

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة المسيلة
UNIVERSITE DE M'SILA



MEMOIRE

Présenté

A LA FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

pour obtenir

Le Diplôme des Etudes Supérieures en Biologie (DES)

OPTION : **BIOCHIMIE**

par

Chicouche F, Djerar H. et Lebouazda K.

THEME :

Utilisation des lipases dans l'industrie alimentaire

Boulmaiz .S

M.A. Classe B

Encadreur

Reggami.Y

M.A. Classe B

Examineur

Promotion : 2010 / 2011



Remerciements

*Louange à dieu le tout puissant qui nous a donné le pouvoir, la santé et la
puissance pour terminé ce travail.*

Au terme de ce travail il nous sommes agréable de remercier avec gratitude

*l'encadreur de ce mémoire Mme: Boulmaiz Sara pour avoir accepter
d'encadrer ce sujet, pour ces précieux conseils, sa suivi et sa compréhension
afin de réaliser ce travail.*

*Nos remerciements vont aussi à tous qui de près ou de loin apporté aide et
soutien dans la réalisation de ce mémoire.*

Le membre de jury Mr Reggami Yassine .

*qui a bien voulu accepter leur lourds responsabilité pour procéder a
l'évaluation de ce modeste travail.*

Fatima/Hayat/Karima.

Sommaire

Introduction	01
Définition de lipases.....	02
Origine et classification	02
Mécanismes d'action.....	06
Mécanisme réactionnel	07
Propriétés et caractéristiques des lipases	08
L'immobilisation des lipases.....	09
Utilisation des enzymes dans les industries alimentaires.....	12
Autres utilisations.....	16
Conclusion	21
Bibliographie	22
Résumé.	

Introduction

Au 19^{ième} siècle, Payan découvrit la diastase (1833) et Bernard la lipase pancréatique (1849), nul ne pouvait imaginer qu'il s'agissait des premiers maillons d'une famille de biocatalyseurs susceptibles d'entraîner une révolution technologique 150 ans plus tard (1). Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes. Elles ont été mises en évidence, dès 1901, chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiousus*, *Bacillus pyocyaneus* et *Bacillus fluorescens*. Cependant, ce n'est qu'à partir de la fin des années 1950 que l'étude des lipases a réellement pris son essor, notamment avec les travaux de l'équipe de Desnuelle à Marseille sur les lipases pancréatique de porc (2).

1. Définition de lipases

Les triacylglycerol, acylhydrolase ou lipases (EC3, 1, 1,3), sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrat. En fonction du microenvironnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycérol. Chez de nombreux êtres vivants cette réaction est capitale de par son rôle physiologique majeur dans le métabolisme de graisses et de lipides.

De plus certaines lipases sont capables d'hydrolyser des phospholipides, des esters de cholestérol et même parfois certains esters synthétiques (1).

Le fonctionnement en milieu organique d'enzymes a été reconnu depuis plus de 30 ans, la question a été développée sur des lipases par Zaks et Klivanov. Ils ont montrés que plusieurs lipases pouvaient faire des réactions de trans-estérification dans des solvants organiques variés contenant 1% d'eau, la réaction revient à remplacer l'accepteur d'acide gras par un autre (acide,alcool)(3). Tout en présentant une certaine énantio-régio et chimio-sélectivité. Les lipases forment une classe d'enzymes hétérogènes de par leur origine, qu'elles soient animales, végétales ou microbiennes, ce qui augmente encore leurs potentialités. Toutes ces propriétés ont conduit au développement de nombreuses applications aussi bien au point de vue industriel, notamment dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie chimiques, qu'en médecine humaine (1)

2. Origine et classification

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 micro-organismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires.

2.1 Les lipases végétales

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

germination de la graine et au développement de la jeune plante. Les lipases végétales peuvent être classées en trois grands groupes. Le premier groupe est constitué par les triacylglycérol hydrolases qui sont principalement présentes dans les graines. Leur étude revêt une importance économique capitale puisqu'elles sont responsables en grande partie de l'altération des graines pendant le stockage. Les constituants du second groupe, dénommés acylhydrolases, sont présents dans divers tissus de la plante. Ces enzymes présentent peu de spécificité pour leur substrat ; elles sont incapables d'hydrolyser les triglycérides mais elles peuvent catalyser certaines réactions de transestérification. Les principales acylhydrolases sont les phospholipases A et B ; les glycolipases, les sulfolipases et les monoglycéride lipases. Le troisième groupe est constitué par les phospholipases C et D. Les liaisons hydrolysées par les phospholipases sont représentées à la figure 1

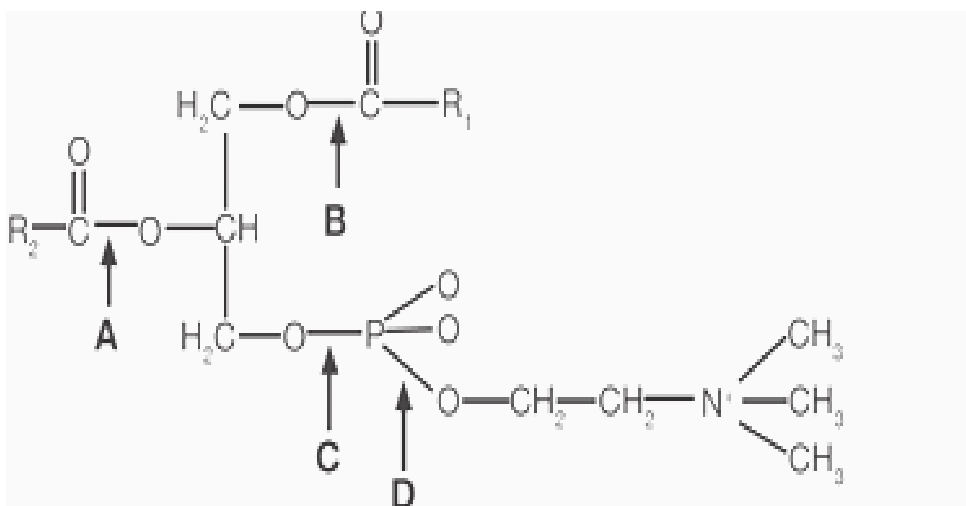


Figure 1 : liaison hydrolysée par les phospholipases(4)

Les lipases végétales interviennent également dans :

* le métabolisme, le réarrangement et la dégradation de la chlorophylle lors de la croissance et de la sénescence des feuilles ainsi que dans le processus de mûrissement des fruits. Par exemple, les chlorophylases (chlorophylle-chlorophylido hydrolases), présentes dans la membrane des thylakoïdes des chloroplastes, interviennent dans le catabolisme de la chlorophylle.

Chez les plantes supérieures, les lipases interviennent dans :

* la biosynthèse de transducteur intervenant dans les mécanismes de régulation ou de défense contre une variété de pathogènes. En effet, les oxylipines octadécanoïques telles que l'acide jasmonique sont synthétisées à partir d'acides gras, notamment d'acide α -linoléique, en présence de lipases membranaires

Certaines protéines végétales possédant une activité lipolytique peuvent avoir un effet cytotoxique pour les cellules animales. Par exemple, la ricine, une glycoprotéine isolée de la graine de *Ricinus communis*, induit le blocage de la synthèse des protéines par inactivation des ribosomes Leur étude a permis leur utilisation comme immunotoxines dans le traitement de certains cancers

D'un point de vue industriel, l'intérêt des lipases végétales n'a cessé de s'accroître depuis quelques années, notamment dans le domaine de la biotransformation de lipides. En effet, les lipases végétales sont facilement isolées à partir de graines et elles présentent des spécificités de substrat atypique comparées aux lipases microbiennes. Par exemple, la lipase des graines de colza (*Brassica napus*), obtenue par simple homogénéisation de graine dans un tampon adéquat, est utilisée industriellement dans la modification d'huile de tournesol ou dans l'enrichissement de l'huile de primevère en acide γ -linoléique.

2.1. Les lipases de mammifères

Les lipides constituent pour les mammifères une source énergétique essentielle et avantageuse de par leur faible densité. Chez l'homme, ainsi que chez d'autres vertébrés, les lipases interviennent dans :

*le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses. 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 chez le nouveau-né dont l'alimentation est riche en lipides. Les tissus adipeux contiennent également une lipase hormonosensible qui est activée par les hormones lipolytiques, telles que le glucagon, via un mécanisme de phosphorylation et déphosphorylation spécifique dépendant de l'AMP cyclique.

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, de la lipoprotéine lipase et de la lipase hépatique. Des études de la structure de leurs gènes suggèrent que ces différents enzymes dérivent d'un ancêtre commun. La lipase gastrique, sécrétée par la muqueuse gastrique, hydrolyse les lipides alimentaires dans l'estomac. Elle ne nécessite pas la présence de cofacteurs pour être active ; elle est stable et active à des valeurs de pH proches de 1 et elle est résistante à la pepsine ainsi qu'aux protéases gastriques.

La lipase pancréatique est le principal enzyme responsable de la digestion des lipides alimentaires. Elle agit principalement sur les diglycérides libérés par la lipase gastrique. Elle est sécrétée dans le duodénum et fonctionne à des pH légèrement alcalins, contrairement à la lipase gastrique. Les produits de la lipolyse sont, suite à son action, véhiculés à l'aide des agents tensioactifs naturels que sont les sels biliaires. L'activité de la lipase pancréatique peut s'exercer en présence ou en absence des sels biliaires. En leur absence, la lipase s'adsorbe d'abord à l'interface lipide / eau avant d'hydrolyser les esters carboxyliques. Par contre, en présence de ces sels biliaires, la lipase pancréatique est inactive, mais son activité est restaurée par un cofacteur protéique appelé colipase. Les sels biliaires sont essentiels pour l'assimilation des lipides. En effet, sans l'interface eau / lipide de l'émulsion formée avec les sels biliaires, la lipolyse des triglycérides serait 2 à 4 fois moins efficace.

La lipoprotéine lipase joue un rôle dans le métabolisme intermédiaire des lipides. Elle permet l'hydrolyse et l'absorption, par les tissus, des triglycérides transportés dans le sang sous forme de lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL). La lipase hépatique joue également un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines circulant dans le sang. Elle est capable d'hydrolyser les glycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol. Elle peut aussi catalyser la trans-estérification entre glycérides.

1.1. Les lipases microbiennes

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram + telles que celles des genres *Bacillus* et *Staphylococcus* que par des bactéries Gram – telles que *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*.

Bien que les premières lipases étudiées étaient d'origine animale, l'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé de s'accroître au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans des domaines très variés. Les lipases microbiennes présentent 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.

1.2. Les cutinases

Les cutinases sont des enzymes produites par différents champignons pathogènes et phytopathogènes tels que *Fusarium solani*, qui est l'agent responsable de la formation de mycétome chez l'homme ou tels que *Fusarium oxysporumradicis-lycopersici* qui est responsable de la pourriture de la racine et du collet chez la tomate et certaines céréales. Les cutinases sont capables de dégrader la cuticule des végétaux en clivant les liaisons esters des polymères de cutine. Elles sont également capables d'hydrolyser des triglycérides à courtes et longues chaînes d'acides gras avec une efficacité comparable à celle de la lipase pancréatique. Les cutinases sont des enzymes qui peuvent être apparentées aux lipases et estérases à la différence qu'elles ne nécessitent pas d'activation interfaciale pour être efficaces. Comme elles sont actives aussi bien en solution moléculaire vraie qu'en système biphasique, les cutinases sont en quelque sorte le lien entre estérases et lipases (4)

3.Mécanismes d'action

Le mécanisme d'action des lipases est identique à celui des protéases à serine qui a été étudié dès les années 60 sur différentes protéases telle que la chymotrypsine. Le mécanisme de catalyse fait appelle à une sérine particulièrement réactive, située au sein du site actif. La serine est activée par un relais de charge formé en amont par l'histidine et l'acide aspartique (ou l'acide glutamique) de la triade catalytique(5).

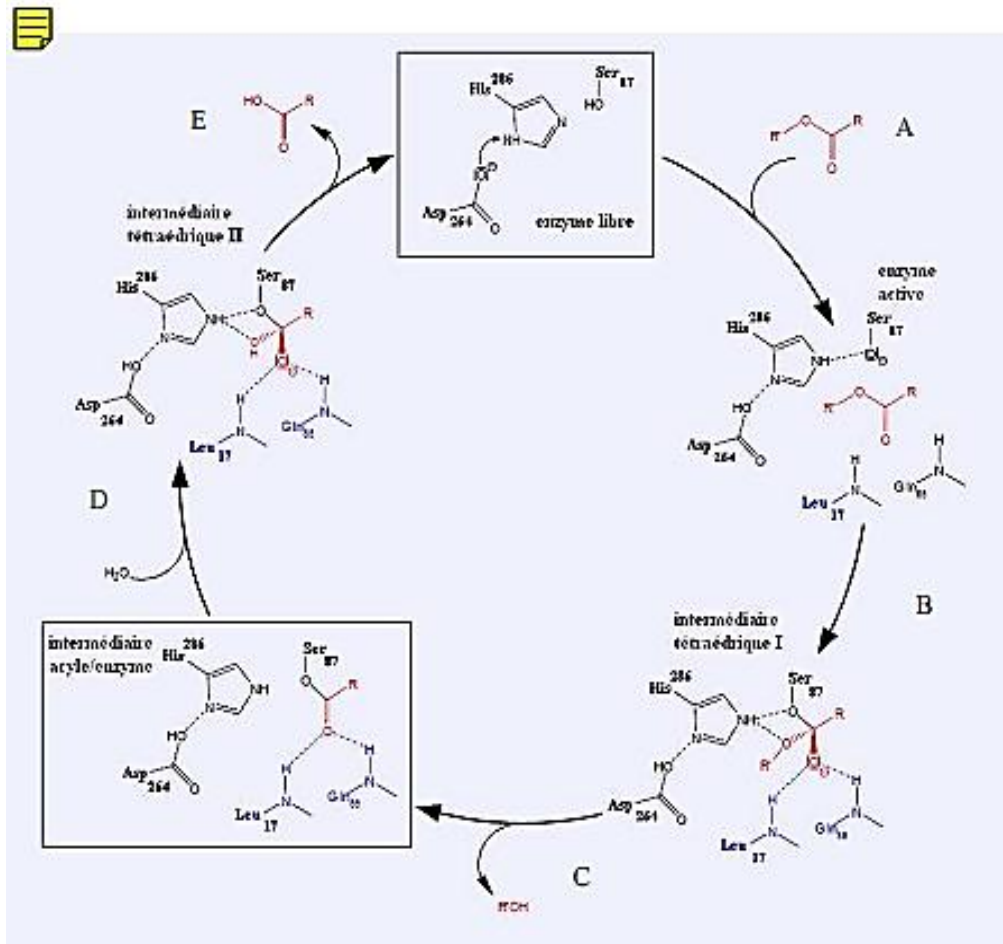


Figure 2 : schématisation de l'hydrolyse d'un ester par une enzyme lipolytique d'après Fischer, 2004 , (5).

4.Mécanisme réactionnel

En milieu aqueux, les lipases catalysent spécifiquement l'hydrolyse de liaisons esters dans des systèmes diphasiques, à l'interface entre la phase aqueuse dans laquelle elles sont solubilisées et la phase apolaire constituée par l'ester d'acide gras non solubilisé. Cette réaction constitue la fonction première de lipases dont les substrats naturels sous forme d'émulsion sont les tri-acylglycérols .IL en résulte la libération de mono- et di-acylglycérols ,de glycérol et d'acides gras .Cette activité hydrolytique trouve des applications dans de nombreux secteurs industriels comme l'industrie laitière pour la production d'arômes ou dans le traitement des effluents . Dans les milieux pauvres en eau, les lipases catalysent la réaction inverse, c'est – à – dire la synthèse de liaisons esters. En fonction de la quantité d'eau libre présente dans le milieu, c'est l'une ou l'autre de ces deux réactions qui se trouve favorisée. La synthèse d'une liaison ester, qu'elle soit catalysé par une lipase ou par un agent chimique, peut se faire selon trois schémas réactionnels :

- La réaction d'estérification directe entre un acide et un alcool.
- La réaction de trans-estérification qui regroupe :
 - ✓ La réaction d'alcoolyse (ester + alcool = ester ' + alcool')
 - ✓ La réaction d'acidolyse (ester + acide = ester ' + acide')
- La réaction d'inter-estérification (ester + ester '=ester'' + ester''')

Dans ce dernier cas , les lipases catalysent la coupure puis la synthèse de liaisons esters de façon séquentielle le terme estérification fait référence à la réaction entre un acide et un alcool , toute fois les lipases présentent en réalité un spectre de substrats beaucoup plus large et sont capables de transférer un groupe acyle sur des atomes autre que l'oxygène comme le soufre et l'azote , créant ainsi des liaisons thioesters et amides (6) .

Hydrolyse	$R_1\text{-COOR}_2 + \text{H}_2\text{O}$	\rightarrow	$R_1\text{-COOH} + R_2\text{-OH}$
Estérification	$R_1\text{-OH} + R_2\text{-COOH}$	\rightarrow	$\text{H}_2\text{O} + R_2\text{-COOR}_1$
Acidolyse	$R_1\text{-COOH} + R_2\text{-COOR}_3$	\rightarrow	$R_2\text{-COOH} + R_1\text{-COOR}_3$
Alcoolyse	$R_1\text{-OH} + R_2\text{-COOR}_3$	\rightarrow	$R_3\text{-OH} + R_2\text{-COOR}_1$
Interestérification	$R_1\text{-COOR}_2 + R_3\text{-COOR}_4$	\rightarrow	$R_1\text{-COOR}_4 + R_3\text{-COOR}_2$

Figure 3: Diversité de réaction catalysée par une lipase (5)

3. 5. Propriétés et caractéristiques des lipases

4. Les lipases sont déclarées être des protéines monomériques, ayant un poids moléculaire de l'ordre de 19-60 kDa. Les propriétés physiques des lipases dépendent principalement de facteurs tels que la position de l'acide gras dans le squelette de glycérol, la longueur de la chaîne de l'acide gras, et son degré d'insaturation. Ces fonctions ont également une incidence sur la valeur nutritionnelle et sens réelle d'une donnée triglycérides. Beaucoup de lipases sont actifs dans les solvants organiques où ils catalysent un certain nombre d'outils y compris les réactions d'estérifications. L'activité de la lipase dépend généralement de la disponibilité de grande surface et exige une extrémité des conditions douces. Plusieurs études structurales sur les lipases ont fourni

des indices à la compréhension de l'activité hydrolytique, activation interfaciale et stéréosélectivité (7).

5. 6.L'immobilisation des lipases

Les lipases sont des enzymes capables de catalyser l'hydrolyse d'esters glycéridiques en milieu aqueux et la synthèse d'esters en milieu non-aqueux. Elles sont de ce fait capables de catalyser un grand nombre de réactions d'intérêt industriel. Que ce soit par inclusion, par adsorption ou par liaison covalente, l'immobilisation des lipases vise à leur conférer une bonne stabilité, permettant une réutilisation des enzymes après une réaction et le développement de procédés en continu. Les réactions d'hydrolyse de triglycérides constituent l'application première des lipases immobilisées, mais leur utilisation dans divers types de réactions d'estérification s'est également mise en place : il existe des procédés faisant intervenir des réactions de transestérification, d'interestérification ou de synthèse d'esters. La production de lipides structurés par interestérification est un exemple. Bien que les conditions réactionnelles sont différentes de celles de l'hydrolyse, les mêmes lipases sont utilisées dans les deux cas. Une lipase spécifiquement adaptée à l'estérification pourrait pourtant constituer un outil performant : une série de stratégies est en cours afin d'atteindre ce but(8).

6-1. Immobilisation par inclusion

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière dans la matrice d'un polymère ou dans une microcapsule. Plusieurs polymères, entre autres l'alginate, le chitosan, le gel de polyacrylamide et le gel d'amidon, sont utilisés dans l'immobilisation par inclusion.

L'alginate est un polysaccharide présent chez les algues brunes ou *Phaeophyceae*, sous forme d'un mélange de sel (sodium, potassium, calcium, magnésium et d'acide alginique). L'acide alginique est un polymère constitué de résidus d'acides uroniques : -D-mannuronique. Les acides uroniques sont dérivés de L-guluronique et acides monosaccharides simples dans lesquels le groupe hydroxyle primaire en C6 a été oxydé en acide carboxylique correspondant. Par exemple, l'acide Dmannuronique est dérivé du D-mannose. L'alginate est principalement extrait à partir de *Macrocystis pyrifera*. L'alginate est l'un des polymères le plus fréquemment utilisé pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité. La gélification qui est l'une des principales propriétés des alginates est due au fait qu'ils réagissent avec les cations divalents (sauf le magnésium) et précipitent lorsque ces cations sont en excès. Les lipases de *Candida rugosa* ont été immobilisées par inclusion dans l'alginate.

Le chitosan est un polysaccharide composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine liée par β -(1-4) (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée). Le chitosan est obtenu par désacétylation de la chitine, un composé particulièrement abondant dans les carapaces de crustacés. Pour permettre à la molécule d'être soluble dans la plupart des acides, la désacétylation libère les groupes amines (NH₂) et confère au chitosan une nature « cationique » en milieu acide, ce qui est particulièrement intéressant du fait que la plupart des polysaccharides du même type, sont le plus souvent neutres ou négativement chargés. ont ainsi immobilisé la lipase de *C. rugosa* dans du chitosan.

6.2. Immobilisation par adsorption

Parmi les diverses techniques d'immobilisation, l'adsorption demeure la méthode la plus simple et la plus rentable. Différents supports, tels que la silice, les billes de verre poreux, l'alumine, la terre diatomée, la célite et le charbon actif ont déjà été exploités pour l'immobilisation d'enzymes. Différents types de liaisons interviennent dans les réactions d'adsorption à savoir l'échange d'ions, les interactions de Van Der Waals et la liaison hydrogène. La concentration en enzyme, le temps de contact, le pH et la quantité du support sont des paramètres qui influencent l'adsorption. La célite est utilisée comme support d'adsorption dans la plupart des applications industrielles des lipases et ce, en raison de son caractère poreux. Les lipases de *Rhizomucor japonicus*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *C. rugosa*, *Rhizopus delemar*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae* et *Chromobacterium viscosum* ont été immobilisées par simple adsorption sur la célite.

Le gel de silice compte parmi les principales substances adsorbantes et se prête à de nombreuses applications. C'est une forme d'acide silicique composé de granulés irréguliers et poreux. Les produits de base sont essentiellement le silicate de sodium et l'acide sulfurique. Ces substances sont exposées à une réaction chimique et produisent un gel de silice très riche en SiO₂. ont immobilisé les lipases de pancréas de porc, de *P. cepacia*, de *Candida antarctica* sur la silice mésoporeuse hexagonale par simple adsorption. Le gel de silice est compatible avec tous les matériaux à l'exception des substances fortement alcalines et l'acide fluorhydrique.

6.3. Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le souci d'obtenir des liaisons très solides entre enzymes et supports. Pour la réalisation de la liaison covalente, il faut une activation préalable soit du support soit de l'enzyme car les groupes fonctionnels de l'enzyme ne sont généralement pas suffisamment réactifs. Mais c'est surtout l'activation des supports d'adsorption qui a fait l'objet de nombreuses études car l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme est délicate et peut conduire à la dénaturation de l'enzyme. Un carbodiimide est un groupe fonctionnel de type $N=C=N$. En chimie organique synthétique, les composés contenant la fonctionnalité de carbodiimide sont des agents de déshydratation et sont souvent employés pour activer les acides carboxyliques vers la formation d'amide ou d'ester et ont l'avantage d'avoir une très faible toxicité pour l'enzyme. La lipase de *C. rugosa* a été immobilisée par liaison covalente sur les billes de chitosan dont les groupements hydroxyles ont été préalablement activés par le carbodiimide. La lipase du pancréas de porc a été immobilisée sur polyacrylamide activé par le carbodiimide et a ainsi été appliquée à l'hydrolyse de l'huile d'olive. Le glutaraldéhyde (dialdéhyde comportant cinq atomes de carbone) est également utilisé pour former des liaisons covalentes. C'est un liquide visqueux et incolore qui se présente normalement en une solution aqueuse limpide et incolore. Pour l'immobilisation par liaison covalente, le glutaraldéhyde, ayant deux sites réactifs, va servir de pont entre les fonctions $-NH_2$ du support et de l'enzyme. Les films de chitosan activés par le glutaraldéhyde ont été utilisés pour l'immobilisation

de la lipase de *Candida cylindracea* et de *Syncephalastrum racemosum*. Certains supports tels que la carboxyméthylcellulose sont obtenus par l'action de l'acide chloroacétique sur la cellulose. Celle-ci a permis d'immobiliser plusieurs enzymes après activation par le carbodiimide, l'azoture, les triazines, etc. Les lipases de *M. javanicus* et de *R. oryzae* ont été immobilisées sur la carboxyméthylcellulose afin d'être appliquées à la synthèse d'ester(9).

7. Utilisation des enzymes dans les industries alimentaires

7.1. Les enzymes :

Enzyme	Application	Secteur
Protéase	Dégradation des protéines	Détergents
Cellulase	Dégradation de la cellulose	Détergents
Lipase	Dégradation des lipides	Détergents
Amylase	Dégradation de l'amidon	Détergents
Amylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucoamylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucose isomérase	Production du sirop de glucose à haute teneur en fructose	Traitement de l'amidon
Xylanase	Améliorer l'assimilation des nutriments chez les volailles	Aliments pour animaux
Phytases	Améliorer la disponibilité des nutriments	Aliments pour animaux
Protéases	Améliorer la digestion des protéines	Aliments pour animaux
Xylanase	Élimination du lignine « blanchiment biologique »	Papeterie
Arabinase	Élimination du trouble après macération	Traitement des fruits et légumes
Amylase	Élimination du trouble d'amidon dans les jus	Traitement des fruits et légumes
Polygalacturonanase	Augmenter le rendement en jus	Traitement des fruits et légumes
Hydrolases	Casser les gels de bio polymères	Gaz et pétrole
Chymosine	Caillage lors de la production de fromages	Produits laitiers
Uréase	Élimination de l'urée	Vin
Pectinase	Augmenter le rendement en jus	Vin
Protease	Attendrissement des viandes	Boucherie
Amylase	Désencollage	Textiles
Amylase	Contrôle de procédé	Boulangerie
Bêta-glucanase	Éviter les problèmes de filtration	Bière
protéase	Augmenter le rendement de surface	tannerie

Tableau : Enzymes industrielles et leurs utilisations(10).

Aujourd'hui, la plupart des applications pour les enzymes industrielles se trouvent dans l'industrie alimentaire. L'application de la technologie enzymatique débuta dans les années 1960 avec l'utilisation de la glucoamylase pour augmenter le rendement et la pureté du

glucose produit à partir de l'amidon ainsi que pour faciliter la cristallisation lors de ce procédé. cette application a très vite remplacé les méthodes classiques d'hydrolyse acide, à faible rendement, et a permis de réduire de 30% le cout lié à la vapeur d'eau, de 50% la production de cendres et de 90% la production de sous-produit. Le grand développement suivant fut l'invention de la glucose-isomérase immobilisée en 1973, ce qui a permis pour la première fois la production industrielle des sirops de glucose à forte teneur en fructose à partir de l'amidon. Parmi les autres grandes applications, on peut citer l'utilisation de l'amylase pour garder la fraîcheur du pain et des gâteaux, l'utilisation de la protéase, de l'amylase et de la glucanase pour la production efficace de la bière, l'utilisation des protéases d'origine alimentaire ou autre (la présure) de la lipase, du lysozyme et de la β -galactosidase dans la production du fromage et d'autre produits laitiers, l'utilisation de la pectine-lyase et de la cellulase pour la production du jus et de la purée de carotte, et l'utilisation de la protéase pour l'attendrissement des viandes et pour améliorer les propriétés de solubilité, de mise en émulsion, de gélification ou de moussage de divers autres produits alimentaires (10).

7.2 Les lipases

a) Lipase dans l'industrie alimentaire

Les graisses et les huiles sont des constituants importants des aliments. La valeur nutritionnelle et sensorielle et des propriétés physiques d'un triglycéride sont fortement influencées par des facteurs tels que la position de l'acide gras dans le squelette de glycérol, la longueur de la chaîne de l'acide gras, et son degré d'insaturation. Les lipases nous permettent de modifier les propriétés des lipides en modifiant l'emplacement de chaînes d'acides gras dans les glycérides et remplaçant une ou plusieurs des acides gras par des neuves. De cette façon, un lipide relativement peu coûteux et moins désirable peut être modifié pour une plus grande valeur matières grasses. Le beurre de cacao, matière grasse de grande valeur, contient des acides palmitique et stéarique et a un point de fusion d'environ 37 ° C de beurre de cacao dans la bouche produit un refroidissement souhaitable sensation dans les produits comme le chocolat. la technologie à base de lipase hydrolyse impliquant mixtes et les réactions de synthèse est utilisée commercialement pour mettre à niveau certains des graisses moins souhaitable de succédanés du beurre de cacao .

Une version de ce procédé utilise lipase immobilisé de *Rhizomucor miehei* pour la réaction de transestérification qui remplace l'acide palmitique dans l'huile de palme avec de l'acide stéarique. De même, Pabai décrit une interestérification catalysée par la lipase de matières grasses du beurre qui a entraîné une considérable diminution de la longue chaîne d'acides gras saturés et une augmentation correspondante de C18: 0 et C18: 1 des acides en position 2 du triacylglycérol sélectionné. En raison de leurs effets métaboliques, les AGPI sont de plus en plus utilisés comme produits pharmaceutiques, nutraceutiques et des additifs alimentaires les acides gras polyinsaturés sont essentiels pour la synthèse normale des membranes lipidiques et les prostaglandines. Lipases microbiennes sont utilisées pour obtenir des AGPI à partir des lipides animaux et végétaux comme le menhaden huile, huile de thon, et l'huile de bourrache. Free AGPI et leurs mono-et diglycérides sont ensuite utilisés pour produire une variété de produits pharmaceutiques, y compris anticholesteroleemics, anti-inflammatoires, et les agents thrombolytiques. En outre, les lipases ont été utilisées pour le développement de saveurs dans l'affinage du fromage, produits de boulangerie, et boissons. En outre, les lipases sont utilisées pour faciliter l'élimination de matières grasses à partir de produits de viande et de poisson(11).

b) L'utilisation des lipases dans l'industrie de pain :

Dans la farine de blé, il y a aussi des lipides polaires, notamment des phospholipides et des glycolipides, qui peuvent être hydrolysés par des lipases ou phospholipases spéciales et sont ensuite plus hydrophiles. Cette formation in situ d'émulsifiants conduit certes à un renforcement de la pâte et à un plus fort volume, mais elle n'améliore pas la durée de conservation, contrairement à ce qui se produit lorsqu'on ajoute des mono et des diglycérides dans une formulation de pain. On sait qu'en raison de leur interaction avec l'amidon, ces composés sont à même de réduire le rassissement. D'un autre côté, ils n'ont qu'un effet très limité sur le volume du pain. Il est très probable que si l'action des émulsifiants formés par voie enzymatique est aussi marquée à cet égard, c'est parce qu'ils sont déjà placés aux bons endroits de la pâte pour pouvoir en améliorer les propriétés. Par contre, il ne se forme pas suffisamment d'émulsifiant pour interférer avec la dégradation de l'amidon et avoir un effet anti-rassissement. Il est intéressant de noter qu'il existe une controverse quant à la nécessité d'ajouter de la matière grasse dans la pâte (et dans l'affirmative, quelle matière grasse) pour que les lipases donnent un résultat satisfaisant. Les travaux qu'ils ont effectués ont montré qu'un ajout de matière grasse réduisait l'efficacité de la lipase en « détournant » celle-ci pour

ainsi dire de son véritable objectif, c'est-à-dire les lipides de la farine. Il existe également un problème d'altération possible du goût qui est dû à la libération d'acides gras, en particulier lorsqu'il y a du beurre dans la pâte. Mais quoi qu'il en soit, les lipases se révèlent indéniablement d'une grande utilité dans certains champs d'application (12).

c)La lipolyse dans le lait :

La lipolyse est une hydrolyse enzymatique de la matière grasse (triglycéride) du lait au travers de laquelle sont formés des acides gras libres ainsi que des mono- et diglycérides. Ce processus de saponification de la matière grasse contribue à la saveur du fromage, mais peut aussi causer un mauvais goût tel que le rancissement. L'influence négative de la saveur repose sur la libération excessive des acides gras volatils butyrique (C4) et caproïque (C6). Dans le beurre, à partir d'une concentration de 4 mg/kg d'acide butyrique, l'odeur spécifique durable est perceptible.

d)La lipolyse dans le fromage à pâte dure :

Des examens microscopiques effectués sur des fromages à pâte dure après pressage ont montré qu'une partie importante de la matière grasse se trouve à l'état libre. On pourrait en conclure qu'il y a suffisamment d'acides gras libres et que l'endommagement de la matière grasse du lait ne joue aucun rôle par rapport à l'apparition du goût rance. Cependant, cette conclusion ne concorde pas avec les résultats des essais d'ALP. En effet, ceux-ci ont montré que non seulement l'état de la graisse jouait un rôle important, mais également l'activité lipasique. Des essais d'ALP effectués sur des fabrications de fromages du type Gruyère confirment qu'une teneur élevée en acides gras libres dans le lait de chaudière ne donne pas nécessairement un goût de rance au fromage. L'acide butyrique, qui produit un arôme désagréable, est très soluble dans l'eau et reste dans le lactosérum, il est donc difficilement détectable dans le fromage jeune. Par contre, des quantités moins importantes d'acide caproïque (C6) (rapport C4:C6 dans la matière grasse du lait \approx 3:1) peuvent être mesurées dans un jeune fromage, l'acide caproïque étant moins soluble dans l'eau que l'acide butyrique. L'acide caproïque devient sensoriellement perceptible et donne une saveur désagréable à partir d'environ 0,2 mmol/kg.

Pour les fromages à pâte dure, le point important est la libération d'acides gras au cours de l'affinage. Des études ont également montré que l'activité de la lipase dans le fromage à pâte dure à 24 heures est généralement très faible. Il y a deux raisons à cela :

➤ Le traitement thermique : le couple temps-température (>50 °C) infligé au caillé lors de la fabrication et sous presse inactive une grande partie des lipases du lait.

Le pH : les lipases ne sont pas détruites, mais elles sont peu actives à un pH voisin de 5,20 à 24 h (pH optimum =8,5). Cependant, au cours de la maturation, la lipolyse est à nouveau activée en raison de l'augmentation du pH. De ce fait, la durée de maturation est un facteur déterminant, même une faible activité la lipase peut avoir un effet négatif sur le goût lors d'une longue période d'affinage. Avec un pH élevé (pH > 6,5), l'odeur de rance est moins bien perceptible sensoriellement, car les acides gras libres se lient à des sels et deviennent non-volatils. Cela se confirme avec les fromages bleus, malgré une activité intense des lipases et une teneur en n-caproïque avoisinant les 5 mmol/kg (Gruyère 6 mois : 0.1-0.2 mmol/kg), le goût de ce fromage n'est pas perçu comme rance (13).

8. Autres utilisations

Les lipases sont largement utilisés dans la transformation des graisses et des huiles, détergents et de formulations dégraissage, la transformation des aliments, la synthèse de la chimie fine et les produits pharmaceutiques, la fabrication papier, et la production de produits cosmétiques et des produits pharmaceutiques. La lipase peut être utilisée pour accélérer la dégradation des gras déchets et le polyuréthane. La plupart des lipases microbiennes industrielles sont issus de champignons et des bactéries.

8.1 Lipases dans l'industrie des détergents

De graisses hydrolyse, les lipases trouver une utilisation comme additifs dans les grands industriels détergents à lessive et le ménage. Lipases détergent sont spécialement sélectionnées pour répondre aux conditions suivantes:

- une spécificité de substrat faible, c'est à dire une capacité à hydrolyser les graisses de compositions différentes,
- la capacité de résister relativement sévères conditions de lavage (pH 10-11, 30-60 C),
- la capacité de résister à des tensioactifs et enzymes nuisibles [par exemple, un groupe alkyle linéaire sulfonates de benzène (LAS) et protéases, qui sont

des ingrédients importants de détergent de nombreuses formulations. Lipases ayant les propriétés souhaitées sont obtenues par une combinaison de dépistage continu et des protéines.

8.2 Lipase dans l'industrie de papiers

"Pitch", ou des composants hydrophobes de bois (principalement de triglycérides et de cires), les causes de graves problèmes dans des pâtes et papiers. Les lipases sont utilisées pour supprimer la hauteur de la pâte produite pour la fabrication du papier. Nippon Papier Industries, le Japon, ont développé une méthode de commande de pâtes qui utilise la lipase *Candida rugosa* fongiques hydrolyser jusqu'à 90% des triglycérides.

8.3 Les lipases en synthèse organique

L'utilisation de lipases dans la synthèse chimique et organique est de plus en plus importante. Les lipases sont utilisées pour catalyser une grande variété de chimio-, régio-et stéréo sélective transformations. La majorité des lipases utilisées comme catalyseurs dans la chimie organique sont d'origine microbienne. Ces enzymes travaillent à l'interface hydrophile-lipophile et tolèrent des solvants organiques dans la réaction mélanges. L'utilisation de lipases dans la synthèse de composés énantiopurs a été discuté par Berglund et Hutt. Les enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides non miscible à l'eau à l'eau-liquide interface. Dans des conditions données, la quantité d'eau dans le mélange réactionnel déterminera la direction de la réaction catalysée par une lipase. Quand il y a peu d'eau ou non, seulement estérification et la transestérification sont favorisés. L'hydrolyse est la réaction favorisée lorsqu'il est l'excès d'eau. Réactions catalysées par la lipase dans des solvants super critique sont été décrits.

8.4 Lipases de bioconversion en milieu aqueux

L'hydrolyse des esters est généralement effectuée par la lipase en deux phases des milieux aqueux un rapport sur l'hydrolyse du p-nitrophényl palmitate (pNPP) dans le n-heptane par une préparation de lipase de *P. cepacia*. Jaeger et Reetz utilisé lipase piégé dans un hydrophobe matrice sol-gel pour une variété de transformations. Mutagenèse a été utilisée pour améliorer considérablement l'énantio-sélectivité des lipases.

Par exemple, dans un cas, l'énantiosélectivité de lipase catalyser hydrolyse d'un ester chiral (lipase de *P. aeruginosa*) a été augmenté de 2% à 81% en seulement quatre cycles de mutagenèse. La lipase-transférase acyl de *C. parapsilosis* a été montré pour catalyser la biosynthèse des acides gras hydroxamique dans un liquide biphasique / aqueuse moyennes. Les substrats de la réaction ont été donneurs d'acyle (acide gras ou ester méthylique d'acide gras) et une hydroxylamine. Le transfert du groupe acyle d'un ester donateurs à hydroxylamine (Aminolyse) a été catalysé par préférence par rapport à la réaction d'acides gras libres. Ce métrage de la *C. parapsilosis* enzyme le catalyseur de choix pour la bioconversion directe des huiles en milieu aqueux. Yeo fait état d'une lipase romane produite par *Burkholderia*., qui pourrait hydrolyser préférentiellement un ester encombrant, t-butyle octanoate (TBO). Cette lipase a été confirmée à 100 fois supérieure à lipases commerciales fonction de son activité TBO-hydrolyse.

8.5 Lipases en bioconversions dans les milieux organiques

Les enzymes en milieu organique, sans une phase aqueuse sans sont connus pour afficher utiles propriétés inhabituelles, ce qui a solidement établi non aqueux systèmes enzymatiques pour la synthèse et biotransformations. Les lipases ont été largement étudiées pour divers biotransformations non aqueux.

8.6 Lipases dans la résolution des acides et des alcools racémiques

La stéréo-sélectivité des lipases a été utilisée pour résoudre les différents mélanges racémiques d'acides organiques non miscibles dans des systèmes biphasiques. Alcools racémiques peuvent également être résolus en énantiomériquement pures formes par transestérification catalysée par la lipase. Arroyo et Sinisterra a signalé que la réaction d'estérification en milieu non aqueux en utilisant la lipase B de *C. antarctica* a été stéréosélective vers le R-isomère du kétoprofène dans un solvant achiral telles que la méthylisobutylcétone et (S +)-carvone. Dans une étude, une préparation de lipase purifiée à partir de *C. rugosa* a été comparée à son brut contre partie sous forme anhydre et légèrement hydratée solvants organiques hydrophobes. Le purifié préparation de lipase a été moins actif que l'enzyme brut dans le n-heptane sec, tandis que le présence d'une faible concentration d'eau de façon spectaculaire activé l'enzyme purifiée, mais pas l'enzyme brut dans l'estérification du 2 racémique - (4-chlorophénoxy) propanoïque avec n-butanol . Profènes (2-aryl acides propinoic), un groupe anti-inflammatoires non stéroïdiens important de médicaments, sont pharmacologiquement active principalement dans la forme (S)-

énantiomère. Par exemple, (S)-ibuprofène [(S)-2-(4-isobutylphényl) propinoïque] est 160 fois plus puissant que son antipode en inhibant la synthèse des prostaglandines. Par conséquent, beaucoup d'efforts sont faits pour obtenir optiquement pure profène par synthèse chimique asymétrique, catalytique résolution cinétique, la résolution de racémate par cristallisation, et des séparations chromatographiques chirales.

Micro-organismes et enzymes se sont révélés particulièrement utiles dans la résolution de mélanges racémiques. Ainsi, pure (S)-ibuprofène est obtenu en utilisant la lipase catalysée par résolution cinétique par hydrolyse ou estérification. De même, le 2-phénoxy-1-propanol a été résolu en utilisant ses énantiomères *Pseudomonas sp.* Les lipase par transestérification énantiosélective, thioestérification sans solvant d'acides gras avec des thiols à longue chaîne catalysée par des lipases de *C. antarctica* et *R. miehei*. Aussi, sans solvant trans-thioestérification des esters méthyliques d'acides gras avec des thiols alcane a été signalé.

8.7 Lipases dans acylations régiosélective

Les lipases acylate certains stéroïdes, sucres et dérivés de sucre avec une régiosélectivité élevée. Les composés monoacylé sucrés ont été produits dans la pyridine anhydre de triéthyle carboxylates et différents monosaccharides. En revanche, Chen et autre utilisés une lipase du Niger A. pour catalyser la désacylation régio-sélective de méthyle preacylated b-D-glucopyranoside. De même, Kodera et al, désacétylation régiosélective de dérivés de monosaccharides preacetylated dans le 1, 1,1-trichloroéthane en utilisant une lipase modifiée avec du polyéthylène glycol.

8.8 Lipases dans la synthèse d'ester

Les lipases ont été utilisés avec succès en tant que catalyseur pour la synthèse d'esters. Les esters produite à partir d'acides gras à chaîne courte ont des applications que des agents aromatisants dans l'industrie des aliments. Esters méthyliques et éthyliques d'acides à longue chaîne ont été utilisés pour enrichir des carburants diesel. Du et al a étudié l'estérification de l'acide lactique acides et alcools à l'aide d'une lipase de *C. antarctica* dans l'hexane. Estérification de cinq isomères de position des acides gras acétyléniques (différentes longueurs de chaîne) avec du n-butanol a été étudié par Lie et al. A l'aide de huit différentes lipases. Arroyo et al a noté que une valeur optimale de activité d'eau prééquilibre a été nécessaire pour obtenir un taux élevé d'estérification de (R, S)-ibuprofène. Un rapport sur l'estérification des acides gras sulcatol et dans le toluène,

catalysée par la lipase *C. rugosa*. en utilisant la lipase immobilisée sur silice et microémulsion à base de organogels, pour la synthèse d'esters.

8.9 Les lipases dans l'industrie oléochimique

L'utilisation de lipases dans le traitement oléochimique économise l'énergie et minimise la dégradation thermique au cours de l'alcoololyse, acidolyse, l'hydrolyse et glycérolyse . Bien que les lipases sont conçus par la nature pour le clivage hydrolytique obligatoire de l'ester de triacylglycérol, lipases peuvent catalyser la réaction inverse (ester de synthèse) dans un milieu aqueux environnement. L'hydrolyse et l'estérification peut se produire simultanément dans un processus connu sous le nom de l'interestérification. Selon les substrats, les lipases peuvent catalyser l' acidolyse (où un groupement acyle est déplacé entre un glycérol acyle et un acide carboxylique), l'alcoololyse (où un groupement acyle est déplacé entre un glycérol acyle et un alcool), et la transestérification (où deux groupements acyle sont échangés entre deux acylglycérol (11).

Conclusion :

Les lipases sont des enzymes ubiquistes que l'on retrouve aussi bien chez les organismes inférieurs tels que les bactéries, champignons ou levures que chez les organismes supérieurs tels que les plantes et les animaux. Bien que leurs origines et leurs spécificités de substrat soient très variées, le centre catalytique de l'enzyme possède la même architecture tridimensionnelle. Ce qui rend ces enzymes atypiques, c'est qu'elles sont actives aussi bien en phase aqueuse qu'en milieu solvant. C'est pour toutes ces raisons que l'intérêt que portent les scientifiques ainsi que le monde industriel sur l'étude des lipases n'a cessé de croître au cours de ces dernières années. La position de l'industrie agroalimentaire est positive à l'égard des nouvelles technologies. En effet celles-ci peuvent apporter des solutions en particulier à des risques sanitaires. Pour appuyer sa position, l'ANIA a montré, par un exemple précis, qu'une nouvelle technologie pouvait réduire la teneur en composés néoformés indésirables obtenus lors des opérations de chauffage et de cuisson. La « nouvelle technologie » utilisée est l'utilisation d'enzymes issues d'organismes auto-clonés, ou génétiquement modifiées afin de réduire le taux d'acrylamide, substance potentiellement cancérigène.

Bibliographie :

1. . <http://membres.multimania.fr/jcbouchez/ENZYMEOK.html>
2. Fickers P. Destain J, Thnart Ph, Les lipases sont des hydrolases atypique : principaux caractéristiques et application ;2008 ;Biotechnol.Agro.Soc.Environ ;119-130.
3. Jean Palment ; Enzymes ; 1993 ; office des publications universitaires 1, (Alger).
4. [http:// popups.ulg.ac.be/Base/document .php? id:2125](http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id:2125)
5. Stephanie Godet; Isolement et caractéristique de trois gènes codant une lipase et deux estérases hypothétiques chez la microalgue marine *Isochrysis galbana*(*Prymnesiophyceae, Haptophyta*) (Thèse de doctorat) ;2008 ; p 28 .
6. [Pegase.scd.inpl-nancy.fr/theses/2008_Husson_E.pdf](http://pegase.scd.inpl-nancy.fr/theses/2008_Husson_E.pdf).
7. Aravindan R, Anbumathi Viruthagiri P et T , Indian Journal of Biotechnology Vol 6, avril 2007, pp 141-158
8. Aimée w, Alloue M , Aguedo M, Destain J , Ghalfi H , Bleker C , watlet G-P , Tonart Ph, Les enzymes immobilisées et leurs applications ; 2008; Biotechnologie, Agro, Soc, page : 57-68.
9. <http://www.bib.fsagx.ac.be/base/text/v12n1/57.pdf>
10. Simon J. Charnock et Barry V. McCleary ; les enzymes : appilcation industrielles et analytiques ; 2005 ; Techniques
11. Sharma R, Chisti Y, Chand Banerjee U ,Production, Purification , characterization and applications of lipases , 2001;Biotechnology advances ,p (4...8)
- 12 . <http://www.muehlenchemie.de/downloads-expertenwissen/mc-enzyme-popper-fr.pdf>
- 13 http://www.agroscope.admin.ch/data/publikationen/1302698805_af83_f_web.

Résumée

Tous les organismes vivants, des bactéries jusqu'à l'être humain ,dépendent pour leur existence de catalyseur biologiques , appelés " enzymes " .

les industries se trouvent parmi les premières à reconnaître et exploiter l'énorme potentiel des enzymes, car ils ont compris que s'il était possible d'accélérer les réactions , les procédés de production pourraient être réalisés en beaucoup moins de temps , avec des matières premières moins chère .

Notre travail vise à étudier l'un de ces enzymes .Les lipases sont largement répandues dans la nature. on les retrouve aussi bien dans le règne végétal. Chez les invertébrés et les vertèbres mais également chez de nombreux microorganismes , principalement sous forme de protéines extracellulaires. Que ce soit par inclusion ,par adsorption ou par liaisons covalents l'immobilisation des lipases vise à leur conférer une bonne stabilité , permettant une réutilisation des enzymes. Elles sont capables de catalyser un grand nombre de réactions d'intérêt industriel .

ملخص:

جميع الكائنات الحية من البكتيريا الى الإنسان يرتبط وجودها بمحفزات بيولوجية تدعى "الإنزيمات". الصناعة من بين الميادين الأولى التي عرفت و استغلّت هذه الإنزيمات لأنها تقوم بتسريع التفاعلات مما يجعل عمليات التحويل تنتهي في أسرع وقت ممكن و بمواد أولية أقل ثمن. عملنا هذا يهدف الى دراسة أحد هذه الإنزيمات الا و هي "الليباز". هذه الإنزيمات تنتشر بشكل واسع في الطبيعة نجدها عند بعض الكائنات المجهرية ,خاصة على شكل بروتينات خارج خلوية في المملكة النباتية ، عند الفقاريات و اللافقاريات ، و مهما كانت طريقة تثبيت الليباز "الدمج, الادمصاص, أو بواسطة الروابط التكافؤية " فهي تعطى الاستقرار الجيد مما يسمح بإعادة استعمالها مرة أخرى .هذه الإنزيمات لها دور كبير في مختلف الصناعات ، و بالأخص الصناعات الغذائية.