

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel



Faculté des Sciences

Département du Biologie cellulaire et Moléculaire

MB 22/08

02
02

Mémoire

De fin d'Études en vue de l'obtention du Diplôme
d'Étude Supérieur (D.E.S)

Option : Microbiologie

Thème

Les applications industrielles des lipases microbiennes

Membre de jury :

Encadreur : Dr. Sifour M^{ed}

Examineur : M^{ed} Akroum S.



Présenté par:

Laouaoudja wafa

Kahili rima

Kerada yamina



Promotion Juin :2008



Remerciements:

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le Tout-puissant, qui nous a aidé à réaliser ce travail.

Nous voudrions exprimer notre profonde reconnaissance à tous ceux qui ont consacré de leur temps pour nous apporter aide et connaissance durant toute la durée de ce travail, commençons par notre encadreur: Dr. MOHAMMED SIFOUR, nous sommes très reconnaissantes envers lui pour son aide, ses conseils, sa compétence et sa présence en tout moment.

Nous remercions vigoureusement Melle. AKROUM S. d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous exprimons toute notre gratitude à tous les professeurs de notre institut.

En fin, nous remercions profondément nos précieuses familles et nos chères amies à la fois pour leur soutien infatigable, leur patience admirable et leur affection continuelle.



SOMMAIRE

I. Introduction	1
II. Définition, source et classification des lipases.....	2
II-1-Définition des lipases	2
II-2-Définition des réaction d'hydrolyse.....	2
II-3- définition des réaction de synthèse	2
II-3-1- la transestérification	2
II-3-2- l'interectérification	3
II-3-3- la synthèse d'ester	3
II -4- Sources des lipases	5
II-5- classification	7
II-6- les méthodes de détection des microorganismes lipolytiques...	10
III- Les facteurs affectant la production des lipases.....	12
III-1- Effet de carbone	12
III-2- Effet d'azote	12
III-3- Effet des ions	13
III-4-Autres effets	13
IV- Méthodes de purification et caractères des lipases	16
IV-1- Méthodes de purification	16
IV-1-1- Membrane processus	17
IV-1-2- Immunopurification	17
IV-1-3- Le système de deux phases aqueuse	17
IV-2- Caractères des lipases	17
IV-2-1- Effet de PH	17
IV-2-2- Effet de température	18
IV-2-3- Effet des ions métalliques	18
IV-2-4- Stabilité dans les solvants organiques	19
IV-2-5- Spécificité des lipases	19
IV-2- 6- les inhibiteurs des lipases	20
V- Lipases et les biotechnologies moléculaires	21
VI- Applications industrielles des lipase microbiennes	23

VI-1- L'utilisation des lipases dans les graisses et les produits oléo chimiques	23
VI-2- La production des polymères biodégradables.....	23
VI-3- Les lipases dans l'industrie des détergents.....	23
VI-4- Les lipases dans l'industrie des aliments et l'amélioration de la qualité.....	24
VI-5- Industrie de pulpe et papier.....	24
VI-6- Cosmétique.....	24
VI-7- L'utilisation des lipases dans la production de biodiesel.....	25
VI-8- Les applications médicales, pharmaceutiques et diagnostiques.....	25
VI-9- Traitement des eaux usées et des déchets.....	25
VI-10- Applications dans l'industrie des textiles.....	26
VI-11- Industrie de cuir.....	26
VII- Conclusion	29
Références	30
Glossaire	

Liste des tableaux

<i>Tableau 1</i> : représente les sources des lipases microbiennes.....	6
<i>Tableau 2</i> : Classification des enzymes lipolytiques.....	9
<i>Tableau 3</i> : Population productrice des lipases dans le sol.....	10
<i>Tableau 4</i> : Quelques conditions culturelles qui influence sur la production des lipases...	15
<i>Tableau 5</i> : Exemples de quelques lipases commerciales.....	27

Liste des figures

<i>Fig. 1:</i> Réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase en milieux aqueux.....	2
<i>Fig. 2:</i> Différents types de réaction de synthèse catalysée par les lipases en milieux aqueux.....	3
<i>Fig. 3:</i> La structure tridimensionnelle d'une lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Fig. 4:</i> Production des lipases par les microorganismes de sol dans des milieux sélectifs.....	11
<i>Fig. 5:</i> Les effets des différents sucres et alcools sur la production des lipases par <i>Bacillus sp.</i>	14

Abréviation:

ADN: Acide Desoxyribonucléique

PCR: Polymerase Chain Reaction

KDa: kilo Dalton

U/ml: unite par millilitre

mM: milli Mole

Ala: Alanine

Gly: Glycine

Ser: Serine

sn: Substitution nucléophile

INTRODUCTION

I. Introduction :

Lorsqu'au 19^{ème} siècle, Payen découvrit la diastase (1833) et Claud Bernard la lipase pancréatique (1856), nul ne pouvait imaginer qu'il s'agissait des premiers maillons d'une famille de biocatalyseurs susceptibles d'entraîner une révolution technologique 150ans plus tard [1].

Les enzymes sont considérées comme catalyseurs de la nature, la plupart de ces enzymes aujourd'hui sont produites par la fermentation (Hasan et al., 2006).

C'est en effet la connaissance et la maîtrise scientifique des fermentations qu'a progressivement fait concevoir l'intérêt d'utiliser non plus le microorganisme entier mais seulement son principe actif pour réaliser une transformation définie d'un substrat biochimique. Depuis deux décennies, l'emploi des enzymes a connu un succès remarquable et entrouvre des perspectives étonnantes, c'est un nombre de procédés classés comme "biotechnologie" qui reposent sur une exploitation des propriétés particulières, de ces mécanismes réactionnels [1].

De nouvelles industries n'ont vu le jour que grâce à la mise sur le marché d'enzymes purifiées; il en est de même pour les techniques de détection et d'analyses dont le principe utilise la sensibilité et la spécificité enzymatique considérant que ces enzymes ne doivent contenir ni substance, ni microorganisme, ni activité enzymatique pouvant être nuisible à la santé et à la qualité des produits élaborés ou conduire à la formation de produits indésirables [2].

Généralement les enzymes microbiennes sont plus utiles que les enzymes d'origine animale à cause de leurs grande variété d'activités catalytiques, le rendement élevé, la facilité de manipulations génétiques, la disponibilité régulière due à l'absence des fluctuations saisonnières et la croissance rapide des microorganismes sur des milieux peu coûteux (Joseph et al., 2007). Seulement environ 2% des microorganismes du monde ont été examinés comme sources d'enzymes, mais on peut dire que maintenant les enzymes microbiennes ont gagné une place importante dans le monde industriel et analytique (Hasan et al., 2006).

Dans ce travail on va voir l'application et le rôle des lipases dans de nombreux secteurs tels que les industries alimentaires, détergents, produits pharmaceutiques et cosmétologiques...etc.

définition, source et classification des lipases

II. Définition, source et classification des lipases :

Les enzymes hydrolysant les triglycérides ont été bien étudiées de puis 300 années et la capacité de lipases de catalyser l'hydrolyse et ainsi la synthèse des esters a été reconnue presque de puis 70 années.

En 1856 Claud Bernard découvrit pour la première fois une lipase dans le suc pancréatique, c'est une enzyme capable d'hydrolyser les gouttelettes d'huile insolubles et les convertit en produits solubles (Hasan et al., 2006).

II.1. Définition des lipases :

Les lipases appelées aussi les triacylglycérol acyl hydrolases (E.C :3.1.1.3) sont un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des triacylglycérols en diacylglycérols, monoacylglycérols, glycérol et acides gras à l'interface entre l'eau et le lipide (Ko et al., 2005).

Les lipases ont généralement la capacité de réaliser des réactions de synthèse telles que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool), et l'interestérification (ester et ester) ainsi que dans les réactions de transfert du groupement acétyl d'un ester sur d'autres nucléophiles tels que les amines ou les thiols (Alloue et al., 2008).

II.2. Définition des réactions d'hydrolyse par les lipases :

Les lipases sont des hydrolases qui agissent dans des conditions aqueuses sur les liaisons de carboxylester présentes dans le triacylglycérol pour libérer les acides gras et le glycérol (Gupta et al., 2004a). L'hydrolyse permet la production d'acides gras pouvant être convertis en alcool gras ou employés dans des réactions d'estérification ou de transestérification (Fig. 1) (Alloue et al., 2008).

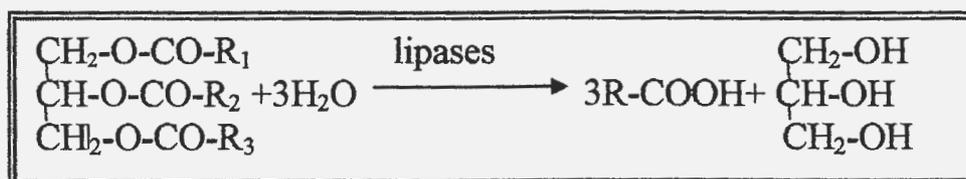


Fig. 1: Réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase en milieu aqueux

II.3. Définition des réactions de synthèse :

Il a été bien démontré que les hydrolases telles que les lipases catalysent les réactions inverses de leurs réactions hydrolytiques à l'aide d'un biocatalyseur, c'est les réactions d'estérification, transestérification et interestérification (Zhao et al., 2007).

II.3.1. La transestérification :

Implique la réaction d'un groupe acyle avec un alcool (alcoolyse) ou avec le glycérol (glycérolyse) (Alloue et al., 2008). Il existe plusieurs applications industrielles

de la transestérification par la lipase, telle que la production des équivalents du beurre de cacao qui sont des lipides riches en acides gras polyinsaturés (Hasan et al., 2006).

II.3.2. L'interestérification :

Lors de cette réaction, un groupe acyle est transféré à un acide gras (acidolyse) ou à un ester d'acide gras. Certaines huiles végétales comme l'huile de palme et d'amande douce présentent des limites d'application à cause de leurs teneurs élevées en acides gras saturés qui sont associés aux maladies cardiovasculaires; pour élargir leur utilisation commerciale, ces huiles peuvent être modifiées physiquement, chimiquement ou par traitement enzymatique (interestérification). De telles modification des huiles permettent également aux industriels de répondre à la demande des consommateurs en produits sains (Fig. 2) (Alloue et al., 2008).

II.3.3. La synthèse d'ester :

Les lipases sont bien utilisées comme des catalyseurs pour la synthèse des esters. Des esters ont été synthétisés à partir d'acides gras à courte chaîne à fin de servir dans l'industrie alimentaire comme des agents de flaveur. Le méthyle et l'éthyle esters des acides gras à longue chaîne ont été utilisés pour l'enrichissement de Biodiesel. (Sharma et al., 2001).

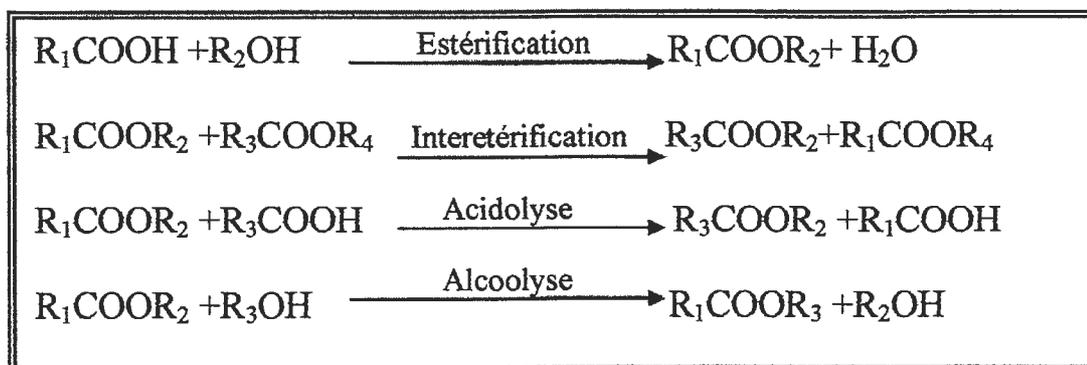


Fig. 2: Différents types de réactions de synthèse catalysées par les lipases en milieux aqueux (Houde et al., 2004)

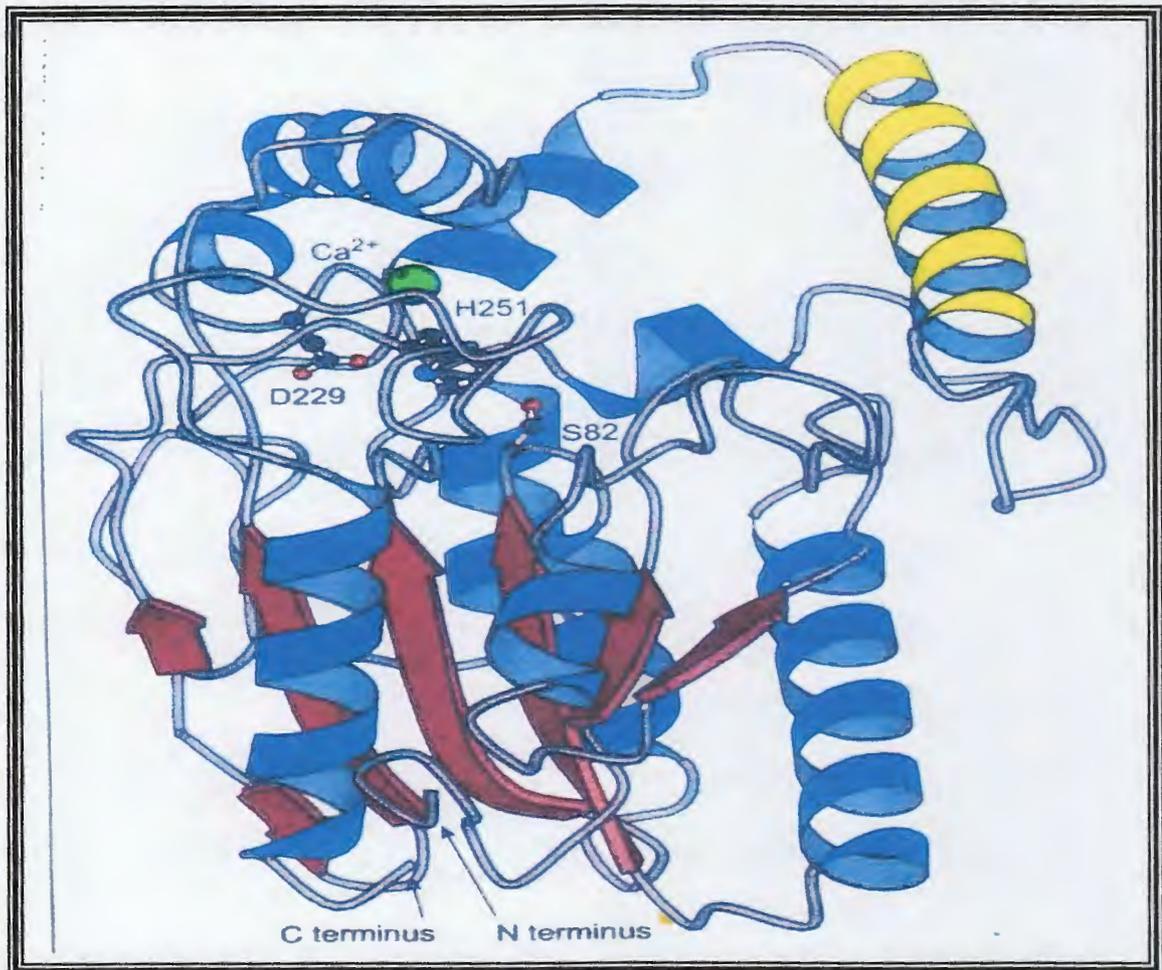


Fig. 3 : La structure tridimensionnelle d'une lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger & Reetz, 1998)

II.4. Source des lipases :

Les lipases sont des enzymes ubiquistes dans la nature et se trouvent dans les plantes, les animaux et les microorganismes (Gupta et al., 2004a; Gilham & Lehner, 2005). Plusieurs lipases ont été commercialement produites et la majorité de ces enzymes sont d'origine bactérienne ou fongique (Jaeger & Reetz, 1998). Ces enzymes représentent la classe la plus utilisée en applications biotechnologique et dans la chimie organique. Les lipases microbiennes extracellulaires ont une importance commerciale considérable, parce que leur production est beaucoup plus facile. Bien que plusieurs sources bactériennes de lipase sont disponibles, seulement quelques espèces sont exploitées en commerce ; parmi ces bactéries les plus importantes sont: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium* et surtout *Pseudomonas* qui est le genre le plus utilisé en biotechnologie (Gupta et al., 2004a). Une liste de plus courants microorganismes producteurs des lipases est présentée dans le **Tableau 1**.

Il faut noter qu'il existe une confusion concernant l'origine des lipases, résultées par les changements des noms systématiques des bactéries et des champignons qui produisent ces enzymes: autrefois, *Candida rugosa* a été appelée *Candida cylindracea*, *Pseudomonas glumae* et *Pseudomonas cepacia* ont été renommées *Burkholderia glumae* et *Burkholderia cepacia*. En outre la lipase de *Burkholderia glumae* est identique à celle de *Chromobacterium viscosum* (Jaeger & Reetz, 1998).

Tableau 1 : représente les sources des lipases microbiennes

Microorganismes	Références
<u>bactéries</u>	
<i>Achromobacter sp.</i>	Gupta et al., 2004a
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	Joseph et al., 2007
<i>Acinetobacter sp.</i>	Gupta et al., 2004a
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Eltaweel et al., 2005
<i>Aeromonas</i>	Hasan et al., 2006
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Joseph et al., 2007
<i>Bacillus sp</i>	Eltweel et al., 2005
<i>Bacillus coagulans</i>	Kumar et al., 2005
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bayoumi et al., 2007
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Kambourova et al., 2003
<i>Bacillus subtilis</i>	Ewis et al., 2004
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	Rùa et al., 1998
<i>Burkholderia cepacia</i>	Jaeger & Reetz, 1998
<i>Burkholderia glumae</i>	Houde et al., 2004
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Gupta et al., 2004a
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Arpigny & Jaeger, 1999
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gupta et al., 2004a
<i>Geobacillus sp.</i>	Abdel-Fattah, 2002
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gupta et al., 2004a
<i>Moraxella</i>	Arpigny & Jaeger, 1999
<i>Propionibacterium acnes</i>	Hasan et al., 2006
<i>Proteus vulgaris</i>	Arpigny & Jaeger, 1999
<i>Pseudomonas</i>	Saeed et al., 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Jaeger et al., 1999
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sinchaikul et al., 2001
<i>Pseudomonas fragi</i>	Arpigny & Jaeger, 1999
<i>Psychrobacter immobilis</i>	Gupta et al., 2004a
<i>Serratia marcescens</i>	Houde et al., 2004
<i>Staphylococcus</i>	Sunna et al., 2002
<i>Staphylococcus aureus</i>	Eltaweel et al., 2005
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Jaeger & Eggert, 2002
<i>Streptomyces</i>	Jaeger et al., 1999
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	Gupta et al., 2004a
<i>Thermus thermophilus</i>	Dominguez et al., 2005; Fuciños et al., 2005
<i>Vibrio cholerae</i>	Arpigny & Jaeger, 1999
<u>Champignons</u>	
<i>Aspergillus carneus</i>	Koblitz & Pastore, 2006
<i>Aspergillus niger</i>	Sharma et al., 2001
<i>Aspergillus oryzae</i>	Alloue et al., 2008
<i>Mucor hiemalis</i>	Koblitz & Pastore, 2006
<i>Mucor javanicus</i>	Scriban, 1999
<i>Mucor miehei</i>	Laboret & Perraud, 1999
<i>Penicillium camembertii</i>	Koblitz & Pastore, 2006
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ferrer et al., 2000
<i>Penicillium roquefortii</i>	Joseph et al., 2007
<i>Rhizopus sp.</i>	Koblitz & Pastore, 2006
<i>Rhizopus nodosus</i>	Hasan et al., 2006
<i>Rhizopus oryzae</i>	Jaeger & Eggert, 2002
<i>Rhizomucor miehei</i>	Alloue et al., 2008
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Mir, 2004
<i>Candida</i>	Arpigny & Jaeger, 1999
<i>Candida antarctica</i>	Sunna et al., 2002
<i>Candida lipolytica</i>	Scriban, 1999
<i>Candida rugosa</i>	Fadiloğlu & Erkmén, 2002; Alloue et al., 2008
<i>Geotrichum</i>	Ginalska et al., 2007
<i>Geotrichum candidum</i>	Vakhlu & Kour, 2006
<i>Trichoderma viride</i>	Kashmiri et al., 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lanciotti et al., 2005

II.5. Classification des lipases :

Les bactéries produisent des classes différentes d'enzymes lipolytiques, y compris des carboxylestérases (EC: 3.1.1.1) qui hydrolysent les esters de petite taille qui sont partiellement solubles dans l'eau (Arpigny & Jaeger, 1999).

Les estérases qui hydrolysent les longues chaînes d'acylglycérols sont appelées «lipases» (EC : 3.1.1.3) et elles peuvent être considérées comme des enzymes lipolytiques et estérolytique (Gilham & Lehner, 2005). Notre connaissance de la structure des lipases et des estérases est augmentée dans ces dernières années par l'élucidation de séquences des gènes et la résolution des nombreuses structures cristallisées (Arpigny & Jaeger, 1999). La comparaison entre les carboxylestérases et les lipases révèle une grande similarité malgré la grande différence des spécificités aux substrats ou les fonctions physiologiques (Gilham & Lehner, 2005).

Les lipases bactériennes sont classées dans huit familles basées sur les motifs des séquences conservées et les propriétés biologiques. Pendant ce temps, plusieurs modifications ont été rajoutées sur cette classification.

1. Famille I: les vraies lipases :

Une vraie lipase est définie comme une carboxylestérase qui catalyse l'hydrolyse et la synthèse des longues chaînes d'acylglycérols à partir de triglycéride (Jaeger & Eggert, 2002). Autrefois, les vraies lipases étaient appelées lipases de *Pseudomonas* groupe 1, 2 et 3 parce que les lipases du genre *Pseudomonas* ont été probablement les premières à être étudiées et elles ont une grande importance en industrie.

Les lipases de *Burkholderia glumae* ont été les seules lipases qui ont une structure tridimensionnelle connue, jusqu'à la publication de la structure cristallisée des lipases de *Chromobacterium viscosum* et *Burkholderia cepacia* (Arpigny & Jaeger, 1999). A cause de la diversité des origines des vraies lipases, cette famille est encore divisée en septes sous-familles (**Tableau 2**) (Jaeger & Eggert, 2002).

2. Famille II :

Cette famille comprend l'estérase de *Streptomyces scabies*, à cause de la similarité avec l'estérase d'*Aeromonas hydrophila*. Le centre catalytique de l'estérase de *Streptomyces scabies* a une particularité architecturale, ce qui forme une dyade catalytique au lieu d'une triade (Arpigny & Jaeger, 1999).

3. Famille III :

Cette famille a été identifiée premièrement par Gruz et al. et mentionnée par Wel et al., qui ont été démontré la structure tridimensionnelle de la lipase de *Streptomyces exfoliatus* (Arpigny & Jaeger, 1999).

4. Famille IV: la lipase hormone -sensible (LHS)

Plusieurs enzymes bactériennes montrent une grande similarité de séquence d'acides aminés avec les LHS des mammifères. Une comparaison de ces enzymes sera donc très importante pour déterminer les propriétés distinctives de cette famille (Arpigny & Jaeger, 1999).

5. Famille V :

L'origine des enzymes regroupées dans la famille V est les bactéries mésophiles (*Pseudomonas aleovorans*) ou bien les bactéries psychrotolérantes (*Moraxella sp.*) ou thermotolérantes (*Sufolebus acidocaldarius*) (Arpigny & Jaeger, 1999).

6. Famille VI :

Les enzymes représentées dans cette famille sont parmi les plus petites estérases connues avec une masse moléculaire entre 23-26KDa. La structure tridimensionnelle de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* est résolue (Arpigny & Jaeger, 1999).

7. Famille VII :

Plusieurs estérases bactériennes de grande taille (55KDa) impliquent des séquences d'acides aminées homogènes avec l'acétylcholine estérase des eucaryotes et la carboxylestérase des intestins et du foie. L'estérase d'*Arthrobacter oxydans* est particulièrement active contre «l'herbicide phenylcarbamate» par l'hydrolyse de sa liaison carbamate centrale (Arpigny & Jaeger, 1999).

8. Famille VIII :

On a besoin de beaucoup plus d'information sur la structure pour décrire le mécanisme catalytique de cette famille (Arpigny & Jaeger, 1999).

Tableau 2: Classification des enzymes lipolytiques selon Arpigny J. L. et Jaeger K. E (1999) avec la modification de Jaeger K. E. et Eggert T. (2002).

Famille	Sous-famille	Souche productrice d'enzyme	Accession no	Similarité (%)		Propriétés	
				Famille	Sous-famille		
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipA)*	D50587	100		Vraies lipases	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95			
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57			
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipC)	U75975	51			
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43			
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40			
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39			
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38			
		2	<i>Burkholderia glumae</i> *	X70354	35		100
			<i>Chromobacterium viscosum</i> *	Q05489	35		100
			<i>Burkholderia cepacia</i> *	M58494	33		78
	<i>Pseudomonas luteola</i>		AF050153	33	77		
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIKW1	D11455	14	100		
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51		
	4	<i>Bacillus subtilis</i> (LipA)*	M74010	16	100		
		<i>Bacillus pumilus</i> 13 80	A34992	13	100		
		<i>Bacillus licheniformis</i>	U35855	13	80		
		<i>Bacillus subtilis</i> (LipB)	C69652	17	74		
	5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> L1	U78785	15	100		
		<i>Geobacillus stearothermophilus</i> P1	AF237623	15	94		
		<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94		
		<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	AF134840	14	92		
	6	<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	100		
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AF096928	15	45		
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	44		
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	36		
		<i>Staphylococcus xylosum</i>	AF208229	14	36		
		<i>Staphylococcus warneri</i>	AF208033	12	36		
7		<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100		
	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	U80063	14	50			
II (GDSL)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100		Acyltransferase sécrétée		
	<i>Streptomyces scabies</i> *	M57297	36		Estérase sécrétée		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35		Estérase liaison-OM		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28		Estérase liaison-OM		
III	<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379	28		Estérase sécrétée		
	<i>Streptomyces exfoliatus</i> *	M86351	100		Lipase extracellulaire		
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82		Lipase extracellulaire		
IV (HSL)	<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33		Estérase extracellulaire 1		
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100		Estérase		
	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	54		Lipase		
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48		Carboxylestérase		
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40		Lipase putative		
	<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36		Carboxylestérase		
	<i>Moraxella</i> sp.	X53868	25		Estérase extracellulaire 2		
	V	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100		PHA-dépolymérase	
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		Estérase putative	
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		Estérase extracellulaire	
<i>Moraxella</i> sp.		X53869	34		Estérase extracellulaire 3		
VI	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32		Estérase		
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	20		Estérase		
	<i>Synechocystis</i> sp.	D90904	100		Carboxylestérase		
	<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50				
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> *	S79600	24				
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20				
VII	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16				
	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100		Carbamate hydrolase		
	<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48		<i>p</i> -Nitrobenzyl estérase		
VIII	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45		Carboxylestérase putative		
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492	100		Estérase stéréosélective		
	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43		Cellule-liaison estérase		
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	AAC60471	40		Estérase III		

* Enzymes lipolytiques avec une structure tridimensionnelle connue

II.6. Les méthodes de détection des microorganismes lipolytiques :

Certains microorganismes sont capables de produire des lipases extracellulaires et puisque le sol est un réservoir d'une grande et diverse population microbienne, on étudie la capacité de ces microorganismes de produire les lipases (Ko et al., 2005).

Des milliers d'échantillons microbiens isolés à partir du sol testés par criblage ou par des milieux de culture solides et liquides, démontrent que 20% sont des producteurs de lipases (Jaeger & Eggert, 2002). Les géloses contenant 0.05, 0.1, 0.2% d'huile de tournesol sont utilisées pour déterminer la concentration optimale de l'huile pour détecter la production des lipases. L'incubation se fait à une température de 24°C pendant 7 jours et on observe sur la gélose des zones claires résultant de l'activité lipolytique, ces zones claires sont beaucoup plus nettes sur la gélose contenant 0.1% d'huile de tournesol que les géloses de 0.2 et 0.05% d'huile.

La population microbienne la plus productrice des lipases est celle des actinomycètes suivie par les bactéries et les champignons (**Tableau 3**) (Ko et al., 2005).

Tableau 3: Populations productrices des lipases dans le sol: 10⁶ colonies /g sol

Microorganismes	Totale	production de lipase
Actinomycètes	57.2	32.0
Bactéries	129.8	11.0
Champignons	4.3	1.0

L'activité lipasique (estérasique) peut être décelée aussi de plusieurs façons :

- un milieu gélosé (milieu de sierra) au Tween 80 (oléate de sorbitol) est coulé en boîte de Pétri et ensemencé par touche. Après incubation, l'activité lipasique se traduit par un halo-opaque autour des colonies dues à la précipitation d'oléate de calcium.
- un milieu gélosé est additionné d'huile d'olive et stérilisé avant de la couler en boîte, on ajoute 0.006% de bleu Victoria (Victoria bleu agar). La boîte est ensemencée par touches. La lipolyse se traduit par apparition d'un précipité bleu dû aux sels d'acides gras.
- il est possible d'utiliser également de la gélose à la tributyrine en boîte de Pétri. L'hydrolyse se manifeste par l'éclaircissement du milieu. Plusieurs variantes sont possibles, si le milieu contient du bleu Evans, la décoloration est plus nette, s'il contient du rouge de phénol, il permet de mettre en évidence l'acidification liée à la libération d'acide butyrique (couleur jaune) (Guiraud, 1998).

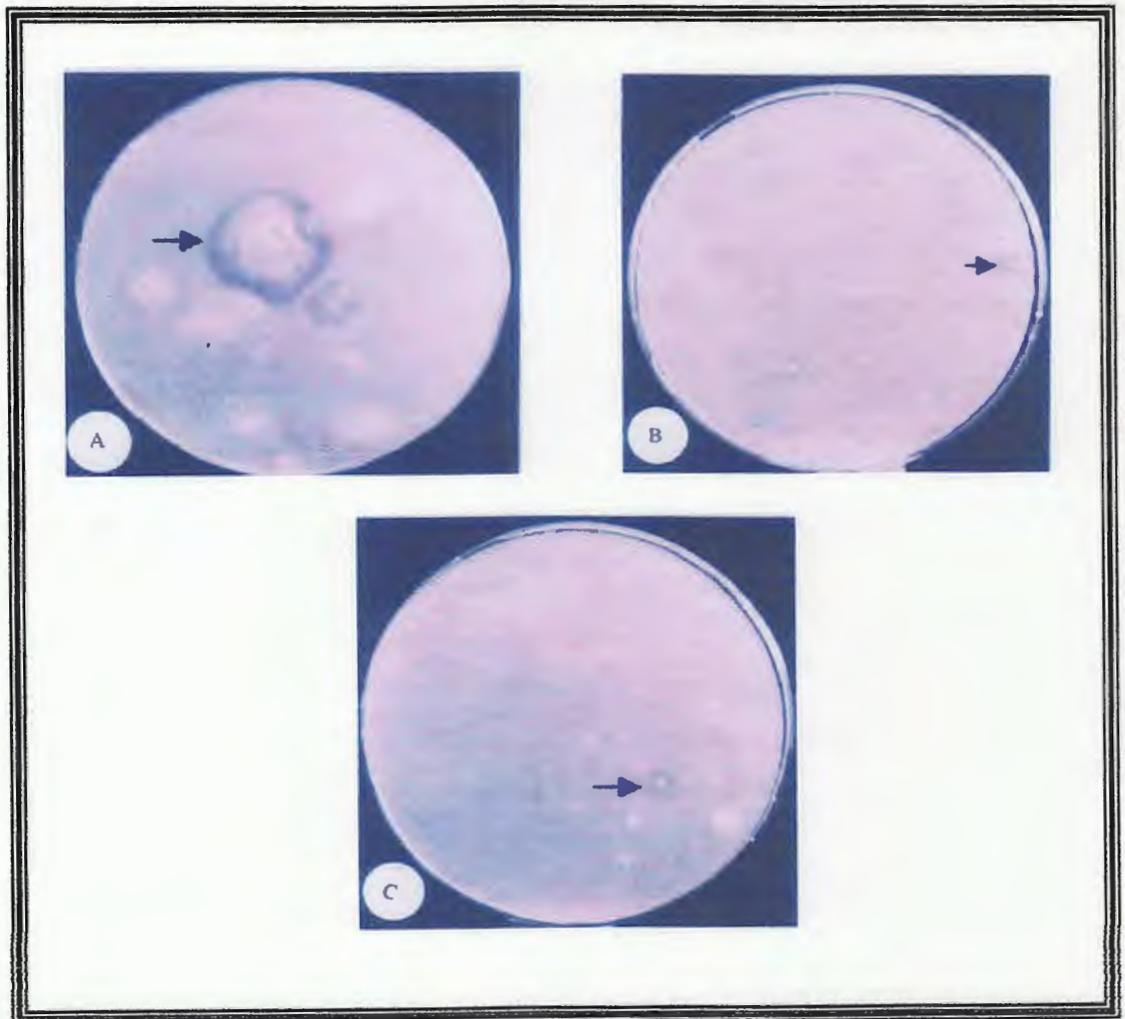


Fig. 4: Production des lipases par les microorganismes de sol dans des milieux sélectifs
(A): champignons (B) : actinomycètes (C) : bactéries (Ko et al., 2005)

les facteurs affectant la production des lipases

III. Les facteurs affectant la production des lipases :

La production des lipases microbiennes est influencée par des facteurs nutritionnels et physico-chimiques, comme la température, le pH, source de carbone et d'azote, présence des lipides, des sels inorganiques et l'agitation (Gupta et al., 2004a). Une liste des conditions de fermentation utilisées par différents microorganismes est présentée dans le **Tableau 4**.

III.1. Effet de carbone :

Le facteur principal pour la production des lipases est toujours le carbone (Gupta et al., 2004a). Plusieurs rapports ont démontré différents effets des sources de carbone sur la production des lipases, par exemple ils ont trouvé que le fructose 1% donne la production maximale des lipases chez *Syncephalastrum recemosum*, et que le sorbitol est la meilleure source de carbone pour *Humicola lanuginosa*. Cependant Eltaweel et al. (2005) ont trouvé que le mannitol dans le milieu de culture inhibe la production de lipase chez *Staphylococcus aureus*, ainsi le glucose, sucrose et le maltose stimulent la production des lipases par *Burkholderia cepacia*, cependant, ces sources de carbone inhibent la production chez *Bacillus sp.* strain 42 (Eltaweel et al., 2005). Ainsi le fructose est le meilleur carbohydre pour *Rhodotomula glutinis* (Ginalska et al., 2007).

Des études sur les conditions de fermentation pour la production des lipases extracellulaires par plusieurs microorganismes comme *Candida rugosa*, *Yarrowia lipolytica*, démontrent que l'addition des lipides dans le milieu augmente le niveau de la production des lipases. Les acides gras sont généralement considérés comme les substrats les plus efficaces pour la biosynthèse des lipases (Grbavčić et al., 2007). On peut aussi utiliser les huiles ou n'importe quel substrat comme le triacylglycérol, les esters hydrolysables, Tween et le glycérol (Gupta et al., 2004a).

Plusieurs rapports démontrent que *Y. lipolytica* produit une grande quantité de lipase quand elle est cultivée dans un milieu contenant l'huile d'olive ou un triacylglycéride à longue chaîne comme source de carbone (Amaral et al., 2006). Ils ont trouvé que l'huile d'olive est aussi la meilleure source pour la production des lipases par *Bacillus sp.* strain IHI.91 (Eltaweel et al., 2005).

III.2. Effet d'azote :

En plus des sources de carbone, les sources d'azote ont aussi une influence sur la production des lipases. Généralement, l'azote organique est préféré par les microorganismes comme le peptone et l'extrait de levure qui sont utilisés par différents espèces de *Bacillus* (Gupta et al., 2004a) et par *Candida rugosa* (Fadiloğlu & Erkmen, 2002). Ainsi l'extrait de levure stimule la production des lipases par *Gryptococcus sp.*, pendant que l'urée a été la meilleure source d'azote pour *Y. lipolytica* (Grbavčić et al., 2007). En absence d'azote organique, *Pseudomonas fluorescens* est incapable de produire des enzymes. Cependant ces sources ne sont pas essentielles pour la production des lipases par *Pseudomonas G6* (Eltaweel et al., 2005).

Les sources d'azote inorganique comme le chlorure d'ammonium, démontre aussi un effet sur la production des lipases (Ginalska et al., 2007).

III.3. Effet des ions :

Les ions métalliques sont nécessaires pour une production optimale des lipases (Eltaweel et al., 2005), il a été retrouvé que Ca^{+2} est l'ion le plus efficace pour la production d'enzymes par plusieurs microorganismes (Eltaweel et al., 2005; Kashmiri et al., 2006). Il a été retrouvé que NaCl_2 , KH_2PO_4 , MgCl_2 sont aussi efficace pour la fermentation (Saeed et al., 2005; Grbavčić et al., 2007; Lanciotti et al., 2005). Cependant, certains ions de métaux lourds comme le chlorure de cobalt et le chlorure de zinc peuvent inhiber la production des lipases (Eltaweel et al., 2005).

III.4. Autres effets :

En plus de divers composants chimiques d'un milieu de fermentation les paramètres physiologiques comme la température, le pH, l'agitation, l'aération et la période d'incubation jouent aussi un rôle important dans la production des lipases chez les microorganismes (Gupta et al., 2004a). Le plus souvent les microorganismes préfèrent un pH voisin de 7.0 pour une meilleure croissance et fermentation, c'est le cas de *Bacillus* (Eltaweel et al., 2005) et *Pseudomonas* (Saeed et al., 2005). Mais on peut trouver une haute production des lipases à un pH égal à 6.0, c'est le cas de *Candida utilis* (Grbavčić et al., 2007).

La température optimale pour la production des lipases est variée selon la température de croissance de chaque microorganisme (Gupta et al., 2004a), par exemple, la température optimale pour la production chez *Bacillus sp.* strain 42 est de 50°C (Eltaweel et al., 2005) et chez *Rhizopus sp.* est de 30°C (Koblitz & pastore, 2006).

La période d'incubation pour une production maximale de lipase est comprise de quelques heures à plusieurs jours (Gupta et al., 2004a). Une période d'incubation de 72h est optimale pour la production chez *Trichoderma viride* (Kashmiri et al., 2006) et chez *Bacillus sp.* strain 42 (Eltaweel et al., 2005) et 120h est optimale chez *candida utilis* (Grbavčić et al., 2007).

Il a été démontré que la production des lipases extracellulaires apparaît normalement dans le milieu de fermentation quand la croissance de microorganisme arrive à la fin de la phase logarithmique, la production de ces enzymes est avantageuse pour le microorganisme seulement quand les nutriments deviennent limitants (Saeed et al., 2005).

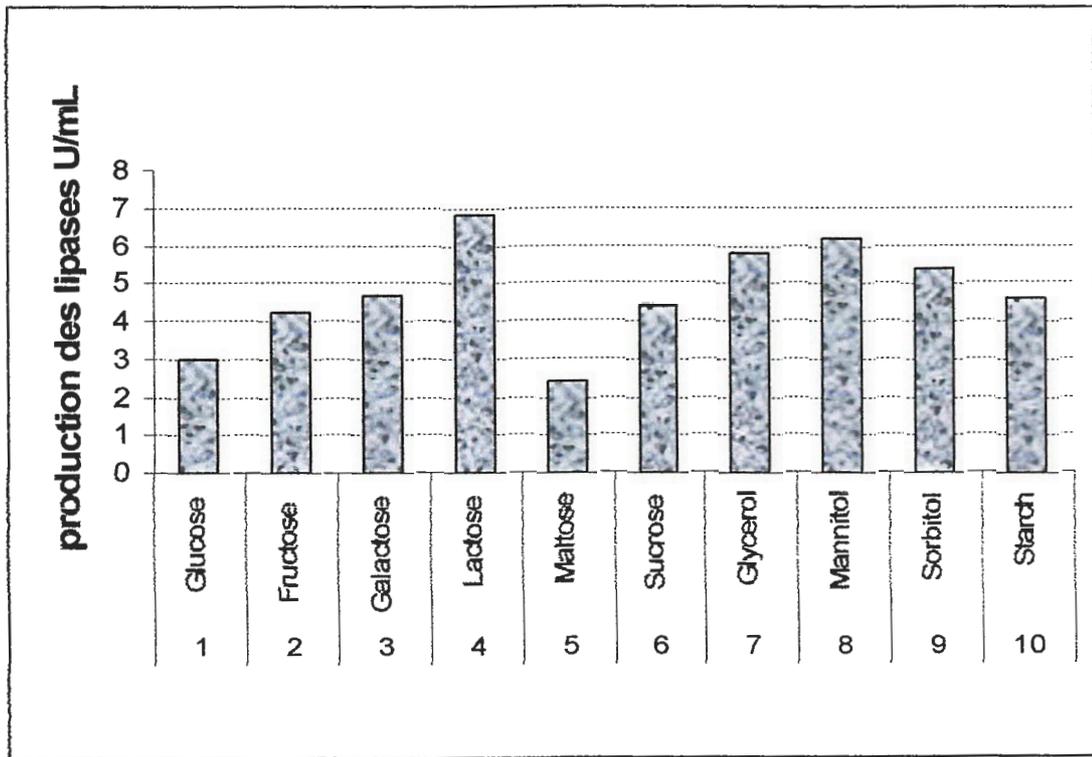


Fig. 5: Les effets des différents sucres et alcools sur la production des lipases par *Bacillus sp.* (Gupta et al., 2004b)



Tableau 4: Quelques conditions culturelles qui influencent sur la production des lipases

Microorganisme	pH	T (°C)	Agitation tours/min	Période d'incubation (h)	Source de carbone	Source d'azote	Références
<i>Bacillus sp.</i> strain 42	7	50	150	72	Sorbitol- fructose- Huile d'olive	Tryptone - Soytone	Eltaweel et al., 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ps-x	7	37	150	48	Tween-20	Extrait de levure	Saeed et al., 2005
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	6.8	30	250	12	Acide lactique- Acide oléique	-	Gupta et al., 2004a
<i>Burkholderia sp.</i>	7	45	250	24	Glucose- Huile de moutard	NH ₄ Cl (NH ₄) ₂ HPO ₄	Gupta et al., 2004a
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	9	70	-	-	Tween 80- Huile d'olive	Peptone	Abdel-fattah, 2002
<i>Aspergillus niger</i>	9.5	60	-	-	Acide gras	Ammonium nitrate	Sharma et al., 2001
<i>Penicillium wortmanii</i>	7	45	-	7 jours	Huile d'olive	-	Sharma et al., 2001
<i>Candida utilis</i>	6	28	120	120	Acide oléique - Acide caprylique	Casein hydolysé	Grbavčić et al., 2007
<i>Trichoderma viride</i>	-	31	100	72	Huile d'olive	NH ₄ Cl	Kashmiri et al., 2006
<i>Geotrichum candidum</i>	7	30	150	2 jours	Glucose- Huile d'olive	Urée	Ginalska et al., 2007
<i>Fusarium globulosum</i>	7	25	250	96	Huile de neem	Peptone	Gulati et al., 2005

Méthodes de purification et caractères des lipases

IV. Méthodes de purification et caractères des lipases

IV.1. Méthodes de purification

La fermentation terminée, les enzymes doivent être séparées des cellules et du milieu, et traitées de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités (Scriban, 1999). La pluparts des applications commerciales n'ont pas besoins des préparations homogènes des lipases, cependant, un certain degré de pureté permet un usage efficace (Saxena et al., 2003). Pour le but industriel, les stratégies de purification employées doivent être rapides, moins coûteuses, donnent un grand rendement et peuvent être des opérations à grande échelle (Gupta et al., 2004a).

Généralement, les méthodes de purification utilisées sont des techniques non spécifiques comme la précipitation, la chromatographie d'interaction hydrophobique, gel filtration et la chromatographie échangeuse d'ions. La chromatographie par affinité a été utilisée dans certains cas pour diminuer le nombre des étapes de purification.

Une lipase de *Staphylococcus epidermidis* RPG2A est purifiée par une combinaison de précipitation, chromatographie par métal affinité et gel filtration (Sharma et al., 2001). Kumar et al. (2005) ont purifié une lipase de *Bacillus coagulans* BTS-3 avec la précipitation par sel d'ammonium et chromatographie sur colonne, le bouillon de culture est centrifugé et filtré sur un papier Whatman N°1, le filtrat est ensuite précipité par le sulfate et dialysé en présence d'un tampon, puis il est mis dans une colonne de DEAE-sepharose (Kumar et al., 2005).

La lipase de *Pseudomonas aeruginosa* est purifiée en utilisant la précipitation sélective avec l'ammonium sulfate suivie par la chromatographie échangeuse d'ions en utilisant une colonne de Q et S-sepharose (Saeed et al., 2005). Bayoumie et al. (2007) ont purifié une lipase de *Bacillus licheniformis* B42 par une procédure consiste en 4 étapes, le surnageant est obtenu par la centrifugation de bouillon de culture; une ultrafiltration est exécutée en utilisant un système Millipore, ensuite ils ont fait une chromatographie sur le Sephadex G200 équilibré par un tampon (Tris-HCl) pH 9.0, les enzymes sont appliquées sur une colonne de Sephadex G100 déjà équilibré par le tampon précédant.

La précipitation des enzymes est fait premièrement par l'ammonium sulfate $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, parce qu'il est très soluble dans l'eau, pas cher et il n'a aucun effet sur la structure de protéine ; à cause de ces raisons, la précipitation par l'ammonium sulfate est choisie comme la première étape de purification (Bayoumi et al., 2007).

Puisque les lipases sont différentes des autres enzymes dans leur nature hydrophobique et leur activité dans le système non aqueux, quelques nouvelles méthodes de purification ont été utilisées pour la purification des lipases (Gupta et al., 2004a).

Ici une brève description de quelques méthodes utilisées.

IV.1.1. Membrane processus

Ce processus est fait pour la filtration des lipases, pour l'enlèvement des cellules microbiennes et la concentration du surnageant du milieu contenant les lipases. La possibilité de purifier la lipase de *Pseudomonas fluorescens* par l'utilisation

d'ultrafiltration par une membrane capillaire a été étudié par Sztajer et Bryjah (1989), ils ont étudié deux types de membranes capillaire : polyacrylonitrile (PAN) et polysulphone (PS) avec un poids moléculaire de 10 KDa et un diamètre de pore de 1.1mm (Saxena et al., 2003).

IV.1.2. Immunopurification

L'immunopurification est une des plus efficaces et sélectives techniques de purification, à cause de la grande spécificité des réactions d'antigène- anticorps (Gupta et al., 2004a). l'immunopurification a été considérée comme un des plus coûteuse méthodes, particulièrement avec l'utilisation des anticorps monoclonaux, cependant, le développement de cette technologie, comprenant des méthodes pour leur production économique à grande échelle, est réduit les frais d'immunopurification, permettant le développement de production (Saxena et al., 2003) .

IV.1.3. Le système de deux phases aqueuses

Cette séparation est un phénomène général qui se produit quand deux solutions de polymères solubles dans l'eau sont mélangées. Au lieu d'utiliser deux polymères, un polymère et une solution salée peuvent être utilisés pour former un système de deux phases aqueuses. Les polymères les plus communs sont le polyéthylène glycol (PEG) et le dextran, on trouve aussi l'utilisation fréquente de polymères/système salé, PEG/Potassium et PEG/ Magnésium sulfate (Saxena et al., 2003).

Les avantages d'extraction de deux phases aqueuses sont la réduction de volume, la grande capacité et une séparation rapide et facile. Cette technique peut être utilisée pour la purification dans des processus contenant toute la cellule ou juste les débris. Pour les lipases la nature hydrophobique de l'enzyme est exploitée dans les systèmes de deux phases aqueuses par l'utilisation des détergents ou surfactants pendant la purification (Gupta et al., 2004a).

IV.2. Caractères des lipases

Les lipases présentent des propriétés catalytiques variables suivant les différents espèces (Alloue et al., 2008). Les lipases de plusieurs microorganismes ont été étudiées en se basant sur leurs propriétés physiques et chimiques (pH, température, Effet des ions,...) (Gupta et al., 2004a).

IV.2.1. Effet de pH

Généralement les lipases bactériennes ont un pH optimal neutre ou alcalin (Gupta et al., 2004a), il a été retrouvé que la plupart des lipases produites par les espèces de *Pseudomonas* ont un pH optimal environ 7.0 et 9.5 (Saeed et al., 2005).

La meilleure valeur de pH pour l'activité d'une lipase purifiée de *Bacillus licheniformis* B-42 est de 9.5 où l'activité atteint 50.23U/ml (Bayoumi et al., 2007). Une

autre souche de *Geobacillus sp.* TW1 a une lipase qui a une activité maximale à un pH de 7.0-8.0, cette lipase reste stable à une gamme de pH de 6.0-9.0 (Li & Zhang, 2005).

D'autres lipases d'origine fongiques ont également un pH optimal neutre ou légèrement acide: pH 7.0 pour la lipase de *Yarrowia lipolytica*. Les lipases peuvent être actives sur une large gamme de pH, ainsi la lipase de *Y. lipolytica* conserve au moins

60% de son activité à pH entre 4.0 et 8.0 (Alloue et al., 2008). La lipase d'*Aspergillus niger* démontre une activité maximale à un pH 6.5 et elle reste active à une gamme de pH entre 4.0 et 6.5 (Pera et al., 2006).

Ferrer et al. (2000) ont trouvé que le pH optimal de l'activité lipolytique chez *Penicillium chrysogenum* est de 7.9-8.1. Une réduction importante de l'activité est observée à un pH plus de 8.5, ce résultat est opposé avec autres enzymes lipolytiques de *Penicillium*, par exemple *Penicillium roquefortii* qui a une activité maximal à un pH=9 ou plus (Ferrer et al., 2000).

IV.2.2. Effet de température

Concernant la température, de nombreuses lipases microbiennes ont une activité maximale à une température située entre 30 et 40°C. Les lipases d'*Aspergillus carneus* et de *Yarrowia lipolytica* par exemple, ont une activité maximale à 37°C (Alloue et al., 2008). Ferrer et al. (2000) ont trouvé que la température optimale pour l'activité maximale chez *Penicillium chrysogenum* est 45°C, une perte importante de l'activité catalytique est avoir lieu à une température plus de 50°C (Ferrer et al., 2000). Les lipases produites par *Bacillus licheniformis* B-42 atteignent leur activité maximale entre 50 et 60°C où elle atteint 50.23 U/ml, au-dessous ou au-dessus de cette température l'activité est diminuée (Bayoumi et al., 2007). Une souche bactérienne de *Anoxybacillus gonensis* G2 démontre aussi une activité maximale de la lipase à une température de 60°C (Çolak et al., 2005). L'activité maximale de la lipase chez *Bacillus coagulans* BTS-3 est obtenue en utilisant l'enzyme après 10 minutes d'incubation à 55°C (Kumar et al., 2005).

Li & Zhang (2005) ont trouvé que l'activité optimale d'une lipase de *Geobacillus sp.* TW1 est obtenue à une température de 40°C, mais elle garde leur activité jusqu'à la température de 90°C à un pH 7.5 (Li & Zhang, 2005). Une autre souche de *Thermus thermophilus* HB27 démontre une activité maximale à une température atteinte jusqu'à 80°C (Fucinos et al., 2005).

IV.2.3. Effet des ions métalliques

Généralement, les cofacteurs ne sont pas nécessaires pour l'activité des lipases, mais souvent certains cations stimulent l'activité d'enzyme (Gupta et al., 2004a). L'effet de quelques ions métalliques sur l'activité d'une lipase purifiée de *Pseudomonas aeruginosa* est aussi étudié, il a été retrouvé que NaCl, CaCl₂ et MgCl₂ augmentent l'activité lipolytique de la lipase purifiée et l'activité est plus grande dans le cas de CaCl₂ que NaCl et MgCl₂, cette observation est aussi exposée par d'autres lipases de *Pseudomonas*. L'observation de cette augmentation en présence de ces ions est probablement reflétée la capacité de ces sels d'agir avec les acides gras libres adhérents aux gouttelettes d'huile pour diminuer l'effet de la charge inter faciale. En outre, le ZnCl₂ à une concentration de 10 mM inhibe l'activité lipolytique de cette lipase (Saeed et al.,

2005). ils ont étudié l'effet des ions métalliques sur une lipase purifiée de *Penicillium requefortii*, l'activité de la lipase est n'a pas influencée par Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Na^+ , K^+ et Cu^{+2} , cependant, l'enzyme est inhibée par l' Ag^+ , Fe^{+2} et l' Hg^{+2} (Sharma et al., 2001).

Kumar et al. (2005) ont trouvé que les ions de K^+ , Fe^{+3} , Hg^{+2} et le Mg^{+2} augmentent l'activité de la lipase de *Bacillus coagulans* BTS-3, pendant que les ions de Al^{+3} , Co^{+2} et Zn^{+2} inhibent l'activité d'enzyme (Kumar et al., 2005).

IV.2.4. Stabilité dans les solvants organiques

La stabilité dans les solvants organiques est souhaitée dans les réactions de synthèse, il peut être déduire que les lipases sont généralement stables dans les solvants organiques avec quelques exceptions de stimulation et d'inhibition (Gupta et al., 2004a).

La lipase de *Rhizopus sp.* a une bonne stabilité dans l'hexane mais elle est fortement dénaturée dans les solvants hydrophiliques, particulièrement le méthanol (Koblitz & Pastore, 2006).

IV.2.5. Spécificité des lipases

Les lipases démontrent des spécificités différentes aux huiles et à la matière grasse, elles peuvent être divisées au cinq catégories.

1. Spécificité au substrat

Les triacylglycérides ne sont pas les seuls substrats pour les lipases; les diacylglycérides, les monoacylglycérides et les phospholipides peuvent aussi être hydrolysés. Certaines lipases démontrent une préférence à des acylglycérides spéciales. La lipase de *Penicillium camembertii* par exemple a une grande activité sur les mono- et les diacylglycérides mais elle n'a aucune activité sur les triacylglycérides [3].

2. Les lipases non spécifiques

Agissent au hasard sur les molécules de triacylglycéride et entraînent l'hydrolyse de ces molécules en acides gras et glycérol. Ce groupe comprend les lipases de *Staphylococcus aureus* (Gupta et al., 2004), *Pseudomonas cepacia* et *Candida rugosa* [3].

3. Les lipases régiospécifiques

Ce sont des lipases qui hydrolysent seulement les liaisons ester primaires (les liaisons ester sur l'atome C1 et C3 de glycérol) et ainsi hydrolysent le triacylglycéride pour donner des acides gras libres, 1,2(1,3)-diacylglycéride et 2-monoacylglycéride. Parmi ces lipases, celles de *Bacillus sp.* (Gupta et al., 2004a) et *Candida antarctica* [3].

4. Les lipases spécifiques aux acides gras

Elles démontrent une préférence aux acides gras. *Achromobacterium lipolyticum* est la seule source bactérienne des lipases qui a une spécificité aux acides gras (Gupta et al., 2004a) avec d'autre champignons comme *Geotrichum candidum* [3]. Cependant, les lipases de *Bacillus sp.* et *Pseudomonas alcaligenes* démontrent une spécificité aux triacylglycérides avec des acides gras à une longue chaîne, pendant que les lipases de *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* préfèrent les acides gras avec des courtes ou moyennes chaînes (Gupta et al., 2004a).

5. Les lipases stereospécifiques

Ces lipases peuvent distinguer entre la position *sn1* et la position *sn3* dans les triglycérides, on trouve ces lipases chez *Pseudomonas fluorescens* [3].

IV.2.6. Les inhibiteurs des lipases

Les inhibiteurs des lipases ont été utilisés dans l'étude des propriétés structuraux et des mécanismes des lipases, en plus, la recherche de ces inhibiteurs a un intérêt pharmacologique, ils ont utilisées pour la fabrication des médicaments. Les composées qui ne agissent pas directement sur le site actif, mais inhibent l'activité des lipases par le changement de la conformation ou des propriétés inter faciales des lipases sont des inhibiteurs non spécifiques; les surfactants, les sels de bile et les protéines sont appartiennent au cet groupe d'inhibiteur, mais les surfactants et les sels de bile stimulent l'activité enzymatiques dans certains cas. On outre, les inhibiteurs spécifiques sont les inhibiteurs qui agissent directement sur le site actif de ces enzymes, on trouve dans ce groupe l'analogue de substrat comme l'analogue de triacylglycéride (Gupta et al., 2004a).

V. Lipases et les biotechnologies moléculaires :

Jusqu'à récemment, un nombre important des gènes des lipases procaryotiques ont été clonés, mais les mécanismes moléculaires qui contrôlent leur expression restent inconnus (Jaeger et al., 1999). La technologie de l'ADN recombinant représente une technique très attirante qui peut être utilisée pour ignorer ou dépasser la limitation des applications industrielles des lipases.

Brièvement, une lipase adéquate est sélectionnée pour une application spécifique et clonée dans un système d'expression pour produire et purifier cette enzyme en grande quantité (Houde et al., 2004).

«Lipolase» de Novozyme, produite en 1994, est la première lipase recombinante, elle a été obtenue par le clonage du gène de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (appelé autrefois *Humicola lanuginosa*) dans le génome de *Aspergillus oryzae* (Mir, 2004). Au début de cette technique, seulement un très petit nombre de microorganismes ont été employés pour ce processus, l'*Escherichia coli* est l'espèce représentative des microorganismes procaryotiques, en plus de la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*. L'application de telle expression comprend l'utilisation des vecteurs (plasmide, phage, cosmide et virus) qui ont une large gamme d'hôtes [3].

L'introduction des lipases thermostables dans les applications industrielles nécessite leur production et leur surexpression fonctionnelle dans des hôtes appropriés. Par conséquent, plusieurs lipases thermostables ont été récemment décrites et dans certains cas leurs gènes sont exprimés dans différents hôtes (Sunna et al., 2002). Une lipase thermophile de *Bacillus thermoleovorans* ID-1 est clonée par Cho et al. (2002). Le gène de lipase code pour 416 acides aminés et contient le pentapeptide Ala-X-Ser-X-Gly, comme les autres lipases de *Bacillus*. Pour l'expression dans l'*Escherichia coli*, le gène de lipase est cloné dans le vecteur PET-22b (+) avec un promoteur puissant T7 (Cho et al., 2000).

La sélection des gènes de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC12980 et ATCC7954 qui sont responsables de l'activité d'estérase/lipase conduit à l'isolement de deux clones positifs. Deux gènes sont identifiés, est30 et est55, ils codent deux carboxylestérases différentes. Le gène est30 code un polypeptide de 248 acides aminés et le gène est55 code un polypeptide de 499 acides aminés, les deux enzymes sont purifiées et homogénéisées d'une souche recombinante d'*E. coli* (Ewis et al., 2004).

Un gène d'estérase d'une souche thermophile *Bacillus licheniformis* LCB40 a été cloné et exprimé dans l'*E. coli*. La comparaison de la séquence des acides aminés d'estérase avec celles des lipases et estérase connues démontre la présence de pentapeptide Gly-X-Ser-X-Gly avec un alanine qui remplace la première glycine, ce remplacement n'a jamais été retrouvé pour une estérase mais il est présent chez les lipases de *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus*. La séquence des acides aminés démontre une similarité avec les lipases, un extrait d'une souche recombinante d'*E. coli* démontre une hydrolyse de *p*-nitrophenyl caprylate (PNPC8) comme l'estérase mais il n'hydrolyse pas le *p*-nitrophenyl palmitate (PNPC18) ou l'huile d'olive comme les lipases (Alvarez-Macarie et al., 1999).

Lipases et les biotechnologies moléculaires

Plusieurs lipases ont été détectées dans *Yarrowia lipolytica*, y compris des enzymes intracellulaires et extracellulaires. Trois gènes codant les lipases ont été isolés de *Y. lipolytica*, Lip1 qui code 486 acides aminés et Lip3 qui code 498 acides aminés. Lip1 et Lip3 sont des gènes de lipases intracellulaires, mais Lip2 qui a été isolé en 2000, est un gène d'une lipase extracellulaire. L'analyse par PCR démontre que contrairement à quelques levures, comme *Candida rugosa* et *Geotrichum candidum* dans les quelles plusieurs gènes sont présents, *Y. lipolytica* a un seul gène pour la lipase extracellulaire (Vakhlu & Kour, 2006).

Pour conclure, la synthèse des lipases extracellulaires émerge comme un mécanisme de régulation, surtout dans les bactéries pathogènes qui ont des lipases considérées comme des facteurs virulents. Des activateurs ou des inhibiteurs supplémentaires de transcription répondant au grand nombre des signaux écologiques semblent exister, mettant l'expression des gènes de lipase un système de haute régulation. (Jaeger et al., 1999).

**Applications industrielles
des lipases microbiennes**

VI. Applications industrielles des lipases microbiennes :

Les enzymes lipolytiques ont actuellement attirées une énorme attention à cause de leur potentiel biotechnologique, elles constituent le groupe le plus important de biocatalyseurs dans les applications biotechnologiques (Joseph et al., 2007). L'utilisation commerciale des lipases est un commerce de milliards de dollars qui comprend une large variété de différentes applications (Jaeger et al., 1999). Les lipases, particulièrement d'origine microbienne, ont un grand potentiel dans les applications commerciales comme additifs dans les aliments (modification de la saveur), détergents (hydrolyse des graisses), synthèse des esters, traitement des eaux usées, cosmétique, pharmaceutique, cuir et analytique (Eltaweel et al., 2005).

VI.1.L'utilisation des lipases dans les graisses et les produits oléochimiques :

L'interestérification et l'hydrogénation sont des techniques qui ont été utilisées dans la préparation des produits de glycérol pour l'usage dans la fabrication du beurre et de la margarine, elle est conduite en présence d'un catalyseur tel que le sodium, le méthylate de sodium ou autres analogues.

La lipase immobilisée de *Mucor miehei* dans le solvant organique a catalysé les réactions de l'interestérification enzymatique pour produire les huiles végétales comme: l'huile de maïs, l'huile de tournesol, l'huile d'arachide, l'huile d'olive et l'huile de soja contenant les acides gras polyinsaturés. En outre la place des lipases dans l'industrie des produits oléochimiques est énorme, les graisses et les pétroles sont produits dans le monde entier à une grande quantité (Hasan et al., 2006).

L'utilisation des lipases dans les processus oléochimiques économise l'énergie et minimise la dégradation thermique pendant l'alcoolyse, l'acidolyse, l'hydrolyse et la glycérolyse (Sharma et al., 2001).

VI.2. La production des polymères biodégradables :

Les lipases et les estérases sont utilisées comme des catalyseurs pour la synthèse des polymères, avec leur majeur avantages: leur grande sélectivité dans des conditions ordinaires. Des structures complexes monomériques avec des groupes de réactives multifonctionnelles sont polymérisées en utilisant des lipases commerciales de différentes sources (Jaeger & Eggert, 2002). Les lipases peuvent être employées comme biocatalyseurs dans la production des composés biodégradables, la 1-Butyl oléate est produit par l'estérification directe du butanol et l'acide oléique pour diminuer la viscosité de biodiesel utilisé en hiver (Hasan et al., 2006).

VI.3. Les lipases dans l'industrie des détergents :

Le domaine le plus commercialement important dans les applications des lipases est leur addition aux détergents, qui sont utilisés principalement dans le ménage, la blanchisserie et dans la vaisselle. Les lipases des détergents sont particulièrement sélectionnées à rencontrer les exigences suivantes: une basse spécificité au substrat, c'est-à-dire la capacité d'hydrolyser la matière grasse de divers compositions; la capacité de résister à des conditions de lessive relativement dures (pH 10.0-11.0 et $T^{\circ}= 30-60^{\circ}\text{C}$); et la capacité de résister aux surfactants et aux enzymes (protéase) qui sont des ingrédients importants de plusieurs détergents (Jaeger & Reetz, 1998).

En 1994, Novo Nordisk a introduit la première lipase recombinante "Lipolase", qui est d'origine du champignon *Thermomyces lanuginosus* et elle est exprimée dans *Aspergillus oryzae*. En 1995, deux lipases bactériennes sont introduites, "Lumafast" de *Pseudomonas mendocina* et "Lipomax" de *Pseudomonas alcaligenes* par Genencor International (Sharma et al., 2001). Ces enzymes sont utilisées dans les formulations de détergents pour enlever les taches de la matière grasse comme celles résultées d'huile de salade, beurre, soupes, sauces et certains cosmétiques (Houde et al., 2004). Dans le domaine de détergents, presque 1000 tonne de lipase sont vendues chaque année (Jaeger et al., 1999).

VI.4. Les lipases dans l'industrie des aliments et l'amélioration de la qualité :

Malgré que certains microorganismes, particulièrement des bactéries psychrophiles de *Pseudomonas sp.* et certaines moisissures de *Rhizopus sp.* et *Mucor sp.* causent des ravages au lait, aux produits de laiterie et aux fruits doux, l'utilisation de ses lipases révèle une grande importance dans l'industrie alimentaire (Joseph et al., 2007).

Les applications des enzymes dans l'industrie alimentaires sont diverses, elles se présentent dans le développement de la texture et de la flaveur. Dans la boulangerie, il y a une attention croissante sur les enzymes lipolytiques (Kirk et al., 2002). Les lipases nous permettent de modifier les propriétés des lipides par le changement des localisations des chaînes des acides gras ou le changement d'un acide gras ou plus par un autre acide (Sharma et al., 2001).

De plus, les lipases ont été utilisées pour le développement de goût dans l'affinage de fromage, des produits de la boulangerie et de boissons. Aussi, les lipases sont utilisées pour aider l'enlèvement de la matière grasse des produits de viande et des poissons (Sharma et al., 2001).

VI.5. Industrie de pulpe et papier :

Un autre domaine d'application de grande importance est l'utilisation des lipases dans l'enlèvement de «Pitch» de pulpe produite dans l'industrie de papier. «Pitch» est un terme utilisé pour décrire collectivement les composants hydrophobiques de bois (triglycérides et cire), qui causent plusieurs problèmes dans la fabrication de papier (Jaeger & Reetz, 1998; Sharma et al., 2001).

L'utilisation des lipases dans le traitement des déchets de papier peut augmenter le taux de production de pulpe, augmenter l'intensité, augmenter l'usage chimique, réduire le niveau de pollution des eaux usées et économiser le temps et l'énergie (Hasan et al., 2006).

VI.6. Cosmétique :

La lipase immobilisée de *Rhizomucor miehei* est utilisée comme biocatalyseur. Selon les fabricants, les frais totaux de la production sont très élevés mais le coût est justifié par l'amélioration de la qualité des produits finaux (Hasan et al., 2006). Une nouvelle méthode pour isoler le (-)- menthol ester par la transestérification de (±)-menthol en utilisant la lipase de *Burkholderia cepacia*, le produit final est le

menthylméthacrylate 16, il est polymérisé pour être utilisé dans la fabrication des parfums (Jaeger & Eggert, 2002).

Unichem International a lancé la production de isopropylmyristate, isopropylpalmitate et 2-éthylhexylpalmitate pour les utiliser dans les produits de soin personnel comme les crèmes de peau, de bronzage, les huiles de bain...etc (Hasan et al., 2006).

VI.7. L'utilisation des lipases dans la production de biodiesel :

Les sources limitées de carburants des fossiles, qui augmente le prix de pétrole et les soucis écologiques sont les diverses raisons de l'exploration d'utilisation des huiles végétales comme des carburants alternatives (Hasan et al., 2006).

Tout les types des huiles végétales et graisses animales peuvent être utilisés pour la production de biodiesel, souvent la production commerciale de biodiesel est accomplie par la transestérification d'huile de soja (Zhao et al., 2007). Cependant, la production à une échelle industrielle a échoué pour le moment à cause des coûts élevés des catalyseurs appropriés. Deux stratégies sont récemment présentées pour donner des solutions à ce problème: l'immobilisation de la lipase de *Pseudomonas fluorescens* et la surexpression cytoplasmique de la lipase de *Rhizopus oryzae* dans *Saccharomyces cerevisiae* (Jaeger & Eggert, 2002).

VI.8. Les applications médicales, pharmaceutiques et diagnostiques :

Les lipases sont aussi importantes dans le secteur médical, elles peuvent être utilisées comme des outils diagnostiques et leur présence ou leur niveau élevé peut indiquer des infections ou des maladies (Hasan et al., 2006). Les lipases ont un grand potentiel dans la médecine clinique pour la détection de la matière grasse dans le sang, et dans les sérums humains (Huang et al., 2001). Le niveau des lipases dans le sérum du sang peut être utilisé pour la diagnostic des blessures pancréatiques. Il a été retrouvé que les lipases et les estérases isolées de *Galleria mellonella* ont une action de bactéricide sur le *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) H37RV; les lipases peuvent aussi être utilisées pour faciliter la digestion des aliments. Les lipase sont des activateurs des facteurs de Nécrose des tumeurs et donc elles peuvent être utilisées dans le traitement des tumeurs malignes (Hasan et al., 2006).

Les lipases sont importantes dans les applications pharmaceutiques surtout les réactions de transestérification et d'hydrolyse. Les lipases jouent un rôle important dans la modification des monoglycérides pour les utiliser dans l'industrie pharmaceutique. Les bactéries psychrophiles qui produisent les lipases froides peuvent être de bonnes sources des acides gras polyinsaturés pour les applications pharmaceutiques (Joseph et al., 2007; Houde et al., 2004).

VI.9. Traitement des eaux usées et des déchets :

Les lipases sont utilisées dans quelques processus aérobiques de traitement, où les couches minces de la matière grasse doivent être enlevées de la surface sans interruption pour permettre le transport d'oxygène. Ces liquides riches en matières grasses sont digérés par les lipases (Hasan et al., 2006).

Les lipases actives en froid ont un grand potentiel dans le traitement des eaux usées. Une souche psychrophile du genre *Acinetobacter* a été identifiée, elle produit une lipase extracellulaire capable d'hydrolyser les triglycérides, comme l'huile de soja, pendant la croissance bactérienne même à une température de 4°C. En plus, d'autres efforts sont nécessaires pour l'identification et le clonage de nouveaux gènes des lipases pour les applications écologiques (Joseph et al., 2007).

Le traitement et l'élimination des eaux usées des moulins d'olive sont devenus des grands problèmes écologiques pour les pays méditerranéens qui ont environ 95% de la production d'olive dans le monde. Certaines *Yarrowia lipolytica* sont de bons candidats pour la production des enzymes telles que les lipases et pour la réduction de la pollution de ces eaux usées (Lanciotti et al., 2005).

VI.10. Applications dans l'industrie des textiles :

Dans le secteur de textiles, le blanchissement et le traitement des fibres naturelles demandent une grande quantité d'énergie, d'eau et de produits chimiques. L'utilisation des enzymes peut contribuer à réduire le coût de ces industries de même que leur impact sur l'environnement [4].

Les lipases sont utilisées dans l'industrie des textiles pour aider à l'enlèvement des lubrifiants de grande taille, à fin de fournir un tissu avec une grande absorption, leur utilisation réduite aussi la fréquence des fissures pendant l'écorchure de jean (Hasan et al., 2006). Des préparations commerciales utilisées dans la fabrication de jean et autres tissus de coton contiennent à la fois l' α -amylase et les lipases (Joseph et al., 2007). Des fibres synthétiques ont été modifiées enzymatiquement pour l'utilisation dans la production des fils, tissu, textiles, tapis et autres produits, il est relié de la modification des caractéristiques des fibres des polyesters qui sont susceptibles de traitement et de modification (Hasan et al., 2006).

VI.11. Industrie de cuir :

L'utilisation des enzymes isolées dans la fabrication de cuir joue un rôle majeur dans l'industrie [5].

L'enlèvement de la matière grasse résiduelle et de débris protéiniques qui sont associés au cuir et aux cheveux par les processus chimiques n'est pas efficace. Il est devenu plus pratique d'utiliser une mixture de lipases et protéases pour ce but. Les lipases peuvent enlever la matière grasse et la graisse de la peau et de cuir, particulièrement ceux qui ont un contenu modéré de graisse. Les lipases alcalines et acides peuvent être utilisées dans l'industrie de cuir.

Les lipases hydrolysent le triglycéride (la forme principale de la matière grasse dans la peau des animaux) en glycérol et acide gras. L'avantage principal d'utiliser des lipases c'est donner une couleur uniforme et une teinture apparente. Les lipases aussi améliorent la production des cuirs hydrophobiques (imperméables) et fabriquent les cuirs de garniture des voitures (Hasan et al., 2006).

Tableau5 : Exemples de quelques lipases commerciales

Lipase commerciale	Source	Rôle et application	Société	Références
Lumafast	<u>Bactéries:</u> <i>Pseudomonas mendocina</i>	Industrie des détergents	Genencor international	Jaeger & Reetz, 1998
Lipomax	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Industrie des détergents	Genencor international	Alloue et al., 2008
Novolime (avec protéase)	-	Industrie de cuir	Novozymes	Houde et al., 2004
Lipase QL	<i>Alcaligenes sp.</i>	Synthèse organique	Meito Sankyo Co., Japon	Jaeger & Reetz, 1998
Lipolase	<u>Champignons:</u> <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Détergents (hydrolyse des lipides)	Novo Nordisk	Jaeger & Reetz, 1998; Hasan et al., 2006
Piecnate	<i>Mucor miehei</i>	Fabrication de fromage	Girsk-Brocades	Hasan et al., 2006
Lipase MY	<i>Candida cylindracea (rugosa)</i>	Industrie pharmaceutique	Meito Sangyo	Houde et al., 2004
Palatase A	<i>Aspergillus oryzae</i>	Agroalimentaire et industrie des détergents	Novo Nordisk	Alloue et al., 2008
Novozyme 435	<i>Candida antarctica B</i>	Production d'isopropyl (cosmétique)	Novozymes	Houde et al., 2004
Resinase	<i>Candida rugosa</i>	Industrie de papier	Novozymes	Houde et al., 2004
-	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Hydrolyse des graisses (écologique)	Artechno S.A.	Alloue et al., 2008

Différents composés tels que des protéines, des sucres ou des polyols sont rajoutés à la solution enzymatique concentrée pour stabiliser l'enzyme et pour faciliter l'étape suivante de déshydratation. Ceci permet d'aboutir à différents types de produits, selon l'objectif visé: une poudre, un liquide concentré, une enzyme enrobée ou sous forme de microgranulés. Des polyols (glycérol, sorbitol ou mannitol), des disaccharides (lactose) ou des sels (NaCl, MgSO₄) sont principalement utilisés afin de stabiliser les enzymes commercialisées sous la forme d'une solution liquide concentrée. Les préparations sous forme de poudre sont obtenues soit par atomisation, soit par lyophilisation. Ces opérations requièrent au préalable l'ajout à la préparation d'enzyme des agents protecteurs tels que l'amidon, maltodextrines, gomme arabique, sels (atomisation) ou sucres, polyéthylène glycol, propylène glycol, polyols, acides amines (lyophilisation). Lipolase™ (Novo Nordisk), Lumafast™ et Lipomax™ (Genencor International) sont des exemples de préparations commerciales lipasiques en poudre utilisées dans les détergents. La lipase de *Y. lipolytica* est une enzyme en cours de développement au Centre Wallon de Biologie Industrielle. La formulation et la stabilisation de cette lipase sous forme de liquide concentré ont été réalisées en utilisant soit des polyols soit des techniques de radiations aux rayons gamma (Alloue et al., 2008).

CONCLUSION

VII. Conclusion :

Les lipases sont les biocatalyseurs de choix pour le présent et le future, à cause de leurs propriétés comme l'activité à une large gamme de température et de pH, spécificité au substrat et une vaste gamme de substrat. Grâce à des progressions dans la biotechnologie moderne, les lipases peuvent être développés aujourd'hui dans des processus où personne n'attendait qu'une enzyme puisse être appliquée, juste il y a une décennie.

Les lipases, par leur capacité à hydrolyser et à esterifier, trouvent des applications dans différents secteurs industriels. Toutefois, l'utilisation de ces enzymes continue à présenter de nombreuses potentialités à exploiter, mais leur utilisation industrielle reste encore limitée à cause du grand coût de la production. L'ADN recombinant a été déjà appliqué avec succès pour produire certaines lipases commerciales et représente une bonne technique pour limiter les coûts de la production et dépasser la limitation d'application des lipases microbiennes.

Références

Références :

- Abdel-Fattah Y.R. (2002). Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus sp.* Using Box-behnken experimental design. *Biotechnol. Lett.* 24: 1217-1222.
- Alloue W.A.M., Aguedo M., Destain J., Ghalfi H., Blecker C., Wathelet J.P. and Thonart P. (2008). Les lipases immobilisées et leurs applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 57-68.
- Alvarez-Macarie E., Magro V.A., Guzzo J. and Baratti J. (1999). Molecular characterization of the gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* showing significant similarities with lipases. *Biotechnol. Lett.* 21: 313-319.
- Amaral P.F.F., Rocha-Leão M.H.M., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P. and Coelho M.A.Z. (2006). Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1368-1374.
- Arpigny J.L. and Jaeger K.E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.
- Bayoumi R.A., El-louboudey S.S., Sidkey N.M. and Abd-El-Rahman M.A. (2007). Production, purification and characterization of Thermoalkalophilic lipase for application in Bio-detergent industry. *J. Appl. Sci. Res.* 3: 1752-1765.
- Cho A.R., Yoo S.K. and Kim E.J. (2002). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 235-238.
- Çolak A., Şişik D., Sağlam N., Güner S., Çanakçı S. and Beldüz A.O. (2005). Characterization of a thermoalkalophilic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2. *bioresource Technol.* 96: 625-631.
- Dominguez A., Pastrana L. and Longo M.A. (2005). Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 26: 95-99.
- Eltaweel M.A., Abd-Rahman R.N.Z.R., Salleh A.B. and Basri M. (2005). An organic solvent-stable lipase from *Bacillus sp.* Strain 42. *Ann. Microbiol.* 55: 187-192.
- Ewis H.E., Abdela A.T. and Lu C.D. (2004). Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl-esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene.* 329: 187-195.
- Fadiloğlu S. and Erkmen O. (2002). Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Turkish J. Eng. Env. Sci.* 26: 249-254.

- Ferrer M., Plou F.J., Nuero O.M., Reyes F. and Ballesteros A. (2000). Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75: 569-576.
- Fuciños P., Abadín C.M., Sanroman A., Longo M.A., Pastana L. and Rúa M.L. (2005). Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. *J. Biotechnol.* 117: 233-241.
- Gilham D. and Lehner R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Meth.* 36:139-147.
- Ginalska G., Cho H.Y., Cho N.S., Bancercz R., Kornilowicz T., Leonowicz A. and Shin S.J. (2007). Effect of culture conditions on growth and lipase production by a newly isolated strain, *Geotrichum-like* R59 (Basidiomycetes). *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 52:29-34.
- Grbavcic S.Ž., Dimitrijević-Branković S.I., Bezbradica D.I., Siler-Marinkovic S.S. and knezević Z.D. (2007). Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. *J. Serb. Chem. Soc.* 72: 757-765.
- Guiraud J.P. (1998). Techniques d'étude et d'identification microbienne. *Microbiologie alimentaire*. P: 231. Ed: Dunod, Paris.
- Gupta N., Gauri M. and Gupta R. (2004). A glycerol-inducible lipase from *Bacillus sp.*: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. *Can. J. microbiol.* 50: 361-368.
- Gulati R., Isar J., kumar V., Prasad A.K., Parmar V.S. and Saxena R.K. (2005). Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. *Pure. Appl. Chem.* 77: 251-262.
- Gupta R., Gupta N. and Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 763-781.
- Hasan F., Shah A.A. and Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enz. Microb. Technol.* 39: 235-251.
- Houde A., Kademi A. and Leblanc D. (2004). Lipases and their industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118: 155-170.
- Huang X.R., Li Y.Z., Yang G.L., Liu L.L., Qu Y.B. and Zhang W.J. (2001). A novel method for fabrication of a glass-electrod-based lipase sensor. *Chinese Chem. Lett.* 12: 453-456.

- Jaeger K.E., Dijkstra B.W. and Reetz M.T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-dimensional structures, and Biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.
- Jaeger K.E. and Eggert T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 390-397.
- Jaeger K.E. and Reetz M.T. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *TIBTECH.* 16: 396-403.
- Joseph B., Ramteke P.W., Thoma G. and Shrivastava N. (2007). Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2: 039-048.
- Kambourova M., Kirilova N., Mandova R. and Derekova A. (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. *J. Mol. Cat B. Enz.* 22: 307-33.
- Kashmiri M.A., Adnan A. and Butt B.W. (2006). Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 878-882.
- Kirk O., Borchert T.V. and Fuglsang C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Cur. Opin. Biotechnol.* 13: 345-351.
- Ko W.H., Wang I.T. and Ann P.J. (2005). A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biol. Biochem.* 37: 597-99.
- Koblitz M.G.B. and Pastore G.M. (2006). Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus sp.* *Ciênc. Agrotec. Lavras.* 30: 494-502.
- Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., Kanwar S.S. and Gupta R. (2005). Production, purification, and characterization of lipase thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Pro. Exp. Pur.* 41: 38-44.
- Laboret F. and Perraud R. (1999). Lipase-catalyzed production of short-chain acids Tripenyl Esters of interest to the food industry. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 82: 185-198.
- Lanciotti R., Gianotti A., Baldi D., Angrisani R., Suzzi G., Mastrocola D. and Guerzoni M.E. (2005). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technol.* 96: 317-322.
- Li H. and Zhang X. (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus sp.* TW1. *Pro. Exp. Pur.* 42: 153-159.
- Mir J. (2004). Industrial microbiology. A new challenge. *Int. Microbiol.* 7: 81-82.

- Pera L.M., Romero C.M., Baigori M.D. and Castro G.R. (2006). Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. Food Technol. Biotechnol. 44: 247-252.
- Rúa M.L., Atomi H. and Schmidt-Dannert C. (1998). High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus* in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 405-410.
- Saeed H.M., Zaghloul T.I., Khalil A.I. and Abdel-Baeth M.T. (2005). Purification and characterization of two extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* PS-X. Polish J. Microbiol. 54: 233-240.
- Saxena R.K., Sheoran A., Giri B. and Davidson W.S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. J. Microbiol. Meth. 52: 1-18.
- Scriban R., (1999). Le métabolisme microbien. Biotechnologie. P: 90-91. 5^{ed}. Ed: TEC. & DOC. New York.
- Sharma R., Chisti Y. and Banerjee U.C. (2001). Production, purification, characterization and application of lipases. Biotechnol. Adv. 19: 627-662.
- Sinchaikul S., Sookkheo B., Putrakul S., Pan F.M. and Chen S.T. (2001). Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, purification and characterization. Pro. Exp. Pur. 22: 388-398.
- Sunna A., Hunter C.A. and Bergquist P.L. (2002). Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. Enz. Microbiol. Technol. 31: 472-476.
- Vakhlu J. and Kour A. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic. J. Biotechnol. 9: 76-85.
- Zhao X., El-Zahab B. and Brosnahan R. (2007). An organic soluble lipase for water-free synthesis of Biodiesel. Appl. Biochem. Biotechnol. 143: 236-243.
- [1]: <http://membres.Lycos.Fr/jcbouchez/EnzymeOK.htm/>
- [2]: <http://news.reseau.comcept.net/images/oiv/client/F.COEI.1-PRENE.pdf>.
- [3]: <http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2008/3437/pdf/the-Lipase-from-Candida-antarctica-ENDVERSION.PDF>.
- [4]: <http://www.oecd.org/dataoecd/43/5/33814422.pdf>.
- [5]: http://media.wiley.com/product.data/excerpt/75/35273049/35273049_75.pdf.

Glossaire :

Atomisation: est la fragmentation d'un liquide en gouttelettes.

Biodiesel: un biocarburant obtenu à partir d'huile végétale ou animale, transformé par un procédé chimique appelé transestérification faisant réagir cette huile avec un alcool.

Diastase: du grec «séparer», protéine agissant comme catalyseur de nombreuses réactions biochimiques, isolée d'un extrait de malt.

Clonage: dans la technologie de l'ADN recombinant, consiste à insérer et perpétuer un fragment d'ADN dans un vecteur.

Gel filtration: ou chromatographie d'exclusion moléculaire permet de séparer des molécules en fonction de leur poids moléculaire.

Lyophilisation : est la dessiccation d'un produit préalablement surgelé, par sublimation.

PCR: est une technique d'amplification génique c'est-à-dire qu'elle permet de réparer un fragment d'ADN ou un gène précis.

Solvant organique: est un liquide organique qui a la propriété de dissoudre et de diluer d'autres substances sans les modifier chimiquement et sans lui-même se modifier.

Nom et prénom:

*Laouaoudja Wafa

*Kahili Rima

*Kerada Yamina

Date de soutenance: 23/06/2008

Titre: Les applications industrielles des lipases microbiennes

Nature de Diplôme: Diplôme d'Etude Supérieure (DES)

Option: Microbiologie

Résumé :

Les lipases sont un groupe important d'enzyme pertinentes pour la biotechnologie et elles trouvent des applications immenses dans l'industrie alimentaire, détergents, pharmaceutiques,... Les lipases sont retrouvées largement dans les animaux et les plantes aussi bien que chez les microorganismes et elles sont généralement produites en présence de carbone lipidique comme les huiles ou les acides gras et en présence d'une source d'azote. Le plus souvent, l'enzyme est purifiée par la chromatographie d'interaction hydrophobique, en plus de quelques méthodes moderne. La plupart des lipases peuvent agir à une large gamme de pH et température, bien que les lipases bactériennes alcalines sont les plus communes. La limitation de l'utilisation industrielle de ces enzymes est principalement à cause de leurs coûts élevés, qui peuvent être dépassé par les technologies moléculaires, permettant la production de ces enzymes à grande quantité et à une forme presque purifiée.

Les mots clés: Lipases, biotechnologie, microorganismes, chromatographie, technologie moléculaire.

Summary:

Lipases are an important group of biotechnologically relevant enzymes and they find immense applications in food, detergent, pharmaceutical industries.... Lipases are widely found throughout the animal and plant kingdoms, as well as in microorganisms and they are generally produced on lipidic carbon sources, such as oils or fatty acids, in the presence of a nitrogen source. The enzyme is most commonly purified by hydrophobic interaction chromatography in addition to some modern methods. Most lipases can act in a wide range of pH and temperature, though alkaline bacterial lipases are more common. Limitations of the industrial use of these enzymes have mainly been owing to their high production costs, which may be overcome by molecular technologies, enabling the production of these enzymes at high levels and in a virtually purified form.

Key words: lipases, biotechnologically, microorganisms, chromatography, molecular technologies.

ملخص

يعتبر الليباز من الإنزيمات المهمة و التي تستعمل بشكل واسع في التكنولوجيا الحيوية ولها أهمية كبرى في الصناعات الغذائية والمنظفات والصناعات الصيدلانية.... وتوجد هذه الإنزيمات بكثرة عند الحيوانات و النباتات كما توجد ايضا عند الكائنات الدقيقة. ينتج الليباز عادة في وجود مصدر كربوني دهني مثل الزيوت و الاحماض الدهنية و كذلك في وجود مصدر للأزوت وتستخلص عموما بواسطة الكروماتوغرافيا بالاضافة الى بعض الطرق الحديثة الأخرى. اغلب إنزيمات الليباز فعالة في مجال واسع من الـ pH ودرجة الحرارة غير أن إنزيمات الليباز القاعدية ذات الأصل البكتيري هي الأكثر انتشارا. إن محدودية الاستعمالات الصناعية لهذه الإنزيمات تعود إلى الكلفة العالية للإنتاج، وهذه المشكلة يمكن التغلب عليها عن طريق التكنولوجيا الجزيئية التي تسمح بإنتاج هذه الإنزيمات بكميات كبيرة وبصورة شبه نقية.

الكلمات المفتاحية: الليباز، التكنولوجيا الحيوية، الكائنات الدقيقة، الكروماتوغرافيا، التكنولوجيا الجزيئية.