine Ala A	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Proline Pro P	
Valine Val V	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Phénylalanine Phe F	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Leucine Leu L	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Tryptophane Trp W	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Isoleucine Ile I	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$		
Acide Aminés à chaînes latérales polaire chargée			
Lysine Lys K	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Acide aspartique Asp D	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Histidine His H	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}^+ \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Acide Glutamique Glu E	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Arginine Arg R	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2)_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$		
Acide Aminés à chaînes latérales polaire non chargé			
Serine Ser S	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Asparagine Asn N	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Thréonine Thr T	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Glutamine Gln Q	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Tyrosine Tyr Y	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Cystéine Cys C	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

ANNEXE III : Structure des triacylglycérols ou triglycérides et définition du trou d'oxyanion

Une molécule de triacylglycérol est formée d'une molécule de glycérol (un alcool a trois carbonnes) et de trois acides gras, c'est un triester d'acides gras et de glycérol.

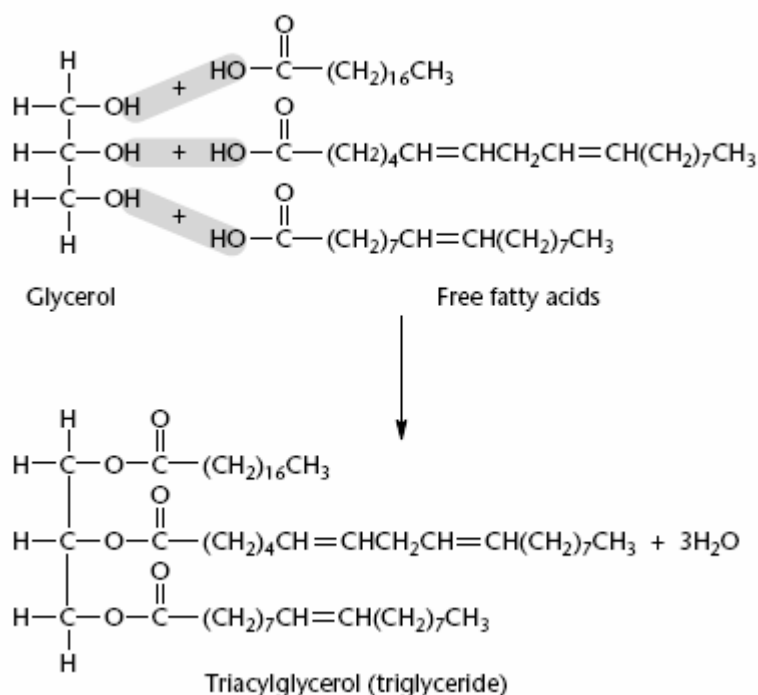


Figure 1 : Exemple d'une structure d'un triacylglycérol

Les acides gras sont des chaînes de carbone, en nombre pair, associées à des atomes d'hydrogène, avec un groupe méthyle à une extrémité et un groupe acide carboxylique à l'autre : $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-2}-\text{COOH}$ pour les acides gras saturés, les acides gras insaturés présentant une (monoinsaturés) ou plusieurs (polyinsaturés), une double liaison entre les atomes de carbone.

Le trou d'oxyanion

Le trou oxyanion est constitué de deux acides aminés dont les groupements amides stabilisent l'état de transition du substrat en formant avec celui-ci deux liaisons hydrogènes. Le premier de ces deux acides aminés est localisé dans le coude nucléophile, après la sérine catalytique. L'autre peut être un acide aminé placé après une glycine. (Fernandez-Lorente et al., 2008).

ANNEXE IV: Courbe d'étalonnage

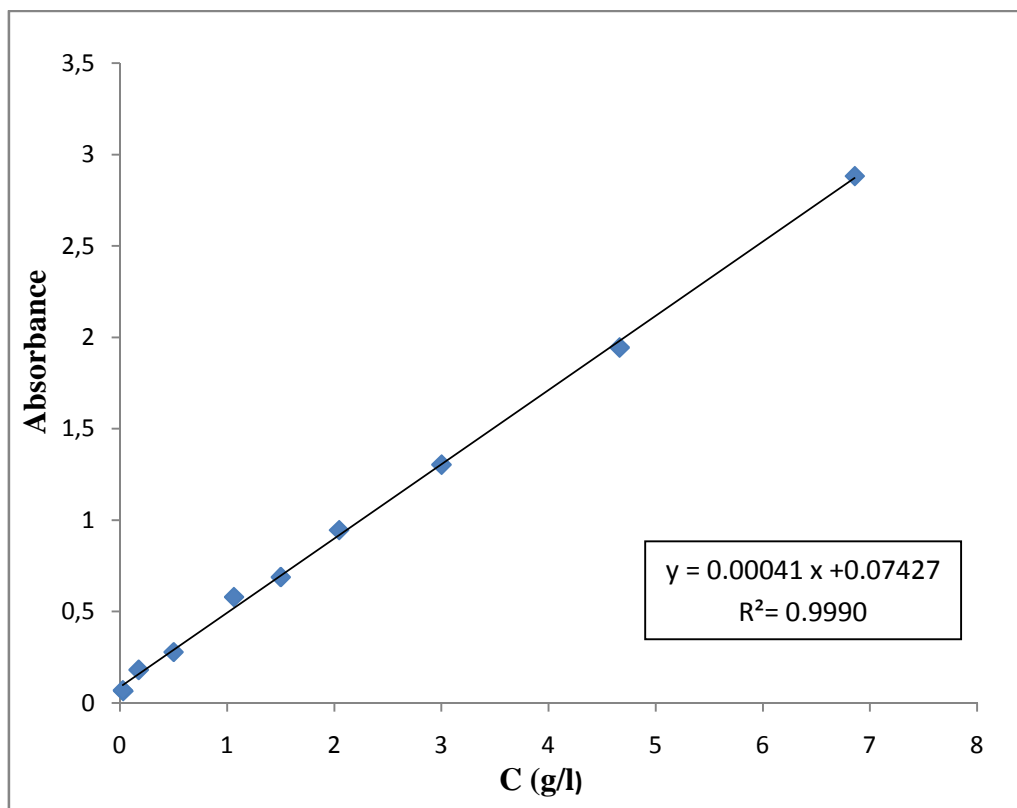
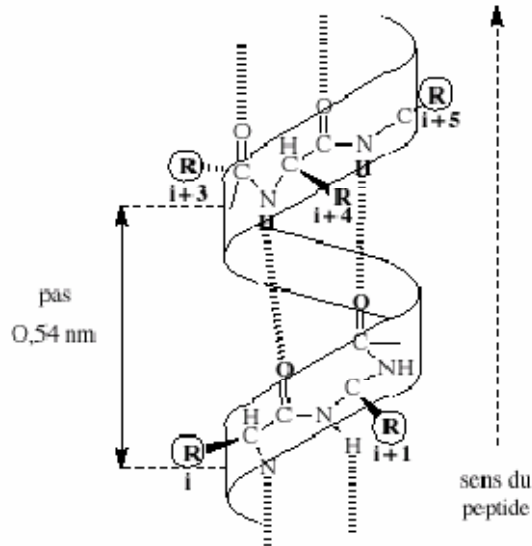


Figure 1: *Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines non liées sur les résines échangeuses d'ions.*

ANNEXE V: Structure des hélices α et feuillet β

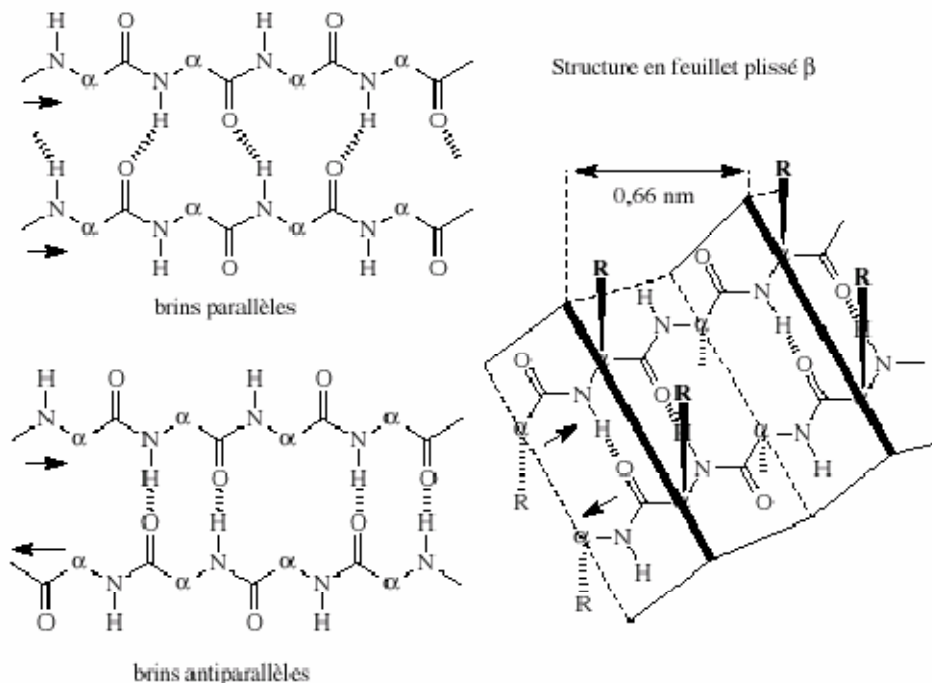
a) Structures en hélice α

L'hélice est l'une des deux grandes catégories de structures secondaires rencontrées dans les protéines. Les hélices sont caractérisées par le nombre d'acides aminés par tour d'hélice (n), par le pas de l'hélice c'est-à-dire la translation (en Å) par tour d'hélice (p), par la présence de liens H et par le couple φ/ψ . représente le type d'hélice le plus couramment rencontré qu'est l'hélice α de pas ($n = 3,6$ résidus ; $p = 5,41 \text{ Å}$; lien H entre l'oxygène du résidu n et l'azote du résidu $n + 4$; $\psi = -57^\circ$ et $\varphi = -47^\circ$).



b) Feuillet β

Les feuillets plissés β sont, après les hélices α , les structures les plus couramment rencontrées dans la nature. Les feuillets sont constitués de brins L qui sont reliés entre eux par des liens H entre le groupement $C=O$ d'un premier brin et le groupement $N-H$ d'un brin adjacent. Si les brins L sont orientés dans le même sens, on parle de feuillets β parallèles sinon, on parle de feuillets β antiparallèles.



ANNEXE VI: Cinétique d'adsorption de la lecitase®ultra immobilisée sur les résines échangeuse d'ions en fonction de la température.

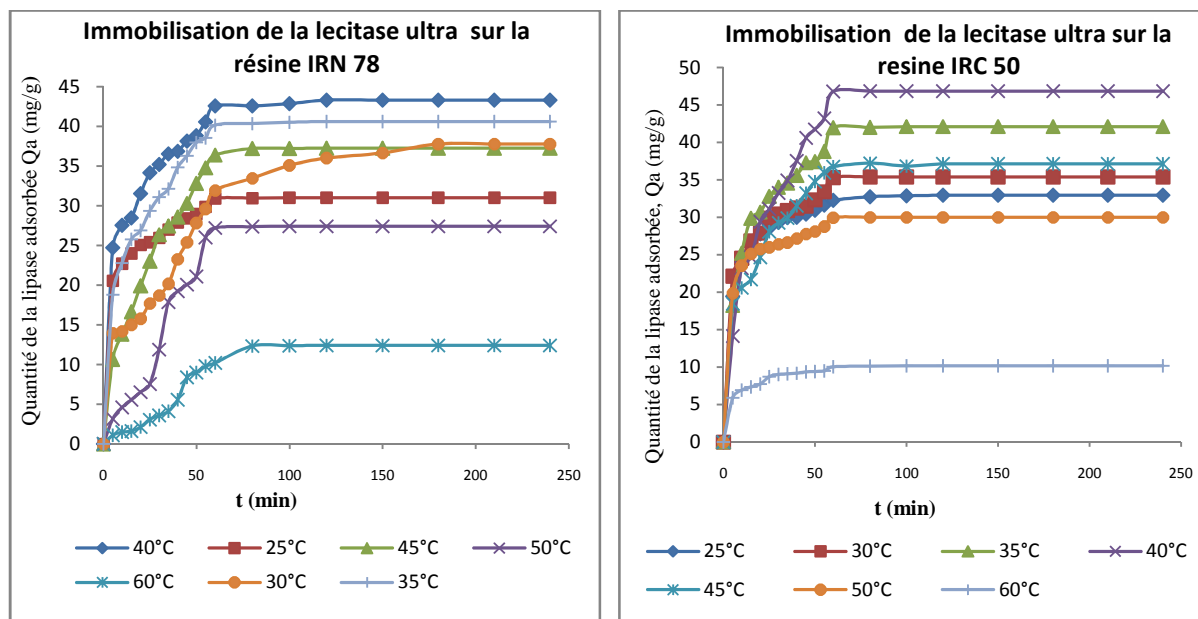


Tableau 1 : Cinétique d'adsorption de la lecitase ultra immobilisée sur la résine échangeuse d'anions en fonction de la température.

Temps (min)	Qa à 25°C	Qa à 30°C	Qa à 35°C	Qa à 40°C	Qa à 45°C	Qa à 50°C	Qa à 60°C
0	0	0	0	0	0	0	0
5	20,5806	13,964	18,7922	24,7304	10,6474	3,1352	1,0864
10	22,702	14,2192	22,7858	27,5612	13,8106	4,5986	1,4766
15	23,9892	14,99	25,7782	28,4794	16,6474	5,5742	1,623
20	25,1108	15,767	26,9126	31,5612	19,9108	6,55	2,1596
25	25,4032	17,7206	29,3836	34,1786	23,0376	7,526	3,0864
30	25,9884	18,7314	31,0864	35,225	26,3548	11,9158	3,5742
35	27,028	20,1596	32,1694	36,5328	27,4766	17,874	4,11
40	27,9108	23,2816	34,862	36,8644	28,6084	19,234	5,5742
45	28,4522	25,428	36,3254	38,1804	30,306	20,1108	8,3888
50	28,95	27,8180	38,0132	38,8418	32,844	21,0864	9,004
55	29,8936	29,594	38,5852	40,5704	34,7938	26,001	9,805
60	30,9426	31,9644	40,1924	42,5986	36,4044	27,247	10,2006
80	30,9888	33,4874	40,3976	42,6022	37,2202	27,3818	12,3554
100	31,011	35,0864	40,5488	42,8914	37,2362	27,4182	12,4006
120	31,011	36,0132	40,6132	43,316	37,2596	27,447	12,4386
150	31,011	36,6816	40,6132	43,316	37,2596	27,447	12,4386
180	31,011	37,8036	40,6132	43,316	37,2596	27,447	12,4386
210	31,011	37,8036	40,6132	43,316	37,2596	27,447	12,4386
240	31,011	37,8036	40,6132	43,316	37,2596	27,447	12,4386

Tableau 2 : Cinétique d'adsorption de la lecitase ultra immobilisée sur la résine échangeuse De cations en fonction de la température.

Temps (min)	Qa à 25°C	Qa à 30°C	Qa à 35°C	Qa à 40°C	Qa à 45°C	Qa à 50°C	Qa à 60°C
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5	19,4278	22,1107	18,2083	14,1107	18,4522	19,8668	5,8668
10	23,7204	24,5010	25,1839	23,1839	20,5985	23,5254	6,8912
15	26,1107	26,8912	29,8668	24,6473	21,7205	25,1351	7,3302
20	27,7693	27,9156	30,6961	29,3790	24,6473	25,7693	7,7205
25	28,5985	29,9156	32,7937	31,0863	28,0620	25,9644	8,6961
30	29,3302	30,4034	34,0132	33,2327	29,2815	26,4034	8,9888
35	29,9644	30,8912	34,5498	34,8912	29,9156	26,5985	9,0863
40	30,0132	31,2327	35,5741	37,5741	31,5254	27,1839	9,1839
45	30,4034	31,4766	37,2815	40,5985	33,1839	27,7693	9,3302
50	30,9400	32,3546	37,4278	41,7693	34,7937	28,1107	9,3790
55	31,6229	33,4278	38,7937	43,1839	35,9156	28,7449	9,4766
60	32,2571	35,2815	41,9644	46,7937	36,7449	29,9644	10,0132
80	32,7449	35,3790	42,0132	46,8424	37,2327	30,0132	10,1107
100	32,8424	35,3790	42,1107	46,8424	36,8424	30,0132	10,1595
120	32,9400	35,3790	42,1107	46,8424	37,1351	30,0132	10,1595
150	32,9400	35,3790	42,1107	46,8424	37,1351	30,0132	10,1595
180	32,9400	35,3790	42,1107	46,8424	37,1351	30,0132	10,1595
210	32,9400	35,3790	42,1107	46,8424	37,1351	30,0132	10,1595
240	32,9400	35,3790	42,1107	46,8424	37,1351	30,0132	10,1595

ANNEXE V II: Activité de la lecitase ultra immobilisée sur les résines échangeuses d'ions

Tableau 3 : *Activité en fonction du Temps de la lecitase ultra immobilisée sur les résines échangeuses d'ions à pH=5 et 50°C.*

<i>Temps (min)</i>	20	60	180	360	480	1140
<i>Activité de la lecitase ultra libre (U/ml)</i>	9840	7733,3	5991,1	5050	4081,7	1684,5
<i>Activité de la lecitase ultra immobilisée sur l'Amberlite IRC 50 (U/ml)</i>	9100	8990	8492	8390	7130	5680
<i>Activité de la lecitase ultra immobilisée sur l'Amberlite IRN78 (U/ml)</i>	6400	5700	5210	4170	4170	1960

Tableau 4: *Activité en fonction du nombre de cycles d'utilisation de la lecitase ultra immobilisée sur les résines échangeuses d'ions à pH=5 et 50°C.*

<i>Cycles</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Activité de la lecitase ultra immobilisée sur l'Amberlite IRC 50 (U/ml)</i>	9100	8900	8660	8040	6380	3550	2850	850
<i>Activité de la lecitase ultra immobilisée sur l'Amberlite IRN78 (U/ml)</i>	6400	3100	2100	860	250	0	0	0

RÉSUMÉ

Résumé :

L'immobilisation d'une enzyme commerciale, la Lecitase® Ultra une phospholipase fabriqué et mis sur le marché par Novozymes, Danemark, sur des résines échangeuses d'ions Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78 a été étudiée en solution aqueuse en utilisant une technique d'adsorption en batch en vue de son utilisation comme biocatalyseur pour l'hydrolyse de l'huile d'olive. L'enzyme a été immobilisé à différents pH, températures et concentrations initiales en enzyme. Des modèles d'isotherme d'adsorption de Langmuir et de Freundlich ont été appliqués pour décrire les isothermes d'équilibre, et les constantes d'isotherme ont été déterminées. On a constaté que l'immobilisation obéit au modèle de Langmuir. Les modèles cinétiques pseudo-premier-ordre et pseudo-second-ordre ont été employés pour décrire les données cinétiques qui prouvent que l'adsorption de la Lecitase® Ultra a suivi l'expression cinétique du second ordre pour les deux résines Amberlite IRN78 et Amberlite IRC 50. Les capacités maximum d'adsorption pour résine échangeuse d'ions Amberlite IRC 50 et Amberlite IRN 78 se sont avérées être 46,64 mg/g et 42,59 mg/g, et les taux d'adsorption sont de 78% et 71% respectivement. Un temps de contact de 1h est suffisants pour immobilisée la majeure partie de l'enzyme sur les deux résines. L'activité de la Lecitase® Ultra, libre et immobilisée a été étudiée. L'enzyme libre a un pH-optimum de 5, et une température optimale de 40°C. La température optimale de l'activité de la Lecitase® Ultra a été affectée par l'immobilisation, l'enzyme montre une bonne stabilité au-dessus de 50°C. La Lecitase® Ultra immobilisée sur l'Amberlite IRC 50 retient plus de 64% de son activité jusqu'à 5 cycles d'utilisation.

Mots clés : Lecitase® Ultra; lipase; Immobilisation; Isotherme d'adsorption; cinétique; Résine échangeuse d'ion.

Abstract:

Investigations were carried out in batch modes for studying the immobilization behavior of Lecitase® Ultra a phospholipase manufactured and marketed by Novozymes, Denmark, on an anionic and a cationic exchanging resin, Amberlite IRN 78 and Amberlite IRC 50 with a view to use them as a bioreactor for the hydrolysis of olive oil. The Lecitase® Ultra was immobilized onto the two supports at various concentrations, at different pHs and temperatures. The Langmuir and Freundlich adsorption isotherm models were applied to describe the equilibrium isotherms, and the isotherm constants were determined. It was found that Langmuir model was more suitable for our data. The pseudo-first-order and pseudo second-order kinetic models were used to describe the kinetic data which shows that the adsorption of the enzyme followed pseudo second order kinetic model both for the Amberlite IRC 50 and the Amberlite IRN 78. The capacities of adsorption for exchanging resins of ions Amberlite IRC 50 and Amberlite IRN 78 were 46.64 mg/g and 42.59 mg/g, and the rates of adsorption are 78% and 71% respectively. 1h of contact was sufficient to deposit most of the enzyme onto the resins. The activity of free and immobilized Lecitase® Ultra was studied. The enzyme has a, pH-optimum of 5, and an optimum temperature of 40°C. The optimum temperature of the activity of the Lecitase® Ultra was affected by immobilization, the enzyme displayed good stability over 50°C. The immobilized Lecitase® Ultra retained more than 64% activity up to 5 cycles on Amberlite IRC 50.

Key words: Lecitase® Ultra; lipase; Immobilization; Adsorption isotherm; Kinetic; Ion exchanging resin.

ملخص :

تُجرى بحال الدفعات لدراسة سلوك تثبيت إنزيم الليسيثاز Lecitase® Ultra الفوسفوليبيداز المصنوع والتسويق من قبل نوفوزيمز، دنمارك، على راتنجين متبادليتي الأيونات، Amberlite IRN 78 و Amberlite IRC 50 بهدف استخدامه كـ مفاعل حيوي لتفكيك زيت الزيتون. تم تثبيت إنزيم الليسيثاز على الدعامتين في تراكيز مختلفة، وفي درجات pH ودرجات حرارة مختلفة. تم تطبيق نماذج إيزوترم الامتزاز لانغمير وفروندليش لوصف إيزوترم التوازن، وتم تحديد ثوابت إيزوترم الامتزاز. لوحظ أن نموذج لانغمير هو الأنسب لبياناتنا. تم استخدام نماذج حركية الترتيب الأول والثاني الكاذب لوصف البيانات الحركية التي تظهر أن امتزاز الإنزيم اتبع نموذج حركية الترتيب الثاني الكاذب سواء على راتنج Amberlite IRC 50 أو راتنج Amberlite IRN 78. سعات الامتزاز للراتنجين المتبادليتي الأيونات Amberlite IRC 50 و Amberlite IRN 78 كانت 46.64 ملغم/غم و 42.59 ملغم/غم، ومعدلات الامتزاز 78% و 71% على التوالي. ساعة واحدة من الاتصال كافية ليدخل معظم الإنزيم على الراتنجين. تم دراسة نشاط الليسيثاز الحرة والتثبيت. إنزيم الليسيثاز الحرة له pH أمثل 5، ودرجة حرارة أمثل 40°C. درجة الحرارة الأمثل لنشاط الليسيثاز Ultra تتأثر بالتثبيت، إنزيم الليسيثاز Ultra أظهرت ثباتاً جيداً فوق 50°C. إنزيم الليسيثاز Ultra المثبت على Amberlite IRC 50 احتفظ بأكثر من 64% من نشاطه حتى 5 دورات على Amberlite IRC 50.